



**Solveig Nicole Söding**

**Identifizierung neuer potentieller Interaktionspartner  
von xIAP  
und Untersuchung ihrer biologischen Funktion**

**2005**



# Biologie

Identifizierung neuer potentieller Interaktionspartner von xIAP  
und Untersuchung ihrer biologischen Funktion

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Solveig Nicole Söding  
aus Hagen

- 2005 -

Dekan:

Prof. Dr. Alexander Steinbüchel

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Walter Stöcker

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Bodo Levkau

Tag der mündlichen Prüfung:

06.06.2005

Tag der Promotion:

22.07.2005

*Für meine Elter*



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 Apoptose</b> .....	<b>4</b>
2.1.1 Bedeutung der Apoptose für den Organismus .....	4
2.1.2 Regulationsmechanismen der Apoptose .....	5
<b>2.2 Die Funktionen von xIAP in Apoptose und Zellzyklus</b> .....	<b>7</b>
<b>2.3 Das Zwei-Hybrid-System</b> .....	<b>11</b>
2.3.1 Das klassische Zwei-Hybrid-System .....	11
2.3.2 Das ‚Sos Recruitment System‘ (SRS).....	12
2.3.3 Das ‚Ras Recruitment System‘ (RRS) .....	14
<b>2.4 Zielsetzung</b> .....	<b>15</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 Chemikalien</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2 Enzyme</b> .....	<b>18</b>
3.2.1 Restriktionsendonukleasen.....	18
3.2.2 Polymerasen, modifizierende Enzyme, Kit’s.....	18
<b>3.3 Inhibitoren</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4 Antikörper</b> .....	<b>19</b>
3.4.1 Primäre Antikörper.....	19

3.4.2	Sekundäre Antikörper .....	19
<b>3.5</b>	<b>Sonstige Materialien.....</b>	<b>20</b>
<b>3.6</b>	<b>Stämme, Medien und Anzucht.....</b>	<b>20</b>
3.6.1	Bakterienstämme .....	20
3.6.2	Hefestämme.....	20
3.6.3	Säugetierzelllinien.....	21
3.6.4	Medien und Anzucht .....	21
3.6.4.1	Medien für <i>Escherichia coli</i> .....	21
3.6.4.2	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	21
3.6.4.3	Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
3.6.4.4	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
3.6.4.5	Medien für Säugetierzelllinien.....	23
3.6.4.6	Anzucht von Säugetierzelllinien .....	24
<b>3.7</b>	<b>Synthetische Oligonukleotide .....</b>	<b>24</b>
<b>3.8</b>	<b>Plasmide .....</b>	<b>25</b>
<b>3.9</b>	<b>HUVEC cDNA-Bank.....</b>	<b>26</b>
3.9.1	Titerbestimmung der cDNA-Bank:.....	26
3.9.2	Amplifikation der cDNA-Bank:.....	26
<b>3.10</b>	<b>Transformationen/ Transfektionen .....</b>	<b>27</b>
3.10.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	27
3.10.1.1	Elektroporation.....	27
3.10.1.2	Ein-Minuten-Transformation .....	28
3.10.1.3	Hocheffiziente Transformation .....	29
3.10.2	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
3.10.2.1	Schnelltransformation .....	30
3.10.2.2	Transformation mit hoher Effizienz.....	31
3.10.3	Transfektion von Säugetierzellen.....	32
3.10.3.1	Lipofektion .....	32
3.10.4	Transduktion von Säugerzellen mit TAT-Fusionsproteinen.....	33



<b>3.11</b>	<b>Zwei-Hybrid-Screens .....</b>	<b>34</b>
3.11.1	CytoTrap.....	34
3.11.2	RRS-Screen .....	36
<b>3.12</b>	<b>DNA und RNA Präparation .....</b>	<b>37</b>
3.12.1	Phenol/Chloroform Extraktion.....	37
3.12.2	Plasmid-Präparation aus <i>Escherichia coli</i> .....	37
3.12.3	DNA-Präparation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> zur Elektroporation in <i>E.coli</i>	38
3.12.4	RNA -Präparation aus Säugetierzellen.....	39
3.12.5	DNA Präparation aus Agarosegelen .....	39
<b>3.13</b>	<b>RT-PCR.....</b>	<b>40</b>
<b>3.14</b>	<b>DNA-Restriktionsanalyse .....</b>	<b>40</b>
<b>3.15</b>	<b>DNA-Ligation .....</b>	<b>41</b>
<b>3.16</b>	<b>PCR-Amplifikation von DNA .....</b>	<b>41</b>
<b>3.17</b>	<b>Auftrennung von DNA-Fragmenten über Agarosegele.....</b>	<b>41</b>
<b>3.18</b>	<b>Proteinpräparation.....</b>	<b>42</b>
3.18.1	Proteinpräparation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	42
3.18.2	Proteinpräparation aus Säugetierzellen .....	43
<b>3.19</b>	<b>Proteinbestimmung .....</b>	<b>43</b>
<b>3.20</b>	<b>Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgele.....</b>	<b>44</b>
<b>3.21</b>	<b>Western-Blot-Analyse .....</b>	<b>45</b>
<b>3.22</b>	<b>In vitro Translation.....</b>	<b>46</b>
<b>3.23</b>	<b>Proteinherstellung aus pGEX-Vektoren .....</b>	<b>46</b>
<b>3.24</b>	<b>GST-Pulldown .....</b>	<b>48</b>
<b>3.25</b>	<b>Apoptoseinduktion bei Säugetierzellen .....</b>	<b>50</b>

3.25.1	Wachstumsfaktorentzug in HUVEC .....	50
3.25.2	Apoptoseinduktion in T-Rex Zellen.....	50
<b>3.26</b>	<b>Induktion von ER-Stress .....</b>	<b>50</b>
<b>3.27</b>	<b>Hypoxie.....</b>	<b>50</b>
<b>3.28</b>	<b>Mitochondrienisolierung aus Säugetierzellen.....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>2-Hybrid-Screens.....</b>	<b>52</b>
4.1.1	Klonierung von xIAP in den Vektor pSos und Verifikation der Proteinexpression in der Hefe .....	52
4.1.2	Screening der HUVEC cDNA-Bank.....	54
<b>4.2</b>	<b>Überprüfung der Interaktion von xIAP mit den neuen potentiellen Interaktionspartnern .....</b>	<b>62</b>
4.2.1	GST-Pulldown von xIAP mit den Originalklonen aus den Two-Hybrid-Screens .....	62
4.2.2	Transfektion von 293 Zellen mit den Klonen 3, 7-4, 15 u. 24 .....	65
4.2.3	Immunpräzipitation von NNE und xIAP .....	67
4.2.4	Klonierung der Gene Tim44, mAAT, xXIP und xIAP für die Transfektion von Humanzellen.....	68
4.2.5	Transduktion von HUVEC Zellen mit NNE-TAT .....	68
4.2.6	Expression der Vollängenproteine in T-Rex Zellen.....	69
<b>4.3</b>	<b>Untersuchungen zur biologischen Funktion von Tim44, NNE und xXIP.....</b>	<b>72</b>
4.3.1	Versuche zur Freisetzung von Tim44 aus den Mitochondrien .....	72
4.3.2	Untersuchungen zur Regulation der Expression von NNE in HUVEC .....	73
4.3.3	Analyse der Funktionen von xXIP .....	74
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>76</b>

5.1	Two-Hybrid-Screens führen zur Identifikation von sieben neuen potentiellen Interaktionspartnern von xIAP .....	76
5.2	Die Interaktion von xIAP mit Tim44, mAAT, NNE und xXIP ist in T-Rex 293 Zellen nicht nachweisbar .....	82
5.3	Tim44 wird nicht aus den Mitochondrien sterbender Zellen ausgeschleust .....	84
5.4	Die Expression der $\alpha$ -Enolase nimmt unter Hypoxie zu .....	85
5.5	Die Überexpression von xXIP schützt die Zellen vor Apoptose.....	86
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	89
7	LITERATUR .....	90
8	ERKLÄRUNG.....	99
9	DANKSAGUNG.....	100

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Aktivierung von Caspasen.....	6
Abb. 2.2:	Struktur des xIAP Proteins.:.....	7
Abb. 2.3:	Funktionen und Interaktionen von xIAP.....	9
Abb. 2.4:	Das Prinzip des Zwei-Hybrid-Systems.....	11
Abb. 2.5:	Das Sos Recruitment System.....	13
Abb. 4.1:	Restriktionsanalyse von pSos-xIAP.....	53
Abb. 4.2:	Western-Blot Fusionsprotein hSos-xIAP.....	54
Abb. 4.3:	Serielle Tropftests der positiven Klone.....	55
Abb. 4.4:	Restriktionsanalyse zur Bestimmung der Insertgröße.....	55
Abb. 4.5:	Restriktionsanalyse für die Klonierung von pRRS-xIAP.....	57
Abb. 4.6:	Western-Blot Fusionsprotein RAS-xXIAP.....	58
Abb. 4.7:	Restriktionsanalyse zur Bestimmung der Insertgröße.....	59
Abb. 4.8:	Alignment YIP1 und xXIP.....	60
Abb. 4.9:	Radioaktiver GST-Pulldown Klon 7-4.....	62
Abb. 4.10:	GST-Pulldown Klon 15.....	63
Abb. 4.11:	GST-Pulldown Klon 24.....	64
Abb. 4.12:	<i>in vitro</i> Translation von xXIP.....	65
Abb. 4.13:	Expression der Klonproteine in T-Rex 293 Zellen.....	66
Abb. 4.14:	Co-Immunopräzipitation Klone 7-4 und 24.....	67
Abb. 4.15:	Transduktion von HUVEC Zellen mit NNE-TAT.....	69
Abb. 4.16:	Expression und Immunpräzipitation von xIAP-HA.....	70
Abb. 4.17:	Expression von Tim44-myc.....	70
Abb. 4.18:	Expression und Immunpräzipitation von xXIP-HA.....	71
Abb. 4.19:	Expression und Immunpräzipitation von mAAT-HA.....	71
Abb. 4.20:	Ausschleusung von Tim44 bei Apoptose.....	72
Abb. 4.21:	Expression humaner NNE unter Hypoxie.....	73
Abb. 4.22:	Auswirkungen der Überexpression von xXIP auf die Apoptose.....	74

# 1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Adenosin (in Sequenzen)
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin (in Sequenzen)
ca.	circa
cDNS	komplementäre DNS
ddH <sub>2</sub> O	doppelt deionisiertes Wasser
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNS
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et. al.	und andere
FKS	Fötales Kälberserum
G	Guanosin (in Sequenzen)
g	Erdbeschleunigung; Gramm
GST	Glutation-S-Transferase
h	Stunde
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]))
IB	Immunoblot

---

Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Galaktosid
kb	Kilobase
kD	Kilodalton
-Leu	Leucin-frei
l	Liter
LB	L-Broth' Vollmedium
-Met	Methionin-frei
M	Molar
mg	Milligramm
$\mu$ g	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
mM	Millimolar
mRNS	messenger-RNS
MW	Molekulargewicht
NK	Negativkontrolle
OL	Oligonukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame
P/C/L	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentia Hydrogenii, Säurestärke
PK	Positivkontrolle
pmol	picomol
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>S. cer.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	synthetisches Medium mit Dextrose
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde
SG	synthetisches Medium mit Galaktose

---

SRS	Sos recruitment system
T	Thymidin (in Sequenzen)
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Temperatursensitivität
-Ura	Uracil-frei
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
UV	Ultravilott
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumenanteil
w/v	Gewicht pro Volumenanteil
wt	Wildtyp
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast Peptone Dextrose
z.B.	zum Beispiel

## 2 Einleitung

### 2.1 Apoptose

#### 2.1.1 Bedeutung der Apoptose für den Organismus

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist an einer Vielzahl von Prozessen im Organismus beteiligt. Dieser physiologische Selbstmord der Zelle führt zu einer schnellen Entfernung nicht mehr benötigter oder beschädigter Zellen aus dem Organismus.

Er ist wichtig in der embryonalen Entwicklung, wo er an der Ausbildung der Strukturen des wachsenden Organismus, z.B. der Entstehung der Finger, beteiligt ist und zur Reifung des Immunsystems beiträgt [1]. So werden T-Lymphozyten, die Selbst-Antigene erkennen und somit Autoimmunreaktionen auslösen könnten, im Thymus durch Apoptose eliminiert. Im adulten Organismus spielt die Apoptose eine wichtige Rolle für den *Turnover* von Geweben sowie bei der Abwehr von Infektionen durch Mikroorganismen und der Bekämpfung von Tumorzellen. In den infizierten oder entarteten Zellen wird der programmierte Zelltod aktiviert, um die betroffenen Zellen zu eliminieren ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen. Während der Apoptose zeigen die betroffenen Zellen typische morphologische Veränderungen [2]. Hierbei kommt es zur Blasenbildung an der Plasmamembran, dem sogenannten *membrane blebbing* sowie zur Fragmentierung der DNA und schließlich zur Bildung apoptotischer Vesikel, die dann von Makrophagen oder anderen benachbarten Zellen schnell phagozytiert werden. Somit werden bei der Apoptose im Gegensatz zur Nekrose keine Zellbestandteile freigesetzt, die dann zu Entzündungsreaktionen führen könnten [3].

In unkontrollierter Form ist die Apoptose jedoch an der Pathogenese einer Vielzahl humaner Erkrankungen beteiligt. So führt ein zu geringes Maß an Zelltod zur Entstehung von Tumoren, da hier die entarteten Zellen nicht aus dem Organismus entfernt werden. Wird das apoptotische Programm hingegen vorzeitig aktiviert, werden gesunde Zellen und Gewebe zerstört, wie z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson aber auch bei atherosklerotischen Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall [4].

Der programmierte Zelltod spielt jedoch nicht nur für vielzellige Organismen eine wichtige Rolle. Vor einiger Zeit konnte diese Form des Zelltodes auch in einem einzelligen eukaryoten Organismus, der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* beobachtet werden [5]. Hierbei traten in Verbindung mit einer Mutation im Gen *CDC48* die für die Apoptose typischen Veränderungen wie z.B. DNA-Fragmentierung auf. Für die homologe Form dieses Gens



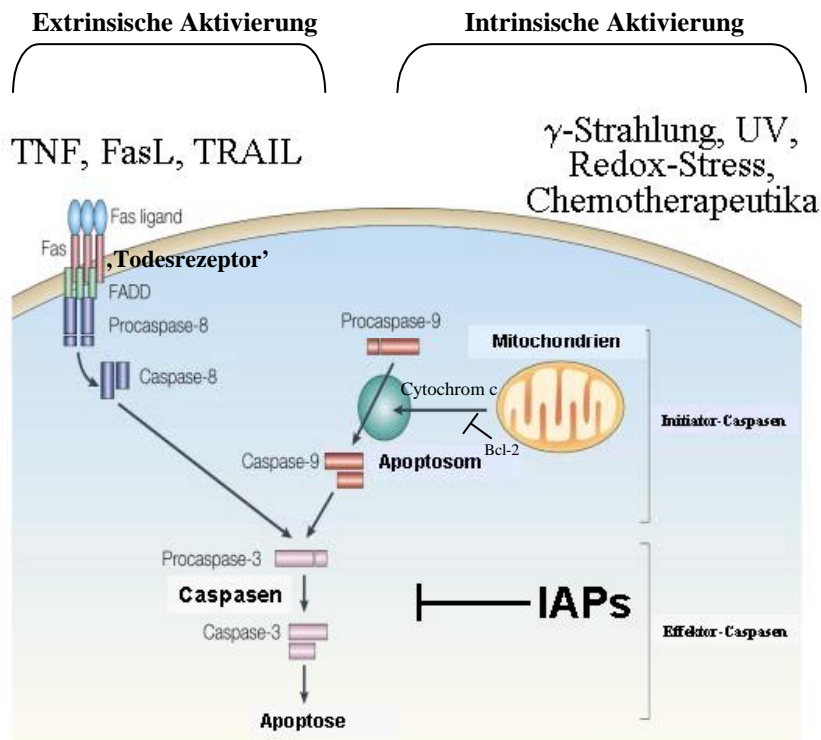
konnte später in Säugern ebenfalls eine Beteiligung an der Apoptoseregulation nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass in der Hefe, wie in höheren Säugetieren auch, reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS[*reactive oxygen species*]) eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose spielen [6].

Die Frage, welche Vorteile der Mechanismus der Apoptose für einen einzelligen Organismus bietet, konnte jedoch erst vor kurzem geklärt werden. Hier opfert sich nicht eine Zelle zum Wohl des ganzen Organismus, sondern es sterben alte Zellen, um das Überleben jüngerer, gesunder Hefezellen und somit das Überleben der gesamten Population zu sichern [7].

### **2.1.2 Regulationsmechanismen der Apoptose**

An der Regulation der Apoptose ist eine Vielzahl von Molekülen beteiligt. Einer der wichtigsten Schritte in diesem Prozess ist die Aktivierung von Caspasen. Diese Cystein-Proteasen spalten ihre Zielproteine nach einer konservierten Aspartatsequenz [8, 9]. Sie werden in der Zelle als inaktive Proenzyme konstitutiv exprimiert, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Dies geschieht entweder autokatalytisch oder durch andere Caspasen. Man unterscheidet zwei Formen von Caspasen, die Initiator-Caspasen und die von ihnen aktivierten Effektor-Caspasen, welche durch Spaltung ihrer Zielproteine z.B. Strukturproteine wie Lamin A und Komponenten des DNA-Reparatursystems wie PARP (Poly-(ADP-Ribose) Polymerase), die für die Apoptose charakteristischen morphologischen Veränderungen hervorrufen und den Tod der Zelle auslösen.

Die Aktivierung von Caspasen kann über zwei Wege erfolgen. Bei dem ‚intrinsischen‘ oder auch mitochondrialen Signalweg wird nach einem apoptotischen Stimulus Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt. Anschließend wird der sogenannte ‚Todeskomplex‘, das Apoptosom aus Cytochrom C, Apaf1 und der Procaspase-9 gebildet. Die hierdurch aktivierte Initiator-Caspase, Caspase-9, kann anschließend die Effektor-Caspasen wie z.B. Caspase-3 aktivieren. Der extrinsischen Todesweg erfolgt über die Aktivierung von Caspasen nach Bindung von Liganden wie FasL an ‚Todesrezeptoren‘ auf der Zelloberfläche. Es kommt zu einer Aktivierung der Initiator-Caspase, Caspase-8, die dann wiederum die Effektor-Caspasen aktiviert (Abb.2.1).



verändert nach Holcik Nat.Rev.Molcellbio V01.2 2001

### Abb. 2.1: Aktivierung von Caspasen

Die Aktivierung von Caspasen kann über zwei Signalkaskaden erfolgen. Extrinsisch über ‚Todesrezeptoren‘ und intrinsisch über die Mitochondrien. In beiden Fällen werden zunächst die Initiator-Caspasen (z.B. 6, 8 u. 9) aktiviert. Diese aktivieren anschließend die Effektor-Caspasen (z.B. 2, 3 u. 7), die dann ihre Zielproteine spalten. IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) können an die aktivierten Caspasen binden, diese so inhibieren und dadurch die Apoptose verhindern.

Damit es nicht zu einer unkontrollierten Aktivierung von Caspasen und somit zu einer für den Organismus schädlichen Apoptose kommt, stehen der Zelle eine Reihe von Mechanismen zur Verfügung.

So wirken einige Proteine der Bcl-2 Familie, wie Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1 antiapoptotisch, indem sie die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien verhindern [8].

Eine weitere wichtige Gruppe von Proteinen, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind, sind die IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*). Diese können im Gegensatz zu Proteinen wie Bcl-2 nicht nur den mitochondrialen Weg der Apoptose blockieren, sondern auch den Weg über die Todesrezeptoren inhibieren, indem sie direkt an die aktivierten Caspasen binden und deren Funktion hemmen. IAPs sind die einzigen bekannten endogenen Inhibitoren apoptotischer Caspasen. Sie wurden zuerst in Baculoviren beschrieben, wo sie die vom Wirt als Abwehrmechanismus ausgelöste Apoptose unterdrücken [10]. Homologe Proteine wurden später auch in *C. elegans*, *Drosophila* und *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert [11]. Alle

Mitglieder dieser Familie besitzen N-terminal mindestens eine BIR-Domäne (*baculoviral IAP repeat*), ein ~ 80 Aminosäuren großes Zink-Finger Motiv, welches die Interaktion mit den Caspasen vermittelt. Einige besitzen zudem eine C-terminale RING-Domäne (*really interesting new gene*), die eine E3-Ubiquitinligase Aktivität besitzt [12, 13]. Jedoch wirken nicht alle IAPs antiapoptotisch. Es konnte gezeigt werden, dass einige Proteine dieser Familie auch an der Zellzyklus-Regulation beteiligt sind.

So führte das Fehlen des BIR-1 Proteins in *C. elegans* zu einem letalen Defekt der Zytokinese während der Embryogenese, zeigt jedoch keinen Einfluss auf die Apoptoserate [14]. In der Hefe *S. cerevisiae* hat das einzige Protein mit einer BIR-Domäne BIR1 ebenfalls einen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus [15].

Das humane IAP *survivin* besitzt, wie die beiden zuvor erwähnten Proteine, ebenfalls nur eine BIR-Domäne. Es wird zu Beginn der G2/M-Phase des Zellzyklus exprimiert und assoziiert dort mit der mitotischen Spindel. Fehlt Survivin, so kommt es zu einer Zunahme der Caspase-3 Aktivität während der Mitose, sowie zu Defekten in der Zytokinese [16-18]. Neben Survivin wurden bis jetzt noch sieben weitere humane IAPs identifiziert: Bruce, NAIP, ML-IAP, c-IAP1, c-IAP2, ILP-2 und xIAP.

## 2.2 Die Funktionen von xIAP in Apoptose und Zellzyklus

Das *X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein* (xIAP) ist eines der wichtigsten und am besten untersuchten Mitglieder der Familie der humanen IAPs. Es besitzt 3 N-terminale BIR-Domänen und eine C-terminale RING-Domäne (Abb. 2.2) und ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. xIAP inhibiert spezifisch die Caspasen-3, -7 und -9, wobei die Inhibition durch unterschiedliche Bereiche des Proteins vermittelt wird [19, 20]. So werden die Caspasen-3 und -7 zum einen von einem kleinen nicht konservierten Bereich unmittelbar



**Abb. 2.2: Struktur des xIAP Proteins.:**

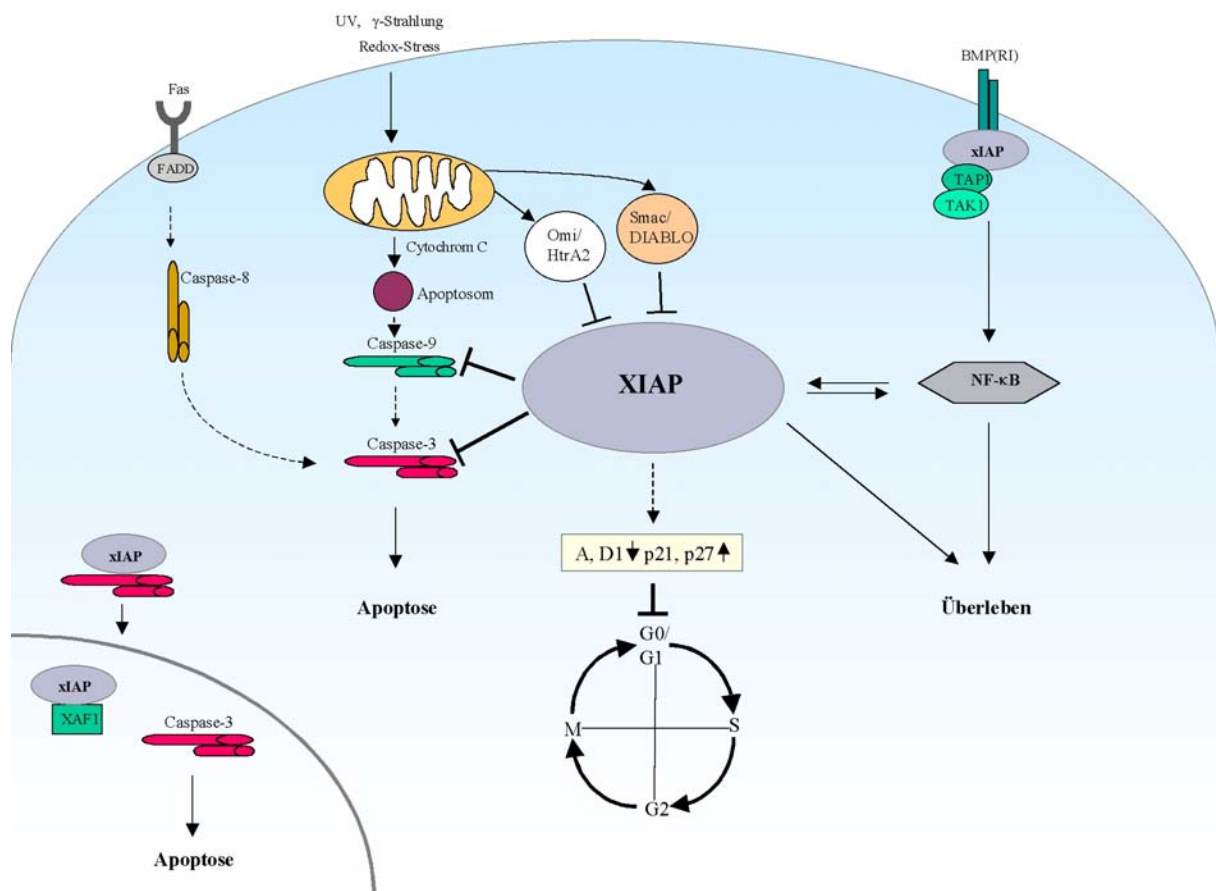
xIAP besitzt 3 BIR-Domänen und eine RING-Domäne. Die Inhibition der Caspasen-3 und -7 wird durch einen Bereich N-terminal der BIR-2 Region vermittelt. Caspase-9 wird über BIR-3 inhibiert. Zudem besitzt xIAP eine C-terminale RING-Domäne, über die andere Proteine ubiquitiniert werden können.

N-Terminal der BIR2-Domäne gebunden. Hierdurch wird die Interaktion der katalytisch aktiven Region der Caspasen mit ihrem Substraten sterisch gehindert [21, 22]. Zum anderen bindet xIAP über einen konservierten Bereich der BIR2-Domäne an Caspase-3 und -7 [23, 24]. Der entsprechende Abschnitt in der BIR3-Domäne von xIAP ist mitverantwortlich für die Inhibition der Caspase-9. Diese Region von xIAP bindet Caspase-9 über ein IAP Binde-Motiv (IBM) der kleinen Untereinheit dieses Enzyms, wodurch deren enzymatische Aktivität gehemmt wird. Zudem bindet die C-terminale Helix von BIR3 an den zur Dimerisierung benötigten Bereich von Caspase-9 und hält sie so in ihrer inaktiven monomeren Form [25].

Neben den Caspasen interagiert xIAP noch mit weiteren Proteinen, von denen einige ebenfalls ein IBM besitzen [26]. Hierzu gehören die beiden mitochondrialen Proteine Smac [27] und Omi/HtrA2 [28], deren IAP Binde-Motiv erst durch die Abspaltung der mitochondrialen Zielsequenz zugänglich wird. Beide werden nach einem apoptotischen Stimulus aus den Mitochondrien freigesetzt. Smac ist in nicht-apoptotischen Zellen im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert. Es wirkt pro-apoptotisch indem es nach seiner Freisetzung an die Bereiche von xIAP bindet, die für dessen Interaktion mit den Caspasen-3, -7 und -9 verantwortlich sind. Dabei interagiert das Smac-Dimer gleichzeitig mit der BIR2 und BIR3 Domäne von xIAP, wodurch die Bindung von xIAP an die Caspasen sterisch verhindert wird [29]. Diese können somit durch xIAP nicht mehr inhibiert werden und es kommt zur Apoptose. Auch Omi/HtrA2 führt zu einer Zunahme der Caspaseaktivität und somit der Apoptose, indem es an xIAP über sein IAP-Binde-Motiv bindet [30]. Darüber hinaus scheint Omi/HtrA2 den Tod von Zellen über einen von seiner IAP-Inhibition unabhängigen Mechanismus hervorzurufen, für den wahrscheinlich eine Serin-Protease-Aktivität verantwortlich ist. Hierbei handelt es sich jedoch um eine nicht-apoptotische Form des Zelltodes [31].

Neben Smac und Omi/HtrA2 sind noch weitere Interaktionspartner von xIAP identifiziert worden, die jedoch kein IBM besitzen. Zu dieser Gruppe gehört XAF1 (*xIAP-association factor 1*), das in einem Two-Hybrid-Screen als Interaktionspartner von xIAP identifiziert wurde [32]. Im Gegensatz zu den beiden mitochondrialen Proteinen Smac und Omi/HtrA2 muss XAF1 nicht prozessiert werden, um mit xIAP zu interagieren. Es konnte gezeigt werden, dass XAF1 *in vitro* ebenfalls die Inhibition von Caspasen durch xIAP unterdrückt. Wie es jedoch *in vivo* zu der Interaktion von dem im Kern lokalisierten XAF1 mit dem cytoplasmatischen xIAP kommt, ist nicht bekannt. Auch die strukturellen Grundlagen der

Bindung von XAF1 und xIAP sind noch nicht untersucht worden. Es wird jedoch vermutet, dass xIAP möglicherweise mit einem Caspase-3 Komplex in den Zellkern gelangt, wo es Caspase-3 inhibiert und so die Zerstörung nukleärer Proteine verhindert. XAF1 könnte hier, wie Smac in den Mitochondrien, als negativer Regulator von xIAP wirken.



**Abb. 2.3: Funktionen und Interaktionen von xIAP**

xIAP interagiert in der Zelle mit einer Reihe von Proteinen. Es bindet z. B. an die Caspasen-3 und -9 und schützt die Zelle so vor der Apoptose. Diese antiapoptotische Wirkung von xIAP wird durch die Bindung der mitochondrialen Proteine Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 aufgehoben, wenn diese nach einem apoptotischen Stimulus aus den Mitochondrien freigesetzt werden. Eine ähnliche Funktion wird auch für den im Zellkern lokalisierten Bindungspartner XAF1 postuliert. Außerdem aktiviert xIAP über seine Interaktionspartner BMP(R1), TAB1 und TAK1 seinen eigenen Transkriptionsfaktor NF-κB in einer positiven Feedback-Schleife. Darüber hinaus führt die Überexpression von xIAP zu einer Abnahme der Zykline A und D1 und einer Zunahme der Zellzyklus-Inhibitoren p21 und p27. Hierdurch kommt es zu einem Arrest der Zellen in der G0/G1 Phase des Zellzyklus.

Neben seiner Funktion als Apoptose-Inhibitor ist xIAP auch an der Signalweiterleitung in der Zelle beteiligt. Zwei der hieran beteiligten Interaktionspartner von xIAP, der Typ I BMP (*bone morphogenic protein*) Rezeptor und dessen Signalmolekül TAB1 (*TAK1-binding*

*protein 1*) wurden ebenfalls über einen Two-Hybrid-Screen identifiziert [33]. Darüber hinaus interagiert das Protein mit der MAP-KKK TAK1 (*transforming growth factor-beta-activated kinase 1*), die durch TAB1 aktiviert wird, sowie mit dem Typ I TGF- $\beta$  Rezeptor. xIAP ist über TAB1/TAK1 an der Regulation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beteiligt. Dieser Transkriptionsfaktor wird unter anderem über TNF $\alpha$  aktiviert. Er schützt die Zellen vor der durch dieses Zytokin vermittelten Apoptose, indem er die Expression von anti-apoptotischen Genen, darunter auch xIAP, reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass xIAP unter Beteiligung von TAK1 NF- $\kappa$ B in einer positiven Feedback-Schleife aktivieren und somit seine eigene, sowie die Expression anderer anti-apoptotischer Proteine verstärken kann [34].

Neben diesen Funktionen konnte kürzlich in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass xIAP den Zellzyklus blockiert. Insbesondere kommt es bei einer Überexpression des Proteins zu einer Abnahme der Zykline A und D1 und einer Zunahme der Zellzyklus-Inhibitoren p21 und p27, wodurch es zu einem Arrest der Zellen in der G0/G1 Phase des Zellzyklus kommt [35]. Über welche Mechanismen xIAP die Zellzyklusregulation beeinflusst, ist bis jetzt nicht bekannt.

Die Diversität der verschiedenen IAPs, ihr Vorkommen bei Hefepilzen, die weder Caspasen noch klassische Apoptose aufweisen, die Entdeckung, dass Survivin bei der normalen Zellteilung für die Zytokinese notwendig ist, sowie die Tatsache, dass xIAP als E3-Ubiquitin-Ligase agieren kann, den Zellzyklus reguliert und NF- $\kappa$ B aktiviert, lassen neben der anti-apoptotischen Wirkung der IAPs auch andere biologische Funktionen vermuten. Diese werden wahrscheinlich durch bislang unbekannte Interaktionspartner von xIAP oder durch deren Komplexe vermittelt.

## 2.3 Das Zwei-Hybrid-System

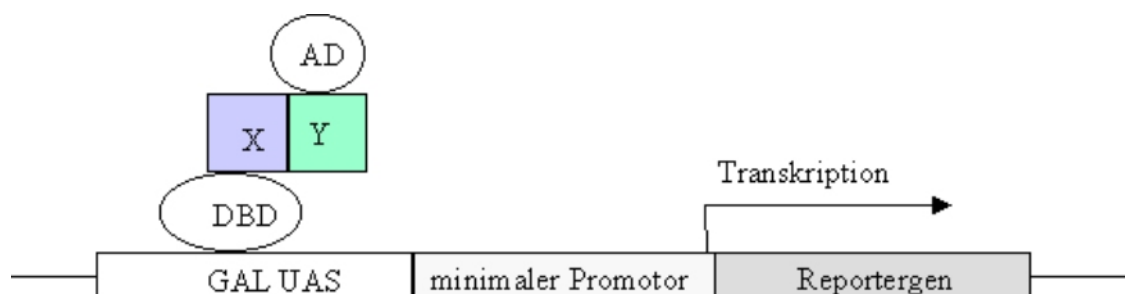
### 2.3.1 Das klassische Zwei-Hybrid-System

Das Zwei-Hybrid-System stellt eine Möglichkeit dar, Proteininteraktionen *in vivo* zu untersuchen. Das System wurde zuerst für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt. Sie ist einer der am häufigsten verwendeten Modellorganismen bei der Untersuchung eukaryotischer Gene. Die Gründe hierfür sind zum einen die mit ca. 90 min relativ kurze Generationszeit, die es ermöglicht, in kurzer Zeit Ergebnisse zu erhalten, sowie die mit einfachen Mitteln durchzuführende Genmanipulation.

Grundlage des klassischen Zwei-Hybrid-Systems ist der Transkriptionsfaktor GAL4 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dieses Protein besteht aus zwei Funktions-Domänen, der DNA-Bindedomäne (DBD), die an der GAL UAS (GAL *upstream-Aktivatorsequenz*) bindet, sowie der Aktivierungsdomäne (AD), die mit der basalen Transkriptionsmaschinerie interagiert und damit die Transkription auslöst, also als Transkriptionsaktivator wirkt.

In einem Zwei-Hybrid-System liegt auf einem Plasmid ein sogenanntes Köderprotein X als Fusion mit der GAL4pDNA-Bindedomäne vor, während auf einem weiteren Plasmid das zweite Protein Y als Fusion mit der GAL4p Aktivierungsdomäne vorliegt.

Interagieren X und Y miteinander, kommen die beiden GAL4 Funktionsdomänen in räumliche Nähe und es kommt zur Transkription von Reporter genen, die in das Hefegenom integriert wurden (Abb. 2.4) [36].



**Abb. 2.4: Das Prinzip des Zwei-Hybrid-Systems**

Die DNA-Bindedomäne (DBD) bindet an die GAL Aktivatorsequenz (GAL UAS). Die Aktivierungsdomäne (AD) fungiert als Transkriptionsaktivator für das Reporter gen.

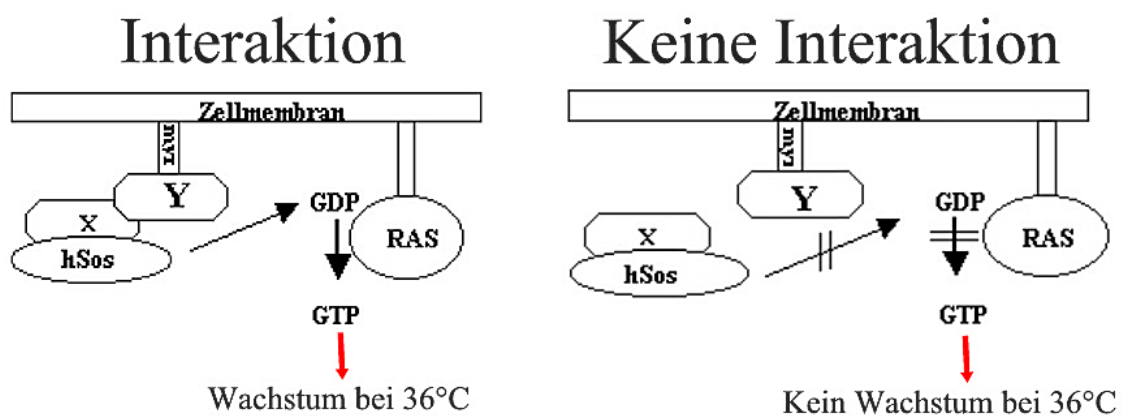
Die Nachteile dieses recht einfachen experimentellen Systems liegen darin begründet, dass die Fusionsproteine direkt nach ihrer Synthese in den Zellkern transportiert werden. Hierdurch können eventuell für die Interaktion wichtige post-translationale Modifikationen an den Proteinen, wie z. B. Glykosylierungen, nicht mehr vorgenommen werden, so dass die entsprechenden Interaktionen nicht entdeckt werden können. Eine weitere Limitierung im klassischen Zwei-Hybrid-System ist darin zu sehen, dass hier keine Köderproteine untersucht werden können, die selber eine Transaktivator-Funktion besitzen, da sie die Transkription der Reportergene unabhängig von einem spezifischen, an die Transkriptionsaktivator-Domäne gebundenen Bindungspartner aktivieren können. Auch Proteine, deren Überexpression für die Hefe letal ist, können nicht als Köder eingesetzt werden. Im Hinblick auf die Identifikation neuer Bindungspartner von xIAP ist zudem zu beachten, dass die Hefe keine Caspasen besitzt, die durch die Spaltung von Proteinen die IBM zugänglich machen könnten. Diese können nur dann mit xIAP interagieren, wenn die Tetrapeptid-Sequenz von Anfang an zugänglich ist. Es ist demnach nicht zu erwarten, dass bekannte Interaktionspartner von xIAP wie Caspase-9 oder Smac in der Hefe identifiziert werden können. Das System eignet sich somit hauptsächlich zur Identifikation von Bindungspartnern, deren Interaktion mit xIAP nicht auf diesem Bindemotiv basiert, wie z.B. XAF1.

### **2.3.2 Das ‚Sos Recruitment System‘ (SRS)**

Das SR-System dient wie das klassische Two-Hybrid-System zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*. Die Untersuchungen werden in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Im Fall des SR-Systems erfolgt die Suche nach Interaktionspartnern in einer temperatursensitiven *cdc25* Hefemutante. *Cdc25* ist das Hefehomolog zu dem humanen Guanylnucleotid-Austauschfaktor hSos. Die *cdc25* Mutation verhindert das Wachstum der Hefe bei der restriktiven Temperatur von 36°C, da hier die Ras-Signalkaskade nicht aktiviert werden kann. Bei der permissiven Temperatur von 25°C wird das Ras-Protein aktiviert und die Hefe zeigt ein normales Wachstum. Das humane hSos kann diese Temperatursensitivität komplementieren und die Ras-Signalkaskade in *S. cerevisiae* aktivieren, wenn es an die Zellmembran gelangt (Abb. 2.5).



Das zu untersuchende Gen X (Köder) wird daher in den pSos Vektor kloniert, so dass ein Fusionsprotein aus hSos und Köder exprimiert wird. Das zweite Gen Y (Zielgen) wird in den pMyr Vektor kloniert. Hier kommt es zur Expression eines Fusionsproteins, das ein Myristilierungssignal trägt, wodurch das Zielprotein an die Zellmembran gelangt. Die Expression steht unter der Kontrolle des GAL1-Promotors, so dass dieses Protein nur auf Selektionsmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle exprimiert wird. Beide Fusionsproteine werden in der Hefe co-exprimiert. Wenn Köder- und Zielprotein miteinander interagieren, so wird hSos an die Zellmembran rekrutiert, aktiviert dort die Ras-Signalkaskade und ermöglicht der cdc25 Mutante ein Wachstum bei der restriktiven Temperatur von 36°C [37].



**Abb. 2.5: Das Sos Recruitment System**

Das zu untersuchende Protein X wird an hSos fusioniert, das Zielprotein Y an das Myristilierungssignal. Interagieren X und Y miteinander, so werden sie gemeinsam durch das Myristilierungssignal an die Zellmembran gebracht. Dort kann hSos den Ras-Signalweg in der cdc25 Mutante auch bei 36°C wieder aktivieren.

Dieses System bietet gegenüber dem klassischen System eine Reihe von Vorteilen. Zum einen können hier Proteine untersucht werden, die eine Transkriptionsaktivatorfunktion besitzen, da hier die Interaktionspartner des Köders nicht über die Aktivierung von Reportergenen erfolgt. Zum anderen erfolgt die Interaktion der Proteine hier nicht im Zellkern, so dass für die Bindung eventuell wichtige post-translationale Modifikationen an den Proteinen vorgenommen werden können. Dennoch ergeben sich auch mit diesem System

einige Probleme bei der Identifikation von Interaktionspartnern. Zum einen können Ras-Proteine höherer Eukaryoten als falsch positiv identifiziert werden, da sie die Ras-Kaskade der Hefe unabhängig von spezifischen Interaktionen mit dem Köderprotein aktivieren können. Zum anderen zeigen ~ 30% der an hSos fusionierten Köderproteine ein effizientes Wachstum bei 36°C, das ebenfalls unabhängig von der Anwesenheit spezifischer Interaktionspartnern ist. Des Weiteren handelt es sich bei hSos mit ~ 150 kDa um ein relativ großes Protein, was zu Schwierigkeiten führen kann, wenn sehr kleine oder große Volllänge-Proteine als Köder eingesetzt werden sollen [38].

### **2.3.3 Das ‚Ras Recruitment System‘ (RRS)**

Das RR-System stellt eine Verbesserung des SR-Systems da. Hier wurde das hSos Protein durch das deutlich kleinere Ras ersetzt. Dieses System basiert darauf, dass es für Ras unbedingt erforderlich ist, an die Zellmembran zu gelangen, um seine Funktion auszuführen. Das hier verwendete Ras besitzt jedoch keine entsprechende Signalsequenz und kann daher nur an die Zellmembran gelangen, wenn das an Ras fusionierte Köderprotein X mit dem an das Myristilierungssignal fusionierten Zielprotein Y interagiert. Neben der leichteren Handhabbarkeit aufgrund der geringeren Größe von Ras gegenüber hSos können hier keine Ras-Proteine als falsch positive Interaktionspartner identifiziert werden. Auch ist der Anteil von Köderproteinen, die unabhängig von spezifischen Interaktionen ein effizientes Wachstum bei 36°C zeigen, in diesem System deutlich geringer. Ein weiterer Vorteil des RR-Systems liegt darin, dass hier nicht nur die Expression des Zielproteins unter einem induzierbaren Promotor (GAL1) erfolgt, sondern auch die Expression des Köders, die durch den MET25 Promotor der Hefe reguliert wird. Die Expression erfolgt hier nur, wenn kein Methionin im Medium vorhanden ist. Hierdurch kann beim Screenen eine Vielzahl falsch positiver Klone eliminiert werden. Dies ist bei der Arbeit mit dem cdc25 Hefestamm von Vorteil, da er zur Reversion seiner Mutation neigt, was zu einer erhöhten Anzahl falsch positiver Klone führen kann [39].

## **2.4 Zielsetzung**

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollten mit Hilfe eines Two-Hybrid-Screens neue Interaktionspartner von xIAP identifiziert werden, um weitere Informationen über die verschiedenen Funktionen dieses Proteins in der Zelle zu erhalten. Die Interaktionen sollten anschließend über GST-Pulldowns und Co-Immunpräzipitation bestätigt werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Untersuchungen zur Funktion der neu identifizierten Interaktionspartner von xIAP durchzuführen

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Lieferant</b>
Acrylamid	Applichem
Adenin	Roth (Karlsruhe)
Agarose	FMC (Rockland, USA)
Ammoniumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Amplify	Amersham
Antibiotika/Antimykotika-Lösung	Gibco
Bacto Agar	BD Biosciences
Bacto Pepton	BD Biosciences
Bacto Trypton	BD Bioscience
Bacto Yeast Extract	BD Biosciences
Bacto yeast nitrogen base (YNB)	BD Biosciences
Blasticidin Hydrochlorid	Invitrogen
Bromphenolblau	Applichem (Darmstadt)
BSA	Serva
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Chloramphenicol	Sigma
Cobaltchloridhexahydrat	Sigma
Coomassie Brilliantblau R250	Merck
Cyclohexamid	Sigma
D(+)-Galaktose	Fluka (Buchse)
D(+)-Glukose	Roth (Karlsruhe)
Deoxyribonukleinsäure Typ III (Carrier DNA)	Sigma
Desoxynukleosid-5'-Phosphate (dNTPs)	Eppendorf
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dithiotreithol (DTT)	Applichem
DL-Homozystein	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (High Glucose)	Gibco
EDTA (Na-Ethylendiamintetraacetat)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol (99 %)	Roth (Karlsruhe)
Ethanol (70 %) vergällt	Roth
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Fötales Kälberserum	Invitrogen
Genetizin (G418)	Invitrogen
Glutaminsäure	Sigma
Glutathionsepharose 4B	Amersham
Glycerin	Applichem

<b>Chemikalie</b>	<b>Lieferant</b>
Glycin	Roth
Harnstoff	Sigma
Hexaminokobaltchlorid	Sigma
Histidin	Sigma
IGEPAL CA-630	Sigma
Isopropanol	Roth
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Amersham
Kaliumacetat	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycinsulfat	Fluka
Leucin (Leu)	Roth
Lithiumacetatdihydrat	Fluka
Lithiumchlorid	Sigma
Lysin	Roth
Magnesiumchlorid	Applichem
Manganchlorid	Sigma
Methanol	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem
Natriumhydroxid	Applichem
Natriumsulfat	Sigma
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
PBS	Serva
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Sigma
Protein A/G plus Agarose	Santa Cruz
RPMI 1640 Medium	Gibco
Salzsäure	Roth
TEMED	Bio Rad
Tetrazyklin	Invitrogen
Tricin	Applichem
Tris-(hydrxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem
TritonX-100	Sigma
Tryptophan	Roth
Tween-20	Roth
Uracil (Ura)	Sigma
Xylencyanol	Applichem

## 3.2 Enzyme

### 3.2.1 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
<i>BamHI</i>	G↓GATCC	Fermentas (Litauen)
<i>Bsp119I</i>	AT↓CGAT	Fermentas (Litauen)
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	Fermentas (Litauen)
<i>EcoRV</i>	GAT↓ATC	Fermentas (Litauen)
<i>HindIII</i>	A↓AGCTT	Fermentas (Litauen)
<i>NotI</i>	GC↓GGCCGC	Fermentas (Litauen)
<i>XhoI</i>	C↓TCGAG	Fermentas (Litauen)

### 3.2.2 Polymerasen, modifizierende Enzyme, Kit's

Enzym / Kit	Hersteller
Advantage HF 2 PCR Kit	BD Biosciences
Advantage GC cDNA PCR Kit	BD Biosciences
CIAP	Fermentas
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Rapid Ligation Kit	Fermentas
RNeasy Mini Kit	Qiagen
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega
MMLV Reverse Transkriptase	Promega
T3 RNA Polymerase	Fermentas
T3 RNA Polymerase	Promega
TNT-T7 Coupled Reticolocyte Lysate System	Promega
TNT-T7 Coupled Wheat Germ Extract System	Promega
T7 RNA Polymerase	Promega
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Promega
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen

### 3.3 Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller
Antipain Hydrochlorid	Sigma
Aprotinin	Applichem
Calpain Inhibitor I	Alexis
Chymostatin	Sigma
clasto-Lactazystin- $\beta$ -Lakton	Calbiochem
Leupeptin Hydrochlorid	Sigma
MG-132	Alexis
Pepstatin A	Sigma
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Applichem
RNasin	Promega

### 3.4 Antikörper

#### 3.4.1 Primäre Antikörper

Name	Produktnr.	Hersteller
anti-cleaved caspase-3	9661	Cell Signaling
anti-CytochromeC	65981A	Pharmigen
Enolase (H-300)	sc-15343	Santa Cruz Biotechnology
anti-HA (6E2)	2367	Cell Signaling
anti-His-6 (Penta)	34660	Qiagen
anti-cleaved Lamin A	2031	Cell Signaling
anti-c-myc (9B11)	2276	Cell Signaling
Tim44		Bauer [40]
xIAP	TL H59520	Transduction Lab.

#### 3.4.2 Sekundäre Antikörper

Name	Produktnr.	Hersteller
anti-goat IgG HRP	sc-2020	Santa Cruz Biotechnology
anti-mouse IgG HRP	PI-2000	Vector
anti-rabbit IgG HRP	PI-1000	Vector

### 3.5 Sonstige Materialien

Material	Firma
Lachssperma-DNA	Sigma
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Greiner
1kb Extension Ladder	Invitrogen
Generuler 100bp	MBI/Fermentas
Precision Prestained Broad Range	Bio Rad
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs
ECL	Amersham

### 3.6 Stämme, Medien und Anzucht

#### 3.6.1 Bakterienstämme

XL<sub>1</sub>-Blue: *supE44 hsdR17 recA 1 endA1 gyrA96 thi relA 1 lac*-[F' *pro AB lacIq ZΔM15 Tn10(tet<sup>r</sup>)*] (Stratagene)

TOP10F': F- *mcrA delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZdeltaM15 deltalacX74 deoR recA1 araD139 delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG*

BL21DE3Trx: F- *ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm trxB15::kan* (DE3)

#### 3.6.2 Hefestämme

Stamm-name	Genotyp	Stamm nr.	Herkunft
cdc25 H	<i>a ura3-25, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112cdc25-2, Gal+</i>	4	Stratagene
CEN.PK2-1C	<i>a leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2</i>	5	J. H. Hegemann



### 3.6.3 Säugetierzelllinien

HEK 293 K1: Humane embrionale Nierenzellen [41]

HUVEC: Humane Nabelschnurendothelzellen (Primärzellen)

T-Rex: HEK 293 + pcDNA6/TR (Invitrogen)

### 3.6.4 Medien und Anzucht

#### 3.6.4.1 Medien für *Escherichia coli*

**LB-Medium:**

10,0 g	Bacto Trypton
5,0 g	Hefe Extrakt
5,0 g	NaCl
13,5 g	Agar (für Platten)

auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, lösen und autoklavieren.

**LB + Amp:** s.o. + Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 50 mg/ml).

**SOB-Medium:**

20,0 g	Bacto Trypton
5,0 g	Hefe Extrakt
0,5 g	NaCl

auf 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, lösen und autoklavieren.

Vor dem Verbrauch MgSO<sub>4</sub> zusetzen (Endkonzentration 20 mM).

#### 3.6.4.2 Anzucht von *Escherichia coli*

*E. coli* wurde in LB + Antibiotika zur Selektion auf Plasmid-Transformanten in aeroben Schüttelkulturen bei 37 °C angezogen.

### 3.6.4.3 Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

**YPD<sup>+</sup>:**

- 10,0 g Hefe Extrakt
- 20,0 g Casein Hydrolysat (Pepton)
- 13,5 g Gibco Agar (für Platten)
- 2,0 ml Adeninstocklösung (2mg/ml)
- 4,0 ml Tryptophanstocklösung (5mg/ml)

auf 900 ml ddH<sub>2</sub>O auffüllen, lösen und autoklavieren.

20 g Glucose auf 100 ml ddH<sub>2</sub>O auffüllen, lösen und autoklavieren. Nach dem Autoklavieren alles zu 1 l zusammengeben und in 250 ml Flaschen portionieren bzw. Platten gießen.

**SD Minimalmedium:**

- 20,0 g Glukose
- 15,0 g Bacto Agar (nur für Platten)

auf 900 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, lösen und autoklavieren.

- 1,7 g Yeast Nitrogen Base (YNB)
- 5,0 g Ammoniumsulfat

+ 100ml 10x Stocklösung der gewünschten Aminosäuren bzw. Basen (Tab.1) lösen und autoklavieren. Nach dem Autoklavieren zu einem Liter zusammengeben.

**SG-Minimalmedium:**

- 30 g Galactose
- 20 g Raffinose
- 20 g Glycerin (100%)
- 20 g Bacto Agar (Nur für Platten)

auf 900 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen, autoklavieren.

Aminosäure /Base	Konzentration im Medium [mg/l]	mg Aminosäure/ 1l 10X Stocklösung
Adenin	20	200
Arginin	50	500
Asparaginsäure	100	1000
Glutaminsäure	100	1000
Histidin	20	200
Isoleucin	30	300
Leucin (Leu)	100	1000
Lysin	50	500
Methionin (Met)	200	2000
Phenylalanin	50	500
Serin	40	400
Threonin	100	1000
Tryptophan	50	500
Tyrosin	50	500
Uracil (Ura)	20	200
Valin	150	1500

**Tabelle 1: Aminosäuren und Basen.**

Die Aminosäuren werden in ddH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. Tryptophan und Histidin müssen steril filtriert und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert werden SD / SG +16 enthält alle oben angegebenen Aminosäuren/Basen.

#### 3.6.4.4 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht der Hefe erfolgte bei 24°C (cdc25 H) bzw. 30°C (CEN.PK2-1C) in Vollmedium oder Minimalmedium. Auxotrophe Effekte wurden bei Bedarf durch Zugabe von Adenin, Uracil, Histidin, Leucin und/oder Tryptophan komplementiert. Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen wurden die entsprechenden Aminosäuren weggelassen. Die Expression von xIAP im RRS-Screen wurde durch die Zugabe von Methionin reprimiert bzw. durch das Weglassen von Methionin induziert. Hefe-Kulturen wurden zur Lagerung über längere Zeiträume bei -80° im Verhältnis 3:1 mit Glycerin versetzt.

#### 3.6.4.5 Medien für Säugetierzelllinien

Für HEK 293 und T-Rex 293 Zellen: DMEM + 10 % FKS + L-Glutamin + PSA. Zur Selektion auf transfizierte Zellen wurden die entsprechenden Antibiotika (Blasticidin, G418, Zeocin) zugegeben.

Für HUVEC's : RPMI + 15 % FKS + L-Glutamin + PSA

### 3.6.4.6 Anzucht von Säugetierzelllinien

Die Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Medienwechsel. Waren die Zellen zu etwa 80 % konfluent, wurden sie mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Die Reaktion wurde nach ~ 5 min mit kaltem PBS abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen in neue Zellkulturflaschen überführt und mit frischem Medium versorgt. Zur Langzeitaufbewahrung wurden 2x10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml Einfriermedium (DMEM, 10 % FKS, 10 % DMSO) langsam über flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in Flüssigstickstoff gelagert.

## 3.7 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotid	Verwendung	Sequenz 5'-3'
XIAP <i>Bam</i> HI	Klonierung xIAP pSos + pRRS-1	GGGGATCCCCATGACTTTTAAACAGTTTTGAAGG
XIAP <i>Not</i> I	Klonierung xIAP pSos + pRRS-1	GGGCGGCCGCGACATGCCTACTATAGAGTTAG
tim44 5'	Klonierung pCMV-Tim44	AGAGAATTCATGGCGGCGGCGGCC
tim44 3'	Klonierung pCMV-Tim44	CTCGAGGCTCAGAGAATCTGCTCGGTGCTGGAG G
GOT-TAT	Klonierung pmAAT-TAT	AACTCGAGATGGCCCTGCTGCAC
GOT-TAT 3'	Klonierung pmAAT-TAT	GGGGAATTCTTACTTGGTGACCTGGTGAATG
NNE-TAT	Klonierung pNNE-TAT	AACTCGAGATGTCTATTCTCAAGATCCATGCC
NNE-TAT 3'	Klonierung pNNE-TAT	GGGAATTCTTACTTGGCCAAGGGGTTTC
Q-TAT	Klonierung pxXIP-TAT	AACTCGAGATGGCGGAAGCGGA
Q-TAT 3'	Klonierung pxXIP-TAT	GGGGGAATTCTTACTGAGGAGTAAAGGTGAG
TIM-TAT	Klonierung pTim-TAT	AACTCGAGTTCTCCAACATGGCGGC
TIM-TAT 3'	Klonierung pTim-TAT	AAGAATTCGCCGCAGGTGGTGT
XIAP-TAT	Klonierung pTim-TAT	AACTCGAGATGACTTTTAAACAGTTTTGAAG
XIAP-TAT 3'	Klonierung pTim-TAT	GGGGAATTCTTAAGACATAAAAATTTTTGCTTG

### 3.8 Plasmide

No.	Name	Backbone	Insert	Selektions- marker	Herkunft
31	pxIAP wt	pcDNA 3.1	xIAP wt 1,5 kb	neo ( <i>Mam.</i> )	K. Abou Hamed
133	pTAT-HA			amp ( <i>E.coli</i> )	Nagahara
134	pSos			Leu ( <i>S.cer.</i> )	Stratagene
135	pMyr			URA ( <i>S.cer.</i> )	Stratagene
136	pSos MAFB	pSos	MAFB	Leu ( <i>S.cer.</i> )	Stratagene
137	pSos Collagenase	pSos	murine Coll. IV aa 148-357	Leu ( <i>S.cer.</i> )	Stratagene
138	pMyr LaminC	pMyr	hum. Lamin C aa67-230	Ura ( <i>S.cer.</i> )	Stratagene
139	pMyr SB	pMyr	Sos-binding-protein	Ura ( <i>S.cer.</i> )	Stratagene
140	pMyr MAFB	pMyr	MAFB	Ura ( <i>S.cer.</i> )	Stratagene
141	pADH-Myc-RASdBamHI	pADH-RRS	Myc-Ras	Leu ( <i>S.cer.</i> )	Ami Aronheim
148	pADH pJZ-Ras	pADH	c-Jun-Ras	Leu ( <i>s.cer.</i> )	Ami Aronheim
149	pMet25-M-ChpAc	pMet25	M-ChpAc	Leu ( <i>S.cer.</i> )	Ami Aronheim
150	HUVEC-Bank	pMyr	cDNA-Bank	Ura ( <i>S.cer.</i> )	Stratagene
151	pRRS-1	pMet25-ChpAc	RAS-Myc(p149), XIAP	Leu ( <i>S.cer.</i> )	Diese Arbeit
155	pSNS35-1	pMyr	similar to cytochrome c	Ura ( <i>S.cer.</i> )	Diese Arbeit
156	pSNS48-4	pMyr	MHC HLA-E	Ura ( <i>S.cer.</i> )	Diese Arbeit
157	pSNS-3	pMyr	xXIP	Ura ( <i>S.cer.</i> )	Diese Arbeit
158	pSNS-15	pMyr	non neuronal enolase (NNE)	Ura ( <i>S.cer.</i> )	Diese Arbeit
159	pSNS-18	pMyr	gamma G-10	Ura ( <i>S.cer.</i> )	Diese Arbeit
160	pSNS-24	pMyr	mAAT	Ura ( <i>S.cer.</i> )	Diese Arbeit
161	pTAT-xIAP	pTAT	xIAP	amp ( <i>E.coli</i> )	A.Sokoll
166	pTim-TAT	pTAT-HA	Tim44	amp ( <i>E.coli</i> )	Diese Arbeit
167	pmAAT-TAT	pTAT-HA	mAAT	amp ( <i>E.coli</i> )	Diese Arbeit
168	pNNE-TAT	pTAT-HA	NNE	amp ( <i>E.coli</i> )	Diese Arbeit
191	pSos-xIAP	pSos	xIAP	amp ( <i>E.coli</i> ) Leu ( <i>S.cer.</i> )	Diese Arbeit
192	pCMV-7-4	pCMV Tag3B	Tim44	kan ( <i>E.coli</i> )	Diese Arbeit
206	pCMV-3	pCMV Tag3B	xXIP	kan( <i>E.coli</i> )	Diese Arbeit
207	pCMV-15	pCMV Tag3B	NNE	kan( <i>E.coli</i> )	Diese Arbeit
208	pCMV-24	pCMV Tag3B	mAAT	kan( <i>E.coli</i> )	Diese Arbeit
209	pCMV-Tim44	pCMV Tag3B	Tim44	kan( <i>E.coli</i> )	Diese Arbeit
210	pxXIP-TAT	pTAT-HA	xXIP	amp ( <i>E.coli</i> )	Diese Arbeit
195	pmAAT 4.0	pcDNA 4.0 To myc-His	mAAT-HA	amp ( <i>E.coli</i> )	Diese Arbeit
196	pxXIP 4.0	pcDNA 4.0 To myc-His	xXIP-HA	amp ( <i>E.coli</i> )	Diese Arbeit
197	pxIAP 4.0-2	pcDNA 4.0 To myc-His	xIAP-HA	amp ( <i>E.coli</i> )	Diese Arbeit
198	pTim44 4.0	pcDNA 4.0 To myc-His	Tim44-myc	amp ( <i>E.coli</i> )	Diese Arbeit

### 3.9 HUVEC cDNA-Bank

#### 3.9.1 Titerbestimmung der cDNA-Bank:

- Ein Aliquot der Bank (Stratagene) auf Eis abnehmen.
- Die Bank 1:10<sup>3</sup> und 1:10<sup>6</sup> in 1 ml LB-Medium verdünnen.
- 1 µl der 1:10<sup>3</sup> Verdünnung auf einer LB-Chloramphenicol-Platte ausplattieren.
- Je 1x 50 µl und 100 µl der 1:10<sup>6</sup> Verdünnung auf LB-Chloramphenicol-Platten ausplattieren und bei 37°C ü.N. inkubieren.
- Titer: 1:10<sup>3</sup> Verd. : X Kolonien x 10<sup>3</sup> x 10<sup>3</sup> = cfu/ml  
1:10<sup>6</sup> Verd. : (X Kolonien/Volumen) x 10<sup>3</sup> x 10<sup>3</sup> x 10<sup>3</sup> = cfu/ml

#### 3.9.2 Amplifikation der cDNA-Bank:

- 3 x 3,7 x 10<sup>6</sup>\* Zellen auf LB-Chloramphenicol-Platten ausplattieren.
- Die Platten ü.N. 37°C inkubieren.
- Die Zellen in 3 ml LB-Chloramphenicol-Medium pro Platte abschaben.
- Die DNA-Aufarbeitung erfolgt mit dem Qiagen Plasmidfilter Giga Kit.

\* Originaltiter der Bank laut Hersteller

## 3.10 Transformationen/ Transfektionen

### 3.10.1 Transformation von *Escherichia coli*

#### 3.10.1.1 Elektroporation

##### Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

- Eine Vorkultur mit *E.coli* ansetzen : 5 ml LB-Medium mit Zellen aus dem Glycerinstock animpfen und ü.N. bei 37°C und 225 rpm inkubieren.
- 1 l LB-Medium mit der Vorkultur auf OD<sub>600</sub> = 0,1 animpfen, die Kultur bei 37°C und 225 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,7-0,8 anziehen.
- Die Zellen 30 min auf Eis abkühlen.
- Die Suspension anschließend 15 min bei 4000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 5415R) und 4°C abzentrifugieren.
- Die Zellen in 500 ml eiskaltem sterilen H<sub>2</sub>O resuspendieren.
- Die Suspension anschließend 15 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugieren.
- Die beiden vorigen Schritte 1x wiederholen.
- Die Zellen in 20 ml eiskaltem sterilen 10 % Glycerin resuspendieren.
- Anschließend werden die Zellen 10 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugieren.
- Die Zellen in 2-3 ml eiskaltem sterilen 10 % Glycerin resuspendieren.
- Die Zellen anschließend zu je 40 µl aliquotieren, in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -80°C lagern.

##### DNA-Transformation durch Elektroporation in *E.coli*

- 40 µl elektrokompetente Zellen / Transformationsansatz auf Eis auftauen.
- 1 Elektroporationsküvette (0,2 cm) / Transformationsansatz auf Eis vorkühlen.
- Je 1 ml SOB (20 mM MgSO<sub>4</sub>) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorlegen.
- Elektroporationsparameter : 2,5 kV
- Die Zellen mit der DNA auf Eis mischen und elektroporieren.

- Die Zellen in 1 ml SOB-Medium vorsichtig resuspendieren und 1h bei 37°C und 225 rpm inkubieren.
- Die Zellen bei 3.000 rpm 5 min abzentrifugieren.
- Das Medium dekantieren, die Zellen vorsichtig! im Restvolumen resuspendieren und auf LB-Selektivplatte ausplattieren.
- Die Platten ü.N. bei 37°C inkubieren.

### 3.10.1.2 Ein-Minuten-Transformation

#### Herstellung von DMSO kompetenten *E.coli* Zellen

- Eine Vorkultur mit *E.coli* ansetzen : 5 ml SOB-Medium mit Zellen aus dem Glycerinstock animpfen und ü.N. bei 37°C und 225 rpm inkubieren.
- 50 ml SOB-Medium mit 1 ml der Vorkultur animpfen und bei 37°C und 225 rpm bis auf eine von  $OD_{600} = 0,5-0,6$  anziehen.
- Die Zellen 10 min auf Eis abkühlen.
- Die Kultur anschließend 10 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Die Zellen in 20 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendieren und 10 min auf Eis abkühlen.
- Die Zellen 10 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Die Zellen in 4 ml eiskaltem FSB-Puffer resuspendieren und 140 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) zugeben, vorsichtig mischen.
- Die Zellen anschließend 15 min auf Eis inkubieren.
- Danach erneut 140 µl DMSO zugeben und vorsichtig mischen.
- Die Zellen zu je 200 µl aliquotieren, in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -80°C lagern.



Für die Ein-Minuten-Transformation werden 20 µl DMSO-Zellen und 1 µl DNA (1-100 ng) auf Eis gemischt. Den Ansatz 1 Minute bei 42°C inkubieren. Anschließend werden 100 µl LB-Medium zugegeben und auf LB-Selektionsmedium ausplattieren. Die Platten bei 37°C ü.N. inkubieren.

Puffer und Lösungen:

DMSO

FSB-Puffer: 10 mM KAc (pH 7,5)  
 45 mM MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O  
 10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
 100 mM KCl  
 3 mM Hexaminokobaltchlorid  
 10 % Glycerin

3.10.1.3 Hocheffiziente Transformation

- 200 µl DMSO kompetente Zellen auf Eis auftauen.
- 5-20 µl des Ligationsansatzes zu den Zellen geben.
- Die DNA und die Zellen vorsichtig mischen.
- Den Ansatz 30 min auf Eis inkubieren.
- Einen Hitzeschock 2 min bei 42°C im Wasserbad durchführen.
- 800 µl SOB-Medium zu den Zellen geben.
- Die Zellen 1 h bei 37°C und 225 rpm inkubieren.
- Die Zellen bei 3.000 rpm für 5 min abzenrifugieren und den Überstand dekantieren.
- Die Zellen vorsichtig im Restvolumen resuspendieren und den kompletten Ansatz auf dem entsprechenden LB-Selektivmedium ausplattieren und die Platten ü. N. bei 37°C inkubieren.

### 3.10.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.10.2.1 Schnelltransformation

- 25 µl Hefezellen/Transformationsansatz von einer bis zu 4 Tage alten Platte abnehmen und in 1 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendieren.
- Die Zellen 15 sec bei 13.000 rpm abzentrifugieren und in 1 ml 100 mM LiAc resuspendieren.
- Die Zellen 5 min bei 25°C inkubieren.
- Die Zellen 15 sec bei 13.000 rpm abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Zu den kompetenten Hefezellen wird der folgende „Transformationsmix“ in der vorgegebenen Reihenfolge zugegeben:

240 µl PEG (50 % w/v)

36 µl 1 M LiAc, pH 8,4 – 8,9

50 µl Carrier DNA (2 mg/ml)

5 µl Plasmid DNA (1-5 µg)

20 µl ddH<sub>2</sub>O

- Den Ansatz stark vortexen bis die Zellen vollständig resuspendiert sind.
- Die Zellen 20 min bei 42°C inkubieren.
- Die Zellen 15 sec bei 13.000rpm abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Die Zellen vorsichtig in 200 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendieren.
- Den kompletten Ansatz auf Selektionsplatten ausplattieren und bei 25° C inkubieren, bis die Kolonien sichtbar werden.

### 3.10.2.2 Transformation mit hoher Effizienz

(Gietz and Schiestl, 1995 [42])

- 5 ml YPD<sup>+</sup> mit Zellen aus dem Glycerinstock animpfen und ü. N. bei 25°C und 225 rpm inkubieren.
- Die Zellen zählen und eine 50 ml YPD<sup>+</sup> auf  $5 \times 10^6$  Zellen /ml animpfen.
- Anzucht der Kultur bis zu einer Zellzahl von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml. (Vor der Transformation müssen mindestens zwei Zellteilungen durchlaufen werden. Die Transformationseffizienz bleibt über 3 bis 4 Zellteilungen konstant.)
- Die Zellen 5 min bei 3.900 rpm abzentrifugieren. Den Überstand verwerfen, die Zellen in 25 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendieren und erneut 5 min 3900 rpm zentrifugieren
- Die Zellen in 1 ml 100 mM LiAc pH 8,4 – 8,9 resuspendieren und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen.
- Die Zellen 5 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren. Den Überstand mit einer Pipette abnehmen und in 0,1 M LiAc pH 8,4 – 8,9 resuspendieren. Die Zellzahl sollte bei  $2 \times 10^9$  Zellen/ml liegen, d.h. bei einer Zellzahl von  $2 \times 10^7$ /ml werden die Zellen in 500 µl 0,1 M LiAc aufgenommen.
- 50 µl Aliquots für die Transformationen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführen.
- Die Zellen werden erneut 5 sec bei 13.000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 5415D) zentrifugiert, der Überstand wird abgezogen.
- Die Carrier-DNA (2 mg/ml) wird zum Denaturieren für 10 min auf 100°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.
- Zu den kompetenten Hefezellen wird der folgende „Transformationsmix“ in der vorgegebenen Reihenfolge zugegeben:

240 µl PEG (50 % w/v)

36 µl 1 M LiAc, pH 8,4 – 8,9

25 µl Carrier DNA

50 µl DNA (0,1 bis 1 µg)

- Die Ansätze werden gut gemischt (Vortex).
- Die Zellen 30 min bei 25 °C im Rad inkubieren
- Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 20 bis 25 min bei 42°C im Thermoblock.
- Die Transformationsansätze werden bei 13.000 rpm für 5 sec sedimentiert und in 1 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Plasmidtransformationen werden nun direkt plattiert. Es werden jeweils 10 % und 90 % ausplattiert.

- Die Platten werden bei 25 °C inkubiert.

### **Puffer und Lösungen:**

**1.0 M LiAc Stocklsg. :** Die LiAc Lösung wird in ddH<sub>2</sub>O angesetzt und sterilfiltriert. Der pH sollte bei 8,4 bis 8,9 liegen.

**PEG (50 % w/v) :** 50 mg PEG 3350 in einen Glaskolben einwiegen und in 35 ml ddH<sub>2</sub>O mit Hilfe eines Magnetrührers lösen. Genau auf 100 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen und mischen. Mit einem 0,45 µm Filter steril filtrieren oder autoklavieren. Bei -20°C einfrieren.

## **3.10.3 Transfektion von Säugetierzellen**

### **3.10.3.1 Lipofektion**

Die Transfektion wurde mit Lipofectamine 2000 gemäß Herstellerangaben in 6- bzw. 12-well Platten mit HEK 283 bzw. T-Rex 293 Zellen durchgeführt. Für die Herstellung stabiler Zellen wurden die Zellen aus je 3 wells einer 6 well Platte nach 24 h in eine 75cm<sup>2</sup> Flasche überführt und nach weiteren 24 h mit Blastidin und Zeocin (T-REX-Zellen) versetzt. Alle 3 Tage erfolgte ein Medienwechsel bis zum Erhalt stabiler Zelllinien nach 3-4 Wochen. Die Expression der in die T-Rex Zellen transfizierten Gene erfolgte durch die Zugabe von 1 µg/ml Tetrazyklin für 24 h. Bei transient transfizierten Zellen erfolgte die Induktion mit Tetrazyklin 24 h nach der Transfektion.

### 3.10.4 Transduktion von Säugerzellen mit TAT-Fusionsproteinen

- 10 ml LB-Medium + 0,1 mg/ml Ampicillin + 34 µg/ml Chloramphenicol mit dem *E.coli*-Stamm animpfen und ü. N. bei 37°C und 225 rpm inkubieren
- Die 10 ml Übernachtskultur zu 300 ml frisches Medium mit Antibiotika geben und die Proteinexpression mit IPTG (Endkonzentration = 250 µM) induzieren.
- Die Zellen 5 h bei 37°C und 225 rpm inkubieren und anschließend bei 4.000 rpm und 4°C 10 min abzentrifugieren. Danach in 10 ml PBS resuspendieren und erneut zentrifugieren.
- Das Pellet in 10 ml Puffer Z (8 M Harnstoff, 100 mM NaCl, 20 mM Hepes pH 8,0) aufnehmen.
- Die Zellen 3 x 15 min mittels Ultraschall aufschließen und zwischendurch auf Eis abkühlen.
- Die Zellen bei 16.000 x g und 4°C 10 min abzentrifugieren und den Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
- Den Überstand auf 20 mM Imidazol einstellen.
- Eine Ni-NTA-Säule mit Puffer Z +20 mM Imidazol equilibrieren.
- Den Überstand über die Säule geben und den Durchlauf bei -20°C aufbewahren.
- Die Säule mit dem 10fachen Volumen des Säulenmaterials an Puffer Z + 20 mM Imidazol waschen.
- Das Fusionsprotein mit steigenden Konzentrationen von Imidazol (100mM, 250 mM, 500 mM und 1M) eluieren und bei -80°C aufbewahren.
- 20 µl Aliquots der Eluate zur Überprüfung auf ein SDS-Gel auftragen.
- Die positiven Fraktionen über eine PD-10 Säule gemäß Herstellerangaben entsalzen und mit 20 mM Hepes pH 7,5 + 100 mM NaCl eluieren und bei -80°C aufbewahren.
- 10 µl Aliquots der Eluate zur Überprüfung auf ein SDS-Gel auftragen und anschließend einen Western-Blot mit HA-Antikörper durchführen.
- HUVEC-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des TAT-HA-Fusionsproteins (10 µM, 100 µM und 1mM) für 6 h inkubieren.
- Die Zellen ernten und auf die Anwesenheit des Fusionsproteins überprüfen.

### 3.11 Zwei-Hybrid-Screens

#### 3.11.1 CytoTrap

Der CytoTrap-Screen wurde zunächst gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Aufgrund zu langsamem Wachstum der Zellen bei 36°C wurde die Zusammensetzung für die SD- und SG-Medien geändert (siehe 1.6.4.3). Die Transformation erfolgte mit 330 µg Köder-Plasmid (pSos-xIAP) und 100 µg Bank-Plasmid.

- Eine Vorkultur *cdc25a* in 150 ml YPD auf  $OD_{600} = 0,05$ ; 0,1; 0,2 animpfen. Die Inkubation erfolgt ü.N. bei 24°C und 150 rpm.
- Die Hauptkultur auf  $OD_{600} = 0,2$  mit der Vorkultur animpfen, deren  $OD_{600} \geq 1,5$  beträgt. Bei 24°C und 150 rpm inkubieren, bis die  $OD_{600} \geq 0,7$  beträgt.
- Die Zellen in sterile 50 ml Tubes überführen und 5 min bei 1.000 x g und RT zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Die Zellen vorsichtig in 500 ml ddH<sub>2</sub>O resuspendieren
- Die Zellen 5 min bei 1000 x g und RT abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Die Zellen in 8 ml frisch hergestelltem 1 x TE pH 7,5/LiAc resuspendieren und 100 µl für die Kontroll-Transformation abnehmen (s.u.).
- Die Zellen in einen sterilen 500 ml Kolben überführen.
- Transformationsansatz:

Köder-Plasmid:	0,2 – 1,0 mg
Bank-Plasmid:	0,1 – 0,5 mg
Carrier-DNA:	20 mg
1x PEG/LiAc:	60 ml
- Den Ansatz vorsichtig mischen und 30 min bei 22 - 24°C und 225 rpm inkubieren
- Einen Hitzeschock 25 min bei 42°C im Wasserbad durchführen und den Ansatz zwischendurch vorsichtig mischen.
- Die Zellen 3 min auf Eis abkühlen.
- Die Zellen in sterile 50 ml Tubes überführen und 5 min bei 1000 x g und RT zentrifugieren, den Überstand verwerfen
- Die Zellen in 20 ml 1 x TE pH 7,5 resuspendieren

- Je 40 µl für eine Verdünnungsreihe 1:10, 1:100, 1:1000 abnehmen und in je 200 µl auf 10 cm SD + 16-Leu-Ura-Platten ausplattieren. Inkubation 4 Tage bei 24°C.
- Je 350 µl des Transformationsansatzes auf 20 cm SD+16-Leu-Ura-Platten ausplattieren und 4 Tage bei 24°C inkubieren.
- Kontrolltransformation:

pSos:	2,0 µg
Bank-Plasmid:	2,0 µg
Carrier-DNA:	0,1 mg
komp. Zellen:	0,1 ml
1 x PEG/LiAc:	0,6 ml

  - Den Ansatz gut vortexen.
  - Die Zellen 30 min bei 24°C inkubieren.
  - Den Hitzeschock 25 min bei 42°C im Wasserbad durchführen und zwischendurch vorsichtig mischen.
  - Die Zellen 2-3 min auf Eis abkühlen.
  - Die Zellen 5 min bei 1000 x g und RT. abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
  - Die Zellen in 800 µl 1 x TE pH 7,5 resuspendieren.
  - Je 2 x 400 µl auf SD + 16-Leu-Ura ausplattieren und 4 Tage bei 24°C inkubieren.
- Transformation und Kontrolltransformation auf je 2 x SD + 16-Leu-Ura und 2 x SG + 16-Leu-Ura Platten replikaplattieren. Je 1 x SD-Platte und 1 x SG-Platte bei 24°C bzw. 37°C für 4 Tage inkubieren.
- Die Klone mit selektivem Wachstum auf SG-Medium bei 37°C auf SD + 16-Leu-Ura ausstreichen und 2 Tage bei 24°C inkubieren.
- Die Zellen der Ausstriche in 100 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendieren und auf je 2 x SD + 16-Leu-Ura und 2 x SG + 16-Leu-Ura Platten tropfen. Je 1 x SD und 1 x SG bei 24°C bzw. 37°C für 4 Tage inkubieren.
- Anschließend erfolgt die DNA-Präparation für die Elektroporation in *E.coli* aus den Klonen, die im Ausstrich und im Tropftest selektives Wachstum auf SG-Medium bei 37°C zeigen (= positive Klone).

### 3.11.2 RRS-Screen

Die Transformation wurde wie für den CytoTrap-Screen durchgeführt. Es wurden 1 mg Köder-Plasmid (pRRS-1) und 0,5 mg Bank-Plasmid verwendet. Die Transformationen wurden nach 5 Tagen auf je zwei Platten SG-Leu-Ura und SG-Leu-Ura-Met replikaplattiert. Je eine Platte von jedem Medium wurde 7 Tage bei 24°C und 37°C inkubiert. Klone mit selektivem Wachstum bei 37°C wurden auf SD-Leu-Ura ausgestrichen und für 4 Tage bei 24°C inkubiert. Anschließend wurden sie auf 1 x SG-Leu-Ura, 2 x SG-Leu-Ura-Met und 1 x SD-Leu-Ura-Met replikaplattiert und bei 37°C für 5 Tage inkubiert. Aus den Klonen mit selektivem Wachstum auf SG-Leu-Ura-Met (= positive Klone) wurde die DNA für die Elektroporation in *E. coli* präpariert.



## **3.12 DNA und RNA Präparation**

### **3.12.1 Phenol/Chloroform Extraktion**

- 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zur DNA-haltigen Lösung geben.
- Den Ansatz 3-4 min vortexen auf höchster Stufe.
- Den Ansatz 5 min 13.000 rpm zentrifugieren.
- Die obere wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen.
- 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,2 zugeben.
- 2,5 Vol. 100 % iges eiskaltes EtOH zugeben und vortexen.
- Den Ansatz ü.N. bei -20°C inkubieren.
- Den Ansatz 20 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Das Pellet 2 x mit 70 % iges eiskaltes EtOH 1 min bei 4°C und 13.000 rpm waschen.
- Das Pellet 5 min bei 40°C im Heizblock trocknen und in dem gewünschten Volumen ddH<sub>2</sub>O aufnehmen.

### **3.12.2 Plasmid-Präparation aus *Escherichia coli***

- 2 ml LB + Amp Übernachtskulturen bei 37 °C und 225 rpm anziehen.
- Die Kulturen werden in Eppendorfgefäße überführt und 25 sec bei 13.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen.
- 300 µl Puffer 1 mit RNase zugeben und gut mischen (Vortex).
- 300 µl Puffer 2 zugeben und gut mischen (invertieren).
- Den Ansatz 5 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- 300 µl (kalter!) Puffer 3 zugeben, gut mischen (invertieren).
- Den Ansatz 5 min bei 13.000 rpm abzentrifugieren.  
Die Plasmid-DNA ist in Lösung, genomische DNA, Zellreste und denaturierte Proteine sind im Pellet.

- Den Überstand ohne feste Bestandteile in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
- 0,7 faches Volumen an Isopropanol zugeben.
- Den Ansatz 10 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Das Pellet in 500 µl kaltem 70 % igem EtOH waschen.
- Das Pellet bei RT trocknen und anschließend in 50 – 100 µl ddH<sub>2</sub>O aufnehmen.

Die Zusammensetzung der Puffer entspricht denen des Qiagen Plasmid Midi Kit.

Für die Gewinnung größerer DNA Mengen (50 ml Kultur) wurde ein Qiagen Plasmid Midi Kit verwendet.

### **3.12.3 DNA-Präparation aus *Saccharomyces cerevisiae* zur Elektroporation in *E.coli***

- Eine 10 ml Hefekultur animpfen und ü.N. bei 24°C und 150 rpm inkubieren.
- Die Zellen 10 sec. bei 13.000 rpm abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Die Zellen in 500 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendieren.
- Die Suspension 15 sec. bei 13.000 rpm abzentrifugieren.
- Den Überstand dekantieren und die Zellen im Restvolumen resuspendieren.
- 200 µl kalten DNA Puffer zugeben.
- 1 Zellvolumen säurebehandelter Glasperlen zugeben.
- 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugeben.
- Den Ansatz 3-4 min stark vortexen.
- 200 µl TE pH 8,0 zugeben.
- Die Suspension 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren.
- Die obere Phase in neues Reaktionsgefäß überführen.
- 1/10 Vol. 3 M NaAc pH 7,2 zugeben.
- 1 ml eiskaltes (-20) 100 % EtOH zugeben.
- Den Ansatz 20 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren und den Überstand verwerfen.

- Das Pellet 2 x mit 70 % eiskaltem EtOH 10 min bei 13.000 rpm und 4°C waschen und den Überstand verwerfen.
- Das Pellet trocknen und in 20 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendieren.
- Für die Transformation mittels Elektroporation in *E. coli* 2 µl einsetzen.

DNA Puffer:	10,0 ml	10 % Triton X-100
	2,5 ml	20 % SDS
	1,0 ml	5 M NaCl
	0,5 ml	1 M Tris-HCl pH 8,0
	0,1 ml	1 M EDTA pH 8,0

mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen, bei 4°C lagern

#### **3.12.4 RNA -Präparation aus Säugetierzellen**

Die RNA Präparation wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

#### **3.12.5 DNA Präparation aus Agarosegelen**

Die Präparation erfolgte mit dem Qiaquick Gelextraction Kit gemäß Herstellerangaben.

### 3.13 RT-PCR

Die RT-PCR wird in drei Zyklen durchgeführt.

#### RT-PCR

1. 1  $\mu$ l Oligo dT  
x  $\mu$ l RNA (= 5  $\mu$ g)  
y  $\mu$ l DPEC-H<sub>2</sub>O  
11  $\mu$ l  
Inkubation bei 70°C für 10 min.
2. + 4  $\mu$ l 5 x First Strand Buffer  
+ 2  $\mu$ l 0,1 M DTT  
+ 1  $\mu$ l 10 mM dNTP-Mix  
+ 1  $\mu$ l RNasin  
Inkubation bei 42°C für 2 min.
3. + 1  $\mu$ l MMLV Reverse Transkriptase

Den Ansatz vorsichtig mischen. Die Inkubation erfolgt bei:

42°C 60 min

70°C 15 min

4°C  $\infty$

### 3.14 DNA-Restriktionsanalyse

Plasmide oder andere DNA-Fragmente werden gemäß Herstellerangaben mit dem für das jeweilige Enzym mitgelieferten Puffer verdaut. Die Restriktionen erfolgten in der Regel für 3-5 Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Präparative Restriktionsverdaue erfolgten z.T. über Nacht. Als Grundlage gilt, dass 1 Enzyeinheit (1U) 1  $\mu$ g  $\lambda$ -Phagen-DNA in einer Stunde vollständig schneidet. Die Analyse der Restriktionsfragmente erfolgt über die Auftrennung in einem Agarosegel.

### **3.15 DNA-Ligation**

Geschnittene DNA-Fragmente werden mit einer T4-DNA-Ligase gemäß Herstellerangaben ligiert. Es wird, wenn möglich ein molares DNA-Verhältnis von Vektor zu Insert von 5 :1 gewählt.

### **3.16 PCR-Amplifikation von DNA**

PCR-Amplifikationen wurden in einem Thermocycler durchgeführt. In der Regel wurde hierfür die *Taq*-Polymerase verwendet. Für Fragmente über 1,5 kb wurde *Pfu*-Polymerase oder das Advantage HF 2 PCR Kit eingesetzt. Um GC-reiche Gene zu amplifizieren wurde das Advantage GC cDNA PCR Kit benutzt.

### **3.17 Auftrennung von DNA-Fragmenten über Agarosegele**

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt auf Agaroseflachbettgelen. Hierbei wandern die DNA-Moleküle aufgrund ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die Poren des Gels und werden so nach ihrer Größe und ihrer Ladung aufgetrennt. Die kleinen Fragmente wandern dabei schneller durch das Gel, als die größeren.

Die Auftrennungseigenschaften eines Geles hängen direkt von der Porengröße ab, die durch die Agarosekonzentration bestimmt wird. Je kleiner die aufzutrennenden Fragmente sind, desto höher muss die Konzentration der Agarose sein. In der Regel werden in dieser Arbeit 0,7 % ige Agarosegele für die Auftrennung verwendet.

Der Gellauf erfolgt in einer Elektrophoresekammer bei 70-100 V. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern in dem dabei erzeugten elektrischen Feld zur Anode.

Um die DNA sichtbar zu machen werden dem Gel 100 µg Ethidiumbromid zugegeben.

Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert mit dem doppelsträngigen DNA-Molekül. Dieses kann anschließend durch Anregung des Farbstoffes mittels UV-Licht von 366 nm im Gel sichtbar gemacht werden.

### 3.18 Proteinpräparation

#### 3.18.1 Proteinpräparation aus *Saccharomyces cerevisiae*

- Eine 10 ml Kultur mit dem gewünschten Hefestamm animpfen und ü.N. bei 25°C und 150 rpm inkubieren.
- Die Zellen 30 sec. bei 13.000 rpm abzentrifugieren.
- Das Pellet in 100 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendieren.
- 100 µl 0,2 M NaOH zugeben.
- Den Ansatz 5 min bei RT inkubieren.
- Die Zellen 30 sec. bei 13.000 rpm abzentrifugieren.
- Die Zellen in 200 µl Lysis Puffer (140 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 % TritonX-100, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, 1 µM Pepstatin A, 100 µM Leupeptin) resuspendieren.
- Dem Zellvolumen entsprechend säurebehandelte Glasperlen zugeben.
- Die Zellen vortexen bis >70 % der Zellen im Phasenkontrast-Mikroskop transparent sind und zwischendurch auf Eis kühlen.
- Die Zellen bei 13.000 rpm und 4°C 5 min abzentrifugieren.
- Den Überstand in Schraubdeckelgefäß überführen.
- Das Pellet in 100 µl Lysispuffer resuspendieren und 5 min vortexen.
- Die Zellen bei 13.000 rpm und 4°C 5 min abzentrifugieren.
- Den Überstand abnehmen und beide Überstände vereinen.
- Proteinbestimmung
- 10 x SDS-Gelladepuffer zugeben.
- Den Ansatz 15 min bei 96°C im Heizblock aufkochen.

### **3.18.2 Proteinpräparation aus Säugetierzellen**

- Die Zellen bei 1200 rpm und 4°C 5 min abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Das Pellet in kaltem PBS resuspendieren und in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen.
- Die Zellen 5 min bei 1200 rpm und 4°C abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Die Zellen in 4 x Volumen Lysis-Puffer 1 oder 2 resuspendieren und 20 min auf Eis inkubieren.
- Die Zellen 10 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugieren.
- Den Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und bei -20°C aufbewahren.

Lysis-Puffer 1: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaF, 0,5 mM NaVa

Lysis-Puffer 2: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8,0, 1 % TritonX-100, 1 µM DTT, 10 % Glycerin

Zu beiden Puffern wurden 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, 1 µM Pepstatin A, 100 µM Leupeptin zugegeben.

### **3.19 Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Bio Rad Protein Assay Kit (Bio Rad) oder dem Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce) in einer Mikrotiterplatte gemäß Herstellerangaben. Dazu wurde 1 µl der Proteinprobe in 200 µl Reagenz resuspendiert. Die Auswertung wurde mit dem Synergy HT-Reader von BIO-TEK und dem Programm KC4 durchgeführt.

**3.20 Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgele**

Für die Auftrennung der Proteine wurden lineare SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (1970) verwendet. Je nach der Größe der Proteine kamen 7,5; 10; 12 oder 15% Gele zum Einsatz. Die aufzutrennenden Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit SDS-Probenpuffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 5% SDS, 12,5%  $\beta$ -Merkapthoethanol, 0,8% Bromphenolblau, 12,5% Glycerin) versetzt. Die Proben wurden entweder 5 min bei 96°C oder 10 min auf Eis denaturiert. Anschließend wurde 20 oder 50  $\mu$ g Protein aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 140 V für 70-80 min. Dabei wurde der *Prestained Protein Marker, Broad Range* mit Proteinen der Größen 175, 83, 62, 47,5, 32,5, 25, 16,5 und 6,5 kDa oder der *Precision Prestained, Broad Range* mit Proteinen der Größen 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 15 und 10 kDa verwendet. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran im Western-Blot wurden die Gele mit Coomassie für 1 h gefärbt. Anschließend wurden die Proteingele solange entfärbt, bis blaue Proteinbanden in einem klaren Gel erkennbar waren.

**SDS-Polyacrylamid-Proteingele**

(30 % Acrylamid 37,5:1 Mini-Gele Bio Rad Protean II und III)

**1,0 mm Gele:**

Trenngel: V = 12,5 ml

	7,0%	7,5%	10%	12%	15%	17%	20%
Acrylamid(ml)	2,9	3,1	4,1	4,9	6,2	7,0	8,2
Aqua dest. (ml)	6,2	6,0	5,0	4,2	2,9	2,1	0,9

add : 3,1 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8                    78  $\mu$ l 8,0 % APS  
         250  $\mu$ l 10 % SDS                                  13  $\mu$ l TEMED

Sammelgel: V = 5 ml

	3,0%	3,75%	4%	4,5%	5%
Acrylamid( $\mu$ l)	500	620	660	744	825
Aqua dest. (ml)	3,0	2,9	2,8	2,7	2,7

add : 1,3 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8                    32  $\mu$ l 8 % APS  
         120  $\mu$ l 10 % SDS                                  5  $\mu$ l TEMED





### 3.22 In vitro Translation

#### in vitro Translation:

x µl DNA ( 1 µg)

25 µl Retikulozytenlysat

2 µl Puffer

1 µl Aminosäuren

2 µl RNasin

y µl ddH<sub>2</sub>O

0,75 µl T3 Polymerase

50,0 µl

Inkubation 2 h bei 30° C

### 3.23 Proteinherstellung aus pGEX-Vektoren

#### A) Vorbereitung Sepharosebeads (für 1 Poly-Prep Säule von Bio Rad 0,8 x 4 cm)

- Die Flasche mit den Beads vorsichtig schütteln, um die Beads zu resuspendieren.
- 1,33 ml abnehmen und in ein 15 ml Falcontube überführen.
- Die Beads 5 min bei 500 x g abzentrifugieren und den Überstand vorsichtig dekantieren.
- 10 ml kaltes PBS zugeben und vorsichtig invertieren.
- Die Beads 5 min bei 500 x g abzentrifugieren und den Überstand vorsichtig dekantieren.
- 1 ml PBS zugeben (= 2 ml 50 % Beadlösung).
- Die Beads sind bei 4°C bis zu 1 Monat lagerbar.

---

## B) Proteinherstellung

- Eine 5 ml Vorkultur mit dem gewünschten *E.coli*-Stamm in Superbroth-Medium (SB) + 6,8 µl Chloramphenicol + 5 µl Ampicillin animpfen und ü.N. bei 37°C und 225 rpm inkubieren.
- Eine 100 ml Hauptkultur (SB + 136 µl Chloramphenicol + 100 µl Ampicillin) mit der kompletten Vorkultur animpfen und bei 37°C und 225 rpm bis die  $OD_{600} = 0,7-0,8$  beträgt.
- Die Expression des Proteins durch Zugabe von 200 µl IPTG (100 mM) induzieren und 2 h bei 30°C und 225 rpm inkubieren.
- Die Zellen 15 min bei 4.000 rpm und 4°C abzentrifugieren.
- Die Zellen in 5 ml Trx-Puffer resuspendieren.
- Die Zellen 10 x 10 sec mittels Ultraschall aufschließen und zwischendurch jeweils 20 sec in Eiswasser abkühlen.
- TritonX-100 (20 % Stock 4°C) zugeben (Endkonzentration = 1 %)
- Die Zellen bei 4°C 30 min im Rad inkubieren.
- Die Zellen 15 min bei 12.000 x g und 4°C abzentrifugieren.
- Den Überstand über Sepharosebeads geben (s.o.) und den Durchfluss sammeln.
- Die Säule erst mit 30 ml Trx-Puffer, dann mit 10 ml PBS waschen (Probe nehmen).
- Die Proteine mit 3 ml GEB eluieren (3 x je 1 ml 10 min inkubieren).
- Das Eluat 2 x gegen PBS dialysieren.
- 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, 1 µM Pepstatin A, 100 µM Leupeptin zugeben und bei -80°C aufbewahren.

Trx-Puffer:     5 ml 10 x PBS  
                  5 ml 1 M NaCl  
                  5 ml 100 % Glycerin  
                  2,5 ml 20 % TritonX-100  
                  26,95 ml H<sub>2</sub>O

frisch zugeben!!!: 50 µl 1 M DTT, 250 µl Aprotinin, 250 µl Leupeptin

Chloramphenicol-Stock: 25 mg/ml in 70 % EtOH

Ampicillin-Stock:       100 mg/ml

### **3.24    GST-Pulldown**

#### A) Binden der GST-Fusionsproteine an Sepharosebeads:

- 266 µl Beads in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen.
- Die Beads 5 min bei 500 x g abzentrifugieren und den Überstand vorsichtig dekantieren.
- 2 ml kaltes PBS zugeben und invertieren.
- Die Beads 5 min bei 500 x g abzentrifugieren und den Überstand vorsichtig abnehmen.
- 200 µl PBS zugeben.
- 20 µl Beads + 2,5 µg Protein in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführen und auf 100 µl mit Puffer 5 auffüllen.
- Den Ansatz im Rad 30 min bei RT inkubieren.
- Die Beads 5 min bei 500 x g abzentrifugieren und den Überstand vorsichtig dekantieren.
- Die Beads 3 x in 200 µl PBS für 5 min bei 500 x g waschen und anschließend in 20 µl Puffer 5 resuspendieren.

B) Pulldown:

- Die *in vitro* Translation zur Herstellung des gewünschten Proteins mit dem TNT-System gemäß Herstellerangaben durchführen.
- 20 µl an Beads gekoppeltes Fusionsprotein mit 1 µl TNT-*in vitro* Translation und 79 µl Puffer 5 in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführen.
- Den Ansatz 1h bei RT und 300 rpm im Thermoschüttler inkubieren
- Die Beads 5 min bei 500 x g abzentrifugieren und den Überstand vorsichtig abnehmen
- Die Beads 4 x in 200 µl Puffer 5 5 min bei 500 x g waschen und anschließend in 20 µl 4 x SDS-Puffer aufnehmen
- Die Proben 5 min kochen und anschließend bei 13.000 rpm 15 sec abzentrifugieren
- Den kompletten Ansatz auf ein SDS-Gel laden.

Pulldownpuffer:

1. 10 mM HEPES pH 7,2, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % TritonX-100
2. 1 x PBS, 0,5 M KCl, 1 % NP-40
3. 100 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM DTT, 0,2 % TritonX-100
4. 12,5 mM HEPES pH 7,9, 5 mM KCl, 100mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 100 µg/ml BSA, 1 mM DTT, 0,05 % NP-40
5. 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 % NP-40

### **3.25 Apoptoseinduktion bei Säugetierzellen**

#### **3.25.1 Wachstumsfaktorentzug in HUVEC**

80 % konfluente HUVEC Zellen wurden in RPMI Medium ohne FBS bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 0, 2, 6 und 8 h wurden die Zellen geerntet und die Proteinpräparation durchgeführt.

#### **3.25.2 Apoptoseinduktion in T-Rex Zellen**

In transient transfizierten T-Rex Zellen wurde die Apoptose durch Zugabe von 5 µM MG132 oder 10 µg/ml TNF-α/ 5 µg/ml Cycloheximid zum Medium ausgelöst. Die Zugabe erfolgte 4 bzw. 18 h nach Induktion der Genexpression mit Tetrazyklin. Danach wurden die Zellen geerntet. Anschließend wurde die Proteinpräparation durchgeführt.

### **3.26 Induktion von ER-Stress**

In transient transfizierten T-Rex Zellen wurde die Apoptose durch Zugabe von 5 mM oder 10 mM DL-Homocystein zum Medium ausgelöst. Die Zugabe erfolgte 4 bzw. 18 h nach Induktion der Genexpression mit Tetrazyklin. Danach wurden die Zellen geerntet. Anschließend wurde die Proteinpräparation durchgeführt.

### **3.27 Hypoxie**

HUVEC Zellen wurden für 2, 4, 6, 8, 11, 24 und 48 h bei 1,4 bzw. 2,4 % O<sub>2</sub> bei 37°C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und die Proteinpräparation durchgeführt.

### 3.28 Mitochondrienisolierung aus Säugetierzellen

#### Mitochondrienpräparation:

- Die Zellen 3 min bei 1200 rpm und 4°C (Eppendorf Zentrifuge 5417R) sedimentieren und den Überstand verwerfen.
- Das Sediment in dem 7-fachem Volumen kaltem hypotonischem Puffer aufnehmen und 3 min auf Eis inkubieren.
- Die Zellen in einen Teflon/Glas-Homogenisator überführen und 10 x homogenisieren
- Die Zellen mit dem gleichem Volumen Saccharoselösung versetzen.
- Die Mitochondrien 15 min bei 15.000 x g und 4°C sedimentieren und den zytosolischen Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen
- Das Mitochondrienpellet in Lysispuffer aufnehmen und 20 min auf Eis inkubieren.
- Die Mitochondrien 10 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugieren.
- Den Überstand mit mitochondrialen Proteinen in neues Reaktionsgefäß überführen und bei -80°C aufbewahren.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 2-Hybrid-Screens

Für die Identifizierung neuer Interaktionspartner von xIAP wurde zunächst ein 2-Hybrid-Screen mit dem SR-System durchgeführt, da für dieses System bereits eine HUVEC (*human umbivillian vascular endothelial cells*) cDNA-Bank zur Verfügung stand. Dieses System wurde gewählt, da die Funktion von xIAP im Endothel näher untersucht werden sollte, vor allem im Hinblick auf unsere Vorarbeiten [35]. Daher war es besonders interessant, weitere Interaktionspartner von xIAP in diesem Zelltyp zu identifizieren. Zunächst wurde ein Screen mit dem SR-System durchgeführt, wobei  $2,5 \times 10^5$  Transformanten gescreent wurden. Da die Sequenzierungen der identifizierten Klone aus dem SR-Screen jedoch einen aufgrund der System-internen Eigenschaften zu hohen Anteil von falsch positiven Klonen ergab, wurde anschließend ein weiterer Screen mit dem neuen RR-System durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein verbessertes SR-System, das eine höhere Selektivität besitzt. Für diesen Screen wurde die bereits zuvor verwendete cDNA-Bank benutzt.

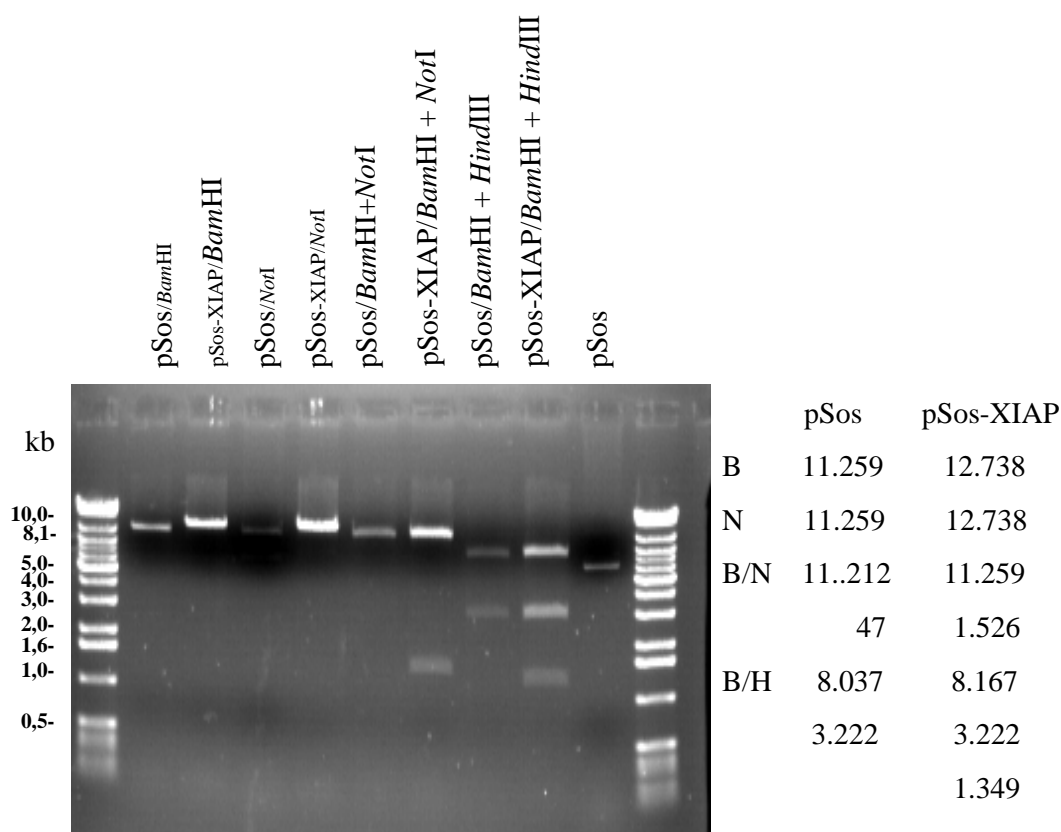
#### 4.1.1 Klonierung von xIAP in den Vektor pSos und Verifikation der Proteinexpression in der Hefe

Um neue Bindungspartner von xIAP mit Hilfe des SR-Two-Hybrid Systems zu identifizieren, wurde xIAP zunächst in pSos kloniert. Hierfür wurde das komplette Gen mittels PCR amplifiziert, wobei das 5' Oligonukleotid eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam*HI und das 3' Nukleotid eine Schnittstelle für *Not*I besaß.

Die erhaltenen Klone wurden anschließend mittels Restriktionsanalyse untersucht.

Das positive Ergebnis der Restriktionsanalyse (Abb. 4.1) wurde anschließend durch die Sequenzierung des pSos-xIAP Klones bestätigt.

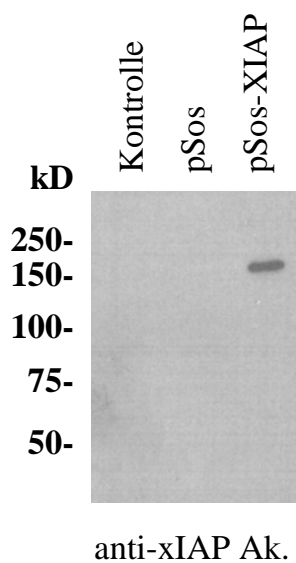




**Abb. 4.1: Restriktionsanalyse von pSos-xIAP**

Das Bandenmuster zeigt, die erfolgreiche Klonierung von xIAP in pSos. Sowohl der leere Vektor pSos, als auch pSos-xIAP wurden mit BamHI (B), NotI (N), BamHI/NotI (B/N) und BamHI/HindIII (B/H) verdaut. Die Restriktionen wurden zusammen mit dem ungeschnittenen pSos Vektor in einem Agarosegel aufgetrennt.

Um sicherzustellen, dass das Fusionsprotein hSos-xIAP in der *cdc25<sub>a</sub>* Hefemutante exprimiert wird, wurden pSos und pSos-xIAP in die Hefe transformiert. Aus den erhaltenen Stämmen und dem nicht-transformierten *cdc25* Stamm wurden danach Proteinextrakte isoliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Western-Blot-Analyse mit einem xIAP-Antikörper. Hier konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein spezifisch in der Hefe *cdc25*-Sos-xIAP überexprimiert wurde (Abb. 4.2). Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Expression von xIAP allein nicht zu einem Wachstum der Hefe bei 37°C führt. Somit erfüllte das Plasmid pSos-xIAP die Voraussetzungen für den 2-Hybrid-Screen und konnte daher für diesen verwendet werden.



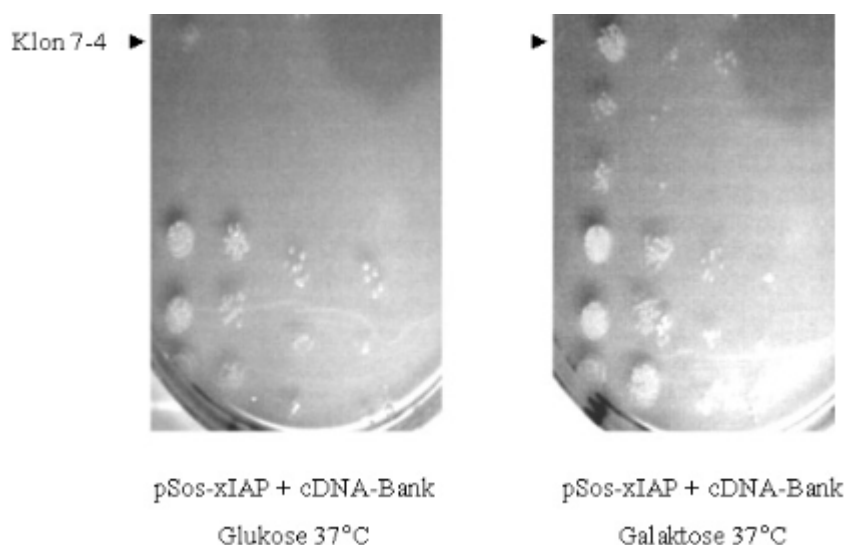
#### Abb. 4.2: Western-Blot Fusionsprotein hSos-xIAP

Das pSos-xIAP Fusionsprotein wird spezifisch in der Hefe *cdc25-Sos-xIAP* exprimiert. Proteinextrakte aus den Hefestämmen *cdc25* (Kontrolle), *cdc25-Sos* (pSos) und *cdc25-Sos-xIAP* (pSos-xIAP) wurden in einem SDS Gel aufgetrennt. Die Expression von xIAP wurde mit einem anti-xIAP Immunoblot untersucht.

#### 4.1.2 Screening der HUVEC cDNA-Bank

Das pSos-xIAP Plasmid wurde anschließend mit der HUVEC cDNA-Bank in die Hefe co-transformiert. Hierbei wurden insgesamt  $2,52 \times 10^5$  Transformanten gescreent. Hiervon zeigten 246 Klone ein selektives Wachstum bei 37°C auf Medium mit Galaktose. Zur Überprüfung dieser positiven Klone wurden logarithmisch wachsende Kulturen angezogen und auf Selektionsmedium mit Galaktose oder Glukose als Kohlenstoffquelle getropft. Danach zeigten noch 84 der 246 Klone ein selektives Wachstum bei 37°C, wenn die cDNA-Bank-Proteine exprimiert wurden. Mit diesen Klonen wurden serielle Tropftests durchgeführt (Abb. 4.3). Letztlich zeigten nach der Überprüfung 26 Klone weiterhin ein selektives Wachstum bei 37°C auf Medium mit Galaktose.

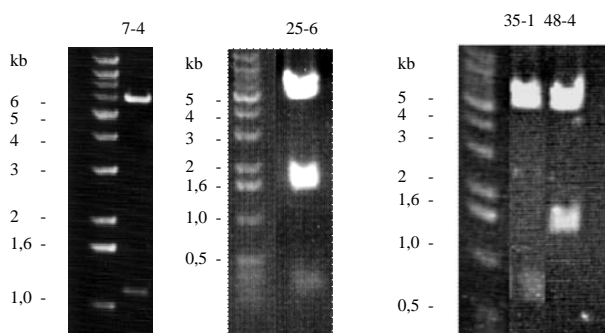
Aufgrund der geringen Anzahl positiver Klone wurde auf eine Retransformation verzichtet. Die Plasmide der positiven Klone wurden zunächst in *E.coli* amplifiziert und anschließend direkt sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, dass bei vier Transformanten der 5' Linker und somit auch das Myristilierungssignal im Bank-Plasmid nicht vollständig vorhanden war. Hier fehlten die letzten zwei der 22 Aminosäuren.



**Abb. 4.3: Serielle Tropftests der positiven Klone**

Die Klone wurden in Selektionsmedium (SD-LEU-URA) ü. N. bei 24°C angezogen. Am folgenden Tag wurden die Hauptkulturen in Selektionsmedium angeimpft und für 6 h (~2 Zellteilungen) bei 24°C inkubiert. Die logarithmischen Kulturen wurden anschließend auf SD-LEU-URA und SG-LEU-URA getropft. Die Platten wurden bei 37°C für 2 Tage inkubiert und dann ausgewertet.

Über die BLAST-Analyse [43] der verbleibenden 22 Klone konnten 4 Proteine als mögliche Interaktionspartner von xIAP identifiziert werden (Tab 4.1). Hierbei stimmten die untersuchten Sequenzen der Klone 7-4 und 35-1 zu 100 % mit den Sequenzen der bei der Analyse identifizierten Proteine überein. Für Klon 25-6 betrug die Übereinstimmung 99 %, während sie bei Klon 48-4 bei 93 % lag.



**Abb. 4.4: Restriktionsanalyse zur Bestimmung der Insertgröße**

Mittels einer Restriktionsanalyse mit EcoRI und XhoI wurde für alle vier möglichen Interaktionspartner die Insertgröße ermittelt, um festzustellen, ob das jeweilige Gen bis zum Stopkodon in dem Plasmid enthalten ist. Bei allen vier Klonen ist aufgrund der so ermittelten Insertgröße davon auszugehen, dass dies der Fall ist (Tab. 4.1).

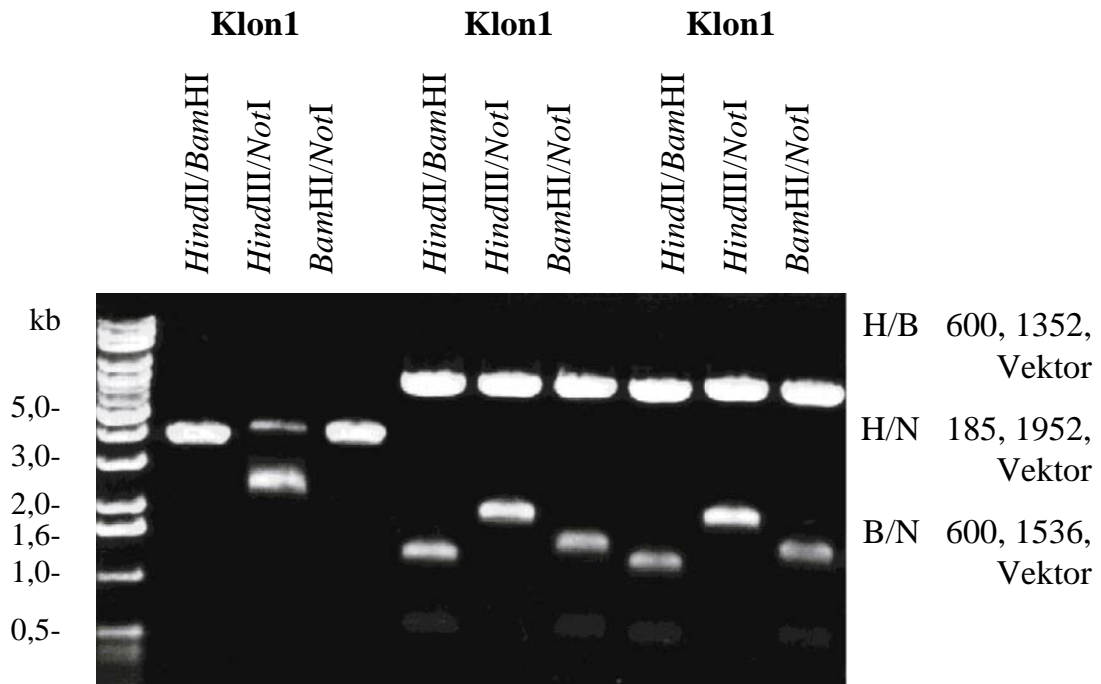
Klone		Insertgröße (kb)	Aminosäuren	Anzahl
Klon-Nr.	Gen			
7-4	Tim44 (452AS)	~1,2	239-452	1
25-6	DNA Polymerase Gamma (mitochondrial) (1240AS)	~2,0	715-1200	1
35-1	OK (134AS)	~1,2	1-134	1
48-4	MHC HLA-E (358AS)	~1,2	2-358	1
Klone mit selektivem Wachstum bei 37°C				<b>26</b>
falsch positive Klone				22
falsch positive Klone mit fehlerhafter Linker				4

**Tab. 4.1: Ergebnisse des SR-Screens**

In diesem Two-Hybrid-Screen zeigten 26 Klone ein selektives Wachstum auf SG-Medium bei 37°C. Die Sequenzierung und anschließende BLAST-Analyse dieser Klone ergab, dass 22 der Klone falsch positiv sind. Von diesen hatten vier eine defekte Linker-Region. Die vier übrigen Klone 7-4, 25-6, 35-1 und 48-4 kodieren für Proteine, die möglicherweise mit xIAP interagieren.

Die Restriktionsanalyse mit *EcoRI/XhoI* ergab, dass alle Gene/Genfragmente bis zum Stopkodon in den Plasmiden enthalten sind (Abb. 4.4).

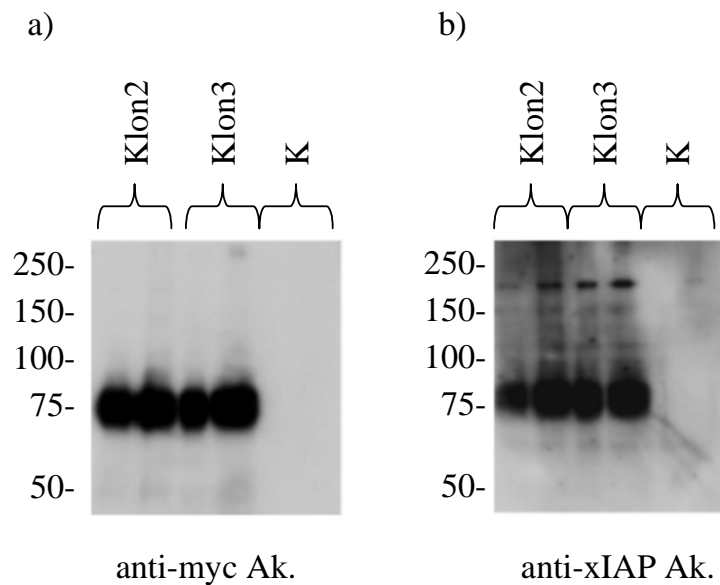
Da in diesem ersten Screen mit  $2,52 \times 10^5$  Transformanten eine recht geringe Anzahl an Klonen gescreent wurde und der Anteil falsch positiver Klone mit 85% sehr hoch war, wurde ein neuer Screen mit dem RR-System durchgeführt. Dieses System ermöglicht mittels regulierbarer Promotoren sowohl die Expression der xIAP-Fusion als auch die Expression des cDNA-Bank-Proteins in einem Hefeklon unabhängig voneinander zu induzieren. Somit können hier falsch positive Klone besser identifiziert und die Anzahl der zu sequenzierenden Klone deutlich verringert werden. Hierfür wurde xIAP über eine Drei-Fragment-Ligation mit RAS in den pMET25 Vektor kloniert, um das Plasmid pRRS-xIAP zu erhalten, bei dem die Expression des xIAP-Fusionsproteins durch den MET25 Promotor kontrolliert wird.



**Abb. 4.5: Restriktionsanalyse für die Klonierung von pRRS-xIAP**

Die Banden zeigen, dass xIAP mit RAS im Fall der Klone 2 und 3 erfolgreich in pMET25 kloniert wurde. Alle drei Klone wurden HindIII/BamHI, HindIII/NotI und BamHI/NotI geschnitten. Die Banden für die Klone 2 und 3 zeigen die erwarteten Fragmente.

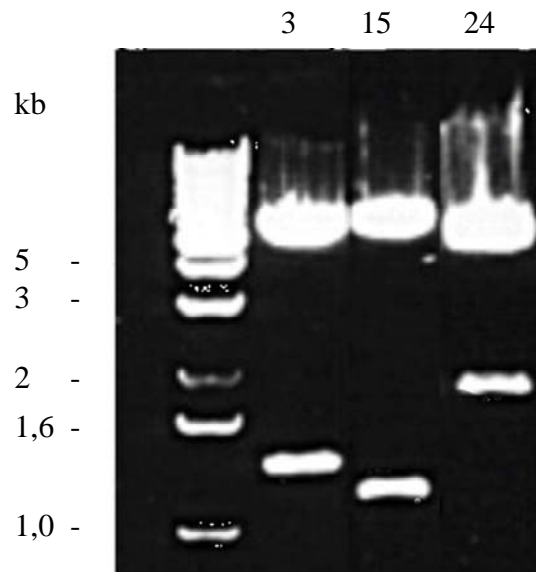
Auch hier wurden die 3 nach der Ligation erhaltenen Plasmide mittels Restriktionsanalyse verifiziert und die Expression des Fusionsproteins in der Hefe *cdc25a* in einem Western-Blot nachgewiesen (Abb. 4.6). Die Expression hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Hefe bei 37°C.



**Abb. 4.6: Western-Blot Fusionsprotein RAS-xIAP**

Das RAS-xIAP Fusionsprotein wird spezifisch in der Hefe *cdc25-pRRS-xIAP 2* und *3* exprimiert. Proteinextrakte aus den Hefestämmen *cdc25-pSos (K)* und *cdc25-pRRS-xIAP 2* und *pRRS-xIAP 3 (Klon2 und 3)* wurden in einem SDS Gel aufgetrennt. Die Expression von RAS-xIAP wurde mit einem anti-myc (a) und einem anti-xIAP-Antikörper (b) analysiert.

Anschließend wurde *pRRS-xIAP* zusammen mit der HUVEC cDNA-Bank in die Hefe transformiert. Hierbei wurde die eingesetzte Menge der cDNA-Bank gegenüber dem SR-Screen erhöht, um eine größere Anzahl von Klonen zu analysieren. Bei diesem Screen wurden insgesamt  $9,38 \times 10^5$  Transformanten erhalten. Hiervon zeigten 694 Klone ein selektives Wachstum bei 37°C auf Galaktosemedium ohne Methionin im Vergleich zum Wachstum auf Platten mit Methionin. Zur weiteren Selektion wurde das Wachstum dieser Klone bei 37°C miteinander verglichen, wenn beide Proteine oder nur das xIAP-Fusionsprotein bzw. das von der cDNA-Bank kodierte Protein exprimiert wurden. Bei dieser Untersuchung zeigten noch 24 Klone ein selektives Wachstum auf Galaktosemedium ohne Methionin. Auch hier wurde aufgrund der geringen Anzahl positiver Klone auf eine Retransformation verzichtet und die Klone wurden direkt sequenziert. Mit Hilfe der BLAST-Analyse [43] der erhaltenen Sequenzen wurden drei mögliche Interaktionspartner von xIAP identifiziert. Die Insertgröße wurde mit Hilfe einer Restriktionsanalyse mit *EcoRI/XhoI* bestimmt. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass alle drei Gene bis zum Stopkodon in dem jeweiligen Plasmid enthalten sind (Abb.4.7 + Tab. 4.2).



**Abb. 4.7: Restriktionsanalyse zur Bestimmung der Insertgröße**

Mittels einer Restriktionsanalyse mit EcoRI und XhoI wurde für alle drei möglichen Interaktionspartner die Insertgröße ermittelt, um festzustellen, ob das jeweilige Gen bis zum Stopkodon in dem Plasmid enthalten ist. Bei allen drei Klonen ist aufgrund der so ermittelten Insertgröße davon auszugehen, dass dies der Fall ist (Tab. 4.2).

Bei allen drei Klonen stimmten die untersuchten Proteinsequenzen zu 100 % mit den Sequenzen der durch die Analyse identifizierten Proteine überein. Darunter war mit der mitochondrialen Aspartat Aminotransferase (mAAT) erneut ein mitochondriales Protein, das als möglicher Interaktionspartner von xIAP identifiziert werden konnte. Es ist bekannt, dass dieses Protein bei Apoptose aus den Mitochondrien ausgeschleust wird [44]. Es besitzt jedoch kein IAP-Binde-Motiv. Als weiterer möglicher Interaktionspartner wurde die nicht neuronale Enolase (NNE oder auch  $\alpha$ -Enolase) identifiziert. Dieses Protein besitzt ein potentiell IAP Binde-Motiv (AVPS), das für die Interaktion von Omi/HtrA2 mit xIAP verantwortlich ist. Dieses Motiv liegt im Bereich der Aminosäuren 34-37 der NNE und ist somit nicht in dem im Screen identifizierten Klon vorhanden (Tab. 4.2). Darüber hinaus wurde ein bislang nicht untersuchtes humanes Protein (Q96EC8) gefunden, welches die Bezeichnung xXIP (*x-chromosomal xIAP interacting protein*) erhielt. Dieses Protein wurde im Rahmen dieses Screens gleich dreimal als möglicher Interaktionspartner identifiziert. Die BLAST-Analyse [43] zeigte, dass es in der Maus ein homologes Protein gibt, das zu 83% identisch mit xXIP ist. Die Funktion dieses Proteins ist bis jetzt ebenfalls nicht bekannt. Die weitere Analyse des Proteins mit dem Programm PredictProtein [45] ergab, dass es vermutlich 4-5

Transmembrandomänen besitzt, was auch durch ein anderes Programm (TMHMM Server [46]) bestätigt wurde. Der Bereich, über den sich diese Transmembrandomänen erstrecken, weist Homologien zu einem Protein aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* auf, das als Yip 1 bezeichnet wird. (Abb. 4.8). Dieses Protein gehört zu einer konservierten Familie von membranständigen Proteinen, die mit Rab GTPasen interagieren [47, 48]. xXIP besitzt den Analysen mit PSORT II [49] zufolge keine N-terminale Signalsequenz und ist wahrscheinlich im endoplasmatischen Retikulum oder in der Plasmamembran lokalisiert.

a)

```

YIP1      1 msfyntsnnanngggfyqpsaqfavpqqsmsfqntvgssntgndnngva
xXIP      1 ---maeaeespgdpgtasprplfa-----glsdisisqdipve
           s a G P FA G S n l V

YIP1     51 pd---plpvgilha-lstkgypheppllee---iginfdhiitktkmqli
xXIP     36 geitipmrsrيرهdsstlnesvrntimrdlkavgkkmhvlyprk----
           d Pl I ST ll e iG F Hii K

YIP1     94 pirfgsgvpqeilndsdlagpliffllfglflma-----gkvhfygi
xXIP     82 -----sntllrdwldwgplilcvtlalmlqrdsadsekdgppqfaev
           q iL D DL GPLI l L L G F i

YIP1    137 ygvalfgtislhnlslkmsnndtstqtnlqffntasilgycflplcflsl
xXIP    124 fvivwfgavtitlnskll-gg-----nisffqslcylgycilplt-vam
           y v FGtisl SKLm Nl FFnt iLGYC LPL lsl

YIP1    187 lgifhglnttgyvsvlfiwstwtssgflnsllqlqnarlliayplli
xXIP    166 l-----icrlvll---adpgpvnfmvr-----
           L v L vi t G lN ll

YIP1    237 fysvfalmvifv-----
xXIP    185 ---lfvvivmfawsivastalladsqppnrralavypvflfyfvismil
           vF lmViF

YIP1    249 -----
xXIP    232 tftpq

```

■ = YIP-Domäne



**Abb. 4.8: Alignment YIP1 und xXIP**

xXIP weist Homologien zu dem Hefeprotein YIP1 auf. a) Das Alignment wurde mit dem Programm Align Plus und der Einstellung FastScan-Max Qual durchgeführt. Die Identität zwischen beiden Proteinen beträgt 28 %. Im Bereich der YIP-Domäne sind sie nahezu identisch. b) Beide Proteine zeigen darüber hinaus eine hohe Ähnlichkeit in der Verteilung der Regionen mit polaren und unpolaren Aminosäuren.



Klone		Insertgröße (kb)	Aminosäuren	Anzahl
Klon-Nr.	Gen			
3,4,26	xXIP (236AS)	~1,4	2-236	3
15	NNE (349AS)	~1,2	84-433	1
24	mAAT (321AS)	~2,3	109-430	1
Klone mit selektivem Wachstum bei 37°C				<b>24</b>
falsch positive Klone				19
falsch positive Klone mit fehlerhafter Linker				5

**Tab. 4.2: Ergebnisse des RR-Screens**

In diesem zweiten Two-Hybrid-Screen zeigten 24 Klone ein selektives Wachstum auf SG-Medium bei 37°C. Die Sequenzierung und anschließende BLAST-Analyse dieser Klone ergab, dass 18 der Klone falsch positiv sind. Von diesen hatten fünf eine defekte Linker-Region. Die sechs übrigen Klone 3, 4, 15, 24 und 26 kodieren für Proteine, die möglicherweise mit xIAP interagieren, wobei die Klone 3, 4 und 26 dasselbe Protein exprimieren.

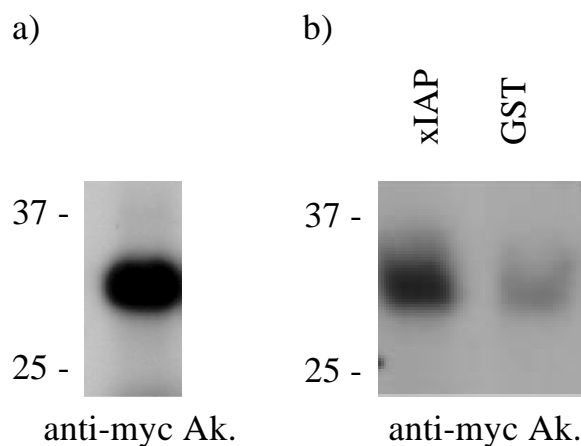
Aufgrund dieser ersten Analysen waren nach beiden Screens folgende Klone vielversprechende Kandidaten für weitergehende Untersuchungen: 7-4 (Tim44), 3 (xXIP), 15 (NNE) und 24 (mAAT).

## 4.2 Überprüfung der Interaktion von xIAP mit den neuen potentiellen Interaktionspartnern

### 4.2.1 GST-Pulldown von xIAP mit den Originalklonen aus den Two-Hybrid-Screens

Um die Interaktion von xIAP mit den im Screen gefundenen Proteinen zu bestätigen, sollte mit allen Klonen ein GST-Pulldown Essay durchgeführt werden. Hierzu wurden diese in den Vektor pCMV-Tag-3B umkloniert, um sie mit einem N-terminalen myc-Tag zu versehen. Anschließend wurden die durch eine *in vitro* Translation erhaltenen Proteine mit bakteriell exprimiertem xIAP-GST inkubiert, um sie anschließend mit diesem Protein präzipitieren zu können, falls beide Proteine miteinander interagieren.

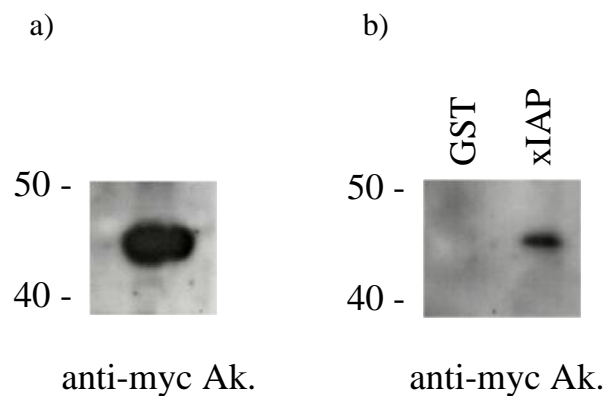
Mit dem Klon 7-4 (Tim44) wurde zunächst eine radioaktive *in vitro* Translation (Abb.4.9 a) durchgeführt. In beiden hiermit durchgeführten GST-Pulldown Essays konnte das translatierte Protein mit xIAP-GST deutlich stärker co-präzipitiert werden als mit GST alleine (Abb.4.9 b). In den nachfolgenden Versuchen mit nicht radioaktiv markiertem Protein konnte die Interaktion des myc-getagten Proteins mit xIAP-GST im Western-Blot mit anti-myc-Antikörper nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 4.9: Radioaktiver GST-Pulldown Klon 7-4**

Das Protein 7-4 kann mit xIAP-GST präzipitiert werden. (a) Der Klon 7-4 wurde mit  $P^{32}$  markiertem Methionin *in vitro* translatiert. (b) Anschließend wurden 5  $\mu$ l dieser Translation mit an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppeltem GST bzw. xIAP-GST (xIAP) inkubiert. Die Beads wurden gewaschen, mit SDS-Probenpuffer aufgekocht und der Überstand in einem SDS-Gel aufgetrennt.

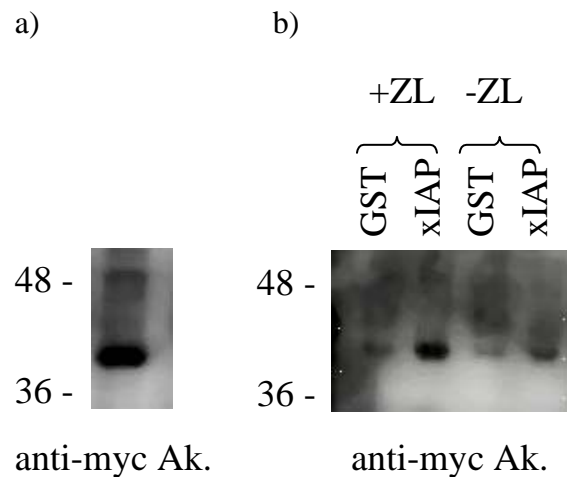
Für Klon 15 (NNE) wurden ausschließlich nicht radioaktive *in vitro* Translationen durchgeführt. Auch hier erfolgte der Nachweis des Proteins mit dem myc-Antikörper. Hierbei konnte ebenfalls eine deutliche Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 4.10).



**Abb. 4.10: GST-Pulldown Klon 15**

Das Protein 15 kann mit xIAP-GST präzipitiert werden. (a) Der Klon 15 wurde *in vitro* translatiert. (b) Anschließend wurden 5  $\mu$ l dieser Translation mit an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppeltem GST bzw. xIAP-GST (xIAP) inkubiert. Die Beads wurden gewaschen, mit SDS-Probenpuffer aufgekocht und der Überstand in einem SDS-Gel aufgetrennt.

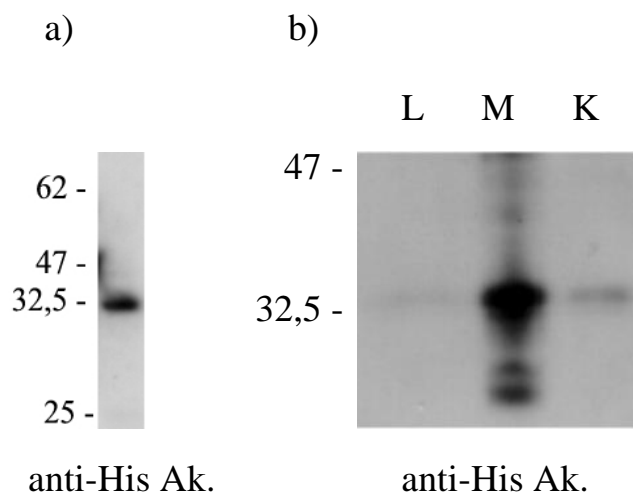
Die Interaktion von xIAP mit Protein 24 (mAAT) konnte ebenfalls durch den nicht radioaktiven GST-Pulldown bestätigt werden. Um festzustellen, ob für eine stärkere Interaktion von xIAP mit den drei myc-getaggten Proteinen weitere zelluläre Komponenten erforderlich sind, wurden bei dem nicht radioaktiven GST-Pulldowns zu gleichen Teilen Zellysate aus unbehandelten und apoptotischen Zellen zugegeben. Bei den Proteinen 7-4 und 15 konnte jedoch unter den gewählten Bedingungen keine Verbesserung der bereits nachgewiesenen Interaktion festgestellt werden. Die Interaktion von Protein 24 mit xIAP konnte hingegen durch die Zugabe von Zellysate deutlich verstärkt werden (Abb. 4.11).



**Abb. 4.11: GST-Pulldown Klon 24**

Das Protein 24 kann mit xIAP-GST präzipitiert werden. (a) Der Klon 24 wurde *in vitro* translatiert. (b) Anschließend wurden 5  $\mu$ l dieser Translation mit an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppeltem GST bzw. xIAP-GST (xIAP) mit oder ohne Zelllysate (ZL) inkubiert. Die Beads wurden gewaschen, mit SDS-Probenpuffer aufgekocht und der Überstand in einem SDS-Gel aufgetrennt.

Sehr ungewöhnlich war die Tatsache, dass Klon 3 (xXIP) auch nach mehreren Versuchen nicht mit Retikulozytenlysate *in vitro* translatiert werden konnte. Das Gen wurde daraufhin in einen Vektor mit einem C-terminalen His-Tag umklontiert, um Probleme bei der Expression, die durch den N-terminalen Tag entstanden sein konnten, auszuschließen. Auch von diesem Plasmid konnte das Protein zunächst nicht *in vitro* translatiert werden. Nach einer genauen Computeranalyse mit dem Programm PESTfind [50] ergab eine PEST-Sequenz im Bereich der Aminosäuren 1-17, was auf eine hohe Anfälligkeit dieses Proteins für Degradierungsprozesse hinweist. Die Halbwertszeit wurde mit 30 Stunden in Retikulozyten angegeben. Durch die Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132, sowie bei einer *in vitro* Translation mit Weizenkeimextrakt, der kein Ubiquitinsystem besitzt, konnte xXIP *in vitro* translatiert werden (Abb. 4.12). Diese Menge war jedoch nicht ausreichend für einen GST-Pulldown.

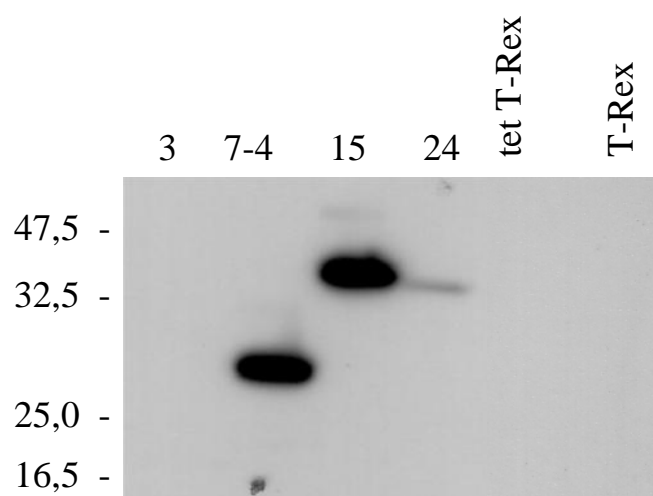


**Abb. 4.12:** *in vitro* Translation von xXIP

Das Protein xXIP kann unter Abwesenheit des Ubiquitinsystems a) bzw. nach Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 *in vitro* translatiert werden. a) *in vitro* Translation von xXIP in Weizenkeimextrakt und Retikulozytenlysat. b) *in vitro* Translation von xXIP in Retikulozytenlysat mit dem Proteasom-Inhibitor LLNL (L), MG132 (M) und ohne Inhibitoren (K).

#### 4.2.2 Transfektion von 293 Zellen mit den Klonen 3, 7-4, 15 u. 24

Um die Interaktion von xIAP mit den Screen-Klon Proteinen in Humanzellen zu bestätigen, wurden zunächst HEK 293 Zellen mit den in den Vektor pCMV-TAG-3B klonierten Klonen 3, 7-4 und 24 transfiziert. Hier konnte trotz Antibiotikaresistenz der transfizierten Zellen, die auf die Anwesenheit des Plasmids in den Zellen hinweist, keine Expression der mit c-myc fusionierten Klonproteine nachgewiesen werden. Daher wurden die Klone mit dem c-myc Tag in den Vektor pcDNA 4.0 TO umkloniert. Anschließend erfolgte die Transfektion von T-REX 293 Zellen mit diesen Plasmiden. Nach Induktion der Expression mittels Tetrazyklin konnten hier die Proteine 7-4, 15 und 24 im Zelllysat deutlich nachgewiesen werden (Abb. 4.13). Die Expression der Proteine hatte bei einer ersten mikroskopischen Untersuchung keinen Einfluss auf die Zellmorphologie im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen.

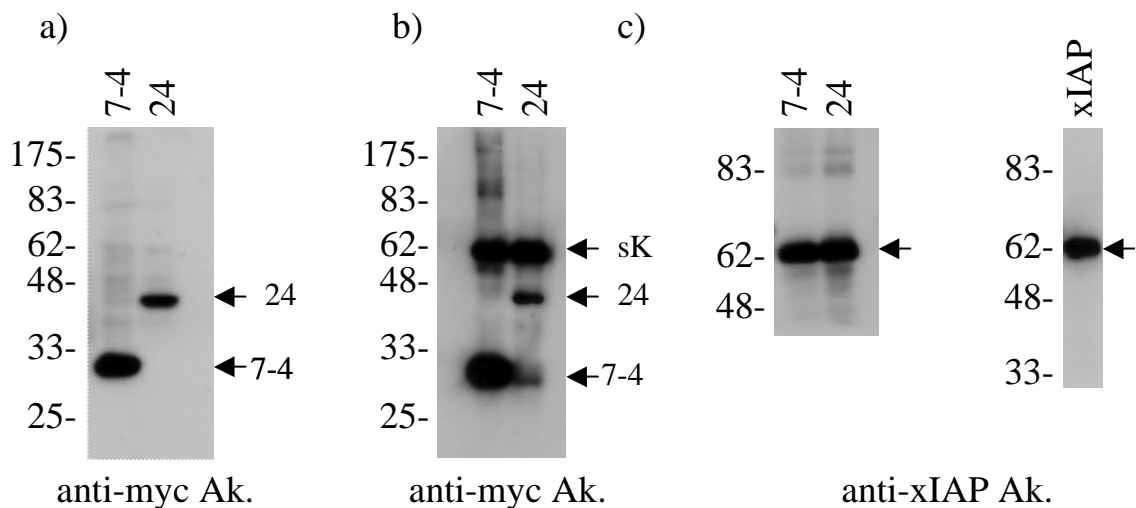


anti-myc Ak.

#### Abb. 4.13: Expression der Klonproteine in T-Rex 293 Zellen

T-Rex 293 Zellen wurden mit den in pcDNA 4.0 TO klonierten Zwei-Hybrid Klonen (3, 7-4, 15, 24) sowie dem leeren Vektor (tet-T-Rex) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit Tetrazyklin induziert. Anschließend wurden aus diesen Zellen und aus unbehandelten T-Rex Zellen (T-Rex) Proteinextrakte präpariert und mittels SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Western-Blot-Analyse mit einem c-myc-Antikörper.

Mit dem c-myc-Antikörper wurde zunächst für die Klone 7-4 (Tim44) und 24 (mAAT) eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt (Abb. 4.14). Die anschließende Western-Blot-Analyse für c-myc zeigte, dass die Proteine 7-4 und 24 mit dem Antikörper präzipitiert werden konnten. Der Western-Blot mit xIAP-Antikörper ergab, dass die xIAP Bande mit der Bande der schweren Kette des zur Präzipitation benutzten c-myc-Antikörpers zusammenfällt, was die Überprüfung der Interaktionen mit diesem Ansatz schwierig machte. Daher wurde entschieden direkt die Interaktion von xIAP mit den Volllängeproteinen der vier potentiellen Interaktionspartner in Humanzellen zu untersuchen.



**Abb. 4.14: Co-Immunopräzipitation Klone 7-4 und 24**

a) Die Klone 7-4 und 24 wurden in T-Rex 293 Zellen überexprimiert. b) Mit dem Lysat wurde eine Co-Immunpräzipitation mit c-myc-Antikörper durchgeführt. Beide Proteine konnten im Präzipitat nachgewiesen werden. Zudem zeigt der Blot eine Bande für die schwere Kette des c-myc-Antikörpers (sK). c) In beiden Immunpräzipitationen zeigt sich mit dem xIAP-Antikörper eine Bande, die in ihrer Laufhöhe der Bande von endogenem xIAP im Kontrolllysat (xIAP) entspricht. Sie befindet sich auf der gleichen Höhe wie die Bande der schweren Kette in b).

### 4.2.3 Immunpräzipitation von NNE und xIAP

Für die Verifikation der Interaktion von xIAP mit der  $\alpha$ -Enolase wurden eine Reihe von Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierdurch konnte diese Interaktion jedoch nicht nachgewiesen werden, da weder die zur Verfügung stehenden xIAP-Antikörper noch der Enolase-Antikörper unter den gewählten Bedingungen ihr Antigen ausreichend präzipitieren konnten. Somit konnte auch der jeweilige Bindungspartner nicht mittels Western-Blot im Präzipitat nachgewiesen werden.

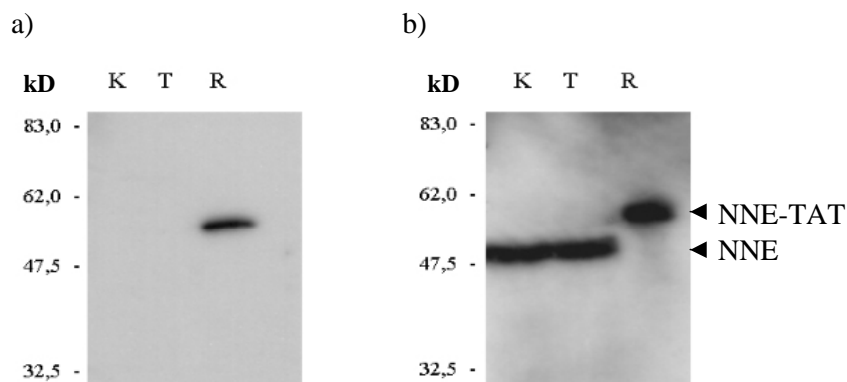
#### 4.2.4 Klonierung der Gene Tim44, mAAT, xXIP und xIAP für die Transfektion von Humanzellen

Um die Interaktionen der Vollängenproteine mit xIAP weiter zu untersuchen, sollten diese in verschiedene Vektoren kloniert werden. Für die Herstellung der Vollängen-Klone wurde zunächst aus HUVEC Zellen RNA präpariert und in cDNA umgeschrieben. Diese diente als Grundlage für die erforderlichen PCR Reaktionen. Die Klonierung von Tim44 stellte sich aufgrund des GC-reichen 5' Bereichs dieses Gens als schwierig dar. Hier konnte die PCR erst mit Hilfe des Advantage GF 2 PCR Systems erfolgreich durchgeführt werden.

#### 4.2.5 Transduktion von HUVEC Zellen mit NNE-TAT

Eine Möglichkeit, um exogene Proteine in intakte Zellen einzuschleusen und sie dort zu studieren, stellt das TAT-System dar [51, 52]. Hierzu wurden die zu untersuchenden Proteine Tim44, mAAT, NNE und xXIP in den Vektor pTAT-HA kloniert, um sie mit dem TAT-Protein aus dem HIV-Virus zu fusionieren. Die so erhaltenen Fusionsproteine tragen neben der TAT-Domäne, welche zur Transduktion des Proteins in die Säugerzellen führt, noch einen N-terminalen His- und HA-Tag. Anschließend sollten die Proteine in *E.coli* exprimiert und über Nickelsäulen aufgereinigt werden. Die Expression in *E.coli* war jedoch nur für die  $\alpha$ -Enolase erfolgreich, obwohl auch die anderen drei Gene der Sequenzierung nach erfolgreich in pTAT-HA kloniert wurden. Nach der Aufreinigung des NNE Fusionsproteins sollten HUVEC Zellen mit dem Protein transduziert werden. Hierbei konnte jedoch lediglich das endogene Protein mittels eines NNE spezifischen Antikörpers in den transduzierten Zellen sowie in den unbehandelten Kontrollzellen nachgewiesen werden (Abb. 4.15).





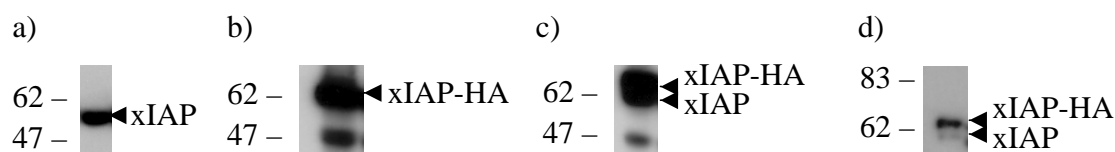
**Abb. 4.15: Transduktion von HUVEC Zellen mit NNE-TAT**

HUVEC Zellen können nicht mit NNE-TAT transduziert werden. Die Zellen wurden für 1 h mit 100 nM NNE-TAT Fusionsprotein inkubiert (T) und anschließend zusammen mit unbehandelten Kontrollzellen (K) geerntet. Die Lysate wurden zusammen mit dem aufgereinigtem rekombinanten Protein (R) in einem SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Analyse mit dem HA-Antikörper (a) und dem NNE-Antikörper (b). Hierbei konnte NNE-TAT mit beiden Antikörpern in den transduzierten Zellen nicht nachgewiesen werden.

#### 4.2.6 Expression der Vollängenproteine in T-Rex Zellen

Zur Überprüfung der Interaktion von xIAP mit den Vollängenproteinen wurden die Gene xIAP, xXIP und mAAT aus dem TAT-Vektor inklusive HA-Tag, sowie Tim44 mit einem N-terminalen myc-Tag in den Vektor pcDNA 4.0 TO umkloniert. T-Rex 293 Zellen wurden mit diesen Plasmiden transient transfiziert und die Expression mit Tetrazyklin induziert. Die Expression von xIAP-HA (Abb. 4.16 b, c), Tim44-myc (Abb. 4.17), xXIP-HA (Abb. 4.18 a) und mAAT-HA (Abb. 4.19) konnte im Western-Blot nachgewiesen werden.

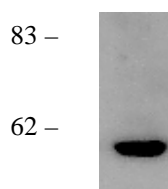
Die Überexpression der Vollängenproteine zeigte in einer ersten Analyse keinen Einfluss auf die Zellmorphologie und das Zellwachstum.



#### Abb. 4.16: Expression und Immunpräzipitation von xIAP-HA

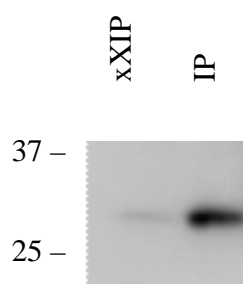
T-Rex 293-Zellen wurden mit dem leeren Vektor pcDNA 4.0 TO (a) und pcDNA 4.0 xIAP-HA (b-c) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit Tetrazyklin induziert. Anschließend wurden aus den Zellen Proteinextrakte präpariert und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Endogenes xIAP wurde mit dem xIAP-Antikörper in beiden Zelllinien nachgewiesen (a und b). Die Expression von xIAP-HA konnte in den transfizierten Zellen mit dem HA- (b) und dem xIAP-Antikörper (c) detektiert werden. Mit diesem Lysat wurde mit HA-Antikörper eine Immunpräzipitation durchgeführt. Der Western-Blot mit xIAP-Antikörper zeigt, dass endogenes xIAP mit xIAP-HA co-präzipitiert wurde (d).

Anschließend wurden mit den Lysaten von xIAP-HA, xXIP-HA und mAAT-HA Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierbei konnte die Co-Präzipitation von endogenem xIAP mit xIAP-HA nachgewiesen werden (Abb. 4.16 d). Die endogene  $\alpha$ -Enolase konnte hingegen mit diesem Ansatz nicht co-präzipitiert werden.



#### Abb. 4.17: Expression von Tim44-myc

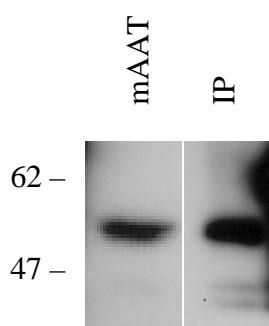
T-Rex 293-Zellen wurden mit dem pcDNA 4.0 Tim44-myc transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit Tetrazyklin induziert. Anschließend wurden aus den Zellen Proteinextrakt präpariert und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Expression von Tim44-myc konnte in den transfizierten Zellen mit dem myc-Antikörper detektiert werden.



**Abb. 4.18: Expression und Immunpräzipitation von xXIP-HA**

T-Rex 293-Zellen wurden mit dem pcDNA 4.0 xXIP-HA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit Tetrazyklin induziert. Anschließend wurden aus den Zellen Proteinextrakt präpariert und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Expression von xXIP-HA konnte in den transfizierten Zellen mit dem HA-Antikörper detektiert werden (xXIP). Mit diesem Lysat wurde mit HA-Antikörper eine Immunpräzipitation durchgeführt. Der Western-Blot mit HA-Antikörper zeigt, dass xXIP-HA präzipitiert wurde (IP).

Auch xXIP-HA (Abb. 4.18) und mAAT-HA (Abb. 4.19) konnten über den HA-Tag präzipitiert werden. Endogenes xIAP konnte jedoch in beiden Präzipitaten nicht nachgewiesen werden.



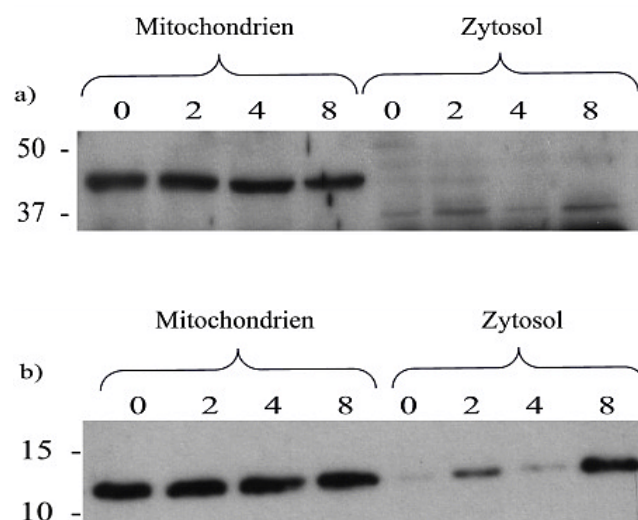
**Abb. 4.19: Expression und Immunpräzipitation von mAAT-HA**

T-Rex 293-Zellen wurden mit dem pcDNA 4.0 mAAT-HA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit Tetrazyklin induziert. Anschließend wurden aus den Zellen Proteinextrakt präpariert und in einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Expression von mAAT-HA konnte in den transfizierten Zellen mit dem HA-Antikörper detektiert werden (mAAT). Mit diesem Lysat wurde mit HA-Antikörper eine Immunpräzipitation durchgeführt. Der Western-Blot mit HA-Antikörper zeigt, dass mAAT-HA präzipitiert wurde (IP).

### 4.3 Untersuchungen zur biologischen Funktion von Tim44, NNE und xXIP

#### 4.3.1 Versuche zur Freisetzung von Tim44 aus den Mitochondrien

Da xIAP und Tim44 unter normalen Bedingungen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind, sollte untersucht werden, ob Tim44, wie andere mitochondriale Interaktionspartner von xIAP, unter Apoptose aus den Mitochondrien freigesetzt wird [53]. Hierfür wurde bei HUVEC durch den Entzug von Wachstumsfaktoren Apoptose ausgelöst und es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen. Anschließend wurden die mitochondrialen und zytosolischen Fraktionen präpariert. Die Analyse dieser Proben ergab, dass es nach 8 Stunden bei den Zellen zu einer deutlichen Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien kam. Eine Freisetzung von Tim44 unter diesen Bedingungen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.20), was auf dessen stabile intramitochondriale Verankerung hinweist.

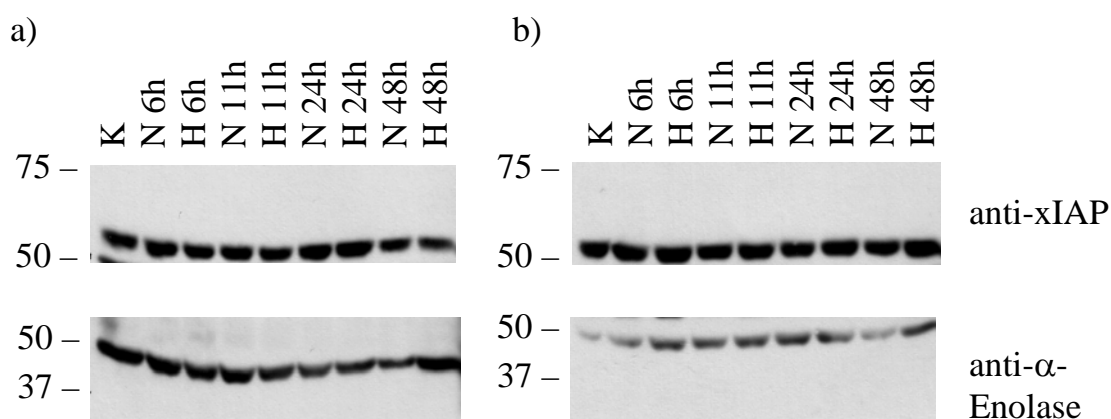


**Abb. 4.20: Ausschleusung von Tim44 bei Apoptose**

Tim44 wird unter Apoptose nicht aus den Mitochondrien ausgeschleust. Bei HUVEC wurde durch Wachstumsfaktorentzug Apoptose ausgelöst. Nach 0, 2, 4 und 8 h wurden Proben genommen und mitochondriale und zytosolische Proteinextrakte präpariert. Diese wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Western-Blot-Analyse mit anti-Tim44 (a) und anti-Cytochrom C (b) Antikörpern.

### 4.3.2 Untersuchungen zur Regulation der Expression von NNE in HUVEC

Es ist bekannt, dass die Expression der  $\alpha$ -Enolase im Rind unter Hypoxie hochreguliert wird [54]. Um festzustellen, ob dies auch im Menschen der Fall ist, wurden HUVEC Zellen in der Hypoxiekammer bei 1,4 % und 2,4 %  $O_2$  für maximal 48 h inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und die Proteinextrakte anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. In den anschließenden Western-Blot-Analysen mit einem Enolase-Antikörper konnte gezeigt werden, dass es bei einer  $O_2$ -Konzentration von 1,4 % im Zeitraum von 24 h bis 48 h zu einer erhöhten Expression der NNE gegenüber bei normoxischen Bedingungen inkubierten Zellen kommt (Abb. 4.21 a). Bei einer  $O_2$ -Konzentration von 2,4 % konnten nach 48 h eine Erhöhung der Expression der  $\alpha$ -Enolase in den hypoxischen Zellen nachgewiesen werden. Zu den übrigen Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede in der NNE Expression zwischen normoxischen und hypoxischen Zellen festgestellt werden (Abb. 4.21 b).



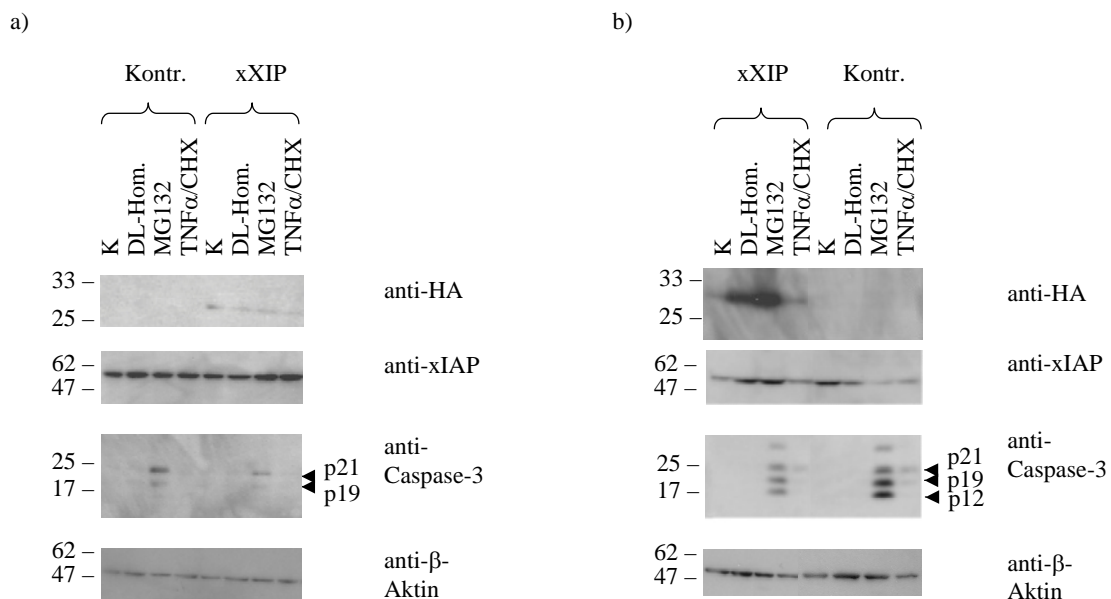
**Abb. 4.21: Expression humaner NNE unter Hypoxie**

Die Expression der  $\alpha$ -Enolase wird unter hypoxischen Bedingungen reguliert. HUVEC wurden unter normoxischen (N) und hypoxischen (H) Bedingungen für 6, 11, 24 und 48 h inkubiert. Die Inkubation unter Hypoxie wurde bei 1,4 %  $O_2$  (a) und 2,4 %  $O_2$  (b) durchgeführt. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  (K) und den weiteren Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet. Die Proteinextrakte wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Western-Blot-Analyse mit xIAP- und  $\alpha$ -Enolase-Antikörpern.

Bei der Expression von xIAP zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen normoxischen und hypoxischen Zellen.

### 4.3.3 Analyse der Funktionen von xXIP

Um erste Informationen über die Funktionen von xXIP in Humanzellen zu erhalten, wurde xXIP-HA in T-Rex 293 Zellen überexprimiert. Nach der Induktion der Genexpression wurden die Zellen für 4 h oder 18 h mit DL-Homozystein behandelt, um Stress im endoplasmatischen Retikulum auszulösen. Zudem wurden weitere Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 oder TNF- $\alpha$ /Cykloheximid inkubiert, um in ihnen Apoptose auszulösen (Abb 4. 22).



**Abb. 4.22: Auswirkungen der Überexpression von xXIP auf die Apoptose**

Die Überexpression von xXIP schützt die Zellen vor MG132-induzierter Apoptose. T-Rex 293 Zellen wurden transient mit pcDNA 4.0 TO (Kontr.) und pcDNA 4.0 xXIP-HA (xXIP) transfiziert. a) Nach der Induktion der Genexpression mit Tetrazyklin wurden die Zellen für 4 h mit 5 mM DL-Homozystein (DL-Hom.), 5  $\mu$ M MG132 (MG132) oder 1 ng/ml TNF- $\alpha$  + 0,5  $\mu$ g/ml Cykloheximid (TNF $\alpha$ /CHX) inkubiert. Anschließend wurden sie zusammen mit den unbehandelten Kontrollzellen (K) geerntet. Die Proteinextrakte wurden in SDS-Gelen aufgetrennt. Die Western-Blot-Analysen wurden mit Antikörpern gegen HA, xIAP, aktiver Caspase-3 und  $\beta$ -Aktin durchgeführt. b) Die Zellen wurden wie bei a) behandelt, jedoch für 18 h mit den jeweiligen Chemikalien inkubiert. Die Konzentration von DL-Homozystein betrug 10 mM.

Nach einer Inkubation von 4 h zeigte keine der Chemikalien einen Einfluss auf die Proteinmenge von xXIP-HA in den Zellen. Die Behandlung mit 5  $\mu$ M MG132 für 18 h führte hingegen zu einer deutlichen Zunahme von xXIP-HA gegenüber der Kontrolle. Auch bei den mit 10 mM DL-Homozystein inkubierten Zellen kam es zu einer Erhöhung der Menge an xXIP-HA, die jedoch geringer war, als bei den mit MG132 behandelten Zellen. Die Zugabe von TNF- $\alpha$  zusammen mit Cykloheximid hatte keinen Einfluss auf den Gehalt von xXIP-HA

---

in den transfizierten Zellen. Die Überexpression von xXIP-HA allein führte nicht zu einer Änderung der Menge an endogenem xIAP in den Zellen. Nach der Induktion der Apoptose durch MG132 sowie TNF- $\alpha$ /Cyklohexamid für 4 h kam es zu einer geringfügigen Zunahme von xIAP. Zu diesem Zeitpunkt konnte nur in den mit MG132 behandelten Zellen aktive Caspase-3 und somit die Apoptose nachgewiesen werden. Die xXIP-HA überexprimierenden Zellen zeigten hier eine deutlich reduzierte Menge an aktiver Caspase-3 gegenüber den Kontrollzellen. Die Überexpression führte somit zu einer Verringerung der durch MG132 ausgelösten Apoptose. Die Behandlung mit den anderen beiden Substanzen für denselben Zeitraum führte nicht zu einer Aktivierung von Caspase-3. Nach 18 h Inkubation war diese sowohl bei den mit MG132 als auch bei den mit TNF- $\alpha$  und Cyklohexamid behandelten Zellen nachweisbar, wobei MG132 einen deutlich stärkeren Effekt auf die T-Rex 293 Zellen hatte. Die Behandlung mit DL-Homozystein löste in diesen Zellen keine durch ER-Stress hervorgerufene Apoptose aus. Bei den mit TNF- $\alpha$ / Cyklohexamid inkubierten Zellen war keine signifikante Reduktion der Caspase-3 Aktivierung festzustellen. Nach der Induktion der Apoptose für 18 h war keine Veränderung der Menge an endogenem xIAP zu erkennen. Die Menge an aktiver Caspase-3 unter MG132 war gegenüber dem 4 h Wert deutlich erhöht. Auch hier führte die Überexpression von xXIP-HA zu einer Reduktion dieser Aktivierung und somit der Apoptose.

## 5 Diskussion

### 5.1 Two-Hybrid-Screens führen zur Identifikation von sieben neuen potentiellen Interaktionspartnern von xIAP

Um neue Interaktionspartner von xIAP zu finden, wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Two-Hybrid-Screens durchgeführt. Hierbei konnten sieben neue potentielle Bindungspartner identifiziert werden, deren Interaktion mit xIAP anschließend weiter untersucht wurde. Während der Durchführung der Two-Hybrid-Screens traten jedoch eine Reihe von nicht antizipierten Schwierigkeiten auf. So zeigten die Hefeklone im CytoTrap-Screen auf den nach den Herstellerangaben zusammengesetzten Medien mit Galaktose als Kohlenstoffquelle bei 37°C ein deutlich langsames Wachstum, als auf Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle. Daher konnte hier beim Vergleich der Platten nicht eindeutig festgestellt werden, ob die Klone ein selektives Wachstum bei 37°C auf Medium mit Galaktose zeigen. Aus diesem Grund wurde der Screen wiederholt werden, wobei die Zusammensetzung des Galaktosemediums dem Artikel von Ami Aronheim von 1997 entnommen wurde [55]. Hier zeigten die Hefeklone auf beiden Medien bei 37°C ein gleichschnelles Wachstum. Insgesamt wurden  $2,52 \times 10^5$  Klone analysiert, dies entspricht  $\sim 6,7 \%$  der cDNA-Bank mit  $3,7 \times 10^6$  Klonen. Die Bank wurde somit in diesem Screen aufgrund der geringen Co-Transformationseffizienz nicht abgedeckt. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass bekannte Interaktionspartner von xIAP, wie zum Beispiel XAF1 hier nicht gefunden wurden. Es erklärt auch, warum die jeweiligen Interaktionspartner nicht mehrfach identifiziert werden konnten. Hierfür hätte die Bank zumindest einmal vollständig abgedeckt werden müssen. Hinzu kommt, dass sich nach der Sequenzierung zeigte, dass von den 26 Klonen mit selektivem Wachstum bei 37°C 19 falsch positiv waren. Das System zeigte somit eine zu geringe Selektivität und wurde daher nicht mehr für den nachfolgenden Screen eingesetzt. Von den 19 falsch positiven Klonen hatten 4 Klone einen defekten Linker im cDNA-Bank Plasmid. Aufgrund diese Defekts konnten möglicherweise Interaktionspartner von xIAP, die von diesem Plasmid kodiert wurden, nicht als solche identifiziert werden. Da die cDNA-Bank in diesem ersten Screen nicht abgedeckt wurde und der Anteil an falsch positiven Klonen mit 85 % sehr hoch war, wurde anschließend ein zweiter Screen durchgeführt. Diesmal wurde



jedoch das RR-System verwendet, das es erlaubt, sowohl die Expression des Köderproteins durch das Fehlen von Methionin im Medium, als auch die Expression des Bank-Proteins in Medium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle unabhängig voneinander zu induzieren [56]. Hierdurch sollte die Zahl falsch positiver Klone verringert werden. Da die Transformationseffizienz im ersten Screen relativ gering war, wurde bei diesem Screen zudem deutlich mehr DNA für die Co-Transformation eingesetzt, um mehr Klone zu analysieren. Hierdurch konnte die Zahl der untersuchten Klone auf  $9,38 \times 10^5$  erhöht werden, was etwa 25 % der cDNA-Bank entspricht. Somit wurde die Abdeckung der Bank gegenüber dem ersten Screen deutlich erhöht. Die größere Selektivität dieses Systems gegenüber dem CytoTrap-System zeigte sich darin, dass hier letztendlich noch 24 Klone ein selektives Wachstum bei 37°C auf Galaktosemedium ohne Methionin zeigten. Die Zahl der positiven Klone war damit im RR-Screen noch etwas geringer, als im CytoTrap-Screen, obwohl hier nahezu die vierfache Menge an Hefeklonen untersucht wurde.

Im ersten Screen konnten vier mögliche Interaktionspartner von xIAP identifiziert werden. Hierunter waren mit Tim44 (*translocase of inner mitochondrial membrane*) und der mitochondrialen DNA-Polymerase  $\gamma$  gleich zwei mitochondriale Proteine. Da zwei der bereits bekannten Interaktionspartner von xIAP, Smac und HtrA2, ebenfalls in den Mitochondrien lokalisiert sind, stellten diese beiden Proteine besonders gute Kandidaten für die Interaktion mit xIAP dar. Tim44 ist am Proteinimport in die Mitochondrien beteiligt und dort lose an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. An diesem Prozess sind zwei Translokase-Komplexe beteiligt, einer an der äußeren Mitochondrienmembran, der sogenannte TOM-Komplex (*translocase of outer mitochondrial membrane*), und ein Komplex an der inneren Mitochondrienmembran, TIM (*translocase of inner mitochondrial membrane*) [57, 58]. Tim44 ist zuständig für die Rekrutierung des mitochondrialen Hsp70 (mtHsp70) an die Importstelle, wo Hsp70 als Motor für den Proteinimport wirkt [59, 60]. Für eine mögliche Interaktion von xIAP mit Tim44 spricht zum einen dessen Lokalisierung im Bereich des Intermembranraums der Mitochondrien, in dem auch bereits bekannte Interaktionspartner von xIAP wie Smac und HtrA2 vorliegen. Hierdurch könnte die Ausschleusung des Proteins nach apoptotischem Stimulus erleichtert werden. Darüber hinaus besitzt Tim44 eine Tetrapeptidsequenz (AHPI), die mit dem IAP Binde-Motiv anderer xIAP Interaktionspartner vergleichbar ist. Diese Sequenz ist auch in dem mit Hilfe des Two-Hybrid-Screens

identifizierten Klon enthalten. Bei der Analyse der Bindungsstärke verschiedener Peptide einer Tetrapeptid-Bank mit der BIR3-Domäne von xIAP zeigte dieses Motiv mit die größte Bindungsaffinität [61]. Ob die Sequenz für die Bindung an xIAP zugänglich ist, muß noch untersucht werden. In einer Analyse mit dem Programm PeptideCutter konnte jedoch keine Schnittstelle von apoptotischen Caspasen in diesem Bereich identifiziert werden, die dieses Tetrapeptid durch Spaltung freilegen könnten, wie das bei anderen Bindungspartnern von xIAP z. B. bei Caspase-9 der Fall ist [26].

Das zweite Protein, das als potentieller Bindungspartner im Screen identifiziert wurde, die mitochondriale DNA-Polymerase  $\gamma$ , ist ein kerncodiertes Protein und stellt die einzige DNA-Polymerase dar, die für die Replikation mitochondrialer DNA benötigt wird [62]. Da dieses Protein nicht wie Tim44 oder Smac im Intermembranraum der Mitochondrien, sondern in der Mitochondrienmatrix lokalisiert und mit 136 kD ein sehr große ist, ist dessen Freisetzung in das Zytoplasma nach apoptotischem Stimulus eher unwahrscheinlich. Da dies aber wahrscheinlich eine Voraussetzung für die Interaktion mit dem zytoplasmatischen xIAP ist, wurde die weitere Untersuchung dieses Kandidaten zunächst zurückgestellt.

Ein weiteres Protein, das mutmaßlich mit xIAP interagiert, war das MHC HLA-E (*major histocompatibility complex human leukocyte antigen E*), ein Protein des Immunsystems [63]. Dieses Protein ist in der Plasmamembran der Zelle lokalisiert und führt durch die Bindung an Rezeptoren auf der Oberfläche von "natürlichen Killer-Zellen" (NK-Zellen) je nach Rezeptor zu deren Aktivierung oder Inaktivierung [64]. Eine Interaktion dieses membranständigen Proteins mit xIAP erschien wenig wahrscheinlich, so dass auf eine weitere Untersuchung verzichtet wurde. Letzteres gilt auch für das Protein OK, das ebenfalls als potentieller Interaktionspartner identifiziert wurde. Bei diesem Protein ist lediglich die Sequenz in der Datenbank veröffentlicht.

Im nachfolgenden RR-Screen wurden drei weitere mögliche Interaktionspartner von xIAP identifiziert. Hierunter war mit der mitochondrialen Aspartat Aminotransferase (mAAT) ein drittes mitochondriales Protein. Es ist bekannt, dass dieses Protein, wie die bereits bekannten mitochondrialen Bindungspartner von xIAP, nach einem durch einen apoptotischen Stimulus ausgelösten Abfall des mitochondrialen Membranpotentials aus den Mitochondrien ausgeschleust wird [44, 65]. Es wird daher häufig als Marker für eine Änderung der MPT (*mitochondrial permeability transition*) unter Apoptose verwendet und stellt einen biologisch

sinnvollen Kandidaten für eine mögliche Interaktion mit xIAP dar. Die mAAT ist in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert. Sie katalysiert die Transaminierung von L-Aspartat und 2-Oxoglutarat zu Oxaloacetat + L-Glutamat und ist somit wichtig für den Harnstoffzyklus. Das Protein ist identisch mit dem *plasma membrane fatty acid binding protein* (FABPpm) der Ratte, das für den Transport gesättigter Fettsäuren in die Zelle verantwortlich ist [66, 67].

Als weiterer möglicher Bindungspartner von xIAP wurde die nicht-neuronale Enolase (NNE) oder auch  $\alpha$ -Enolase identifiziert. Dieses zytoplasmatische Protein ist an der Glykolyse beteiligt, wo es die reversible Dehydratisierung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat katalysiert. Es gehört zur Proteinfamilie der Enolasen und wird in fast allen Geweben exprimiert, während die  $\beta$ -Form nur in der Muskulatur und die  $\gamma$ -Form nur in neuronalem Gewebe vorhanden ist. Die  $\alpha$ -Enolase ist eines der fünf Stressproteine, die in Rinderendothelzellen hochreguliert werden, um sie vor Hypoxie zu schützen [54]. Da xIAP und  $\alpha$ -Enolase beide im Zytoplasma lokalisiert sind, erscheint eine Interaktion dieser beiden Proteine möglich. Darüber hinaus besitzt die NNE mit dem Tetrapeptid AVPS ein putatives IAP Binde-Motiv, das identisch auch bei Omi/HtrA2 vorkommt. Jedoch liegt diese Sequenz ausserhalb des von dem identifizierten Klon abgedeckten Bereich's und kann daher bei diesem nicht für dessen Interaktion mit xIAP verantwortlich sein. Ob das Tetrapeptid für eine mögliche Bindung von xIAP zugänglich ist, ist jedoch nicht bekannt, da auch hier mit dem Programm PeptideCutter keine Schnittstelle für apoptotische Caspasen in diesem Bereich gefunden werden konnte. Eine Interaktion mit xIAP über diesen Bereich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da möglicherweise auch andere Proteasen diese Sequenz freilegen könnten. Dies gilt ebenfalls für Tim44.

Das dritte Protein, das als möglicher Interaktionspartner von xIAP in diesem Screen identifiziert wurde, ist ein Protein, dessen Funktionen in der Zelle bis dahin noch nicht untersucht wurden. Es wird wie xIAP vom X-Chromosom kodiert und erhielt daher die Bezeichnung xXIP (*x-chromosomal xIAP interacting protein*). Im Gegensatz zu allen anderen in beiden Screens identifizierten potentiellen Bindungspartnern wurde dieses Protein gleich mehrfach gefunden. Dies spricht dafür, dass diese beiden Proteine tatsächlich mit einander interagieren und dass es sich, falls tatsächlich vorhanden, um eine relativ starke Bindung handeln muss. Es handelt sich bei xXIP um ein Protein, das vier oder fünf

Transmembrandomänen besitzt. Da es keine N-terminale Zielsequenz besitzt, kann nicht genau vorhergesagt werden, welche subzelluläre Lokalisation das Protein hat. Erste Computeranalysen sprechen jedoch für eine Lokalisierung in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) oder der Plasmamembran. Die Möglichkeit, dass xXIP im ER vorkommt, ist besonders interessant, da einige Mitglieder der Bcl-2 Familie, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind, ebenfalls in der Membran des endoplasmatischen Retikulums vorkommen [68, 69]. Hierzu gehört unter anderem Bim (*Bcl-2 interacting mediator of cell death*), das nach seiner Translokation ins ER zu einer Aktivierung von Caspase-12 führt, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der durch ER-Stress ausgelösten Apoptose spielt [70-73]. Neben Caspase-12 scheint ein weiteres Mitglied der Caspase-1 Subfamilie -Caspase-4- an der ER-Stress vermittelten Apoptose beteiligt zu sein [74]. Interessanterweise besitzt xXIP zwei Schnittstellen für Caspase-1, ein weiteres Mitglied dieser Familie, das neben seiner Funktion bei Entzündungsreaktionen ebenfalls an apoptotischen Prozessen beteiligt zu sein scheint [75-77]. Als weiteres strukturelles Merkmal besitzt das Protein xXIP den Computeranalysen zufolge eine PEST-Sequenz, was darauf hinweist, dass es möglicherweise über den Ubiquitinweg abgebaut wird. Es besitzt aber kein IAP Binde-Motiv.

Somit tragen nur zwei der sieben identifizierten Proteine eine Sequenz, die diesem Tetrapeptid entspricht, wobei keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob die Sequenz für eine eventuelle Bindung zugänglich ist. Bei den anderen Proteinen müsste die mögliche Interaktion in jedem Fall über einen anderen Mechanismus erfolgen, wie dies auch bei bereits bekannten Interaktionspartnern von xIAP, z. B. TAB1 der Fall ist [33], wo kein IAP Binde-Motiv an der Bindung beteiligt ist. Die Interaktion von xIAP mit drei der Two-Hybrid-Klone kann im GST-Pulldown bestätigt werden

Um zu überprüfen, ob die von den Klonen 3 (xXIP), 7-4 (Tim44), 15 ( NNE ) und 24 ( mAAT) kodierten Proteine tatsächlich mit xIAP interagieren, wurden diese mit einem myc-Tag versehen, und für die anschließende Inkubation mit rekombinantem GST-xIAP *in vitro* translatiert. Die Tatsache, dass dies für Klon 3 nur unter Zugabe eines Proteasom-Inhibitors oder unter Abwesenheit des Ubiquitinsystems möglich war, spricht dafür, dass xXIP tatsächlich eine funktionelle PEST-Sequenz besitzt. Aufgrund der geringen Mengen an

synthetisiertem Protein konnte die Interaktion von xIAP mit xXIP nicht im GST-Pulldown analysiert werden. Bei diesen Versuchen wurden die Proben vor dem Auftragen auf das SDS-Gel durch Aufkochen denaturiert. In späteren Ansätzen zeigte sich jedoch, dass das Protein unter diesen Bedingungen agglomeriert und daher kaum in das Gel einwandern kann. Erst wenn die Denaturierung auf Eis durchgeführt wurde, was die Bildung makromolekularer Strukturen verhindert, konnte es in einem SDS-Gel aufgetrennt werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass xXIP bereits in den ersten *in vitro* Translationen hergestellt werden war, jedoch war die erhaltene Menge hier zu gering, um trotz der Agglomeratbildung in das Gel einzuwandern. Erst wenn kein Abbau durch das Ubiquitinsystem mehr erfolgte, war die Proteinmenge groß genug, um trotz der Bildung makromolekularer Strukturen im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend im Western-Blot nachgewiesen zu werden.

Für Klon 7-4 (Tim44) konnte die Interaktion zwischen xIAP und dem vom Klon kodierten Protein im GST-Pulldown in der Tat nachgewiesen werden. Jedoch gilt dies nur für den mit radioaktiv markierten Protein 7-4 durchgeführten Essay, während die Bindung über den myc-Tag nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse sprechen für eine schwache Interaktion von xIAP mit dem Protein 7-4, die nur durch den sensitiveren radioaktiven Pulldown nachzuweisen war. Auch durch die Zugabe von Zelllysate unbehandelter oder apoptotischer Zellen konnte die Bindung nicht soweit verstärkt werden, dass ein Nachweis unter nicht-radioaktiven Bedingungen möglich war. Es ist daher unwahrscheinlich, dass für diese Interaktion weitere Proteine benötigt werden. Möglicherweise sind für eine stärkere Bindung von 7-4 und xIAP Modifikationen nötig, die bei der Herstellung der rekombinanten Proteine bei der *in vitro* Translation bzw. in *E.coli* so nicht stattfinden.

Die Interaktion von Protein 15 (NNE) mit xIAP ist anscheinend stärker, als die mit Protein 7-4, da diese bereits mit dem nicht radioaktiv markierten Protein in GST-Pulldowns mit xIAP über den myc-Tag nachweisbar war. Auch hier werden anscheinend keine weiteren Komponenten für die Bindung benötigt, da eine Zugabe von Zelllysate nicht zu einer besseren Co-Präzipitation des Proteins mit xIAP-GST führte.

Bei Klon 24 scheinen hingegen noch weitere Proteine für die Interaktion nötig zu sein, denn hier führte die Zugabe von Zelllysate zu einer deutlich verbesserten Präzipitation des Proteins. Welche Proteine dies sind, ist bislang nicht bekannt. Für spätere Untersuchungen bietet sich

---

eine MALDI-TOF Analyse des Co-präzipitierten Komplexes zur Identifizierung der weiteren Bindungspartner an.

Um festzustellen, ob die durch den GST-Pulldown bestätigten Interaktionen von xIAP mit den drei Klonproteinen auch in intakten Zellen stattfinden, wurden die Proteine mit einem myc-Tag versehenen Proteine in T-Rex 293 Zellen überexprimiert, und Immunpräzipitationen durchgeführt. Da im Western-Blot jedoch die schwere Kette des zur Präzipitation benutzten myc-Antikörpers zusammen mit der xIAP-Bande auf einer Höhe lief, konnte nicht festgestellt werden, ob eine Co-Präzipitation stattgefunden hatte oder nicht. Daher wurde als Nächstes untersucht, ob xIAP *in vivo* mit den Volllängenproteinen interagiert.

## **5.2 Die Interaktion von xIAP mit Tim44, mAAT, NNE und xXIP ist in T-Rex 293 Zellen nicht nachweisbar**

Bei der Untersuchung der Interaktion von xIAP mit den Volllängenproteinen wurde zunächst die Bindung mit der  $\alpha$ -Enolase überprüft, da für dieses Protein ein Antikörper zur Verfügung stand. In mehreren Versuchsansätzen stellte sich jedoch heraus, dass dieser Antikörper für eine Immunpräzipitation nicht geeignet war, da er auch unter verschiedensten Bedingungen sein Antigen nicht präzipitieren konnte. Da für die NNE keine weiteren Antikörper verfügbar waren, wurden die Versuche anschließend mit verschiedenen xIAP-Antikörpern durchgeführt. Auch hier stellte sich jedoch heraus, dass nicht genügend xIAP mit dem jeweiligen Antikörper präzipitiert werden konnte, um die Interaktion mit der endogenen Enolase zu untersuchen. Weil eine Überprüfung der Bindung zwischen den beiden endogenen Proteinen daher nicht möglich war, wurde die NNE, wie auch die drei anderen potentiellen Interaktionspartner von xIAP in den Vektor pTAT-HA umklontiert. Anschließend sollten dann HUVEC Zellen mit den rekombinanten Proteinen transduziert werden, um danach eine Co-Immunpräzipitation mit einem HA-Antikörper durchzuführen. Obwohl die Sequenzierung ergab, dass die Klonierung aller vier Gene erfolgreich war, konnte lediglich die rekombinante  $\alpha$ -Enolase hergestellt werden. Warum die anderen drei Proteine auch nach mehreren

Versuchen nicht in *E.coli* exprimiert werden konnten, ist nicht bekannt. Die anschließende Transduktion der Endothelzellen mit NNE-TAT war ebenfalls nicht effizient genug, da das Protein weder mit dem Antikörper gegen den HA-Tag, noch mit dem gegen die  $\alpha$ -Enolase in den Zellen nachgewiesen werden konnte. Es ist daher wahrscheinlich, dass das rekombinante Protein bei der gewählten Aufarbeitung eine Konformation eingenommen hat, die ein Eindringen in die Zellen verhindert hat. Hier müssten noch weitere Bedingungen getestet werden, um diejenige zu finden, bei der die Faltung so erfolgt, dass die Zellen mit dem Protein transduziert werden können. Um zu untersuchen, ob die endogene Enolase mit überexprimiertem xIAP co-präzipitiert werden kann, wurde xIAP mit einem HA-Tag versehen und in T-Rex 293 Zellen überexprimiert.

In der anschließend durchgeführten Co-Immunpräzipitation, konnte endogenes xIAP mit dem transfizierten xIAP-HA co-präzipitiert werden. Damit konnte eine Auto-Dimerisierung von xIAP in diesen Zellen gezeigt werden, die in anderen Zelltypen bereits beschrieben wurde [78]. Daher wurde dieser Ansatz als geeignet erachtet, die Bindung zwischen xIAP und seinen potentiellen Interaktionspartnern zu untersuchen.

Um festzustellen, ob in diesem Versuch auch die endogene  $\alpha$ -Enolase mit xIAP-HA präzipitiert worden war, wurde ein Western-Blot mit dem entsprechenden Antikörper durchgeführt. Hierbei konnte das Protein jedoch nicht im Präzipitat nachgewiesen werden. Unter den gewählten Bedingungen kommt es daher wahrscheinlich nicht zu einer direkten Interaktion zwischen den beiden Proteinen. Ob für eine Bindung möglicherweise Modifikationen der Proteinen notwendig sind, die z.B. erst nach Einleitung der Apoptose stattfinden, muss noch untersucht werden. Dies gilt auch für die anderen drei potentiellen Interaktionspartner von xIAP, xXIP, Tim44 und mAAT, die ebenfalls mit einem HA-Tag versehen in den T-Rex Zellen überexprimiert wurden. In allen drei Fällen konnte das überexprimierte Protein über den Tag präzipitiert werden. Eine Co-Präzipitation von endogenem xIAP konnte jedoch in keinem Fall nachgewiesen werden. Insbesondere bei der mAAT ist es wahrscheinlich, dass die Interaktion nur in apoptotischen Zellen stattfinden kann, da das Protein nur unter diesen Bedingungen aus den Mitochondrien in das Zytoplasma freigesetzt wird, in dem auch xIAP lokalisiert ist.

### **5.3 Tim44 wird nicht aus den Mitochondrien sterbender Zellen ausgeschleust**

Damit xIAP und Tim44 miteinander interagieren können, müssen sie sich im gleichen Zellkompartiment befinden. Da xIAP im Zytoplasma lokalisiert ist, sollte untersucht werden, ob Tim44, wie andere Bindungspartner von xIAP wie z. B. Smac, während der Apoptose aus den Mitochondrien ausgeschleust wird. Das Tim-Proteine aus isolierten Mitochondrien nach einem apoptotischen Stimulus ausgeschleust werden, wie z. B. Timm13b, war bereits bekannt [79]. Da hier festgestellt werden sollte, ob Tim44 unter physiologischen Bedingungen aus den Mitochondrien freigesetzt wird, wurde die Apoptose in Endothelzellen durch Wachstumsfaktorentzug induziert. Hierbei kam es, wie erwartet, nach acht Stunden zu einer deutlichen Freisetzung von Cytochrom C. Eine Ausschleusung von Tim44 konnte allerdings weder unter diesen Bedingungen, noch nach auslösen der Apoptose mit Staurosporin nachgewiesen werden. Somit lagen die beiden Proteine auch nach Einleitung der Apoptose nicht im selben Zellkompartiment vor, was eine zytoplasmatische Interaktion von Tim44 und xIAP unwahrscheinlich macht. Gegen eine Bindung der beiden Proteine spricht auch, dass diese in mit Tim44 transfizierten 293 Zellen durch Co-Immunpräzipitation nicht nachgewiesen werden konnte. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise zellspezifische Modifikationen der beiden Proteine für eine Interaktion erforderlich sind. So ist es z. B. vorstellbar, dass Proteasen, die eventuell benötigt werden, um das IAP Binde-Motiv von Tim44 für eine Bindung zugänglich zu machen nicht in allen Zelltypen exprimiert werden oder dass sie nur unter bestimmten Bedingungen aktiv sind. Auch kann eine Interaktion der beiden Proteine an der Mitochondrienmembran selbst nicht ausgeschlossen werden. Hierfür müsste z. B. untersucht werden, ob xIAP unter bestimmten Bedingungen an die Mitochondrien relokalisiert wird.



## 5.4 Die Expression der $\alpha$ -Enolase nimmt unter Hypoxie zu

Da bisher nur bekannt war, dass die Expression der  $\alpha$ -Enolase bei Hypoxie in Rinder-Endothelzellen reguliert wird, sollte untersucht werden, ob dies auch in Endothelzellen der Fall ist [54]. Daher wurde die Expression dieses Proteins in unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen kultivierten humanen Endothelzellen verglichen. Hierbei konnte insbesondere nach 48 Stunden Hypoxie sowohl bei 1,4 % O<sub>2</sub> und 2,4 % O<sub>2</sub> eine Zunahme der NNE Proteinmenge beobachtet werden. Somit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Expression der  $\alpha$ -Enolase auch in HUVEC unter Hypoxie zunimmt.

Hierbei wird die Expression des Proteins wahrscheinlich über die *hypoxia response elements* reguliert, indem der Transkriptionsfaktor HIF-1 ( *hypoxia-inducible factor 1* ) an diese Region bindet [80, 81]. Unter Hypoxie induziert HIF-1 die Expression einer Reihe von Proteinen darunter auch solche, die pro-apoptotisch wirken [82]. Im Fall der NNE trägt die erhöhte Menge an Protein jedoch zu einem Schutz der Zelle vor Hypoxie bei und somit wahrscheinlich auch zu einem Schutz vor der durch Hypoxie ausgelösten Apoptose.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit zwar keine direkte Interaktion zwischen xIAP und  $\alpha$ -Enolase nachgewiesen werden. Jedoch gibt es eine funktionelle Gemeinsamkeit zwischen den beiden Proteinen, da sie beide zum Schutz der Zelle beitragen. Es besteht die Möglichkeit, dass eine direkte Interaktion dieser Proteine nur unter bestimmten Bedingungen in der Zelle zustande kommt, die bei den bisher durchgeführten Versuchen nicht vorlagen. Daher erscheint es sinnvoll zu untersuchen, ob es z. B. unter Hypoxie oder nach der Induktion von Apoptose zu einer Bindung der beiden Proteine kommt.

## 5.5 Die Überexpression von xXIP schützt die Zellen vor Apoptose

Da in den bisherigen Versuchen eine physische Interaktion von xIAP und xXIP nicht nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen besteht. Daher wurden xXIP-HA überexprimierende T-Rex Zellen zusammen mit Kontrollzellen verschiedenen apoptotischen Stimuli ausgesetzt und anschließend das Ausmaß der Apoptose anhand der Aktivierung von Caspase-3 bestimmt. Hierbei konnte in den T-Rex Zellen durch den mit Hilfe von Homocystein ausgelösten ER-Stress jedoch keine Apoptose induziert werden. Somit kann zu diesem Zeitpunkt keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Überexpression des möglicherweise im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierten xXIP die Zellen vor ER-Stress schützt.

Ganz in Gegensatz dazu konnte mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 in den Zellen sowohl nach 4 Stunden als auch nach 8 Stunden Apoptose induziert werden. Die von MG132 ausgelöste Apoptose wird durch die Aktivierung von JNK1 vermittelt, gleichzeitig aktiviert der Proteasom-Inhibitor jedoch auch Hsp72, welches die JNK-abhängige Apoptose unterdrückt [83]. Bei beiden Zeitpunkten war eine deutliche Reduktion an aktiver Caspase-3 in den xXIP-HA überexprimierenden Zellen nachweisbar. Die Überexpression von xXIP schützt die Zellen somit vor MG132 induzierter Apoptose.

Nach 18 Stunden kam es auch bei der Behandlung mit TNF- $\alpha$ /Cyclohexamid, einem anderen apoptotischen Stimulus für Endothelzellen, zu einer Aktivierung von Caspase-3. Hier konnte in den xXIP-HA überexprimierenden Zellen jedoch keine signifikante Reduktion der Menge an aktiver Caspase-3 festgestellt werden. Demzufolge vermittelt die Überexpression von xXIP nur einen Schutz vor MG132 induzierter und nicht vor TNF- $\alpha$  induzierter Apoptose. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass die durch TNF- $\alpha$  ausgelöste Apoptose über eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen vermittelt wird und JNK nur eines von vielen der daran beteiligten Signalmoleküle ist [84, 85]. Die vorliegenden Ergebnisse weisen somit darauf hin, dass die Überexpression von xXIP die Zellen spezifisch vor der über JNK vermittelten Apoptose schützt. Auf welchem Weg es zu diesem Schutz kommt, muss jedoch erst noch untersucht werden. Da MG132 sowohl JNK als auch Hsp72 aktiviert muss z.B. analysiert werden, ob die Überexpression von xXIP das Gleichgewicht dieser beiden Proteine möglicherweise in Richtung von Hsp72 verschiebt und dadurch die Apoptoserate verringert. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass xXIP einen Einfluss auf die Aktivierung von

JNK haben könnte. Es wird zur Zeit kontrovers diskutiert, ob dessen Aktivierung je nach Stimulus und Zelltyp eine pro- oder antiapoptotische Wirkung in den Zellen hat [86]. Es ist somit vorstellbar, dass die Überexpression von xXIP die Art der Aktivierung von JNK so verändert, dass es nicht mehr pro-apoptotisch sondern anti-apoptotisch wirkt. Daher muss in Zukunft auch untersucht werden, ob xXIP möglicherweise zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt, denn es konnte gezeigt werden, dass dieser Transkriptionsfaktor einen Einfluss darauf hat, ob die Aktivierung von JNK durch TNF- $\alpha$  zur Apoptose führt oder nicht [85]. Möglicherweise ist dies auch bei der Aktivierung von JNK durch MG132 der Fall. Hier könnte eventuell auch xIAP eine Rolle spielen, das bekannterweise an der Signaltransduktion über NF- $\kappa$ B und JNK beteiligt ist [34, 87]. In diesem Zusammenhang muss auch noch untersucht werden, ob eine Co-Überexpression von xXIP und xIAP möglicherweise einen synergistischen Effekt bei der Inhibition der Apoptose hat. Darüber hinaus ist es sehr wichtig, über Immunfluoreszenz oder subzelluläre Fraktionierung festzustellen, in welchem Zellkompartiment xXIP lokalisiert ist, um herauszufinden, ob aufgrund der Lokalisierung eine direkte Interaktion mit xIAP möglich ist. Außerdem würde es hierdurch möglich sein, eine Aussage darüber zu treffen, ob xXIP mit anderen Proteinen interagieren könnte, die ebenfalls an der Regulation der Apoptose beteiligt sind. Sollte sich herausstellen, dass das Protein tatsächlich im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, kämen hierfür vor allem Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie in Frage [68]. Dieser Aspekt wäre besonders interessant, da sich die Hinweise verdichten, dass es neben den beiden bekannten Wegen der Apoptoseinduktion über die Mitochondrien und die Todesrezeptoren einen dritten Weg gibt, der durch das Endoplasmatische Retikulum vermittelt wird [88]. Möglicherweise ist xXIP an diesem Weg beteiligt. Neben der Reduktion der Apoptose kommt es in den xXIP überexprimierenden Zellen bei der Behandlung mit MG132 nach 18 Stunden zu einer deutlichen Akkumulation des Proteins. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die durch die Computeranalyse identifizierte PEST-Sequenz in xXIP funktionell ist und das Protein tatsächlich über den Ubiquitinweg abgebaut wird. Interessanterweise besitzt xIAP eine RING-Domäne, die eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt [89-92]. Möglicherweise ist xXIP ein Substrat von xIAP und es kommt zwischen den beiden Proteinen während der Ubiquitinierung nur zu einer transienten Interaktion. Ob dies der Fall ist, muss in Zukunft z. B. durch *in vitro* Ubiquitinierungs-Assays untersucht werden. Auch unter der Einwirkung von DL-Homozystein kommt es zu einer Zunahme von xXIP-HA, die auf eine Störung der

Proteinprozessierung und Proteinsekretion durch Homozystein zurückzuführen ist [93]. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Identifizierung von xXIP als Apoptose regulierendes Protein ein weites Feld zur Charakterisierung seiner biologischen Funktionen *in vitro* und *in vivo* eröffnet

## 6 Zusammenfassung

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein wichtiger Prozess im Organismus. Er ist sowohl an der embryonalen Entwicklung als auch an der Entstehung von Krankheiten, wie z. B. der Atherosklerose beteiligt. Bei der Regulation dieses Prozesses spielen unter anderem die IAPs eine wichtige Rolle, indem sie die apoptotischen Caspasen inhibieren und somit die Apoptose verhindern. Eines der wichtigsten Mitglieder dieser Proteinfamilie ist xIAP, das nicht nur als Apoptose-Inhibitor wirkt, sondern auch an der Signaltransduktion und der Zellzyklusregulation beteiligt ist.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Interaktionspartner von xIAP zu identifizieren und ihre Funktion in der Zelle zu untersuchen, um weitere Einblicke in die Prozesse zu erhalten, an denen dieses Protein beteiligt ist. Hierfür wurden mehrere Two-Hybrid-Screens durchgeführt, in denen insgesamt sieben neue potentielle Interaktionspartner identifiziert werden konnten. Darunter waren mit Tim44, DNA-Polymerase  $\gamma$  und mAAT drei Proteine, die, wie auch einige bereits bekannte Interaktionspartner von xIAP, in den Mitochondrien lokalisiert sind. Unter den weiteren vier möglichen Bindungspartnern war darüber hinaus ein bis dahin noch nicht charakterisiertes Protein, das wie xIAP auf dem X-Chromosom lokalisiert ist und als xXIP bezeichnet wurde. Es wurde in den Two-Hybrid-Screen's gleich dreimal als potentieller Interaktionspartner identifiziert, dies ist ein sehr starker Hinweis auf eine Interaktion der beiden Proteine. Bei den Untersuchungen zeigte sich eine funktionelle Beziehung zwischen den beiden Molekülen, denn auch xXIP zeigte eine antiapoptotische Wirkung, da es die in 293 Zellen durch Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 ausgelöste Apoptose reduzierte. Die weitere Charakterisierung dieses Proteins ergab darüber hinaus, dass es sich um ein Transmembranprotein handelt, das wahrscheinlich im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und über den Ubiquitinweg abgebaut wird. Gemeinsamkeiten mit anderen anti-apoptotischen Proteinen konnten bislang nicht gefunden werden. Somit konnte über den Two-Hybrid-Screen ein neues anti-apoptotisches Protein identifiziert werden, dessen genaue Funktionen in der Zelle in Zukunft noch genauer untersucht werden müssen.

## 7 Literatur

1. Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-54.
2. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
3. Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* **146**, 3-15.
4. Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-62.
5. Madeo, F., Frohlich, E., and Frohlich, K. U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* **139**, 729-34.
6. Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., and Frohlich, K. U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **145**, 757-67.
7. Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Frohlich, K. U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S., and Madeo, F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **164**, 501-7.
8. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171.
9. 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.
10. Crook, N. E., Clem, R. J., and Miller, L. K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* **67**, 2168-74.
11. Salvesen, G. S., and Duckett, C. S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 401-10.
12. Yang, Y. L., and Li, X. M. (2000). The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* **10**, 169-77.

13. Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M., and Ashwell, J. D. (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* **288**, 874-7.
14. Fraser, A. G., James, C., Evan, G. I., and Hengartner, M. O. (1999). *Caenorhabditis elegans* inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Curr Biol* **9**, 292-301.
15. Li, F., Flanary, P. L., Altieri, D. C., and Dohlman, H. G. (2000). Cell division regulation by BIR1, a member of the inhibitor of apoptosis family in yeast. *J Biol Chem* **275**, 6707-11.
16. Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G., and Altieri, D. C. (1998). Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* **273**, 11177-82.
17. Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* **3**, 917-21.
18. Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* **396**, 580-4.
19. 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**, 7787-90.
20. 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**, 5242-51.
21. Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E. S., and Shi, Y. (2001). Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* **104**, 769-80.
22. Riedl, S. J., Renatus, M., Schwarzenbacher, R., Zhou, Q., Sun, C., Fesik, S. W., Liddington, R. C., and Salvesen, G. S. (2001). Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* **104**, 791-800.
23. Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Nakata, K., Reed, J. C., and Takahashi, R. (2001). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem* **276**, 27058-63.

24. Scott, F. L., Denault, J. B., Riedl, S. J., Shin, H., Renatus, M., and Salvesen, G. S. (2005). XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *Embo J* **24**, 645-55.
25. Shiozaki, E. N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Fairman, R., and Shi, Y. (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* **11**, 519-27.
26. 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**, 112-6.
27. Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53.
28. 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**, 613-21.
29. Huang, Y., Rich, R. L., Myszka, D. G., and Wu, H. (2003). Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. *J Biol Chem* **278**, 49517-22.
30. 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**, 432-8.
31. Martins, L. M., Turk, B. E., Cowling, V., Borg, A., Jarrell, E. T., Cantley, L. C., and Downward, J. (2003). Binding specificity and regulation of the serine protease and PDZ domains of HtrA2/Omi. *J Biol Chem* **278**, 49417-27.
32. Fong, W. G., Liston, P., Rajcan-Separovic, E., St Jean, M., Craig, C., and Korneluk, R. G. (2000). Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics* **70**, 113-22.
33. Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H., and Matsumoto, K. (1999). XIAP, a cellular member of



- the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *Embo J* **18**, 179-87.
34. Sanna, M. G., da Silva Correia, J., Ducrey, O., Lee, J., Nomoto, K., Schrantz, N., Deveraux, Q. L., and Ulevitch, R. J. (2002). IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol Cell Biol* **22**, 1754-66.
  35. Levkau, B., Garton, K. J., Ferri, N., Kloke, K., Nofer, J. R., Baba, H. A., Raines, E. W., and Breithardt, G. (2001). xIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappaB : new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. *Circ Res* **88**, 282-90.
  36. Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., and Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9578-82.
  37. Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. J., and Karin, M. (1997). Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* **17**, 3094-102.
  38. Aronheim, A. (2000). Protein recruitment systems for the analysis of protein-protein interactions. *Biochem Pharmacol* **60**, 1009-13.
  39. Aronheim, A. (2001). Membrane recruitment systems for analysis of protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* **177**, 319-28.
  40. Bauer, M. F., Gempel, K., Reichert, A. S., Rappold, G. A., Lichtner, P., Gerbitz, K. D., Neupert, W., Brunner, M., and Hofmann, S. (1999). Genetic and structural characterization of the human mitochondrial inner membrane translocase. *J Mol Biol* **289**, 69-82.
  41. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.
  42. Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355-60.
  43. (BLAST). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

44. Stadler, J., Bentz, B. G., Harbrecht, B. G., Di Silvio, M., Curran, R. D., Billiar, T. R., Hoffman, R. A., and Simmons, R. L. (1992). Tumor necrosis factor alpha inhibits hepatocyte mitochondrial respiration. *Ann Surg* **216**, 539-46.
45. (PredictProtein). <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>.
46. (TMHMM Server). <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>.
47. Yang, X., Matern, H. T., and Gallwitz, D. (1998). Specific binding to a novel and essential Golgi membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases Ypt1p and Ypt31p. *Embo J* **17**, 4954-63.
48. Calero, M., Winand, N. J., and Collins, R. N. (2002). Identification of the novel proteins Yip4p and Yip5p as Rab GTPase interacting factors. *FEBS Lett* **515**, 89-98.
49. (PSORT). <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>.
50. (PESTfind). <http://www.at.embnnet.org/embnnet/tools/bio/PESTfind/>.
51. Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A., and Dowdy, S. F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med* **4**, 1449-52.
52. Becker-Hapak, M., McAllister, S. S., and Dowdy, S. F. (2001). TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods* **24**, 247-56.
53. van Loo, G., Saelens, X., van Gorp, M., MacFarlane, M., Martin, S. J., and Vandenabeele, P. (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* **9**, 1031-42.
54. Aaronson, R. M., Graven, K. K., Tucci, M., McDonald, R. J., and Farber, H. W. (1995). Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. *J Biol Chem* **270**, 27752-7.
55. Aronheim, A. (1997). Improved efficiency sos recruitment system: expression of the mammalian GAP reduces isolation of Ras GTPase false positives. *Nucleic Acids Res* **25**, 3373-4.
56. Broder, Y. C., Katz, S., and Aronheim, A. (1998). The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions. *Curr Biol* **8**, 1121-4.
57. Wada, J., and Kanwar, Y. S. (1998). Characterization of mammalian translocase of inner mitochondrial membrane (Tim44) isolated from diabetic newborn mouse kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 144-9.

58. Rehling, P., Wiedemann, N., Pfanner, N., and Truscott, K. N. (2001). The mitochondrial import machinery for preproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **36**, 291-336.
59. Moro, F., Okamoto, K., Donzeau, M., Neupert, W., and Brunner, M. (2002). Mitochondrial protein import: molecular basis of the ATP-dependent interaction of MtHsp70 with Tim44. *J Biol Chem* **277**, 6874-80.
60. Liu, Q., D'Silva, P., Walter, W., Marszalek, J., and Craig, E. A. (2003). Regulated cycling of mitochondrial Hsp70 at the protein import channel. *Science* **300**, 139-41.
61. Kipp, R. A., Case, M. A., Wist, A. D., Cresson, C. M., Carrell, M., Griner, E., Wiita, A., Albinia, P. A., Chai, J., Shi, Y., Semmelhack, M. F., and McLendon, G. L. (2002). Molecular targeting of inhibitor of apoptosis proteins based on small molecule mimics of natural binding partners. *Biochemistry* **41**, 7344-9.
62. Ropp, P. A., and Copeland, W. C. (1996). Cloning and characterization of the human mitochondrial DNA polymerase, DNA polymerase gamma. *Genomics* **36**, 449-58.
63. Koller, B. H., Geraghty, D. E., Shimizu, Y., DeMars, R., and Orr, H. T. (1988). HLA-E. A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J Immunol* **141**, 897-904.
64. Wada, H., Matsumoto, N., Maenaka, K., Suzuki, K., and Yamamoto, K. (2004). The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *Eur J Immunol* **34**, 81-90.
65. Patterson, S. D., Spahr, C. S., Daugas, E., Susin, S. A., Irinopoulou, T., Koehler, C., and Kroemer, G. (2000). Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ* **7**, 137-44.
66. Isola, L. M., Zhou, S. L., Kiang, C. L., Stump, D. D., Bradbury, M. W., and Berk, P. D. (1995). 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9866-70.
67. Cechetto, J. D., Sadacharan, S. K., Berk, P. D., and Gupta, R. S. (2002). Immunogold localization of mitochondrial aspartate aminotransferase in mitochondria and on the cell surface in normal rat tissues. *Histol Histopathol* **17**, 353-64.

- 
68. Schinzel, A., Kaufmann, T., and Borner, C. (2004). Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. *Biochim Biophys Acta* **1644**, 95-105.
  69. Annis, M. G., Yethon, J. A., Leber, B., and Andrews, D. W. (2004). There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1644**, 115-23.
  70. Szegezdi, E., Fitzgerald, U., and Samali, A. (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci* **1010**, 186-94.
  71. Morishima, N., Nakanishi, K., Tsuchiya, K., Shibata, T., and Seiwa, E. (2004). Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 50375-81.
  72. Hitomi, J., Katayama, T., Taniguchi, M., Honda, A., Imaizumi, K., and Tohyama, M. (2004). Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neurosci Lett* **357**, 127-30.
  73. Lamkanfi, M., Kalai, M., and Vandenabeele, P. (2004). Caspase-12: an overview. *Cell Death Differ* **11**, 365-8.
  74. Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y., and Tohyama, M. (2004). Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* **165**, 347-56.
  75. Liu, K., and Abrams, S. I. (2003). Coordinate regulation of IFN consensus sequence-binding protein and caspase-1 in the sensitization of human colon carcinoma cells to Fas-mediated apoptosis by IFN-gamma. *J Immunol* **170**, 6329-37.
  76. Rowe, S. J., Allen, L., Ridger, V. C., Hellewell, P. G., and Whyte, M. K. (2002). Caspase-1-deficient mice have delayed neutrophil apoptosis and a prolonged inflammatory response to lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J Immunol* **169**, 6401-7.
  77. Aiba-Masago, S., Masago, R., Vela-Roch, N., Talal, N., and Dang, H. (2001). Fas-mediated apoptosis in a rat acinar cell line is dependent on caspase-1 activity. *Cell Signal* **13**, 617-24.

- 
78. Silke, J., Hawkins, C. J., Ekert, P. G., Chew, J., Day, C. L., Pakusch, M., Verhagen, A. M., and Vaux, D. L. (2002). The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites. *J Cell Biol* **157**, 115-24.
79. Van Loo, G., Demol, H., van Gurp, M., Hoorelbeke, B., Schotte, P., Beyaert, R., Zhivotovsky, B., Gevaert, K., Declercq, W., Vandekerckhove, J., and Vandenabeele, P. (2002). A matrix-assisted laser desorption ionization post-source decay (MALDI-PSD) analysis of proteins released from isolated liver mitochondria treated with recombinant truncated Bid. *Cell Death Differ* **9**, 301-8.
80. Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M., and Wang, G. L. (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **269**, 23757-63.
81. Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P., and Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **271**, 32529-37.
82. Greijer, A. E., and van der Wall, E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* **57**, 1009-14.
83. Meriin, A. B., Gabai, V. L., Yaglom, J., Shifrin, V. I., and Sherman, M. Y. (1998). Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem* **273**, 6373-9.
84. Ding, W. X., and Yin, X. M. (2004). Dissection of the multiple mechanisms of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* **8**, 445-54.
85. Varfolomeev, E. E., and Ashkenazi, A. (2004). Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* **116**, 491-7.
86. Lin, A. (2003). Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays* **25**, 17-24.
87. Lewis, J., Burstein, E., Reffey, S. B., Bratton, S. B., Roberts, A. B., and Duckett, C. S. (2004). Uncoupling of the signaling and caspase-inhibitory properties of X-linked inhibitor of apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 9023-9.
88. Rao, R. V., Ellerby, H. M., and Bredesen, D. E. (2004). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* **11**, 372-80.

- 
89. MacFarlane, M., Merrison, W., Bratton, S. B., and Cohen, G. M. (2002). Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem* **277**, 36611-6.
  90. Shin, H., Okada, K., Wilkinson, J. C., Solomon, K. M., Duckett, C. S., Reed, J. C., and Salvesen, G. S. (2003). Identification of ubiquitination sites on the X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Biochem J* **373**, 965-71.
  91. Creagh, E. M., Murphy, B. M., Duriez, P. J., Duckett, C. S., and Martin, S. J. (2004). Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* **279**, 26906-14.
  92. Morizane, Y., Honda, R., Fukami, K., and Yasuda, H. (2005). X-Linked Inhibitor of Apoptosis Functions as Ubiquitin Ligase toward Mature Caspase-9 and Cytosolic Smac/DIABLO. *J Biochem (Tokyo)* **137**, 125-32.
  93. Lentz, S. R., and Sadler, J. E. (1993). Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. *Blood* **81**, 683-9.

## **8 Erklärung**

Münster, 14. Juli 2005

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits als Prüfungsarbeit vorgelegen hat.

Solveig Nicole Söding

## 9 Danksagung

Insbesondere möchte ich Herrn Professor Dr. Bodo Levkau dafür danken, dass er es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seinem Labor durchzuführen. Ich bedanke mich hier besonders für die stetige Anregung und Geduld.

Herrn Professor Dr. Walter Stöcker danke ich für die Übernahme der externen Betreuung und Vertretung vor dem Fachbereich Biologie.

Ein besonderer Dank geht an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe, die meine emotionale Vielseitigkeit die ganze Zeit gut ertragen haben. Ohne Euch hätte vieles nicht so gut geklappt. Kerstin Abou Hamed: Vielen Dank für die Hilfe beim chackachacka, das wäre sonst wohl eine ewig lange Nacht geworden. Karin von Wnuck Lipinski möchte ich für die gemeinsam durchstandene Promotionszeit mit vielen hilfreichen Diskussion und Anregungen danken. Ein dickes Dankeschön auch an Sina Mersmann für „noch mal“ vier Gele und Susann Lucke für das Korrekturlesen. Ich hoffe, die Arbeit ist jetzt fast fehlerfrei und „im Block“. Vanessa und Petra danke ich für ihre gute Laune und ihre Hilfsbereitschaft. Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Kirsten Leineweber für viele gute praktische Tipps bedanken, die mir meine Arbeit besonders in der Endphase erleichtert haben. Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen ehemaligen Kollegen am Institut für Arterioskleroseforschung in Münster und den Flurkollegen am Universitätsklinikum Essen.

Mein Dank gilt auch der Dr. H.-H. Deichmann-Stiftung, die es mir ermöglicht hat, meine Arbeit in Essen am Institut für Pathophysiologie zu beenden.

Danke auch an alle Freunde und Bekannte, die mich in meiner Promotionszeit moralisch unterstützt haben, insbesondere Iris, Angela und Gabi. Dieser Dank geht auch an Frank, der mir nicht nur bei der Umsetzung der Plasmiddatenbank zur Seite gestanden hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben, so lange ich denken kann. Es ist gut, dass es Euch gibt.





