

# **Die Rolle des Transkriptionsfaktors MAD1 in der Apoptose**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Stefanie Speckgens

aus Würselen

Berichter: Universitätsprofessor Dr.rer.nat Bernhard Lüscher  
Universitätsprofessor Dr.rer.nat Werner Baumgartner

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2009

Diese Dissertation ist auf der Internetseite der Hochschulbibliothek online verfügbar.

---

**Das Wesentliche ist für die Augen unsichtbar.**

Antoine de Saint-Exupéry

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
	<b>Summary</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Regulation der Genexpression</b>	<b>3</b>
2.1.1	Das Proto-Onkogen c-MYC .....	4
2.1.2	Die Proteine des MYC/MAX/MAD-Netzwerks.....	5
2.1.3	Antagonistische Funktion von MYC und MAD .....	6
2.1.4	Chromatin- <i>remodeling</i> durch MYC/MAX/MAD.....	8
<b>2.2</b>	<b>Biologische Funktion des MAD1-Proteins</b>	<b>10</b>
2.2.1	MAD1-Effekte auf die Proliferation, Differenzierung und Transformation ..	10
2.2.2	MAD1-Effekte auf die Apoptose.....	11
<b>2.3</b>	<b>Apoptose</b>	<b>12</b>
2.3.1	Caspasen .....	13
2.3.1.1	Aufbau der Caspasen .....	16
2.3.1.2	Substratspezifität von Caspasen.....	17
2.3.1.3	Caspase-Substrate .....	18
2.3.2	Extrinsischer Apoptose-Signalweg.....	19
2.3.2.1	Der Fas-Rezeptor.....	19
2.3.2.2	Typ I und Typ II-Zellen .....	21
2.3.3	Intrinsischer Apoptose-Signalweg.....	23
2.3.4	Regulatoren der Apoptose .....	24
2.3.4.1	c-FLIP-Moleküle .....	24
2.3.4.2	Die Proteine der Bcl-2-Familie .....	26
2.3.4.3	Regulation durch IAPs .....	27
<b>2.4</b>	<b>Proteasomaler Abbau</b>	<b>29</b>
2.4.1	Ubiquitin .....	29
2.4.2	Ubiquitinierung .....	30
2.4.3	Ubiquitinierungssignale .....	31
2.4.4	Komponenten des Ubiquitin-Konjugationssystems.....	32
2.4.5	Deubiquitinierende Enzyme .....	34
2.4.6	Protein-Abbau durch das Proteasom.....	35
<b>2.5</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>37</b>

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Inhibition der Apoptose durch den Transkriptionsfaktor MAD1</b>	<b>38</b>
3.1.1	MAD1 verhindert Ausbildung von <i>apoptotic bodies</i> .....	38
3.1.2	MAD1 inhibiert DNA-Fragmentierung .....	41
3.1.3	MAD1 verringert Aktivierung von Caspasen und Spaltung von PARP1 ....	42
3.1.4	MAD1-Domänen sind für die Inhibition der Apoptose relevant .....	43
<b>3.2</b>	<b>MAD1 wird während der Apoptose verstärkt degradiert</b>	<b>47</b>
3.2.1	MAD1-Reduktion in der Fas-vermittelten Apoptose .....	47
3.2.2	MAD1-Transkription in apoptotischen Zellen .....	48
3.2.3	MAD1-Reduktion in der Staurosporin-vermittelten Apoptose .....	50
3.2.4	MAD1-Abbau bei Rezeptor- und mitochondrial-vermitteltem Zelltod .....	51
<b>3.3</b>	<b>Einfluss von Caspasen auf MAD1-Abbau in apoptotischen Zellen</b>	<b>57</b>
3.3.1	MAD1 ist <i>in vitro</i> ein Substrat von Effektor-Caspasen .....	59
3.3.2	Konsensus-Sequenz .....	61
<b>3.4</b>	<b>Analysen zum proteasomalen MAD1-Abbau in der Apoptose</b>	<b>63</b>
3.4.1	MAD1 wird proteasomal abgebaut .....	63
3.4.2	MAD1 enthält keine, für den Abbau relevant Domäne .....	65
3.4.3	MAD1-Abbau während der Apoptose erfolgt nicht über das Proteasom ...	68
<b>3.5</b>	<b>Die Phosphorylierung von MAD1 in der Apoptose</b>	<b>71</b>
3.5.1	MAD1-Serin-145-Mutante wird nicht mehr phosphoryliert .....	72
3.5.2	MAD1-Abbau in der Apoptose ist unabhängig von der Phosphorylierung.	73
3.5.3	MAD1-Phosphorylierung ist essentiell für die Inhibition der Apoptose .....	76
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>80</b>
<b>4.1</b>	<b>Der anti-apoptotische Effekt von MAD1</b>	<b>80</b>
4.1.1	MAD1 inhibiert Apoptose durch die Repression von Zielgenen .....	80
4.1.2	Phosphorylierung von MAD1 aktiviert die Genregulation .....	81
4.1.3	Positiver <i>feedback loop</i> über den PI3K/AKT-Signalweg .....	82
<b>4.2</b>	<b>Proteasomaler Abbau von MAD1</b>	<b>83</b>
4.2.1	Ubiquitinierung von MAD1 .....	83
4.2.2	Ubiquitinierung von MAD1 durch cIAP1 .....	85
4.2.3	Proteasomaler Abbau von phosphoryliertem MAD1 .....	86
<b>4.3</b>	<b>Proteasom-unabhängiger Abbau von MAD1</b>	<b>86</b>
4.3.1	Degradation von MAD1 in apoptotischen Zellen .....	86
4.3.2	Proteolytische Spaltung von MAD1 durch Caspasen .....	87
4.3.3	Modell des Abbaus von MAD1 in apoptotischen Zellen durch HtrA2/Omi.	88

<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>91</b>
5.1	Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	91
5.2	Oligonukleotide	91
5.3	Plasmide	92
5.4	Antikörper	96
<b>5.5</b>	<b>Arbeiten mit Nukleinsäuren</b>	<b>97</b>
5.5.1	Isolation von Plasmid-DNA .....	97
5.5.2	Isolation von RNA .....	97
5.5.3	Enzymatische Manipulation von DNA .....	98
5.5.4	Reinigung, Präzipitation und Konzentrationsbestimmung.....	98
5.5.5	Agarose-Gel-Elektrophorese.....	99
5.5.6	Klonierung mit Gateway-System.....	100
5.5.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	101
5.5.8	PCR-Mutagenese (ortsgerichtete Mutagenese).....	101
5.5.9	Sequenzierung .....	102
5.5.10	cDNA-Synthese.....	103
5.5.11	Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) .....	103
<b>5.6</b>	<b>Arbeiten mit prokaryotischen Zellen</b>	<b>104</b>
5.6.1	Bakterienstämme .....	104
5.6.2	Material für das Arbeiten mit Bakterien .....	104
5.6.3	Protokolle für das Arbeiten mit Bakterien.....	105
5.6.3.1	Herstellung kompetenter E.coli Zellen zur Transformation .....	105
5.6.3.2	Hitzeschock-Transformation .....	105
5.6.3.3	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen .....	105
<b>5.7</b>	<b>Arbeiten mit eukaryotischen Zellen</b>	<b>106</b>
5.7.1	Eukaryotisch Zell-Linien .....	106
5.7.2	Materialien für die Zellkultur .....	106
5.7.3	Kulturbedingungen .....	107
5.7.4	Protokolle zum Arbeiten mit eukaryotischen Zellen .....	107
5.7.4.1	Kryokonservierung und Auftauen von eukaryotischen Zellen .....	107
5.7.4.2	Transiente Transfektion .....	107
5.7.4.3	Präparation von Zell-Lysaten .....	108
5.7.4.4	Immunpräzipitation.....	109
5.7.4.5	Präparation cytosolischer Extrakten für " <i>cytochrome c release</i> " .....	110
5.7.4.6	<i>In vivo</i> Ubiquitinierungs-Assay .....	110
5.7.4.7	Reportergen-Assay .....	111
5.7.4.8	DNA-Fragmentierung .....	112
<b>5.8</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>112</b>
5.8.1	Bradford-Test .....	112
5.8.2	Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	113
5.8.3	Anfärben von Proteinen im Polyacrylamidgel .....	114
5.8.4	Western-Blot und Immundetektion von Proteinen.....	114
5.8.5	<i>In vitro</i> Caspase-Assay .....	115
5.8.6	Immunfluoreszenz.....	115

<b>6</b>	<b>Referenzen</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>135</b>
7.1	Abkürzungen	135
7.2	Aminosäurecode	139
7.3	Lebenslauf	140
7.4	Veröffentlichungen	141
7.4.1	Publikationen.....	141
7.4.2	Posterpräsentationen.....	141
7.5	Eidesstattliche Erklärung	142
7.6	Danksagung	143

# 1 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor MAD1 ist ein Mitglied des MYC/MAX/MAD-Netzwerks, durch dessen Kontrolle spezifischer Zielgene das Verhalten von Zellen reguliert wird. MAD- und MYC-Proteine zeigen dabei antagonistische Wirkung auf die Proliferation, die Differenzierung und die Apoptose. Die Bildung von Heterodimeren mit MAX ermöglicht deren Bindung an spezifische DNA-Abschnitte, den E-Boxen. Die Rekrutierung von Coaktivatoren an MYC erlaubt die Aktivierung der Gentranskription, während MAD1, mit Corepressoren assoziiert, die Transkription reprimiert. MAD1 inhibiert die Proliferation und Transformation und kann als anti-apoptotisches Protein verschiedenen Zellstimmulierenden Faktoren entgegenwirken. Für diese Funktion von MAD1 sind die Eigenschaften als Transkriptionsfaktor unerlässlich, da sie im Wesentlichen durch die Repression des Tumorsuppressorgens *PTEN* vermittelt wird. In dieser Arbeit wurde geklärt, dass die Phosphorylierung von MAD1 durch AGC-Kinasen für die Regulation dieses Zielgens unerlässlich ist, wodurch ein positiver *feedback-loop* über den PI3K/AKT-Signalweg aufgezeigt wurde.

MAD1 ist ein kurzlebiges Protein, bei dem nicht nur die Expression und die posttranslationalen Modifizierungen einer strengen Regulation unterliegen, sondern auch der Abbau wirksam kontrolliert wird. So wurde die für den Abbau durch das 26S-Proteasom notwendige Poly-Ubiquitinierung von MAD1 nachgewiesen. Diese wird je nach Phosphorylierungs-Status durch unterschiedliche E3-Ligasen vermittelt. Es wurde gezeigt, dass die in apoptotischen Zellen zusätzlich auftretende Degradation von MAD1 nicht über das Proteasom verläuft. Bei dieser Proteolyse von MAD1 erscheint auch die direkte Beteiligung von Caspasen unwahrscheinlich. Mit der Serin-Protease HtrA2/Omi konnte ein Modell für den zusätzlichen Abbau des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktor MAD1 in der fortgeschrittenen Apoptose vorgeschlagen werden.

## Summary

The MYC/MAX/MAD network of transcriptional regulators controls distinct aspects of cell physiology including cell proliferation, differentiation and apoptosis. Within the network MAD proteins antagonize the functions of MYC oncoproteins, with the latter being deregulated in the majority of human cancers. MYC and MAD proteins form heterodimers with MAX which bind to E-box DNA elements and regulate gene transcription by recruiting cofactors. MYC proteins bind to coactivators while MAD proteins interact with corepressors. MYC sensitizes cells to proapoptotic signals whereas the transcriptional repressor MAD1 inhibits apoptosis in response to a broad range of stimuli, including oncoproteins and induction of death receptors. MAD1's function as transcriptional regulator is essential for its ability to inhibit apoptosis, especially by mediating the repression of the tumour suppressor gene *PTEN*. This work summarized that the phosphorylation of MAD1 by serine-/threonin protein kinases is necessary for this repression and reveals a positive feedback loop between the PI3K/AKT-pathway and the MYC/MAX/MAD network in the regulation of apoptosis.

The expression of MAD1 is tightly regulated at several different levels, including its rapid degradation and posttranslational modifications. MAD1 becomes poly-ubiquitinated and proteolysed by the 26S-proteasome. Different E3 ligases have been suggested to be responsible for the modification of phosphorylated and unphosphorylated MAD1. We observed that MAD1 is degraded in response to different apoptotic stimuli and suggest a hydrolysis of the protein independent of the proteasome. Caspases seem not to be involved directly in this degradation of MAD1 while the serine protease HtrA2/Omi is a good candidate for the degradation of the anti-apoptotic transcription factor MAD1 in late apoptosis.

Together the work has revealed new mechanisms that regulate the transcriptional repressor MAD1 and control its biological functions in cell physiology.



## 2 Einleitung

### 2.1 Regulation der Genexpression

Höhere und niedrigere Lebewesen bestehen aus einer Vielzahl verschiedener Zellen mit unterschiedlichen Aufgaben. Durch die Differenzierung weisen die Zellen eine Aufgabenteilung auf, was mit dem Verlust der Pluripotenz einhergeht. Für die Ausprägung des Phänotyps und der jeweiligen Funktionen der Zellen ist ein spezifisches und genau koordiniertes Programm von Genaktivitäten notwendig. Vor dem Hintergrund identischen genetischen Materials individueller Zell-Typen müssen Entwicklungs- und Wachstumsprozesse koordiniert werden. Spezialisierung und Aufgabenteilung zwischen Zellen und Gewebeverbänden sind zu gewährleisten. Voraussetzung dafür ist die Regulierbarkeit der Genexpression. Zusätzlich befähigt die regulierbare Expression der Gene die Zelle, angemessen und vorteilhaft auf wechselnde Umwelteinflüsse zu reagieren. Wird der vielzellige Organismus in seiner Gesamtheit durch eine Fehlregulation einzelner Zellen bedroht, werden diese durch Apoptose selektiv eliminiert. Auch dieser Prozess unterliegt einer spezifischen Genregulation.

Unterschieden werden *housekeeping*-Gene, deren Produkte ständig benötigt werden, und solche Gene, die nur in bestimmten Situationen exprimiert werden. Eine Vielzahl von Genen muss inaktiv gehalten werden, wohingegen andere Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt signalabhängig induziert werden. Derart regulierte Gene werden entweder bald wieder inaktiv oder bleiben konstitutiv aktiv. Einige Gene müssen periodisch an- und abgeschaltet werden, wie z.B. eine Reihe von Zyklinen im Rahmen der Zellzyklusregulation. Auch Tumorsuppressorgene, deren Genprodukte für das Anhalten des Zellzyklus sorgen, oder Onkogene, die für Komponenten von Zellwachstum stimulierenden Signalketten kodieren, unterliegen einer strengen Kontrolle. Eine Fehlregulation dieser Prozesse kann zur Ausbildung von Krankheiten, insbesondere Krebs, führen.

### 2.1.1 Das Proto-Onkogen c-MYC

Das *c-MYC*-Proto-Onkogen wurde als das zelluläre Homolog des transformierenden Onkogens *v-Myc* des Vogel-Leukämie-Virus MC29 identifiziert. In Säugerzellen existieren neben *c-MYC* noch *N-* und *L-MYC* (Kohl et al., 1983; Nau et al., 1985). Die drei Gene ähneln sich nicht nur in ihrer genomischen Organisation, auch die entsprechenden Proteine besitzen eine hohe Homologie in einer Reihe von Sequenz-Elementen. In einer Vielzahl verschiedener Tumore ist die Expression von *c-MYC* durch chromosomale Translokationen, Genamplifikationen und retrovirale Insertionen fehlreguliert. Dies führt zu einer ständig erhöhten Expression von *MYC*, die nicht mehr reguliert wird. Beispielsweise steht beim Burkitt-Lymphom das *c-MYC*-Gen durch eine chromosomale Translokation unter der Kontrolle eines Immunglobulin-Locus. Bei Neuroblastomen werden Genamplifikationen von *N-MYC* beobachtet, und bei kleinen Lungenkarzinomen wurde die Genamplifikation von *L-MYC* festgestellt (Nesbit et al., 1999).

In zellulären Systemen besteht eine hohe Korrelation zwischen der Expression von *c-MYC* und der Proliferation. Diese Expression stellt eine sehr frühe Gen-Antwort auf die Stimulation mit einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Mitogenen dar (Grandori et al., 2000). In ruhenden Zellen kann die Expression von *c-MYC* dagegen nicht detektiert werden. Nach Serum-Stimulation wird *c-MYC* bis zum Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus stark induziert und fällt dann in proliferierenden Zellen auf ein basales Niveau ab. Im Verlauf der Differenzierung von Zellen geht die Expression von *c-MYC* stark zurück (Facchini and Penn, 1998; Grandori et al., 2000; Henriksson and Luscher, 1996). Der Eintritt von ruhenden Zellen in den Zellzyklus wird durch Inhibition der Expression von *c-MYC* blockiert und eine Überexpression von *c-MYC* in ruhenden Zellen induziert den Eintritt in die S-Phase (Barone and Courtneidge, 1995; Eilers et al., 1989; Eilers et al., 1991; Roussel et al., 1991). Deshalb wird *c-MYC* als positiver Regulator des G1/S-Übergangs im Zellzyklus angesehen. In primären Zellen führt *c-MYC* zusammen mit coexprimiertem, aktiviertem Ras zur Immortalisierung. Wird *c-MYC* dagegen in Abwesenheit von Überlebensfaktoren überexprimiert so induziert es Apoptose über den ARF-Mdm2-p53-Signaltransduktionsweg (Prendergast, 1999; Zindy et al., 1998).

## 2.1.2 Die Proteine des MYC/MAX/MAD-Netzwerks

Für den Mechanismus, über den c-MYC diese biologischen Funktionen ausübt, ist sein Charakter als Transkriptionsfaktor entscheidend. Die MYC-Proteine gehören zu den bHLHZip-Transkriptionsfaktoren. Diese Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch eine basische Region sowie eine *Helix-Loop-Helix*- und Leucin-*Zipper*-Domäne (bHLHZip) aus. Dabei ist die basische Region für die spezifische Bindung an die DNA notwendig, während die unmittelbar folgenden *Helix-Loop-Helix*- und Leucin-*Zipper*-Domänen die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Zusammen mit MAX (*myc-associated factor X*) bildet c-MYC Heterodimere um an spezifische DNA-Abschnitte mit der Konsensus-Sequenz 5'-CACGTG, den E-Boxen, zu binden (Blackwood and Eisenman, 1991; Luscher and Larsson, 1999; Prendergast and Ziff, 1991) und die Transkription eines Zielgens zu regulieren (Dang et al., 1999; Grandori et al., 2000). Für die durch c-MYC beeinflussten biologischen Funktionen ist die Interaktion mit MAX essentiell (Amati et al., 1993a; Amati et al., 1993b; Gu et al., 1993). In der N-terminalen Region des MYC-Proteins (Abbildung 2.1) befindet sich die Transaktivierungs-Domäne (TAD) (Dang et al., 1999; Facchini and Penn, 1998). Diese Domäne enthält die evolutionär konservierten Elemente MYC-Box I (MBI) und MYC-Box II (MBII) und ist für die biologischen Funktionen wie Zellzyklus-Progression, die Induktion des programmierten Zelltodes sowie Zell-Transformation erforderlich. Durch sie kommt es zur Assoziation mit mindestens drei Histon-Acetyltransferasen (HAT) (Bouchard et al., 2001; Frank et al., 2003; Vervoorts et al., 2003).

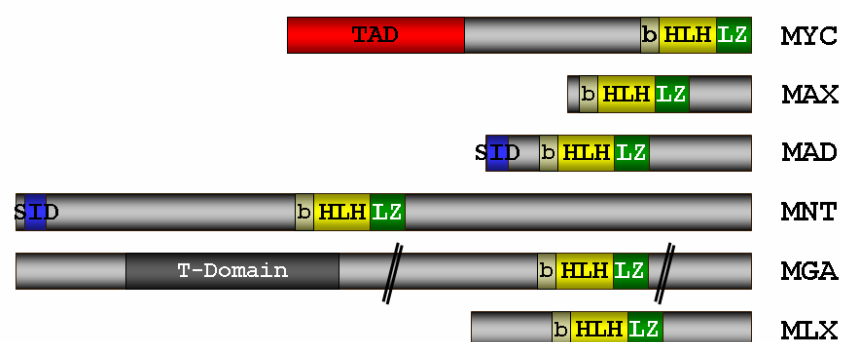


Abbildung 2.1: **Schematische Übersicht der Proteine des MYC/MAX/MAD Netzwerks**  
Das gemeinsame Motiv aller MYC/MAX/MAD-Netzwerkmitglieder ist die basische *Helix-Loop-Helix*-Leucin-*Zipper*-Domäne (bHLH LZ). Durch sie wird die Bildung von Heterodimeren und die Bindung an die DNA ermöglicht. Als transkriptioneller Aktivator weist MYC eine Transaktivierungs-Domäne (TAD) auf, durch die Coaktivator-Komplexe rekrutiert werden können. Die MAD-Proteine und MNT zeichnen sich dagegen durch die mSIN3-Interaktions-Domäne (SID) aus, durch die der Corepressor-Komplex binden kann. Als einziges Mitglied besitzt MGA eine weitere DNA-Bindungs-Domäne (T-Domain).

Als weitere Interaktionspartner für MAX wurden die MAD(*max dimerization protein*)-Proteine identifiziert, zu denen MAD1 (MXD1), MXI1 (MAD2), MAD3 und MAD4 gehören (Ayer and Eisenman, 1993; Hurlin et al., 1995; Zervos et al., 1993). Die MAD-Proteine bilden, wie die c-MYC-Proteine, Heterodimere mit MAX und binden an das gleiche E-Box-Motiv. Dabei unterscheidet sich die Bindungs-Spezifität der MYC/MAX- und MAD/MAX-Komplexe an die E-Boxen kaum (Sommer et al., 1998). Mit den MYC- und MAX-Proteinen haben die MAD-Proteine die bHLHZip-Domäne gemeinsam (Abbildung 2.1), besitzen jedoch im N-terminalen Bereich eine SID (*Sin3 interaction domain*). Über die SID interagieren die MAD-Proteine mit dem mSIN3-Protein, das Teil eines Histon-Deacetylase-Komplexes (HDAC) ist (Hassig et al., 1997; Laherty et al., 1997; Sommer et al., 1997). Die MAD-Proteine weisen eine konservierte C-terminale Region auf, der bis jetzt noch keine genauere Funktion zugeschrieben werden konnte. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass MAD1 C-terminal positive wie negative regulatorische Elemente aufweist, durch die die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors beeinflusst wird (Barrera-Hernandez et al., 2000).

Abgesehen von den Mitgliedern der MYC- und MAD-Familie interagiert MAX noch mit zwei weiteren bHLHZip-Proteinen, MNT und MGA (Hurlin et al., 1997; Hurlin et al., 1999). Wie die MAD-Proteine besitzt MNT eine SID, während MGA neben der bHLHZip-Domäne noch eine zweite DNA-bindende Region aufweist, die T-Domäne.

### 2.1.3 Antagonistische Funktion von MYC und MAD

Die Proteine des MYC/MAX/MAD-Netzwerkes regulieren wesentliche Aspekte des Zellverhaltens über die Kontrolle von spezifischen Zielgenen. Funktionelle Untersuchungen der Proteine des Netzwerks führten zu der Erkenntnis, dass MYC- und MAD-Proteine dabei antagonistisch wirken. Dies konnte insbesondere bei der MYC-abhängigen Proliferation und Transformation, sowie bei der Apoptose beobachtet werden (Abbildung 2.2). Durch MYC werden Gene aktiviert, die die Proliferation der Zelle positiv beeinflussen (Amati et al., 1993b). Die Expression von MAD wird dagegen mit der Inhibition der Proliferation, mit dem Stoppen des Zellzyklus und der Induktion der Differenzierung in Verbindung gebracht (Rottmann and Luscher, 2006). Im Allgemeinen dominieren die MAD-Proteine über die durch MYC hervorgerufenen zellulären Effekte. MYC-Proteine sind potente Inhibitoren der Differenzierung, was in vielen zellulären Systemen gezeigt werden konnte (Henriksson and Luscher, 1996). So kann beispielsweise in Erythroleukemie-Zellen von Mäusen durch DMSO die Differenzierung

eingeleitet werden, was mit einer erniedrigten MYC- und einer erhöhten MAD-Konzentration korreliert (Cultraro et al., 1997; Kime and Wright, 2003). Eine weitere bekannte Eigenschaft von MYC-Proteinen ist die Fähigkeit zur Transformation von primären Rattenembryofibroblasten in Kombination mit HA-Ras (Henriksson and Luscher, 1996; Marcu et al., 1992). Auch in diesem Fall kann eine antagonistische Wirkung von MAD-Proteinen festgestellt werden (Cerni et al., 1995; Hurlin et al., 1997; Lahoz et al., 1994).

MYC induziert den Zelltod nicht selbst, aber es sensibilisiert die Zelle für andere apoptotische Stimuli, inklusive Entzug von Serum und Wachstumsfaktoren, die Reaktion auf Aktivierung des Fas-Rezeptors und die p53-vermittelte Reaktion auf DNA-Schäden (Askew et al., 1991; Hueber et al., 1997; Zindy et al., 1998). MAD1-Proteine können dagegen die durch Serum-Entzug hervorgerufene Apoptose in Fibroblasten verhindern (Bejarano et al., 2000). Auch die durch Fas, TRAIL oder UV-Strahlung verursachte Apoptose, genauso wie die durch Onkogen-Expression induzierte Apoptose, können durch MAD1 inhibiert werden (Gehring et al., 2000).

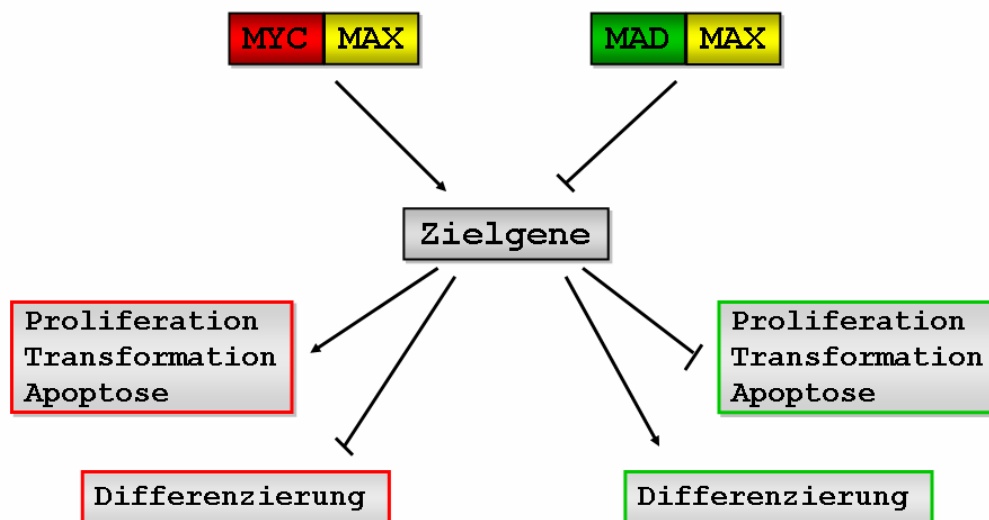


Abbildung 2.2: **Schematische Übersicht über die biologischen Funktionen der Proteine des MYC/MAX/MAD-Netzwerks**

MYC- und MAD-Proteine bilden Heterodimere mit MAX, wodurch sie die Fähigkeit zur spezifischen Bindung an die DNA erlangen. Durch diese Komplexe wird eine Vielzahl von Zielgenen reguliert. Hierbei wird durch MYC/MAX-Komplexe die Transkription stimuliert, während MAD/MAX-Komplexe diese inhibieren und so Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Transformation unterschiedlich regulieren.

Die Expression von MYC und MAD1 sind gegensätzlich. In zellulären Systemen korreliert die Expression von c-MYC mit einer erhöhten Proliferationsrate. Im Verlauf der Differenzierung von Zellen geht die Expression von c-MYC drastisch zurück, während die Expression von MAD1 gesteigert wird (Cultraro et al., 1997). Die verschiedenen Expressions-Muster von MYC und MAD1 ermöglichen die antagonistische Regulation der Zielgene. Die Proteine des MYC/MAX/MAD-Netzwerks besitzen alle außer MAX eine Halbwertszeit von weniger als 30 Minuten. Die Halbwertszeit des konstitutiv exprimierten MAX liegt dagegen im Bereich mehrerer Stunden (Ayer and Eisenman, 1993). Erst vor kurzem konnte der Abbau von MAD1 in Mitogen-stimulierten Zellen mit der Phosphorylierung durch AGC-Kinasen (Familie der Proteinkinasen A, B und C) in Verbindung gebracht werden (Zhu et al., 2008). Sowohl RSK (*p90 ribosomal kinase*) als auch S6K1 (*p70 ribosomal S6 kinase 1*) phosphorylieren MAD1 an Serin-145, was zur Ubiquitinierung und schließlich zum Abbau des Proteins führt. Beide Kinasen gehören zum MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) bzw. zum PI3K/AKT- (*phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat kinase/protein kinase B*) Signalweg.

### **2.1.4 Chromatin-remodeling durch MYC/MAX/MAD**

Die antagonistische Wirkung von MYC- und MAD-Proteinen bei der Transkription ist zum Teil auf ihre unterschiedlichen Effekte auf die Chromatin-Struktur zurückzuführen. Wie bereits oben erwähnt, korreliert die Bindung von MYC an einen Promotor mit einer erhöhten Acetylierung der Kern-Histone, während die MAD-Bindung mit einer Deacetylierung assoziiert ist.

In eukaryotischen Zellen hängt die Transkription stark von der Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren ab. Die fundamentale Untereinheit des Chromatins ist das Nukleosom, ein hochorganisierter, dynamischer Protein-DNA-Komplex. Dabei ist ein DNA-Fragment von 146 bp um ein Histon-Oktamer, bestehend aus dem H3-H4-Tetramer und zwei H2A-H2B-Dimeren, gewickelt (Strahl and Allis, 2000). Das Histon H1 liegt dem Partikel auf und überdeckt die Ein- und Austrittsstelle der DNA.

Bisher wurde eine Reihe verschiedener Modifikationen von Histonen und Chromatin-modulierenden Proteinen beschrieben, die mit der Packungsdichte des Chromatins korrelieren. Verglichen mit der Methylierung (Robertson, 2002), der Phosphorylierung (Davie and Chadee, 1998), Ubiquitinierung (Jason et al., 2002) und Sumoylierung (Verger et al., 2003) ist die Acetylierung (Eberharter and Becker, 2002) der Kern-Histone wahrscheinlich die am besten charakterisierte Modifikation. Die Acetylierung findet an

der  $\epsilon$ -Aminogruppe verschiedener Lysin-Reste statt. Die Lysine befinden sich hauptsächlich im N-terminalen Bereich unter den ersten 30 Aminosäuren, die die Histon-*tails* bilden (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000).

Die gegensätzliche Aktivität von HAT und HDAC sorgt dabei für ein Gleichgewicht zwischen acetylierten und deacetylierten Histonen. Es wird angenommen, dass die Acetylierung der Lysin-Reste an H3 und H4 die Interaktion benachbarter Nucleosomen (Fletcher and Hansen, 1996) und die zwischen Histonen und DNA (Hong et al., 1993) schwächt. Hierdurch wird vermutlich die Chromatin-Struktur gelockert, so dass die DNA leichter zugänglich für Transkriptionsfaktoren ist. Hier kommt zusätzlich die Hypothese des Histon-Codes ins Spiel, bei der die Kombination verschiedener Histon-Modifikationen das Anlagern von Proteinen ermöglicht. Es kommt zur Anlagerung von Proteinen, die über ihre Bromo-Domänen mit Acetyl-Resten oder über Chromo-Domänen mit Methyl-Resten assoziieren können und dadurch die Bindung anderer Proteine fördern oder verhindern, so dass diese weitere Modifikationen einleiten können. Eine Bindung von MYC führt durch die Rekrutierung von HATs zum Anstieg der Acetylierung in den Kern-Histonen der entsprechenden Promotor-Bereiche (Abbildung 2.3) (Bouchard et al., 2001; Fernandez et al., 2003; Frank et al., 2003; Frank et al., 2001). Dagegen korreliert die Bindung von MAD1 mit einer Rekrutierung von HDAC1 und einer verringerten Acetylierung der Histone (Bouchard et al., 2001). Die Abnahme der Histon-Acetylierung verhindert die Beladung mit Polymerase II (Bouchard et al., 2001), wodurch sich die reprimierende Wirkung von MAD1 auf die Transkription der jeweiligen Zielgene erklären lässt (Knoepfler and Eisenman, 1999; Schreiber-Agus and DePinho, 1998).

Die Rekrutierung des mSIN3-Repressor-Komplexes mit HDAC-Aktivität durch die SID ist somit essentiell für die biologischen Aktivitäten der MAD-Proteine (Baudino and Cleveland, 2001; Grandori et al., 2000). Der mSIN3-Komplex scheint der einzige Repressor-Komplex zu sein, der von MAD-Proteinen gebunden wird. Dieser Repressor-Komplex besteht aus mindestens 10 Untereinheiten (Hassig et al., 1997). Dabei fungiert mSIN3 als ein Adaptor, der mit vielen Untereinheiten des Komplexes durch Protein-Protein-Bindung interagiert, inklusive HDAC1, HDAC2 und weiteren transkriptionellen Regulatoren (Knoepfler and Eisenman, 1999; Rottmann and Luscher, 2006).

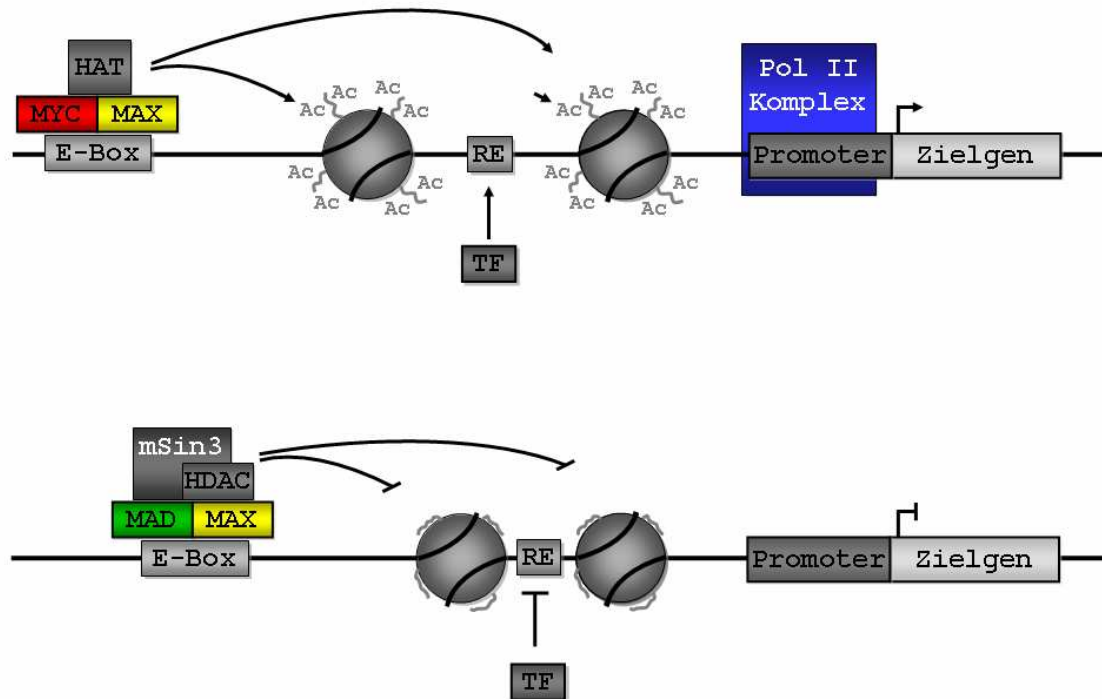


Abbildung 2.3: **Modell zur transkriptionellen Regulation durch MYC und MAD-Proteine**  
 Das MYC/MAX-Heterodimer bindet einen Komplex, dessen Histon-Acetyltransferase-Aktivität (HAT) zur Acetylierung der Kern-Histone führt. Die aufgelockerte Struktur des Promotors führt zur Anlagerung von Transkriptionsfaktoren (TF) an die entsprechenden *Response*-Elemente (RE) sowie des Polymerase II-Komplexes, wodurch es zur Transkription kommt. Das MAD/MAX-Heterodimer kann durch die Bindung des mSIN3-Komplexes (Repressor-Komplex) die Histon-Deacetylase (HDAC) an die DNA rekrutieren. Die Deacetylierung der Lysin-Reste an den *histone-tails* korreliert mit einer kompakteren Anordnung des Chromatins, so dass der Promotor schwerer für den basalen Transkriptionsapparat zugänglich ist, was zu einer Repression der Transkription führt.

## 2.2 Biologische Funktion des MAD1-Proteins

### 2.2.1 MAD1-Effekte auf die Proliferation, Differenzierung und Transformation

Nachdem MAD1 in das Netzwerk der bHLHZip-Transkriptionsfaktoren eingeordnet und sein Gegenspieler c-MYC in seinen biologischen Funktionen und Wirkmechanismen erläutert wurde, soll hier nun die Rolle von MAD1 in der Regulation von Differenzierung und Apoptose aufgezeigt werden. Während bei einer Cotransfektion von MYC und Ras eine Transformation der REFs erfolgt (Bildung von Foci) (Land et al., 1983), bewirkt eine



Cotransfektion von MAD1, MYC und Ras eine Reduktion der Foci um 50% (Cerni et al., 1995; Koskinen et al., 1995; Lahoz et al., 1994; Vastrik et al., 1995). MAD1 inhibiert also Transformation wie auch Zellwachstum. Außerdem wurde gezeigt, dass die MAD1-Expression in G0-Zellen durch Serum oder Wachstumsfaktoren induzierten G1/S-Übertritt inhibiert (Roussel et al., 1996). MAD1 wird dementsprechend in differenzierenden und terminal differenzierten Zell-Linien exprimiert, nicht aber in proliferierenden Zellen (Ayer et al., 1993; Larsson et al., 1994; Zervos et al., 1993). Somit spricht das Expressionsverhalten von MAD1 für eine inhibitorische Funktion im Zellwachstum und eine Assoziation mit der Zell-Differenzierung. Während c-MYC als Proto-Onkogen bekannt ist, zeigt sich der Einfluss von MAD1 in Tumorzellen nicht so eindeutig. In zwei Zell-Linien führte zwar die Überexpression von exogenem MAD1 zu einer Verlangsamung des Wachstums und Verminderung der Malignität dieser Tumorzellen in Nacktmäusen (Chen et al., 1995), in anderen Tumorzell-Linien konnte aber kein Effekt beobachtet werden (Roy and Reisman, 1995). Da *MXI1* (*MAD2*) in einer chromosomalen Region liegt, die häufig in Prostata-Tumoren verändert ist, lag zumindest bei diesem MAD-Protein die Hypothese eines Tumorsuppressors nahe. Sie konnte aber bisher nicht bestätigt werden. Über Mutationen in anderen MAD-Genen in Tumoren ist nichts bekannt.

## 2.2.2 MAD1-Effekte auf die Apoptose

Nachdem MYC als ein Apoptose-induzierendes Protein identifiziert wurde (Pelengaris et al., 2002; Prendergast, 1999), konnte die antagonistische Aktivität von MAD1 auch diesbezüglich bestätigt werden. So weisen Granulozyten-Vorläufer aus *MAD1*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine um 30-50% gesteigerte Sensitivität gegenüber verschiedenen Apoptose-Induktoren auf (Foley et al., 1998). Die Funktion von MAD1 in der Regulation der Apoptose wird des Weiteren durch die Befunde aus Mäusen mit einem MAD1-Transgen unterstützt. Die entsprechenden Granulozyten zeigen sich wesentlich resistenter gegen den Entzug von Überlebensfaktoren (Queva et al., 1999).

Auch im Zellkulturmodell kann eine anti-apoptotische Funktion von MAD1 beobachtet werden. In Fibroblasten kann MAD1 die durch Serum-Entzug eingeleitete Apoptose reduzieren (Bejarano et al., 2000). Dabei schützt MAD1 vor mehreren unterschiedlichen Apoptose-induzierenden Signalen, wie z.B. der Stimulation von Todesrezeptoren (Fas, TRAIL), DNA-Schädigung durch UV-Strahlung und der Expression von Onkoproteinen (Gehring et al., 2000). Bei einer Suche nach MAD1-Zielgenen konnte *PTEN*

(*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom 10*) identifiziert werden. Durch die Dephosphorylierung von PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) verhindert die Phosphatase PTEN die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges. In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor reprimiert MAD1 das *PTEN*-Gen und aktiviert dadurch den PI3K/AKT-Signalweg. Die Regulation des *PTEN*-Genes ist somit für die MAD1-abhängige Repression der Apoptose essentiell (Rottmann et al., 2008).

## 2.3 Apoptose

Der programmierte Zelltod (Apoptose) spielt in vielzelligen Organismen eine wichtige Rolle. Durch virale Infektion oder durch Mutationen geschädigte Zellen werden durch Apoptose entfernt (Thompson, 1995). Der programmierte Zelltod auf Einzelzell-Ebene steht somit im Interesse des gesamten Organismus. Die Apoptose kann als Folge von Strahlung, chemischen Mutagenen, Entzug von Wachstumsfaktoren und durch Onkoproteine ausgelöst werden. Auch bei der Erhaltung der Gewebemöostase hat die Apoptose eine bedeutende Funktion und ist unter physiologischen Bedingungen ein wichtiger Schritt in der Embryonalentwicklung, sowie der Entwicklung des Nerven- und Immunsystems (Burek and Oppenheim, 1996; Weller et al., 1997). Eine Dysregulation der Apoptose kann zu Erkrankungen führen. So kann exzessive Apoptose beispielsweise neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer oder die Destruktion von T-Lymphozyten bei AIDS, bewirken. Im Gegensatz dazu kann verminderte Apoptoseaktivität einerseits zu unkontrollierter Zell-Proliferation in malignen Erkrankungen, andererseits zu autoimmunen Erkrankungen führen (Borgerson et al., 1999).

Die Apoptose ist durch eine Vielzahl morphologischer Veränderungen definiert. Dazu zählen das Schrumpfen der Zelle und die Kondensierung des Chromatins. Es kommt zur endonukleolytischen Spaltung der DNA zwischen den Nukleosomen, wodurch DNA-Fragmente mit einer Länge von 150 bp und ganzzahligen Vielfachen davon auftreten. Durch die Abnahme der Membran-Stabilität kommt es zu Ausstülpungen und schließlich zur Abschnürung von Vesikeln, den so genannten *apoptotic bodies*. Zusätzlich kommt es zum Verlust der Membran-Symmetrie, wobei die Präsentation von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche der Erkennung durch Phagozyten dient (Savill et al., 1993).

Im Unterschied dazu ist die Nekrose durch das Anschwellen der Zelle und die Zerstörung der Organellen gekennzeichnet. Es kommt zur Ausschüttung des cytoplasmatischen Inhalts in den extrazellulären Raum, was mit einer inflammatorischen Reaktion und Gewebeschädigungen einhergeht.

### 2.3.1 Caspasen

Apoptose kann durch die Aktivierung von Todesrezeptoren oder durch die Ausschüttung pro-apoptotischer Moleküle aus den Mitochondrien ausgelöst werden. Dabei sind die Proteasen der Caspase-Familie (*cysteine-aspartic acid proteases*) in beiden Fällen für die meisten charakteristischen Veränderungen einer apoptotischen Zelle verantwortlich. Caspase-1 wurde aufgrund der Homologie zu CED-3, einem für den Zelltod in *Caenorhabditis elegans* notwendigen Genprodukt identifiziert und zuerst nach ihrer Funktion, der aktivierenden Spaltung des Entzündungs-Mediators Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), ICE (*interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme*) benannt (Thornberry et al., 1992). Über die Jahre wurden mehrere Proteine mit Sequenzhomologien zu ICE entdeckt, die jetzt die Familie der Caspasen bilden (Degterev et al., 2003; Reed, 2006). Bisher sind 12 humane Caspasen bekannt (Abbildung 2.4), die entsprechend ihrer Hauptfunktion und ihrer Sequenzhomologien in drei Unterfamilien, die Initiator-Caspasen, die Effektor-Caspasen und die Entzündungs-Mediatoren, eingeteilt werden (Fan et al., 2005a). Während der Apoptose werden zunächst Initiator-Caspasen aktiviert, die dann die Effektor-Caspasen kaskadenartig aktivieren und durch die proteolytische Spaltung einer Vielzahl von Substraten das apoptotische Programm vollstrecken (Fischer et al., 2003).

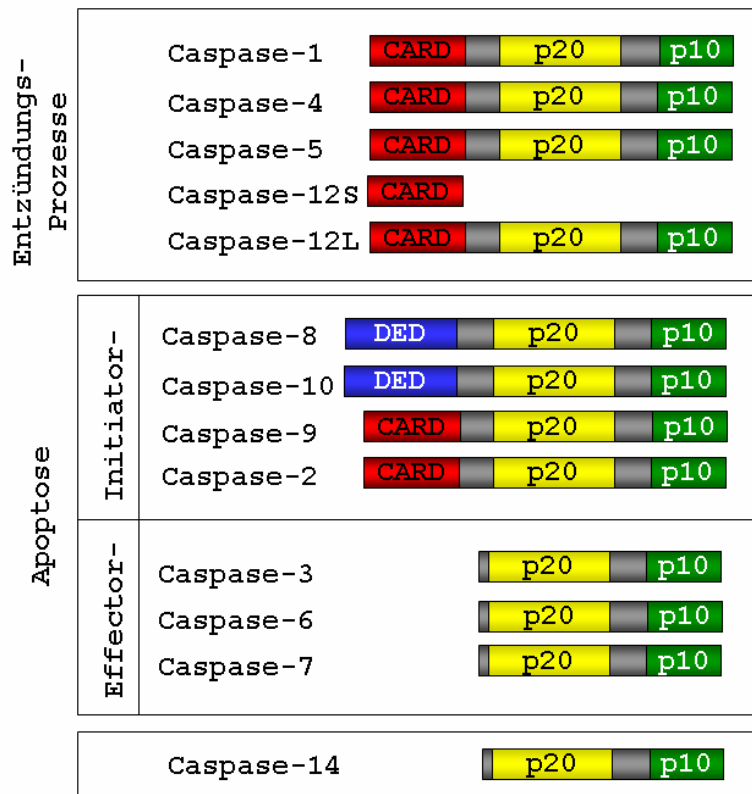


Abbildung 2.4: **Einteilung und struktureller Aufbau der Procaspasen**

Gezeigt sind die humanen Caspasen, sortiert nach ihren Hauptfunktionen. Während alle Caspasen eine große (p20) und eine kleine (p10) Untereinheit besitzen, zeichnen sich nur einige Caspasen durch zusätzliche Oligomerisierungs-Domänen (DED und CARD) in der N-terminal gelegenen Prodomäne aus.

### Initiator-Caspasen

Die Caspase-8 kann einerseits über die Aktivierung des Fas-Rezeptors und die dadurch eingeleitete Bildung des DISC (*death inducing signaling complex*) aktiviert werden (Fan et al., 2005b). Andererseits kann die Aktivierung der Caspase-8 auch über den intrinsischen Signalweg durch das Mitochondrium erfolgen (Scaffidi et al., 1998). Durch Caspase-8 kommt es zur proteolytischen Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 und das pro-apoptische Bcl-2-Protein BID wird in seine aktive Form tBID überführt, wodurch der mitochondriale Apoptose-Signalweg involviert wird.

Die Aktivierung des Apoptose-Signalweges durch Caspase-10 verläuft über die Aktivierung des Fas-Rezeptors und nicht über die Mitochondrien (Wang et al., 2001). Bei Caspase-2 handelt es sich ebenfalls um eine Initiator-Caspase, die unabhängig von Cytochrom c und Apaf-1 in einem Protein-Komplex aktiviert wird, um dann unter

anderem durch Aktivierung von BID über die mitochondrialen Signalwege den Zelltod zu induzieren (Read et al., 2002).

Die Aktivierung der Caspase-9 erfolgt über den intrinsischen Signalweg. Hierbei kommt es durch die Freisetzung von Cytochrom c und anderen pro-apoptotischen Molekülen aus den Mitochondrien zur Bildung des Apoptosoms, welches die aktive Form der Caspase-9 darstellt (Acehan et al., 2002; Li et al., 1997b).

Die Caspase-12 ist die Initiator-Caspase in einem Apoptose-Signalweg, der unter der Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums (ER) abläuft. Caspase-12 gehört zur Gruppe der inflammatorischen Caspasen und ist an der ER-Membran lokalisiert. Die Aktivierung der Caspase-12 wird durch ER-Stress-Signale ausgelöst und erfolgt unabhängig vom Rezeptor-vermittelten und Mitochondrien-induzierten Signalweg (Nakagawa et al., 2000). Das Gen für Caspase-12 weist einen Polymorphismus auf und kann so zu einer langen (Caspase-12L) oder einer inaktiven verkürzten Caspase-12S führen (Fischer et al., 2002; Saleh et al., 2004).

#### Effektor-Caspasen

Caspase-3 spielt eine zentrale Rolle bei der Ausführung des programmierten Zelltodes. Die Aktivierung kann dabei durch Caspasen, wie Caspase-8 und -9, durch Caspase-3 selbst, aber auch durch andere Moleküle, wie Granzyme B, erfolgen. Ebenso erfolgt die Aktivierung der anderen beiden Effektor-Caspasen, Caspase-6 und -7, aus den jeweiligen Procaspasen auf ähnlichem Wege (Fan et al., 2005a). Am Ende der Caspasen-Kaskade steht die proteolytische Spaltung verschiedener Substrate, wie z.B. PARP1 (Fan et al., 2005a) oder CAD (Nagata, 2000).

#### Inflammatorische Caspasen

Die inflammatorischen Caspasen, Caspase-1, -4 und -5 spielen eine Rolle bei der Bereitstellung inflammatorischer Zytokine und haben keinen Einfluss auf apoptotische Vorgänge.

Die Caspase-14 konnte bisher keinem Zweig eindeutig zugeordnet werden. Basierend auf ihrer Lokalisation in der Epidermis wird für sie eine Funktion in der Differenzierung von Keratinozyten angenommen (Park et al., 2006).

### 2.3.1.1 Aufbau der Caspasen

In der Zelle liegen die Caspasen als inaktive Zymogene (Procaspasen) vor. Sie bestehen alle aus einer N-terminalen Prodomäne mit variabler Länge, gefolgt von einer großen (p20) und einer kleinen (p10) Untereinheit. Erst die Proteolyse zwischen den beiden Untereinheiten sowie der Entfernung der Prodomäne ermöglichen die Zusammenlagerung zu einem aktiven Enzym-Komplex (Abbildung 2.5). Das aktive Heterotetramer besteht aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten und besitzt zwei katalytische Zentren, die sich jeweils in den großen Untereinheiten befinden (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004).

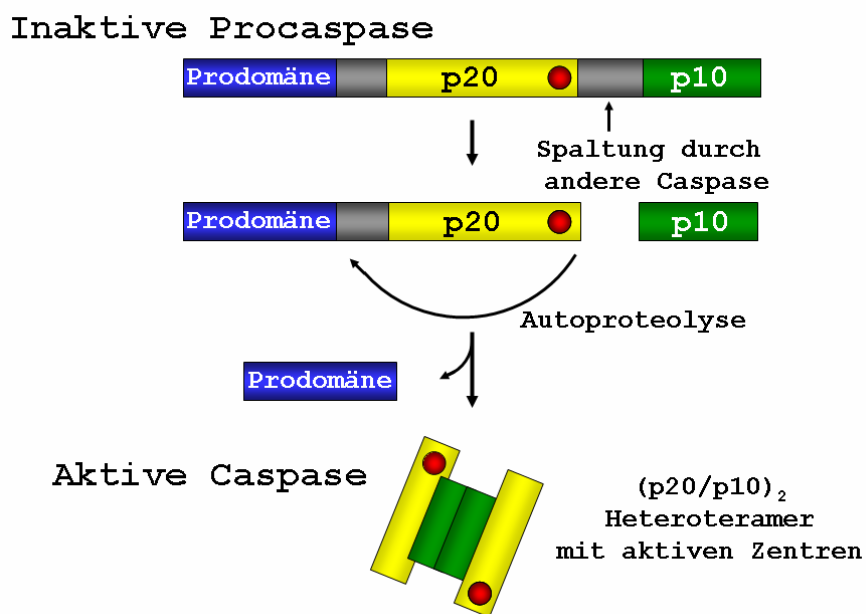


Abbildung 2.5: **Schematische Darstellung der Caspase-Aktivierung**

Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Proenzyme vor. Die Aktivierung erfolgt in zwei Schritten, wobei zunächst eine proteolytische Spaltung zwischen den beiden Untereinheiten und anschließend die Abspaltung der Prodomäne erfolgen. Jeweils zwei große und zwei kleine Untereinheiten lagern sich zu einem Heterotetramer zusammen und bilden die aktive Caspase.

Im Gegensatz zu den Effektor-Caspasen besitzen die Initiator-Caspasen eine lange Prodomäne, in denen zwei unterschiedliche Protein-Protein-Interaktions-Domänen identifiziert wurden. Die Prodomänen von Caspase-8 und Caspase-10 weisen zwei Kopien der DED (*death effector domain*) auf, durch welche sie an das Adapter-Protein FADD des Fas-Rezeptors binden können (Ashkenazi and Dixit, 1998). Andere Caspasen enthalten eine CARD (*caspase recruitment domain*) in ihrer Prodomäne. Ähnlich wie die DED dient auch die CARD zu der Bindung an Adapter-Moleküle, wie z.B. die Interaktion

zwischen Apaf-1 und Procaspase-9. Damit stellen die Prodomänen die kritische Verbindung zwischen dem Stimulus und der Aktivierung von Caspasen dar (Cryns and Yuan, 1998). Alle Caspasen besitzen im aktiven Zentrum ein konserviertes QACXG-Pentapeptid mit dem namensgebenden und für die Katalyse essentiellen Cystein-Rest.

### 2.3.1.2 Substratspezifität von Caspasen

Zur Beschreibung einer Protease-Schnittstelle in einem Substrat wurde eine Nomenklatur eingeführt (Schechter and Berger, 1967). Die Aminosäure-Reste des Substrats werden mit P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4' bezeichnet, wobei die proteolytische Spaltung zwischen P1 und P1' erfolgt (Abbildung 2.6.B).

Das aktive Zentrum der Caspasen wird durch einen Cystein-Rest gebildet, der spezifisch die Spaltung des Substrates C-terminal von Asparaginsäuren katalysiert. Dabei wird im Substrat eine Tetrapeptid-Sequenz erkannt, bei der sich die gespaltene Asparaginsäure an Position 1 (P1) befindet. Die Caspasen unterscheiden sich in ihrer Akzeptanz für die Aminosäuren in den Position P2-P4. Sie lassen sich aufgrund ihrer optimalen Tetrapeptid-Sequenz in drei Gruppen einteilen (Garcia-Calvo et al., 1998; Garcia-Calvo et al., 1999; Thornberry, 1997) (Abbildung 2.6.A).

Die Gruppe I beinhaltet die Caspasen-1, -4, -5, die große, hydrophobe Reste in der Position-P4 ihrer optimalen Konsensus-Sequenz WEHD bevorzugen. Sie schneiden und beeinflussen dadurch die Reifung bestimmter Zytokine während inflammatorischer Reaktionen.

Die Gruppe II besteht aus Caspase-2, -3, -7 und begünstigt Substrate mit Asparaginsäure in der P4-Position. Ihre optimale Spaltstelle ist DEXD, wobei das X bei den Caspasen-3 und -7 für Valin und bei der Caspase-2 für Histidin steht. Diese Caspasen führen hauptsächlich zur Spaltung von Todessubstraten. Die Caspasen der Gruppe III, Caspasen-6, -8, -9 und -10, sind bezüglich der P4-Position weniger wählerisch. Ihre bevorzugte Substrat-Schnittstelle lautet (I/V/L)EXD, wobei die Caspase-6 VEHD, die Caspase-8 LETD, die Caspase-9 LEHD und die Caspase-10 LEXD als Konsensus-Sequenz aufweisen. Sie vermitteln hauptsächlich die Aktivierung der Caspasen aus Gruppe II oder anderer Gruppe III Caspasen. Allen Gruppen ist die Bevorzugung von Glutaminsäure in der P3-Position gemeinsam. In der P1'-Position werden geladene oder besonders große Aminosäuren nicht toleriert. Demnach sind Glycin, Alanin, Threonin, Serin und Asparagin förderlich, während Glutaminsäure, Asparaginsäure, Lysin, Arginin und Tryptophan sich negativ auf die proteolytische Spaltung auswirken (Stennicke et al., 2000). Des Weiteren konnten einige Caspase-3-

und Caspase-7-Substrate mit nicht-kanonischer Schnittstelle identifiziert werden (Beyaert et al., 1997; Nicholson, 1999; Yin et al., 2001). Bei dem Transkriptionsfaktor MAX, der als Dimerisierungspartner für c-MYC und MAD-Proteine fungiert, handelt es sich um ein Caspase-5-Substrat mit einer untypischen Schnittstelle. Hier befindet sich Glutaminsäure in der P1-Position, zusätzlich führt die Phosphorylierung von MAX zur Inhibition der proteolytischen Spaltung durch Caspase-5 (Krippner-Heidenreich et al., 2001).

**A**

Spezifitätsgruppe		P4-P1	Consensus
Gruppe I	Caspase-1	WEHD	WEHD
	Caspase-4	WEHD	
	Caspase-5	WEHD	
Gruppe II	Caspase-2	DEHD	DEXD
	Caspase-3	DEVD	
	Caspase-7	DEVD	
Gruppe III	Caspase-6	VEHD	(I/V/L) EXD
	Caspase-8	LETD	
	Caspase-9	LEHD	
	Caspase-10	LEXD	

**B**

P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4'

Abbildung 2.6: **Caspase-Schnittstellen**

**A:** Gruppierung der Caspasen nach ihrer Substratspezifität (Thornberry, 1997)

**B:** Nomenklatur für Protease-Schnittstellen (Schechter and Berger, 1967)

### 2.3.1.3 Caspase-Substrate

Bis jetzt sind über 280 Caspase-Substrate bekannt (Fischer et al., 2003), die in fast allen Bereichen zellulärer Funktionen zu finden sind. Ihre Spaltung kann im direkten oder indirekten Zusammenhang mit den Veränderungen während der Apoptose stehen. Einige Substrate verlieren durch die proteolytische Spaltung ihre Aktivität, während andere dadurch erst aktiviert werden.

Eine eindeutige Funktion kann der Spaltung von ICAD/DFF40 (*inhibitor of caspase-activated DNase*) zugewiesen werden. Dieser Inhibitor liegt als Komplex zusammen mit der Endonuklease CAD (*caspase-activated DNase*) im Cytoplasma vor. Die Spaltung von ICAD durch Caspase-3 ermöglicht CAD in den Zellkern zu gelangen und die DNA zu



fragmentieren (Enari et al., 1998; Liu et al., 1997). Des Weiteren werden verschiedene Struktur- und Cytoskelett-Proteine durch Caspasen prozessiert, wie z.B. Lamin, dessen Spaltung das innere Gerüst der Kernhülle aufhebt (Orth et al., 1996; Takahashi et al., 1996). Durch die Spaltung von Aktin wird das Cytoskellet und die Zellgestalt beeinflusst (Mashima et al., 1997; Mashima et al., 1999), dagegen ist die Spaltung von Keratin (Caulin et al., 1997) und Gelsolin (Kothakota et al., 1997) wichtig für die Ausbildung der *apoptotic bodies*. Weitere Caspase-Substrate sind Enzyme, die an der DNA-Synthese oder DNA-Reparatur beteiligt sind wie PARP1 (Casiano et al., 1996). Zusätzlich werden Proteine mit regulatorischer Funktion in der Apoptose geschnitten, wie die Caspasen selbst oder das pro-apoptotische Bcl-2-Protein BID (Luo et al., 1998).

### 2.3.2 Extrinsischer Apoptose-Signalweg

Ein bedeutender Mechanismus zur Induktion des programmierten Zelltodes ist die Interaktion spezifischer Liganden mit extrazellulären Todesrezeptoren (Extrinsischer Apoptose-Signalweg). Diese Liganden und Rezeptoren gehören zur Familie der TNF- (*tumor necrosis factor*)-Rezeptoren und zeichnen sich durch den Besitz einer Cysteinreichen, extrazellulären und einer konservierten cytoplasmatischen Region aus (Ashkenazi and Dixit, 1998). Die einzelnen Mitglieder sind nicht nur für die Induktion der Apoptose verantwortlich, sie üben auch wichtige Funktionen in immunologischen, Differenzierungs- und Überlebens-Signalwegen aus (Aggarwal, 2003).

#### 2.3.2.1 Der Fas-Rezeptor

Der Fas-Rezeptor (CD95/Apo1) ist ein Mitglied der TNF-Rezeptoren. Er findet sich auf zahlreichen Zell-Linien und Geweben, so zum Beispiel auch auf Tumorzellen (Debatin et al., 1993) und spielt eine große Rolle bei der Induktion der Apoptose. Es existieren zwei Modelle für die Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor. Das Modell der Post-Liganden-Trimerisierung beschreibt die Bindung durch ein Homotrimer des Fas-Liganden an drei monomere Fas-Rezeptoren, was zum Zusammenbau des trimeren Rezeptors führt (Abbildung 2.7). Das Modell der Pre-Liganden-Trimerisierung geht von einer Trimerisierung des Fas-Rezeptors vor der Bindung des Fas-Liganden aus (Siegel et al., 2000). Durch die Trimerisierung des Rezeptors kommt es zur Gruppierung der cytoplasmatischen, C-terminalen Todesdomänen (DD, *death domain*). Die Cluster-Bildung ermöglicht die Bindung des Adapterprotein FADD (Fas-associated death

domain) durch seine eigene DD an den Fas-Rezeptor. Die Interaktion des Adaptermoleküls mit der DD des Rezeptors führt zur Exposition der N-terminalen DED (*death effector domain*), die ihrerseits mit der N-terminalen Todesdomäne der Procaspase-8 interagiert. Dieser Protein-Komplex aus trimerisiertem Rezeptor, Adaptermolekül und Procaspase wird als DISC (*death inducing signaling complex*) bezeichnet.

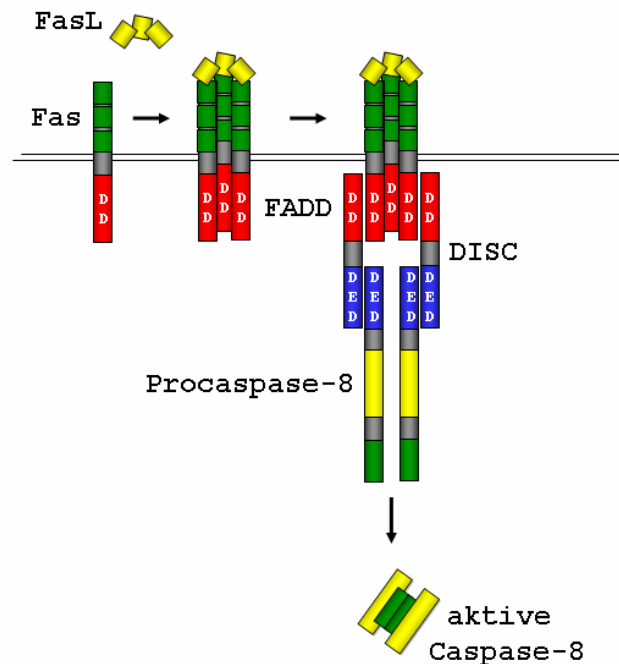


Abbildung 2.7: **Aktivierung des Fas-Rezeptors**

Die Bindung des Zelloberflächen-Rezeptors Fas an den Fas-Liganden (FasL) führt zur Trimerisierung des Rezeptors. Es folgt die Anlagerung des Adaptermoleküls FADD (*Fas-associated death domain*) über die DD (*death domain*) und ermöglicht über die DED (*death effector domain*) die Rekrutierung von Procaspase-8. Der so formierte DISC (*death inducing signaling complex*) ist notwendig für die Prozessierung der aktiven Initiator-Caspase-8.

Als Konsequenz der DISC-Bildung werden die Caspase-8-Zymogene in räumliche Nähe zueinander gebracht, was in ihrer Dimerisierung und der Bildung von katalytisch aktiven Heterotetrameren resultiert (Borgerson et al., 1999; Muzio, 1998; Muzio et al., 1998). Auch die zu Caspase-8 homologe Initiator-Caspase, Caspase-10, spielt eine initiiierende Rolle in der Rezeptor-vermittelten Apoptose (Boatright and Salvesen, 2003; Donepudi et al., 2003). Die so prozessierten und aktivierten Initiator-Caspasen können durch proteolytische Spaltung die Effektor-Caspasen aktivieren und dadurch die Caspase-Kaskade in Gang setzen. Zusätzlich zu den Initiator-Caspasen-8 und -10 können auch andere Moleküle in die Steuerung dieses Signal-Komplexes eingreifen. Beispielsweise

führt das Procaspase-8 Homolog c-FLIP zu einer Inhibition der Caspase-Kaskade (Thome and Tschopp, 2001).

### 2.3.2.2 Typ I und Typ II-Zellen

Bei der Fas-vermittelten Apoptose werden Typ I und Typ II-Zellen, die verschiedene Signalwege nutzen, unterschieden (Abbildung 2.8).

In Typ I-Zellen wird Procaspase-8 schnell und in großen Mengen am DISC aktiviert, so dass es direkt zur Prozessierung der Effektor-Caspasen und durch die Aktivierung der Caspase-Kaskade zur Induktion der Apoptose kommt.

In Typ II-Zellen wird dagegen weniger DISC gebildet, was eine limitierte Menge an aktiver Caspase-8 zur Folge hat. Um das apoptotische Signal zu verstärken, kommt es in diesen Zellen zusätzlich zur Aktivierung des mitochondrialen Signalweges (Fulda et al., 2001; Scaffidi et al., 1998). Durch aktive Caspase-8 kommt es zur proteolytischen Spaltung des cytosolischen Proteins BID (*BH3 interacting domain death agonist*). Das entstehende C-terminale Spaltprodukt tBID (*truncated BID*) vermittelt nach der Translokation an die Mitochondrienmembran die Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren und führt so zur Aktivierung der Caspase-9. Diese fungiert als Initiator-Caspase und induziert ihrerseits durch die Spaltung von Effektor-Caspasen die Caspase-Kaskade.

#### Legende zu Abbildung 2.8: Rezeptor-vermittelte Apoptose in Typ I und Typ II-Zellen

In Typ I-Zellen kommt es durch die Aktivierung des Fas-Rezeptors zu einer starken Prozessierung von Caspase-8 an der DISC, was sofort die Caspase-Kaskade initiiert, indem Effektor-Caspasen aktiviert werden und zur Apoptose führen. In Typ II-Zellen wird dagegen weniger DISC formiert, was zu einer geringeren Menge aktivierter Caspase-8 führt. In diesen Zellen wird das Mitochondrium zur Verstärkung des Apoptose-Signals mit einbezogen. Durch Caspase-8 wird BID gespalten und dessen aktivierte Form, tBID, forciert die Ausschüttung von pro-apoptotischen Molekülen aus dem Mitochondrium. Durch freigesetztes Cytochrom c und Apaf-1 kommt es zusammen mit ATP und Procaspase-9 zur Formierung des Apoptosoms, welches als Initiator-Caspase die Caspase-Kaskade verstärkt und so auch in diesen Zellen die Apoptose ermöglicht. Das Apoptose-Signaling kann durch die verschiedensten Modulatoren reguliert werden. FLIP<sub>L</sub> ermöglicht die Inhibition der Apoptose indem es die Prozessierung von Caspase-8 verhindert, während durch Bcl-2 die Freisetzung der pro-apoptotischen Moleküle aus den Mitochondrien blockiert wird. XIAP inhibiert die Apoptose durch die Blockade der Caspasen und wird selbst durch Smac/DIABLO und HtrA2/Omi, die aus dem Intermembranraum der Mitochondrien entlassen werden, inhibiert. Die Freisetzung von AIF und Endonuklease G ermöglicht die Initiation der Caspase-unabhängigen Apoptose.

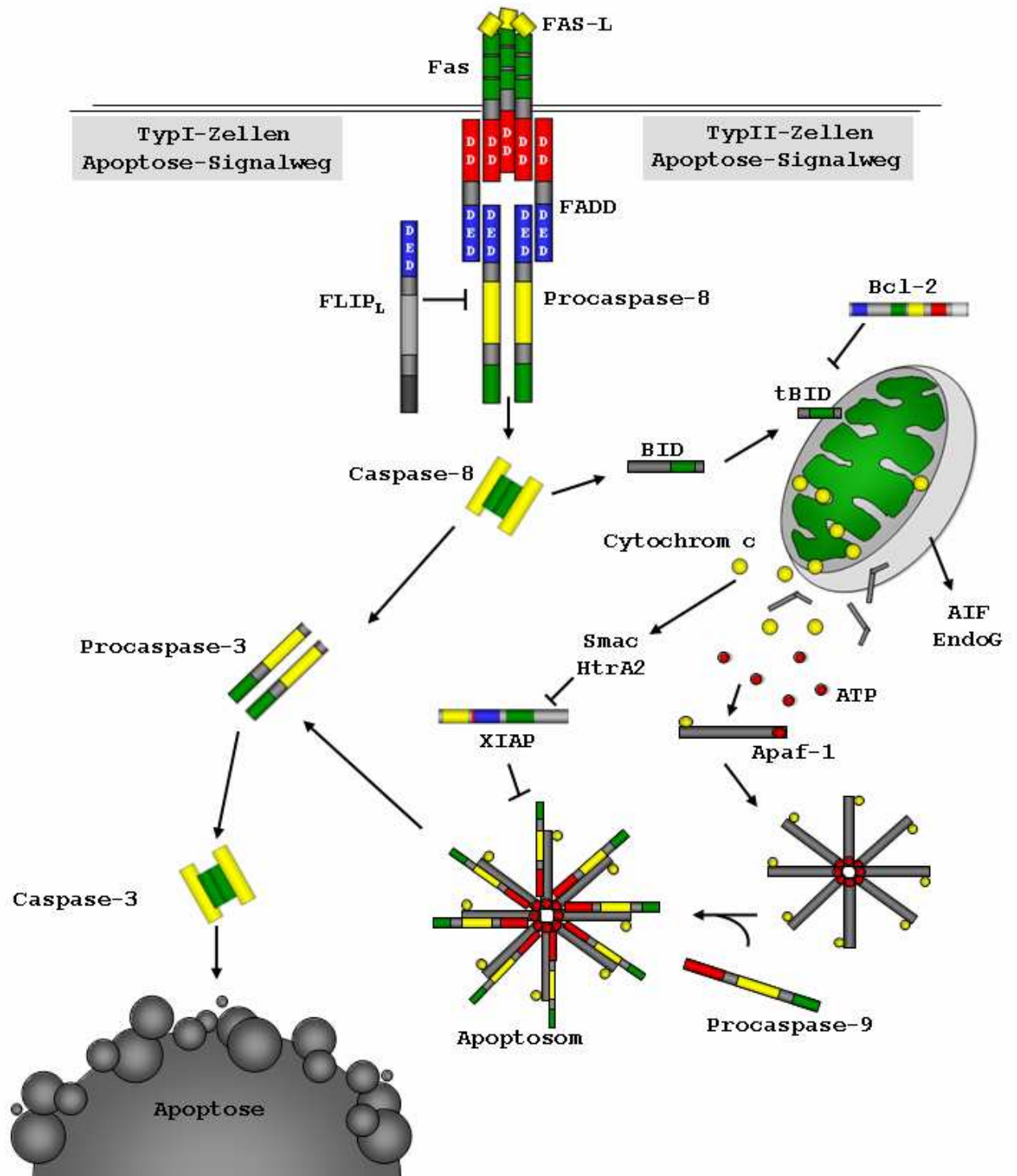


Abbildung 2.8: Rezeptor-vermittelte Apoptose in Typ I und Typ II-Zellen

### 2.3.3 Intrinsischer Apoptose-Signalweg

Die Mitochondrien erfüllen verschiedene Funktionen in der Zelle. Dazu gehören unter anderem die Produktion von ATP durch aeroben Metabolismus und die Aufrechterhaltung des Ionen-Gleichgewichtes. Einen entscheidenden Schritt bei der Apoptose-Induktion stellt die Störung dieser Mitochondrien-Funktionen dar. Der intrinsische Weg kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden wie z.B. dem Tumorsuppressor p53, einem Transkriptionsfaktor, der durch Schädigung der DNA aktiviert wird und die Expression pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2 Familie (z.B. BAX, BAD) aktiviert. Viele toxische Substanzen wirken direkt auf die Mitochondrien und können so die Apoptose induzieren. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Cytosol (Abbildung 2.8). Die Bindung von Cytochrom c an ATP und Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*) führt zu einer Konformationsänderung des Proteins. Durch diese Konformationsänderung wird die Protein-Bindedomäne CARD von Apaf-1 zugänglich, so dass sie an die korrespondierende CARD der Procaspase-9 binden kann. Diese Komplex-Bildung ist eine Voraussetzung für die autokatalytische Aktivierung der Caspase-9 (Li et al., 1997b). Dieser Komplex wird Apoptosom genannt und stellt die aktive Form der Caspase-9 dar. Durch sie kommt es nachfolgend zur weiteren Aktivierung der Caspase-Kaskade.

Neben Cytochrom c sind noch weitere Moleküle bekannt, die während der Apoptose aus dem inneren Membranraum der Mitochondrien ins Cytoplasma gelangen (Abbildung 2.8). Das Flavoprotein AIF (*apoptosis inducing factor*) transloziert zum Nukleus, wo es die Chromatinkondensation der DNA und deren Fragmentierung über die Aktivierung ICE-artiger Proteasen induziert; dies geschieht Caspasen-unabhängig (Cande et al., 2002; Susin et al., 2000; Susin et al., 1999). Infolge apoptotischer Stimuli kommt es zur Öffnung der mitochondrialen Permeabilitätstransitions-Poren (PT) und damit zum Verlust des Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ). Bei den PT-Poren handelt es sich um Multiprotein-Komplexe, die an den Kontaktstellen zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind und als  $\text{Ca}^{2+}$ -, Spannungs-, pH- und Redox-Gleichgewicht-regulierende Kanäle wirken. Diese dynamischen Multiprotein-Komplexe sind assoziiert mit Cyclophilin D, einem wasserlöslichen Matrix-Protein sowie dem Innermembran-Protein ANT (*adenine nucleotide translocator*) und Proteinen der äußeren Mitochondrienmembran wie Porin und VDAC (*voltage-dependent anion channel*). Durch die Öffnung der PT-Pore kommt es zu einem plötzlichen Anstieg in der Permeabilität der Mitochondrienmembran für Moleküle mit einer Masse kleiner als 1,5 kDa, was zum

Einstrom von Ionen, der Ansäuerung des Cytoplasmas und schließlich zum Zusammenbruch des Membranpotentials führt (Crompton, 1999).

Nach der Freisetzung von Smac/DIABLO (*second mitochondrial activator of caspases / direct IAP-binding protein with low pI*) aus den Mitochondrien bindet das Protein an die BIR-3-Domäne von XIAP und anderen IAPs (*Inhibitor of apoptosis proteins*) (Liu et al., 2001; Srinivasula et al., 2001) und antagonisiert so deren Caspase-inhibitorische Wirkung. Hierdurch kommt es zur ungehinderten Aktivierung der Caspase-Kaskade auf Ebene der Caspasen-9 und -3 (Slee et al., 2001; Wu et al., 2000).

Die Serin-Protease HtrA2/Omi (*high temperature requirement A2*) kann die Apoptose auf zwei verschiedenen Wegen fördern (Gray et al., 2000). Zum einen wirkt sie genau wie Smac/DIABLO als IAP-Inhibitor. Zum anderen kann durch extramitochondriales HtrA2/Omi der Zelltod auch Caspasen-unabhängig induziert werden. Dabei ist die Serin-Protease-Aktivität von HtrA2/Omi unerlässlich (Hegde et al., 2002; Suzuki et al., 2001; Verhagen et al., 2002).

Die Endonuklease G wird während der Apoptose aus den Mitochondrien frei gesetzt. Sie ist, ähnlich wie AIF, wichtig um die nukleäre DNA unabhängig von einer Aktivierung der Caspasen zu hydrolysieren. Ansonsten wird ihr eine Funktion bei der Replikation der mitochondrialen DNA und der Zell-Proliferation zugeschrieben (Cote and Ruiz-Carrillo, 1993; Huang et al., 2006; Li et al., 2001; Parrish et al., 2001).

### 2.3.4 Regulatoren der Apoptose

Modulation und besonders die Hemmung der Apoptose kann auf vielen verschiedenen Ebenen stattfinden. Da die Aktivierung der Caspasen kaskadenartig verläuft, stellen gerade die Initiator-Caspasen wichtige Angriffspunkte für Regulatoren der Apoptose dar.

#### 2.3.4.1 c-FLIP-Moleküle

Durch c-FLIP (*cellular-FLICE inhibitory protein*) kommt es zur Inhibition der Rezeptor-vermittelten Apoptose, indem die Aktivierung von Caspase-8 blockiert wird (Kataoka, 2005). Über die N-terminale DED interagieren sie mit FADD und verhindern so die Rekrutierung von Procaspase-8 an den DISC (Abbildung 2.9) (Irmeler et al., 1997). Das Protein gibt es in zwei Varianten, c-FLIP<sub>L</sub>(*long*) und c-FLIP<sub>S</sub>(*short*), die beide eine hohe Homologie zu Procaspase-8 (FLICE) aufweisen. Dem reinen Inhibitor c-FLIP<sub>S</sub> fehlt die C-terminale Caspase-ähnliche Domäne, wodurch die notwendige Konformationsänderung und damit die Aktivierung des Procaspase-8-Moleküls

ausbleiben. Dagegen weisen Procaspase-8-Homodimere und Procaspase-8/FLIP<sub>L</sub>-Heterodimere gleiche Aktivität und Substratspezifität auf (Boatright et al., 2004). Da c-FLIP<sub>L</sub> eine Caspase-ähnliche Domäne besitzt, kommt es zur Aktivierung des benachbarten Procaspase-8-Moleküls. Dieses prozessiert daraufhin sich selbst und das c-FLIP<sub>L</sub>-Molekül. Aufgrund der fehlenden katalytischen Kompetenz von c-FLIP<sub>L</sub> endet die Prozessierung beim Stand eines Caspase-8/c-FLIP<sub>L</sub>-Heterotetramers (Krueger et al., 2001). Im Gegensatz zur aktiven Caspase-8 bleibt dieses über seine DED mit der DISC assoziiert und kann, obwohl es katalytisch aktiv ist, die Apoptose nicht induzieren.

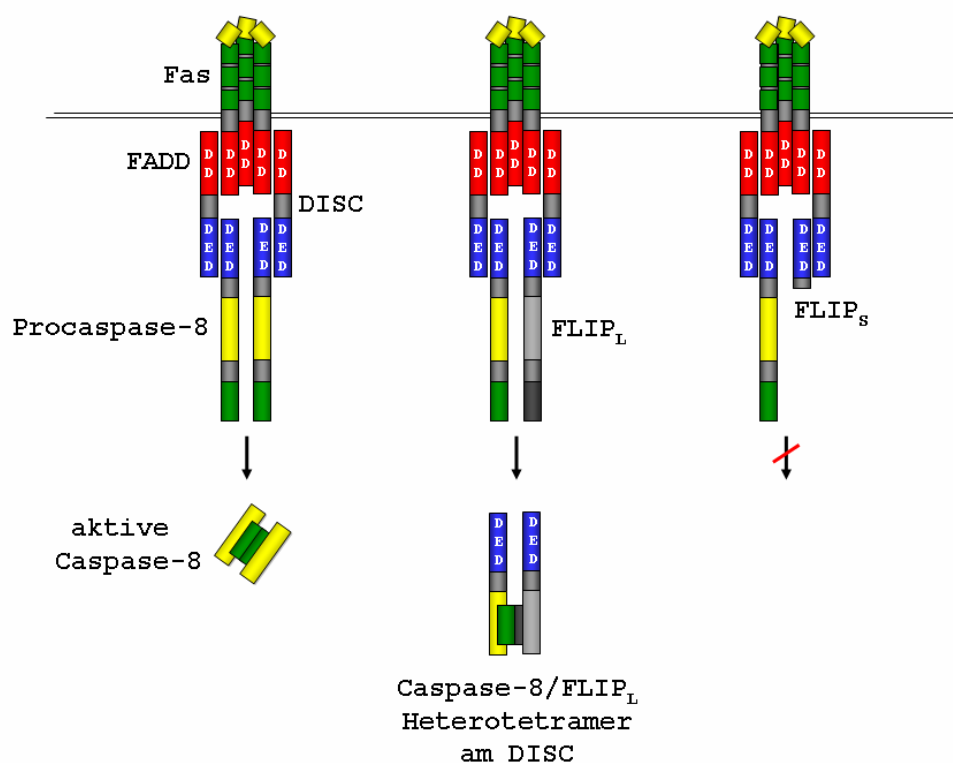


Abbildung 2.9: **Inhibition der Prozessierung von Procaspase-8 durch c-FLIP**

Bei der DISC-Bildung gibt es durch die Rekrutierung von Procaspase-8, FLIP<sub>L</sub> und FLIP<sub>S</sub> mehrere Möglichkeiten, die von den Expressionsmengen der jeweiligen Proteine abhängt. Durch die Homodimerisierung von Procaspase-8 kommt es zur Prozessierung der aktiven Caspase-8. FLIP<sub>L</sub> führt zur Bildung eines aktiven Caspase-8/FLIP<sub>L</sub>-Heterodimers, welches über seine DED mit der DISC assoziiert bleibt. FLIP<sub>S</sub> behindert dagegen die Prozessierung der Procaspase-8 vollständig.

#### 2.3.4.2 Die Proteine der Bcl-2-Familie

Die entscheidenden Schritte der Apoptose-Induktion durch die Mitochondrien werden im Wesentlichen durch die Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*)-Proteine kontrolliert. Die Vertreter dieser Familie zeichnen sich durch vier konservierte, dem Bcl-2 homologe BH-Domänen (*Bcl-2 homology*) aus, von denen in allen Familienmitgliedern mindestens eine vorhanden ist. Je nach Anteilen von BH1, BH2, BH3 und BH4 können die Bcl-2-Proteine in zwei Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 2.10).

Alle anti-apoptotischen Mitglieder weisen vier Domänen auf (Bcl-2 und Bcl-xL). In intakten Zellen liegen sie als integrale Membran-Proteine von Mitochondrien, Nukleus und ER vor (Reed, 2006). Pro-apoptotische Mitglieder unterteilen sich in die Multi-Domänen (BH1-3) und die *BH3-only*-Proteine. Die Multi-Domänen-Proteine (BAX, BAK) können durch die BH3-Domäne mit den anderen Mitgliedern der Bcl-2 Familie interagieren (Puthalakath and Strasser, 2002). Das pro-apoptotische Protein BAK (*Bcl-2 antagonist killer*) ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Durch Apoptose-Signale kommt es bei dem pro-apoptotischen cytoplasmatischen Protein BAX (*Bcl-2 associated X protein*) zu einer Konformationsänderung, gefolgt von der Translokation in die äußere Mitochondrienmembran. Durch Oligomerisierung mit sich selbst oder mit BAK entstehen Poren durch die Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Cytosol gelangt, was zur Aktivierung der Caspase-Kaskade führt (Li et al., 1997b). Die *BH3-only*-Proteine werden durch vielfältige Mechanismen reguliert (Strasser, 2005). So können diese Proteine entweder durch proteolytische Spaltung (BID zu tBID), Stress-induzierte Dephosphorylierung (BAD) oder mitochondriale Translokation (BIM) aktiviert werden (Gross et al., 1999; Reed, 2006). Die Antagonisten der Cytochrom c-Freisetzung sind die anti-apoptotischen Bcl-2 Familien-Mitglieder. Diese sind integrale mitochondriale Membran-Proteine, die an aktiviertes BAX und BAK binden und so die Porenbildung verhindern. Darüber hinaus hemmen sie durch die Bindung an aktivierte *BH3-only*-Proteine die Signalweiterleitung an BAK/BAX (Cheng et al., 2001). Für die Regulation der Apoptose durch Bcl-2-Proteine scheint vor allem das Verhältnis von BAX zu Bcl-2 entscheidenden Einfluss zu haben (Korsmeyer, 1999; Reed, 2006).



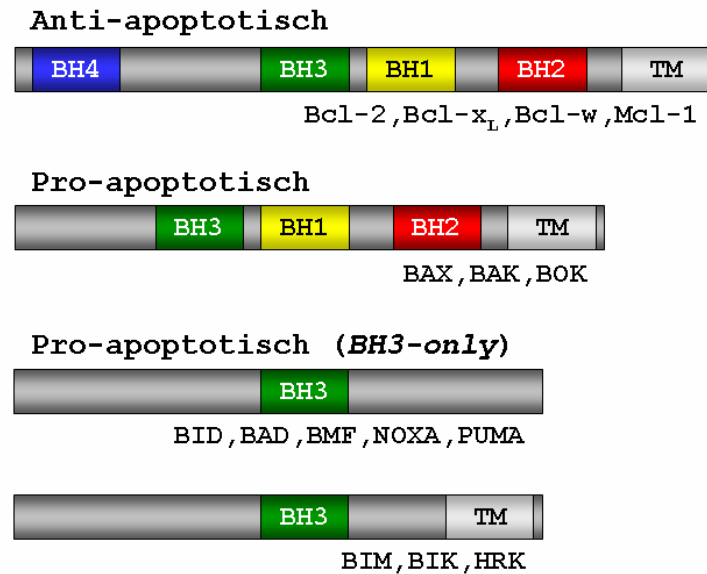


Abbildung 2.10: **Die Bcl-2 Protein-Familie**

Die Proteine der Bcl-2-Familie lassen sich in pro- und anti-apoptotischen Mitglieder unterteilen. Die anti-apoptotischen Proteine besitzen vier BH-Domänen (*Bcl-2 homology domain*). Den pro-apoptotischen Proteinen fehlt die BH4-Domäne. Alle *BH3-only*-Proteine sind pro-apoptotisch und weisen als einzige Gemeinsamkeit mit den anderen Bcl-2-Proteinen die BH3-Domäne auf. Die meisten Bcl-2-Mitglieder besitzen eine kurze C-terminale TM-Sequenz (*transmembrane domain*), mit deren Hilfe die Proteine an die Mitochondrienmembran binden können. Die TM-Domäne fehlt in den meisten pro-apoptotischen *BH3-only*-Proteinen. (Abbildung modifiziert nach (Ogata and Takahashi, 2003))

### 2.3.4.3 Regulation durch IAPs

Die Mitglieder der IAP (*inhibitor of apoptosis protein*)-Familie zeichnen sich durch BIR (*baculovirus IAP repeat*)- und RING (*really interesting new gene*)-Domänen aus (Hinds et al., 1999; Srinivasula and Ashwell, 2008). Die in bis zu drei Wiederholungen vorkommenden BIR-Domänen sind essentiell für die anti-apoptotischen Eigenschaften der IAPs (Abbildung 2.11). Die C-terminal lokalisierte RING-Domäne katalysiert die Ubiquitinierung und somit die Degradation des Proteins selbst oder anderen Zielproteinen. Diese Domäne ist nicht bei allen Mitgliedern vorhanden und hat keinen Einfluss auf die anti-apoptotische Funktion der Familien-Mitglieder c-IAP1, c-IAP2 und XIAP (Deveraux et al., 1997; Roy et al., 1997; Takahashi et al., 1998). Die IAPs inhibieren die Caspasen, mit denen sie über die CARD interagieren können, in dem sie deren katalytische Aktivität blockieren. Durch XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) kommt es zur Inhibition von Caspase-9 und Caspase-3 (Deveraux et al., 1999). Die IAPs werden selbst durch mitochondriale, pro-apoptitische Moleküle wie Smac/DIABLO inhibiert (Wu et al., 2000).

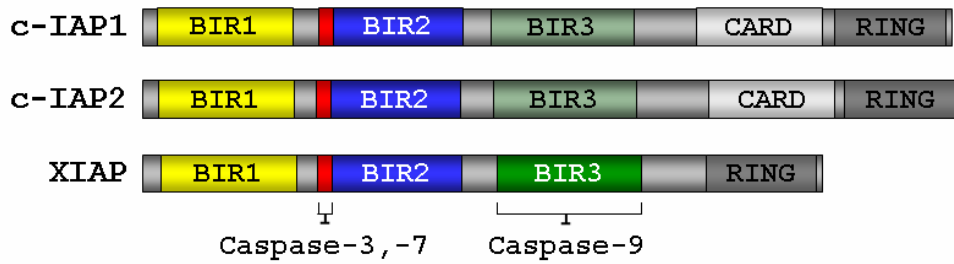


Abbildung 2.11: **Die Mitglieder der IAP-Familie**

Zu den Mitgliedern der IAP-Familie gehören unter anderem c-IAP1, c-IAP2 und XIAP, die sich durch mehrere BIR-Motive (*baculoviral IAP repeat*) auszeichnen. Durch die IAPs kann sowohl der mitochondriale als auch der Rezeptor-vermittelte Apoptose-Signalweg inhibiert werden. Die konservierte Linker-Sequenz (in rot dargestellt) an der BIR2-Domäne ist für die Inhibition von Caspase-3 und Caspase-7 verantwortlich, während ausschließlich die BIR3-Domäne von XIAP Caspase-9 inhibieren kann. Die RING-Domäne im C-terminalen Bereich verleiht den Proteinen E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, während die CARD der Bindung an Caspasen mit eben dieser Domäne dient. (Abbildung modifiziert nach (Riedl and Shi, 2004)).

## 2.4 Proteasomaler Abbau

Der Abbau der meisten Proteine einer Zelle erfolgt auf eine von zwei unterschiedlichen Arten. Durch den lysosomalen Abbauweg werden Proteine abgebaut, die über Endocytose aus dem extrazellulären Bereich aufgenommen wurden. Es handelt sich um einen überwiegend unspezifischen Abbauweg, durch den vor allem Fremdproteine eliminiert werden. Zelleigene Bestandteile, wie fehlgefaltete Proteine werden dagegen durch den Prozess der Autophagozytose abgebaut. Der bekannteste nicht-lysosomale Abbauweg ist der Ubiquitin-Proteasom-Weg, in dem Proteine, nachdem sie mit Ubiquitin konjugiert wurden, im 26S-Proteasom abgebaut werden.

### 2.4.1 Ubiquitin

Bei Ubiquitin handelt es sich um ein 76 Aminosäure langes und 8,5 kDa schweres, hoch konserviertes Protein (Vijay-Kumar et al., 1987), das sich in nahezu allen Eukaryoten finden lässt (Weissman, 2001). Die Bezeichnung für dieses Protein basiert auf der ubiquitären Existenz dieses Moleküls in vielen Geweben und Organismen (Wilkinson et al., 1986). Ubiquitin weist eine kompakte, globuläre Struktur auf (Abbildung 2.12), aus der lediglich der mit zwei Glycin-Resten (GG-Motiv) endende C-Terminus herausragt (Vijay-Kumar et al., 1985). Dieses GG-Motiv ist für die spätere Konjugation des Ubiquitins essentiell. Die außerordentliche Stabilität des Proteins beruht auf der charakteristischen  $\beta$ -Grasp-Falte in der UBX (*ubiquitin regulatory X*)-Domäne. Diese besteht aus vier  $\beta$ -Faltblättern, die um eine zentrale  $\alpha$ -Helix angeordnet sind (Buchberger et al., 2001).

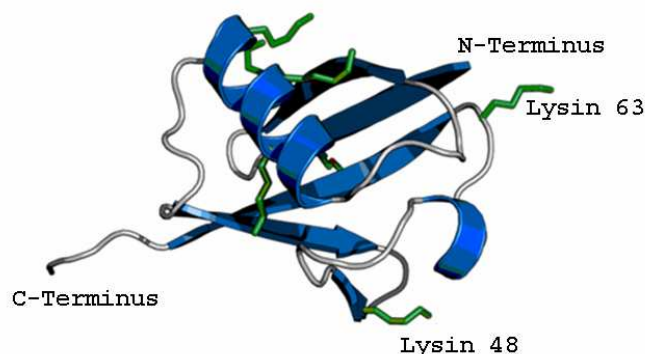


Abbildung 2.12: **Dreidimensionale Struktur von Ubiquitin**

Dargestellt ist die Sekundär-Struktur von Ubiquitin bestehend aus  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblättern (blau). Die sieben Lysine des Proteins sind dargestellt (grün) und Lysine-48 und -63 zusätzlich markiert. (Abbildung verändert nach (Ramage et al., 1994))

## 2.4.2 Ubiquitinierung

Neben den posttranslationalen Modifikationen, wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Glykosylierung, Biotinylierung und ADP-Ribosylierung, stellt Ubiquitinierung eine weitere Möglichkeit dar, um Proteine zu regulieren. Dabei wird Ubiquitin über eine Isopeptidbindung zwischen seinem C-terminalen Glycin-Rest und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysin-Restes des zu modifizierenden Proteins angehängt (Finley et al., 1989; Haririnia et al., 2007).

Ubiquitin besitzt sieben Lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) (Abbildung 2.12). Alle sieben Lysin-Reste des Ubiquitins können zur Kettenbildung genutzt werden (Chastagner et al., 2006; Peng et al., 2003; Wu-Baer et al., 2003). Die unterschiedlichen Verknüpfungen bei den Ubiquitin-Modifikationen können unterschiedliche zelluläre Funktionen ausüben (Wang and Pickart, 2005). Es gibt Mono-, Multi- und Poly-Ubiquitinierung (Miller et al., 2004). Bei der Mono-Ubiquitinierung wird nur ein Ubiquitin-Molekül auf das Substrat transferiert. Ein bereits ubiquitiniertes Protein kann jedoch an weiteren Lysin-Resten mono-ubiquitiniert werden (Multi-Ubiquitinierung). Hingegen erfolgt bei der Poly-Ubiquitinierung eine kettenartige Verknüpfung vieler Ubiquitin-Moleküle an einem oder mehreren Lysin-Reste (Chau et al., 1989; Wilkinson et al., 1995). Bei den Ubiquitin-Ketten kommt es zur Verknüpfung einer  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins des einen Ubiquitins mit dem C-terminalen Glycin eines anderen Ubiquitin-Moleküls. Bei der Poly-Ubiquitinierung werden homeotypische, gemischte und heterologe Ketten unterschieden (Ikeda and Dikic, 2008). In homeotypischen Ubiquitin-Ketten werden die Lysine immer über das gleiche Lysin verbunden, während in gemischten Polymeren die Lysine unterschiedlich sind. Heterologe Ubiquitin-Ketten bestehen aus Verknüpfungen zwischen Ubiquitinen und Ubiquitin-ähnlichen Proteine. Alle diese Arten von Ubiquitinierung werden durch die Enzym-Kaskade des Ubiquitin-Konjugationssystems katalysiert.

### Mono-Ubiquitinierung

Die Mono-Ubiquitinierung hat eine modulatorische Funktion und ist an zahlreichen zellulären Prozessen, wie der Histonmodifikation, dem nukleären Export und der DNA-Reparatur beteiligt (Hicke, 2001; Katzmann et al., 2002; Shih et al., 2000). Bei der Mono-Ubiquitinierung handelt es sich um das minimal benötigte Signal zur Endocytose (Riezman et al., 1996). Durch Mono-Ubiquitinierung kann eine neue Bindungsstelle für die Interaktion des modifizierten Proteins mit Ubiquitin-Bindedomänen entstehen (Hicke et al., 2005).

### Multi-Ubiquitinierung

Ein Beispiel für Multi-Ubiquitinierung sind die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, bei denen diese Modifikation für die Sortierung und den Abbau der Rezeptoren wichtig ist (Haglund et al., 2003; Monami et al., 2008; Mosesson et al., 2003).

### Poly-Ubiquitinierung

Lysin-48-verknüpfte Ketten dienen als Degradationssignal für das 26S-Proteasom (Chau et al., 1989). Als Abbausignal müssen die Ubiquitin-Ketten mindestens vier Ubiquitin-Moleküle umfassen (Thrower et al., 2000). Bekannte Substrate des Proteasoms sind falsch gefaltete und fehlerhafte Proteine, Tumorsuppressoren, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren und insgesamt kurzlebige Proteine (Finley et al., 1994).

K63-verknüpfte Ketten werden nicht durch das Proteasom erkannt und stellen kein Degradationssignal dar. Die Modifikation durch K63-verzweigtes Ubiquitin steht im Zusammenhang mit Signaltransduktion (Wang et al., 2001), Translationskontrolle (Spence et al., 2000) und postreplikativer DNA-Reparatur (Spence et al., 2000). Außerdem spielt K63-Ubiquitinierung eine wichtige Rolle bei zellulären Stressantworten (Arnason and Ellison, 1994) und Endocytose bestimmter Plasmamembran-Proteine (Galan and Hagenauer-Tsapis, 1997). Da K63-verknüpfte Ubiquitinketten sich bezüglich ihrer Konformation von dem K48-verzweigten Ubiquitin unterscheiden (Varadan et al., 2004), könnten die unterschiedlichen Funktionen zum Teil durch strukturelle Varianz, erkannt durch unterschiedliche Interaktions-Domänen, begründet sein.

## 2.4.3 Ubiquitinierungssignale

Voraussetzung für die Ubiquitinierung eines Proteins ist das zugängliche Vorliegen eines Sequenz- oder Struktur-Motivs im Protein, an das die modifizierenden Enzyme spezifisch binden können (Laney and Hochstrasser, 1999; Pickart, 2001).

Spezifische Sequenzen können zum Abbau eines Proteins führen. So ist die *Destruction-Box* eine Abfolge weniger Aminosäuren, die bei mitotischen Zyklinen und Substraten des APC (*anaphase-promoting complex*)-Komplexes gefunden wurde (Deshaies, 1999; Glotzer et al., 1991; Page and Hieter, 1999). Hierbei beeinflussen sowohl die Aminosäuren der Primär-Sequenz (Glotzer et al., 1991; Yamano et al., 1998)

als auch die Konformation der Signalsequenz die Affinität zwischen Substrat und Enzym (Laney and Hochstrasser, 1999).

Bestimmte N-terminale Aminosäuren stellen ein Erkennungs-Signal für den Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg dar. Diese Abhängigkeit der Ubiquitinierung von der N-terminalen Aminosäure ist unter dem Begriff *N-end-rule*, und die N-terminalen Abbausignale als *N-Degrans*, bekannt. Die Aminosäuren Alanin, Glycin und Methionin stellen einen stabilisierenden N-Terminus dar, wogegen die Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin das Protein destabilisieren. Für die N-terminale Diversität der meisten Proteine ist die posttranslationale Entfernung des Methionins verantwortlich, dieser Prozess wird als NME (*N-terminal methionine excision*) bezeichnet (Brown and Smith, 1970). Der Abbau eines Proteins kann auch durch die Übertragung von Arginin durch eine Arginyl-tRNA induziert werden. Die Arginierung erfolgt bevorzugt an N-terminalen Glutaminsäure- und Asparaginsäure-Resten. Diese Termini wiederum können durch Desaminierung von terminalem Glutamin- bzw Asparagin-Resten erzeugt werden.

Andere Ubiquitinierungs-Signale bedürfen einer Veränderung der Konformation des Proteins, induziert z.B. durch Phosphorylierung, durch Bindung eines Adapter-Proteins oder die Veränderungen durch Fragmentierung, Oxidation oder Alterung (Hershko and Ciechanover, 1998; Laney and Hochstrasser, 1999; Strous and Govers, 1999).

Beispielsweise besitzen viele kurzlebige Proteine, wie die Cycline oder Transkriptionsfaktoren, die proteasomal abgebaut werden, eine PEST-Sequenz (Rogers et al., 1986). Dabei handelt es sich um hydrophile Abschnitte im Protein, in denen viele Prolin (P)-, Glutamat (E)-, Serin (S)- und Threonin (T)-Reste vorkommen. Erst die Phosphorylierung der PEST-Sequenz induziert die Ubiquitinierung und dadurch den Abbau des Proteins (Rechsteiner, 1990).

### **2.4.4 Komponenten des Ubiquitin-Konjugationssystems**

Die Konjugation von Ubiquitin erfolgt über eine dreistufige Enzym-Kaskade und setzt sich aus einem aktivierenden, einem konjugierenden und einem verknüpfenden Schritt zusammen (Abbildung 2.13). Für die initiale Reaktion der Ubiquitinierung, bei es zur Aktivierung des exponierten C-Terminus von Ubiquitin kommt, ist eines der zwei bekannten hochkonservierten E1-Enzyme zuständig (Hochstrasser, 1996). Dieses katalysiert unter ATP-Hydrolyse zunächst die Bildung eines Ubiquitinadenylats. Bei gleichzeitiger Freisetzung von AMP kommt es zur Übertragung des Ubiquitins auf die Thiol-Gruppe des konservierten Cystein-Restes im aktiven Zentrum des E1-Enzyms und

schließlich zur Ausbildung einer energiereichen Thioesterbindung zwischen dem Cystein und dem terminalen Glycin des Ubiquitins. Das so aktivierte Ubiquitin wird durch Transesterifizierung vom E1-Enzym auf ein E2-Enzym (*ubiquitin conjugating enzyme*, UBC) übertragen (Hershko, 1983). Das charakteristische Merkmal der E2-Enzyme ist die ubiquitinkonjugierende-Domäne (UBC-Domäne), in der sich das aktive Zentrum mit dem Akzeptor-Cystein befindet. Die E2-Enzyme bilden eine hochkonservierte Protein-Familie (Hochstrasser, 1996; Matuschewski et al., 1996), deren über 50 verschiedene Mitglieder an den spezifischen Funktionen der Ubiquitinierung beteiligt sind. Die E2-Enzyme übertragen das Ubiquitin direkt über eine Säureamid-Bindung auf das jeweilige Substrat oder mit der Hilfe einer Ubiquitin-E3-Ligase (E3-Enzym). Mit der Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem terminalen Glycin des Ubiquitins und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins im Substrat endet die Konjugation (Weissman, 2001).

Die E3-Ligasen sind die Substrat-Erkennungskomponenten des Ubiquitinsystems und vermitteln die Spezifität der Ubiquitinierung. Es werden zwei verschiedene Klassen von E3-Enzymen unterschieden, die HECT (*homologous to E6-associated protein C-terminus*)- und die RING-Finger-Ligasen (*really interesting new gene*) (Ardley and Robinson, 2005). Die E3-Ligasen mit HECT-Domäne besitzen eine Domäne mit einem konservierten Cystein-Rest (Huibregtse et al., 1995), der mit Ubiquitin einen Thioester bildet, bevor das Ubiquitin mit dem Akzeptor-Lysin im Substrat verknüpft wird. Die E3-Ligasen mit RING-Finger-Struktur bilden keinen Thioester mit Ubiquitin, sind jedoch für die Interaktion zwischen Substrat und E2-Ubiquitin-Intermediat essentiell (Deshaies, 1999; Lorick et al., 1999).

Das konjugierte Ubiquitin kann wiederum als Substrat der Ubiquitin-Konjugation fungieren, wodurch Poly-Ubiquitinketten gebildet werden können (Robinson and Ardley, 2004). An der Kettenbildung ist möglicherweise eine vierte Enzymgruppe beteiligt, die E4-Ubiquitinketten-Verlängerungsfaktoren (Hoppe, 2005; Koegl et al., 1999).

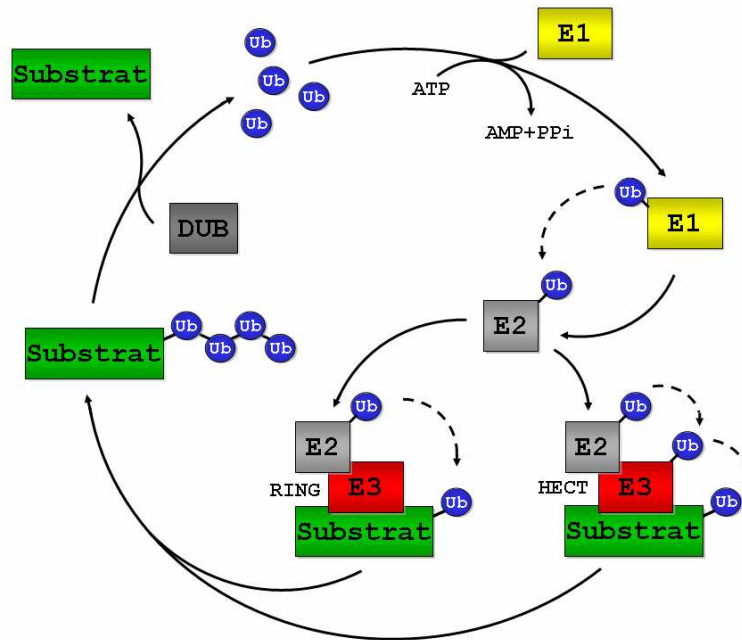


Abbildung 2.13: **Ubiquitin-Konjugationssystem**

Freies Ubiquitin (Ub) wird ATP-abhängig aktiviert und bildet mit dem E1-Enzym eine Thiolesterbindung aus. Von diesem Intermediat wird Ubiquitin unter Abspaltung von AMP an ein E2-Enzym gebunden. Durch ein E3-Enzym kommt es zur Ligation des Ubiquitins an das entsprechende Substrat. Es werden zwei Typen von E3-Ligasen unterschieden: bei den HECT-E3-Ligasen wird das Ubiquitin zunächst auf das Enzym selber übertragen bevor es an das Substrat gebunden wird, dagegen konjugieren die RING-E3-Ligasen Ubiquitin direkt vom E2-Enzym auf das Substrat. An bereits ubiquitinierten Substraten können Poly-Ubiquitinketten entstehen, die als Modifikation zum Abbau des Substrates gelten. Deubiquitinasen (DUB) führen zur Entfernung des Ubiquitins vom Substrat.

## 2.4.5 Deubiquitinierende Enzyme

Zur Gewährleistung der Funktionalität des Ubiquitinierungs-Systems ist die Entfernung von Ubiquitin durch Deubiquitinasen (DUB) essentiell. Zum einen regulieren DUBs das Ubiquitinsystem, indem sie für die Prozessierung von inaktiven Ubiquitin-Vorstufen zuständig sind, die Ubiquitin-Protein-Konjugate auf Richtigkeit überprüfen, das Ubiquitin von zellulären Addukten entfernen und das Proteasom von inhibierenden Ubiquitinketten frei halten (Amerik and Hochstrasser, 2004). Zum anderen sind die DUBs für das Ubiquitin-Recycling und die Prozessierung von Ubiquitinketten bedeutend, da sie diese verkürzen und von Target-Proteinen entfernen können (Wing, 2003). Basierend auf Sequenzhomologien und Wirkmechanismen werden die DUBs in mindestens vier Untergruppen unterteilt: Ubiquitin-spezifische Proteasen (UBP), Ubiquitin-Carboxyterminale Hydrolasen (UCH), Machado-Joseph-Disease-Proteasen (MJD) und Otubain-Proteasen (OTU).



## 2.4.6 Protein-Abbau durch das Proteasom

Der Abbau der Protein-Ubiquitinkonjugate erfolgt in einer ATP-abhängigen Reaktion in einem großen Protease-Komplex, dem 26S-Proteasom. Das Substratprotein wird darin zu Peptiden abgebaut, das Ubiquitin wird wieder freigesetzt und kann erneut für eine Proteinkonjugation verwendet werden (Abbildung 2.14).

Das 26S-Proteasom ist ein hochselektiver, im Cytoplasma und im Zellkern lokalisierter Proteinase-Komplex, der als eine biologisch aktive Einheit innerhalb der Zelle angesehen wird. Er besteht aus zwei komplexen Teilkomponenten. Ein regulatorischer 19S-Komplex sitzt an jedem Ende des zylindrischen, proteolytischen 20S-Kernkomplex. Der 20S-Kernkomplex des Proteasoms besteht selbst aus insgesamt 28 Untereinheiten, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten unterteilt werden (Heinemeyer et al., 1994). Je sieben  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheiten lagern sich zu einem Ring zusammen und bilden eine zylindrische Struktur aus vier Ringen. Die äußeren Ringe werden durch die  $\alpha$ -Untereinheiten gebildet und die inneren Ringe durch die  $\beta$ -Untereinheiten. Im Inneren des Zylinders befindet sich die proteolytische Kammer, in der die aktiven  $\beta$ -Untereinheiten Zugang zu ihrem Substrat bekommen. Die zwei äußeren  $\alpha$ -Ringe verschließen diese Kammer, welche durch eine reversible Konformationsänderung der  $\alpha$ -Untereinheiten wieder geöffnet werden kann (Groll et al., 1997). Nur drei der  $\beta$ -Untereinheiten können Peptidbindungen spalten. Die katalytische Aktivität erhalten sie, im Gegensatz zu anderen Proteasen, durch ein N-terminales Threonin, dessen Aminogruppe für die Peptidase Aktivität als Nukleophil dient (Groll et al., 1997). Die drei aktiven  $\beta$ -Untereinheiten weisen unterschiedliche katalytische Aktivität auf (Rivett, 1989). So werden Substrate von  $\beta 2$  (Z) nach basischen Aminosäuren (Trypsin-ähnliche Aktivität), von  $\beta 5$  (X) nach hydrophoben Aminosäuren (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität) und von  $\beta 1$  ( $\delta$ ) nach sauren Aminosäuren (*Postacidic* Aktivität) gespalten. Da jede Untereinheit doppelt repräsentiert ist, befinden sich sechs aktive  $\beta$ -Untereinheiten im Proteasom.

Das 20S-Proteasom selbst ist nicht in der Lage, Proteine zu entfalten und sie dann abzubauen (Nandi et al., 1997; Zwickl et al., 1999). Dazu sind regulatorische Komplexe notwendig, die sich an den jeweiligen Öffnungen an den Enden des Zylinders befinden. Es wurden bisher drei unterschiedliche regulatorische Komplexe entdeckt: Der bereits erwähnte 19S-Regulator (PA700), der 11S-Regulator (PA28), der bei der Immunantwort eine Rolle spielt, und PI31, der das Proteasom inhibiert (Tanahashi et al., 1999; Zaiss et al., 1999).

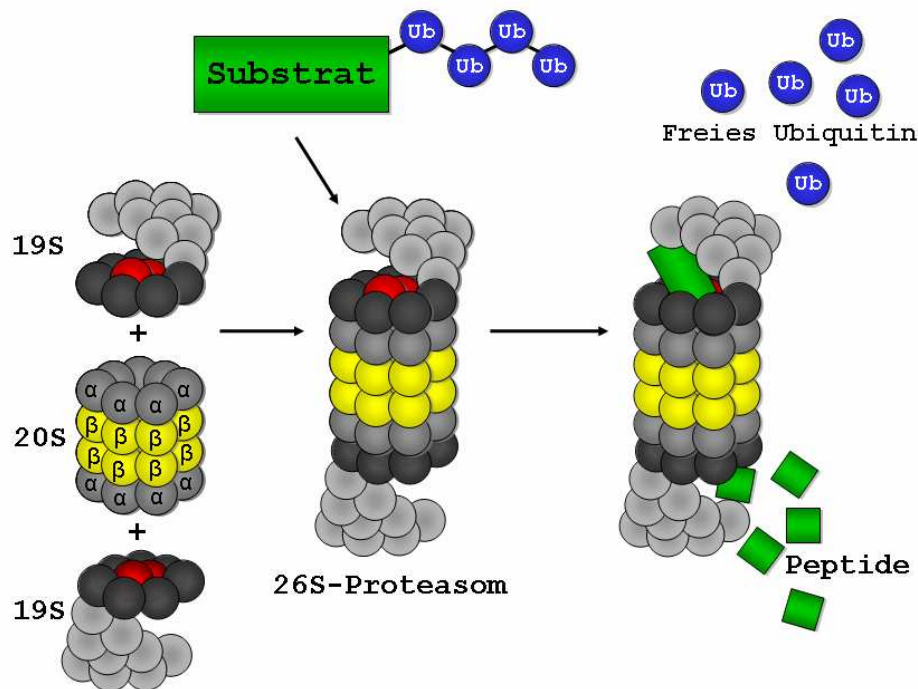


Abbildung 2.14: **Abbau von poly-ubiquitinierten Proteinen durch das 26S-Proteasom**

Das 20S-Proteasom setzt sich aus 28 Untereinheiten zusammen. Die beiden äußeren Ringe werden von jeweils 7  $\alpha$ -Untereinheiten gebildet (grau). Die beiden inneren Ringe aus jeweils 7  $\beta$ -Untereinheiten beherbergen das katalytische Zentrum (gelb). Der 19S-Regulator-Komplex besteht aus 2 Sub-Komplexen: dem Basis-Komplex, der 6 TripleA-ATPasen (dunkel-grau) und 2 Nicht-ATPasen (rot) enthält, und dem Deckelkomplex, der aus 10 Nicht-ATPasen besteht, die poly-ubiquitinierte Substrate erkennen. Das 20S-Proteasom mit zwei gebundenen 19S-Regulator-Komplexen bildet das 26S-Proteasom, durch das poly-ubiquitinierte Substrate erkannt und proteolytisch abgebaut werden. (Abbildung modifiziert nach (Marteijn et al., 2006))

Der 19S-Regulator-Komplex (PA700) besteht aus zwei Sub-Komplexen, dem Basis-Komplex und dem Deckelkomplex (Glickman et al., 1998). Der Deckelkomplex, der aus bis zu zehn Nicht-ATPase-Untereinheiten besteht, erkennt die zu spaltenden Proteine durch deren Poly-Ubiquitinierung und entfernt die Ubiquitin-Ketten vom Substratprotein durch seine Isopeptidase-Aktivität. Durch die TripleA-ATPase-Aktivität ist der Basis-Komplex in der Lage die abzubauenen Proteine zu entfalten (*reverse chaperone* Aktivität) und zu den  $\alpha$ -Ring passieren zu lassen (Deveraux et al., 1994; Dubiel et al., 1992; Ferrell et al., 2000). Danach gelangen die so entstandenen linearen Aminosäureketten in das Innere des Proteasoms und werden an den aktiven Zentren der  $\beta$ -Untereinheiten geschnitten und so in Peptide zerlegt. Die entstehenden Oligopeptide können in der Folge durch cytosolische Exopeptidasen weiter abgebaut werden.

## 2.5 Zielsetzung

Die Transkriptionsfaktoren des MYC/MAX/MAD-Netzwerkes regulieren viele Aspekte des Zellverhaltens, wie die Proliferation, die Transformation, die Differenzierung und die Apoptose, indem sie auf molekularer Ebene Zielgene aktivieren oder reprimieren. MAD1 wirkt als Antagonist von c-MYC, indem es die MYC-abhängige Transformation in Zellen blockiert. Des Weiteren hemmt MAD1 unter bestimmten Umständen die Zell-Proliferation und inhibiert die Apoptose. Für den anti-apoptotischen Effekt sind die Repression des Tumorsuppressorgens *PTEN* und die dadurch resultierende Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges essentiell. Es handelt sich bei MAD1 somit um einen potentiellen Tumorsuppressor, dessen eingehende Analyse als Gegenspieler zu dem Proto-Onkoprotein c-MYC von wesentlicher Bedeutung ist.

MAD1 ist ein kurzlebiges Protein, bei dem, ähnlich wie bei anderen stringent kontrollierten Transkriptionsfaktoren, nicht nur die Expression einer strengen Regulation unterliegt, sondern auch die posttranslationalen Modifizierungen und der Abbau des Proteins wirksam kontrolliert werden.

Als Ziel dieser Arbeit sollte die Regulation des Transkriptionsfaktors MAD1 selbst untersucht werden. Dabei sollten zunächst die Bedingungen für den Abbau des Proteins in apoptotischen Zellen analysiert, und zusätzlich die Beteiligung typischer apoptotischer Proteasen und des Ubiquitin-Proteasomen-Systems geklärt werden um dadurch Aufschluss über den Abbaumechanismus des MAD1-Proteins während der Apoptose zu erhalten.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Inhibition der Apoptose durch den Transkriptionsfaktor MAD1

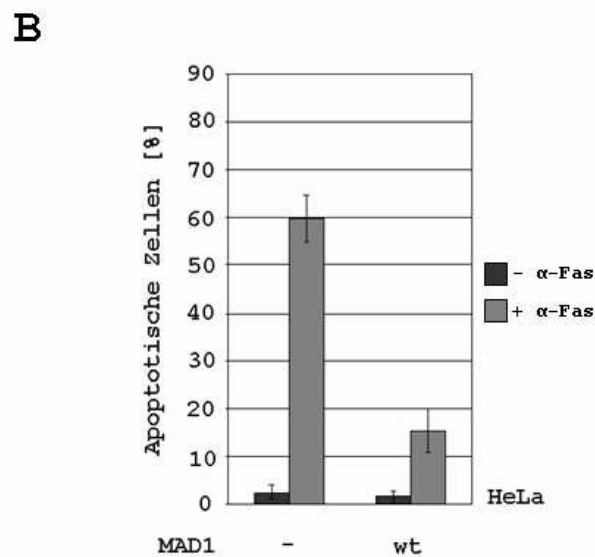
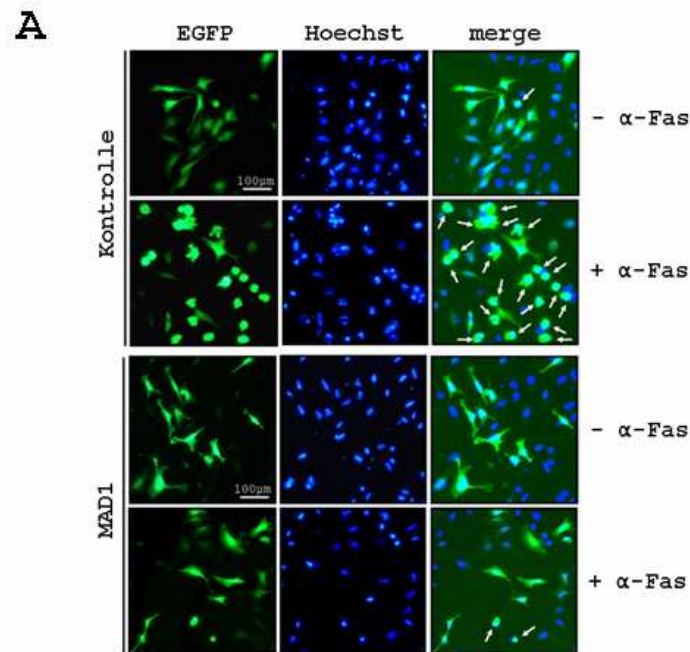
Das Proto-Onkoprotein c-MYC hat pro-apoptotische Aktivität. MAD1 besitzt demgegenüber antagonistische Funktion und kann Zellen vor unterschiedlichen Apoptose-induzierenden Signalen schützen, wie der Stimulation von Todesrezeptoren, der DNA-Schädigung, der Expression von Onkoproteinen oder der Abwesenheit von Überlebensfaktoren (Bejarano et al., 2000; Gehring et al., 2000; Queva et al., 1999). In vorangegangenen Arbeiten konnte das Tumorsuppressorgen *PTEN* als Zielgen für MAD1 identifiziert werden. Es wurde nachgewiesen, dass die Repression des *PTEN*-Gens und die dadurch resultierende Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges für die MAD1-abhängige Repression der Apoptose essentiell ist (Rottmann et al., 2008). In dieser Arbeit sollte die Inhibition verschiedener apoptotischer Merkmale durch MAD1 geklärt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob dieser wichtige transkriptionelle Faktor selbst während der Apoptose reguliert wird.

#### 3.1.1 MAD1 verhindert Ausbildung von *apoptotic bodies*

Als ein frühes Merkmal der Apoptose kann man eine Verringerung des Zellvolumens beobachten. Im Gegensatz zur Nekrose bleiben die Organellen intakt und der Stoffwechsel läuft normal weiter. Das Chromatin verdichtet sich und der Zellkern schrumpft. Man kann *membrane blebbing*, die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen, an der Cytoplasmamembran beobachten. Schließlich kommt es zur Abschnürung membranumschlossener Vesikel, der so genannten apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*). *In vivo* würden diese von phagozytierenden Zellen aufgenommen, wodurch eine lokale Entzündungsreaktion verhindert wird.

Bei Zellen kann man die morphologische Veränderung mikroskopisch beobachten. Diese Veränderung sollte genutzt werden, um die Reduktion der Apoptose durch MAD1 in mit  $\alpha$ -Fas behandelten HeLa-Zellen (Gehring et al., 2000; Rottmann et al., 2008) weiter zu verifizieren. Die Transfektion von HeLa-Zellen mit pCR3-Fas führte zu der Ausbildung des Fas-Rezeptors auf der Zelloberfläche, wodurch die Zellen für die extrazelluläre Apoptose empfänglich wurden. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Expressionsvektor für MAD1 oder mit dem Klonierungsvektor pBluescriptIIKS+ als Kontrolle transfiziert. Durch Zugabe des  $\alpha$ -Fas-Antikörpers (CH11) wurde Apoptose für 4 Stunden induziert. Nach dem Fixieren erfolgte die Anfärbung der DNA aller Zellen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33258. Die transfizierten Zellen konnten durch cotransfiziertes pEGFP-C3 nach Anregung mit UV Licht am Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden. Hierbei lag die Annahme zugrunde, dass jede Zelle, die EGFP exprimiert, auch MAD1 überexprimiert. Die apoptotischen Zellen konnten aufgrund der durch das *membrane blebbing* veränderten Morphologie eindeutig erkannt werden. Zusätzlich zeigten die apoptotischen Zellen mit verdichtetem Chromatin durch die Kondensierung stärker blau fluoreszierende Kerne.

Die Behandlung mit  $\alpha$ -Fas löst in den mit pCR3-Fas transfizierten Zellen Apoptose aus (Abbildung 3.1). Das für die Apoptose typische Auftreten von *membrane blebbing* trat bei 60% der EGFP exprimierenden Kontroll-Zellen auf (Abbildung 3.1). Bei diesen Zellen konnte durch die Hoechst-Färbung zusätzlich eine verstärkte Kondensierung des Chromatins nachgewiesen werden. Anhand des durchgeführten Experiments wurde bestätigt, dass cotransfiziertes MAD1 eine Reduktion des durch  $\alpha$ -Fas induzierten Zelltods bewirkte. Es kam zu einem geringeren Auftreten von *apoptotic bodies* und Chromatinkondensation. MAD1 konnte die Apoptoserate auf 15% reduzieren, was den anti-apoptotischen Effekt des c-MYC-Antagonisten bestätigte.



**Abbildung 3.1: MAD1 inhibiert die Apoptose**

HeLa-Zellen wurden durch ExGen500 mit pCR3-Fas und pCMV-MAD1 transient transfiziert. Mit dem antagonistischen Fas-Antikörper (CH11) wurde die Apoptose ausgelöst und nach 4 h die Reaktion, durch fixieren der Zellen, gestoppt. Die DNA wurde mit dem Farbstoff Hoechst 33258 angefärbt. Transfizierte Zellen konnten durch cotransfiziertes pEGFP-C3 identifiziert werden. Es wurde eine statistisch relevante Anzahl von jeweils 250 Zellen gezählt und der Anteil der apoptotischen Zellen anhand ihres charakteristischen Aussehens bestimmt.

**A.** Repräsentative Aufnahmen der GFP- und Hoechst-Färbung sowie die Überlagerung beider Färbungen (merge) bei einer 200x Vergrößerung.

**B.** Quantifizierung des Assays

Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.1.2 MAD1 inhibiert DNA-Fragmentierung

Das wichtigste morphologische Merkmal der Apoptose ist die Kondensierung und Anlagerung des Chromatins an der Kernperipherie (Wyllie, 1992). Das bedeutendste biochemische Kennzeichen für den programmierten Zelltod ist das Auftreten von oligonukleosomalen DNA-Fragmenten im Agarose-Gel. Bis jetzt wurde der anti-apoptotische Effekt von MAD1 durch eine Reduktion des *membrane blebbing* gezeigt. Zusätzlich wurde die verstärkte Kondensierung der DNA durch die Färbung mit Hoechst sichtbar gemacht und als apoptotisches Merkmal mit analysiert.

Als weitere Charakteristik sollte die endonukleolytische Spaltung der DNA, die während des apoptotischen Zelltodes auftritt, untersucht werden. Hierzu wurden mit MAD1 transient transfizierte HeLa-Zellen für 6 Stunden mit 50 ng/ml des antagonistischen Antikörpers  $\alpha$ -Fas (CH11) inkubiert. Es folgte die Lyse der Zellen und Präzipitation der DNA. Die Auftrennung der gewonnenen DNA wurde mit einer Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die für die Apoptose typische DNA-Fragmentierung konnte in den Kontroll-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.2). Es traten Fragmente kleiner als 500 bp auf. In den Zellen, die mit MAD1 transfiziert wurden, war eine deutlich schwächere Fragmentierung der DNA zu sehen als in den Zellen, die nicht mit MAD1 transfiziert wurden.

Der anti-apoptotische Effekt des c-MYC-Antagonisten, MAD1, konnte somit auch auf biochemischer Ebene nachgewiesen werden.

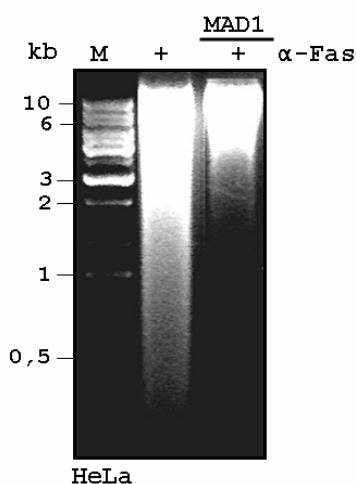


Abbildung 3.2: **MAD1 inhibiert DNA-Fragmentierung**

HeLa-Zellen wurden durch ExGen500 mit pCR3-Fas und pCMV-MAD1 transient transfiziert. Durch den antagonistischen Antikörper  $\alpha$ -Fas (CH11) wurde die Rezeptor-vermittelte Apoptose für 6 h aktiviert. Mit Hilfe des Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit (BioVision) wurde die DNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Zur weiteren Analyse der DNA wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese mit einem 1,2%igem Agarose-Gel bei 5V/cm<sup>2</sup> durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

### 3.1.3 MAD1 verringert Aktivierung von Caspasen und Spaltung von PARP1

Ein weiteres wichtiges Merkmal der Apoptose ist die Aktivierung von Cystein-Proteasen, gefolgt von der proteolytischen Spaltung ihrer Substrate. Die 113 kDa Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP1), die unter anderem an der DNA-Reparatur und der DNA-Stabilität beteiligt ist, wird von Mitgliedern der Caspase-Familie geschnitten. Das Auftreten der beiden 89 und 24 kDa Fragmente des DNA-bindenden Proteins wird als ein frühes Zeichen der Apoptose angesehen.

Im Rahmen der Analysen des anti-apoptotischen Effektes von MAD1 sollte auch das PARP1-*cleavage* als weiteres Apoptose-Merkmal betrachtet werden. Es wurden exponentiell wachsende HeLa-Zellen transient transfiziert. Die Expression des Fas-Rezeptors sensibilisierte die Zellen für die durch den antagonistischen Antikörper  $\alpha$ -Fas (CH11) ausgelöste Apoptose. Die Zell-Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und das PARP1-*cleavage* mit einem spezifischen Antikörper, der sowohl das ungeschnittene 113 kDa große PARP1 als auch das große Fragment von 89 kDa des geschnittenen PARP1 erkennt, im Western-Blot nachgewiesen.

Bei der Kontrolle kam es durch die Behandlung mit dem antagonistischen Antikörper zu einem deutlichen Anstieg des 89 kDa Fragments von PARP1 sowie einer Reduktion des ungeschnittenen 113 kDa Proteins (Abbildung 3.3). In den mit MAD1 transfizierten Zellen war deutlich weniger des Spaltproduktes zu erkennen, was auf eine Reduktion der Apoptose hinwies und folglich den anti-apoptotischen Effekt des Transkriptionsfaktors bestätigte. Neben der Spaltung des Substrates wurde auch die Aktivierung der relevanten Protease betrachtet. Procaspase-3, das inaktive Vorläuferprotein der Effektor-Caspase, wurde mit dem polyklonalen Antikörper  $\alpha$ -Caspase-3 (H-277) detektiert. In den Kontroll-Zellen kam es zu einer Abnahme der Proteinmenge von Procaspase-3, woraus die während des induzierten Zelltodes eingeleitete Spaltung zur aktiven Form geschlossen werden konnte. Diese Prozessierung war in Gegenwart von MAD1 deutlich reduziert. Folglich verhinderte der anti-apoptotische Effekt von MAD1 die Spaltung und dadurch die Aktivierung von Procaspase-3 zu Caspase-3. Weiterhin war eine Reduktion von MAD1 durch Induktion der Apoptose auffallend (Abbildung 3.3). Da die Zellen zunächst transfiziert, dann aufgeteilt und mit oder ohne  $\alpha$ -Fas (CH11) behandelt wurden, sind unterschiedliche Effizienzen bei der Transfektion auszuschließen. Die Detektion von Aktin, als Standard, bezeugt zudem, dass gleiche Proteinmengen verwendet wurden.



Schlussfolgernd kam es durch den Transkriptionsfaktor MAD1 zur Inhibition der Apoptose, was durch die reduzierte Aktivierung von Caspase-3 und das verringerte PARP1-*cleavage* gezeigt werden konnte. Zusätzlich führte die Induktion des programmierten Zelltods zu einer Abnahme der MAD1-Proteinmenge.

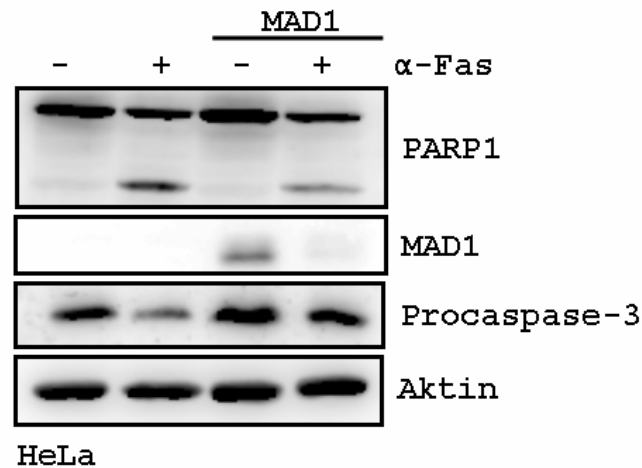


Abbildung 3.3: **Die Spaltung von PARP1 wird durch MAD1 reduziert**

HeLa-Zellen wurden durch das Transfektionsreagenz ExGen500 mit pCR3-Fas und pCMV-MAD1 transient transfiziert. Durch cotransfiziertes pEGFP-C3 konnte eine Transfektions-Effizienz von über 50% festgestellt werden. Der Fas-Antikörper (CH11) wurde verwendet, um die Apoptose für 4 h auszulösen. Von den in F-Puffer lysierten Zellen wurden, nach Bradford-Assay, gleiche Proteinkonzentrationen für die SDS-PAGE verwendet. Die Proteine im Western-Blot wurden mit den Antikörpern α-PARP1, α-MAD1 (C19), α-Caspase-3 (H-277) und α-Aktin (C4) detektiert.

Diese Ergebnisse konnten in mehreren (>3) unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

### 3.1.4 MAD1-Domänen sind für die Inhibition der Apoptose relevant

Es wurde bereits publiziert, dass der Transkriptionsfaktor MAD1 seine anti-apoptotische Wirkung unter anderem durch die Repression des Tumorsuppressorgens *PTEN* und die daraus resultierende Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges erhält (Rottmann et al., 2008). Durch welche Domänen des Transkriptionsfaktors MAD1 der anti-apoptotische Effekt vermittelt wird, wurde bisher noch nicht in die Analysen mit einbezogen. Die Untersuchung sollte daher zum Nachweis der Bedeutung der einzelnen MAD1-Domänen in der Repression der Apoptose ausgeweitet werden. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Deletionsmutanten von MAD1 verwendet (Abbildung 3.4).

**A**

MAD1 wt	1	MAAAVRMNIQ	MLLEAADYLE	RREREAEHGY	ASMLPYNNKD	RDALKRRNKS
MAD1 ΔN	1	MAAAVRMNIQ	MLLEAADYLE	RREREAEHGY	ASMLPYNNKD	RDALKRRNKS
MAD1 ΔC	1	MAAAVRMNIQ	MLLEAADYLE	RREREAEHGY	ASMLPYNNKD	RDALKRRNKS
MAD1 ΔNC	1	MAAAVRMNIQ	MLLEAADYLE	RREREAEHGY	ASMLPYNNKD	RDALKRRNKS
MAD1 ΔBR	1	MAAAVRMNIQ	MLLEAADYLE	RREREAEHGY	ASMLPYNNKD	RDALKRRNKS
MAD1 ΔLZ	1	MAAAVRMNIQ	MLLEAADYLE	RREREAEHGY	ASMLPYNNKD	RDALKRRNKS
MAD1 wt	51	KQNNSSSRST	HNEMEKNRRA	HLRLCLEKLK	GLVPLGPSS	RHTTSLLTk
MAD1 ΔN	51	KQNNSSSRST	HNEMEKNRRA	HLRLCLEKLK	GLVPLGPSS	RHTTSLLTk
MAD1 ΔC	51	KQNNSSSRST	HNEMEKNRRA	HLRLCLEKLK	GLVPLGPSS	RHTTSLLTk
MAD1 ΔNC	51	KQNNSSSRST	HNEMEKNRRA	HLRLCLEKLK	GLVPLGPSS	RHTTSLLTk
MAD1 ΔBR	51	KQNNSSSRST	HNEMEKNRRA	HLRLCLEKLK	GLVPLGPSS	RHTTSLLTk
MAD1 ΔLZ	51	KQNNSSSRST	HNEMEKNRRA	HLRLCLEKLK	GLVPLGPSS	RHTTSLLTk
MAD1 wt	101	AKLHIKKLED	CDRKAVHQID	QLQREQRHLK	RQLEKLGIER	IRMDSIGSTV
MAD1 ΔN	101	AKLHIKKLED	CDRKAVHQID	QLQREQRHLK	RQLEKLGIER	IRMDSIGSTV
MAD1 ΔC	101	AKLHIKKLED	CDRKAVHQID	QLQREQRHLK	RQLEKLGIER	IRMDSIGSTV
MAD1 ΔNC	101	AKLHIKKLED	CDRKAVHQID	QLQREQRHLK	RQLEKLGIER	IRMDSIGSTV
MAD1 ΔBR	101	AKLHIKKLED	CDRKAVHQID	QLQREQRHLK	RQLEKLGIER	IRMDSIGSTV
MAD1 ΔLZ	101	AKLHIKKLED	CDRKAVHQID	QLQREQRHLK	RQLEKLGIER	IRMDSIGSTV
MAD1 wt	151	SSERSDSRE	EIDVDVESTD	YLTGDLWSS	SSVSDSDEG	SMQSLGSDEG
MAD1 ΔN	151	SSERSDSRE	EIDVDVESTD	YLTGDLWSS	SSVSDSDEG	SMQSLGSDEG
MAD1 ΔC	151	SSERSDSRE	EIDVDVESTD	YLTGDLWSS	SSVSDSDEG	SMQSLGSDEG
MAD1 ΔNC	151	SSERSDSRE	EIDVDVESTD	YLTGDLWSS	SSVSDSDEG	SMQSLGSDEG
MAD1 ΔBR	151	SSERSDSRE	EIDVDVESTD	YLTGDLWSS	SSVSDSDEG	SMQSLGSDEG
MAD1 ΔLZ	151	SSERSDSRE	EIDVDVESTD	YLTGDLWSS	SSVSDSDEG	SMQSLGSDEG
MAD1 wt	201	YSSTSIIKRIK	LQDSHKACLG L			
MAD1 ΔN	201	YSSTSIIKRIK	LQDSHKACLG L			
MAD1 ΔC	201	YSSTSIIKRIK	LQDSHKACLG L			
MAD1 ΔNC	201	YSSTSIIKRIK	LQDSHKACLG L			
MAD1 ΔBR	201	YSSTSIIKRIK	LQDSHKACLG L			
MAD1 ΔLZ	201	YSSTSIIKRIK	LQDSHKACLG L			

**B**

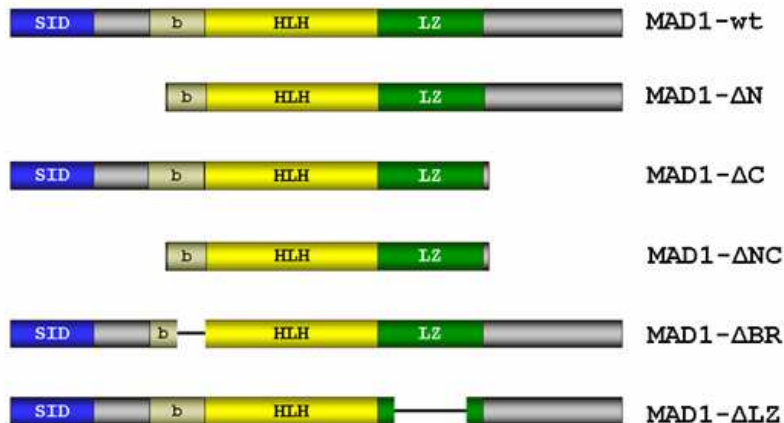


Abbildung 3.4: **Sequenz und schematischen Darstellung von MAD1 und den verwendeten Deletionsmutanten**

**A:** Aminosäure-Sequenz von MAD1-wt und den verwendeten Deletionsmutanten. Die jeweils fehlenden Aminosäuren sind in grau wiedergegeben.

**B:** Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von MAD1-wt und den verwendeten Deletionsmutanten

SID: mSIN3-Interacting Domäne (blau), b: basische Region (grau-gelb), HLH: *Helix-Loop-Helix* (gelb), LZ: *Leucin-Zipper* (grün).

Bei der MAD1 $\Delta$ N-Mutante fehlen die ersten 56 Aminosäuren des N-Terminus, was unter anderem den Verlust der mSIN3-Interaktions-Domäne (SID) bedeutet. Diese Mutante kann nicht an den mSIN3-Repressor-Komplex binden und verliert somit ihre Fähigkeit, reprimierend auf die Transkription der Zielgene zu wirken. Der MAD1 $\Delta$ C-Mutante fehlen die letzten 67 Aminosäuren des C-Terminus. Die MAD1 $\Delta$ NC-Mutante weist weder den N- noch C-terminalen Bereich auf. Bei der MAD1 $\Delta$ BR-Mutante wurden 10 Aminosäuren aus der für die DNA-Bindung relevanten Region entfernt, wodurch die Mutante die Fähigkeit verliert an die Konsensus-Sequenz auf der DNA zu binden. Der MAD1 $\Delta$ LZ-Mutante fehlen 26 Aminosäuren aus dem Leucin-*Zipper* und dadurch die Möglichkeit, an den Heterodimerisierungs-Partner MAX zu binden.

Für die Analyse der unterschiedlichen Regionen von MAD1 und ihrer Funktionen bei der Hemmung des induzierten Zelltods wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und durch ExGen500 transient transfiziert. Zur Sensibilisierung der Zellen für die Rezeptor-vermittelte Apoptose wurden sie mit einem Expressions-Plasmid für den Fas-Rezeptor transfiziert. Zusätzlich wurden sie mit Expressions-Vektoren für MAD1 oder Deletionsmutanten des Transkriptionsfaktors cotransfiziert. Durch die Zugabe des Fas-Antikörpers (CH11) für 4 Stunden wurde die Apoptose induziert. Die DNA aller Zellen wurde nach dem Fixieren mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst 33258 angefärbt. Am Fluoreszenzmikroskop konnten die mit pEGFP-C3 cotransfizierten Zellen durch die Anregung mit UV-Licht identifiziert werden. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden charakteristische Merkmale der Apoptose, wie die Kondensierung des Chromatins und die Abspaltung von apoptotischen *Bodies* analysiert. Zusätzlich wurde die Expression der MAD1-Mutanten im Wesern-Blot überprüft (Daten nicht gezeigt).

In der Quantifizierung wurde deutlich, dass nur Wildtyp MAD1 in der Lage war, die Fas-induzierte Apoptose zu reprimieren, nicht jedoch die Deletionsmutanten. Durch den Wildtyp konnte die Apoptoserate der Kontrolle von 75% auf 25% deutlich reduziert werden (Abbildung 3.5). Keine der MAD1-Mutanten bewirkte eine statistisch relevante Veränderung der Apoptoserate.

Dies führte zu dem Schluss, dass neben der Bindung an die DNA auch die Bindungen an MAX und den mSIN3-Repressor-Komplex notwendig sind. Für die Hemmung der Apoptose konnte auch nicht auf den C-terminalen Bereich, der noch nicht weiter identifizierte regulatorische Elemente für die DNA-Bindung enthält, verzichtet werden.

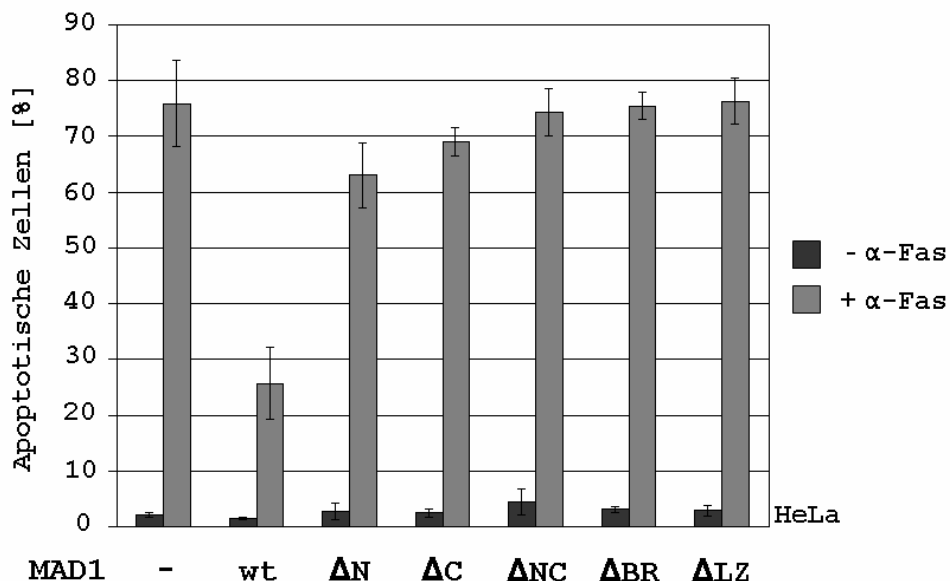


Abbildung 3.5: **MAD1 benötigt sämtliche Domänen für die Repression der Apoptose**

HeLa-Zellen wurden durch ExGen500 mit pCR3-Fas und pCMV-MAD1 oder der jeweiligen Deletionsmutante transient transfiziert. Die Behandlung mit dem antagonistischen Fas-Antikörper (CH11) löste die Apoptose aus. Nach 4 h wurde die Reaktion abgestoppt und die Zellen fixiert. Die DNA wurde mit dem Farbstoff Hoechst 33258 angefärbt. Am Fluoreszenzmikroskop konnten die transfizierten Zellen durch cotransfiziertes pEGFP-C3 identifiziert werden. Es wurde eine statistisch relevante Anzahl von jeweils 250 Zellen gezählt und der Anteil der apoptotischen Zellen, durch deren charakteristisches Aussehen, bestimmt. Quantifizierung des Assays: gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend konnten die Experimente den anti-apoptischen Effekt des Transkriptionsfaktors MAD1 bestätigen, dies sowohl durch Inhibition früher apoptotischer Merkmale, wie der Caspase-Aktivierung und der proteolytischen Spaltung von PARP1 als auch durch Repression später Merkmale der Apoptose, wie des *membrane blebbing*, der Chromatinkondensation und der endonukleolytischen Spaltung der DNA. Zudem wurde eine Abnahme der MAD1 Proteinmenge festgestellt, die im Folgenden weiter untersucht werden sollte.

## 3.2 MAD1 wird während der Apoptose verstärkt degradiert

Im Laufe der Untersuchungen zu den anti-apoptotischen Auswirkungen des Transkriptionsfaktors MAD1 wurde eine Reduktion der Proteinmenge von MAD1 festgestellt. Eine umfangreiche Analyse der Apoptose-Signalwege sollte Aufschluss über den chronologischen Ablauf und die dazu führenden Bedingungen bringen.

### 3.2.1 MAD1-Reduktion in der Fas-vermittelten Apoptose

Durch die Behandlung von Zellen mit dem antagonistischen Fas-Antikörper wird die Apoptose durch den extrinsischen Signalweg eingeleitet. Es kommt zur *Trimerisierung* des Fas-Rezeptors und zur Aktivierung der Initiator-Caspase, Caspase-8, welche ihren Aktivierungsschritt vor den Effektor-Caspasen, Caspase-3 und -7, aufweist, die im Laufe der Kaskade prozessiert werden. Dies führt schließlich zum PARP1-*cleavage* und der Fragmentierung der DNA.

In vorherigen Experimenten konnte eine starke Reduktion von MAD1 bereits nach vierstündiger Behandlung mit  $\alpha$ -Fas beobachtet werden (Abbildung 3.3). Zum weiteren Eingrenzen des chronologischen Ablaufs wurden mit MAD1 transient transfizierte HeLa-Zellen für unterschiedlich lange mit dem Fas-Antikörper behandelt. Die gewonnenen Lysate wurden im Westen-Blot mit Antikörpern gegen den C-terminalen Bereich von MAD1 und gegen PARP1 analysiert. Das 89 kDa Fragment von PARP1, welches erst durch das Schneiden des Proteins während der Apoptose auftritt, konnte bereits eine Stunde nach Apoptose-Induktion in den Kontroll-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.6). In den mit MAD1 transfizierten Zellen war die Detektion des charakteristischen Fragments erst später und auch sehr viel schwächer möglich, wodurch die Inhibition der Apoptose durch MAD1 verifiziert werden konnte. Eine Reduktion des Transkriptionsfaktors, MAD1, selbst trat bereits nach zwei Stunden ein. Diese Erkenntnis führt zu dem Schluss, dass es sich bei der Degradation von MAD1 um ein frühes Ereignis in der Apoptose handelt.

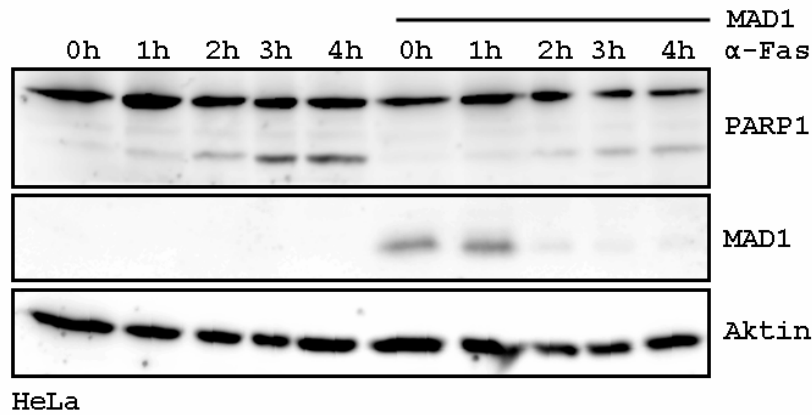


Abbildung 3.6: **Reduktion der MAD1 Proteinmenge während der Apoptose**

HeLa-Zellen wurden mit pCR3-Fas und pCMV-MAD1 transfiziert. Der antagonistische Fas-Antikörper (CH11) wurde verwendet, um die Apoptose für die jeweils angegebene Zeit auszulösen. Gleiche Proteinmengen wurden für die SDS-PAGE verwendet und der Western-Blot mit den Antikörpern  $\alpha$ -PARP1,  $\alpha$ -MAD1 (C19) und  $\alpha$ -Aktin (C4) detektiert. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

### 3.2.2 MAD1-Transkription in apoptotischen Zellen

Bei der Reduktion von MAD1 in apoptotischen Zellen kann es sich um eine verringerte Stabilität des Proteins, um den Abbau durch in der Apoptose aktivierte Proteasen oder um das Beeinflussen der Expression auf Transkriptions- oder Translations-Ebene handeln. Die im Cytosol für die Translation verfügbare Menge an reifer mRNA entscheidet in hohem Maße darüber, wie viel Protein über eine Neusynthese gebildet werden kann.

Durch eine quantitative *Real-time*-PCR wurde überprüft, ob die Expression von MAD1 durch die Aktivierung des extrinsischen Signalweges reprimiert wird. Es wurden HeLa-Zellen mit oder ohne MAD1 transient transfiziert, aufgeteilt und ein Ansatz für 4 Stunden mit dem monoklonalen Fas-Antikörper behandelt. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Die Bestimmung der Expression erfolgte durch Verwendung von Primern gegen *MAD1*. Die gemessenen Werte wurden durch die von konstitutiv exprimiertem  $\beta$ -Gus (*beta-glucuronidase*) standardisiert. Die standardisierte Expression in den mit MAD1 transfizierten, jedoch nicht Apoptose-induzierten Zellen, wurde auf 100% gesetzt.

Durch die Transfektion konnte die Expression von *MAD1* um das 5 fache gesteigert werden (Abbildung 3.7). In den Zellen, die zusätzlich noch mit  $\alpha$ -Fas behandelt wurden,

konnte kein signifikanter Unterschied zu den nicht Apoptose-induzierten Zellen gemessen werden.

Das Ergebnis zeigt eindeutig, dass die Expression von *MAD1* durch die Induktion der Apoptose nicht beeinflusst wurde. Demnach muss der Verringerung der *MAD1*-Proteinmenge in apoptotischen Zellen ein anderer Mechanismus zugrunde liegen.

In weiteren Experimenten sollten die Bedingungen, unter denen es zur Reduktion des Transkriptionsfaktors kommt, näher untersucht werden. Die Verwendung eines anderen Stimulus und anderer Zell-Linien sollte darüber Aufschluss geben, welche apoptotische Konstellation zu einer Abnahme von *MAD1* führt.

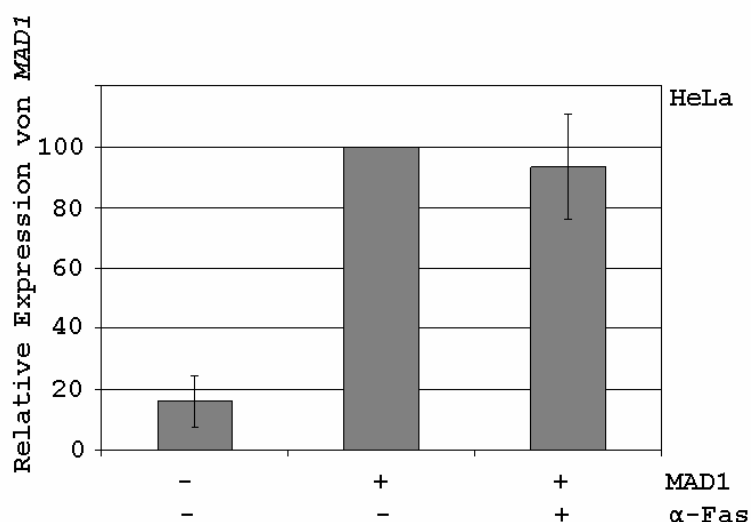


Abbildung 3.7: **Die Apoptose hat keinen Effekt auf die Expression von *MAD1***

HeLa-Zellen wurden mittels ExGen500 mit pCMV-*MAD1* und pCR3-Fas transient transfiziert. Die Apoptose wurde durch eine 4-stündige Behandlung mit dem antagonistischen Fas-Antikörper (CH11) ausgelöst. Der mRNA Isolation folgte die cDNA Synthese und im Roche Lightcycler wurde die Expression der *MAD1*-mRNA, standardisiert über das *housekeeping*-Gen  $\beta$ -Gus, ermittelt.

Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten, bei denen die Expression von *MAD1* in nicht Apoptose-induzierten Zellen gleich 100% gesetzt wurde.

### 3.2.3 MAD1-Reduktion in der Staurosporin-vermittelten Apoptose

Der intrinsische oder mitochondriale Apoptose-Signalweg kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Signale, wie die Schädigung der DNA durch Bestrahlung, oxidativen Stress, durch die Anwesenheit von Zytostatika oder Glukokortikoide und der Entzug von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, führen zu einer Zunahme der Permeabilität der Mitochondrienmembran. Es kommt zur Ausschüttung von Cytochrom c und anderen pro-apoptotischen Molekülen aus dem Intermembranraum. Es folgt die Ausbildung des Apoptosoms und schließlich die Aktivierung von Effektor-Caspasen. Bei Staurosporin handelt es sich um einen Protein-Kinase-Inhibitor, der als starker Apoptose-Induktor für viele Zell-Typen gilt. Dabei wird die Apoptose bei einer Behandlung mit Staurosporin durch die Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs eingeleitet (Tafani et al., 2001). Um den Abbau von MAD1 während der Apoptose aufzuklären und die Analyse des anti-apoptotischen Effektes des Transkriptionsfaktors auszuweiten, sollte in den folgenden Experimenten die Relevanz des intrinsischen Signalwegs überprüft werden.

Handelt es sich bei der Reduktion der MAD1 Proteinmenge um ein Phänomen, das nur bei der Fas-vermittelten Apoptose auftritt, oder wird dies auch durch die Aktivierung des intrinsischen Signalweges ausgelöst? Um diese Frage zu beantworten, wurde MAD1 in HeLa-Zellen überexprimiert und diese, wie auch die Kontroll-Zellen, mit dem Protein-Kinase-Inhibitor, Staurosporin, behandelt. Die Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit den spezifischen Antikörpern analysiert. Die Induktion der Apoptose durch 1  $\mu$ M Staurosporin zeigte bereits nach 2 Stunden eine deutliche Aktivierung von Caspase-3 (Abbildung 3.8). Etwa die Hälfte der Proteinmenge von PARP1 wurde geschnitten. Nach 4 Stunden waren weder Procaspase-3 noch ungeschnittenes PARP1 zu erkennen. In den mit MAD1 transfizierten Zellen kam es zu einer Verzögerung der Apoptose. PARP1-*cleavage* und die Prozessierung von Caspase-3 waren in den MAD1-exprimierenden Zellen deutlich verlangsamt. Nach 4 h Induktion der Apoptose durch Staurosporin kam es zu einer Abnahme der Proteinmenge von MAD1. Dass hier nur eine Verzögerung und keine Inhibition der Apoptose erfolgte, lag an der Induktion, die durch die Behandlung mit dem Protein-Kinase-C-Inhibitor, den Zelltod in allen Zellen und nicht nur in den transfizierten auslöste. Die Aktivierung durch den antagonistischen Fas-Antikörper funktioniert dagegen ausschließlich bei den mit dem Fas-Rezeptor transfizierten Zellen. Da es sich bei HeLa-Zellen um Fas-Rezeptor-



defiziente Zellen handelt, trat diese Problematik bei den Experimenten mit Rezeptor vermittelter Apoptose nicht auf.

Der anti-apoptotische Effekt von MAD1 konnte durch die Behandlung mit Staurosporin bestätigt werden. Zusätzlich kam es auch in apoptotischen Zellen, die durch den mitochondrialen Signalweg induziert wurden, zum Abbau von MAD1. Die Reduktion von MAD1 wird somit durch die Aktivierung des extrinsischen und des intrinsischen Apoptose-Signalweges eingeleitet.

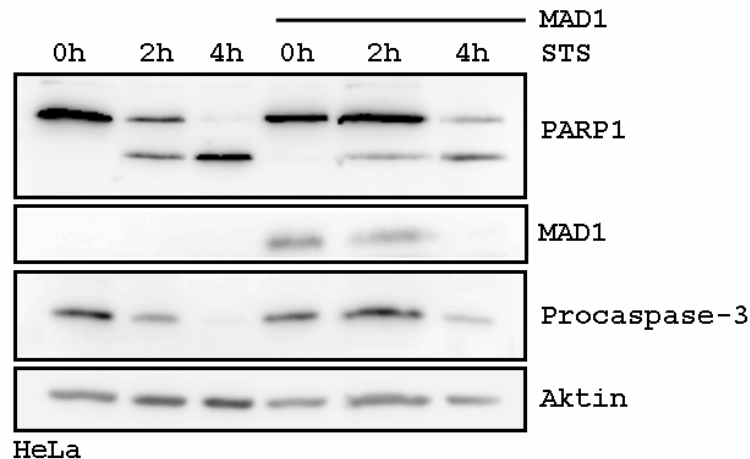


Abbildung 3.8: **Reduktion der MAD1 Proteinmenge durch mitochondrial induzierte Apoptose**

Durch ExGen500 wurden HeLa-Zellen mit pCMV-MAD1 transient transfiziert. Die Zellen wurden für 2-4 h mit 1  $\mu$ M Staurosporin (STS) behandelt. Vergleichbare Proteinmengen der in F-Puffer lysierten Zellen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und der Western-Blot mit den Antikörpern  $\alpha$ -PARP1,  $\alpha$ -MAD1 (C19),  $\alpha$ -Caspase-3 (H-277) und  $\alpha$ -Aktin (C4) detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von mehreren Experimenten.

### 3.2.4 MAD1-Abbau bei Rezeptor- und mitochondrial-vermitteltem Zelltod

In Zellen, die dem Typ I angehören, wird durch das pro-apoptotische Bcl-2-Protein, BID, der intrinsische Signalweg bei Stimulation über den extrinsischen Signalweg mit aktiviert. Von der humanen Cervixkarzinom-Zell-Linie, HeLa, und der embryonalen Nieren-Zell-Linie, HEK293T, ist bekannt, dass sie zu den Typ II-Zellen gehören (Kominsky et al., 2002; Mandal et al., 1996; Yasuhara et al., 1997). Bei der Osteosarkoma-Zell-Linie, U2OS, handelt es sich dagegen um Typ I-Zellen (Martin and Fearnhead, 2002; Scaffidi et al., 1998), welche bei Rezeptor-vermittelter Apoptose den mitochondrialen Weg nicht aktivieren.

Um zu erfahren, ob es sich bei dem verstärkten Abbau von MAD1 während der Apoptose um einen zellspezifischen Effekt handelt, wurden die Experimente in weiteren Zell-Linien verifiziert. Zusätzlich soll durch das Verwenden von Typ I-Zellen Aufschluss über die Beteiligung des über BID aktivierten mitochondrialen Apoptoseweges bei der Reduktion von MAD1 geliefert werden, wodurch die Bedingungen für den während der Apoptose induzierten Abbau von MAD1 weiter analysiert werden sollen. Für die Experimente wurden MAD1 und der Fas-Rezeptor in U2OS-Zellen überexprimiert. Die Apoptose konnte so durch  $\alpha$ -Fas ausgelöst werden. Die lysierten Zellen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit den spezifischen Antikörpern im Western-Blot detektiert. Bei den mit MAD1 und Fas-Rezeptor transient transfizierten U2OS-Zellen wurde der anti-apoptotische Effekt von MAD1 durch das verringerte PARP1-*cleavage* bestätigt (Abbildung 3.9A). Da es in diesen Zellen nicht zu einer Verstärkung des Signals durch Einbeziehen des Mitochondriums kommt, trat nur eine geringe proteolytische Spaltung von PARP1 auf. Bereits 2 Stunden nach Apoptose-Induktion durch  $\alpha$ -Fas wurde eine Verringerung des MAD1-Proteins nachgewiesen. Durch die Verwendung von Typ I-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung spezifischer Komponenten des mitochondrialen Signalweges für den Abbau von MAD1 nicht zwingend erforderlich sind.

In einem weiteren Experiment stand die Auslösung der Apoptose in Typ I-Zellen durch den intrinsischen Signalweg im Vordergrund. Die M19-Zellen weisen ein Tetracyclin-induzierbares System auf. Die cDNA für MAD1 wurde unter der Kontrolle eines Tetracyclin-Repressors stabil in U2OS-Zellen integriert. In Gegenwart von Tetracyclin wird die Expression unterdrückt und kann durch die Wegnahme des Antibiotikums induziert werden. Dieses System ist notwendig, da durch permanente Überexpression von MAD1 die Proliferation der Zellen inhibiert würde. Durch Entfernen von Tetracyclin aus dem Medium wurde die Expression von MAD1 in den M19-Zellen für 12 Stunden induziert, bevor für 2 Stunden die Apoptose durch Staurosporin ausgelöst wurde. Die Zellen wurden in F-Puffer lysiert und die relevanten Proteine nach einer SDS-PAGE im Western-Blot mit  $\alpha$ -PARP1,  $\alpha$ -MAD1 (C19) und  $\alpha$ -Aktin (C4) analysiert. Abbildung 3.9.B belegt die erläuterte Induktion der Expression von MAD1 aufgrund der Entfernung von Tetracyclin. Die Ausbildung von MAD1 bewirkte eine Verringerung des PARP1-*cleavage*. Zusätzlich konnte man in den MAD1-induzierten Zellen, die mit Staurosporin behandelt wurden, eine Reduktion des MAD1-Proteins erkennen. Dieses Ergebnis bestätigt die Resultate aus den vorherigen Versuchen. Zusätzlich konnte durch

die stabil transfizierten Zellen gezeigt werden, dass es sich nicht um einen Effekt handelt, der durch die transiente Transfektion hervorgerufen wurde.

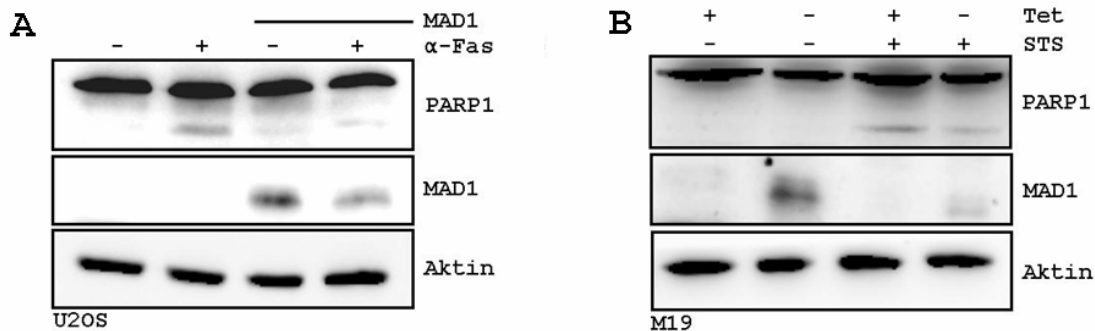


Abbildung 3.9: **Reduktion der MAD1 Proteinmenge in apoptotischen U2OS-Zellen**

**A:** U2OS-Zellen wurden durch ExGen500 mit pCR3-Fas und pCMV-MAD1 transfiziert. Die Apoptose wurde durch Zugabe des antagonistischen Fas-Antikörpers für 2 h eingeleitet. Die Zell-Lysate wurden in einer SDS-PAGE und anschließend Western-Blot verwendet. Die Antikörper  $\alpha$ -PARP1,  $\alpha$ -MAD1 (C19) und  $\alpha$ -Aktin (C4) wurden für die Immunodetektion genommen.

Das Ergebnis konnte in zwei weiteren Experimenten bestätigt werden.

**B:** Um die MAD1 Expression in den UTA-tet-MAD1 (M19) Zellen zu induzieren, wurden diese für 12 h ohne Tetrazyclin kultiviert. Die Apoptose wurde durch Zugabe von 1  $\mu$ M STS für 2 h induziert. Die Zell-Lysate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine nach einem Western-Blot detektiert.

Das Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Zusätzlich wurden diese Experimente in embryonalen Nieren-Zellen (HEK293T) durchgeführt. Auch die HEK293T verhalten sich bei Rezeptor-vermitteltem Zelltod wie Typ II-Zellen. Sowohl bei der Apoptose-Induktion durch den antagonistischen Fas-Antikörper (Abbildung 3.10.A) als auch bei Behandlung mit Staurosporin (Abbildung 3.10.B), konnte das PARP1-*cleavage* verlangsamt und ein deutlicher Abbau von MAD1 gezeigt werden.

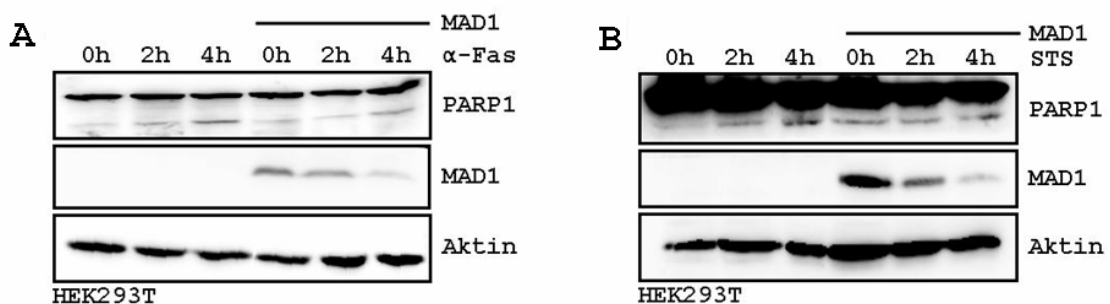


Abbildung 3.10: **Reduzierte MAD1 Proteinmenge in apoptotischen HEK293T-Zellen**

HEK293T-Zellen wurden durch die Calcium-Phosphat-Methode mit pCMV-MAD1 transfiziert. Die Apoptose wurde für die angegebene Zeit eingeleitet. Zell-Lysate wurden in einer SDS-PAGE eingesetzt und der Western-Blot mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

**A:** Nach cotransfektion von pCR3-Fas wurde die Apoptose durch  $\alpha$ -Fas (CH11) ausgelöst.

**B:** Die Induktion der Apoptose erfolgte durch 1  $\mu$ M STS.  
Die Ergebnisse konnte in jeweils zwei weiteren Experimenten bestätigt werden.

Bei den pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie handelt es sich um wichtige Regulatoren des mitochondrialen Apoptose-Signalweges. Durch die Überexpression des anti-apoptotischen Proto-Onkogens Bcl-2 kann die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum ins Cytoplasma verhindert werden (Vander Heiden and Thompson, 1999).

Nachdem in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass der anti-apoptotische Transkriptionsfaktor MAD1 sowohl nach Stimulation des extrinsischen als auch des intrinsischen Apoptoseweges in Typ I und Typ II-Zellen abgebaut wird, sollte dieses Phänomen durch Inhibition des mitochondrialen Signalweges weiter definiert werden. Von HeLa-Zellen ist bekannt, dass es sich um Typ II-Zellen handelt, weil sie durch eine Überexpression von Bcl-2 vor der durch CD95-vermittelten Apoptose geschützt sind (Mandal et al., 1996; Yasuhara et al., 1997). Aus diesem Grund wurden sie für die folgenden Experimente ausgewählt. Expressions-Plasmide für MAD1 und Bcl-2 wurden cotransfiziert und durch den überexprimierten Fas-Rezeptor die Apoptose mit Hilfe von  $\alpha$ -Fas (CH11) eingeleitet. Die Immunodetektion des Western-Blots erfolgte mit den spezifischen Antikörpern  $\alpha$ -PARP1,  $\alpha$ -MAD1 (C19),  $\alpha$ -Bcl-2 (C-2) und  $\alpha$ -Aktin (C4).

Anhand des geringeren PARP1-*cleavage* war in Abbildung 3.11.A eindeutig eine Reduktion der Apoptose in Gegenwart von MAD1 zu erkennen. Die Abnahme des MAD1-Proteins nach einer Apoptose-Induktion von 2 Stunden war ebenfalls festzustellen. Die Überexpression von Bcl-2 hatte eine Stabilisierung des Transkriptionsfaktors zur Folge, jedoch keinen zusätzlichen inhibitorischen Effekt auf das PARP-*cleavage*. Die leichten Schwankungen lassen sich in diesem Fall durch das Verwenden ungleicher Proteinmengen erklären, was sich auch bei der Detektion von Aktin zeigte. In einem weiteren Ansatz wurde die Apoptose in den mit Expressions-Plasmiden für MAD1 und Bcl-2 transfizierten Zellen durch Staurosporin ausgelöst und somit der intrinsische Signalweg zur Einleitung des Zelltods aktiviert.

Durch das Proto-Onkogen Bcl-2 konnte nicht nur die Apoptose inhibiert, sondern auch der Abbau von MAD1 verhindert werden (Abbildung 3.11.B).

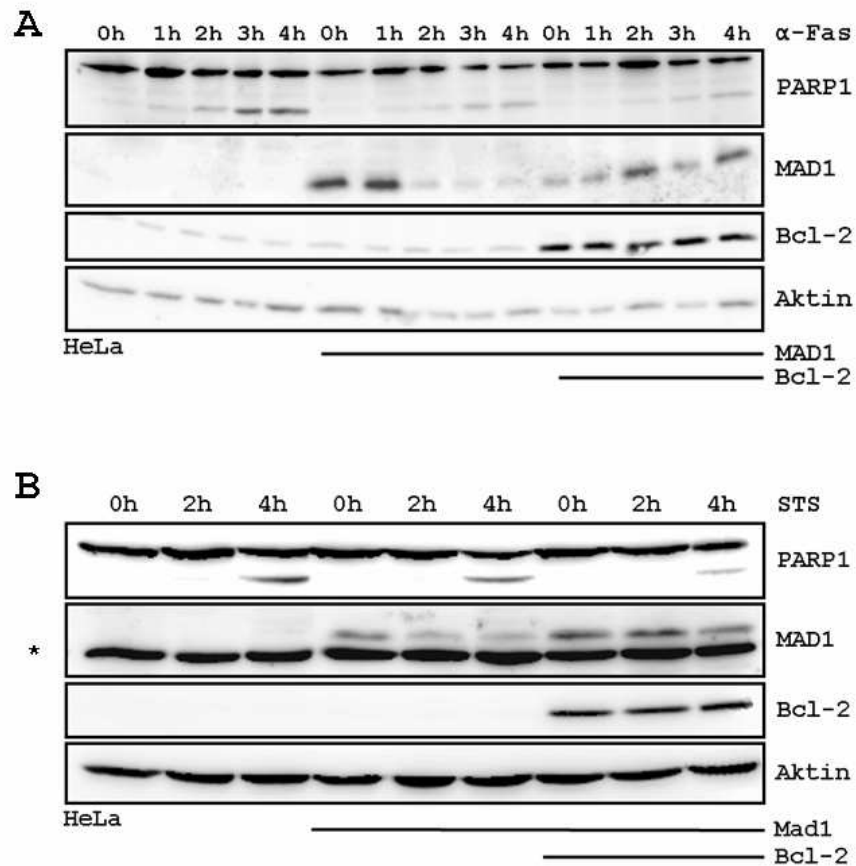


Abbildung 3.11: **Bcl-2 verhindert die Reduktion von MAD1 in apoptotischen HeLa-Zellen**  
 HeLa-Zellen wurden mit pCMV-MAD1 und pBabePuro-Bcl-2 transient transfiziert. Die Apoptose wurde für die jeweils angegebene Zeit eingeleitet. In einer SDS-PAGE wurden die Zell-Lysate aufgetrennt und im anschließenden Western-Blot die Antikörper α-PARP1, α-MAD1 (C19), α-Bcl-2 (C-2) und α-Aktin (C4) für die Immunodetektion verwendet.

**A:** Die Cotransfektion von pCR3-Fas ermöglichte die Induktion der Apoptose durch Zugabe des antagonistischen Fas-Antikörpers.

**B:** Induktion der Apoptose durch Zugabe von 1 μM STS. Eine unspezifische Bande wurde mit einem \* markiert.

Die Ergebnisse konnten in jeweils zwei weiteren Experimenten bestätigt werden.

Wie erwartet, zeigte die Überexpression von Bcl-2 in U2OS Zellen weder einen reprimierenden Effekt auf den durch Fas-eingeleiteten Zelltod noch konnte ein stabilisierender Einfluss auf die MAD1-Proteinmenge nachgewiesen werden (Abbildung 3.12).

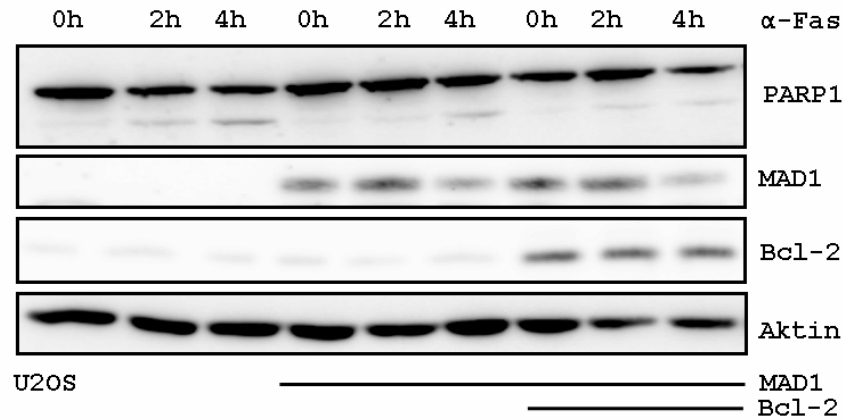


Abbildung 3.12: **In U2OS-Zellen verhindert Bcl-2 die Reduktion von MAD1 nicht**  
 U2OS-Zellen wurden mit pCR3-Fas, pCMV-MAD1 und pBabePuro-Bcl-2 transient transfiziert. Die Apoptose wurde für die jeweils angegebene Zeit eingeleitet. In einer SDS-PAGE wurden die Zell-Lysate aufgetrennt und im anschließenden Western-Blot die Antikörper  $\alpha$ -PARP1,  $\alpha$ -MAD1 (C19),  $\alpha$ -Bcl-2 (C-2) und  $\alpha$ -Aktin (C4) für die Immunodetektion verwendet.

In diesem Versuchsteil konnte belegt werden, dass es sich bei der Abnahme der MAD1-Proteinmenge während der Apoptose um einen Effekt auf das Protein selbst und nicht um eine Repression der Expression handelt. Des Weiteren konnte dieses Phänomen bei verschiedenen Apoptose-Stimuli und in verschiedenen Zell-Typen beobachtet werden, wodurch ein zellspezifischer Effekt ausgeschlossen werden konnte. Die Relevanz der verschiedenen Apoptose-Signalwege bei der Reduktion von MAD1, konnte durch die Verwendung von Typ I-Zellen und durch die Überexpression des anti-apoptotischen Bcl-2 nachgewiesen werden.

### 3.3 Einfluss von Caspasen auf MAD1-Abbau in apoptotischen Zellen

Mit den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass sowohl die Aktivierung des extrinsischen als auch des intrinsischen Signalwegs zum Abbau von MAD1 während des induzierten Zelltods führt. Im Hinblick auf dieses Phänomen sollte die Relevanz der in der Apoptose aktivierten Proteasen, den Caspasen, in weiteren Experimenten überprüft werden. Da die kaskadenartige Aktivierung von Caspasen in den verschiedenen Apoptose-Signalwegen vorkommt, bietet die Blockade der Caspasen auf molekularer Ebene eine gute Möglichkeit zur Hemmung des programmierten Zelltods. Hierfür werden allgemein synthetische Tetrapeptide verwendet, die reversibel oder irreversibel an das aktive Zentrum von allen oder nur von bestimmten Caspasen binden und es dadurch blockieren (Borner and Monney, 1999; Concha and Abdel-Meguid, 2002; Degterev et al., 2003; Garcia-Calvo et al., 1998). Bei dem Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk (Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-Fluoromethylketon) handelt es sich um ein synthetisches Peptid. Der C-Terminus enthält die für Caspase-Substrate erforderliche Aminosäure Aspartat. Der Benzyloxycarbonyl-Rest und die O-methyl-Seitenkette erhöhen die Zellpermeabilität sowie die Stabilität des Peptids. Die Fluoromethyl-Gruppe bewirkt eine kovalente Bindung an das aktive Zentrum der jeweiligen Caspase. Diese Reaktion führt zu einer sofortigen und irreversiblen Hemmung der Protease-Aktivität (Borner and Monney, 1999; Garcia-Calvo et al., 1998).

Für diese Experimente erfolgte vor der Behandlung mit antagonistischem  $\alpha$ -Fas eine Pre-Inkubation mit dem generellen Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk. Die Zellen wurden nach der angegebenen Zeit lysiert, die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen PARP1, MAD1 (C19) und Aktin (C4) analysiert.

In Folge der ausgelösten Apoptose kann PARP1 als Substrat durch Caspasen, wie der Effektor-Caspase-3, geschnitten werden (Nicholson et al., 1995), was durch die Verwendung des Inhibitors z-VAD-fmk erfolgreich verhindert wurde (Abbildung 3.13). Auch die Expression von MAD1 führte zu einer Verringerung des PARP1-*cleavage*, die durch die Anwendung von z-VAD-fmk weiter verstärkt werden konnte. Durch die Blockade der Caspase-Kaskade konnte eine Stabilisierung des MAD1-Proteins in den Apoptose-induzierten Zellen detektiert werden. Dieses Erkenntnis weist darauf hin, dass die Aktivierung von Caspasen für den in der Apoptose-induzierten Abbau des Transkriptionsfaktors MAD1 notwendig ist.

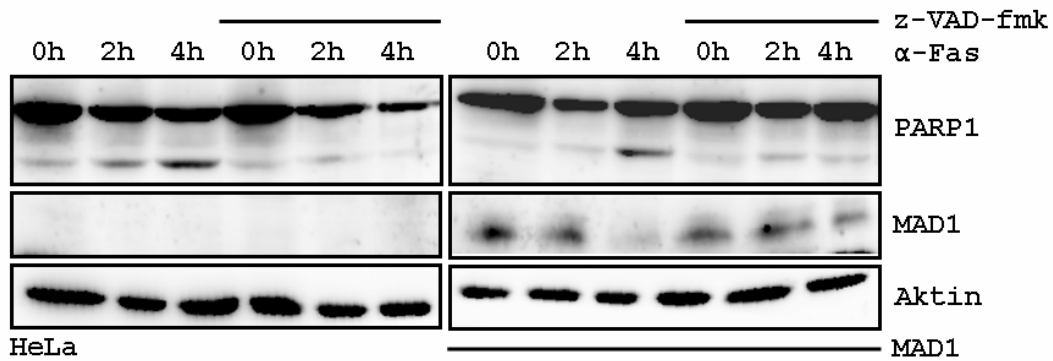


Abbildung 3.13: **Inhibition der Caspasen verhindert MAD1-Degradation**

HeLa-Zellen wurden mit pCR3-Fas und pCMV-MAD1 transfiziert. Die Zellen für 1,5 h mit 100  $\mu$ M des Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk preinkubiert, bevor die Apoptose durch  $\alpha$ -Fas eingeleitet wurde. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine nach SDS-PAGE und Western-Blot mit den spezifischen Antikörpern detektiert.

Das Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Zur Ermittlung der zutreffenden Caspase wurden mit MAD1 transfizierte HeLa-Zellen vor der  $\alpha$ -Fas Stimulation mit dem Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk oder spezifischen Caspase-Inhibitoren preinkubiert. Das Tetrapeptid z-DEVD-fmk entspricht der spezifischen Sequenz für Caspase-3-Substrate und inhibiert effizient die Effektor-Caspasen Caspase-3 und Caspase-7. Bei dem synthetischen Peptid z-LEVD-fmk handelt es sich um einen spezifischen Inhibitor für Caspase-9. Alle verwendeten Inhibitoren binden irreversibel an das konservierte Pentapeptid-Motiv des aktiven Zentrums der jeweiligen Caspase, wodurch diese inaktiviert und die Caspase-Kaskade unterbrochen wird. Die Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen PARP1, MAD1 (C19) und Aktin (C4) analysiert. Wie bereits gezeigt, kam es durch die Pre-Inkubation mit z-VAD-fmk zur Inhibition der Apoptose und zur Stabilisierung von MAD1 (Abbildung 3.14). Anhand des PARP1-*cleavage* konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass es mit den spezifischen Caspase-Inhibitoren zu einer Reduktion der Apoptose kam, jedoch nicht zu einer vollständigen Blockade. Die Inhibition einzelner Caspasen zeigte keinen stabilisierenden Effekt auf das MAD1 Protein.

Dieses Ergebnis lässt auf eine Beteiligung der Caspasen an dem verstärkten Abbau des Transkriptionsfaktors MAD1 während der Apoptose schließen. Die Frage, ob es sich bei MAD1 um ein direktes Caspase-Substrat handelt, bleibt offen. Es könnte sich bei der Reduktion des MAD1-Proteins in apoptotischen Zellen auch um einen indirekten Effekt der Caspasen handeln. Die Beteiligung einer distinkten Caspase konnte durch dieses Experiment nicht ermittelt werden.



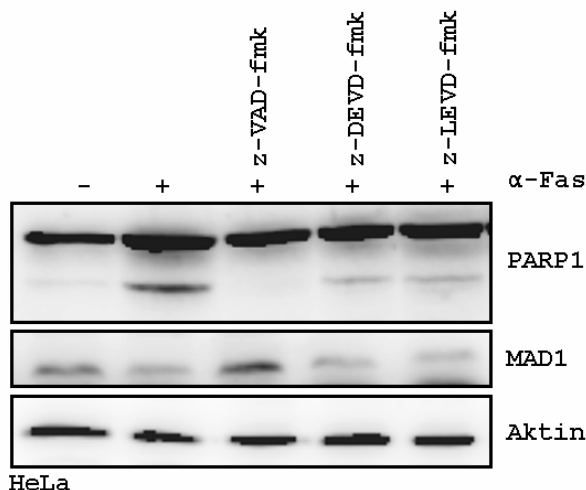


Abbildung 3.14: **Abbau von MAD1 wird nicht durch Inhibition einzelner Caspasen verhindert**

HeLa-Zellen wurden mit pCR3-Fas und pCMV-MAD1 transfiziert und für 1,5 h mit 75  $\mu$ M unterschiedlicher Caspase-Inhibitoren pre-inkubiert. Anschließend wurde die Apoptose durch Zugabe des Fas-Antikörpers induziert. In der SDS-PAGE wurden die Zell-Lysate aufgetrennt und nach einem Western-Blot wurden die angegebenen Antikörper für die Detektion verwendet. Das Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

### 3.3.1 MAD1 ist *in vitro* ein Substrat von Effektor-Caspasen

Da die Fragmentierung von MAD1 durch die Pre-Inkubation mit dem generellen Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk verhindert werden konnte, sollte in weiteren Experimenten geklärt werden, ob es sich bei dem anti-apoptotischen Transkriptionsfaktor MAD1 um ein direktes Caspase-Substrat handelt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde rekombinantes GST-MAD1 (Abbildung 3.16) mit den rekombinanten Caspasen -2, -3 oder -6 (Talanian et al., 1997) in An- und Abwesenheit des irreversiblen Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk inkubiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurden verschiedene Antikörper für die Detektion benutzt. Der monoklonale  $\alpha$ -MAD1 (5C9) ist gegen ein Epitop im N-terminalen Bereich des Proteins gerichtet, dagegen erkennt der  $\alpha$ -MAD1 (C19) den C-terminalen Bereich von MAD1. Zusätzlich kam der monoklonale  $\alpha$ -GST (6C9) bei der Detektion des N-terminalen Glutathion-S-Transferasen-*tags* zur Anwendung.

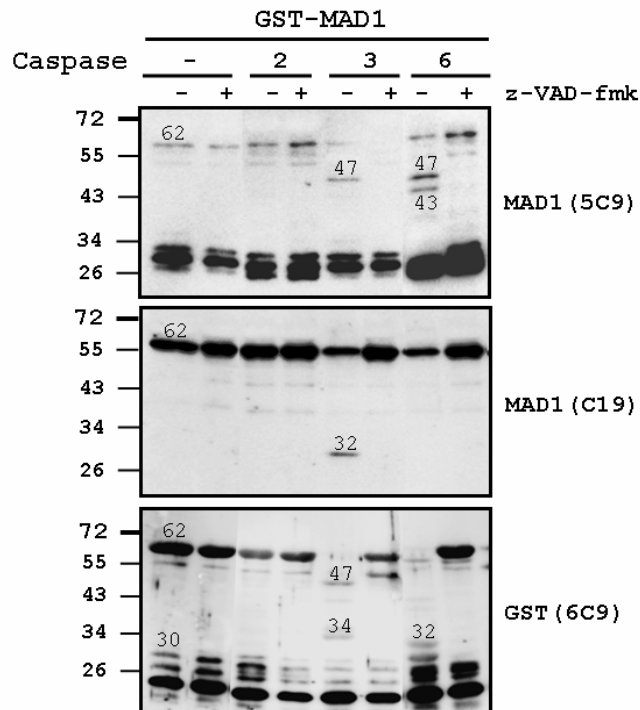
Alle drei Antikörper erkannten das *full length* GST-MAD1 bei einer Höhe von 62 kDa (Abbildung 3.15). In den Ansätzen mit den Effektor-Caspasen kam es zu einer Verringerung des Fusions-Proteins. Es konnten Spaltprodukte bei unterschiedlichen Höhen detektiert werden. Die Behandlung mit Caspase-3 führte zu einem 47 kDa Fragment, welches mit dem GST- und dem N-terminalen MAD1-Antikörper detektiert

werden konnte. Dies ließ auf den Verlust eines etwa 15 kDa großen Stück des C-Terminus schließen. Mit dem C-terminalen Antikörper für MAD1 konnte ein Spaltprodukt mit einer Größe von 32 kDa erkannt werden. Das ergänzende N-terminale Stück von 34 kDa wurde mit dem GST-Antikörper nachgewiesen.

Auch die Behandlung mit Caspase-6 führte zu Spaltprodukten. Durch den N-terminalen MAD1 Antikörper konnten Fragmente von 47 und 43 kDa gezeigt werden, die mit dem GST-Antikörper nicht zu sehen waren. Dieser detektierte dagegen ein Fragment von 32 kDa. Durch den C19-Antikörper ließen sich keine Fragmente nachweisen.

Die Vorbehandlung der Caspasen mit z-VAD-fmk in einigen Ansätzen sollte die Spezifität der Spaltreaktion aufzeigen. Da bei den mit Caspase-Inhibitor behandelten Ansätzen weder eine Verringerung von GST-MAD1 noch Spaltprodukte zu erkennen waren, konnte von einer spezifischen proteolytischen Aktivität der Caspasen ausgegangen und eine Verunreinigung durch andere Proteasen ausgeschlossen werden. Bei einer Höhe von 30 bis 20 kDa wurden durch den N-terminale MAD1-Antikörper (5C9) und den GST-Antikörper mehrere Banden detektiert. Es handelte sich hierbei um Abbauprodukte, die nicht auf die proteolytische Aktivität der Caspasen zurückzuführen sind, da sie auch in den Kontrollen ohne zugesetzte rekombinante Caspase auftraten. Aufgrund der Spezifität der Antikörper, die zum Nachweis dieser Fragmente führten, ist davon auszugehen, dass hier vorrangig freies GST oder GST mit einem Teil des N-terminalen Bereichs von MAD1 detektiert wurde.

Durch Caspase-3 und Caspase-6 wurde MAD1 nachweislich effizient gespalten. Die Initiator-Caspase Caspase-2 zeigte dagegen keine proteolytische Aktivität bei rekombinantem MAD1.



### Abbildung 3.15: Spaltung von MAD1 durch rekombinante Effektor-Caspasen

*In vitro* Spaltreaktionen mit rekombinantem GST-MAD1 und rekombinanten Caspase in An- und Abwesenheit von Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk.

Die Western-Blots wurden mit Antikörpern gegen den GST-tag (6C9), den C-Terminus (C19) oder den N-Terminus von MAD1 (5C9) entwickelt.

Das Ergebnis konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden.

### 3.3.2 Konsensus-Sequenz

Die Größen der Fragmente aus dem *in vitro*-Assay geben Anhaltspunkte für die Lage potentieller Caspase-Schnittstellen in MAD1. Eine Analyse der Protein-Sequenz durch die PeptideCutter Software (Gasteiger et al., 2003) ergab keine einzige Konsensus-Sequenz für Caspase-Schnittstellen. Die Verwendung des SVM-Algorithmus des CASVM-Server 1.0 ermöglichte das Auffinden von drei nicht-kanonischen Schnittstellen, deren P1-Positionen Glutaminsäure anstelle von Asparaginsäure aufweisen (DYLE-20, DREE-161, DSDE-188) (Wee et al., 2006; Wee et al., 2007). Zwei dieser potentiellen Schnittstellen (Abbildung 3.16) liegen in den Bereichen von MAD1, die durch den *in vitro*-Assay als mögliche Caspase-Schnittstellen ermittelt wurden.

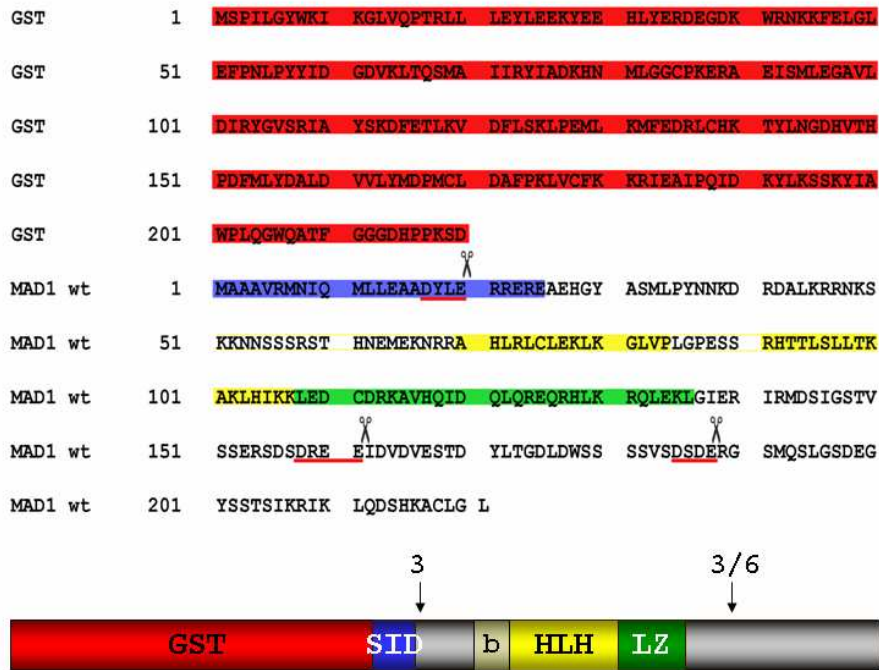


Abbildung 3.16: **Sequenz und schematische Darstellung von GST-MAD1 mit potentiellen Caspase-Schnittstellen**

GST: Glutathione-S-Transferase (rot), SID: mSIN3-Interacting Domäne (blau), b: basische Region (grau-gelb), HLH: *Helix-Loop-Helix* (gelb), LZ: *Leucin-Zipper* (grün).

Potentielle Caspase-Schnittstellen, die durch den CASVM-Server 1.0 ermittelt wurden, sind in der Sequenz von MAD1 eingezeichnet (✂).

Mögliche Caspase-Schnittstellen aus *in vitro*-Assays sind in der schematischen Darstellung von MAD1 markiert.

Als Resultat der durchgeführten z-VAD-fmk Experimente konnte nicht eindeutig festgestellt werden, dass an dem in der Apoptose induzierten Abbau von MAD1 Caspasen beteiligt sind. Das Fehlen einer Konsensus-Sequenz stellte eine direkte Beteiligung in Frage. Spaltprodukte von MAD1 durch Caspase-3 und Caspase-6 konnten *in vitro* nachgewiesen werden. Die aus den *in vitro*-Experimenten ermittelten Fragmentgrößen können durch potentielle, nicht-kanonische, proteolytische Schnittstellen, die durch den CASVM-Server 1.0 errechnet wurden, bestätigt werden.

Es war noch nicht möglich, die Spaltprodukte in Zellen zu verifizieren.

### **3.4 Analysen zum proteasomalen MAD1-Abbau in der Apoptose**

Da die Ergebnisse darauf hinweisen, dass es sich bei dem Transkriptionsfaktor MAD1 nicht um ein direktes Caspase-Substrat handelt, kann ein indirekter Effekt nicht ausgeschlossen werden. Im Weiteren sollte zusätzlich die Auswirkung des Ubiquitin-Proteasomen-Signalweges auf die verstärkte Degradation von MAD1 in apoptotischen Zellen untersucht werden.

#### **3.4.1 MAD1 wird proteasomal abgebaut**

Die Funktion vieler Proteine der Zelle ist auf einen örtlich und zeitlich engen Rahmen begrenzt. In welchem Rahmen ein Protein wirksam werden kann, hängt neben der Geschwindigkeit der Biosynthese und dem Ausmaß an kovalenten Modifikationen auch entscheidend von der Abbaugeschwindigkeit des Proteins ab. Auch MAD1 ist ein stringent regulierter Transkriptionsfaktor, der eine kurze Halbwertszeit von weniger als 30 Minuten besitzt. Durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg kommt es zur selektiven Proteolyse von Proteinen, weshalb dieser eine bedeutende regulatorische Funktion in der Zelle aufweist. Proteine, die für den Abbau über diesen Weg bestimmt sind, werden durch Verknüpfung von Ubiquitin-Polymeren an Lysinen markiert, worauf sie von den 19S-Komplexen des Proteasoms erkannt, entfaltet und dann von der 20S-Untereinheit proteolytisch gespalten werden. Von dem Proto-Onkogen c-MYC ist bekannt, dass es, wie auch andere kurzlebige Transkriptionsfaktoren, durch den Ubiquitin-Proteasomen-Signalweg abgebaut wird. Basierend auf dieser Tatsache wurde analysiert, ob dies auch für den c-MYC-Antagonisten MAD1 zutrifft. Bei MG132 handelt es sich um ein Tripeptid-Aldehyd (Z-LLL-CHO = N-Carboxybenzyl-Leu-Leu-Leu-Aldehyde). Das zellpermeable Reagenz inhibiert reversibel alle drei proteasomalen Peptidase-Aktivitäten des humanen 26S-Proteasom-Komplexes, ohne dessen ATPase oder Isopeptidase Aktivität zu beeinflussen (Tsubuki et al., 1993).

Zum Nachweis der Degradation von MAD1 über das 26S-Proteasom wurde in exponentiell wachsenden HeLa-Zellen durch die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des Peptid-aldehyds MG132 der proteasomale Abbau inhibiert. Die

Zellen wurden nach 8 Stunden lysiert und die Proben in der SDS-PAGE aufgetrennt. Im anschließenden Western-Blot wurden die Antikörper  $\alpha$ -MAD1 (C19) und  $\alpha$ -Aktin (C4) zur Analyse der Proteine verwendet. Mit steigender Konzentration von MG132 konnte eine Anreicherung von endogenem MAD1 beobachtet werden. Bereits eine Inhibition des Proteasoms mit 5  $\mu$ M des Peptidaldehyds führte zu einer detektierbaren Proteinmenge des schwach exprimierten Transkriptionsfaktors, die mit höheren Konzentrationen noch weiter gesteigert werden konnte (Abbildung 3.17). Dieses Ergebnis ist ein erster Hinweis auf den Abbau von MAD1 durch den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg.

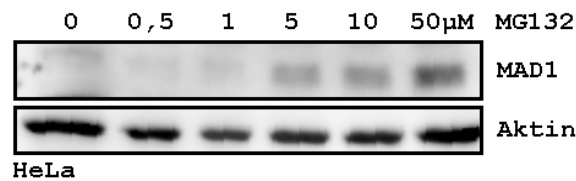


Abbildung 3.17: **Endogenes MAD1 wird proteasomal abgebaut**

HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von MG132 für 8 h behandelt. Die Zellen in F-Puffer lysiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit den Antikörpern  $\alpha$ -MAD1 (C19) und  $\alpha$ -Aktin (C4) analysiert. Das Ergebnis konnten in zwei weiteren Experimenten bestätigt werden.

Sollte MAD1 tatsächlich proteasomal abgebaut werden, müsste es zu der dafür notwendigen Poly-Ubiquitinierung kommen. Durch weitere Experimente sollte geklärt werden, ob MAD1 einem solchen Ubiquitinierungs-Prozess unterliegt. Zur Analyse wurden HEK293T-Zellen mit Expressions-Vektoren für MAD1 und His-Ubiquitin transfiziert. Die durch His-Ubiquitin modifizierten Proteine wurden nach Lyse in Harnstoffhaltigem Puffer über Cobalt-Beads präzipitiert. Im Hinblick auf die sehr hohe Aktivität von Ubiquitinhydrolasen war die Verwendung des stark denaturierenden Urea-Puffers notwendig. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurde mit dem MAD1 spezifischen Antikörper C19 detektiert.

Die durch 8,5 kDa großes Ubiquitin modifizierten Proteine weisen ein höheres apparentes Molekulargewicht auf und laufen im Gel durch die unterschiedliche Länge der angehängten Polymere nicht als distinkte Bande, sondern als Schmier. Ubiquitiniertes MAD1 ist im Vergleich zur Kontrolle ohne überexprimiertes His-Ubiquitin deutlich zu detektieren (Abbildung 3.18). Die Poly-Ubiquitinierung von MAD1 bestätigte die Ergebnisse von (Xu et al., 2007).

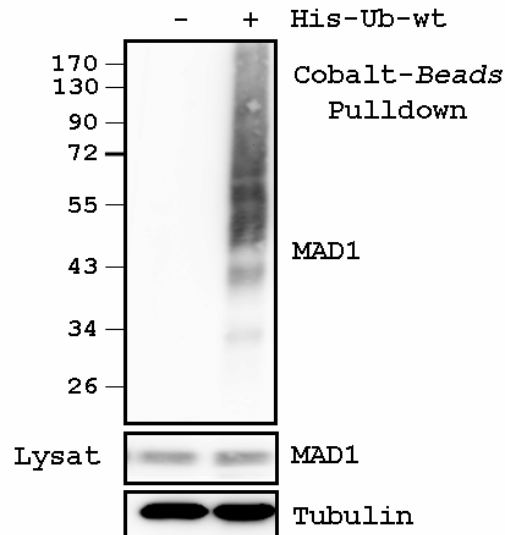


Abbildung 3.18: **MAD1 wird Poly-Ubiquitiniert**

Die Plasmide pCMV-MAD1 und pCW7-Ubwt wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und His-Ubiquitin modifizierte Proteine nach Lyse über Cobalt-Beads präzipitiert. MAD1 wurde in den Lysaten und im *Pulldown* nach SDS-PAGE im Western-Blot mit dem MAD1 spezifischen Antikörper C19 detektiert. Als Kontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin (B-5-1-2) verwendet. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von mehreren Experimenten.

### 3.4.2 MAD1 enthält keine, für den Abbau relevant Domäne

Die voran gegangenen Ergebnisse haben genügend Hinweise auf eine Poly-Ubiquitinierung und proteasomale Degradation von MAD1 gegeben. Das nächste Ziel war, herauszufinden, welches die Domäne von MAD1 ist, die modifiziert werden kann und für den Abbau über das 26S-Proteasom verantwortlich ist. Die Bedeutung der Domänen von MAD1 für den proteasomalen Abbau wurde getestet, indem die ECFP-fusionierten MAD1-Deletionsmutanten (Abbildung 3.4) in HeLa-Zellen transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit Cycloheximid (CHX) und MG132 behandelt. Cycloheximid wirkt in eukaryotischen Zellen als Translationshemmer und unterbindet so die Proteinbiosynthese. Die zusätzliche Blockade des Proteasoms verhindert folgerichtig den Abbau bereits vorhandener Proteine. Die Proben wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit  $\alpha$ -GFP über den ECFP-tag im Western-Blot analysiert. Das zur Kontrolle transfizierte ECFP wurde durch Cycloheximid nicht beeinflusst, weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit von MG132 (Abbildung 3.19). Die Expression aller ECFP-MAD1-Fragmente wurde durch Cycloheximid reduziert. Die Inhibition des Proteasoms durch MG132 verhinderte in allen Fällen den Abbau der MAD1-Deletionsmutanten. Somit konnte allen Regionen von MAD1 eine besondere Sensitivität für den proteasomalen Abbau zugeschrieben werden.

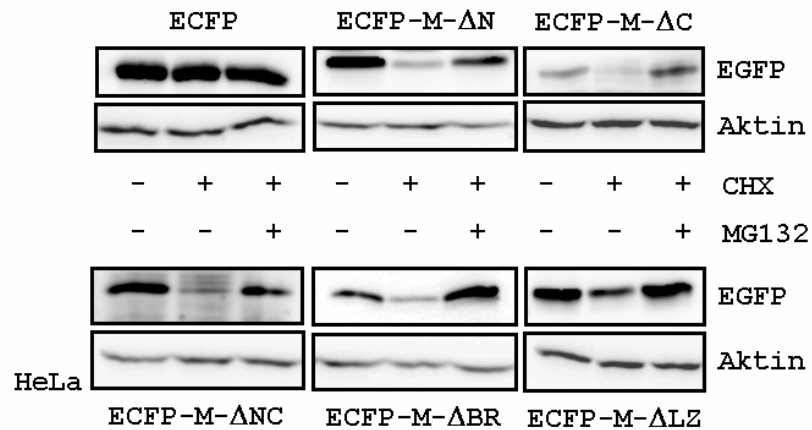


Abbildung 3.19: **MAD1 weist keine Abbau-relevante Domäne auf**

HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden für ECFP-Fusions-Konstrukte der MAD1-Deletionsmutanten transfiziert. Die Zellen, wie angegeben, mit Cycloheximid (CHX) und MG132 für 5 h behandelt. Äquivalente Mengen der Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Western-Blot durch die Antikörper  $\alpha$ -GFP und  $\alpha$ -Aktin (C4) nachgewiesen. Das Ergebnis konnte in zwei weiteren Experimenten bestätigt werden.

Ziel der nächsten Untersuchungen war die Beantwortung der Frage, in welchen Regionen der Transkriptionsfaktor MAD1 durch Ubiquitin-Ketten modifiziert wird.

Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Deletionsmutanten (Abbildung 3.4) in einem *in vivo* Ubiquitinierungs-Assay eingesetzt. Es sollte verhindert werden, dass die Mutanten im Western-Blot durch verschiedene Antikörper detektiert werden müssen und deren unterschiedliche Affinität zu einem falschen Ergebnis führen würden. Aus diesem Grund wurden für das Experiment HA-Fusionsproteine in HEK293T-Zellen exprimiert, diese in Urea-Puffer lysiert, sonifiziert und durch Cobalt-*Beads* präzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot konnte der monoklonale  $\alpha$ -HA (3F10) Antikörper für die Immunodetektion verwendet werden.



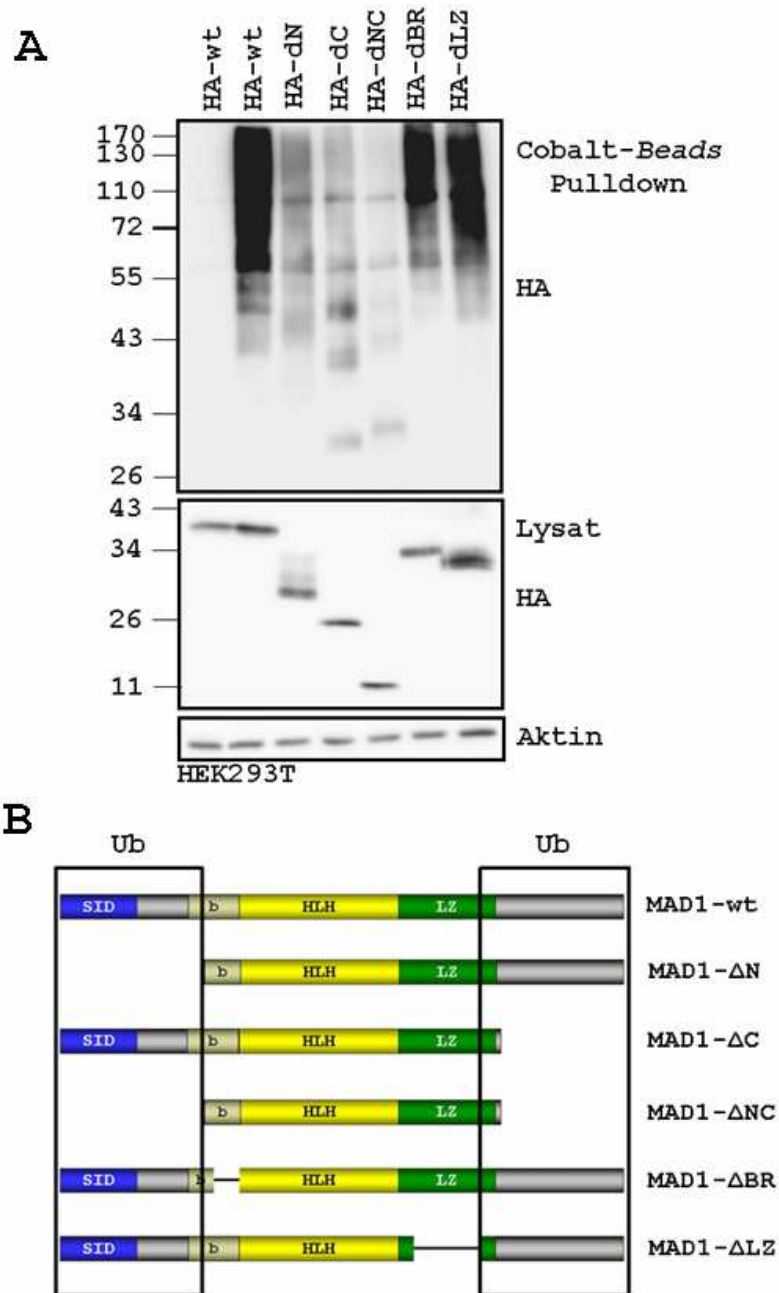


Abbildung 3.20: **Ubiquitylierung von MAD1 findet hauptsächlich in den N- und C-terminalen Regionen statt**

HEK293T-Zellen wurden mit Expressions-Plasmiden für HA-getaggetes MAD1 oder MAD1-Deletionsmutanten und pCMV-His6-Ubiquitin transfiziert. Die Zellen wurden für 3 h mit MG132 inkubiert, danach lysiert, sonifiziert und über Cobalt-Beads präzipitiert. MAD1 wurde in den Lysaten und im *Pulldown* nach SDS-PAGE im Western-Blot mit  $\alpha$ -HA (3F10) detektiert. Als Kontrolle wurde  $\alpha$ -Aktin (C4) verwendet.

Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten.

In Abbildung 3.20.A ist deutlich zu sehen, dass die MAD1-Fragmente ohne C- oder N-terminalen Bereich schwächer poly-ubiquitiniert werden als der Wildtyp. Da es durch den Verlust der N- und der C-terminalen Region zu einer weiteren Reduktion des Signals kommt, kann davon ausgegangen werden, dass das Protein an beiden Regionen modifiziert werden konnte. Die Mutanten MAD1 $\Delta$ BR und MAD1 $\Delta$ LZ werden nur geringfügig schwächer als der Wildtyp modifiziert. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf keine oder geringe Poly-Ubiquitinierung in diesen Regionen. Aufgrund dieses Ergebnisses kann man davon ausgehen, dass der Transkriptionsfaktor MAD1 an mehreren Stellen modifiziert wird und dabei hauptsächlich in den N- und C-terminalen Regionen poly-ubiquitiniert werden kann (Abbildung 3.20B).

### **3.4.3 MAD1-Abbau während der Apoptose erfolgt nicht über das Proteasom**

Nach der Bestätigung des generellen proteasomalen Abbaus von MAD1 und der Identifizierung der verstärkten Degradation während des programmierten Zelltodes sollte als nächstes die Beteiligung des 26S-Proteasoms bei dem verstärkten Abbau von MAD1 während der Apoptose untersucht werden.

Der Überexpression des Transkriptionsfaktors MAD1 und des Fas-Rezeptors in HeLa-Zellen folgte die Behandlung mit MG132, um so den proteasomalen Abbau in den Zellen zu inhibieren. In den Zellen wurde die Apoptose durch den antagonistischen Fas-Antikörper eingeleitet. Die Zellen wurden mit F-Puffer lysiert und die Proteine nach SDS-PAGE im Western-Blot durch Immunodetektion mit den Antikörpern  $\alpha$ -PARP1,  $\alpha$ -MAD1 (C19) und  $\alpha$ -Aktin (C4) analysiert.

In apoptotischen Zellen kam es auch hier (Abbildung 3.21) zur Degradation von MAD1. Die Hemmung des Proteasoms führte zu einer Anreicherung von MAD1-Protein. Durch die Inhibition des Proteasoms konnte jedoch die apoptotische Degradation von MAD1 nicht verhindert werden. Es war eine deutliche Abnahme der Proteinmenge im Vergleich zu den Apoptose-induzierten und mit MG132 behandelten Zellen zu erkennen. Dieses Ergebnis gab einen ersten Hinweis darauf, dass es sich bei dem verstärkten Abbau von MAD1 während der Apoptose um eine proteasomal-unabhängige Degradation des Proteins handelt.

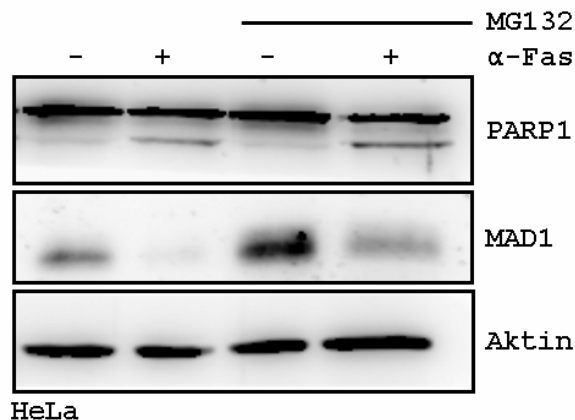


Abbildung 3.21: **Abbau von MAD1 während der Apoptose erfolgt nicht über das Proteasom**

HeLa-Zellen wurden mit pCR3-Fas und pCMV-MAD1 transfiziert. Zwei Ansätze wurde für 6 h mit MG132 behandelt und nach 2 h wurde zusätzlich die Apoptose durch  $\alpha$ -Fas eingeleitet. Die Lysate in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Western-Blot analysiert. Die Ergebnisse konnten in drei unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Zur Verifizierung dieses Resultats sollte die Poly-Ubiquitinierung von MAD1 während der Apoptose in einem weiteren *in vivo* Ubiquitinierungs-Assay analysiert werden. Hierzu wurden MAD1, Fas-Rezeptor und His-Ubiquitin in HEK293T-Zellen transient exprimiert. Die Zellen mit MG132 und  $\alpha$ -Fas behandelt, in Urea-Puffer lysiert, sonifiziert und die His-Ubiquitin modifizierten Proteine mit Cobalt-Beads präzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurde MAD1 mit dem Antikörper  $\alpha$ -MAD1 (C19) detektiert. In apoptotischen Zellen konnte eine deutliche Reduktion der Poly-Ubiquitinierung von MAD1 nachgewiesen werden (Abbildung 3.22). Im Falle eines verstärkten proteasomalen Abbaus würde eine Zunahme der Poly-Ubiquitinierung erwartet. Die Reduktion der nachgewiesenen Modifikation lässt demnach den Schluss eines proteasomal-unabhängigen Abbaus von MAD1 in apoptotischen Zellen zu. Bei dem Vergleich der detektierten MAD1 Proteinmengen in den Lysaten, fiel auch hier die verringerte Proteinmenge in den apoptotischen Zellen auf. Diese Reduktion scheint sich bei der Signalstärke der Poly-Ubiquitinierung widerzuspiegeln.

Ein verstärkter proteasomaler Abbau von MAD1 in der Apoptose ist auf Grund des Ausbleibens zusätzlicher Poly-Ubiquitinierung unwahrscheinlich.

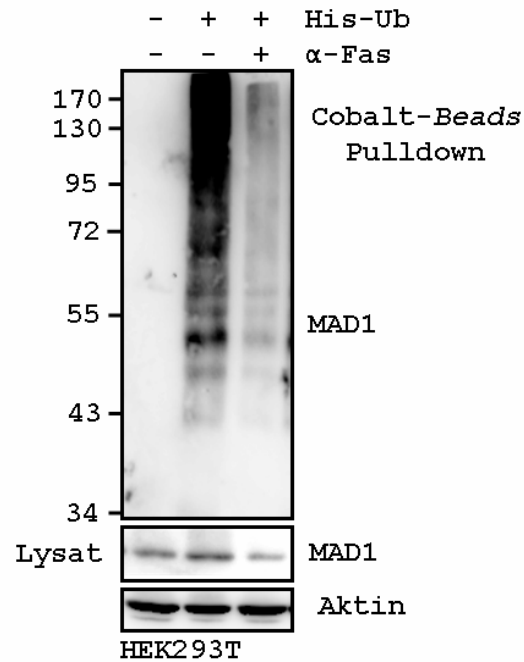


Abbildung 3.22: **Induktion der Apoptose führt nicht zu verstärkter Ubiquitinierung von MAD1**

HEK293T-Zellen wurden mit pCMV-MAD1, pCR3-Fas und pCMV-His6-Ub transfiziert. Die Zellen für 4 h mit MG132 inkubiert und durch  $\alpha$ -Fas (CH11) Apoptose ausgelöst. Die Zellen wurden lysiert, sonifiziert und über Cobalt-Beads präzipitiert. MAD1 wurde in den Lysaten und im *Pulldown* nach SDS-PAGE im Western-Blot mit  $\alpha$ -MAD (C19) detektiert. Als Kontrolle wurde  $\alpha$ -Aktin (C4) verwendet.

Das Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte die Poly-Ubiquitinierung und der generelle proteasomale Abbau von MAD1 gezeigt werden. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass der Transkriptionsfaktor MAD1 mehrere Regionen aufweist, die den proteasomalen Abbau vermitteln können. Das Protein wird an mehreren Stellen poly-ubiquitiniert, wobei sowohl die N-terminale als auch das C-terminale Region die am stärksten modifizierten Positionen aufweisen.

Es gibt es Hinweise darauf, dass der verstärkte Abbau von MAD1 in apoptotischen Zellen unabhängig von der Modifikation durch Ubiquitin-Ketten und der proteasomalen Degradation verläuft.

### 3.5 Die Phosphorylierung von MAD1 in der Apoptose

In weiteren Experimenten sollte der proteasomal-unabhängige Abbau von MAD1 während der Apoptose verifiziert werden. Durch Zhu und Mitarbeiter konnte gezeigt werden, dass MAD1 ein Substrat der *ribosomal kinase* (RSK) und der *S6 kinase 1* (S6K1) ist (Zhu et al., 2008). Beide Kinasen phosphorylieren Serin-145 des Transkriptionsfaktors nach Serum- oder Insulin-Stimulation. Durch diese Phosphorylierung werden die Ubiquitinierung und der Abbau von MAD1 durch das 26S-Proteasom forciert. Der Austausch von Serin gegen Alanin verhindert die Phosphorylierung von MAD1. Mit Hilfe dieser nicht mehr phosphorylierbaren Mutante, ihrer dadurch eingeschränkten Poly-Ubiquitinierung und dem daraus resultierenden verringerten proteasomalen Abbau, sollten die Untersuchungen zur Degradation von MAD1 in apoptotischen Zellen ergänzt werden.

MAD1 wt	1	MAAAVRMNIQ	MLEEAADYLE	RREREAEHGY	ASMLPYNNKD	RDALKRRNKS
MAD1 S145A	1	MAAAVRMNIQ	MLEEAADYLE	RREREAEHGY	ASMLPYNNKD	RDALKRRNKS
MAD1 wt	51	KKNNSSSRST	HNEMEKNRRA	HLRLCLEKLK	GLVPLGPES	RHTTLLSLTK
MAD1 S145A	51	KKNNSSSRST	HNEMEKNRRA	HLRLCLEKLK	GLVPLGPES	RHTTLLSLTK
MAD1 wt	101	AKLHIKKLED	CDRKAVHQID	QLQREQRHLK	RQLEKLGIER	IRMSIGSTV
MAD1 S145A	101	AKLHIKKLED	CDRKAVHQID	QLQREQRHLK	RQLEKLGIER	IRMDAIGSTV
MAD1 wt	151	SSERSDSRE	EIDVDVESTD	YLTGDLWSS	SSVSDSDERG	SMQSLGSDEG
MAD1 S145A	151	SSERSDSRE	EIDVDVESTD	YLTGDLWSS	SSVSDSDERG	SMQSLGSDEG
MAD1 wt	201	YSSTSIKRIK	LQDSHKACLG	L		
MAD1 S145A	201	YSSTSIKRIK	LQDSHKACLG	L		

Abbildung 3.23: **Sequenz und Schema von MAD1 wt und der Ser145Ala-Mutante**

Das Serin (S) an der Position 145 wurde gegen Alanin (A) ersetzt (rot), wodurch eine Phosphorylierung an dieser Stelle durch AGC-Kinasen verhindert werden soll. Das relevante Serin wurde in der schematischen Darstellung durch eine rote Blase markiert. SID: mSIN3-Interaktions-Domäne (blau), b: basische Region (grau-gelb), HLH: *Helix-Loop-Helix* (gelb), LZ: *Leucin-Zipper* (grün).

### 3.5.1 MAD1-Serin-145-Mutante wird nicht mehr phosphoryliert

Für die weiteren Experimente wurde zunächst eine nicht phosphorylierbare Mutante von MAD1 hergestellt. Eine Punktmutation in der MAD1-Sequenz führte zum Austausch von Serin-145 zu Alanin (Abbildung 3.23). Zum Test, ob die Mutante die Fähigkeit, phosphoryliert zu werden, verloren hat, wurden HeLa-Zellen mit Expressions-Plasmiden für HA-MAD1 oder HA-MAD1S145A transfiziert. Mit einem spezifischen Antikörper für durch AGC-Kinasen phosphorylierten Substrate wurden eben diese präzipitiert, zusammen mit den Lysaten in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot durch  $\alpha$ -HA (3F10),  $\alpha$ -MAD1 (C19) und  $\alpha$ -Aktin (C4) analysiert. Abbildung 3.24 veranschaulicht, dass durch den AKT-Phospho-Substrat-Antikörper HA-getaggtes MAD1 gebunden werden konnte, die S145A-Mutante jedoch nicht. Dieses Ergebnis bestätigt, dass der Austausch von Serin zu Alanin an der Position 145 des Transkriptionsfaktors MAD1 dessen Phosphorylierung durch AGC-Kinasen verhindert.

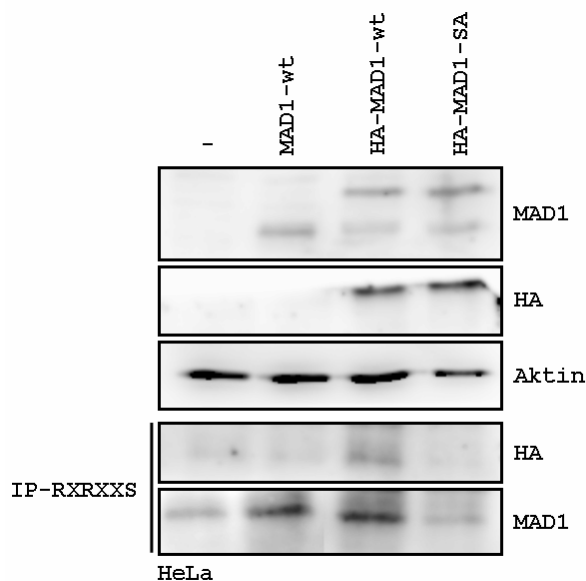


Abbildung 3.24: **Die MAD1-Serin-145-Alanin-Mutante kann nicht mehr phosphoryliert werden**

HeLa-Zellen wurden mit GWpHA-MAD1 oder GWpHA-MAD1S145A transfiziert. Die Zellen lysiert und durch den Antikörper  $\alpha$ -RXRXXS wurden alle durch AGC-Kinasen phosphorylierten Proteine präzipitiert. Die IP und die Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit den Antikörpern  $\alpha$ -HA (3F10),  $\alpha$ -MAD1 (C19) und  $\alpha$ -Aktin analysiert. Das Resultat konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden.

### 3.5.2 MAD1-Abbau in der Apoptose ist unabhängig von der Phosphorylierung

Zhu und Mitarbeiter haben herausgefunden, dass durch Serum-Stimulation die Poly-Ubiquitinierung und die Phosphorylierung von MAD1 gleichermaßen induziert werden. Sie sprechen davon, dass die Phosphorylierung an Serin-145 für die durch Serum-induzierte Degradation von MAD1 erforderlich ist (Zhu et al., 2008). Mit Hilfe der MAD1S145A-Mutante sollte in den folgenden Experimenten der Einfluss der Poly-Ubiquitinierung auf den in apoptotischen Zellen forcierten Abbau von MAD1 untersucht werden. Für dieses Experiment wurden HA-Fusionsproteine von MAD1 oder MAD1S145A zusammen mit His-Ubiquitin in HEK293T-Zellen exprimiert. Der Zelltod wurde durch 1  $\mu$ M Staurosporin eingeleitet und die Zellen anschließend in Urea-Puffer lysiert und sonifiziert. Die modifizierten Proteine wurden durch Cobalt-*Beads* präzipitiert. Nach SDS-PAGE und Western-Blot wurde der monoklonale  $\alpha$ -HA (3F10) Antikörper für die Immunodetektion verwendet werden.

In den mit MAD1-Expressions-Plasmid transfizierten Zellen konnte durch den typischen Schmier eine deutliche Poly-Ubiquitinierung nachgewiesen werden (Abbildung 3.25). Die MAD1-Mutante zeigte ein schwächeres Ubiquitin-Signal als der MAD1-Wildtyp, was das Ergebnis von Zhu und Mitarbeitern reproduzierte. Weder bei der Mutante, noch bei dem MAD1-Wildtyp zeigte sich nach Apoptose-Induktion eine Zunahme der Poly-Ubiquitinierung. Die durch das Fehlen der relevanten Phosphorylierungs-Stelle, geringer poly-ubiquitinierte Mutante zeigte in apoptotischen Zellen keinen Unterschied, während der MAD1-Wildtyp eine Reduktion der für den Abbau relevanten Modifizierung aufwies. Somit kommt es durch Stimulation der Apoptose zur Inhibition der phosphorylierungs-abhängigen Poly-Ubiquitinierung. Durch dieses Ergebnis kann postuliert werden, dass es sich bei der Degradation von MAD1 in apoptotischen Zellen um einen proteasomal-unabhängigen Abbau des Proteins handelt.

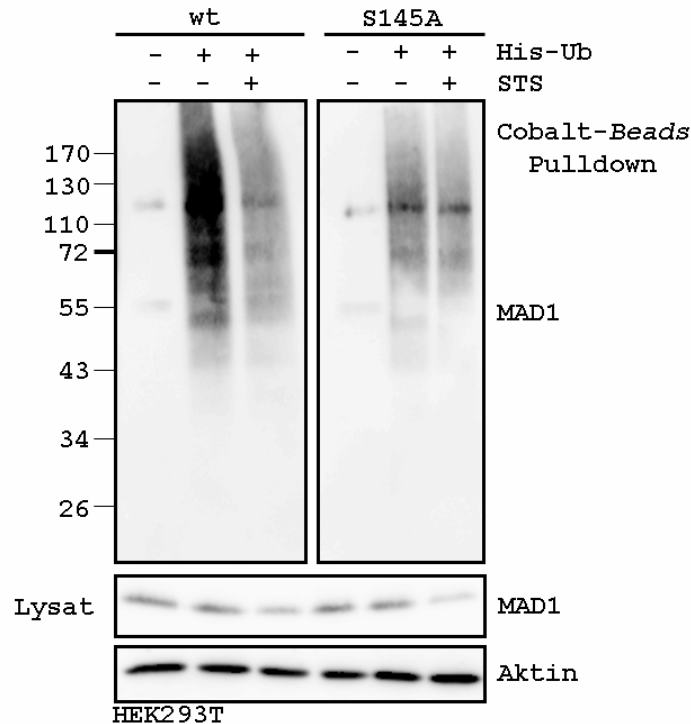


Abbildung 3.25: **Induktion der Apoptose führt nicht zu verstärkter Ubiquitinierung von MAD1-wt und der MAD1-Mutante**

HEK293T-Zellen wurden mit Expressions-Vektoren für HA-getaggttes MAD1 oder MAD1S145A sowie pCMV-His6-Ubiquitin transfiziert. Die Zellen wurden mit MG132 und Staurosporin inkubiert, in Urea-Puffer lysiert, sonifiziert und mit Cobalt-Beads präzipitiert. MAD1 wurde in den Lysaten und im *Pulldown* nach SDS-PAGE im Western-Blot mit  $\alpha$ -HA (3F10) detektiert. Als Kontrolle wurde  $\alpha$ -Aktin (C4) verwendet.

Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Da gezeigt werden konnte, dass es in apoptotischen Zellen nicht zum Anstieg der Poly-Ubiquitinierung bei MAD1 oder der MAD1-Mutante kam, sollte als nächstes die Stabilität des Proteins während der Apoptose eingehender untersucht werden.

HeLa-Zellen wurden mit HA-getaggttem MAD1 oder MAD1S145A transient transfiziert und für 4 Stunden mit Staurosporin behandelt. Die Frackelton-Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und der Western-Blot mit Antikörpern gegen Cytochrom c, MAD1 und Aktin analysiert werden. Sowohl der Wildtyp als auch die Mutanten zeigten eine vergleichbare Reduktion des Proteins in apoptotischen Zellen. Durch dieses Ergebnis ließ sich schlussfolgern, dass die Phosphorylierung an Serin-145 auf die Degradation des Proteins während der Apoptose keinen Einfluss hatte, was den proteasomal-unabhängigen Abbau von MAD1 in apoptotischen Zellen bestätigte.



Durch die Behandlung mit Staurosporin kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der Mitochondrienmembran. Cytochrom c tritt ins Cytoplasma aus und dort bildet sich, zusammen mit Apaf-1, das Apoptosom, ein multimerer Protein-Komplex, der als Plattform zur Aktivierung von Caspase-9 dient. Die Freisetzung von Cytochrom c ist demnach nicht nur eine Begleiterscheinung der Apoptose, sondern eine relevante Folge der Induktion des mitochondrialen Signalweges und konnte nach Behandlung mit Staurosporin im Cytoplasma der HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.26). Durch die Anwesenheit von MAD1 kam es zu einer Reduktion des Austritts von Cytochrom c ins Cytoplasma. Die Mutante MAD1S145A war dagegen nicht im Stande, den Ausstrom von Cytochrom c aus den Mitochondrien zu verhindern, weshalb der Verlust des anti-apoptischen Effektes angenommen wurde.

Die Phosphorylierung an Serin-145 ist für die inhibitorischen Fähigkeiten von MAD1 relevant, durch sie verliert der Transkriptionsfaktor die Fähigkeit die Proliferation von Zellen zu inhibieren (Zhu et al., 2008). Ob die Phosphorylierung auch die Inhibition der Apoptose durch MAD1 beeinflussen kann, sollte in folgenden Experimenten weiter analysiert werden.

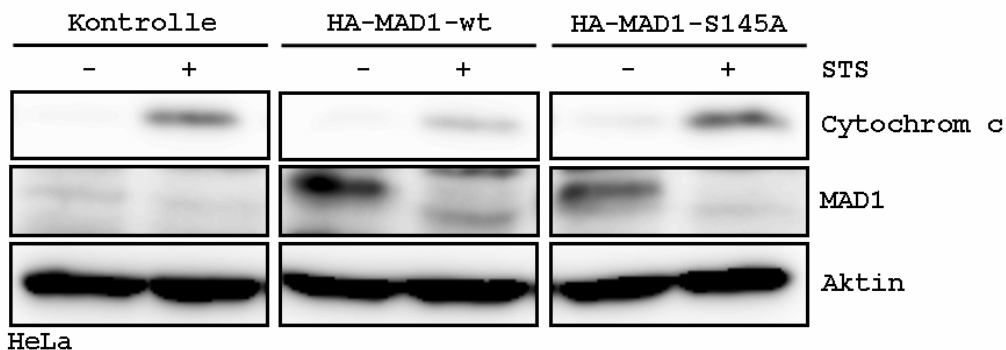


Abbildung 3.26: **MAD1S145A wird in apoptotischen Zellen verstärkt abgebaut**

HeLa-Zellen wurden mit den Plasmiden GWpHA-MAD1 oder GWpHA-MAD1S145A transfiziert. Die Hälfte der Zellen wurde, nach Apoptose-Induktion, für die Detektion von freigesetztem Cytochrom c in DSS-Puffer lysiert, während die andere Hälfte in F-Puffer lysiert und für die Detektion von MAD1 (C19) und Aktin (C4) verwendet wurde.

Das Resultat konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden.

### **3.5.3 MAD1-Phosphorylierung ist essentiell für die Inhibition der Apoptose**

Da gezeigt werden konnte, dass die Phosphorylierung von MAD1 an Serin-145 Auswirkungen auf die Inhibition des induzierten Zelltods hatte, sollte dieses Phänomen in weiteren Apoptose-Experimenten untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit Expressions-Plasmiden für MAD1 oder der MAD1-Mutante, so wie pCR3-Fas und pEGFP-C3, transfiziert. Die Präparation und Fixierung von Zellen auf Objektträgern und eine anschließende Färbung mit Hoechst stellte sich für die Untersuchung dieser Fragestellung als optimal heraus. Die Zellen waren dabei flach ausgebreitet, so dass ihre Morphologie einfach zu bestimmen war. Durch die Expression von EGFP wurden die apoptotischen Merkmale gut hervorgehoben. Es konnten charakteristische Merkmale der Apoptose, Chromatinkondensierung und die Abspaltung von apoptotischen Körperchen analysiert werden.

Die Quantifizierung dieses Assays zeigte eindeutig, dass durch MAD1 die Fas-stimulierte Apoptose von 75% auf 25% reduziert werden konnte (Abbildung 3.27). Die Anwesenheit der MAD1-Mutante zeigte dagegen keinen reprimierenden Effekt auf den induzierten Zelltod.

Dieses Ergebnis belegt, dass die Phosphorylierung von MAD1 an Serin-145 für den anti-apoptotischen Effekt des Transkriptionsfaktors erforderlich ist.

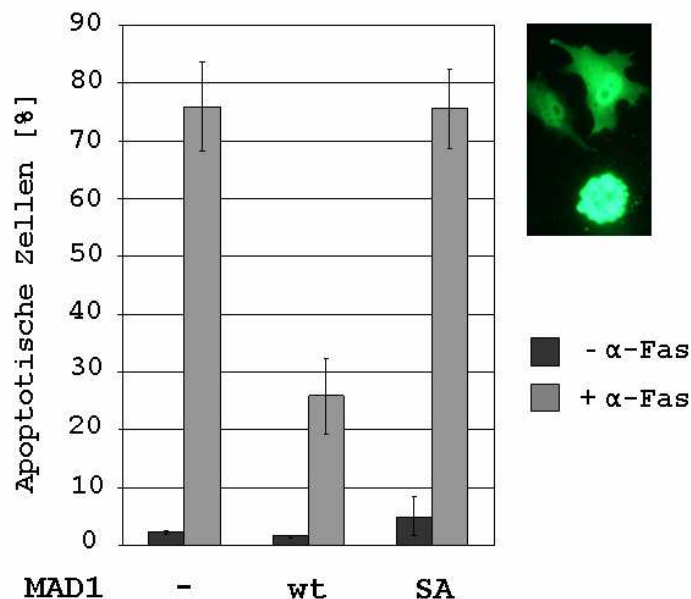


Abbildung 3.27: **Die Phosphorylierung von MAD1 an Serin-145 ist für die Inhibition der Apoptose notwendig**

HeLa-Zellen wurden mit pCR3-Fas und GWpHA-MAD1 oder GWpHA-MAD1S145A transfiziert. Durch die Behandlung mit  $\alpha$ -Fas wurde Apoptose ausgelöst. Die transfizierten Zellen wurden durch cotransfiziertes pEGFP-C3 identifiziert. Es wurde eine statistisch relevante Anzahl von jeweils 250 Zellen gezählt und der Anteil der apoptotischen Zellen anhand ihres charakteristischen Aussehens bestimmt.

Quantifizierung des Assays: gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Wie bereits publiziert, erhält MAD1 seine anti-apoptotische Wirkung auch durch die Repression des Tumorsuppressorgens *PTEN* und die dadurch resultierende Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges (Rottmann et al., 2008). Da im Rahmen dieser Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Phosphorylierung von MAD1 für die Inhibition der Apoptose relevant ist, sollte in weiteren Experimenten getestet werden, ob die Phosphorylierung für die Regulation des *PTEN*-Promotors wesentlich ist.

In einem Reporteragen-Assay wurde die reprimierende Eigenschaft von MAD1S145A bei der p53 und CBP abhängigen Aktivierung der Transkription von *PTEN* analysiert. Hierzu wurde das Reporteragen-Plasmid pGL3PTEN2526/427 benutzt (Stambolic et al., 2001). Es besteht aus der Region -2526 bis -427 des *PTEN*-Gens. Der Promotor enthält zwei E-Boxen sowie die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor p53 vor dem Luciferase-Gen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* als Reporter. Das Genprodukt setzt das Substrat Luciferin unter Verwendung von ATP enzymatisch zu Licht um. Dabei verhält sich die Lichtproduktion proportional zur Luciferasemenge, so dass die Transaktivierung

quantifiziert werden kann. Die Luciferase-Aktivität wurde mit der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität normalisiert, um Unterschiede in der Transfektions-Effizienz auszugleichen.

Im Versuch wurden HEK293-Zellen den Plasmiden pGL3PTEN2526/427, pEQ176p $\beta$ Gal, pRc/CMVp53wt, pGal-CBP, GWpHA-MAD1 und GWpHA-MAD1S145A transient transfiziert und die Luciferase-Aktivität in den Zell-Extrakten ermittelt.

Es zeigte sich, dass p53 alleine kein starker Aktivator für die *PTEN*-Expression war (Abbildung 3.28). Die Coexpression von CBP erhöhte die Transaktivierung deutlich. In Anwesenheit von MAD1 war, wie erwartet, eine Repression zu beobachten (Rottmann et al., 2008). Durch die Coexpression der nicht phosphorylierbaren Mutante von MAD1 konnte keine reprimierende Eigenschaft auf den durch p53 und CBP aktivierten *PTEN*-Promotor gemessen werden.

Dieses Ergebnis gab einen Hinweis darauf, dass das Ausbleiben der MAD1-Phosphorylierung an Serin-145 zum Verlust der Repression der *PTEN*-Expression führt. Die dadurch ausbleibende Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges könnte somit für den Verlust des anti-apoptischen Effekts des Transkriptionsfaktors verantwortlich sein.

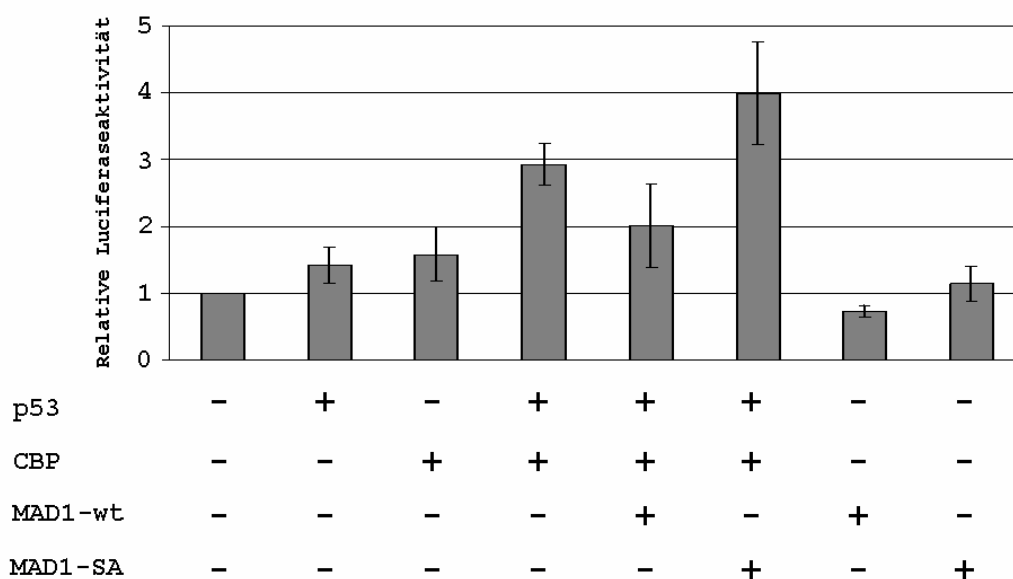


Abbildung 3.28: **MAD1-Mutante besitzt keine repressorische Wirkung auf den *PTEN*-Promotor**

HEK293-Zellen wurden mit dem Luciferase-Reporterplasmid pGL3PTEN2526/427 und dem Expressions-Vektor pEQ176p $\beta$ Gal transfiziert. Die Expressions-Plasmide für p53, CBP, MAD1 und MAD1-S145A wurden, wie angegeben, cotransfiziert. Die gemessene Luciferase-Aktivität wurde mit der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität normalisiert und die Aktivität des Reportergen-Konstruktes gleich „1“ gesetzt.

Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Verlust der Phosphorylierung an Serin-145 von MAD1 zu einem reduzierten Abbau über das Proteasom führt. Da in apoptotischen Zellen eine vergleichbare Degradation von MAD1 und der MAD1-Mutante nachgewiesen werden konnte, wurde durch dieses Ergebnis der proteasomal-unabhängige Abbau von MAD1 in apoptotischen Zellen bestätigt.

Zusätzlich zeigte sich, dass die Phosphorylierung von MAD1 essentiell für den anti-apoptotischen Effekt des Transkriptionsfaktors ist, wobei erste Experimente zeigen, dass die Phosphorylierung von MAD1 für die Repression des *PTEN*-Promoters notwendig ist.

## 4 Diskussion

### 4.1 Der anti-apoptotische Effekt von MAD1

#### 4.1.1 MAD1 inhibiert Apoptose durch die Repression von Zielgenen

Der programmierte Zelltod kann durch Stimuli verschiedenster Art eingeleitet werden. Dabei werden mehrere Arten der Apoptose-Initiation unterschieden, wie z.B. die Rezeptor- und Onkogen-vermittelte Apoptose oder der durch DNA-Schädigung, UV-Strahlung und durch Wachstumsfaktor-Entzug hervorgerufene Zelltod. Allen gemeinsam ist die Aktivierung von Caspasen. Abhängig vom Zell-Typ, der Expression, der in den Zelltod involvierten Faktoren und dem physiologischen Zustand der Zelle können die Zellen resistent gegen einen bestimmten Stimulus sein oder innerhalb weniger Minuten die Apoptose einleiten.

Der Transkriptionsfaktor MAD1 inhibiert die durch verschiedene Stimuli eingeleitete Apoptose. Dazu gehören der durch die Rezeptoren Fas und TRAIL vermittelte Zelltod, sowie die durch UV-Strahlung induzierte oder durch Onkogen-Expression hervorgerufene Apoptose (Gehring et al., 2000). Ziel dieser Arbeit war es, mehr über den Einfluss von MAD1 auf die Apoptose und vor allem über die Regulation des Transkriptionsfaktors selbst in apoptotischen Zellen herauszufinden.

In dieser Arbeit wurden für die Bestimmung der Apoptose hauptsächlich zwei Methoden angewandt. Zum einen wurde die Morphologie fixierter Zellen betrachtet, zum anderen wurde die Spaltung von PARP1 untersucht. Die charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zelle, wie die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen an der Zellmembran sowie das Abschnüren von *apoptotic bodies* sind eindeutige Zeichen dafür, dass eine Zelle den programmierten Zelltod durchläuft. Bei der hier verwendeten Kombination des Nachweises von kondensiertem Chromatin und der Auswertung der morphologischen Veränderungen der Zellen handelt es sich um eine verlässliche Methode zur Bestimmung der Apoptoserate. In MAD1 exprimierenden Zellen konnte eine drastische Reduktion der durch  $\alpha$ -Fas oder Staurosporin ausgelösten Apoptose

nachgewiesen werden (Abbildung 3.1,Abbildung 3.8). Dieser anti-apoptotische Effekt von MAD1 wurde ebenfalls durch die Analyse der DNA-Fragmentierung belegt (Abbildung 3.2). Die Inhibition der Apoptose durch MAD1 bestätigte sich in verschiedenen Zell-Typen bei der Fas-vermittelten Apoptose durch die Inhibition der Spaltung von Procaspase-3 und die dadurch hervorgerufene Verzögerung des PARP1-*cleavage* (Abbildung 3.3, Abbildung 3.9A, Abbildung 3.10A). Dieser Effekt ist auch eindeutig nach der Behandlung mit Staurosporin zu sehen (Abb: 3.8, Abbildung 3.9B,Abbildung 3.10B). Die bereits bekannte Inhibition der Apoptose durch MAD1 konnte demzufolge in dieser Arbeit durch verschiedene Nachweis-Methoden verifiziert werden.

Bei MAD1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, dessen Einfluss auf das Zell-Verhalten aus der Regulation von Zielgenen resultiert. Die Repression des PTEN-Gens und die dadurch hervorgerufene Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges ist für die MAD1-abhängige Inhibition der Apoptose essentiell (Rottmann et al., 2008). Bei PTEN handelt es sich um ein häufig mutiertes Gen in humanen Tumoren des Gehirns, der Prostata und der Gebärmutter (Li et al., 1997a). PTEN führt zu einer Sensibilisierung für die durch die Todesrezeptoren TNF-, Fas- und TRAIL-vermittelte Apoptose, jedoch nicht für den durch UV-Strahlung-induzierten Zelltod (Yuan and Whang, 2002). Der Verlust von PTEN hat die konstitutive Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase AKT und dadurch das Überleben der Zelle zur Folge (Myers et al., 1998).

In dieser Arbeit konnte durch verschiedene Deletionsmutanten von MAD1 gezeigt werden, dass alle Domänen, die für die transkriptionelle Regulation von Zielgenen unerlässlich sind, auch für die Inhibition der Apoptose notwendig sind (Abbildung 3.5). So werden die Interaktion mit dem Heterodimerisierungs-Partner MAX und die Bindung an die DNA über den bHLH-Leucin-*Zipper* genauso benötigt, wie die Rekrutierung des mSIN3-Repressor-Komplexes durch die SID im N-terminalen Bereich und die regulatorischen Elemente im C-terminalen Bereich des Proteins. Dieses Resultat belegt eindeutig, dass MAD1 seinen anti-apoptotischen Effekt ausschließlich durch die Repression von Zielgenen vermittelt.

#### **4.1.2 Phosphorylierung von MAD1 aktiviert die Genregulation**

Eukaryotische Transkriptionsfaktoren bestehen typischerweise aus getrennten Domänen für die DNA-Bindung und die Rekrutierung von Repressor- bzw. Aktivator-Komplexen, welche wiederum durch posttranslationale Modifikationen streng kontrolliert werden (Hunter and Karin, 1992). So wird MAD1 von AGC-Kinasen an Serin-145 phosphoryliert

(Abbildung 3.24) (Zhu et al., 2008). Das Serin-145 liegt im C-terminalen Bereich des MAD1-Proteins, welcher nicht weiter charakterisierte regulatorische Elemente aufweist (Barrera-Hernandez et al., 2000) (Abbildung 3.23). Bei der Phosphorylierung könnte es sich um die hierfür notwendige regulatorische Modifizierung handeln, durch die die Bindung an die E-Box beeinflusst wird. In dieser Arbeit konnte durch den Einsatz der entsprechenden Phospho-Mutante nachgewiesen werden, dass die Expression von PTEN nur durch phosphoryliertes MAD1 reprimiert wird (Abbildung 3.28). Da aus der Inhibition von PTEN die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs resultiert, erklärt sich auch die beobachtete Notwendigkeit der Phosphorylierung von MAD1 an Serin-145 für dessen anti-apoptischen Effekt (Abbildung 3.26, Abbildung 3.27). Erstaunlicherweise wurde für die Repression von *hTERT* (*human telomerase reverse transcriptase*) durch MAD1 der gegenteilige Effekt festgestellt, wo die Phosphorylierung an Serin-145 zum Verlust der Regulation des Zielgens führt (Chou et al., 2009). Somit hat die durch Serum-Stimulation ausgelöste Phosphorylierung von MAD1 das Ausbleiben der *hTERT* Regulation zur Folge, was zum Fortschreiten des Zellzyklus und des Zellwachstums führt, während die Repression von *PTEN* durch diese Phosphorylierung das Überleben der Zelle ermöglicht. Demzufolge handelt es sich nicht um widersprüchliche Ergebnisse, sondern um einen Hinweis auf unterschiedliche Möglichkeiten für MAD1 ein Zielgen zu reprimieren und so eine genspezifischer Mechanismus postuliert werden.

Um die phosphorylierungs-abhängige Regulation durch MAD1 in weiteren Experimenten zu analysieren, bietet sich der Einsatz von Phosphomimic-Mutanten an. Hierbei sind die Untersuchung weiterer Zielgene und deren Auswirkungen auf das Zellverhalten unumgänglich. Zusätzlich wäre die Analyse der jeweiligen Komponenten des Repressor-Komplexes nahe liegend.

### **4.1.3 Positiver *feedback loop* über den PI3K/AKT-Signalweg**

Der Transkriptionsfaktor MAD1 kann nicht nur aktivierend auf den PI3K/AKT-Signalweg einwirken, sondern wird selbst durch eine positive Rückkopplung von diesem in seiner Aktivität reguliert. Ein reprimiertes Zielgen von MAD1 ist das des Tumorsuppressors PTEN (Rottmann et al., 2008), dessen Funktionen im Wesentlichen aus der Lipid-Phosphatase-Aktivität resultieren. Das hauptsächliche Substrat von PTEN ist Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) (Maehama and Dixon, 1998; Myers et al., 1998) welches aus der Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP<sub>2</sub>) durch PI3K entsteht (Abbildung 4.1). Abhängig von PIP<sub>3</sub> kommt es zur Rekrutierung von



AKT und dessen Aktivierung durch PDK1/2 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1/2*) (Bellacosa et al., 1998). Aktiviertes AKT hat Einfluss auf zelluläre Funktionen, wie z.B. die Proliferation, das Wachstum und das Überleben der Zelle. Neben anderen Substraten phosphoryliert AKT den TSC (*tuberous sclerosis complex*) und hebt damit dessen inhibitorischen Einfluss auf mTOR (*mammalian target of rapamycin*) auf. Die Aktivierung des mTOR-Komplexes führt zur Phosphorylierung von S6K1. Diese AGC-Kinase weist ein NLS (*nuclear localization signal*) auf und wird nach Serum-Stimulation in den Zellkern transportiert (Panasyuk et al., 2006), wo sie MAD1 an Serin-145 phosphoryliert (Zhu et al., 2008). Erst diese Modifizierung ermöglicht die Repression von *PTEN* durch MAD1, wodurch sich der Kreis schließt und das Überlebens-Signal aufrecht erhalten bleibt.

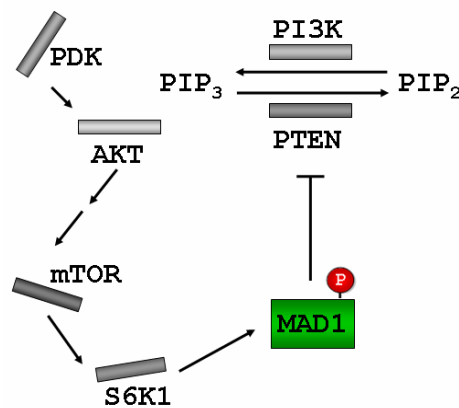


Abbildung 4.1: **Positiver *feedback-loop* über den PI3K/AKT-Signalweg**

Das Verhältnis von  $PIP_3$  zu  $PIP_2$  wird durch PI3K und PTEN reguliert und beeinflusst die Aktivierung von AKT durch PDK. Diese führt über mTOR zur Phosphorylierung von MAD1 durch S6K1 und ermöglicht so die Repression der PTEN-Expression.

## 4.2 Proteasomaler Abbau von MAD1

### 4.2.1 Ubiquitinierung von MAD1

Bei vielen Transkriptionsfaktoren, speziell bei denen die in die Regulation des Zellzyklus involviert sind, handelt es sich um kurzlebige Proteine, die durch Ubiquitin modifiziert und durch das Proteasom abgebaut werden (Glickman and Ciechanover, 2002). Dabei handelt es sich um eine stringente Kontrolle der aktiven Transkriptionsfaktoren und der durch sie regulierten Zielgene (Sundqvist and Ericsson, 2003).

Die Behandlung von Zellen mit dem Proteasomen-Inhibitor MG132 führte zu einer Anreicherung des MAD1-Proteins (Abbildung 3.17) was zeigt, dass MAD1 über das

26S-Proteasom abgebaut wird. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass durch MG132 auch ein induzierender Effekt auf die Transkription von MAD1 ausgeübt wird (unveröffentlichte Daten von Nadine Hein), was die Anreicherung des Proteins zusätzlich begünstigen könnte. Das 26S-Proteasom weist sowohl Trypsin-ähnliche als auch Chymotrypsin-ähnliche Aktivität auf und spaltet die Proteine zusätzlich nach sauren Aminosäuren. Mit Hilfe der ExPASy-Software PeptideCutter konnten 40 potentielle Schnittstellen für Trypsin und 46 für Chymotrypsin in der Aminosäure-Sequenz von MAD1 identifiziert werden. Die für den proteasomalen Abbau relevante Domäne von MAD1 konnte jedoch nicht eingegrenzt werden (Abbildung 3.19). Die für den Abbau von Proteinen typische Poly-Ubiquitinierung wurde bei dem Transkriptionsfaktor MAD1 in Zellen eindeutig nachgewiesen (Abbildung 3.18) und zusätzlich durch *in vitro*-Experimente bestätigt (Xu et al., 2007). In weiteren Analysen könnte die Modifizierung von MAD1 auf die Art der Ubiquitin-Verknüpfung untersucht werden. Dies könnte mit Hilfe von Antikörpern, die zwischen K48- und K63-verknüpften Poly-Ubiquitinketten unterscheiden, untersucht werden. Zusätzlich wäre der Einsatz von Ubiquitin-Mutanten denkbar, bei denen die für die Verknüpfung relevanten Lysin-Reste gegen Arginin ausgetauscht wären. Hierdurch könnte die Markierung für den proteasomalen Abbau eindeutig identifiziert werden.

Bei der Modifizierung von MAD1 handelt es sich um eine Multi-Poly-Ubiquitinierung, die hauptsächlich in den N- und C-terminalen Bereichen stattfindet, jedoch nicht ausschließlich auf diese beschränkt ist (Abbildung 3.20). Die Poly-Ubiquitinierung eines Proteins muss nicht zwangsläufig an einem Lysin stattfinden. Laut der *N-end-rule* ist diese ebenfalls am N-Terminus möglich. Die drastische Reduktion der Modifizierung des MAD1 $\Delta$ N-Fragmentes im Vergleich zum MAD1-Wildtyp könnte auf ein *N-Degron* schließen lassen. Im Fall von MAD1 würde die Abspaltung der ersten Aminosäure am N-Terminus durch NME (*N-terminal methionine excision*) zu einem N-terminalen Alanin führen. Alanin gehört neben Methionin und Glycin zu den Aminosäuren die stabilisierend auf den N-Terminus wirken. Diese Vermutung eines potentiell stabilen N-terminalen Bereichs konnte auch durch die TerminoNator-Software bestätigt werden (Meinzel et al., 2005). Da es sich bei MAD1 aber um einen kurzlebigen Transkriptionsfaktor handelt, ist eine Modifizierung nach der *N-end-rule* unwahrscheinlich.

Im Bereich der Aminosäuren Lysin-80 und Arginin-91 wurde mit der ePEST-find-Software eine schwache potentielle PEST-Sequenz identifiziert. Dieses Ubiquitinierungs-Signal ist in allen verwendeten MAD1-Fragmenten vorhanden. Aufgrund der sehr schwachen Modifizierung des MAD1 $\Delta$ NC-Fragmentes (Abbildung 3.20) ist diese Sequenz für die Poly-Ubiquitinierung vermutlich nicht relevant. Um in weiteren

Experimenten die in MAD1 poly-ubiquitinierten Lysine zu identifizieren, sind weitere Untersuchungen notwendig. In massenspektrometrischen Analysen könnten die Ubiquitinierungs-Stellen von MAD1 kartiert werden. Das MAD1-Protein weist insgesamt 18 Lysine auf, die einzeln gegen Arginin ausgetauscht werden könnten. Hierbei sollte als Negativkontrolle eine Lysin-freie *full length*-Mutante verwendet werden. Weil in dieser Mutante keine Lysine vorhanden sind, dürfte keine Ubiquitinierung erfolgen. Erste Experimente mit einer Lysin-losen Mutante von MAD1 zeigten eine erhebliche Reduktion der Poly-Ubiquitinierung, jedoch keinen kompletten Verlust (Daten nicht gezeigt). Hierfür spricht, dass es neben Lysin auch zu der Modifizierung von Serin und Threonin durch Ubiquitin kommen kann (Wang et al., 2007). Zusätzlich besteht hier die Gefahr, dass der Austausch aller Lysine auch andere Eigenschaften des Proteins beeinträchtigt, wie z.B. die Bildung der Sekundär-Struktur, die Interaktion mit anderen Proteinen oder der DNA sowie posttranslationale Modifikationen.

#### 4.2.2 Ubiquitinierung von MAD1 durch cIAP1

In erster Linie inhibiert c-IAP1 die Apoptose, indem es die katalytische Aktivität von Caspasen blockiert (Wilkinson et al., 2004). Durch seine RING-Domäne kann es auch als E3-Ligase fungieren und so die Ubiquitinierung verschiedener Proteine vermitteln. Es ist bekannt, dass c-IAP1 hauptsächlich im Zellkern vorkommt (Samuel et al., 2005). und mit MAD1 wurde kürzlich sein erstes nukleäres Substrat identifiziert (Xu et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von c-IAP1 zu verstärkter Poly-Ubiquitinierung von MAD1 führt und dadurch dessen sowieso schon kurze Halbwertszeit deutlich reduziert (Xu et al., 2007). Hierdurch wurde ein Mechanismus aufgezeigt, durch den c-IAP1 den Zellzyklus positiv beeinflussen kann. Für den durch Serum- oder Insulin-induzierten Abbau wird c-IAP1 jedoch nicht benötigt, woraus geschlossen wurde, dass es weitere E3-Ligasen für MAD1 geben muss (Zhu et al., 2008). Eine Funktion von c-IAP1 beim Abbau von MAD1 in apoptotischen Zellen ist demzufolge fragwürdig. Dies könnte jedoch durch Überexpressions-Experimente, bei denen c-IAP1 mit einer enzymatisch inaktiven Mutante verglichen wird, in apoptotischen Zellen untersucht werden. Ergänzend wäre die Analyse der Protein-Stabilität von MAD1 in apoptotischen Zellen bei einem *knock-down* von c-IAP1 hierbei hilfreich.

### 4.2.3 Proteasomaler Abbau von phosphoryliertem MAD1

Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges führt zur Phosphorylierung von MAD1 an Serin-145. Abhängig davon kommt es zu verstärkter Poly-Ubiquitinierung von MAD1 und dessen Degradation durch das 26S-Proteasom (Zhu et al., 2008). Während die S6K1 so zu einer phosphorylierungs-abhängigen Degradation von MAD1 führt, vermittelt die E3-Ligase c-IAP1 dessen Abbau durch phosphorylierungs-unabhängige Ubiquitinierung (Abbildung 4.2). Somit beeinflusst die Phosphorylierung von MAD1 einerseits dessen Aktivität (Abbildung 3.28) und führt andererseits zu verstärkter Poly-Ubiquitinierung bzw. zum schnellen Abbau des Transkriptionsfaktors, wodurch sich die stringente Kontrolle von MAD1 offenbart.

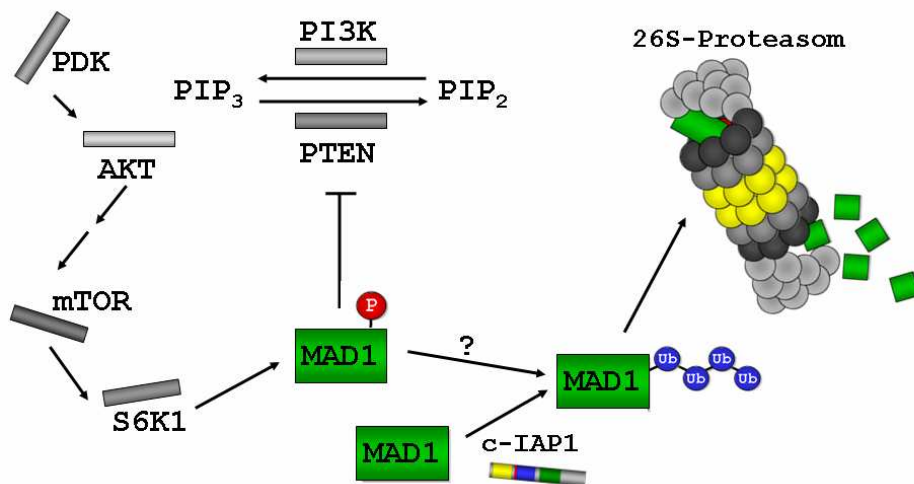


Abbildung 4.2: **Proteasomaler Abbaus von MAD1**

Der aktive PI3K/AKT-Signalweg führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von MAD1. Diese Phosphorylierung dient auch als Signal für die Ubiquitinierung und den anschließenden proteasomalen Abbau. Die E3-Ligase c-IAP1 vermittelt dagegen phosphorylierungs-unabhängigen Abbau von MAD1 über das 26S-Proteasom.

## 4.3 Proteasom-unabhängiger Abbau von MAD1

### 4.3.1 Degradation von MAD1 in apoptotischen Zellen

In apoptotischen Zellen konnte eine Reduktion von MAD1 festgestellt werden (Abbildung 3.6, Abbildung 3.8), die auf eine verstärkte Degradation des Proteins zurückgeführt werden kann und nicht auf reprimierte Transkription (Abbildung 3.7). Die Beobachtung, dass unter apoptotischen Bedingungen keine verstärkte Poly-Ubiquitinierung von MAD1 vorkommt (Abbildung 3.22), sowie dass die Inhibition des Proteasoms die Degradation

nicht verhindert (Abbildung 3.21), zeigt, dass der Abbau von MAD1 während der Apoptose nicht über das Proteasom erfolgt. Für diese Degradation in apoptotischen Zellen ist die Phosphorylierung von MAD1 nicht notwendig (Abbildung 3.26).

### 4.3.2 Proteolytische Spaltung von MAD1 durch Caspasen

Für den Abbau von Proteinen, die selektiv in apoptotischen Zellen gespalten werden, sind hauptsächlich die kaskadenartig aktivierten Caspasen verantwortlich. Ihre Substrate sind an Signalübertragungen, der Genexpression, der Regulation des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und dem strukturellen Aufbau der Zelle beteiligt.

Die Spaltung von GST-MAD1 durch die rekombinanten Effektor-Caspasen -3 und -6 konnte in dieser Arbeit durch *in vitro*-Assays gezeigt werden (Abbildung 3.15). Die Größen der nachgewiesenen Spaltprodukte gaben Hinweise auf die Lage von potentiellen Caspase-Schnittstellen. Eine Sequenz-Analyse von MAD1 mit Hilfe des CASVM-Servers 1.0 führte zu drei potentiellen nicht-kanonischen Caspase-Schnittstellen, deren P1-Positionen Glutaminsäure aufweisen (DYLE-20, DREE-161, DSDE-188). Zwei dieser potentiellen Schnittstellen liegen in den Bereichen, die auch durch den *in vitro*-Assay ermittelt wurden. Demzufolge würde es sich bei MAD1 um ein Caspase-Substrat mit nicht-kanonischer Schnittstelle handeln, wie bei seinem Dimerisierungs-Partner MAX (IEVE), dessen Glutaminsäure in Position P1 durch die Protein-Kinase CK2 phosphoryliert und so die Spaltung durch Caspase-5 reguliert (Krippner-Heidenreich et al., 2001).

In apoptotischen Zellen konnte bisher zwar die Reduktion des MAD1-Proteins nachgewiesen werden, jedoch keine Spaltprodukte. Im Gegensatz zu dem Ergebnis des *in vitro*-Assays führte die Verwendung von spezifischen Inhibitoren gegen Caspase-3 und Caspase-9 in Zellen nicht zu einer Verringerung der Degradation (Abbildung 3.14), weshalb ihre Beteiligung ausgeschlossen werden kann. Die Behandlung mit dem generellen Caspase-Inhibitor führte dagegen zu einer Stabilisierung von MAD1 in apoptotischen HeLa-Zellen (Abbildung 3.13). Für weitere Untersuchungen des Abbaus von MAD1 in apoptotischen Zellen müssten weitere spezifische Caspase-Inhibitoren eingesetzt werden. Alternativ könnte durch die Überexpression von c-FLIP<sub>s</sub> die Aktivierung von Procaspase-8 am Fas-Rezeptor unterbunden und so die Beteiligung der Caspasen am Abbau von MAD1 bestätigt werden. Solange es jedoch nicht möglich ist, Spaltprodukte in Zellen nachzuweisen und diese z.B. massenspektrometrisch im Bezug auf die relevante Schnittstelle zu analysieren, gibt es keine eindeutigen Beweise dafür,

dass es sich bei MAD1 um ein direktes Caspase-Substrat handelt. Es wäre ebenso gut möglich, dass die Caspasen einen indirekten Effekt auf die Degradation von MAD1 ausüben.

### **4.3.3 Modell des Abbaus von MAD1 in apoptotischen Zellen durch HtrA2/Omi**

Neben der Aktivierung der Caspasen kommt es während der Apoptose auch zur Spaltung von Proteinen durch Serin-Proteasen. Den Serin-Proteasen Granzym B und HtrA2/Omi können wichtige Funktionen beim programmierten Zelltod zugeschrieben werden (Moffitt et al., 2007), weil durch die Verwendung von deren Inhibitoren typische apoptotische Merkmale ausbleiben (Grabarek et al., 2002; Rideout et al., 2001). Zu den Substraten von HtrA2/Omi gehören anti-apoptotische Proteine, wie z.B. HAX-1 (*HS1-associated protein X-1*) oder WT (*Wilms tumor suppressor*) (Cilenti et al., 2004). Somit ist HtrA2/Omi ein viel versprechender Kandidat für die Proteolyse des anti-apoptotischen MAD1 während des fortgeschrittenen Zelltodes (Abbildung 3.6). HtrA2/Omi befindet sich, wie Cytochrom c und Smac/DIABLO, im Intermembranraum der Mitochondrien (Hegde et al., 2002), aus dem es aufgrund diverser apoptotischer Stimuli ins Cytosol entlassen wird (Abbildung 4.3) (van Loo et al., 2002). Die Ausschüttung aus dem Mitochondrium wird durch Bcl-2 verhindert, genauso wie der Abbau von MAD1 in apoptotischen Zellen (Abbildung 3.11). Das Mitochondrium wird durch die Inhibition der Caspasen während der Rezeptor-induzierten Apoptose nicht involviert. Vorrangig führt die Blockade von Caspase-8 dazu, dass es nicht zur Ausschüttung von Cytochrom c und HtrA2/Omi kommt, wodurch sich auch das Ausbleiben der Degradation von MAD1 in Anwesenheit von z-VAD-fmk erklären lässt (Abbildung 3.13). Weder die Inhibition der Effektor-Caspasen noch die der aktiven Caspase-9 verhindern die Freisetzung pro-apoptotischer Moleküle aus dem Intermembranraum. Folglich führt ihre Inhibition auch nicht zur Stabilisierung von MAD1 (Abbildung 3.14).

In ersten Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass Überexpression von HtrA2/Omi, im Gegensatz zu einer katalytisch inaktiven Mutante, zu verstärktem Abbau von MAD1 führte (Daten nicht gezeigt). Wie schon bei der Staurosporin-induzierten Apoptose nachgewiesen (Abbildung 3.26), trifft dies auch auf die nicht phosphorylierbare Mutante von MAD1 zu (Daten nicht gezeigt). Die Annahme, dass es sich bei MAD1 um ein weiteres Substrat von HtrA2/Omi handelt, sollte zunächst durch Apoptose-Experimente in HtrA2/Omi-defizienten Zellen bestätigt werden. In diesem Falle muss

ergänzend die Phosphorylierungs-Unabhängigkeit der Proteolyse durch den Einsatz einer Phosphomimic-Mutante belegt werden.

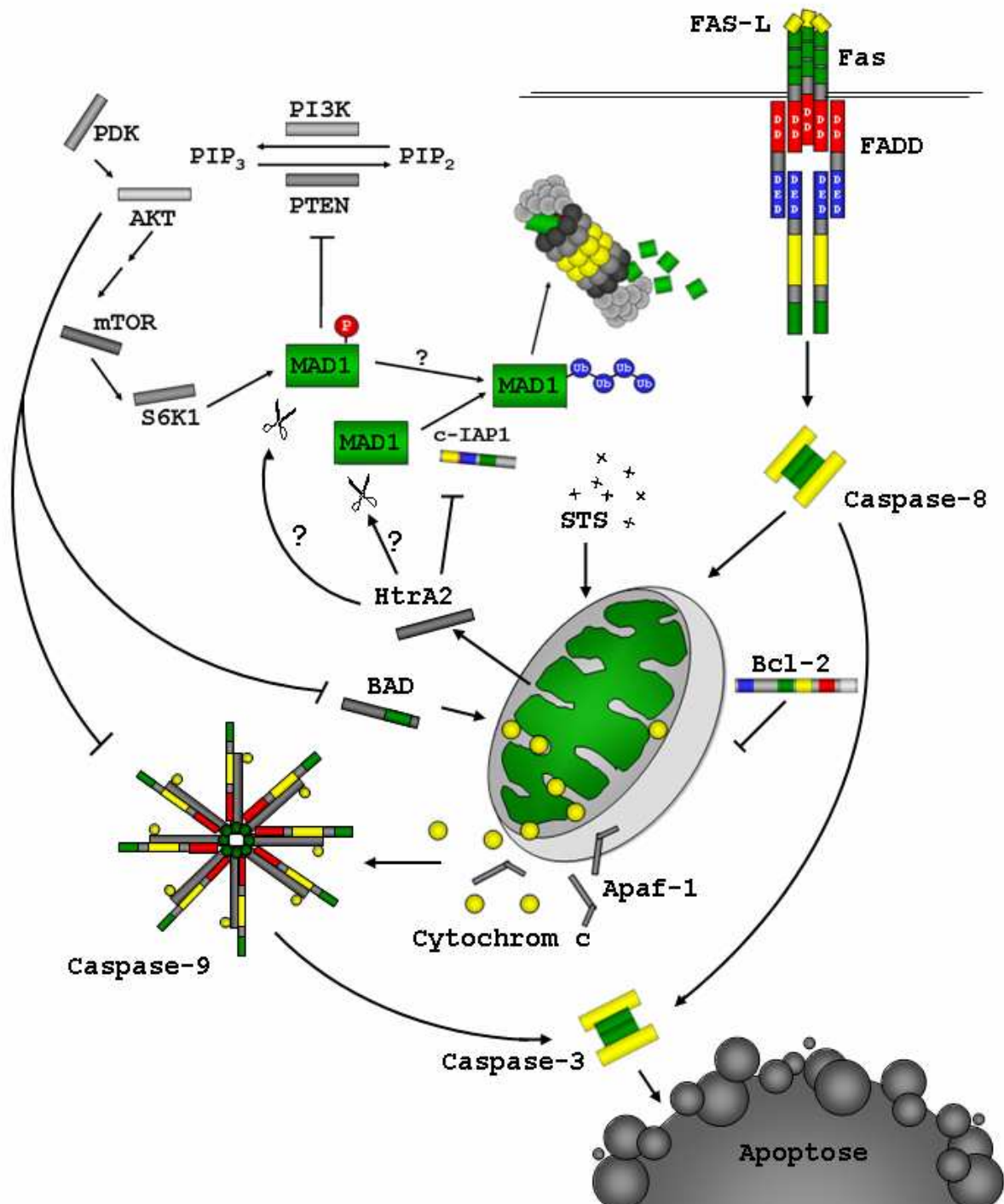


Abbildung 4.3: **Modell für den nicht-proteasomalen Abbau von MAD1 in apoptotischen Zellen**

Die Induktion der Apoptose durch den Fas-Rezeptor oder Staurosporin (STS) führt zur Aktivierung der Caspase-Kaskade und zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Der so ermöglichte Austritt von Cytochrom c und Apaf-1, der durch Bcl-2 inhibiert werden kann, führt zur Formierung von Caspase-9. Die Freisetzung von HtrA2/Omi könnte, neben dem MAD1-Abbau durch das Proteasom, zur Proteolyse von MAD1 führen und dadurch die Repression der PTEN-Expression verhindern. Hierdurch bleibt die Inhibition von Caspase-9 und BAD aus, die die anti-apoptotische Wirkung des PI3K/AKT-Signalwegs ermöglicht.

Zusammenfassend erklärt das Modell plausibel, dass es sich wahrscheinlich bei HtrA2/Omi um die Protease handelt, die für den beobachteten zusätzlichen Abbau von MAD1 während der Apoptose verantwortlich ist. Es kann die Inhibition des programmierten Zelltodes durch MAD1 veranschaulichen und aufzeigen, wie die Degradation von MAD1 in der fortgeschrittenen Apoptose zum Verlust der Inhibition von Caspase-9 und BAD durch AKT führt.

Durch diese Arbeit war es möglich, detailliertere Erkenntnisse über die Rolle des Transkriptionsfaktors MAD1 in der Apoptose, dessen regulatorische Funktion durch diese reguliert wird, zu gewinnen.



## 5 Material und Methoden

### 5.1 Reagenzien, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien und Fertiglösungen wiesen den Reinheitsgrad p.a. auf und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Biosciences, Amicon, AppliChem, Baker, Bayer, BD Biosciences, Biozym, Biomol, Boehringer, Calbiochem, Clontech, Delta, Difco, Du Pont, Eurogentech, Fluka, GE Healthcare, Gibco, Invitrogen, KMF, Fermentas, Merck, MP Biomedicals, New England Biolabs, Perkin Elmer, Qiagen, Promega, Riedel-de-Haën, Roche, Rockland, Roth, Santa Cruz, Seromed, Serva, Sigma und Stratagene, Zymo Research.

Verbrauchsmaterialien stammen von den Firmen:

Amersham Biosciences, Ansell, Beckman, Becton Dickinson, Beranek, Biometra, Bio-Rad, Brand, Braun, Biozym, Corning, Costar, Eppendorf, Falcon, Fisher Scientific, Fuji, Gilson, Greiner, Hartenstein, Integra Biosciences, Kimberley-Clark, Kodak, Macherey-Nagel, Millipore, Nalgene, Nerbe Plus, Nunc, Pharmacia, Qiagen, Roth, Sarstedt, Sartorius, Schleicher&Schuell Stratagene, Terumo, TPP, VWR, WillCo Wells, Whatman.

### 5.2 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von MWG Biotech, Germany bezogen:

Sequenzierprimer

Name	Sequenz 5' → 3'
CMV-for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
EGFP-C-for	CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G
EGFP-N-rev	CGT CGC CGT CCA GCT CGA CCA G
GW-for	GAG GTC TAT ATA AGC AGA GC
GW-rev	CAA CGG TGG TAT ATC CAG TG
M13(-21)-for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT

Klonierungsprimer

Name	Sequenz 5' → 3'
attB1_Mad1	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTC CAT GGC GGC GGC GGT TCG GAT GAA

<i>attB2_Mad1</i>	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT TTA GAG ACC AAG ACA CGC CTT GTG
<i>attB1_Mad1dN</i>	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTC CAG CAG ATC AAC TCA CAA TGA AAT G
<i>attB2_Mad1dC</i>	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CTA CTC CGA GGA GAC GGT GGA

Mutageneseprimer

Name	Sequenz 5' → 3'
MADS145A-for	GAG AGG ATC CGG ATG GAC GCC ATC GGC TCC ACC GTC TCC
MADS145A-rev	GGA GAC GGT GGA GCC GAT GGC GTC CAT CCG GAT CCT CTC

qRT-PCR-Primer

Name	Sequenz 5' → 3'
b-GUS_for	CTC ATT TGG AAT TTT GCC GAT T
b-GUS-rev	CCG AGT GAA GAT CCC CTT TTT A
Hs_MXD1-1SG	QT00082915

## 5.3 Plasmide

Eukaryotische Expressionsplasmide

pEQ176P2	Durch Restriktionsverdau von pEQ176 mit <i>PvuII</i> und Religation des verbleibenden Vektors wurde ein Großteil der $\beta$ -Galactosidase-cDNA entfernt. Dieser Vektor wurde zum Auffüllen der Transfektionsansätze auf gleiche DNA-Mengen eingesetzt. (Firzlaff et al., 1991)
pEQ176- $\beta$ -Gal	Der frühe ( <i>immediate early</i> ) Cytomegalie-Virus (CMV)-Promotor exprimiert konstitutiv die $\beta$ -Galactosidase in eukaryotischen Zellen. Außerdem trägt der Vektor Replikationsursprungs-Sequenzen ( <i>origin of replication</i> ) für bakterielle (von pBR322) und eukaryotische Zellen (von SV40) und kodiert für Ampizillinresistenz. Dieser Vektor wurde zur Standardisierung der transienten Transfektion genutzt. (Firzlaff et al., 1991)
pEGFP-C3	Vektor codiert unter der Kontrolle eines CMV-Promoters für eine optimierte Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Der Vektor weist einen bakteriellen und eukaryotischen (f1) Replikationsursprung auf und kodiert für Resistenzen gegen Kanamycin und Neomycin. Der Vektor wurde zum Ermitteln der Transkriptionsrate in Apoptose Assays verwendet. (Clontech)
pBabePuro-Bcl2	Die cDNA von humanem <i>Bcl-2<math>\alpha</math></i> wurde über die <i>BamHI</i> Restriktionsstelle in den Vektor pBabePuro eingesetzt. (G.I. Evan)
pCR3Fas	Die cDNA des humanen Fas-Rezeptors wurde über <i>BamHI/XbaI</i> in den pCR3-Vektor von Invitrogen kloniert. Das Insert steht unter der Kontrolle eines CMV-Promoters; der Vektor kodiert für Resistenzen gegen Neomycin, Ampicillin und Kanamycin. (J.Tschopp)
pCMV-Mad1	Die <i>MAD1</i> cDNA wurde aus pVZ durch <i>NotI/EcoRI</i> herausgeschnitten und nach einer Klenow-Behandlung in den <i>XhoI</i> geschnittenen Vektor pEQ176P2 kloniert. (Cerni et al., 1995)

pCMV-MAD1ΔN	Durch PCR wurde die cDNA von <i>MAD1</i> beginnend mit der DNA-Bindungsstelle amplifiziert und mit Restriktionsschnittstellen versehen. Das Fragment wurde dann in den <i>Asp718/PvuII</i> geschnittenen Vektor pEQ176P2 ligiert. (S. Schreek)
pCMV-MAD1ΔC	Mit Hilfe von <i>HindIII</i> und <i>KpnI</i> wurde aus dem Vektor pSPMAD1ΔC das <i>MAD1</i> Fragment ohne C-Terminus aber mit Hepatitis B Polyadenylation-Site ausgeschnitten und in den Vektor pEQ176P2 kloniert
pCMV-MAD1ΔNC	Die cDNA von <i>MAD1</i> ohne den N- und C-Terminus wurde mittels <i>HindIII</i> und <i>KpnI</i> aus dem Vektor pSPMAD1ΔNC in den Vektor pEQ176P2 überführt. (M. Henriksson)
pCMV-Mad1ΔBR	Das <i>HindIII/KpnI</i> Fragment wurde von pSPΔBR in pEQ176P2 umklont. Kodiert für eine <i>MAD1</i> -Mutante, welche aufgrund der fehlenden basischen Region nicht mehr an DNA binden kann. (D. Ayer)
pCMV-MAD1ΔLZ	Die Sequenz von <i>MAD1</i> mit fehlendem Leucin- <i>Zipper</i> wurde durch <i>BamHI/HindIII</i> aus dem Vektor pSPMAD1ΔLZ in den Vektor pEQ176P2 überführt. (S. Hilfenhausen)
GW-pECFP-MAD1	Humanes <i>MAD1</i> aus Vektor GW-pENTR-MAD1 wurde mit einer LR-Reaktion in GW-pECFP-Cass1 rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pECFP-MAD1ΔN	Humanes <i>MAD1</i> ohne den N-Terminus wurde in einer LR-Reaktion aus GW-pENTR-MAD1ΔN in den Vektor GW-pECFP-Cass1 rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pECFP-MAD1ΔC	Humanes <i>MAD1</i> ohne den C-Terminus wurde in einer LR-Reaktion aus GW-pENTR-MAD1ΔC in den Vektor GW-pECFP-Cass1 rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pECFP-MAD1ΔNC	Das humane <i>MAD1</i> -Fragment wurde in einer LR-Reaktion aus GW-pENTR-MAD1ΔNC in den Vektor GW-pECFP-Cass1 rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pECFP-MAD1ΔBR	Humanes <i>MAD1</i> ohne die DNA-Binderegion wurde in einer LR-Reaktion aus GW-pENTR-MAD1ΔBR in den Vektor GW-pECFP-Cass1 rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pECFP-MAD1ΔLZ	Humanes <i>MAD1</i> ohne den Leucin- <i>Zipper</i> wurde in einer LR-Reaktion aus GW-pENTR-MAD1ΔLZ in den Vektor GW-pECFP-Cass1 rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pECFP-MAD1S145A	Dieser Vektor wurde, ausgehend von dem Vektor GW-pECFP-MAD1, mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit und den MADS145A Primern erstellt. Im exprimierten Protein ist die Aminosäure Serin an der Position 145 gegen Alanin ausgetauscht. (S. Speckgens)
GW-pHA-MAD1	Humanes <i>MAD1</i> aus Vektor GW-pENTR-MAD1 wurde mit einer LR-Reaktion in GW-pHA rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pHA-MAD1ΔN	Humanes <i>MAD1</i> ohne N-Terminus wurde aus dem Vektor GW-pENTR-MAD1ΔN mit einer LR-Reaktion in den Vektor GW-pHA rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pHA-MAD1ΔC	Humanes <i>MAD1</i> ohne C-Terminus wurde aus dem Vektor GW-pENTR-MAD1ΔC mit einer LR-Reaktion in den Vektor GW-pHA rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pHA-MAD1ΔNC	Das humane <i>MAD1</i> -Fragment wurde aus dem Vektor GW-pENTR-MAD1ΔNC mit einer LR-Reaktion in den Vektor GW-pHA rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pHA-MAD1ΔBR	Humanes <i>MAD1</i> ohne DNA-Binderegion wurde aus dem Vektor GW-pENTR-MAD1ΔBR mit einer LR-Reaktion in den Vektor GW-pHA rekombiniert. (S. Speckgens)

GW-pHA-MAD1ΔLZ	Humanes <i>MAD1</i> ohne Leucin- <i>Zipper</i> wurde aus dem Vektor GW-pENTR-MAD1ΔLZ mit einer LR-Reaktion in den Vektor GW-pHA rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pHA-MAD1S145A	Dieser Vektor wurde, ausgehend von dem Vektor GW-pHA-MAD1, mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit und den MADS145A Primern erstellt. Im exprimierten Protein ist die Aminosäure Serin an der Position-145 gegen Alanin ausgetauscht. (S. Speckgens)
pGL3PTEN 2526/427	Luciferase-Reportergen-System: Der pGL3-Vektor enthält keine eukaryotische Promotor und Enhancer-Sequenz. Expression der Luciferase hängt von dem integrierten Promotor ab. Über <i>NheI</i> und <i>HindIII</i> wurde die <i>PTEN</i> cDNA Region -2526/-427 (AF067844) kloniert. Zusätzlich trägt der Vektor bakterielle und eukaryotische (f1) Replikationsursprungs-Sequenzen. Der Vektor wurde von Tak W. Mak (Toronto) zur Verfügung gestellt. (Stambolic et al., 2001)
pVR1012Gal 4-CBP	Die murine cDNA von <i>CBP</i> wurde als <i>BamHI</i> Fragment aus pRSV-HA-CBP in die <i>BamHI</i> Schnittstelle von pVR1012Gal4 eingefügt. (Snowden et al., 2000)
pRc/CMV-p53wt	Humane cDNA von <i>p53</i> wurde durch <i>HindIII/XbaI</i> in pRc/CMV (Invitrogen) kloniert. Dieser Vektor kodiert zusätzlich für Ampicillin- und Neomycin-Resistenz.
pCMV-His6-Ubiquitin	Der Expressionsvektor kodiert unter der Kontrolle eines CMV-Promotors für die Expression von His6- <i>Ubiquitin</i> . Der Vektor weist eine Ampicillin-Resistenz auf. (M. Treier)
pCW7-Ub wt	Für diesen Vektor wurde die cDNA von wt- <i>Ubiquitin</i> aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit einem N-terminalen 6xHis- und c-myc-tag über die Restriktionsschnittstellen <i>Clal/EcoRI</i> in den Vektor pRBG4 kloniert. (Ward et al., 1995)

#### Prokaryotische Expressionsplasmide

pGEX3X-MAD1	Ein 840bp großes Fragment aus dem pVZ-MAD1 wurde in den Vektor pGEX-3X integriert. Dem Konstrukt fehlen die ersten 5 Aminosäuren von MAD1. (L. Larsson)
pGEXp21MAX	Dieser Vektor wurde durch PCR-Klonierung hergestellt. Als Ausgangsvektor diente pEMSV-MAX. Das PCR-Produkt von <i>MAXp21</i> wurde über die Restriktionsstellen <i>BamHI/EcoRI</i> in den Vektor pGEX-3X integriert. (Bousset et al., 1993)
pGEXp22MAX	Dieser Vektor wurde durch PCR-Klonierung hergestellt. Als Ausgangsvektor diente pEMSV-MAX. Das PCR-Produkt von <i>MAXp22</i> wurde über die Restriktionsstellen <i>BamHI/EcoRI</i> in den Vektor pGEX-3X integriert. (Bousset et al., 1993)

#### Klonierungsplasmide und Gateway-Vektoren

pDONR/Zeo	Entry-Vektor zum Einbau von <i>attB</i> -flankierten Inserts über Gateway-Rekombination. Er besitzt die Rekombinationsstellen <i>attP1</i> und <i>attP2</i> , welche das Selektionsgen <i>ccdB</i> einschließen, ein Zeocin-Resistenzgen, M13 Promotoren und einen pUC Replikationsursprung. (Invitrogen)
-----------	---

pDONR221	Entry-Vektor zum Einbau von PCR-Produkten über Gateway-Rekombination. Er besitzt die Rekombinationsstellen <i>attP1</i> und <i>attP2</i> , welche das Selektionsgen <i>ccdB</i> einschließen, ein Kanamycin-Resistenzgen, M13 Promotor und einen pUC Replikationsursprung. (Invitrogen)
GW-pENTR-MAD1	Die humane <i>MAD1</i> cDNA wurde mit den Primern <i>attB1_MAD1</i> und <i>attB2_MAD1</i> aus dem Vektor pCMV-MAD1 amplifiziert und mit einer BP-Reaktion in den Vektor pDONR/Zeo rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pENTR-MAD1ΔN	Das <i>MAD1</i> Fragment wurde mit den Primern <i>attB1_MAD1ΔN</i> und <i>attB2_MAD1</i> aus dem Vektor pCMV-MAD1 amplifiziert und mit einer BP-Reaktion in den Vektor pDONR/Zeo rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pENTR-MAD1ΔC	Das <i>MAD1</i> Fragment wurde mit den Primern <i>attB1_MAD1</i> und <i>attB2_MAD1ΔC</i> aus dem Vektor pCMV-MAD1 amplifiziert und mit einer BP-Reaktion in den Vektor pDONR/Zeo rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pENTR-MAD1ΔNC	Das <i>MAD1</i> Fragment wurde mit den Primern <i>attB1_MAD1ΔN</i> und <i>attB2_MAD1ΔC</i> aus dem Vektor pCMV-MAD1 amplifiziert und mit einer BP-Reaktion in den Vektor pDONR/Zeo rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pENTR-MAD1ΔBR	Das <i>MAD1</i> Fragment wurde mit den Primern <i>attB1_MAD1</i> und <i>attB2_MAD1</i> aus dem Vektor pCMV-MAD1ΔBR amplifiziert und mit einer BP-Reaktion in den Vektor pDONR/Zeo rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pENTR-MAD1ΔLZ	Das <i>MAD1</i> Fragment wurde mit den Primern <i>attB1_MAD1</i> und <i>attB2_MAD1</i> aus dem Vektor pCMV-MAD1ΔLZ amplifiziert und mit einer BP-Reaktion in den Vektor pDONR/Zeo rekombiniert. (S. Speckgens)
GW-pENTR-MAD1S145A	Dieser Vektor wurde, ausgehend von dem Vektor GW-pENTR-MAD1, mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit und den MADS145A Primern erstellt. Im exprimierten Protein ist die Aminosäure Serin an der Position-145 gegen Alanin ausgetauscht. (S. Speckgens)
pECFP-Nuc	Der Vektor codiert für ECFP, fusioniert mit einer dreifachen Kopie des NLS des SV40 large-T-Antigen am C-Terminus. (Clontech)
GW-pECFP-CassC1	Dieser Destination-Vektor ermöglicht Fusionen von N-terminalem ECFP. In den Ursprungsvektor pECFP-Nuc wurde über die <i>XhoI/BamHI</i> Schnittstellen die Gateway-Cassette C.1 eingesetzt und die NLS eliminiert. (R.M. Sobota)
pEVRF0-HA	Mit den pEV-HA Vektoren können HA-Epitop getaggte cDNAs in eukaryotischen Zellen unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert werden. Die Vektoren besitzen einen SV40 <i>origin of replication</i> , die Translations-Initiations-Region der HSV Thymidin Kinase, Splicing und Polyadenylierungssignale des Kaninchen β-Globin Gens und beruhen auf der bakteriellen Plasmidsequenz von pSP65. (Matthias et al., 1989)
GW-pHA	Gateway-kompatibler Expressionsvektor für die Expression von Proteinen mit N-terminalem Hämagglutinin-Epitop. Die Gateway-Kassette C1 wurde über die <i>SmaI</i> Schnittstelle in den Vektor pEVRF0-HA kloniert. Der Vektor besitzt einen CMV-Promotor, ein Ampicillin-Resistenzgen, die Rekombinierungsstellen <i>attR1</i> und <i>attR2</i> und einen SV40-Replikationsursprung. (R. Pandithage)

## 5.4 Antikörper

$\alpha$ -Aktin (C4)	Monoklonals Maus IgG1. Die Antikörper erkennen ein Epitop welches von humanen Skelettmuskeln bis zu Pflanzen konserviert ist. (MP Biomedicals).
$\alpha$ -Bcl2 (C-2)	Monoklonale Antikörper aus der Maus gegen die Aminosäuren 1-205 des humanen Bcl-2. (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
$\alpha$ -Caspase-3 (H-277)	Polyklonale Kaninchen Antikörper gegen die Aminosäuren 1-277 von humaner Caspase-3, welche zur Detektion von humaner <i>full length</i> Procaspase-3 sowie aus Maus und Ratte genutzt werden kann. (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
$\alpha$ -Cytochrom c (7H8.2C12)	Aus Zellkulturüberstand Affinitätsgereinigte monoklonale murine Antikörper (IgG2b) gegen die Aminosäuren 93-104 von Tauben Cytochrom c. Erkennt denaturiertes Cytochrom c aus Taube, Pferd, Ratte, Maus und Mensch. (BD Pharmingen TM)
$\alpha$ -Fas (CH11)	Immunoaffinitätsgereinigtes Maus IgM; erkennt das humane Oberflächen Antigen Fas und induziert Apoptose in humanem System sowie bei Maus und Ratte. (Upstate cell signaling solutions)
$\alpha$ -GFP (FL)	Polyklonale Antikörper aus Kaninchen gegen <i>full length</i> GFP ( <i>green fluorescent protein</i> ) aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i> , erkennt auch EGFP. (Santa Cruz Biotechnology Inc.)
$\alpha$ -GFP	Polyklonales Kaninchen IgG zur Detektion von wt GFP sowie den Varianten EGFP, EBFP, EYFP und ECFP. (Antikoerper-online GmbH)
$\alpha$ -GST (B-14)	Maus monoklonale Antikörper gegen die 26 kDa Glutathion-S-Transferase Domäne eines vom Vektor pGEX.3X codierten Fusionsprotein. (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
$\alpha$ -HA (3F10)	Monoklonale Antikörper (IgG1) aus der Ratte, erkennen die Peptidsequenz YPYDVPDYA, welche den Aminosäuren 98-108 in Hämagglutinin des Influenza-Virus entspricht. (Roche)
$\alpha$ -MAD1 (C19)	Affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum gegen Aminosäuren 203-221 aus humanem MAD1. Erkennt MAD1 aus allen Säugern. (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)
$\alpha$ -MAD1 (5C9)	Monoklonale Antikörper; reaktiv gegen humanes MAD1. Sie wurden durch Immunisierung von Wistar-Ratten mit bakteriell expremiertem His-MAD1-Fusionsprotein erzeugt. Der Antikörper 5C9 ist gegen den N-Terminus gerichtet. (E. Kremmer, B. Lüscher)
$\alpha$ -PARP1	Polyklonales Kaninchenserum gegen rekombinantes <i>full length</i> PARP1, welches im Sf9/Baculovirus-System produziert wurde. Erkennt Maus, Ratte und Mensch. (Roche)
$\alpha$ -RXRXXS/T (110B7E)	Affinitätsgereinigte monoklonale Kaninchen Antikörper des (IgG) gegen die phosphorylierte Konsensussequenz von AGC-Kinasen. (Upstate cell signaling solutions)
$\alpha$ -Tubulin (B-5-1-2)	Monoklonaler Maus Antikörper gegen alpha-Tubulin. (Sigma)
$\alpha$ -mouse IgG + IgM (H+L) HRP-gekoppelt	Meerrettichperoxidase gekoppelte Sekundär-Antikörper aus Ziege zur Erkennung der leichten und schweren Ketten von murinen IgG und IgM Antikörpern. (Jackson Immuno Research) (115-036-068)
$\alpha$ -rabbit IgG + IgM (H+L) HRP-gekoppelt	Meerrettichperoxidase gekoppelte Sekundär-Antikörper aus Ziege zur Erkennung der leichten und schweren Ketten von Kaninchen IgG und IgM Antikörpern. (Jackson Immuno Research) (111-035-144)

## 5.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 5.5.1 Isolation von Plasmid-DNA

Lösung 1:	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl, pH 8 10 mM EDTA bei 4°C gelagert
Lösung 2:	0,2 M NaOH 1% (w/v) SDS frisch angesetzt
Lösung 3:	3 M Kaliumacetat, pH 4,8 5 M Eisessig bei 4°C gelagert
TE:	10mM Tris-HCL, pH 7,4 1 mM EDTA

1 mg/ml RNase

In kleinem Maßstab:

1 ml einer Bakterienkultur in LB-Amp/Kan-Medium wurde für 30 sec bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, in 200 µl Lösung 1 resuspendiert, durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 lysiert und nach Zugabe von 200 µl Lösung 3 für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat 10 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand mit 600 µl Isopropanol für 15 min gefällt und für 20 min abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70% EtOH gewaschen und in 20 µl TE aufgenommen. Die RNA wurde durch Zugabe von 1 µg RNase für 10min bei 37°C verdaut.

Wurde sehr reine DNA für Sequenzierungen benötigt, erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA mit dem *QIAprep Spin Miniprep* Kit (Qiagen) oder dem *GeneJET™ Plasmid Miniprep* Kit (Fermentas) gemäß den Herstellerangaben.

Im großen Maßstab:

Plasmide aus 250 ml Bakterienkultur in LB-Amp/Kan-Medium wurde über Maxi-Säulen von Qiagen oder Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch oder am *Nanodrop* bestimmt. Die DNA wurde durch analytische Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

### 5.5.2 Isolation von RNA

Die totale mRNA von eukaryotischen Zellen wurde mit Hilfe des *RNeasy Mini* Kit (Qiagen) nach Angabe des Herstellers, unter zusätzlicher Verwendung des *RNase Free DNase Kits* (Qiagen), isoliert. Die RNA Konzentration wurde mittels UV-Spektrometrie am *Nanodrop* ermittelt.

### 5.5.3 Enzymatische Manipulation von DNA

#### Restriktion von DNA

DNA-Restriktionen wurden nach den Vorgaben des Herstellers in den mitgelieferten Puffern unter Berücksichtigung der jeweils optimalen Inkubationszeit und Temperatur durchgeführt. Um 1 µg DNA zu schneiden wurde eine Enzymmenge von 2-10 U eingesetzt. Restriktionen von DNA mit zwei verschiedenen Enzymen wurden in einem Ansatz eingesetzt, sofern die Reaktionsbedingungen der Restriktionsenzyme kompatibel waren, hierzu wurde der *Magic*-Puffer verwendet.

10 x Magic Puffer:	200 mM Tris pH 7.5
	700 mM NaCl
	200 mM KCl
	100 mM MgCl <sub>2</sub>
	0.5 mM Spermin
	0.125 mM Spermidin

#### Dephosphorylierung des Vektors

Ein Vektor wurde durch Zugabe von alkalischer Phosphatase (Roche) gemäß Herstellerangaben dephosphoryliert, mit dem Ziel, eine Religation des Vektors zu vermeiden.

#### *Fill-in*-Reaktion

Nach Restriktion wurden überhängende 5'-Enden bei DNA mit dem N-terminalen Fragment der *E.coli* DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) in Gegenwart eines Überschusses an dNTPs zu glatten Enden aufgefüllt. Es wurde eine Enzymmenge von 1 U und eine finale Konzentration von 0,05 mM dNTP-Mix zu dem Restriktionsansatz gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA gestoppt. Abschließend wurde eine Phenol-Chlorophorm-Isoamyl-Extraktion durchgeführt, da die dNTPs eine anschließende Ligation stören würden.

#### Ligation von restringierter DNA

Die Verknüpfung zweier restringierter DNA-Fragmente erfolgte mit 80 U T4-DNA-Ligase (Fermentas) in dem vom Hersteller angegebenen Puffersystem in einem Endvolumen von 20 µl. Ligationsansätze enthielten das Insert in dreifach molarem Überschuss zur Vektormenge und wurden über Nacht bei RT inkubiert.

### 5.5.4 Reinigung, Präzipitation und Konzentrationsbestimmung

#### Phenol-Chlorophorm-Isoamyl-Extraktion

Die PCI-Extraktion wurde durchgeführt, um Proteinkontaminationen aus DNA-Proben zu beseitigen. Dazu wurde die Probe nacheinander mit einem Volumen TE gesättigten Phenol und einem Volumen Chlorophorm-Isoamylalkohol-Gemisch (im Verhältnis 24:1 (v/v)) ausgeschüttelt. Dazwischen wurde jeweils zentrifugiert und die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Die denaturierten Verschmutzungen verblieben in der organischen Phase und die DNA konnte aus der wässrigen Phase präzipitiert werden.

#### Präzipitation von DNA

DNA-Präzipitationen aus wässrigen Lösungen wurden zur Konzentrierung, Reinigung und Umpufferung von DNA angewendet. Bei der Ethanol-fällung wurde die Probe mit 2



Volumen 100% Ethanol sowie 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt. Die Ansätze wurden 30 min bei -80°C gelagert. Anschließend wurde die gefällte DNA pelletiert (13.000 rpm / 2 min / 4°C), mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Die DNA wurde bei RT getrocknet und in sterilem, entionisiertem Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

#### Konzentration- und Reinheitsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde mittels UV-Spektrometrie am Nanodrop ermittelt, oder über die photometrische Messung der optischen Dichte bestimmt. Dazu wurde die Absorption bei 260 nm einer in TE verdünnten DNA-Lösung in einer Quarzküvette gemessen. Die DNA-Konzentration wurde mit folgender Formel errechnet:

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Aus dem Verhältnis der OD<sub>260</sub> nm und OD<sub>280</sub> nm wurde der Reinheitsgrad der DNA-Lösung bestimmt, wobei eine proteinfreie Nukleinsäure-Lösung ein Verhältnis von 1,8-2,0 aufweist.

### 5.5.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

TBE:	89 mM Tris-HCl, pH 8,0 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
10 x DNA-Ladepuffer:	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM EDTA 50% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol
Längenmarker:	“Gene Ruler™ 1kb-ladder” (Fermentas)
Agarose	Low EEO (Sigma) NuSieve GTG Agarose (Biozym Scientific)
Ethidiumbromid	0,5 µg/ml Agarose

Plasmid-DNA oder DNA-Fragmente wurden mit 10 x DNA-Ladepuffer versetzt und für analytische Zwecke elektrophoretisch in 0,5 bis 2%igen Agarose-Gelen bei einer Feldstärke von 5 V/cm<sup>2</sup> aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in TBE-Puffer durchgeführt. Zur Visualisierung der DNA unter UV-Licht wurde der Agarose 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) zugegeben.

#### Extraktion von DNA-Fragmenten

Nach der Separation der DNA-Fragmente wurden die gewünschten Fragmente mit dem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA aus der Agarose wurde das *Zippy Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

## 5.5.6 Klonierung mit Gateway-System

Das Gateway-System (Invitrogen) ermöglicht es mit Hilfe von Rekombinationsstellen (*att*) ein PCR-Produkt in einen Zwischenvektor (Entry-Klon) zu rekombinieren. Diese Reaktion wird aufgrund der verwendeten Rekombinationsstellen BP-Reaktion genannt. In einer weiteren Rekombination des Entry-Klons mit einem Expressionsvektor erhält man in einer LR-Reaktion den Expressions-Klon (Abbildung 5.1).

Zur Generierung eines Entry-Klons aus einem *attB*-flankierten PCR-Produkt und einem *attP*-enthaltenden Plasmid wurde eine BP-Reaktion durchgeführt. Hierzu wurden 2,5 µl des *attB*-flankierten PCR-Produkts, 125 ng Plasmid, 1 µl 5 x BP-Reaktionspuffer und 1 µl BP-Klonase über Nacht bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl Proteinase K (2 µg/µl) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Von diesem Reaktionsansatzes wurden 2 µl in kompetente Bakterien (*E.coli* DH5α) transformiert. Diese Bakterien reagieren toxisch auf das in der Gateway-Kassette enthaltene *ccdB*-Gen, so dass nur Bakterien wachsen können, die das rekombinante Plasmid aufgenommen haben.

Zur Generierung eines Expressions-Klons wurde eine LR-Reaktion mit dem zuvor klonierten *attL*-enthaltenden Entry-Klon und einem *attR* enthaltenden Expressionsvektor durchgeführt. Hierzu wurden 75 ng des Entry-Klons, 75 ng Expressionsvektor, 1 µl 5 x LR-Reaktionspuffer, 4 µl TE-Puffer und 1 µl LR-Klonase über Nacht bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl Proteinase K (2 µg/µl) wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl dieser Reaktion in kompetente Bakterien (*E.coli* DH5α) transformiert. Die aufgereinigten Plasmide konnten in einem Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *BSP1407I* auf Rekombination überprüft werden.

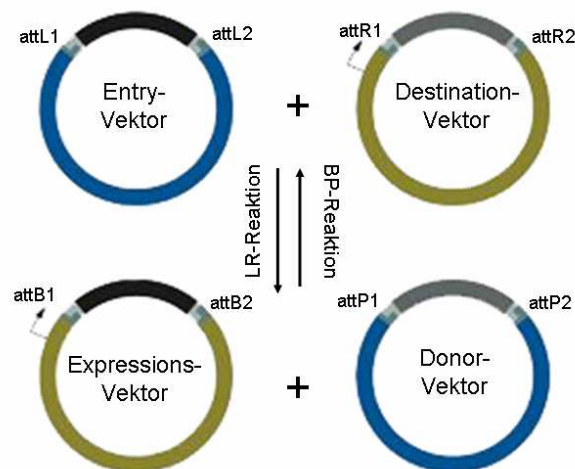


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Rekombinations-Reaktionen des Gateway-Systems

### 5.5.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die entsprechenden DNA-Fragmente für die Gateway-Klonierung wurden mit passenden Primern (MWG Biotech) amplifiziert. Für die Amplifikation wurde *Pfu* Turbo Polymerase (Stratagene) verwendet, um eine geringe Fehlerquote zu garantieren. Die Reaktions-Ansätze von je 50 µl wurden wie folgt zusammengesetzt:

PCR-Wasser	41 µl
Template (50 ng/µl)	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primer-Mix (je 5 µM)	1 µl
5 x <i>Pfu</i> Puffer	5 µl
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl

Die PCR zur Amplifikation des gewünschten Fragmentes erfolgte in einem PCR-Cycler (MWG Biotech) mit folgenden Zyklusparametern:

Zyklus	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Erste Denaturierung	94°C	20 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	30
Hybridisierung	70°C	30 sec	
Elongation	72°C	45 sec	
Letzte Elongation	72°C	8 min	1
Halten	4°C	∞	1

### 5.5.8 PCR-Mutagenese (ortsgerichtete Mutagenese)

Zur Erstellung von Punktmutationen in Plasmiden wurden Mutagenese-PCRs mit dem *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis* Kit (Stratagene) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die *sense* und *antisense* Primer zur Einführung der Mutation wurden so entworfen, dass sie zwischen 25 und 45 Basenpaaren aufweisen und jeweils 13-15 Nukleotide zu beiden Seiten der/des zu mutierenden Nukleotide(s) liegen. Die Primer sollten einen GC-Gehalt von 40-70% haben, am 3' Ende mit einem G oder C terminieren und eine Schmelztemperatur  $T_m$  von mindestens 75°C haben. Zur Berechnung der Schmelztemperatur wurde folgende Formel verwendet:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times \text{GC} [\%] - 675 / N - M [\%]$$

mit GC = GC-Gehalt

N = Primerlänge in Basenpaaren

M = mismatch

### Mutagenese-PCR

Als Matrizen-Plasmid wurde das kleinstmöglichste zur Verfügung stehende Konstrukt gewählt. Zur Amplifikation wurde *Pfu* Turbo Polymerase (Stratagene) verwendet, um eine geringe Fehlerquote zu garantieren.

Die Reaktionsansätze von je 50 µl wurden wie folgt zusammengesetzt:

PCR-Wasser	41 µl
Template (25 ng/µl)	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Primer-Mix (je 5 µM)	1 µl
5 x <i>Pfu</i> Puffer	5 µl
<i>Pfu</i> Turbo Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl

Die PCR zur Amplifikation des gewünschten Fragmentes erfolgte in einem PCR-Cycler (MWG Biotech) mit folgenden Zyklusparametern:

Zyklus	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Erste Denaturierung	95°C	30 sec	1
Denaturierung	95°C	30 sec	16
Hybridisierung	55°C	60 sec	
Elongation	68°C	2 min pro kb	
Letzte Elongation	68°C	10 min	1
Halten	4°C	∞	1

### Verdau und Transformation

Nach der PCR wurde 1/10 des Ansatzes auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um zu prüfen, ob ein entsprechend großes Produkt amplifiziert wurde. Parallel wurde der restliche Ansatz mit 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* für 1 h bei 37°C verdaut. Dieses Enzym erkennt nur die methylierte Restriktionsstelle, so dass spezifisch das Matrizen-Plasmid verdaut wird und das mutierte Plasmid erhalten bleibt. Hiermit wurden dann XL-10 Bakterien transformiert. Aus den erhaltenen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

## 5.5.9 Sequenzierung

Die Sequenz der durch PCR klonierten Vektoren wurde durch Sequenzierung kontrolliert (MWG Biotech oder SeqLab: Sequence Laboratories Göttingen). Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels *GeneJET™ Plasmid Miniprep* Kit. Es wurde pro Sequenzierreaktion 1 µg DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß lyophilisiert und versandt. Falls spezielle Primer benötigt wurden, wurde von diesen 10 µl einer 2 pmol/µl Lösung mitgeschickt. Die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Dnaman.

### 5.5.10 cDNA-Synthese

Die cDNA Synthese wurde mit dem *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) durchgeführt. Dazu wurden 1 µg totaler RNA und 2 µl *random hexamer* Primer mit RNase freiem Wasser auf 13 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und 10 min bei 65°C zur Anlagerung der Primer inkubiert. Der Ansatz wurde mit 4 µl 5 x *reverse transcriptase* Puffer, 0,5 µl *Protector* RNase Inhibitor, 2 µl dNTP-Mix und 0,5 µl der Reversen Transcriptase versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Die cDNA Synthese erfolgt bei 55°C 30 min im Heizblock. Bei 85°C wird die Reverse Transkriptase für 5 min Hitze-inaktiviert. Die cDNA wird sofort in der RT-PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

### 5.5.11 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR ist eine sensitive Methode um den mRNA-Gehalt von Zellen spezifisch zu bestimmen. Sie erlaubt die direkte Messung der Zunahme an PCR-Produkt in der logarithmischen Phase der PCR-Reaktion von Zyklus zu Zyklus durch den Einbau eines Fluorophors. Die Zunahme der Fluoreszenz korreliert somit mit der Menge an PCR Produkt. Die Zykluszahl an der die Probe in die logarithmische Phase der PCR-Reaktion Eintritt, korreliert mit der Menge an Primer-spezifischer cDNA in der Probe.

Die RT-PCR wurde im Roche LightCycler wie folgt durchgeführt:

QuantiTect SYBR Green PCR Mix (Qiagen)	10 µl
PCR Wasser	6 µl
template cDNA	2 µl
Primer-Mix ( <i>reverse</i> und <i>forward</i> Primer)	2 µl

Zyklus	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Erste Denaturierung	95°C	15 min	1
Denaturierung	94°C	15 sec	40
Hybridisierung	55°C	20 sec	
Elongation	72°C	20 sec	
Melting	95°C	10 sec	1
Melting	45°C – 95°C	0,2°C/sec	1
Halten	4°C	∞	1

Der entscheidende Wert ist die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz über den basalen Wert steigt. Der Unterschied in der Zykluszahl, im Vergleich von Probe zur negativ-Kontrolle beschreibt die Änderung in der Expression. Berechnungen wurden mit dem Programm *RelQuant* vorgenommen.

## 5.6 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

### 5.6.1 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> XL10-Gold (Stratagene)	Tetr $\Delta$ (mcrA)183 $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F'proAB lacIq $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]a
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ (Invitrogen)	F- $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk- mk+) phoA supE44 $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1
<i>E.coli</i> DB3.1 (Invitrogen)	F- gyrA462 endA $\Delta$ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 (rB- mB-) supE44 ara14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20 (StrR) xyl5 $\lambda$ - leu mtl1
<i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS (Stratagene)	B F- dcm ompT hsdS(rB-mB-) gal $\lambda$ (DE3) [pLysS Camr]

### 5.6.2 Material für das Arbeiten mit Bakterien

LB-Medium:	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl pH 7,0
Low-Salt Medium:	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 0,5% (w/v) NaCl pH 7,5
Agar-Platten (Amp/Kan):	LB-Medium 1,5% (w/v) Bacto-Agar (Difco) 100 $\mu$ g/ml Ampicillin oder 30 $\mu$ g/ml Kanamycin
Agar-Plattem (Zeo):	Low-Salt Medium 1,5% (w/v) Bacto-Agar (Difco) 50 $\mu$ g/ml Zeocin (Invitrogen) Lichtempfindlich!

## 5.6.3 Protokolle für das Arbeiten mit Bakterien

### 5.6.3.1 Herstellung kompetenter E.coli Zellen zur Transformation

TB-Puffer	15 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl 10 mM HEPES 55 mM MnCl <sub>2</sub> pH 6.7 steril filtriert
-----------	---

LB-Medium (250 ml) wurde mit einer gut gewachsenen Übernachtskultur (5 ml) des gewünschten Zellstammes versetzt und bei 220 rpm und 37° C unter Schütteln bis zu einer OD600 von 0.94 inkubiert. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis gestellt und bei 4°C und 5000 rpm während 10 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 20 ml TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und im Anschluss wie zuvor zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 20 ml TB-Puffer mit 7% DMSO resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Aliquots (200 µl) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 5.6.3.2 Hitzeschock-Transformation

Zur Hitzeschocktransformation wurden die transformationskompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 10 ng der Plasmid-DNA oder 5 µl eines 20 µl Ligationsansatzes gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 45 sec bei 42°C. Der Reaktionsansatz wurde erneut für eine Minute auf Eis gestellt bevor 1 ml LB-Medium zugegeben wurde. Zur Regeneration der Bakterien und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz wurde für 60 min bei 37°C unter Schütteln (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 5.6.3.3 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Puffer A:	50 mM Tris-HCL, pH 8.0 100 mM NaCl 0,5% (v/v) Nonidet P-40 5 mM EDTA 10 mM DTT 0,2 mM PMSF
-----------	---

Glutathion-Agarose (Sigma)

10 mM Glutathion in Puffer A

BL21-Bakterien wurden zunächst mit dem gewünschten pGEX-Konstrukt transformiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml LB/Ampicillin mit 3-5 Kolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:10 in ein gewünschtes Volumen LB/Ampicillin verdünnt und bis zu einer OD600 von 0,7-0,9 inkubiert. Schließlich wurde

die Kultur für 3-16 Stunden mit 0,4 mM IPTG induziert, sedimentiert und in Puffer A durch Ultraschallbehandlung lysiert.

Die Zelltrümmer werden sedimentiert (20 min bei 4°C und 15000 rpm im JA21-Rotor) und der Überstand für 30 min bei 4°C mit Glutathion-Agarose (Sigma), die zuvor durch mehrmaliges Waschen mit Puffer A äquilibriert worden war, inkubiert. Vor der Benutzung wurde das Säulenmaterial zunächst in PBS gequollen und dann dreimal mit demselben Puffer gewaschen, um den vom Hersteller zur trockenen Lagerung verwendeten Stabilisator zu entfernen. Die Glutathion-Agarose mit dem gebundenen Protein wurde dreimal mit Puffer A gewaschen und dann in eine Chromatographiesäule (Biorad) gefüllt. Die gebundenen Proteine wurden mit Glutathion in 500 µl Fraktionen eluiert. Zur Konzentrationsabschätzung wurden Aliquots der Fraktionen zusammen mit einer BSA-Verdünnungsreihe auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

## 5.7 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

### 5.7.1 Eukaryotisch Zell-Linien

HeLa	Epitheloide Zell-Linie, isoliert aus einem menschlichen Cervix-Karzinom (ATCC CCL-2)
HEK293	Mit Adenovirus Type 5 (Ad5) DNA transformierte humane embryonale Nieren Zell-Linie (ATCC CRL-1573)
HEK293T	Humane embryonale Nieren Zell-Linie die durch Transformation mit Adenovirus 5 und SV40 T-Antigen immortalisiert ist (ATCC 293tsA1609neo)
U2OS-tet-Mad1(M19)	Klone von UTAwt mit stabil integrierten Plasmiden tetmad1 und pBabepuro
U2OS	Osteosarkoma Zell-Linie (ATCC HTB-96)

### 5.7.2 Materialien für die Zellkultur

DMEM (Gibco) mit 4,5g/l Glucose

PBS: 140 mM NaCl  
2,6 mM KCl  
2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,45 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

PBS / EDTA PBS  
10 mM EDTA

FCS (Gibco)

Penicillin/Streptomycin 10.000 Einheiten/10.000 µg/ml

Trypsin/EDTA (Seromed) 0,5/0,02% (w/v) in PBS



G418	50 mg/ml in HEPES
Puromycin	1 mg/ml in PBS
Tetrazyclin	1 mg/ml in PBS
Gewebekulturschalen (Sarstedt)	Durchmesser 6, 10 cm
Gewebekulturplatten (TPP)	6, 12 well
Einfriergefäße (Nalgene)	1 ml

### 5.7.3 Kulturbedingungen

Alle Zell-Linien wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

HEK293, HEK293T, HeLa und U2OS wurden in DMEM mit 10% (v/v) FCS und 1% (w/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Der stabil transformierte U2OS-tet-Mad1 Zell-Klon M19 wurde in DMEM mit 10% (v/v) FCS und 1% (w/v) Penicillin/Streptomycin so wie 500 µg/ml G418, 1 µg/ml Puromycin und 1 µg/ml Tetrazyclin kultiviert.

Zur Induktion des Mad1-Klons wurden die M19-Zellen am Tag 1 auf 4 x 10<sup>5</sup> Zellen pro 6 cm-Schale bzw. 8 x 10<sup>5</sup> Zellen pro 10 cm-Schale eingestellt und am Tag 3 einmal mit PBS gewaschen und in DMEM mit 10% (v/v) FCS und 1% (w/v) Penicillin/Streptomycin mit oder ohne Tetrazyclin (1 µg/ml) weiter kultiviert. Am Tag 4 wurde auf verschiedene Weise Apoptose induziert.

### 5.7.4 Protokolle zum Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

#### 5.7.4.1 Kryokonservierung und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen in 1 ml FCS mit 10% DMSO aufgenommen, in ein Einfriergefäß überführt, in Zellstoff eingewickelt und bei -80°C über Nacht langsam abgekühlt. Anschließend wurden die gefrorenen Zellen bei -150°C gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen in einem 37°C Wasserbad kurz inkubiert. Um das DMSO zu entfernen wurden die Zellen mit 10 ml Medium gewaschen und mit frischem Medium in die entsprechenden Gefäße überführt.

#### 5.7.4.2 Transiente Transfektion

Calcium-Phosphat-Methode

HEPES-Puffer	142 mM NaCl 10 mM HEPES 6,7 mM KCl pH 7,3
--------------	--

2 x Hebs-Puffer  
274 mM NaCl  
42 mM HEPES  
9,6 mM KCl  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH 7,1

250mM CaCl<sub>2</sub>

Zur transienten Transfektion von HEK293- und HEK293T-Zellen wurde die Calcium-Phosphat-Methode genutzt (Bousset et al., 1993; Chen and Okayama, 1988). Dabei copräzipitiert die DNA in einem Komplex mit Calciumphosphat, und wird von der Zelle über Endozytose aufgenommen und im Zellkern extrachromosomal transkribiert.

Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von  $1,2 \times 10^5$  pro 6 cm bzw.  $8 \times 10^5$  pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Es wurden generell 20 µg DNA auf einer 10 cm- und 7 µg auf einer 6 cm Schale transfiziert. Die DNA für 10 cm Schalen wurde in 500 µl (200 µl für 6 cm Schalen) CaCl<sub>2</sub> aufgenommen. Unmittelbar vor der Transfektion wurde 500 µl (200 µl) 2 x Hebs-Puffer tropfenweise unter Schütteln zugegeben, durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und nach 15 min in das Kulturmedium gegeben. Die Schalen wurden kurz geschwenkt und sofort in den Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt. Nach 4-6 Stunden wurde das Präzipitat kontrolliert und die Zellen mit 5 ml (3 ml) HEPES-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 9 ml (4 ml) frisches Medium zugesetzt.

ExGen500 Transfektions-Reagenz (Fermentas)

Zur transienten Transfektion von Hela und U2OS Zellen wurde das Transfektionsreagenz ExGen500 verwendet. Es handelt sich um ein Polyethylenimin (PEI) mit hoher Transfektionseffizienz. Durch das kationische Polymer wird die DNA kondensiert und vor dem niedrigen pH-Wert der Endosomen geschützt. Durch den sicheren Transport zum Zellkern wird die hohe Transfektionseffizienz ermöglicht.

Am Vortag wurden die zu transfizierenden Zellen in einer Dichte von je  $4 \times 10^4$  pro 12 well Zellkultur-Platte oder  $4 \times 10^5$  pro 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Zwei Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die DNA für die 12 well Platte wurde in 100 µl (200 µl für 6 cm Schale) 150 mM NaCl-Lösung aufgenommen. Die Lösung wurde durch kurzes Vortexen gemischt und nach Zentrifugation mit 6,6 µl (16,45 µl) ExGen500 versetzt. Es folgten 10 sec Vortexen und 10 min Inkubieren bei RT bevor der Transfektionsansatz ins Kulturmedium gegeben wurde. Die Schale wurde nach kurzem Schwenken in den Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt. Nach 12 bis 15 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

### 5.7.4.3 Präparation von Zell-Lysaten

Frackelton-Puffer (F-Puffer):  
20 mM HEPES, pH 7,05  
50 mM NaCl  
30 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>  
10% Glycerin  
0,2% (v/v) Triton X-100  
50 mM NaF  
5 µM ZnCl<sub>2</sub>

Protease-Inhibitoren:	2,5 U/ml Pepstatin A 2,5 U/ml Leupeptin 100 $\mu\text{M}$ $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 5 U/ml $\alpha$ -Makroglobulin 0,15 mM Benzamidin 500 $\mu\text{M}$ PEFA-Bloc
Apoptose-Reagenzien:	Staurosporine (Calbiochem) $\alpha$ -Fas (CH11) (Upstate) Caspase-Inhibitor I Z-VAD-fmk Caspase-3-Inhibitor II Z-DEVD-fmk Caspase-9-Inhibitor I Z-LEHD-fmk

Für Frackelton-Puffer-Lysate wurden die Zellen einer 6 cm (10 cm) Zellkulturschale in 120  $\mu\text{l}$  (300  $\mu\text{l}$ ) gekühlten Frackelton-Puffer lysiert. Das entspricht einer Konzentration von 2,5 bis  $5 \times 10^7$  Zellen pro ml F-Puffer. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden die lysierten Zellen von der Platte geschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt, 45 sec gevortext und 20 min bei 4°C und 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden sofort weiter eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

Für Lysate von apoptotischen Zellen wurde das Medium in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, die restlichen adhärennten Zellen mit PBS gewaschen, welches anschließend mit dem bereits abgenommenen Medium vereinigt wurde. Mit 1 ml Trypsin/EDTA werden die Zellen bei 37°C von der Platte gelöst und dann mit den apoptotischen Zellen im bereits abgenommenen Medium vereinigt. Die mit PBS gewaschenen Zellen (1000 rpm, 4°C, 3 min) wurden in 120  $\mu\text{l}$  (300  $\mu\text{l}$ ) gekühltem Frackelton-Puffer aufgenommen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min auf Eis inkubiert, gevortext und 20 min bei 4°C und 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden sofort weiter verarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

#### 5.7.4.4 Immunpräzipitation

CoIP-Puffer:	20 mM HEPES, pH 7,4 50 mM NaCl 30 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 50 mM NaF 0,2% Triton X-100 10% Glycerol 5 $\mu\text{M}$ $\text{ZnCl}_2$ pH 7,05
Protease-Inhibitoren:	500 $\mu\text{M}$ PEFA-Bloc 0,025 U/ml $\alpha$ 2-Macroglobulin 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin A 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin 150 $\mu\text{M}$ Benzamidin 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin 10 mM Natrium- $\beta$ -glycerophosphat

#### Protein G-Sepharose

40  $\mu\text{l}$  Protein G-Sepharose (*Beads*) wurden dreimal mit CoIP-Puffer (ohne Protease-Inhibitoren) gewaschen und bei 1400 rpm abzentrifugiert. 1  $\mu\text{g}$  des spezifischen Antikörpers wurde zusammen mit dem Zell-Lysat der Protein G-Sepharose in einem

1,5 ml-Reaktionsgefäß zugegeben und bei 4°C für 2 bis 3 h rotierend inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die *Beads* ebenfalls dreimal mit ColP-Puffer gewaschen und in 20 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot detektiert.

### 5.7.4.5 Präparation cytosolischer Extrakten für "*cytochrome c release*"

DSS-Puffer	0,5 M Sucrose 10 µg/ml Digiton (Fluka)
------------	---

Nach erfolgter Induktion der Apoptose wurde das Medium von den Zellen abgenommen und einmal mit PBS gewaschen und die übrigen adhärennten Zellen mit PBS/EDTA von der Platte gelöst. Danach wurden alle Zellen vereinigt und ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Die Zellen ( $2 \times 10^6$ ) wurden in 62,5 µl PBS resuspendiert, mit 62,5 µl DSS-Puffer versetzt und 30 sec gevortext. Anschließend wurde 1 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit SDS-Probenpuffer versetzt, aufgekocht und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 5.7.4.6 *In vivo* Ubiquitinierungs-Assay

Urea-Puffer:	8 M Harnstoff 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 8,0 10 mM Imidazol
Cobalt-Beads:	Talon Metal Affinity- <i>Beads</i> (Clontech)
2 x Probenpuffer:	200 mM Imidazol 160 mM Tris, pH 6,8 0,25% (w/v) Bromphenolblau 10% (w/v) SDS 20% (v/v) Glycerol 100 mM β-MeEtOH
MG132 (Sigma)	

Zellen wurden mit pCMV-His6-Ubiquitin Konstrukten und einem Plasmid, welches das zu testende Protein exprimiert, transient transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für 2-3 h mit Proteasomen Inhibitor MG132 behandelt und in 1 ml Urea-Puffer lysiert, sonifiziert (3 x 20sec bei 70% Amplitude) und bei 13.200 rpm für 20 min bei RT pelletiert. Auf das abgenommene Lysat wurden 20 µl äquilibrierte Cobalt-*Beads* gegeben und für 2-3 Stunden bei RT auf einem Rotator inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit je 500 µl Urea-Puffer (Zentrifugation bei 4000 rpm für 2 x 60sec) wurde die Probe mit 30 µl 2 x Probenpuffer + 200 mM Imidazol von den *Beads* gelöst und in einer SDS-PAGE eingesetzt. Um das potentiell ubiquitinierte Protein über proteinspezifische Antikörper oder Antikörper gegen einen Tag detektieren zu können, folgte ein Western-Blot.

### 5.7.4.7 Reporter-gen-Assay

Die Regulation von Promotoren wurde durch die Messung der Aktivität eines Reporter-genprodukts untersucht. Dazu wurde ein Promoterfragment vor die Luziferase-cDNA kloniert. Erhöhte Transkription der cDNA korreliert mit einer erhöhten Luziferaseaktivität im Zellysat (Nordeen, 1988). Da die Transfektionseffizienz innerhalb einer Transfektionsserie stark variieren kann wurde immer 1 µg des β-Galactosidase-Expressionsvektors pEQ176 pro 6 cm Schale kotransfiziert. Die β-Galactosidaseaktivität war damit ein Maß für die Transfektionseffizienz und wurde zur Standardisierung der Luziferaseaktivität benutzt. Da die Transfektionseffizienz auch von der Menge an transfizierter DNA abhängt, wurde in jedem Transfektionsansatz die Menge an transfizierter DNA konstant gehalten, indem entweder entsprechende Mengen an "leeren" Expressionsvektoren zugegeben oder mit pEQ176P2 aufgefüllt wurden.

5 x Extraktionspuffer:	25 mM Tris pH 8 (mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) 2 mM EDTA 10% Glycerin 1% Triton X-100 10 mM DTT (frisch zugeben)
Messpuffer:	25 mM Glycin 15 mM MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 5 mM ATP (frisch zugeben)
Luciferin-Lösung:	25 mM Luciferin 25 mM NaOH bei -20°C gelagert, vor Licht schützen
Z-Puffer:	60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei) 40 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 10 mM KCl 1 mM MgSO <sub>4</sub> 50 mM β-MeEtOH (frisch zugeben)
	1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	4 mg/ml ONPG in Z-Puffer

Die transient-transfizierten Zellen wurden 24 h nach dem Entfernen des Präzipitats einmal mit PBS gewaschen und 10 min mit 200 µl Extraktionspuffer (6 cm Schale) auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (3 min, 13.000 rpm) und der Überstand für die Luciferase- und β-Galactosidasemessung verwendet.

Zur Messung der Luciferaseaktivität wurden 20µl Lysat zu 100µl Messpuffer gegeben und sofort in einen ELISA-Reader (Victor2) gestellt. Das Gerät injiziert automatisch 35 µl Luciferin-Lösung und bestimmt die Anzahl an Photonen, die innerhalb von 10 sec emittiert werden.

Jede Messung wurde zweimal durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

Zur Messung der β-Galactosidase wurden 100 µl Z-Puffer mit 20 µl Lysat und 25 µl ONPG-Lösung gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 65 µl Natrium-bicarbonat

gestoppt, sobald eine deutliche Gelbfärbung vorhanden war. Der Färbungsgrad wurde photometrisch bei 405 nm im ELISA-Reader (Viktor2) bestimmt.

Aus dem Quotienten der Luciferasemessung und der  $\beta$ -Galactosidasemessung wurde die relative Luciferaseaktivität (RLA) errechnet. Für die Angabe der Aktivierung eines Promoters wurde die relative Luciferaseaktivität des Reporterkonstrukts ohne coexprimierte Transkriptionsfaktoren gleich "1" gesetzt.

#### 5.7.4.8 DNA-Fragmentierung

Nach erfolgter Induktion der Apoptose wurde das Medium von den Zellen abgenommen und einmal mit PBS gewaschen, die übrigen adhärennten Zellen wurden mit PBS/EDTA von der Platte gelöst. Alle Zellen wurden vereinigt und ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Der Nachweis der fragmentierten DNA erfolgte mit dem *Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit* (BioVision) nach Angaben des Herstellers.

## 5.8 Proteinchemische Methoden

### 5.8.1 Bradford-Test

5 x Bradford-Reagenz:	50 mg Coomassie G-250 25 ml EtOH (100%) 50 ml O-Phosphorsäure (85%) 25 ml destilliertes Wasser
-----------------------	---

10 $\mu$ g/ $\mu$ l BSA (NEB)

Um die Proteinkonzentration von Zell-Lysaten zu bestimmen, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Das Verfahren basiert auf der Wechselwirkung von basischen und aromatischen Aminosäuren mit der sauren Coomassie-G250-Lösung, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Für die Quantifizierung wurde zunächst eine Eichreihe mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen (10 bis 100  $\mu$ g/ml) in F-Puffer erstellt. Zu jeweils 800  $\mu$ l einer Zell-Lysat-Verdünnung sowie der Eichreihe wurden 200  $\mu$ l des 5 x Bradford-Reagenzes gegeben, 15 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm bestimmt. Von den zu analysierenden Proteinlösungen wurden mindestens 3 verschiedene Verdünnungen gemessen. Die jeweilige Proteinkonzentration wurde anhand der abgeleiteten Eichgeraden ermittelt.

## 5.8.2 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

2 x Ladepuffer:	160 mM Tris-HCl, pH 6,8 20% (v/v) Glycerin 10% (w/v) SDS 0,25% (w/v) BPB 100 mM $\beta$ -MeEtOH
4 x Ladepuffer:	320 mM Tris-HCl, pH 6,8 40% (v/v) Glycerin 20% (w/v) SDS 0,5% (w/v) BPB 200 mM $\beta$ -MeEtOH
15%iges Trenngel:	7,5% (v/v) Acrylamid 0,085% (v/v) Bisacrylamid 0,4M Tris pH 8,7 0,035% (v/v) TEMED 0,1% (v/v) SDS 0,66%(v/v) APS
12%iges Trenngel:	19,5% (v/v) Acrylamid 0,5% (v/v) Bisacrylamid 0,625 M Tris pH 8,8 0,1% (v/v) TEMED 0,1% (v/v) SDS 0,5% (v/v) APS
10%iges Trenngel:	32,5% (v/v) Acrylamid 0,9% (v/v) Bisacrylamid 0,38 M Tris pH 8,8 0,1% (v/v) TEMED 0,1% (v/v) SDS 0,1% (v/v) APS
5%iges Sammelgel:	13,3% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%) 0,13 M Tris pH 6,8 0,068% (v/v) TEMED 0,12% (v/v) SDS 0,11% (v/v) APS
Laemmli-Laufpuffer :	50 mM Tris-Base 380 mM Glycerin 0,1% (w/v) SDS
Längenmarker:	PageRulerPrestained Protein Ladder, 11-170kDa (Fermentas)

Für die Auftrennung von Proteingemischen wurde die denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit 10 bis 15%igen Trenngelen und 5%igem Sammelgel gegossen. Die Proteinlösung wurde 1:2 in 2 x bzw. 1:4 in 4 x Ladepuffer verdünnt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel geladen.

### 5.8.3 Anfärben von Proteinen im Polyacrylamidgel

Fixierungs-Lösung:                    25% Isopropanol  
   10% Eisessig

Rapid-Coomassie-Färbe-Lösung:    10% Eisessig  
   0,006% Coomassie brilliant blue G-250

Zur Detektion von Proteinen nach der SDS-PAGE wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt. Dazu wurden die Gele eine Stunde in Fixierungs-Lösung geschwenkt, danach eine Stunde bis über Nacht mit der Rapid-Coomassie-Färbe-Lösung gefärbt und mit Wasser entfärbt. Dann wurden die Gele auf ein Whatman-Papier überführt, mit Haushalts-Folie bedeckt und für 1,5 Stunden bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

### 5.8.4 Western-Blot und Immundetektion von Proteinen

10 x Semi-Dry-Puffer:                    250 mM Tris-Base  
   1,92 M Glycin  
   pH 8,3 bis 8,8

1 x Semi-Dry-Puffer:                    10 x Semidry-Puffer  
   20% Methanol  
   frisch angesetzt

Waschpuffer:                            PBS  
   0,05% (v/v) Tween-20

Blockpuffer:                            PBS oder TBS  
   0,05% (v/v) Tween-20  
   5 % (w/v) Magermilchpulver  
   oder  
   5 % (w/v) BSA

0,2% Ponceau S in 3% TCA

ECL-Kit (Pierce, Pico, Femto)

Zell-Lysate wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, in einer Blot-Apparatur auf Nitrozellulose transferiert und die nicht besetzten Stellen der Membran mit Milchprotein abgesättigt. Anschließend wurden die Positionen der Proteine mittels eines spezifischen Antikörpers und eines gegen den ersten Antikörper gerichteten zweiten Antikörpers bestimmt. Letzterer hat kovalent die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, deren Umsetzung eines Substratgemisches ein fluoreszierendes Signal aussendet, das detektiert werden kann.



Aus dem Polyacrylamidgel wurde ein Streifen mit dem zu detektierenden Protein ausgeschnitten und in 1 x Semi-Dry-Puffer getränkt. Gleichzeitig wurden zwei Whatman-Papiere und eine Nitrozellulose-Membran der Größe des Gelstreifens in 1 x Semi-Dry-Puffer getränkt. Alles wurde folgendermaßen blasenfrei auf die Blot-Apparatur geschichtet: auf die negative Kathode folgt ein Whatman-Papier, das Gel, die Membran und das zweite Whatman-Papier. Die Blot-Apparatur wurde mit der positiven Anoden-Platte geschlossen und die Proteine bei  $2 \text{ mA/cm}^2$  für 1 h aus dem Gel auf die Nitrozellulose-Membran transferiert. Nach dem Transfer wurden die Proteine auf der Membran reversibel mit Ponceau S für 5 min gefärbt und durch Wasser wieder entfärbt. Die Membran wurde für 1 h in Blockpuffer abgesättigt, bevor sie mit dem entsprechenden Antikörper bei  $4^\circ\text{C}$  über Nacht oder für 90 min bei RT auf einer Wippe inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und für 1 h mit dem zweiten Antikörper bei RT inkubiert. Dieser erkennt die schwere Kette des Primärantikörpers und ist mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Es folgen drei 10-minütige Waschschrte und die Zugabe von ECL-Lösung, die ein Substrat für die Meerrettich-Peroxidase enthält, das unter Freisetzung von Lichtquanten chemiluminesziert. Mit einem Kamera-assoziierten Chemi-Dokumentationssystem (Las3000, Fuji) erfolgte die Detektion des Signals.

### 5.8.5 *In vitro* Caspase-Assay

Caspase Puffer:	100 mM Hepes, pH 7,5 20% Glycerin 0,5 mM EDTA 10 mM DTT 0,1% BSA
-----------------	--

Z-VAD-fmk Caspase Inhibitor VI (Calbiochem)

Caspase-1 bis -8 wurden von R.V. Talanian, Worcester, USA, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um N-terminale Poly(His)-Fusionsproteine, die zu ca. 90% aufgereinigt wurden (Kamens et al., 1995; Talanian et al., 1997).

Der Aufbewahrungspuffer enthält 50 mM Hepes, pH 7,5 (mit Ausnahme von Caspase-1 und Caspase-6, die in 100 mM Hepes pH 7,5 gelagert werden), 10% Glycerin und 100 mM NaCl.

Zur Stabilisierung der Caspasen wurde eine Präinkubation für mindestens 30 sec in Gegenwart von 0,1% BSA durchgeführt.

Für die *in vitro* Spaltreaktion wurden 20 ng rekombinantes Protein mit jeweils 100 ng der Caspase mit oder ohne  $100 \mu\text{M}$  z-VAD-fmk für 90 min bei  $30^\circ\text{C}$  in  $20 \mu\text{l}$  Caspase-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt und die Proteine im Western-Blot analysiert.

### 5.8.6 Immunfluoreszenz

PBS <sup>++</sup>	PBS 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM CaCl <sub>2</sub>
-------------------	---

4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS

Hoechst 33258 (1 mg/ml) in PBS

Moviol 4-88 (Hoechst) mit Isopropylgallat

Um Zellen für die Apoptose zu sensibilisieren, wurden sie mit einem Expressionsplasmid für den Fas-Rezeptor transfiziert. Die transfizierten Zellen konnten durch kotransfiziertes EGFP am Fluoreszenz-Mikroskop identifiziert werden. Apoptotische Zellen wurden aufgrund des charakteristischen *membrane blebbing* analysiert.

Deckgläschen mit einem Durchmesser von 18 mm wurden durch das Einlegen in EtOH entfettet, anschließend hitzesterilisiert und auf dem Boden von 12 well Zellkulturplatten platziert. Darauf wurden die Zellen ausgesät ( $2 \times 10^4$  HeLa) und am nächsten Tag durch ExGen500 transfiziert. Am nächsten Tag wurde durch die Zugabe von 50 ng/ml  $\alpha$ -Fas (CH11) die Apoptose induziert. Durch Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS wurde die Apoptose-Induktion nach 4 h gestoppt. Die Zellen wurden für 25 min bei RT mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit Hoechst 33258, das mit PBS 1:2000 verdünnt wurde, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Auf Objektträger wurden 10  $\mu$ l Moviol pipettiert und darauf die, mit H<sub>2</sub>O gewaschenen Deckgläschen mit den Zellen nach unten gelegt. Nach dem Aushärten des Moviols wurden die Deckgläschen durch Klarlack versiegelt. Das Betrachten und Fotografieren erfolgte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Olympus IX50 und der Software AnalySIS.

## 6 Referenzen

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., and Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9, 423-432.

Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-756.

Amati, B., Brooks, M. W., Levy, N., Littlewood, T. D., Evan, G. I., and Land, H. (1993a). Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72, 233-245.

Amati, B., Littlewood, T. D., Evan, G. I., and Land, H. (1993b). The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *Embo J* 12, 5083-5087.

Amerik, A. Y., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695, 189-207.

Ardley, H. C., and Robinson, P. A. (2005). E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem* 41, 15-30.

Arnason, T., and Ellison, M. J. (1994). Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol Cell Biol* 14, 7876-7883.

Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Askew, D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C., and Cleveland, J. L. (1991). Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 6, 1915-1922.

Ayer, D. E., and Eisenman, R. N. (1993). A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes Dev* 7, 2110-2119.

Ayer, D. E., Kretzner, L., and Eisenman, R. N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211-222.

Barone, M. V., and Courtneidge, S. A. (1995). Myc but not Fos rescue of PDGF signalling block caused by kinase-inactive Src. *Nature* 378, 509-512.

Barrera-Hernandez, G., Cultraro, C. M., Pianetti, S., and Segal, S. (2000). Mad1 function is regulated through elements within the carboxy terminus. *Mol Cell Biol* 20, 4253-4264.

- Baudino, T. A., and Cleveland, J. L. (2001). The Max network gone mad. *Mol Cell Biol* 21, 691-702.
- Bejarano, M. T., Albiñan, A., Cornvik, T., Brijker, S. O., Asker, C., Osorio, L. M., and Henriksson, M. (2000). Inhibition of cell growth and apoptosis by inducible expression of the transcriptional repressor Mad1. *Exp Cell Res* 260, 61-72.
- Bellacosa, A., Chan, T. O., Ahmed, N. N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J., and Tsichlis, P. (1998). Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 17, 313-325.
- Beyaert, R., Kidd, V. J., Cornelis, S., Van de Craen, M., Denecker, G., Lahti, J. M., Gururajan, R., Vandenabeele, P., and Fiers, W. (1997). Cleavage of PITS/LRE kinases by ICE/CASP-1 and CPP32/CASP-3 during apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 272, 11694-11697.
- Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-1217.
- Boatright, K. M., Deis, C., Denault, J. B., Sutherlin, D. P., and Salvesen, G. S. (2004). Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L). *Biochem J* 382, 651-657.
- Boatright, K. M., and Salvesen, G. S. (2003). Caspase activation. *Biochem Soc Symp*, 233-242.
- Borgerson, K. L., Bretz, J. D., and Baker, J. R., Jr. (1999). The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease. *Autoimmunity* 30, 251-264.
- Borner, C., and Monney, L. (1999). Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 6, 497-507.
- Bouchard, C., Dittrich, O., Kiermaier, A., Dohmann, K., Menkel, A., Eilers, M., and Luscher, B. (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* 15, 2042-2047.
- Bousset, K., Henriksson, M., Luscher-Firzlaff, J. M., Litchfield, D. W., and Luscher, B. (1993). Identification of casein kinase II phosphorylation sites in Max: effects on DNA-binding kinetics of Max homo- and Myc/Max heterodimers. *Oncogene* 8, 3211-3220.
- Brown, J. C., and Smith, A. E. (1970). Initiator codons in eukaryotes. *Nature* 226, 610-612.
- Buchberger, A., Howard, M. J., Proctor, M., and Bycroft, M. (2001). The UBX domain: a widespread ubiquitin-like module. *J Mol Biol* 307, 17-24.
- Burek, M. J., and Oppenheim, R. W. (1996). Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol* 6, 427-446.
- Cande, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 84, 215-222.
- Casiano, C. A., Martin, S. J., Green, D. R., and Tan, E. M. (1996). Selective cleavage of nuclear autoantigens during CD95 (Fas/APO-1)-mediated T cell apoptosis. *J Exp Med* 184, 765-770.

- Caulin, C., Salvesen, G. S., and Oshima, R. G. (1997). Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 138, 1379-1394.
- Cerni, C., Bousset, K., Seelos, C., Burkhardt, H., Henriksson, M., and Luscher, B. (1995). Differential effects by Mad and Max on transformation by cellular and viral oncoproteins. *Oncogene* 11, 587-596.
- Chastagner, P., Israel, A., and Brou, C. (2006). Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO Rep* 7, 1147-1153.
- Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K., and Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576-1583.
- Chen, C. A., and Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6, 632-638.
- Chen, J., Willingham, T., Margraf, L. R., Schreiber-Agus, N., DePinho, R. A., and Nisen, P. D. (1995). Effects of the MYC oncogene antagonist, MAD, on proliferation, cell cycling and the malignant phenotype of human brain tumour cells. *Nat Med* 1, 638-643.
- Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S. J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8, 705-711.
- Chou, C. K., Lee, D. F., Sun, H. L., Li, L. Y., Lin, C. Y., Huang, W. C., Hsu, J. M., Kuo, H. P., Yamaguchi, H., Wang, Y. N., *et al.* (2009). The suppression of MAD1 by AKT-mediated phosphorylation activates MAD1 target genes transcription. *Mol Carcinog*.
- Cilenti, L., Soundarapandian, M. M., Kyriazis, G. A., Stratico, V., Singh, S., Gupta, S., Bonventre, J. V., Alnemri, E. S., and Zervos, A. S. (2004). Regulation of HAX-1 anti-apoptotic protein by Omi/HtrA2 protease during cell death. *J Biol Chem* 279, 50295-50301.
- Concha, N. O., and Abdel-Meguid, S. S. (2002). Controlling apoptosis by inhibition of caspases. *Curr Med Chem* 9, 713-726.
- Cote, J., and Ruiz-Carrillo, A. (1993). Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* 261, 765-769.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341 ( Pt 2), 233-249.
- Cryns, V., and Yuan, J. (1998). Proteases to die for. *Genes Dev* 12, 1551-1570.
- Cultraro, C. M., Bino, T., and Segal, S. (1997). Function of the c-Myc antagonist Mad1 during a molecular switch from proliferation to differentiation. *Mol Cell Biol* 17, 2353-2359.
- Dang, C. V., Resar, L. M., Emison, E., Kim, S., Li, Q., Prescott, J. E., Wonsey, D., and Zeller, K. (1999). Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res* 253, 63-77.

- Davie, J. R., and Chadee, D. N. (1998). Regulation and regulatory parameters of histone modifications. *J Cell Biochem Suppl* 30-31, 203-213.
- Debatin, K. M., Goldman, C. K., Waldmann, T. A., and Krammer, P. H. (1993). APO-1-induced apoptosis of leukemia cells from patients with adult T-cell leukemia. *Blood* 81, 2972-2977.
- Degtarev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.
- Deshaies, R. J. (1999). SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 435-467.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., and Rechsteiner, M. (1994). A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* 269, 7059-7061.
- Deveraux, Q. L., Leo, E., Stennicke, H. R., Welsh, K., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo J* 18, 5242-5251.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304.
- Donepudi, M., Mac Sweeney, A., Briand, C., and Grutter, M. G. (2003). Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 11, 543-549.
- Dubiel, W., Ferrell, K., Pratt, G., and Rechsteiner, M. (1992). Subunit 4 of the 26 S protease is a member of a novel eukaryotic ATPase family. *J Biol Chem* 267, 22699-22702.
- Eberharter, A., and Becker, P. B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 3, 224-229.
- Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K. R., and Bishop, J. M. (1989). Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature* 340, 66-68.
- Eilers, M., Schirm, S., and Bishop, J. M. (1991). The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *Embo J* 10, 133-141.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Facchini, L. M., and Penn, L. Z. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *Faseb J* 12, 633-651.
- Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., and Liang, J. (2005a). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37, 719-727.
- Fan, W., Ha, T., Li, Y., Ozment-Skelton, T., Williams, D. L., Kelley, J., Browder, I. W., and Li, C. (2005b). Overexpression of TLR2 and TLR4 susceptibility to serum deprivation-induced apoptosis in CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 840-848.

- Fernandez, P. C., Frank, S. R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17, 1115-1129.
- Ferrell, K., Wilkinson, C. R., Dubiel, W., and Gordon, C. (2000). Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci* 25, 83-88.
- Finley, D., Bartel, B., and Varshavsky, A. (1989). The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* 338, 394-401.
- Finley, D., Sadis, S., Monia, B. P., Boucher, P., Ecker, D. J., Crooke, S. T., and Chau, V. (1994). Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol Cell Biol* 14, 5501-5509.
- Firzlaff, J. M., Luscher, B., and Eisenman, R. N. (1991). Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5187-5191.
- Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L., and Tschachler, E. (2002). Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 722-726.
- Fischer, U., Janicke, R. U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10, 76-100.
- Fletcher, T. M., and Hansen, J. C. (1996). The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 6, 149-188.
- Foley, K. P., McArthur, G. A., Queva, C., Hurlin, P. J., Soriano, P., and Eisenman, R. N. (1998). Targeted disruption of the MYC antagonist MAD1 inhibits cell cycle exit during granulocyte differentiation. *Embo J* 17, 774-785.
- Frank, S. R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H. M., Livingston, D. M., and Amati, B. (2003). MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep* 4, 575-580.
- Frank, S. R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S., and Amati, B. (2001). Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev* 15, 2069-2082.
- Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384, 201-232.
- Fulda, S., Meyer, E., Friesen, C., Susin, S. A., Kroemer, G., and Debatin, K. M. (2001). Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene* 20, 1063-1075.
- Galan, J. M., and Haguenaer-Tsapis, R. (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo J* 16, 5847-5854.
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E. P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 273, 32608-32613.

- Garcia-Calvo, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Vaillancourt, J. P., Zamboni, R., Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1999). Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differ* 6, 362-369.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784-3788.
- Gehring, S., Rottmann, S., Menkel, A. R., Mertsching, J., Krippner-Heidenreich, A., and Luscher, B. (2000). Inhibition of proliferation and apoptosis by the transcriptional repressor Mad1. Repression of Fas-induced caspase-8 activation. *J Biol Chem* 275, 10413-10420.
- Glickman, M. H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fried, V. A., and Finley, D. (1998). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 18, 3149-3162.
- Glotzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
- Grabarek, J., Dragan, M., Lee, B. W., Johnson, G. L., and Darzynkiewicz, Z. (2002). Activation of chymotrypsin-like serine protease(s) during apoptosis detected by affinity-labeling of the enzymatic center with fluoresceinated inhibitor. *Int J Oncol* 20, 225-233.
- Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., and Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 653-699.
- Gray, C. W., Ward, R. V., Karran, E., Turconi, S., Rowles, A., Viglienghi, D., Southan, C., Barton, A., Fantom, K. G., West, A., *et al.* (2000). Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem* 267, 5699-5710.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-471.
- Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S. J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274, 1156-1163.
- Gu, W., Cechova, K., Tassi, V., and Dalla-Favera, R. (1993). Opposite regulation of gene transcription and cell proliferation by c-Myc and Max. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2935-2939.
- Haglund, K., Sigismund, S., Polo, S., Szymkiewicz, I., Di Fiore, P. P., and Dikic, I. (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5, 461-466.
- Haririnia, A., D'Onofrio, M., and Fushman, D. (2007). Mapping the interactions between Lys48 and Lys63-linked di-ubiquitins and a ubiquitin-interacting motif of S5a. *J Mol Biol* 368, 753-766.



- Hassig, C. A., Fleischer, T. C., Billin, A. N., Schreiber, S. L., and Ayer, D. E. (1997). Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* 89, 341-347.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277, 432-438.
- Heinemeyer, W., Trondle, N., Albrecht, G., and Wolf, D. H. (1994). PRE5 and PRE6, the last missing genes encoding 20S proteasome subunits from yeast? Indication for a set of 14 different subunits in the eukaryotic proteasome core. *Biochemistry* 33, 12229-12237.
- Henriksson, M., and Luscher, B. (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* 68, 109-182.
- Hershko, A. (1983). Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell* 34, 11-12.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.
- Hicke, L., Schubert, H. L., and Hill, C. P. (2005). Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 610-621.
- Hinds, M. G., Norton, R. S., Vaux, D. L., and Day, C. L. (1999). Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol* 6, 648-651.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405-439.
- Hong, L., Schroth, G. P., Matthews, H. R., Yau, P., and Bradbury, E. M. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem* 268, 305-314.
- Hoppe, T. (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci* 30, 183-187.
- Huang, K. J., Ku, C. C., and Lehman, I. R. (2006). Endonuclease G: a role for the enzyme in recombination and cellular proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8995-9000.
- Hueber, A. O., Zornig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S., and Evan, G. I. (1997). Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science* 278, 1305-1309.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5249.

- Hunter, T., and Karin, M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70, 375-387.
- Hurlin, P. J., Queva, C., and Eisenman, R. N. (1997). Mnt: a novel Max-interacting protein and Myc antagonist. *Curr Top Microbiol Immunol* 224, 115-121.
- Hurlin, P. J., Queva, C., Koskinen, P. J., Steingrimsson, E., Ayer, D. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Eisenman, R. N. (1995). Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *Embo J* 14, 5646-5659.
- Hurlin, P. J., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Eisenman, R. N. (1999). Mga, a dual-specificity transcription factor that interacts with Max and contains a T-domain DNA-binding motif. *Embo J* 18, 7019-7028.
- Ikeda, F., and Dikic, I. (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep* 9, 536-542.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Jason, L. J., Moore, S. C., Lewis, J. D., Lindsey, G., and Ausio, J. (2002). Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays* 24, 166-174.
- Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Kamens, J., Paskind, M., Hugunin, M., Talanian, R. V., Allen, H., Banach, D., Bump, N., Hackett, M., Johnston, C. G., Li, P., and *et al.* (1995). Identification and characterization of ICH-2, a novel member of the interleukin-1 beta-converting enzyme family of cysteine proteases. *J Biol Chem* 270, 15250-15256.
- Kataoka, T. (2005). The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol* 25, 31-58.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 893-905.
- Kime, L., and Wright, S. C. (2003). Mad4 is regulated by a transcriptional repressor complex that contains Miz-1 and c-Myc. *Biochem J* 370, 291-298.
- Knoepfler, P. S., and Eisenman, R. N. (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 99, 447-450.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., and Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, 635-644.
- Kohl, N. E., Kanda, N., Schreck, R. R., Bruns, G., Latt, S. A., Gilbert, F., and Alt, F. W. (1983). Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 35, 359-367.
- Kominsky, D. J., Bickel, R. J., and Tyler, K. L. (2002). Reovirus-induced apoptosis requires both death receptor- and mitochondrial-mediated caspase-dependent pathways of cell death. *Cell Death Differ* 9, 926-933.

- Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 59, 1693s-1700s.
- Koskinen, P. J., Ayer, D. E., and Eisenman, R. N. (1995). Repression of Myc-Ras cotransformation by Mad is mediated by multiple protein-protein interactions. *Cell Growth Differ* 6, 623-629.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Kohts, K., Kwiatkowski, D. J., and Williams, L. T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298.
- Krippner-Heidenreich, A., Talanian, R. V., Sekul, R., Kraft, R., Thole, H., Ottleben, H., and Luscher, B. (2001). Targeting of the transcription factor Max during apoptosis: phosphorylation-regulated cleavage by caspase-5 at an unusual glutamic acid residue in position P1. *Biochem J* 358, 705-715.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276, 20633-20640.
- Laherty, C. D., Yang, W. M., Sun, J. M., Davie, J. R., Seto, E., and Eisenman, R. N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89, 349-356.
- Lahoz, E. G., Xu, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R. A. (1994). Suppression of Myc, but not E1a, transformation activity by Max-associated proteins, Mad and Mxi1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5503-5507.
- Land, H., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.
- Laney, J. D., and Hochstrasser, M. (1999). Substrate targeting in the ubiquitin system. *Cell* 97, 427-430.
- Larsson, L. G., Pettersson, M., Oberg, F., Nilsson, K., and Luscher, B. (1994). Expression of mad, mxi1, max and c-myc during induced differentiation of hematopoietic cells: opposite regulation of mad and c-myc. *Oncogene* 9, 1247-1252.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., *et al.* (1997a). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275, 1943-1947.
- Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997b). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Liu, S. S., Tsang, B. K., Cheung, A. N., Xue, W. C., Cheng, D. K., Ng, T. Y., Wong, L. C., and Ngan, H. Y. (2001). Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer* 37, 1104-1110.

- 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.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S., and Weissman, A. M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11364-11369.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Luscher, B., and Larsson, L. G. (1999). The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation. *Oncogene* 18, 2955-2966.
- Maehama, T., and Dixon, J. E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273, 13375-13378.
- Mandal, M., Maggirwar, S. B., Sharma, N., Kaufmann, S. H., Sun, S. C., and Kumar, R. (1996). Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF-kappaB signaling pathway. *J Biol Chem* 271, 30354-30359.
- Marcu, K. B., Bossone, S. A., and Patel, A. J. (1992). myc function and regulation. *Annu Rev Biochem* 61, 809-860.
- Marteijn, J. A., Jansen, J. H., and van der Reijden, B. A. (2006). Ubiquitylation in normal and malignant hematopoiesis: novel therapeutic targets. *Leukemia* 20, 1511-1518.
- Martin, A. G., and Fearnhead, H. O. (2002). Apocytochrome c blocks caspase-9 activation and Bax-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277, 50834-50841.
- Mashima, T., Naito, M., Noguchi, K., Miller, D. K., Nicholson, D. W., and Tsuruo, T. (1997). Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* 14, 1007-1012.
- Mashima, T., Naito, M., and Tsuruo, T. (1999). Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene* 18, 2423-2430.
- Matthias, P., Muller, M. M., Schreiber, E., Rusconi, S., and Schaffner, W. (1989). Eukaryotic expression vectors for the analysis of mutant proteins. *Nucleic Acids Res* 17, 6418.
- Matuschewski, K., Hauser, H. P., Treier, M., and Jentsch, S. (1996). Identification of a novel family of ubiquitin-conjugating enzymes with distinct amino-terminal extensions. *J Biol Chem* 271, 2789-2794.
- Meinzel, T., Peynot, P., and Giglione, C. (2005). Processed N-termini of mature proteins in higher eukaryotes and their major contribution to dynamic proteomics. *Biochimie* 87, 701-712.
- Miller, S. L., Malotky, E., and O'Bryan, J. P. (2004). Analysis of the role of ubiquitin-interacting motifs in ubiquitin binding and ubiquitylation. *J Biol Chem* 279, 33528-33537.

- Moffitt, K. L., Martin, S. L., and Walker, B. (2007). The emerging role of serine proteases in apoptosis. *Biochem Soc Trans* 35, 559-560.
- Monami, G., Emiliozzi, V., and Morrione, A. (2008). Grb10/Nedd4-mediated multiubiquitination of the insulin-like growth factor receptor regulates receptor internalization. *J Cell Physiol* 216, 426-437.
- Mosesson, Y., Shtiegman, K., Katz, M., Zwang, Y., Vereb, G., Szollosi, J., and Yarden, Y. (2003). Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *J Biol Chem* 278, 21323-21326.
- Muzio, M. (1998). Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis. *Int J Clin Lab Res* 28, 141-147.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273, 2926-2930.
- Myers, M. P., Pass, I., Batty, I. H., Van der Kaay, J., Stolarov, J. P., Hemmings, B. A., Wigler, M. H., Downes, C. P., and Tonks, N. K. (1998). The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13513-13518.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256, 12-18.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.
- Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D. B., and Monaco, J. J. (1997). Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *Embo J* 16, 5363-5375.
- Nau, M. M., Brooks, B. J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A. F., Kirsch, I. R., McBride, O. W., Bertness, V., Hollis, G. F., and Minna, J. D. (1985). L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 318, 69-73.
- Nesbit, C. E., Tersak, J. M., and Prochownik, E. V. (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18, 3004-3016.
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042.
- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., and et al. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43.
- Nordeen, S. K. (1988). Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* 6, 454-458.
- Ogata, Y., and Takahashi, M. (2003). Bcl-xL as an antiapoptotic molecule for cardiomyocytes. *Drug News Perspect* 16, 446-452.

- Orth, K., Chinnaiyan, A. M., Garg, M., Froelich, C. J., and Dixit, V. M. (1996). The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem* 271, 16443-16446.
- Page, A. M., and Hieter, P. (1999). The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu Rev Biochem* 68, 583-609.
- Panasyuk, G., Nemazanyy, I., Zhyvoloup, A., Bretner, M., Litchfield, D. W., Filonenko, V., and Gout, I. T. (2006). Nuclear export of S6K1 II is regulated by protein kinase CK2 phosphorylation at Ser-17. *J Biol Chem* 281, 31188-31201.
- Park, K., Kuechle, M. K., Choe, Y., Craik, C. S., Lawrence, O. T., and Presland, R. B. (2006). Expression and characterization of constitutively active human caspase-14. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 941-948.
- Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., and Xue, D. (2001). Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature* 412, 90-94.
- Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, G. I. (2002). Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* 109, 321-334.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S. P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21, 921-926.
- Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.
- Prendergast, G. C. (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 18, 2967-2987.
- Prendergast, G. C., and Ziff, E. B. (1991). Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* 251, 186-189.
- Puthalakath, H., and Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* 9, 505-512.
- Queva, C., McArthur, G. A., Ramos, L. S., and Eisenman, R. N. (1999). Dwarfism and dysregulated proliferation in mice overexpressing the MYC antagonist MAD1. *Cell Growth Differ* 10, 785-796.
- Ramage, R., Green, J., Muir, T. W., Ogunjobi, O. M., Love, S., and Shaw, K. (1994). Synthetic, structural and biological studies of the ubiquitin system: the total chemical synthesis of ubiquitin. *Biochem J* 299 ( Pt 1), 151-158.
- Read, S. H., Baliga, B. C., Ekert, P. G., Vaux, D. L., and Kumar, S. (2002). A novel Apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex. *J Cell Biol* 159, 739-745.
- Rechsteiner, M. (1990). PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. *Semin Cell Biol* 1, 433-440.
- Reed, J. C. (2006). Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ* 13, 1378-1386.

- Rideout, H. J., Zang, E., Yeasmin, M., Gordon, R., Jabado, O., Park, D. S., and Stefanis, L. (2001). Inhibitors of trypsin-like serine proteases prevent DNA damage-induced neuronal death by acting upstream of the mitochondrial checkpoint and of p53 induction. *Neuroscience* 107, 339-352.
- Riedl, S. J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907.
- Riezman, H., Munn, A., Geli, M. I., and Hicke, L. (1996). Actin-, myosin- and ubiquitin-dependent endocytosis. *Experientia* 52, 1033-1041.
- Rivett, A. J. (1989). The multicatalytic proteinase complex. *Revis Biol Celular* 20, 113-123.
- Robertson, K. D. (2002). DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* 21, 5361-5379.
- Robinson, P. A., and Ardley, H. C. (2004). Ubiquitin-protein ligases. *J Cell Sci* 117, 5191-5194.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-368.
- Rottmann, S., and Luscher, B. (2006). The Mad side of the Max network: antagonizing the function of Myc and more. *Curr Top Microbiol Immunol* 302, 63-122.
- Rottmann, S., Speckgens, S., Luscher-Firzlaff, J., and Luscher, B. (2008). Inhibition of apoptosis by MAD1 is mediated by repression of the PTEN tumor suppressor gene. *Faseb J* 22, 1124-1134.
- Roussel, M. F., Ashmun, R. A., Sherr, C. J., Eisenman, R. N., and Ayer, D. E. (1996). Inhibition of cell proliferation by the Mad1 transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 16, 2796-2801.
- Roussel, M. F., Cleveland, J. L., Shurtleff, S. A., and Sherr, C. J. (1991). Myc rescue of a mutant CSF-1 receptor impaired in mitogenic signalling. *Nature* 353, 361-363.
- Roy, B., and Reisman, D. (1995). Inducible expression of Mad accelerates growth arrest of serum deprived human glioblastoma cells. *Cell Biol Int* 19, 307-313.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* 16, 6914-6925.
- Saleh, M., Vaillancourt, J. P., Graham, R. K., Huyck, M., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Steinberg, M. H., Nolan, V., Baldwin, C. T., Hotchkiss, R. S., *et al.* (2004). Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* 429, 75-79.
- Samuel, T., Okada, K., Hyer, M., Welsh, K., Zapata, J. M., and Reed, J. C. (2005). cIAP1 Localizes to the nuclear compartment and modulates the cell cycle. *Cancer Res* 65, 210-218.

Savill, J., Fadok, V., Henson, P., and Haslett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* *14*, 131-136.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* *17*, 1675-1687.

Schechter, I., and Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* *27*, 157-162.

Schreiber-Agus, N., and DePinho, R. A. (1998). Repression by the Mad(Mxi1)-Sin3 complex. *Bioessays* *20*, 808-818.

Shih, S. C., Sloper-Mould, K. E., and Hicke, L. (2000). Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *Embo J* *19*, 187-198.

Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., and Lenardo, M. J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* *288*, 2354-2357.

Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* *276*, 7320-7326.

Snowden, A. W., Anderson, L. A., Webster, G. A., and Perkins, N. D. (2000). A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. *Mol Cell Biol* *20*, 2676-2686.

Sommer, A., Bousset, K., Kremmer, E., Austen, M., and Luscher, B. (1998). Identification and characterization of specific DNA-binding complexes containing members of the Myc/Max/Mad network of transcriptional regulators. *J Biol Chem* *273*, 6632-6642.

Sommer, A., Hilfenhaus, S., Menkel, A., Kremmer, E., Seiser, C., Loidl, P., and Luscher, B. (1997). Cell growth inhibition by the Mad/Max complex through recruitment of histone deacetylase activity. *Curr Biol* *7*, 357-365.

Spence, J., Gali, R. R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M., and Finley, D. (2000). Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* *102*, 67-76.

Srinivasula, S. M., and Ashwell, J. D. (2008). IAPs: what's in a name? *Mol Cell* *30*, 123-135.

Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., and Alnemri, E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* *410*, 112-116.

Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., and Mak, T. W. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* *8*, 317-325.

Stennicke, H. R., Renatus, M., Meldal, M., and Salvesen, G. S. (2000). Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *Biochem J* *350 Pt 2*, 563-568.



- Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5, 189-200.
- Strous, G. J., and Govers, R. (1999). The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci* 112 ( Pt 10), 1417-1423.
- Sundqvist, A., and Ericsson, J. (2003). Transcription-dependent degradation controls the stability of the SREBP family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13833-13838.
- Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Prevost, M. C., *et al.* (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192, 571-580.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8, 613-621.
- Tafani, M., Minchenko, D. A., Serroni, A., and Farber, J. L. (2001). Induction of the mitochondrial permeability transition mediates the killing of HeLa cells by staurosporine. *Cancer Res* 61, 2459-2466.
- Takahashi, A., Alnemri, E. S., Lazebnik, Y. A., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Moir, R. D., Goldman, R. D., Poirier, G. G., Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C. (1996). Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8395-8400.
- Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 273, 7787-7790.
- Talanian, R. V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M. C., Mankovich, J. A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K. D., and Wong, W. W. (1997). Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 272, 9677-9682.
- Tanahashi, N., Kawahara, H., Murakami, Y., and Tanaka, K. (1999). The proteasome-dependent proteolytic system. *Mol Biol Rep* 26, 3-9.
- Thome, M., and Tschopp, J. (2001). Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* 1, 50-58.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- Thornberry, N. A. (1997). The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 53, 478-490.

- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., and et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* 19, 94-102.
- Tsubuki, S., Kawasaki, H., Saito, Y., Miyashita, N., Inomata, M., and Kawashima, S. (1993). Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 1195-1201.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 9, 20-26.
- Vander Heiden, M. G., and Thompson, C. B. (1999). Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* 1, E209-216.
- Varadan, R., Assfalg, M., Haririnia, A., Raasi, S., Pickart, C., and Fushman, D. (2004). Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J Biol Chem* 279, 7055-7063.
- Vastrik, I., Kaipainen, A., Penttila, T. L., Lymboussakis, A., Alitalo, R., Parvinen, M., and Alitalo, K. (1995). Expression of the mad gene during cell differentiation in vivo and its inhibition of cell growth in vitro. *J Cell Biol* 128, 1197-1208.
- Verger, A., Perdomo, J., and Crossley, M. (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* 4, 137-142.
- Verhagen, A. M., Silke, J., Ekert, P. G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L. M., Day, C. L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., et al. (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277, 445-454.
- Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J. M., Rottmann, S., Lilischkis, R., Walsemann, G., Dohmann, K., Austen, M., and Luscher, B. (2003). Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep* 4, 484-490.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E., Wilkinson, K. D., and Cook, W. J. (1985). Three-dimensional structure of ubiquitin at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3582-3585.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E., Wilkinson, K. D., Vierstra, R. D., Hatfield, P. M., and Cook, W. J. (1987). Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin. *J Biol Chem* 262, 6396-6399.
- Wang, C. N., Chi, C. W., Lin, Y. L., Chen, C. F., and Shiao, Y. J. (2001). The neuroprotective effects of phytoestrogens on amyloid beta protein-induced toxicity are mediated by abrogating the activation of caspase cascade in rat cortical neurons. *J Biol Chem* 276, 5287-5295.

- Wang, M., and Pickart, C. M. (2005). Different HECT domain ubiquitin ligases employ distinct mechanisms of polyubiquitin chain synthesis. *Embo J* 24, 4324-4333.
- Wang, X., Herr, R. A., Chua, W. J., Lybarger, L., Wiertz, E. J., and Hansen, T. H. (2007). Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. *J Cell Biol* 177, 613-624.
- Ward, C. L., Omura, S., and Kopito, R. R. (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83, 121-127.
- Wee, L. J., Tan, T. W., and Ranganathan, S. (2006). SVM-based prediction of caspase substrate cleavage sites. *BMC Bioinformatics* 7 Suppl 5, S14.
- Wee, L. J., Tan, T. W., and Ranganathan, S. (2007). CASVM: web server for SVM-based prediction of caspase substrates cleavage sites. *Bioinformatics* 23, 3241-3243.
- Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169-178.
- Weller, M., Schulz, J. B., Wullner, U., Loschmann, P. A., Klockgether, T., and Dichgans, J. (1997). Developmental and genetic regulation of programmed neuronal death. *J Neural Transm Suppl* 50, 115-123.
- Wilkinson, J. C., Wilkinson, A. S., Scott, F. L., Csomos, R. A., Salvesen, G. S., and Duckett, C. S. (2004). Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs). A caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition. *J Biol Chem* 279, 51082-51090.
- Wilkinson, K. D., Cox, M. J., Mayer, A. N., and Frey, T. (1986). Synthesis and characterization of ubiquitin ethyl ester, a new substrate for ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Biochemistry* 25, 6644-6649.
- Wilkinson, K. D., Tashayev, V. L., O'Connor, L. B., Larsen, C. N., Kasperek, E., and Pickart, C. M. (1995). Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T. *Biochemistry* 34, 14535-14546.
- Wing, S. S. (2003). Deubiquitinating enzymes--the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 590-605.
- Wu-Baer, F., Lagazon, K., Yuan, W., and Baer, R. (2003). The BRCA1/BARD1 heterodimer assembles polyubiquitin chains through an unconventional linkage involving lysine residue K6 of ubiquitin. *J Biol Chem* 278, 34743-34746.
- Wu, G., Chai, J., Suber, T. L., Wu, J. W., Du, C., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 408, 1008-1012.
- Wyllie, A. H. (1992). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 11, 95-103.
- Xu, L., Zhu, J., Hu, X., Zhu, H., Kim, H. T., LaBaer, J., Goldberg, A., and Yuan, J. (2007). c-IAP1 cooperates with Myc by acting as a ubiquitin ligase for Mad1. *Mol Cell* 28, 914-922.

Yamano, H., Tsurumi, C., Gannon, J., and Hunt, T. (1998). The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitin-dependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor. *Embo J* 17, 5670-5678.

Yasuhara, N., Sahara, S., Kamada, S., Eguchi, Y., and Tsujimoto, Y. (1997). Evidence against a functional site for Bcl-2 downstream of caspase cascade in preventing apoptosis. *Oncogene* 15, 1921-1928.

Yin, X., Gu, S., and Jiang, J. X. (2001). The development-associated cleavage of lens connexin 45.6 by caspase-3-like protease is regulated by casein kinase II-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 276, 34567-34572.

Yuan, X. J., and Whang, Y. E. (2002). PTEN sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated and drug-induced apoptosis through a FADD-dependent pathway. *Oncogene* 21, 319-327.

Zaiss, D. M., Standera, S., Holzhutter, H., Kloetzel, P., and Sijts, A. J. (1999). The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes. *FEBS Lett* 457, 333-338.

Zervos, A. S., Gyuris, J., and Brent, R. (1993). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 72, 223-232.

Zhu, J., Blenis, J., and Yuan, J. (2008). Activation of PI3K/Akt and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6584-6589.

Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12, 2424-2433.

Zwickl, P., Voges, D., and Baumeister, W. (1999). The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 1501-1511.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

Δ	Deletion
α	Antikörper
A	Adenin
Ac-	Acetyl-
AIF	apoptosis inducing factor
AKT (PKB)	protein kinase B
Amp	Ampicillin
ANT	adenine nucleotide translocator
Apaf-1	apoptotic protease-activating factor 1
APC	anaphase-promoting complex
APS	Ammonium-Persulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gus	beta-glucuronidase
b	basic region
BAK	Bcl-2 antagonist killer
BAX	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2
BH	Bcl-2 homology
BID	BH3 interacting domain death agonist
BIR	baculovirus IAP repeat
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BR	Basische Region
BSA	bovine serum albumin; Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
C	Cytosin
C	Carboxyl-Terminus, C-Terminus
CAD	caspase-activated DNase
CARD	capase recruitment domain
CBP	CREB binding protein
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalie-Virus
CoIP	Co-Immunpräzipitation
DD	death domain
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser

DED	death effector domain
DISC	death inducing signaling complex
DMEM	Dulbeccos´ s Modifies Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	double stranded DNA
DTT	Dithreitol
E-Box	Promotor-Enhancer-Element
ECFP	enhanced cyan-fluorescent protein
ECL	enhanced chemiluminescence
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzym linked immuno sorbant assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FADD	Fas-associated death domain
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fötales Kälberserum
FLIP	FLICE inhibitory protein
G	Guanin
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
GW	Gateway System
h	<i>hour</i> , Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
HAT	Histon-Acetyltransferase
HAX-1	HS1-associated protein X-1
HDAC	Histon-Deacetylase
Hebs	hepes buffered saline
HECT	homologous to E6-associated protein C-terminus
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N´-2-Ethansulfonsäure
His	Histidin
HLH	Helix-Loop-Helix
Hs	Homo sapiens
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
HtrA2/Omi	high temperature requirement A2
IAP	Inhibitor of apoptosis proteins
ICAD/DFF40	inhibitor of caspase-activated DNase
ICE	interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
Kan	Kanamycin
kb	Kilo-Basen = 1000 Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria Broth
LZ	leucine-zipper
$\mu$	Mikro-
m	Milli-
M	Molar

mA	Milli-Ampere
MAD	max dimerization protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAX	myc-associated factor X
$\beta$ -MeEtOH	$\beta$ -Mercaptoethanol
MEF	mouse embryonic fibroblast
MEM	Modified Eagle Medium
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA; Boten-RNA
mTOR	mammalien target of rapamycin
n	Nano-
N	Amino-Terminus, N-Terminus
neo	Neomycin-Resistenzgen
NLS	nuclear localization signal
NME	N-terminal methionine excision
nt	Nucleotide
Nuc	Nukleus
OD	optische Dichte
ONPG	O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactosidase
ORF	<i>open reading frame</i> ; offenes Leseraster
ori	origin of replication; Replikationsstart
p	Pico-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP1	poly(ADP-ribose)polymerase1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
REF	rat embryonal fibroblasts
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	pH-Wert
PI3K	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
Pol	Polymerase
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
PT-Pore	permeability transitino pore
Puro	Puromycin
qRT-PCR	quantitative <i>Real-time</i> -PCR
RING	really interesting new gene
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i> ; RNA Interferenz
Rnase	Ribonuclease
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RSK	p90 ribosomal kinase
RT	Raumtemperatur
S	Serin
S6K1	p70 ribosomal S6 kinase 1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	<i>second</i> ; Sekunde(n)
SID	mSIN3-Interaktions-Domäne
siRNA	short interfering RNA

Smac/DIABLO	second mitochondrial activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI
ssDNA	single stranded DNA
STS	Staurosporin
SV40	Simianvirus Typ 40
T	Thymin
TAD	Transaktivierungsdomäne
tBID	truncated BID
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TNF	tumor necrosis factor
TSC	tuberous sclerosis complex
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>units</i> ; Enzymeinheit
U	Uracil
Ub	Ubiquitin
UBX	ubiquitin regulatory X
UV	Ultraviolett
V	Volt
VDAC	voltage-dependent anion channel
v/v	Volumen pro Volumen-Verhältnis
w/v	Gewicht pro Volumen-Verhältnis
wt	Wildtyp
WT	Wilms tumor suppressor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
zeo	Zeocin



## 7.2 Aminosäurecode

Aminosäure	Dreibuchstaben	Einbuchstaben	Rest
Alanin	Ala	A	-CH <sub>3</sub>
Arginin	Arg	R	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH-C(NH)NH <sub>2</sub>
Asparagin	Asn	N	-CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
Asparaginsäure	Asp	D	-CH <sub>2</sub> COOH
Cystein	Cys	C	-CH <sub>2</sub> SH
Glutamin	Gln	Q	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>
Glutaminsäure	Glu	E	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH
Glycin	Gly	G	-H
Histidin	His	H	-CH <sub>2</sub> (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> N <sub>2</sub> )
Isoleucin	Ile	I	-CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Leucin	Leu	L	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Lysin	Lys	K	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
Methionin	Met	M	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>
Phenylalanin	Phe	F	-CH <sub>2</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )
Prolin	Pro	P	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -
Serin	Ser	S	-CH <sub>2</sub> OH
Threonin	Thr	T	-CH(OH)CH <sub>3</sub>
Tryptophan	Trp	W	-CH <sub>2</sub> (C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> N)
Tyrosin	Tyr	Y	-CH <sub>2</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> )OH
Valin	Val	V	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

Proteinsequenzen werden vom N-Terminus zum C-Terminus geschrieben. Aminosäuren in Proteinen werden im Ein-Buchstaben-Code, gefolgt von der Position der Aminosäure, angegeben. Mutanten von Proteinen werden mit dem Namen des Wildtyps und der Mutantenbeschreibung bezeichnet. Die Mutantenbeschreibung besteht aus der Wildtyp-Aminosäure (Ein-Buchstaben-Code), der Position der Mutation und der ausgetauschten Aminosäure (Ein-Buchstaben-Code).

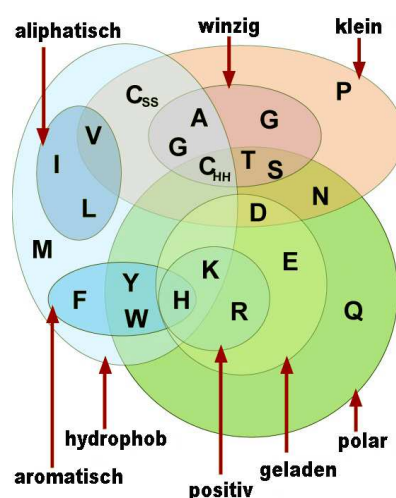


Abbildung 7.1: Venn-Diagramm mit Einteilung der Aminosäuren nach ihren physikochemischen Eigenschaften. (modifiziert nach Taylor et al., 1986)

## 7.3 Lebenslauf

### Persönliche Informationen

---

Name: Stefanie Speckgens  
Geburtsdatum: 06.12.1977  
Geburtsort: Würselen  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

---

1984-1988 Besuch der Kath. Grundschule der Stadt Würselen  
1988-1994 Besuch der Realschule der Stadt Würselen  
Juni 1994 Erlangung der Fachoberschulreife  
1994-1997 Besuch des Gymnasiums der Stadt Herzogenrath  
Juni 1997 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

### Studium

---

1997-2004 Diplom-Studiengang Biologie an der RWTH Aachen  
2003-2004 Diplomarbeit am  
Institut für Biochemie und Molekularbiologie  
an der RWTH Aachen  
bei Prof. B. Lüscher  
Thema: Regulation des Tumorsuppressorgens  
*PTEN* durch *MAD1*  
November 2004 Erlangung des Grades Diplom-Biologe

### Berufstätigkeit

---

Seit Februar 2005 wissenschaftliche Angestellte im  
Institut für Biochemie und Molekularbiologie  
an der RWTH Aachen  
bei Prof. B. Lüscher

## 7.4 Veröffentlichungen

### 7.4.1 Publikationen

Rottmann\*, S. Speckgens\*, S., Lüscher-Firzlaff, J. M., and Lüscher, B. (2008). Inhibition of apoptosis by MAD1 is mediated by repression of the PTEN tumor suppressor gene. *FASEB Journal*, 22, 1124-1134. \*equal contribution

Lue, H., Thiele, M., Franz, J., Dahl, E., Speckgens, S., Leng, L., Fingerle-Rowson, G., Bucala, R., Lüscher, B., and Bernhagen, J. (2007). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Onkogene* 26, 5046-5059.

Krippner-Heidenreich, A., Walsemann, G., Beyrouthy, M. J., Speckgens, S., Kraft, R., Thole, H., Talanian, R. V., Hurt, M. M., and Lüscher, B. (2005). Caspase-dependent regulation and subcellular redistribution of the transcriptional modulator YY1 during apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3704-3714.

### 7.4.2 Posterpräsentationen

Speckgens, S., Rottmann, S., Lüscher, B. (2008). Inhibition of apoptosis by MAD1 is mediated by repression of the PTEN tumor suppressor gene. 16th Euroconference on Apoptosis, ECDO, Bern.

Speckgens, S. Lüscher, B. (2009). MAD1 dependent inhibition of apoptosis is followed by decreased stability. Signal Transduction and Disease, GBM-Meeting, Aachen.

## 7.5 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle in Anspruch genommenen Hilfen in der Dissertation angegeben habe. Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation nicht bereits als Diplomarbeit oder vergleichbare Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Aachen, den 14.10.2009

Stefanie Speckgens

## 7.6 Danksagung

Bei allen, die mich bei dieser Arbeit begleitet haben, möchte ich mich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Lüscher möchte ich für die Möglichkeit zur Promotion danken, für die Übertragung dieses Projekts, sein Vertrauen in meine Arbeit, für seine Diskussionsbereitschaft und den unglaublichen Optimismus.

Für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Herrn Prof. Dr. Werner Baumgartner dankbar.

Für die gute Atmosphäre beim Arbeiten, wissenschaftlichen Austausch und vieles mehr bedanke ich mich bei den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Lüscher:

Georgios Agalaridis, Dr. Poornima Basavarajaiah, Kathrin Borggrebe, Anne Braczynski, Stefan Brüning, Heike Chauvistre, Christian Cornelissen, Karla Feijs, Franziska Flick, Alexandra Forst, Isabella Gawlista, Andrea Graf, Nora Honke, Britta Jedamzik, Dr. Kan Jiang, Angelina Kriescher, Dr. Richard Lilischkis, Barbara Lippok, Gabriele Lützeler, Larissa Milke, Elke Meyer, Katrin Montzka, Alexandra Neuss, Daniela Otten, Dr. Ruwin Pandithage, Carolina Pfaff, Krischen Ray, Marcel Robbertz, Jens Schirmacher, Anne Schröder, Vera Schumacher, Mikola Seeliger, Jürgen Stahl, Angelika Szameit, Sven Vosshall, Susanne Waibel, Alexandra Wolf.

Dr. Thomas Claßen, Anna Dittrich, Tanja Nöcker, Dr. Radek Sobota, Marianna Tatarek-Nossol und Michael Vogt möchte ich für ihre spontane Hilfe in kritischen Situationen und für das zur Verfügung stellen von Wissen und Material danke sagen.

Dafür, dass sie sich immer Zeit für die Beantwortung von großen und kleinen Fragen genommen haben, möchte ich Dr. Henning Kleine, Dr. Jörg Vervoorts-Weber und Dr. Juliane Lüscher-Firzlaff meinen Dank aussprechen.

Für gute Ratschläge aus der Ferne geht ein „Vielen Dank“ an Dr. Sabine Rottmann.

Speziell bei Elena Buerova möchte ich mich für ihre hilfsbereite Art, ihre Unterstützung und mütterliche Fürsorge bedanken.

Danke, an Dr. Mei Yu dafür, dass sie mir gezeigt hat, dass es auch anders geht!

Bei Dr. Stephan Dreschers möchte ich mich nicht nur für seine Unterstützung am FACS bedanken, „just try!“.

Nadine Hein danke ich für das gemeinsame Durchleben von guten und schwierigen Zeiten.

Ulrike Linzen bekommt ein extra glitzerndes Dankeschön für Freitag-Nachmittags-Spässe, sowie regelmäßiges verbales und physisches „in den Hintern treten“!

Dr. Gesa Walsemann gebührt mein Dank dafür, dass sie mir das alles zugetraut hat, für ihre Freundschaft und für *gelato* bis zum Abwinken.

Dr. Wibke Peters gebührt mein besonderer Dank für ihre Freundschaft und dafür, dass sie mich immer motivieren konnte.

Von Herzen danken möchte ich Pia Müller für ihre Freundschaft und dafür, dass sie mich nicht nur bei dieser Arbeit so großartig unterstützt.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meinen „Projektmanager“ Dr. Karsten Kapelle für seine guten Ideen und Diskussionen bis in die späte Nacht, für eine wunderbare Freundschaft und dafür, dass er in bösen Zeiten so selbstverständlich für mich da war.

Tausend Dank an alle meine tollen Freunde, die mir in dieser Zeit immer beigestanden haben.

Vor allem aber danke ich meiner Familie, meinen lieben Eltern, ohne die ich es niemals hätte schaffen können, sowie meinem Bruder und meinen Großmüttern, die immer an mich geglaubt haben.