

Untersuchungen zur Beteiligung Aktin-assoziiierter Proteine an intrazellulären Signalwegen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Susanne Vetterkind

aus

Bremen

Bonn (August) 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: PD Dr. Ute Preuß

2. Referent: Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann

Tag der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN	VI
ABKÜRZUNGEN FÜR AMINOSÄUREN	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 DAS AKTIN-ZYTOSKELETT	1
1.1.1 AUFBAU DES AKTIN-ZYTOSKELETTS	1
1.1.2 AKTIN-BINDEnde PROTEINE REGULIEREN DIE POLYMERISATION UND DEPOLYMERISATION	3
1.1.3 NEUBILDUNG UND VERZWEIGUNG VON AKTIN-FILAMENTEN	5
1.1.4 RHO-GTPASEN KOORDINIEREN DIE ZYTOSKELETT-DYNAMIK	6
1.1.5 DAS ZYTOSKELETT ALS SENSOR FÜR DIE INTEGRITÄT DER ZELLE	7
1.2 DIE APOPTOSE, EINE FORM DES PROGRAMMIERTEN ZELLTODS	8
1.2.1 ALLGEMEINE BEDEUTUNG DER APOPTOSE	8
1.2.2 ABLAUF DER APOPTOSE	8
1.2.3 REZEPTOR-VERMITTELTE APOPTOSE	9
1.2.4 INTRINSISCHE APOPTOSE	9
1.2.5 ZYTOSKELETT UND APOPTOSE	11
1.3 UNTERSUCHUNG ZWEIER AKTIN-ASSOZIIERTER PROTEINE	12
1.3.1 WIP	12
1.3.2 PAR-4	12
1.3.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	14
2. MATERIAL	15
2.1 CHEMIKALIEN	15
2.2 KITS	15
2.3 ALLGEMEINE STAMMLÖSUNGEN UND PUFFER	15
2.4 KULTUR VON BAKTERIEN	16
2.4.1 BAKTERIENSTÄMME	16
2.4.2 MEDIEN	17
2.5 KULTUR VON SÄUGERZELLEN	17
2.5.1 ZELLINIEN	17

INHALTSVERZEICHNIS	II
2.5.2 ZELLKULTUR-MEDIEN	18
2. 6 PLASMIDE	19
2. 7 OLIGONUKLEOTIDE	20
2. 8 ANTIKÖRPER	21
3. METHODEN	22
3.1 ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	22
3.1.1 PRÄPARATION VON NUKLEINSÄUREN	22
3.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli nach Birnboim und Doly	22
3.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli durch Affinitätschromatographie	22
3.1.1.3 Präparation von RNA aus Zellkulturen	23
3.1.2 ENZYMATISCHE BEHANDLUNG VON DNA	23
3.1.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	23
3.1.2.2 Dephosphorylierung von DNA	23
3.1.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten	24
3.1.3 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	24
3.1.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien	24
3.1.3.2 Transformation	24
3.1.4 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA	25
3.1.5 REINIGUNG, KONZENTRIERUNG UND MENGENBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	25
3.1.5.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	25
3.1.5.2 Fällung von Nukleinsäuren	25
3.1.5.3 Konzentrations- und Reinheitsgradbestimmung von Nukleinsäuren	25
3.1.6 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	26
3.1.7 UMSCHREIBEN VON RNA IN CDNA UND RT-PCR	26
3.1.8 NORTHERN BLOT-HYBRIDISIERUNG	27
3.2 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	28
3.2.1 PRÄPARATION VON ZELLEXTRAKTEN	28
3.2.1.1 Gesamtprotein-Zellextrakte	28
3.2.1.2 Fraktionierung in Triton X-lösliche und -unlösliche Zellextrakte	29
3.2.1.3 Proteinbestimmung nach Bradford	29
3.2.2 <i>IN VITRO</i> -TRANSKRIPTION/TRANSLATION	29
3.2.3 <i>IN VITRO</i> -FILAMENT-BINDUNG	30
3.2.4 IMMUNPRÄZIPITATION	30
3.2.5 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON PROTEINEN	31
3.2.5.1 Vorbereitung der Proben	31

3.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
3.2.5.3 Fluorographie	32
3.2.6 WESTERN BLOT-ANALYSEN	32
3.2.6.1 Western Blot	32
3.2.6.2 Immunfärbung	33
3.2.6.3 Regeneration von Western Blots	33
3.3 ZELLKULTUR-METHODEN	33
3.3.1 KULTUR VON SÄUGERZELLEN	33
3.3.2 TRANSIENTE TRANSFEKTION VON SÄUGERZELLEN	34
3.3.3 HERSTELLUNG STABIL TRANSFIZIERTER ZELLINIEN	34
3.3.4 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON SÄUGERZELLEN	34
3.3.5 FLUORESZENZMIKROSKOPIE VON SÄUGERZELLEN	35
3.3.5.1 Ausplattieren von Säugerzellen für die Fluoreszenzmikroskopie	35
3.3.5.2 Triton X-Extraktion für fluoreszenzmikroskopische Analysen	35
3.3.5.3 Fixieren von Säugerzellen für die Fluoreszenzmikroskopie	35
3.3.5.4 Immunfluoreszenzfärbung	35
3.3.5.5 Kernfärbung mit DAPI	36
3.3.5.6 Aktin-Färbung mit Phalloidin	36
3.3.5.7 Einbetten von fixierten Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie	36
3.4 ISOLIERUNG EINES GENES AUS EINER CDNA-BIBLIOTHEK	37
3.4.1 PHAGEN-INFESTION	37
3.4.2 HERSTELLUNG DER REPLIKA-FILTER	37
3.4.3 HYBRIDISIERUNG DER REPLIKA-FILTER UND ISOLIERUNG POSITIVER PHAGENKLONE	38
3.4.4 <i>IN VIVO</i> -EXZISION DER PHAGEMIDE	38
3.5 METHODEN ZUM NACHWEIS DER APOPTOSE	39
3.5.1 BESTIMMUNG DER APOPTOSERATE ANHAND MORPHOLOGISCHER MERKMALE	39
3.5.2 NACHWEIS DER APOPTOTISCHEN DNA-FRAGMENTIERUNG	39
3.5.3 NACHWEIS DER PARP-SPALTUNG	40
4. ERGEBNISSE	41
<hr/>	
4.1 UNTERSUCHUNGEN AM WASP-INTERAGIERENDEN PROTEIN, WIP	41
4.1.1 ISOLIERUNG UND KLONIERUNG VON WIP	41
4.1.1.1 Isolierung einer neuen cDNA durch Plaque-Hybridisierung	41
4.1.1.2 Identifizierung der neuen cDNA als Ratten-Ortholog des humanen WIP	42
4.1.1.3 Klonierung von WIP	42
4.1.2 CHARAKTERISIERUNG VON WIP	43

4.1.2.1 Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener WIP-Orthologe	43
4.1.2.2 In vitro-Transkription/Translation von WIP	44
4.1.2.3 Expressionsstudie von WIP auf RNA-Ebene	45
4.1.2.4 Nachweis verschiedener Spleißformen von WIP	46
4.1.2.5 Expression von WIP in Säugerzellen	49
4.1.2.6 Triton X-Extraktion von WIP	51
4.1.3 WIP UND N-WASP INTERAGIEREN <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i>	52
4.1.3.1 Nachweis der Interaktion von WIP und N-WASP	52
4.1.3.2 Koexpression von WIP und N-WASP in Säugerzellen	55
4.2 UNTERSUCHUNGEN AN DEM PRO-APOPTOTISCHEN PROTEIN PAR-4	61
4.2.1 PAR-4-EXPRESSION IM ZELLKULTURMODELL	61
4.2.1.1 Herstellung von stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien	61
4.2.1.2 Verringerung der Apoptose-Induktion in stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien	62
4.2.3 ENDOGENE UND EKTOPISCHE EXPRESSION VON PAR-4 IN GEHIRNTUMORZELLINIEN	66
4.2.3.1 Endogene Par-4-Expression in Gehirntumorzelllinien	66
4.2.3.2 Induktion von Apoptose in verschiedenen Gehirntumorzelllinien durch ektopische Expression von Par-4	69
4.2.4 UNTERSUCHUNG DER SIGNALWEGE DER PAR-4-INDUZIERTEN APOPTOSE	70
4.2.4.1 Bcl-2-Expressionsniveau in verschiedenen Gehirntumorzelllinien	70
4.2.4.2 Einfluß von Par-4 auf die Bcl-2-Expression	71
4.2.4.3 PKC ζ -Expression und Aktivierung in verschiedenen Gehirntumorzelllinien	72
4.2.5 CHARAKTERISIERUNG DER AKTIN-ASSOZIATION VON PAR-4	74
4.2.5.1 Immunfluoreszenz-Analyse der subzellulären Lokalisation von Par-4	74
4.2.5.2 Triton X-100-Extraktion von Par-4-exprimierenden Zellen	77
4.2.5.3 Nachweis der Interaktion von Par-4 und Aktin durch einen In vitro-Filament-Bindungsversuch	77
4.2.5.4 Klonierung von Par-4-Deletionsmutanten	78
4.2.5.4 Untersuchung der Zytoskelett-Assoziation von Par-4-Deletionsmutanten	79
4.2.5.5 Untersuchung der Triton X-100-Löslichkeit von Par-4-Deletionsmutanten	81
4.2.5.6 pH-Abhängigkeit der Zytoskelett-Assoziation von Par-4	82
4.2.6 BEDEUTUNG DER ZYTOSKELETT-BINDUNG FÜR DIE APOPTOTISCHE FUNKTION VON PAR-4	83
4.2.6.1 Induktion von Apoptose durch verschiedene Par-4-Deletionsmutanten	83
4.2.6.2 Inhibition der Par-4-induzierten Apoptose durch Cytochalasin D-Behandlung	84

5. DISKUSSION	86
5.1 WIP FÖRDERT DIE N-WASP-VERMITTELTE AKTIN-POLYMERISATION	86
5.1.1 WIP IST EIN MODULAR AUFGEBAUTES PROTEIN	86
5.1.2 WIP IST EIN AKTIN-BINDENDES PROTEIN	87
5.1.3 DIE KOEXPRESSION VON WIP UND N-WASP FÜHRT ZUR AKTIN-REORGANISATION	89
5.2 DAS AKTIN-ZYTOSKELETT IST EIN EFFEKTOR DER PAR-4-VERMITTELTEN APOPTOSE	92
5.2.1 DIE STABILE EXPRESSION VON PAR-4 FÜHRT ZUR SELEKTION VON ZELLINIEN, DIE APOPTOSEDEFEKTE AUFWEISEN	93
5.2.2 VERRINGERTE EXPRESSION VON ENDOGENEM PAR-4 IN GEHIRNTUMORZELLINIEN	95
5.2.3 EKTOPISCHE PAR-4-EXPRESSION INDUZIERT APOPTOSE IN GEHIRNTUMORZELLINIEN	96
5.2.4 BEDEUTUNG DER AKTIN-BINDUNG FÜR DIE PRO-APOPTOTISCHE FUNKTION VON PAR-4	98
5.3 AUSBLICK	102
6. ZUSAMMENFASSUNG	103
7. LITERATURVERZEICHNIS	104
ANHANG A	115
CDNA-SEQUENZVERGLEICH DER WIP-ORTHOLOGE	115
ANHANG B	118
PROTEINSEQUENZ-VERGLEICH DER WIP-ORTHOLOGE	118

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Abk.verz.	Abkürzungsverzeichnis
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
C-	carboxy-
Ci	Curie
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i> , alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm
CytD	Cytochalasin D
d. h.	das heißt
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
dATP	2'-Desoxyriboadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxyribocytidin-5'-triphosphat
DD	<i>Death Domain</i> , Todesdomäne
DTE	Dithioerythritol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
et al.	et alteri
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s); Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>

GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphat-?
h	Stunde
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
K	Kalium
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LT	<i>Large T-Antigen</i> , großes T-Antigen von SV40
LZ	Leucin-Zipper
M	molar
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
µmol	Mikromol
mCi	Millicurie
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
mod.	modifiziert
mol	Mol, Stoffmenge ($6,023 \times 10^{23}$)
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
N-	amino-
Na	Natrium
NEM	N-Ethylmaleinimid
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kernlokalisierungssignal
Noc	Nocodazol
NP-40	Nonidet P-40
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

PIPES	1,4-Piperazin-bis-ethansulfonsäure
PLP	Phosphat-Lysispuffer
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	mittlere Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
tRNA	Transfer-RNA
TX	Triton X-100
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
w/v	Masse pro Volumen
WB	Western Blot
Wdh.	Wiederholung(en)
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

Abkürzungen für Aminosäuren

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

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine WIP (WASP-interagierendes Protein) und Par-4 (*prostate apoptosis response 4*) untersucht, deren Gemeinsamkeit ihre Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett darstellt, die aber an der Regulation von ganz unterschiedlichen Prozessen in der Zelle beteiligt sind. Im ersten Teil der Einleitung wird das Aktin-Zytoskelett detaillierter beschrieben. Da es sich bei einem der untersuchten Proteine (Par-4) um ein pro-apoptotisches Protein handelt, wird im zweiten Teil der Einleitung näher auf die Apoptose eingegangen. Im dritten Teil der Einleitung werden dann die zu untersuchenden Proteine WIP und Par-4 vorgestellt.

1.1 Das Aktin-Zytoskelett

Das Zytoskelett ist ein System aus Proteinfilamenten, das nur in eukaryontischen Zellen zu finden ist. Anders als die Bezeichnung „Zytoskelett“ vermuten läßt, sind die Filamente des Zytoskeletts neben der Vermittlung mechanischer Stabilität vor allem an dynamischen Prozessen wie Zellteilung, Endozytose und Positionierung von Zellorganellen sowie an der Fortbewegung von Zellen (Motilität) beteiligt. Das Zytoskelett wird daher häufig auch als „Zellmuskulatur“ bezeichnet. Ermöglicht werden die vielseitigen Funktionen der zytoskelettären Filamente durch ihren Aufbau aus Protein-Monomeren sowie durch die komplexe Regulation des Auf- und Abbaus der Filamente. Es werden drei zytoskelettäre Filament-Systeme unterschieden, die Mikrotubuli, die Intermediärfilamente und das Aktin-Filament-System, von denen letzteres für die vorliegende Arbeit von besonderer Relevanz ist.

1.1.1 Aufbau des Aktin-Zytoskeletts

Das Aktin-Zytoskelett ist aus Aktinpolymeren sowie Aktin-assoziierten Proteinen wie z. B. Myosin oder Tropomyosin zusammengesetzt. Aktin ist ein Protein mit einer molekularen Masse von 43 kDa, das in Eukaryonten weit verbreitet ist. Es gibt verschiedene Isoformen des Aktin-Moleküls, die von einer Familie hochkonservierter Gene kodiert werden. Die α -Isoform des Aktin kommt hauptsächlich in Muskelzellen vor, während β - und γ -Aktin vorwiegend in Nicht-Muskelzellen auftreten. Aktin kann entweder in der Form des als G-Aktin bezeichneten globulären Monomers oder als filamentöses F-Aktin vorliegen, das aus einer Kette von G-Aktin-Untereinheiten besteht. Da die Monomere um etwas mehr als

180° gegeneinander versetzt sind, erscheint ein Aktin-Filament in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als zwei miteinander verdrehte „Perlschnüre“ (s. schematische Darstellung in Abb. 1 A). Aktin-Filamente sind mit einem Durchmesser von etwa 7 nm die dünnsten Filamente des Zytoskeletts; sie treten im Gegensatz zu Mikrotubuli jedoch oft in gebündelter Form auf, z. B. in Form von Spannungsfasern (den sogenannten *stress fibers*), die man bei adhärennten Zellkultur-Zellen beobachten kann (Abb. 1 B).

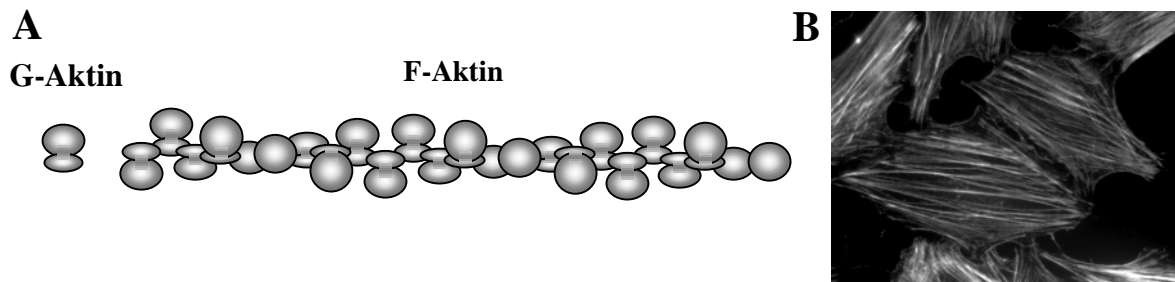


Abb. 1: Aktin-Filamente. (A) schematische Darstellung von monomerem G-Aktin und filamentösem F-Aktin. (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Fibroblasten, in denen das Aktin-Zytoskelett mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin angefärbt wurde. Die Aktin-Filamente sind in gebündelter Form als Spannungsfasern sichtbar.

Die Strukturierung von Aktin zu Spannungsfasern oder auch zu zwei- oder dreidimensionalen Netzwerken wird in der Zelle durch die Interaktion der Aktin-Filamente mit einer Vielzahl von Aktin-quervernetzenden Proteinen vermittelt (s. Abb. 2). Diese Proteine sind an der Regulation der Formenvielfalt, die Aktin-Filamente annehmen können, beteiligt. Das Protein Filamin z. B. kann Aktin-Filamente zu gelartigen raumfüllenden Strukturen vernetzen (Shizuta et al., 1976; Wang und Singer, 1977). Zu den Proteinen, die Aktin-Filamente zu Bündeln ordnen können, gehören z. B. Fimbrin (Bretscher und Weber, 1980a), α -Actinin (Maruyama und Ebashi, 1965), Villin (Bretscher und Weber, 1980b) und Fascin (Otto et al., 1979). Die Kombination solcher quervernetzenden Proteine bestimmt im wesentlichen die dreidimensionale Architektur des Mikrofilamentsystems und ist somit an der Ausbildung spezifischer Zellstrukturen beteiligt: Zellausläufer wie die Mikrovilli werden u. a. unter Beteiligung von Fimbrin und Villin ausgebildet, wohingegen die Aktin-Filamente in den Filopodien u. a. durch Fascin quervernetzt werden. In den Spannungsfasern, die entstehen, wenn Zellkultur-Zellen sich auf festem Substrat ausbreiten (s. Abb. 1 B), kann die parallele Bündelung des F-Aktins z. B. durch α -Actinin und Fascin vermittelt werden. Myosin, ein Motorprotein, das selbst zu Filamenten assoziieren kann, bildet zusammen mit Aktin das sogenannte Aktomyosin, das kontraktile Filamentsystem der Muskelzellen. Als mechanochemische ATPase ermöglicht Myosin, daß die Aktin- und Myosinfilamente aneinander vorbeigleiten können, wodurch die Kontraktilität des

Aktomyosins entsteht. Auch in Nicht-Muskelzellen ermöglicht Myosin in den Überlappungsbereichen der Spannungsfasern die Kontraktion des Aktin-Filamentsystems. So wird z. B. der kontraktile Ring, der während der Zytokinese durch Kontraktion zur Einschnürung und schließlich zur Teilung des Zellkörpers in zwei Tochterzellen führt, aus Aktin und Myosin gebildet.

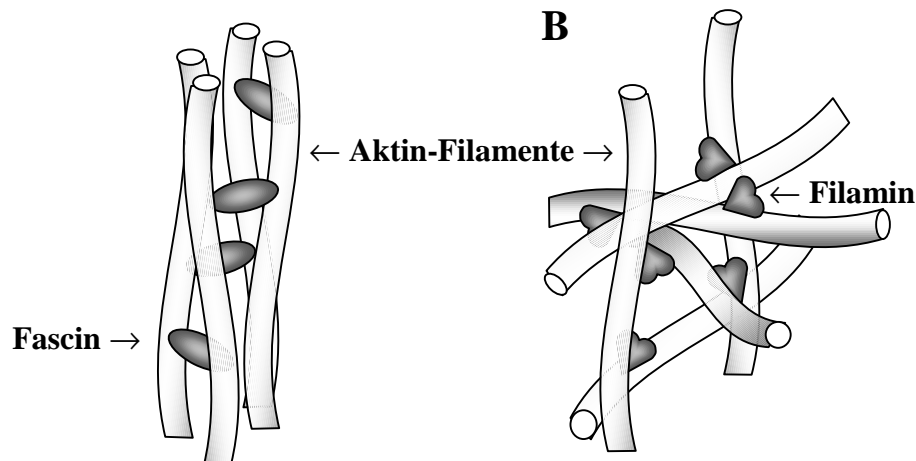


Abb. 2: Bündelung und Vernetzung von Aktin-Filamenten. (A) Fascin bündelt Aktin-Filamente zu Spannungsfasern. (B) Filamin verbindet Aktin-Filamente zu dreidimensionalen Netzwerken.

1.1.2 Aktin-bindende Proteine regulieren die Polymerisation und Depolymerisation

Die Aktin-Filamente sind keine starren Strukturen, sondern befinden sich in einem stetigen Auf- und Abbau, wodurch das Aktin-Zytoskelett einen hohen Grad an Flexibilität erreicht. Polymerisation und Depolymerisation der Filamente werden durch verschiedene Faktoren reguliert, z. B. durch die Art des an Aktin gebundenen Nukleotids. Ein Aktin-Molekül besitzt eine Bindungsstelle für ein Nukleotid (entweder ATP oder ADP) sowie eine intrinsische ATPase-Aktivität. Bei der Polymerisation zu Aktin-Filamenten lagern sich schrittweise Aktin-Monomere an die Enden eines bereits bestehenden Aktin-Filaments an. Aktin-Filamente weisen eine Polarität auf, d. h. sie polymerisieren bevorzugt in einer bestimmten Orientierung. Das Plus-Ende („*barbed end*“) wächst schnell durch die Assoziation neuer Aktin-Untereinheiten, das Minus-Ende („*pointed end*“) wächst langsamer und wird daher durch Netto-Depolymerisation abgebaut. Aufgrund der hohen ATP-Konzentration in der Zelle sind die freien Aktin-Moleküle mit ATP beladen, wenn sie an das Plus-Ende des Aktin-Filaments binden. Nach dem Einbau in das Aktin-Filament wird durch die intrinsische ATPase-Aktivität des Aktin das ATP zu ADP hydrolysiert, so daß die am Minus-Ende dissoziierenden Aktin-Moleküle nur gebundenes ADP enthalten. In der Zelle liegt die Konzentration an G-Aktin über der kritischen Konzentration für die Assoziation an ATP-beladene Aktin-Moleküle, jedoch unterhalb der kritischen

Konzentration, die für die Assoziation an ADP-beladene Aktin-Moleküle benötigt wird. Die Assoziation von Aktin-Monomeren an ein bestehendes Filament erfolgt daher bevorzugt am Plus-Ende, an dem die Aktin-Moleküle ATP enthalten. Wenn die Wachstumsrate des Filaments am Plus-Ende der Dissoziationsrate am Minus-Ende entspricht, tritt ein sogenannter „Tretmühlen-Effekt“ („*treadmilling*“) auf, d. h. das Aktin-Filament kann seine Lage in der Zelle verändern, ohne daß ein Netto-Wachstum des Filaments stattfindet.

Die Hydrolyse des ATP wird für die Aktin-Polymerisation selbst nicht benötigt; vielmehr wird die Polymerisation durch Aktin-bindende Proteine reguliert, so z. B. durch die sogenannten „Capping-Proteine“, die an die Enden der Aktin-Filamente binden. Sobald ein Capping-Protein an das Minus-Ende gebunden ist, wird das Filament durch Blockierung der Depolymerisation stabilisiert, wohingegen die Bindung eines Capping-Proteins an das Plus-Ende eines Filaments die Polymerisation inhibiert, was aufgrund der fortschreitenden Dissoziation von Aktin-Molekülen am Minus-Ende zur Destabilisierung des Filaments führt. Ein Beispiel für ein solches Capping-Protein ist Gelsolin, das an die Plus-Enden von Aktin-Filamenten bindet und somit die weitere Polymerisation inhibiert, was letztendlich zur Depolymerisation der Aktin-Filamente führt. Desweiteren bindet Gelsolin aber auch entlang von Aktin-Filamenten und kann dabei Filamentbrüche herbeiführen (Yin et al., 1981). Ein Gegenspieler von Gelsolin ist das Protein Tropomyosin, das sich helikal an F-Aktin anlagert und so das Filamentsystem vor dem Angriff durch Gelsolin schützt (Fattoum et al., 1983).

Viele Aktin-bindende Proteine regulieren auch die Dynamik von Aktin-Filamenten, indem sie an G-Aktin binden, wie z. B. Thymosin- β 4 und Profilin. Thymosin- β 4 bindet freie Aktin-Monomere nach der Dissoziation von einem Filament und blockiert dadurch den Austausch des gebundenen ADP durch ATP sowie die Polymerisation (Safer et al., 1991; Goldschmidt-Clermont et al., 1992). Profilin dagegen, das ebenfalls an G-Aktin bindet, fördert die Aktin-Polymerisation, indem es eine Konformationsänderung des Aktin-Moleküls induziert, wodurch der Austausch von ADP gegen ATP ermöglicht wird (Goldschmidt-Clermont et al., 1992). Das ATP-beladene Aktin-Monomer steht dann wieder für die Assoziation an ein Aktin-Filament zur Verfügung. Profilin-Aktin Komplexe binden darüber hinaus auch an das Plus-Ende von Aktin-Filamenten, wodurch ebenfalls die Polymerisation gefördert wird (Tilney et al., 1983; Pollard und Cooper, 1984; Pring et al., 1992; Bubb et al., 2003).

Ein Protein, das in pH-abhängiger Weise sowohl an G-Aktin als auch an F-Aktin binden kann, ist Cofilin. Bei alkalischen pH-Werten bindet dieses Protein Aktin-Monomere, in neutralem oder saurem Milieu ist es mit filamentösem Aktin assoziiert. Weiterhin beobachtet man bei alkalischen pH-Bedingungen eine stärkere Cofilin-stimulierte Depolymerisation der Aktin-Filamente als bei sauren pH-Bedingungen (Nishida et al., 1984; Yonezawa et al., 1985).

1.1.3 Neubildung und Verzweigung von Aktin-Filamenten

Die Fortbewegung von Zellen (Migration) auf einer Matrix erfolgt aufgrund von Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts, insbesondere durch Neubildung von Filamenten und Kontraktion vorhandener Filamente, sowie durch stetige Neubildung und Entfernung von Anhaftungspunkten (Fokalkontakten) der Zelle auf der Matrix. Die Propulsion von Zellausläufern wie z. B. den Mikrovilli, den Filopodien oder des Leitsaums (Lamellipodium), ein sich in Kriechrichtung der Zelle voranschiebender Zellfortsatz, wird durch Polymerisation von Aktin-Filamenten erreicht, die zu Fasern gebündelt und mit dem Plus-Ende zur Zellperipherie orientiert sind. An welcher Seite der Zelle sich aus den Filopodien der Leitsaum bildet, hängt wahrscheinlich von der Aktivierung der Proteine ab, die an der Neubildung von Aktin-Filamenten (Nukleation) beteiligt sind. Für die Aktin-Filament-Neubildung ist zunächst der Zusammenbau von drei Aktin-Monomeren erforderlich, wobei dieser Komplex dann als Nukleationskeim für die Assoziation weiterer Aktin-Monomere dient. Die Bildung des Nukleationskeims ist jedoch in der Zelle eine thermodynamisch ungünstige Reaktion (Cooper et al., 1983), so daß die Aktin-Nukleation durch Proteine katalysiert werden muß, die als Aktin-Nukleationsfaktoren bezeichnet werden und die gleichzeitig eine gezielte Regulation der Aktin-Nukleation ermöglichen. Von den verschiedenen Aktin-Nukleationsfaktoren soll hier beispielhaft der *actin-related protein* (Arp) 2/3-Komplex erwähnt werden. Es handelt sich dabei um einen Proteinkomplex aus sieben Proteinen, von denen drei (Arp2, Arp3 und p20-Arc) zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert sind, während die übrigen vier Proteine (p41-, p34-, p21- und p16-Arc) weniger stark konserviert sind. Die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes erfolgt durch Proteine der WASP-(Wiskott-Aldrich-Syndrome Protein)-Familie, darunter das in blutbildenden Zellen exprimierte Protein WASP (Derry et al., 1994; Symons et al., 1996) und das neuronale WASP (N-WASP; (Miki et al., 1996; Miki et al., 1998), das ursprünglich im Gehirn gefunden wurde, aber ubiquitär exprimiert wird. Das Protein N-WASP stellt bei der Aktin-Nukleation wahrscheinlich ein Gerüst-Protein

(*scaffold*) dar, das die für die Nukleation notwendigen Proteine rekrutiert und aktiviert (Rohatgi et al., 1999; Snapper und Rosen, 1999). N-WASP besitzt Bindungsstellen sowohl für G-Aktin also auch für Profilin, und darüber hinaus auch für die Proteine des Arp2/3-Komplexes. Durch die Bindung an N-WASP erfährt der Arp2/3-Komplex wahrscheinlich eine Konformationsänderung, durch welche die beiden Aktin-ähnlichen Proteine Arp2 und Arp3 in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, so daß sie einem Aktin-Dimer ähneln. An diesen aktivierten Arp2/3-Komplex können dann Aktin-Monomere assoziieren, so daß ein Aktin-Filament entsteht. Die Filamentbildung wird durch N-WASP weiterhin dadurch unterstützt, indem durch die N-WASP-vermittelte Bindung von G-Aktin und Profilin polymerisationsfähige Aktin-Monomere zur Verfügung stehen. Während der Elongation verbleibt der Arp2/3-Komplex am Minus-Ende des Filaments. Die Neubildung von Aktin-Filamenten durch den Arp2/3-Komplex und N-WASP geht häufig seitlich von existierenden Aktin-Filamenten aus, so daß eine Verzweigung des Filaments entsteht. In diesem Fall bindet der Arp2/3-Komplex an der Seite eines Aktin-Filaments, wo dann durch Bindung von Aktin-Monomeren an den Arp2/3-Komplex das neue Filament entsteht. Der Arp2/3-Komplex bleibt in diesem Fall an der Verzweigungsstelle gebunden (Suetsugu et al., 2001).

1.1.4 Rho-GTPasen koordinieren die Zytoskelett-Dynamik

Die Organisation und Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts erfolgt als Reaktion auf äußere Signale, wie z. B. Lockstoffe (Chemokine). Auf molekularer Ebene führt die Bindung extrazellulärer Liganden an ihre membranständigen Rezeptoren (z. B. Rezeptor-Tyrosinkinase) zur Aktivierung von G-Proteinen. Bei der Übertragung von Signalen zum Zytoskelett sind diese G-Proteine meist Mitglieder der Rho-GTPase-Familie (Hall, 1992). Die bekanntesten Vertreter dieser Proteinfamilie sind die GTPasen Rho, Rac und Cdc42. Im aktivierten Zustand sind die Rho-GTPasen mit GTP beladen, das durch ihre intrinsische GTPase-Aktivität zu GDP hydrolysiert wird, wodurch das Protein in einen inaktiven Zustand zurückfällt. Die Aktivierung der GTPasen erfolgt durch den Austausch des GDP gegen ein GTP, was durch einen Guanyl-Nukleotid-Austausch-Faktor beschleunigt werden kann. GTPase-aktivierende Proteine können durch Erhöhung der GTPase-Aktivität die Rückkehr der Rho-GTPasen in den inaktiven Zustand fördern (Takai et al., 1993).

Die genauen Signalwege, die von den Rho-GTPasen zum Zytoskelett führen, sind bisher nur teilweise aufgeklärt. Im Fall von Cdc42 ist bereits gezeigt worden, daß die aktivierte Form des Proteins an die GTPase-Bindungsdomäne (GBD) von WASP bzw. N-WASP

bindet, wodurch die Proteine durch eine Konformationsänderung aktiviert werden, was letztendlich zur Aktin-Nukleation und -Polymerisation und -im Fall von N-WASP- zur Ausbildung von Filopodien führt (Miki et al., 1998; Rohatgi et al., 1999). Die Aktivierung von Rac führt über einen ähnlichen Signaltransduktionsweg zur Ausprägung von Lamellipodien (Kotani et al., 1995; Carpenter et al., 1997). Die GTPase Rho stimuliert in aktivierter Form die Bildung von Spannungsfasern und Fokalkontakten. Dabei erfolgt die Signalweiterleitung von der GTPase Rho über die Rho-Kinase (ROCK) auf die LIM-Kinase 1 (LIMK1), die ein Substrat der Rho-Kinase darstellt (Maekawa et al., 1999). Die durch Phosphorylierung aktivierte LIMK1 phosphoryliert wiederum ihr Substrat Cofilin, das durch die Phosphorylierung inhibiert wird (Moriyama et al., 1996; Yang et al., 1998). Da Cofilin ein Antagonist der Aktin-Polymerisation ist, führt die Inaktivierung des Proteins zur vermehrten Aktin-Polymerisation und damit zu einer herabgesetzten Aktin-Dynamik.

Wie ihre zum Teil entgegengesetzten Effekte vermuten lassen, können sich die Rho-GTPasen auch gegenseitig regulieren. So kann z. B. die Aktivierung von Rho durch Rac gehemmt werden; andererseits kann aber auch abhängig vom Zelltyp eine sequenzielle Aktivierung der GTPasen von Cdc42 ausgehend über Rac und Rho stattfinden (Nobes und Hall, 1995; Leeuwen et al., 1997).

1.1.5 Das Zytoskelett als Sensor für die Integrität der Zelle

Eine Reihe aktueller Publikationen (Rubtsova et al., 1998; Suria et al., 1999; Yamazaki et al., 2000; White et al., 2001; Kim et al., 2002; Kulms et al., 2002) bietet Hinweise darauf, daß das Zytoskelett nicht nur das Ziel von Signalwegen ist, die zu seiner Reorganisation führen, sondern vielmehr auch als Sensor für den allgemeinen Zustand der Zelle dienen kann. So können z. B. Signale, die Informationen über den Adhäsionsstatus der Zelle oder über die Integrität des Zytoskeletts enthalten, von den Protein-Komponenten des Zytoskeletts wahrgenommen und weitergeleitet werden. Bei Schäden der Zelle wie z. B. irreversibler Zerstörung des Zytoskeletts oder Ablösung vom Substrat wird dann die Apoptose eingeleitet.

1.2 Die Apoptose, eine Form des programmierten Zelltods

1.2.1 Allgemeine Bedeutung der Apoptose

In mehrzelligen Organismen ist die Koordination von Zellteilung und Zelltod die Voraussetzung für die Gewebehomöostase. Ermöglicht wird die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen der Vermehrung und der Eliminierung von Zellen durch die genetische Kontrolle sowie die Koordination beider Prozesse. Daher sind viele intrazelluläre Regulationsmechanismen, die für die Regulation der Zellteilung wichtig sind, gleichzeitig mit Signalwegen verknüpft, die zum Zelltod führen können (McCarthy et al., 2001; Chau und Wang, 2003).

Eine Form des physiologischen und genetisch kontrollierten („programmierten“) Zelltods, die Apoptose, ist an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, die mit der Entfernung nicht (mehr) benötigter Zellen verbunden sind. So erfolgt z. B. die Rückbildung der Interdigitalfalten während der Embryonalentwicklung des Menschen durch Apoptose, ebenso wie die Entfernung nicht mehr benötigter Immunzellen nach einer überstandenen Infektion. Apoptose ist aber auch für die Elimination von Zellen notwendig, die zu einer Gefahr für den gesamten Organismus werden können. Beispielsweise induziert die Freisetzung von Zytokinen der T-Zellen des Immunsystems den programmierten Zelltod von autoreaktiven Immunzellen, Virus-infizierten oder genetisch entarteten Zellen. Deregulierte Apoptose kann zu einer Vielzahl von pathologischen Zuständen führen, darunter körperliche Mißbildungen, erhöhte Infektanfälligkeit, Autoimmunkrankheiten, neurodegenerative Erkrankungen und Krebs.

1.2.2 Ablauf der Apoptose

Während der Apoptose werden zelluläre Strukturen, einschließlich Kern und Zytoskelett, durch Apoptose-spezifische Proteasen (den sogenannten Caspasen) und spezifische Nukleasen abgebaut (Salvesen, 2002; Nagata et al., 2003). Die sterbende Zelle schnürt kleine Vesikel ab, die von den benachbarten Zellen und von Makrophagen durch Phagozytose aufgenommen werden, ohne daß es zur Freisetzung von Zellbestandteilen in das Interstitium kommt. In diesem Punkt unterscheidet sich die Apoptose grundsätzlich von der Nekrose, bei der die Zellen lysieren und ihre Bestandteile in den Zellzwischenraum entlassen, so daß es zu Entzündungsreaktionen kommen kann.

1.2.3 Rezeptor-vermittelte Apoptose

Die Aktivierung der Caspasen und der apoptotischen Nukleasen kann durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst werden. So kann eine Zelle durch Signale anderer Zellen (wie z. B. durch zytotoxische T-Zellen) zur Apoptose stimuliert werden. Da diese Signale durch membranständige Rezeptoren der Zielzellen vermittelt werden, spricht man in diesem Fall von Rezeptor-vermittelter Apoptose (Schulze-Osthoff et al., 1998; Schmitz et al., 2000). Ein schematischer Überblick der Rezeptor-vermittelten Apoptose ist in Abbildung 3 (oben) dargestellt. Die sogenannten „Todesrezeptoren“ gehören zur Superfamilie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptoren, deren bekannteste Vertreter TNF α -R und CD95/Fas sind. Wird ein Ligand wie TNF α oder der Fas-Ligand an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors gebunden, führt dies zu einer Trimerisierung und damit Aktivierung des Rezeptors. Ein Teil der zytoplasmatischen Domäne des aktivierten Rezeptors, die sogenannte Todesdomäne, rekrutiert ein Adapterprotein, z. B. FADD (*Fas-associated protein with death domain*), das wiederum an seine Todeseffektor-Domäne (*death effector domain*, DED) die Procaspase-8 rekrutieren kann, die anschließend durch Autoproteolyse aktiviert wird. Der Multiproteinkomplex aus Fas, FADD und Procaspase-8, der zur Aktivierung der Caspase-8 führt, wird im allgemeinen als „*death-inducing signaling complex*“ (DISC) bezeichnet. Die aktivierte Caspase-8, die eine sogenannte „Initiator-Caspase“ darstellt, kann weitere Caspasen, (z. B. Caspase-3, -6 und -7) proteolytisch aktivieren und damit das apoptotische Signal verstärken. Diese sogenannten „Effektor-Caspasen“ spalten dann proteolytisch ihre spezifischen Substrate, z. B. Aktin oder Lamin, was letztendlich zum Zelltod führt.

1.2.4 Intrinsische Apoptose

Wird die Apoptose durch zelleigene Stimuli ausgelöst, die u. a. durch einen Mangel an Wachstumsfaktoren, Hypoxie oder starke DNA-Schädigung hervorgerufen werden, so sind meist die Mitochondrien die zentralen Vermittler der Apoptose (Granville und Gottlieb, 2002). Bei der durch die Mitochondrien vermittelten, sogenannten „intrinsischen“ Apoptose, die in Abbildung 3 (unten) schematisch dargestellt ist, spielen die Mitglieder der Bcl-2-Familie eine wichtige Rolle. Die pro-apoptotischen Mitglieder der Familie, darunter Bax und Bid, können in der äußeren Mitochondrienmembran kanalähnliche Strukturen bilden, die die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ermöglichen, wohingegen die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie z. B. Bcl-2 und Bcl-X_L, die Freisetzung von Cytochrom c blockieren. Das in das Zytoplasma freigesetzte

Cytochrom c bindet an den Apoptose-Protease-aktivierenden Faktor 1 (Apaf1), wodurch eine Konformationsänderung erfolgt, die zur Oligomerisierung mehrerer Apaf1-Moleküle führt. Dieser Komplex aus Apaf1 und Cytochrom c bindet die Procaspase-9, die daraufhin autoproteolytisch zur Caspase-9 aktiviert wird. Der Komplex aus Apaf1, Cytochrom c und Procaspase-9 wird als „Apoptosom“ bezeichnet. Die Caspase-9 ist wie die Caspase-8 eine Initiator-Caspase, die weitere Effektor-Caspasen aktivieren und dadurch das apoptotische Signal weiterleiten und verstärken kann.

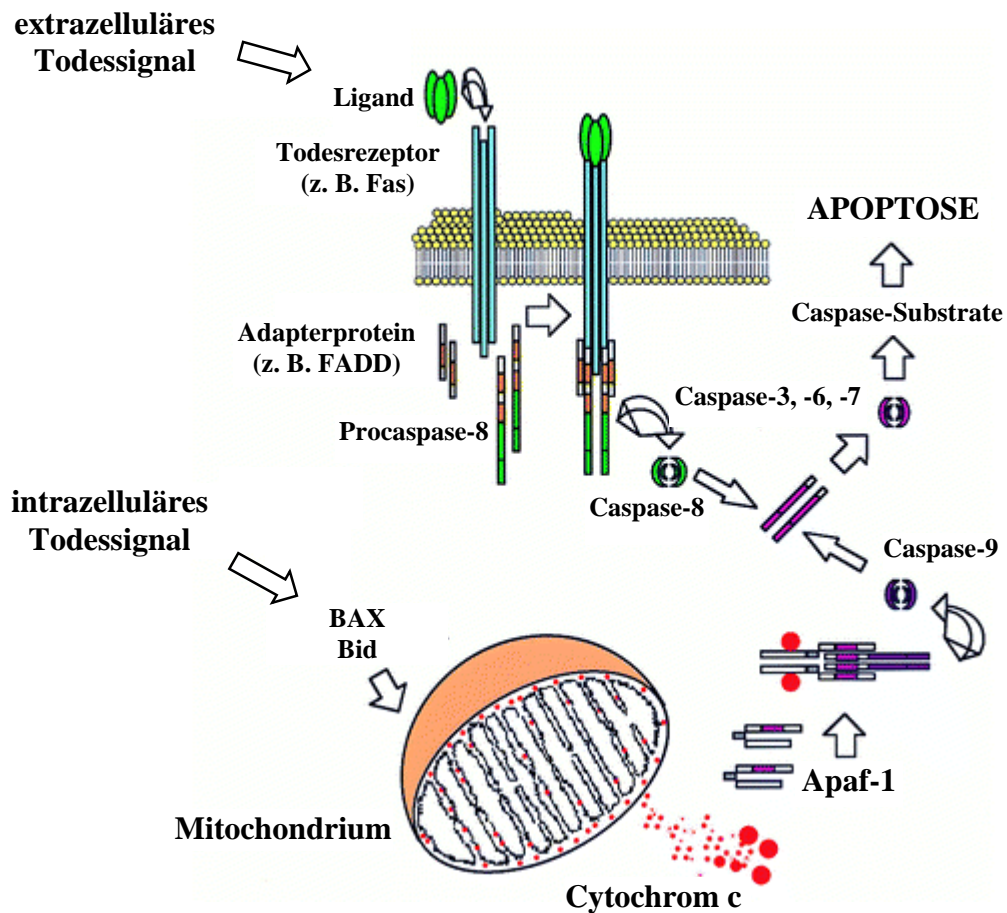


Abb. 3: Zwei unabhängige Wege der Apoptose-Induktion. Der erste Weg verläuft über die Aktivierung von Todesrezeptoren, die anschließend Adaptorproteine und Procaspasen binden. In diesem als „*death inducing signaling complex*“ (DISC) bezeichneten Komplex wird die Procaspase-8 zur aktiven Caspase-8 gespalten. Diese aktiviert die sogenannten Effektor-Caspasen (z. B. Caspase-3) durch proteolytische Spaltung. Der zweite Weg führt ausgehend von intrazellulären Todessignalen über pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, das dann an Apaf1 bindet. Mehrere Apaf1-Moleküle aggregieren daraufhin zu Oligomeren und rekrutieren Procaspase-9. Dieser Komplex wird als „Apoptosom“ bezeichnet. Die gegenseitige Aktivierung der komplexierten Procaspase-9-Moleküle führt zur Bildung der aktiven Form der Caspase-9, die daraufhin Effektorcaspasen aktivieren kann (entnommen aus Green, 1998).

1.2.5 Zytoskelett und Apoptose

Die Inhibition der Aktin-Dynamik führt in vielen Zelltypen zur Induktion von Apoptose. So kann z. B. die Stabilisierung von Aktin-Filamenten durch das Gift Jasplakinolide des Schwammes *Jaspis johnstoni* zur Auslösung des programmierten Zelltods führen (Posey und Bierer, 1999; White et al., 2001; Morley S.C. et al., 2003). Desweiteren liegen Berichte vor, denen zufolge die Inhibition der Aktin-Polymerisation durch Cytochalasin D zu einer Verringerung der Apoptose führen kann (Cotter et al., 1992; Levee et al., 1996; Suarez-Huerta et al., 2000; Ailenberg und Silverman, 2003). Die Cytochalasine bilden eine Klasse von antibiotischen Pilzmetaboliten, die an die Plus-Enden von Aktin-Filamenten binden und dadurch die Aktin-Polymerisation inhibieren. Da die Aktin-Filamente am Minus-Ende jedoch weiterhin abgebaut werden, führt die Behandlung mit Cytochalasin letztendlich zu einer Depolymerisation der Aktin-Filamente (Flanagan und Lin, 1980). Die Verringerung der Apoptose nach Cytochalasin-Behandlung läßt eine aktive Beteiligung des Aktin-Filamentsystems an apoptotischen Signalwegen vermuten. Auf der anderen Seite kann die irreversible Schädigung des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin die Apoptose herbeiführen (Rubtsova et al., 1998; Yamazaki et al., 2000; White et al., 2001).

Die Signalwege, die der zytoskelett-vermittelten Apoptose-Induktion zugrunde liegen, sind bislang weitgehend unklar. Zu den wenigen bisher aufgeklärten Mechanismen gehört der durch das Protein Bmf (*Bcl-2 modifying factor*) vermittelte Signalweg. Dieses Protein bindet an die leichte Kette 2 des Motorproteins Dynein, einem Bestandteil des Myosin V-Motorkomplexes des Aktin-Filamentsystems. Durch Auflösung des Aktin-Zytoskeletts oder durch Ablösung der Zelle von ihrem Substrat wird Bmf aus seiner Zytoskelett-Assoziation freigesetzt und interagiert dann mit dem Protein Bcl-2, einem anti-apoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie. Durch diese Interaktion wird die anti-apoptotische Funktion von Bcl-2 ausgeschaltet, und es kommt zur Induktion des Zelltods, der über die Mitochondrien vermittelt wird (Puthalakath et al., 2001). Möglicherweise kann die Induktion der Apoptose auch durch zytoskelett-vermittelte Aktivierung von sogenannten membranständigen „Todesrezeptoren“ erfolgen. Es konnte bereits gezeigt werden, daß durch die Behandlung von Zellen mit Cytochalasin die Aktivierung des Todesrezeptors Fas verstärkt werden kann. Es handelt sich dabei um das erste Beispiel für eine intrazelluläre Aktivierung des Fas-Rezeptors (Kulms et al., 2002).

1.3 Untersuchung zweier Aktin-assoziiierter Proteine

1.3.1 WIP

Das humane Protein WIP (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP)-interagierendes Protein) wurde auf der Suche nach Interaktionspartnern des Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP) in einer Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse gefunden (Ramesh et al., 1997). Das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) ist eine X-chromosomal rezessiv vererbliche Erkrankung, die zu Störungen in der Blutgerinnung und in der Immunabwehr führt. Erst vor wenigen Jahren ist das verantwortliche Gen identifiziert worden (Derry et al., 1994). Es kodiert für ein Protein von 65 kDa, das als WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein) bezeichnet wird. WASP wird nur in blutbildenden Zellen exprimiert und ist wie sein ubiquitär exprimiertes Ortholog N-WASP (Miki et al., 1996) an der Aktin-Nukleation und -Polymerisation beteiligt. Bisher sind in WAS-Patienten über 100 verschiedene Mutationen des WASP-Gens charakterisiert worden, die zu unterschiedlich starken Ausprägungen der Krankheit führen. Erst durch die Identifizierung und Charakterisierung von WASP konnte gezeigt werden, daß der Großteil der Krankheitserscheinungen der WAS-Patienten auf eine fehlerhafte Aktin-Polymerisation in den blutbildenden Zellen zurückzuführen ist (Thrasher et al., 2000). Betroffen sind dabei zytoskelett-abhängige Funktionen der Immunzellen wie z. B. die Formänderung aktivierter B-Zellen oder die Phagozytose durch die Makrophagen (Westerberg et al., 2001; Leverrier et al., 2001).

Die seit der Isolierung von WIP veröffentlichten Untersuchungen zeigten, daß WIP gemeinsam mit N-WASP an der Bildung von Filopodien beteiligt ist. Welche Rolle WIP bei diesem Prozeß spielt, konnte allerdings aufgrund kontroverser Ergebnisse noch nicht geklärt werden, da zum Teil von Aktivierung der Aktin-Polymerisation durch WIP berichtet wurde (Ramesh et al., 1997; Anton et al., 2003), andererseits aber auch ein hemmender Einfluß von WIP auf die Aktin-Polymerisation gezeigt wurde (Martinez-Quiles et al., 2001).

1.3.2 Par-4

Das Par-4-(*prostate apoptosis response-4*)-Gen wurde ursprünglich bei der Suche nach Genen gefunden, die während der Induktion von Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen hochreguliert werden (Sells et al., 1994). Das Par-4-Protein der Ratte umfaßt 332 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von 38 kDa. Obwohl Par-4 zwei Kernlokalisationssequenzen besitzt, zeigt es in den meisten Zelltypen und Geweben eine

zytoplasmatische Verteilung (Boghaert et al., 1997; Sells et al., 1997; Guo et al., 1998). Am C-Terminus des Proteins befindet sich eine potentielle Todesdomäne, wie sie in proapoptischen Proteinen wie Fas oder FADD anzutreffen ist (Rangnekar, 1998). Par-4 besitzt außerdem innerhalb dieser Todesdomäne einen potentiellen Leucin-Zipper, über den es mit seinen Interaktionspartnern in Wechselwirkung treten könnte (Johnstone et al., 1996; Diaz-Meco et al., 1996; Page et al., 1999; Roussigne et al., 2003). Da die Strukturen von Todesdomäne und Leucin-Zipper sich gegenseitig ausschließen, kann jedoch nur eine der Strukturen funktionell sein; ob es sich dabei um die Todesdomäne oder um den Leucin-Zipper handelt, ist bisher nicht geklärt.

Die Signalwege, die zur Auslösung der Apoptose durch Par-4 führen, sind noch weitgehend unklar. Am besten untersucht sind die Mechanismen, durch die Par-4 proliferationsfördernde und antiapoptische Signale unterdrückt. So wird z. B. die proliferationsfördernde Proteinkinase C ζ (PKC ζ), eine atypische Isoform der Proteinkinase C, durch die Interaktion mit Par-4 inhibiert (Diaz-Meco et al., 1996). Ein weiterer Interaktionspartner von Par-4 ist das Wilms-Tumor-Protein 1 (WT1), ein Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor, dessen proliferationshemmende Wirkung durch die Interaktion mit Par-4 verstärkt wird (Johnstone et al., 1996). Die Hemmung der Wachstumsstimulation ist jedoch wahrscheinlich nicht ausreichend, um Apoptose auszulösen. Tatsächlich führt die alleinige Expression von Par-4 in vielen Zelllinien nicht zur Apoptose, sondern sensibilisiert die Zellen lediglich für apoptotische Stimuli (Sells et al., 1997; Cook et al., 1999; Qiu et al., 1999; Camandola und Mattson, 2000; Bohrer et al., 2002). Ein weiterer Interaktionspartner von Par-4 ist die Serin/Threonin-Kinase Dlk (*DAP-like kinase*; Kögel et al., 1998), die ihren Namen aufgrund einer hohen Sequenzidentität zur DAP-Kinase (*Death Associated Protein Kinase*; Cohen et al., 1997) erhalten hat. Die Dlk und die DAP-Kinase bilden mit drei weiteren Vertretern eine neue Kinase-Subfamilie, die hohe Sequenzidentitäten in der Kinasedomäne aufweisen, während sie außerhalb der Kinase-Domäne völlig unterschiedlich sind. Alle Kinasen dieser Familie wurden mit der Regulation der Apoptose in Verbindung gebracht. Die Dlk ist ein Protein mit einer molekularen Masse von 52 kDa. Sie besitzt im Gegensatz zur DAP-Kinase keine Todesdomäne, sondern ein C-terminales Leucin-Zipper-Motiv. Die Kinase ist im Zellkern mit punktförmigen Strukturen (den sogenannten „speckles“) assoziiert. Während Par-4 und Dlk allein nach ektopischer Expression in Ratten-Fibroblasten-Zellen keine Apoptose auslösen, führt die gleichzeitige Expression von Par-4 und Dlk zur Relokalisation der

kernständigen Kinase an die Spannungsfasern des Zytoskeletts, wo sie mit Par-4 kolokalisiert. Gleichzeitig wird eine starke Kontraktion des Zytoskeletts beobachtet. Weiterhin führt die Koexpression von Par-4 und Dlk zur Induktion der Apoptose (Page et al., 1999). Die genauen Signalwege, die in diesem Fall zur Induktion des Zelltods führen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt.

1.3.3 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil sollte eine in einer Hefe-Zwei-Hybrid-Suche nach potentiellen Interaktionspartnern des großen T-Antigens von SV40 gefundene cDNA-Teilsequenz mittels Durchmusterung einer Ratten-Genbibliothek vervollständigt werden. Das vollständige Gen, das sich im Verlauf der vorliegenden Arbeit als das Ratten-Ortholog des humanen WIP herausstellte, sollte dann eingehender charakterisiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Signalwege, die der Par-4-vermittelten Apoptose zugrunde liegen, genauer zu untersucht. Zu diesem Zweck wurden einerseits stabile Par-4-exprimierende Zelllinien erzeugt und andererseits die Expression von Par-4 in verschiedenen Gehirntumorzelllinien untersucht. Desweiteren sollte die Kolokalisation von Par-4 mit zytoskelettären Strukturen eingehend analysiert und die Relevanz der Zytoskelett-Assoziation von Par-4 für die pro-apoptotische Funktion des Proteins untersucht werden.

2. Material

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammten, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Biomol, Biozym, Roth, Fluka, La Roche, Invitrogen, Merck, Serva und Sigma. Enzyme wurden von den Firmen NEB, La Roche, Promega, Peqlab und Qiagen bezogen. Radiochemikalien ($[^{35}\text{S}]$ -Methionin, $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ dATP und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP) wurden von Amersham Buchler bezogen.

2.2 Kits

In dieser Arbeit wurden verschiedene kommerzielle Kits verwendet, die nachfolgend neben ihren Anwendungen und Herstellern angegeben sind.

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
JETSTAR Plasmid Purification Kit	Isolierung von Plasmid-DNA	Genomed
QIAquick Gel Extraction Kit	Gelextraktion von DNA	Qiagen
T7-Sequencing Kit	DNA-Sequenzierung	Amersham Pharmacia
Megaprime DNA Labelling Kit	Markierung von DNA-Sonden	Amersham Pharmacia
TNT [®] T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	<i>In vitro</i> Transkription / Translation	Promega

2.3 Allgemeine Stammlösungen und Puffer

Nachfolgend aufgeführte Puffer und Lösungen wurden für allgemeine Arbeiten verwendet.

<i>DNA-Ladepuffer (6×)</i>	
Xylenblau (Cyanol FF)	0,25 %
Glycerin	30 %
EDTA	105 mM
Na-Acetat	0,1 M
Tris-Eisessig, pH 7,9	0,2 M
<i>SSC (20×)</i>	
NaCl	3 M
Trinatriumcitrat	0,3 M
EDTA	60 mM
SDS	6 %

SM-Puffer

Tris-HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	100 mM
MgSO ₄	10 mM
Gelatine	0,05 %

PBS⁺ (pH 7,2)

Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
CaCl ₂	0,1 g
MgCl ₂	0,1 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

Phosphatlysispuffer (PLP)

NaPO ₄ pH 8,0	20 mM
NaCl	140 mM
MgCl ₂	3 mM
NP-40	0,5 %
DTT	1 mM
Leupeptin	50 μM
PMSF	1 mM

2. 4 Kultur von Bakterien**2.4.1 Bakterienstämme**

Die verschiedenen *Escherichia coli*-Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind nachfolgend unter Angabe von Genotyp und Referenz aufgeführt.

E. coli-Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	<i>F</i> , <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , ϕ 80d, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁻), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)
XL1 blue-MRF'	Δ (<i>mcrA</i>)183, Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q , Δ M15, Tn10 (Tet ^r)]	(Jerpseth et al., 1992)
XL0LR	Δ (<i>mcrA</i>)183, Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> , <i>lacI</i> _q , Δ M15, Tn10 (Tet ^r)], Su ⁻ , λ R	Stratagene

2.4.2 Medien

Für die Kultivierung von *E. coli*-Zellen wurden die unten aufgeführten Medien verwendet. Zur Herstellung von Agar-Platten wurde vor dem Autoklavieren 15 % Agar zugefügt. Top-Agar enthielt 0,7 % Agarose anstelle des Agars.

LB-Medium (pH 7,0)

NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

NZY-Medium (pH 7,5)

NaCl	5 g
MgSO ₄	2 g
Hefeextrakt	5 g
Caseinhydrolysat	10 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

DYT-Medium (pH 7,0)

NaCl	5 g
Hefeextrakt	10 g
Trypton	16 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

YB-Medium

KCl	10 mM
MgSO ₄	20 mM

in DYT-Medium

2. 5 Kultur von Säugerzellen

2.5.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden verschiedene Fibroblasten-Zelllinien sowie Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft kultiviert. Die Zelllinien sind nachfolgend unter Angabe ihrer histologischen Herkunft, ihres Transformationsstatus und ihrer Spezies aufgelistet.

Zelllinie	Histologische Herkunft	Transformationsstatus	Spezies
208F	Fibroblasten	nicht transformiert / immortal	Ratte
A172	Gliom	transformiert	Mensch
C6	Gliom	transformiert	Ratte
CHO	Ovar	nicht transformiert / immortal	Hamster
COS-7	Niere	SV40-transformiert	Grüne Meerkatze
D283-Med	Medulloblastom	transformiert	Mensch
E14-2	Gehirn	SV40-immortalisiert	Ratte
IMR-90	Lungen-Fibroblasten	normal	Mensch
N2A	Neuroblastom	transformiert	Maus
PC12	Phäochromozytom	transformiert	Ratte
REF52.2	Fibroblasten	nicht transformiert / immortal	Ratte
SH-SY5Y	Neuroblastom	transformiert	Mensch
TZ102	PNET*	SV40-transformiert	Ratte
TZ103	PNET*	SV40-transformiert	Ratte
TZ107	PNET*	SV40-transformiert	Ratte
U251-MG	Gliom	transformiert	Mensch
U87-MG	Gliom	transformiert	Mensch

* Primitiver neuroektodermaler Tumor

2.5.2 Zellkultur-Medien

Die verwendeten Zellkultur-Lösungen und -Medien sind nachfolgend zusammengefaßt. Die Medien wurden von Sigma bezogen, das FCS von Seromed. Alle Medien enthielten 1 % Glutamin sowie 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (0,6 % Penicillin, 1 % Streptomycin in PBS⁺)

PBS⁻ (pH 7,2)

Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1 l

Trypsin-Lösung (pH 7,8)

NaCl	136,9 mM
KCl	5,4 mM
Glucose	5,5 mM
EDTA	0,7 mM
Trypsin	0,4 %

<i>Zelllinie</i>	<i>Zellkultur-Medium</i>	<i>komplementiert mit</i>
D283-Med IMR-90 N2A	MEM	1 % nicht-essentielle Aminosäuren (Sigma)
		10 % FCS
CHO		5 % FCS
SH-SY5Y	DMEM (4500 mg/ml Glucose)	15 % FCS
PC12	RPMI	10 % HS, 5 % FCS
alle übrigen	DMEM (1000 mg/ml Glucose)	5 % FCS

2. 6 Plasmide

Folgende Klonierungs- und Expressionsvektoren wurden in dieser Arbeit verwendet:

<i>Bezeichnung</i>		<i>Anwendung</i>
pAD-GAL4-3.7.1	(Klawitz, 2000)	Sonde zur Durchmusterung der Phagen-cDNA-Bibliothek
pEGFP-C1	(Clontech)	Expressionsvektor mit N-terminalem GFP
pEGFP-N1	(Clontech)	Expressionsvektor mit C-terminalem GFP
pBlueskript-SK+	(Stratagene)	Klonierungs- und Expressionsvektor
pCMV-Tag2A, -B, -C	(Stratagene)	Expressionsvektor mit N-terminalem FLAG-Signal
pcDL-SR α II-N-WASP	(Miki et al., 1996)	Expression von N-WASP
pCB6-GFP- Δ WH1	(Moreau et al., 2000)	Expression von N-WASP- Δ WH1
pCB6-GFP- WH1	(Moreau et al., 2000)	Expression von N-WASP-WH1
pEGFP-N1-Par-4	(Boosen, 2001)	Expression von Par-4-GFP
pEGFP-C1-Dlk	(Kögel et al., 1998)	Expression von GFP-Dlk
pCMV-Tag2B-Dlk	(Boosen, 2000)	Expression von FLAG-Dlk

2. 7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert. Nachstehend sind die Sequenzen aller verwendeter Oligonukleotide sowie und ihre Schmelztemperatur (T_m) angegeben. Die aufgeführten Positionen beziehen sich jeweils auf die Ratten-DNA, mit Ausnahme der Aktin-Oligonukleotide, die für die Maus-cDNA angegeben sind.

Bezeichnung	Position	Sequenz	T_m
3.7.1 Sense	2524-2644	5'-TCTTCCTGGCTCAGAACCAGC-3'	60 °C
3.7.1 Antisense	2659-2639	5'-CTCCTATCTTGCCCTCCTAGC-3'	60 °C
Klon10 <i>Pst</i> I-ATG	1-25	5'-AACTGCAGATATGCCTGTGCCTCCCC ACCAGCAC-3'	60 °C
Klon10 <i>Xba</i> I	1680-1661	5'-GCTCTAGAGCGGCTGACACAAGCAATA GC-3'	60 °C
WIP400 <i>Hind</i> III rev	1200-1177	5'-CCCAAGCTTTCAAGGCCTAGGCCCACT TCTGGGACT-3'	64 °C
WIPMID for	1618-1638	5'-GGATCGGGAAAGAAGGGCCTG-3'	57 °C
WIPMID rev	1972-1952	5'-CCTGGAGCCTACCTCAGACTG-3'	57 °C
MutWIP-KLAAfor	128-157	5'-GGAAGAAGCTAGCTGCTACAGTCACCA ATG-3'	54 °C
MutWIP-KLAArev	157-128	5'-CATTGGTGACTGTAGCAGCTAGCTTCTT CC-3'	54 °C
10f Sense	49-69	5'-CTCGCCAATACTGAGAAACCC-3'	55 °C
10f Antisense	561-541	5'-TGGCGTATTTGGTACCGGAGG-3'	55 °C
5'Par-4 mut T155	451-477	5'-AAGCGCCGCTCCGCTGGCGTGGTCAA C-3'	50 °C
Par-4 795-775 rev	795-775	5'-GAAGCCACTTCTATCTGTTCG-3'	50 °C
rat Bcl-2 for	468-486	5'-CGCTGGGCCTGCGCTCAGC-3'	55 °C
rat Bcl-2 rev	811-792	5'-CCCAGCCTCCGTTATCCTGG-3'	55 °C
rat GAPDH for	884-861	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'	50 °C
rat GAPDH rev	1167-1144	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'	50 °C
β -Actin USP	182-203	5'-CGTGGGCCCGCCCTAGGCACCAG-3'	50 °C
β -Actin DSP	424-403	5'-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'	50 °C

2. 8 Antikörper

Die verwendeten Antikörper sind neben ihrer Bezugsquelle nachfolgend aufgeführt. Die verwendeten Verdünnungen für Immunfluoreszenz (IF)- und Western Blot-Analysen (WB) sind angegeben. Für Immunpräzipitationen (IP) sind die pro mg Gesamtprotein eingesetzten Antikörpermengen aufgeführt.

Erstantikörper	Spezies	Quelle/Referenz	IP	IF	WB
anti- α -Actinin*	Maus	Sigma	–	1:500	–
anti- α -Tubulin	Maus	Sigma	–	1:150000	1:10000
anti-FLAG	Maus	Stratagene	1 μ l/mg	1:5000	1:2500
anti-Myosin IIA	Kaninchen	(Phillips et al., 1995)	–	1:10000	–
anti-N-WASP**	Kaninchen	(Fukuoka et al., 1997)	–	1:2000	1:2000
anti-Par-4	Kaninchen	Santa Cruz	–	–	1:5000
anti-PARP	Kaninchen	Cell Signaling	–	–	1:1000
anti-PKC ζ	Kaninchen	Santa Cruz	20 μ l/mg	–	1:500
anti-p-PKC ζ	Kaninchen	Cell Signaling	–	–	1:1000
anti-Tropomyosin	Maus	Sigma	–	1:2000	–
anti-Vinculin*	Maus	Sigma	–	1:500	–

* freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Susanne Illenberger (TU Braunschweig)

** freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Hiroaki Miki (Universität Tokyo)

Zweitantikörper	Spezies	Quelle/Referenz	IF	WB
anti-Kaninchen-Cy3	Ziege	Dianova	1:5000	–
anti-Kaninchen-FITC	Ziege	Dianova	1:1600	–
anti-Kaninchen-HRP	Ziege	Nordic	–	1:5000
anti-Maus-Cy3	Ziege	Dianova	1:5000	–
anti-Maus-HRP	Kaninchen	Nordic	–	1:5000

3. Methoden

3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.1.1 Präparation von Nukleinsäuren

3.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* nach Birnboim und Doly

Zur Präparation eines Plasmid-DNA-Konstruktes in geringem Maßstab (ca. 10 µg DNA) wurde die Methode nach (Birnboim und Doly, 1979, mod.) verwendet. Es wurden 1 ml-Übernachtskulturen von *E. coli* in LB-Medium in Eppendorf-Reaktionsgefäßen angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min 16000 × g, RT) geerntet. Nach gründlichem Entfernen des Mediums wurde das Zellpellet in 100 µl P1-Puffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8) resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 100 µl P2-Puffer (1 % (w/v) SDS, 200 mM NaOH) lysiert. Die Fällung der Proteine und der mit Proteinen besetzten genomischen DNA erfolgte durch Zugabe von 100 µl eiskaltem P3-Puffer (3 M K-Acetat, pH 5,5), sofortiges vorsichtiges Mischen und anschließende Zentrifugation (5 min 16000 × g, 4 °C). Der Überstand wurde zur Fällung der Plasmid-DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol (RT) versetzt und erneut für 10 min wie oben zentrifugiert. Die pelletierte Plasmid-DNA wurde mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, erneut für 5 min wie oben pelletiert und nach dem Trocknen in 10 – 20 µl TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-Hcl, pH 8,0) aufgenommen. Bei dieser Methode wurde eine Ausbeute von ca. 10 µg DNA pro Ansatz erreicht.

3.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch Affinitätschromatographie

Für Anwendungen, die einen hohen Reinheitsgrad der DNA verlangten, wurde das *JET-STAR Plasmid DNA Purification Kit* (Genomed, Bad Oeynhausen) verwendet. *E. coli*-Übernachtskulturen in 30-50 ml LB-Medium wurden in 50 ml-Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (10 min 3500 × g, RT). Das Zellpellet wurde einmal in TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-Hcl, pH 8,0) gewaschen. Resuspension, Lyse und Proteinfällung erfolgten nach Angaben des Herstellers mit den Lösungen des Kits. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie über Silikat-Säulen. Die von den Säulen eluierte DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (30 min 25000 × g, 4 °C) pelletiert. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem 70 %igen Ethanol und 10minütiger Zentrifugation wie oben wurde die DNA getrocknet und in 200-

300 µl TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) aufgenommen. Bei dieser Methode wurde eine Ausbeute von ca. 200-300 µg DNA pro Ansatz erreicht.

3.1.1.3 Präparation von RNA aus Zellkulturen

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus Säugerzellen wurde eine konfluente LP 3 × mit eiskaltem PBS⁺ gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurde 1 ml *Trizol*[®] (Invitrogen) mit dem Gummischaber auf der Schale verteilt. Das Lysat wurde vorsichtig mit einer 1000 µl-Pipette auf- und abpipettiert und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extraktion von Proteinen und genomischer DNA erfolgte durch Zugabe von 200 µl Chloroform, gründliches Mischen und nachfolgender Phasentrennung durch 3 min Inkubation bei Raumtemperatur und fünfminütiger Zentrifugation bei 16000 × g. Die obere, wäßrige Phase wurde zur Fällung der RNA mit 500 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei 16000 × g und 4 °C zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit eiskaltem 70 %igem Ethanol und Zentrifugation (10 min 9000 × g, 4 °C) wurde die RNA leicht angetrocknet und bei 65 °C in RNase-freiem TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst.

3.1.2 Enzymatische Behandlung von DNA

3.1.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in dem vom Hersteller mitgeliefertem Puffersystem und bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur. Die Inkubationsdauer betrug 1-4 h. Für analytische Zwecke wurde 1 µg DNA mit 2-5 U Enzym in einem Ansatz von 10 µl verdaut. Für präparative Anwendungen wurden 2-5 µg DNA mit 5-50 U Enzym in einem Ansatzvolumen von 20 – 50 µl verdaut.

3.1.2.2 Dephosphorylierung von DNA

Um eine Selbstligation von Vektoren zu verhindern, wurden linearisierte Vektoren einer Dephosphorylierung unterzogen. Diese erfolgte direkt nach der Restriktion im gleichen Ansatz unter Zugabe von 0,1 U alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (*Calf intestinaline phosphatase*, CIP, Promega) pro 2 pmol 5'-Enden. Der Dephosphorylierungsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgte durch Zugabe 25 mM EGTA sowie Hitzeinaktivierung für 15 min bei 75 °C.

3.1.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte durch die T4-DNA-Ligase in einem vom Hersteller mitgelieferten Ligase-Puffer. Zunächst wurden die zu ligierenden Insert- und Vektorfragmente in einem molaren Verhältnis von 3:1 bis 5:1 und in einer Gesamtmenge von maximal 100 ng DNA in einem Volumen von 8 µl zur Denaturierung für 5 min auf 55 °C erwärmt und dann langsam abgekühlt, um die Aneinanderlagerung überhängender Enden zu begünstigen. Nach Zugabe von 1 µl 10×Ligase-Puffer und 1 - 3 U T4-DNA-Ligase wurde der Reaktionsansatz 1 - 3 h bei Raumtemperatur oder bei 16 °C über Nacht inkubiert und stand dann für die Transformation in Bakterien bereit.

3.1.3 Transformation von Bakterien

3.1.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurden 50 ml vorgewärmtes YB-Medium mit 0,5 ml einer ÜN-Vorkultur angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0,45-0,55 wurden die Bakterien in ein vorgekühltes 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und 10-15 min auf Eis inkubiert. Nach einer 10minütigen Zentrifugation (2800 × g, 4 °C) wurde das Bakterienpellet in 10 ml TFB I (eiskalt) resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut wie oben zentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden dann in 2 ml TFB II resuspendiert, auf einer Ethanol-Trockeneis-Mischung zu je 100 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort bei -70 °C eingefroren.

<i>TFB I</i>		<i>TFB II</i>	
Na-Acetat	30 mM	MOPS pH 7,0	10 mM
MnCl ₂	50 mM	CaCl ₂	75 mM
NaCl	100 mM	NaCl	10 mM
CaCl ₂	10 mM	Glyzerin	15 mM
Glyzerin	15 %		

3.1.3.2 Transformation

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und dann vorsichtig mit der zu transformierenden DNA (1 ng DNA oder 10 µl Ligationsansatz mit 100 ng DNA) vermischt. Die Zellen wurden 30 min erschütterungsfrei auf Eis inkubiert und dann für 60 s einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Nach anschließender 1-2 minütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 900 µl LB-Medium versetzt und für 30 - 60 min schüttelnd bei 37 °C inkubiert, um die Ausprägung der Anti-

biotika-Resistenz zu ermöglichen. Die Bakterien wurden zur Selektion der transformierten, resistenten Klone auf Antibiotikum-haltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen.

3.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Fragmentgrößen der aufzutrennenden DNA wurden Gele mit Konzentrationen von 0,8 - 2,0 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (0,1 M Na-Acetat, 5 mM EDTA, 0,2 M Tris-Eisessig, pH 7,9) verwendet. Als Größenstandards wurden 100 bp-DNA-Marker und 1 kb-bp-Marker der Firma Peqlab verwendet. Zur Visualisierung der DNA wurde dem Gel 0,5 µg/ml (w/v) des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V in TAE-Puffer durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente in einem UV-Transilluminator (*Image Master VDS*, Pharmacia) detektiert.

3.1.5 Reinigung, Konzentrierung und Mengenbestimmung von Nukleinsäuren

3.1.5.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus präparativen Agarose-Gelen erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraktion Kit* (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers. Die DNA wurde in 30 - 50 µl TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

3.1.5.2 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung wurde die DNA- oder RNA-Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,5) vermischt und anschließend mit 2,5 Volumen 100 %igen (v/v) Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgte für mehrere Stunden bei -70 °C oder über Nacht bei -20 °C. Die DNA oder RNA wurde durch 15minütige Zentrifugation (16000 × g, 4 °C) pelletiert, einmal mit eiskaltem 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, erneut wie oben pelletiert und nach kurzem Trocknen in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

3.1.5.3 Konzentrations- und Reinheitsgradbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäure-Konzentration von DNA- oder RNA-Präparationen mit hoher Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 260 nm entspricht eine Optische Dichte (OD) von 1 einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Sambrook et al.,

1989). Liegt der Quotient ($OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$) zwischen 1,8 und 2,0, so ist die DNA- oder RNA-Präparation sehr rein; niedrigere Werte zeigen eine Verunreinigung mit Proteinen an. Bei Präparationen, in denen niedrige Konzentrationen zu erwarten waren (z. B. Eluat einer Gelextraktion), wurde der DNA-Gehalt der Probe mittels Gelelektrophorese durch Vergleich mit *Bam*HI / *Hind*III-verdauter λ -DNA, die als DNA-Mengenstandard diente, ermittelt. Die prozentualen Anteile der einzelnen λ -DNA-Fragmente an der Gesamt-DNA sind bekannt.

3.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um DNA-Fragmente *in vitro* zu amplifizieren und gegebenenfalls nach Bedarf zu modifizieren, wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) eingesetzt. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt durch wiederholte Folgen von Denaturierung, Anlagerung synthetischer Oligonukleotide (MWG) und Strang-Synthese durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Die PCR wurde in einem *TGradient*-Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Je nach Anwendung wurden die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Promega), die *Hot Star Taq* (Qiagen), das *Expand Long Template PCR System* (Roche) oder das *GC-rich PCR System* (Roche) verwendet. Die Schmelztemperatur T_m der synthetischen Oligonukleotide wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 59,9 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 600/L,$$

wobei % GC den prozentualen GC-Anteil und L die Länge (in Nukleotiden) des Oligonukleotids angibt. Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich im allgemeinen wie folgt zusammen und wurde nach den angegebenen Bedingungen durchgeführt:

<i>PCR-Ansatz</i>		<i>PCR-Bedingungen</i>	
Matrizen-DNA	1-10 ng	Anfangs-Denaturierung	95 °C 5 min
Oligonukleotide	je 50 pmol	Denaturierung	95 °C 45 s
10 × Puffer	5 μ l	Oligonukleotid-Anlagerung	X °C 60 s
MgCl ₂	1,5 mM	Strang-Synthese	72 °C Y s
dNTP-Gemisch	je μ M	Abschluß-Strang-Synthese	72 °C 7 min
Polymerase	0,5-2,5 U	wobei X = T_m (s. oben) und Y = 60 s / kb PCR-Produkt	
H ₂ O bidest.	ad 50 μ l		

3.1.7 Umschreiben von RNA in cDNA und RT-PCR

Zur Expressionsanalyse von Genen im Zellkulturmodell wurde die RT-PCR angewendet. Die nach 3.1.1.3 präparierte RNA wurde mit Hilfe der Reversen Transcriptase *Super-*

scriptTM II (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Diese Methode basiert darauf, daß die meisten Gen-Transkripte an ihrem 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz besitzen. Bei der RT-Reaktion wird daher ein Oligo-dT-Oligonukleotid eingesetzt, das an die Poly-A-Schwänze der mRNAs bindet. Von diesem Oligonukleotid ausgehend synthetisiert die Reverse Transkriptase dann die entsprechende cDNA. Mit 200 U der Reversen Transkriptase wurde die mRNA aus 2,5 µg Gesamt-RNA umgeschrieben. Um zu überprüfen, ob die cDNA frei von genomischen Verunreinigungen war, wurde eine Kontroll-PCR mit den Oligonukleotiden *β-Actin USP* und *β-Aktin DSP* durchgeführt. Diese Oligonukleotide flankieren eine Intron-Sequenz des *β-Aktin*-Gens. Ist das Intron durch Spleißen entfernt, so entsteht ein PCR-Produkt mit einer Größe von 243 bp. Weist die umgeschriebene cDNA noch genomische Verunreinigungen auf, so entsteht durch die Anwesenheit des Introns ein zusätzliches PCR-Produkt von 330 bp Länge. War die cDNA frei von genomischen Verunreinigungen, so konnte sie für RT-PCR-Analysen eingesetzt werden. Das Gen, dessen Expression zu untersuchen war, wurde mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert, wobei die cDNA als Matrize diente (s. 3.1.6). Um verschiedene Ansätze (z. B. aus verschiedenen Zelllinien) vergleichen zu können, wurde ein Abgleich mit Oligonukleotiden für das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitgeführt. Analyse und Abgleich erfolgten je nach Kompatibilität der PCR-Bedingungen in zwei getrennten Ansätzen oder in einem gemeinsamen Ansatz.

3.1.8 Northern Blot-Hybridisierung

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonde für die Northern Blot-Hybridisierung wurde mit Hilfe des *Megaprime DNA Labelling Kit* (Amersham) durchgeführt. 50 ng DNA wurden entsprechend den Instruktionen des Herstellers mit 4 µl [α -³²P]dCTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol) radioaktiv markiert. Im Anschluß an die Markierungsreaktion wurde die Sonde durch Zentrifugation durch eine Sephadex G 50-Säule (3 min, 330 × g) von nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden gereinigt. Der Erfolg der Markierungsreaktion wurde durch Messung eines Aliquots der radioaktiv markierten Sonde im Szintillationsmeßgerät (Beckmann) überprüft. Pro 50 ng Sonde sollte eine Gesamtaktivität von etwa 4×10^7 cpm erreicht werden. Die Blot-Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht im Rollinkubator bei 42 °C in einer Prähybridisierungs-Lösung vorinkubiert. Direkt vor der Hybridisierung wurde die

radioaktiv markierte DNA-Sonde für 10 min bei 95 °C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und dann zu der Prähybridisierungslösung in die Hybridisierungsröhre pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C im Rollinkubator.

Nach der Hybridisierung wurde der Northern Blot in $2 \times$ SSC mit 0,1 % SDS bei 55-60 °C zunächst für 10 min gewaschen. Je nach Bindungseigenschaften der Sonde folgten weitere, stringendere Waschschrötte mit niedrigerer SSC-Konzentration und höherer Temperatur. Mit dem Handmonitor wurde nach jedem Waschschrötte die auf dem Blot verbliebene spezifische Aktivität gemessen. Der Waschvorgang wurde beendet, wenn noch etwa 50 bis 150 cpm auf dem Blot meßbar waren. Danach wurde die Blotmembran in Folie eingeschweißt. Die Detektion von Signalen erfolgte mit einem Röntgenfilm (*X-OMAT AR*, Kodak) und einer Verstärkerfolie bei -70 °C. Vor einer erneuten Hybridisierung wurde die Membran mit 0,1 % SDS in H₂O für 30 min bei 90 °C gewaschen.

(Prä-)Hybridisierungslösung (in DMDC-H₂O)

deionisiertes Formamid	50 % (v/v)
SSC	5 ×
50 × Denhardt's Reagenz (je 1 % BSA, Ficoll, Polyvinylpyrrolidon)	5 ×
SDS	0,5 % (w/v)
Heringsperma-DNA	0,01 % (w/v)
<i>E. coli</i> -tRNA	0,01 % (w/v)

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Präparation von Zellextrakten

3.2.1.1 Gesamtprotein-Zellextrakte

Zur Herstellung von Zellysaten wurden Säugerzellen mit Hilfe eines Gummischabers von der Kulturschale abgeschabt und einschließlich Medium in 15 ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei $150 \times g$ (3 min, RT) sedimentiert und zweimal mit eiskaltem PBS⁺ gewaschen. Um konzentrierte Zellextrakte für Western Blot-Analysen zu erhalten, wurde das Zellpellet in 50 µl PLP pro LP aufgenommen, für Immunpräzipitationen wurden die Zellen in 500 µl PLP aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, gemischt und für 30 min auf Eis lysiert. Zur Reinigung von Zelltrümmern wurde anschließend eine Zentrifugation bei $16000 \times g$ durchgeführt (15 min, 4 °C).

3.2.1.2 Fraktionierung in Triton X-lösliche und -unlösliche Zellextrakte

Die Zellkulturschalen wurden zweimal mit PEM-Puffer (37 °C) gewaschen und anschließend für 3 min unter fortwährendem Schwenken mit 500 µl PEM-Puffer ((Preuss et al., 1995)) + 0,5 % Triton X-100 (37 °C) pro LP inkubiert. Der Überstand, der der Triton X-100-löslichen Fraktion entspricht, wurde komplett abgenommen und für 3 min (16000 × g, 4 °C) zentrifugiert. Währenddessen wurde die auf der Kulturschale verbliebene Triton X-100-unlösliche Fraktion mit einem Gummischaber in 50 µl 2 × SDS-Probenpuffer (500 mM Tris, 80 mM DTT, 13,2 % (w/v) SDS, pH 6,8) pro LP abgeschabt und resuspendiert. Zur Fertigstellung der löslichen Fraktion wurde der Überstand der Zentrifugation über Nacht mit 2 Volumen 100 %igem Ethanol gefällt. Am nächsten Tag wurden die gefällten Proteine durch erneute Zentrifugation (10 min, wie oben) pelletiert und anschließend in 50 µl 2 × SDS-Probenpuffer pro LP resuspendiert.

<i>PEM-Puffer</i>	
PIPES pH 6,8	80 mM
EGTA	1 mM
MgCl ₂	1 mM
PEG-6000	4 %

3.2.1.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung von Zellextrakten wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Es wurden 800 µl einer 1:80-1:800-Verdünnung des Zellextraktes mit 200 µl *Protein Assay Dye Reagent* (Bio-Rad) versetzt, gemischt und für 5 min inkubiert (RT). Anschließend wurde die OD_{595 nm} gemessen. Die Proteinkonzentration der Probe wurde anhand einer mitgeführten Eichreihe mit verschiedenen BSA-Konzentrationen (0-20 µg/ml) ermittelt.

3.2.2 *In vitro*-Transkription/Translation

Die *In vitro* Transkription/Translation wurde mit dem *TNT[®] T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega) entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Da in diesem System die T3- oder T7-Polymerase verwendet wird, muß die zu transkribierende cDNA in einem Vektor vorliegen, in dem entweder ein T3- oder ein T7-Promotor vor der Multiplen Klonierungsstelle liegt. Für einen Translationsansatz wurde 1 µg DNA (präpariert nach 3.1.1.2) eingesetzt. Zur radioaktiven Markierung des *in vitro*-translatierten Proteins wurden 4 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml, 1000 Ci/mmol) zugegeben. Die *In vitro*-

Transkription/Translation erfolgte während einer 90minütigen Inkubation bei 30 °C. Im Anschluß wurde der Ansatz mit 20 µg RNase A behandelt und mit 1 µg Leupeptin versetzt.

3.2.3 *In vitro*-Filament-Bindung

Diese Methode, mit der man die Bindung von Proteinen an Aktin sowie den Einfluß von Proteinen auf die Aktin-Polymerisation untersuchen kann, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Susanne Illenberger (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde gereinigtes Aktin (Sigma) in einer Konzentration von 30 µM durch Inkubation für 1 h bei 37 °C in Polymerisierungs-Puffer polymerisiert. Es folgte eine Inkubation von 3 µM Aktin in Sedimentations-Puffer in An- oder Abwesenheit von 1 µM des zu untersuchenden Proteins für 2 h bei 37 °C. Die Aktin-Filamente wurden durch Inkubation (1h, 37 °C) mit TRITC-Phalloidin (Sigma) angefärbt. Die Analyse der Ansätze erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie.

<i>Polymerisierungs-Puffer</i>		<i>Sedimentations-Puffer</i>	
Tris-HCl pH 7,2	20 mM	Tris-HCl pH 7,2	20 mM
KCl	100 mM	KCl	25 mM
MgCl ₂	2 mM	MgCl ₂	2 mM
ATP	1 mM	ATP	1 mM
DTE	0,2 mM	DTE	0,2 mM

3.2.4 Immunpräzipitation

Diese Methode wurde angewendet, um Proteine aus Zellextrakten anzureichern oder um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Es wurden nach 3.2.1.1 hergestellte Zellextrakte eingesetzt, die jedoch in einem größeren Volumen Puffer aufgenommen wurden (ca. 8 µl PLP je cm² Kulturschale). Die Zellextrakte wurden 1 h bei 4 °C mit Sepharose 4B rotierend präinkubiert, um Bestandteile aus dem Zellextrakt zu entfernen, die unspezifisch an die Matrix binden. Nach Sedimentation der Sepharose (500 × g) wurde der Überstand für mindestens 1 h bei 4 °C rotierend mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Während der Inkubation wurde die Matrix vorbereitet. Je nach verwendetem Antikörper wurde 1/3 Protein A- (bei Kaninchen-Antikörpern) oder Protein G-Agarose (bei Maus-Antikörpern) und 2/3 Sepharose 4B in einem Volumen von 30 µl je Ansatz gemischt und 2 × mit PLP gewaschen. Je 30 µl der Matrix wurden zu den Zellextrakten gegeben. Die Ansätze wurden für mindestens 1 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurde die

Matrix 3 × mit PLP und einmal mit 10 mM Tris HCl (pH 7,5) gewaschen. Das Protein wurde von der Matrix durch Zugabe von 30 µl 2 × SDS-Probenpuffer (0,5 M Tris, 80 mM DTT, 13,2 % (w/v) SDS, pH 6,8), 5 min Inkubation bei 60 °C und Sedimentation der Matrix eluiert.

3.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

3.2.5.1 Vorbereitung der Proben

Proteinproben für die Gelelektrophorese wurden in 1 × SDS-Probenpuffer (0,25 M Tris, 40 mM DTT, 6,6 % (w/v) SDS, pH 6,8) aufgenommen oder mit 2 × oder 5 × SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 100 °C denaturiert, wobei das im Probenpuffer enthaltene DTT eine Aufspaltung der Disulfidbrücken bewirkt. Um eine Reoxidation der Disulfidbrücken zu verhindern, wurde den Proben 1/3 Volumen NEM (2,5 % NEM, 33 % (v/v) mit Bromphenolblau gesättigtes Glycerin) zugesetzt, das zu einer Alkylierung der Sulfhydryl-Gruppen führt. Die Inkubation mit NEM erfolgte für 15 min (RT).

3.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen wurde durch eine denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (Laemmli, 1970). Diese Methode erlaubt die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, indem SDS an die Proteine angelagert wird, was zu einer der Länge der Aminosäurekette proportionalen negativen Ladung der Proteine führt und deren Eigenladung maskiert, so daß diese vernachlässigt werden kann. Die Proteine wurden bei der Elektrophorese zunächst in einem Sammelgel mit 4,5 % Polyacrylamid und einem pH-Wert von 6,8 bei 17 mA auf eine Lauffront konzentriert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte dann in Abhängigkeit von ihrer Molekularmasse und ihrer Nettoladung in einem Trenngel mit Polyacrylamid-Konzentrationen von 7,5-12,5 %, und einem pH-Wert von 8,8 bei einer Stromstärke von 34 mA. Als Molekulargewichts-Standard wurde ein vorgefärbter Protein-Marker der Firma Biorad verwendet. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde das Gel je nach Versuchsansatz weiterbehandelt. Zum Nachweis [³⁵S]-markierter Proteine wurde eine Fluorographie (s. 3.2.5.3) durchgeführt, der Nachweis [³²P]-markierter Proteine erfolgte durch Trocknen des Gels (40 min bei 80 °C unter Vakuum) und anschließender Autoradiographie. Um Proteine immunologisch nachzuweisen, wurden Western Blot-Analysen (s. 3.2.6) durchgeführt.

<i>Sammelgelpuffer</i>		<i>Trenngelpuffer</i>	
Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 M	Tris-HCl (pH 8,8)	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)	SDS	0,4 % (w/v)

<i>Sammelgel</i>		<i>Trenngel (10 %)</i>	
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1,25 ml	Trenngelpuffer (pH 8,8)	4 ml
H ₂ O _{bidest.}	3 ml	H ₂ O _{bidest.}	6,7 ml
Acrylamidlösung	0,75 ml	Acrylamidlösung	5,3 ml
APS (10 %, w/v)	15 µl	APS (10 %, w/v)	80 µl
TEMED	5 µl	TEMED	4 µl

3.2.5.3 Fluorographie

Mit Hilfe der Fluorographie wurde die schwache β -Strahlung von [³⁵S]-markierten Proteinen genutzt, um einen Fluoreszenzfarbstoff anzuregen und so die Schwärzung eines Röntgenfilms zu verstärken. Zu diesem Zweck wurde das SDS-Gel zunächst durch Inkubation in 25 % (v/v) Isopropanol und 10 % (v/v) Essigsäure fixiert (1 h, RT) und anschließend zweimal 20 min in DMSO gewaschen. Es folgte die Inkubation (2 h, RT) in der Fluoreszenzfarbstoff-Lösung (*Rotifluoreszint*, Roth). Nach 30 min wässern in H₂O_{bidest.} wurde das Gel getrocknet. Die Banden wurden durch Exposition eines Röntgenfilms (*X-OMAT AR*, Kodak) detektiert.

3.2.6 Western Blot-Analysen

3.2.6.1 Western Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und dann auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wo sie mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden können (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981). Für den Transfer wurde eine Blotting-Kammer der Firma Bio-Rad verwendet. Der Blot-Aufbau bestand aus einer Lage Schwammtuch, zwei Lagen Filterpapier (Schleicher und Schüll), dem Gel, der Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schüll), zwei weiteren Lagen Filterpapier und wieder einer Lage Schwammtuch, umschlossen von einem zu der Blotting-Kammer gehörenden Einsatz. Dieser Einsatz wurde so in die Kammer eingesetzt, daß die Gelseite zur Kathode und die Membran zur Anode des Spannungsgerätes zeigte. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wandern nach Anlegen einer Spannung aufgrund ihrer negativen Ladung (vermittelt durch das SDS im Acrylamid-Gel) zur Anode, wodurch sie auf der Trägermembran immobilisiert werden. Der Transfer erfolgte für 1 h

bei 80 V und 4 °C in vorgekühltem 1×Blotting Puffer. Im Anschluß wurde die Membran mit 20 % (v/v) Ponceau-Lösung (0,1 % (w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure, AppliChem) in H₂O gefärbt, um den Erfolg der Übertragung auf die Nitrocellulosemembran zu überprüfen. Die Membran wurde anschließend durch Inkubation in TBS-Tween (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween, pH 7,5) entfärbt.

3.2.6.2 Immunfärbung

Um auf einer Nitrocellulose-Membran Proteine immunologisch nachzuweisen, mußten zunächst unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Tween (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween, pH 7,5; über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler) abgesättigt werden. Am nächsten Tag wurde dann die Membran mit TBS-Tween abgespült und 2-24 h mit dem Erstantikörper in TBS-Tween (je nach Antikörper ohne oder mit 5 % Magermilchpulver) rotierend inkubiert, wobei die längeren Inkubationen bei 4 °C durchgeführt wurden. Nach dreimaligem Waschen für 10 min auf dem Schüttler (RT) erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase (PO)-gekoppelten Zweitantikörper (30 min rotierend, RT). Nach drei weiteren Waschschritten (s. oben) wurden die Protein-Antikörper-Komplexe auf der Membran mit dem *SuperSignal[®] West Pico* Chemilumineszenz-Substrat (Perbio Science) nachgewiesen und die Signale mit einem Röntgenfilm (*Cronex 5*, AGFA) detektiert.

3.2.6.3 Regeneration von Western Blots

Die Nitrocellulose-Membranen wurden häufig mehrfach verwendet, z. B. um einen Protein-Abgleich verschiedener Proben durchzuführen. Um die Antikörper der vorangegangenen Analyse zu entfernen, wurde die Membran für 30 min bei 50 °C in „Blot-Strip-Puffer“ (62,5 mM Tris, 2 % (w/v) SDS, 100 mM β-Mercaptoethanol) inkubiert und stand dann für weitere Analysen zur Verfügung.

3.3 Zellkultur-Methoden

3.3.1 Kultur von Säugerzellen

Die Kultur von Säugerzellen erfolgte bei 37 °C je nach Zelllinie in einer 5 % oder 10 % CO₂-Atmosphäre. Zum Passagieren der Zellen, die als adhärenente Monolayer wachsen, wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen, mit Trypsin abgelöst, bei 150 × g sedimentiert und je nach Zelllinie mit frischem Medium in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:15 verdünnt. Zur längerfristigen Lagerung wurden exponentiell wachsende Zellen nach Trypsinierung in

vorgekühltem Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen und schrittweise abgekühlt (2 h -20 °C, über Nacht -70 °C), bevor sie in flüssigem Stickstoff (-180 °C) dauergelagert wurden.

3.3.2 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Zur Transfektion von Säugerzellen wurde das *JetPEI*-Transfektionsreagenz (Qbiogene) verwendet. Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden $1,7 \times 10^4$ Zellen auf runden Deckgläschen in Kulturgefäßen mit passenden Vertiefungen (1,5 cm Ø) ausplattiert. Für diese Zellkulturgefäße wurden Transfektionsansätze von 50 µl je Vertiefung angesetzt. Es wurde zunächst eine Lösung von 500 ng DNA in 25 µl 150 mM NaCl sowie eine Verdünnung von 1 µl Transfektionsreagenz in 25 µl 150 mM NaCl angesetzt. Beide Lösungen wurden gründlich gemischt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zu 450 µl Medium je Vertiefung in die Kulturschale pipettiert. Für Zellkulturgefäße von 5 cm Ø wurden die Transfektionsansätze entsprechend den obigen Angaben auf 200 µl, für Gefäße von 10 cm Ø auf 500 µl vervielfacht. Der Transfektionsansatz konnte bis zur Analyse (maximal 48 h) auf den Zellen verbleiben.

3.3.3 Herstellung stabil transfizierter Zelllinien

Zur Herstellung stabil transfizierter Zelllinien wurden die Zellen zunächst wie unter 3.3.2 beschrieben transfiziert. 24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und zu jeweils $1 - 4 \times 10^4$ Zellen auf mehrere LPs ausplattiert. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte durch Inkubation in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums. Nach einem Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um die abgestorbenen Zellen zu entfernen. Die Zellen wurden weiterhin mit Selektionsantibiotikum mehrere Tage inkubiert, bis aus einzelnen transfizierten und daher resistenten Zellen Zellklone von 1-3 mm Ø herangewachsen waren. Diese wurden mit Hilfe von Klonierungszyklindern isoliert und nach Trypsinierung in neue Kulturgefäße überführt. Die Expression des gewünschten Proteins wurde in den unterschiedlichen Klonen durch Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analysen (s. 3.3.5 und 3.2.6) untersucht.

3.3.4 Radioaktive Markierung von Säugerzellen

Zur metabolischen Markierung von Proteinen wurden die Zellen mit radioaktivem Methionin inkubiert. Die zu markierenden Zellen wurden in der Zellkulturschale zweimal mit PBS⁺ gewaschen und 30 min mit 1,5 ml Methionin-freiem Medium, komplementiert

mit dialysiertem FCS, im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 25 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml, 1000 Ci/mmol) in das Medium pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken der Kulturschale verteilt. Die Inkorporation des markierten Methionins erfolgte während einer Inkubation von 2 h im Brutschrank. Aufgrund des geringen Mediumvolumens wurden die Zellkulturschalen dabei auf einem Schüttler bewegt. Nach der Markierung folgte die Herstellung von Zellextrakten (s. 3.2.1.1).

3.3.5 Fluoreszenzmikroskopie von Säugerzellen

3.3.5.1 Ausplattieren von Säugerzellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen auf runden Deckgläschen in passenden Zellkulturgefäßen mit passenden Vertiefungen (1,5 cm Ø) ausplattiert. Es wurden je nach Zelllinie 1,5 - 2,5×10⁴ Zellen je Vertiefung ausplattiert.

3.3.5.2 Triton X-Extraktion für fluoreszenzmikroskopische Analysen

Um die Triton X-Löslichkeit von Proteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen, wurden die auf Deckgläschen ausplattierten Zellen bei 37 °C einmal mit PEM-Puffer (s. 3.2.1.2) gewaschen. Die Extraktion löslicher Proteine erfolgte durch Inkubation für 10 s bis 3 min in 0,2 % bis 0,5 % Triton X-100 in PEM-Puffer (37 °C). Anschließend wurden die Zellen sofort fixiert (s. 3.3.5.3). Mit den Kontrollansätzen wurde entsprechend verfahren, jedoch ohne Triton X-Behandlung.

3.3.5.3 Fixieren von Säugerzellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Die Fixierung der Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte 24 - 48 h nach der Transfektion. Für eine Fixierung mit Methanol wurden die Zellen einmal mit PBS⁺ gewaschen und anschließend genau 5 min bei -20 °C in eiskaltem Methanol fixiert. Das Methanol wurde anschließend durch Verdünnung mit PBS⁺ von den Zellen entfernt. Für eine Fixierung mit Paraformaldehyd wurden die Zellen einmal mit PBS⁺ gewaschen und anschließend für 20 min in 3 % Paraformaldehyd in PBS inkubiert (RT). Das Paraformaldehyd wurde durch Waschen mit PBS⁺ von den Zellen entfernt.

3.3.5.4 Immunfluoreszenzfärbung

Nach der Fixierung der zu analysierenden Zellen konnten diese mit spezifischen Antikörpern gefärbt werden. Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die fixierten Zellen zunächst für 1 h in 5 % Magermilchpulver in PBS⁺ mit 1 % Ziegen Serum und 0,1 %

Triton X-100 inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS⁺ gewaschen und anschließend für 1 h in 200 µl der Erstantikörperverdünnung in PBS⁺ mit 1 % Ziegen Serum und 0,1 % Triton X-100 inkubiert. Es folgten drei 10minütige Waschschriffe in PBS⁺. Der Erstantikörper wurde durch entsprechende FITC- oder Cy3-fluoreszenzmarkierte Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Maus-Antikörper (Dianova) nachgewiesen. Die Zweitantikörperinkubation erfolgte für 30 min in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS⁺ mit 1 % Ziegen Serum und 0,1 % Triton X-100. Nach der Zweitantikörperinkubation folgten drei weitere 10minütige Waschschriffe mit PBS⁺.

3.3.5.5 Kernfärbung mit DAPI

Die Anfärbung von Zellkernen für die Immunfluoreszenz erfolgte mit dem fluoreszierenden DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid, Sigma). Die fixierten Zellen wurden für 5 min bei Raumtemperatur mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert, für 15 min in 0,25 µg/ml DAPI in PBS⁺ inkubiert und anschließend zweimal für 10 min mit PBS⁺ gewaschen.

3.3.5.6 Aktin-Färbung mit Phalloidin

Zur Anfärbung des Zytoskeletts von Säugerzellen für die Fluoreszenzmikroskopie wurde Tetramethylrhodamin B-Isothiocyanat (TRITC)- oder Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-gekoppeltes Phalloidin (Sigma) verwendet. Phalloidin ist ein Pilzgift, das eine hohe Affinität zu Aktin-Filamenten hat und seine Giftwirkung durch die Inhibition der Aktin-Dynamik entfaltet. Die Färbung von fixierten Zellen erfolgte durch Permeabilisierung für 5 min bei Raumtemperatur mit 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS, 15 min Inkubation in 50 ng/ml TRITC-Phalloidin in PBS⁺ bzw. 500 ng/ml FITC-Phalloidin in PBS⁺ sowie zwei 10minütigen Waschschriffen in PBS⁺.

3.3.5.7 Einbetten von fixierten Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Bevor die Deckgläschen mit den fixierten Zellen auf Objektträger montiert wurden, wurden die Zellen einmal mit H₂O bidest. gewaschen, um die Bildung von Salzkristallen zu verhindern. Dann wurde das Einbettmedium (*PERMAFLUOR Aqueous Mounting Medium*, Immunotech) auf die Objektträger getropft und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten luftblasenfrei auf das Einbettmedium gelegt. Die Objektträger wurden vor der fluoreszenzmikroskopischen Analyse über Nacht lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

3.4 Isolierung eines Genes aus einer cDNA-Bibliothek

In dieser Arbeit wurde eine Phagen-cDNA-Bibliothek (Lambda-HybriZap, Stratagene) mit cDNA aus der Zelllinie TZ103 (Klawitz, 2003d) verwendet. Um ein Gen aus der Phagen-cDNA-Bibliothek zu isolieren, wurden Bakterien mit der Phagenbibliothek infiziert und auf Agar-Platten ausplattiert (s. 3.4.1). Die auf dem Bakterienrasen ausgebildeten Phagenplaques wurden dann mit einer Sonde für das gesuchte Gen hybridisiert, um die Phagenplaques zu markieren, die das gesuchte Gen enthalten (s. 3.4.2 und 3.4.3). Durch wiederholte Hybridisierungszyklen wurden homogene Phagenstämme isoliert, aus denen die gesuchte cDNA gewonnen werden konnte (s. 3.4.4).

3.4.1 Phagen-Infektion

Eine 2 ml-Übernachtskultur von *E. coli* XL1 Blue MRF' wurde zur Ausprägung von Maltose-Rezeptoren, die auch als Phagenrezeptoren dienen, in LB-Medium mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ sowie 30 µg/ml Tetracyclin angeimpft. Am nächsten Tag wurden 25 ml LB-Medium, ebenfalls komplementiert mit 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄, mit 0,25 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 – 1,0 bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienzellen wurden sedimentiert (10 min 1400 × g, 4 °C) und anschließend in eiskaltem 10 mM MgSO₄ bis zu einer errechneten OD₆₀₀ von 0,6 verdünnt. Jeweils 200 µl der Zellsuspension wurden in einem Rundbodenröhrchen mit 1-10 µl verschiedener Verdünnungen der Phagen-cDNA-Bibliothek in SM-Puffer (1-300 pfu / cm² Agarplatte) vermischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Adsorptionsansätze mit je 4 ml auf 48 °C temperierten NZY-Topagars vermischt und auf NZY-Agarplatten ausplattiert. Nach Erstarren des Topagars wurden die Platten über Nacht (max. 14 h) bei 37 °C inkubiert.

3.4.2 Herstellung der Replika-Filter

Am folgenden Tag wurden von jeder Platte zwei Replikafilter durch Auflegen von Hybond-N-Membranen (Amersham) angefertigt. Die Platten wurden zunächst für 2-3 h gekühlt, um eine höhere Stabilität der Topagar-Schicht zu erreichen. Die erste Replikamembran wurde für 2 min auf die Agar-Oberfläche gelegt und asymmetrisch markiert, die zweite Membran wurde für 5 min aufgelegt und mit der gleichen Markierung versehen. Die Membranen wurden vorsichtig von der Platte abgezogen, um die Topagar-Schicht nicht zu beschädigen, und für 2 min in 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl denaturiert. Anschließend wurden die Membranen für 5 min in 0,5 M Tris und 1,5 M NaCl (pH 8,0) neutrali-

siert und danach zum Entfernen eventueller Agar-Reste in $2 \times$ SSC und 0,2 M Tris (pH 7,5) gespült. Nach dem Trocknen der Filter wurde die Phagen-DNA durch UV-Bestrahlung auf der Membran kreuzvernetzt (*UV Stratalinker*[®] 2400, Stratagene).

3.4.3 Hybridisierung der Replika-Filter und Isolierung positiver Phagenklone

Die Replikamembranen wurden zur Identifizierung des gesuchten Gens mit einer entsprechenden radioaktiv markierten Sonde hybridisiert, wobei analog zur Northern Blot-Hybridisierung verfahren wurde (s. 3.1.8). Phagenplaques, die auf beiden Replikamembranen ein positives Signal erzeugten, wurden aus der Agarplatte ausgestochen und in SM-Puffer (mit 5 % Chloroform zum Lysieren der Bakterien) überführt. Während einer Übernacht-Inkubation bei 4 °C diffundierten die Phagen aus dem Agar heraus, sodaß eine neue Phagensuspension für eine weitere Hybridisierungsrunde zur Verfügung stand. Zur Vereinzelung von positiven Phagenpopulationen waren drei bis vier Hybridisierungs-Zyklen notwendig.

3.4.4 *In vivo*-Exzision der Phagemide

Zur *In vivo*-Exzision der Phagemide aus den positiven Phagenplaques wurden 200 µl Phagensuspension mit 40 µl einer Übernacht-Kultur von *E. coli* XL1 Blue MRF' in LB ($OD_{600} = 5,0$) und 1 µl ExAssist-Helferphagen-Suspension (mindestens 10^{10} pfu) vermischt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Zufügen von 5 ml LB wurde der Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch eine 20minütige Inkubation bei 70 °C lysiert. Die Phagen- bzw. Phagemidsuspension wurde durch Zentrifugation (10 min $1200 \times g$, 4 °C) von den Bakterientrümmern getrennt und wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Zur Transfektion der ausgeschnittenen Phagemide wurde eine *E. coli* XL0LR-Übernachtkultur in LB vorbereitet und am nächsten Tag abzentrifugiert. Die Zellen wurden in eiskaltem 10 mM $MgSO_4$ auf eine OD_{600} von 1,0 verdünnt. Mit 1,25 ml dieser Verdünnung wurden 25 ml LB angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,3 – 0,4 bei 37 °C inkubiert. Diese Kultur wurde ebenfalls abzentrifugiert und mit eiskaltem 10 mM $MgSO_4$ auf eine OD_{600} von 1,0 verdünnt. 200 µl dieser Zellsuspension wurden mit 20-100 µl der Phagemidsuspension vermischt, 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Agar-Platten mit einem geeigneten Antibiotikum ausplattiert. Durch Plasmid-DNA-Präparation (s. 3.1.1.1) aus den resistenten Bakterienkolonien konnte die Phagemid-DNA gewonnen werden.

3.5 Methoden zum Nachweis der Apoptose

3.5.1 Bestimmung der Apoptoserate anhand morphologischer Merkmale

Die Zellen wurden entsprechend dem Versuchsansatz nach den unter 3.3.5 beschriebenen Methoden für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert und einer Kernfärbung unterzogen (s. 3.3.5.5). Apoptotische Zellen wurden anhand ihrer morphologischen Eigenschaften (fragmentierte Kerne, Chromatinkondensation, Blasenbildung der Zytoplasmamembran) identifiziert. Pro Versuchsreihe wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. In jedem Experiment wurde je Ansatz eine Gesamtzahl von mindestens 200 Zellen gezählt und als apoptotisch oder nicht apoptotisch eingestuft.

3.5.2 Nachweis der apoptotischen DNA-Fragmentierung

Während der Apoptose wird das Chromatin durch Endonukleasen abgebaut. Da die chromosomale DNA dort, wo sie an Nukleosomen gebunden ist, vor dem Angriff der Nukleasen geschützt ist, resultiert die apoptotische DNA-Fragmentierung in Bruchstücken von 180 - 200 bp, was der zweifachen Windung um ein Nukleosom entspricht, oder ganzzahligen Vielfachen davon. Diese DNA-Fragmente können aus apoptotischen Zellen isoliert und durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und visualisiert werden. In dieser Arbeit wurde die Methode nach Arad (Arad, 1998) verwendet. Für die Analyse wurden die je nach experimentellem Ansatz kultivierten und behandelten Zellen (mind. 10^6) mit einem Gummischaber von der Zellkulturschale geschabt und einschließlich ihres Kultur-Mediums bei $350 \times g$ 10 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde einmal mit PBS⁺ gewaschen, wie oben sedimentiert und anschließend in 250 μ l TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Die Zellen wurden durch Zugabe von einem Volumen 2,5 %iger SDS-Lösung und 5 min Inkubation (RT) lysiert. Die Fällung der genomischen DNA erfolgte durch Zugabe von 0,7 Volumen CsCl₂-Lösung und einer 15minütigen Inkubation auf Eis. Durch einen Zentrifugationsschritt (15 min, $16000 \times g$, 4 °C) wurde die gefällte genomische DNA sedimentiert. Der wässrige Überstand, der im Fall von apoptotischen Zellen auch die fragmentierte DNA enthielt, wurde durch DNA-Reinigungssäulen aus dem *QIAquick Gel Extraction Kit* zentrifugiert (1 min, $16000 \times g$). Eventuell vorhandene DNA-Fragmente binden bei diesem Schritt an die Matrix der Säule. Nach einem Waschschrift mit 750 μ l Waschpuffer je Säule wurde die DNA mit 25 μ l TE-Puffer eluiert. Es folgte der Abbau der RNA durch 50 ng/ml RNase A (1 h, 37 °C). Zur Vorbereitung für die Gelelektrophorese wurden die Proben mit Ladepuffer versetzt und 10 min bei 65 °C

denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte auf einem 1,8 %igen Agarosegel für 45 min bei 80 V.

<i>CsCl₂-Lösung</i>		<i>Waschpuffer</i>	
CsCl ₂	3 M	Tris-HCl pH 7,5	10 mM
K-Acetat	1 M	K-Acetat	80 mM
Essigsäure	4 % (v/v)	EDTA	40 µM
		Ethanol	60 % (v/v)

3.5.3 Nachweis der PARP-Spaltung

Das Protein Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) ist ein Reparaturenzym, das spezifisch an DNA-Strangbrüche bindet, wie sie während der Apoptose entstehen. PARP selbst ist wiederum ein Zielprotein der Caspase 3, die das 116 kDa große Protein in zwei Fragmente von 89 kDa und 24 kDa spaltet und dadurch inaktiviert. Die Spaltung von PARP läßt sich durch PARP-spezifische Antikörper in Western Blot-Analysen nachweisen. Die zu analysierenden Zellen wurden je nach experimentellem Ansatz kultiviert und behandelt. Anschließend wurden Zellextrakte (s. 3.2.1.1) hergestellt, die einer Gelelektrophorese (s. 3.2.5) unterzogen und anschließend durch das Western Blot-Verfahren (s. 3.2.6) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen wurden. Das Protein PARP wurde immunologisch durch einen polyklonalen anti-PARP-Antikörper nachgewiesen. Die Antikörperinkubation erfolgte über Nacht in TBS-Tween (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween, pH 7,5) in einer Verdünnung von 1:1000.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen am WASP-interagierenden Protein, WIP

4.1.1 Isolierung und Klonierung von WIP

4.1.1.1 Isolierung einer neuen cDNA durch Plaque-Hybridisierung

In einer Hefe-Zwei-Hybrid-Suche nach potentiellen Interaktionspartnern des großen T-Antigens (LT) des Simian Virus 40 (SV40) wurde im Rahmen der Dissertation von Ingrid Klawitz (Klawitz, 2000) aus einer Ratten-cDNA-Bibliothek eine unvollständige cDNA-Sequenz von 1300 bp Länge isoliert, die 83 % Sequenzidentität zu einem 407 bp langen Maus-EST (*expressed sequence tag*) unbekannter Funktion aufwies (Datenbank-Zugangsnummer AA62345.emest16). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die komplette Sequenz dieses cDNA-Klons isoliert und das Protein näher charakterisiert werden. Um die vollständige cDNA des Gens zu isolieren, wurde zunächst eine Phagen-DNA-Bibliothek aus der PNET-Zelllinie TZ103 mit dem 1300 bp-cDNA-Klon als Sonde durchmustert. Es wurde dabei die Methode der Plaque-Hybridisierung angewendet. Nach der ersten Durchmusterung der Phagen-Bibliothek konnten aus 200 000 ausplattierten pfu zehn doppelt positive Phagenplaques (bezeichnet als Klon 1-10) isoliert werden. Um eventuelle falsch-positive Klone ausschließen zu können, wurden die Klone einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden *3.7.1 sense* und *3.7.1 antisense*, die aus dem bereits sequenzierten 1300 bp-cDNA-Fragment abgeleitet wurden, unterworfen. Ein spezifisches PCR-Produkt der zu erwartenden Größe von 136 bp ergab sich nur bei den Klonen 9 und 10. Diese wurden jeweils durch zwei weitere Durchmusterungen der Phagen-Bibliothek angereichert, bis zwei homogene Phagenpopulationen der Klone 9 und 10 zur Verfügung standen. Aus diesen Phagenklonen wurden mit Hilfe eines Helferphagens (*ExAssist*, Stratagene) die Phagemide ausgeschnitten und durch nachfolgende Transformation in den *E. coli*-Stamm *XLOLR* amplifiziert. Die Phagemide wurden aus den Bakterien gereinigt und mit Hilfe von Restriktionsanalysen analysiert. Ein Verdau des Klons 10 mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XhoI* ergab vier Fragmente mit etwa 1400 bp, 1100 bp und 2×700 bp Länge, was einer Gesamtlänge der isolierten cDNA von 3900 bp entspricht. Bei einer entsprechenden Analyse des Klons 9 fanden sich zwei DNA-Fragmente von etwa 510 bp und 650 bp, also insgesamt 1200 bp Länge. Da die cDNA des Klons 9 ca. 2700 bp kürzer war als die des Klons 10, wurden die folgenden Untersuchungen ausschließlich mit Klon 10 weitergeführt.

4.1.1.2 Identifizierung der neuen cDNA als Ratten-Ortholog des humanen WIP

Die cDNA-Sequenz wurde mit Hilfe des Sequenzanalysesystems HUSAR (EMBL, Heidelberg) analysiert. Mit Hilfe des Programms BLAST wurden verschiedene Datenbanken auf Sequenzidentitäten untersucht. Die Analyse ergab drei humane cDNA-Sequenzen mit Sequenzübereinstimmungen von 65 %, 82 % und 84 % (Datenbank-Zugangsnummern X86019, NM_003387 und AF03158). Zwei dieser cDNA-Sequenzen waren als cDNA für das Wiskott-Aldrich-Syndrome Protein (WASP)-interagierende Protein (WASPIP oder WIP) identifiziert, die dritte Sequenz entsprach der cDNA für ein Protein mit der Bezeichnung PRPL2. Aufgrund der hohen Sequenzidentität wurde die isolierte cDNA als Ratten-Ortholog des humanen WIP-Gens (Ramesh et al., 1997) identifiziert und wird daher im folgenden als WIP bezeichnet. Die vollständige Sequenz der Ratten-WIP-cDNA wurde unter der Datenbank-Zugangsnummer AJ303456 in der EMBL-Datenbank (GenBank™, Heidelberg) veröffentlicht. Die WIP-cDNA wurde hinsichtlich offener Leseraster (*open reading frame*, ORF) sowie auf die Position von Start- und Stopcodon hin analysiert. Als Startcodon wurden durch Vergleich mit den bereits veröffentlichten cDNA-Sequenzen die Nukleotide 1-3 identifiziert. Nach einem offenen Leseraster von 1462 Nukleotiden folgt das Stopcodon, das von den Nukleotiden 1462-1464 kodiert wird. Eine vergleichende Gegenüberstellung der unterschiedlichen Sequenzen ist im Anhang A dargestellt. Die Abbildung veranschaulicht die hohe Sequenzidentität der WIP-Orthologe im kodierenden Bereich der cDNA-Sequenzen. Die im Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendete Sonde entspricht den Nukleotiden 2524 bis 3797 und liegt damit weit im 3'-untranslatierten Bereich der cDNA. Da sich darüber hinaus das aus der Nukleotidsequenz abgeleitete offene Leseraster für WIP von dem im Zwei-Hybrid-System als Gal-4-Fusionsprotein vorgegebenen Raster unterschied, handelte es sich hierbei offensichtlich um einen falsch-positiven Klon, wodurch eine Interaktion mit LT ausgeschlossen werden konnte. Da dieses Protein potentiell interessant erschien und über seine Funktion wenig bekannt war, wurde es eingehender charakterisiert.

4.1.1.3 Klonierung von WIP

Für weitere Untersuchungen wurde die WIP-cDNA in verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Da die Sequenz keine geeigneten Restriktionsschnittstellen aufwies, wurde mittels PCR direkt vor dem Startcodon eine *Pst*I-Schnittstelle und 166 bp hinter dem Stopcodon eine *Xba*I-Schnittstelle eingeführt (Oligonukleotide *Klon10 Pst*I-ATG und *Klon10 Xba*I). Die Amplifizierung eines spezifischen Produktes der erwarteten Größe von 1,7 kb konnte

nur mit dem *Expand Long Template PCR System* (Roche) erreicht werden. Das PCR-Produkt wurde mit *PstI* und *XbaI* nachgeschnitten und in den Expressionsvektor pEGFP-C1 sowie in den Vektor pBlueskript-SK+, ebenfalls *PstI*- und *XbaI*-geschnitten, ligiert. Die cDNA wurde nach der Klonierung vollständig sequenziert (Agowa).

4.1.2 Charakterisierung von WIP

4.1.2.1 Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener WIP-Orthologe

Die WIP-cDNA enthält ein offenes Leseraster von 1461 Nukleotiden, welches einem Protein von 487 Aminosäuren entspricht. Die aus der Aminosäuresequenz abgeleitete Molekularmasse beträgt etwa 50 kDa (Computerprogramm *PeptideMass*, <http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>). Bei der Betrachtung der von der Ratten-WIP-cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz (s. Anhang B) wird sofort deutlich, daß es sich um ein ausgesprochen Glycin- und Prolin-reiches Protein handelt. Während die Prolin-Reste über das gesamte Protein verteilt sind, befinden sich die meisten Glycin-Reste im N-terminalen Teil des Proteins. Allein der Bereich zwischen den Nukleotiden 64 bis 98 enthält 25 Glycin-Reste. Auf das gesamte Protein bezogen beträgt der Glycin-Gehalt 12 % und der Prolin-Gehalt 28 %. Der mit 30 % recht hohe Anteil kleiner Aminosäuren (Glycin, Alanin, Serin) läßt auf eine hohe Flexibilität der Peptidkette schließen. Der Vergleich der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergab eine Sequenzidentität von 84 % auf Proteinebene mit den humanen Orthologen (s. Anhang B). Zwischen der Ratten-WIP-cDNA und der humanen PRPL2-Sequenz gibt es Abweichungen im C-Terminus des Proteins, die bereits beim Vergleich der entsprechenden cDNA-Sequenzen zu finden sind. Dieser Unterschied geht möglicherweise auf differentielles Spleißen der WIP cDNA zurück (s. 4.1.2.4). Eine Abweichung der Ratten-WIP-Proteinsequenz von den humanen WIP-Proteinsequenzen befindet sich an der Position 288-296 (die Numerierung bezieht sich auf die Ratten-WIP-Sequenz). Die Sequenz von WIP wurde mit Hilfe entsprechender Computerprogramme analysiert, um putative Proteindomänen zu identifizieren. Die so ermittelte Domänenstruktur von WIP ist in Abbildung 4 graphisch dargestellt. Interessanterweise befindet sich an der Position 288-296 im Ratten-Ortholog ein Sequenzmotiv, das mit je zwei weiteren Kopien sowohl im humanen als auch im Ratten-WIP zu finden ist (s. Abb. 4 und Anhang B). Es handelt sich bei diesem Motiv mit der Konsensussequenz *XPPPPP* (X = G, A, P, S, T) um ein ABM-2 (*actin based motility-2*)-Motiv, das durch die Bindung an Profilin, einem Protein, das an der Aktin-

Polymerisation beteiligt ist, indirekt die Bindung an Aktin vermittelt (Purich und Southwick, 1997). Ebenfalls mit der Aktin-Bindung in Verbindung gebracht wird das sogenannte VH-Motiv (Verprolin-Homologie-Domäne; auch WH-2 für WASP-Homologie-Domäne 2 genannt; Rohatgi et al., 1999; Mullins, 2000). WIP beinhaltet zwei VH-Motive (Aminosäuren 32-60 und 92-108; s. Abb. 4). Das erste VH-Motiv von WIP umfaßt zusätzlich ein Sequenzmotiv, KLKK (Abb. 4), das ebenfalls mit der Aktin-Bindung in Zusammenhang gebracht wird (Van Troys et al., 1996). Auch WASP und N-WASP, die als Interaktionspartner des humanen WIP identifiziert wurden (Ramesh et al., 1997), enthalten VH-Motive (Abb. 10), die zusammen mit der Cofilin-Homologie-Domäne und einer sauren Domäne an der Aktivierung des Arp2/3-Komplexes, einem Schlüsselkomplex der Aktin-Polymerisation, beteiligt sind. WIP und WASP bzw. N-WASP haben ein weiteres Motiv gemeinsam, das Prolin-reiche SH3-Bindungsmotiv mit der Konsensussequenz GRSGPXPPXP (s. Abb. 4). Es ist mit drei Kopien in WIP und mit jeweils zwei Kopien in WASP und N-WASP enthalten. Dieses Motiv vermittelt die Bindung an Proteine, die SH3 (Src-Homologie-Domäne 3)-Motive enthalten. Beispiele hierfür sind die Tyrosinkinase Src, Fyn, das Protein Fgr und die Phospholipase C γ 1 (Banin et al., 1996; Finan et al., 1996).

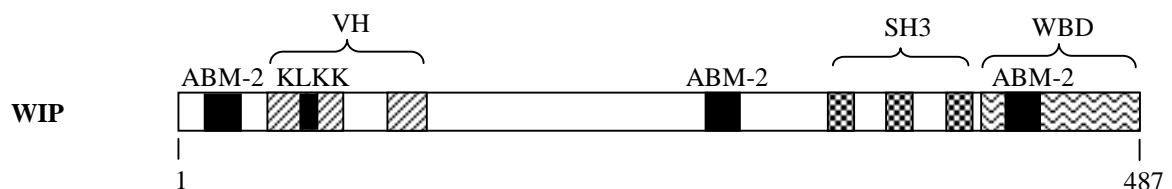


Abb. 4: Schematische Darstellung der Proteindomänen-Struktur des Ratten-WIP. **ABM-2**, Profilin-Bindemotiv; **KLKK**, Aktin-Bindemotiv; **VH**, Verprolin-Homologie-Domäne; **SH3**, Src-Homologie-Domäne-3; **WBD**, WASP-Bindedomäne

4.1.2.2 *In vitro*-Transkription/Translation von WIP

Um die korrekte Translation der klonierten WIP-cDNA zu überprüfen, wurde eine *In vitro*-Transkription/Translation durchgeführt. Für diese Analyse wurde das pBlueskript-WIP-cDNA-Konstrukt verwendet (s. 4.1.1.2), in dem die WIP-cDNA stromabwärts des T7-Promoters kloniert wurde und daher von der T7-Polymerase des verwendeten TNT-Kits (Promega) abgelesen werden kann. Das Ergebnis der *In vitro*-Transkription/Translation war ein Proteinprodukt von etwa 53 kDa (Abb. 5, Spur 3). Die Größe des Produkts stimmt somit mit der erwarteten berechneten Molekularmasse von 50 kDa überein.

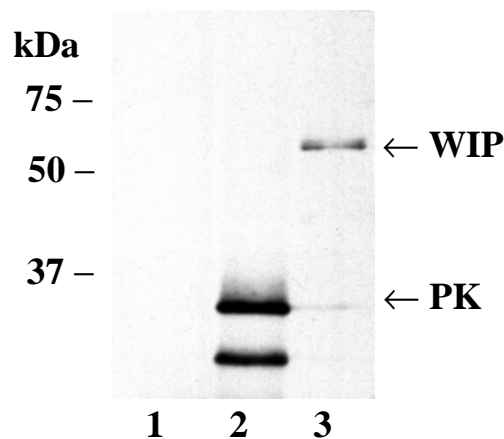


Abb. 5: *In vitro*-Transkription/Translation von WIP. Für diesen Versuch wurde die WIP-cDNA stomabwärts des T7-Promotors des Vektors pBluescript-SK+ kloniert und mit Hilfe eines Reticulozyten-Extraktes *in vitro* transkribiert und translatiert (Spur 3). Als Positivkontrolle (PK) für das *In vitro*-Translationssystem wurde ein pBluescript-cDNA-Konstrukt verwendet, dessen Proteinprodukt eine Größe von 22 kDa hat, in der SDS-PAGE aber eine Molekularmasse von etwa 33 kDa aufweist (Spur 2). Als Negativkontrolle wurde der leere pBlueskript-SK+-Vektor eingesetzt (Spur 1).

4.1.2.3 Expressionsstudie von WIP auf RNA-Ebene

Das Expressionsmuster von WIP in verschiedenen Rattengeweben wurde durch Northern Blot-Analyse mit einer kommerziellen Multi-Gewebe-Northern Blot-Membran (Clontech) untersucht, wobei die verwendete Northern Blot-Membran jeweils 2 µg der gelelektrophoretisch aufgetrennten mRNA der Gewebe Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Hoden enthielt. Die Membran wurde mit einer [³²P]-α-dCTP-markierten Sonde (im folgenden als Sonde WIP1 bezeichnet) hybridisiert, die durch Amplifizierung eines Teilstückes des kodierenden Bereiches der WIP-cDNA (Nukleotide 49-561) mit den Oligonukleotiden *10f sense* und *10f antisense* hergestellt wurde. Anschließend wurde die Membran mit einer radioaktiv markierten GAPDH-Sonde hybridisiert, wobei das Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Mengenabgleich diente. Das Ergebnis in Abbildung 6 zeigt, daß das Haupttranskript von WIP, das in fast allen Geweben exprimiert wird, eine Größe von etwa 5 kb besitzt. Dieses Transkript ist besonders stark vertreten in Milz und Lunge (Abb. 6, Spuren 3 und 4), weniger stark dagegen in Herz, Gehirn, Leber und Niere (Abb. 6, Spuren 1, 2, 5 und 7). In einigen dieser Gewebetypen (Milz, Lunge, Leber und Niere; Abb. 6, Spuren 3, 4, 5 und 7) wird zusätzlich ein schwächeres Signal von 3,8 kb exprimiert; in der Leber wurde außerdem noch ein Transkript von 2,4 kb detektiert (Abb. 6, Spur 5). Ein kleines Transkript von 1,4 kb konnte nur in Herz, Leber und Hoden nachgewiesen werden (Abb. 6, Spuren 1, 5 und 8). Ein weiteres Hoden-spezifisches Transkript hat eine Länge

von 1,8 kb (Abb. 6, Spur 8). Interessanterweise gibt es noch ein großes Transkript von 6,9 kb Länge, daß ausschließlich im Skelettmuskel vorkommt und dort das einzige WIP-Transkript darstellt (Abb. 6, Spur 6). Insgesamt konnten 6 verschiedene WIP-Transkripte in den unterschiedlichen Geweben nachgewiesen werden, von denen in jedem Gewebe mindestens eines exprimiert wird. Möglicherweise handelt es sich bei den verschiedenen Signalen um unterschiedliche Spleißformen von WIP.

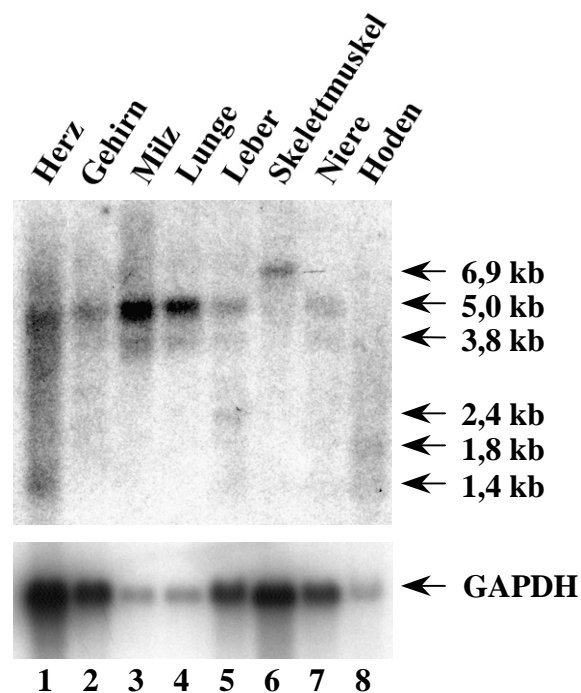


Abb. 6: Northern Blot-Analyse der WIP-Expression in verschiedenen Gewebetypen der Ratte. Eine kommerzielle Northern Blot-Membran (Clontech), auf der je 2 µg mRNA aus verschiedenen Gewebetypen der Ratte repräsentiert ist, wurde mit der Sonde WIP1 aus dem kodierenden Bereich der WIP-cDNA (Basen 49-561) hybridisiert (oben). Als Mengenabgleich wurde die Membran anschließend mit einer GAPDH-Sonde hybridisiert (unten). Spur 1, Herz; Spur 2, Gehirn; Spur 3, Milz; Spur 4, Lunge; Spur 5, Leber; Spur 6, Skelettmuskel; Spur 7, Niere; Spur 8, Hoden.

4.1.2.4 Nachweis verschiedener Spleißformen von WIP

Unter der Annahme, daß die verschiedenen in der Northern Blot-Analyse gefundenen Transkripte unterschiedliche Spleißvarianten von WIP darstellen könnten, wurden zusätzlich zu der bisher verwendeten Sonde (WIP1, Nukleotide 49-561, s. 4.1.2.3) vier weitere Sonden hergestellt, die nahezu die gesamte WIP cDNA abdecken. Eine schematische Darstellung der Sonden und ihrer Position in der WIP-cDNA ist in Abbildung 7 B gegeben. Die Sonden WIP2 (Nukleotide 589-1059) und WIP3 (Nukleotide 1059-1408) wurden durch *Bam*HI-Verdau der WIP-cDNA generiert. Durch eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden *WIPMID for* und *WIPMID rev* wurde die Sonde WIP4

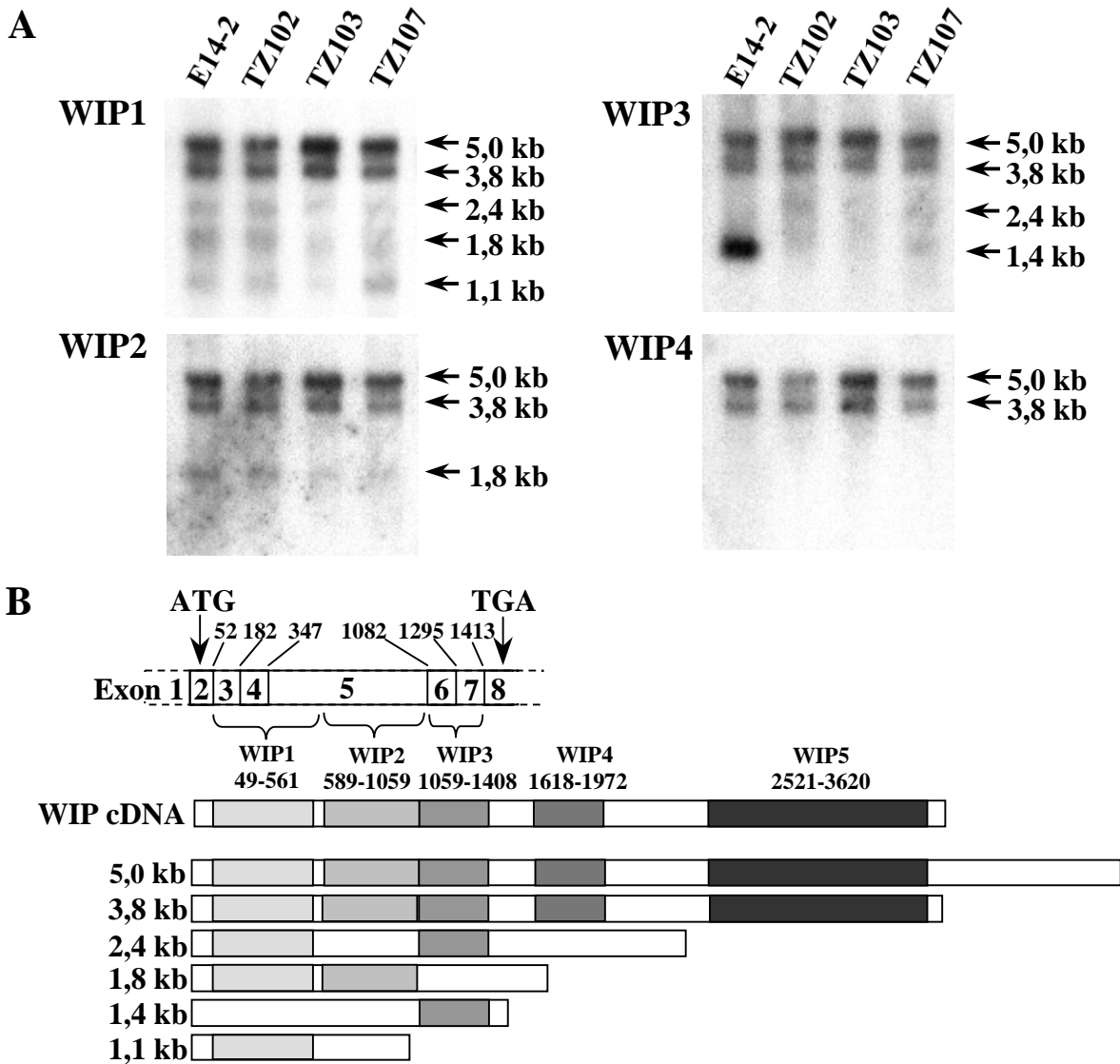


Abb 7: Detektion mehrerer Spleißformen der Ratten-WIP-mRNA in verschiedenen Zelllinien. **(A)** Northern Blot-Analyse mit unterschiedlichen Sonden, die aus der WIP-cDNA abgeleitet wurden (s. Schema in B): WIP1 (Nukleotide 49-561), WIP2 (Nukleotide 589-1059), WIP3 (Nukleotide 1059-1408), WIP4 (Nukleotide 1618-1972) und WIP5 (Nukleotide 2521-3620). Es wurde eine Northern Blot-Membran mit je 1,2 µg mRNA aus der Rattenhirn-Zelllinie E14-2 und den drei Tumorzelllinien TZ102, TZ103 und TZ107 verwendet. **(B)** Schematische Darstellung der putativen Exon-Struktur der kodierenden Region der WIP-cDNA, die von dem humanen WIP-Gen (Datenbank-Zugangsnummer NT_0051821) abgeleitet wurde (oben). Die oberen Zahlen stellen die Exon-Grenzen in der Ratten-WIP-cDNA dar. Die Klammern markieren die Regionen, die von den verschiedenen, bei der Northern Blot-Analyse verwendeten Sonden überspannt wurden (Mitte). Unten ist eine Gegenüberstellung der verschiedenen WIP-Transkripte dargestellt.

(Nukleotide 1618-1972) hergestellt. Sonde WIP5 entspricht der 1,1 kb-langen cDNA-Sequenz, die auch als Sonde für die Plaque-Hybridisierung diente (s. 4.1.1.1). Diese Sonde entspricht den Nukleotiden 2521-3620 der WIP-cDNA. Eine Northern Blot-Membran, die je 1,2 µg mRNA aus drei verschiedenen Ratten-PNET-Zelllinien (TZ102, TZ103 und TZ107; Weggen et al., 1997) und einer immortalisierten embryonalen Rattenhirn-Zelllinie

(E14-2) enthält, wurde mit den unterschiedlichen Sonden hybridisiert. Die Abbildung 7 A zeigt die Autoradiographien dieser Northern Blot-Analysen. Die Haupttranskripte der WIP-mRNA, die bereits bei der Gewebe-Expressionsanalyse gefunden wurden, konnten mit allen WIP-Sonden in allen Zelllinien detektiert werden (Abb. 7 A). Die erste Sonde, WIP1, die auch bei der Analyse des Gewebe-Northern Blots verwendet wurde, hybridisierte zusätzlich mit drei weiteren Transkripten von 2,4 kb, 1,8 kb und 1,1 kb (Abb. 7 A), von denen die zweite Sonde, WIP2, nur das 1,8 kb-Transkript detektierte (Abb. 7 A). Mit der Sonde WIP3 konnten außer den 5,0 kb- und 3,8 kb-Transkripten noch das 2,4 kb-Transkript sowie ein 1,4 kb-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 7 A). Interessanterweise wies das 1,4 kb-Transkript eine sehr starke Expression in der immortalisierten Kontrollzelllinie E14-2 auf (Abb. 7 A). Die Sonden WIP4 und WIP5, die beide aus dem 3'-untranslatierten Bereich der WIP-cDNA abgeleitet wurden, detektierten ausschließlich die beiden Haupttranskripte von 5,0 kb und 3,8 kb (in Abb. 7 A ist stellvertretend für beide Sonden aus dem 3'-untranslatierten Bereich nur die Northern Blot-Analyse mit der Sonde WIP4 dargestellt). Eine Analyse der Exon-Struktur der WIP-cDNA durch Vergleich mit der humanen genomischen WIP-Sequenz (*Homo sapiens* Chromosom 2, Datenbank-Zugangsnummer NT_005182) ergab, daß die Sonde WIP1 die Exons 3, 4 und Teile von Exon 5 überspannte, während die Sonde WIP2 komplett im Bereich des Exons 5 lag. Die Exons 6 und 7 wurden von der Sonde WIP3 überspannt (Abb. 7 B). Überträgt man diese Information auf die mit den verschiedenen Sonden detektierten Transkripte, so läßt sich daraus ableiten, daß die beiden 3,8 kb und 5,0 kb großen Haupttranskripte von WIP die Exons 3 und/oder 4, Exon 5 sowie Exons 6 und/oder 7 enthalten müssen. Dem 2,4 kb-Transkript fehlt dagegen das Exon 5, da es nicht mit der Sonde WIP2 detektiert werden konnte. Das 1,8 kb-Transkript konnte nicht mit der Sonde WIP3 detektiert werden, wohl aber mit den Sonden WIP1 und WIP2. Folglich fehlen diesem Transkript die Exons 6 und 7. Die 1,4 kb und 1,1 kb großen Transkripte ließen sich nur mit jeweils einer Sonde, WIP3 bzw. WIP1, nachweisen. Das 1,4 kb-Transkript beinhaltet demnach nur Exons 6 und/oder 7 und das 1,1 kb-Transkript nur die Exons 3, 4 und/oder 5. Anhand der verwendeten Sonden kann über die Exons 1, 2 und 8 keine Aussage getroffen werden. Insbesondere die Detektierung des 2,4 kb-Transkripts mit den Sonden WIP1 und WIP3, nicht aber mit Sonde WIP2, die komplett aus Exon 5 abgeleitet wurde, ist ein starker Hinweis auf alternatives Spleißen, da sich das Fehlen des Exons 5 in diesem Transkript nicht durch Verwendung eines alternativen Start-Codons oder eines alternativen PolyA-Signals erklären läßt. Alternatives Spleißen könnte auch eine Erklärung

für die Abweichung zwischen der humanen und der Ratten-WIP-Aminosäuresequenz einerseits und der humanen PRPL2-Aminosäuresequenz andererseits darstellen, das zu unterschiedlichen C-terminalen Enden der Proteine führt.

4.1.2.5 Expression von WIP in Säugerzellen

Um die subzelluläre Lokalisation des Ratten-WIP *in vivo* zu ermitteln, wurden REF52.2-Zellen mit dem pEGFP-WIP-Konstrukt (s. 4.1.1.2; im folgenden als GFP-WIP bezeichnet) transfiziert (s. 3.3.2). Als Vergleich wurde eine Transfektion mit dem leeren GFP-Vektor mitgeführt. 42 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und zusätzlich einer TRITC-Phalloidin-Färbung unterzogen, um das Aktin-Zytoskelett anzufärben. Wie aus Abbildung 8 A ersichtlich wird, wies das GFP-Protein keine spezifische subzelluläre Lokalisation auf; es zeigte im Zellkern wie auch im Zytoplasma eine diffuse Verteilung. Im Gegensatz dazu zeigte das GFP-WIP, neben einer diffusen perinukleären Färbung, eine Verteilung, die der Aktinfärbung stark ähnelt (Abb. 8 C und D), was auf eine Assoziation von GFP-WIP mit dem Aktin-Zytoskelett hindeutete. Um eine Beeinflussung der WIP-Lokalisation in der Zelle durch den GFP-Fusionspartner auszuschließen, wurde die WIP-cDNA mit einem FLAG-Epitop fusioniert. Für die Klonierung von FLAG-WIP wurde ein 2669 bp-PCR-Produkt der Oligonukleotide *Klon 10 PstI-ATG* und *3.7.1 antisense* mit *PstI* und *HindIII* nachgeschnitten und das entstandene 2279 bp-Fragment in den Expressionsvektor pCMV-Tag2C kloniert. Die FLAG-WIP-transfizierten Zellen wurden nach dem Fixieren mit einem anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper angefärbt. Die Aktin-Färbung wurde in diesem Fall mit FITC-Phalloidin durchgeführt. Ebenso wie GFP-WIP zeigt auch FLAG-WIP eine zytoskelett-assoziierte Lokalisation sowie eine schwache diffuse Verteilung im perinukleären Bereich (Abb. 8 E und F).

Eine Deletionsmutante von WIP, bestehend aus den ersten 400 Aminosäuren, wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden *Klon 10 PstI-ATG* und *WIP400-HindIIIrev* amplifiziert und dabei mit einem FLAG-Epitop versehen. Dieser Deletionsmutante fehlen die letzten 87 Aminosäuren und folglich das dritte ABM-2-Motiv (s. 4.1.2.1 und Anhang B). Die Deletionsmutante, bezeichnet als FLAG-WIP400, zeigt eine unbeeinträchtigte Bindung an Aktin-Filamente; darüber hinaus zeigten einige der transfizierten Zellen eine Verdickung der Aktin-Filamente (Abb. 8 G und H). Auch zwei weitere Mutanten von WIP, in denen durch ortsspezifische Mutagenese eine Punktmutation mit den Oligonukleotiden *WIP KLAA for* und *WIP KLAA rev* in das Aktin-Bindemotiv KLKK (s. 4.1.2.1 und Anhang

B; verändert zu KLAA) der Wildtyp-WIP-cDNA bzw. der WIP400-cDNA eingeführt wurde, zeigten eine unveränderte Aktin-Assoziation (nicht abgebildet).

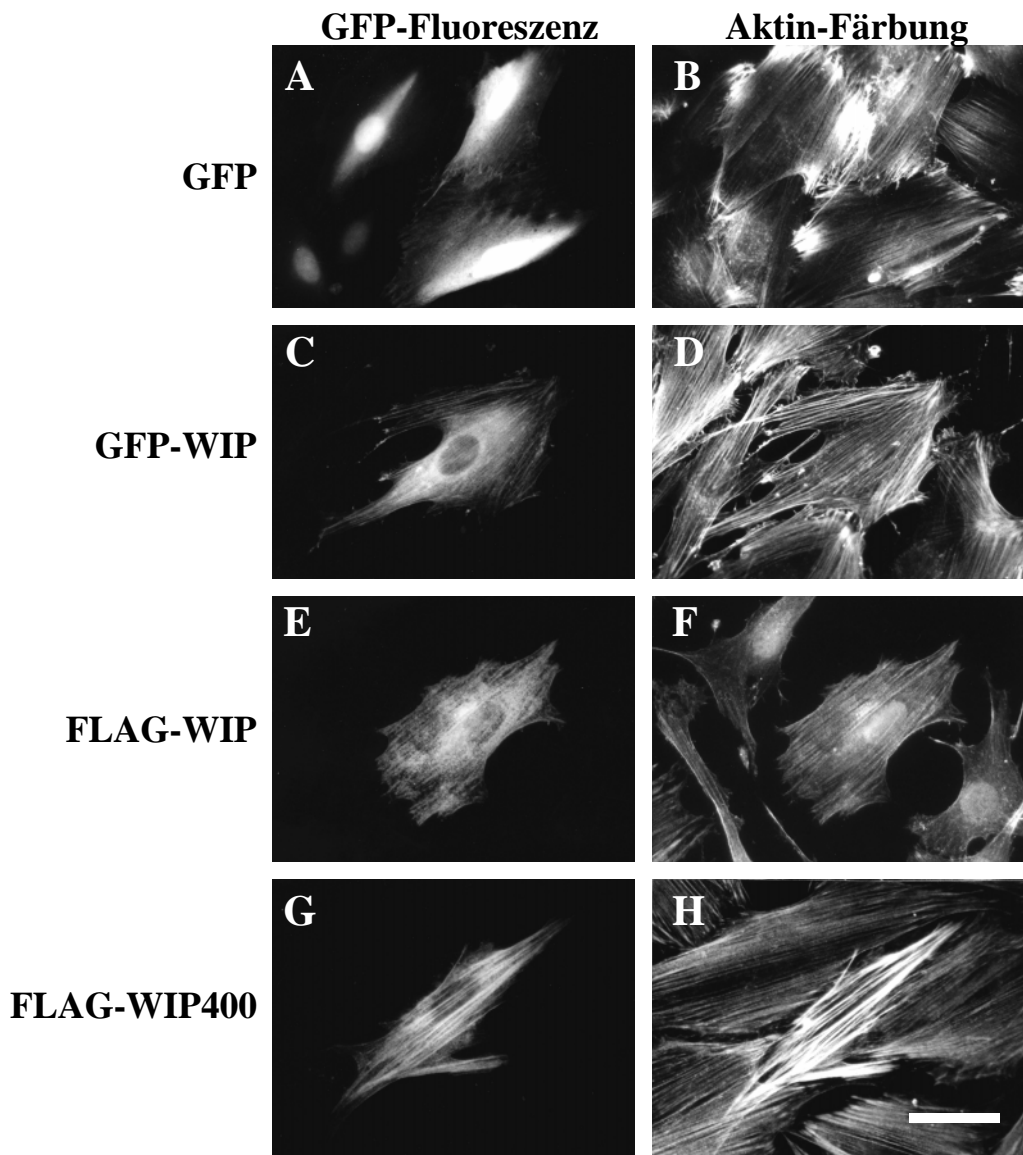


Abb. 8: Subzelluläre Lokalisation des Ratten-WIP in REF52.2-Zellen. REF52.2-Zellen wurden mit dem leeren GFP-Vektor (A und B) oder mit den WIP-Konstrukten GFP-WIP (C und D), FLAG-WIP (E und F) oder der WIP-Deletionsmutante FLAG-WIP400 (G und H) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und entweder durch direkte fluoreszenzmikroskopische Analyse (A-D) oder durch indirekte Immunfluoreszenz nach Anfärbung mit einem anti-FLAG-Antikörper (E-H) analysiert. Links ist jeweils die GFP- bzw. Cy3-Fluoreszenz dargestellt, rechts die dazugehörige Aktin-Färbung. Balken, 10 μ m.

Da die für die Expression von WIP ausgewählten REF52.2-Rattenfibroblasten ein gut ausgeprägtes Zytoskelett besitzen, stellte sich die Frage, welchen Einfluß eine Überexpression von WIP in Zellen haben könnte, die ein nur schwach ausgeprägtes Zytoskelett besitzen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die drei Tumorzelllinien TZ102, TZ103 und TZ107 (Weggen et al., 1997) ausgewählt. Tumorzellen zeigen häufig

Veränderungen in ihrer Zytoskelett-Architektur, die zu erhöhter Mobilität der Zellen oder zur Verringerung der Kontaktinhibition führen können. Zum Vergleich wurde eine embryonale Rattenhirn-Zelllinie, E14-2, herangezogen. Die Expression von GFP-WIP zeigte auch den embryonalen Rattenhirn-Zellen eine deutliche zytoskelett-assoziierte Lokalisation (s. Abb. 9 A und B), wohingegen in der Tumorzelllinie TZ103, die kein ausgeprägtes Aktin-Zytoskelett aufweist, GFP-WIP diffus in der Zelle verteilt war. Der Vergleich mit der Aktin-Färbung der TZ103-Zellen zeigte jedoch, daß GFP-WIP auch in diesen Zellen mit Aktin kolokalisierte, jedoch nur in den Lamellipodien (Abb. 9 C und D, Pfeile). Veränderungen des Zytoskeletts (wie z. B. eine Umstrukturierung) waren durch die WIP-Expression in beiden Zelllinien sowie auch in den Zelllinien TZ102 und TZ107 (nicht abgebildet) allerdings nicht zu beobachten (vgl. die Aktin-Färbung der GFP-WIP-transfizierten Zellen in Abb. 9 B und D), was darauf hindeutet, daß die Expression von WIP allein nicht ausreicht, um eine Umstrukturierung des Zytoskeletts auszulösen.

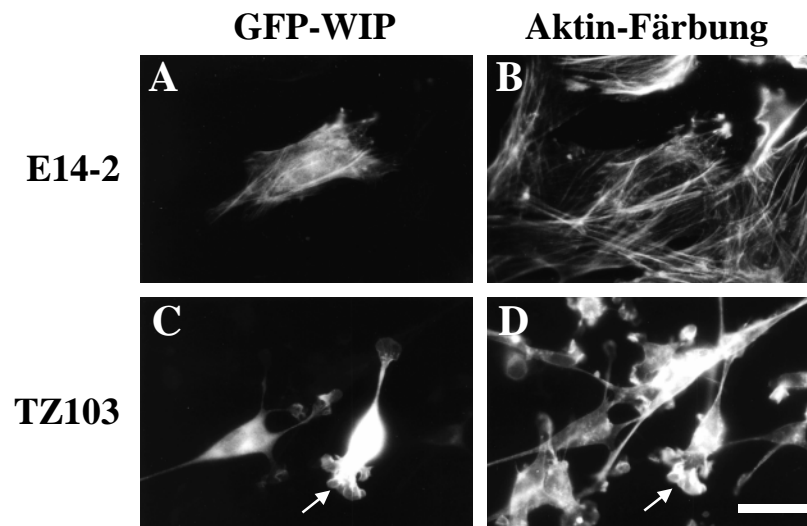


Abb. 9: Ektopische Expression von Ratten-WIP in den Zelllinien E14-2 und TZ103. Die immortalisierte embryonale Rattenhirn-Zelllinie E14-2 (**A** und **B**) sowie die Tumorzelllinie TZ103 (**C** und **D**) wurden mit GFP-WIP transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und einer Aktin-Färbung mit Phalloidin (**B** und **D**) unterzogen. Balken, 10 µm.

4.1.2.6 Triton X-Extraktion von WIP

Um die Stärke der Zytoskelett-Assoziation von WIP zu analysieren, wurden GFP-WIP-transfizierte REF52.2-Zellen für verschiedene Inkubationszeiten (10-60 s) mit 0,2 % Triton X-100 in PEM-Puffer (pH 6,8) behandelt und anschließend fixiert. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse zeigte sich, daß im Gegensatz zu den Kontrollansätzen bereits bei Inkubationszeiten von 10 s keine GFP-WIP-transfizierten

Zellen mehr zu detektieren waren, was auf eine sehr schwache Zytoskelett-Bindung von WIP hindeutet (Daten nicht abgebildet).

4.1.3 WIP und N-WASP interagieren *in vitro* und *in vivo*

4.1.3.1 Nachweis der Interaktion von WIP und N-WASP

Das humane WIP ist in einer Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse als Interaktionspartner des Wiskott Aldrich Synrome-Proteins, WASP, identifiziert worden (Ramesh et al., 1997). Darüber hinaus ist gezeigt worden, daß das humane WIP auch mit dem WASP-Homolog N-WASP (Martinez-Quiles et al., 2001) interagiert. Es war daher von Interesse, ob das Ratten-Ortholog von WIP ebenfalls zur Interaktion mit Proteinen der WASP-Familie fähig ist. Da WASP nur in Lymphgewebe exprimiert wird, wurde für die Untersuchungen das ubiquitär exprimierte N-WASP ausgewählt.

Den beiden Proteinen WIP und N-WASP sind eine Reihe von Sequenz-Homologien und Bindungsmotiven gemeinsam. Die Domänenstrukturen der im folgenden verwendeten WIP- und N-WASP-Konstrukte sind in Abbildung 10 schematisch dargestellt. Ebenso wie WIP besitzt auch N-WASP eine N-terminal lokalisierte Verprolin-Homologie-Domäne (VH). Zusätzlich befindet sich am N-Terminus von N-WASP eine Plektrin-Homologie-Domäne (PH), die mit der VH-Domäne überlappt. Desweiteren befindet sich in der

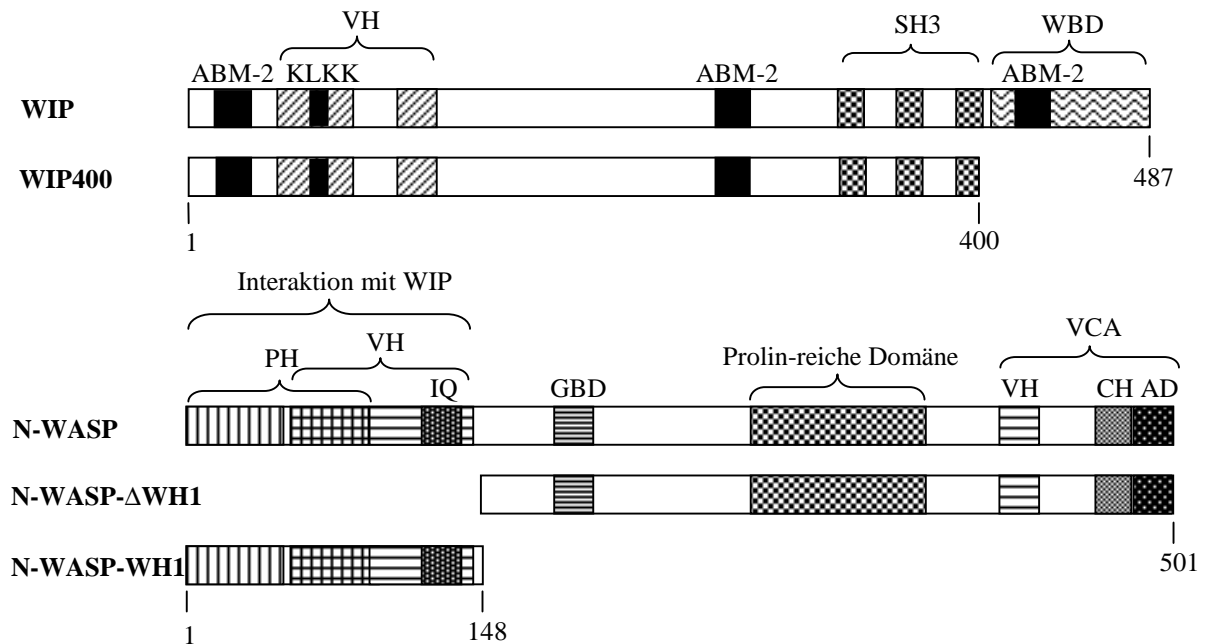


Abb. 10: Schematische Darstellung der Proteindomänen-Struktur von WIP (oben) und N-WASP (unten) sowie einiger Deletionsmutanten. **ABM-2**, Profilin-Bindungsmotiv; **KLKK**, Aktin-Bindungsmotiv; **VH**, Verprolin-Homologie-Domäne; **SH3**, Src-Homologie-Domäne 3; **WBD**, WASP-Bindungsdomäne; **PH**, Plektrin-Homologie-Domäne; **IQ**, Calmodulin-Bindungsmotiv; **GBD**, GTPase-Bindungsdomäne; **CH**, Cofilin-Homologie-Domäne; **AD**, saure Domäne.

N-terminalen VH-Domäne von N-WASP ein Calmodulin-bindendes IQ-Motiv. Die GTPase-Bindungsdomäne (GBD) im mittleren Teil von N-WASP vermittelt die Bindung an die GTPase Cdc42. Im C-terminalen Teil von N-WASP befindet sich eine Prolin-reiche Domäne. Auch WIP besitzt in der gleichen Region drei Prolin-reiche SH3-Motive. Der C-Terminus von N-WASP umfaßt eine weitere VH-Domäne, eine Cofilin-Homologie-Domäne (CH) sowie eine saure Domäne (*acidic domain*, AD), die unter der Bezeichnung VCA (für VH, CH und AD) zusammengefaßt werden. Die VCA-Domäne ist für die Bindung von N-WASP an den Arp2/3-Komplex im Rahmen der N-WASP vermittelten Aktin-Nukleation und -Polymerisation verantwortlich.

Neben der Wildtyp-N-WASP-cDNA wurden in den folgenden Experimenten zwei Mutanten von N-WASP verwendet. Die Deletionsmutante N-WASP- Δ WH1 ist um 148 Aminosäuren eine N-terminal verkürzte Mutante von N-WASP, der die Plektrin-Homologie-Domäne (PH), das Calmodulin-Bindungsmotiv IQ sowie die N-terminale Verprolin-Homologie-Domäne (VH) fehlen. Die entsprechende reziproke Mutante N-WASP-WH1 ist um 353 Aminosäuren C-terminal verkürzt. Sie besteht daher ausschließlich aus Plektrin-Homologie-Domäne (PH), dem Calmodulin-Bindungsmotiv IQ sowie der N-terminalen Verprolin-Homologie-Domäne (VH), während die GTPase-Bindungs-Domäne (GBD), die Prolin-reiche Domäne und die VCA-Domäne fehlen.

Um die Interaktion von WIP und N-WASP nachzuweisen, wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. PC12-Zellen wurden mit FLAG-WIP bzw. als Kontrolle mit dem leeren FLAG-Vektor jeweils allein oder mit N-WASP zusammen transfiziert. Die Immunpräzipitation wurde mit einem anti-FLAG-Antikörper durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und das kopräzipitierte N-WASP durch einen N-WASP-Antikörper nachgewiesen. Die Abbildung 11 A zeigt, daß sowohl in den FLAG-WIP-transfizierten Zellen als auch in den mit FLAG-WIP und N-WASP kotransfizierten Ansätzen N-WASP kopräzipitiert wurde (Abb. 11 A unten, Spuren 1 und 3), während in den Kontrollansätzen, die mit dem FLAG-Vektor transfiziert wurden, kein N-WASP auf dem Western Blot nachweisbar war (Abb. 11 A unten, Spuren 2 und 4). Durch eine Western Blot-Analyse der eingesetzten Zellextrakte mit dem anti-N-WASP-Antikörper wurde sichergestellt, daß in allen Ansätzen N-WASP vorhanden war (Abb. 11 A, oben). Interessanterweise war die Expression von N-WASP in den zusätzlich mit N-WASP transfizierten Zellen nicht höher als die endogene N-WASP-Expression in den untransfizierten Ansätzen (Abb. 11 A oben, vgl. Spuren 1 und 2 mit Spuren 3 und 4). Wahrscheinlich zeigen die in diesem Versuch verwendeten PC12-

Zellen eine hohe endogene N-WASP-Expression, so daß ektopisch transfiziertes N-WASP, möglicherweise auch aufgrund einer geringen Transfektionseffizienz, den N-WASP-Spiegel in den Zellen nicht wesentlich erhöht.

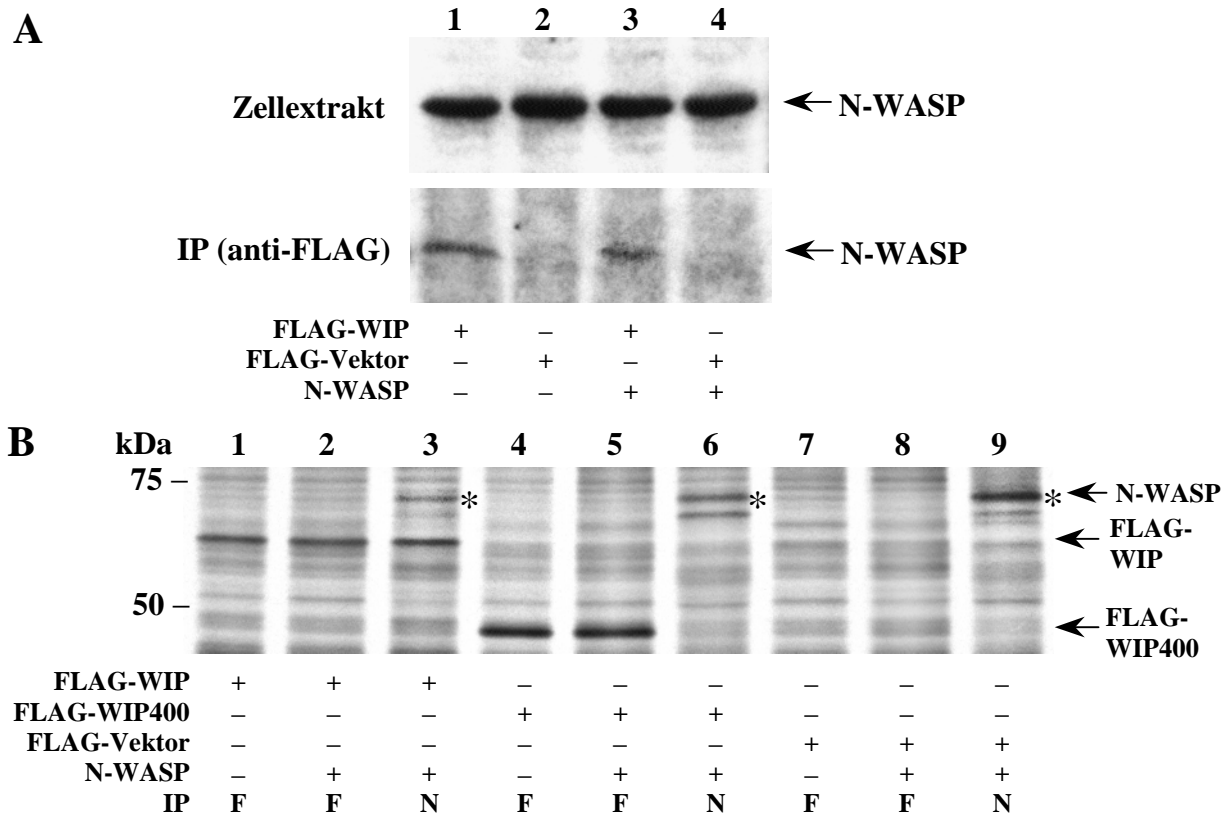


Abb. 11: Koimmunpräzipitation von N-WASP mit FLAG-WIP. **(A)** PC12-Zellen wurden entweder mit FLAG-WIP (Spur 1) oder mit FLAG-WIP und N-WASP (Spur 3) transfiziert. Als Kontrolle dienen entsprechende Ansätze mit dem leeren FLAG-Vektor anstelle von WIP (Spuren 2 und 4). Mit einem anti-N-WASP-Antikörper wurde mittels Western Blot-Analyse das endogene und/oder ektopisch exprimierte N-WASP in den für die IP eingesetzten Zellextrakten (oben) sowie auch das nach der IP mit einem anti-FLAG-Antikörper kopräzipitierte N-WASP (unten) nachgewiesen. **(B)** PC12-Zellen wurden wie unten angegeben transfiziert und anschließend mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert. Es wurden IPs mit Antikörpern gegen FLAG (F) sowie gegen N-WASP (N) durchgeführt. Die Proteinbanden, die N-WASP entsprechen, wurden mit einem Stern (*) markiert.

Die Interaktion von WIP und N-WASP wurde in einem weiteren Versuch bestätigt. PC12-Zellen wurden mit FLAG-WIP, FLAG-WIP400 oder dem leeren FLAG-Vektor transfiziert oder mit einem der genannten Konstrukte und N-WASP kotransfiziert. 42 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit [³⁵S]-Methionin metabolisch markiert und anschließend einer Immunpräzipitation mit dem anti-FLAG-Antikörper bzw. mit einem anti-N-WASP-Antikörper unterzogen. Die Immunpräzipitate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie visualisiert (Abb. 11 B). In dem Immunpräzipitat der N-WASP- und FLAG-WIP-kotransfizierten Zellen mit dem anti-N-WASP-Antikörper ließ sich neben N-WASP auch FLAG-WIP nachweisen (Abb. 11 B, Spur 3). Die

Proteinbanden, die N-WASP entsprechen, wurden in der Abbildung 11 mit einem Stern markiert. FLAG-WIP400, dem die letzten 87 Aminosäuren und damit auch die WASP-Bindedomäne (WBD, s. Abb. 10) fehlen, ließ sich dagegen nicht mit N-WASP kopräzipitieren (Abb. 11 B, Spur 6), was bestätigt, daß die im humanen WIP für die N-WASP-Bindung verantwortliche Region beim Ratten-Ortholog von WIP die gleiche Funktion besitzt. In diesem Versuch gelang es leider nicht, die Koimmunpräzipitation von N-WASP mit FLAG-WIP durch den anti-FLAG-Antikörper nachzuweisen (Abb. 11 B, Spuren 1 und 2).

4.1.3.2 Koexpression von WIP und N-WASP in Säugerzellen

Nachdem die Interaktion von WIP und N-WASP durch Koimmunpräzipitationsversuche nachgewiesen werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob WIP und N-WASP auch unter physiologischen Bedingungen interagieren und welche Konsequenzen eine Interaktion der beiden Proteine in der Zelle hat. Zu diesem Zweck wurde N-WASP allein bzw. mit FLAG-WIP in REF52.2-Zellen transfiziert und 24 h später die Lokalisation der Proteine in der Zelle mittels Immunfluoreszenz-Analyse untersucht. Im Gegensatz zu WIP (Abb. 8, C und E) zeigte N-WASP in REF52.2-Zellen eine überwiegend nukleäre und diffuse perinukleäre Lokalisation (Abb. 12 A, entsprechende Aktin-Färbung in Abb. 12 B). Interessanterweise führt jedoch die Koexpression von WIP und N-WASP zu einer veränderten subzellulären Lokalisation von N-WASP. Eine diffuse perinukleäre Färbung von N-WASP ist auch in diesem Fall zu sehen, der Kern ist jedoch ausgespart. Zusätzlich konnte eine Anfärbung von N-WASP in den Filopodien an der Peripherie der Zelle beobachtet werden (Abb. 12 C, Pfeile). Zudem zeigen WIP und N-WASP eine nahezu vollständige Kolo­kalisierung in den koexprimierenden Zellen (vgl. Abb. 12 C und D). Diese Translokation von N-WASP aus dem Kern ließ sich nicht durch Kotransfektion mit der Mutante FLAG-WIP400 erreichen (Abb. 12 E und F), in der die N-WASP-Interaktionsdomäne deletiert wurde. Um zu bestätigen, daß es sich bei der veränderten subzellulären Lokalisation von N-WASP tatsächlich um einen von WIP ausgelösten Effekt handelt, wurden zwei Deletionsmutanten von N-WASP bei den Transfektionsexperimenten eingesetzt. Die Mutante N-WASP- Δ WH1 ist am N-terminalen Ende um 148 Aminosäuren verkürzt, während die Mutante N-WASP-WH1 nur die Aminosäuren 1- 148 beinhaltet und somit C-terminal deletiert ist.

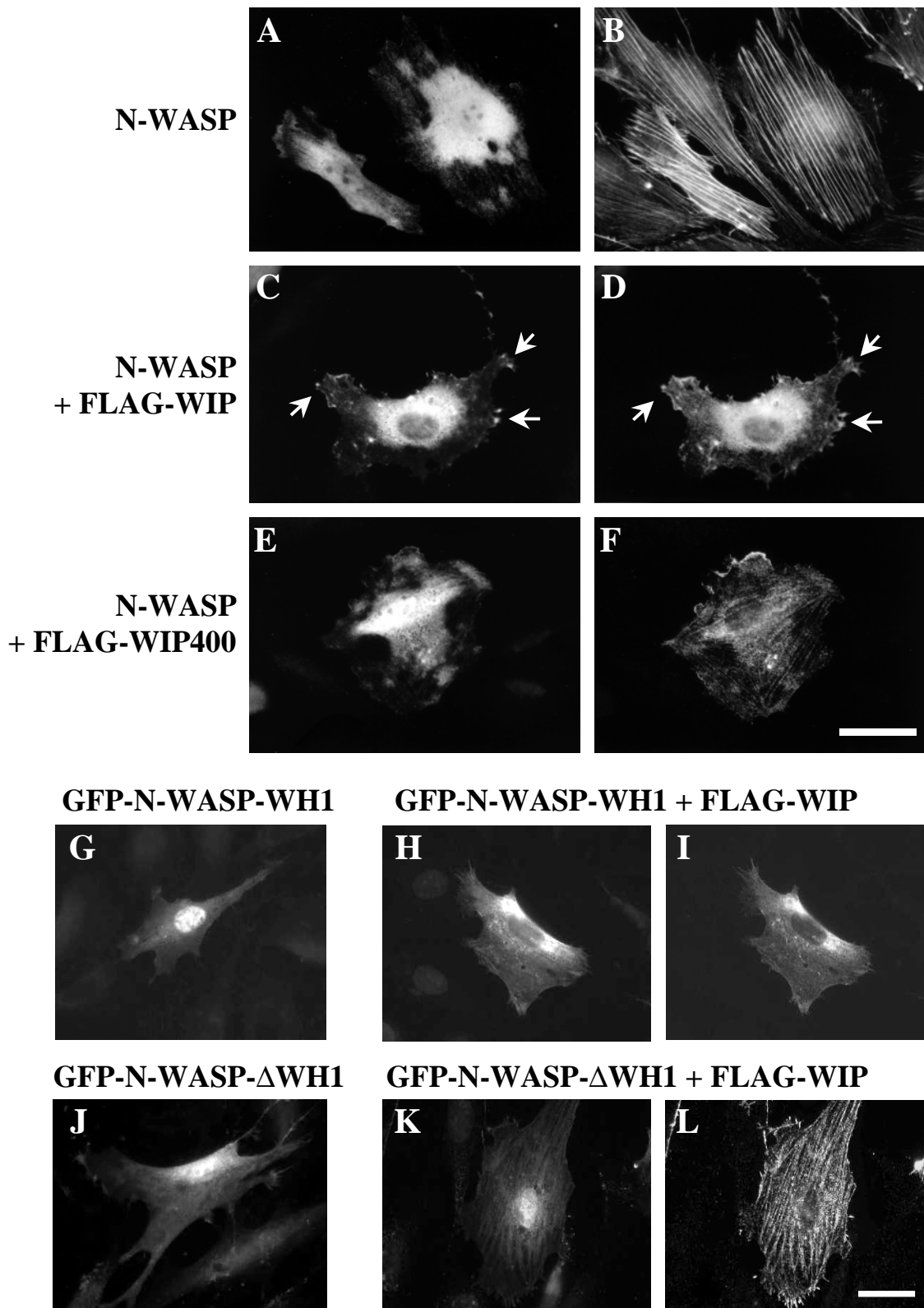


Abb. 12: Koexpression von WIP und N-WASP in REF52.2-Zellen. Oben: Expression von N-WASP allein (A) und die dazugehörige Aktin-Färbung (B); Koexpression von N-WASP (C) und FLAG-WIP (D); Koexpression von N-WASP (E) und FLAG-WIP400 (F). Unten: Expression von GFP-N-WASP-WH1 allein (G) sowie Koexpression von GFP-N-WASP-WH1 (H) und FLAG-WIP (I); Expression von GFP-N-WASP- Δ WH1 allein (J) sowie Koexpression von GFP-N-WASP- Δ WH1 (K) und FLAG-WIP (L). Die Mutanten GFP-N-WASP-WH1 und GFP-N-WASP- Δ WH1 wurden freundlicherweise von Dr. Michael Way (Cancer Research UK, London) zur Verfügung gestellt. Balken, 10 μ m.

Es handelt sich also um zwei reziproke Mutanten, von denen die Mutante N-WASP-WH1 ausschließlich aus der WIP- Bindedomäne von N-WASP besteht (Moreau et al., 2000), wohingegen der Mutante N-WASP- Δ WH1 genau diese WIP-Bindedomäne fehlt. Beide Mutanten zeigen, wenn sie allein exprimiert werden, eine nukleäre Lokalisation (Abb. 12 G und J). Dagegen weist nur N-WASP-WH1, nicht aber N-WASP- Δ WH1, nach Koexpression mit WIP eine zytoplasmatische Verteilung auf (vgl. Abb. 12 H und K). Dieser Befund bestätigt daher die Deutung, daß die beobachtete Translokation von N-WASP tatsächlich durch die Interaktion von WIP und N-WASP ausgelöst wird. Die Aufhebung der Interaktion von WIP und N-WASP durch die Deletion der WIP- bzw. N-WASP-Bindedomänen deutet daraufhin, daß für den Translokationseffekt die direkte Interaktion der beiden Proteine notwendig ist und nicht durch indirekte Bindung über dritte Proteine (wie z. B. Aktin) vermittelt wird. Um auszuschließen, daß es sich bei der Translokation von N-WASP durch Koexpression von WIP um einen Zelltyp-spezifischen Effekt handelt, wurde dieses Experiment in zwei weiteren Zelllinien durchgeführt, der Zelllinie COS-7 (Abb. 13) und der Ratten-Fibroblasten-Zelllinie 208F (Abb. 14). In beiden Zelllinien wurde N-WASP, das allein exprimiert eine deutliche Kernlokalisation aufwies (Abb. 13 C und D bzw. Abb. 14 C und D), durch Koexpression mit WIP aus dem Kern in

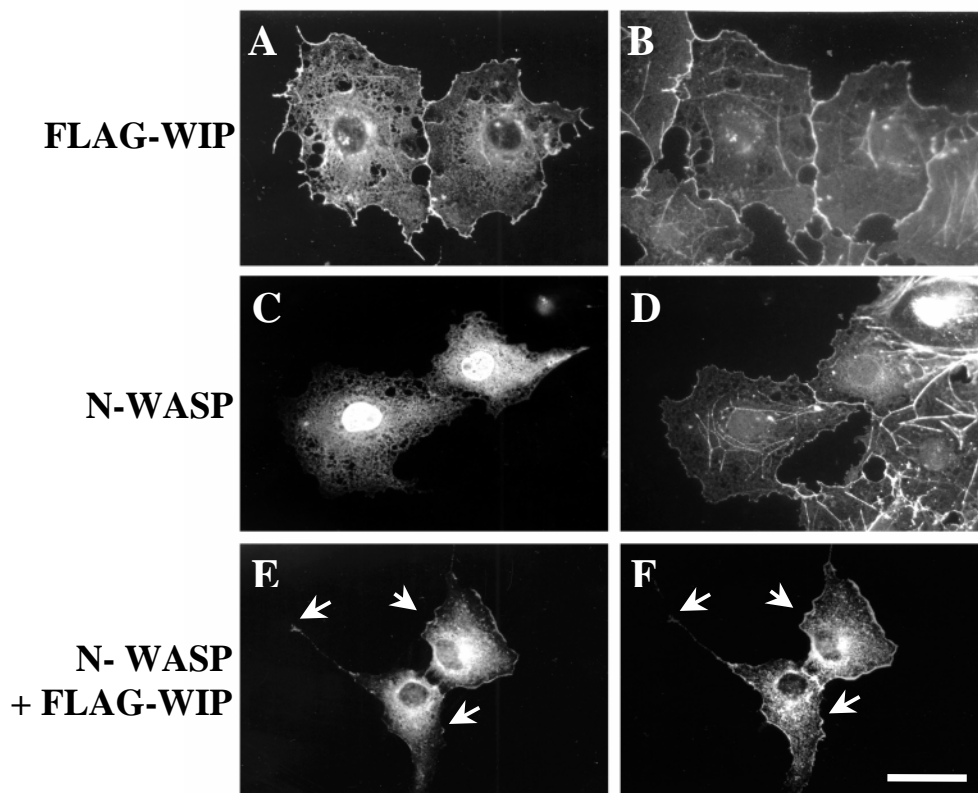


Abb. 13: Koexpression von FLAG-WIP und N-WASP in COS-7-Zellen. Expression von FLAG-WIP (A) mit Aktin-Färbung (B), Expression von N-WASP (C) mit Aktin-Färbung (D), sowie Koexpression von N-WASP (E) und FLAG-WIP (F). Balken, 10 μ m.

das Zytoplasma transloziert, wo es in der Zellperipherie und in den Filopodien nachgewiesen wurde (Abb. 13 E und F bzw. Abb. 14 E und F, Pfeile).

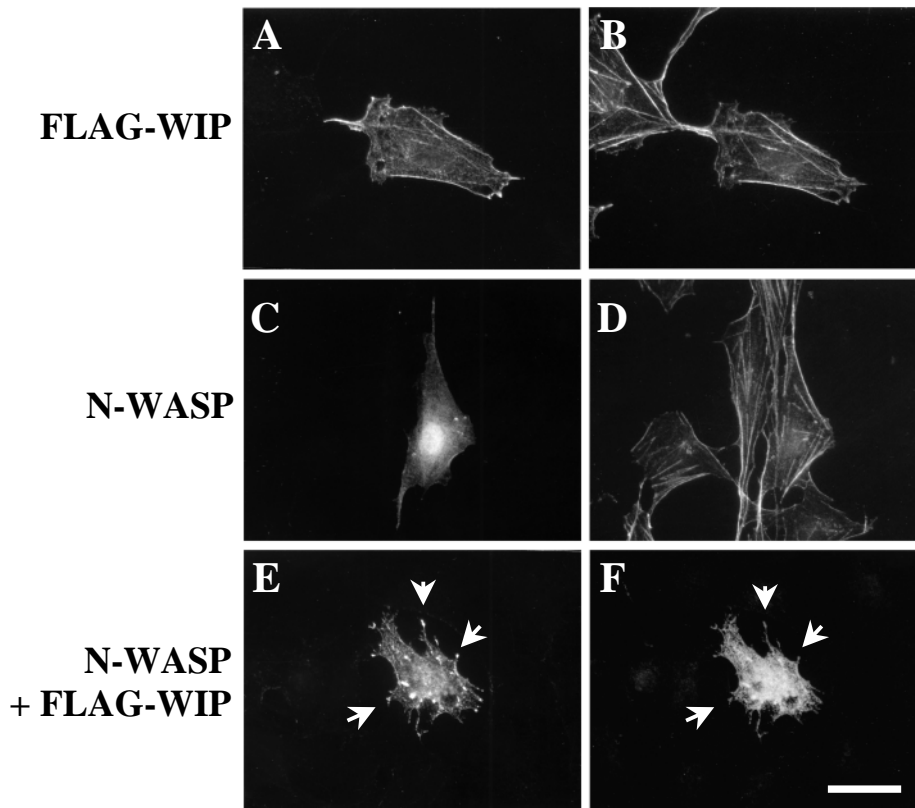


Abb. 14: Koexpression von FLAG-WIP und N-WASP in 208F-Zellen. Expression von FLAG-WIP (A) mit Aktin-Färbung (B), Expression von N-WASP (C) mit Aktin-Färbung (D) sowie Koexpression von N-WASP (E) und FLAG-WIP (F). Balken, 10 μ m.

Die Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation von N-WASP durch die Expression von WIP wurde durch ein Titrations-Experiment verifiziert. Zu diesem Zweck wurden REF52.2- bzw. COS-7-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an WIP-cDNA und N-WASP-cDNA transfiziert. Die Zellen wurden 42 h nach der Transfektion fixiert, immunocytochemisch angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Bei diesem Experiment wurde unter den doppelt-transfizierten Zellen der Anteil der Zellen ermittelt, bei denen N-WASP eine deutliche Kernlokalisierung aufwies. Abbildung 15 zeigt eine graphische Darstellung der Ergebnisse. Es ist deutlich zu sehen, daß mit zunehmender Menge an WIP-cDNA im Transfektionsansatz die Kernlokalisierung von N-WASP abnahm. In beiden Zelllinien sank der Anteil der Zellen, in denen N-WASP im Kern lokalisiert war, von ca. 90 % (Abb. 15, erstes Säulenpaar, N-WASP allein exprimiert) auf ca. 10 % (REF52.2) bzw. ca. 15 % (COS-7) bei einem Verhältnis von WIP-cDNA zu N-WASP-cDNA von 4:1 (Abb. 15, letztes Säulenpaar).

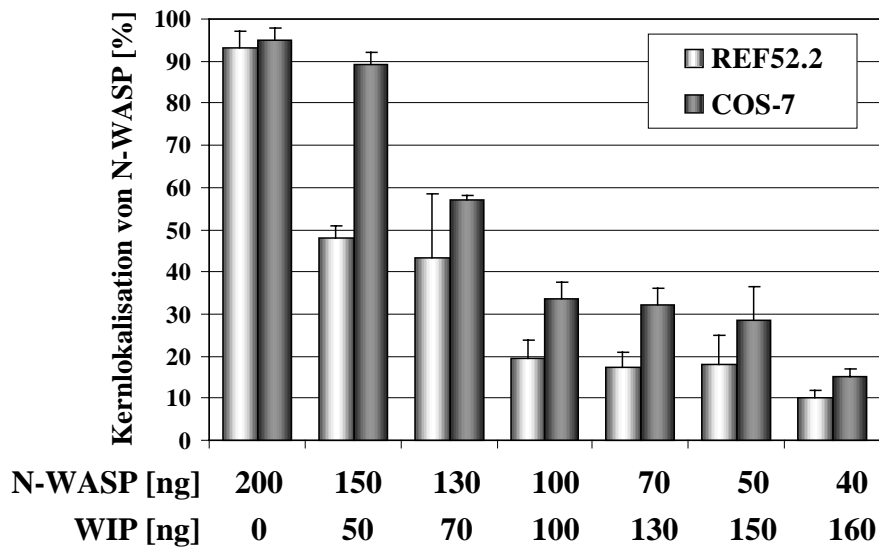


Abb. 15: Koexpression von WIP und N-WASP verändert die subzelluläre Verteilung von N-WASP. REF52.2-Zellen (helle Säulen) bzw. COS-7-Zellen (dunkle Säulen) wurden mit N-WASP allein oder mit N-WASP und GFP-WIP transfiziert, wobei das Verhältnis von WIP-cDNA zu N-WASP-cDNA stufenweise von 1:3 bis 4:1 erhöht wurde. 42 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, durch Immunfärbung mit einem anti-N-WASP-Antikörper angefärbt und zusätzlich einer Kernfärbung mit DAPI unterzogen. In der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurde unter den doppelt-transfizierten Zellen der Anteil der Zellen bestimmt, in denen N-WASP deutlich im Kern detektiert wurde. Der Graph beruht auf Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten, in denen je mindestens 100 Zellen pro Ansatz ausgewertet wurden.

Bei der Kotransfektion von WIP und N-WASP fiel auf, daß sich nicht nur die subzelluläre Lokalisation von N-WASP veränderte, sondern auch die Verteilung von WIP. Während nach alleiniger Expression von WIP eine deutliche Assoziation mit den Aktin-Filamenten in der Zelle nachzuweisen war, konnte nach der Koexpression von N-WASP und WIP sowohl eine perinukleäre Verteilung als auch eine Lokalisation in der Peripherie der Zelle, insbesondere in den Filopodien beobachtet werden. Es stellte sich daher die Frage, ob sich nach Koexpression von N-WASP und WIP die subzelluläre Lokalisation von WIP verändert oder ob die Interaktion der beiden Proteine die zytoskelettäre Architektur der Zelle beeinflusst. Um diese Frage zu klären, wurden REF52.2-Zellen mit FLAG-WIP und N-WASP kotransfiziert, jedoch nur mit einem anti-N-WASP-Antikörper angefärbt. Außerdem wurden die Zellen einer Aktin-Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin unterzogen. Die doppelt-transfizierten Zellen konnten anhand der fehlenden Expression von N-WASP im Zellkern identifiziert werden. Durch die Anfärbung der Aktin-Filamente konnte gezeigt werden, daß die N-WASP- und WIP-koexprimierenden Zellen einer starken Umstrukturierung ihres Zytoskeletts unterlagen, da in diesen Zellen die Spannungsfasern fast vollständig aufgelöst waren; statt dessen wiesen diese Zellen eine Vielzahl von Filopodien auf (s. Abb. 16, C und D).

Es ist bekannt, daß die Bindung des Wachstumsfaktors EGF (*epidermal growth factor*) an den EGF-Rezeptor (eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase) die G-Protein vermittelte Aktivierung von N-WASP auslöst, so daß eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts induziert wird (Miki et al., 1996). Dies trägt dazu bei, daß die Polymerisation von Aktin bevorzugt an der Seite der Zelle erfolgt, die in Richtung eines aufsteigenden Wachstumsfaktor-Gradienten orientiert ist (Sturge et al., 2002). Um zu ermitteln, ob die bei der Koexpression von WIP und N-WASP beobachtete Aktin-Reorganisation mit der durch EGF induzierten, N-WASP vermittelten Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts übereinstimmt, wurden die beiden Effekte durch Immunfluoreszenz-Analysen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, daß N-WASP- und WIP-koexprimierende Zellen die gleichen Umstrukturierungen des Zytoskeletts (Auflösung der Spannungsfasern, Ausbildung von Filopodien) aufwiesen wie N-WASP-exprimierenden Zellen nach EGF-Behandlung, (s. Abb. 16, A und B). Die Ähnlichkeit der Auswirkungen von der Expression von WIP und der Stimulation mit EGF auf das Zytoskelett N-WASP-exprimierender Zellen zeigt, daß sich der N-WASP-vermittelte Signalweg, der zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts führt, offenbar nicht nur durch EGF, sondern auch durch die Koexpression von WIP und N-WASP aktivieren läßt.

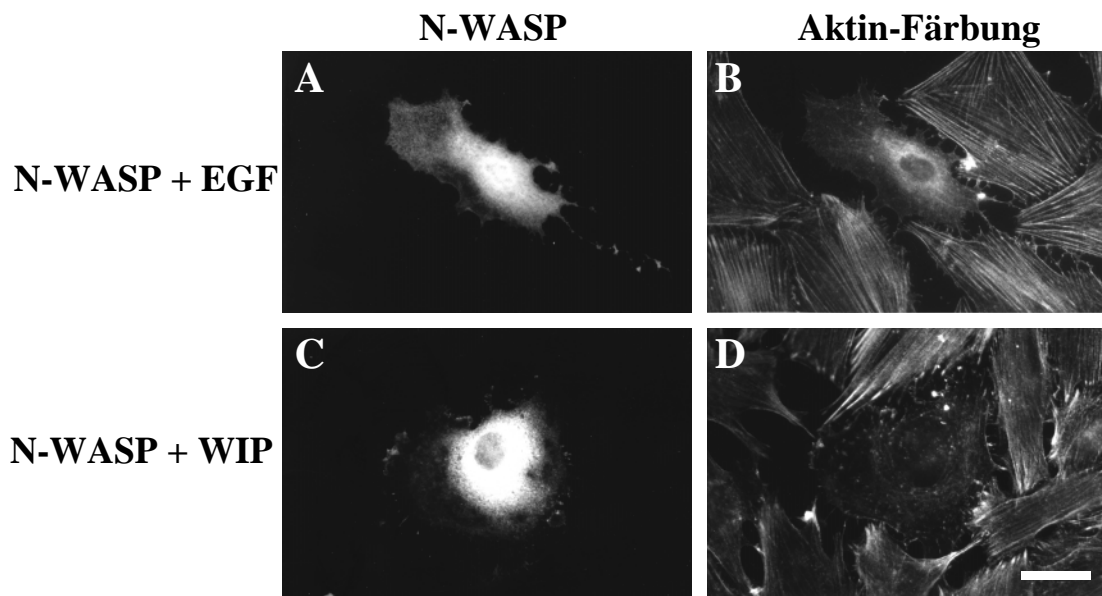


Abb. 16: Einfluß von EGF und WIP auf N-WASP-exprimierende REF 52.2-Zellen. REF52.2-Zellen wurden entweder mit N-WASP transfiziert und mit EGF stimuliert (A und B) oder mit N-WASP und WIP kotransfiziert (C und D). Die Zellen wurden mit einem anti-N-WASP-Antikörper immunzytochemisch angefärbt (A und C) und einer Aktinfärbung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin unterzogen (B und D). Balken, 10 µm.

4.2 Untersuchungen an dem pro-apoptotischen Protein Par-4

Nach der Charakterisierung von WIP und seiner Assoziation mit dem Zytoskelett wurde das pro-apoptotische Protein Par-4 eingehender untersucht, da auch dieses Protein mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert ist. Aufgrund seiner Interaktion mit N-WASP wird WIP mit der Aktin-Polymerisation in Verbindung gebracht, wohingegen die Bedeutung der Aktin-Assoziation für die Funktion von Par-4 noch unklar ist.

Die Proteindomänenstruktur von Par-4 ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt. Par-4 besitzt in seiner N-terminalen Hälfte zwei Kernlokalisationssequenzen (*nuclear localization signals*, NLSs) sowie in seinem C-terminalen Teil eine sogenannte Todesdomäne (*death domain*, DD), die das Protein als pro-apoptotisch wirksam charakterisiert. Innerhalb der Todesdomäne befindet sich außerdem ein Leucin-Zipper-Motiv (LZ), das Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann und wahrscheinlich für die Interaktionen von Par-4 mit seinen Effektorproteinen, wie z. B. Dlk, verantwortlich ist. Da die Signalwege, die nach Expression von Par-4 zur Induktion von Apoptose führen, nur teilweise bekannt sind, sollte zunächst das Protein in der vorliegenden Arbeit eingehender charakterisiert werden.

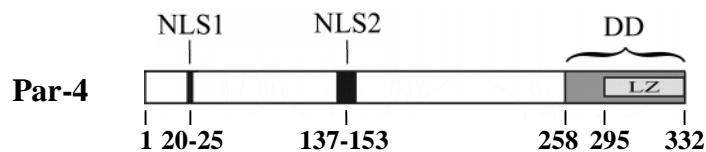


Abb. 17: Proteindomänenstruktur des Ratten-Par-4. Im N-terminalen Teil des Proteins befinden sich zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS1 und NLS2), die sich über die Aminosäuren 20-25 und 137-153 erstrecken. Im C-Terminus von Par-4 befindet sich eine Todesdomäne (DD), die die Aminosäuren 258-332 überspannt und die mit einem Leucin-Zipper-Motiv (LZ, Aminosäuren 295-330) überlappt.

4.2.1 Par-4-Expression im Zellkulturmodell

4.2.1.1 Herstellung von stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien

Die transiente Transfektion von Zellen mit dem Ziel der ektopischen Protein-Expression hat oft den Nachteil, daß nur ein geringer Teil der Zellen transfiziert wird, die transfizierten Zellen dann aber das Zielprotein in hohen, möglicherweise toxischen Mengen exprimieren. Um ein Zellkulturmodell mit homogener und gut nachweisbarer Par-4-Expression für proteinbiochemische Anwendungen zu etablieren, wurde die Ratten-Fibroblasten-Zelllinie REF52.2, die Ratten-Phäochromzytom-Zelllinie PC12 sowie die Hamster-Fibroblasten-Zelllinie CHO stabil mit einem Par-4-GFP-Fusionskonstrukt, das im Rahmen der Diplomarbeit von Meike Boosen hergestellt wurde (Boosen, 2001), transfiziert. Dabei konnten

jedoch nur von den CHO-Zellen stabile Zelllinien etabliert werden, obwohl die Expression von Par-4 in diesen Zellen ohne weitere apoptotische Stimuli innerhalb von 24 h zu einer Apoptoserate von 30-40 % führt (Daten nicht gezeigt). Von den stabilen Zelllinien wurden nur diejenigen ausgewählt, die nach der Immunfluoreszenz-Analyse eine homogene Expression von Par-4-GFP zeigten. Durch Western Blot-Analysen mit einem polyklonalen Par-4-Antikörper wurde die Expressionsstärke der verschiedenen stabilen Zelllinien untereinander verglichen (Abb. 18). Die endogene Par-4-Expression konnte mit dem verwendeten Antikörper weder in den CHO wt-Zellen noch in den unabhängig voneinander isolierten Zelllinien A3, A6, B5, A6-3, D3-3 und D3-8 nachgewiesen werden. In den stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien wurde jedoch eine deutliche Protein-Bande bei 65 kDa detektiert, die dem Fusionsprotein Par-4-GFP entspricht (Abb. 18 oben, Spuren 2 bis 7). Die ektopische Par-4-Expression war in den stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien etwa gleich stark; lediglich die Zelllinien D3-3 und D3-8 zeigten eine etwas schwächere Par-4-GFP-Expression. Um nachzuweisen, daß in allen Spuren die gleiche Proteinmenge auf das Gel aufgetragen wurde, wurde die Western Blot-Membran regeneriert und einer Immunfärbung mit einem monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörper unterzogen (Abb. 18, unten).

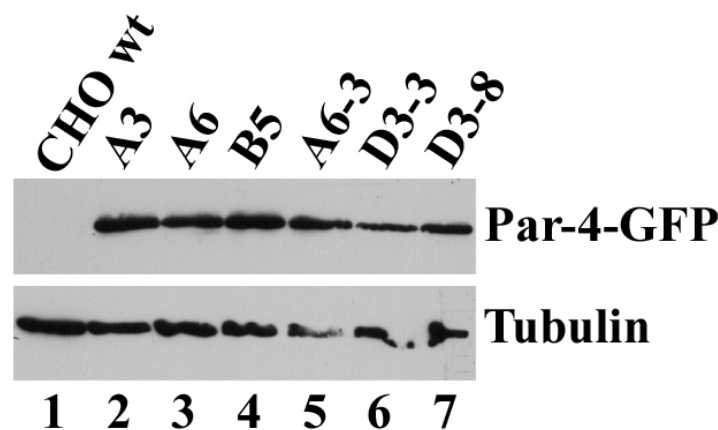


Abb. 18: Western Blot-Analyse der stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien. Die Gesamtzellextrakte von CHO wt-Zellen sowie von den stabil mit Par-4-GFP transfizierten Zelllinien A3, A6, B5, A6-3, D3-3 und D3-8 wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Par-4-GFP (65 kDa) wurde durch einen polyklonalen anti-Par-4-Antikörper nachgewiesen (oben). Der gleichmäßige Proteingehalt der Zellextrakte in den jeweiligen Spuren wurde durch eine weitere Western Blot-Analyse der gleichen Membran mit einem monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörper sichergestellt (unten).

4.2.1.2 Verringerung der Apoptose-Induktion in stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien

Im Rahmen der Charakterisierung der stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien wurde untersucht, ob in den verschiedenen Zelllinien durch Koexpression des Par-4-Interaktions-

partners Dlk Apoptose ausgelöst wird. In den bisher in dieser Hinsicht untersuchten Zelllinien (REF52.2-Ratten-Fibroblasten und NIH3T3-Maus-Fibroblasten) führte die gleichzeitige Expression von Par-4 und seinem Interaktionspartner Dlk zur Relokalisation der normalerweise kernständigen Kinase in das Zytoplasma und zur Kolokalisation mit Par-4 entlang von Spannungsfasern (Page et al., 1999). Weiterhin wurden starke Kontraktionen des Zytoskeletts beobachtet. Die Koexpression beider Proteine führte schließlich zum Zelltod. Um zu überprüfen, ob diese Effekte auch in den stabilen Par-4-GFP-exprimierenden CHO-Zelllinien auftreten, wurden die Zellen mit einem FLAG-Dlk-Konstrukt transfiziert. Als Kontrolle wurden CHO wt-Zellen mit Par-4-GFP-cDNA und FLAG-Dlk-cDNA transfiziert, wobei hier das Verhältnis der cDNA-Mengen 3:1 betrug, da bereits gezeigt wurde, daß bei diesem Verhältnis der cDNA-Mengen die höchste Apoptoserate zu erwarten war (Page et al., 1999). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper sowie mit DAPI angefärbt, um die Kerne der Zellen anzufärben. Durch anschließende fluoreszenzmikroskopische Analysen wurden die Apoptoseraten der transfizierten Zellen bestimmt, wobei morphologische Merkmale der Apoptose (Chromatinkondensation, Kernfragmentierung, Blasenbildung der Zytoplasmamembran) zur Beurteilung der Zellen herangezogen wurden. Das Ergebnis des Experiments ist in Abbildung 19 graphisch dargestellt. Interessanterweise war in den stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu den CHO wt-Zellen generell eine deutliche Verringerung der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose zu beobachten. Während bei CHO wt-Zellen die Apoptose-Induktion durch Koexpression von Par-4-GFP und FLAG-Dlk in einer Apoptoserate von etwa 50-60 % resultierte (Abb. 19, Säule 1), erreichten die stabilen Par-4-Zelllinien A3, A6 und D3-3 nach Expression von FLAG-Dlk lediglich eine Rate von etwa 40 % an apoptotischen Zellen (Abb. 19, Säule 2, Säule 3 und Säule 6), und in den Zelllinien B5 und D3-8 konnte nur 30-35 % apoptotische Zellen detektiert werden (Abb. 19, Säule 4 und Säule 7). Lediglich die stabile Par-4-GFP-exprimierende Zelllinie A6-3 zeigte nach Expression von FLAG-Dlk eine mit den CHO wt-Zellen vergleichbare Apoptoserate von ca. 50 % (Abb. 19, Säule 5).

Da offenbar die Induktion der Apoptose durch Koexpression von Par-4 und Dlk in den stabilen Par-4-GFP-exprimierenden CHO-Zelllinien weniger effizient war als in CHO wt Zellen, wurde nun untersucht, ob in den stabilen Zelllinien generell ein Apoptosedefekt vorlag. Die Zelllinien CHO wt, A3, A6, B5, A6-3, D3-3 und D3-8 wurden daher einer Apoptose-Induktion durch Behandlung mit Staurosporin (STS, 5 h, 200 nM) unterzogen.

Staurosporin, ein Alkaloid aus dem Bakterium *Streptomyces staurospores*, wirkt als nicht-selektiver Breitband-Kinase-Inhibitor und inhibiert u. a. die Proteinkinase A (PKA), die Proteinkinase C (PKC), die Proteinkinase G (PKG) sowie Kalzium-Calmodulin-abhängige Kinasen wie die MLCK (*myosin light chain kinase*). Somit interferiert Staurosporin mit einer großen Anzahl verschiedener Signaltransduktionswege, wodurch in den meisten Zelltypen Apoptose ausgelöst wird. Die Zellen wurden nach der Staurosporin-Behandlung fixiert und einer DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung durch fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, daß sowohl bei den CHO wt-Zellen als auch bei den stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien gleichermaßen morphologische Merkmale der Apoptose, wie Kernfragmentierung und Blasenbildung der Zytoplasmamembran, ausgeprägt waren (nicht abgebildet).

Um die apoptotische DNA-Fragmentierung nachzuweisen, wurde aus den gleichen Zelllinien nach Staurosporin-Behandlung nach der Methode von Arad (Arad, 1998) niedermolekulare DNA präpariert und durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, mit denen ebenso verfahren wurde wie mit den Staurosporin-behandelten Zellen. Das in Abbildung 20 dargestellte Ergebnis zeigt, daß in den CHO wt-Zellen nach Staurosporin-Behandlung eine deutliche DNA-Fragmentierung, wie sie für apoptotische Zellen charakteristisch ist, auftrat (Abb. 20, Spur 2). Auch in den stabilen Zelllinien A3, A6 und A6-3 konnten die Apoptose-spezifische DNA-Fragmentierung, die sogenannte „DNA-Leiter“, nachgewiesen werden (Abb. 20, Spuren 4, 6 und 10), wobei die Intensität der Färbung in der Zelllinie A6 deutlich schwächer war als in CHO wt-Zellen (Abb. 20, Spur 6, vgl. Spur 2). In den Zelllinien B5, D3-3 und D3-8 konnte nur eine sehr schwache apoptotische DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden

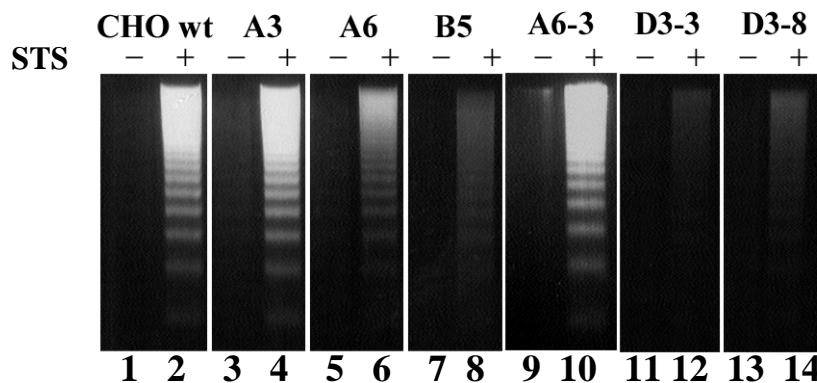


Abb. 20: Nachweis der apoptotischen DNA-Fragmentierung („DNA-Leiter“) in CHO wt-Zellen und in den stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien A3, A6, B5, A6-3, D3-3 und D3-8. Vor der Präparation der niedermolekularen DNA nach der Methode von Arad (ARAD, 1998) wurden die Zellen zur Apoptose-Induktion für 5 h mit 200 nM Staurosporin (STS) behandelt (+) oder unbehandelt belassen (-). Die Analyse der apoptotischen DNA-Fragmentierung erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

(Abb. 20, Spuren 8, 12 und 14), die sich kaum von den mitgeführten Kontrollansätzen ohne Staurosporin-Behandlung (Abb. 20, Spuren 7, 11 und 13) unterschied.

Die fehlende Ausbildung der apoptotischen DNA-Fragmentierung deutete darauf hin, daß in den stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien B5, D3-3 und D3-8 ein Defekt in einem Apoptose-Signalweg vorliegen könnte. Da einer der Signalwege, die zur apoptotischen DNA-Fragmentierung führen, die Aktivierung der Caspase-3 beinhaltet, wurde die proteolytische Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), einem Caspase-3-spezifischen Substrat, in den stabilen Zelllinien untersucht. Das Protein PARP ist ein DNA-Reparaturenzym mit einer molekularen Masse von 116 kDa, das während der Apoptose durch die Caspase-3 in zwei Fragmente von 89 kDa und 24 kDa gespalten wird. Das gesamte Protein sowie seine proteolytischen Fragmente können durch Western Blot-Analyse nachgewiesen werden. CHO wt-Zellen und die Zelllinien A3, A6, B5, A6-3, D3-3 und D3-8 wurden wie zuvor beschrieben für 5 h mit 200 nM Staurosporin behandelt. Es wurden anschließend Zellextrakte präpariert, und das Protein PARP wurde durch Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen anti-PARP-Antikörper detektiert. Das Ergebnis der Western Blot-Analyse ist in Abbildung 21 dargestellt. Bei den STS-behandelten CHO wt-Zellen war neben der Bande bei 116 kDa auch eine deutliche Bande bei 89 kDa zu sehen, die das größere PARP-Spaltungsprodukt darstellt (Abb. 21, Spur 2). Bei den unbehandelten CHO wt-Zellen dagegen war diese 89 kDa-Proteinbande nicht nachzuweisen (Abb. 21, Spur 1). Das 89 kDa-PARP-Fragment konnte desweiteren nach STS-Behandlung in den Zelllinien A3, A6 und A6-3 detektiert werden (Abb. 21, Spuren 3, 4 und 6), während es in den Zelllinien B5, D3-3 und D3-8 kaum nachweisbar war (Abb. 21, Spuren 5, 7 und 8), wobei jedoch bei der Zelllinie B5 auch das 116 kDa-Fragment weniger stark ausgeprägt

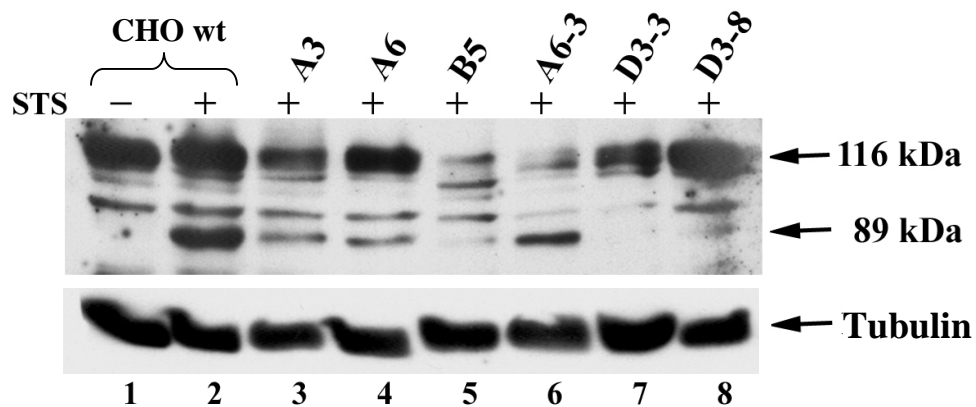


Abb. 21: Western Blot-Analyse der PARP-Spaltung in den stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien. Nach Staurosporin-Behandlung (5 h, 200 nM) wurden Zellextrakte von CHO wt-Zellen sowie von den stabilen Par-4-Zelllinien A3, A6, B5, A6-3, D3-3 und D3-8 hergestellt, durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis des PARP-Proteins erfolgte durch Immunfärbung der Membran mit einem polyklonalen anti-PARP-Antikörper.

war. Die verringerte Spaltung des Proteins PARP nach Apoptose-Induktion durch STS bestätigte die Vermutung, daß die stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien Defekte in apoptotischen Signalwegen aufweisen, an denen Par-4 beteiligt ist. Da die Expression von Par-4 in CHO-Zellen ohne weitere apoptotische Stimuli Apoptose auslöst, wäre es denkbar, daß eine verringerte Sensitivität gegenüber der Par-4-induzierten Apoptose während der Etablierung der stabilen Zelllinien zu einem Wachstumsvorteil geführt hat. Da auch Tumorzellen häufig durch verringerte Sensitivität gegenüber Apoptose-auslösende Signale einen Wachstumsvorteil erlangen, ist es möglich, daß die Apoptose-Resistenz von Tumorzellen durch Defekte der Par-4-vermittelten apoptotischen Signalwege erreicht oder unterstützt werden kann. Es wurde daher in den nachfolgenden Experimenten untersucht, ob die Ausschaltung von Par-4 oder der Par-4-vermittelten Signalwege bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen könnte.

4.2.3 Endogene und ektopische Expression von Par-4 in Gehirntumorzelllinien

4.2.3.1 Endogene Par-4-Expression in Gehirntumorzelllinien

Die Expression von Par-4 ist in verschiedenen Tumor-Arten, wie z. B. Renalkarzinom, Melanom, Prostata-Karzinom und Lymphom, herunterreguliert (Cook et al., 1999; Boehrer et al., 2001; Lucas et al., 2001; Chakraborty et al., 2001). Andererseits ist in einigen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinson-Krankheit und der Alzheimer-Krankheit eine erhöhte Expression von Par-4 festgestellt worden (Guo et al., 1998; Duan et al., 1999). Um der Frage nachzugehen, ob eine verringerte Expression von Par-4 auch eine Rolle bei der Entwicklung von Tumoren des Nervensystems spielt, wurde eine Reihe verschiedener neuronaler Tumorzelllinien auf ihre Par-4-Expression analysiert. Hierfür wurden drei PNET-Zelllinien der Ratte (TZ102, TZ103 und TZ107; (Weggen et al., 1997), drei humane Gliomzelllinien (A172, U87-MG und U251-MG), eine Ratten-Gliomzelllinie (C6), zwei Neuroblastomzelllinien humanen (SH-SY5Y) und murinen (N2A) Ursprungs sowie eine humane Medulloblastomzelllinie (D283-Med) ausgewählt. Als Kontrollzelllinien dienten die embryonale Rattenhirn-Zelllinie E14-2 sowie die humane Lungenfibroblasten-Zelllinie IMR-90. Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 1 unter Angabe ihrer wichtigsten Eigenschaften aufgeführt.

Tab. 1: Ausgewählte Zelllinien für die in den Abschnitten 4.2.3 f. durchgeführten Experimente.

Zelllinie	Histologische Herkunft	Transformationsstatus	Spezies
E14-2	Gehirn	SV40-immortalisiert	Ratte
IMR-90	Lungen-Fibroblasten	normal	Mensch
TZ102	PNET	SV40-transformiert	Ratte
TZ103	PNET	SV40-transformiert	Ratte
TZ107	PNET	SV40-transformiert	Ratte
N2A	Neuroblastom	transformiert	Maus
SH-SY5Y	Neuroblastom	transformiert	Mensch
D283-Med	Medulloblastom	transformiert	Mensch
C6	Gliom	transformiert	Ratte
A172	Gliom	transformiert	Mensch
U87-MG	Gliom	transformiert	Mensch
U251-MG	Gliom	transformiert	Mensch

In den beiden Kontrollzelllinien E14-2 und IMR-90 sowie in den in Tabelle 1 aufgeführten Gehirntumorzelllinien wurde mittels RT-PCR die Par-4-mRNA-Expression analysiert. Dazu wurde die Gesamt-RNA der Zellen präpariert, diese unter Verwendung der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und schließlich einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden *5'Par-4 mutT155* und *Par-4 775-795 rev* unterzogen. Als interner Abgleich wurde im gleichen Ansatz eine PCR-Reaktion mit den GAPDH-Oligonukleotiden *rat GAPDH for* und *rat GAPDH rev* durchgeführt, wobei ein DNA-Fragment von 309 bp amplifiziert wurde. Interessanterweise war in der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y sowie in der Gliom-Zelllinie C6 kein Par-4-Transkript nachweisbar (Abb. 22 B, Spuren 6 und 8), da kein PCR-Produkt der erwarteten Größe von 246 bp amplifiziert wurde. Auch bei alleiniger Amplifikation von Par-4 (ohne gleichzeitige GAPDH-Amplifikation) konnte kein Par-4-Produkt erhalten werden (Daten nicht gezeigt). In der PNET-Zelllinie TZ102 und in der Gliom-Zelllinie U87-MG konnte nur eine schwache Expression des Par-4-Transkripts festgestellt werden (Abb. 22 A, Spur 2, und Abb. 22 B, Spur 10). In allen anderen Zelllinien konnte ein deutliches Par-4-Transkript nachgewiesen werden. Am stärksten war die Par-4-mRNA-Expression in der Kontroll-Zelllinie E14-2 sowie in der Gliom-Zelllinie A172 (Abb. 22 A, Spur 1 und Abb. 22 B, Spuren 3 und 9). Der Abgleich mit GAPDH (Abb. 22 A und B, obere Bande) zeigte, daß in allen Ansätzen vergleichbare mRNA-Konzentrationen vorlagen.

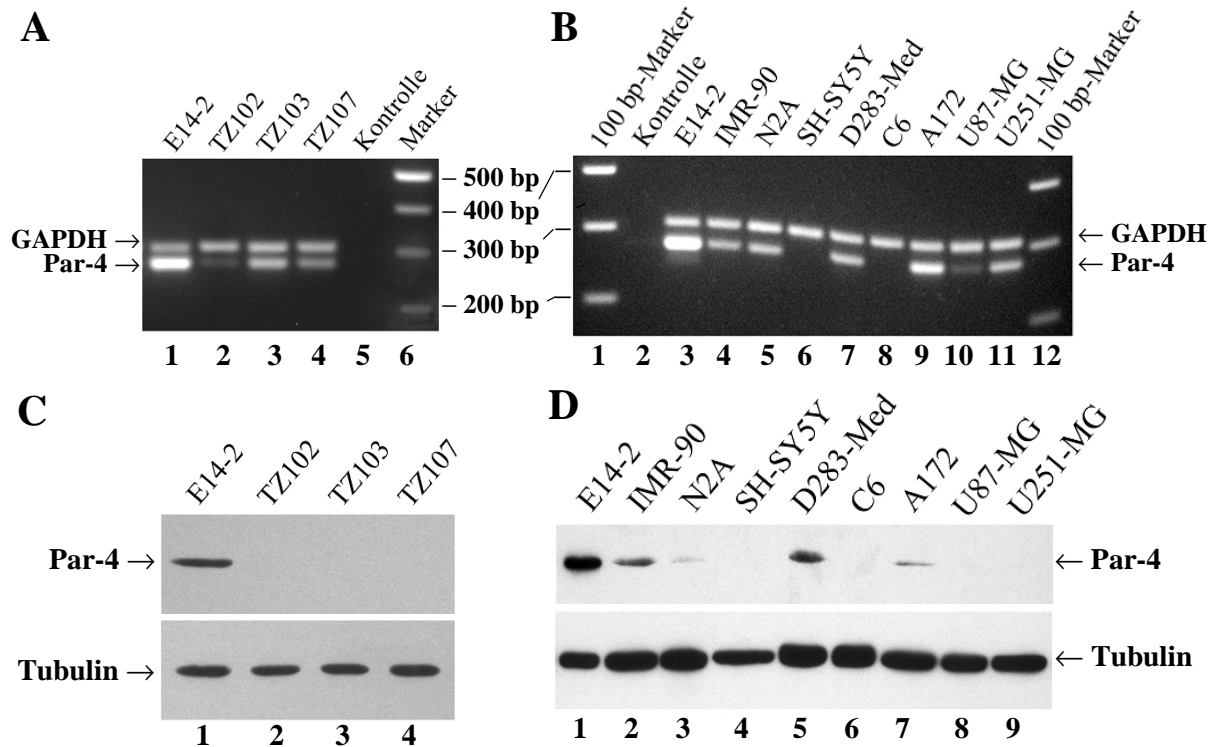


Abb. 22: Endogene Par-4-Expression in verschiedenen Gehirntumorzelllinien. (**A und B**) RT-PCR-Analyse der Par-4-mRNA-Expression. Aus den Gehirntumorzelllinien TZ102, TZ103, TZ107, N2A, SH-SY5Y, D283-Med, C6, A172, U87-MG und U251-MG sowie aus den Kontrollzelllinien E14-2 und IMR-90 wurde Gesamt-RNA präpariert, in cDNA umgeschrieben und einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse mit Par-4-spezifischen sowie GAPDH-spezifischen Oligonukleotiden unterzogen. Die amplifizierten Produkte wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. (**C und D**) Western Blot-Analyse der Par-4-Protein-Expression. Zellextrakte aus den Gehirntumorzelllinien TZ102, TZ103, TZ107, N2A, SH-SY5Y, D283-Med, C6, A172, U87-MG und U251-MG sowie aus den Kontrollzelllinien E14-2 und IMR-90 wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper unterzogen (oben). Zum Abgleich der Proteinmengen wurde die Membran mit einem monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörper gefärbt (unten).

Um zu überprüfen, ob die Protein-Expression von Par-4 mit der mRNA-Expression korrelierte, wurde die Expression des Par-4-Proteins in den verschiedenen Tumorzelllinien durch Western Blot-Analyse mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper untersucht (Abb. 22 C und D, oben). Interessanterweise zeigte neben den Kontrollzelllinien E14-2 und IMR-90 (Abb. 22 C oben, Spur 1 und Abb. 22 D, Spuren 1 und 2) nur die Medulloblastomzelllinie D283-Med eine deutliche Expression von Par-4 (Abb. 22 D oben, Spuren 1, 2 und 5), während in allen anderen Tumorzelllinien nur eine sehr schwache oder gar keine Par-4-Expression nachweisbar war. Auch in den PNET-Zelllinien TZ102, TZ103 und TZ107 und den humanen Gliom-Zelllinien U87-MG und U251-MG konnte keine Expression des Par-4-Proteins detektiert werden (Abb. 22 C oben, Spuren 2-4 und Abb. 22 D oben, Spuren 8 und 9), obwohl in diesen Zelllinien die Expression von Par-4-mRNA nachgewiesen werden konnte (Abb. 22 A oben, Spuren 2-4 und Abb. 22 B oben, Spuren 10 und 11). In diesen Zelllinien gibt es also eine große Diskrepanz zwischen der Expression

von Par-4 auf mRNA- und Proteinebene. In der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y und der Ratten-Gliomzelllinie C6 konnte keine Par-4-Proteinexpression nachgewiesen werden (Abb. 22 D oben, Spuren 4 und 6), da in diesen Zelllinien auch keine Par-4-mRNA-Expression detektiert werden konnte (Abb. 22 B oben, Spuren 6 und 8). Der Abgleich der Proteinmengen, der mit einem monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörper durchgeführt wurde, zeigte, daß in allen Spuren etwa gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden (Abb. 22 C und D, unten). Zusammengenommen zeigt die Mehrzahl der untersuchten Tumorzelllinien keine oder nur eine sehr schwache Expression von Par-4 auf Proteinebene; nur in der Medulloblastomzelllinie D283-Med konnte eine deutliche Par-4-Protein-Expression nachgewiesen werden.

4.2.3.2 Induktion von Apoptose in verschiedenen Gehirntumorzelllinien durch ektope Expression von Par-4

Da Par-4 ein pro-apoptotisches Protein darstellt, liegt die Vermutung nahe, daß die Herunterregulation der Par-4-Expression zur Tumorentstehung beigetragen haben könnte. Um zu prüfen, ob die Reexpression von Par-4 in den Tumorzelllinien zur Auslösung von Apoptose führt, wurden die verschiedenen Tumorzelllinien mit Par-4-GFP transfiziert und auf morphologische Merkmale der Apoptose untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 graphisch dargestellt. Die ektope Expression von Par-4-GFP führte in den Tumorzelllinien TZ102, TZ107, N2A, SH-SY5Y, C6 und U87-MG zu hohen Apoptoseraten von 50-80 % (Abb. 23, helle Säulen), während die Rate apoptotischer Zellen in den Kontrollzelllinien E14-2 und IMR-90 mit 15-28 % vergleichsweise gering war (Abb. 23, helle Säulen). Auch die Zelllinien TZ103, A172, D283-Med und U251-MG zeigten nach Par-4-GFP-Expression geringe Apoptoseraten von 20-40 % (Abb. 23, helle Säulen). In diesem Experiment konnte eine negative Korrelation zwischen der endogenen Par-4-Expression und der Sensitivität gegenüber ektope exprimiertem Par-4-GFP festgestellt werden: In den Tumorzelllinien, die die höchsten Apoptoseraten nach ektope Par-4-GFP-Expression zeigten (Zelllinien TZ102, TZ107, N2A, SH-SY5Y, C6 und U87-MG; Abb. 23, helle Säulen), war kein oder nur wenig endogenes Par-4-Protein nachweisbar (s. Abb. 22 C, Spuren 2 und 4, und Abb. 22 D, Spuren 3, 4, 6 und 8). Dagegen zeigten die Zelllinien E14-2, IMR-90, D283-Med und A172, in denen die ektope Expression von Par-4-GFP nur zu geringen Apoptoseraten von 15-30 % führte (Abb. 23, helle Säulen), in der Western Blot-Analyse eine deutliche Expression von endogenem Par-4-Protein (Abb. 22 C, Spur 1 und Abb. 22 D, Spuren 1, 2, 5 und 7). Durch die Expression des leeren

GFP-Vektors als Kontrolle, die nur zu geringen Apoptoseraten von 2-11 % führte, konnte ein toxischer Effekt des Transfektionsprozesses an sich ausgeschlossen werden (Abb. 23, dunkle Säulen).

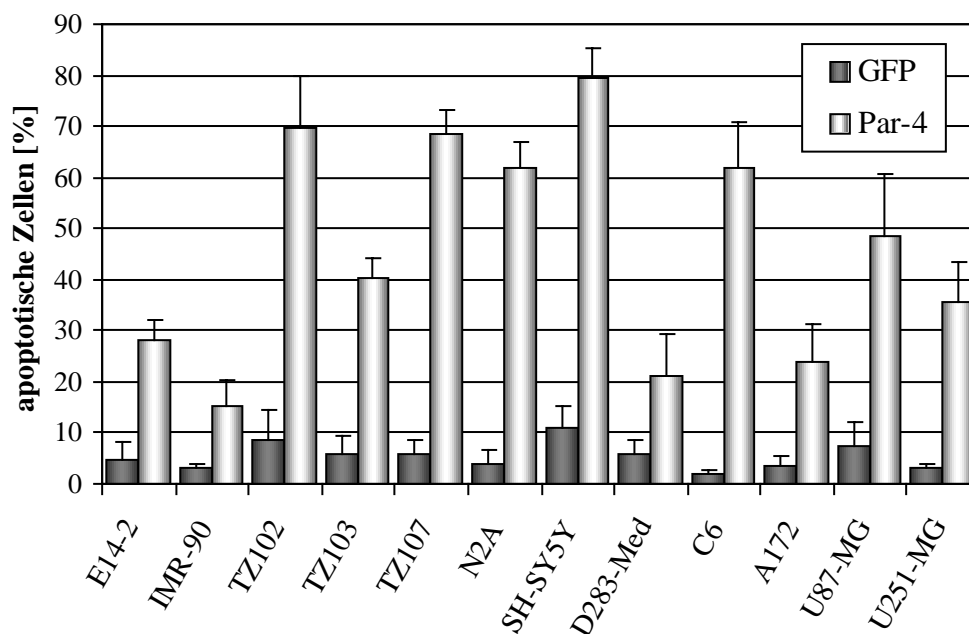


Abb. 23: Apoptose-Induktion in verschiedenen Gehirntumorzelllinien durch ectopische Par-4-GFP-Expression. Die Kontrollzelllinien E14-2 und IMR-90 sowie die PNET-Zelllinien TZ102, TZ103 und TZ107, die Neuroblastom-Zelllinien N2A und SH-SY5Y, die Medulloblastom-Zelllinie D283-Med und die Gliom-Zelllinien C6, A172, U87-MG und U251-MG wurden mit Par-4-GFP (helle Säulen) oder als Kontrolle mit dem leeren GFP-Vektor (dunkle Säulen) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert. Durch fluoreszenzmikroskopische Analysen wurde der Anteil der apoptotischen Zellen unter den Par-4-GFP- bzw. GFP-exprimierenden Zellen ermittelt. Das Diagramm repräsentiert die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, in denen je Ansatz 100-200 Zellen ausgewertet wurden.

4.2.4 Untersuchung der Signalwege der Par-4-induzierten Apoptose

4.2.4.1 Bcl-2-Expressionsniveau in verschiedenen Gehirntumorzelllinien

Es ist beschrieben worden, daß Par-4 und Bcl-2 in verschiedenen Tumor-Arten ein gegenläufiges Expressionsmuster zeigen (Qiu et al., 1999; Boehrer et al., 2001). Tatsächlich kann Par-4 durch Interaktion mit WT1 die Bcl-2-Expression hemmen (Cheema et al., 2003). Die in Abschnitt 4.2.3 analysierten Tumorzellen wurden daher durch eine RT-PCR-Analyse auf ihren Bcl-2-Expressionsstatus untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Par-4- und Bcl-2-Expression und der Sensitivität gegenüber der Par-4-induzierten Apoptose herzustellen. Mit den Oligonukleotiden *rat Bcl-2 for* und *rat Bcl-2 rev* wurde ein Bcl-2-PCR-Produkt von 390 bp amplifiziert (Abb. 24 oben). Der Mengenabgleich erfolgte wie in Abschnitt 4.2.3.1 beschrieben durch die Amplifizierung von GAPDH. Die PCR-Reaktion wurde jedoch aufgrund der geringen Expression der

Bcl-2-mRNA in einem getrennten Ansatz durchgeführt, um eine Kompetition mit den GAPDH-Oligonukleotiden zu vermeiden. Wie in Abbildung 24 (oben) zu sehen ist, variierte die Expression der Bcl-2-mRNA deutlich zwischen den verschiedenen Zelllinien. Eine starke Bcl-2-Expression wurde in den Zelllinien E14-2, N2A und SH-SY5Y detektiert (Abb. 24 oben, Spuren 1, 3 und 4); etwas weniger stark war die Expression von Bcl-2 in der Zelllinie A172 (Abb. 24 oben, Spur 7). In den Zelllinien IMR-90, D283-Med, C6, U87-MG und U251-MG war nur eine schwache Bcl-2-Expression nachweisbar (Abb. 24 oben, Spuren 2, 5, 6, 8 und 9). Eine gegenläufige Expression von Par-4- und Bcl-2 konnte nur in den Zelllinien IMR-90 (hohe Par-4-Expression und niedrige Bcl-2-Expression, vgl. Abb. 22 B, Spur 4 mit Abb. 24, Spur 2) sowie in der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y (niedrige Par-4-Expression und hohe Bcl-2-Expression, vgl. Abb. 22 B, Spur 6 mit Abb. 24, Spur 4) nachgewiesen werden. Die GAPDH-Expression wurde als Mengenabgleich herangezogen (Abb. 24, unten). Insgesamt konnte in diesem Experiment keine Korrelation zwischen dem Bcl-2-Expressionsniveau und der Sensitivität für Par-4-induzierte Apoptose hergestellt werden.

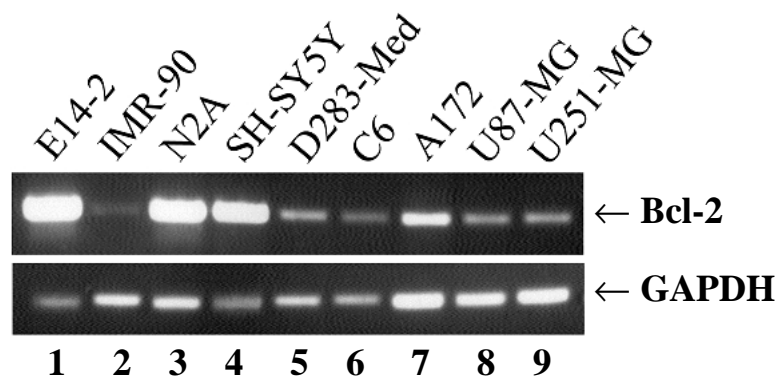


Abb. 24: RT-PCR-Analyse der Bcl-2-Expression in verschiedenen Gehirntumorzelllinien. Die endogene Bcl-2-mRNA-Expression wurde in den Kontrollzelllinien E14-2 und IMR-90 sowie in den Gehirntumorzelllinien N2A, SH-SY5Y, D283-Med, C6, A172, U87-MG und U251-MG durch RT-PCR untersucht (oben). Als Mengen-Abgleich wurde in separaten Ansätzen die Amplifikation von GAPDH herangezogen (unten). Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

4.2.4.2 Einfluß von Par-4 auf die Bcl-2-Expression

In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob die ektopische Expression von Par-4 in den verschiedenen Gehirntumorzelllinien zu einer Verringerung der endogenen Bcl-2-Expression führt. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien A172, N2A und SH-SY5Y ausgewählt, da diese Gehirntumorzelllinien die höchste Bcl-2-Expression aufwiesen (Abb. 24, Spuren 3, 4 und 7). Die Zelllinien wurden entweder mit Par-4-GFP oder als Kontrolle mit dem leeren GFP-Vektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die Bcl-2-

Expression durch RT-PCR analysiert. In drei getrennten PCR-Reaktionen wurden Produkte von Bcl-2 (390 bp), von Par-4 (247 bp) und von GAPDH (309 bp) amplifiziert, wobei die Oligonukleotid-Paare 5' *Par-4 mutT155* und *Par-4 775-795 rev*, *rat Bcl-2 for* und *rat Bcl-2 rev* sowie *rat GAPDH for* und *rat GAPDH rev* verwendet wurden. In Abbildung 25 wurden die gelelektrophoretischen Analysen der verschiedenen PCR-Produkte gegenübergestellt. Nach ektoptischer Expression von Par-4 konnte in keiner der Tumorzelllinien A172, N2A und SH-SY5Y eine Verringerung der Bcl-2-Expression gezeigt werden (Abb. 25, Mitte, vgl. Spuren 1 und 2, Spuren 3 und 4 sowie Spuren 5 und 6). Wie aus der Abbildung 25 (oben) ersichtlich wird, wurde durch die Transfektion von Par-4-GFP ein deutlicher Unterschied zwischen endogener und ektoptischer Par-4-Expression erreicht (Abb. 25, oben). Der Mengen-Abgleich mit GAPDH zeigt, daß in den verwendeten Proben vergleichbare Konzentrationen an mRNA vorlagen (Abb. 25, unten).

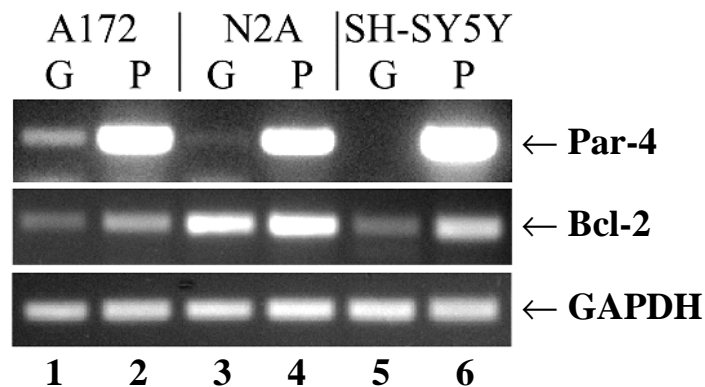


Abb. 25: Einfluß der ektoptischen Par-4-Expression auf die endogene Bcl-2-Expression. Die Gliomzelllinie A172 und die Neuroblastomzelllinien N2A und SH-SY5Y wurden mit Par-4-GFP (P, Spuren 2, 4 und 6) oder als Kontrolle mit dem leeren GFP-Vektor (G, Spuren 1, 3 und 5) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. (Oben) Par-4-Expression, (Mitte) Bcl-2-Expression, (unten) GAPDH-Expression als Mengen-Abgleich.

4.2.4.3 PKC ζ -Expression und Aktivierung in verschiedenen Gehirntumorzelllinien

Nachdem in den untersuchten Gehirntumorzelllinien kein Einfluß von Par-4 auf die Bcl-2-Expression festgestellt werden konnte, wurde nun die Expression und Aktivierung der Proteinkinase C ζ (PKC ζ), die ein weiteres Zielgen von Par-4 darstellt, untersucht. Die Expression der PKC ζ führt zur Inaktivierung von I κ B, dem Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF κ B, wodurch indirekt der proliferationsfördernde NF κ B-Signaltransduktionsweg aktiviert wird (Diaz-Meco et al., 1993; Diaz-Meco et al., 1994). Es ist beschrieben worden, daß Par-4 mit PKC ζ interagiert und dadurch die Funktion der Proteinkinase hemmt (Diaz-Meco et al., 1996). Par-4 ist daher in der Lage, durch

Inaktivierung der PKC ζ die Sensitivität der Zellen für apoptotische Stimuli zu erhöhen oder direkt in den Zellen Apoptose auszulösen (Diaz-Meco et al., 1999; de Thonel et al., 2001). In den Gehirntumorzelllinien A172, C6, D283-Med, N2A, SH-SY5Y, U87-MG und U251-MG sowie in den Kontrollzelllinien E14-2 und IMR-90 wurde daher durch Western Blot-Analysen die Expression von PKC ζ untersucht. Die Zellen wurden vor der Präparation von Zellextrakten für 15 h in serumreduziertem Medium (0,1 % FCS) kultiviert, um eine basale Aktivierung der PKC ζ durch Wachstumsfaktoren im Medium zu verringern. Die Zellextrakte wurden anschließend einer Western-Blot-Analyse mit einem phosphospezifischen polyklonalen anti-PKC ζ -Antikörper unterzogen, der die phosphorylierte, aktive Form der PKC ζ (p-PKC ζ) detektiert (Abb. 26 A, oben). Der Abgleich der Proteinmengen erfolgte durch einen polyklonalen anti-pan-PKC ζ -Antikörper (Abb. 26 A, Mitte), der sowohl mit der phosphorylierten (untere Bande) als auch mit der unphosphorylierten Form (obere Bande) des Proteins interagiert, sowie zusätzlich mit einem monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörper (Abb. 26 A, unten). Das in Abbildung 26 A dargestellte Ergebnis des Versuchs zeigte, daß die Ratten-Gliom-Zelllinie U87-MG im Vergleich zu den Kontrollzelllinien E14-2 und IMR-90 eine leicht erhöhte Expression der PKC ζ , jedoch keine verstärkte Phosphorylierung der Kinase aufwies (Abb. 26 A, Spuren 1, 2 und 9). In den übrigen untersuchten Gehirntumorzellen konnte dagegen im Vergleich zu den Kontrollzelllinien E14-2 und IMR-90 (Abb. 26 A, Spuren 1 und 2) weder eine Erhöhung der Expression noch eine verstärkte Aktivität der PKC ζ nachgewiesen werden (Abb. 26 A, Spuren 3-8).

Um weiterhin zu untersuchen, ob die ektopische Expression von Par-4 die Aktivität von PKC ζ in den Tumorzelllinien beeinflussen kann, wurden die Gehirntumorzelllinien C6, D283-Med, N2A und SH-SY5Y sowie die Kontrollzelllinie IMR-90 entweder mit Par-4-GFP oder als Kontrolle mit dem leeren GFP-Vektor transfiziert. 9 h nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen in serumreduziertem Medium (0,1 % FCS) kultiviert, um die basale Aktivität der PKC ζ zu unterdrücken. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte wie bereits oben beschrieben anhand von Western Blot-Analysen mit dem phosphospezifischen polyklonalen anti-PKC ζ -Antikörper (Abb. 26 B, oben) und dem polyklonalen anti-pan-PKC ζ -Antikörper (Abb. 26 B, unten) untersucht. Das in Abbildung 26 B dargestellte Ergebnis zeigte, daß in keiner der untersuchten Zelllinien nach Expression von Par-4-GFP eine Verringerung des Anteils der phosphorylierten PKC ζ (Abb. 26 B, oben) an der gesamten PKC ζ -Menge (Abb. 26 B,

unten) auftrat, da die p-PKC ζ / PKC ζ - Verhältnisse in Extrakten der GFP- und der Par-4-GFP-transfizierten Zellen innerhalb einer Zelllinie nicht signifikant voneinander abwichen. Nur in den Zelllinien C6 und D283-Med zeigte sich sogar eine leichte Erhöhung der PKC ζ -Aktivierung nach der Expression von Par-4 (Abb. 26 B oben und Mitte, vgl. Spuren 3 mit 4 und 5 mit 6). Zusammenfassend kann durch die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse für die untersuchten Tumorzelllinien eine mögliche Par-4-vermittelte Herunterregulation von Bcl-2 bzw. Inhibition der PKC ζ -Signalwege als Ursache für die beobachtete Apoptose-Induktion ausgeschlossen werden.

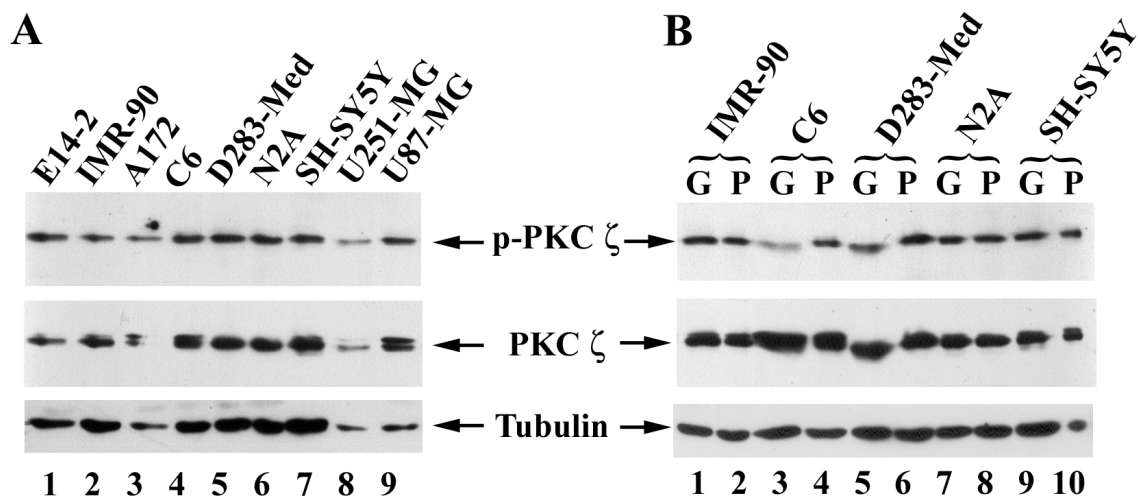


Abb. 26: Western Blot-Analyse der PKC ζ -Expression in Gehirntumorzelllinien. (A) Zellextrakte der Kontrollzelllinien E14-2 und IMR-90 sowie der Gehirntumorzelllinien A172, C6, D283-Med, N2A, SH-SY5Y, U87-MG und U251-MG wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Nachweis der aktivierten p-PCK ζ erfolgte durch einen phosphospezifischen polyklonalen anti-PKC ζ -Antikörper (oben), der Abgleich der Proteinmengen erfolgte durch einen polyklonalen anti-pan-PKC ζ -Antikörper (Mitte) und zusätzlich durch einen monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörper. (B) Die Kontrollzelllinie IMR-90 sowie die Gehirntumorzelllinien C6, D283-Med, N2A und SH-SY5Y wurden mit Par-4-GFP (P) oder als Kontrolle mit dem leeren GFP-Vektor (G) transfiziert. Der Nachweis der PKC ζ erfolgte wie unter (A) beschrieben durch einen phosphospezifischen anti-PKC ζ -Antikörper (oben), durch einen anti-pan-PKC ζ -Antikörper (Mitte) sowie durch einen monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörper.

4.2.5 Charakterisierung der Aktin-Assoziation von Par-4

4.2.5.1 Immunfluoreszenz-Analyse der subzellulären Lokalisation von Par-4

In vergangenen Untersuchungen konnte eine Kollokalisierung von Par-4 mit dem Aktin-Zytoskelett gezeigt werden (Page et al., 1999). Da jedoch bisher nicht bekannt war, ob die Aktin-Bindung von Par-4 direkt oder indirekt über einen weiteren Interaktionspartner erfolgt, und welche Bedeutung die Aktin-Assoziation für die Par-4-vermittelte Apoptose spielt, wurde die Interaktion von Par-4 mit dem Aktin-Zytoskelett eingehender untersucht. Für diese Untersuchungen wurden REF52.2-Ratten-Fibroblasten, die über ein gut ausgeprägtes Zytoskelett verfügen, mit Par-4-GFP transfiziert. 24 h nach der Transfektion

wurden die Zellen fixiert und einer Aktin-Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin unterzogen. Wie in Abbildung 27 dargestellt, führte die Expression von Par-4-GFP (Abb. 27 A) zu einer deutlichen Anfärbung von parallel angeordneten zellulären Strukturen, die eine deutliche Kolokalisation mit den durch das Phalloidin angefärbten Spannungsfasern des Aktin-Zytoskeletts aufwiesen (Abb. 27 D). Da bei genauer Betrachtung eine punktiert strukturierte Verteilung des Par-4-GFP entlang der Spannungsfasern zu erkennen war, die jedoch bei der entsprechenden Aktinfärbung nicht auftrat, bestand die Möglichkeit, daß Par-4 nicht direkt an Aktin-Filamente bindet, sondern an ein anderes zytoskelettäres Protein mit einer periodischen Verteilung entlang der Aktin-Filamente assoziiert. Es wur-

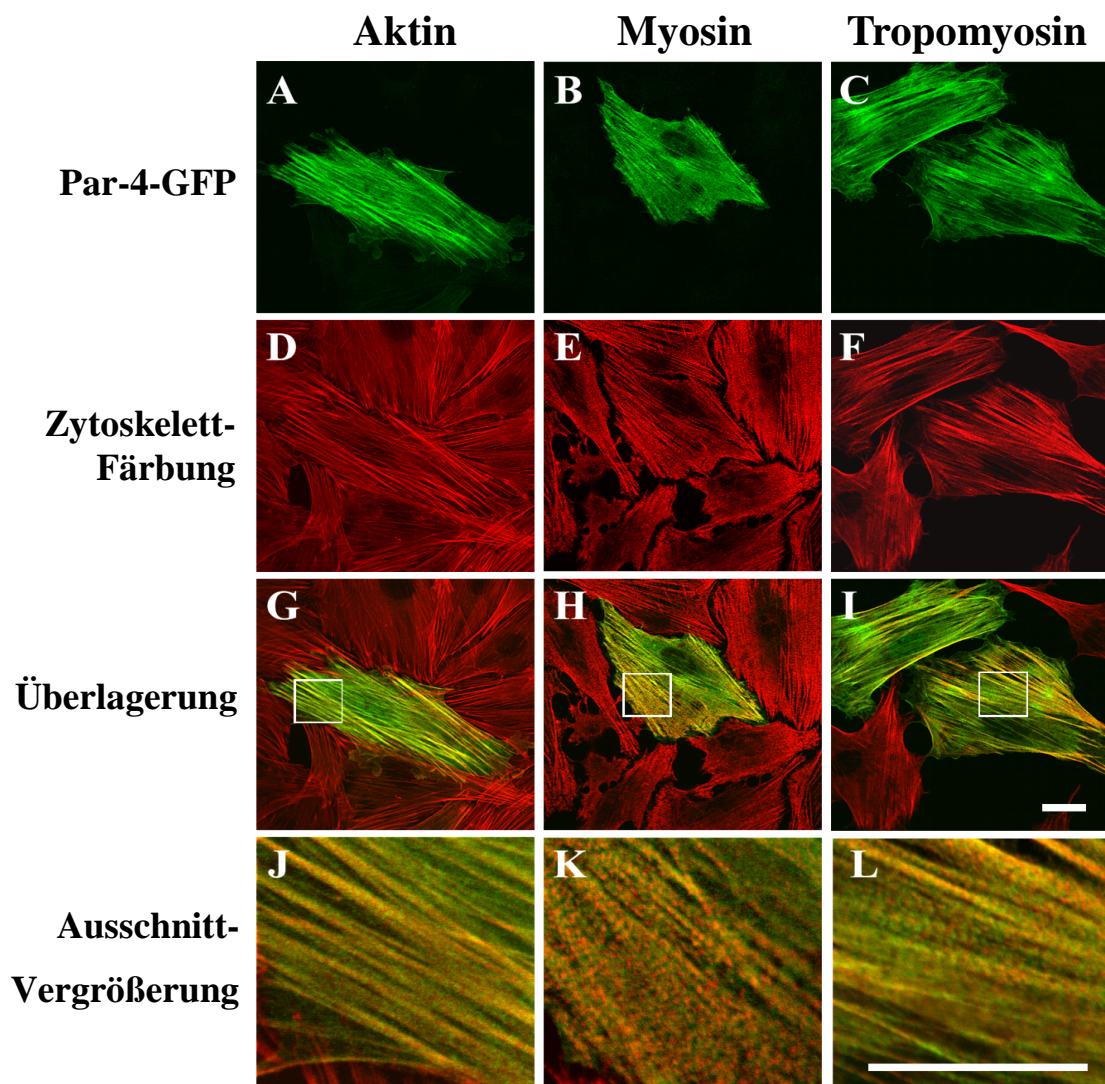


Abb. 27: Subzelluläre Lokalisation von Par-4. REF52.2-Zellen wurden mit Par-4-GFP transfiziert und nach 24 h fixiert. Es wurden Immunzytochemische Färbungen des Aktin-Zytoskeletts mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (links), mit einem polyklonalen anti-Myosin IIA-Antikörper (Mitte) bzw. mit einem monoklonalen anti-Tropomyosin-Antikörper (rechts) durchgeführt und durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie analysiert. In Grün ist das Par-4-GFP zu sehen (A, B, C), in Rot die jeweilige Zytoskelett-Komponente (D, E, F). Überlagerungen von Par-4-GFP und Zytoskelett sind in den Bildern G, H und I zu sehen. Ausschnittvergrößerungen, die den weißen Rahmen entsprechen, sind in J, K und L dargestellt. Balken, 20 µm.

den daraufhin Immunfluoreszenz-Analysen mit Antikörpern durchgeführt, die gegen verschiedene Zytoskelett-Proteine gerichtet waren. REF52.2-Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert und fixiert, dann jedoch durch Immunfärbung angefärbt. Eine punktuelle Verteilung, die der von Par-4-GFP ähnelte, konnte bei der Immunfärbung mit polyklonalen anti-Myosin II A-Antikörpern und anti-Tropomyosin-Antikörpern beobachtet werden (Abb. 27 E und F). Bei genauer Betrachtung zeigte sich allerdings, daß sich die Fluoreszenzfärbung der Par-4-GFP-transfizierten Zellen und die Fluoreszenzfärbung, die nach Immunfärbung mit dem polyklonalen anti-Myosin II A-Antikörper bzw. mit dem anti-Tropomyosin-Antikörper nachgewiesen wurden, sich nicht überlagerten, sondern daß die angefärbten Strukturen exakt alternierten (Abb. 27 K und L). Auch bei der Immunfärbung der Par-4-GFP-transfizierten Präparate mit einem monoklonalen anti- α -Actinin-Antikörper konnte keine Kolokalisation von Par-4 mit α -Actinin entlang von Aktin-Fasern gezeigt werden (Abb. 28 A-D). Da zum Teil Anreicherungen von ektopisch exprimiertem Par-4 an der Zellperipherie auftraten, wurde die Kolokalisation von Par-4 mit Vinculin untersucht, einem Protein, das in den Fokalkontakten (*focal adhesions*), den Anheftungspunkten von Zellen an ihrem Substrat, lokalisiert ist. Nach Immunfärbung von Par-4-GFP-transfizierten Zellen mit einem monoklonalen anti-Vinculin-Antikörper zeigte Vinculin jedoch lediglich eine partielle Kolokalisation mit Par-4-GFP in den Ansatzpunkten der Aktin-Filamente an der Zellperipherie (Abb. 28 E-F).

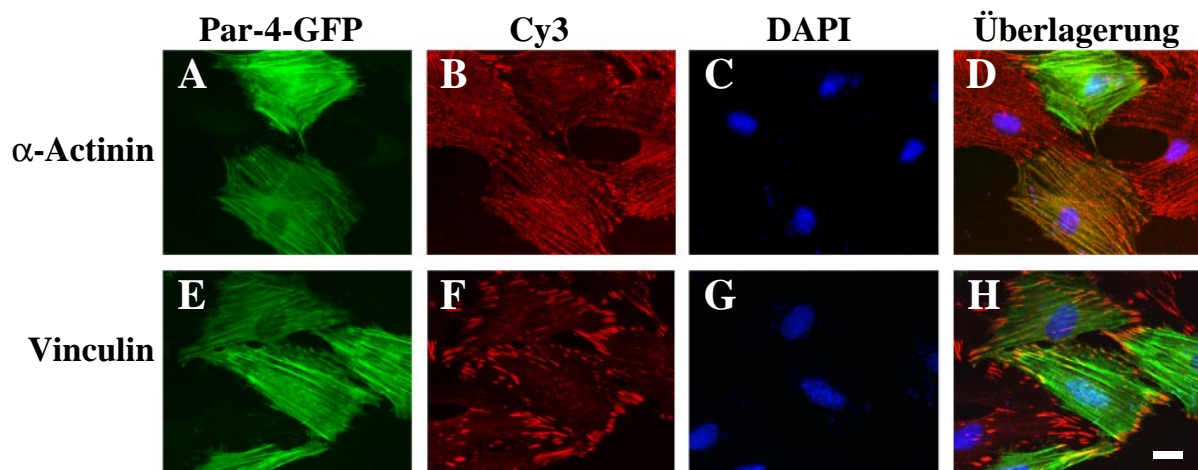


Abb. 28: α -Actinin- und Vinculinfärbung von Par-4-GFP-transfizierten Zellen. REF52.2 Zellen wurden mit Par 4-GFP transfiziert (A und E) und immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti- α -Actinin-Antikörper (B) bzw. mit einem monoklonalen anti-Vinculin-Antikörper (F) gefärbt und zusätzlich einer Kernfärbung mit DAPI unterzogen (C und G). Die Überlagerung der verschiedenen Signale ist in D und H gezeigt. Balken, 20 μ m.

4.2.5.2 Triton X-100-Extraktion von Par-4-exprimierenden Zellen

Da die Immunfluoreszenzanalysen keinen eindeutigen Hinweis auf einen zytoskelettären Interaktionspartner von Par-4 geliefert hatten, war der Mechanismus der Bindung von Par-4 an das Zytoskelett weiter unklar. Es stellte sich daher die Frage, ob die zytoskelettäre Lokalisation von Par-4 auf einer festen Bindung an ein Zytoskelett-Protein beruhte oder ob Par-4 nur durch eine schwache Assoziation mit dem Zytoskelett verbunden war. Im Hinblick auf diese Fragestellung wurde ein Triton X-100-Extraktionsversuch durchgeführt. REF52.2-Zellen wurden mit Par-4-GFP transfiziert und nach 24 h entweder direkt fixiert oder vor der Fixierung einer Triton X-100-Extraktion unterzogen. Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurde das Aktin-Zytoskelett mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin angefärbt. Es zeigte sich, daß die Bindung von Par-4-GFP an das Zytoskelett auch durch eine starke Triton X-100-Behandlung (5 min, 0,5 % Triton X-100) nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 29 D-F, vgl. A-C), was auf eine stabile Bindung von Par-4 an ein zytoskelettäres Protein hinweist.

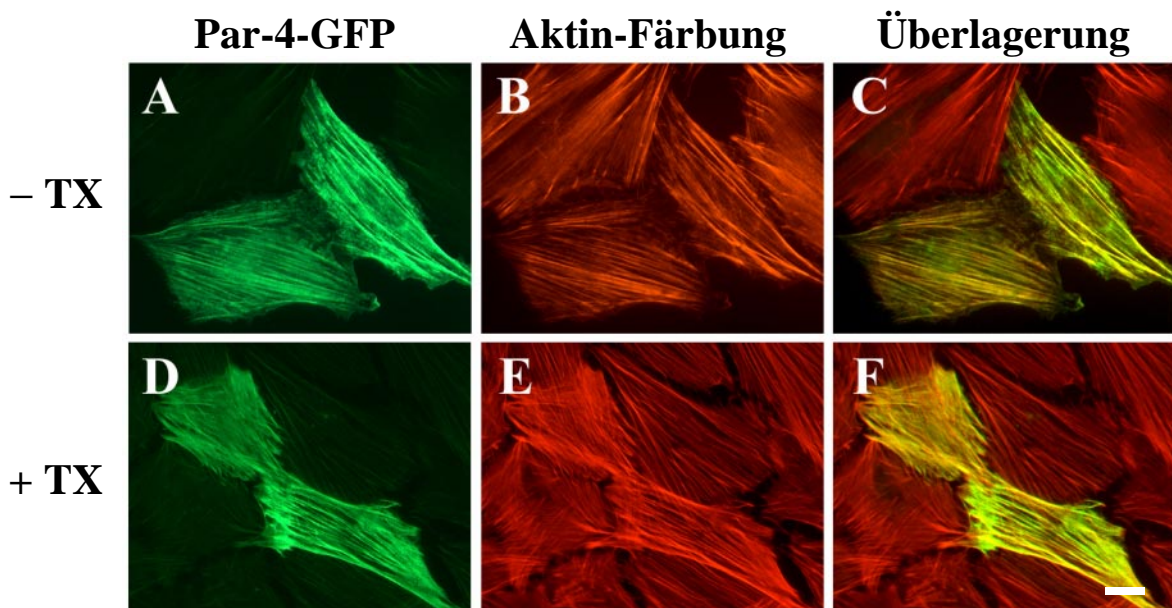


Abb. 29: Triton X-100-Extraktion von Par-4-GFP-transfizierten Zellen. REF52.2-Zellen wurden mit Par-4-GFP transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder direkt fixiert (A, B, C) oder einer Triton X-100-Behandlung unterzogen (D, E, F). Die Zellen wurden anschließend einer Aktin-Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (B und E) unterzogen. Balken, 20 µm.

4.2.5.3 Nachweis der Interaktion von Par-4 und Aktin durch einen *In vitro*-Filament-Bindungsversuch

Um nachzuweisen, ob Par-4 direkt mit Aktin interagieren kann, wurde in Kooperation mit Dr. Susanne Illenberger (Technische Universität Braunschweig) ein *In vitro*-Filament-

Bindungsversuch durchgeführt. Dazu wurde polymerisiertes Aktin in An- oder Abwesenheit von gereinigtem rekombinanten Par-4-Protein (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Jan Kubicek, Forschungszentrum Jülich) für 2 h bei 37 °C in Sedimentationspuffer inkubiert. Nach der Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Phalloidin wurden die Ansätze 1 h bei 37 °C inkubiert. Die in Abbildung 30 gezeigte fluoreszenzmikroskopische Analyse der Ansätze zeigte, daß sich nach der Inkubation von Aktin mit Par-4 wt dicke Aktin-Filament-Bündel gebildet hatten (Abb. 30 B), wohingegen in dem Kontrollansatz, der nur Aktin enthielt, keine Filament-Bildung zu beobachten war (Abb. 30 A). Auch die C-terminal deletierte Mutante Par-4 ΔC_{1-266} führte zu einer Bildung von Aktin-Bündeln, nicht jedoch die reziproke Mutante Par-4 DD₂₆₆₋₃₃₂. Das Ergebnis dieses Versuchs verdeutlicht, daß Par-4 die Fähigkeit besitzt, *in vitro* direkt mit Aktin zu interagieren und die Bildung von Aktin-Filament-Bündeln zu induzieren, wobei die Aktin-Bindungsdomäne offensichtlich im N-terminalen Teil des Proteins lokalisiert ist.

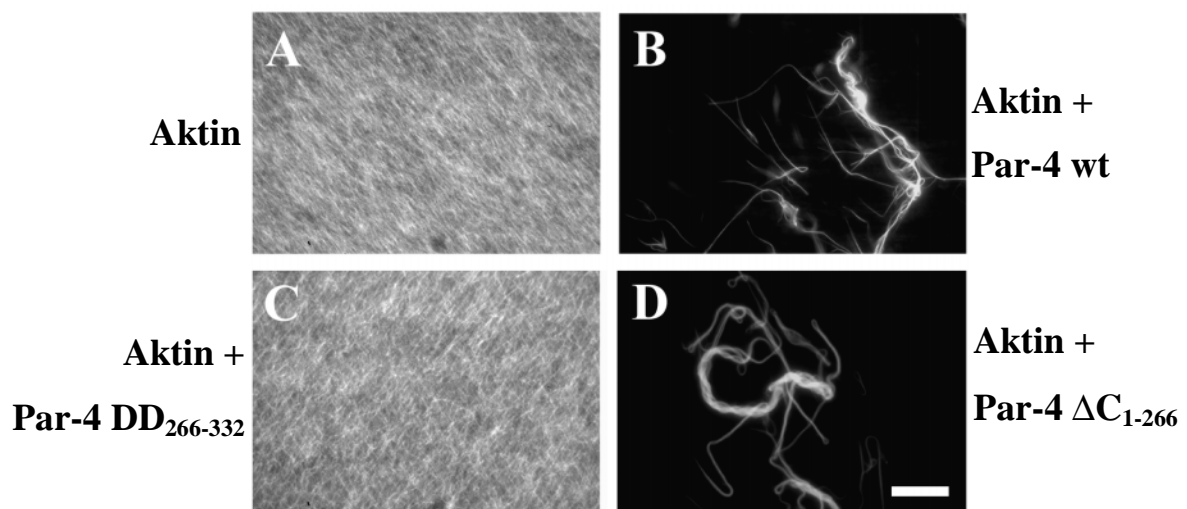


Abb. 30: *In vitro*-Filament-Bindungsversuch mit Aktin und Par-4. Polymerisiertes Aktin wurde (A) in Abwesenheit oder in Anwesenheit von gereinigtem (B) Strep-Par-4 wt-Protein, (C) Strep-Par-4 DD₂₆₆₋₃₃₂ oder (D) Strep-Par-4 ΔC_{1-266} für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Anfärbung der Aktin-Filamente erfolgte durch eine Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin für 1 h bei 37 °C (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Susanne Illenberger, Technische Universität Braunschweig).

4.2.5.4 Klonierung von Par-4-Deletionsmutanten

Die für die Zytoskelett-Bindung verantwortlichen Domänen von Par-4 wurden mit Hilfe von Deletionsmutanten kartiert. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein 1425 bp langes *EcoRI*-Fragment von Par-4, das die gesamte kodierende Sequenz der cDNA umfaßte, in den Vektor pCMV-Tag2B kloniert, um ein FLAG-Par-4-Fusionskonstrukt herzustellen. Ausgehend von diesem FLAG-Par-4-Konstrukt wurden vier verschiedene Par-4-Deletionsmutanten hergestellt. Für die N-terminal verkürzte Mutante ΔN_{41-332} , der die ersten 40

Aminosäuren fehlen, wurde ein 1246 bp langes DNA-Fragment mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hin*DIII aus dem FLAG-Par-4-Konstrukt ausgeschnitten und in den Vektor pCMV-Tag2A ligiert. Die Deletionsmutante ΔC_{1-233} , der die letzten 90 Aminosäuren fehlen, wurde durch einen Restriktionsverdau des FLAG-Par-4-Konstrukts mit *Eco*RV und anschließende Religation erzeugt. Die ebenfalls C-terminal verkürzte Mutante ΔC_{1-266} , der die letzten 67 Aminosäuren fehlen, entstand durch Restriktionsverdau des FLAG-Par-4-Konstrukts mit *Bgl*III und *Hin*DIII und nachfolgender Religation. Die Par-4-Mutante $DD_{266-332}$, die ausschließlich aus den letzten 67 Aminosäuren von Par-4 besteht, wurde durch Klonierung eines 571 bp langen *Bgl*III und *Hin*DIII-geschnittenen DNA-Fragments aus dem FLAG-Par-4-Konstrukt in den Vektor pCMV-Tag2A hergestellt. Der C-Terminus von Par-4 enthält sowohl ein Leucin-Zipper-Motiv (Aminosäuren 295-330) als auch eine Todesdomäne (Aminosäuren 258-332). Der Mutante ΔC_{1-266} fehlt daher nur das Leucin-Zipper-Motiv, während der Mutante ΔC_{1-233} neben dem Leucin-Zipper auch die Todesdomäne fehlt. Die Mutante $DD_{266-332}$ enthält den Leucin-Zipper von Par-4 sowie einen großen Teil der Todesdomäne. Eine Übersicht der verwendeten Par-4-Deletionsmutanten ist in Abbildung 31 dargestellt.

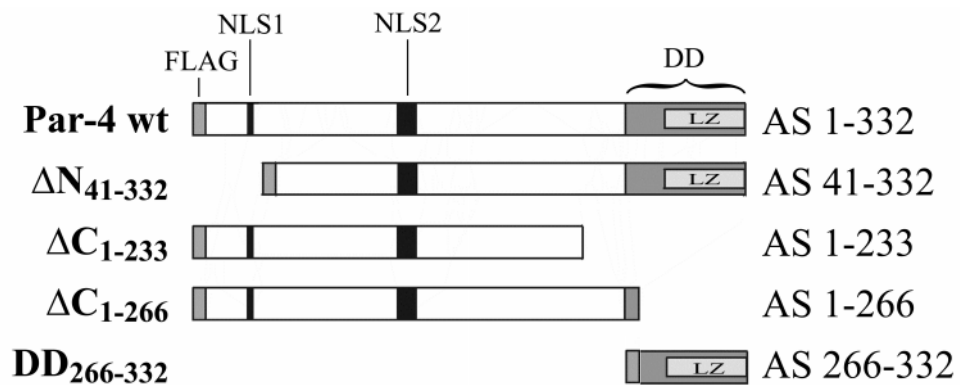


Abb. 31: FLAG-Par-4 und FLAG-Par-4-Deletionsmutanten. Der N-terminal deletierten Mutante ΔN_{41-332} fehlen die ersten 40 Aminosäuren einschließlich der ersten Kernlokalisationssequenz. Die Mutanten ΔC_{1-233} und ΔC_{1-266} sind C-terminal deletiert, wobei der Mutante ΔC_{1-233} die komplette Todesdomäne fehlt, während der Mutante ΔC_{1-266} nur der Leucin-Zipper und damit ein Teil der Todesdomäne fehlt. Die Mutante $DD_{266-332}$ besteht ausschließlich aus der C-terminalen Todesdomäne von Par-4. FLAG, FLAG-Epitop; NLS1 und NLS2, Kernlokalisationssequenzen; DD, Todesdomäne; LZ, Leucin-Zipper-Motiv.

4.2.5.4 Untersuchung der Zytoskelett-Assoziation von Par-4-Deletionsmutanten

Zur Analyse der Zytoskelett-Assoziation der Par-4-Deletionsmutanten wurden REF52.2-Zellen mit den FLAG-Par-4-Deletionsmutanten ΔN_{41-332} , ΔC_{1-233} , ΔC_{1-266} und $DD_{267-332}$ sowie mit FLAG-Par-4 wt transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-

fluoreszenzmarkierten anti-Maus-IgG-Antikörper angefärbt. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt. Durch die fluoreszenzmikroskopische Analyse konnte gezeigt werden, daß FLAG-Par-4 wt ebenso wie Par-4-GFP eine deutliche Kolokalisation mit Aktin-Filamenten aufwies (Abb. 32 A und B; vgl. Abb. 27 A, D und G), wohingegen die verschiedenen Par-4-Deletionsmutanten generell eine verminderte Aktin-Assoziation zeigten. Die Mutante ΔN_{41-332} war diffus im Zytoplasma verteilt, wobei auch eine schwache Färbung von filamentösen Strukturen sichtbar war (Abb. 32 C und D). Auch die kürzere C-terminale Deletionsmutante ΔC_{1-233} zeigte neben einer diffusen Verteilung eine schwache Zytoskelett-Bindung, wobei der Kern nicht angefärbt war (Abb.

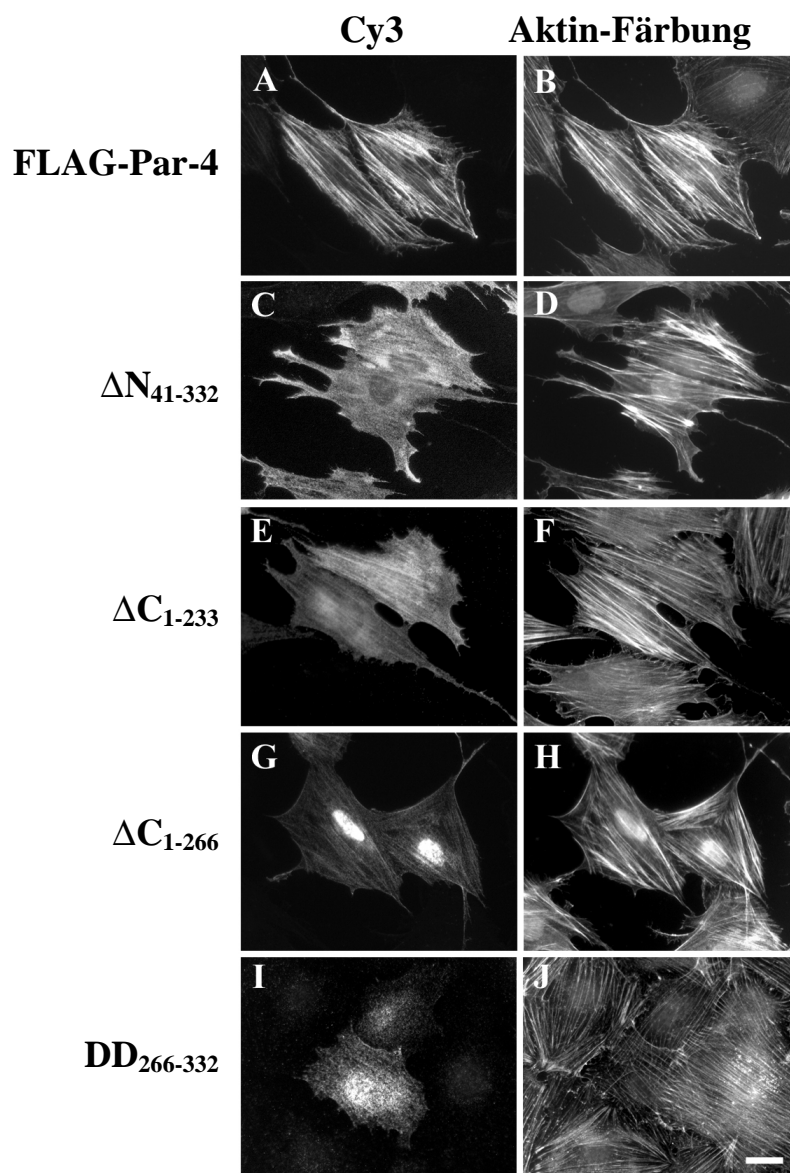


Abb. 32: Immunfluoreszenzanalyse verschiedener Par-4-Deletionsmutanten. REF52.2-Zellen wurden mit FLAG-Par-4 bzw. mit verschiedenen FLAG-Par-4 Deletionsmutanten wie links angegeben transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Maus-IgG-Antikörper gefärbt (Cy3). Das Aktin-Zytoskelett wurde durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin angefärbt. Balken, 20 μ m.

32 E und F). Im Gegensatz dazu war die längere C-terminale Deletionsmutante ΔC_{1-266} fast ausschließlich im Kern lokalisiert (Abb. 32 G und H). Auch bei dieser Mutante war eine schwache Färbung von filamentösen Strukturen zu sehen. Die Mutante $DD_{266-332}$, die die C-terminale Todesdomäne und den Leucin-Zipper von Par-4 beinhaltet, zeigt eine diffuse Verteilung im Kern und im Zytoplasma. Jedoch wurde auch eine schwache Färbung von Aktin-Filamenten beobachtet, was verdeutlicht, dass der C-Terminus von Par-4 allein an das Zytoskelett binden kann (Abb. 32 I und J).

4.2.5.5 Untersuchung der Triton X-100-Löslichkeit von Par-4-Deletionsmutanten

In Abschnitt 4.2.1.2 ist gezeigt worden, daß Wildtyp-Par-4-GFP nach Triton X-100-Extraktion ebenso stark an Aktin-Filamente bindet wie in unbehandelten Kontrollansätzen. Um nun die Triton X-100-Löslichkeit der verschiedenen Par-4-Deletionsmutanten zu untersuchen, wurde ein proteinbiochemischer Ansatz gewählt. REF52.2-Zellen wurden mit den Par-4-Deletionsmutanten ΔN_{41-332} , ΔC_{1-233} und ΔC_{1-266} sowie als Kontrollansatz mit FLAG-Par-4 wt transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden durch die Behandlung mit 0,5 % Triton X-100 für 3 min Triton X-100-lösliche und -unlösliche Zellextrakte herge-

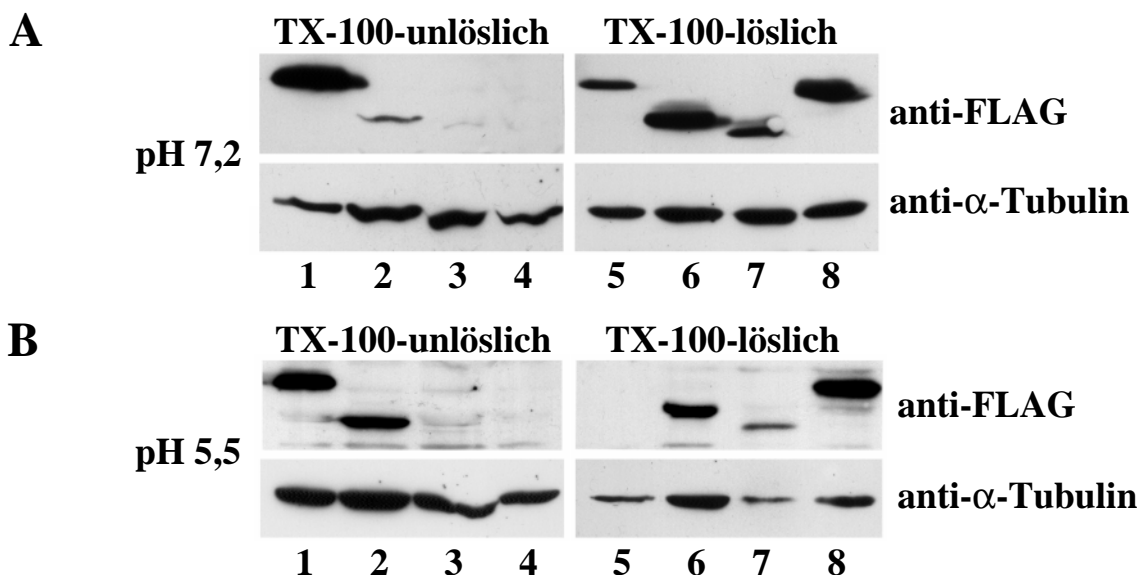


Abb. 33: Triton X-100-Löslichkeit verschiedener Par-4-Deletionsmutanten. REF52.2-Zellen wurden mit den Konstrukten FLAG-Par-4 (Spuren 1 und 5), ΔN_{41-332} (Spuren 2 und 6), ΔC_{1-233} (Spuren 3 und 7) sowie ΔC_{1-266} (Spuren 4 und 8) transfiziert. (A) 24 h nach der Transfektion wurden Triton X-100-lösliche (Spuren 5 bis 8) und Triton X-100-unlösliche (Spuren 1 bis 4) Zellextrakte hergestellt, die durch Western Blot mit Hilfe eines monoklonalen anti-FLAG-Antikörpers analysiert wurden (oben). Der Abgleich der Proteinmengen erfolgte durch Immunfärbung mit einem monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörper (unten). (B) 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min in Kulturmedium bei pH 5,5 inkubiert. Triton X-100-lösliche (Spuren 5 bis 8) und Triton X-100-unlösliche (Spuren 1 bis 4) Zellextrakte wurden ebenfalls bei pH 5,5 hergestellt. Die Verteilung der Proteine wurde anschließend durch Western Blot-Analyse wie oben beschrieben analysiert.

stellt. Die Zellextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert, wobei die Western Blot-Membran mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper gefärbt wurde. Wie in Abbildung 33 A (oben) dargestellt, befand sich FLAG-Par-4 wt zum größten Teil in der unlöslichen Fraktion (Abb. 33 A, Spur 1, vgl. Spur 5). Die FLAG-Par-4-Deletionsmutanten waren dagegen hauptsächlich in der Triton X-100-löslichen Fraktion zu finden (Abb. 33 A, Spuren 6-8, vgl. Spuren 2-4). Lediglich von der N-terminal deletierten Par-4-Mutante ΔN_{41-332} konnte auch ein Teil des Proteins in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 32 A, Spur 2).

4.2.5.6 pH-Abhängigkeit der Zytoskelett-Assoziation von Par-4

Es ist gezeigt worden, daß der C-Terminus von Par-4 bei physiologischen pH-Werten aufgrund des repulsiven Effekts eines Glutamat- und eines Aspartat-Restes keine definierte Struktur annehmen kann. Bei Absenkung des pH-Wertes in den sauren Bereich werden diese Aminosäurereste jedoch durch Protonierung neutralisiert, so daß die Formation einer *coiled coil*-Struktur ermöglicht wird (Dutta et al., 2001; Dutta et al., 2003). Es wurde daher untersucht, ob sich auch die Bindung der Par-4-Deletionsmutanten ΔN_{41-332} , ΔC_{1-233} und ΔC_{1-266} an das Aktin-Zytoskelett bei einem sauren pH-Wert verändert. Zu diesem Zweck wurde der unter 4.2.1.5 beschriebene Versuch wiederholt, jedoch wurden die transfizierten Zellen vor der Triton X-Behandlung für eine halbe Stunde in Medium mit einem pH-Wert von 5,5 kultiviert und die ersten Waschschriffe in Puffer mit einem pH-Wert von 5,5 durchgeführt. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 33 B dargestellt. Das FLAG-Par-4 wt-Protein war bei pH 5,5 komplett in der Triton X-100-unlöslichen Fraktion zu finden (Abb. 33 B, Spur 1; vgl. Spur 5). Die beiden C-terminal deletierten Par-4-Mutanten ΔC_{1-233} und ΔC_{1-266} waren, wie bereits bei pH 7,2 beobachtet, vollständig in der Triton X-100-löslichen Fraktion zu detektieren (Abb. 33 B, Spuren 7 und 8; vgl. Spuren 3 und 4). Ein deutlicher Unterschied war jedoch bei Betrachtung der Mutante ΔN_{41-332} zu sehen. Während diese Mutante bei neutralem pH-Wert überwiegend in der Triton X-100-löslichen und nur zu einem kleinen Teil in der unlöslichen Fraktion zu finden war, befand sie sich bei pH 5,5 zu gleichen Anteilen in der löslichen und der unlöslichen Fraktion (Abb. 33 B, Spuren 2 und 6; vgl. Abb. 33 A, Spuren 2 und 6).

4.2.6 Bedeutung der Zytoskelett-Bindung für die apoptotische Funktion von Par-4

4.2.6.1 Induktion von Apoptose durch verschiedene Par-4-Deletionsmutanten

Nachdem in den Abschnitten 4.2.1.4 und 4.2.1.5 für die Par-4-Deletionsmutanten ΔN_{41-332} , ΔC_{1-233} und ΔC_{1-266} eine verringerte Zytoskelett-Assoziation demonstriert werden konnte, stellte sich als nächstes die Frage, ob sich dies auch auf die pro-apoptotische Funktion der Proteine auswirkt. Um die Apoptose-Induktion zu quantifizieren, wurden die Deletionsmutanten ΔN_{41-332} , ΔC_{1-233} und ΔC_{1-266} zusammen mit GFP-Dlk in REF52.2-Zellen exprimiert. Während die Par-4-Expression allein in diesen Zellen keine Apoptose auslöst, führt die Koexpression der beiden Proteine zu starken Veränderungen des Zytoskeletts und zur Auslösung der Apoptose (Page et al., 1999). Die Zellen wurden daher mit GFP-Dlk und FLAG-Par-4 wt bzw. den Deletionsmutanten ΔN_{41-332} , ΔC_{1-233} und ΔC_{1-266} kotransfiziert. Für die Transfektion wurde die cDNA von GFP-Dlk und den verschiedenen FLAG-Par-4-Konstrukten in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt, da bei diesem Verhältnis die Apoptoseinduktion am effektivsten war (Page et al., 1999). Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion fixiert, immunzytochemisch angefärbt und einer DAPI-Kernfärbung unterzogen. Die Apoptoserate wurde anhand morphologischer Merkmale der Apoptose durch Analyse der Präparate am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Wie in der Abbildung 34 zu sehen ist, betrug die Apoptoserate nach Koexpression von Par-4 und Dlk etwa 70 % (Abb. 34, erste dunkle Säule, Par-4 wt). Dagegen sank die

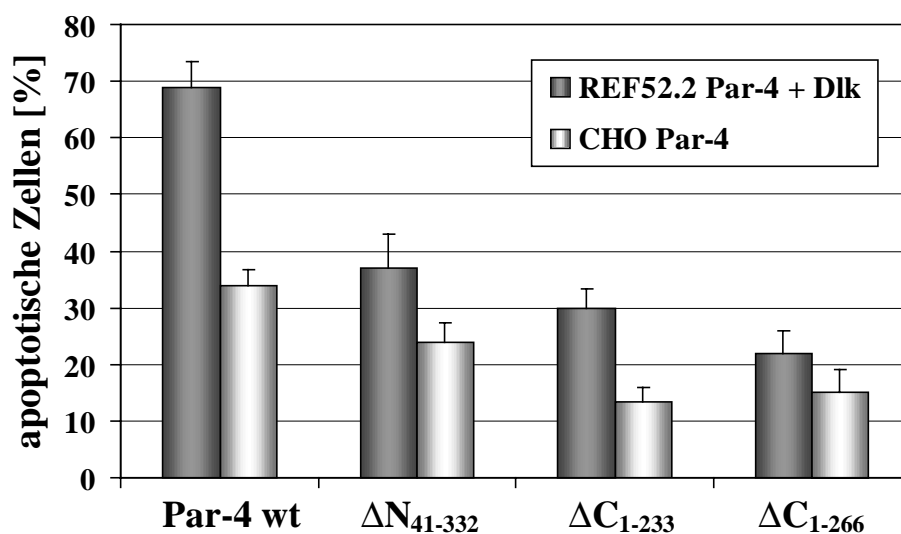


Abb. 34: Apoptose-Induktion durch verschiedene Par-4-Deletionsmutanten. REF52.2-Zellen (dunkle Säulen) wurden mit GFP-Dlk und FLAG-Par-4, ΔN_{41-332} , ΔC_{1-233} bzw. ΔC_{1-266} kotransfiziert. CHO-Zellen (helle Säulen) wurden mit FLAG-Par-4, ΔN_{41-332} , ΔC_{1-233} oder ΔC_{1-266} transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und einer Kernfärbung mit DAPI unterzogen. Die Rate apoptotischer Zellen wurde durch Immunfluoreszenzanalyse ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, in denen je 100 – 200 transfizierte Zellen je Ansatz ausgewertet wurden.

Apoptoserate deutlich bei Kotransfektion von Dlk und den Par-4-Deletionsmutanten. Die Apoptoserate betrug etwa 38 % bei Kotransfektion von Dlk und ΔN_{41-332} , 30 % bei Kotransfektion von Dlk und ΔC_{1-233} und 22 % bei Kotransfektion von Dlk und ΔC_{1-266} (Abb. 34, dunkle Säulen 2-4). Die Verringerung der Apoptoserate ging dabei mit einer verminderten Kolo-kalisation von Par-4 und Dlk einher (nicht abgebildet). Die Interaktion von Par-4 und Dlk wird durch die Leucin-Zipper-Region von Par-4 vermittelt (Page et al., 1999). Um auszuschließen, daß die Reduktion der Apoptoseinduktion bei den beiden C-terminal deletierten Mutanten ΔC_{1-233} und ΔC_{1-266} auf allein eine verminderte Interaktion von Par-4 und Dlk zurückzuführen ist, wurde die Hamster-Fibroblasten-Zelllinien CHO für die Analyse herangezogen. In CHO-Zellen führt die Expression von Par-4 allein zur Induktion von Apoptose mit einer Rate von 30-40 %. Die CHO-Zellen wurden ebenso behandelt wie die REF52.2-Zellen, jedoch mit FLAG-Par-4 wt allein bzw. mit den Deletionsmutanten ΔN_{41-332} , ΔC_{1-233} und ΔC_{1-266} allein transfiziert. Das Ergebnis dieses Experiments ist ebenfalls in Abbildung 34 dargestellt (helle Säulen). Bei den CHO-Zellen sank die Apoptoserate von etwa 35 % nach Expression von Par-4 wt (Abb. 34, erste helle Säule) auf ca. 23 % nach Expression der Deletionsmutante ΔN_{41-332} , auf ca. 13 % bei Expression der Deletionsmutante ΔC_{1-233} und auf ca. 15 % bei Expression der Deletionsmutante ΔC_{1-266} (Abb. 34, helle Säulen 2-4).

4.2.6.2 Inhibition der Par-4-induzierten Apoptose durch Cytochalasin D-Behandlung

Um sicherzustellen, daß die in Abschnitt 4.2.2.1 durch die Par-4-Deletionsmutanten beobachtete Abnahme der Apoptoserate tatsächlich mit der verminderten Zytoskelett-Assoziation in ursächlichem Zusammenhang steht, wurde ein Experiment durchgeführt, in dem die Induktion der Apoptose durch Par-4 nach Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts untersucht wurde. Zu diesem Zweck wurden REF52.2-Zellen mit FLAG-Par-4 wt und GFP-Dlk in einem Verhältnis von 1:3 transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 15 min mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin D, einem Inhibitor der Aktin-Polymerisation, bzw. mit mit Nocodazol (5 $\mu\text{g/ml}$), einem Inhibitor der Mikrotubuli-Polymerisation behandelt. Als Kontrollansätze dienten unbehandelte, FLAG-Par-4 und GFP-Dlk-kotransfizierte Zellen. Die Zellen wurden anschließend fixiert und immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper gefärbt. Die Effizienz der Cytochalasin D- bzw. der Nocodazol-Behandlung wurde durch Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts mit Phalloidin bzw. durch Immunfärbung der behandelten Zellen mit einem

monoklonalen anti- α -Tubulin-Antikörper kontrolliert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Präparate zeigte, daß die Par-4-Dlk-vermittelte Apoptose durch Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts, jedoch nicht durch Zerstörung des Mikrotubuli-Zytoskeletts, beeinträchtigt wurde. Wie in Abbildung 35 dargestellt, sank die Apoptoserate von ca. 60 % in den unbehandelten, Par-4 und Dlk-koexprimierenden Zellen (Abb. 35, linke Säule) auf ca. 40 % in den Par-4 und Dlk-koexprimierenden Zellen, die mit Cytochalasin D behandelt wurden (Abb. 35, mittlere Säule). In den Nocodazol-behandelten Zellen dagegen war die Apoptoserate der FLAG-Par-4 und GFP-Dlk-koexprimierenden Zellen unbeeinträchtigt (Abb. 35, rechte Säule).

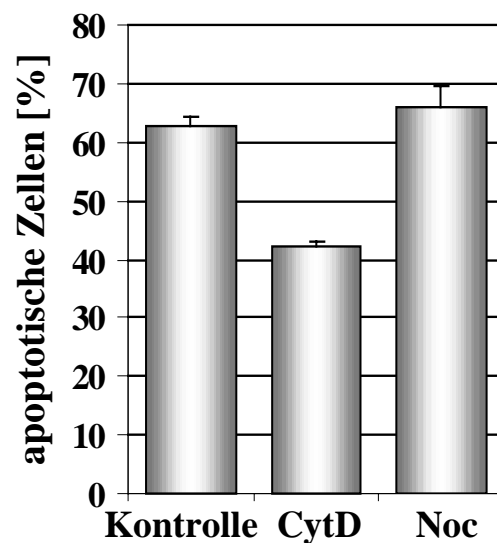


Abb. 35: Induktion der Apoptose durch Par-4 und Dlk nach Cytochalasin D- bzw. Nocodazol-Behandlung. REF52.2-Zellen wurden mit GFP-Dlk und FLAG-Par-4 wt in einem Verhältnis von 1:3 kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für 15 min mit 1 μ g/ml Cytochalasin D (CytD) bzw. für 2 h mit 5 μ g/ml Nocodazol (Noc) behandelt oder unbehandelt belassen (Kontrolle). Nach anschließender Fixierung und immunzytochemischer Färbung mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper wurden die Präparate fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die Apoptoserate wurde anhand morphologischer Merkmale der transfizierten Zellen in drei unabhängigen Experimenten durch Auszählen von je 100-200 Zellen bestimmt.

5. Diskussion

5.1 WIP fördert die N-WASP-vermittelte Aktin-Polymerisation

Durch eine Hefe-Zwei-Hybrid-Suche nach neuen Interaktionspartnern des großen T-Antigens (LT) des SV40-Virus (Klawitz, 2000) wurde aus einer Ratten-cDNA-Bank eine unvollständige cDNA von 1300 bp isoliert, die 83 % Sequenzidentität zu einer Maus-cDNA unbekannter Funktion aufwies. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die komplette cDNA isoliert, die nach Sequenzvergleich mit verschiedenen Datenbanken als das Ratten-Ortholog des erst kürzlich entdeckten humanen WASP-interagierenden Proteins (WIP; Ramesh et al., 1997) identifiziert wurde. Im Hinblick auf die Interaktion mit LT handelte es sich jedoch bei dieser cDNA um einen falsch-positiven Klon. Die vollständige Isolierung der Ratten-WIP-cDNA und die eingehende Charakterisierung des Proteins lieferte eine Reihe neuer Erkenntnisse einerseits über die Interaktion von WIP mit dem Aktin-Zytoskelett und andererseits über die funktionelle Beziehung von WIP und seinem Interaktionspartner N-WASP, einem Mitglied der WASP-Familie.

5.1.1 WIP ist ein modular aufgebautes Protein

Durch Aminosäuresequenzvergleiche mit Hilfe von Datenbankanalysen wurde eine Vielzahl von Aktin-Bindungsmotiven in der Aminosäuresequenz des Ratten-WIP-Orthologs identifiziert (s. Anhang B), die zwischen dem Ratten- und dem humanen WIP-Protein (Ramesh et al., 1997) vollständig konserviert sind und eine direkte Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett (KLKK-Motiv) bzw. eine indirekte Aktin-Bindung (Profilin-bindende ABM-2-Motive) vermitteln können. Desweiteren enthält WIP mehrere prolinreiche SH3-Bindungsmotive, die die Interaktion mit Proteinen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind (z. B. Src-Kinase), ermöglichen (Finan et al., 1996; Moreau et al., 2000). Das Vorhandensein dieser Vielzahl an Interaktionsmotiven, die sich zum Teil auch in den WIP-Interaktionspartnern WASP und N-WASP wiederfinden, deutet darauf hin, daß WIP an verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligt sein kann, je nachdem, welche Interaktionspartner zur Verfügung stehen.

Die funktionelle Vielseitigkeit von WIP wird zusätzlich durch alternatives Spleißen der WIP-mRNA erhöht. Die Expressionsanalyse der WIP-Transkripte in verschiedenen Rattengeweben durch Northern Blot-Analyse zeigte neben der ubiquitären Expression von WIP auch die Expression verschiedener Spleißformen. Während die zwei 3,8 kb und

5,0 kb großen Transkripte in den meisten Geweben exprimiert wurden, trat ein 6,9 kb großes Transkript spezifisch in der Skelett-Muskulatur auf. Drei kleinere Transkripte von 2,4 kb, 1,8 kb und 1,4 kb waren dagegen nur in Herz-, Leber- und/oder Hodengewebe zu finden. Diese Spleißformen haben möglicherweise gewebespezifische Funktionen.

Die Analyse der Spleißprodukte mit verschiedenen, aus der WIP-cDNA abgeleiteten Sonden, und der anschließende Vergleich mit der Exon-Struktur der WIP cDNA zeigte, daß sich die verschiedenen Transkripte in der Zusammensetzung der Protein-Bindungsmotive unterscheiden und folglich auch in ihrem Interaktionsspektrum differieren können. In allen Spleißvarianten ist mindestens ein ABM-2-Motiv enthalten, wobei das Wildtyp-Protein drei Kopien dieses Motivs beinhaltet. Die WASP-Bindungsdomäne dagegen fehlt in den 1,8 kb und 1,1 kb großen Transkripten. Daher ist anzunehmen, daß diese Transkripte zelluläre Funktionen ausüben, die unabhängig von WASP oder N-WASP sind. Die VH1-Domäne mit dem Aktin-Bindungsmotiv KLKK fehlt in dem 1,4 kb großen Transkript, das aber dennoch eine WASP-Bindungsdomäne besitzt. Dieses Transkript könnte daher eine natürliche dominant-negative Variante von WIP darstellen, die möglicherweise an der Regulation der WASP- bzw. N-WASP-Aktivität beteiligt ist, indem sie mit WASP bzw. N-WASP interagiert, ohne dabei mit Aktin zu assoziieren, wodurch die Aktin-polymerisierende Funktion von WASP bzw. N-WASP blockiert wäre. Ähnliche Fälle, in denen Signaltransduktionswege durch natürliche Spleißvarianten reguliert werden, sind z. B. für MyD88, ein Adapterprotein, das an der Aktivierung von NF κ B beteiligt ist, für den Transkriptionsfaktor Stat5 und für den Kalziumkanal RyR3 bereits beschrieben worden (Janssens et al., 2002; Yamashita et al., 2003; Jiang et al., 2003). Die Isolierung und Charakterisierung der verschiedenen WIP-Transkripte könnte daher interessante Erkenntnisse über die Funktionen von WIP sowie über die Regulation der beteiligten Signaltransduktionswege vermitteln.

5.1.2 WIP ist ein Aktin-bindendes Protein

Die Expression von WIP in Säugerzellen zeigte eine deutliche Kollokalisierung des Proteins mit den Spannungsfasern des Aktin-Filamentsystems. Eine Deletionsmutante, der das dritte ABM-2-Motiv fehlte, zeigte eine unbeeinträchtigte Aktin-Bindung. Darüber hinaus war auch die zytoskelettäre Assoziation einer Punktmutante, in der das Aktin-Bindungsmotiv KLKK gegen KLAA ausgetauscht war, in der Aktin-Filamentbildung nicht beeinträchtigt. Offenbar ist die Eliminierung einer einzelnen Aktin-Bindungsdomäne nicht ausreichend, um die Aktin-Assoziation des WIP-Proteins zu unterbinden. Selbst die

Entfernung des dritten ABM-2-Motivs zusammen mit dem KLKK-Motiv führte zu keiner Veränderung in der Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett. Die gleichmäßige Verteilung der Aktin-Bindungsmotive über das gesamte Protein gewährleistet wahrscheinlich auch dann die zytoskelettäre Assoziation von WIP, wenn eines der Aktin-Bindungsmotive sterisch nicht zugänglich ist, z. B. durch die Interaktion mit anderen Proteinen. Folglich wird die Aktin-Bindung von WIP nicht vorrangig von einer definierten Bindungsdomäne vermittelt, sondern durch die Kombination mehrerer über das Protein verteilter Bindungsmotive. Die gleichmäßige Verteilung der Aktin-Bindungsmotive führt möglicherweise auch zu einer Zytoskelett-Bindung der Spleißvarianten von WIP.

Um den Einfluß von WIP auf das Aktin-Zytoskelett genauer zu untersuchen, wurde das Protein in verschiedenen Tumorzelllinien, die im Vergleich zu Fibroblasten ein nur schwach ausgeprägtes Aktin-Filamentsystem besitzen, exprimiert. Obwohl WIP auch in diesen Zellen eine Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett zeigte, sofern Aktin-Filamente in diesen Zellen ausgeprägt waren, war dennoch keine durch WIP induzierte Umstrukturierung des Aktin-Filamentsystems zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen, daß in diesen Tumorzelllinien die alleinige Expression von WIP nicht ausreichend ist, um eine Aktin-Polymerisation oder eine Reorganisation des Aktin-Filamentsystems herbeizuführen. In der PNET-Zelllinie TZ103 z. B. ist die Überexpression von Gelsolin, einem Protein, das an der Aktin-Depolymerisation beteiligt ist, demonstriert worden (Klawitz et al., 2001). Es ist daher möglich, daß in diesen Tumorzellen eine potentielle Aktivierung der Aktin-Polymerisation durch WIP durch das hohe Expressionsniveau von Gelsolin inhibiert wird.

Die Untersuchung der Stärke der Aktin-Assoziation von WIP durch Triton X-100-Extraktionsexperimente zeigte überraschenderweise, daß es sich um eine äußerst schwache Bindung handelt. Bereits die Behandlung mit 0,2 % Triton X-100 für 10 s führte zu einer kompletten Ablösung des WIP-Proteins von den Spannungsfasern des Zytoskeletts. Besonders vor dem Hintergrund der bisherigen Ergebnisse, die gezeigt haben, daß WIP durch die Kombination mehrerer verschiedener Aktin-Bindungsmotive mit den Aktin-Filamenten assoziiert, erscheint die schwache Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett verwunderlich. Es ist bekannt, daß nicht alle Aktin-bindenden Proteine eine starke Bindungs-Affinität zu Aktin aufweisen; für verschiedene Myosin-Isoformen sind z. B. deutlich unterschiedliche Bindungsaffinitäten für Aktin ermittelt worden, wobei die

schwächer bindenden Isoformen bei der Aktin-Bindung eine höhere Dynamik aufweisen (Morano und Haase, 1997). Möglicherweise ist eine schwache, reversible Bindung von WIP an Aktin-Filamente eine notwendige Voraussetzung für eine rasche Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts oder für die Beteiligung von WIP an verschiedenen Signaltransduktionsprozessen.

5.1.3 Die Koexpression von WIP und N-WASP führt zur Aktin-Reorganisation

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß das Ratten-WIP, wie auch sein humanes Ortholog, *in vitro* mit N-WASP interagieren kann. Die beiden Proteine interagieren direkt miteinander, wobei die Interaktion durch die Aminosäuren 401 bis 487 von WIP vermittelt wird. Die WASP-Bindedomäne des Ratten-WIP-Proteins entspricht damit der von Ramesh et al. (Ramesh et al., 1997) für das humane WIP ermittelten Bindungsdomäne. Interessanterweise ist die Interaktion von WIP und N-WASP aufgehoben, sobald eine der Bindungsdomänen der Proteine fehlt. Obwohl WIP und N-WASP mehrere Interaktionspartner gemeinsam haben (z. B. Aktin und Profilin), reicht dies nicht aus, um eine indirekte Interaktion der beiden Proteine herbeizuführen.

Die alleinige Expression von N-WASP in Säugerzellen führte, im Gegensatz zu den von (Miki et al., 1996) veröffentlichten Daten, nicht zur Bildung von Filopodien, sondern lediglich zur Anreicherung von N-WASP und Aktin am Zellsaum in einigen der transfizierten Zellen, während der größte Teil des Proteins im Zellkern und im perinukleären Bereich lokalisiert war. Die Kernlokalisierung von N-WASP wurde auch von anderen Arbeitsgruppen demonstriert (Miki et al., 1996; Bear et al., 1998). Desweiteren ergab die Analyse der Aminosäuresequenz von N-WASP mit Hilfe des Computerprogramms *PSORT II* (<http://psort.nibb.ac.jp>) eine 69 %ige Wahrscheinlichkeit der Kernlokalisierung von N-WASP sowie das Vorhandensein von drei Kernlokalisationssequenzen an den Positionen 128, 131 und 194. Die Bedeutung der Kernlokalisierung von N-WASP ist bisher unklar. Möglicherweise dient der Kern als ein Depot für N-WASP, das bei Bedarf mobilisiert werden kann. Vielleicht übt aber auch N-WASP im Zellkern eine bisher unbekannt Funktion aus.

Interessanterweise führte die Koexpression von WIP und N-WASP zu einer deutlichen Veränderung der subzellulären Lokalisation von N-WASP. Das Protein konnte nach Koexpression von WIP nicht mehr im Kern nachgewiesen werden, sondern war verstärkt an der Zellperipherie lokalisiert, wo es zu einer vermehrten Bildung von Filopodien kam. In den WIP und N-WASP-koexprimierenden Zellen konnte eine deutliche Kolo-kalisation

von WIP und N-WASP nachgewiesen werden. Der Mechanismus, der zu einer Translokation von N-WASP in das Zytoplasma führt, könnte darin begründet sein, daß ein durch WIP stimulierter aktiver Transport von N-WASP aus dem Kern stattfindet; viel wahrscheinlicher ist jedoch, daß N-WASP durch die Komplexbildung mit WIP am Eintritt in den Kern gehindert wird, zumal eine der Kernlokalisationssequenzen von N-WASP in der WIP-Bindungsdomäne liegt. Durch die Bindung von N-WASP an WIP könnte also dieses Signal verdeckt sein und dadurch der Kerntransport unterbunden werden.

Neben der Relokalisation von N-WASP nach Koexpression von WIP konnte weiterhin gezeigt werden, daß die gleichzeitige Expression der beiden Proteine zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts führte. Die WIP- und N-WASP-koexprimierenden Zellen wiesen weniger Spannungsfasern auf und zeigten gleichzeitig eine Anreicherung von Aktin an der Zellperipherie sowie die Ausbildung von Filopodien. Die beobachteten Effekte ähnelten morphologisch denen, die durch EGF-Stimulation von N-WASP exprimierenden Zellen hervorgerufen wurden (Miki et al., 1996): Nach Bindung von EGF an den EGF-Rezeptor erfolgt die Rekrutierung eines Komplexes aus dem Adapterprotein Grb2 und dem Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor Sos, der die Rho-GTPase Cdc42 rekrutieren und aktivieren kann. N-WASP wird wahrscheinlich durch Grb2 an den EGF-Rezeptor rekrutiert, wie es bereits für WASP demonstriert wurde, und dann durch Cdc42 aktiviert (She et al., 1997; Carlier et al., 2000). Die Aktivierung von N-WASP führt dann zu einer Auflösung von Spannungsfasern und zur vermehrten Bildung von Filopodien. Der Vergleich zeigt, daß auch die Koexpression von WIP, ebenso wie die Stimulation mit EGF, zur Aktivierung von N-WASP führen kann. Es sind dabei zwei Möglichkeiten denkbar. Zum einen könnte die Relokalisation von N-WASP durch WIP dazu führen, daß N-WASP mit seinem Aktivator Cdc42 interagieren und durch diesen aktiviert werden kann. Zum anderen könnte die Bindung von WIP selbst die Aktivierung von N-WASP hervorrufen. Nach der bisherigen Modellvorstellung nimmt N-WASP normalerweise eine geschlossene Konformation ein, die durch intramolekulare Interaktion zwischen basischen Aminosäuren am N-Terminus und einer sauren C-terminalen Domäne aufrechterhalten wird (Miki et al., 1996; Kim et al., 2000). In dieser geschlossenen Konformation ist das Protein für die Interaktion mit dem Arp2/3-Komplex oder Aktin selbst nicht zugänglich. Die Aktivierung erfolgt durch die Bindung von Cdc42 an die N-terminale GTPase-Bindungsdomäne (GBD), wodurch die intramolekulare Bindung aufgelöst und die Interaktion von N-WASP mit dem Arp2/3-Komplex und Aktin ermöglicht wird (Miki et al., 1998; Kim et al., 2000).

Die Bindungsstelle von WIP umfaßt die ersten 147 Aminosäuren von N-WASP (Ramesh et al., 1997); es wäre also denkbar, daß auch WIP, analog zu Cdc42, N-WASP von der geschlossenen, inaktiven Konformation in die geöffnete, aktive Form überführen kann. Da die Bindungsstellen von WIP und Cdc42 sich nicht gegenseitig ausschließen (Ramesh et al., 1997), wäre es auch möglich, daß eine sequenzielle Aktivierung von N-WASP stattfindet, in der zuerst WIP an den freiliegenden N-Terminus des Proteins bindet, bevor dann Cdc42 an die weiter C-terminal gelegene GB-Domäne binden und so die vollständige Aktivierung von N-WASP auslösen kann.

Die Aktivierung des N-WASP-Signaltransduktionsweges durch WIP zeigt, daß durch Überexpression von WIP der Effekt von Wachstumsfaktoren auf die N-WASP-Aktivierung nachgeahmt werden kann. Dies bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, daß WIP in einem Signaltransduktionsweg, der nach Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptoren über die Aktivierung von N-WASP zur Ausbildung von Filopodien führt, oberhalb von N-WASP eingeordnet werden muß. Vielmehr deuten Studien mit Vaccinia-Viren und parasitischen Bakterien wie *Shigella*, die sich die Aktin-Polymerisations-Maschinerie ihrer Wirtszelle zu Fortbewegungszwecken zunutze machen, auf eine gegenseitige Rekrutierung von N-WASP und WIP im Zuge der Aktin-Polymerisation hin (Moreau et al., 2000).

Der Einfluß von WIP auf die Aktin-Polymerisation erscheint in den bisher veröffentlichten Studien widersprüchlich. So wurde z. B. von einer inhibitorischen Wirkung von WIP auf die Aktin-Polymerisation und gleichzeitiger Stabilisierung von Aktin-Filamenten berichtet (Martinez-Quiles et al., 2001), während in anderen Studien die Aktivierung der Aktin-Polymerisation durch WIP beobachtet wurde (Ramesh et al., 1997; Anton et al., 2003). Generell hängt die Funktion von WIP wahrscheinlich stark vom zellulären Kontext ab, worauf auch der Nachweis der gewebespezifischen Spleißformen von WIP hindeutet. Dennoch lassen sich die beobachteten Widersprüche durch ein hypothetisches Modell erklären, in welchem WIP direkt an Aktin-Filamente bindet (z. B. an Spannungsfasern) und diese in Abwesenheit von N-WASP stabilisiert, während WIP in Gegenwart von N-WASP die Depolymerisation von F-Aktin stimuliert. Dabei wird die Neubildung von Aktin-Filamenten (z. B. in Filopodien) unterstützt, indem WIP Aktin-Monomere zu N-WASP rekrutiert. Die Präsenz von Profilin-Bindungsstellen in beiden Proteinen kann wahrscheinlich die Effizienz der Aktin-Umstrukturierung von Spannungsfasern zu Filopodien zusätzlich erhöhen, da Profilin den ADP-ATP-Austausch der Aktin-Monomere

beschleunigt (Goldschmidt-Clermont et al., 1992). In diesem Modell würde WIP für die Aktin-Reorganisation keine essentielle Rolle spielen, könnte jedoch durch Erhöhung der Aktin-Dynamik die Effizienz einer solchen Umstrukturierung des Aktin-Filamentssystems steigern.

Allerdings erfordert das beschriebene Modell, daß WIP verschiedene Funktionen ausübt, die von der Verfügbarkeit von N-WASP abhängen: Erstens eine Aktin-stabilisierende Wirkung in Abwesenheit von N-WASP und zweitens eine Aktin-depolymerisierende Aktivität in Gegenwart von N-WASP. Einen ersten Hinweis auf eine stabilisierende Funktion von WIP in Abwesenheit von N-WASP lieferte die Beobachtung von verstärkter Spannungsfaser-Bildung in Fibroblasten, die die Deletionsmutante WIP400 exprimierten. Diese Mutante ist nicht mehr in der Lage, mit N-WASP zu interagieren. Zudem ist gezeigt worden, daß die ektopische Expression von WIP in B-Zellen zu einem erhöhten F-Aktin-Gehalt der Zellen führt (Ramesh et al., 1997). Zu klären ist, auf welchen Grundlagen der Funktionswechsel von WIP bei der Reorganisation des Zytoskeletts beruht. Denkbar wäre die Rekrutierung unterschiedlicher WIP-Interaktionspartner in An- oder Abwesenheit von N-WASP. Die Bestätigung des vorgestellten hypothetischen Modells ist durch zukünftige Untersuchungen zu erbringen.

5.2 Das Aktin-Zytoskelett ist ein Effektor der Par-4-vermittelten Apoptose

Das pro-apoptotische Protein Par-4 wurde als Produkt eines Genes entdeckt, das zu Beginn der Apoptose-Induktion in Prostatakarzinomzellen hochreguliert wird (Sells et al., 1994). Seitdem sind mehrere Interaktionspartner von Par-4 identifiziert worden, die an der durch Par-4 vermittelten Apoptose beteiligt sind. Die bisher identifizierten Signalwege der Par-4-induzierten Apoptose beinhalten u. a. die Inaktivierung der proliferationsfördernden Proteinkinase C-Isoform ζ (PKC ζ) durch direkte Bindung (Diaz-Meco et al., 1996) und die negative Regulation der Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor WT1 (Johnstone et al., 1996; Cheema et al., 2003). Die Interaktion von Par-4 mit der Proteinkinase Dlk (*DAP-like kinase*; Kögel et al., 1998) führt über einen bisher nicht aufgeklärten Signalweg zur Auslösung der Apoptose (Page et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde durch Expression von Par-4 im Zellkulturmodell und in verschiedenen Tumorzelllinien die Par-4-vermittelte Apoptose

untersucht, wobei eine besondere Rolle des Aktin-Zytoskeletts an der durch Par-4 induzierten Apoptose gezeigt werden konnte.

5.2.1 Die stabile Expression von Par-4 führt zur Selektion von Zelllinien, die Apoptosedefekte aufweisen

Zur Etablierung eines Zellkultur-Modells wurden stabile Par-4-GFP-exprimierende Zelllinien aus der Hamster-Fibroblasten-Zelllinie CHO hergestellt. Bei der Charakterisierung von sechs unabhängig voneinander isolierten stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien stellte sich heraus, daß einige dieser Zelllinien weniger stark auf apoptotische Signale reagierten als CHO wt-Zellen. So führte die Expression von Dlk in den stabilen Par-4-Zelllinien A3, A6, B5, D3-3 und D3-8 zu einer Rate von 30-40 % apoptotischen Zellen, während die Koexpression von Par-4 und Dlk in CHO wt-Zellen in ca. 50-60 % der Zellen Apoptose auslöste. Desweiteren waren in den Zelllinien B5, D3-3 und D3-8 im Vergleich zu CHO wt-Zellen nach Apoptose-Induktion durch Staurosporin die apoptotische DNA-Fragmentierung sowie die Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) stark vermindert.

Es ist anzunehmen, daß die bei den stabilen Par-4-exprimierenden Zelllinien beobachtete verringerte Sensitivität gegenüber Apoptose-Induktion durch Dlk und STS in einem direkten Zusammenhang mit der konstitutiven Expression von Par-4 steht. Bei der Etablierung der stabilen Zelllinien erfolgte möglicherweise durch die Expression des pro-apoptotischen Proteins Par-4 eine Selektion von Zellen, die Defekte in den Signalwegen aufweisen, durch die Par-4 die Apoptose vermittelt. Solche Defekte könnten es den Zellen ermöglichen, die konstitutive Expression des pro-apoptotischen Proteins Par-4 zu tolerieren. Die genaue Charakterisierung dieser Defekte könnte daher Rückschlüsse auf die Signalwege der Par-4-vermittelten Apoptose zulassen.

So könnte z. B. die Ursache für die Verringerung der apoptotischen DNA-Fragmentierung in den stabilen Par-4-GFP-exprimierenden Zelllinien B5, D3-3 und D3-8 an einer Unterbrechung der apoptotischen Signalwege stromabwärts von Par-4 und stromaufwärts einer der apoptotischen Nukleasen, die auf verschiedenen Wegen aktiviert werden können, liegen. Der am besten untersuchte Signalweg beinhaltet die Caspase-abhängige Aktivierung der Endonuklease CAD (*caspase-activated DNase*; Liu et al., 1997). Dieses Enzym liegt in seinem inaktiven Zustand in einem Komplex mit seinem Chaperon und Inhibitor ICAD (*Inhibitor of CAD*; Mitamura et al., 1998) vor. Wird der Inhibitor durch die

Caspase-3 gespalten, so ist die DNase CAD aktiv und spaltet das Chromatin der apoptotischen Zelle zwischen den Nukleosomen, so daß die für die Apoptose typische „DNA-Leiter“ entsteht. Die Beobachtung, daß auch in Zellen von transgenen Mäusen, die einen nicht-spaltbaren CAD-Inhibitor (resultiert in inaktiver CAD) oder keinen CAD-Inhibitor (resultiert in falsch gefalteter und daher inaktiver CAD) exprimieren, apoptotische DNA-Fragmentierung stattfindet, führte zu der Identifizierung einer weiteren apoptotischen DNase, der Endonuklease G (EndoG; Li et al., 2001). EndoG wird in einer Caspase-unabhängigen Weise während der Apoptose aus den Mitochondrien freigesetzt und wandert in den Zellkern, wo die Nuklease an der apoptotischen Chromatin-Spaltung beteiligt ist. Es existieren desweiteren Hinweise in der Literatur, daß neben CAD und EndoG noch weitere Endonukleasen an der apoptotischen DNA-Fragmentierung beteiligt sein könnten (Shiokawa und Tanuma, 1998; Oliveri et al., 2001).

In den stabil mit Par-4 transfizierten Zelllinien B5, D3-3 und D3-8, die einen Defekt in der apoptotischen DNA-Fragmentierung aufweisen, ist gleichzeitig auch die proteolytische Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) verringert. PARP ist ein DNA-Reparaturenzym, das während der Apoptose durch die Caspase-3 gespalten und somit inaktiviert wird. Die gleichzeitige Verringerung von PARP-Spaltung und DNA-Fragmentierung während der Apoptose ist ein starker Hinweis darauf, daß in den Zelllinien B5, D3-3 und D3-8 entweder ein Defekt der Caspase-3 selbst oder in ihrer Aktivierungskaskade vorliegt. Dies würde bedeuten, daß die Par-4-vermittelte Apoptose in CHO-Zellen über die Aktivierung der Caspase-3 führt. Diese Hypothese deckt sich mit der Beobachtung, daß in neoplastischen Lymphozyten die Par-4-vermittelte Apoptose zur Aktivierung der Caspase-3 führt (Boehrer et al., 2002).

In der Zelllinie D3-3 wurde zwar eine verringerte PARP-Spaltung und DNA-Fragmentierung beobachtet, die Apoptose-Induktion durch Koexpression von Par-4 und Dlk war jedoch nicht so stark vermindert wie in den Zelllinien B5 und D3-8, die ebenfalls eine verringerte PARP-Spaltung und DNA-Fragmentierung aufwiesen. Auf der anderen Seite ist in den stabilen Zelllinien A3 und A6 die Apoptose-Induktion durch Dlk vermindert, obwohl PARP-Spaltung und DNA-Fragmentierung nachweisbar sind. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß an der Auslösung der Apoptose, die zum einen durch alleinige Expression von Par-4 und zum anderen durch Koexpression von Par-4 und Dlk vermittelt wird, wahrscheinlich verschiedene Signalwege beteiligt sind. Wenn in der Zelllinie D3-3 tatsächlich ein Defekt der Caspase-3-Aktivierung vorliegt, so ist die Caspase-3 für die

Par-4/Dlk-induzierte Apoptose offenbar nicht essentiell. Diese Annahme wird durch Studien unterstützt, in denen gezeigt wurde, daß die durch eine konstitutiv-proapoptotische Dlk-Mutante ausgelöste Apoptose unabhängig von Caspasen erfolgen kann (Kögel et al., 2001; Kögel et al., 2003).

5.2.2 Verringerte Expression von endogenem Par-4 in Gehirntumorzelllinien

Es wurde bereits gezeigt, daß die Expression von Par-4 in verschiedenen Tumor-Arten wie Nierenkarzinom (Cook et al., 1999), Leukämie (Boehrer et al., 2001), Melanom (Lucas et al., 2001) und Prostatakarzinom (Chakraborty et al., 2001) stark verringert ist. Desweiteren spielt Par-4 eine wichtige Rolle bei der Apoptose-Induktion in neuronalen Zellen (Mattson et al., 1999). Auch in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer (Guo et al., 1998), Parkinson (Duan et al., 1999) und Amyotrophischer Lateralsklerose (ALS; (Pedersen et al., 2000) ist eine deregulierte Par-4-Expression festgestellt worden, die zu erhöhten Apoptoseraten führt. Da Par-4 anscheinend eine wichtige Rolle bei der Apoptose neuronaler Zellen spielt, stellte sich die Frage, ob Par-4 auch an der Entwicklung von neuronalen Tumoren beteiligt ist.

Bei der Untersuchung der Par-4-Expression in verschiedenen Gehirntumorzelllinien zeigten 8 von 10 Zelllinien keine oder nur eine geringe Expression von Par-4 auf Proteinebene. Der Verlust der Par-4-Expression könnte im Verlauf der Tumorentstehung zu einem Wachstumsvorteil für die Tumorzellen geführt haben, da sie weniger sensitiv gegenüber apoptotischen Reizen geworden sind. Da die meisten transformierten Zellen noch vor der Tumorentstehung durch apoptotische Prozesse eliminiert werden, die entweder intrazellulär oder durch äußere Einwirkung, z. B. durch die Ausschüttung von Cytokinen durch Lymphozyten, ausgelöst werden, ist der Erwerb der Resistenz gegenüber apoptotische Stimuli eine der Grundvoraussetzungen für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Tumoren (Hanahan und Weinberg, 2000). Gleichzeitig stellt die Apoptoseresistenz ein großes Problem bei der therapeutischen Behandlung von Tumorerkrankungen dar, da viele der dabei verwendeten Medikamente ihre Wirkung durch die Auslösung apoptotischer Prozesse entfalten (Tolomeo und Simoni, 2002).

Die Untersuchung der Par-4-Expression in den verschiedenen Gehirntumorzelllinien hat gezeigt, daß sich die verminderte Par-4-Expression in einigen Zelllinien auf mRNA-Ebene (SH-SY5Y und C6), in anderen Zelllinien dagegen auf Protein-Ebene manifestierte (TZ103,

TZ107, N2A und U251-MG); zum Teil war in den Zelllinien die Par-4-Expression auf mRNA-Ebene bereits deutlich verringert und auf Protein-Ebene nicht mehr nachweisbar (TZ102 und U87-MG). Dies deutet darauf hin, daß der Verlust der Par-4-Expression keine Begleiterscheinung der Transformation ist, sondern daß die Verringerung der Par-4-Expression selbst eine Strategie darstellen könnte, die den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil verschafft. Die Ursachen für die Verringerung der Par-4-Expression in den untersuchten Gehirntumorzelllinien sind bisher unklar. Neben Mutationen des Par-4-Gens wäre eine transkriptionelle Regulation von Par-4 durch ein anti-apoptisches Protein möglich. Der Par-4-Interaktionspartner PKC ζ beispielsweise hemmt die Transkription des Par-4-Gens (Hsu et al., 2002). Da jedoch in den untersuchten Gehirntumorzelllinien die Expression von PKC ζ im Vergleich zu den Kontrollzelllinien nicht signifikant erhöht war und das Protein auch keine konstitutive Aktivität aufwies, ist unwahrscheinlich, daß in den untersuchten Zelllinien eine negative Regulation des Par-4-Gens durch PKC ζ den Grund für die verminderte Par-4-Expression darstellt.

5.2.3 Ektopische Par-4-Expression induziert Apoptose in Gehirntumorzelllinien

Über die apoptotische Aktivität von Par-4 liegen widersprüchliche Berichte vor. Einige Studien belegen die Induktion von Apoptose durch Par-4, ohne daß es weiterer apoptotischer Stimuli bedarf (Lucas et al., 2001; Chakraborty et al., 2001), während andere Studien demonstrieren, daß Par-4 nur die Sensitivität von Zellen gegenüber Apoptose-auslösende Faktoren erhöht (Sells et al., 1994; Diaz-Meco et al., 1996; Sells et al., 1997; Cook et al., 1999; Bohrer et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die alleinige Expression von Par-4 in 8 von 10 untersuchten Gehirntumorzelllinien zu einer raschen Induktion der Apoptose führt. Ob die alleinige Expression von Par-4 ausreicht, um Apoptose zu induzieren, oder ob Par-4 die Wirkung anderer Apoptose-auslösender Faktoren verstärkt, hängt möglicherweise auch vom jeweiligen Zelltyp ab. Tatsächlich ist gezeigt worden, daß die ektopische Expression von Par-4 in Ras-transformierten Zellen, nicht aber in Zellen ohne onkogenes Ras, direkt Apoptose zur Auslösung der Apoptose führt (Nalca et al., 1999). Es wäre auch denkbar, daß in Zellen, in denen einer der Par-4-Interaktionspartner überexprimiert wird, die Expression von Par-4 ohne weitere apoptotische Stimuli zur Induktion von Apoptose führen kann.

Einer der möglichen Wege, auf denen Par-4 die Auslösung der Apoptose herbeiführen kann, ist die Inhibition der PKC ζ (Diaz-Meco et al., 1996), die den Transkriptionsfaktors NF κ B aktivieren kann (Dominguez et al., 1993; Diaz-Meco et al., 1993; Sanz et al., 1999). PKC ζ ist auch an der Aktivierung des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signaltransduktionsweges beteiligt (Berra et al., 1993; Berra et al., 1995). Die Inhibition der PKC ζ führt demnach zur Unterbrechung von wachstumsfördernden, anti-apoptotischen Signalwegen. Tatsächlich ist bereits gezeigt worden, daß in Glioblastomzellen, die eine konstitutiv aktive Form des EGF-Rezeptors exprimieren und dadurch eine von Wachstumsfaktoren unabhängige Aktivierung der Proliferations-Signaltransduktionswege aufweisen, die Inaktivierung der atypischen PKC-Isoformen durch ein inhibitorisches Peptid zur Induktion von Apoptose führt (Lorimer et al., 2002). Da in den untersuchten Gehirntumorzelllinien weder eine konstitutive Aktivierung der PKC ζ noch eine Inaktivierung nach Par-4-Expression gezeigt werden konnte, scheint die Inhibition der PKC ζ in den untersuchten Gehirntumorzelllinien keine Rolle für die Par-4-induzierte Apoptose zu spielen.

Ein weiterer Par-4-Interaktionspartner, der an der Par-4-induzierten Apoptose beteiligt ist, ist der Transkriptionsfaktor WT1 (Johnstone et al., 1996), der zusammen mit Par-4 die Transkription des Bcl-2-Gens negativ regulieren kann (Cheema et al., 2003). Viele Tumorzellen zeigen eine erhöhte Bcl-2-Expression, wodurch sie gegenüber apoptotischen Signalen resistent werden (Colombel et al., 1993; Fulda et al., 2002). Unter den in dieser Arbeit untersuchten Tumorzellen zeigten die Neuroblastom-Zelllinien SH-SY5Y und N2A eine sehr starke Expression von Bcl-2. Par-4 könnte möglicherweise gerade in diesen beiden Tumorzelllinien, die wahrscheinlich auch aufgrund der erhöhten Bcl-2-Expression ihre Apoptose-Resistenz aufrechterhalten, effektiv Apoptose auslösen, indem es die Bcl-2-Expression herunterreguliert. Da jedoch durch ektopische Expression von Par-4 keine Verringerung in der Bcl-2-Expression zu beobachten war, kann die Herunterregulation der Bcl-2-Expression durch Par-4 in den hier untersuchten Tumorzellen als Ursache für die Auslösung der Apoptose ausgeschlossen werden.

Im Hinblick auf eine mögliche Tumor-Therapie erscheint es besonders interessant, daß Par-4 in der Lage ist, in den Bcl-2 überexprimierenden Zellen effektiv Apoptose auszulösen. Die (Re-)Aktivierung der Par-4-vermittelten Signalwege könnte daher interessante Möglichkeiten für neue Therapie-Ansätze bieten.

5.2.4 Bedeutung der Aktin-Bindung für die pro-apoptotische Funktion von Par-4

Die Induktion der Apoptose durch die Interaktion von Par-4 mit PKC ζ oder mit WT1 beruht nach dem derzeitigen Wissensstand vorrangig auf einer Störung der anti-apoptotischen Signalwege. Ob Par-4 auf einem direkten, aktiven Weg zur Aktivierung des apoptotischen Programms führen kann, ist bisher nicht geklärt, wird aber durch den Befund unterstützt, daß in verschiedenen Tumorzelllinien durch Par-4 Apoptose ausgelöst wurde, ohne daß PKC ζ oder Bcl-2 inhibiert bzw. herunterreguliert wurden. Ein möglicher Interaktionspartner, der eine aktive Apoptose-Induktion zusammen mit Par-4 auslösen könnte, ist das pro-apoptotische Protein THAP1 (Roussigne et al., 2003). Die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion ist jedoch unklar, da beide Proteine in den untersuchten Zellen (NIH3T3) auch nach alleiniger Expression Apoptose auslösen können. Ein weiterer Kandidat ist die Kinase Dlk (*DAP like kinase*, Kögel et al., 1998), die zusammen mit Par-4 zu einer starken Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts und zur Induktion der Apoptose führt (Page et al., 1999). Da gezeigt worden ist, daß die leichte Kette des Myosin von Dlk *in vitro* phosphoryliert wird (Kögel et al., 1998), geht die während der Par-4- und Dlk-vermittelten Apoptose auftretende Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts möglicherweise auf eine verstärkte Myosin-Phosphorylierung und auf eine damit einhergehende Kontraktion der Spannungsfasern zurück. Der genaue Mechanismus der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

Da Par-4 in den meisten untersuchten Zelllinien eine Aktin-Assoziation aufweist, erscheint es möglich, daß Par-4 entweder durch die Interaktion mit endogener Dlk oder durch einen Dlk-unabhängigen Weg Apoptose auslöst, die durch das Aktin-Zytoskelett vermittelt wird. Tumorzellen zeigen häufig ein erhöhtes migratorisches Potential, das z. B. auf die erhöhte/verringerte Expression von zytoskelettären Komponenten oder auf die Deregulation der Zytoskelett-Umstrukturierung zurückgeht (Kassis et al., 2001; Feldner und Brandt, 2002). Möglicherweise können solche Veränderungen, wie z. B. die in den untersuchten PNET-Zelllinien nachgewiesene Überexpression von Gelsolin (Klawitz et al., 2001), durch eine erhöhte Dynamik des Zytoskeletts auch zu einer erhöhten Sensitivität für die Par-4-induzierte Apoptose führen.

Die Fähigkeit, an Aktin-Filamente zu binden, ist ein neuer Aspekt der Par-4-induzierten Apoptose. Zu Beginn der hier vorgestellten Arbeit war lediglich bekannt, daß ektopische exprimiertes Par-4 in Ratten- und Maus-Fibroblasten eine Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett aufweist. Ob jedoch ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktin-Bindung

und der Auslösung des programmierten Zelltods besteht, war bislang unklar. Die Aktin-Assoziation von Par-4 wurde zunächst durch Immunfluoreszenz-Analysen genauer untersucht, in denen Par-4-GFP-exprimierende Rattenfibroblasten mit Antikörpern gegen verschiedene Zytoskelett-Komponenten, darunter Myosin, Tropomyosin, α -Aktinin und Vinculin angefärbt wurden. Die Kolokalisation von Par-4 konnte zwar für Aktin-Filamente demonstriert werden; eine Aussage, mit welchem der untersuchten zytoskelettalen Komponenten (Aktin, Myosin, Tropomyosin) Par-4 interagiert, konnte jedoch anhand der Immunfluoreszenz-Analyse nicht getroffen werden. Die Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-Myosin-Antikörper zeigte eine alternierende Verteilung von Myosin und Par-4 entlang von Aktin-Filamenten. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, daß entweder ein bisher nicht identifiziertes Effektorprotein die Bindung von Par-4 an das Zytoskelett vermittelt, oder daß Par-4 direkt an F-Aktin bindet, und zwar an den Stellen, wo es nicht durch Myosin besetzt ist. Durch Kosedimentations- und *In vitro*-Filament-Bindungsversuche mit Aktin, die in Zusammenarbeit mit Dr. Susanne Illenberger (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, daß Par-4 tatsächlich *in vitro* direkt an Aktin binden kann.

Um die Aktin-Bindungsdomäne von Par-4 zu kartieren, wurden C- und N-terminal deletierte Par-4-Mutanten hergestellt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse dieser Mutanten zeigte, daß sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus von Par-4, der das Leucin-Zipper-Motiv und die Todesdomäne beinhaltet, für die Aktin-Assoziation notwendig sind. Durch Extraktionsversuche mit dem Detergenz Triton X-100 konnte gezeigt werden, daß die Assoziation von Par-4 mit dem Aktin-Zytoskelett sehr stabil ist. Weiterhin wurde durch die Extraktionsversuche anhand der Deletionsmutanten demonstriert, daß die starke, Triton X-unlösliche Bindung von Par-4 an das Zytoskelett durch den C-Terminus vermittelt wird. Zusammen mit den Kosedimentations- und *In vitro*-Bindungsversuchen von Par-4 und Aktin geht aus diesen Ergebnissen hervor, daß Par-4 zwei verschiedene Regionen besitzt, die die Bindung an das Aktin-Zytoskelett vermitteln: Die direkte Aktin-Bindung von Par-4 wird durch den N-Terminus vermittelt, während der C-Terminus die starke, Detergenz-unlösliche Bindung an die Aktin-Filamente bewirkt.

Interessanterweise stellte sich heraus, daß die Stärke der Aktin-Assoziation von Par-4 auch von den pH-Bedingungen der Umgebung beeinflussbar ist. Die Triton X-100-Extraktionsversuche bei pH-Werten von 5,5 zeigten, daß die Löslichkeit der beiden C-

terminal deletierten Mutanten im Vergleich zu neutralen pH-Werten unverändert war; Par-4 wt und die N-terminal deletierte Par-4-Mutante jedoch waren bei saurem pH-Wert deutlich stärker in der unlöslichen Fraktion vertreten, was darauf hindeutet, daß der C-Terminus von Par-4 für die pH-abhängige Bindung an das Aktin-Zytoskelett verantwortlich ist. Computeranalysen haben gezeigt, daß der C-Terminus bei der Dimerisierung von Par-4 eine *coiled-coil*-Struktur annehmen kann, die jedoch bei neutralen pH-Werten durch die Repulsion eines Glutamat- und eines Aspartat-Restes an den Positionen 305 und 310 verhindert wird (Dutta et al., 2001; Dutta et al., 2003). Die Absenkung des pH-Wertes in den sauren Bereich hat zur Folge, daß diese beiden Aminosäurereste durch Protonierung neutralisiert werden, so daß die Ausbildung einer *coiled coil*-Struktur ermöglicht wird (Dutta et al., 2001). Ob diese Eigenschaft des Leucin-Zippers auch die Bildung von Heterodimeren beeinflussen könnte, ist noch zu untersuchen. Die verstärkte Aktin-Bindung der N-terminal deletierten Par-4-Mutante durch pH-bedingte Stabilisierung des C-Terminus weist darauf hin, daß in dem Par-4 wt-Protein der N-Terminus möglicherweise eine stabilisierende Wirkung auf den C-Terminus ausübt, die durch Absenkung des pH-Wertes in den sauren Bereich simuliert werden kann. Die Stabilisierung des C-Terminus könnte dabei z. B. infolge einer Konformationsänderung von Par-4, die durch die vom N-Terminus vermittelte Aktin-Bindung ausgelöst wird, erfolgen; denkbar wäre aber auch eine intramolekulare Interaktion von basischen Aminosäureresten des N-Terminus mit den beiden repulsiven sauren Aminosäureresten an den Positionen 305 und 310. Desweiteren läßt dieser Befund vermuten, daß Par-4 entweder als Homodimer an Aktin-Filamente bindet oder daß die Bindung eines Par-4-Monomers an Aktin ebenfalls durch Absenkung des pH-Wertes bzw. durch den N-Terminus stabilisiert werden kann.

Die Quantifizierung der Apoptose-Induktion durch die verschiedenen Par-4-Deletionsmutanten zeigte, daß der Verlust der Aktin-Zytoskelett-Bindung der einzelnen Mutanten mit einer verringerten Apoptoserate korrelierte. Generell läßt sich der Verlust der proapoptischen Funktion der Par-4-Deletionsmutanten durch eine verringerte Fähigkeit, entweder direkt oder indirekt mit dem Aktin-Zytoskelett und/oder anderen Effektorproteinen zu interagieren, erklären. Da alle bisher identifizierten Interaktionspartner von Par-4 an den C-terminalen Teil von Par-4 binden, der die Todesdomäne und den Leucin-Zipper enthält (Johnstone et al., 1996; Diaz-Meco et al., 1996; Page et al., 1999; Roussigne et al., 2003), läßt sich der Verlust der apoptotischen Funktion der C-

terminalen deletierten Mutanten wahrscheinlich direkt dadurch erklären, daß sie keinen Interaktionspartner mehr binden können. Im Fall der N-terminal deletierten Par-4-Mutante dagegen geht die verringerte apoptotische Kapazität wahrscheinlich auf den Verlust der direkten Aktin-Bindung und/oder auf die fehlende Stabilisierung des C-Terminus zurück, wodurch (indirekt) die Bindung an das Aktin-Zytoskelett und auch die Bindung der Par-4-Interaktionspartner geschwächt wird. Daß die verminderte Apoptose-Induktion durch die Deletionsmutanten nicht allein auf die verringerte Bindung der Interaktionspartner, sondern auch auf eine verminderte Aktin-Assoziation zurückgeht, zeigte die Behandlung von Par-4- und Dlk-koexprimierenden Zellen mit Cytochalasin D, einem Inhibitor der Aktin-Polymerisation. Die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts führte in diesem Fall zu einer Reduktion der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose, ein Hinweis darauf, daß das Aktin-Zytoskelett direkt an der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose beteiligt ist.

Zusammenfassend lassen die in dieser Arbeit über Par-4 gewonnenen Erkenntnisse vermuten, daß der C-Terminus des Par-4-Proteins ein Sensor für apoptotische Stimuli sein könnte. Die Sequenzmotive der Todesdomäne und des Leucin-Zippers von Par-4 sind am C-Terminus des Proteins lokalisiert, wo sie miteinander überlappen. Die Struktur des Leucin-Zippers, der eine *coiled coil*-Struktur annimmt, und die der Todesdomäne, die aus 6 α -Helices besteht, schließen sich jedoch strukturell gegenseitig aus. Daher besteht die Möglichkeit, daß der C-Terminus von Par-4 je nach äußeren Bedingungen verschiedene Konformationen annehmen kann, die zum einen die Ausbildung des Leucin-Zippers und der *coiled coil*-Struktur und zum anderen die Formation der Todesdomäne begünstigt. Daß die Assoziation von Par-4 mit dem Aktin-Zytoskelett von der Struktur des C-Terminus abhängig ist, legen die Extraktions-Experimente nahe, durch die eine pH-abhängige Triton X-Löslichkeit von Par-4 gezeigt wurde. Daher könnte auch die Bindung von Par-4 an seine Interaktionspartner auf pH-abhängige Weise erfolgen. Möglicherweise existieren Interaktionspartner von Par-4, die mit den herkömmlichen experimentellen Ansätzen wie dem Hefe-Zwei-Hybrid-System oder durch Koimmunpräzipitationen nicht identifiziert werden können, da sie nur unter speziellen Bedingungen, z. B. in einem sauren Milieu (wie es beispielsweise in den Lysosomen herrscht), mit Par-4 interagieren. Die Herstellung und Untersuchung einer Par-4-Mutante, in der die repulsiven Glutamat- und Aspartat-Aminosäurereste ausgetauscht werden, um die die *coiled coil*-Struktur des C-Terminus von Par-4 zu stabilisieren, könnte hier zu interessanten neuen Erkenntnissen führen.

5.3 Ausblick

Der Vergleich der beiden Aktin-bindenden Proteine WIP und Par-4 zeigt, daß es sich in beiden Fällen um kleine, modular aufgebaute Proteine handelt, die jedoch an völlig verschiedenen Prozessen in der Zelle beteiligt sind.

WIP ist zusammen mit seinem Interaktionspartner N-WASP an der Regulation der Aktin-Filament-Neubildung und -Polymerisation beteiligt. Obwohl das Aktin-Zytoskelett einschließlich seiner Protein-Komponenten, seiner Funktion und der Regulation seiner Dynamik seit vielen Jahren ein Objekt intensivster Forschung darstellt, sind die beteiligten Signaltransduktionswege doch aufgrund ihrer Komplexität immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Die in dieser Arbeit demonstrierte WIP-vermittelte Relokalisation von N-WASP und die dadurch ausgelöste Zytoskelett-Umstrukturierung könnte neue Einblicke in die Mechanismen der Reorganisation des Aktin-Filamentsystems liefern. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Entdeckung verschiedener Spleißformen von WIP, die möglicherweise zu der Komplexität der Aktin-Dynamik beitragen. Die Isolierung und Charakterisierung der WIP-Spleißformen und die Aufklärung ihrer einzelnen Funktionen stellen daher interessante zukünftige Forschungsziele dar.

Die Bedeutung der Aktin-Bindung von Par-4 ist nicht auf den ersten Blick ersichtlich, da es sich um ein pro-apoptotisches Protein handelt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle des Aktin-Zytoskeletts in der Par-4-vermittelten Apoptose hin. Besonders interessant ist dabei die pH-abhängige Aktin-Bindung von Par-4 an das Aktin-Zytoskelett. Möglicherweise handelt es sich bei Par-4 um ein Sensor-Protein, das Milieuveränderungen in der Zelle wahrnehmen kann und daraufhin durch eine Konformationsänderung und/oder Änderung seiner Bindungsaffinität für Interaktionspartner entsprechende Signalkaskaden auslösen kann. Die genauere Untersuchung der pH-abhängigen Bindungseigenschaften von Par-4 sowie die Isolierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern, die in Abhängigkeit vom jeweiligen pH-Wert an Par-4 binden und die daher mit herkömmlichen Methoden nicht erfaßt werden können, ist für die Aufklärung der Par-4-vermittelten Apoptose unbedingt notwendig. Da die deregulierte Expression von Par-4 mit Tumorerkrankungen und neurodegenerativen Erkrankungen in ursächlichen Zusammenhang gebracht wird, könnten weitere Kenntnisse über die Signalwege der Par-4-vermittelten Apoptose eventuell zur Entwicklung neuer Therapieansätze zur Krebsbekämpfung oder zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen beitragen.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei Aktin-assoziierte Proteine, WIP und Par-4, durch protein-biochemische und zellbiologische Methoden untersucht.

Zunächst wurde ausgehend von einer unvollständigen cDNA-Sequenz die komplette cDNA eines neuen Gens aus einer Ratten-cDNA-Bibliothek isoliert und anhand von computerunterstützten Sequenzanalysen als das Ratten-Ortholog des humanen WASP-interagierenden Proteins (WIP) identifiziert. Durch Northern Blot-Analysen konnten sechs verschiedene Spleißformen von WIP detektiert werden. Die Expression des Ratten-WIP in Fibroblasten zeigte, daß das Protein an die Aktin-Filamente des Zytoskeletts bindet. Durch Koimmunpräzipitationsversuche wurde die Interaktion des Ratten-WIP mit N-WASP nachgewiesen. Die Koexpression von WIP und N-WASP in Ratten-Fibroblasten führte interessanterweise zu einer Relokalisation von N-WASP in das Zytoplasma und darüber hinaus zu einer Reorganisation des Aktin-Filamentsystems, wobei die Spannungsfasern zugunsten einer vermehrten Bildung von Filopodien aufgelöst wurden. Diese Ergebnisse zeigen, daß WIP möglicherweise die N-WASP-vermittelte Aktin-Polymerisation unterstützen kann.

Das zweite Aktin-bindende Protein, das in dieser Arbeit untersucht wurde, ist das proapoptotische Protein Par-4. Die stabile Expression von Par-4 in CHO-Zellen führte zur Selektion von Zelllinien mit partieller Apoptose-Resistenz. Außerdem zeigte sich, daß in 8 von 10 untersuchten Gehirntumorzelllinien die Par-4-Expression herunterreguliert war, was ebenfalls zur Apoptose-Resistenz beitragen könnte. Die ektopische Expression von Par-4 führte in diesen Tumorzelllinien zur Apoptose, jedoch konnte eine Par-4-vermittelte Inaktivierung der PKC ζ -Signalwege bzw. eine Herunterregulation von Bcl-2 ausgeschlossen werden. Durch Immunfluoreszenz-Analysen und *In vitro*-Filament-Bindungsversuche wurde gezeigt, daß der N-Terminus von Par-4 die direkte Aktin-Bindung vermittelt, der C-Terminus dagegen für die starke Bindung an das Aktin-Zytoskelett notwendig ist. Durch Deletionsmutanten sowie durch die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts mit Cytochalasin D konnte gezeigt werden, daß die Bindung an Aktin für die Par-4-vermittelte Apoptose wichtig zu sein scheint. Extraktionsversuche mit Triton X-100 haben gezeigt, daß die C-terminale Bindung an Aktin-Filamente von Par-4 pH-sensitiv ist, was möglicherweise auf Konformationsänderungen des C-Terminus zurückzuführen ist. Par-4 könnte daher ein Sensor-Protein darstellen, dessen Interaktion mit seinen Effektorproteinen sowie mit dem Aktin-Zytoskelett durch äußere Bedingungen beeinflusst werden kann.

7. Literaturverzeichnis

- Ailenberg, M. and Silverman, M. (2003). Cytochalasin D disruption of actin filaments in 3T3 cells produces an anti-apoptotic response by activating gelatinase A extracellularly and initiating intracellular survival signals. *Biochim. Biophys. Acta* **1593**, 249-258.
- Anton, I. M., Saville, S. P., Byrne, M. J., Curcio, C., Ramesh, N., Hartwig, J. H., and Geha, R. S. (2003). WIP participates in actin reorganization and ruffle formation induced by PDGF. *J. Cell Sci.* **116**, 2443-2451.
- Arad, U. (1998). Modified Hirt procedure for rapid purification of extrachromosomal DNA from mammalian cells. *Biotechniques* **24**, 760-762.
- Banin, S., Truong, O., Katz, D. R., Waterfield, M. D., Brickell, P. M., and Gout, I. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) is a binding partner for c-Src family protein-tyrosine kinases. *Curr. Biol.* **6**, 981-988.
- Bear, J. E., Rawls, J. F., and Saxe, C. L., III (1998). SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. *J. Cell Biol.* **142**, 1325-1335.
- Berra, E., Diaz-Meco, M. T., Dominguez, I., Municio, M. M., Sanz, L., Lozano, J., Chapkin, R. S., and Moscat, J. (1993). Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* **74**, 555-563.
- Berra, E., Diaz-Meco, M. T., Lozano, J., Frutos, S., Municio, M. M., Sanchez, P., Sanz, L., and Moscat, J. (1995). Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J.* **14**, 6157-6163.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Boehrer, S., Chow, K. U., Beske, F., Kukoc-Zivojnov, N., Puccetti, E., Ruthardt, M., Baum, C., Rangnekar, V. M., Hoelzer, D., Mitrou, P. S., and Weidmann, E. (2002). In lymphatic cells par-4 sensitizes to apoptosis by down-regulating bcl-2 and promoting disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation. *Cancer Res.* **62**, 1768-1775.
- Boehrer, S., Chow, K. U., Puccetti, E., Ruthardt, M., Godziszard, S., Krapohl, A., Schneider, B., Hoelzer, D., Mitrou, P. S., Rangnekar, V. M., and Weidmann, E. (2001). Deregulated expression of prostate apoptosis response gene-4 in less differentiated lymphocytes and inverse expressional patterns of par-4 and bcl-2 in acute lymphocytic leukemia. **2**, 103-107.
- Boghaert, E. R., Sells, S. F., Walid, A. J., Malone, P., Williams, N. M., Weinstein, M. H., Strange, R., and Rangnekar, V. M. (1997). Immunohistochemical analysis of the proapoptotic protein Par-4 in normal rat tissues. *Cell Growth Differ.* **8**, 881-890.

- Boosen, M. 2001. Erzeugung und Charakterisierung von GFP-Par-4-Fusionskonstrukten und von Par-4-Phosphorylierungsmutanten. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bretscher, A. and Weber, K. (1980a). Fimbrin, a new microfilament-associated protein present in microvilli and other cell surface structures. *J. Cell Biol.* **86**, 335-340.
- Bretscher, A. and Weber, K. (1980b). Villin is a major protein of the microvillus cytoskeleton which binds both G and F actin in a calcium-dependent manner. *Cell* **20**, 839-847.
- Bubb, M. R., Yarmola, E. G., Gibson, B. G., and Southwick, F. S. (2003). Depolymerization of Actin Filaments by Profilin: EFFECTS OF PROFILIN ON CAPPING PROTEIN FUNCTION. *J. Biol. Chem.* **278**, 24629-24635.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Camandola, S. and Mattson, M. P. (2000). Pro-apoptotic action of PAR-4 involves inhibition of NF-kappaB activity and suppression of BCL-2 expression. *J. Neurosci. Res.* **61**, 134-139.
- Carlier, M. F., Nioche, P., Broutin-L'Hermite, I., Boujemaa, R., Le Clainche, C., Egile, C., Garbay, C., Ducruix, A., Sansonetti, P., and Pantaloni, D. (2000). GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 21946-21952.
- Carpenter, C. L., Tolia, K. F., Couvillon, A. C., and Hartwig, J. H. (1997). Signal transduction pathways involving the small G proteins rac and Cdc42 and phosphoinositide kinases. *Adv. Enzyme Regul.* **37**, 377-390.
- Chakraborty, M., Qiu, S. G., Vasudevan, K. M., and Rangnekar, V. M. (2001). Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res.* **61**, 7255-7263.
- Chau, B. N. and Wang, J. Y. (2003). Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 130-138.
- Cheema, S. K., Mishra, S. K., Rangnekar, V. M., Tari, A. M., Kumar, R., and Lopez-Berestein, G. (2003). Par-4 Transcriptionally Regulates Bcl-2 through a WT1-binding Site on the bcl-2 Promoter. *J. Biol. Chem.* **278**, 19995-20005.
- 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 J.* **16**, 998-1008.

- Colombel, M., Symmans, F., Gil, S., O'Toole, K. M., Chopin, D., Benson, M., Olsson, C. A., Korsmeyer, S., and Buttyan, R. (1993). Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am. J. Pathol.* **143**, 390-400.
- Cook, J., Krishnan, S., Ananth, S., Sells, S. F., Shi, Y., Walther, M. M., Linehan, W. M., Sukhatme, V. P., Weinstein, M. H., and Rangnekar, V. M. (1999). Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. *Oncogene* **18**, 1205-1208.
- Cooper, J. A., Buhle, E. L., Jr., Walker, S. B., Tsong, T. Y., and Pollard, T. D. (1983). Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization. *Biochemistry* **22**, 2193-2202.
- Cotter, T. G., Lennon, S. V., Glynn, J. M., and Green, D. R. (1992). Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res.* **52**, 997-1005.
- de Thonel, A., Bettaieb, A., Jean, C., Laurent, G., and Quillet-Mary, A. (2001). Role of protein kinase C zeta isoform in Fas resistance of immature myeloid KG1a leukemic cells. *Blood* **98**, 3770-3777.
- Derry, J. M., Ochs, H. D., and Francke, U. (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* **78**, 635-644.
- Diaz-Meco, M. T., Berra, E., Municio, M. M., Sanz, L., Lozano, J., Dominguez, I., Diaz-Golpe, V., Lain de Lera, M. T., Alcami, J., Paya, C. V., and . (1993). A dominant negative protein kinase C zeta subspecies blocks NF-kappa B activation. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4770-4775.
- Diaz-Meco, M. T., Dominguez, I., Sanz, L., Dent, P., Lozano, J., Municio, M. M., Berra, E., Hay, R. T., Sturgill, T. W., and Moscat, J. (1994). zeta PKC induces phosphorylation and inactivation of I kappa B-alpha in vitro. *EMBO J.* **13**, 2842-2848.
- Diaz-Meco, M. T., Lallena, M. J., Monjas, A., Frutos, S., and Moscat, J. (1999). Inactivation of the inhibitory kappaB protein kinase/nuclear factor kappaB pathway by Par-4 expression potentiates tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**, 19606-19612.
- Diaz-Meco, M. T., Municio, M. M., Frutos, S., Sanchez, P., Lozano, J., Sanz, L., and Moscat, J. (1996). The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* **86**, 777-786.
- Dominguez, I., Sanz, L., Arenzana-Seisdedos, F., Diaz-Meco, M. T., Virelizier, J. L., and Moscat, J. (1993). Inhibition of protein kinase C zeta subspecies blocks the activation of an NF-kappa B-like activity in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Cell Biol.* **13**, 1290-1295.
- Duan, W., Zhang, Z., Gash, D. M., and Mattson, M. P. (1999). Participation of prostate apoptosis response-4 in degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **46**, 587-597.
- Dutta, K., Alexandrov, A., Huang, H., and Pascal, S. M. (2001). pH-induced folding of an apoptotic coiled coil. *Protein Sci.* **10**, 2531-2540.

- Dutta, K., Engler, F. A., Cotton, L., Alexandrov, A., Bedi, G. S., Colquhoun, J., and Pascal, S. M. (2003). Stabilization of a pH-sensitive apoptosis-linked coiled coil through single point mutations. *Protein Sci.* **12**, 257-265.
- Fattoum, A., Hartwig, J. H., and Stossel, T. P. (1983). Isolation and some structural and functional properties of macrophage tropomyosin. *Biochemistry* **22**, 1187-1193.
- Feldner, J. C. and Brandt, B. H. (2002). Cancer cell motility--on the road from c-erbB-2 receptor steered signaling to actin reorganization. *Exp. Cell Res.* **272**, 93-108.
- Finan, P. M., Soames, C. J., Wilson, L., Nelson, D. L., Stewart, D. M., Truong, O., Hsuan, J. J., and Kellie, S. (1996). Identification of regions of the Wiskott-Aldrich syndrome protein responsible for association with selected Src homology 3 domains. *J. Biol. Chem.* **271**, 26291-26295.
- Flanagan, M. D. and Lin, S. (1980). Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. *J. Biol. Chem.* **255**, 835-838.
- Fukuoka, M., Miki, H., and Takenawa, T. (1997). Identification of N-WASP homologs in human and rat brain. *Gene* **196**, 43-48.
- Fulda, S., Meyer, E., and Debatin, K. M. (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* **21**, 2283-2294.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., Furman, M. I., Wachsstock, D., Safer, D., Nachmias, V. T., and Pollard, T. D. (1992). The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol. Biol. Cell* **3**, 1015-1024.
- Granville, D. J. and Gottlieb, R. A. (2002). Mitochondria: regulators of cell death and survival. *ScientificWorldJournal.* **2**, 1569-1578.
- Green, D. R. (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* **94**, 695-698.
- Guo, Q., Fu, W., Xie, J., Luo, H., Sells, S. F., Geddes, J. W., Bondada, V., Rangnekar, V. M., and Mattson, M. P. (1998). Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nat. Med.* **4**, 957-962.
- Hall, A. (1992). Ras-related GTPases and the cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **3**, 475-479.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hsu, S. C., Kirschenbaum, F., Miller, J., Cordell, B., and McCarthy, J. V. (2002). Structural and functional characterization of the upstream regulatory region of the human gene encoding prostate apoptosis response factor-4. *Gene* **295**, 109-116.
- Janssens, S., Burns, K., Tschopp, J., and Beyaert, R. (2002). Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr. Biol.* **12**, 467-471.

- Jerpseth, J., Greener, A., Short, J. M., Viola, J., and Kretz, P. L. (1992). XL1-Blue-MRF⁺ *E. coli* cells: *mrcA*⁻, *mrcCB*⁻, *mrcF*⁻, *mrr*⁻, *hsdR*⁻ derivative of XL1-Blue cells. *Strategies* **5**, 81-83.
- Jiang, D., Xiao, B., Li, X., and Chen, S. R. (2003). Smooth muscle tissues express a major dominant negative splice variant of the type 3 Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* **278**, 4763-4769.
- Johnstone, R. W., See, R. H., Sells, S. F., Wang, J., Muthukkumar, S., Englert, C., Haber, D. A., Licht, J. D., Sugrue, S. P., Roberts, T., Rangnekar, V. M., and Shi, Y. (1996). A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6945-6956.
- Kassis, J., Lauffenburger, D. A., Turner, T., and Wells, A. (2001). Tumor invasion as dysregulated cell motility. *Semin. Cancer Biol.* **11**, 105-117.
- Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A., and Rosen, M. K. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* **404**, 151-158.
- Kim, J. A., Mitsukawa, K., Yamada, M. K., Nishiyama, N., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2002). Cytoskeleton disruption causes apoptotic degeneration of dentate granule cells in hippocampal slice cultures. *Neuropharmacology* **42**, 1109-1118.
- Klawitz, I. 2000. Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktionspartner des großen T-Antigens (LT) von SV40 in LT-induzierten primitiven neuroektodermalen Tumoren mit dem Two-Hybrid-System. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Klawitz, I., Preuss, U., and Scheidtmann, K. H. (2001). Interaction of SV40 large T antigen with components of the nucleo/cytoskeleton. *Int. J. Oncol.* **19**, 1325-1332.
- Kögel, D., Plöttner, O., Landsberg, G., Christian, S., and Scheidtmann, K. H. (1998). Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones. *Oncogene* **17**, 2645-2654.
- Kögel, D., Reimertz, C., Dussmann, H., Mech, P., Scheidtmann, K. H., and Prehn, J. H. (2003). The death associated protein (DAP) kinase homologue Dlk/ZIP kinase induces p19ARF- and p53-independent apoptosis. *Eur. J. Cancer* **39**, 249-256.
- Kögel, D., Reimertz, C., Mech, P., Poppe, M., Frühwald, M. C., Engemann, H., Scheidtmann, K. H., and Prehn, J. H. (2001). Dlk/ZIP kinase-induced apoptosis in human medulloblastoma cells: requirement of the mitochondrial apoptosis pathway. *Br. J. Cancer* **85**, 1801-1808.
- Kotani, K., Hara, K., Kotani, K., Yonezawa, K., and Kasuga, M. (1995). Phosphoinositide 3-kinase as an upstream regulator of the small GTP-binding protein Rac in the insulin signaling of membrane ruffling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 985-990.
- Kulms, D., Dussmann, H., Poppelmann, B., Stander, S., Schwarz, A., and Schwarz, T. (2002). Apoptosis induced by disruption of the actin cytoskeleton is mediated via activation of CD95 (Fas/APO-1). *Cell Death. Differ.* **9**, 598-608.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leeuwen, F. N., Kain, H. E., Kammen, R. A., Michiels, F., Kranenburg, O. W., and Collard, J. G. (1997). The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J. Cell Biol.* **139**, 797-807.
- Levee, M. G., Dabrowska, M. I., Lelli, J. L., Jr., and Hinshaw, D. B. (1996). Actin polymerization and depolymerization during apoptosis in HL-60 cells. *Am. J. Physiol* **271**, C1981-C1992.
- Leverrier, Y., Lorenzi, R., Blundell, M. P., Brickell, P., Kinnon, C., Ridley, A. J., and Thrasher, A. J. (2001). Cutting edge: the Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for efficient phagocytosis of apoptotic cells. *J. Immunol.* **166**, 4831-4834.
- Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**, 175-184.
- Lorimer, I. A., Parolin, D. A., and Lavictoire, S. J. (2002). Induction of apoptosis in glioblastoma cells by an atypical protein kinase C pseudosubstrate peptide. *Anticancer Res.* **22**, 623-631.
- Lucas, T., Pratscher, B., Krishnan, S., Fink, D., Gunsberg, P., Wolschek, M., Wacheck, V., Muster, T., Romirer, I., Wolff, K., Pehamberger, H., Eichler, H. G., Rangnekar, V. M., and Jansen, B. (2001). Differential expression levels of Par-4 in melanoma. *Melanoma Res.* **11**, 379-383.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**, 895-898.
- Martinez-Quiles, N., Rohatgi, R., Anton, I. M., Medina, M., Saville, S. P., Miki, H., Yamaguchi, H., Takenawa, T., Hartwig, J. H., Geha, R. S., and Ramesh, N. (2001). WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat. Cell Biol.* **3**, 484-491.
- Maruyama, K. and Ebashi, S. (1965). Alpha-actinin, a new structural protein from striated muscle. II. Action on actin. *J. Biochem. (Tokyo)* **58**, 13-19.
- Mattson, M. P., Duan, W., Chan, S. L., and Camandola, S. (1999). Par-4: an emerging pivotal player in neuronal apoptosis and neurodegenerative disorders. *J. Mol. Neurosci.* **13**, 17-30.
- McCarthy, N., Mercer, J., and Bennett, M. (2001). Apoptotic proteins. p53 and c-myc related pathways. *Cardiol. Clin.* **19**, 75-89.

- Miki, H., Miura, K., and Takenawa, T. (1996). N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**, 5326-5335.
- Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., and Takenawa, T. (1998). Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* **391**, 93-96.
- Mitamura, S., Ikawa, H., Mizuno, N., Kaziro, Y., and Itoh, H. (1998). Cytosolic nuclease activated by caspase-3 and inhibited by DFF-45. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 480-484.
- Morano, I. and Haase, H. (1997). Different actin affinities of human cardiac essential myosin light chain isoforms. *FEBS Lett.* **408**, 71-74.
- Moreau, V., Frischknecht, F., Reckmann, I., Vincentelli, R., Rabut, G., Stewart, D., and Way, M. (2000). A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nat. Cell Biol.* **2**, 441-448.
- Moriyama, K., Iida, K., and Yahara, I. (1996). Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* **1**, 73-86.
- Morley S.C., Sun, G. P., and Bierer, B. E. (2003). Inhibition of actin polymerization enhances commitment to and execution of apoptosis induced by withdrawal of trophic support. *J. Cell Biochem.* **88**, 1066-1076.
- Mullins, R. D. (2000). How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 91-96.
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., and Fukuyama, H. (2003). Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death. Differ.* **10**, 108-116.
- Nalca, A., Qiu, S. G., El Guendy, N., Krishnan, S., and Rangnekar, V. M. (1999). Oncogenic Ras sensitizes cells to apoptosis by Par-4. *J. Biol. Chem.* **274**, 29976-29983.
- Nishida, E., Maekawa, S., and Sakai, H. (1984). Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry* **23**, 5307-5313.
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62.
- Oliveri, M., Daga, A., Cantoni, C., Lunardi, C., Millo, R., and Puccetti, A. (2001). DNase I mediates internucleosomal DNA degradation in human cells undergoing drug-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.* **31**, 743-751.
- Otto, J. J., Kane, R. E., and Bryan, J. (1979). Formation of filopodia in coelomocytes: localization of fascin, a 58,000 dalton actin cross-linking protein. *Cell* **17**, 285-293.

- Page, G., Kogel, D., Rangnekar, V., and Scheidtmann, K. H. (1999). Interaction partners of Dlk/ZIP kinase: co-expression of Dlk/ZIP kinase and Par-4 results in cytoplasmic retention and apoptosis. *Oncogene* **18**, 7265-7273.
- Pedersen, W. A., Luo, H., Kruman, I., Kasarskis, E., and Mattson, M. P. (2000). The prostate apoptosis response-4 protein participates in motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J.* **14**, 913-924.
- Phillips, C. L., Yamakawa, K., and Adelstein, R. S. (1995). Cloning of the cDNA encoding human nonmuscle myosin heavy chain-B and analysis of human tissues with isoform-specific antibodies. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **16**, 379-389.
- Pollard, T. D. and Cooper, J. A. (1984). Quantitative analysis of the effect of Acanthamoeba profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry* **23**, 6631-6641.
- Posey, S. C. and Bierer, B. E. (1999). Actin stabilization by jasplakinolide enhances apoptosis induced by cytokine deprivation. *J. Biol. Chem.* **274**, 4259-4265.
- Preuss, U., Doring, F., Illenberger, S., and Mandelkow, E. M. (1995). Cell cycle-dependent phosphorylation and microtubule binding of tau protein stably transfected into Chinese hamster ovary cells. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1397-1410.
- Pring, M., Weber, A., and Bubb, M. R. (1992). Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry* **31**, 1827-1836.
- Purich, D. L. and Southwick, F. S. (1997). ABM-1 and ABM-2 homology sequences: consensus docking sites for actin-based motility defined by oligoproline regions in Listeria ActA surface protein and human VASP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 686-691.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C., and Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**, 1829-1832.
- Qiu, G., Ahmed, M., Sells, S. F., Mohiuddin, M., Weinstein, M. H., and Rangnekar, V. M. (1999). Mutually exclusive expression patterns of Bcl-2 and Par-4 in human prostate tumors consistent with down-regulation of Bcl-2 by Par-4. *Oncogene* **18**, 623-631.
- Ramesh, N., Anton, I. M., Hartwig, J. H., and Geha, R. S. (1997). WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 14671-14676.
- Rangnekar, V. M. (1998). Apoptosis mediated by a novel leucine zipper protein Par-4. *Apoptosis* **3**, 61-66.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M. W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**, 221-231.

- Roussigne, M., Cayrol, C., Clouaire, T., Amalric, F., and Girard, J. P. (2003). THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies. *Oncogene* **22**, 2432-2442.
- Rubtsova, S. N., Kondratov, R. V., Kopnin, P. B., Chumakov, P. M., Kopnin, B. P., and Vasiliev, J. M. (1998). Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53. *FEBS Lett.* **430**, 353-357.
- Safer, D., Elzinga, M., and Nachmias, V. T. (1991). Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J. Biol. Chem.* **266**, 4029-4032.
- Salvesen, G. S. (2002). Caspases and apoptosis. *Essays Biochem.* **38**, 9-19.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanz, L., Sanchez, P., Lallena, M. J., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (1999). The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *EMBO J.* **18**, 3044-3053.
- Schmitz, I., Kirchhoff, S., and Krammer, P. H. (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 1123-1136.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* **254**, 439-459.
- Sells, S. F., Han, S. S., Muthukkumar, S., Maddiwar, N., Johnstone, R., Boghaert, E., Gillis, D., Liu, G., Nair, P., Monnig, S., Collini, P., Mattson, M. P., Sukhatme, V. P., Zimmer, S. G., Wood, D. P., Jr., McRoberts, J. W., Shi, Y., and Rangnekar, V. M. (1997). Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **17**, 3823-3832.
- Sells, S. F., Wood, D. P., Jr., Joshi-Barve, S. S., Muthukumar, S., Jacob, R. J., Crist, S. A., Humphreys, S., and Rangnekar, V. M. (1994). Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Cell Growth Differ.* **5**, 457-466.
- She, H. Y., Rockow, S., Tang, J., Nishimura, R., Skolnik, E. Y., Chen, M., Margolis, B., and Li, W. (1997). Wiskott-Aldrich syndrome protein is associated with the adapter protein Grb2 and the epidermal growth factor receptor in living cells. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1709-1721.
- Shiokawa, D. and Tanuma, S. (1998). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding an apoptotic endonuclease DNase gamma. *Biochem. J.* **332**, 713-720.
- Shizuta, Y., Shizuta, H., Gallo, M., Davies, P., and Pastan, I. (1976). Purification and properties of filamin, and actin binding protein from chicken gizzard. *J. Biol. Chem.* **251**, 6562-6567.
- Snapper, S. B. and Rosen, F. S. (1999). The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 905-929.

- Sturge, J., Hamelin, J., and Jones, G. E. (2002). N-WASP activation by a beta1-integrin-dependent mechanism supports PI3K-independent chemotaxis stimulated by urokinase-type plasminogen activator. *J. Cell Sci.* **115**, 699-711.
- Suarez-Huerta, N., Mosselmans, R., Dumont, J. E., and Robaye, B. (2000). Actin depolymerization and polymerization are required during apoptosis in endothelial cells. *J. Cell Physiol* **184**, 239-245.
- Suetsugu, S., Miki, H., Yamaguchi, H., Obinata, T., and Takenawa, T. (2001). Enhancement of branching efficiency by the actin filament-binding activity of N-WASP/WAVE2. *J. Cell Sci.* **114**, 4533-4542.
- Suria, H., Chau, L. A., Negrou, E., Kelvin, D. J., and Madrenas, J. (1999). Cytoskeletal disruption induces T cell apoptosis by a caspase-3 mediated mechanism. *Life Sci.* **65**, 2697-2707.
- Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., and Abo, A. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* **84**, 723-734.
- Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A., Sasaki, T., and Shirataki, H. (1993). Regulators of small GTPases. *Ciba Found. Symp.* **176**, 128-138.
- Thrasher, A. J., Burns, S., Lorenzi, R., and Jones, G. E. (2000). The Wiskott-Aldrich syndrome: disordered actin dynamics in haematopoietic cells. *Immunol. Rev.* **178**, 118-128.
- Tilney, L. G., Bonder, E. M., Coluccio, L. M., and Mooseker, M. S. (1983). Actin from Thyone sperm assembles on only one end of an actin filament: a behavior regulated by profilin. *J. Cell Biol.* **97**, 112-124.
- Tolomeo, M. and Simoni, D. (2002). Drug resistance and apoptosis in cancer treatment: development of new apoptosis-inducing agents active in drug resistant malignancies. *Curr. Med. Chem. Anti. -Canc. Agents* **2**, 387-401.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 4350-4354.
- Van Troys, M., Dewitte, D., Goethals, M., Carlier, M. F., Vandekerckhove, J., and Ampe, C. (1996). The actin binding site of thymosin beta 4 mapped by mutational analysis. *EMBO J.* **15**, 201-210.
- Wang, K. and Singer, S. J. (1977). Interaction of filamin with f-actin in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 2021-2025.
- Weggen, S., Bayer, T. A., Koch, A., Salewski, H., Scheidtmann, K. H., Pietsch, T., and Wiestler, O. D. (1997). Characterization of neural cell lines derived from SV40 large T-induced primitive neuroectodermal tumors. *Brain Pathol.* **7**, 731-739.

- Westerberg, L., Greicius, G., Snapper, S. B., Aspenstrom, P., and Severinson, E. (2001). Cdc42, Rac1, and the Wiskott-Aldrich syndrome protein are involved in the cytoskeletal regulation of B lymphocytes. *Blood* **98**, 1086-1094.
- White, S. R., Williams, P., Wojcik, K. R., Sun, S., Hiemstra, P. S., Rabe, K. F., and Dorscheid, D. R. (2001). Initiation of apoptosis by actin cytoskeletal derangement in human airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **24**, 282-294.
- Yamashita, H., Iwase, H., Toyama, T., and Fujii, Y. (2003). Naturally occurring dominant-negative Stat5 suppresses transcriptional activity of estrogen receptors and induces apoptosis in T47D breast cancer cells. *Oncogene* **22**, 1638-1652.
- Yamazaki, Y., Tsuruga, M., Zhou, D., Fujita, Y., Shang, X., Dang, Y., Kawasaki, K., and Oka, S. (2000). Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* **259**, 64-78.
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., and Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**, 809-812.
- Yin, H. L., Hartwig, J. H., Maruyama, K., and Stossel, T. P. (1981). Ca²⁺ control of actin filament length. Effects of macrophage gelsolin on actin polymerization. *J. Biol. Chem.* **256**, 9693-9697.
- Yonezawa, N., Nishida, E., and Sakai, H. (1985). pH control of actin polymerization by cofilin. *J. Biol. Chem.* **260**, 14410-14412.


```
WIP (Ratte)      GAGTGGGAAAGCAGGTTCTACTTCCATCCGATTTCCGACTTACCGCCTCCAGAGCCGTAT 1356
WIP (human)     GAGTGGGAAAGCAGATTCTACTTCCATCCGATTTCCGATTTGCCACCTCCAGAGCCATAT 1512
PRPL2(human)    GAGTGGGAAAGCAGATTCTACTTCCATCCGATTTCCGATTTGCCACCTCCAGAGCCATAT 1611
                ***** ** ** ***** **

WIP (Ratte)     GTGCCAACGACCAAGACGTACCCAGCAAAGTGGCCAGAAGTGAAAGCCGAAGTGGATCC 1416
WIP (human)     GTACAAACGACCAAAAAGTTATCCAGCAAACGGCAAGAAACGAAAGCCGGAGTGGA--- 1569
PRPL2(human)    GTACAAACGACCAAAAAGTTATCCAGCAAACGGCAAGAAACGAAAGCCGGAGTGAGTAT 1671
                ** * ***** * ** ***** ***** *****

WIP (Ratte)     AACAGAAGAGAAAGG-GGCGCCCAACCCTTCCTCCCATCCCGAGGTGATCTCTGCCTGC 1475
WIP (human)     TCCAACCGAAG-----AGAAAGGGGTGGTCCACC---ACTCCCTCCCATCCCGAGGTGAT 1621
PRPL2(human)    TTCTGCCAAGGTTTTTGAAGATTCACGCTTGAGT---AGCCTGAGTGACACTCGGGCTAT 1728
                *      *                               * *      * *
```

Anhang B

Proteinsequenz-Vergleich der WIP-Orthologe

Nachfolgend ist eine vergleichende Gegenüberstellung der Proteinsequenzen von WIP (Ratten- und Mensch-Homologe) und PRPL2 (human) dargestellt. Abweichungen zwischen den Sequenzen sind grau unterlegt. Die ABM-2-Motive, die VH-Domänen sowie die SH3-Domänen sind umrahmt. Das Aktin-Bindemotiv KLKK wird durch Sterne hervorgehoben.

	ABM-2	VH ****	
WIP (Ratte)	MPVPPP A PPPP P TFALAN T EK P SLNK T EQA GR NALLSDISK G KLKK T VTNDRS A PILD 60		
WIP (human)	MPVPPP A PPPP P TFALAN T EK P TLNK T EQA GR NALLSDISK G KLKK T VTNDRS A PILD 60		
PRPL2 (human)	MPVPPP A PPPP P TFALAN T EK P TLNK T EQA GR NALLSDISK G KLKK T VTNDRS A PILD 60		
		VH	
WIP (Ratte)	KPKGAGGGYGGG--SGGG--GGGSSGGGNF GGG PPGLGGLFQAGMP K L R STANRDND 116		
WIP (human)	KPKGAGAGGGGGFGGGGFGGGGGGGGSG FGG PPGLGGLFQAGMP K L R STANRDND 120		
PRPL2 (human)	KPKGAGAGGGGGFGGGGFGGGGGGGGSG FGG PPGLGGLFQAGMP K L R STANRDND 120		
WIP (Ratte)	SGGSRP L LP P GG R ATS A K P FS P SG P GR F P A SP G HRS G PP E P P RN R M P PR P D V GS K P 176		
WIP (human)	SGGSRP L LP P GG R STS A K P FS P SG P GR F VP P SG H RS G PP E P Q R N R M PP R P D VGS K P 180		
PRPL2 (human)	SGGSRP L LP P GG R STS A K P FS P SG P GR F VP P SG H RS G PP E P Q R N R M PP R P D VGS K P 180		
WIP (Ratte)	DSL P PP V NT P RP I P S SL H NR G SP A GL G AP R -----PP F PN R GA A F G AG S VR Q N L S 228		
WIP (human)	DS I PP V ST P RP I Q S SL H NR G SP P VG G PR Q PS P GT P PP F PN R GT A L G GG S IR Q S P L 240		
PRPL2 (human)	DS I PP V ST P RP I Q S SL H NR G SP P VG G PR Q PS P GT P PP F PN R GT A L G GG S IR Q S P L 240		
WIP (Ratte)	SSSS P FP R PL P PT P S R AL D D K PP P PP P VG N R P SM H RE A V P PP P S Q NS K PP V ST P RP 287		
WIP (human)	SSSS P FS N R P PL P PT P S R AL D D K PP P PP P VG N R P SI H RE A V P PP P Q N NS K PP V ST P RP 300		
PRPL2 (human)	SSSS P FS N R P PL P PT P S R AL D D K PP P PP P VG N R P SI H RE A V P PP P Q N NS K PP V ST P RP 300		
	ABM-2	SH3	
WIP (Ratte)	G A GS Q AP P - P PP S R P GG P PL P PT S --DE I PR L Q R N L SL T SP T PL P SP GR SG L PP P 344		
WIP (human)	S A PH R PH L R P PP S R P GG P PL P SS S GN D ET P RL Q R N L S LS S ST P PL P SP GR SG L PP P 360		
PRPL2 (human)	S A PH R PH L R P PP S R P GG P PL P SS S GN D ET P RL Q R N L S LS S ST P PL P SP GR SG L PP P 360		
	SH3	SH3	
WIP (Ratte)	- P TER P PP P V R DP GR SG L PP P PI N R N GS T AR A L P AT P Q L PS R SG M DS PR SG P RP P LP 403		
WIP (human)	- P SER P PP P V R DP GR SG L PP P PI V SR N GS T SR A L P AT P Q L PS R SG V DS PR SG P RP P LP 419		
PRPL2 (human)	V ESER P PP P V R DP GR SG L PP P PI V SR N GS T SR A L P AT P Q L PS R SG V DS PR SG P RP P LP 420		
	ABM-2		
WIP (Ratte)	PDR P S A G A PP P PP P ST S IR N GF Q DS P CE D E W ES R F Y F H P I SD L PP E PE Y V ET TK T Y P SK V 463		
WIP (human)	PDR P S A G A PP P PP P ST S IR N GF Q DS P CE D E W ES R F Y F H P I SD L PP E PE Y V Q TK S Y P SK L 479		
PRPL2 (human)	PDR P S A G A PP P PP P ST S IR N GF Q DS P CE D E W ES R F Y F H P I SD L PP E PE Y V Q TK S Y P SK L 480		
WIP (Ratte)	AR S ES R SG S NR R ER G AP L PP I PR* 487		
WIP (human)	AR N ES R SG S NR R ER G GP L PP I PR* 503		
PRPL2 (human)	AR N ES R SE Y FC Q GF*----- 494		

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich ganz herzlich danken!

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Ute Preuß für die Überlassung der Themen und den Freiraum, diese eigenständig zu bearbeiten, für die stetige Forderung und Förderung, die immerwährende Diskussionsbereitschaft und die angenehme Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmanne danke ich für die hilfreichen Anregungen und für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Susanne Illenberger danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit, die Bereitstellung der Abbildungen und für die wertvolle fachliche Beratung in Aktin-Fragen.

Meike, Harry, Gerd, René, Barbara, Ansgar, Julia und allen übrigen ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen möchte ich für die gute Zusammenarbeit, für die bereichernden Diskussionen, für jegliche Unterstützung und für die freundschaftliche Atmosphäre in unserem Labor - und auch außerhalb davon - danken.

Allen Institutsmitgliedern danke ich sehr für ihre Hilfsbereitschaft und außerdem für die netten Grill-bzw. Film-Abende.

Ein herzlicher Dank gilt meiner Mutter, Dirk, Nina und Caro, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An Eides Statt versichere ich, daß ich diese Dissertation selbst und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt habe, daß diese oder eine ähnliche Arbeit noch keiner anderen Stelle zu Prüfung vorgelegen hat und daß sie an der nachstehend aufgeführten Stelle auszugsweise veröffentlicht worden ist.

Vetterkind, S., Miki, H., Takenawa, T., Klawitz, I., Scheidtmann, K.H. und Preuss, U.

The rat homologue of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-interacting protein (WIP) associates with actin filaments, recruits N-WASP from the nucleus, and mediates mobilization of actin from stress fibers in favor of filopodia formation.

J. Biol. Chem. (2002) **277** (1): 87-95.

Susanne Vetterkind

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Susanne Vetterkind
geboren am	18. 01. 1973
Geburtsort	Bremen
Anschrift	Gebrüder-Wright-Str. 53 53125 Bonn

Schulbildung

1979-1983	Grundschule IB Twistringen
1983-1992	Liebfrauenschule Vechta
1992	allgemeine Hochschulreife

Berufs-/Hochschulbildung

1992-1993	Ausbildung zur Fotografin (ohne Abschluß)
1993-1999	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität zu Göttingen
1997-1998	Wissenschaftliche Hilfskraft am Deutschen Primatenzentrum, Abteilung Virologie und Immunologie
1999	Betreuung von Studenten im Rahmen des Elektronenmikroskopischen Praktikums, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Strukturelle Mikrobiologie
1998-1999	Anfertigung der Diplomarbeit bei Prof. Dr. Frank Mayer im Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung Strukturelle Mikrobiologie, zu dem Thema: „Untersuchungen zur katalytischen Aktivität von Guanylatkinase-Fusionsproteinen in Wechselwirkung mit Membranoberflächen“
1999	Diplomabschluß Biologie
seit 1999	Betreuung von Studenten im Rahmen des Praktikums der Molekulargenetik, Institut für Genetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
1999-2003	Anfertigung der Dissertation bei PD Dr. Ute Preuß im Institut für Genetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn zu dem Thema: „Untersuchungen zur Beteiligung Aktin-assoziiierter Proteine an intrazellulären Signalwegen“