

**Untersuchungen zur funktionellen
Charakterisierung von
regulatory-protein T-lymphocyte-1 (rpt-1, Trim 30)**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Kerstin Späth
aus Essen

Düsseldorf
2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent(in): Prof. Dr. Josef Abel

Korreferent(in): Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

Tag(e) der mündlichen Prüfung: 28.1. 2005

Inhalt**I****Inhalt.....****Abkürzungsverzeichnis..... VII**

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Yeast Two Hybrid System.....	3
1.2	Apoptose.....	5
1.2.1	Apoptosemechanismen.....	6
1.3	Zielsetzung und Fragestellung.....	9
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Material.....	10
2.1.1	Laborchemikalien.....	10
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	10
2.1.3	Antikörper.....	12
2.1.4	Plasmide.....	12
2.1.4.1	Plasmide für das Two Hybrid System.....	12
2.1.4.2	Plasmide für die <i>In vitro</i> Translation.....	13
2.1.4.3	Plasmide für die Transfektion.....	14
2.1.5	Lösungen für die Hefetransformation.....	14
2.1.6	Lösungen für die Proteinextraktion aus Hefen.....	14
2.1.7	Kits.....	15
2.1.8	Bakterien und Hefestämme.....	16
2.1.8.1	Bakterienstämme.....	16
2.1.8.2	Hefestamm.....	16
2.1.9	Bakterien und Hefeanzucht.....	17
2.1.9.1	Anzucht von <i>Epicurian Coli</i>	17
2.1.10	Zellkultur.....	20

Inhalt	II
2.1.10.1	Medien für die Zellkultur..... 20
2.1.10.2	Zelllinien..... 21
2.2	Methoden..... 22
2.2.1	Methoden im Rahmen des Two Hybrid Systems..... 22
2.2.1.1	Klonierung von rpt-1 in den Bait Vektor pGBKT7..... 24
2.2.1.2	Amplifizierung der Kontrollvektoren..... 26
2.2.1.2.1	Kontrollvektoren..... 26
2.2.1.3	Amplifizierung der Mouse Liver Matchmaker cDNA-Bank..... 27
2.2.1.3.1	cDNA-Bank..... 27
2.2.1.3.2	Amplifizierung..... 28
2.2.1.4	Test auf unspezifische Aktivierung der Reportergene durch Transformation des Hefestamms <i>AH109</i> nach der Lithiumacetat-Methode..... 28
2.2.1.5	Test auf rekombinante Proteinexpression von rpt-1 in Hefen 29
2.2.1.5.1	Proteinextraktion aus Hefen..... 29
2.2.1.5.2	Anreicherung spezifischer Proteine durch Immunpräzipitation..... 30
2.2.1.6	Transformation des „Bait-Konstrukts“ pGBKT7-rpt-1 in den Hefestamm <i>AH109</i> 30
2.2.1.7	Verifizierung der putativen Interaktionsklone im Two-Hybrid-System..... 31
2.2.1.7.1	Retransformation..... 32
2.2.1.7.2	Plasmidisolierung aus Hefen..... 32
2.2.1.7.3	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA aus Hefen..... 32
2.2.1.7.4	Kontrolle der Protein-Protein Interaktion in Hefen..... 32
2.2.1.7.4.1	Sequenzierung von Plasmid-DNA..... 33
2.2.1.7.5	Einfügen des T7-Promoters mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die <i>In vitro</i> Transkription/Translation..... 34
2.2.2	Allgemeiner Methodenteil..... 36
2.2.2.1	Molekularbiologische Methoden..... 36
2.2.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien..... 36
2.2.2.1.2	Klonierungstechniken und Agarosegelelektrophorese..... 36
2.2.2.1.3	<i>In vitro</i> Transkription/ <i>In vitro</i> Translation..... 36

2.2.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	37
2.2.2.2.1	Proteinbestimmung.....	37
2.2.2.2.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen.....	37
2.2.2.3	Immunologische Methoden.....	37
2.2.2.3.1	Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen (Western Blot) mit einem modifizierten Verfahren nach Michov (1995).....	37
2.2.2.3.2	Immunologischer Nachweis elektrophoretisch getrennter Proteine.....	39
2.2.2.3.3	Aufreinigung des rabbit-Anti Mouse rpt-1-Antikörpers.....	39
2.2.2.3.4	<i>In-Vitro</i> Co-Immunopräzipitation.....	40
2.2.2.3.5	Immunhistochemischer Nachweis von rpt-1 in Hela und HepG2 Zellen.....	40
2.2.2.4	Enzymatische Analysen.....	41
2.2.2.4.1	Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Mikroassay (Zytotoxizitätstest).....	41
2.2.2.5	Zellkultur.....	42
2.2.2.5.1	Kultivierung von Hela Zellen.....	42
2.2.2.5.2	Kultivierung von HepG2 Zellen.....	43
2.2.2.5.3	Kultivierung von Hacat Zellen.....	43
2.2.2.5.4	Kultivierung von Cos-7 Zellen.....	43
2.2.2.5.5	Transfektion der Zelllinien Hela, HepG2 und Cos-7.....	44
2.2.2.6	Fluoreszenzmikroskopie.....	45
2.2.2.7	Apoptose-Tests.....	45
2.2.2.7.1	Caspase 3-Assay.....	45
2.2.2.7.2	Apoptose Tunel Assay.....	46
2.2.2.7.3	Apoptoseinduktion.....	46
2.2.2.7.3.1	Actinomycin D.....	46
2.2.2.7.3.2	Anti-Fas-Antikörper.....	48
2.2.2.7.3.3	UVB-Bestrahlung.....	48

3.	Ergebnisse.....	49
3.1	Klonierung von rpt-1.....	49
3.2	Test auf rekombinante Proteinexpression von rpt-1 in Hefen.....	49
3.3	cDNA-Bank Screen.....	49
3.4	<i>In vitro</i> Transkription/ <i>In vitro</i> Translation.....	53
3.5	Co-Immunopräzipitation von <i>In vitro</i> translatierten Proteinen.....	55
3.6	Transfektion eukaryotischer Zellkulturen mit rpt-1 Expressionskonstrukten.....	60
3.6.1	Transfektion von Hela-HepG2 und Cos-7 Zellen mit pEGFP-rpt-1.....	60
3.7	Messung der LDH-Aktivität in rpt-1 transfizierten Hela Zellen.....	68
3.7.1	Einfluss des pCMV-rpt-1-Konstruktes auf die LDH-Aktivität von Hela Zellen.....	69
3.7.2	LDH-Messung bei rpt-1 transfizierten HepG2 und Cos-7 Zellen.....	70
3.8	Untersuchungen zur Apoptose in rpt-1 transfizierten Zellen.....	71
3.8.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Apoptose rpt-1 transfizierter Hela Zellen.....	71
3.8.2	Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Apoptose in pEGFP-rpt1 transfizierten HepG2 Zellen.....	75
3.9	Nachweis der Apoptose mit dem TUNEL Assay in rpt-1 transfizierten Hela und HepG2 Zellen.....	77
3.9.1	Apoptose TUNEL Assay mit rpt-1 transfizierten Hela Zellen.....	77
3.9.2	Apoptose TUNEL Assay mit rpt-1 transfizierten HepG2 Zellen.....	78
3.10	Caspase 3 Assay mit rpt-1 transfizierten Zellen.....	81
3.10.1	Messung der Caspase3 Aktivität in rpt-1 transfizierten Hela Zellen.....	81
3.10.2	Messung der Caspase3 Aktivität in rpt-1 transfizierten HepG2 Zellen.....	82
3.11.	Untersuchungen zur Lokalisation von rpt-1 in Hela- und HepG2 Zellen.....	85
3.11.1	Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von rpt-1 in Hela- und HepG2 Zellen.....	85
3.12	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Expression von rpt-1 in Hela-, HepG2- und Cos-7 Zellen.....	90
3.13	Induktion der Apoptose und rpt-1 Expression.....	91
3.13.1	Apoptoseinduktion durch Actinomycin D in Hela und HepG2 Zellen.....	92
3.13.1.1	Apoptoseinduktion durch Actinomycin D in Hela Zellen.....	92
3.13.1.2	Apoptoseinduktion durch Actinomycin D in HepG2 Zellen.....	93

Inhalt	V
3.13.2	Apoptoseinduktion durch Anti-Fas AK..... 95
3.13.2.1	Apoptoseinduktion in Hela Zellen durch Anti-Fas AK..... 95
3.13.2.2	Apoptoseinduktion in HepG2 Zellen durch Anti-Fas AK..... 96
3.13.3	Induktion von Apoptose durch UVB-Bestrahlung..... 98
3.13.3.1	Induktion von Apoptose durch UVB-Bestrahlung in HaCat Zellen..... 98
3.13.3.2	Induktion von Apoptose durch UVB-Bestrahlung in Hela- und HepG2 Zellen..... 100
4.	Diskussion..... 103
4.1	Two Hybrid Screen der Mouse Liver Matchmaker cDNA-Bank..... 103
4.1.1	“Falsch Positive” Klone im Two-Hybrid System..... 103
4.1.2	Funktion der Proteine eif3, Bif-1 und Katalase..... 106
4.1.2.1	Katalase..... 106
4.1.2.2	Translation initiation factor 3, subunit 5 (eif3)..... 108
4.1.2.3	Bax interacting factor-1 (Bif-1)..... 110
4.2	Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von rpt-1..... 111
4.2.1	Lokalisation von rpt-1 in transfizierten Hela, HepG2- und Cos-7 Zellen..... 111
4.3	Mechanismen der Apoptose..... 113
4.4	rpt-1 Expression und Apoptose..... 117
4.5	Apoptoseinduktion und rpt-1 Expression..... 118
4.6	Hypothese zur potentiellen Funktion von rpt-1..... 121
5	Zusammenfassung..... 125
6.	Literatur..... 126
7.	Anhang..... 138
	Danksagung..... 145
	Eidesstattliche Erklärung..... 146
	Lebenslauf..... 147

Abkürzungen

Abb	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
AIF	Apoptosis inducing factor
AK	Antikörper
AMD	Actinomycin D
Amp	Ampicillin
AP	nukleärer Transkriptionsfaktor
Apaf-2	Apoptotic protease activating factor
Apo-1	Apoptosis Antigen-1
Bak	Bcl-2 antagonist Killer-1
Bax	Bcl-2 associated X-Protein
BD	DNA-Bindedomäne
BID	Bcl-2 interacting domain
Bif-1	Bax-interacting factor-1
bp	Basenpaare
CD95	Cluster of differentiation 95
cDNA	<i>complementary</i> DNA
cfu	Colonie forming units
Ci	Curie (1Ci = 3,7x 10 ¹⁰ Bequerel)
Cpp32	Caspase 3
CTL	Fragmentin
DAPK	Death associated Protein Kinase
DD	Death Domain
DED	Death effector domain
DIABLO	Direct IAP-binding Protein with low pI
DISCs	Death inducing signalling complexes
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitrol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat

eif3	Translation initiation factor 3
Endo G	Endonuklease G
FADD	Fas associated Protein with death domain
FAF-1	Fas Associated Protein Faktor
Fas	Siehe Apo-1
FCS	fötales Kälberserum
FLICE	FADD-like interleukin 1 β -converting enzyme
FLIP	Flice-like inhibitory Protein
Gal	Galaktosidase
GFP	Green fluorescence Protein
HA	Hämagglutinin
His	Histidin
ICE	Interleukin 1 β -converting Enzyme
Ig	Immunglobulin
IL2R α	Interleukin 2 Rezeptor α
Kan	Kanamycin
kD	Kilodalton
LB-Medium	Luria Bertani Medium
LDH	Lactat Dehydrogenase
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
MAIR	Trim 35
MCS	Multiple cloning site
Mel1	α -Galactosidase Gen
MOPs	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
OD	optische Dichte
P	Penicillin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p53	Protein 53
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol

PML	Promyelocytic leukemia Protein
PS	Phosphatidylserin
RBCC	Ring B-Box Coiled-Coil Motif
RFP	Ret Finger Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute
rpt-1	Regulatory protein T-lymphocyte
RT	Raumtemperatur
S	Streptomycin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SMAC	Second mitochondria derived activator of caspases
Staf 50	Stimulated Trans-Acting Factor 50
T-Antigen	Simian Virus 40 large T-antigen
TCDD	Tetrachlordibenzo-p-dioxin
Tif-1	Transcriptional Intermediary factor 1
TNF	Tumor necrosis factor
TRIM	tripartite motif
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
UAS	Upstream Aktivierungssequenz
YPD	Yeast Peptone Dextrose
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3 indolyl- β -D

1. Einleitung

Das regulatory protein T-lymphocyte (rpt-1) ist ein Zink-Ring-Finger Protein, das erstmals 1989 von Patarca beschrieben wurde (Patarca *et al.*, 1989). Bislang ist seine Expression nur bei Mäusen beschrieben, wobei die mRNA in Thymus, Milz und peripheren Blutlymphozyten gefunden wurde. Patarca beschrieb rpt-1 als ein selektiv in ruhenden CD4⁺ T-Zellen exprimiertes und nukleär lokalisiertes Protein (Patarca *et al.*, 1988, 1989). Es wurde vermutet, dass rpt-1 eine wichtige Rolle in der CD4⁺ T-Zell vermittelten Immunantwort spielt, da rpt-1 die Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (IL-2R α) kontrolliert. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in Thymus und Milz TCDD-behandelter Mäuse, eine Erhöhung der rpt-1 mRNA mit der Verminderung der IL-2R α Expression einhergeht (Donat 1998). Eine Niederregulierung von rpt-1 wird als Startsignal für die klonale Expansion von T-Lymphozyten interpretiert. Die Interaktion zwischen IL-2 und seinem Rezeptor spielt eine große Rolle bei der Aktivierung von peripheren Blut T-Lymphozyten. Dabei bestimmt die Stärke einer zellulären Immunantwort hauptsächlich die IL-2 Menge, die als Antwort auf einen bestimmten Stimulus gebildet wird. Die Fähigkeit von Lymphozyten und anderen Zellen eine IL-2 Antwort zu zeigen, hängt von der Expression des IL-2 Rezeptors ab. Der IL-2 Rezeptor ist ein Komplex aus IL-2 R α , IL-2R β und IL-2R γ . Die β - und γ -Ketten werden konstitutiv exprimiert, während die IL-2R α Expression durch eine Reihe von Stimuli aktiviert werden kann, wie zum Beispiel IL-1 und IL-2 (Minami *et al.*, 1993). Über welchen Mechanismus rpt-1 die Expression der IL-2R α Kette modulieren kann, ist noch nicht geklärt. Rpt-1 besitzt keine DNA-Bindedomäne und kann daher nicht direkt die Transkription modulieren. Möglicherweise existiert ein Interaktionspartner von rpt-1, der für einen solchen Mechanismus wichtig sein könnte.

Die genomische Struktur von rpt-1 ist noch nicht aufgeklärt, bislang bekannt ist nur die cDNA-Sequenz (Genbank Acc. No: NP_033125), die für eine Proteinkette aus 353 Aminosäuren codiert. Das Molekulargewicht von rpt-1 liegt bei ca. 58 kDa.

In der 3'-Region des Gens kommen mehrere Silencersequenzen vor, die AP-1-Motive enthalten (Patarca *et al.*, 1989).

Man hat festgestellt, dass die cDNA Sequenz von rpt-1 eine hohe Identität zu dem Staf-50 Gen des Menschen hat (Tissot und Mechti, 1995). Die Begründung für die hohe Identität dieser beiden Gene lieferten die Untersuchungen von Reymond und Mitarbeitern (Reymond *et al.* 2001). Demnach ist rpt-1 ebenso wie Staf 50 ein Mitglied der Trim- Familie (auch

RBCC-Familie), die sich dadurch auszeichnet, dass die Mitglieder dieser Familie das Tripartite Motiv gemeinsam haben. Dies setzt sich zusammen aus drei zinkbindenden Domänen, einem Ring (R), einer B-Box Typ 1 (B1) gefolgt von einer Coiled-Coil Region (Reddy et al, 1992; Borden, 1998). Gene, die dieser Familie angehören, sind an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt. Dies sind zum Beispiel Zellentwicklung und Wachstum oder verschiedene humane Erkrankungen wie Zwergwuchs (Mulberry nanism), Opitz oder GBBB Syndrom (Stoffwechselerkrankung der Cholesterin Biosynthese) und Mediteranem Fieber (Reymond *et al.*, 2001). Andere können oncogene Wirkung entwickeln, wie z. B. Promyelocytic Leukemia Protein (PML), Ret Finger Protein (RFP) und Transcriptional Intermediary factor 1 (Tif-1) (Takahashi *et al.*, 1988, Grignani *et al.*, 1994; Le Douarin *et al.*, 1995).

Außerdem hat man herausgefunden, dass einige Trim-Proteine Apoptose induzieren können bzw. fördernd daran beteiligt sind, wie z. B. Trim 27 (RFP), Trim 35 (MAIR) sowie Trim 19 (PML) (Lee und Peter, 2003; Zhang *et al.*; 2004; Reyes, 2001, Borden, 2000). Für Trim 27 (RFP) ist beschrieben worden, dass es die Apoptose über das RBCC-Motif induziert (Dho und Kwon, 2003).

rpt-1 wird innerhalb der Trim Familie als Trim 30 bezeichnet. Untersuchungen haben gezeigt, dass rpt-1 (Trim 30) im Zytoplasma konzentriert als „cytoplasmatische bodies“ vorkommt und gelegentlich um den Nukleus herum lokalisiert sein kann. Ebenso kann es in Strukturen, die als „Nuclear Bodies“ beschrieben werden, im Kern lokalisiert sein.

Für die meisten Trim Proteine wird angenommen, dass sie Komplexe von hohem molekularen Gewicht bilden, in dem sie homodimerisieren oder multimerisieren. Dies wurde für rpt-1 *in vivo* und *in vitro* beschrieben (Reymond *et al.*, 2001). Die Interaktionen hierbei finden über die Coiled-Coil Region des Proteins statt, was auch andere Trim-Proteine zu potentiellen Interaktionspartnern von rpt-1 machen könnte.

Über rpt-1 selbst ist noch nicht viel bekannt und vieles noch ungeklärt. Da rpt-1 die strukturellen Voraussetzungen für Protein-Protein Interaktionen mitbringt, sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst die Frage geklärt werden, ob putative Interaktionspartner von rpt-1 existieren.

Eine Methode zur Erforschung von Protein-Protein Interaktionen ist das Two-Hybrid System.

1.1 Das Yeast Two-Hybrid System

Mit Hilfe des Two-Hybrid Systems ist es möglich, Protein-Protein Interaktionen *in vivo* zu untersuchen. So kann die Interaktion zweier bekannter Proteine hinsichtlich ihrer Affinität und deren Änderung durch gezieltes Einführen von Mutationen untersucht werden (Jaitner *et al.*, 1997). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, neue Interaktionspartner für Proteine zu finden. In diesem Fall wird mit Hilfe eines bekannten Bait (oder Angel-) Proteins eine cDNA-Bank auf mögliche neue Bindungspartner hin untersucht. Dabei geschieht die Interaktion zweier Proteine innerhalb einer Hefezelle. Diese wird veranlasst, beide Proteine zu exprimieren. Im Falle einer Interaktion erlangt die Hefezelle zusätzliche Eigenschaften, wie die Prototrophie der Synthese bestimmter Aminosäuren, wodurch die Interaktion detektiert werden kann (Bartel *et al.*, 1993a).

Der in dieser Arbeit verwendete Hefestamm *AH109* der Gattung *Saccharomyces cerevisiae*, kann die Aminosäuren Adenin, Histidin, Tryptophan und Leucin nicht selber synthetisieren (James *et al.*, 1996). Die Prototrophie der Aminosäuresynthese erlangt er durch die Aufnahme der Kontroll-Expressionsvektoren:

PGBKT7 (Bait-Vektor)	Tryptophansynthese	DNA-Bindedomäne
PGADT7 (Prey-Vektor)	Leucinsynthese	DNA-Aktivierungsdomäne

PGBKT7 ist der DNA-Bindedomäne Expressionsvektor, in den man die bekannte *rpt-1* cDNA als Bait inkloniert. *Saccharomyces cerevisiae AH109* exprimiert dann ein Hybrid aus der DNA Bindedomäne und *rpt-1*. pGADT7 enthält die cDNA eines möglichen Interaktionspartners und exprimiert ein Hybrid aus Aktivierungsdomäne und eines Proteins der eingesetzten Maus Liver cDNA-Bank.

Eine Grundlage des Two-Hybrid Systems ergibt sich aus der Zweidomänenstruktur vieler eukaryotischer Transkriptionsfaktoren. Dadurch können diese in zwei unabhängige, strukturell intakte Domänen gespalten werden. Es handelt sich um eine DNA-bindende Domäne (Bindedomäne, BD) und eine transkriptionsaktivierende Domäne (Aktivierungsdomäne, AD). Jede einzelne Domäne führt nicht zur Initiation der Transkription. Im Two-Hybrid System liegen diese beiden Domänen in zwei verschiedenen Plasmiden.

Für das Finden eines neuen Interaktionspartners wird das Bait-Protein und die zu durchsuchende cDNA-Bank, wie in Abb.1 beschrieben, kloniert. Im Falle einer Interaktion dieser beiden Fusionsproteine gelangen die beiden Domänen des Transkriptionsfaktors in

räumliche Nähe. Daraus resultiert die Transkription der oben beschriebenen Reportergene Ade2, His3 und Mel1 (siehe auch Abb. 1).

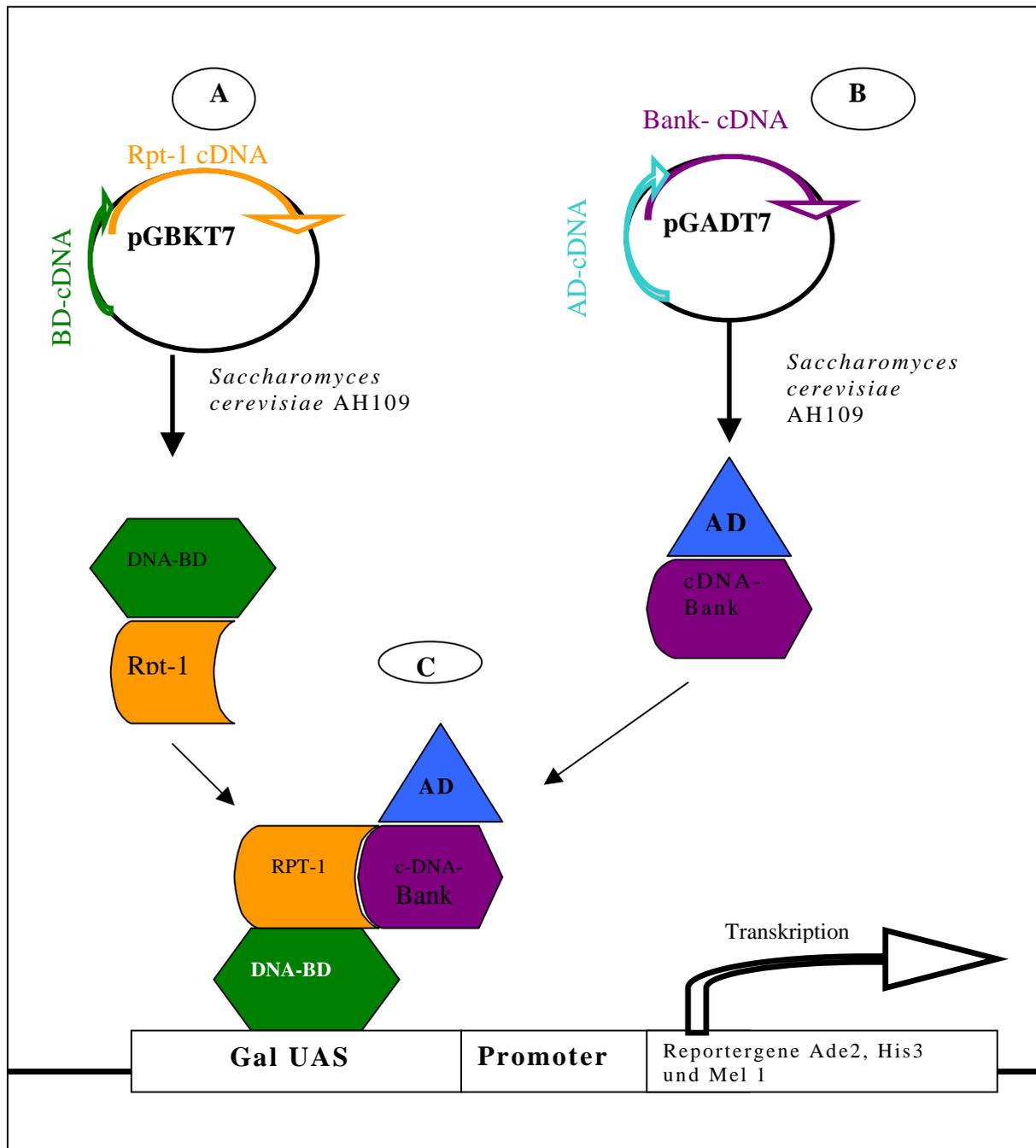


Abb.: 1 Schematische Darstellung des Two-Hybrid Systems. Expression der BD- und AD-Hybride im Hefestamm *AH109*, vom Bait-Vektor pGBKT7-rpt-1(A) bzw. Prey-Vektor pGADT7-Maus Liver cDNA-Bank (B). C.: Das Prinzip des Two-Hybrid Systems. Die DNA-BD besteht aus den Aminosäuren 1-147 des Hefe Gal4 Proteins, welches an die Gal Upstream Aktivierungssequenz (UAS) stromauf der Reportergene Ade2, His3 und Mel1 bindet. Die AD besteht aus den Aminosäuren 768-881 des Gal4 Proteins und fungiert als transkriptioneller Aktivator. Im Falle einer Interaktion der beiden Fusionsproteine, gelangen die Bindedomäne (BD) und die Aktivierungsdomäne (AD) in räumliche Nähe, was in der Transkription der Reportergene resultiert.

Kommt es zur Interaktion der Fusionsproteine, so wird im Hefestamm die Expression des Adenin (Ade2) und Histidin (His3) Gens aktiviert, wodurch diese beiden Aminosäuren synthetisiert werden können. Außerdem wird die Expression von Mel1 aktiviert, woraufhin die Hefe α -Galaktosidase exprimiert. In X-Gal-haltigem Medium wird durch Spaltung dieses Farbstoffs eine Blaufärbung erreicht, welche positive Interaktionspartner detektiert.

Nach der Transfektion in den Hefestamm werden Fusionsproteine aus pGBKT7-DNA-bindender Domäne und Bait Protein exprimiert, entsprechend im Plasmid mit der Transkriptions-aktivierenden Domäne. Hier werden Fusionsproteine aus Aktivierungsdomäne und unterschiedlichen Fragmenten einer cDNA-Bank exprimiert.

1.2 Apoptose

Bei all den bisher bekannten Eigenschaften der Trim Familie, ist die Beteiligung einzelner Mitglieder an der Apoptose aus Forschungssicht die interessanteste Funktion. In Thymus und Milz TCDD-behandelter Mäuse, ist ein stark erhöhter mRNA-Gehalt von *rpt-1* zu verzeichnen (Donat, 1998). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *rpt-1* und der IL-2 Rezeptor sich gegenseitig gegensinnig regulieren. Da IL-2 ein anti-apoptotisch wirksames Protein ist stellt sich die Frage, ob *rpt-1* wie andere Mitglieder der Trim Familie Apoptose fördernd wirken kann.

Die Bezeichnung Apoptose wurde erstmals 1972 beschrieben, um einen strukturell auffälligen Zelltod zu definieren, der für den Zellverlust in lebendem Gewebe verantwortlich war (Kerr *et al.*, 1972). Die herausragenden morphologischen Merkmale dabei waren das Schrumpfen der Zellen, begleitet von transienter, aber ausgeprägter Ausstülpung und Blasenbildung der Membran. Dies führte schließlich zur Aufteilung der Zelle in viele kleine von Membran umgebene Partikel. Die Struktur der Organellen bleibt dabei erhalten, jedoch weist der Kern charakteristische Chromatinkondensation auf. Diese können ringförmig oder in heterochromatischen Bereichen unterschiedlicher Dichte erscheinen.

Änderungen in verschiedenen Oberflächenmolekülen bewirken, dass apoptotische Zellen im Gewebe schnell erkannt und von den Nachbarzellen phagozytiert werden. Dadurch können viele Zellen aus dem Gewebe in relativ kurzer Zeit eliminiert werden. Dieser Phagocytose-Prozess ist verantwortlich für den Zelltod in der Entwicklung, der normalen Gewebe-

fluktuation, Atrophie ausgelöst durch endokrine oder andere exogene Stimuli, negative Selektion im Immunsystem und hat einen wesentlichen Anteil am T-Zell Tod.

Apoptose wird ebenfalls als Folge von Einwirkungen zytotoxischer Substanzen, Sauerstoffmangel und Virusinfektionen ausgelöst, und ist ein Hauptfaktor der Zellkinetik von Tumoren. Viele Krebstherapeutica bewirken eine Apoptoseinitiierung. Der Prozess der Krebsentwicklung ist manchen Fällen abhängig vom Ausbleiben der Apoptose, was das Überleben von Zellen nach einem mutagenem DNA-Fehler ermöglicht. Möglicherweise trägt die Apoptose auch zu chronisch degenerativen Prozessen, wie z. B. die Alzheimer Erkrankung, Parkinson Syndrom und dem Herztod bei (Wyllie, 1998).

1.2.1 Apoptosemechanismen

In den letzten Jahren wurde zunehmend deutlich, dass die meisten physiologischen Zelltode durch Apoptose hervorgerufen werden und dass Änderungen im „Apoptotischen Prozess“ auf eine Vielzahl von malignen Störungen hinauslaufen. Aus diesem Grund ist das Interesse an der Apoptose und ihrer zugrunde liegenden Mechanismen, sowie den beteiligten Genprodukten stark gestiegen. Deshalb hat sich bis heute ein sehr umfangreiches Bild von den Vorgängen und beteiligten Proteinen innerhalb der Apoptose entwickelt, von denen die wichtigsten Schlüsselemente nachfolgend vorgestellt werden sollen.

Todesrezeptor (Death receptor)

Apoptose kann durch viele verschiedene Oberflächenrezeptoren induziert werden. CD95 (Apo-1, Fas) ist ein Rezeptor-Liganden System, welches in mehreren physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, wie z. B. der Selbstregulation des peripheren Lymphoidalen Systems und im CTL (fragmentin-2)-vermittelten Zelltod eine Rolle spielt. Der Fas-Rezeptor initiiert eine Signalkaskade, die caspaseabhängig zum programmierten Zelltod führt (Trauth *et al.*, 1989).

Membranveränderungen

Im frühen Stadium der Apoptose finden Veränderungen an der Zelloberfläche und Membran statt. Eine dieser Veränderungen ist die Translokation des Phosphatidylserin (PS) von der

Innenseite der Membran zur Außenseite, wobei PS auf der äußeren Oberfläche exponiert wird (Vermees *et al.*, 1995).

Protease-Kaskade

Signale, die zur Aktivierung der Familie von intrazellulären Cystein Proteasen führen, den Caspasen (cysteiny-l-aspartate-specific proteinases), spielen eine zentrale Rolle in der Initiierung und Durchführung der Apoptose. Insgesamt 11 verschiedene Caspasen sind bis heute in Säugerzellen identifiziert worden. Die bestcharakterisierte Caspase ist hierbei die Caspase 1 oder ICE (Interleukin 1 β -Converting Enzyme). Die Caspase 3 (Cp32) hingegen ist erforderlich für die Induktion der Apoptose über Effektoren, wie dem Tumor-necrosis factor (TNF) und CD95 (Fas) (Enari *et al.*, 1995).

DNA-Fragmentierung

Das Hauptmerkmal der Apoptose ist die Fragmentierung der genomischen DNA. Diese prelytische DNA-Fragmentierung ist ein irreversibler Prozess, der die Zelle veranlasst zu sterben, noch bevor Änderungen in der Permeabilität der Plasmamembran auftreten. Es konnte gezeigt werden, dass diese Fragmentierung aus der Aktivierung von endogenem Ca²⁺ und Mg²⁺-abhängigen nukleären Endonukleasen resultiert. Dieses Enzym spaltet selektiv DNA zwischen nukleosomalen Einheiten. Dadurch entstehen mono- und oligonukleosomale DNA-Fragmentierungen (Wyllie *et al.*, 1980; Burgoyne *et al.*, 1974; Stach *et al.*, 1979).

Mitochondriale Veränderungen

Während der Apoptose verändert sich die Permeabilität der Mitochondrien. Dadurch werden spezifische Protease-Aktivatoren aus den Mitochondrien entlassen. Speziell die Brüche in der äußeren mitochondrialen Membran bewirken, dass Cytochrom C ins Cytosol ausströmt, gefolgt von der Depolarisierung der inneren mitochondrialen Membran (Liu *et al.*, 1996; Krippner *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997). Dieser Cytochrom C (Apaf-2, Apoptotic protease activating factor) Ausstrom fördert die Caspase Aktivierung durch Bindung an Apaf-1. Dies wiederum aktiviert Apaf-3 (Caspase 9) (Zou *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997).

Durch diese mitochondrialen Veränderungen kann AiF (Apoptosis inducing factor) ins Zytoplasma der Zelle gelangen. AiF hat proteolytische Wirkung und kann, wenn er ins Zytoplasma entlassen wird, eigenständig Apoptose induzieren (Susin *et al.*, 1996).

1.3 Zielsetzung und Fragestellung

Aus der spärlichen Literatur über rpt-1 und dessen strukturelle Verwandtschaft zur Trim-Familie, ergaben sich Hinweise auf eine mögliche Protein-Protein Interaktion zwischen rpt-1 und anderen regulatorischen Proteinen. Da rpt-1 keine DNA-bindende Domäne besitzt, könnte es möglich sein, dass ein Interaktionspartner für die rpt-1 Funktion notwendig ist. Auch die strukturellen Voraussetzungen durch den Zink-Ring-Finger von rpt-1 machen eine Protein-Protein Interaktion wahrscheinlich (Patarca *et al.*, 1989). Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit mittels Two-Hybrid System nach möglichen Interaktionspartnern sondiert werden.

Darüber hinaus wurde das Ziel verfolgt, fundierte Hinweise auf die funktionelle Bedeutung von rpt-1 zu gewinnen, da dieses offensichtlich wichtige Protein in allen Körperzellen exprimiert ist. rpt-1 ist ein Mitglied der Trim-Familie. Mitglieder der Trim Familie sind an verschiedenen Prozessen beteiligt, wie der Zellentwicklung und Wachstum, Auslöser verschiedener Erkrankungen, sie besitzen eine oncogene Wirkung und können Apoptose induzieren. In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob rpt-1 an einem der genannten Prozesse beteiligt ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborchemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten, wenn nicht anders angegeben den Reinheitsgrad p.a. und wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Ø Eurogentec, Belgien
- Ø Merck, Darmstadt
- Ø Roth, Karlsruhe
- Ø Serva, Heidelberg
- Ø SIGMA-Aldrich, Schnelldorf

Die verwendeten Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden bezogen.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Actinomycin D	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Agarose	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
Amplify™Fluorographic Reagent	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
BC-Assay-Reagent	Uptima Interchim, Montflouçon, Frankreich
BioRad Dc Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bradford Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf

BSA	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
Caspase-3-Inhibitor	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
Caspase-3-Substrat (DEVD-pNA)	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
Casamino Acid	Difco, Otto Nordwald, Hamburg
2,4-Dinitrophenylhydrazin	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
Dimethylformamid (DMF)	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
DTT (Dithiothreitol)	Boehringer, Mannheim
DNase I	Boehringer, Mannheim
EDTA	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
Endonukleasen	Boehringer, Mannheim
Glass beads (G-8772)	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
Hering Testes carrier DNA	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
T ₄ -Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Lithium Acetat	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
Multi Mark® Multi colored Standard	Invitrogen, Groningen
Molecular weight Marker	BULK
MOPS Puffer	Carlsbad, Kalifornien, USA
Natriumpyruvat	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
NuPAGE® Novex BIS-TRIS Gele 4%-12%	Invitrogen, Groningen
NuPAGE® Novex TRIS-Glycine Gele 4%-12%	Invitrogen, Groningen
Polyethylen glycol (PEG) 3350	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
Protein A	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Protein G	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Smart Ladder	Eurogentec, Lüttich, Belgien
Tris	Serva, Heidelberg
Taurin	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
Whatman® GF/A glass fiber Filter	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
Whatman® 3MM Filterpapier	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid)	Boehringer, Mannheim

2.1.3 Antikörper

Anti-FAS Antikörper	Boehringer, Mannheim
Anti-Apoptose Inducing Factor (AIF)- rabbit polyclonal IgG-Antikörper	Upstate, Lake Placid, USA
c-myc monoclonal Antikörper; mouse IgG	Clontech, Palo Alto, USA
Goat-anti-rabbit Antikörper (sek. Western-Blot Antikörper) IgG	Boehringer, Mannheim
HA-Tag polyclonal Antikörper rabbit IgG	Clontech, Palo Alto, USA
Rabbit-anti Maus-rpt-1-Antikörper	Eurogentec,Lüttich,Belgien
Rhodamine (TRITC)-conjugated- Goat Anti rabbit IgG (H+L) Antikörper	Dianova, Hamburg

2.1.4 Plasmide2.1.4.1 Plasmide für das Two-Hybrid-System

pGBKT7	7,3 kb Bait-Vektor mit 700bp ADH1-Promoter und Gal4 DNA-Bindedomäne
pGBKT7-rpt-1	pGBKT7-Derivat, mit 1500bp <i>EcoRI/XhoI</i> Fragment der rpt-1 Maus-cDNA
pGBKT7-53	pGBKT7-Derivat mit 318 bp cDNA Fragment für murines p53 Protein, codiert Fusionsprotein aus Gal4-DNA Bindedomäne und p53
pGBKT7-LAM	pGBKT7-Derivat mit 164 bp cDNA-Fragment für humanes Lamin C, codiert für Fusionsprotein aus Gal4- DNA Bindedomäne und humanem Lamin C
pGADT7	8 kb Prey-Vektor mit der Gal4 Aktivierungsdomäne

pGADT7-T	pGADT7-Derivat, mit SV40 large T-Antigen (84708), codiert Fusionsprotein aus Aktivierungsdomäne und SV40 large T-Antigen
pACT2	8,1 kb großes pACT-1-Derivat, Bankvektor mit der Gal4 Aktivierungsdomäne
pACT2-mouse-liver cDNA-Bank	pACT2-Derivat mit <i>XhoI/EcoRI</i> Mouse Liver cDNA-Bank (2.2.3.1)
pCL 1	Ycp50 Derivat Wildtyp Vollängen Gal4-Gen

Alle Plasmide für das Two-Hybrid-System, mit Ausnahme der rpt-1 Konstrukte, sind von der Firma Clontech, Heidelberg.

2.1.4.2 Plasmide für die *In vitro* Translation

pGBKT7-rpt-1	pGBKT7-Derivat, mit 1500bp <i>EcoRI/XhoI</i> Fragment der rpt-1 Maus-cDNA
pGADT7	8 kb Prey-Vektor mit der Gal4 Aktivierungsdomäne
pGADT7-eif3	pGADT7-Derivat mit 1250 bp <i>EcoRI/XhoI</i> eif3-Fragment
pGADT7-Bif-1	pGADT7-Derivat mit 1500bp <i>EcoRI/XhoI</i> Bif-1-Fragment
pGADT7-Katalase	pGADT7-Derivat mit 1400bp <i>EcoRI/XhoI</i> Katalase-Fragment

2.1.4.3 Plasmide für die Transfektionen

pCMV-6 HA-Act	pCMV5-Derivat mit <i>HindIII/ EcoRI</i> linker und 1442bp <i>XbaI/BamHI</i> Act Fragment
pCMV6-rpt-1	pCMV -Derivat mit 1500bp <i>EcoRI/XhoI</i> rpt-1 Fragment
pEGFP-C1	codiert für die Green fluorescence Protein (GFP) mit 1 Variante, die als Fusion mit inseriertem Protein exprimiert wird.
pEGFP-C1-rpt-1	pEGFP-C1-Derivat mit 1500bp <i>EcoRI/XhoI</i> rpt-1 Fragment

2.1.5 Lösungen für die Hefetransformationen

PEG/LiAc : 40%PEG 3350
1X TE (10 mM Tris/ 1mM EDTA)
1X LiAc (100mM)

2.1.6 Lösungen für die Proteinextraktionen aus Hefen

Phenylmethyl-sulfonyl Fluorid (PMSF)-100XStocklösung: 100mM PMSF(SIGMA-Aldrich, Schnelldorf) in Isopropanol

Cracking-Puffer-Stocklösung:	8M Harnstoff 5% (w/v) SDS 40mM Tris-HCl (pH 6,8) 0,1mM EDTA 0,4mg/ml Bromphenolblau
Cracking-Puffer Gebrauchslösung:	1ml Cracking-Puffer-Stocklösung 10 µl β-Mercaptoethanol 70µl Protease Inhibitor–Solution for Yeast (Oncogene) 50µl 100X Stocklösung PMSF

2.1.7 KITS

Caspase-3-Assay Kit	BD Biosciences Pharmingen, Belgien
ECL-plus Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche Diagnostics, Penzberg
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche Diagnostics, Penzberg
MatchMaker CO-IP-Kit	Clontech, Heidelberg
Matchmaker Two-Hybrid-System	Clontech, Heidelberg
PCR Purifikation Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Mini, Midi, Maxi, Giga Plasmid-Purifikation Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel-Extraction-Kit	Qiagen, Hilden
TNT®-Quick coupled Transcription/Translation-System	Promega

2.1.8 Bakterien- und Hefestämme2.1.8.1 Bakterienstämme

Genotyp:

E. coli-XL-1-blue MRF' elektrokompetente Zellen:

$\Delta(\text{mcrA})$ 183, $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})$ 173 end A1, supE44 thi-1 recA1, gyrA96 rel A1, lac [F' proAB lacI Z Δ M15Tn10(Tet^r)]

E. coli KC8 elektrokompetente Zellen:

hsdr,leuB600,trpC9830,pyrF::Tn5,hisB463,lac Δ X74,strA,galU,K

2.1.8.2 Hefestamm

Genotyp:

AH109:

MATa trp1-901, leu2-3,112,ura3-52,his3-200,Gal4 Δ ,gal80 Δ ,LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

Phänotyp auf unterschiedlichen Wachstumsmedien:

STAMM	SD/-ADE	SD/-MET	SD/-TRP	SD/-LEU	SD/-HIS	SD/-URA	YPAD
<i>AH109</i>	-	+	-	-	-	+	+

AH109 sezerniert α -Galaktosidase als Antwort auf Gal4 –Aktivierung durch Protein-Protein Interaktion. Dieses Enzym kann auf X-Gal-haltigem Medium durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden. Positive Interaktionsklone wachsen somit in blauen Kolonien.

2.1.9 Bakterien und Hefeanzucht

2.1.9.1 Anzucht von *Epicurian coli*

Luria-Bertani Medium (LB) (Sambrook <i>et al.</i> ,1989)	10g/l NaCl 10g/l Trypton 5g/l Hefeextrakt, pH 7,5
SOC-Medium (Sambrook <i>et al.</i> ,1989)	20g/l Bactopepton 5g/l Hefeextract 10mM NaCl 2,5 mM KCl 10mM MgCl ₂ 10mM MgSO ₄ 20mM Glukose
M9 Minimal medium	750ml H ₂ O 200ml 5x M9 Salts 2ml 1M MgSO ₄ 0,1 ml 1M CaCl ₂ 9ml 45% Glukose 1ml 1M Thiamine 100ml –Leu DO Solution 1ml Amp (100mg/ml)

5x M9 Salts	64g/l Na ₂ HPO ₄
	15g/l KH ₂ PO ₄
	2,5g/l NaCl
	5g/l NH ₄ Cl

Zur Herstellung von Kulturplatten wurden den entsprechenden Medien 20g/l Agar zugesetzt. Sämtliche Medienkomponenten wurden entweder autoklaviert (20min, 121°C, 1bar) oder bei Hitzeempfindlichkeit sterilfiltriert (45 µm Porenweite, Einmalfilter, Schleicher & Schuell, Dassel). Zur Propagierung antibiotikaresistenter rekombinanter Stämme wurden 100mg/ml Ampicillin bzw. 50mg/ml Kanamycin eingesetzt.

Die Anzucht von Bakterien in kleinen Kulturvolumina (3ml) erfolgte in sterilen 12 ml Greiner Gefäßen. Diese wurden in einem Horizontal Wasserbadschüttler (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) bei 37°C mit 200-250 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 16-18h inkubiert. Bei größeren Kulturvolumina wurden zur Anzucht sterile Erlenmeyerkolben verwendet, die mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur 1%ig (v/v) angeimpft wurden.

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienzellen wurden 30%ige (v/v) Glycerinkulturen angelegt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.1.9.2 Anzucht des Hefestamms AH109 in Voll- und Minimalmedium

YPD Medium	20g/l Difco Pepton
	10g/l Hefeextrakt
	20g/l Agar (für Platten)
	2% Glukose

YPDA-Medium	YPD (s.o.) + 15 ml 0,2% Adeninhemisulfat Lösung
SD-Medium	Minimal SD Base bzw. Minimal SD Agar Base (beides Clontech, Heidelberg) entsprechend Herstellerangaben in A.dest lösen
SD-Drop Out (DO) Medium	10x Supplement Stock Lösung: 200mg/l L-Adenin-Hemisulfat 200mg/l L-Arginin 200mg/l L-Histidin Monohydrat 300mg/l L-Isoleucin 1000mg/l L-Leucin 300mg/l L-Lysin HCL 200mg/l L- Methionin 500mg/l L-Phenylalanin 2000mg/l L- Threonin 200mg/l L- Tryptophan 300mg/l L-Tyrosin 200mg/l L-Uracil 1500mg/l L-Valin

Alle Komponenten der 10X Supplement-Stocklösung von SIGMA-Aldrich, Schnelldorf.

Um das gewünschte SD-Drop-out Medium mit 1X Supplementlösung herzustellen, werden die jeweiligen Aminosäuren, auf die selektiert werden soll, in der Supplement-Stocklösung ausgelassen.

Alle Medien und Medienkomponenten wurden autoklaviert (121°C, 20 min, 1bar) und anschließend bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Der Hefestamm *S. cerevisiae AH109* ist Adenin-, Histidin-, Leucin- und Tryptophan-auxotroph (vergl.2.1.8.2). Den untransformierten Hefen sind deshalb die genannten Aminosäuren dem Wachstumsmedium zuzusetzen. Bei plasmidvermittelter Aminosäureprototrophie erfolgte die Selektion auf Minimalmedium ohne Histidin, Adenin, Leucin und Tryptophan. Zum Interaktionsnachweis zweier „Two-Hybrid“-Konstrukte wurde dem Medium außerdem 1ml /l x- α -Gal (20mg/ml in DMF) zugesetzt.

Die Kultivierung von *S. cerevisiae AH109* Zellen erfolgte in geeigneten Anzuchtmedien bei 30°C und guter Belüftung in Schikanekolben für 16-36h in Submerskulturen. Dabei betrug das Kulturvolumen maximal 1/10 des Gefäßvolumens.

Vorkulturen (ca. 10-50ml) wurden mit Einzelkolonien oder 1ml einer Stockkultur beimpft, über Nacht angezogen und dienten vollständig als Ausgangsmaterial zur Erstellung von 300ml Flüssigkulturen.

Die auf Festagarplatten kultivierten Hefezellen wurden nach dem Ausplattieren 2-14 Tage bei 30°C inkubiert.

Zur langfristigen Lagerung der Hefezellen wurden 15%ige Glycerinkulturen angelegt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.10 Zellkultur

2.1.10.1 Medien für die Zellkultur

RPMI 1640	Invitrogen, GIBCO, Groningen
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf
PBS	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Penicillin (P) 5000 U	Invitrogen, GIBCO, Groningen
Streptomycin (S), 5000 U	Invitrogen, GIBCO, Groningen
Natriumhydrogen-phosphat	SIGMA-Aldrich, Schnelldorf

2.1.10.2 Zelllinien

Tab.1: Herkunft der verwendeten Zelllinien und Hinweise zur Kultivierung

P = Penicillin, S = Streptomycin, FCS = fötales Kälberserum

Name	Herkunft	Verdopplungszeit	Passage	Medium
HELA, human cervix carcinoma	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) DSMZ-Nr. ACC57	48h	4-15	1X RPMI +10% FCS +50 U/ml P +50µg/ml S
COS-7, African green monkey kidney, SV-40 transformed	DSMZ-Nr.: ACC66	35-48h	bis 20	DMEM +10% FCS +50 U/ml P +50µg/ml S
Hep-G2, human hepatocellular carcinoma	DSMZ-Nr. ACC 180	50-60h	11-25	1X RPMI +10% FCS +50 U/ml P +50µg/ml S
HaCat	Institut für Umweltmedizinische Forschung, AG, Dr. Grether-Beck	48h	20-25	1X RPMI +10% FCS +50 U/ml P. +50µg/ml S

Die Inkubation aller Zelllinien erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchte.

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden im Rahmen des Yeast Two-Hybrid Systems

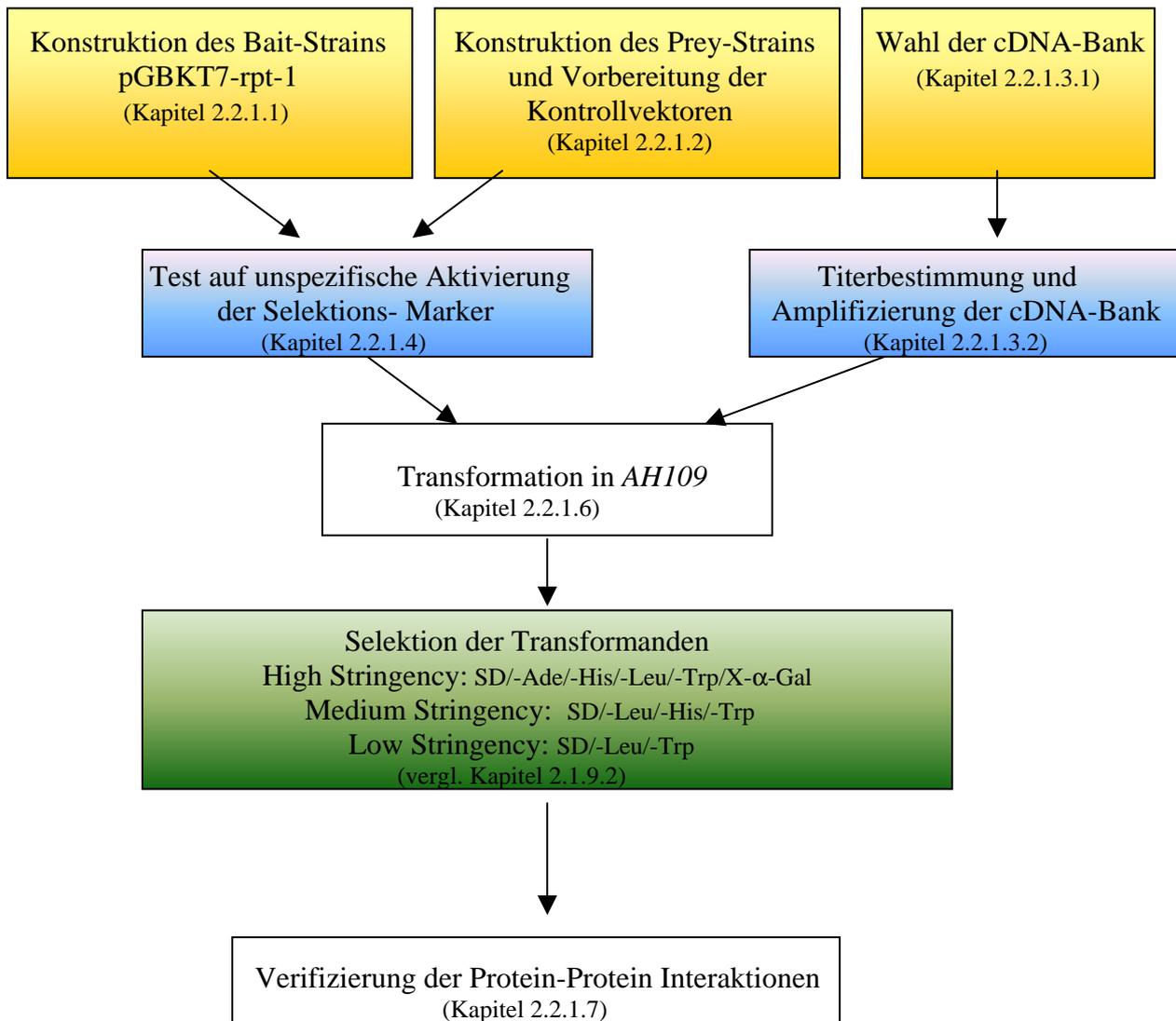
Prinzip des Two-Hybrid-Systems

Mit Hilfe des Two-Hybrid Systems kann man Protein-Protein Interaktionen *in vivo* in Hefen nachweisen.

Ein funktioneller Transkriptionsfaktor besteht aus einer DNA-Bindedomäne (BD) und der Aktivierungsdomäne (AD). Im Two-Hybrid System werden beide Domänen von unterschiedlichen Plasmiden codiert und nur bei der Rekonstitution des Transkriptionsfaktors kommt es zur Transkription der Reportergene Ade2, His3 und Mel1 oder lacZ.

Das Plasmid, welches die DNA-Bindedomäne enthält, fungiert als „Bait-Vektor“. Hier hinein wird das rpt-1 kloniert, welches dann als Fusionsprotein mit der Gal4-DNA-Bindedomäne exprimiert wird. Die putativen Interaktionspartner sind als Fusionsproteine der AD konstruiert. Dieses fungiert als sogenannter „Prey-Vektor“ und beinhaltet das Protein, oder wie in diesem Fall die Mouse Liver Matchmaker cDNA Library, die auf Interaktion mit dem „Bait-Protein“ getestet werden soll. Findet eine Interaktion zwischen „Bait-Protein“ und einem Protein der cDNA-Bank statt, so werden Aktivierungsdomäne und DNA-Bindedomäne wieder zusammengeführt und können an die Gal Upstream Activation Sequence (UAS) binden, was die Aktivierung der Transkription der Reportergene zur Folge hat.

Positive Transformanten werden über entsprechende Selektionsmedien/-platten selektiert.

Yeast Two Hybrid Screen**Abb.2:** Flusschema des Two-Hybrid Systems

2.2.1.1 Klonierung von rpt-1 in den „Bait-Vektor“ pGBKT7

Der Vektor pGBKT7 ist der DNA-BD Vektor und Bestandteil des MATCHMAKER Two-Hybrid Systems (Clontech). Er fungiert als "Bait"-Vektor und exprimiert Fusionsproteine der Gal4 DNA-Bindedomäne.

In Hefen werden die Fusionsproteine in hohem Maße vom konstitutiven ADH1-Promoter exprimiert. Die Transkription ist terminiert durch das T7 und ADH1 Transkriptionsstop-Signal.

Der Vektor beinhaltet ebenfalls den T7 Promoter, ein c-myc Epitop-tag und eine multiple cloning site (MCS).

pGBKT7 repliziert selbständig sowohl in *E. coli* vom pUC als auch in *S. cerevisiae* vom 2 μ ori. Der Vektor trägt die Kanamycinresistenz zur Selektion in *E. coli* und den Trp-Marker zur Selektion in Hefen. pGBKT7 führt bei Hefestämmen zu einer erhöhten Transformationseffizienz gegenüber Stämmen mit anderen DNA-BD Vektoren.

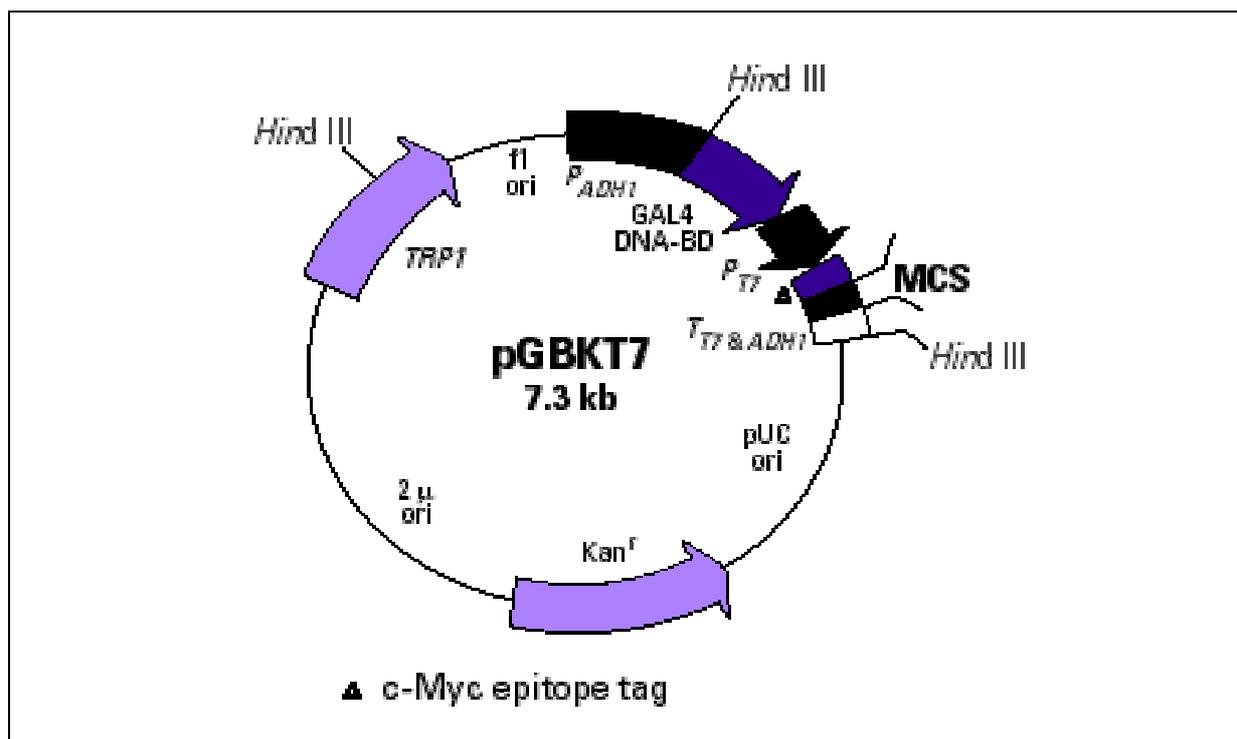


Abb.3: pGBKT7-Vektor mit der DNA-BD. Die multiple cloning site (MCS) ermöglicht eine gerichtete Klonierung des Inserts. Der Vektor repliziert selbständig in Hefen vom 2 μ ori bzw. in *E. coli* vom pUC. Der Selektionsmarker für die Selektion in *E. coli* ist die Kanamycinresistenz (Kan) und für die Selektion in Hefen der Tryptophan Marker (Trp). Ferner beinhaltet der Vektor den T7-Promoter sowie das c-myc epitop tag. Diese Strukturen sind wichtig für die anschließende zellfreie Expression der Proteine.

Um die 1500bp große Maus rpt-1-cDNA (Donat, 1998) in den Bait-Vektor pGBKT7 zu klonieren, wurden beide Plasmide zunächst in den Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue MRF transformiert.

Je 40µl einer *E. coli* XL1-Blue MRF-Suspension (1×10^{10} cfu/µg) wurden mit 0,1µg pGBKT7, bzw. 0,4µg rpt-1 versetzt und mittels Elektroporation transformiert.

Elektroporationsbedingungen waren:

1800V

15µF

335R

Die Pulsdauer betrug > 1ms.

Anschließend wurden die Bakterien in 965µl SOC-Medium aufgenommen und 1h bei 37°C im Wasserbad sanft geschüttelt und danach bei 3000rpm für ca. 3min zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet in ca. 50µl Medium resuspendiert.

Die Bakteriensuspension wurde dann auf LB-Agarplatten mit 50µg/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Aus den Transformanten wurde über Nacht eine 2ml LB/KAN Vorkultur angeimpft und am nächsten Tag aus einem 1,5ml Aliquot eine Plasmid Minipräparation mit Hilfe des Qiagen Mini Plasmid Purifikation Kits (Qiagen) durchgeführt.

Für eine erfolgreiche Klonierung wurde ein Dephosphorylierungsschritt des *EcoRI* / *XhoI* geschnittenen Vektors notwendig.

Dephosphorylierungsansatz: 5µg pGBKT7

2,5µl Dephosphorylierungspuffer (10x, Boehringer)

0,8µl Alkalische Phosphatase (1U/µl Boehringer)

ad 40µl mit A.dest.

Dephosphorylierung: 30min bei 37°C inkubieren

Inaktivierung: 20min bei 80°C

Renaturierung: 20min bei Raumtemperatur

Der gesamte Dephosphorylierungsansatz sowie der Restriktionsansatz von rpt-1 wurden auf ein 1% TBE Agarosegel aufgetragen und für 30-60min elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), nach Angaben des Herstellers, die DNA aus dem Gel eluiert. In der Folge wurde die so aufbereitete DNA ligiert. Die Ligation erfolgte mit dem pGBKT7 Vektor und rpt-1 (EcoR1/XhoI geschnitten) im molaren Verhältnis 1:3. Der Ligationsansatz wurde 16h bei 16°C inkubiert.

2.2.1.2 Amplifizierung der Kontrollvektoren

2.2.1.2.1 Kontrollvektoren

Positiv-Kontrolle:

pCL- codiert den Vollängen Wildtyp des Gal4 Proteins und fungiert als Positiv-Kontrolle für α - und β -Galaktosidase-Enzymtests.

pGBKT7-53 und pGADT7-T codieren Fusionsproteine aus murinem p53 mit GAL4 DNA-BD bzw. SV40 large T-Antigen mit der AD. Protein 53 und das large T-Antigen interagieren in Two-Hybrid Versuchen und aktivieren die entsprechenden Reportergene.

Negativ-Kontrolle:

pGBKT7-Lam codiert für ein Fusionsprotein zwischen DNA-BD und humanem Lamin C.

Dieses Konstrukt dient als Kontrolle für zufällige, unspezifische Interaktionen von Proteinen. Lamin C formt keine Proteinkomplexe mit anderen Proteinen.

Alle Kontrollvektoren wurden durch Elektroporation (vergl. Kapitel 2.2.1.1) transformiert und anschließend die DNA mit Hilfe des Plasmid Purifikation Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.1.3 Amplifizierung der Mouse Liver Matchmaker cDNA-Bank

2.2.1.3.1 cDNA-Bank

Die Mouse Liver Matchmaker cDNA-Bank der Firma Clontech, bringt $3,5 \times 10^6$ unabhängige Klone hervor.

Der Titer beträgt 10^8 cfu/ml in LB- Medium.

Die durchschnittliche cDNA-Größe liegt bei 2,0 kb.

Die Insertgrößen liegen zwischen 0,4-4,0kb. Die cDNA`s wurden *XhoI/EcoRI* in den pACT2-Vektor inseriert.

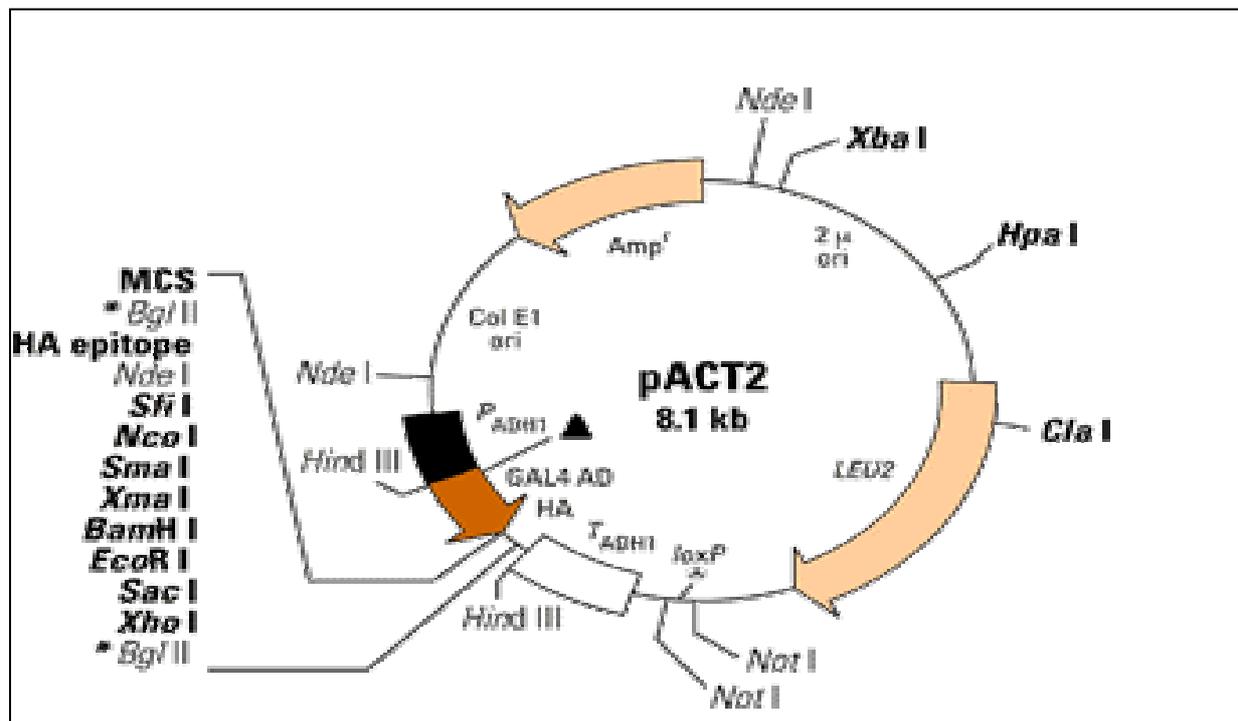


Abb.4: Vektorkarte des c-DNA-Bank Vektors. Der Vektor besitzt die Gal4 Aktivierungsdomäne (AD), vermittelt Ampicillinresistenz (Amp) für die Selektion in Bakterien, sowie die Leucin Prototrophie für die Selektion in Hefen. Zum Nachweis exprimierter Proteine mittels Antikörpern dient der Ha-Tag.

2.2.1.3.2 Amplifizierung

Um sicherzustellen, dass jeder Klon der Bank im anschließenden Two-Hybrid-Test auch vertreten ist, muss die Bank zuvor amplifiziert werden.

Hierzu geht man bei den Berechnungen davon aus, dass theoretisch jeder Klon mindestens zweimal vertreten sein muss. Ferner wird vorausgesetzt, dass pro Platte ca. 20.000 Kolonien wachsen sollten. Mit Hilfe dieser Vorgaben ließen sich die Anzahl der Platten und das Volumen des benötigten Mediums berechnen.

Da die Bank $3,5 \times 10^6$ unabhängige Klone hat, wurden 7×10^6 cfu ausplattiert. Die *E. coli* XL-1-Blue MRF⁺ Bakterien wurden mit 52,5 ml LB Medium gemischt und auf LB/Amp-Platten ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C für 16h wurden die Platten mit 5ml Medium abgespült und anschließend mit dem Qiagen Giga-Präp-Kit nach Angaben des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert.

2.2.1.4 Test auf unspezifische Aktivierung der Reportergene durch Transformation des Hefestamms *AH109* nach der Lithiumacetat-Methode

Um zu verifizieren, dass die Konstrukte pGBKT7-rpt-1 und pACT 2-cDNA Bank die Reportergene nicht alleine aktivieren, werden diese jeweils einzeln in den Hefestamm *AH109* transformiert. Hierzu werden die Hefen zunächst im Vollmedium YPDA über Nacht bei 30°C angezogen, bis sie in die stationäre Wachstumsphase kommen. Diese ist erreicht, wenn die Übernacht-Kultur eine OD₆₀₀ von >1,5 hat. Dann wird diese Kultur mit Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 verdünnt und anschließend erneut bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 +/- 0,1 inkubiert.

Es folgten zwei fünfminütige Zentrifugationsschritte bei 1000g und Raumtemperatur, ein Waschschritt mit TE-Puffer oder Aqua dest. Das Pellet wurde in 1,5ml 1M LiAc/TE Lösung resuspendiert. Die zu transformierende DNA (0,1µg) wird mit Hering-Testes carrier DNA (0,1mg) und 100µl der kompetenten Hefezellen versetzt, durch vortexen gemischt und mit 600µl 1M LiAc/PEG-Lösung (PEG 3350) aufgefüllt. Dieser Ansatz wird 30min bei 30°C inkubiert und anschließend mit 70µl DMSO versetzt und für weitere 15min bei 42°C inkubiert. Danach wird der Ansatz für 2min auf Eis gekühlt. Nach der folgenden Zentrifugation bei 14000rpm in der Eppendorf Tischzentrifuge, wird der Überstand dekantiert

und das Pellet in 50µl 1M Sorbitol resuspendiert und anschließend auf Selektionsmedium ausplattiert.

Selektionsmedium für pGBKT7-rpt-1: SD/-TRP/ X- α -Gal bzw. für die pACT2-cDNA Bank: SD /-LEU/X- α -Gal.

Die Transformanden müssen auf diesen Selektionsplatten weiß wachsen, das bedeutet, dass sie das getestete Reporter-gen Mel1 nicht aktivieren. (Mel1 codiert für α -Galaktosidase. Dieses Enzym wird sekretiert und kann direkt auf X- α -Gal Indikatorplatten nachgewiesen werden. Mel1 wird in einigen Hefestämmen gefunden). Ein blaues Wachstum deutet auf eine unspezifische Aktivierung von Mel1 durch rpt-1 bzw. die Mouse-Liver Matchmaker-cDNA Bank hin.

2.2.1.5 Test auf rekombinante Proteinexpression von rpt-1 in Hefen

Um die Expression von rpt-1 in Hefen zu testen wurde das pGBKT7-rpt-1 Plasmid in den Hefestamm *AH109* transformiert (vergl. Kapitel 2.2.1.4) und zur weiteren Analyse die Proteine extrahiert.

2.2.1.5.1 Proteinextraktion aus Hefen

Mit einer 5ml Übernachtskultur, die in entsprechendem Selektionsmedium angezogen wurde, werden 50ml YPD Medium angeimpft. Dieses wurde anschließend bei 30°C und 250rpm geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,4-0,6 erreicht war. Die Kultur wurde anschließend durch Umfüllen in ein, halb mit Eis gefülltes, 100ml Zentrifugenröhrchen heruntergekühlt und dieses dann bei 4°C und 1000g für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50ml eiskaltem H₂O resuspendiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 5min bei 4°C und 1000g wurde die Suspension erneut pelletiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet bei -70°C eingefroren.

Das gefrorene Pellet wurde anschließend in 100µl, 60°C warmen Cracking-Puffer pro 7.5 OD, resuspendiert, getaut und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt, das mit 80µl Glass beads gefüllt war. Die Proben wurden dann bei 70°C für 10min zur Freisetzung der Membranproteine erhitzt.

Nach anschließendem 1minütigem vortexen wurden die Proben bei 14000rpm und 4°C für 5min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren.

Danach erfolgte die Überführung des Überstandes in ein frisches 1,5ml Eppendorfgefäß und das erneute Kochen des Pellets in einem 100°C heißem Wasserbad für 3-5min. Anschließend wurde 1min gevortext und im Anschluss die Zelltrümmer bei 14000rpm, 5min, 4°C herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem schon vorhandenen gepoolt.

Nach 5minütigem Kochen der Proben mit SDS-Probenpuffer, wurden diese auf ein 4%-12% NuPAGE® Novex Bis-Tris Gradientengel aufgetragen und bei 130mA für 50min aufgetrennt.

2.2.1.5.2 Anreicherung spezifischer Proteine durch Immunpräzipitation

Bei dieser Methode werden spezifische Antikörper benutzt, um Proteine aus komplexen Mischungen selektiv auszufällen (pull-down). Der Antikörper-Protein Komplex wird anschließend durch Bindung an Protein A-Sepharose von den übrigen Proteinen getrennt.

Da ein direkter Nachweis von rpt-1 aus Heferohextrakten quantitativ nicht möglich war, wurde dieses „pull-down“ Experiment mit dem kompletten Ansatz des Proteinrohextrakts (Proteinextraktion siehe Kapitel 2.2.1.5.1) durchgeführt. Dem Proteinrohextrakt wurden der Antikörper gegen das c-myc-Epitop bzw. der rpt-1-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 zugefügt und 1,5h bei RT inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz 3mg Protein A/ml Proteinrohextrakt zugefügt.

Nach 1h Inkubation bei RT wurde der Ansatz bei 10.000g zentrifugiert und anschließend 4x 5min mit Immunpräzipitationspuffer (siehe unten) gewaschen. Das letzte gereinigte Sediment wurde in SDS-PAGE Probenpuffer gelöst, erhitzt (5min, 100°C) und bei 10.000g, 5min zentrifugiert. Das so eluierte DNA-BD/rpt-1 Fusionsprotein wurde durch Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot analysiert.

Als sekundärer Antikörper wurde der Anti rabbit-IGg-horseraddish-peroxidase gekoppelte Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS + 2% Tween 20 eingesetzt. Inkubationszeiten und -temperaturen wurden wie in Kapitel 2.2.2.3.2 beschrieben gewählt.

2.2.1.6 Transformation des „Bait-Konstrukts“ pGBKT7-rpt-1 in den Hefestamm *AH109*

Zur Durchführung einer sequenziellen Transformation wurde zunächst ein Bait-Strain konstruiert, indem das Konstrukt pGBKT7-rpt-1 in den Hefestamm *AH109* nach Angaben im MatchMaker Two-Hybrid System 3 User Manual (PT3247) transformiert wurde.

In den so erzeugten Bait-Strain wurde dann die cDNA-Bank im Rahmen einer Großtransformation eingebracht und anschließend unter höchsten Selektionsbedingungen (Vergl. Abb. 2.) für 14 Tage bei 30°C bebrütet.

2.2.1.7 Verifizierung der putativen Interaktionsklone im Two-Hybrid System

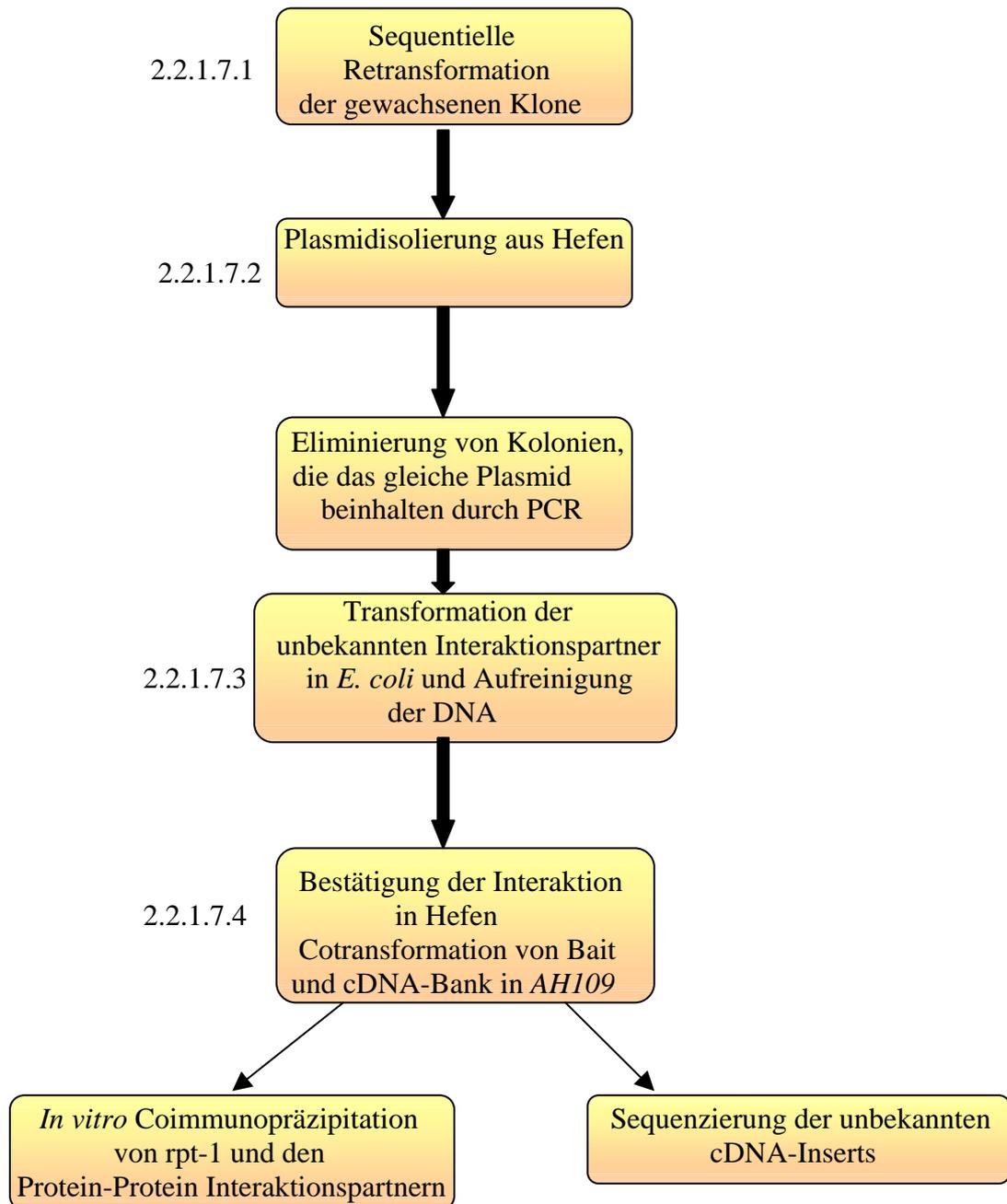


Abb.5: Flussschema der durchgeführten Analyse und Verifizierung von putativen rpt-1 Protein-Protein Interaktionspartnern

2.2.1.7.1 Retransformation

Die DNA der gewachsenen Klone wurde isoliert und erneut in den Bait-Strain transformiert, (sequentielle Transformation, da beide Plasmide nacheinander transformiert werden) und bis zum Erscheinen der Transformanden bei 30°C inkubiert.

Die gewachsenen Klone wurden erneut unter Selektionsbedingungen kultiviert und dreimal hintereinander auf Selektionsmedium überimpft, um solche Klone zu eliminieren, die mehrere Plasmide besitzen.

2.2.1.7.2 Plasmidisolierung aus Hefen

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus Hefen wurden die Zellen mit „acid-washed glass beads“ (SIGMA G-8772) aufgeschlossen und unter Verwendung des Qiaprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert (Abgeändertes Protokoll TS-PRO 4 11/98).

2.2.1.7.3 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA aus Hefen

Die aus Hefen isolierte Plasmid-DNA wurde mittels Elektroporation in den *E. coli*-Stamm XL-1-blue MRF⁺ und *E. coli* KC 8 transformiert. Hierzu wurden 40µl elektrokompetente *E. coli*-Bakterien mit 0,1µg Plasmid-DNA gemischt und wie unter 2.2.1.2 beschrieben, transformiert.

Das Gesamteluat wurde zur Transformation eingesetzt.

Die sich anschließende DNA-Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des Qiagen Plasmid Midi Kits (Qiagen), nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.7.4 Kontrolle der Protein-Protein Interaktion in Hefen

Um die putative Interaktion in Hefen zu bestätigen, wurde eine Cotransformation des „Bait“-Plasmids pGBKT7-rpt-1 und der isolierten Bank-Plasmide in den Hefestamm AH109, den Angaben im MatchMaker Two-Hybrid System 3 User Manual (PT3247) folgend durchgeführt.

Dann wurden die Hefen erneut unter hochstringenten Bedingungen (SD/-Ade/-His/-Leu/-His) bei 30°C für 3-14 Tage inkubiert.

Die unbekannte Plasmid c-DNA der positiv blau wachsenden Interaktionsklone wurde isoliert und in *E. coli* KC8 transformiert. Dieser Bakterien-Stamm trägt hisB, leuB und trpC Mutationen, das heißt, dass diese Aminosäuren dem Wachstumsmedium zugesetzt werden müssen. Die im Plasmid der positiven Klone vorhandenen Hefe-His3, Leu2 und Trp1-Gene werden im Falle der Transformation im Bakterien-Stamm ausreichend exprimiert, so dass dieses Defizit ausgeglichen werden kann. Dadurch ist bei Wachstum auf den entsprechenden Selektionsplatten die Isolierung der richtigen Plasmide gewährleistet.

Die aus *E. coli* isolierte DNA wurde erneut auf Interaktion im Hefestamm getestet.

2.2.1.7.4.1 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Sequenzierung wurden 2µg DNA, gelöst in 5µl Gesamtvolumen pro Sequenzierungsreaktion benötigt (in H₂O oder TE).

Die Sequenzierung erfolgte beidseitig mit dem

- T7-Sequencing Primer (0,1µg/µl) und
- 3'-DNA-BD Sequencing Primer (0,1µg/µl)

bzw. für die cDNA-Bank-Interaktionsklone mit dem

- 3'AD Sequencing Primer (0,1µg/µl)

Alle Primer waren von der Firma Clontech und Bestandteil des MatchMaker Two-Hybrid Systems (Clontech).

Die Sequenzierung wurde von der Firma Scientific Research and Development GmbH (SRD) in Frankfurt/Main durchgeführt.

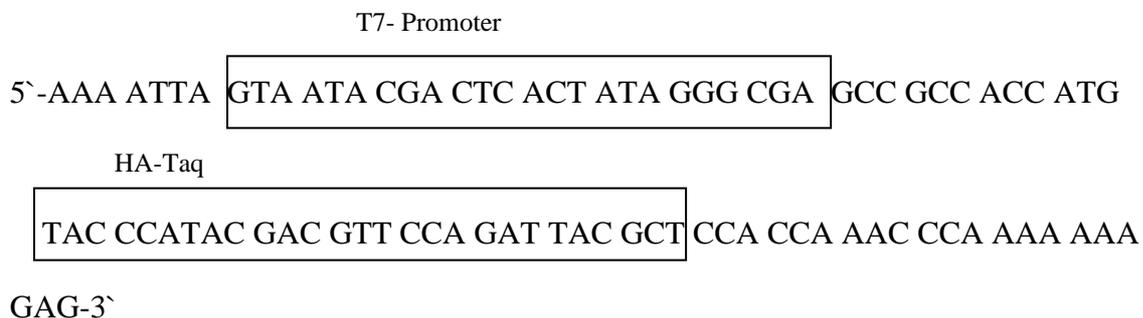
2.2.1.7.5 Einfügen des T7-Promoters mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die *In vitro* Transcription/*In vitro* Translation

Zur Durchführung der zellfreien Translation ist der T7-Promoter essentiell, da die Transkription und Translation von Genen, die Stromab des T7-Promoters kloniert sind, initiiert wird.

Der pACT2-Vektor hat keinen T7-Promoter, deshalb müssen die geangelten Proteine umklontiert, oder der T7-Promoter mittels PCR angefügt werden.

Die hierfür benötigten Primer waren:

AD HA Forward Primer



AD Reverse Primer



Es wurde ein 50µl PCR-Ansatz durchgeführt. Die PCR Bedingungen waren wie folgt:

94°C für 1min
 94°C für 15sec
 72°C für 5min 2 Zyklen

94°C für 15sec
 70°C für 5min 2 Zyklen

94°C für 15sec

68°C für 5min 21 Zyklen

68°C für 7min

Die Größenkontrolle der PCR-Produkte erfolgte auf einem 1%igenTBE Agarosegel bei 145V, 90mA und 45min.

2.2.2 Allgemeiner Methodenteil

2.2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1.1 Präparation von Plasmid DNA aus Bakterien

Zur Plasmidpräparation aus Bakterienzellen wurde je nach Umfang der zu isolierenden DNA das Qiagen Mini-, Midi- oder Maxi Plasmid Purifikation Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.1.2 Klonierungstechniken und Agarosegelelektrophorese

Standardtechniken wie Restriktion mit Endonukleasen, Ligation und Modifizierungen von DNA-Enden sowie die Agarosegelelektrophorese von DNA wurden gemäß Sambrook *et al.*(1989) durchgeführt. Die Elution von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Qiaquick Gel-Extraction Kits (Qiagen, Hilden).

Klonierungstechniken im Rahmen des Two-Hybrid Systems sind in Kapitel 2.2.1 gesondert aufgeführt, soweit von den Normbedingungen abweichend.

2.2.2.1.3 *In vitro* Transcription/*In vitro* Translation

Die zellfreie Translation wurde mit dem TNT® Quick coupled Transcription/Translation System (Promega) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Pro Ansatz wurden 2µg DNA und 2 Ci/mmol L-[³⁵S]-Methionin eingesetzt. Das Volumen des Gesamtansatzes betrug 50µl. Im Anschluss wurden 5µl des Ansatzes zu 20µl SDS-Probenpuffer gegeben und 10 min bei 70°C erhitzt, zur Überprüfung der Translation auf ein 4%-12% Tris-Glycine Gel aufgetragen und bei 100-115 mA, 200V für 50min getrennt.

Danach wurde das Gel in Fixierungslösung (50% Methanol, 10% Eisessig, 40% Wasser) fixiert, für 2h bei 80°C getrocknet und für mindestens 16h auf einem Imaging Screen-K (Kodak Phosphor Screen) exponiert.

Die Auswertung erfolgte am Molecular Imager® FX der Firma BIORAD.

2.2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.2.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford (1976) mit dem Bradford- Reagenz der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH, München durchgeführt. Als Eichprotein diente Rinderserumalbumin. Für geringe Proteinkonzentrationen wurde das Dc Protein Assay-Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) verwendet.

Für die Proteinbestimmung im Rahmen des Caspase 3- Assays, erfolgte die Bestimmung der Proteinmenge mit Hilfe des Bc-Assay-Reagent (Uptima Interchim, Montflouon, Frankreich).

2.2.2.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde wie bei Laemmli (1970) beschrieben durchgeführt. Die 4%-12%igen Minigradientengele (NuPAGE® Novex Bis-Tris oder Tris-Glycine in MOPS- Puffer) wurden mit einer konstanten Spannung von 200V für 1h betrieben. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert (vgl. 2.2.2.3.1). Als Größenstandard diente der MultiMark® Multi colored Standard (Invitrogen).

2.2.2.3. Immunologische Methoden

2.2.2.3.1. Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulosemembranen (Western Blot) mit einem modifizierten Verfahren nach Michov (1995)

Zur Überführung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf die Oberfläche von Membranen wurde eine „Semi-Dry-Elektrotransferkammer“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) verwendet.

Hierzu erfolgte zunächst die Benetzung der Anodenplatte mit dest. H₂O und die Befeuchtung der Filterpapiere (Whatman-Papier) mit Anoden- und Kathodenpuffer (s.u.). Die Blotmembran, die Cellophanmembran und das Gel wurden für 3-4min in Anodenpuffer equilibriert.

Anschließend wurde wie folgt geschichtet:

Auf die Anode:

6 Lagen Filterpapier in Anodenpuffer
Nitrocellulosemembran Hybond™ ECL™
(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB)
SDS-Gel
Cellophanmembran (Amersham Biosciences,
Buckinghamshire, GB)
Eine Lage Filterpapier in Anodenpuffer
Vier Lagen Filterpapier in Kathodenpuffer

Zum Schluss wurde die Kathode aufgelegt. Der Transfer erfolgte anschließend bei 12V für 1,5h.

Anodenpuffer-Stocklösung:	2,29ml Ameisensäure
	0,58g SDS
	0,10g NaN ₃
	ad 1l mit A. dest.

Kathodenpuffer-Stocklösung:	4,20g TRIS
	6,02 g Taurin
	0,58g SDS
	0,10g NaN ₃
	ad 1l mit A. dest.

Vor jedem Blotvorgang wurden aus den Stocklösungen die Gebrauchslösungen wie folgt hergestellt:

50ml Anoden-bzw. Kathodenpufferstocklösung
20ml Methanol p.a.
30ml A.dest.

2.2.2.3.2 Immunologischer Nachweis elektrophoretisch getrennter Proteine

Der Nachweis der getrennten und transferierten Proteine erfolgte, indem die Blotmembran in Anschluss an den Blotvorgang über Nacht in Blocklösung mit primärem Antikörper (1:1000) bei 4°C inkubiert wurde.

Im Anschluß wurde die Membran 2x mit Waschpuffer kurz gespült und dann für 15min gewaschen. Es schlossen sich drei 5minütige Waschschrte an.

In der Folge wurde die Membran für 1h in sekundärem Antikörper, der in Waschpuffer 1:5000 verdünnt wurde, inkubiert. Es folgten erneut die oben beschriebenen Waschschrte.

Die Detektion wurde mit dem ECL-plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Waschpuffer: PBS + 0,1% Tween 20

2.2.2.3.3 Aufreinigung des rabbit-Anti Mouse rpt-1-Antikörpers

Der Antikörper gegen rpt-1 wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Ingo Christiansen zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde gegen das gereinigte Protein in Kaninchen generiert.

Zur Aufreinigung über Protein A-Sepharose-Säulen (HiTrap®) der Firma Amersham Pharmacia wurden die Säulen mit 5ml A. Dest, 5ml Elutionspuffer und 10 ml Binding-Puffer (siehe unten) equilibriert.

Das bei 37°C aufgetaute Serum wurde mit 400µl des 20mM Binding-Puffer/3,6ml Serum versetzt, 10min bei 10000g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand auf die Säule aufgebracht, der Durchfluss aufgefangen und nochmals auf die Säule gegeben. Es folgte ein Waschschrte mit 10ml Binding-Puffer. Die Elution erfolgte mit 2x5ml Elutionspuffer.

In 10 Eppendorf-Reaktionsgefäßen (1,5ml) mit je 200µl Neutralisationspuffer wurde jeweils 1ml Eluat aufgefangen.

Proteinhaltige Proben wurden gepoolt und konzentriert. Die Konzentrierung der Proben erfolgte über Centricon YM-10-Röhrchen der Firma amicon Bioseparations, indem der Überstand der zuvor bei 10000g zentrifugierten Proben auf die entsprechende Menge

Centricon-Röhrchen verteilt wurde (2ml/Röhrchen). Diese wurden dann bei 20°C und 3500g für 20min zentrifugiert. Nach anschließender Zugabe von 600µl PBS/Röhrchen und 15minütiger Inkubation bei 4°C wurde der gereinigte Antikörper aus dem Eluat aufgefangen und bei -80°C gelagert.

<u>Natriumphosphatpuffer (200mM)</u>	<u>Bindingpuffer</u>	<u>Elutionspuffer</u>	<u>Neutralisationspuffer</u>
Nach Anleitung Roche Lab FAQs	20mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0	0,1M Natriumphosphatpuffer pH 3,0	1M TRIS-HCL, pH 9,0

2.2.2.3.4 In-vitro Co-Immunopräzipitation

Zur Verifizierung der Protein-Protein Interaktionen wurde eine *in vitro* Co-Immunopräzipitation mit dem Matchmaker Co-IP-Kit (Clontech) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die in der *in-vitro* Translation synthetisierten und mit L-[³⁵S]-Methionin markierten Proteine wurden laut Vorschrift eingesetzt und nach Pull-down mit den notwendigen Antikörpern rpt-1 AK, c-myc-AK oder HA-Taq-AK; auf ein 4%-12% iges Tris-Glycine Gel (Invitrogen) aufgetragen und bei 100-115mA, 200V 50min aufgetrennt.

Die angegebenen Antikörper waren Bestandteil des Kits mit Ausnahme des rpt-1 Antikörpers. Alle Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

2.2.2.3.5 Immunhistochemischer Nachweis von rpt-1 in Hela- und HepG2 Zellen

1x10⁴-1x10⁵ Zellen wurden auf Chamber Slides eingesät und mit dem pCMV6-rpt-1-Plasmid wie unter 2.2.2.5.5 beschrieben transfiziert. Als Negativkontrolle diente die gleiche Konzentration des pCMV6-Leervektors.

Nach Fixierung der Zellen wie unter 2.2.2.6 beschrieben, schlossen sich zwei 5minütige Waschschrte mit 1ml PBS/Kammer an.

Anschließend erfolgte die Inkubation für 1h bei 37°C mit dem 1:50 in PBS-T (PBS+0,3 % Triton-X 100) verdünnten rpt-1-AK (vergl. Kapitel 2.2.2.3.3). Diesem Ansatz werden zum blocken 10% (w/v) in PBS verdünntes Goat-Serum zugegeben.

Es schlossen sich drei 10minütige Waschgänge in PBS an.

Anschließend folgte die Inkubation für 30min bei 37°C mit 100µl/Kammer des 1:100 in PBS verdünntem Rhodamine (TRITC)-conjugated Goat anti-rabbit IgG (H+L) Antikörper (Dianova).

Nach drei 15minütigen Waschschritten, wobei dem letzten Waschgang 0,2 mg/ml Höchst-Färbelösung zugesetzt wurde, wurden die Proben zum Entfernen von Salzurückständen in Millipore Wasser getaucht und nach dem Trocknen wie unter 2.2.2.6 beschrieben eingedeckelt.

2.2.2.4 Enzymatische Analysen

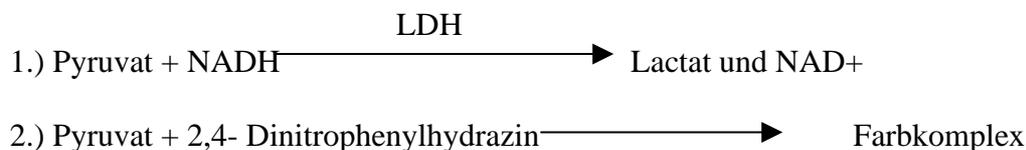
2.2.2.4.1 Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Mikroassay (Zytotoxizitätstest)

Zur Differenzierung von Apoptose und Nekrose wurde die LDH-Aktivität im Medium gemessen.

Bei Nekrose bedingter Lyse der Zellmembran wird die cytosolische LDH freigesetzt und deren Enzymaktivität kann gemessen werden.

Der Gehalt an LDH-Aktivität ist ein Maß für die Zytotoxizität.

LDH katalysiert die Reaktion von Pyruvat und NADH zu Lactat und NAD +



Nicht umgesetztes Pyruvat bildet mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin einen Farbkomplex. Die Absorption bei 540nm ist auf das noch vorhandene Pyruvat zurückzuführen und ist umgekehrt proportional zur LDH-Aktivität.

Für die LDH Bestimmung wurde das Medium der transfizierten Zellen abgenommen und 24h bei 4°C gelagert. Danach wurden die Proben bei 4°C 5min und 14000rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und jeweils 20µl der Proben in Mikrotiterplatten (Greiner) gegeben.

Als Referenzstandard wurde 0, 280, 640, 1040, 1530 und 2000U/ml LDH mitgeführt.

Nach Zugabe von je 50µl 0,75mM Natriumpyruvat mit 1mg/ml NAD wurde die Mikrotiterplatte für 30min bei 37°C im Dunkeln inkubiert, (Natriumpyruvat ist lichtempfindlich) und anschließend mit je 50 µl 2,4- Dinitrophenylhydrazin versetzt.

Es folgte eine weitere Inkubation für 20min bei RT im Dunkeln.

Durch Zugabe von 50µl 4N NaOH und einer Inkubation von 5min bei RT wurde die LDH inaktiviert und die Extinktion bei 540nm im Mikroplattenlesegerät bestimmt.

2.2.2.5 Zellkultur

2.2.2.5.1 Kultivierung von Hela –Zellen

Bei den adherent wachsenden Hela Zellen handelt es sich um humane cervix carcinoma Zellen, die als Monolayer wachsen.

Die Hela-Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% rel. Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen (Greiner) der Größe 120cm² und 25ml RPMI-Vollmedium (GIBCO) kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Bei Erreichen von 80-90% Konfluenz wurden die Zellen 1:5 gesplittet. Hierzu wurde das Medium abgenommen und die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS/PS, mit 2,5ml Accutase (PAA Laboratories, Linz, Österreich) versetzt. Nachdem die Zellen sich vom Flaschenboden abgelöst hatten, wurden sie durch mehrmaliges resuspendieren vereinzelt und auf neue Kulturflaschen verteilt. Die Hela Zellen wurden von Passage 5 bis Passage 15 verwendet. Bei höheren Passagen verloren die Zellen ihre Eigenschaften.

Zum Einfrieren wurden 2x10⁶ Zellen mit 70% Medium, 20% FBS und 10% DMSO versetzt und bei –80°C (Kurzzeitlagerung) oder in flüssigem Stickstoff (Langzeitlagerung) aufbewahrt.

RPMI-Vollmedium

10% FCS
2mM Glutamin
50U/ml Penicillin
50µg/ml Streptomycin

PBS/PS (Penicillin/Streptomycin)

PBS(SIGMA.)
50 U/ml Penicillin(P)
50µg/ml Streptomycin (S)

in 1x RPMI 1640 (GIBCO)

2.2.2.5.2 Kultivierung von HepG2 Zellen

HepG2 sind humane hepatocelluläre carcinoma Zellen. Die HepG2 Zellen wurden in RPMI-Vollmedium (vergl. Kapitel 2.2.2.5.1) kultiviert. Zum Splitten wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS/PS mit 2,5ml Accutase versetzt und nach ca. 3minütiger Inkubation bei 37°C in 10ml Medium aufgenommen, mehrmals resuspendiert um sie zu vereinzeln und 1:3 gesplittet.

Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert, die Zellen ebenfalls alle zwei Tage gesplittet.

Hep G2-Zellen wurden zwischen Passage 11-25 eingesetzt.

2.2.2.5.3 Kultivierung von HaCat-Zellen

HaCat-Zellen wurden ebenfalls in RPMI-Vollmedium kultiviert und nach Erreichen von 80-90% Konfluenz 1:3 gesplittet.

Die Erneuerung des Mediums erfolgte alle 2-3 Tage.

2.2.2.5.4 Kultivierung von Cos-7 Zellen

Die Kultivierung der Cos-7 Zellen (african green monkey kidney Zellen, SV 40 transformed) erfolgte in DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) (SIGMA).

Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert und das Splitten der Zellen erfolgte nach Erreichen von 80-90% Konfluenz, wie unter 2.2.2.5.1 beschrieben.

Cos-7 Zellen wurden bis zur Passage 20 eingesetzt.

DMEM-Vollmedium:

- Ø 50U/ml Penicillin
- Ø 50µg/ml Streptomycin
- Ø 10% FCS

in 1x DMEM- Medium

2.2.2.5.5 Transfektionen der Zelllinien HeLa, HepG2 und Cos-7

Für die transiente Transfektion wurden die verschiedenen Zellkulturen auf 6-Well-Platten bzw. auf gekammerte Objektträger (Chamber Slides) mit den in Tabelle 2 angegebenen Zellzahlen ausgesät und zur Anheftung für 16h bei 37°C im CO₂ Inkubationsschrank belassen.

Tab.2: Mengenangaben zur Aussaat der Zellen auf die jeweiligen Kulturgefäße.

Alle Angaben in Zellen/ml

	6-Well-Platten	Gekammerte Objektträger
HeLa	2x10 ⁴ /3ml	1x10 ⁴ /400µl
HepG2	2x10 ⁵ /3ml	1x10 ⁵ /400µl
Cos-7	1x10 ⁵ /3ml	2x10 ⁴ /400µl

Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit dem Effectene Transfection Reagent Kit® (Qiagen) mit 0,75µg DNA, 1,5µg Enhancer und 3µg Effectene pro Ansatz.

Die Transfektionen wurden nach 24h abgestoppt, die Auswertungen erfolgten, je nach Versuchsansatz, zwischen 2h und 48h anschließender Expressionszeit.

2.2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen zunächst mit 0,75µg pEGFP-rpt-1 Plasmid, wie unter 2.2.2.5.5 beschrieben, für 24h in gekammerten Objekträgern transfiziert.

Die Präparation der Proben für die Fluoreszenzmikroskopie fand wie folgt statt: Nach Transfektionsende wurden die Zellen für 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h und 24h weiterinkubiert und dann wie folgt fixiert:

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen 1mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 250µl/Kammer frisch angesetzter 4% Paraformaldehyd-Lösung (siehe unten) für 10min bei Raumtemperatur fixiert.

Nach weiteren zwei Waschschritten mit PBS wurden sie mit einer 1:2000 verdünnten Höchst-Färbelösung (SIGMA) gefärbt. Ein weiteres Mal mit A.Dest gewaschen und mit Vectashield® Mounting Medium for Fluorescence H-1000 (LINARIS) eingedeckelt.

Die Auswertung der Proben erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 60 Phasenkontrast) mit dem Grünfluoreszenzfilter „NIBA“ (490nm-570nm).

Paraformaldehydlösung.: 4g Paraformaldehyd/100ml PBS
+ 3 Tropfen 5N NaOH unter Erhitzen lösen
abkühlen lassen und den pH mit HCL auf 7,0 einstellen

2.2.2.7 Apoptose-Tests

2.2.2.7.1 Caspase-3 Assay

Die Caspase-3-Aktivität in den transformierten, Hela, HepG2 und HaCat-Zellen wurden mit dem Caspase-3 Assay-Kit der Firma BD Biosciences Pharmingen nach Angaben des Herstellers getestet.

Als Substrat wurde DEVD-pNA verwendet. Die Auswertung erfolgte fluorometrisch am ELISA-Reader bei 405nm.

2.2.2.7.2 Apoptose TUNEL Assay

Die Spaltung genomischer DNA während der Apoptose verursacht doppelsträngige, niedrig molekulare DNA-Fragmente, sowie Einzelstrangbrüche (nicks) in hochmolekulare DNA-Fragmente.

Diese DNA-Strangbrüche können identifiziert werden, indem die freien 3'-OH-Enden mit modifizierten Nukleotiden in einer enzymatischen Reaktion markiert werden.

Hierzu wurde das *In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche), für bereits mit dem Green Fluoreszenzprotein transfizierte Zellen eingesetzt. Für alle Anderen wurde das *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche) verwendet, welches einen grün fluoreszierenden Farbstoff enthält. Die Versuche wurden gemäß der Herstellerangaben durchgeführt, die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch wie unter 2.2.2.6 beschrieben.

2.2.2.7.3 Apoptoseinduktion

Die Induktion der Apoptose in HeLa-, HepG- und HaCat- Zellen erfolgte mit Actinomycin D, Anti-Fas-Antikörper und UVB-Bestrahlung.

2.2.2.7.3.1 Actinomycin D

Das in p.A. Ethanol gelöste Actinomycin D (AMD) wurde 24 h nach Aussaat der Zellen auf 6-Well-Platten (vergl. Tab.2), in einer Konzentration von 1µg und 2µg/ml dem Medium zugefügt.

Nach einer Inkubation von 24h wurden die Zellen geerntet, indem sie nach einmaligem Waschen mit 2ml PBS mit Lysispuffer (150 µl/ well Lysispuffer aus Caspase-Kit für Caspase-Assay, für Westernblot:125µl/well Lysispuffer siehe unten) benetzt wurden und anschließend mit einem Scraper abgeschabt und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt wurden. Die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte auf Eis bzw. bei – 20°C.

Im Anschluss wurde mit Hilfe des Caspase-3-Assays (BD Biosciences) die Apoptose nachgewiesen und in einem Western Blot (vergl. Kapitel 2.2.2.3.1 und 2.2.2.3.2) die Expression von rpt-1 kontrolliert.

2X Lysispuffer (vRIPA) für die Western-Blot-Analyse von Zellen:

Tris HCl pH 7,4	50mM
NaCl	300mM
EDTA	0,2mM
NP-40 (IGEPAL CA-630)	2%
SDS	0,2%
Deoxycholot	2%
NaN ₃	0,05%

Mit sterilem A. bidest. auf 50ml auffüllen.

Diese 2X Stocklösung wird aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Vor Gebrauch werden dieser Lösung folgende Komponenten zugesetzt:

1X vRIPA:	2X vRIPA	+10µl/ml Endvolumen Protease-Inhibitor Cocktail (SIGMA)
		+10µl/ml Endvolumen Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (SIGMA)
		+ A. bidest (steril)

2.2.2.7.3.2 Anti-Fas-Antikörper

Anti Fas-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1µg/ml und 2µg/ml dem Medium zugefügt.

Die Ernte der Zellen erfolgte nach 24h, 36h und 48h (vergl. 2.2.2.7.3.1)

Anschließend wurde ein Caspase-Assay (vergl. 2.2.2.7.3.1) und Western Blot (vergl. 2.2.2.3.1) durchgeführt.

2.2.2.7.3.3 UVB-Bestrahlung

Für den UVB-Versuch wurden die Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät (vergl. Tab.2) Die Apoptose-Induktion durch UVB (Wellenlängenbereich 290-320 nm) erfolgte nach folgendem Schema:

Tab.3 :Bestrahlungsschema der Apoptose-Induktion durch UVB in verschiedenen humanen Zelllinien. Strahlendosis in J/m²

UVB-Dosis	Hela	HepG2	HaCat
100 J/m ²	+	+	+
200 J/m ²	+	+	+
300 J/m ²	+	+	+

Anschließend wurde ein Caspase-Assay (vergl. 2.2.2.7.3.1) und Western Blot (vergl. 2.2.2.3) zum Nachweis der Apoptose bzw. zur Kontrolle der rpt-1- Expression durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung von rpt-1

Nach der Klonierung der Maus rpt-1 cDNA in den Bait-Vektor pGBKT7, wurde die aufgereinigte Plasmid-DNA auf Vorhandensein des richtigen Inserts getestet.

Die 1500bp große cDNA des rpt-1 konnte per *EcoRI* / *XhoI* Restriktion aus dem pGBKT7 Vektor freigesetzt werden.

3.2 Test auf rekombinante Proteinexpression von rpt-1 in Hefen

Da ein direkter Nachweis von rpt-1 in Heferohextrakten quantitativ nicht möglich war, wurde eine Immunopräzipitation durchgeführt.

Im anschließenden Western Blot mit den Antikörpern gegen das c-myc-Epitop (Abb. 6A) und rpt-1 (Abb. 6B) konnte die Expression von rpt-1 in transfizierten Hefen nachgewiesen werden (Abb. 6 A und B, 4). Durch diesen Befund ist die Voraussetzung für die Durchführung des Two-Hybrid Screens geschaffen.

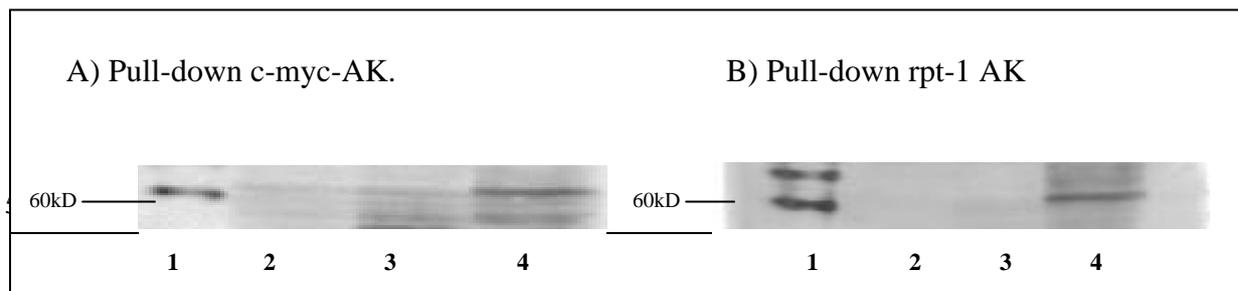


Abb.6: Western Blot zum Nachweis der Expression von rpt-1 in transformierten *AH109*-Hefen **A)** pull-down mit dem c-myc Epitop Ak: **1=** Marker, **2=** *AH109* untransformiert, **3=** *AH109* + pGBKT7-leer, **4=** *AH109* + pGBKT7-rpt-1 **B)** „pull-down“ mit dem rpt-1 AK **1=** Marker, **2=** *AH109* untransformiert, **3=** *AH109* + pGBKT7-leer, **4=** *AH109* + pGBKT7-rpt-1 Mit beiden Antikörpern konnte die Expression von rpt-1 in transformierten Hefezellen nachgewiesen werden.

3.3 cDNA-Bank Screen

Die Transformation der cDNA-Bank wurde in Form einer simultanen Cotransformation durchgeführt. Hierbei werden sowohl das "Bait"- als auch das "Prey"- Plasmid gleichzeitig transformiert. Der Vorteil dieser Transformationsmethode ist, das eventuelle Toxizität des

exprimierten DNA-BD/Bait Proteins nicht zum Tragen kommen kann. In solch einem Fall hätten die durch spontane Deletion im DNA-BD/Bait Protein hervorkommenden Klone einen Wachstumsvorteil gegenüber den Klonen, die ein intaktes Plasmid tragen.

Die Ansätze wurden auf Medium-stringenten-Platten ausplattiert (Abb.2, Kapitel 2.2.1). Medium-stringente-Platten selektieren im Vergleich zu leicht-stringenten-Platten nicht nur auf die DNA-BD- und AD-Vektoren, sondern zusätzlich auf die Expression von His3. Die positiv wachsenden Transformanden wurden auf Hoch-Stringente-Platten überstrichen, um die Expression von Mel1 und Ade2 zu testen und somit „falsch positive“ Klone auszuwählen. Der komplette Versuchsaufbau für den Two-Hybrid-cDNA-Bank Screen ist in Tabelle 4 aufgelistet:

Tab. 4: Kontroll- und Versuchsansätze des Two-Hybrid-Screens und ihr Phänotyp auf verschiedenen Selektionsmedien

Vektoren	SD Minimal Medium	Phänotyp MEL1/LacZ	Phänotyp HIS/ADE
α - Gal. Positivkontrolle: pCL1	-Leu	blau	+
Pos.Kontr. :pGADT7T+ pGBKT7-53	-Leu	weiß	-
	-Trp	weiß	-
	-Leu/-Trp	blau	+
	-Ade/-His/-Leu/-Trp/x- α Gal	blau	+
Neg.Kontr.:pGADT7T+ pGBKT7-LAM	-Leu	weiß	-
	-Trp	weiß	-
	-Leu/-Trp	weiß	-
	-Ade/-His/-Leu/-Trp/x- α Gal	weiß	-
DNA-BD/rpt-1+AD mouse liver cDNA-Bank	cDNA- -Leu	weiß	-
	-Trp	weiß	-
	Medium string. -Leu/-His/-Trp	Weiß/blau	-/+
	High string.: -Ade/-His/-Leu/-Trp/x- α Gal	Weiß/blau	-/+

Die auf den Hoch-Stringenten-Platten positiv gewachsenen blauen Kolonien wurden viermal in Folge überstrichen, um so Kolonien auszuwählen, die mehr als ein Plasmid tragen.

Es konnten im ersten Ansatz 55 Interaktionsklone isoliert werden, von denen nach mehrmaliger Selektion 12 unterschiedliche Klone identifiziert wurden.

Aus den mit mehreren Selektionsmarkern getesteten Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und in den *E. coli*-Stamm KC8 transformiert. Die Sequenz der positiven Klone wurde bestimmt und mittels der NCBI-Datenbank auf Identitäten überprüft.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Putative Interaktionspartner von rpt-1

Klon-Nr.	Name	Größe	Funktion
68	Translation initiation factor 3 (subunit 5)	1250bp	Rekrutierung der 30s ribosomalen Untereinheit
43x1	Na/taurocholate cotransporting polypeptide 2 (Ntcp-2)	1500bp	Hepatocelluläre Gallensäureaufnahme Die Expression von Ntcp wird in Verbindung gebracht mit Gallensäure –Rückstau (Cholestase)
43/2	Na/taurocholate cotransporting polypeptide 2(Ntcp-2)	2050bp	s.o.
27/6	“Riken”cDNA clone of unknown function	Mind. 700bp	Unbekannte Funktion
22/1	“Riken”cDNA clone of unknown function	2700bp	Unbekannte Funktion
83/8	“Riken”cDNA clone of unknown function	2250bp	Unbekannte Funktion
27/1	“Riken”cDNA clone of unknown function	Mind.700bp	Unbekannte Funktion
37/3	Bif-1, SH3-domain GrB2-like B1	1500bp	Bif-1 ist ein SH3-Domänen beinhaltendes Protein, welches mit Bax interagiert. Bax ist ein Proapoptotisches Mitglied der BCL-2-Familie
57/2	Leucocyte-platelet-activation factor receptor	1600bp	
43/1	Fatty acid binding protein	Ca. 5000bp	Cytosolischer Transport von pytanic acid zur Peroxisomenmembran oder zum Nukleus zur Aktivierung von PPAR alpha
34/2	Catalase	1400bp	Enzym des Apoptose-Pathways
83/3	Homolog to cadherin-like protein	1000bp	-

Die Kontrolle der Sequenzen ergab, dass nur drei der sequenzierten Proteine im fortschreitenden Leserahmen der Aktivierungsdomäne lagen. Dies waren die Klone Nr. 68 (eif3), Nr. 34/2 (Katalase) und Nr. 37/3 (Bif-1). Aufgrund dessen, konzentrierten sich alle folgenden Untersuchungen auf diese drei Proteine.

Die Hauptfunktion des 1250bp großen eif3 (Nr. 68, Translation initiation factor 3, subunit 5), besteht in der Rekrutierung der 30s ribosomalen Untereinheit. Die Katalase (Nr. 34/2) ist ein Enzym des Apoptose Pathways und hat eine Größe von 1400bp. Bif-1 (Nr. 37/3, bax interacting factor-1) beinhaltet eine SH3-Domäne und interagiert mit dem proapoptotischen Protein Bax. Die Größe beträgt 1500bp.

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

Tab. 6: Positive Interaktionspartner des Two-Hybrid Systems im fortschreitendem Leserahmen der Aktivierungsdomäne

Klon-Nr.	Name	Größe	Funktion
68	eif3 (Translation initiation factor 3, subunit 5)	1250bp	Rekrutierung der 30s ribosomalen Untereinheit
34/2	Catalase	1400bp	Enzym des Apoptose-Pathways
37/3	Bif-1, SH3-domain GrB2-like B1	1500bp	Bif-1 ist ein SH3-Domänen beinhaltendes Protein, welches mit Bax interagiert. Bax ist ein Proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie

3.4 In vitro Transkription/In vitro Translation

Für die *In vitro* Translation ist der T7-Promoter essentiell, da die Transkription und Translation von Genen, die Stromab des T7-Promoters kloniert sind, initiiert wird.

Die Klone Bif-1, eif3 und Katalase wurden dazu in den pGADT7 Vektor kloniert und anschließend zur Kontrolle *EcoRI/XhoI* restringiert auf ein 1% TBE Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Da die Banden die erwarteten Größen zeigten (eif3-1250bp, bif-1-1500bp und Katalase-1400bp), wurden diese anschließend mit dem Qiaquick Gel-Extraktion Kit

eluiert und durch Sequenzierung sichergestellt, dass die Klonierung im fortschreitenden Leserahmen der Aktivierungsdomäne erfolgt ist.

Bei der zellfreien Translation wurden die Proteine durch L-[³⁵S]-Methionin-Einbau radioaktiv markiert. Pro 50µl Translationsansatz wurden 2µg DNA und 2Ci/mmol Methionin eingesetzt. Für die vor jedem Co-Immunopräzipitationstest durchgeführte Translationskontrolle wurden 5µl des 50µl Translationsansatzes auf ein SDS Gel aufgetragen um den Einbau der radioaktiven Aminosäure Methionin zu überprüfen. Dies entsprach durchschnittlich 37.000 cpm pro Ansatz. In Abb.7 ist der Phosphor Screen der Translationskontrolle abgebildet. Die Bahnen 4-7 zeigen die zellfrei synthetisierten und radioaktiv markierten Kontrollproteine rpt-1 (Abb.7, Bahn 4), T-Antigen und p53 (Abb.7, Bahn 5 und Bahn 6), die bei der Co-Immunopräzipitation als Positivkontrolle fungieren, da sie miteinander eine Protein-Protein Interaktion eingehen. Bahn 7 zeigt die als Größenkontrolle fungierende, 61kD große Bande von Luciferase (Abb.7, Bahn 7).

Die Bahnen 1-3 in Abb.7 zeigen die zellfrei synthetisierten Proteine der Interaktionsklone.

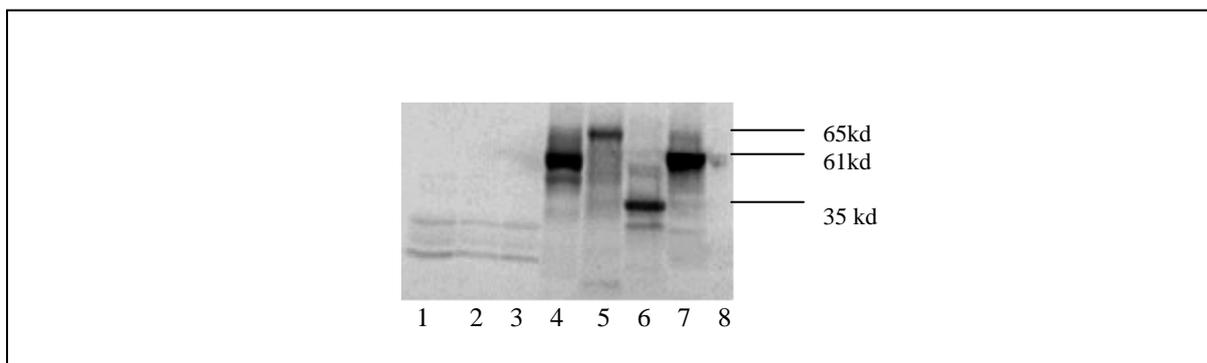


Abb.7: Phosphor Screen der *In vitro* Translation von S³⁵-markierten Proteinen.

Bahn 1: Bif-1, **Bahn 2:** Katalase, **Bahn 3:** eif3, **Bahn 4:** rpt-1, **Bahn 5:** SV 40 large T-Antigen; **Bahn 6:** p53, **Bahn 7:** Luciferase (Positivkontrolle, Größenkontrolle), **Bahn 8:** Negativkontrolle ohne DNA. Die Translationseffizienz ist bei den Interaktionsklonen (Bahn 1-3) deutlich geringer als bei rpt-1 und den Kontrollproteinen

Wie in Abbildung 7 gezeigt, ist die Translationseffizienz bei den Interaktionsklonen geringer als bei den Kontrollproteinen.

Die Translationseffizienz konnte auch durch Einsatz PCR-generierter DNA nicht gesteigert werden, zudem war die Generierung der eif3 DNA mittels PCR nicht möglich (Abb.8, Bahn 3). Deshalb wurde für die nachfolgenden Versuche die Plasmid DNA eingesetzt.

Abbildung 8 zeigt den Vergleich zwischen PCR-generierter DNA (Bahnen 1-3) und Plasmid-DNA (Bahnen 5-6). Die Abbildung zeigt, dass durch den Einsatz PCR-generierter DNA keine Steigerung der Translationseffizienz erreicht werden konnte. Die Banden sind in beiden Ansätzen gleich stark. (Abb.8). Der Vorteil bei der Plasmid DNA liegt darin, dass es möglich ist auch eif3 zu generieren, was mit PCR generierter DNA nicht gelang. (Abb.8, Bahn 6 bzw. Bahn 3)

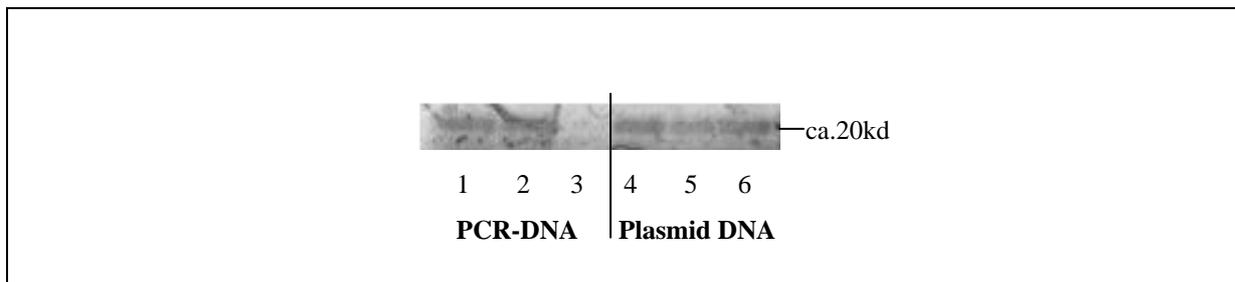


Abb.8: Phosphor Screen der S^{35} -markierten Translationsprodukte der Interaktionsklone eif3, Bif-1 und Katalase, von PCR generierter oder Plasmid DNA **Bahn 1:** Katalase, PCR generiert **Bahn 2:** Bif-1, PCR generiert **Bahn 3:** eif3, PCR generiert **Bahn 4:** Katalase, Plasmid-DNA **Bahn 5:** Bif-1, Plasmid-DNA **Bahn 6:** eif3, Plasmid-DNA. Aus der PCR generierten DNA von eif3 (Bahn 3) konnte kein Translationsprodukt gewonnen werden.

3.5 Co-Immunopräzipitation von *In vitro* translatierten Proteinen

Zum Nachweis der Protein-Protein Interaktionen, wurden die *In vitro* translatierten und radioaktiv markierten Proteine im Co-Immunopräzipitations Experiment getestet.

Dabei wurde pro 20 μ l Ansatz 0,8 Ci/mmol radioaktives Methionin eingesetzt.

Die geringe Translationseffizienz der Interaktionsklone wurde durch den Einsatz gleicher cpm (counts per minute) kompensiert.

Abbildung 9 zeigt den Phosphor Screen der Co-Immunopräzipitation der Interaktionsklone mit rpt-1. Der pull-down mit dem c-myc Antikörper (Abb.9 A) bestätigt die im Two Hybrid Experiment gefundenen Protein-Protein Interaktionen mit rpt-1 (Abb.9 A, Bahnen 1-3).

Durch pull-down mit dem HA-Tag Antikörper (Abb.9 B) kann nur das 60 kD große rpt-1 detektiert werden (Abb.9 B, Bahnen 1-3).

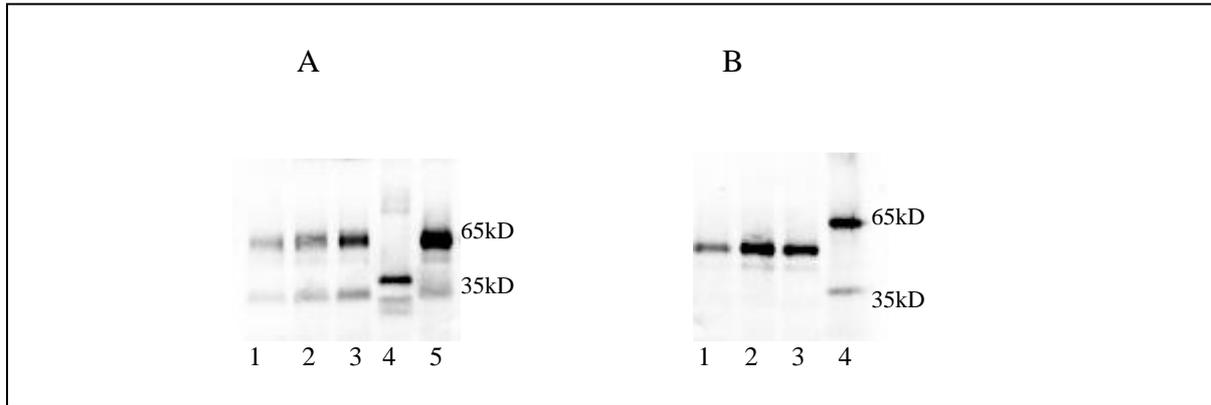


Abb.9: Phosphor Screen von der Co-Immunopräzipitation der putativen Interaktionspartner von rpt-1. Der „pull-down“ erfolgte mit dem c-myc Antikörper (A) bzw HA-Tag Antikörper (B). **Bahn 1:** rpt-1 +Bif1; **Bahn 2:** rpt-1+Katalase; **Bahn 3:** rpt-1+eif3; **Bahn 4:** Positivkontrolle T-Antigen + p53; **Bahn 5** (nur A): Negativkontrolle für den c-myc Antikörper: rpt-1+ T-Antigen. Mit dem HA-Tag Antikörper (B) konnte, im Gegensatz zum c-myc Antikörper keine Interaktion detektiert werden.

Vermutlich bindet der HA-Tag Antikörper mit einer höheren Affinität an rpt-1 als an den HA-Tag der Interaktionsklone. Da im pull-down Experiment (Abb.9 B) nur rpt-1, nicht jedoch die Interaktionsklone eif3, Katalase und Bif-1 nachgewiesen werden können, wurde in einem weiteren Experiment geklärt, ob der HA-Tag mit rpt-1 kreuzreagiert.

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse des pull-down Experimentes mit steigenden Antikörperkonzentrationen für den HA-Tag Antikörper und den Proteinen rpt-1 (Negativkontrolle) und T-Antigen (Positivkontrolle, Abb.10 A) sowie mit dem c-myc Antikörper und den Proteinen p53 (Positivkontrolle) und Luciferase (Negativkontrolle, Abb.10 B) dargestellt. Es hat sich herausgestellt, dass der HA-Tag Antikörper in allen getesteten Konzentrationen mit rpt-1 kreuzreagiert (Abb.10 A). Der c-myc Antikörper hingegen, reagiert ab einer Konzentration von 0,8 μ g spezifisch mit dem Fusionsprotein aus p53 und dem c-myc Epitop (Abb.10 B).

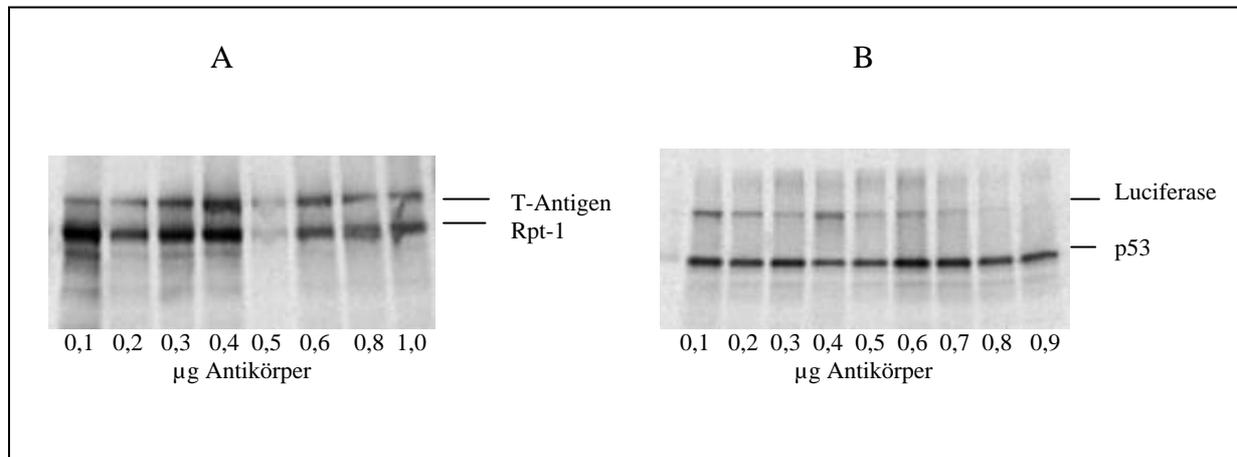


Abb.10: Phosphor Screen des „pull down“ Experiments mit steigenden Antikörperkonzentrationen für den HA-Tag Antikörper (A) und den c-myc-Antikörper (B). Als Kontrollen für den HA-Tag Antikörper wurden rpt-1 als Negativkontrolle und large T-Antigen als Positivkontrolle eingesetzt. Für den c-myc-Antikörper diente Luciferase als Negativkontrolle und p53 als Positivkontrolle. Der HA-Tag Antikörper lässt deutlich eine Kreuzreaktion mit rpt-1 erkennen.

Um auszuschließen, dass die Konstrukte pGBKT7-rpt-1 und das als Kontrollprotein eingesetzte pGADT7-T-Antigen miteinander interagieren, wurden in einem weiteren pull-down Experiment beide Proteine auf Interaktion getestet. Abbildung 11 zeigt den Phosphor Screen des Co-Immunopräzipitationsexperiments der Proteine rpt-1 und large T-Antigen. Der pull-down erfolgte mit dem rpt-1 Antikörper. Die Ergebnisse schließen eine Interaktion dieser beiden Proteine aus, weil mit dem rpt-1 AK nur rpt-1 detektiert werden kann. Im Falle einer Interaktion ließen sich beide Proteine (rpt-1 und T-Antigen) nachweisen.

Da sich mit dem rpt-1 Antikörper nur rpt-1 detektieren lässt (Abb.11), bestätigt dies gleichzeitig die Vermutung aus Abb.10, dass der HA-Tag Antikörper unspezifische Reaktionen mit rpt-1 eingeht (Abb.10 A) und somit rpt-1 nicht als Interakteur von large T-Antigen präzipitiert wird.

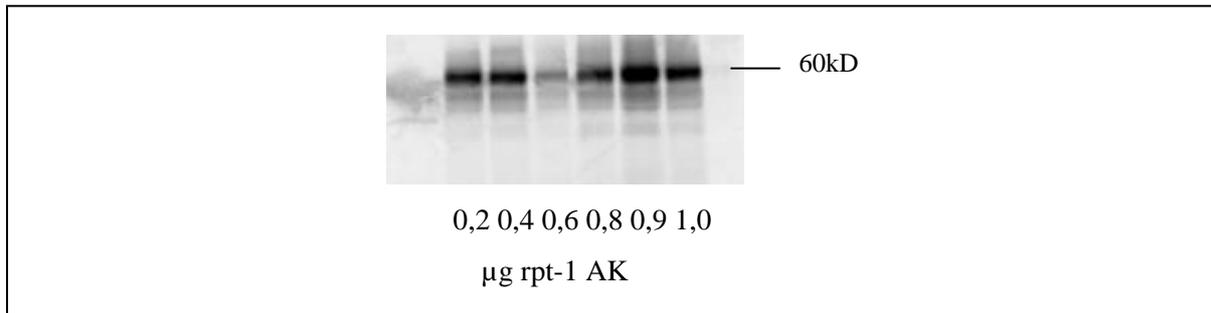


Abb.11: Phosphor Screen der Co- Immunopräzipitation von rpt-1 und large T-Antigen. Der pull-down erfolgte mit dem rpt-1 Antikörper in aufsteigender Konzentration. Nur das 60kD große rpt-1 konnte detektiert werden. Es ist keine Kreuzreaktion des rpt-1 Antikörpers nachweisbar.

Die in Abb.10 und 11 dargestellten Ergebnisse belegen die Kreuzreaktion des HA-Tag Antikörpers mit rpt-1. Dadurch konnte dieser Antikörper nicht in einem Co-Immunopräzipitations-Experiment eingesetzt werden. Zur Bestätigung der mit dem c-myc Antikörper erzielten Ergebnisse (Abb.9 A), wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, in dem der „pull-down“ mit dem rpt-1 AK erfolgte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 zusammengefasst.

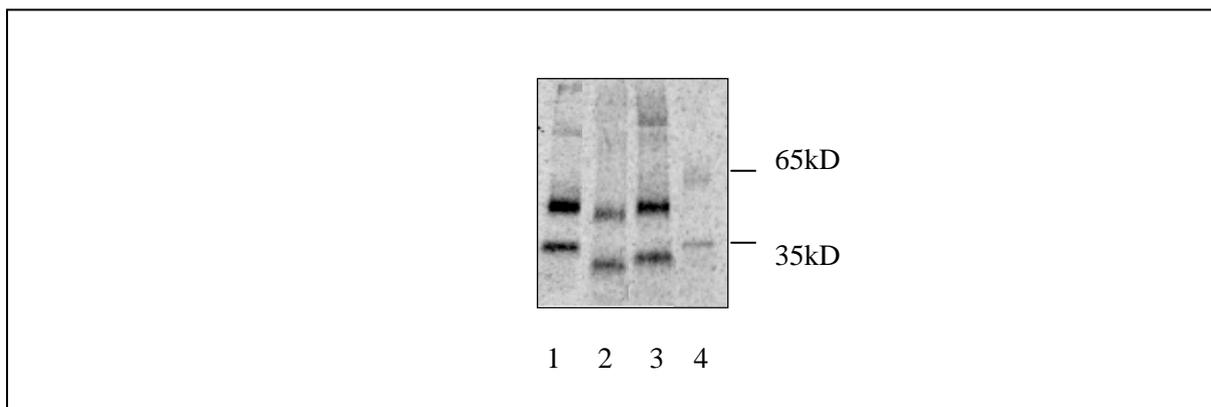


Abb.12: Phosphor Screen der Co-Immunopräzipitation von rpt-1 mit den Interaktionsklonen eif3, Katalase und Bif-1. Der pull-down erfolgte mit dem rpt-1 Antikörper. **Bahn 1:** Katalase und rpt-1, **Bahn 2:** eif3 und rpt-1, **Bahn3:** Bif1 und rpt-1. **Bahn 4 :** p53 + T-Antigen (Positivkontrolle), pull-down mit rpt-1-Antikörper. Mit dem rpt-1 Antikörper lassen sich die Interaktionen zwischen rpt-1 und den Interaktionsklonen nachweisen.

Die in Abbildung 12 gezeigten Ergebnisse bestätigen die mit dem c-myc Antikörper detektierten Interaktionen (Abb.9 A). Mit dem rpt-1 Antikörper lassen sich im Co-Immunopräzipitationsexperiment die Interaktionen zwischen den Klonen Katalase (Abb.12, Bahn 1), eif3 (Abb.12, Bahn 2), Bif-1 (Abb.12, Bahn 3) und rpt-1 nachweisen.

Damit konnten die im Two-Hybrid Screen gefundenen putativen Interaktionspartner von rpt-1, (eif3, Bif-1, Katalase) mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden.

3.6 Transfektionen eukaryotischer Zellkulturen mit rpt-1 Expressionskonstrukten

Für die transiente Transfektionen von HeLa, Cos-7, HepG2 und HaCat Zellen wurde rpt-1 in den Expressionsvektor pEGFP-C1 (welcher das Green-Fluorescence Protein exprimiert) und den Überexpressionsvektor pCMV6 umkloniert. Nach der Klonierung wurde die Plasmid-DNA über *EcoRI/XhoI*-Restriktion kontrolliert. Die Midi-Präparation der positiven Klone diente als Ausgangsmaterial der anschließenden Versuche.

3.6.1 Transfektion von HeLa , HepG2 und Cos-7 Zellen mit pEGFP-rpt-1

Bei der transienten Transfektion der Zelllinien HeLa, HepG2 und Cos-7 mit dem Green-Fluorescence Protein (GFP), wurde zunächst durch die Transfektion des leeren Vektors pEGFP-C1, die Expression und Verteilung des GFP in den verschiedenen Zelllinien überprüft.

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse dieser Kontrolluntersuchungen dargestellt. HeLa-Zellen (Abb.13 A) und Cos-7 Zellen (Abb.13 C) zeigen im Durchlichtbild (Abb.13 A1 bzw. 13 C1) normales konfluentes Wachstum ohne erkennbare morphologische Veränderungen. Die Fluoreszenzbilder (Abb.13 A2 und 13 C2) lassen eine intensive und diffus verteilte Fluoreszenz in beiden Zelllinien erkennen.

In Hep G2-Zellen (Abb.13 B), ist die Fluoreszenz deutlich geringer (Abb.13 B2), aber ebenfalls diffus über die gesamte Zelle verteilt. Das Durchlichtbild (Abb.13 B1) lässt keine morphologischen Veränderungen erkennen. Das Wachstum ist normal.

Da in den nachfolgenden Versuchen die Expression von rpt-1 zeitabhängig über 24h nach Transfektionsstop beobachtet werden soll, wurden die Kontrollen 24h nach Transfektionsstop fixiert um sicherzustellen, dass die Versuchsdauer keinen Einfluss auf Morphologie und Wachstum der Zellen hat.

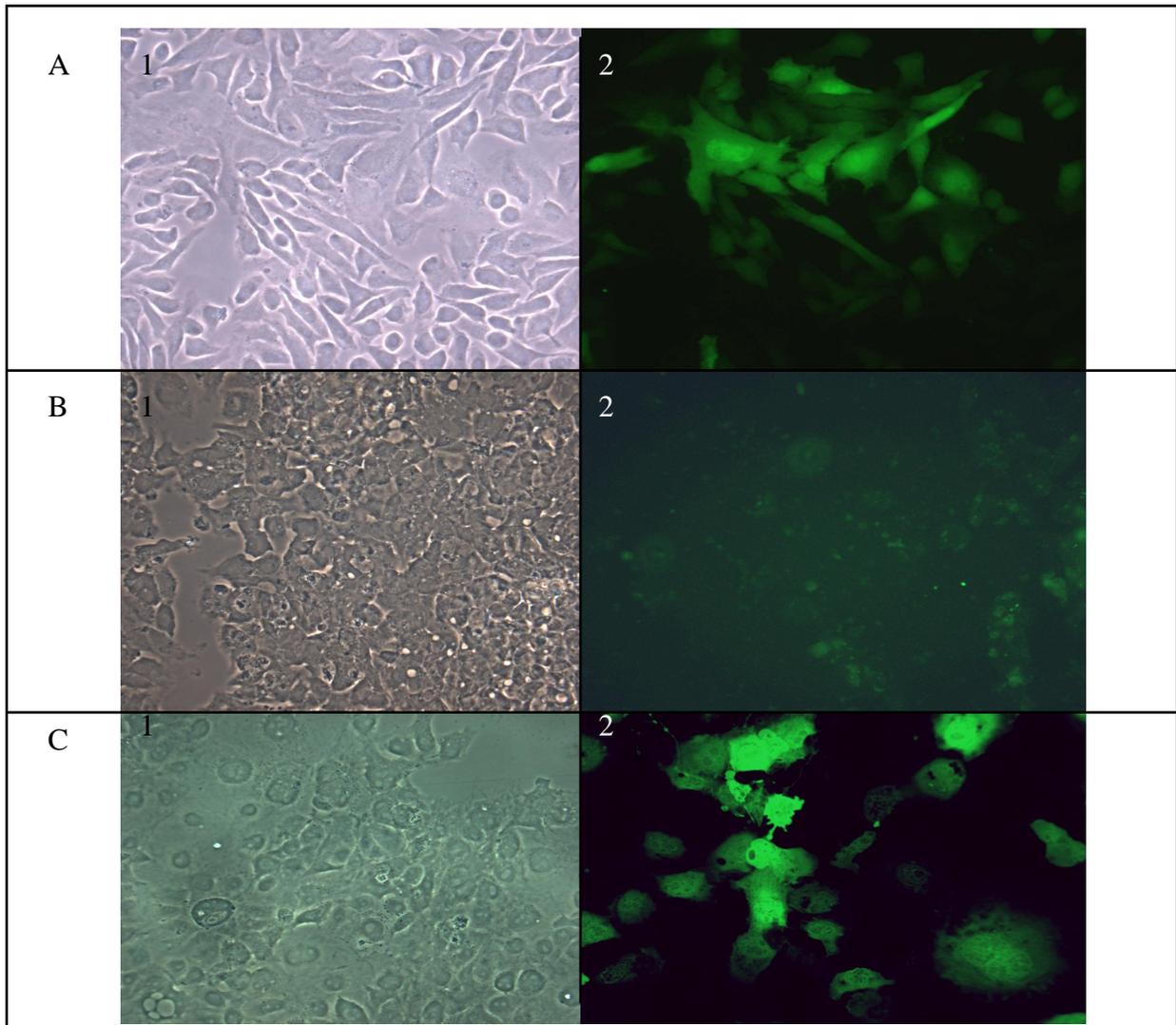


Abb.13: Transiente Transfektion von HeLa-, HepG2-, und Cos-7-Zellen mit dem leeren pEGFP-C1-Vektor. (Leervektorkontrolle) **A:** HeLa Zellen, 1-Durchlichtbild, 2-Fluoreszenzbild. **B:** HepG2-Zellen, 1-Durchlichtbild, 2-Fluoreszenzbild **C:** Cos-7-Zellen, 1-Durchlichtbild, 2-Fluoreszenzbild Das Durchlichtbild zeigt bei allen Zelllinien normales konfluentes Wachstum. Die Fluoreszenz ist in den Zellen unterschiedlich intensiv, jedoch lässt sich in allen Zelllinien eine diffuse Verteilung der Fluoreszenz erkennen. Vergrößerung 40.000x, Fixierung 24h nach Transfektionsstop.

Die mit dem Konstrukt pEGFP-rpt-1 transfizierten Zelllinien, Hela, HepG2 und Cos-7 wurden über einen Zeitraum von 48h nach Transfektionsstop beobachtet. Hierzu wurden zu den Zeitpunkten 0h (bei Transfektionsstop), 2h, 4h, 6h, 12h, 24h und 48h nach Transfektionsstop die entsprechenden Ansätze fixiert.

Die Auswertung der Durchlichtaufnahmen (Abb.14) ergab, dass durch die transiente Transfektion von pEGFP-rpt-1 in den Zelllinien Hela und HepG2 eine zeitabhängige Zellzahlabnahme festzustellen ist. In Hela Zellen konnte 24h nach Transfektionsstop die Auflösung des Zellverbandes beobachtet werden, während bei HepG2 Zellen bereits bei Transfektionsstop (0h) eine Lockerung des Zellverbandes sichtbar ist. In Cos-7 Zellen hingegen konnte über den beobachteten Zeitraum keine Veränderung der Zelldichte festgestellt werden.

Weiterhin zeigen die Durchlichtaufnahmen in Abbildung 14 morphologische Veränderungen in Hela und HepG2 Zellen. Die Zellen erscheinen deutlich kleiner als in den Kontrollansätzen (Abb.13). Cos-7 Zellen zeigten dagegen keine morphologischen Veränderungen.

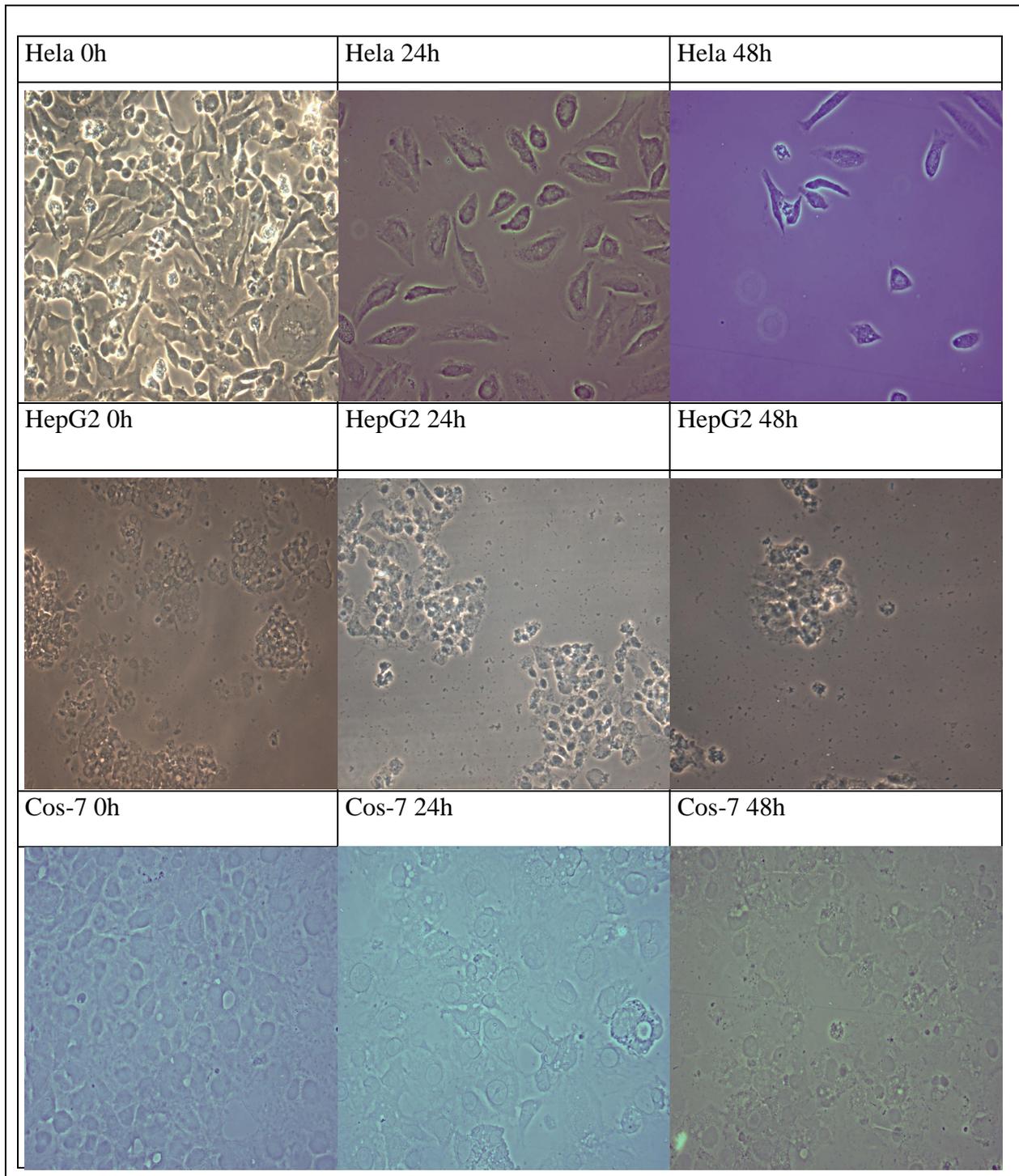


Abb.14: Zeitabhängige Transfektion von Hela-, HepG2-, und Cos-7-Zellen mit pEGFP-rpt-1. Durchlichtaufnahmen. Vergrößerung 40.000x. Die Fixierung erfolgte 0h, 12h und 48h nach Transfektionsstop. Zu beobachten ist die zeitabhängige Verringerung der Zelldichte bei Hela und HepG2 Zellen, sowie morphologische Veränderungen. Bei Cos-7 Zellen ist über diesen Zeitraum keine Veränderung in Morphologie und Zellzahl feststellbar.

Die fluoreszenzmikroskopischen Auswertungen ergaben in allen Zelllinien eine zeitabhängige rpt-1 Expression (Abb.15, 15-1 und 15-2).

In Hela-Zellen (Abb.15) ist 6h und 12h nach Transfektionsstop eine deutliche Zellschädigung erkennbar. Die Durchlichtaufnahmen (Abb.15, A u. D) zeigen deutlich geschrumpfte Zellen, in denen zum Teil Chromatinverdichtungen erkennbar sind. Zu diesem Zeitpunkt sind fluoreszenzmikroskopisch deutlich „Spots“ zu beobachten, die auf eine rpt-1 Expression hindeuten (Abb.15, B und E). 6h nach Transfektionsstop (Abb.15, B) lässt sich vereinzelt im Cytoplasma rpt-1 Expression erkennen. Durch die Überlagerung des Fluoreszenzbildes und der Höchst Kernfärbung, wird dies verdeutlicht (Abb.15, C).

12h nach Transfektionsstop ist die Fluoreszenz komplett aus dem Kern gewichen (Abb.15, E). Die Fluoreszenz im Cytoplasma weist nur noch vereinzelt „Spots“ auf, und ist meistens intensiv und homogen erscheinend.

In den Zeitabschnitten 0h–4h nach Transfektionsstop, konnte in Hela Zellen nur sehr vereinzelt rpt-1 Expression im Cytoplasma beobachtet werden. In fast allen Zellen war eine beginnende rpt-1 Expression erst 6h nach Transfektionsstop erkennbar (Abb.15, B) und steigerte sich bis 12h nach Transfektionsstop (Abb.15, E). Danach verringerte sich die rpt-1 Expression. Zu diesem Zeitpunkt war der Zellverband aufgelöst und eine erhebliche morphologisch nachweisbare Schädigung der Zellen erkennbar (Abb. 14)

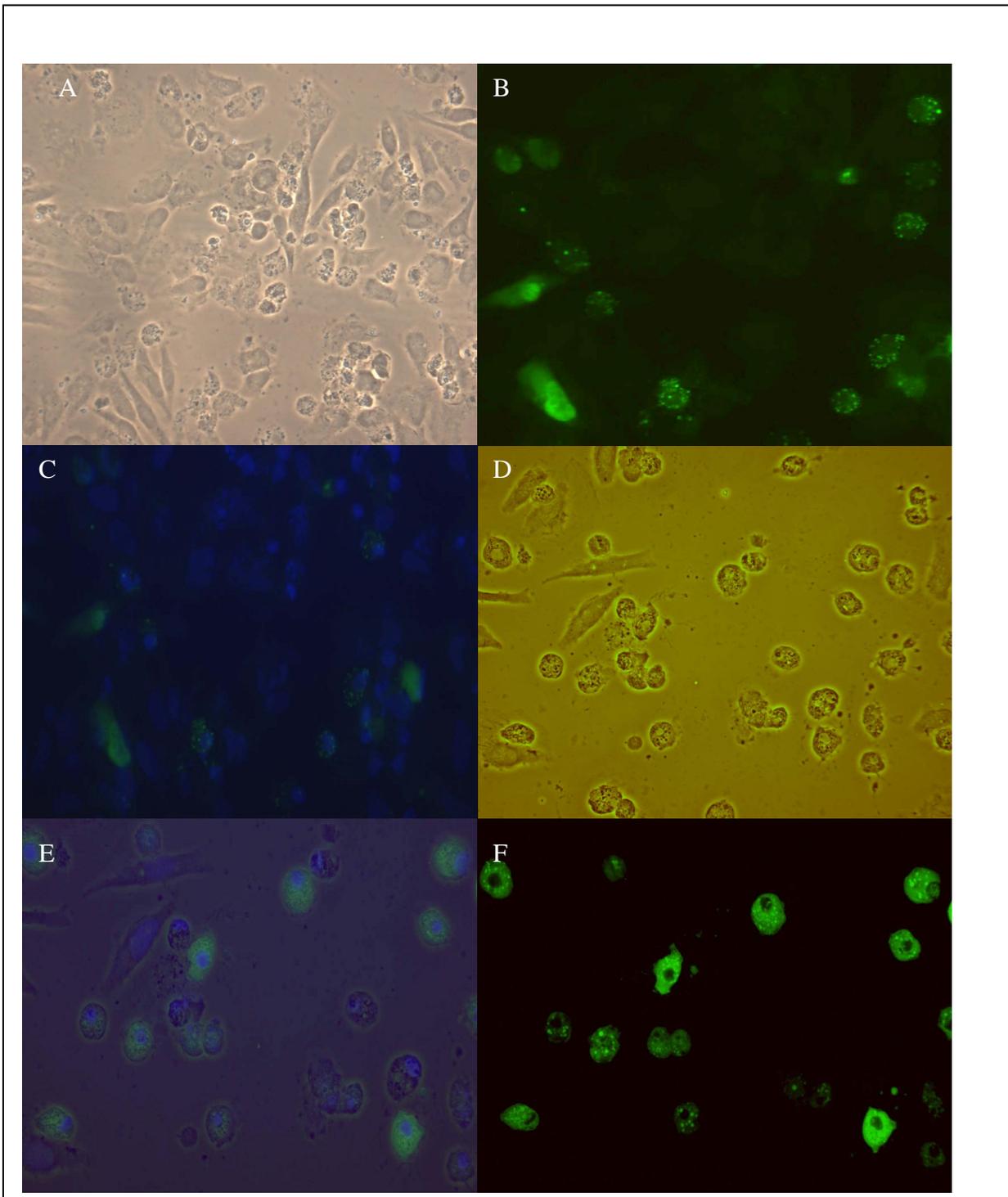


Abb.15 Transiente Transfektion von HeLa Zellen mit pEGFP-rpt1. Fixierung 6h (A-C) und 12h (D-F) nach Transfektionsstop, Vergrößerung 20.000x. **A:** Durchlichtbild, 6h. Zellen schrumpfen und lassen teilweise Chromatinverdichtungen erkennen. **B:** Fluoreszenzbild, 6h. Die rpt-1 Expression wird vereinzelt im Cytoplasma sichtbar. **C:** Überlagerung des Höchst- und des Fluoreszenzbildes, 6h. Durch die Überlagerung der beiden Bilder wird die Expression im Cytoplasma verdeutlicht. **D:** Durchlichtbild, 12h. Deutlich geschädigte Zellen erkennbar. Zellen geschrumpft mit sichtbarer Chromatinkondensation und unregelmäßiger Membran. **E:** Überlagerung des Höchst- und Fluoreszenzbildes (12h) macht die Expression im Zytoplasma der Zellen deutlich. Die ausgesparten Bereiche der Zellen (Bild F) werden hier als Kerne erkennbar. **F:** Fluoreszenzbild.(12h) Expression von rpt-1 im Zytoplasma. Der Kern erscheint als „Loch“.

Durch die transiente Transfektion der HepG2 Zellen mit pEGFP-rpt-1 ist eine Abnahme der Zellzahl über einen Zeitraum von 0h-24h nach Transfektionsstop erkennbar. Die Zellzahl ging bis 48h nach Transfektionsstop soweit zurück, dass nur noch vereinzelt Zellen zu beobachten waren.

Eine deutliche Verringerung der Zellzahl ist bereits 2h nach Transfektionsstop in der Durchlichtaufnahme erkennbar (Abb.15-1, A). Die Fluoreszenzaufnahmen lassen lediglich den Schluss zu, dass die Fluoreszenz bei rpt-1 transfizierten Zellen stärker ist als bei der Leervektorkontrolle (Abb.13, B). Eine Aussage zur Lokalisation von rpt-1 kann nicht getroffen werden. Jedoch war die stärkste Fluoreszenz 2h nach Transfektionsstop zu beobachten (Abb.15-1, B).

Die Höchst Kernfärbung zeigte erstmals Chromatinverdichtungen 0h nach Transfektionsstop, die 2h und 4h nach Transfektionsstop verstärkt wurde (ohne Abb.). HepG2 Zellen reagieren im Gegensatz zu Hela Zellen, viel früher auf morphologische Veränderungen nach transienter Überexpression von rpt-1. Bereits nach 2h ist die Verringerung der Zellzahl signifikant und die rpt- 1 Expression am höchsten. Abb.15-1 zeigt die Durchlicht- und die Fluoreszenzaufnahme zu diesem Zeitpunkt.

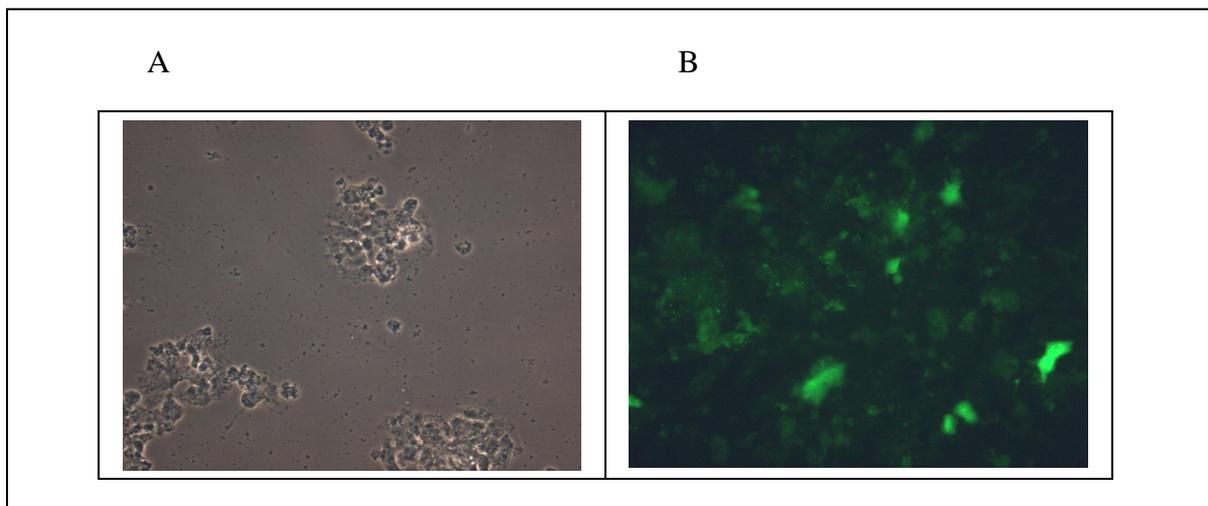


Abb.15-1: Transiente Transfektion von HepG2-Zellen mit pEGFP-rpt-1. Fixierung 2h nach Transfektionsstop. Vergrößerung 40.000x. Bild A: Durchlichtaufnahme. Bild B: Fluoreszenzbild.

Bereits 2h nach Transfektionsstop hat sich die Zellzahl deutlich verringert und der Zellverband gelockert. Die Fluoreszenzaufnahmen geben keinen Aufschluss über die Lokalisation der rpt-1 Expression. Die Intensität der Fluoreszenz ist höher als bei den Kontrollen, was auf eine rpt-1 Expression hindeutet.

Die Transfektion von Cos-7 Zellen ergibt ein anderes Bild. Die Zellzahl verringert sich über den beobachteten Zeitraum nicht. Die Expression von rpt-1 hat 6h-12h nach Transfektionsstop ihr Maximum erreicht. Die Lokalisation von rpt-1 beschränkt sich bei Cos-7 Zellen ausschließlich auf den Kern und die Kernmembran. Abbildung 15-2 zeigt die Expression von rpt-1 in Cos-7 Zellen 6h und 12h nach Transfektionsstop (Abb.15-2, A, B und C). Eindeutig zu erkennen ist die rpt-1 Expression im Kern und in der Kernmembran. Dies wird durch die Überlagerung der Höchst Kernfärbung und der Fluoreszenzaufnahme verdeutlicht (Abb.15-2, B). Der Kern selbst scheint im Vergleich zu den Kernen untransformierter Zellen vergrößert und die Struktur aufgelockert. Die Fluoreszenz hat sich diffus den Kern verlagert (Abb.15-2, C).

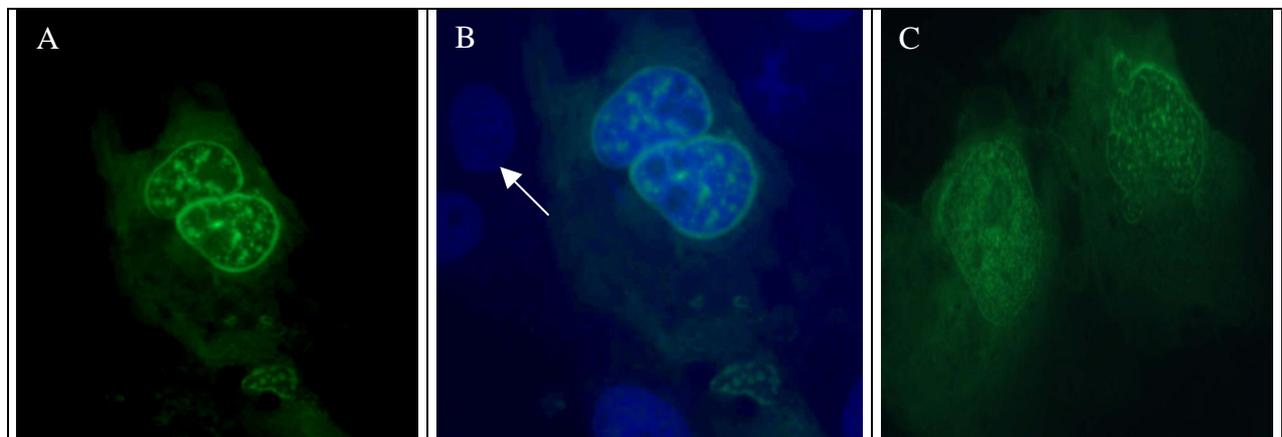


Abb 15-2: Transiente Transfektion von Cos-7 Zellen mit pEGFP-rpt-1. Vergrößerung 100000x (Öl-Immersion), Fluoreszenzaufnahmen.

A: rpt-1 transfizierte Cos-7 Zellen, 6h nach Transfektionsstop **B:** rpt-1 transfizierte Cos-7 Zellen, 6h nach Transfektionsstop, Überlagerung Höchst-Kernfärbung und Fluoreszenzaufnahme. **C:** rpt-1 transfizierte Cos-7 Zellen, 12h nach Transfektionsstop
Deutlich erkennbar ist die rpt-1 Expression im Kern und der Kernmembran. Die stärkste Expression findet, wie auch bei Hela Zellen zwischen 6h-12h nach Transfektionsstop statt. Der Kern transfizierter Zellen erscheint Größer und die Struktur aufgelockert als bei untransfizierten Zellen (Bild, B Pfeil).

0h (bei Transfektionsstop), war bei Cos-7 Zellen noch keine rpt-1 Expression feststellbar. 24h nach Transfektionsstop war die rpt-1 Expression bereits vollständig abgeklungen.

Die Fluoreszenz in den Kontrollansätzen erscheint bei allen Zelllinien diffus über die gesamte Zelle verteilt. Morphologische Veränderungen und eine Verringerung der Zelldichte konnte durch die Transfektion des leeren Vektors sowie durch die Versuchsdauer nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten der Transfektionsversuche mit dem Konstrukt pEGFP rpt-1, dass in HeLa und HepG2 Zellen morphologische Veränderungen, sowie eine Auflockerung des Zellverbandes zu beobachten ist. In Cos-7 Zellen konnten nach pEGFP-rpt-1 Transfektion keine Veränderungen beobachtet werden.

3.7 Messung der LDH- Aktivität in rpt-1 transfizierten HeLa Zellen

Da die Transfektionen von pEGFP-rpt-1 einen Einfluß auf die Morphologie und die Lebensdauer von HeLa Zellen zeigten, wurde ein Lactat-Dehydrogenase (LDH) Microassay durchgeführt, um einen zytotoxischen Effekt von rpt-1 bzw. des Transfektionsgemisches auszuschließen. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der zeitabhängigen Messung der LDH-Aktivität von pEGFP-rpt-1 transfizierten HeLa Zellen. Die LDH-Aktivität der untransformierten Kontrolle und der mit dem leeren pEGFP-C1 Vektor transformierten Kontrolle unterscheiden sich nicht, so dass eine zytotoxische Wirkung durch den Transfektionsvorgang ausgeschlossen werden kann.

Ebenso unterscheidet sich die Aktivität der LDH in rpt-1 transfizierten Zellen auch 6h-12h nach Transfektionsstop nicht von den Kontrollen. Nach 24h ist ein leichter Anstieg der LDH Aktivität erkennbar.

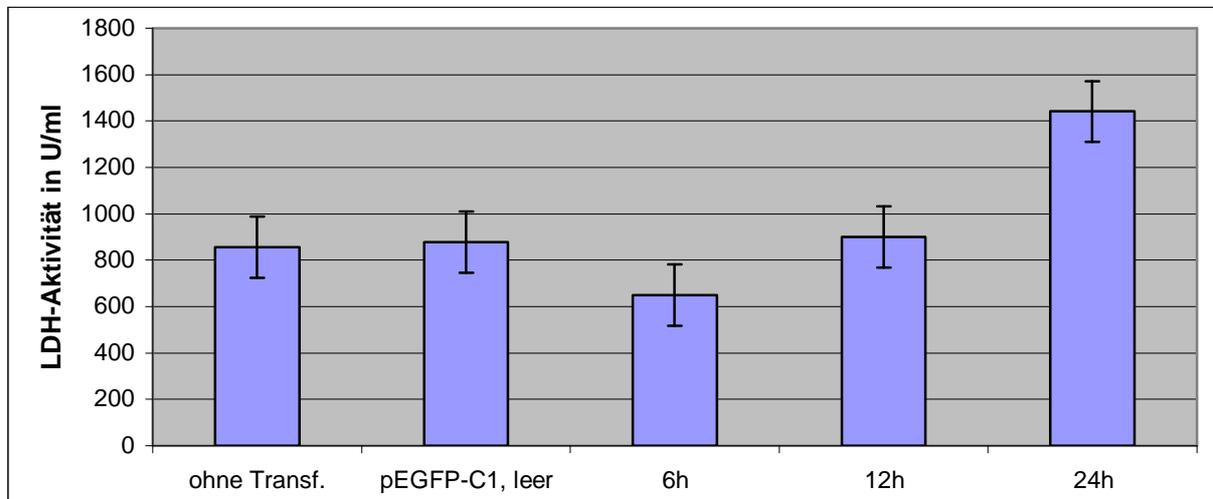


Abb.16: Zeitabhängige Messung der LDH-Aktivität in U/ml in pEGFP-rpt-1 transformierten Hela Zellen. Trotz erkennbarer geschädigter Zellen zu den Zeitpunkten 0h-12h, ist keine Erhöhung der LDH-Aktivität gegenüber den Kontrollen messbar. Dies bedeutet, dass kein zytotoxischer Effekt vorliegt. Nach 24h ist eine geringe Erhöhung der Aktivität messbar. Der Zeitpunkt 0h (bei Transfektionsstop) konnte nicht gemessen werden, da das zu diesem Zeitpunkt noch im Medium vorhandene Transfektionsgemisch die Messung der LDH stört. Die Proben „ohne Transfektion“ und „pEGFP-C1, leer“ wurden nach 6h, 12h und 24h gemessen und der Mittelwert aufgetragen.

3.7.1 Einfluß des pCMV-rpt-1-Konstruktes auf die LDH-Aktivität von Hela Zellen

Um einen zytotoxischen Effekt des pCMV-rpt-1 Konstruktes ausschließen zu können, wurden über einen Zeitraum von 0h-24h nach Transfektionsstop LDH-Aktivitätsmessungen durchgeführt.

In Abbildung 16-1 sind die Ergebnisse der zeitabhängigen Messung der LDH-Aktivität in pCMV-rpt-1 transfizierten Hela Zellen dargestellt. Es ist ein leichter Anstieg der LDH Aktivität in transfizierten Zellen gegenüber den untransfizierten Kontrollen zu beobachten. Die Expression von rpt-1 nimmt keinen Einfluss auf die LDH-Aktivität transfizierter Hela-Zellen, da von 0h bis 12h nach Transfektionsstop die LDH-Aktivität auf Kontrollniveau bleibt. Dadurch lässt sich ein zytotoxischer Effekt durch transiente Expression des Konstruktes ausschließen.

Ein geringer Anstieg war lediglich 24h nach Transfektionsstop feststellbar.

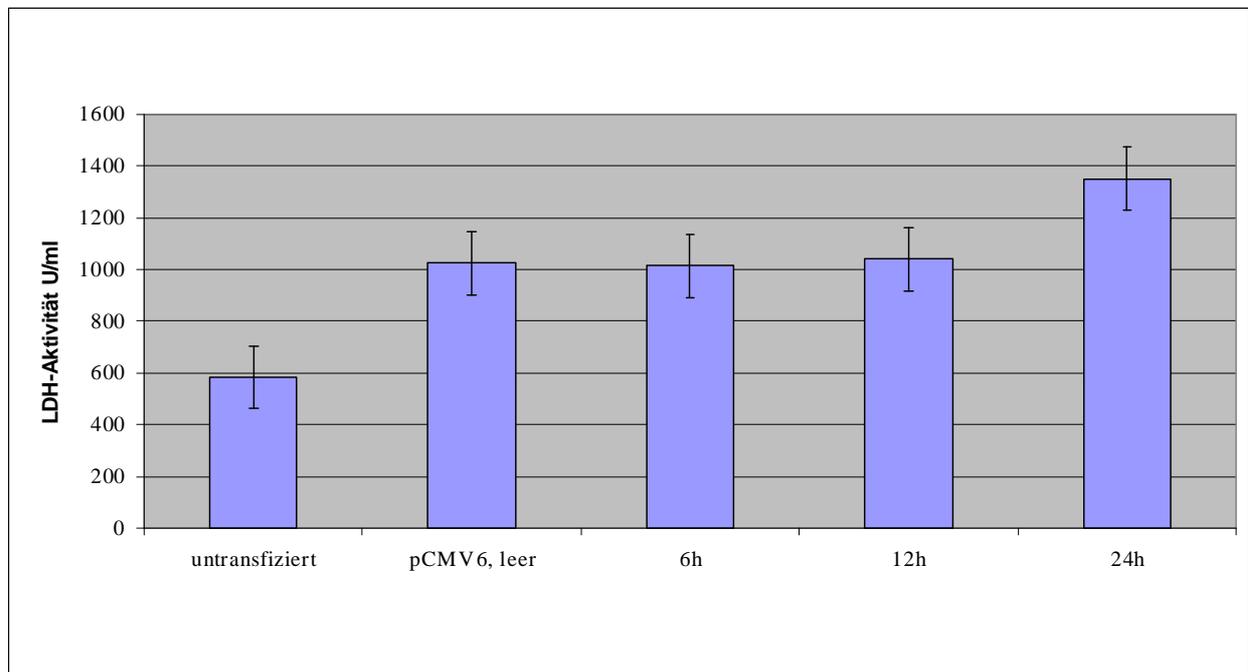


Abb.16-1: Zeitabhängige Messung der LDH-Aktivität in pCMV-rpt-1 transfizierten HeLa Zellen, angegeben in U/ml. Die LDH-Aktivität ist bei transfizierten Zellen geringfügig höher als bei der untransfizierten Kontrolle. In den rpt transfizierten HeLa-Zellen ist die LDH-Aktivität nach 6h und 12h genauso hoch wie in der Leervektorkontrolle (pCMV6, leer). Nach 24h ist ein leichter Anstieg der LDH-Aktivität erkennbar (vergl. auch Abb.19). Die Proben „untransfiziert“ und „pCMV6, leer“ wurden nach 6h, 12h und 24h gemessen und der Mittelwert aufgetragen.

3.7.2 LDH-Messung bei rpt-1 transfizierten HepG2- und Cos-7 Zellen.

Die Messung der LDH-Aktivität transfizierter HepG2 und Cos-7 Zellen wurde zeitabhängig über den Zeitraum 0h-24h nach Transfektionsstop gemessen und parallel zu den Messungen transfizierter HeLa Zellen durchgeführt. Auch nach mehrmaliger Wiederholung des Experimentes konnten keine Aktivitätserhöhungen in HepG2 und Cos-7 Zellen gemessen werden.

Zusammenfassend zeigen die Befunde, dass in den untersuchten Zelllinien HeLa, HepG2 und Cos-7, durch die Transfektion mit rpt-1 Konstrukten keine erhöhten LDH-Aktivitäten gemessen werden konnten. Aus diesem Grunde lässt sich ein zytotoxischer Effekt von rpt-1 auf HeLa, HepG2 und Cos-7 Zellen ausschließen.

3.8 Untersuchungen zur Apoptose in rpt-1 transfizierten Zellen

Die Transfektionsstudien an HeLa und HepG2 Zellen mit rpt-1 ergaben eine Veränderung der Morphologie, sowie die Auflösung des Zellverbandes.

Da die LDH Tests keine Hinweise auf zytotoxische Einflüsse durch die transfizierten Konstrukte erkennen ließen, war zu vermuten dass Apoptose induziert wurde. Um diese Fragestellung abzuklären, wurden beide Zelllinien auf Apoptose untersucht.

3.8.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Apoptose, rpt-1 transfizierter HeLa Zellen

Lichtmikroskopisch können typische Merkmale apoptotischer Zellen abgeklärt werden. Die zelluläre Apoptose wird optisch in sechs Stufen eingeteilt: Die erste Stufe zeigt geschrumpfte Zellen, die teilweise Chromatinverdichtungen aufweisen (Abb.17-1, B). Die zweite Stufe zeichnet sich durch das Auftreten unregelmäßig geformter Membranen aus, die teilweise blasenförmig ausgestülpt sind. Diese Stufe wird auch als „Blebbing Prozess“ oder „Zeiose“ bezeichnet (Abb.17-1, C). In der dritten Stufe wird die Chromatinverdichtung stärker und verlagert sich in Richtung Kern, bis es diesen schließlich umschließt (Envelope-Stadium, Abb.17-2, D). Die vierte Stufe oder das „Black hole“- Stadium ist gekennzeichnet durch die vollständige „Klumpung“ des Kerns, so dass dieser lichtmikroskopisch wie ein schwarzes Loch („Black hole“) erscheint (Abb.17-2, E). In der fünften Stufe zerfällt der Kern schließlich in kleine Fragmente, was durch die Höchst-Kernfärbung verdeutlicht werden kann (Abb.17-2, F). Die letzte Stufe schließlich zeigt nur noch die von der Zellmembran umschlossenen Zellfragmente oder „Apoptotic Bodies“ (Abb.17-3), die *in vivo* von Makrophagen aufgenommen und abgebaut werden.

In den Abbildungen 17-1, 17-2 und 17-3 sind die einzelnen Apoptosestufen in transfizierten HeLa Zellen dargestellt.

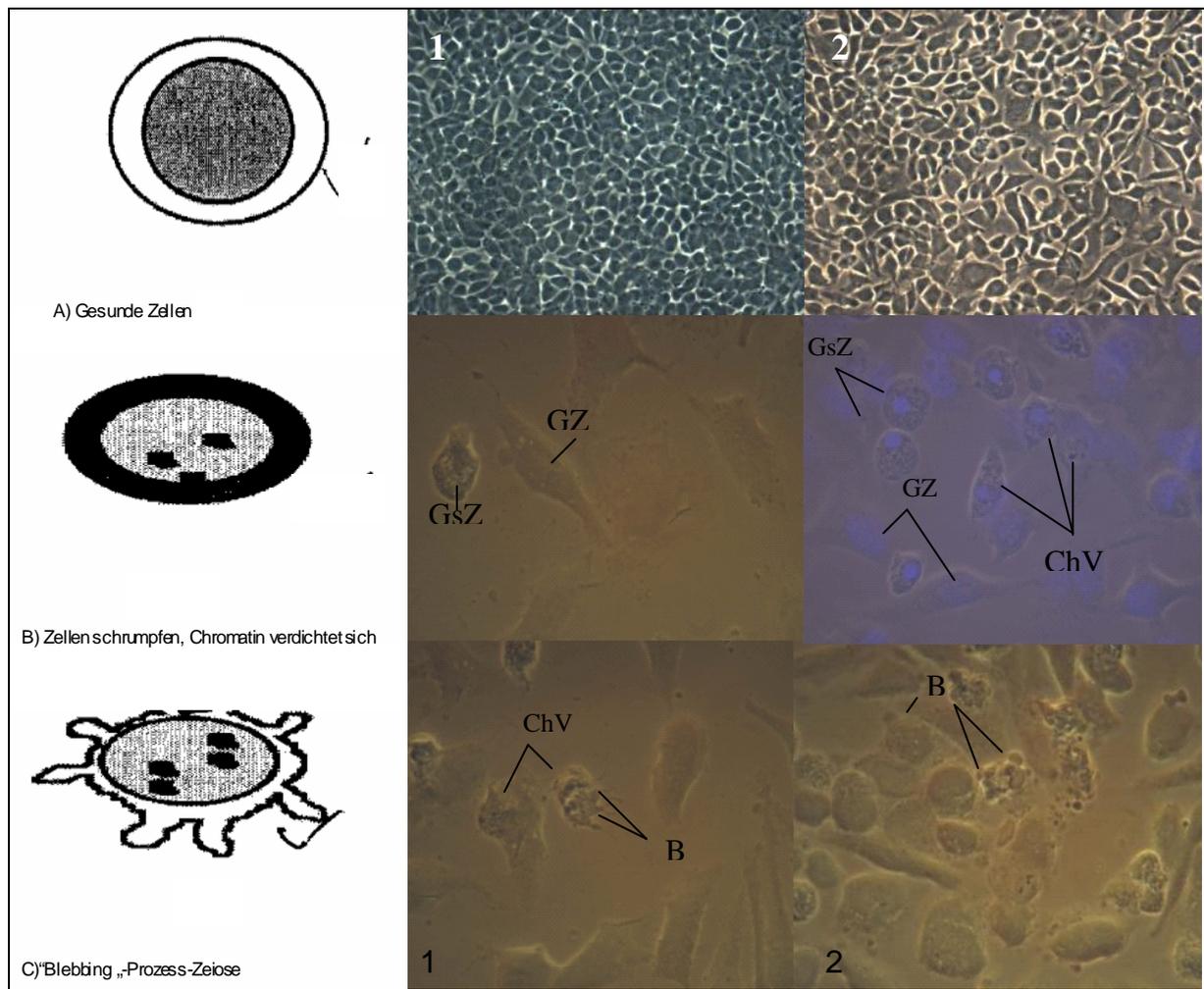


Abb.17-1: Schematische Darstellung einzelner Apoptosestufen mit licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, pEGFP-rpt-1 transfizierter HeLa-Zellen. **A) gesunde Zelle.** Bild 1: Untransformierte Zellen; Bild 2: HeLa Zellen transformiert mit leerem pEGFP-C1. Vergrößerung 20.000x **B) 1. Stufe:** Zellen schrumpfen, Chromatin verdichtet sich. Bild 1: HeLa Zellen transformiert mit pEGFP-rpt1. Durchlichtaufnahme. Vergrößerung 100.000x. Bild 2: HeLa Zellen transformiert mit pEGFP-rpt1. Höchstgefärbte Kerne und Durchlichtaufnahme überlagert. Vergrößerung 40000x. **C) 2. Stufe :** Zeiose oder „Blebbing“-Prozess. In dieser Phase der Apoptose bekommt die Membran blasenartige Ausstülpungen, das Chromatin verdichtet sich. Bild 1+2: HeLa Zellen transformiert mit pEGFP-rpt1. Durchlichtaufnahmen.

GZ: gesunde Zelle; GsZ: geschrumpfte Zelle; BM: blasenartige Ausstülpungen der Membran; ChV.: Chromatinverdichtungen

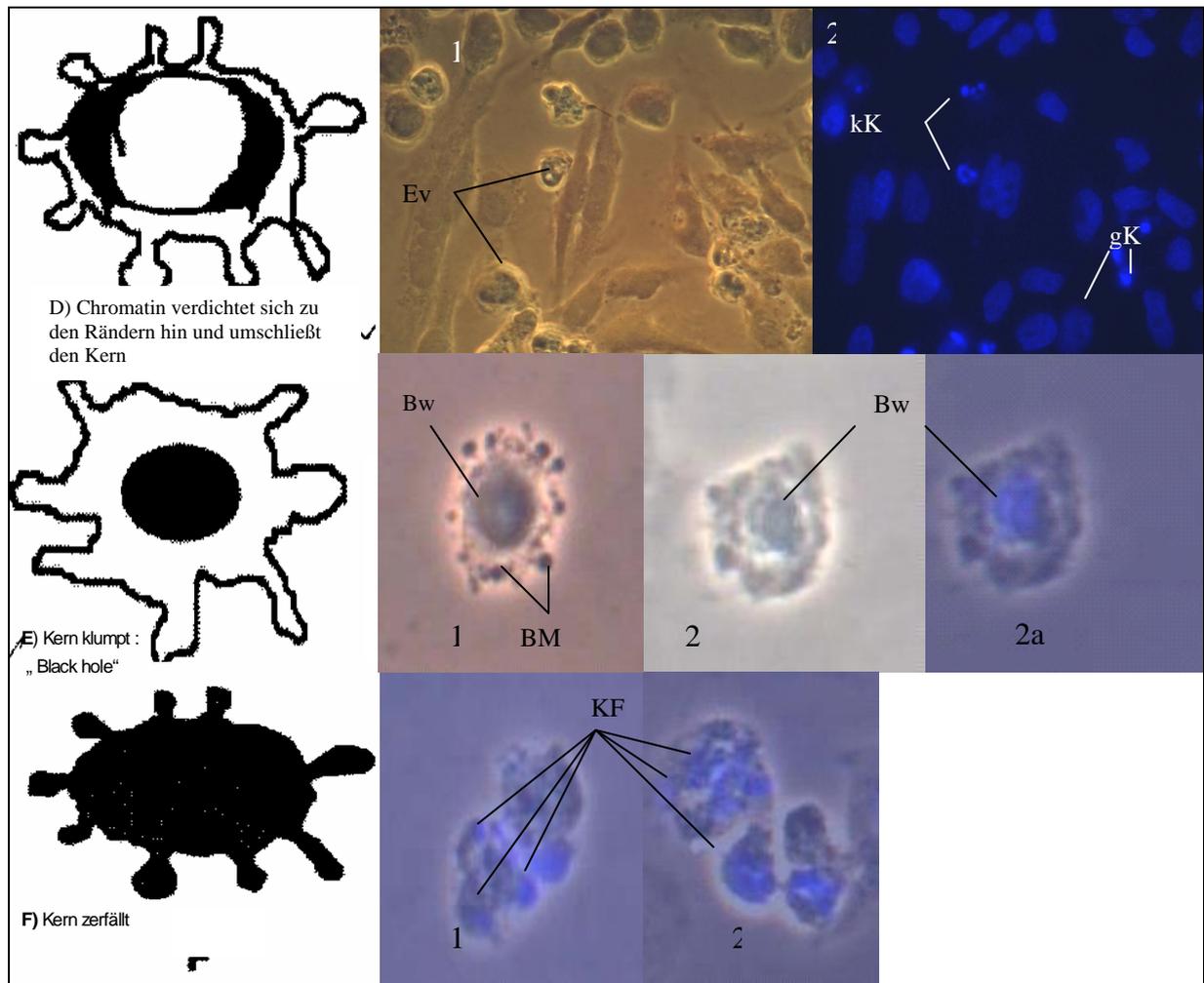


Abb.17-2: Schematische Darstellung einzelner Apoptosestufen mit licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, pEGFP-rpt-1 transfizierter HeLa-Zellen. **D) 3. Stufe:** Chromatin verdichtet sich zu den Rändern hin und umschließt den Kern = „Envelope Stadium“. Bild 1: HeLa Zellen transformiert mit pEGFP-rpt1. Durchlichtaufnahme Vergrößerung 40000x. Chromatinverdichtung um den Kern sichtbar. Bild 2: HeLa Zellen transformiert mit pEGFP-rpt1. Höchst Kernfärbung. Gefärbte Kerne weisen stark kondensierte Bereiche auf. **E) 4. Stufe:** Der Kern „klumpt“ vollständig, so dass lichtmikroskopisch der Eindruck eines „Black hole“ entsteht. Bild 1: HeLa Zellen transformiert mit pEGFP-rpt1. Durchlichtaufnahme. Deutlich erkennbar der dunkle Kern und die blasige Struktur der Zellmembran. Vergrößerung 100000x. Bild 2: Durchlichtaufnahme einer apoptotischen Zelle mit dunklem, geklumpten Kern, Bild 2a: Die gleiche Zelle mit Höchst gefärbtem Kern (überlagert mit Durchlichtaufnahme). In beiden Bildern ist die unregelmäßige Membran deutlich zu erkennen. **F) 5. Stufe:** Der stark kondensierte Kern zerfällt in kleine Fragmente. Bild 1+2: HeLa Zellen transformiert mit pEGFP-rpt1. Durchlichtaufnahmen überlagert mit Höchstfärbung der Kerne. Deutlich sind blau gefärbte Kernfragmente innerhalb der Zellen zu erkennen. Bild 1 und 2: Vergrößerte Aufnahmen einzelner Zellen.

Ev: Envelope; gK: gesunder Kern; kK: kondensierter Kern; Bw: „Black hole“; BM: blasenartige Ausstülpungen der Membran; KF: Kernfragmente

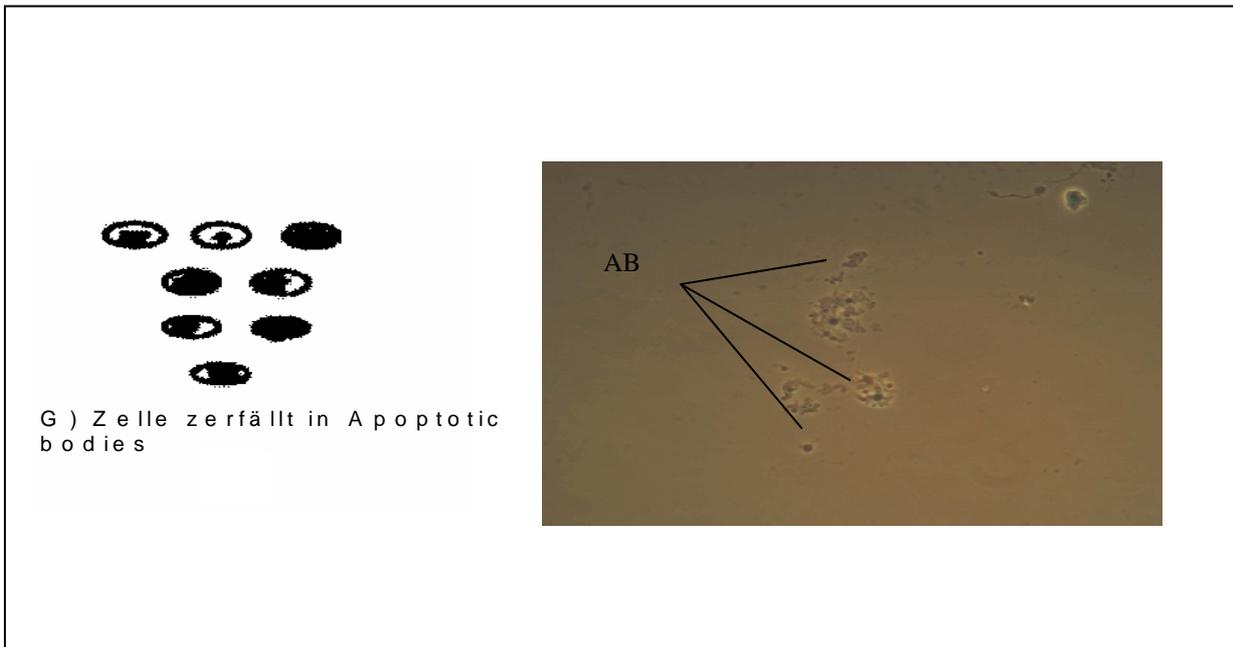


Abb.17-3: Schematische Darstellung einzelner Apoptosestufen mit licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, pEGFP-rpt-1 transfizierter HeLa-Zellen. **G) 6. Stufe:** Die gesamte Zelle zerfällt in kleine Fragmente, die von der Membran umgeben sind. Im lebenden Organismus werden diese „Apoptotic Bodies“ von Makrophagen aufgenommen und abgebaut. In Kultur platzen diese und geben ihren Inhalt in das Medium ab. Bild 1: Durchlichtaufnahme einer zerfallenden Zelle. Vergrößerung 40000x.

AB: Apoptotic Bodies

Die Abbildungen 17-1 bis 17-2 belegen, dass in rpt-1 transfizierten HeLa Zellen lichtmikroskopisch alle Apoptosestufen nachweisbar sind. In Zellen, die mit dem Leervektor transformiert wurden, ist keine Apoptose sichtbar. In Abbildung 17-1, A sind untransformierte Zellen (Bild 1) und mit dem Leervektor pGFP-C1 transformierte Zellen abgebildet (Bild 2). Die Leervektorkontrolle zeigt morphologisch keine Veränderungen gegenüber den untransformierten Kontrollen.

In HeLa Zellen wurde bei Transfektionsstop die 1. Stufe (geschrumpfte Zellen) beobachtet. Zu späteren Zeitpunkten (6h-12h) konnten die Zeiose („Blebbing Prozess“), die „Envelope Phase“ und die 4. Stufe (komplette Klumpen des Kerns) beobachtet werden. Die 5. Stufe (Kernzerfall) ließ sich überwiegend 12h nach Transfektionsstop beobachten.

Die letzte Stufe, in der die Zelle komplett in Apoptotic Bodies zerfällt, konnte nur 24h nach Transfektionsstopp beobachtet werden. Hierbei zerfällt die Zellmembran und umschließt die Zellfragmente. Im lebenden Organismus werden diese Apoptotic Bodies von Makrophagen aufgenommen und abgebaut. In der Zellkultur platzen diese und geben ihren Inhalt ins Medium ab, so dass zu diesem Zeitpunkt erhöhte Enzymaktivitäten gemessen werden können.

3.8.2 Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Apoptose in pEGFP-rpt1 transfizierten HepG2-Zellen

Da sich rpt-1 transfizierte HepG2 Zellen ähnlich verhielten wie transfizierte Hela Zellen, und auch bei dieser Zelllinie durch den LDH-Test keine Hinweise auf eine Zytotoxizität erhalten wurden, wurden die Zellen ebenfalls zunächst lichtmikroskopisch auf Apoptose untersucht. Auch bei rpt-1 transfizierten HepG2 Zellen lassen sich lichtmikroskopisch alle sechs Apoptosestufen beobachten. In Abbildung 18 ist der zeitliche Verlauf der Apoptoseinduktion dargestellt. Es ergaben sich ähnliche Befunde wie bei den Hela Zellen.

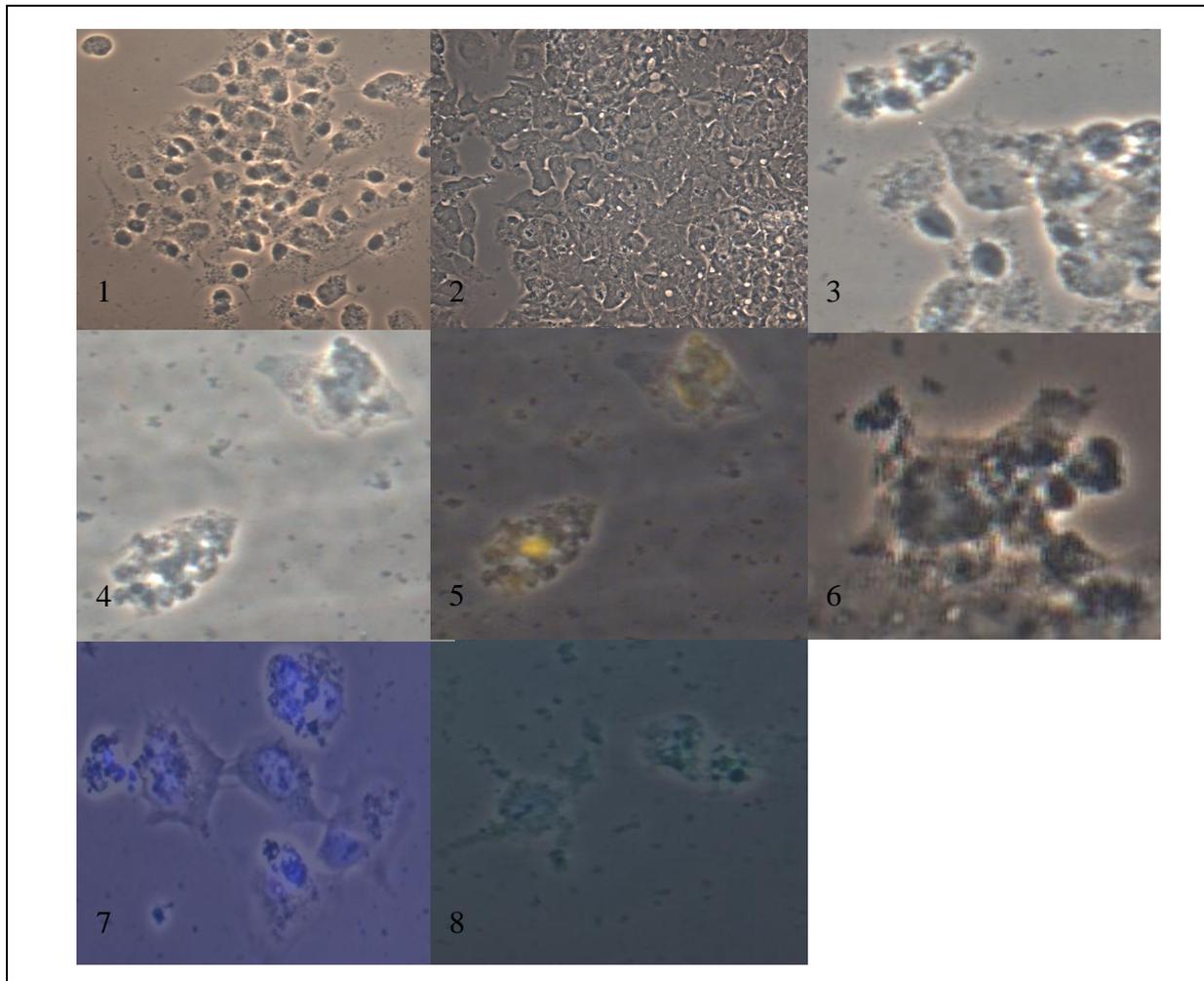


Abb.18: Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Apoptose in pEGFP-rpt1 transfizierten HepG2-Zellen. Bild 1 und 2: Leervektorkontrolle. Zellen normal groß, zeigen normales Wachstum.. Bild 3: Erste Stufe der Apoptose, Zellen schrumpfen. Bild 4 und 5: „Blebbing Prozess“ oder Zeiose. Bild 4 Durchlichtaufnahme, Bild 5 Überlagerung mit Fluoreszenzaufnahme aus Apoptose TUNEL- Assay. Apoptotischer Kern und unregelmäßige Membran sind deutlich zu erkennen. Bild 6: „Envelope“-Stadium. Das Chromatin verdichtet sich und formatiert sich um den Kern herum. Bild 7: Überlagerung Durchlichtaufnahme und der Höchst-Kernfärbung. Apoptose Stufe 4. Der Kern zerfällt in einzelne Fragmente. Bild 8: Durchlichtaufnahme. Letzte Apoptosestufe, die Zelle zerfällt in „Apoptotic Bodies“.

In HepG2-Zellen, die mit rpt-1 transfiziert wurden, lassen sich in lichtmikroskopischen Untersuchungen, die meisten Apoptosestufen nachweisen (Abb.18).

Zellschrumpfung (Bild 2), Zeiose (Bild 4 und 5), Envelope-Stadium (Bild 6) sowie der Kernzerfall (Bild 7) und der Zerfall der gesamten Zelle (Bild 8) lassen sich zu jedem Zeitpunkt im mikroskopischen Präparat nachweisen. In der Leervektorkontrolle (Bild 1 und 2) war keine dieser Stufen zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Die Zellen wurden 0h, 2h, 4h, 6h, 8h und 24h nach Transfektionsstop fixiert.

3.9 Nachweis der Apoptose mit dem TUNEL-Assay in rpt-1 transfizierten HeLa und HepG2 Zellen

Die lichtmikroskopischen Auswertungen ließen in HeLa und HepG2 Zellen Apoptosemerkmale nach rpt-1 Transfektion erkennen. Ein Apoptose TUNEL-Assay, in dem fluoreszenzmikroskopisch DNA-Strangbrüche, wie sie während der Apoptose auftreten, identifiziert werden können, sollte Aufschluss darüber geben, ob und in welchem Maße Apoptose durch rpt-1 Transfektion in HeLa und HepG2 Zellen auftritt.

3.9.1 Apoptose TUNEL-Assay mit rpt-1 transfizierten HeLa-Zellen

Da der eingesetzte Farbstoff Fluorescein grün fluoresziert, konnte das Konstrukt pEGFP-rpt-1 nicht eingesetzt werden. Deshalb wurden für den Fluorescein Apoptose TUNEL-Assay HeLa Zellen mit dem Konstrukt pCMV-rpt-1 transfiziert.

Abbildung 19 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen transfizierter HeLa Zellen 0h (Bild D) -24h (Bild G) nach Transfektionsstop. Es ist eine zeitabhängige Steigerung der Apoptoserate in rpt-1 transfizierten HeLa Zellen festzustellen (Abb.19, C-G). Die höchste Apoptoserate lässt sich 6h-12h nach Transfektionsstop erkennen (Abb.19 E+F). 24 h nach Transfektionsstop (Bild G) sind nur noch vereinzelt apoptotische Kerne im Fluoreszenzbild sichtbar, was sich durch die Abnahme der Zellzahl begründen lässt.

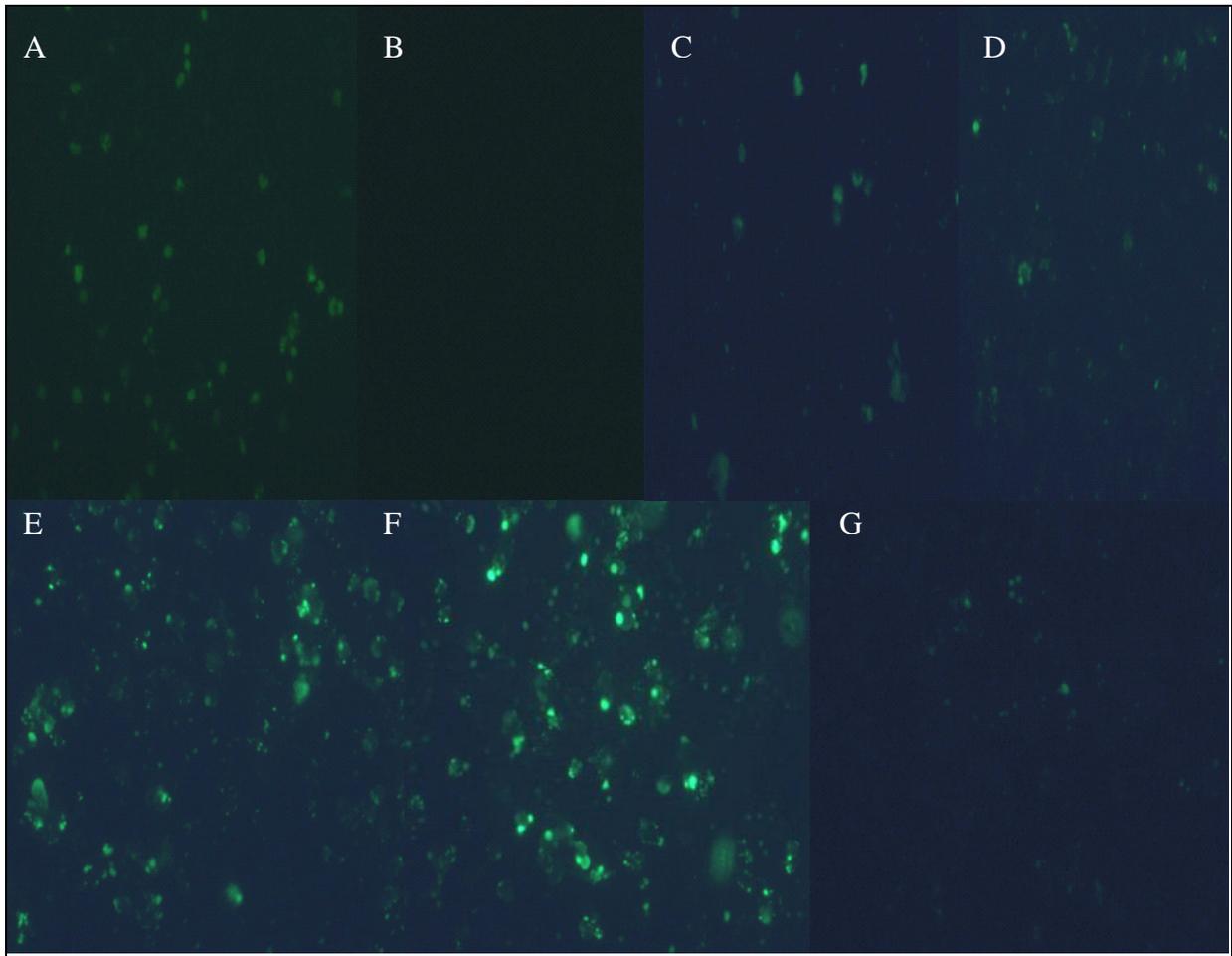


Abb.19: Apoptose TUNEL-Assay pCMV-rpt-1 transfizierter HeLa-Zellen. Fluoreszenzaufnahmen (A-G). **A:** Positivkontrolle. Untransfizierte HeLa-Zellen, bei denen durch DNase I, DNA-Strangbrüche verursacht wurden. **B:** Negativkontrolle. Unbehandelte, untransfizierte HeLa Zellen. **C:** HeLa Zellen, transfiziert mit leerem pCMV6-Vektor. **D:** HeLa Zellen + pCMV-rpt-1, fixiert bei Transfektionsstopp (0h) **E:** HeLa Zellen + pCMV-rpt-1, fixiert 6h nach Transfektionsstopp **F:** HeLa Zellen + pCMV-rpt-1, fixiert 12h nach Transfektionsstopp **G:** HeLa Zellen + pCMV-rpt-1, fixiert 24h nach Transfektionsstopp. Vergrößerung A-G 20000x. Die Apoptoserate in rpt-transfizierten HeLa Zellen ist 6h und 12h nach Transfektionsstopp am höchsten. (E+F) Nach 24 h fällt sie auf Kontrollniveau (C) zurück. Bei Transfektionsstopp (0h, D) ist die Apoptoserate vergleichbar mit der Leervektorkontrolle (C).

3.9.2 Apoptose TUNEL-Assay mit rpt-1 transfizierten HepG2-Zellen

Auch HepG2 Zellen wurden mit dem Konstrukt pEGFP-rpt-1 transfiziert und anschließend in einem TMR-Apoptose TUNEL-Assay getestet. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse dieses Tests dargestellt.

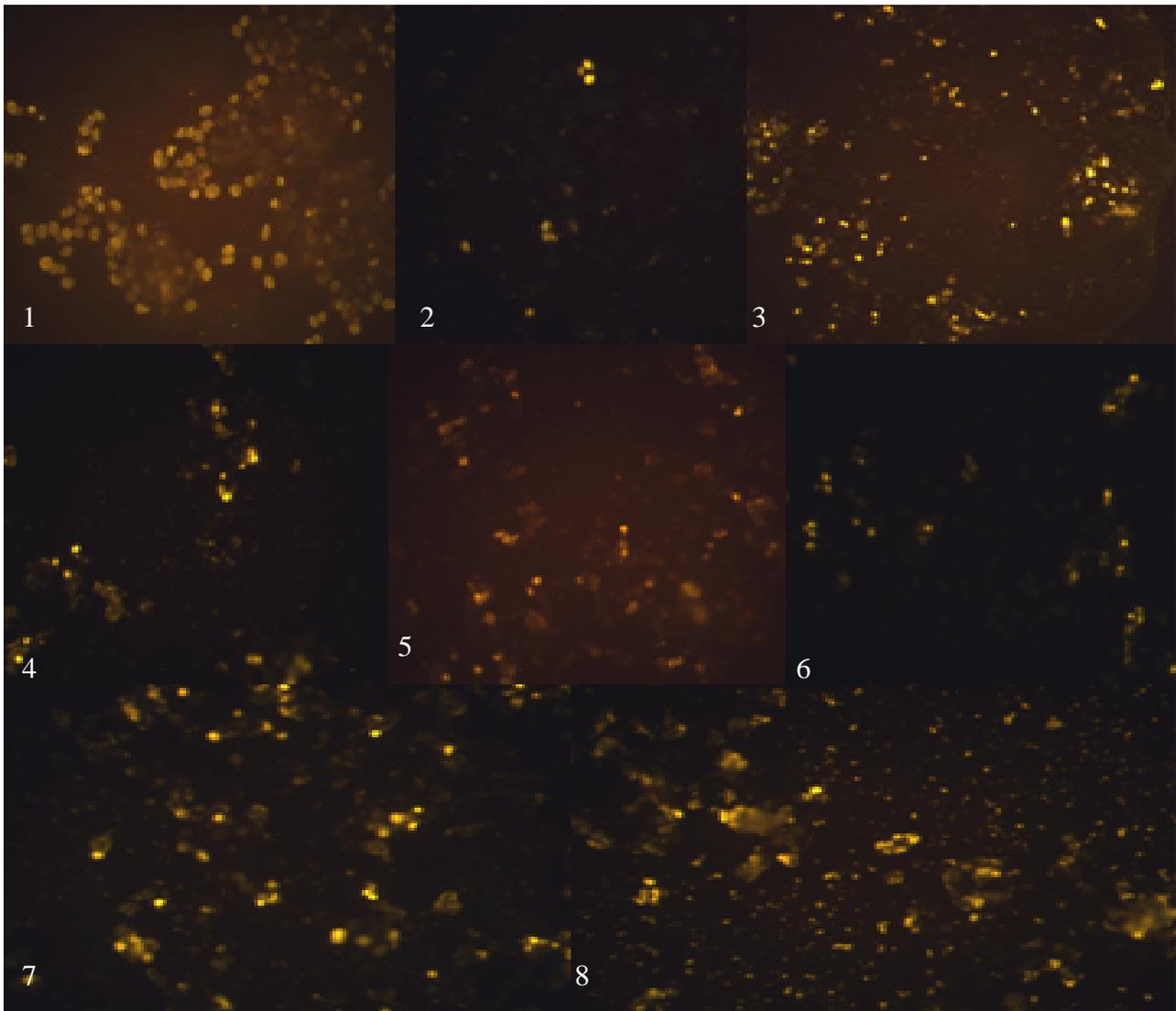


Abb.20: Fluoreszenzaufnahmen des Apoptose TUNEL-Assays in pEGFP-rpt-1 transfizierten HepG2 Zellen. Zur Unterscheidung vom Green Fluoreszenzprotein des pEGFP-C1 Vektors wurde das *In situ* Cell Death Detection Kit, TMR red verwendet. Bild 1: Positivkontrolle, Bild 2: Leervektorkontrolle, Bild 3: 0h nach Transfektionsstop, Bild 4: 2h nach Transfektionsstop, Bild 5: 4h nach Transfektionsstop, Bild 6: 6h nach Transfektionsstop, Bild 7: 8h nach Transfektionsstop, Bild 8: 24h nach Transfektionsstop.

Die Aufnahmen zeigen 0h, 8h und 24h nach Transfektionsstop eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen. 2h, 4h und 6h nach Transfektionsstop ist die Anzahl apoptotischer Zellen geringer, jedoch deutlich höher als in der Leervektorkontrolle.

In rpt-1 transfizierten HepG2-Zellen lassen sich zeitabhängig hohe Apoptoseraten nachweisen. Bereits 0h nach Transfektionsstop steigt die Apoptoserate stark an (Abb.20, 3). Ferner sind hohe Apoptoseraten 8h und 24h nach Transfektionsstop zu beobachten (Abb.20, 7 und 8). 2h, 4h und 6h nach Transfektionsstop (Abb.20 4, 5 und 6) ist eine geringere Apoptoserate feststellbar, jedoch deutlich höher als in der Leervektorkontrolle (Abb.20, 2).

Die Ergebnisse des TUNEL-Assays belegen den Verdacht der Apoptoseinduktion in rpt-1 transfizierten HepG2 und Hela Zellen. Deshalb wurde in den folgenden Studien zur Erhärtung der Befunde, weitere unabhängige Apoptosetests durchgeführt.

3.10 Caspase-3 Assay mit rpt-1-transfizierten Zellen

Caspasen sind in einer Cystein Proteasen Familie zusammengefasst und fungieren als Todes-Effektoren in verschiedenen Formen des Zelltodes. Sie liegen als inaktive Form vor und werden durch proteolytische Spaltung aktiviert. Man unterscheidet zwischen Effektor- und Initiator-Caspasen. Initiator-Caspasen übersetzen verschiedene Signale direkt in Protease-Aktivität und binden direkt an die „death inducing signaling complexes“ (DISCs). Die Effektor-Caspasen spalten unterschiedliche zytoplasmatische und nucleäre Substrate, die die typischen morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zelle hervorrufen, wie z.B. DNA-Fragmentierung, Zellschrumpfung und Verlust der Zellform bis zum Zerfall in kleine Fragmente.

Caspase-3 gehört zu den Effektor-Caspasen. Da in den bisherigen Versuchen typische Merkmale wie Zellschrumpfung, Membranveränderungen und Zerfall des Kerns und der gesamten Zelle beobachtet wurden, müsste in rpt-1 transfizierten Zellen eine Caspase-3-Aktivität messbar sein. Deshalb wurde die Caspase-3-Aktivität zeitabhängig gemessen.

3.10.1 Messung der Caspase-3-Aktivität in rpt-1 transfizierten Hela-Zellen

In Abbildung 21 ist die zeitabhängige Messung der Caspase-3-Aktivität in rpt-1 transfizierten Hela Zellen dargestellt. Gemessen wurde zu den Zeitpunkten 0h, 2h, 4h, 6h und 12h nach Transfektionsstop. Die Messung bei 405nm ergab eine Erhöhung der Caspase-Aktivität, 6h nach Transfektionsstop, auf das 4fache des Kontrollwertes. Zu früheren Zeitpunkten blieb die Caspase-3-Aktivität auf Kontrollniveau, zu späteren Zeitpunkten nahm die Caspase-3-Aktivität ab.

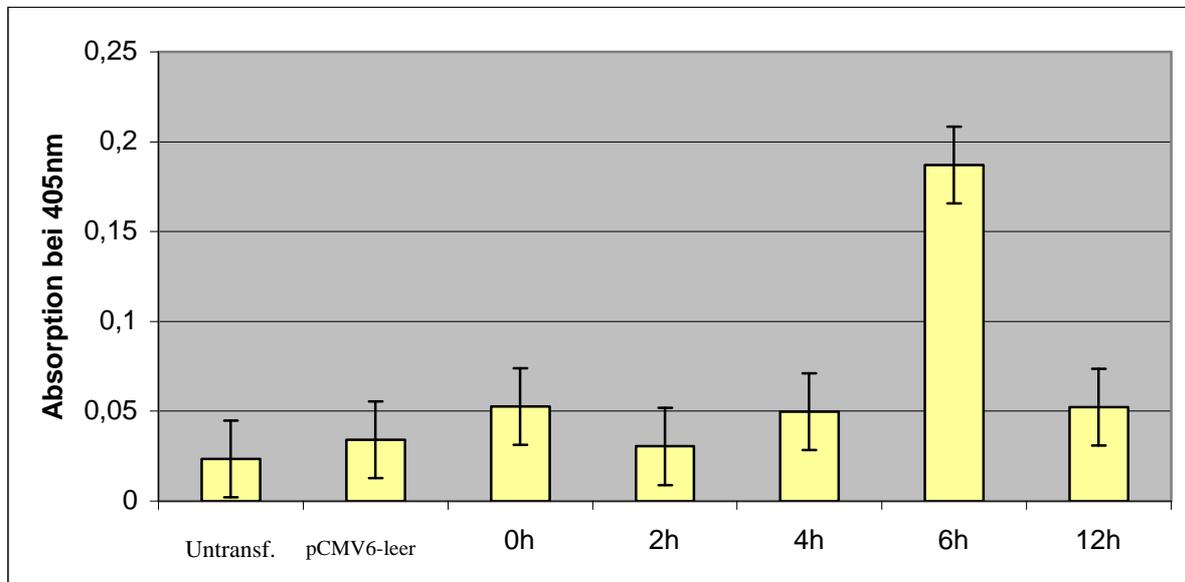


Abb. 21: Zeitabhängige Messung der Caspase-3-Aktivität in pCMV-rpt-1-transfizierten HeLa-Zellen. Gemessen wurde die Absorption bei 405nm. 6h nach Transfektionsstop steigt die Caspase-3-Aktivität auf das 4fache des Kontrollwertes an. Zu allen anderen Zeitpunkten bleibt die Caspase-Aktivität ungefähr auf Kontrollniveau.

3.10.2 Messung der Caspase-3-Aktivität in rpt-1 transfizierten HepG2-Zellen

In HepG2-Zellen wurde 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h und 24h nach Transfektionsstop die Caspase-3-Aktivität bei 405nm gemessen. Das Ergebnisse zeigt Abbildung 22.

In der Leervektorkontrolle ist eine geringfügig höhere Caspase-3-Aktivität messbar als in der untransformierten Kontrolle. Die Caspase-3-Aktivität steigt in rpt-1 transfizierten HepG2-Zellen an. 0h bis 6h nach Transfektionsstop war die Aktivität auf das doppelte der Leervektorkontrolle erhöht. 8h bis 24h nach Transfektionsstop war keine erhöhte Aktivität nachweisbar.

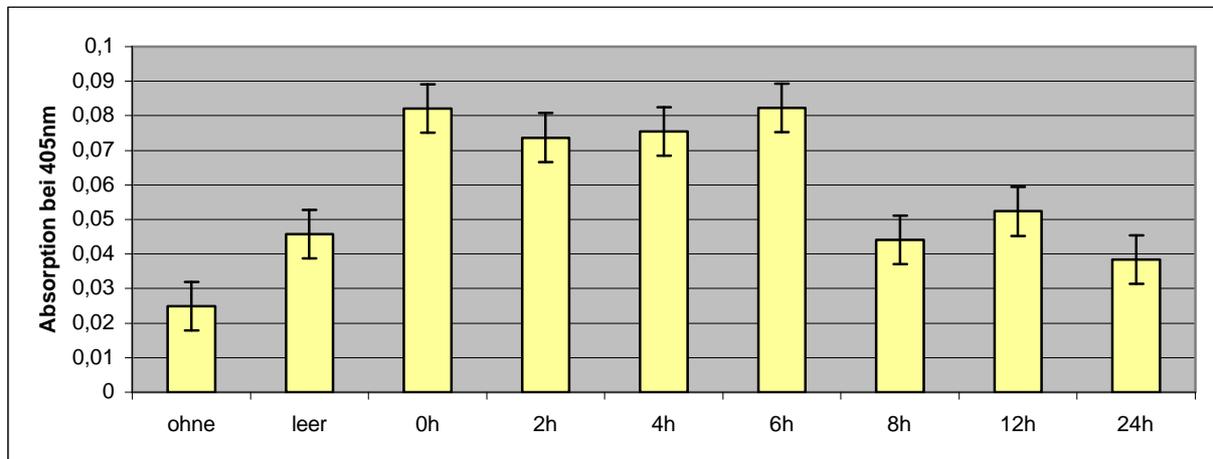


Abb.22: Zeitabhängige Messung der Caspase-3-Aktivität, in pCMV-rpt-1 transfizierten HepG2-Zellen. Gemessen wurde die Absorption bei 405nm im ELISA Reader. Die Caspase-3-Aktivität liegt in der Leervektorkontrolle (leer) geringfügig höher als in der untransfizierten Kontrolle (ohne). Von 0h bis 6h nach Transfektionsstop steigt die Caspase-3-Aktivität auf ca. den doppelten Wert der Leervektorkontrolle an. 8h-24h nach Transfektionsstop sinkt die Caspase-3-Aktivität auf das Niveau der Leervektorkontrolle zurück.

Parallel zu den Caspase-Assays wurde die rpt-1 Expression durch einen Western Blot überprüft. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse des Western Blots rpt-1 transfizierter Hela Zellen. 4h nach Transfektionsstop war eine rpt-1 Expression nachweisbar (Abb.23, Bahn 5).

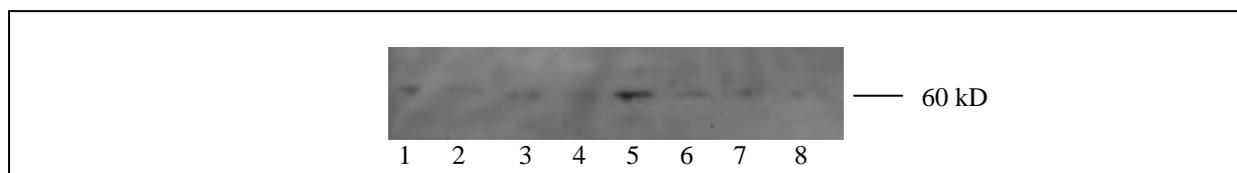


Abb. 23: Western Blot mit rpt-1-transfizierten Hela Zellen. Nachweis durch rpt-1 AK als primärer Antikörper. **Bahn 1:** untransfizierte Hela Zellen **Bahn 2:** Hela Zellen, transfiziert mit pCMV6-leer **Bahn 3:** 0h nach Transfektionsstop **Bahn 4:** 2h nach Transfektionsstop **Bahn 5:** 4h nach Transfektionsstop **Bahn 6:** 6h nach Transfektionsstop **Bahn 7:** 12h nach Transfektionsstop **Bahn 8:** 24h nach Transfektionsstop

Die Ergebnisse des Western Blots rpt-1 transfizierter HepG2 Zellen sind in Abb. 24 dargestellt. In HepG2 Zellen lässt sich eine starke rpt-1 Expression 0h und 2h nach Transfektionsstop beobachten (Abb.24, Bahn 3 und 4). Eine geringe, aber deutlich über den Kontrollen liegende Expression (Abb.24, Bahn 1 und 2), war 4h, 6h, und 8h nach Transfektionsstop sichtbar (Abb.24, Bahn 5, 6 und 7). Eine basale Expression von rpt-1 in HepG2 Zellen ist nicht feststellbar.

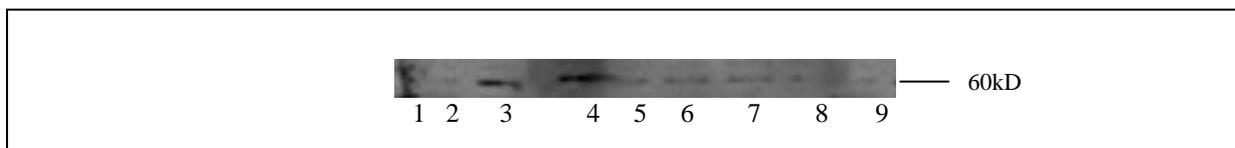


Abb.24: Western Blot pCMV-rpt-1 transfizierter HepG2-Zellen. **Bahn 1:** untransfizierte Kontrolle **Bahn 2:** Leervektorkontrolle **Bahn 3:** 0h nach Transfektionsstop **Bahn 4:** 2h nach Transfektionsstop **Bahn 5:** 4h nach Transfektionsstop **Bahn 6:** 6h nach Transfektionsstop **Bahn 7:** 8h nach Transfektionsstop **Bahn 8:** 12h nach Transfektionsstop **Bahn 9:** 24h nach Transfektionsstop

Die Befunde der Western Blot Analysen zeigen, dass eine rpt-1 Expression in HeLa und HepG2 Zellen stattfindet. In HeLa Zellen ist eine rpt-1 Expression 4h nach Transfektionsstop nachweisbar, die Caspase-3-Aktivität steigt 6h nach Transfektionsstop an. In HepG2 Zellen wurde rpt-1 0h und 2h nach Transfektionsstop exprimiert. Eine Aktivitätserhöhung der Caspase-3 ist 0h-6h nachweisbar. Damit konnte gezeigt werden, dass einer erhöhten Caspase-3-Aktivität eine rpt-1 Expression in HeLa und HepG2 Zellen vorausgeht.

3.11 Untersuchungen zur Lokalisation von rpt1-in HeLa und HepG2 Zellen

3.11.1 Immunhistochemische Untersuchungen zur Lokalisation von rpt-1 in HeLa und HepG2 Zellen

In beiden Zelllinien (HeLa und HepG2) lässt sich, nach Transfektion von rpt-1, Apoptose nachweisen. In Cos-7 Zellen konnte dies nicht beobachtet werden. Da sich diese drei Zelllinien hinsichtlich der Lokalisation von rpt-1 unterscheiden, wurde ein immunhistochemisches Experiment durchgeführt, in dem mit Hilfe des Rabbit-Anti Maus-rpt-1-Antikörpers die Lokalisation von rpt-1 innerhalb der HeLa- und HepG2 Zellen verifiziert werden sollte um somit eine mögliche Expression von rpt-1 im Kern auszuschließen.

Beide Zelllinien wurden mit dem pCMV6-rpt1 Plasmid transfiziert. Die Auswertung des Experiments erfolgte fluoreszenzmikroskopisch.

Bei einer Antikörperkonzentration von 1:50 konnte man in HeLa Zellen eine zeitabhängige Expression im Zytoplasma der Zellen detektieren (Abb.25). 4h nach Transfektionsstop ist eine rpt-1 Expression in Kernnähe zu beobachten (Abb.25, B). 6h nach Transfektionsstop hat sich die rpt-1 Expression auf das gesamte Zytoplasma ausgedehnt (Abb.25, C). Es konnte keine Expression von rpt-1 im Kern beobachtet werden. Im zeitlichen Verlauf ist ein Anstieg der Expression von rpt-1 zwischen 2h und 6h nach Transfektionsstop festzustellen. 12h nach Transfektionsstop hat die rpt-1 Expression bereits stark abgenommen und ist 24h nach Transfektionsstop nur noch schwach erkennbar (ohne Abbildung). Eine unspezifische Reaktion mit dem Leervektor konnte nicht festgestellt werden (A).

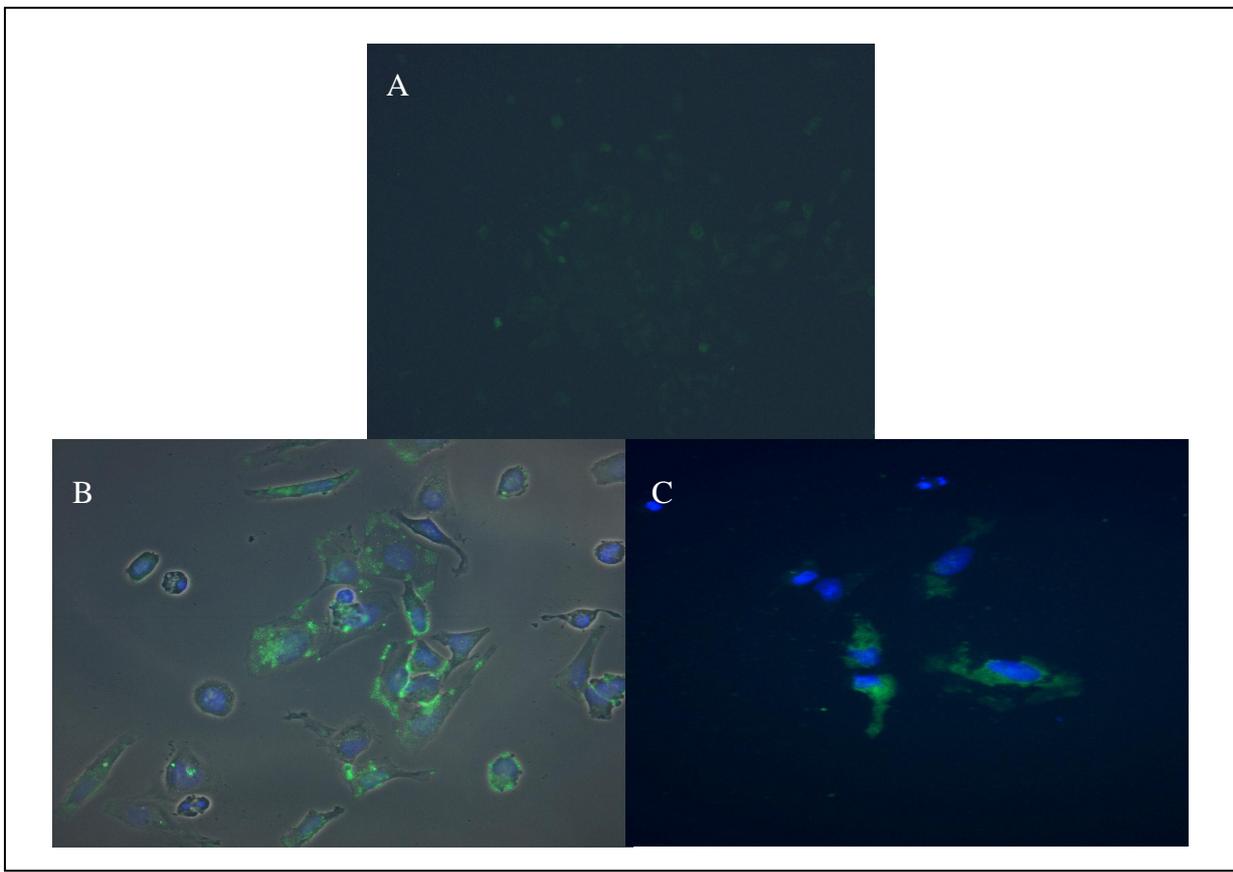


Abb.25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Untersuchungen, rpt-1 transfizierter Hela-Zellen. Konzentration des eingesetzten rpt1-AK 1: 50. **A:** Leervektorkontrolle. **B:** 4h nach Transfektionsstop. Überlagerung des Durchlicht- und Fluoreszenzbildes. Beginnende rpt-1 Expression ist ausschließlich im Zytoplasma erkennbar, vereinzelt um den Kern herum angelagert (grüne Fluoreszenz). **C:** 6h nach Transfektionsstop. rpt-1 Expression hat sich auf das gesamte Zytoplasma ausgedehnt.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der immunhistochemischen Untersuchungen an HepG2-Zellen, die mit dem Konstrukt pCMV6-rpt-1 transfiziert wurden, sind in Abbildung 26 dargestellt. 2h nach Transfektionsstop lässt sich eine rpt-1 Expression im Zytoplasma mit dem 1:50 verdünnten rpt-1 AK nachweisen (B). Unspezifische Reaktionen der eingesetzten Antikörper mit dem leeren pCMV6 Vektor konnten nicht nachgewiesen werden (A). Im immunhistochemischen Experiment nachweisbare Expressionsraten werden in HepG2-Zellen 2h nach Transfektionsstop erreicht (Abb.26, B). Zu allen anderen Zeitpunkten konnte keine Expression mit dem rpt-1 Antikörper nachgewiesen werden. Die Expression von rpt-1 in HepG2 Zellen konnte ausschließlich im Zytoplasma beobachtet werden.

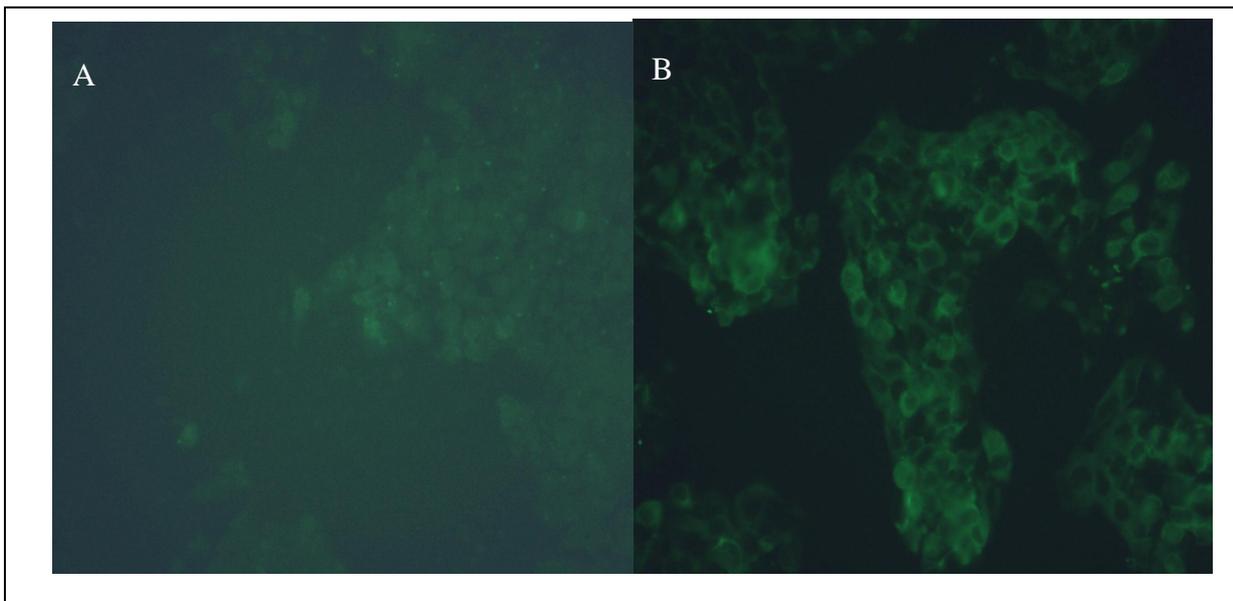


Abb.26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Untersuchung rpt-1 transfizierter HepG2-Zellen. Konzentration des rpt-1 AK: 1:50. **A:** Leervektorkontrolle. **B:** GFP-Fluoreszenzbild. Auch in HepG2-Zellen ist die rpt-1 Expression auf das Zytoplasma beschränkt. Eine starke Expression war in HepG2 Zellen nur 2h nach Transfektionsstop nachweisbar.

Parallel zu den immunhistochemischen Untersuchungen an Hela Zellen wurde zu jedem Zeitpunkt die Caspase-3-Aktivität gemessen, um eventuelle Zusammenhänge zwischen einer rpt-1 Expression und dem Anstieg der Caspase-3-Aktivität zu ermitteln. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse dieses Tests dargestellt. Es lässt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der rpt-1 Expression in Hela-Zellen und der Caspase-3-Aktivität beobachten. Ein Anstieg der Expression von 2h bis 6h nach Transfektionsstop (Abb.27, A) hat auch einen Anstieg der Caspase-3-Aktivität im gleichen Zeitraum zur Folge (Abb.27, B). Die höchste Caspase-3-Aktivität ist 6h nach Transfektionsstop messbar und erreicht den 4fachen Wert der Leervektorkontrolle (Abb.27, B). Zu diesem Zeitpunkt ist auch die rpt-1 Expression am stärksten (Abb.27, A, 6h). Von 2h bis 4h nach Transfektionsstop steigt die Caspase-3-Aktivität vom 2fachen des Kontrollwertes (2h) auf das 3,5fache (4h) des Kontrollwertes an (Abb.27, B). 12h nach Transfektionsstop (Abb.27, A, 12h) ist nur noch eine geringe rpt-1 Expression zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt ist auch die Caspase-3-Aktivität auf Kontrollniveau zurückgegangen (Abb.27, B).

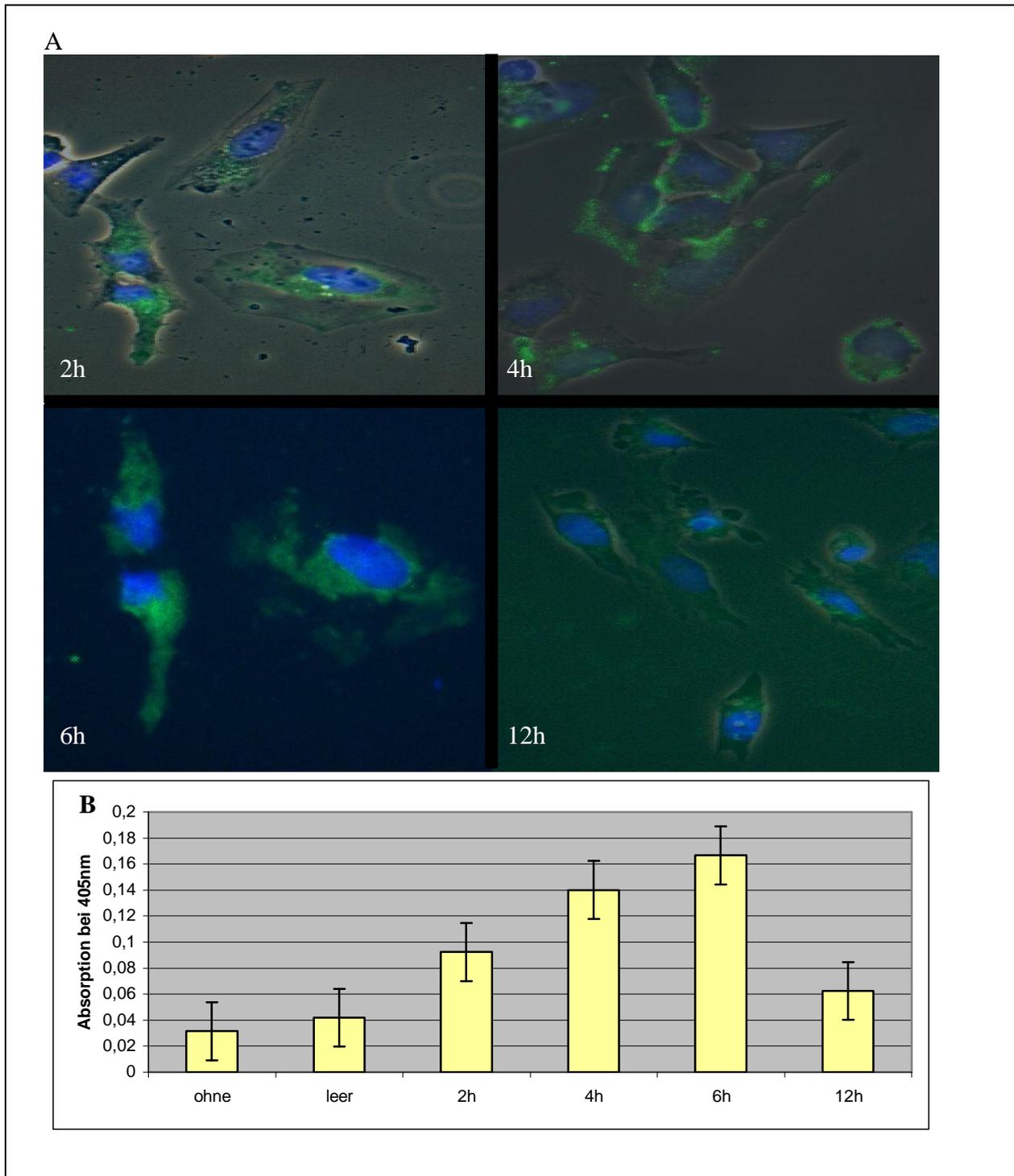


Abb 27: Zusammenhang zwischen der Caspase-3-Aktivität und der Expression von rpt-1 in transfizierten HeLa-Zellen. **A:** Fluoreszenzaufnahmen der immunhistochemischen Untersuchungen rpt-1 transfizierter HeLa-Zellen. Ausschnittvergrößerungen. rpt-1 Expression im Zytoplasma. Zunahme der rpt-1 Expression 2h bis 6h nach Transfektionsstop, gefolgt von einer Expressionsabnahme bis 12h nach Transfektionsstop. **B:** Caspase-3-Aktivität in rpt-1 transfizierten HeLa-Zellen. Die Caspase-3-Aktivität steigt 2h bis 6h nach Transfektionsstop an. Im Zeitraum zwischen 6h und 12h nach Transfektionsstop sinkt die Aktivität auf den Kontrollwert zurück.

Die immunhistochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass entgegen den Beobachtungen in Cos-7 Zellen, sowohl in Hela Zellen als auch in HepG2 Zellen eine rpt-1 Expression nur im Zytoplasma beobachtet werden kann. In Hela Zellen ist ein Anstieg der rpt-1 Expression in einem Zeitraum von 2h bis 6h nach Transfektionsstop zu beobachten, der mit einem Anstieg der Caspase-3-Aktivität einhergeht.

In HepG2 Zellen konnte immunhistochemisch nur 2h nach Transfektionsstop rpt-1 detektiert werden. Die Expression erfolgte ausschließlich im Zytoplasma der Zellen. Ein linearer Zusammenhang zwischen der rpt-1 Expression und der Caspase-3-Aktivität in HepG2-Zellen konnte in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden.

3.12 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Expression von rpt-1 in Hela, HepG2, und Cos-7 Zellen

Tab. 7: Vergleich der Zelllinien Hela, HepG2 und Cos-7, bezüglich ihrer Reaktion auf eine rpt-1 Transfektion

	Hela-Zellen	HepG2-Zellen	Cos-7 Zellen
Wird rpt-1 exprimiert?	Ja	ja	ja
Expressionszeit, nach Transfektionsstop	6h-12h	0h-8h	6h-12h
Expressionsort	Zytoplasma	Zytoplasma	Kern, Kernmembran
Lichtmikroskopisch Apoptosemerkmale nachweisbar?	ja	ja	Nein
Zeitpunkt der höchsten Apoptoserate (Im Tunel-Assay, nach Transfektionsstop)	6h und 12h	0h, 8h und 24 h	-----
Zeitpunkt der höchsten Caspase 3-Aktivität (nach Transfektionsstop)	6h	0h, 2h, 4h und 6h	-----
Zeitpunkt des rpt-1 Nachweises im Western Blot (nach Transfektionsstop)	4h	0h, 2h	-----
Zeitpunkt des rpt-1 Nachweises mittels Immunhistochemie (nach Transfektionsstop)	2h-6h Maximum: 6h	2h	-----

In Tabelle 7 sind alle bisherigen Ergebnisse der rpt-1 Transfektion und Expression zusammenfassend dargestellt.

rpt-1 exprimiert in den Zelllinien Hela, HepG2 und Cos-7. Während in Cos-7 Zellen die Expression 6h-12h nach Transfektionsstop im Kern und der Kernmembran stattfindet, exprimiert rpt-1 in Hela- und HepG2-Zellen ausschließlich im Zytoplasma. Die Expression erreicht bei Hela-Zellen 6h-12h nach Transfektionsstop ihr Maximum, bei HepG2-Zellen liegt dieser Zeitraum zwischen 0h-8h nach Transfektionsstop.

In HeLa und HepG2-Zellen lassen sich lichtmikroskopisch alle Apoptosemerkmale erkennen. In Cos-7 Zellen geht die rpt-1 Expression nicht mit einer Zellzahlreduzierung einher und lichtmikroskopisch konnten keine Apoptosemerkmale nachgewiesen werden. Im Apoptose TUNEL-Assay ist in den Zelllinien HeLa und HepG2 Apoptose nachweisbar. Die maximale Apoptoserate ist in HeLa-Zellen 6h-12h nach Transfektionsstop zu beobachten, was sich mit der Expressionszeit von rpt-1 deckt. In HepG2-Zellen liegt das Maximum 0h, 8h und 24h nach Transfektionsstop. Auch in dieser Zelllinie deckt sich dieser Wert mit der Expressionszeit.

Da in Cos-7 Zellen keine Anzeichen für Apoptose zu beobachten waren, wurden die Experimente zur Apoptose mit dieser Zelllinie nicht durchgeführt. Ein Anstieg der Caspase-3-Aktivität ist in HeLa und HepG2-Zellen zu beobachten. Während in HeLa-Zellen die Caspase-3-Aktivität 6h nach Transfektionsstop erhöht ist, ist eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität in HepG2-Zellen über den Zeitraum 0h-6h festzustellen. Der Nachweis von rpt-1 im Western Blot Experiment ist bei HeLa-Zellen 4h nach Transfektionsstop möglich, bei HepG2-Zellen 0h und 2h nach Transfektionsstop. In immunhistochemischen Untersuchungen ist rpt-1 in HeLa-Zellen ansteigend 2h-6h nach Transfektionsstop nachweisbar. Zu späteren Zeitpunkten nur in geringem Maße.

In HepG2-Zellen gelingt der immunhistochemische Nachweis nur 2h nach Transfektionsstop. In beiden Zelllinien ist rpt-1 im Zytoplasma lokalisiert.

3.13 Induktion der Apoptose und rpt-1 Expression

Da die bisherigen Ergebnisse darauf hindeuten, dass rpt-1 in den Apoptose-Pathway eingegliedert ist, müsste rpt-1 auch in untransfizierten Zellen nachweisbar sein, wenn in diesen Apoptose stattfindet. Um nachzuweisen, ob eine Induktion der Apoptose durch unterschiedliche Agenzien die Expression von rpt-1 in untransformierten Zellen beeinflusst, wurde in den Zelllinien HeLa, HepG2 und HaCat die Apoptose durch Actinomycin D, Anti Fas-AK und UVB-Strahlung induziert und parallel die rpt-1 Expression über Western Blots überprüft.

Die diesen Experimenten zugrunde liegende Fragestellung war: Verändert Apoptoseinduktion die Expression von rpt-1 in untransformierten HeLa, HepG2 und HaCat Zellen ?

3.13.1 Apoptoseinduktion durch Actinomycin D in HeLa- und HepG2-Zellen

Actinomycin D (AMD) sensitiviert Zellen für die FAS (CD95) vermittelte Apoptose. Die durch FAS induzierte Apoptose beschreitet den mitochondrialen Apoptoseweg. Durch eine Veränderung der rpt-1 Expression können sich Hinweise auf einen eventuellen Regulationsmechanismus ergeben, in den rpt-1 eingegliedert sein könnte.

3.13.1.1 Apoptoseinduktion durch Actinomycin D in HeLa-Zellen

Zur Induktion der Apoptose in untransformierten HeLa-Zellen wurde Actinomycin D (AMD) in den Konzentrationen 1µg und 2µg/ml dem Medium zugefügt. In zwei parallel laufenden Experimenten wurde die Caspase-3-Aktivität und die rpt-1 Expression mittels Western Blot in den Zellen überprüft. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse des Caspase-Assays und des Western Blots dargestellt. Die Caspase-3-Aktivität (Abb.28 A) nimmt bei einer Konzentration von 2µg/ml, 6h nach der Behandlung um das 10fache zu. Bei einer Konzentration von 1µg/ml ist 6h nach der Behandlung keine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität zu beobachten.

Die rpt-1 Expression hingegen (Abb.28 B) ist schon bei der Behandlung der HeLa-Zellen mit 1µg/ml nachweisbar (Abb.28, Bahn 2), ebenso wie bei der Behandlung mit 2µg/ml (Abb.28, Bahn 3). In der unbehandelten Kontrolle (Bahn 1) ist kein rpt-1 nachweisbar.

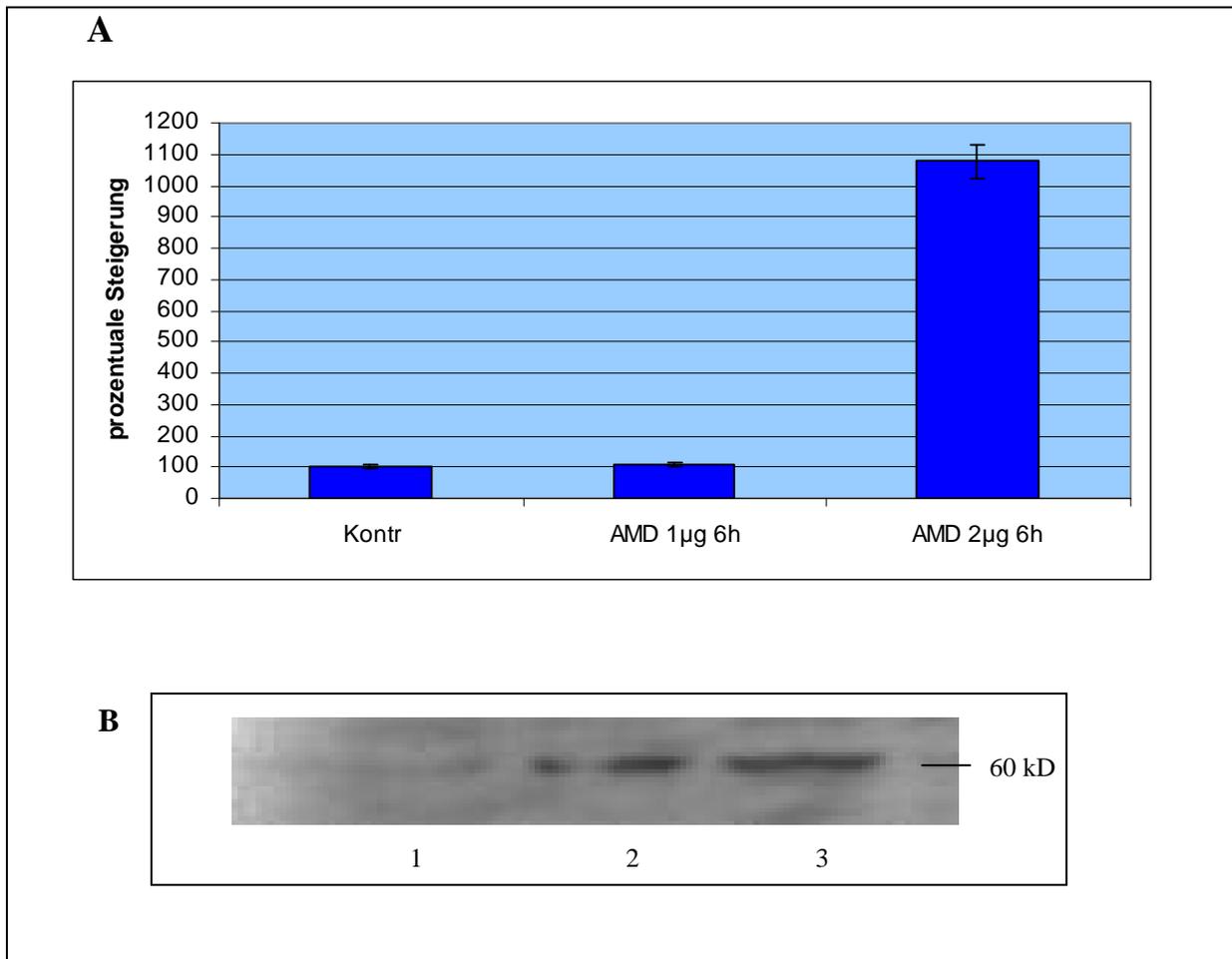


Abb.28: Apoptoseinduktion durch Actinomycin D in untransformierten HeLa Zellen. **A:** Caspase-3-Aktivität in untransformierten HeLa Zellen, 6h nach Behandlung mit 1µg/ml bzw. 2µg/ml Actinomycin D **B:** Western Blot. rpt-1 Expression in untransformierten HeLa Zellen, 6h nach Behandlung mit Actinomycin D. Bahn 1: unbehandelte Kontrolle Bahn 2: HeLa Zellen behandelt mit 1µg/ml Actinomycin D. Bahn 3: HeLa-Zellen behandelt mit 2µg/ml Actinomycin D. Bei einer Actinomycin D Konzentration von 2µg/ml steigt die Caspase-3-Aktivität (A) 6h nach der Behandlung auf das ca. 10fache des Kontrollwertes an. Bei einer Actinomycin D Konzentration von 1µg/ml ist kein Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle feststellbar. Die rpt-1 Expression (B) ist schon bei einer Actinomycin D Konzentration von 1µg/ml nachweisbar, während bei der unbehandelten Kontrolle kein rpt-1 nachgewiesen werden kann.

3.13.1.2 Apoptoseinduktion durch Actinomycin D in HepG2-Zellen

In einem weiteren Experiment wurde die Apoptoseinduktion und die Expression von rpt-1 in untransformierten HepG2 Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb.29 dargestellt. Durch die Behandlung von untransformierten HepG2 Zellen mit Actinomycin D steigt die Caspase-3-Aktivität in diesen Zellen konzentrationsabhängig an (Abb.29, A). Die Behandlung der

Zellen mit 1µg AMD bewirkt eine 2fache Erhöhung der Caspase-Aktivität, 2µg AMD lassen die Aktivität auf das 4fache ansteigen.

Die Ergebnisse des Western Blots (Abb.29, B) zeigen, das in AMD behandelten HepG2 Zellen die rpt-1 Expression konzentrationsabhängig zunimmt (Abb.29, B, Bahn 2 + 3). In unbehandelten Zellen ist keine rpt-1 Expression nachweisbar (Abb.29, B, Bahn 1).

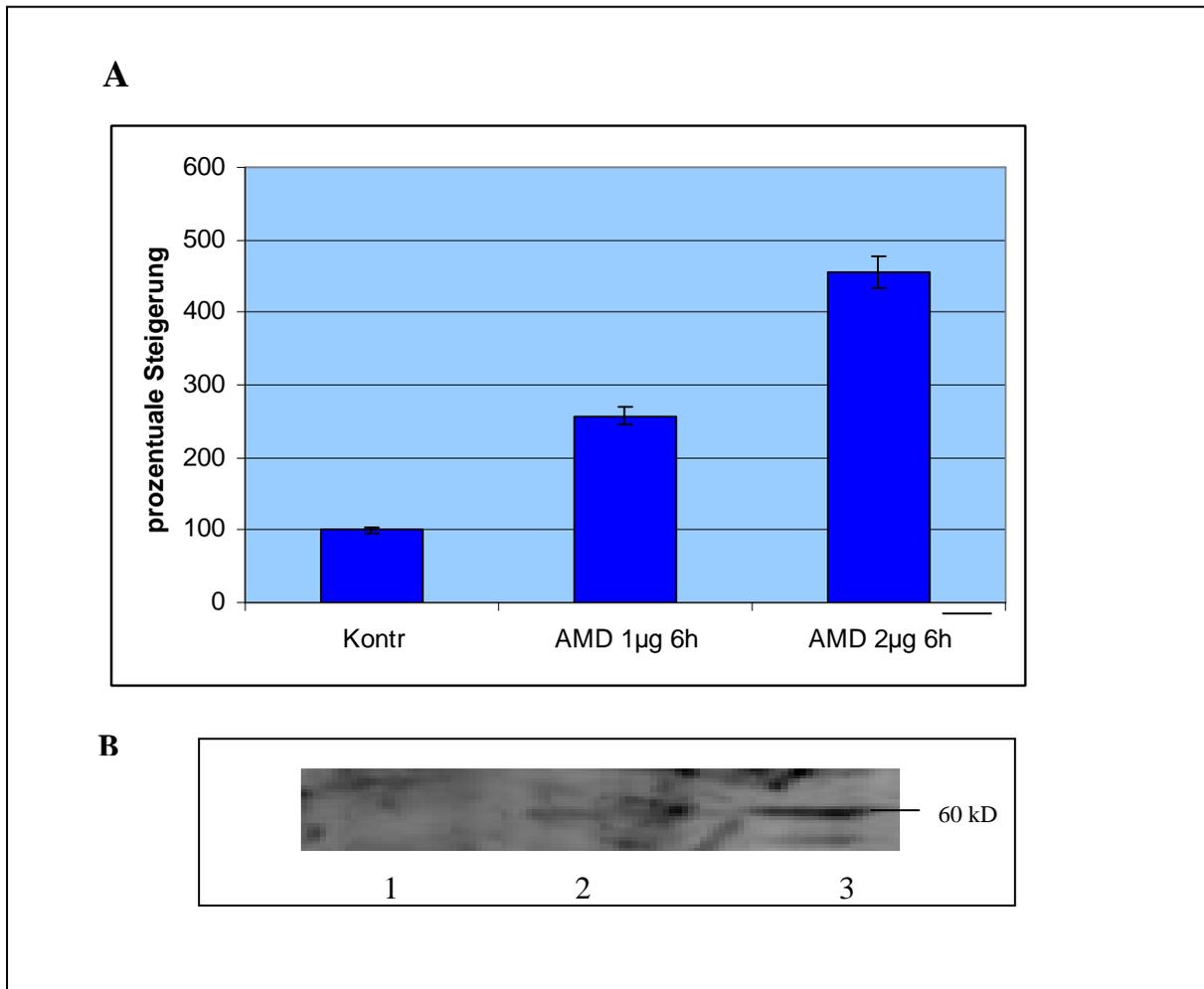


Abb.29: Apoptoseinduktion durch Actinomycin D in untransformierten HepG2 Zellen. **A:** Caspase-3-Aktivität in untransformierten HepG2 Zellen, 6h nach Behandlung mit 1µg/ml bzw. 2µg/ml Actinomycin D **B:** Western Blot. rpt-1 Expression in untransformierten HepG2 Zellen, 6h nach Behandlung mit Actinomycin D. Bahn 1: unbehandelte Kontrolle Bahn 2: HepG2 Zellen behandelt mit 1µg/ml Actinomycin D. Bahn 3: HepG2 Zellen behandelt mit 2µg/ml Actinomycin D. Durch die Behandlung mit AMD kann in untransformierten Zellen, 6h nach der Behandlung eine erhöhte Caspase-3-Aktivität bei beiden Konzentrationen festgestellt werden. In der unbehandelten Kontrolle ist keine erhöhte Caspase-3-Aktivität feststellbar (A). In untransformierten, behandelten HepG2 Zellen ist rpt-1 bei beiden AMD Konzentrationen nachweisbar (Bahn 2 + 3). Die unbehandelte Kontrolle exprimiert rpt-1 nicht (Bahn 1).

3.13.2 Apoptoseinduktion durch Anti-Fas AK

Da Actinomycin D Zellen für die FAS vermittelte Apoptose sensitiviert, müsste bei einer Induktion mit Anti-Fas Antikörper ebenfalls eine rpt-1 Expression in untransformierten Zellen beobachtet werden können. Hierzu wurde in untransformierten Zellen die Apoptose durch Anti-Fas Antikörper induziert, parallel dazu die Caspase-3-Aktivität gemessen und die rpt-1 Expression im Western Blot kontrolliert.

3.13.2.1 Apoptoseinduktion in Hela-Zellen durch Anti-Fas AK

Die Ergebnisse der Apoptoseinduktion durch den Anti-Fas Antikörper in untransformierten Hela Zellen sind in Abbildung 30 zusammengefasst. In Hela Zellen sind durch Induktion mit Anti-Fas Antikörper eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Caspase-3-Aktivität (Abb.30 A), sowie der rpt-1 Expression zu beobachten (Abb.30, B). Die Caspase-Aktivität steigt nach Behandlung mit 2 μ g Anti-Fas Antikörper auf das 3fache an. Nach Behandlung der Zellen mit 1 μ g Anti-Fas Antikörper lässt sich keine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität erkennen (Abb. 30, A). Die Expression von rpt-1 ist im Western Blot nach Behandlung mit 1 μ g Anti-Fas Antikörper erkennbar (Abb.30, B, Bahn 2), jedoch lässt sich nach Behandlung mit 2 μ g Anti-Fas Antikörper eine wesentlich stärkere Expression beobachten (Abb.30, B, Bahn 3). Eine rpt-1 Expression in untransformierten, unbehandelten Zellen ist nicht festzustellen (Abb.30, B, Bahn 1).

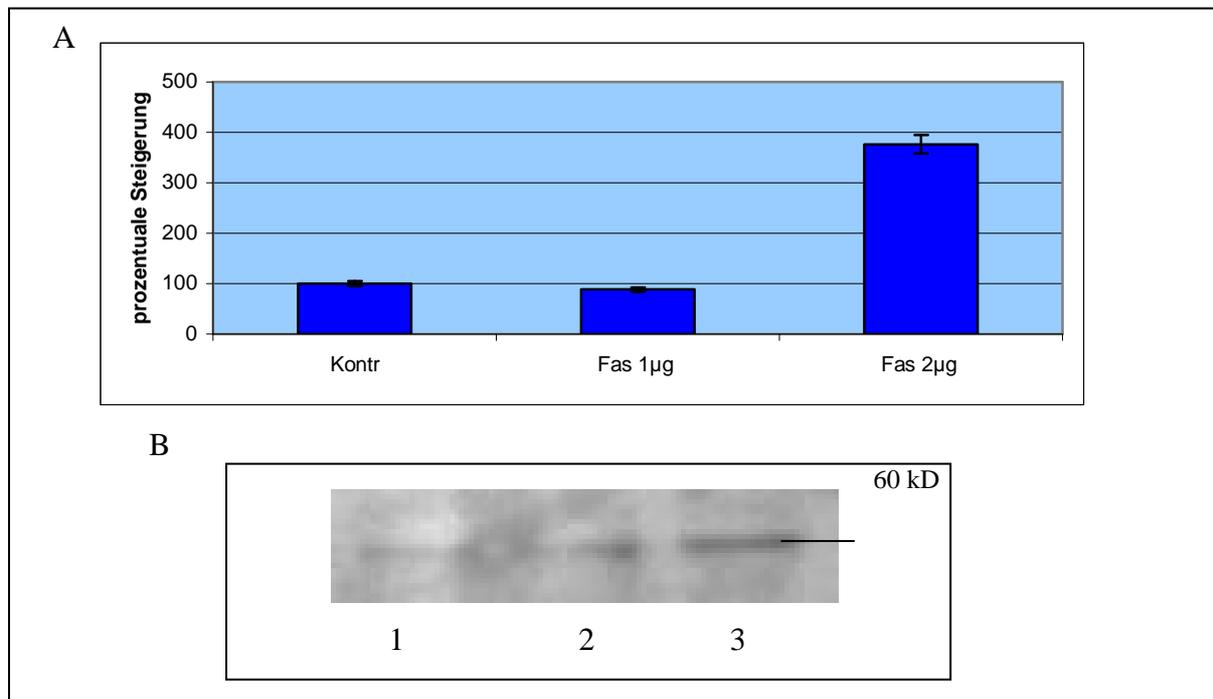


Abb.30: Ergebnisse des Caspase-3-Assays (A) und des Western Blots (B) von untransformierten HeLa Zellen, 6h nach Behandlung mit Anti-Fas AK. **A:** Die Caspase-3-Aktivität steigt in HeLa-Zellen 6h nach Behandlung mit Anti-Fas AK bei einer Konzentration von 2µg/ml an. Die untransformierte Kontrolle und eine Konzentration von 1µg/ml, lassen keine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität erkennen **B:** Der Western Blot zeigt die Expression von rpt-1, 6h nach Behandlung mit Anti-Fas AK. Bahn 1: unbehandelte Kontrolle. Bahn 2: 1µg/ml Anti-Fas AK Bahn 3: 2µg/ml Anti-Fas AK

3.13.2.2 Apoptoseinduktion in HepG2-Zellen durch Anti-Fas AK

In HepG2 Zellen wurde parallel, durch 1µg bzw. 2µg Anti-FAS Antikörper Apoptose induziert und die Caspase-3-Aktivität sowie die rpt-1 Expression beobachtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 gezeigt.

In untransformierten HepG2-Zellen steigt durch eine Behandlung mit 2µg/ml Anti-Fas AK die Caspase-3-Aktivität auf das 4fache an. Die Behandlung mit 1µg Anti-Fas Antikörper erzielte keine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität (Abb.31, A).

Die rpt-1 Expression steigt konzentrationsabhängig in HepG2-Zellen an (Abb.31, B). Eine schwache basale Expression ist in der unbehandelten Kontrolle erkennbar (Abb.31, B, Bahn 1). Mit zunehmender Anti-Fas AK Konzentration steigt auch die rpt-1 Expression an (Abb.31 B Bahn 2, und Bahn 3).

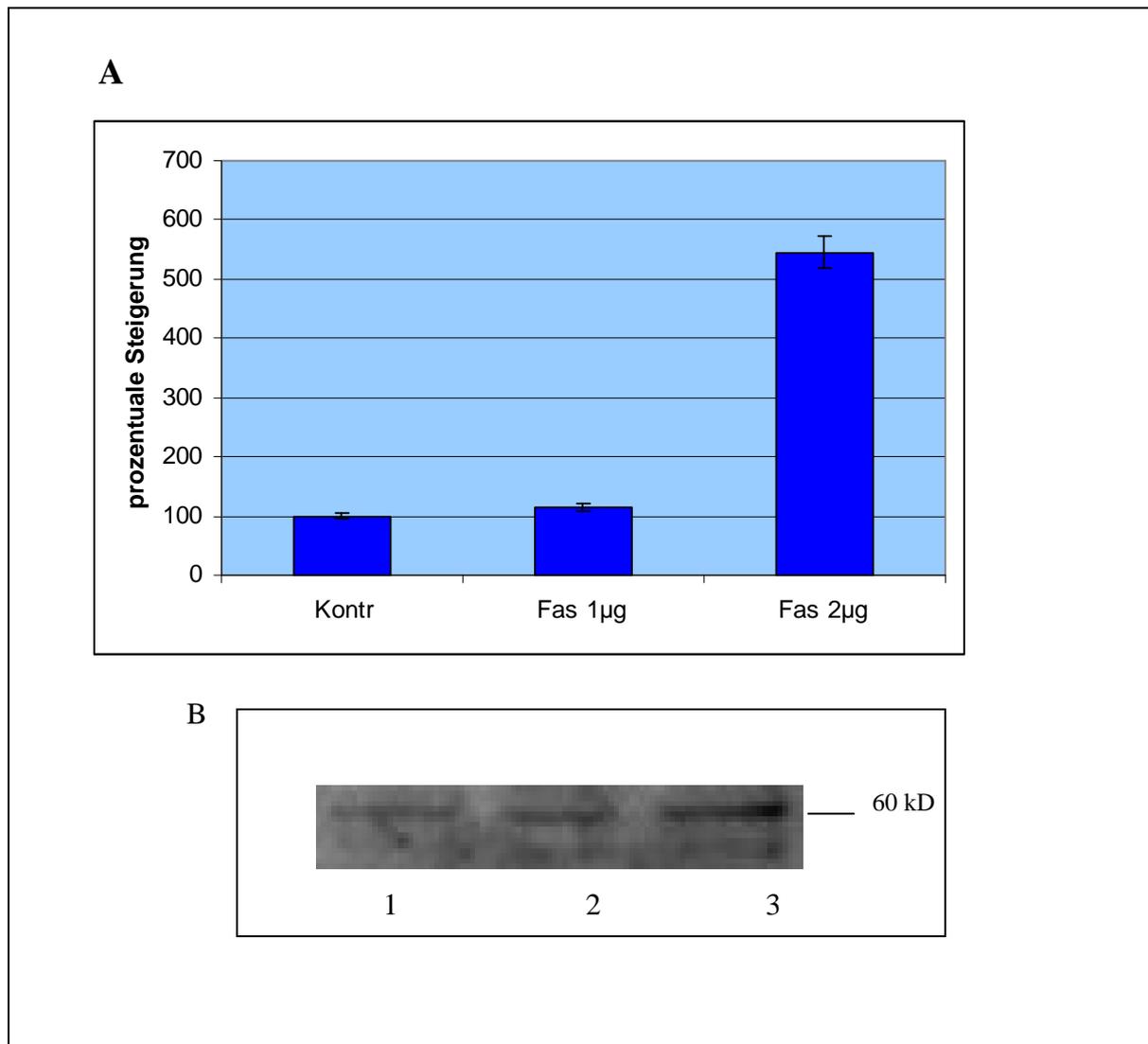


Abb.31: Ergebnisse des Caspase-3-Assays (A) und des Western Blots (B) von untransformierten HepG2 Zellen, 6h nach Behandlung mit Anti-Fas AK. **A:** Die Caspase-3-Aktivität nimmt bei einer Anti-Fas AK Konzentration von 2µg/ml zu. Bei einer Konzentration von 1µg/ml bleibt der Wert auf Kontrollniveau. **B:** Die rpt-1 Expression steigt konzentrationsabhängig an. Bahn 1: unbehandelte Kontrolle, Bahn 2: 1µg /ml Anti Fas-AK. Bahn 3: 2µg/ml Anti-Fas AK.

3.13.3. Induktion von Apoptose durch UVB-Bestrahlung

Da die Experimente mit Actinomycin D und Anti-Fas AK zeigten, dass in untransformierten Hela und HepG2 Zellen durch die Induktion der Apoptose auch die rpt-1 Expression induziert wurde, sollte in einem weiteren Experiment geklärt werden, ob rpt-1 nur bei bestimmten Apoptosemechanismen (z.B. mitochondrialer Apoptoseweg) exprimiert, oder generell in apoptotischen Zellen unabhängig vom Mechanismus exprimiert wird.

UVB-Bestrahlung in hohen Dosen rufen direkte DNA-Schädigungen hervor, was eine direkte Caspase-3-Aktivierung zur Folge hat. In diesem Fall wird der mitochondriale Apoptoseweg umgangen. Niedrige Strahlungsdosen hingegen induzieren Apoptose über den Fas vermittelten, mitochondrialen Weg.

In untransformierten Hela, HepG2 und HaCat Zellen wurde durch UVB-Bestrahlung Apoptose induziert und parallel die Caspase-3-Aktivität sowie die rpt-1 Expression beobachtet.

3.13.3.1 Induktion von Apoptose durch UVB-Bestrahlung in HaCat Zellen

Die hier eingesetzten HaCat Zellen dienen als „Kontrollzelllinie“, da bei diesen Zellen die eingesetzten Bestrahlungsmengen in jedem Fall zur Apoptose führen.

In HaCat Zellen ist durch die ausgewählten Bestrahlungsintensitäten Apoptose induzierbar (Abb.32). Die Caspase-3-Aktivität steigt intensitätsabhängig an und erreicht bei einer Bestrahlungsintensität von 300 J/m² das 2fache des Kontrollwertes. Bei 100 J/m² und 200 J/m² ist die Caspase-Aktivität geringer, aber deutlich über dem Kontrollwert (Abb.32, A).

Im Western Blot lässt sich eine rpt-1 Expression bei 100 J/m² nachweisen (Abb.32 B, Bahn 2). In der unbestrahlten Kontrolle (Abb.32 B, Bahn 3) ist eine geringe basale rpt-1 Expression erkennbar, die rpt-1 Expression in den mit 200 J/m² und 300 J/m² bestrahlten Zellen ging nicht über die basale Expression hinaus.

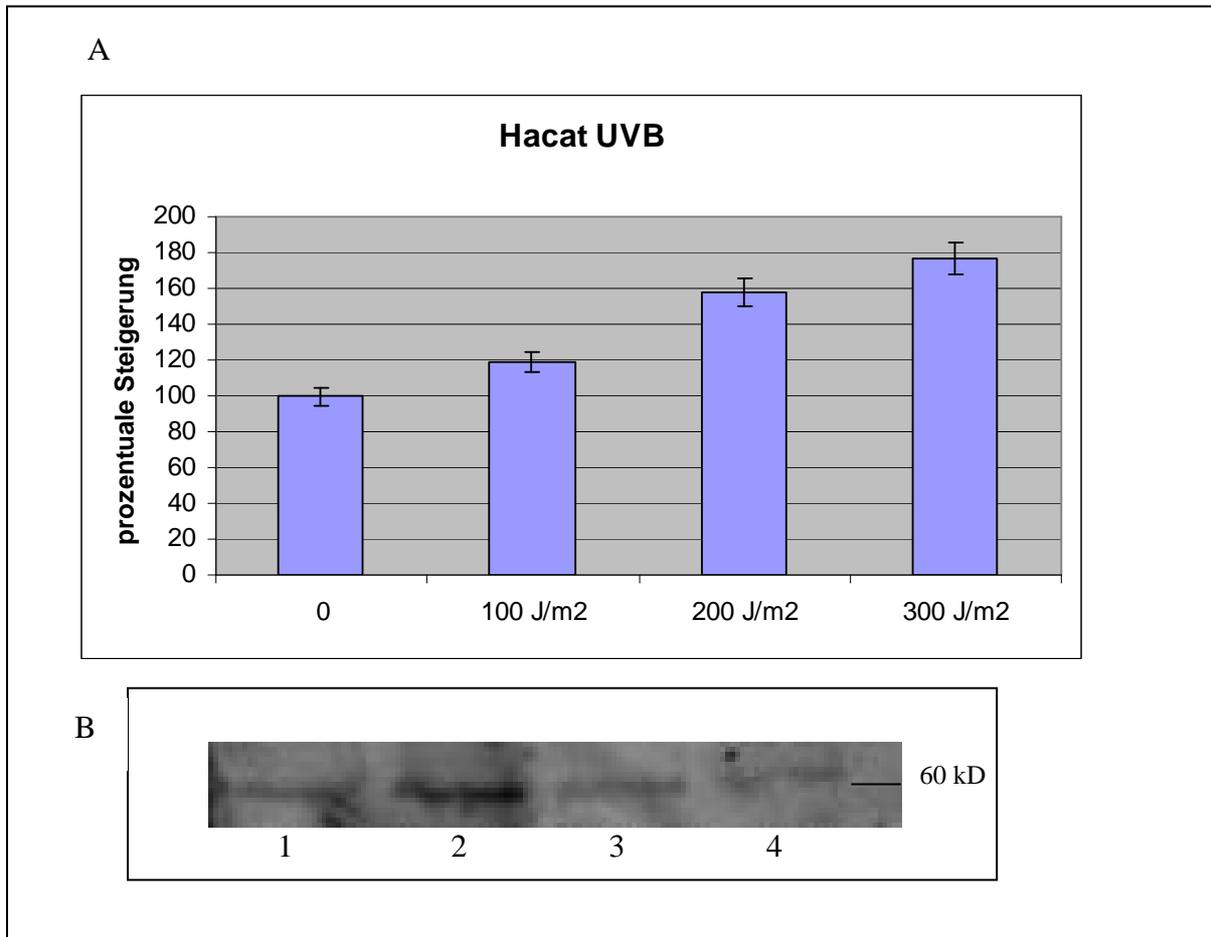


Abb.32: Ergebnisse des Caspase-3 Assays (A) und des Western Blots (B) von untransformierten HaCat Zellen. **A:** Die Caspase-3-Aktivität nimmt, abhängig von der Strahlungsintensität, zu. **B:** Im Western Blot lässt sich eine erhöhte rpt-1 Expression bei einer Strahlungsintensität von 100 J/m² nachweisen. Bahn 1: unbehandelte Kontrolle. Bahn 2: HaCat 20h nach Bestrahlung mit UVB der Intensität 100 J/m². Bahn 3: HaCat 20h nach Bestrahlung mit UVB der Intensität 200 J/m². Bahn 4: HaCat 20h nach Bestrahlung mit UVB der Intensität 300 J/m².

3.13.3.2 Induktion von Apoptose durch UVB-Bestrahlung in Hela und HepG2 Zellen

Die Ergebnisse der Versuche zur Induktion der Apoptose durch UVB-Bestrahlung in Hela und HepG2 Zellen sind in Abbildung 33 dargestellt.

In Hela Zellen konnte durch eine Bestrahlung mit 300 J/m^2 eine ca. 6fach höhere Caspase-3-Aktivität gemessen werden. Bestrahlungen von 100 J/m^2 und 200 J/m^2 führten nicht zu einer Erhöhung der Caspase-3-Aktivität (Abb.33, A).

In HepG2 Zellen konnte durch die gewählten Strahlungsintensitäten keine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität hervorgerufen werden (Abb.33, B).

Weder in Hela noch in HepG2 Zellen konnte nach UVB-Bestrahlung eine rpt-1 Expression im Western Blot nachgewiesen werden.

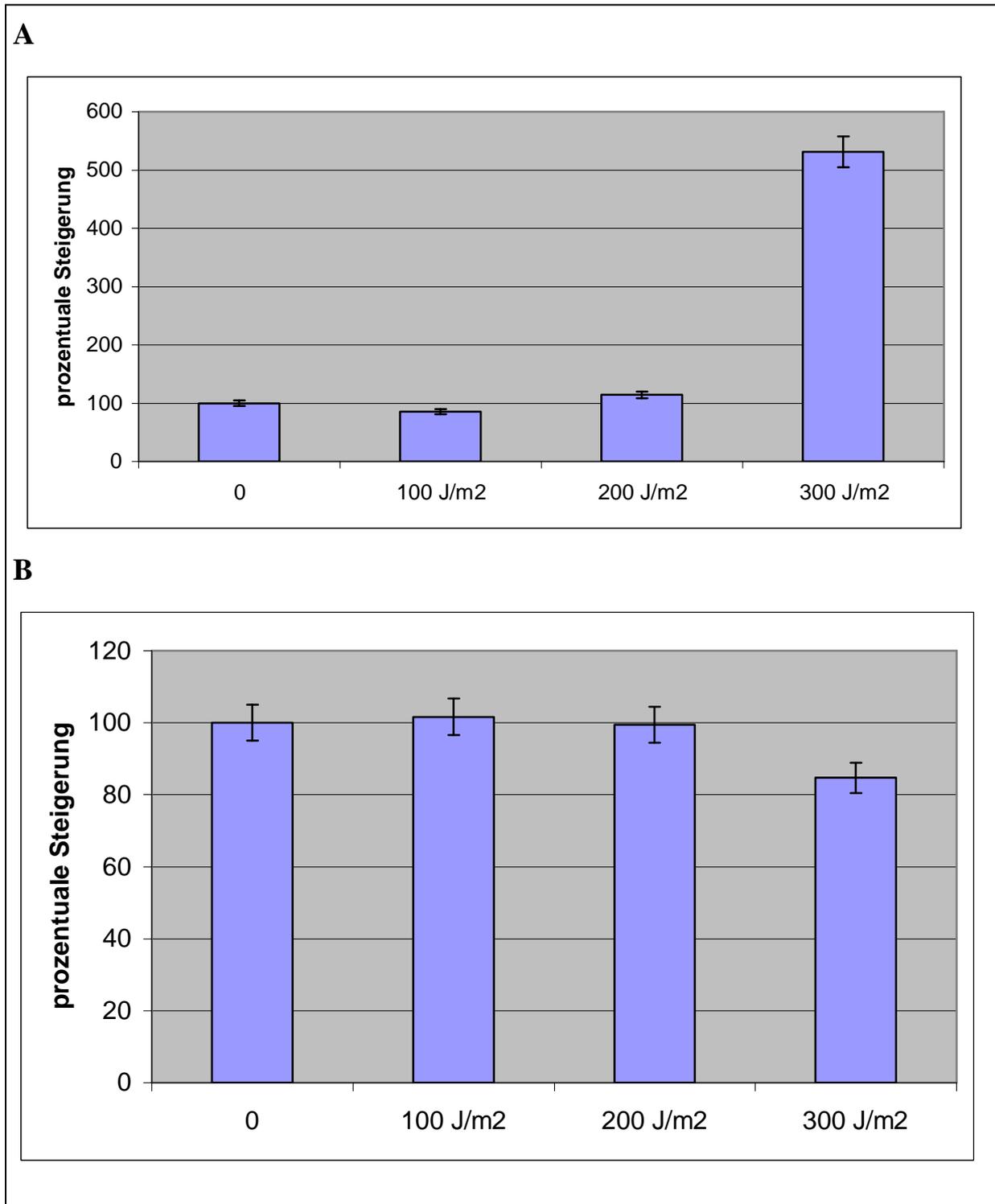


Abb.33: Ergebnisse des Caspase-3 Assays nach UVB-Bestrahlung von HeLa-Zellen (A) und HepG2-Zellen (B) **A:** In HeLa-Zellen ist die Apoptose erst ab einer UVB Bestrahlung von 300J/m² induzierbar. **B:** HepG2-Zellen reagieren nicht mit einer Erhöhung der Caspase-3-Aktivität durch UVB Bestrahlung. Bei beiden Zelllinien konnte im Western Blot keine rpt-1 Expression nachgewiesen werden.

Die Induktion der Apoptose mit unterschiedlichen Agenzien ruft in manchen Zellen eine rpt-1 Expression hervor.

In Hela Zellen kann durch Behandlung mit 2 μ g AMD sowie 2 μ g Anti-Fas Antikörper eine Caspase-3-Aktivierung hervorgerufen werden, die mit einer rpt-1 Expression einhergeht.

Die Induktion durch UVB-Bestrahlung ergab, dass nur Bestrahlungsintensitäten von 300 J/m² eine Caspase-3-Aktivierung bewirken. Eine rpt-1 Expression konnte nicht nachgewiesen werden.

In HepG2 Zellen lässt sich durch Behandlung mit 1 μ g und 2 μ g AMD eine Caspase-3 Aktivierung erzielen. Konzentrationsabhängig verstärkt sich auch die rpt-1 Expression. Die Behandlung mit Anti-Fas Antikörper ergab, dass nur eine Konzentration von 2 μ g/ml eine Caspase-3-Aktivierung zur Folge hatte. rpt-1 Expression konnte bei einer Konzentration von 1 μ g /ml und 2 μ g/ml nachgewiesen werden.

Durch UVB-Bestrahlung konnte in HepG2 Zellen keine Caspase-3-Aktivierung und keine rpt-1 Expression erzielt werden.

In HaCat Zellen ließ sich durch UVB-Bestrahlung die Caspase-3-Aktivierung intensitätsabhängig steigern. Eine Bestrahlung von 100 J/m² induzierte in diesen Zellen die rpt-1 Expression.

Die Versuche zu verschiedenen Apoptose induzierenden Noxen zeigten, eine Konzentrationsbedingte Caspase-Aktivierung und rpt-1 Expression in Hela und Hepg2 Zellen durch Actinomycin D und Anti-Fas Antikörper.

HaCat Zellen exprimieren rpt-1 nach niedrigdosierter UVB-Bestrahlung. Eine Caspase-3-Aktivierung konnte nur durch hohe UVB Dosen in HaCat und Hela Zellen induziert werden.

4. Diskussion

4.1 Two-Hybrid Screen der Mouse Liver Matchmaker cDNA-Bank

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, putative Interaktionspartner und die mögliche Funktion von rpt-1 zu charakterisieren. rpt-1 weist keine DNA-bindende Domäne auf, besitzt aber strukturelle Hinweise, die vermuten lassen, dass Protein-Protein Interaktionen stattfinden. Um eine solche nachzuweisen, ist das Two-Hybrid System die Methode der Wahl.

Allerdings weist das Two-Hybrid System einige Probleme auf, die in der Literatur ausführlich diskutiert worden sind (Golemis, E. Fox Chase Cancer Center, N.J., 1995, Fields *et al.*, 1994, Zhu *et al.*, 1997; McQuibban *et al.*, 2000).

Dies sind z. B.:

- 1) „falsch positive“ Klone
- 2) Selektionsmedien
- 3) Hefestamm

Beispielsweise ist das Auftreten „falsch positiver“ Klone ein gravierendes Problem, das mitunter vom Selektionsmedium und vom Hefestamm abhängt.

4.1.1 „Falsch positive“ Klone im Two-Hybrid System

Die Anwendung des Two-Hybrid Systems bei der Durchmusterung einer cDNA Bank nach putativen Interaktionspartnern ist nicht unproblematisch, da oft „falsch positive“ Klone detektiert werden. Dabei besitzen die Hefeklone zwar die Eigenschaft auf Selektionsmedium wachsen zu können, was aber keine Folge einer intrazellulären Protein-Protein Interaktion ist. Das Auftreten solcher „falsch positiven“ Klone kann verschiedene Ursachen haben:

1. Die cDNA im Prey-Vektor pGADT7 kodiert für einen funktionellen Transkriptionsaktivator. Ebenfalls möglich ist, dass die cDNA für ein DNA-bindendes Protein kodiert, so dass ein funktionsfähiger Transkriptionsaktivator entstehen kann. Solche „falsch positiven“ Klone lassen sich eliminieren, indem ausgeschlossen wird, dass die Hefen auch auf Selektionsmedium wachsen, wenn sie nur mit dem Prey-Vektor PGADT7 inclusive cDNA transfiziert sind. Hier liegt der Vorteil des

verwendeten MatchMaker Two-Hybrid Systems, welches durch die Möglichkeit der leicht-, medium- und hoch-stringenten Selektion, die beschriebenen „falsch positiven“ Klone ausselektiert. Die in vorherigen Versuchen verwendeten Two-Hybrid Systeme boten diese Möglichkeit nicht, was der Grund für die aufgetretenen durchweg „falsch positiven“ Klone gewesen sein könnte.

2. Ein weniger offensichtlicher Fall liegt vor, wenn der Hefestamm mit dem Bait und Prey-Plasmid co-transformiert wurde und auf Selektionsmedium wächst, es sich jedoch trotzdem nicht um eine „echte“ Interaktion handelt. Ein solcher Fall kann detektiert werden, wenn die Gegenprobe mit einem unabhängigen Prey-Plasmid durchgeführt wurde, von dem bekannt ist, dass es nicht mit dem Bait-Plasmid interagiert. Käme es dann zum Wachstum auf Selektionsmedium, so kann der Interaktionspartner als „falsch positiver“ Klon angesehen werden, da keine Spezifität für das Bait Protein vorliegt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Interakteur nicht mit dem Bait, sondern direkt mit der Gal4 Domäne des Hybrids interagiert. Im verwendeten System war diese Kontrolle das Konstrukt pGADT7-Lam, welches auf Interaktion mit den geangelten Proteinen getestet wurde.

3. Auch der Einfluss der verwendeten Promotorsequenz des entsprechenden Vektors ist festgestellt worden. „Falsch positive“ Interakteure treten demnach nur in Verbindung mit jeweils einer ganz bestimmten Promotorsequenz auf, während bei Verwendung einer anderen Sequenz die „falsch positiven“ Klone nicht angezeigt werden.

Es wird davon ausgegangen, dass bei promoterabhängigen „falsch positiven“ das vom Prey-Plasmid kodierte Interakteur-Aktivator Hybrid direkt an den Promotor, oder an dort gebundene Proteine, bindet. (Bartel *et al.*, 1993a und 1993b)

Um diese promoterabhängige Art von „falsch positiven“ Klonen vorzubeugen, stehen bei dem *AH109* Hefestamm die Reportergene Ade2, His3 und Mel1 (oder lacZ) jeweils unter der Kontrolle von verschiedenen heterogenen Gal4 upstream Aktivierungssequenzen und TATA Boxen. Dadurch werden zwei Hauptklassen von „falsch positiven“ Klonen eliminiert: Solche, die direkt an die Gal4 flankierende Sequenz binden, und solche, die an einen TATA Box gebundenen Transkriptionsfaktor binden. Durch den His3 Reporter ist eine strenge Selektion möglich. Die Option zusätzlich auf Ade2 zu selektieren, reduziert das Vorkommen von

„falsch positiven“ Klonen abermals. Ferner besteht die Option auf Selektion über Mel1 (für α -Galactosidase) oder lacZ (β -Galactosidase) (James *et al.*, 1996).

Als „falsch positive“ Klone erachtet man auch solche Interaktionen, die zur Expression aller Reportergene führen, aber offensichtlich keine biologische Bedeutung haben können, da es sich um Proteine handelt, die *in vivo* zeitlich oder räumlich getrennt sind (Fields *et al.*, 1994).

Als Ursache für solche Interaktionen werden klebrige Bereiche in den Proteinen vermutet (Serebrijskii *et al.*, 2000). Solche Bereiche sind vor allem ausgedehnte hydrophobe Regionen, die zu unspezifischen Wechselwirkungen oder zu elektrostatischen Verbindungen aufgrund entgegengesetzter Ladung führen. Diese Umstände machen eine sorgfältige Prüfung der geangelten putativen Interaktionspartner unabdingbar.

Einen wichtigen Einfluss auf das Ergebnis hat die Auswahl des geeigneten Hefestammes.

In Vorversuchen gelang es nicht mit dem Hefestamm *S.cerevisiae* L40 ein Screening durchzuführen, da der gewählte Hefestamm sich durch die Transformation mit rpt-1 als Bait-Protein zu einem degenerierten Phänotyp entwickelte. Dies äußerte sich darin, dass das Wachstum der Hefezellen gehemmt war, oder sie selbst bei niedrigen Temperaturen übermäßig wucherten. Andererseits gelang es durch Umstellen der Medien und Medienzusätze ein cDNA-Screen mit diesem L40-Hefezell-System durchzuführen. Die geangelten putativen Interaktionspartner erwiesen sich als „falsch positive“ Interaktionsklone, weil in den anschließenden Selektionsexperimenten kein Wachstum der Hefezellen nachweisbar war. Solche und ähnliche Probleme werden in der Literatur ausführlich diskutiert (Mayeur *et al.*, 2002; Fröhlich und Madeo, 2000).

Dagegen ergaben sich bei dem Hefestamm *S.cerevisiae* AH109, der Bestandteil des MatchMaker Gal4 Two-Hybrid Systems (Clontech) ist, positive Befunde. Es konnten drei putative Interaktionspartner isoliert werden, die sich nach Durchführung entsprechender Kontrollversuche (Überstreichen, Retransformation und Austausch des Vektors), als positive Interaktionsklone herausstellten. Nach Sequenzvergleichen mit der NCBI Genbank, konnten diese Interaktionsklone als Teile der Katalase und Endophilin B1 (Bif-1, Bax interacting factor-1), sowie den kompletten Translation initiation Faktor 3, subunit 5 (eif3) identifiziert werden.

Mittels umfangreicher Co-Immunopräzipitations Studien nach *In vitro*- Translation der identifizierten Klone, in der diese Proteine radioaktiv markiert wurden, konnte die Interaktion von rpt-1 bestätigt werden. Die Funktionen dieser Proteine werden in folgendem Abschnitt kurz beschrieben.

4.1.2 Funktion der Proteine eif3, Bif-1 und Katalase

4.1.2.1 Katalase

Die Katalase ist ein peroxisomal lokalisiertes Enzym welches die Spaltung von Wasserstoffperoxid in Wasser und molekularen Sauerstoff katalysiert. Dadurch bietet die Katalase einen Schutz vor oxidativem Stress. Sie ist aber auch ein an der Apoptose beteiligtes Enzym. Wasserstoffperoxid fördert die toxische Wirkung vieler DNA-schädigender Agentien und somit die Apoptose. Dies wird meist über die Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 vermittelt. Die Überexpression der Katalase senkt die Phosphorylierung von p53 und inhibiert somit die Apoptose (Bai und Cederbaum, 2003).

Im Gegensatz dazu wird von Brown und Mitarbeitern beschrieben, dass unter bestimmten Voraussetzungen die Katalase Apoptose fördern kann. In vaskulären glatten Muskelzellen z. B., wird die Produktion von endogenem Wasserstoffperoxid, die Proliferation und das Überleben dieser Zellen gefördert, während die Überexpression von Katalase, die Proliferation in diesem Gewebe inhibiert und die Apoptose fördert (Brown *et al.*, 1999). Wiederum gegensätzlich verhält sich die Katalase in Krebstumorgewebe. Man hat festgestellt, dass der Katalasegehalt in Krebstumorgewebe höher ist als in gesundem Gewebe, die Apoptoserate jedoch niedriger (Kahlos, 1999). Dies zeigt, dass nicht immer eine Überexpression von Katalase zur Apoptose führt. Vermutlich ist in Tumorgewebe die Schutzfunktion der Apoptose durch Mutationen nicht mehr gewährleistet. Möglich wäre, dass rpt-1 in Tumorgewebe nicht ausreichend exprimiert und so eine Blockade des Enzyms nicht stattfindet, was dann durch oxidativen Stress zur Apoptose führt.

In Cardiomyocyten wird die Apoptose durch den Anstieg von Superoxiden, trotz Anwesenheit der Katalase, induziert (Li *et al.*, 1999). Dass die Katalase die Superoxide zum Schutz der Zelle nicht umsetzt, könnte in einer Interaktion mit rpt-1 begründet sein. Durch die Interaktion von rpt-1 und Katalase könnte eine Konformationsänderung im Katalasemolekül stattfinden und somit die enzymatische Wirkung der Katalase aufheben (z. B. durch Veränderungen im katalytischen Zentrum).

So kann Arsenoxid über den Anstieg von Reaktiven Oxigen Species (ROS) und einen Abfall des mitochondrialen Potentials Apoptose induzieren. Dies hat die Freisetzung von Cytochrom C zur Folge und somit die Aktivierung der Caspase-3. Dieser Mechanismus kann durch die Katalase gehemmt werden (Park *et al.*, 2003). Durch eine Interaktion von rpt-1 und Katalase könnte diese durch das rpt-1 Protein blockiert werden oder Veränderungen im

Katalasemolekül hervorgerufen werden, wodurch die Katalase unwirksam wird, die ROS ansteigen und Apoptose gefördert wird. Die Katalase ist ein Enzym, das sowohl in den Peroxisomen lokalisiert ist, (Katalase A) als auch im Zytoplasma vorkommt (Katalase T). Ebenfalls beschrieben wurde eine mitochondriale Form der Katalase (Petrova *et al.*, 2002).

Es liegt nahe, dass rpt-1 eine Interaktion mit der zytoplasmatischen Katalase eingeht. Da alle rpt-1 Interaktionspartner (Katalase, eif3 und Bif-1) im Zytoplasma co-lokalisiert sein können, ist eine Regulation des Interaktionsprozesses mit rpt-1 notwendig. Ein möglicher Regulationsmechanismus bedarf noch weiterer Klärung.

Eine Möglichkeit besteht darin, dass einer der Interaktionspartner erst vom Kern ins Zytoplasma exportiert wird. Für eif3 sowie für rpt-1 kommt diese Hypothese in Frage, da für beide beschrieben ist, dass sie in Cos-7 Zellen im Nukleus lokalisiert sind (Desbois *et al.*, 1996 und Patarca *et al.*, 1989).

Ob ein Protein transferiert wird und um welches es sich handelt, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Davon ausgehend, dass rpt-1 und Katalase eine Bindung eingehen, bei dem das Enzym Katalase blockiert wird oder eine Konformationsänderung eintritt, kann man nicht von einer Protein-Protein Interaktion im herkömmlichen Sinne sprechen. Inwieweit rpt-1 und Katalase einer gegenseitigen Regulation unterliegen, könnte durch Aktivitätsmessungen des Enzyms geklärt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte.

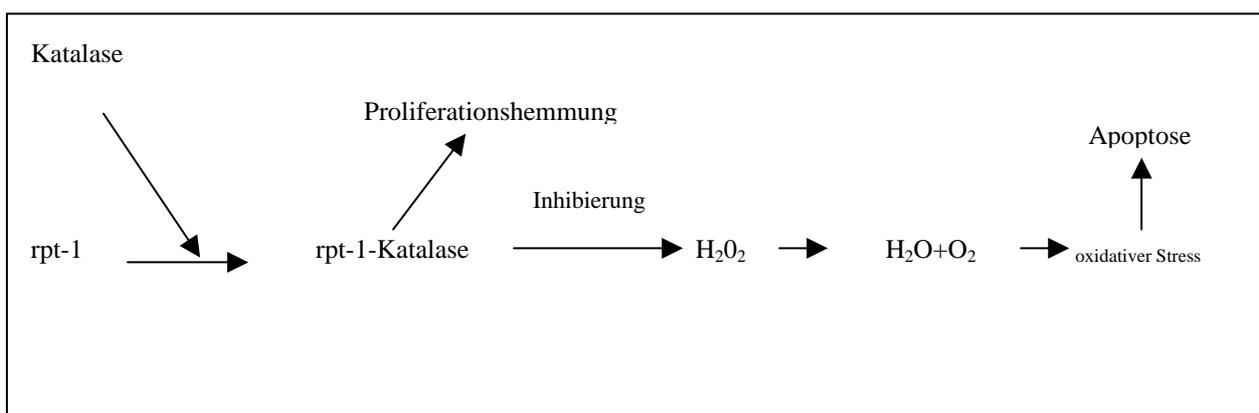


Abb.34: Flusschema zur putativen Wirkweise von Katalase und rpt-1

4.1.2.2 Translation Initiation Faktor 3, subunit 5 (eif3)

eif3 ist ein hochmolekularer Komplex von mindestens 11 Untereinheiten und spielt eine wichtige Rolle bei der Initiierung des Translationsprozesses (Fletcher *et al.*, 1999).

Es konnte gezeigt werden, dass eif3 direkt an eif1 bindet, und dass die Expression einiger Untereinheiten von eif3, wie z. B. eif3a oder eif3h in Brust- oder Prostatakrebs beobachtet werden (Nupponen *et al.*, 1999).

Die im Rahmen des Two-Hybrid Screens isolierte Untereinheit 5 (eif3 sub. 5, eif3e, eif3 p47/p48) codiert im Int 6 Gen und ist an der Regulation der Zellproliferation beteiligt (Asano *et al.*, 1997).

Mayeur konnte zeigen, dass eine stabile Expression eines gekürzten Stücks von eif3e eine maligne Entwicklung in NIH3T3-Zellen verursacht, wohingegen eine stabile Expression des Vollängens eif3e dies nicht tut. Ebenso inhibiert das gekürzte eif3e in Zellen die durch Hungerserum hervorgerufene Apoptose (Mayeur und Hershey, 2002).

Bisher bekannte Interaktionen von eif3e sind die Interaktion mit der Thyrosinkinase p56, welche eine essentielle Rolle in der Induktion der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade und der Caspase Aktivierung spielt (Guo *et al.*, 2000), sowie mit der Cyclin Dependent Kinase 11 (CDK 11) (Shi *et al.*, 2003), was den Bezug zu Bax und weiteren Proteinen der Bcl-xL-Familie herstellt, die wiederum in der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade eine zentrale Rolle einnehmen. Da beide Proteine Multidomänen-Proteine sind, ist es theoretisch möglich, dass rpt-1 zeitgleich mit beiden Proteinen (Bif-1 und eif3) interagiert und so die Voraussetzung für den Ablauf der Apoptose bewirkt.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eif3e über seine Mov 34 / JAB Domäne mit CDK 11 interagiert. Dabei wird eif3e während der Apoptose phosphoryliert. Diese Phosphorylierung kann durch Caspase-3 Inhibitoren geblockt werden, was bedeutet, dass ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Aktivierung der Caspase-3 und der Phosphorylierung von eif3e besteht. Die Phosphorylierung von eif3 erreicht in apoptotischen Zellen ihr Maximum nach 36h. Der eif3e Proteinlevel steigt während der Apoptose an und erreicht seine maximale Expression ebenfalls 36h nach Stimulation (Shi *et al.*, 2003). Im Transfektionsversuch, bei dem rpt-1 in Hela bzw. in HepG2 Zellen transfiziert wurde, konnte eine rpt-1 Proteinexpression beobachtet werden, die zeitparallel zu der oben beschriebenen Expression von eif3 verläuft.

Die Lokalisation von eif3 wird für Hefezellen im Zytoplasma beschrieben (Diella *et al.*, 1997), während in Cos-7 Zellen eif3 im Nukleus beobachtet wird und erst durch Überexpression des Tax-Oncoproteins vom humanen T-Zell Leukemia Virus-1 (HTLV-1) ins Zytoplasma transferiert wird (Desbois *et al.*, 1996). Sowohl in der Literatur (Patarca *et al.*, 1989), als auch in den ektopischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, konnte rpt-1 in Cos-7 Zellen im Nukleus beobachtet werden, in Hela und HepG2 Zellen hingegen ausschließlich im Zytoplasma. Shi und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eif3 und CDK 11 im Nukleozytoplasma Co-lokalisiert sind, kamen aber zu der Schlussfolgerung, dass es einen nukleären und einen zytoplasmatischen Pool von eif3e geben muss (Shi *et al.*, 2003). Da rpt-1 im Zytoplasma lokalisiert ist, kommt für die Interaktion mit eif3e nur der zytoplasmatische Pool in Frage. Dies deutet darauf hin, dass eine Abhängigkeit der beiden Proteine besteht und dass die Lokalisation der Proteine maßgeblich für die Funktion innerhalb des apoptotischen Prozesses ist. Möglich ist auch der Shuttle von eif3 vom Kern ins Zytoplasma, was die unterschiedliche Lokalisation in Cos-7 und Hela bzw. HepG2 Zellen erklärt. Vermutlich ist für diesen Shuttle eine Interaktion mit rpt-1 notwendig.

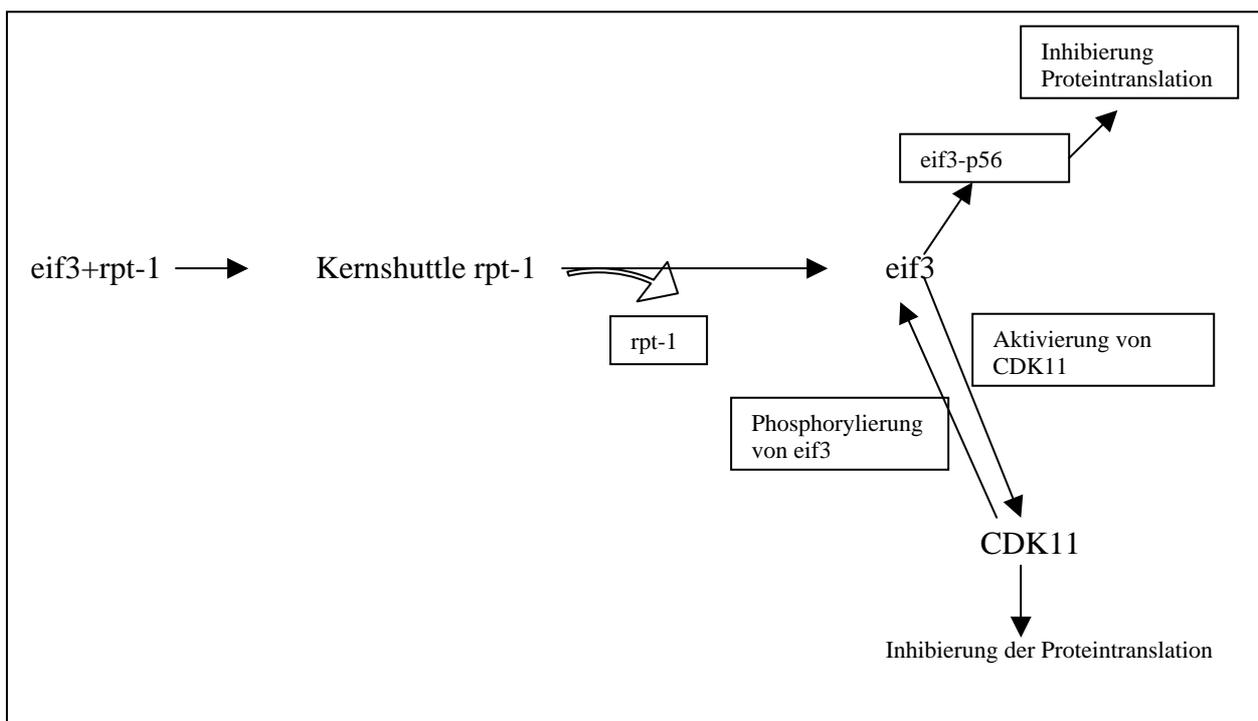


Abb.35: Flussschema zur putativen Funktion von eif3 innerhalb der Interaktion mit rpt-1

4.1.2.3 Bax interacting factor-1 (Bif-1)

Bif-1 ist ein zytoplasmatisches Protein aus der Endophilin Familie (Endophilin B1), welches in den meisten Geweben vorkommt, mit erhöhter Präsenz in murinen Muskel- und Herzzellen, ebenso wie rpt-1, wobei jedoch rpt-1 die höchste Expression im Thymus und Leber der Maus aufweist (Donat, unveröffentlichte Daten, 1999).

Bif-1 ist eine SH3-Domäne beinhaltendes Protein, welches mit dem proapoptotisch wirksamem Protein Bax interagiert (Tan *et al.*, 2001). Die Interaktion von Bif-1 und Bax hat eine Konformationsänderung im Bax Protein zur Folge (Cuddeback *et al.*, 2001). Dies bewirkt, dass das multidomänen Protein Bax vom Zytoplasma zur äußeren mitochondrialen Membran wandert. Durch Oligomerisierung bilden die an diesem Prozess beteiligten Proteine (aus der Bcl-xL-Familie) eine porenähnliche Struktur und fördern somit den Cytochrom C Ausstrom, was wiederum unter IL3-Abnahme die Aktivierung der Caspase und somit die Induktion der Apoptose zur Folge hat (Cuddeback *et al.*, 2001).

Ferner hat Pierrat (Pierrat *et al.*, 2001) beschrieben, dass Mitglieder der Endophilin-Familie über eine Coiled-Coil Region dimerisieren. rpt-1 besitzt ebenfalls eine solche Coiled-Coil Region und könnte über diese Region mit Bif-1 interagieren.

Bax und Bif-1 sind beide im Zytoplasma lokalisierte Proteine (Pierrat *et al.*, 2001). Dies setzt voraus, dass eine Aktivierung eines der Interaktionspartner stattfinden muss, um die Bif-1/Bax Interaktion auszulösen und damit die Apoptose über Cytochrom C Ausschüttung und Caspase-3 Aktivierung zu induzieren. Die Aktivierung, welche die Interaktion von Bif-1 und Bax herbeiführt, könnte durch die Interaktion von Bif-1 mit rpt-1 hervorgerufen werden.

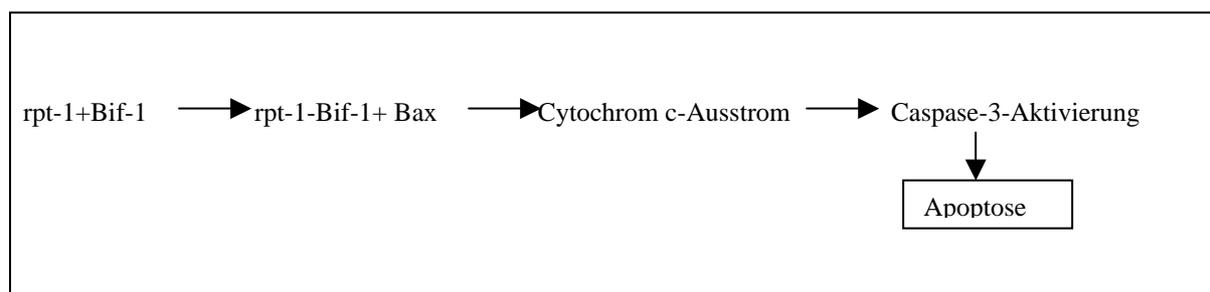


Abb. 36: Flusschema zur putativen Wirkweise von rpt-1 und Bif-1

Alle identifizierten Interaktionspartner (eif3, Katalase und Bif-1) sind am apoptotischen Prozess in der Zelle beteiligt und alle drei putativen Interaktionspartner von rpt-1 sind im gleichen Kompartiment lokalisiert. Möglicherweise könnte rpt-1 als eine Art An/Aus-Schalter fungieren und für diese Proteine eine Kaskade in Gang setzen. Die genaue Wirkweise der Proteine Bif-1, Katalase und eif3 im apoptotischen Prozess ist allerdings noch nicht geklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass der mitochondriale Apoptoseweg beschriftet wird, da der detektierte Interaktionspartner Bif-1, durch die Interaktion mit Bax, an der mitochondrialen Apoptose beteiligt ist. Ebenso führt die Niederregulierung von IL-2 durch rpt-1 zur mitochondrialen Apoptose (vergl. Abb. 40) (Herzog, 2004; Shi *et al.*, 2003; Cuddeback *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 1999)

Die Funktionen dieser identifizierten Interaktionsproteine lassen eine mögliche Rolle von rpt-1 in der Apoptose vermuten. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden Transfektionsversuche mit rpt-1 und den Zelllinien HeLa, HepG2 und Cos-7 durchgeführt.

4.2 Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von rpt-1

Die identifizierten Proteine ergeben Hinweise auf eine Funktion von rpt-1 bei der Apoptose. Deshalb wurde der Einfluss einer transienten Überexpression von rpt-1 auf Apoptose untersucht.

4.2.1 Lokalisation von rpt-1 in transfizierten HeLa-, HepG2- und Cos-7-Zellen

Um Hinweise auf die intrazelluläre Funktion von rpt-1 gewinnen zu können, wurden die Zelllinien HeLa, HepG2 und Cos-7 mit dem Konstrukt pEGFP-rpt-1 und pCMV6-rpt-1 transfiziert.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigen Apoptose in HeLa und HepG2 Zellen nach Transfektion der rpt-1-Konstrukte. Nach Transfektion der Zelllinien HeLa und HepG2 mit pEGFP-rpt-1, konnte ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation beobachtet werden. Die Gruppe von Partaca hingegen hat rpt-1 als nukleäres Protein beschrieben. Der Grund dafür könnte in der Cos-7 Zelllinie begründet sein (Patarca *et al.*, 1989).

Auch in den eigenen Untersuchungen lässt sich in Cos-7 Zellen rpt-1 nur im Kern oder der Kernmembran beobachten, was die Ergebnisse der Gruppe von Patarca bestätigt. Cos-7 Zellen gehen nach rpt-1 Transfektion nicht in Apoptose und lassen dadurch eine zellspezifische Funktion und Lokalisation von rpt-1 vermuten.

Für die zellspezifische Lokalisation bieten sich unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten an. Z.B. könnte es sein, dass in Cos-7 Zellen keine Translokation von rpt-1 in das Zytoplasma stattfindet, wodurch die Interaktion mit den Partnern Bif-1 eif3 oder Katalase unterbleibt und dadurch keine Apoptose ausgelöst wird.

Cos-7 Zellen exprimieren eif3 im Kern, welches erst durch die Überexpression des Tax Oncoproteins des human T-cell-Leukemia Virus ins Zytoplasma gelangen kann (Desbois *et al.*, 1996). Die Interaktion von rpt-1 und eif3 und der gemeinsame Export, könnte eine mögliche Begründung für die beobachtete selektive Kernlokalisierung von rpt-1 in Cos-7 Zellen sein, da eine Überexpression des Oncoproteins nicht vorliegt.

Für die Zelllinien A375 und HEK 293 hingegen ist beschrieben worden, dass es einen nukleären und einen zytoplasmatischen eif3 Pool gibt (Shi *et al.*, 2003), was die Lokalisation von rpt-1 im Zytoplasma der Zelllinien Hela und HepG2 erklären könnte.

Weiterhin interessant ist, dass für das Ret Finger Protein (RFP, Trim 27), ebenfalls ein Mitglied der Trim Familie wie rpt-1, beschrieben wird, dass es abhängig von den Zelllinien in verschiedenen Kompartimenten vorkommen kann (Zytoplasma, Nukleus, Zytoplasma und Nukleus) (Tetzl *et al.*, 1999 und Harbers *et al.*, 2001). So könnte auch rpt-1, abhängig von der Zelllinie, in unterschiedlichen Kompartimenten vorkommen und möglicherweise unterschiedliche Aufgaben erfüllen.

RFP besitzt ein Nuclear Export Signal (NES), welche in der Coiled-Coil-Region lokalisiert ist und den Export vom Nukleus ins Zytoplasma vermittelt (Harbers *et al.*, 2001). Eine NES ist charakterisiert durch eine leucinreiche Domäne. Diese können von einer Klasse von Proteinen erkannt werden, die als Exportin I bezeichnet werden. Diese binden an die leucinreiche Sequenz und vermitteln den Kernexport. Proteine, die eine NES besitzen, haben meist auch eine Nuclear Lokalisation Sequenz (NLS), die den Transport oder den Verbleib im Kern regeln. Diese NLS ist charakterisiert durch mehrere aufeinander folgende Lysine und hat oft auch einen Prolinrest. An diesem lysinreichen Bereich können Proteine binden, die als Importin bezeichnet werden und den Export oder den Verbleib im Kern regeln (Görlich, 1998; Moore, 1998; Henderson und Fagotto, 2002).

Da rpt-1 ebenfalls eine Coiled-Coil-Region beinhaltet und der gleichen Familie angehört, könnte es sich hier ähnlich verhalten. In der Aminosäuresequenz von rpt-1 lässt sich sowohl eine leucinreiche Domäne finden, als auch eine Domäne, durch die eine NLS charakterisiert ist (Abb. 37). Ebenso beschreiben Tissot und Mehti eine NLS im Staf 50 Protein (Tissot und Mehti, 1995). Staf 50 ist ebenfalls ein Mitglied der Trim-Familie und wird als humanes Homolog zu rpt-1 diskutiert.

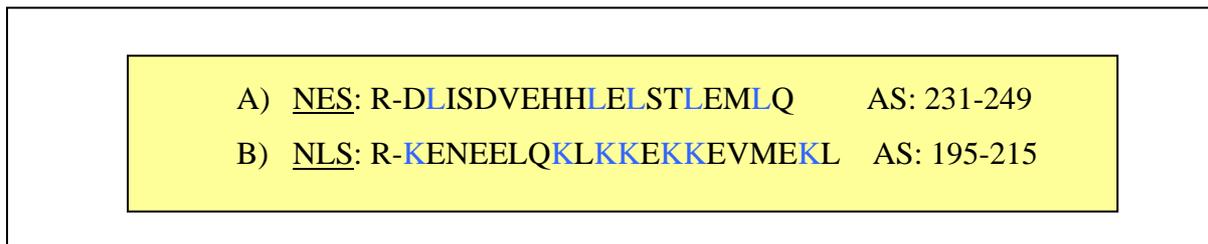


Abb.37: Ausschnitte aus der Aminosäuresequenz von rpt-1. **A)** Nuclear Export Sequenz (NES) Leucinreiche Domäne sind die AS: 240-250 **B)** Nuclear Lokalisation Sequenz (NLS), Charakterisiert durch mehrere aufeinander folgende Lysine, gebildet von den Aminosäuren 203-212

Ob rpt-1 nun generell in verschiedenen Kompartimenten vorkommt oder es via NES unter bestimmten Bedingungen aus dem Kern exportiert wird ist noch ungeklärt.

Bei der mikroskopischen Auswertung der Transfektionsversuche, zeigte sich speziell bei Hela und HepG2 Zellen eine Auflösung des Zellverbandes. Um einen möglichen zellschädigenden Einfluss des Vektors oder des Konstruktes zu prüfen, wurden Zytotoxizitätsstudien durchgeführt. Die umfangreichen LDH-Messungen ergaben keinen Hinweis auf zellschädigende Effekte, was auf mögliche apoptotische Mechanismen indiziert.

4.3 Mechanismen der Apoptose

Ein initialer Schritt bei der Auslösung der Apoptose ist die Bindung von FasL oder Anti-Fas-Antikörper. Dies führt zur Multimerisierung des Fas-Rezeptors und zur Rekrutierung des FADD Proteins (Fas associated protein with death domain). Das C-terminale Ende des

FADD, die death domain (DD), interagiert mit der cytosolischen Death Domäne des Rezeptors. (Chinnaiyan *et al.*, 1995) Diese Fas- Rezeptor Interaktion wurde DISC (Death inducing signaling complex) genannt (Kischkel *et al.*, 1995).

Das N-terminale Ende von FADD enthält die Death Effektor Domäne (DED). Diese ist, im Falle der Aktivierung des Fas-Rezeptors, für die Rekrutierung der ProCaspase-8 zuständig. Die Anlagerung erfolgt über die DED im N-terminalen Ende der Procaspase (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996). Direkt nach der Rekrutierung wird die ProCaspase-8, durch Selbstspaltung in ein aktives Dimer, aktiviert (Medema *et al.*, 1997; Muzio *et al.*, 1998).

Nach dieser Aktivierung wird die Caspase-8 autark und benötigt keine weiteren Fas oder FADD bindende Proteine. Die weitere Regulierung der Fas-abhängigen Apoptose Kaskade erfolgt über andere regulatorische Moleküle, die fördernd oder inhibierend einwirken können (Memon *et al.*, 1998). FLIP (FLICE (FADD-like interleukin 1 β -converting enzyme)-like inhibitory Protein) ist ein inhibierendes Protein, welches zwei N-terminale DED Motive besitzt. Über diese DED-Motive kann Flip die Fas vermittelte Apoptose hemmen, indem es mit der DED an die DISC bindet, und so die Aktivierung der ProCaspase-8 verhindert (Irmeler *et al.*, 1997; Scaffidi *et al.*, 1999; Thome und Tschopp, 2001, Krüger *et al.*, 2001).

Induzierende Wirkungen auf die Fas-vermittelte Apoptose hat die Proteinkinase DAPK (Death Associated Protein Kinase). Diese ist eine Kalzium/Calmodulin regulierte Serin/Threonin Kinase mit einer Todesdomäne (Death Domain), welche wahrscheinlich mit der DISC und mit anderen Caspasen interagiert und damit die Apoptose fördert.

FAF-1 (Fas Associated Protein Faktor) interagiert mit der zytoplasmatischen Domäne von Fas und potenziert die durch Fas vermittelte Apoptose (Cohen *et al.*, 1999; Chu *et al.*, 1995).

Einmal aktiviert, initiiert die Caspase-8 zwei verschiedene Fas-vermittelte Apoptose Mechanismen, die zur Aktivierung der Caspasen führt. In jedem Zelltyp sind prinzipiell beide Wege möglich, doch unterscheidet man in Fas-Typ-1 und Fas-Typ-2 Zellen, abhängig von dem bevorzugten Weg.

In Fas-Typ-1 Zellen aktiviert die Caspase-8 die stromab aktiven Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7 hauptsächlich durch direkte Spaltung.

In Fas-Typ-2 Zellen aktiviert die Caspase-8 indirekt die stromab gelegenen Caspasen durch die Spaltung des proapoptotischen Moleküls BID (Bcl-2 Interacting Domäne). Dieses fördert die mitochondrialen Veränderungen, wodurch die proteolytische Kaskade in Gang gesetzt wird (Luo *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998).

Nach der Spaltung von BID durch die Caspase-8, findet eine Translokation des C-terminalen Endes von BiD ins Mitochondrium statt. Dadurch wird der Ausstrom von

apoptoseinduzierenden Proteinen, wie z. B. Cytochrom C, SMAC/ Diablo (second mitochondria derived activator of caspases/ direct IAP-binding Protein with low pI), Endonuklease G und AIF, ins Zytoplasma gefördert. Der Mechanismus, der diesem Prozess zugrunde liegt, ist noch ungeklärt (Li *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Yin, 2000).

Um die Rolle von Bid in der Apoptosekaskade zu erklären, werden zwei Hypothesen favorisiert:

Die erste Hypothese geht davon aus, dass Bid als Ligand für andere Proteine der Bcl-2 Familie wie Bak (Bcl-2 antagonist Killer-1) und Bax (Bcl-2 associated X-Protein) dient, die an die äußere mitochondriale Membran gebunden sind. Durch diese Bindung wird dann, in einem unbekanntem Prozess, der Ausstrom von apoptoseinduzierenden Proteinen gefördert.

Die zweite Hypothese geht davon aus, dass ein „wartendes“ proapoptotisches Protein tBID abhängig von der Existenz des spezifischen mitochondrialen Lipids Cardiolipin agieren kann. Dies würde bedeuten, dass BiD direkt die Lipidstruktur der äußeren mitochondrialen Membran stört. Eine Vermutung ist, dass das „wartende“ tBiD, andere Proteine wie z. B. die BH3- Proteine Bak oder Bax benötigt um seinen proapoptotischen Einfluss ausüben zu können. (Wei *et al.*, 2000). Da gezeigt wurde, dass tBID Lipidstrukturen *in vitro* destabilisieren kann, (Kudla *et al.*, 2000; Zhai *et al.*, 2001), könnte es möglich sein, dass tBiD an einer cardiolipinreichen Kontaktstelle von innerer und äußerer Membran bindet. Dies könnte zu einer Membrandestabilisierung durch die Integrierung von Bak oder Bax führen. Die Konsequenz daraus wäre, dass die äußere Membran permeabel wird ohne zu reißen. Somit könnten die Apoptoseinduzierenden Proteine ins Zytoplasma gelangen (Lutter *et al.*, 2001).

In Abb. 38 sind die bisher beschriebenen Vorgänge der mitochondrialen Apoptose graphisch zusammengefasst.

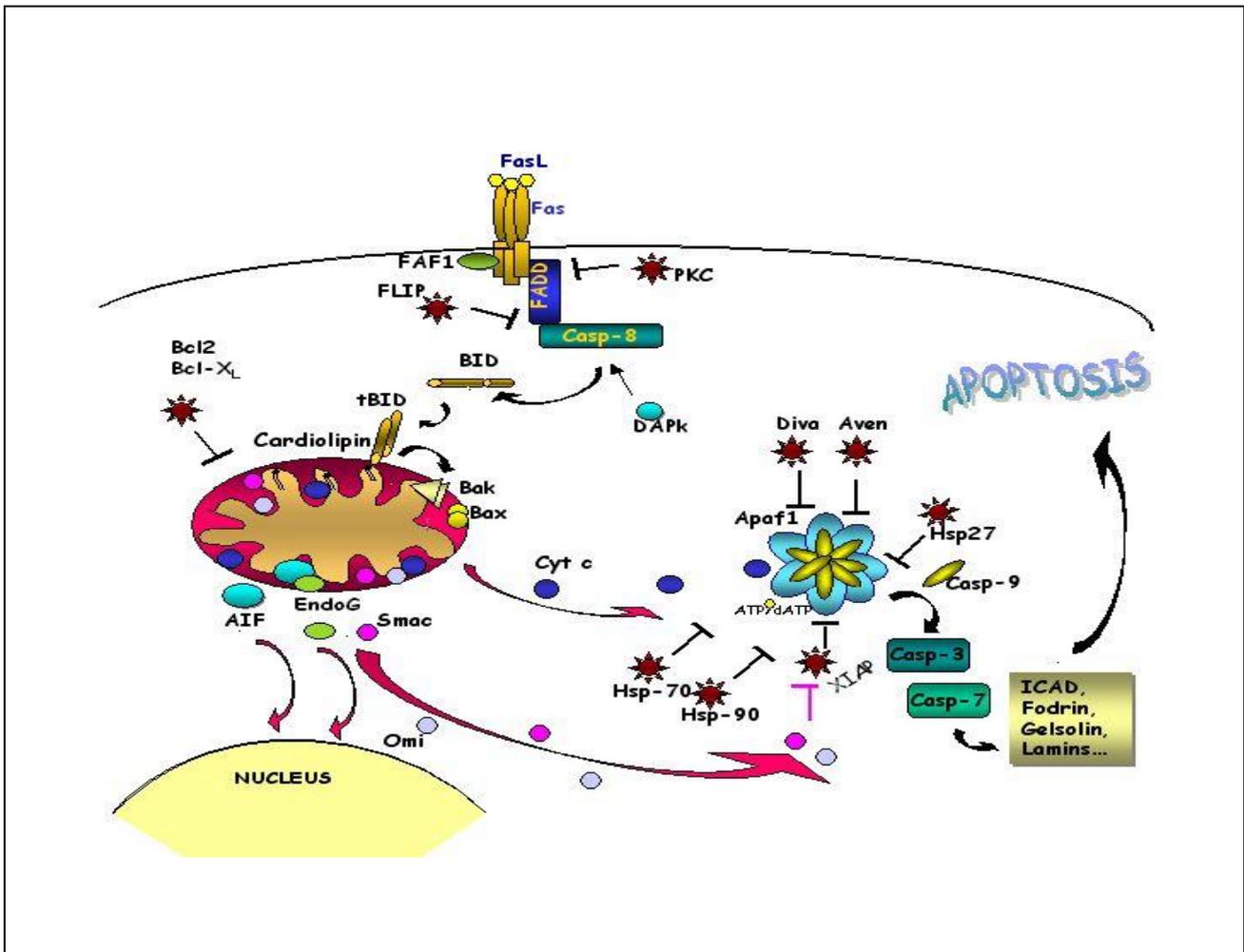


Abb.38:Flussschema des mitochondrialen Apoptoseweges nach Ferraro (Ferraro, 2003)

→ = Aktivierung; —| = Hemmung

FasL: APO1, APT1, CD95, TNFRSF6, Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 6 **FADD:** Fas associating death domain containing protein **FAF:** Fas associated factor **Flip:** Cellular FLICE like inhibitory protein **DAPK:** Death Associated Protein Kinase 1 **BID:** Bcl-2 Interacting Domaine. **tBID:** Inaktive Form von BID **Bak:** BCL2-antagonist/killer 1 **Bax:** Bcl 2 Associated X Protein **Bcl-2:** B cell lymphoma 2 **Bcl-XL:** BCL2 related Protein long isoform **AIF:** Apoptose inducing factor **Cyt C:** Cytochrome C **Apaf:** apoptosis protease-activating factor **OMI:** mitochondriale Serin Protease, Antagonist zu Apoptoseinhibitoren **AP:** nucleärer Transkriptionsfaktor. **Endo G:** Endonuklease G **SMAC:** Second mitochondria derived activator of caspase

4.4 rpt-1 Expression und Apoptose

Zur funktionellen Charakterisierung von rpt-1 wurden transiente Transfektionsstudien mit dem pCMV6 Überexpressionsvektor durchgeführt. Als Endpunkte für Apoptose wurde die Caspase-3-Aktivierung gemessen sowie Apoptose TUNEL Assays an Hela und HepG2 Zellen durchgeführt. Sowohl in transfizierten Hela als auch in HepG2 Zellen war Apoptose auslösbar, was durch eine Zunahme der Caspase-3-Aktivität angezeigt werden konnte.

Ebenso konnte in transfizierten Hela-Zellen 4h nach Transfektionsstop rpt-1 im Western Blot nachgewiesen werden, gleichzeitig mit einer ca. 8fachen Erhöhung der Caspase-3-Aktivität. Ähnliche Befunde konnten mit dem Apoptose TUNEL Assay, einem weiteren Test zum Apoptosenachweis erzielt werden. Diese Befunde lassen auf eine proapoptotische Funktion von rpt-1 schließen. Es ist außerdem gezeigt worden, dass rpt-1 die Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (IL-2R α) kontrolliert. Die Niederregulierung von rpt-1 wird als ein Startsignal für die klonale Expansion von T-Lymphozyten interpretiert (Patarca *et al.*, 1988,1989). IL-2 ist ein antiapoptotisches Protein, welches die Expression der survival Proteine bcl-2/bcl-x(L) induziert (Sieg *et al.*, 1997).

In den immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stärke der rpt-1 Expression in Hela Zellen in direktem Zusammenhang zur Höhe der Caspase Aktivität steht (Abb.27). Dies würde bedeuten, dass die Menge an rpt-1 verantwortlich für die Stärke der Apoptose ist. Dies lässt vermuten, dass es eine Art Schwellenwert (evtl. für rpt-1) geben könnte, der wenn er überschritten wird, unabdingbar zur Apoptose führt.

Die immunhistochemischen Untersuchungen von HepG2-Zellen lassen eine zytoplasmatische Expression von rpt-1 2h nach Transfektionsstop erkennen (Abb.26). Im Western Blot ist zum gleichen Zeitpunkt rpt-1 am stärksten detektierbar. Dass sich zu keinem anderen Zeitpunkt rpt-1 im immunhistochemischen Experiment nachweisen lässt, könnte darin begründet sein, dass eine zu geringe Menge an rpt-1 fluoreszenzmikroskopisch nicht erkennbar ist. In HepG2 Zellen ist eine 2fach erhöhte Caspase Aktivität bis 6h nach Transfektionsstop zu verzeichnen, eine rpt-1 Expression ist 0h und 2h nach Transfektionsstop erkennbar (Abb.22 und 24).

Dies bedeutet vermutlich, dass in HepG2 Zellen die Apoptose durch rpt-1 direkt über die Interaktion von Bif-1/Bax vermittelt und Caspase-3 dadurch direkt aktiviert wird.

Die Zeitpunkte, an denen die Apoptoseraten am höchsten sind (Hela bis 12h, HepG2 0h, 8h, 12h), lassen Abstufungen erkennen, ähnlich der Apoptose, wie sie unter IL-3 Mangel hervorgerufen wird. Hierbei erfolgt die Apoptose in zwei Stufen. Zunächst wird von 8h-12h 50% Apoptose festgestellt, die durch IL3-Gabe reversibel ist. Nach 10-12h jedoch ist der Eintritt der Apoptose irreversibel (Leverrier *et al.*, 1997). Cuddeback und Mitarbeiter beschrieben, dass die durch Bax initiierte Apoptose mit einer IL-3 Senkung einhergeht. Bax ist ein Interaktionspartner von Bif-1 (Cuddeback *et al.*, 2001), Bif-1 ist, wie die vorliegende Arbeit zeigt, ein Interaktionspartner von rpt-1. Bax ist in der Mitochondrienmembran lokalisiert und hat eine zentrale Rolle in der mitochondrialen Apoptose (Ferraro, 2003). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass rpt-1 ebenfalls den mitochondrialen Apoptoseweg beeinflusst.

4.5 Apoptoseinduktion und rpt-1 Expression

Um zu untersuchen, ob die rpt-1 Expression sich durch apoptoseinduzierende Stimuli ändert, wurden die Zellen mit Actinomycin D (AMD), Anti-Fas Antikörper und UVB-Bestrahlung behandelt.

Die Induktion der Apoptose in untransformierten Hela und HepG2 Zellen geht einher mit einer rpt-1 Expression (Abb.28 und 29).

In Hela Zellen konnte eine deutliche rpt-1 Expression, mit einem gleichzeitigen Anstieg der Caspase-3-Aktivität nach Behandlung mit 2µg AMD erzielt werden. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Menge an rpt-1 in einem direkt proportionalen Verhältnis zur Apoptoserate steht. Dies ist dadurch begründet, dass bei geringen Mengen AMD rpt-1 zwar exprimiert wurde, jedoch keine Caspase-3-Aktivität messbar war. Bei Behandlung der Zellen mit 2µg AMD/ml erhöht sich die Caspase-3-Aktivität um ca. das 10fache. Möglicherweise deutet dies darauf hin, dass ein Schwellenwert überschritten wurde und somit Apoptose irreversibel stattfindet. Die fehlende Aktivitätserhöhung nach Gabe von 1µg AMD/ml könnte somit mit einer Dosisunterschreitung erklärbar sein.

Die Erhöhung der Caspase-3-Aktivität in HepG2 Zellen hingegen scheint direkt von der rpt-1 Expression abhängig zu sein, wobei ein Zusammenhang zwischen der rpt-1 Menge und der

Stärke der Caspase-3-Aktivitätserhöhung zu bestehen scheint. Für AMD beschreiben Glazyrin und Mitarbeiter, dass es Zellen für die Fas (CD 95) vermittelte Apoptose sensitiviert (Glazyrin *et al.*, 2002). Deshalb wurde nachfolgend überprüft, ob Fas-induzierte Apoptose die Expression von rpt-1 ändert. Eine Behandlung von Hela und HepG2 Zellen mit AMD, führte in beiden Zelllinien zu einer konstanten Zunahme der rpt-1 Expression, die mit der Aktivierung der Caspase-3 korrelierte. AMD ist ein bekannter Transkriptionshemmer. Da eine Zunahme der rpt-1 Expression zu beobachten war, kann ein Einfluss auf die Transkription des Proteins ausgeschlossen werden.

Anti-Fas Antikörper induzierte Apoptose in untransformierten Hela und HepG2 Zellen geht in beiden Zelllinien mit einer dosisabhängigen Expression von rpt-1 und mit der Erhöhung der Caspase-3-Aktivität einher (Abb.30 und 31).

In beiden Zelllinien lässt sich durch Anti-Fas Antikörper rpt-1 exprimieren. Dies konnte nach Behandlung mit 1µg Anti-Fas Antikörper als auch nach Behandlung mit 2µg Anti-Fas Antikörper erzielt werden. Wiederum wurde in Hela Zellen eine indirekte Abhängigkeit der Caspase-3-Aktivitätserhöhung von der rpt-1 Expression beobachtet, wie auch schon bei der Induktion mit AMD.

In HepG2-Zellen konnte eine direkte Abhängigkeit der Caspase-3-Aktivierung von der rpt-1 Expression beobachtet werden. Möglicherweise ist dies ein Hinweis darauf, dass in HepG2 Zellen, durch Induktion der Apoptose mit Anti-Fas Antikörper, die Apoptose über den mitochondrialen Mechanismus und der Interaktion von Bif-1 /Bax abläuft.

Durch Induktion der Apoptose in HepG2 Zellen mit AMD, als auch mit Anti-Fas Antikörper, lässt sich eine direkte Abhängigkeit der Caspase-3-Aktivierung von der rpt-1 Expression feststellen. In Hela Zellen scheint eine indirekte Abhängigkeit zwischen der Erhöhung der Caspase-3-Aktivität und der rpt-1 Expression zu bestehen, sowohl nach Behandlung mit AMD als auch nach Behandlung mit Anti-Fas Antikörper.

Parallel dazu haben die Transfektionsversuche ebenfalls gezeigt, dass in Hela Zellen eine indirekte und in HepG2 Zellen eine direkte Abhängigkeit zu bestehen scheint. Vermutlich ist in Hela Zellen ein Schwellenwert zu überschreiten, was dann über eine starke (8-10fache) Erhöhung der Caspase-3-Aktivität irreversibel zur Apoptose führt (Abb.21).

In HepG2 Zellen fällt die Aktivitätserhöhung der Caspase-3 geringer aus (2-4fach), steht aber im direkten Zusammenhang zur rpt-1 Expression (Abb.23 und 29).

Die Expression von rpt-1 in HeLa und HepG2 Zellen nach Apoptoseinduktion mittels UVB-Bestrahlung war dagegen unverändert. In HaCat Zellen konnte bei niedriger Strahlendosis eine Zunahme der rpt-1 Expression gezeigt werden. Eine Aktivierung der Caspase-3 war nur nach hohen Strahlendosen nachweisbar.

Kulms und Mitarbeiter konnten zeigen, dass UVB-Bestrahlung auf unterschiedliche Weise Apoptose induzieren kann. Hohe Strahlungsdosen können direkte DNA-Schädigungen hervorrufen, was unmittelbar zur Caspase-3-Aktivierung führt. In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine Caspase-3-Aktivierung in HeLa und HaCat Zellen festgestellt werden. Niedrige Strahlungsintensitäten führen zur CD95 bzw. Caspase-8-Aktivierung und somit zur Beschreitung des mitochondrialen Apoptoseweges, was die rpt-1 Expression bei geringen Strahlungsintensitäten in HaCat Zellen erklärt (Kulms *et al.*, 1999).

In HeLa Zellen wird kein rpt-1 exprimiert, weil erst bei der höchsten Strahlendosis eine erhöhte Caspase-3-Aktivität gemessen werden kann. Dies ist bereits eine so hohe Dosis, dass vermutlich eine direkte DNA-Schädigung hervorgerufen wird und so der Apoptose Mechanismus über CD95 in den Hintergrund tritt.

Eine Beteiligung von rpt-1 am Apoptose-Prozess konnte durch die Transfektionsstudien belegt werden. Die Identifizierung der Interaktionspartner eif3, Bif-1 und Katalase durch den Two Hybrid-Screen geben Hinweise auf den möglichen Apoptosemechanismus. Möglicherweise ist rpt-1 zunächst im Kern oder der Kernmembran lokalisiert (Patarca *et al.*, 1989, Harbers *et al.*, 2001, Tetzl *et al.*, 1999), da es ähnlich dem Ret Finger Protein (RFP), welches ebenfalls ein Protein der Trim Familie ist und das gleiche Motiv besitzt, eine NES (nuclear export signal) in der Coiled-Coil Region beinhaltet (Tetzl *et al.*, 1999, Harbers *et al.*, 2001). Es lassen sich in der Aminosäuresequenz von rpt-1 Strukturen lokalisieren, die sowohl auf eine NES, als auch auf eine Nuclear Lokalisation Sequenz (NLS) hindeuten. Proteine, die eine NES besitzen, haben oft auch eine NLS, da die Regulation des Exports über die Exponierung eines der beiden Signale läuft. Durch Phosphorylierung wird die NES exponiert, was zum Export des Proteins aus dem Kern führt. Bei Dephosphorylierung wird die NLS exponiert und das Protein verbleibt im Kern oder wird in diesen importiert (Cyert, 2001; Klee *et al.*, 1998; Horsley und Pavlath, 2002).

Durch die Interaktion mit dem ebenfalls im Kern lokalisiertem eif3 (Desbois, 1996) könnte rpt-1 stimuliert werden, möglicherweise durch Phosphorylierung des rpt-1/eif3 Komplexes ins Zytoplasma überzugehen, vermutlich unter Einflussnahme von Protein Kinase Calpha

(PKC α) und/oder dem Tax Oncoprotein (Harbers *et al.*, 2001, Desbois 1999, Kasai und Jeang, 2004, Mayeur und Hershey, 2001). Im Zytoplasma wird der rpt-1 /eif3 Komplex wieder getrennt, möglicherweise durch die Interaktion von eif3 mit CDK11, wobei eif3 phosphoryliert wird (Shi *et al.*, 2003).

Die Interaktion von eif3 mit CDK11 bewirkt weiterhin die Aktivierung von CDK11. Dies wiederum hat die Inhibierung der Proteintranslation zur Folge (Shi *et al.*, 2003, Nelson, 2004). Nachgewiesen ist auch eine Interaktion von eif3 und p56, was im weiteren zur Inhibierung der Translation führt (Mayeur und Hershey, 2002). Eine weitere theoretische Möglichkeit wäre, dass eif3 ähnlich wie eif4e, durch die Phosphorylierung eine Stimulation von Anti CD4 und Anti CD3 bewirkt und dies wiederum zur Abnahme der Proteinsynthese und somit zur Apoptose führt (Baretta *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse aus den Two-Hybrid Studien, die eine Interaktion von rpt-1 mit Apoptose regulierenden Proteinen ergaben, als auch die Studien zur Transfektion, Überexpression, Lokalisation und Induktion von Apoptose, weisen auf eine wichtige Funktion von rpt-1 in der Regulation des programmierten Zelltodes hin. Die möglichen Regulationsmechanismen, an denen rpt-1 beteiligt ist, sind in folgendem Kapitel zusammengefasst.

4.6 Hypothese zur potentiellen Funktion von rpt-1

rpt-1 kann im Zytoplasma mehrere verschiedene Aufgaben erfüllen, welche aber alle mit der Regulation der Apoptose im Zusammenhang zu stehen scheinen.

Zuerst ist in diesem Zusammenhang die Interaktion von rpt-1 mit Bif-1 zu nennen (Dho und Kwon, 2003), welche vermutlich über die Coiled-Coil Region beider Proteine stattfinden müsste (Dho und Kwon, 2003, Cao *et al.*, 1997). Bif-1 wiederum interagiert mit Bax, wozu erst eine Stimulation bzw. Aktivierung notwendig ist, da Bax und Bif-1 im Zytoplasma Co-lokalisiert sind (Tan *et al.*, 2001, Pierrat *et al.*, 2001). Bax geht vom Zytoplasma an die äußere mitochondriale Membran und fördert unter Beteiligung mehrerer verschiedener Proteine der Bcl-xL Familie die Ausschüttung von Cytochrom C, was unter IL3-Abnahme zur Caspase Aktivierung und somit zur Apoptose führt (Cuddeback *et al.*, 2001, Yoshida, 1999; Cai *et al.*, 1998, Lee und Wei, 2000, Leverrier *et al.*, 1997).

Es ist auch bekannt, dass rpt-1 den IL-2R α niederreguliert, wodurch die IL-2 Immunantwort der Zelle ausbleibt. Zusätzlich wird die Proliferation gehemmt, was in einer Immunsuppression mündet (Patarca *et al.*, 1989, Minami *et al.*, 1993).

Gleichzeitig jedoch, hat die Niederregulierung des IL-2-Rezeptors zur Folge, dass CD95 (Fas) erhöht wird, was zur Rekrutierung von Fas associated Protein with Death Domaine (FADD) führt. Dadurch wird die Caspase-8 aktiviert, die wiederum die Spaltung von BID vermittelt. Das prozessierte BID interagiert mit Bax, was über die Bif-1 /Bax Kaskade zur Apoptose führt (Kuwana *et al.*, 1998, Ferraro 2002).

Im umgekehrten Fall, wenn rpt-1 durch IL-2R α niederreguliert wird, hat das über die Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor, die T-Zell Aktivierung (Patarca *et al.*, 1989) und c-fos Expression zur Folge. Eine Erhöhung der c-fos Expression bewirkt ihrerseits eine gegenseitige Regulation von rpt-1 (Patarca *et al.*, 1989).

Sowohl c-Fos als auch AP-1 können von rpt-1 niederreguliert werden. Im 3`translatierten Bereich von rpt-1 sind Ap-1 Silencersequenzen beschrieben worden (Patarca *et al.*, 1989). Ebenso ist gezeigt worden, dass die Niederregulierung von AP-1 den Proteinlevel von Bax erhöht was dann über die Bif-1 /Bax Kaskade zur Apoptose führt (Park *et al.*, 2004).

Die Interaktion von rpt-1 und Katalase im Zytoplasma könnte zur Blockade oder Veränderung des Enzyms führen. Dies kann einerseits proliferationshemmend wirken (Brown *et al.*, 1999), und andererseits einen Einfluss auf die Biogenese der Peroxisomen haben (Lovering *et al.*, 1993). Hauptsächlich jedoch würde dies die Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff unterbinden, was dann innerhalb der Zelle zu oxidativem Stress und letztendlich zur Apoptose führt (Li *et al.*, 1999).

Die theoretisch möglichen Regulationsmechanismen, wie sie durch rpt-1 während der Apoptose durchgeführt werden können, bedürfen noch weiterer Klärung.

Im folgendem Schema sind die oben beschriebenen Zusammenhänge graphisch dargestellt.

Nach Abschluss der Arbeiten lassen sich folgende neue Erkenntnisse zusammenfassen:

rpt-1 ist ein an der Apoptose beteiligtes Protein, welches durch die Interaktion mit den Proteinen eif3, Bif-1 und Katalase mehrere Möglichkeiten besitzt, um regulierend in den apoptotischen Prozess der Zelle einzugreifen. Es hat sich gezeigt, dass rpt-1 nur bei Lokalisation im Zytoplasma apoptotisch wirksam wird. Die Lokalisation im Kern, wie sie in Cos-7 Zellen beobachtet werden kann, ruft keine Apoptose in transfizierten Zellen hervor.

Daher scheint ein Shuttlemechanismus zu existieren, der über eine NES den Export ins Zytoplasma bewerkstelligen kann und durch die NLS den Verbleib im Kern reguliert.

Ein wichtiges Protein hierfür könnte der Interaktionspartner eif3 sein. Für dieses Protein ist beschrieben, dass es den Shuttle vom Kern ins Zytoplasma vollzieht (Desbois *et al.*, 1996) und somit durch die Interaktion mit rpt-1 aktiv an dessen Transport ins Zytoplasma beteiligt sein könnte.

Weitere Regulationsmöglichkeiten bestehen durch die schon vorher bekannten Eigenschaften von rpt-1, den IL-2 Rezeptor sowie AP-1 nieder zu regulieren. Durch die Entdeckung des Interaktionspartners Bif-1 schließt sich der Kreis zwischen den gegensinnigen Regulierungen von rpt-1/IL-2 Rezeptor bzw. rpt-1/AP-1 und der Regulation der Apoptose.

Die Induktionsversuche haben gezeigt, dass endogenes rpt-1, durch Stimulation der Zelle mit Apoptose induzierenden Substanzen, aktiviert werden kann. Vermutlich ist die Interaktion von rpt-1 mit Katalase eine Folge ähnlicher Stimulation, die verhindern soll, dass Katalase die Apoptose in schon geschädigten Zellen hemmt.

Abschließend kann gesagt werden, dass rpt-1 wie schon andere Mitglieder der Trim-Familie, ein am Apoptoseprozess beteiligtes Protein ist welches vermutlich eine wichtige Rolle in der Regulierung der Apoptose spielt. Aufgrund der zentralen Rolle, welche die Apoptose in den pathogenen Abläufen im Organismus, aber auch in der Entwicklung eines Organismus einnimmt, ist es wichtig, durch fortführende Untersuchungen die genauen Sachverhalte zu klären.

5. Zusammenfassung

Das regulatory-protein-T-lymphocyte-1 (rpt-1) ist ein Zink-Ring-Finger Protein, das erstmals im Zusammenhang mit der Regulation des IL2-Rzeptors α beschrieben wurde. Jüngste Arbeiten zeigten eine Zugehörigkeit zur Trim-Familie, was eine Funktion von rpt-1 in der Apoptose vermuten lässt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels des Two-Hybrid Systems putative Interaktionspartner zu ermitteln und die mögliche Funktion von rpt-1 zu charakterisieren.

Mit Hilfe des Two-Hybrid Systems konnten die Proteine Bif-1 (Bax interacting factor-1), eif3 (translation initiation factor 3 subunit 5) und Katalase als Interaktionspartner von rpt-1 identifiziert werden. Die Ergebnisse des Two-Hybrid Systems konnten durch anschließende Co-Immunopräzipitations-Experimente verifiziert werden. Da die Funktion dieser Proteine ebenfalls auf eine Rolle von rpt-1 in der Apoptose hindeuten, wurden dazu transiente Transfektionsstudien in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Als Endpunkte für Apoptose wurde an HeLa und HepG2 Zellen die Caspase-3 Aktivierung gemessen, Apoptose TUNEL Assays durchgeführt und lichtmikroskopisch apoptosebedingte morphologische Veränderungen überprüft. In beiden Zelllinien war nach rpt-1 Transfektion Apoptose auslösbar, was durch die Zunahme der Caspase-3-Aktivität angezeigt werden konnte und lichtmikroskopisch belegt wurde. Ähnliche Befunde konnten mit dem Apoptose TUNEL Assay erzielt werden. Die intrazelluläre Lokalisation scheint hierbei wichtig für die funktionelle Bedeutung von rpt-1. Eine zytoplasmatische Expression ist wichtig für die Induktion apoptotischer Prozesse, wie die Ergebnisse an HeLa und HepG2 Zellen belegen. Eine Lokalisation im Kern und der Kernmembran löst keine Apoptose aus, wie an Cos-7 Zellen gezeigt werden konnte.

Die Untersuchungen an untransfizierten HeLa und HepG2 Zellen mit den apoptoseinduzierenden Stimuli Actinomycin D (AMD) und Anti-Fas Antikörper sollten zeigen, ob sich die rpt-1 Expression in den untersuchten Zelllinien ändert. Eine Behandlung der Zellen mit AMD und Anti-Fas Antikörper führte in beiden Zelllinien zu einer konstanten Zunahme der rpt-1 Expression, die mit der Aktivierung der Caspase-3 korrelierte. In HaCat Zellen konnte durch niedrig dosierte UVB-Bestrahlung eine Zunahme der rpt-1 Expression gezeigt werden.

Sowohl die Ergebnisse aus den Two-Hybrid Studien, als auch die Studien zur Transfektion, Überexpression und Induktion von Apoptose, weisen auf eine wichtige Funktion von rpt-1 in der Regulation des programmierten Zelltodes hin. Die möglichen Regulationsmechanismen unter rpt-1 Beteiligung lassen sich wie folgt zusammenfassen: Durch die Interaktion von eif3 und rpt-1 wird möglicherweise der Export dieser beiden Proteine vom Kern ins Zytoplasma bewirkt, unter Beteiligung der NES (nuclear export sequence) von rpt-1. Im Zytoplasma interagiert rpt-1 mit Bif-1 und ist so direkt am mitochondrialen Apoptoseprozess beteiligt.

Die Ergebnisse zeigen, dass rpt-1 regulativ in die Apoptose eingreift und es sich somit bei diesem Protein vermutlich um einen wichtigen Regulator der mitochondrialen Apoptose handelt.

6. Literatur

Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J. (1996) Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*, 87: 171

Antonsson B. (2003) *Essentials of Apoptosis. A guide for Basic and Clinical Research.* Humana Press: 85-100

Asano K., Merrick W.C., Hershey J.W.B.(1997) The translation initiation factor eIF3-p48 subunit is encoded by int-6, a site of frequent integration by the mouse mammary tumor virus genome.*J. Biol. Chem.* 271: 23477-23480

Asano K., Shalev A., Phan L., Nielsen K., Clayton J., Valsek L., Donahue T.F., and Hinnebusch A.G. (2001). Multiple roles for the carboxyl terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. *EMBO J.* 20: 2326-2337

Bai, J. und Cederbaum, A.L. (2003) Catalase protects HepG2 cells from apoptosis induced by DNA-damaging agents by accelerating the degradation of p53. *J.Biol. Chem.* 278 (7): 4660-7

Bartel P.L., Chien C.T., Sternglanz R., Fields S. (1993a) Using the two hybrid system to detect protein-protein interactions. *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach.*, ed. Hartley, D.A. (Oxford University Press, Oxford) pp 153-179

Bartel P.L., Chien C.T., Sternglanz R., Fields S. (1993b) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid-system. *BioTechniques* 14: 920-924

Baretta L.; Singer N.G.; Hinderer R.; Gingras A.C.; Richardson B.; Hanash S.M.; Sonenberg, N.(1998) Differential regulation of Translation and eIF4E phosphorylation during human thymocyte maturation. *J.Immunol.* 160(7): 3269-73

Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V., and Wallach D., (1996) Involvement of MACH, a novel interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor induced cell death. *Cell* 85:803-815

Borden K.L. (1998) RING fingers and B-boxes: zinc-binding protein-protein interaction domains. *Biochem. Cell Biol.*, 76, 351-358

Borden KL. (2000) RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol* 4; 295(5):1103-12

Bradford, M.,(1976)A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Reproduction Research Laboratories, Dept. of Biochemistry, University of Georgia, Athens, Ga., Jan. 29*

Brown M.R., Miller F.J., Li W.G., Ellingson A.N., Mozena J.D., Chatterjee P., Engelhardt J.F., Zwacka R.M., Oberley L.W., Fang X., Spector A.A., Weintraub N. L. (1999) Overexpression of Human Catalase Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, 85: 524-533

Burgoyne L.A., Hewish D.R., Mobbs J. (1974) Mammalian chromatin substructure studies with the Calcium-Magnesium Endonuclease and Two-Dimensional Polyacrylamide-gel Electrophoresis." *Biochem. J.* 143, 67-72

Cai, J., Yang J., Jones D.P. (1998) Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta*, 1366: 139-149

Cao T., Borden K.L., Freemont P.S., Etkin L.D. (1997) Involvement of the rfp tripartite motif in protein-protein interactions and subcellular distribution. *J. Cell Sci.* 110 (14): 1563-71

Cao T., Duprez E., Borden K.L., Freemont P.S., Etkin L.D. (1998) Ret finger protein is a normal component of PML nuclear bodies and interacts directly with PML. *J. Cell Sci.* 111 (10): 1319-29

Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewari M., and Dixit V.M. (1995) FADD a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512

Chu K., Niu X. and Williams L.T. (1995) A Fas- associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11894-11898

Cohen G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem.J.* 326 : 1-16

Cohen O., Inbal B., Kissil J.L., Raveh T., Berissi H., Spivak-Kroizaman T., Feinstein E. and Kimchi A. (1999) DAP-kinase participates in TNF-alpha-and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain. *J. Cell Biol* 146: 141-148

Cuddeback S.M., Yamaguchi H., Komatsu K., Miyashita T., Yamada M., Wu C., Singh S., Wang, H.G.(2001) Molecular Cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J.Biol. Chem.* 8; 276 (23): 20559-65

Cyert M.S. (2001) Regulation of nuclear Localisation during Signaling. *J.Biol. Chem.* 276, 24: 20805-20808

Deutsches Krebs Forschungszentrum (dkfz-Heidelberg) (2004) Homepage of the division of Immunogenetics. Apoptosis and T-Cells. The Role of IL2

Desbois C., Rousset R., Bantignies F., Jalinot P. (1996) Exclusion of Int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-I Tax oncoprotein. *Science* 273: 951-953

Desbois-Morris C., Rety S., Ferro M., Garin J., and Jalinot P. (2001). The human protein HSPC021 interacts with Int-6 and is associated with the translation initiation factor eIF3. *J. Biol. Chem.* 2001, 4

Dho S.H., Kwon K.S. (2003) the Ret finger protein induces apoptosis via its Ring finger-B box-coiled-coil motif. *J. Biol. Chem.* 278 (34): 31902-8

Diella F., Levi G., Callahan R. (1997) Characterization of the INT6 mammary tumor gene product. *DNA Cell Biol.* 16: 839-847

Donat S. (1998) Wirkung von TCDD auf die Genexpression in Geweben von C57BL/6 Mäusen. Dissertation der mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Enari M., Hase A. und Nagata S. (1995) Apoptosis by a cytosolic extract from Fas-activated cells. *EMBO J.* 14: 5201-5208

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., and Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50

Ferraro E. (2003)The Mitochondrial Pathway of Fas-Mediated Apoptosis. *Mint Journal of molecular interactions*, 1

Fields S., Sternglanz R. (1994) the two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* 10: 286-292

Fletcher C.M., Pestova T.V., Hellen C.U.T., Wagner G. (1999) Structure and interactions of the translation initiation factor eIF1. *EMBO J.* 18: 2631-2637

Fröhlich K.U. and Madeo F. (2000) Apoptosis in yeast- a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Letters* 473 (2000): 6-9

Gaye T.; Tetsuro N.; Naoko I.; Naoya A.; Toshihide I.; Keita S.; Masahide T. (1999) Different nuclear/cytoplasmic distributions of Ret finger protein in different cell types, *Pathology international*, 49, 10, 881

Glazyrin AL.; Chinni S.; Alhasan S.; Adsay V.N.; Vaitkevicius V.K.; Sarkar F.H. (2002) Molecular mechanism(s) of Actinomycin-D induced sensitization of pancreatic cancer cells to CD95 mediated Apoptosis. *Int.J.Oncol.* Jan, 20(1): 201-5

Gringani F., Fagioli M., Alcalay M., Longo L., Pandolfi P.P., Donti E., Biondi A., Lo Coco F., Pelicci P.G. (1994) Acute promyelotic leucemia: from genetics to treatment. *Blood*, 83, 10-25

Gross A., Yin X.M., Wang K., Wei M.C., Jockel J., Milliman C., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Korsmeyer S.J. (1999) Caspase cleaved Bid targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 274: 1156-1163

Golemis E. (1995) Table of false positives. Fox Chase Cancer Center, NY

Görlich D. (1998) Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.* 17: 2721-2727

Guo J., Hui D.J., Merrick W.C., Sen G.C. (2000) A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3. *EMBO J.* 19: 6891-6899

Harbers M., Nomura T., Ohno S., Ishii S. (2001) Intracellular Localisation of the Ret Finger Protein Depends on a Functional Nuclear Export Signal and Protein Kinase C Activation. *J. Biol. Chem.* 276 (51): 48596-48607

Henderson B.R. and Fagotto, F. (2002) The ins and outs of APC and β -catenin nuclear transport. *EMBO reports* 3, 9: 834-839

Herzog A., Kindermann B., Döring F., Daniel H., Wenzel U.(2004) Pleiotropic molecular effects of the pro-apoptotic dietary constituent flavone in human colon cancer cells identified by protein and mRNA expression profiling. *Proteomics* 4, 8: 2455-2464

Horsley V.; Pavlath G.K.; (2002) Nfat: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *The Journal of Cell Biology*, 156, 5 : 771-774

Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J.L., Schroter, Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L.E. and Tschopp J. (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-195

James P., Haliaday J., Craig E.A. (1996) genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two hybrid selection in yeast. *Genetics* 144: 1425-1436

Jaitner B.K. , Becker J., Linnemann T., Herrmann C., Wittinghofer A. and Block C.(1997) Discrimination of Amino Acids Mediating Ras Binding from Noninteracting Residues Affecting Raf Activation by Double Mutant Analysis *The American Society for Biochemistry And Molecular Biology*, 272, 47,21: 29927-29933

Joazeiro C.A. and Weissman A.M. (2000) Ring finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102: 549-552.

Kahlos K. (1999) The Expression and Possible Role of manganese Superoxide Dismutase in Malignant Pleural Mesothelioma. Department of Internal medicine, University of Oulu, FIN-90401 Oulu Finland, Oulu University Library

Kasai T.; Jeang K.T. (2004) Two discrete events, human T-cell leukaemia virus type I Tax Oncoprotein expression and a separate stress stimulus, are required for induction of apoptosis in T-cells. *Retrovirology* 1(1):7

Kerr J.R.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257

Kischkel F.C., Hellbarth S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., and Peter M.E. (1995) cytotoxicity-dependent Apo-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signalling complex the receptor. *Embo J.*, 14: 5579-5588

Klee C.B.; Ren H.; Wang X. (1998) Regulation of the Calmodulin-stimulated Protein Phosphatase, Calcineurin. *J.Biol. Chem.* 273, 22: 13367-13370

Krippner A., Matsuno-Yagi A., Gottlieb R.A., Babior B.M. (1996) Loss of function of cytochrome c in Jurkat cells undergoing fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem* 271 (35): 21629-36

Kroemer G. (2001) B709 mitochondrial control of cell death. *Scientific World Journal* 1 (3): 48

Krueger A., Schmitz I., Baumann S., Krammer P.H. and Kirchhoff S. (2001) cellular FLICE inhibitory protein splice variants inhibit different Steps of caspase8 activation at the CD95 death inducing signal complex. *J.Biol. Chem.* 276: 20633-20640

Kudla G., Montessuit S., Eskes R., Berrier C., Martinou J.C., Ghazi A. and Antonsson B. (2000) The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8 cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment. *J. Biol. Chem.* 275: 22713-22718

Kulms D., Pöppelmann B., Yarosh D., Luger T.A., Krutmann J., Schwarz T. (1999) Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7974-7979

Kuwana T., Smth J.J., Muzio M., Dixit V., Newmeyer D.D., Kornbluth S., (1998) Apoptosis induction by caspases-8 is amplified through the mitochondrial release of Cytochrom c. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 16589-16594

Laemmli UK., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Aug 15;227(5259):680-5

Le Douarin B., Zechel C., Garnier J.-M., Lutz Y., Tora L., Pierrat B., Heery D., Gronemeyer H., Chambon P., and Losson R. (1995) The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J.* 14, 2020-2033

Lee JC and Peter ME (2003) Regulation of apoptosis by ubiquitination. *Immunol. Rev.* 193, 39-47

Lee H. und Wei Y. (2000) Mitochondrial role in life and death of the cell. *J. Biomed. Sci.* 7: 2-15

Leverrier Y., Thomas J., Perking G.R., Mangeney M., Collins M.K., Marvel J.(1997) In bone marrow derived Baf-3 cells, inhibition of apoptosis by IL-3 is mediated by two independent pathways. *Oncogene* 14 (4): 425-30

Li H., Zhu H., Xu C.J. and Yuan J. (1998) Cleavage of Bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501

Li L.Y., Luo X. And Wang X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic Dnase when released from mitochondria. *Nature* 412: 95-99

Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemr, E. S., and Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-89

Li P.-F., Dietz R., von Harsdorf R. (1999) Superoxide induces apoptosis in cardiomyces, but proliferation and expression of transforming growth factor- β 1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Letters*, 448 (2-3): 206-210

Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X. (1996) Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c
Cell 86: 147-157

Lovering R., Hanson I., Borden K.L., Martin S., O'Reilly N.J., Evan G.I., Rahman D., Pappin D.J. Trowsdale J. and Freemont P.S. (1993) Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc.Natl. Acad.Sci U.S.A.* 90: 2112-2116

Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C. and Wang X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481-490

Lutter M., Perkins G.A. and Wang X. (2001) The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites. *BMC Cell Biol* 2: 22

Mayeur G.L. und Hershey J.W.B. (2002) Malignant transformation by the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p48 (eIF3) *FEBS Letters* 514 (1): 49-54

Mc Kinsey T.A.; Zhang C.L.; Olson E.N. (2001) Identification of a Signal-Responsive Nuclear Export Sequence in Class II Histone Deacetylases. *Mol.Cell. Biol.* 21 (18): 6312-6321

McQuibban G.A.; Gong J.H.; Tam E.M.; McCulloch C.A.G.; Clark-Lewis I.; Overall C.M. (2000) Inflammation Dampened by Gelatinase A Cleavage of Monocyte Chemoattractant Protein-. *Science* 289: 1202-1206

Medema J.P., Scaffidi C., Kischkel F.C., Shevchenko A., Mann M., Krammer P.H. and Peter M.E. (1997) FLICE is activated by association with the CD 95 death inducing signalling complex (DISC). *Embo J.*16: 2794-2804

Memon S.A., Hou J., Moreno M.B. and Zacharchuk C.M. (1998) Apoptosis induced by a chimeric Fas/FLICE receptor: lack of requirement for Fas or FADD binding proteins. *J. Immunol.* 160: 2046-2049

Minami Y.; Kono T; Miyazaki T.; Taniguchi T (1993) The IL2-Receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 245-268

Muzio M, Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E. and Dixit V.M. (1996) FLICE, a novel FADD homolog ICE/CED 3-like protease, is recruited to the CD 95 (Fas/APO-1) death inducing signalling complex. *Cell* 85, 6: 817-27

Muzio M., Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S. and Dixit V.M. (1998) an induced proximity model Caspase 8 activation. *J. Biol. Chem.* 273: 2926-2930

Moore M.S. (1998) Ran and Nuclear Transport. *J. Biol. Chem.* 273, 36: 22857-22860

Nelson M.A. (2004) Summary of research activities. Department of Pathology, Tucson Arizona

Nicholson and Thornberry (2003) APOPTOSIS: Life and Death Decisions, *Science* 299: 214-215

Nupponen N.N., Porkka K., Kakkola L., Taner M., Persson K., Borg A., Isola J., Visakorpi T. (1999) Amplification and overexpression of p40 subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 in breast and prostate cancer. *Am. J. pathol.* 154: 1777-1783

Park S., Hahm E.R., Lee D.K., Yang C.H. (2004) Inhibition of AP-1 transcription activator induces myc-dependent apoptosis in HL 60 cells. *J. Cell Biochem.* 91 (5): 973-86

Park I.C.; Park M.J.; Woo S.H.; Lee H.C.; An S.; Gwak H.S.; Lee S.H.; Hong S.I.; Bae I.J.; Seo K.M.; Rhee C.H. (2003) Tetraarsenic oxide induces apoptosis in U937 leukemic cells through a reactive oxygen species-dependent pathway. *International Journal of Oncology* 23: 943-948

Park I.C.; Woo S.H.; Park M.J.; Lee H.C.; Lee S.J.; Hong Y.J.; Lee S.H. Hong S.I.; Rhee C.H. (2002) Ionizing radiation and nitric oxide donor sensitize Fas-induced apoptosis via upregulation of Fas in human cervical cancer cells. *Oncology Reports* 10: 629-633

- Patarca R.; Schwartz J.; Singh R.P.; Kong Q.T.; Murphy E.; Anderson Y.; Sheng F.Y.W.; Singh P.; Johnson K.A.; Guarangia S.M.; Durfee T.; Blattner F.; Cantor H.; (1988) rpt-1, an intracellular protein from helper/inducer cells that regulates gene expression of interleukin 2 receptor and human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85: 2733-2737
- Patarca R.; Singh R.P.; Durfee T.; Freeman G.; Blattner F.R.; Cantor H.; (1989) Definition of T-cell specific DNA-binding factors that interact with a 3'-silencer in the CD4+ T-cell gene Rpt-1. *Gene* 85: 461-469
- Petrova V.Y., Rasheva T.V., Kujumdzieva A.V. (2002) catalase enzyme in mitochondria of *Saccaromyces cerevisiae*. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458
- Pierrat B., Simonen M., Cueto M., Mestan J., Ferrigno P., Heim J. (2001) SH3GLB, a New Endophilin-Related Protein Family Featuring an SH3 Domain. *Genomics* 71(2): 222-234
- Reddy B.A., Etkin L.D. and Freemont P.S. (1992) A novel zinc finger coiled-coil domain in a family of nuclear proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 17, 344-345
- Reyes J.C. (2001) PML and Cop1-two proteins with much in common. *Trends in Biochem Sci.* 26 (1): 18-20
- Reymond A., Meroni G., Fantozzi A., Merla G., Cairo S., Luzi L., Riganelli D., Panaria E., Messali S., Cainarca S., Guffanti A., Minacci S., Pelicci PG., Ballabio A.(2001) The tripartite motif family identifies cell compartments. *The EMBO Journal* 29 (9): 2140-2151
- Sambrook J.; Fritsch E.F.; Maniatis T. (1989) *Molecular cloning*, 2nd ED., Cold Spring Harbour, CSHL Press
- Scaffidi C., Schmitz I., Krammer P.H. and Peter M.E. (1999) The role of c-FLIP in modulation of CD95 induced apoptosis. *J.Biol. Chem.* 274: 1541-1548
- Serebriiskii I., Estojak J., Barman M., Golemis E. (2000) Approaches to detecting false positives in yeast-two-hybrid systems. *Biotechniques*, 28 (2): 328-336
- Shi J.; Feng Y.; Goulet A.C.; Vaillancourt R.R.; Sachs N.A.; Hershey J.W.; Nelson M.A. (2003) The p34 cdc2-related Cyclin dependent kinase 11 Interacts with the p47 Subunit of Eukariotic Initiation Factor 3 during Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278(7):5062-5071

Sieg S., Huang Y. and Kaplan D. (1997) Viral Regulation of CD95 Expression and Apoptosis in T Lymphocytes *The Journal of Immunology* Volume: 159 : 15 : 1192-1199

Stach R.W., Garian N., Olender E.J. (1979) Biological activity of the beta nerve growth factor: the effects of various added proteins. *J. Neurochem.* 33 (1): 257-61

Suigura S., Iwata K., Matsuoka M., Hayashi H., Takemia T., Yasuda S., Ichikawa M., Yamauchi T., Mehlen P., Haga T., Yamagata K. (2004) Inhibitory Role of Endophilin 3 in Receptor-mediated Endocytosis. *J.Biol. Chem.* 279 (22): 23343-23348

Susin S.A.; Daugas E.; Ravagnan L.; Samaejima K.; Zamzami N.; Loeffler M.; Costantini P.; Ferri K.F.; Irinopoulou T.; Prevost M.C.; Brothers G.; Mak T.W.; Penninger J.; Earnshaw W.C.; Kroemer G. (2000) Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *J. Exp. Med.* 192 (4): 571-579

Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Hirsch T., Marchetti P., Macho A., Daugas E., Geuskens M. and Kroemer G. (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease *J. Exp. Med.* 184,1331-1342

Takahashi M., Inaguma Y., Hiai H. and Hirose F. (1988) Developmentally regulated expression of a human "finger"-containing gene encoded by the 5' half of the ret transforming gene. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 1853-1856

Tan K.O., Tan K.M.L.T., Chan S-L., Yee K.S.Y., Bevort M., Ang K.C., Yu V.C. (2001) Map-1, a Novel Proapoptotic Protein Containing a BH3-like Motif That Associates with Bax through Its Bcl-2 Homology Domains. *J.Biol. Chem.* 276, 4: 2802-2807

Tang D., Gururajan, R. Kidd V. (1998) Phosphorylation of PITSLRE p110 isoforms Accompanies Their Processing by caspases during Fas- mediated Cell Death. *J. Biol. Chem.* 273, 26: 16601-16607

Tetzel G.; Nagasaka T.; Iwahashi N.; Asai N.; Iwashita T.; Sakata K.; Takahashi M. (1999) Different nuclear/cytoplasmic distributions of RET finger protein in different cell types. *49*, 10: 881

Thome M. and Tschopp J. (2001) Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 50-58

Tissot C. und Mechti N. (1995) Molecular Cloning of a New Interferon-induced Factor That Represses Human Immunodeficiency Virus Type 1 Long Terminal Repeat Expression. *J. Biol. Chem.* 270, 25: 14891-14898

Trauth B.C., Klas C., Peters A.M., Matzku S., Moller P., Falk W., Debatin K.M., Krammer P.H. (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245 (4915): 301-5

Valasek L.; Nielsen K.H.; Hinnebusch A.G. (2002) Direct eIF2-eIF3 contact in the multifactor complex is important for translation initiation in vivo. *EMBO J.* 21 (21): 5886-98

Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184 (1): 39-51

Wei M.C., Lindsten T., Mootha V.K., Weiler S., Gross A., Ashiya M., Thompson C.B. and Korsmeyer S.J. (2000) tBID, a membrane-targeted death Ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 14: 2060-2071

Wenzel A.; Grimm C.; Marti A.; Kueng-Hitz N.; Hafezi F.; Niemeyer G.; Reme C.E. (2000) c-fos controls the „private pathway“ of light-induced apoptosis of retinal photoreceptors. *J. Neurosci.* 1, 20 (1): 81-8

Wyllie A.H. (1998) *Cell Death, Apoptosis and cell Proliferation* 2nd Edition, Boehringer/Mannheim GmbH, Biochemica: VI-VII

Wyllie A. H., Kerr J. F. R., and Currie A.R.(1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306

Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T., Jones D.P., Wang X., (1997) prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science* 275: 1129-1132

Yin X.M. (2000) Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res* 10: 161-167

Yoshida Y. (1999) *Apoptosis as a Mechanism of Cell Control*. Bangkok, Thailand Oct. 24-28

Zhai D., Miao Q., Xin X. And Yang F. (2001) Leakage and aggregation of phospholipids vesicles induced BH3-only Bcl-2 family member, BID. *Eur. J. Biochem* 268: 48-55

Zhang HG, Wang J, Yang X, Hsu HC, Mountz JD (2004) Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin. *Oncogene* 23: 2009-15

Zhu J.; Kahn C.R. (1997) Analysis of a peptide hormone-receptor interaction in the yeast two-hybrid system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 13063-13068

Zou H., Henzel W.J., Liu,X. Lutschg A., Wang X., (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of Caspase-3. *Cell* 90 (3): 405-13

7. Anhang

7.1 Nukleotidsequenzen des cDNA-Klons pGADT7-eif3 und die Originalsequenz aus der NCBI Genbank (Genbank: BC083190.1)

21	ccggctgcgactcccgtgctgctccccggcgcccgtctcgtctgatcctgctgtagctgcg	80
120	ccggctgcgactcccgtgctgctccccggcgcccgtctcgtctgatcctgctgtagctgcg	179
81	cctgcagccccgggcccagaccccagcctccgcgccagccccagcgcagacgccggcgct	140
180	cctgcagccccgggcccagaccccagcctccgcgccagccccagcgcagacgccggcgct	239
141	tcgcagccccgggcccgcctcccggggcctttcccgggcgcccgctggtcaggctacac	200
240	tcgcagccccgggcccgcctcccggggcctttcccgggcgcccgctggtcaggctacac	299
201	cccgtcattttggcctcgatcgtggacagctacgaacgccgcaacgagggagctgccga	260
300	cccgtcattttggcctcgatcgtggacagctacgaacgccgcaacgagggagctgccga	359
261	gttattggaacctgttgggaactgttgacaagcactcggtagaagtcaccaactgcttt	320
360	gttattggaacctgttgggaactgttgacaagcactcggtagaagtcaccaactgcttt	419
321	tcggtgccacacaatgagtcagaagatgaagtggctgttgacatggaattgctaagaat	380
420	tcggtgccacacaatgagtcagaagatgaagtggctgttgacatggaattgctaagaat	479
381	atgtatgaattacataaaaaagtctccccaatgagctcatcctaggctggtatgccaca	440
480	atgtatgaattacataaaaaagtctccccaatgagctcatcctaggctggtatgccaca	539
441	ggccatgacatcacagaacactcagtgtgatccatgagtactacagcagggaggccccg	500
540	ggccatgacatcacagaacactcagtgtgatccatgagtactacagcagggaggccccg	599
501	aacccattcacctcacggtggaacaggtctccagcatggggcgcagatgagcatcaaggcc	560
600	aacccattcacctcacggtggaacaggtctccagcatggggcgcagatgagcatcaaggcc	659
561	tatgtcagcactttaatgggtgtccctgggaggaccatgggagtgatgttcacacctctc	620
660	tatgtcagcactttaatgggtgtccctgggaggaccatgggagtgatgttcacacctctc	719
621	acagtgaagtacgcgtattatgacactgaacgcattggagttgacctcatcatgaagacg	680
720	acagtgaagtacgcgtattatgacactgaacgcattggagttgacctcatcatgaagacg	779
681	tgttttagccccaaccgggtgattggactctcaagtgacttacaacaagtgggaggggcc	740
780	tgttttagccccaaccgggtgattggactctcaagtgacttacaacaagtgggaggggcc	839
741	tcagctcgcattccaggatgctcetaagcactgtattacagtatgctgaggatgtgctgtct	800
840	tcagctcgcattccaggatgctcetaagcactgtattacagtatgctgaggatgtgctgtct	899
801	gggaaagtgtctgctgacaacacgggtgggcccgttcttgatgagccttgtaaccaagta	860
900	gggaaagtgtctgctgacaacacgggtgggcccgttcttgatgagccttgtaaccaagta	959
861	cccaagatagttcctgatgactttgagaccatgctcaatagcaacatcaatgacctgctg	920
960	cccaagatagttcctgatgactttgagaccatgctcaatagcaacatcaatgacctgctg	1019
921	atggtgacctacctggccaatctcaccagtcacagattgccctcaacgagaaacttgta	980
1020	atggtgacctacctggccaatctcaccagtcacagattgccctcaacgagaaacttgta	1079
981	aacctgtgaatgagccccaagaggcacttgtgctggtcagggtttaccacagggctga	1040
1080	aacctgtgaatgagccccaagaggcacttgtgctggtcagggtttaccacagggctga	1139
1041	gaccgaagtggaggcaaaagggtttcttgggtcttgagtcacgggtgactcagtcagctg	1100
1140	gaccgaagtggaggcaaaagggtttcttgggtcttgagtcacgggtgactcagtcagctg	1199

1101	cttgtgactccaaataaacatagcttaccttttgtaaag	1140
1200	cttgtgactccaaataaacatagcttaccttttgtaaag	

Mus Musculus eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 (epsiolon) complete cds. Die mittels des Two Hybrid Systems isolierte Nukleotidsequenz ist schwarz, die NCBI-Genbank Nukleotidsequenz ist blau dargestellt. Gen: 1257 Basen. Cds: 3-1088

7.2 Nukleotidsequenzen des cDNA-Klons pGADT7-Bif-1 und die Originalsequenz aus der NCBI Genbank (Genbank: NM_019464)

20	ccgtcgccgctgccccggcgccccagcccggccgcgggcgctccccgcctccccgctagegc	79
180	ccgtcgccgctgccccggcgccccagcccggccgcgggcgctccccgcctccccgctagegc	239
80	agccggcggtctgccccggctgccgcccggcatgaacatcatggatttcaacgtgaagaa	139
240	agccggcggtctgccccggctgccgcccggcatgaacatcatggatttcaacgtgaagaa	299
140	gctggcggtcgacgcgggcaccttctcagccgggcccgtgcagttcacagaagaaaagct	199
300	gctggcggtcgacgcgggcaccttctcagccgggcccgtgcagttcacagaagaaaagct	359
200	tggccaggcagagaagacagaactggacgctcacctggaaaacctccttagcaaaagctga	259
360	tggccaggcagagaagacagaactggacgctcacctggaaaacctccttagcaaaagctga	419
260	atgtacaaaatattggacagaaaagataatgaagcagaccgaagtgtgttcagccaaa	319
420	atgtacaaaatattggacagaaaagataatgaagcagaccgaagtgtgttcagccaaa	479
320	tccaatgccaggatagaagaatttgtttatgagaaactggatagaaaagcaccaagtcg	379
480	tccaatgccaggatagaagaatttgtttatgagaaactggatagaaaagcaccaagtcg	539
380	tataaacaaccgggaacttttgggacaatatatgattgatgcaggaactgagtttggccc	439
540	tataaacaaccgggaacttttgggacaatatatgattgatgcaggaactgagtttggccc	599
440	agggacagcttatggaaatgcccttattaatgtggagaaacacagaagcgaattggaac	499
600	agggacagcttatggaaatgcccttattaatgtggagaaacacagaagcgaattggaac	659
500	agctgaccgagagctgattcaaacatcagccttaatttctcactcctttaagaaaactt	559
660	agctgaccgagagctgattcaaacatcagccttaatttctcactcctttaagaaaactt	719
560	tatagaaggggattacaaaacaatcgcaaaagaaaggaaactattacagaataagagact	619
720	tatagaaggggattacaaaacaatcgcaaaagaaaggaaactattacagaataagagact	779
620	ggatttgggatgctgcaaaaacaagactaaaaaaggcaaaagctgcagaaactaaaagt	679
780	ggattt-ggatgctgcaaaaacaagactaaaaaaggcaaaagctgcagaaactaaaagt	838
680	catctgaacaggaattgagaataactcaaagtgaatttgatcgtcaggcagagattacc	739
839	catctgaacaggaattgagaataactcaaagtgaatttgatcgtcaggcagagattacc	898
740	gactcctgcttgagggaatcagcagtacacacgeccatcatctccgctgtctgaatgact	799
899	gactcctgcttgagggaatcagcagtacacacgeccatcatctccgctgtctgaatgact	958
800	ttgtagaagcccagatgacttactatgcacagtgttaccagtatatgctagacctacaga	859
959	ttgtagaagcccagatgacttactatgcacagtgttaccagtatatgctagacctacaga	1018
860	agcaactgggaagtttccatccaattatctttctaacaacaatcagacctctgggacac	919
1019	agcaactgggaagtttccatccaattatctttctaacaacaatcagacctctgggacac	1078
920	cagtgccatagctttgtcaaatgcaattggctcttctgccaggcttcaacgggtagcc	979
1079	cagtgccatagctttgtcaaatgcaattggctcttctgccaggcttcaacgggtagcc	1138
980	ttgtaatcacctgtccttctaacctcaatgaccttaagaatccagcaacaacaggaagg	1039

1139	ttgtaatcacctgtccttctaacctcaatgaccttaagaatccagcaacaacaggaagg	1198
1040	ctagggctctctatgattatgatgctgcaaatagcactgaactgtcactcctggccgatg	1099
1199	ctagggctctctatgattatgatgctgcaaatagcactgaactgtcactcctggccgatg	1258
1100	aggtaatcactgtgttcagtgtcgttggaatggactccgactggctaatagggagagagag	1159
1259	aggtaatcactgtgttcagtgtcgttggaatggactccgactggctaatagggagagagag	1318
1160	gaaatcaaaagggcaag	1176
1319	gaaatcaaaagggcaag	1335

Mus musculus SH3-domain GRB2-like B1 (endophilin)

Die mittels des Two Hybrid Systems isolierte Nukleotidsequenz ist schwarz, die NCBI-Genbank Nukleotidsequenz ist blau dargestellt. Gen: 3949 Basen. Cds: 271-1368

7.3 Nukleotidsequenzen des cDNA-Klons pGADT7-Katalase und die Originalsequenz aus der NCBI Genbank (Genbank: BC013447)

21	gatctgaccaaggtttggcctcacaaggactaccctcttataccagttggcaaaactggt	80
964	gatctgaccaaggtttggcctcacaaggactaccctcttataccagttggcaaaactggt	1023
81	ttaaacaaaaatccagtttaattactttgctgaagttgaacagatggcttttgaccaagc	140
1024	ttaaacaaaaatccagtttaattactttgctgaagttgaacagatggcttttgaccaagc	1083
141	aatatgccccctggcatcgagcccagccctgacaaaaatgcttcagggccgccttttggc	200
1084	aatatgccccctggcatcgagcccagccctgacaaaaatgcttcagggccgccttttggc	1143
201	taccgggacactcaccgtcaccgctgggacccaactatctgcagatacctgtgaactgt	260
1144	taccgggacactcaccgcccaccgctgggacccaactatctgcagatacctgtgaactgt	1203
261	ccctaccgcgctcgagtggccaactaccagcgtgatggccccatgtgcatgcatgacaac	320
1204	ccctaccgcgctcgagtggccaactaccagcgtgatggccccatgtgcatgcatgacaac	1263
321	caggggtggtgcccccaactattacccaacagcttcagcgcaccagagcagcagcgtca	380
1264	caggggtggtgcccccaactattacccaacagcttcagcgcaccagagcagcagcgtca	1323
381	gccctggagcacagcgtacagtgcgctgtagatgtgaaacgcttcaacagtgctaataa	440
1324	gccctggagcacagcgtccagtgcgctgtagatgtgaaacgcttcaacagtgctaataa	1383
441	gacaatgtcactcaggtgaggacattctacacaagggtgtgaacgaggaggagaggaaa	500
1384	gacaatgtcactcaggtgaggacattctacacaagggtgtgaacgaggaggagaggaaa	1443
501	cgctgtgtgagaacattgccggccacctgaaggacgctcagcttttcattcagaagaaa	560
1444	cgctgtgtgagaacattgccggccacctgaaggacgctcagcttttcattcagaagaaa	1503
561	gcggtcaagaatttactgacgtccaccctgactatggggcccgatccaggctctctg	620
1504	gcggtcaagaatttactgacgtccaccctgactatggggcccgatccaggctctctg	1563
621	gacaagtacaacgctgagaagcctaagaacgcaattcacacctacacgaggccggctct	680
1564	gacaagtacaacgctgagaagcctaagaacgcaattcacacctacacgaggccggctct	1623
681	cacatggctgcaagggaaaagctaacctgtaactccgggtgctcagcctccgctgaggag	740
1624	cacatggctgcaagggaaaagctaacctgtaactccgggtgctcagcctccgctgaggag	1683
741	acctctcgtgaagccgagcctgaggatcacctgtaataacgctggatggattcttccc	800
1684	acctctcgtgaagccgagcctgaggatcacctgtaataacgctggatggattcttccc	1743
801	gccggagcgcagactcacgctgatgactttaaacgataatccgggcttctagagtgaat	860
1744	tccggagcgcagactcacgctgatgactttaaacgataatccgggcttctagagtgaat	1803
861	gataacctgcttttgatgccgttctgaaggaaatgaaaggttagggcttagcaatc	920
1804	gataacctgcttttgatgccgttctgaaggaaatgaaaggttagggcttagcaatc	1863
921	atntaaacagaaacatggatctaataaggacttctgtttggattattcattaaatgactac	980
1864	atntaaacagaaacatggatctaataaggacttctgtttggattattcattaaatgactac	1923
981	atntaaaatgattacaagaaagggtttctatccagaaacatgacttgattagacaagata	1040
1924	atntaaaatgattacaagaaagggtttctatccagaaacatgacttgattagacaagata	1983
1041	aaaatcttggcgagaatagtgtattctcctattacctcatgggctggtatat	1092
1984	aaaatcttggcgagaatagtgtattctcctattacctcatgggctggtatat	2035

Mus Musculus Catalase Die mittels des Two Hybrid Systems isolierte Nukleotidsequenz ist schwarz, die NCBI-Genbank Nukleotidsequenz ist blau dargestellt. Gen: 2479 Basen

7.4 Nucleotidsequenz von rpt-1 (Genbank A30891)

1 tcttcacaga tcttgagtct cttggttggg atctgaagat gtgagccaat ttccaacgca
61 gagtttgag gaatttagaa aaaggcacag tctttgctct gcagtgtgag gagicaggac
121 aggcagacac aggatcacag caact atggc ctcatcagtc ctggagatga taaaggagga
181 agtaacctgt cctatctgtt tggagctct gaaggaacct gtgagtgtg attgtaacca
241 cagcttctgc agagcctgca tcacactgaa ttatgagtc aacagaaaca cagacgggaa
301 gggcaactgc cctgtatgcc gagttcctta cccattt ggg aatctgaggc ctaactaca
361 tgtggccaac atagtagaga ggctcaaggg atccaagtcc attccagagg aggagcagaa
421 ggtgaatate tgtgcacaac atggagagaa actccggctc ttctgtagga aggacatgat
481 ggtcatctgc tggctttgtg agcgatctca ggagcaccgt ggtcaccaa cagctctcat
541 tgaagagggt gaccaagaat acaaggagaa gctgcaggga gctctgtgga agctgatgaa
601 aaaggcaaaa atatgtgatg aatggcagga tgacctcaa ctgcagagag ttgactggga
661 gaaccaaata cagatcaatg tagaaaatgt tcagagacag ttaaaggac taagagacct
721 cctggactcc aaggagaatg aggagctgca gaagctgaag aaagagaaga aaga ggttat
781 ggaaaagctg gaagagtctg aaaatgagct ggaggatcag acagagtgg tgagagacct
841 catctcagat gtggaacatc atttggagct ctcaacctta gaatgctgc agggtgcaaa
901 ttgtgtctg agaaggagtc agtccttaag cctgcaacag cccaaaactg tccccaaaa
961 gagaaaaaga acattccaag ctccagatct gaaaggcatg ctgcaagtgt atcaaggact
1021 catggataatc cagcaatact gggttcatat gactctacat gcaaggaaca atgcagtcac
1081 tgccattaac aaagaaaaag acaataacag tatagaagtt acaatacggg tccagtttct
1141 gagatctacc atttgggtgt cctgggatat ccagctcttt cctcagggaa gcattactgg
1201 gaagtagaca tatctagaag tgatgcctgg ctctctggat taaatgacgg aaagtgtgct
1261 caaccccaac ttaactcaaa ggaagaaatg ggcatcaaaa aaaacctca ttctcagatc
1321 aaacaaaatg tattgtttca gcctaaatgt ggctactggg tta tagggat gaagaatccg
1381 tctgtataca aggccttga tgagtgttct atcaccaca attccagtat cctggtcate
1441 tctctgctg atcgteccag tctgtctgga gtttctctgg atcggaagc tggcactctc
1501 tcattttatg atgtttetaa ctgagggtgct ctcatctata gttctatga cctgccttc
1561 cctgttgaag tctatccata tttaactct atgaaatgtt cagagccaat gactatatgc
1621 gggccacct cetaaacctt cacctatate tatatctata tctatctata tctatctata
1681 tatctatate atctatctt ttatacagtc cccccatgct tgggtatct tatgcaagaa
1741 acccttgca tcattctaac ttcttttgt cttgggcctt ttatttaac gaccttact
1801 ttaaccca accactgta gattcattc cttgatccag ttgctgtct gttcacaaga
1861 tgattactgt catgtatcat tcecatatt caaaaaaaaa aatagttgtt tctcaca
1921 gtaaaataga tctctgcta acaccatctc tgtagaaaca cagtcaaaag aatgactcat
1981 ggtgagcaat gtcttagga cctgtaagag aagccccaga gaaaaagaa gagggcctt
2041 aacctcaggg acattttgtt cctggattg ctttggatgt gattttgtgc ctctgcaaa
2101 aagaacatct gattcaatt tgtaagatct gttactctt gttggatgct agaacatagc

```

2161 tatagatcca attcctgtgc aaggatatac tgaatgctgg cctcaatgta caaattctga
2221 atatggactt gtccttgat ctcattttt tcaagatata atctatagca tagtaccaga
2281 cacttgtgtt tatatggctc gtcctgagac agttgtagga aaggtttgtt aatatgttct
2341 tactggatg tattacatg ttttctgat ttggttcttc tgaactcacc aaccttctg
2401 ctttcttttg tacattcatg tttaaaagca cagtgaaact gaaataaagt tgtctgcagc
2461 atcaggctgt agtccccca tttttaagg tctgcaaacc ccagatctta cagacagAAC
2521 tacataggcc cacaacggta tgcacacctt cttttgggtg ttgccagaga tagaagccag
2581 ggattcgtga gtgcttatga gttgctctac cctgagtta cttgtctcag ctctgcagg
2641 tctccacagc tgcattcttt ctgaaactga aaaagctgag agaaagtctt tctccagtgt
2701 gtctagcagt ttaggaaatt atatgtagga gtctgtcttt aaggaatggg acttagcaga
2761 aggtcagttt aaccacaatg cttgtgttcc atcaaaaagt taagaaggag acatctcaaa
2821 tgatataccac taagaccatg tgtttagaat atccaggttc taatcctgtc tccccacata
2881 gcattacaac cctgaataac atcatctcaa gctgtttgt ttgttctttt ctttgtttgt
2941 ttcatttttc tttttgttt tcagttttgc taaaatagca gcacctatat tacacgtcat
3001 tttaggaaaa taaatttgaa atctttaca ggctctgaga gtaaaagccc ttcctctgt
3061 gagtgatgaa ctgtgttcat ttacttagac cctctggct gaaggaagca gccagctctg
3121 agagatgata gtcttacttc acaaatatgc tacagaacat ctaggctgaa atcacaataa
3181 atgagaggag actatgttat ttttagtaag aaaagatcaa taggtataat gtgtccagtg
3241 cacactctgt aagtggggat tgtgctaatt actgggtaga tgtgctgtac tgatgttcta
3301 tgtggcactg aggaaactaa ggtatagata ttctcatgct tggatattag atctggggag
3361 ctgccgcaaa gactattcta atgtgttggt gatatatatg atttttttc tttcacact
3421 taccttttga aaggatattt gtttagctgt attcattatc aagtaagttt aatctatga
3481 tttccattc acaataaata ataataatga caatgatacc cataactgaa cttctgtta
3541 tgttgatgaa tgtaacaat agaatgtttc taggaactca tattgttctc agcagataga
3601 aggtatcaga tactgtatct gtttaagttt ttctaccctt tgtgtgacc acaataaagt
3661 accattggaa tgac

```

Nukleotidsequenz von rpt-1. Die Position des ORF ist blau gekennzeichnet. Die unterstrichenen Bereiche markieren die Sequenz des Inserts. Schwarz gerahmt ist die RING-Region. Die Coiled-Coil Region ist durch einen roten Rahmen hervorgehoben. Die Nuclear Lokation Sequenz (NLS) ist „**fett**“ gedruckt, die Nuclear Export Sequenz (NES) ist *kursiv* gedruckt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. Abel für die interessante Themenstellung, seine Unterstützung und Anregungen sowie für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die große experimentelle Freiheit im Verlauf dieser Arbeit bedanken.

Für die freundliche Übernahme des Korreferates bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Mehlhorn.

Außerdem danke ich ganz herzlich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Sandra Wolff und Dr. Antje Berken, für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und immerwährende gute Laune.

Ferner gilt mein Dank Frau Birgit Neumann und Frau Ulrike Hübenthal für die Unterstützung bei den Laborarbeiten und die Einarbeitung in die Methoden.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Despina Kosmidou bedanken für das schnelle und gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit, der dadurch viele Komma- und sonstige Fehler erspart worden sind.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Peter und meinen Söhnen Jan und Lukas für ihre immerwährende und vielfältige Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Meinen Eltern, Gerda und Günter Kopatz, widme ich diese Arbeit und bedanke mich bei ihnen für ihre immerwährende, wohlwollende Unterstützung während meines gesamten Werdegangs.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

„Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung von regulatory-protein T-lymphocyte-1 (rpt-1, Trim30)“

selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich habe die vorgelegte Dissertation weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Essen im Dezember 2004

Kerstin Späth

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kerstin Späth

Geburtsdatum: 31. Oktober 1967

Geburtsort: Essen

Schulbildung

1974-1978 Grundschule im Bergmannsfeld, Essen

1978-1987 Carl-Humann-Gymnasium, Essen

Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

10. 1989-10.1995 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum

Abschluss: Diplom, Note: „gut“

Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Wirkung von Cotrifazid und seiner Einzelkomponenten Isoniazid, Rifampicin, Trimethoprim, Sulfomethoxazol auf *Plasmodium berghei* und *Babesia divergens*“

Angefertigt am Lehrstuhl für spez. Zoologie und Parasitologie

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. H. Mehlhorn

08. 1999-03. 2004

Anfertigung der Dissertation:

„ Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung von regulatory-protein-T-lymphocyte-1 (rpt-1, Trim 30)“

Angefertigt am Institut für umweltmedizinische Forschung,

Abteilung allgemeine Toxikologie

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. J. Abel

Berufliche Tätigkeiten

In den Jahren 1996-1997 Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Ruhr-Universität Bochum

In den Jahren 1997-1998 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Zoomorphologie und Parasitologie an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Von 1998-1999 Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Immunbiologie an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Essen, den 20.12.2004