

Die Rolle der Apoptose-relevanten Faktoren Daxx und DAP-Kinase im humanen Nierenzellkarzinom

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Nils Wethkamp
Hagen a.T.W.

Düsseldorf
März 2006

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Claus Dieter Gerharz
1. Koreferent: Prof. Dr. Werner Kunz
2. Koreferent: Prof. Dr. Joachim Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das humane Nierenzellkarzinom.....	1
1.2	Tumorentstehung durch Apoptose-Defekte.....	2
1.3	Verlauf der Apoptose.....	2
1.4	Caspasen – Effektormoleküle der Apoptose.....	4
1.5	Signalwege der Apoptose.....	6
1.6	Regulatoren der Apoptose.....	13
1.7	Ziel der Arbeit.....	22
2	Material & Methoden.....	24
2.1	Material.....	24
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Mikrobiologische Methoden.....	29
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	40
2.2.4	Biochemische Methoden.....	47
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Untersuchungen zur funktionellen Inaktivierung der DAP-Kinase im RCC.....	53
3.1.1	Expression der DAP-Kinase-mRNA in humanen RCC-Zelllinien.....	53
3.1.2	Relative Quantifizierung der DAP-Kinase-mRNA-Expression.....	55
3.1.3	Die Expression der DAP-Kinase-mRNA in RCC-Primärtumoren.....	56
3.1.4	Methylierungsanalyse des <i>DAP-Kinase</i> -Promotors im humanen RCC.....	59
3.1.5	DAP-Kinase-Proteinexpression im humanen RCC.....	60
3.1.6	Der Aktivitätszustand der DAP-Kinase im RCC.....	62

3.1.7	DAP-Kinase-Expression in mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	62
3.1.8	Analyse des Survivin/DAP-Kinase-Expressionsverhältnisses im RCC.....	65
3.2	Untersuchungen zur funktionellen Inaktivierung des <i>Daxx</i> -Gens im humanen RCC.....	67
3.2.1	Expression von <i>Daxx</i> in humanen RCC-Zelllinien.....	67
3.2.2	Identifizierung der <i>Daxx</i> -Spleißvarianten <i>Daxx</i> - β und <i>Daxx</i> - γ	68
3.2.3	Strukturelle Charakterisierung von <i>Daxx</i> - β und <i>Daxx</i> - γ	70
3.2.4	Funktionelle Charakterisierung von <i>Daxx</i> - β und <i>Daxx</i> - γ	74
3.2.5	Untersuchungen zur Funktion der <i>Daxx</i> -Isoformen in der CD95-abhängigen Apoptose.....	80
3.2.6	Die Funktion der <i>Daxx</i> -Isoformen als Regulatoren der p53-abhängigen Transkription.....	94
3.2.7	Untersuchungen zur Funktion der <i>Daxx</i> -Varianten im humanen RCC.....	98
3.2.8	Untersuchungen zur Rolle von <i>Daxx</i> im Taxol-induzierten Zelltod.....	105
4	Diskussion.....	108
4.1	Die DAP-Kinase-Expression im humanen RCC.....	109
4.1.1	Die DAP-Kinase-mRNA-Expression im Verlauf der Tumorprogression.....	109
4.1.2	DAP-Kinase-mRNA-Expression in klarzelligem und chromophil/papillären RCC.....	111
4.1.3	Der Methylierungszustand des <i>DAP-Kinase</i> -Promotors im RCC.....	111
4.1.4	DAP-Kinase-Proteinexpression und -Aktivität im humanen RCC.....	112
4.2	Expression der DAP-Kinase in nicht-neoplastischen Lymphozyten.....	114
4.3	Die Aufrechterhaltung der DAP-Kinase-Expression im humanen RCC.....	115
4.4	Identifizierung von neuen <i>Daxx</i> -Spleißvarianten - <i>Daxx</i> - β und <i>Daxx</i> - γ - in humanen RCC-Zelllinien.....	117
4.5	Strukturelle Charakterisierung von <i>Daxx</i> - β und <i>Daxx</i> - γ	118
4.6	Funktionelle Charakterisierung von <i>Daxx</i> - β und <i>Daxx</i> - γ	120
4.6.1	Die subzelluläre Lokalisation von <i>Daxx</i> - β und <i>Daxx</i> - γ	120
4.6.2	Die Bedeutung der <i>Daxx</i> -Varianten für die CD95-abhängige Apoptose.....	121
4.6.3	Die Bedeutung der <i>Daxx</i> -Varianten für die p53-abhängige Transkription.....	125
4.7	Das Spleißen von <i>Daxx</i> – ein Resistenzmechanismus des RCC gegenüber der p53-abhängigen Apoptose?.....	127
4.7.1	Die Auswirkung der <i>Daxx</i> -Varianten auf die p53-abhängige Transkription im RCC.....	128
4.7.2	Die Bedeutung der <i>Daxx</i> -Varianten für die p53-abhängige Apoptose im RCC...	129
4.8	Die Funktion der <i>Daxx</i> -Varianten beim Taxol-induzierten Zelltod.....	131
4.9	Die Rolle der <i>Daxx</i> -Varianten im humanen RCC.....	132
4.10	Perspektiven.....	133

5	Zusammenfassung.....	134
6	Literaturverzeichnis.....	136
7	Anhang.....	153
7.1	Tabellen und Abbildungen.....	153
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	158
7.3	Tabellenverzeichnis.....	160
7.4	Abkürzungsverzeichnis.....	161

1. Einleitung

1.1 Das humane Nierenzellkarzinom

Das humane Nierenzellkarzinom (RCC, renal cell carcinoma) ist eine maligne Tumorerkrankung des Nierenparenchyms. Es bildet beim Erwachsenen mit 85% den Hauptanteil aller bösartigen Nierengeschwulste und macht insgesamt 3-4% aller bösartigen Tumore aus (SCHAEFER-PROKOP, 1998; WUNDERLICH et al., 1999). Das RCC tritt meist sporadisch zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr auf, kann aber auch familiär gehäuft auftreten, wobei in diesem Fall auch jüngere Patienten betroffen sein können (STORKEL, 1999; DECKER & STORKEL, 1998). Der familiär-bedingten Tumorform liegt häufig das von Hippel-Lindau Syndrom (VHL) zu Grunde. Hierbei führt ein mutagener Effekt oder der Verlust des Tumorsuppressorgens *VHL* zur Tumorenstehung, wenn beide Allele inaktiviert sind (NEUMANN et al., 1998).

Generell werden histologische Subtypen des RCC unterschieden (THOENES et al., 1986): Klarzellige RCC zeichnen sich durch eine massive zytoplasmatische Akkumulation von Glykogen, Phospholipiden und Neutralfetten aus, weisen häufig Allelverluste auf und stellen mit 80% den häufigsten Typ dar (STORKEL, 1999). Chromophil/papilläre RCC bilden einen Anteil von ca. 10% und sind durch verschiedene zytogenetische Veränderungen charakterisiert, wie der Trisomie von Chromosom 7, 16 und 17, sowie dem Verlust des Y Chromosomen bei Männern. Sowohl klarzellige, als auch chromophil/papilläre RCC leiten sich vom proximalen Tubulusepithel ab (KOVACS et al., 1991). Chromophobe RCC umfassen ca. 5% aller RCC und sind durch den Verlust von Chromosom 1, 2, 6, 10, 13 und/oder 17 gekennzeichnet. Sie leiten sich von den Schaltzellen des Sammelrohrs der Niere ab. Darüber hinaus gibt es weitere Tumortypen wie das metanephrogene RCC oder das Sammelgangkarzinom, die allerdings jeweils weniger als 1% aller RCC ausmachen (SPEICHER et al., 1994; DECKER & STORKEL, 1998). Zur Entstehung des Nierenzellkarzinoms gibt es keine zuverlässigen Anhaltspunkte, jedoch werden Rauchen, Fettsucht, Langzeit-Dialyse, erworbene Nierenzysten und Cadmium- sowie Asbestbelastung als Risikofaktoren angesehen (YUAN et al., 1998a; YUAN et al., 1998b; HEATH et al., 1997).

In den meisten Fällen ist das RCC zum Zeitpunkt der Diagnose bereits metastasiert und hat dann eine extrem schlechte Prognose. Nierenzellkarzinome metastasieren auf hämatogenem und lymphogenem Wege vorwiegend in die Lunge (55%), die Lymphknoten (34%), die Leber (30-35%), das Skelettsystem (30-40%), die kontralaterale Niere (11%), das Gehirn (5%) und das Herz (5%) (SCHAEFER-PROKOP, 1998). Aufgrund einer weitgehenden Resistenz des Nierenzellkarzinoms gegenüber Chemo- und Radiotherapiestrategien ist bei lokal auf die Niere begrenzten Tumoren deren chirurgische Entfernung die einzig relevante Therapieform und ermöglicht eine 98%-ige, 5-Jahres-Überlebensrate (MOTZER et al., 1997; STAHLER & BRKOVIC, 1999).

1.1.1 Die Therapieresistenz des humanen Nierenzellkarzinoms

Im Gegensatz zu lokalen Tumoren, die durch radikale Nephrektomie oder Tumornukleation behandelt werden können, treten bei der Therapie von metastasierenden Nierenzellkarzinomen große Probleme auf. Die 5-Jahres-Überlebensrate sinkt hier (abhängig vom Tumorstadium) auf unter 10% (BICHLER &

WECHSEL, 1999). Während in anderen Tumorarten p53-Mutationen mit einer erhöhten Chemo- und Radiotherapieresistenz assoziiert sind, zeigt das Nierenzellkarzinom trotz einer geringen p53-Mutationshäufigkeit eine ausgeprägte Resistenz gegenüber diesen Therapien (SOUSSI et al., 2000; IARC p53 Database; WALLACE-BRODEUR & LOWE, 1999). Die Ursachen für diese Resistenz sind größtenteils unbekannt aber vermutlich mit der Überexpression des *mdr 1*-Gens (*multidrug resistance 1*) verbunden. Das entsprechende Protein p170 trägt als membranständige Effluxpumpe zur Entgiftung der Tumorzelle bei, indem es die effektive Konzentration der Zytostatika verringert (FOJO et al., 1987). Allerdings zeigen enttäuschende Ergebnisse aus Therapieansätzen mit p170-Inhibitoren, dass weitere Mechanismen zur Chemotherapieresistenz des RCC beitragen müssen (HARTMANN & BOKEMEYER, 1999). Jüngste Arbeiten weisen in diesem Zusammenhang auf Defekte innerhalb apoptotischer Signalwege hin, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden sollte (RAMP et al., 2003; RAMP et al., 2000; GERHARZ, 1999; YAN et al., 2004).

1.2 Tumorentstehung durch Apoptose-Defekte

Während der Entwicklung und Differenzierung von mehrzelligen tierischen Organismen spielt die Apoptose, welche entwicklungsbiologisch auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet wird, eine fundamentale Rolle. Durch diesen Prozess werden Zellen, die ihre Funktion verloren haben oder fehl entwickelt sind und eine potentielle Gefahr für den Gesamtorganismus darstellen, eliminiert (JACOBSON et al., 1997). Neben der Zellproliferation stellt die Apoptose somit einen weiteren Mechanismus zur Kontrolle der Zellzahl dar, wobei die Balance zwischen beiden Prozessen entscheidend für einen regelhaften Entwicklungsverlauf des Gesamtorganismus ist (WAGENER, 1999). Mutationen und genetische Anomalien, die mit einer Inaktivierung von pro-apoptotischen Genen wie z.B. *p53* verbunden sind oder die vermehrte Expression von anti-apoptotischen Faktoren wie bspw. Bcl-2, XIAP oder Survivin zur Folge haben, führen zu einer Störung dieses physiologischen Gleichgewichtes, indem die Apoptose inhibiert wird (VOGELSTEIN et al., 2000; TSUJIMUTO et al., 1985; TAMM et al., 2000; YAN et al., 2004). Unkontrolliertes Zellwachstum kann die Folge sein, wodurch die Entstehung von Tumoren gefördert wird (THOMPSON, 1995; CARSON & RIBEIRO, 1993). Darüber hinaus kann die Fehlregulation der Apoptose in bereits manifestierten Tumoren zu einer Resistenz gegenüber der Behandlung mit Chemotherapeutika führen, da gezeigt werden konnte, dass Zytostatika durch die Induktion apoptotischer Prozesse eine Reduktion des Tumors bewirken (BARRY et al., 1990; HICKMAN, 1992). Neben Tumorerkrankungen kann eine Dysregulation der Apoptose mit der Ausbildung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson assoziiert sein und ist ebenfalls an der Pathogenese von AIDS und ischämischen Erkrankungen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall beteiligt. Im Gegensatz zu Tumoren sind diese Erkrankungen allerdings durch eine erhöhte Apoptosefrequenz gekennzeichnet (THOMPSON, 1995; CARSON & RIBEIRO, 1993).

1.3 Verlauf der Apoptose

Apoptose ist die häufigste Form des eukaryotischen Zelltodes und wurde erstmals 1972 von Kerr, Wyllie und Currie definiert (KERR et al., 1972). Der Begriff entstammt aus dem Griechischen und bedeutet „von Bäumen herab fallendes Laub“. Apoptose ist ein aktiv regulierter physiologischer

Prozess, dessen biochemischer Apparat in jeder Zelle vorliegt und der innerhalb der Evolution hoch konserviert ist (REED 1999; ARAVIND et al., 1999). Der programmierte Zelltod unterscheidet sich grundlegend von der nekrotischen Form des Zelltodes, der bspw. als Folge von traumatischen Gewebsverletzungen oder der Exposition mit unphysiologischen Noxen auftritt. In der Apoptose befindliche Zellen runden sich ab, schrumpfen und lösen sich aus dem Zellverband heraus, wobei die Plasmamembran intakt bleibt und Blasen bildet, was als „blebbing“ bezeichnet wird. Darüber hinaus ist ein Verlust der Membranasymmetrie zu beobachten, was dazu führt, dass Phosphatidylserin an der Zelloberfläche externalisiert wird (VERMES et al., 1995). Mit Fortschreiten der Apoptose erfolgt die Kondensation des Chromatins und die komplette Fragmentierung des Zellkerns, wobei die DNA durch Endonukleasen in einer charakteristischen Weise degradiert wird.

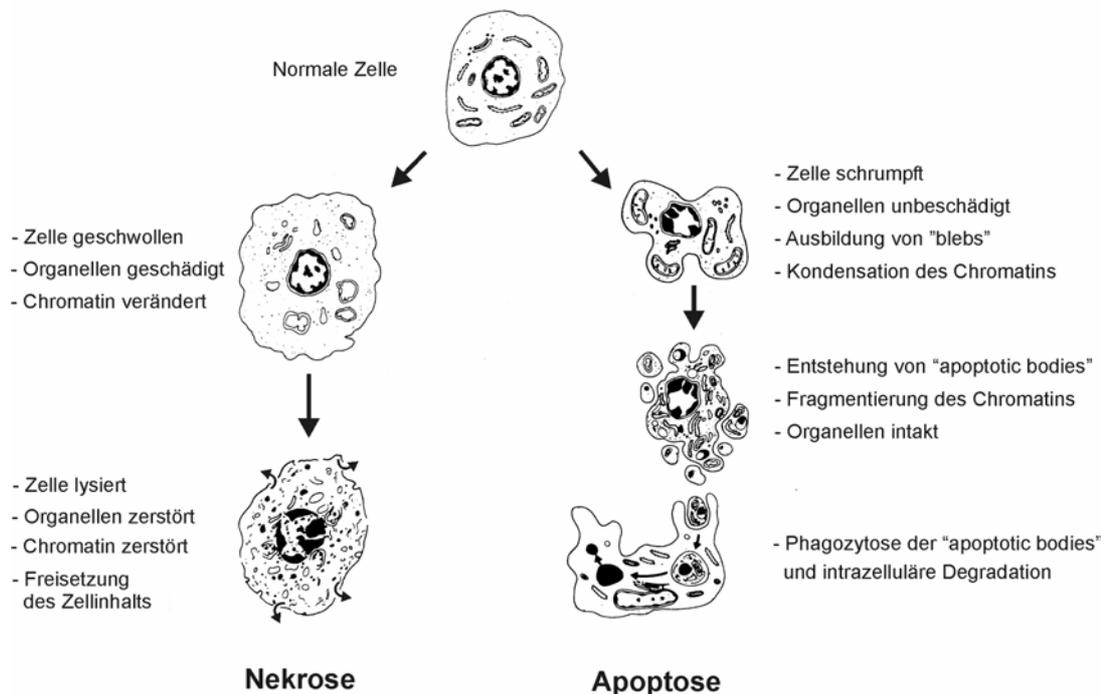


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen während der Nekrose und Apoptose (verändert nach WILLIAMS et al., 1992)

Schließlich zerfällt die Zelle in kleine membranumschlossene Körperchen, die als „apoptotic bodies“ bezeichnet werden. Die Nekrose ist im Gegensatz dazu durch ein Anschwellen der Zelle charakterisiert, was nachfolgend zur Zerstörung der Zellmembran führt. Anders als bei der Apoptose tritt hierbei der Zellinhalt ins umliegende Gewebe aus, wodurch die Nekrose mit einer Entzündungsreaktion verbunden ist (WAGENER, 1999). In Abbildung 1.1 ist der Verlauf der Apoptose im Vergleich zur Nekrose schematisch dargestellt. Genetische und biochemische Untersuchungen am Nematoden *Caenorhabditis elegans* haben entscheidend für das heutige Verständnis der Apoptose beigetragen, da analoge und homologe Gene später auch in Säugerzellen identifiziert werden konnten (HENGARTNER & HORVITZ, 1994; ZOU et al., 1997). Der Apoptoseverlauf lässt sich grundsätzlich in drei Phasen unterteilen: In der Induktionsphase erhält die zu tötende Zelle die Apoptose-auslösenden Signale, wie z.B. die Bindung eines zytotoxischen Liganden (vgl. 1.5.2), die Schädigung der DNA (vgl. 1.5.3.2), der Entzug von Wachstumsfaktoren sowie der Verlust von Zell-Zell Kontakten bzw. Kontakt

zur extrazellulären Matrix (FRISCH & FRANCIS, 1994). In der zweiten, der Effektorphase der Apoptose werden die induzierten Stoffwechselprozesse durchlaufen und führen durch die Aktivierung von Proteasen und Nukleasen zum Zelluntergang. In dieser Phase weist die Zelle die typischen morphologischen Merkmale der Apoptose auf. In der Degradationsphase werden die Zellreste von Makrophagen oder benachbarten Zellen phagozytiert und schließlich vollständig degradiert. Ob eine Zelle in den Prozess der Apoptose eintritt und ihn vollständig durchläuft, hängt von der Balance zwischen einer Vielzahl an pro- und anti-apoptotischen Faktoren ab und ist nach dem Erreichen eines so genannten „Punkt ohne Wiederkehr“ nicht mehr aufzuhalten, sodass die Zelle nach dessen Überschreiten unwiderruflich zugrunde geht.

1.4 Caspasen – Effektormoleküle der Apoptose

Eine zentrale Rolle innerhalb der Apoptose-Regulation nehmen die Caspasen ein, eine Familie von intrazellulären Proteasen, die auch als Effektormoleküle der Apoptose bezeichnet werden. Der Begriff „Caspasen“ reflektiert die Wirkungsweise dieser Enzyme, die der übergeordneten Familie der Cystein-Proteasen angehören und ihre Substrate spezifisch C-terminal hinter Aspartatresten spalten. (Cystein-Aspartat Proteasen). Obwohl mit der Protease ICE (Interleukin-1 β -converting enzyme, Caspase-1) die erste Caspase in humanen Zellen identifiziert worden ist, konnte eine direkte Beteiligung der Caspasen an der Apoptose erstmalig durch Untersuchungen an *C. elegans* aufgeklärt werden (YUAN et al., 1993). Bis heute wurden Spezies-übergreifend insgesamt 14 Caspasen identifiziert (davon 11 humane Caspasen), wobei 7 entscheidend an der Regulation der Apoptose beteiligt sind (EARNSHAW et al., 1999). Alle Caspasen werden als inaktive Zymogene (Pro-Caspasen) in Form einer N-terminalen Pro-Domäne mit einer großen (ca. 20 kDa) und einer kleinen (ca. 10 kDa) Untereinheit synthetisiert.

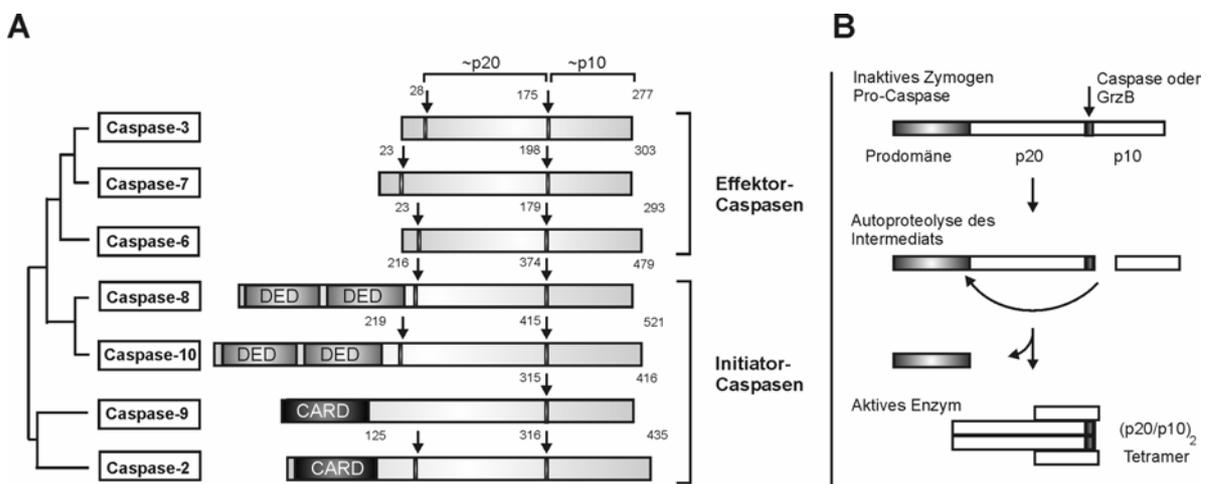


Abb. 1.2: Die Familie der Apoptose-relevanten Caspasen. A: Schematische Darstellung der Initiator- und Effektor-Caspasen gemäß ihrer aus der Homologie abgeleiteten Verwandtschaft. Die Pro-Domänen innerhalb der Initiator-Caspasen beinhalten die für die Proteininteraktion essentiellen Sequenzmotive DED (Death Effector Domain) und CARD (Caspase Recruitment Domain). Schwarze Pfeile kennzeichnen die zur Aktivierung verwendeten Spaltstellen. **B:** Darstellung des allgemeinen Aktivierungsprinzips der Effektor-Caspasen. Die Abspaltung der kleinen Untereinheit (p10) durch bereits aktivierte Caspasen oder der Serinprotease Granzym B (GrzB) führt zur auto-proteolytischen Freisetzung der Prodomäne und zur Bildung der aktiven Caspasen, einem Heterotetramer aus jeweils zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten (verändert nach RIEDL & SHI, 2004).

Durch Abspaltung der Pro-Domäne sowie einer intramolekularen Spaltung zwischen der großen und kleinen Untereinheit werden Caspasen prozessiert (vgl. Abb. 1.2). Röntgenstrukturanalysen von Caspase-1, -3 und -7 belegen, dass jeweils zwei Heterodimere bestehend aus einer kleinen und einer großen Untereinheit über hydrophobe Wechselwirkungen miteinander assoziieren und eine katalytisch aktive Caspase-Einheit in Form eines $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramers bilden (WALKER et al., 1994; WILSON et al., 1994; ROTONDA et al., 1996; RIEDL et al., 2001). Strukturell lassen sich anhand der Länge der Pro-Domäne die Initiator-Caspasen (lange Pro-Domäne, bis zu 219 Aminosäuren) von den Effektor-Caspasen (kurze Pro-Domäne, ca. 20-30 Aminosäuren) unterscheiden (EARNSHAW et al., 1999).

Die Initiator-Caspasen, zu denen Caspase-2, -8, -9 und -10 gehören, werden als Antwort auf Apoptose-induzierende Stimuli unter Beteiligung von Adaptermolekülen autokatalytisch aktiviert, während die Effektor-Caspasen, zu denen Caspase-3, -6 und -7 gezählt werden, durch die aktivierten Initiator-Caspasen prozessiert und aktiviert werden. Die Rekrutierung der akzessorischen Regulatorproteine bzw. der zu aktivierenden Caspasen wird bei den Initiator-Caspasen über die in der ausgeprägten Pro-Domäne lokalisierten DED- (Death Effector Domain) oder CARD- (Caspase Recruitment Domain) Sequenzmotive vermittelt (CHINNAIYAN et al., 1995; BOLDIN et al., 1995b; BRAKEBUSCH et al., 1992). Die Aktivierung der Effektor-Caspasen führt zur proteolytischen Spaltung von einer Reihe zellulärer Proteine, die an essentiellen Prozessen wie z.B. der Aufrechterhaltung der Zellstruktur, der Signaltransduktion oder dem DNA-Metabolismus beteiligt sind und deren direkte oder indirekte Inaktivierung schließlich den Zelluntergang zur Folge hat. Tabelle 1.1 liefert eine Übersicht über einige der wichtigsten Caspase-Substrate und ihrer Funktion innerhalb der Zelle. Seit kurzem sind auch Caspase-unabhängige Mechanismen der Apoptose bzw. des programmierten Zelltodes bekannt, bei denen die proteolytische Degradation der Zelle bspw. durch lysosomale Proteasen der Cathepsin-Familie initiiert wird. Insgesamt nehmen die Caspasen somit zwar eine zentrale Rolle innerhalb der Apoptose ein, die Zelle hat aber vermutlich alternative „Back-up“ Mechanismen entwickelt, um den programmierten Zelltod, je nach Art des Stimulus, auch unter Caspase-unabhängigen Bedingungen ablaufen zu lassen (BROKER et al., 2005).

Tab. 1.1: Auflistung verschiedener Caspase-Substrate (verändert nach NICHOLSON, 1999)

Signaltransduktion		DNA-/RNA Metabolismus	Zytoskelett	Sonstige Funktionen
Bid	I- κ B α	PARP	Rock I	Catenin
Bcl-2	RasGAP	Rad51	Gas2	Ataxin-3
Bcl-X _L	PISTLRE Kinase	DFF45/I-CAD	NuMa	HSP90
PKC	proIL16	SAF	Plectin	Nup153
MEKK-1	RAF1	DNA-PKcs	LAP2	AMPA-Rezeptoren
PKN	PP2A	UBF	D4-GDI	Kinektin
Pro-Caspasen	cPLA-2	MCM3	FAK	Atrophen
STAT-1	PAK2	Sp1	α -II-Fodrin	UbqCE NEDD4
RB	CaMk-IV	Acinus	Vimentin	Ataxin-3
Akt1	SRP p72	CDC27	Rabatin	Huntingtin
Raf1	P28BAP31	hnRNP-U	Cytokeratin 18	β -APP
p27 ^{KIP1}	p59 ^{lyn}	hnRNP-A1	Lamin A und B	Persenilin-2
Wee1		hnRNP-C1/C2	Gelsolin	Calpastatin
Mst1		U1-70 kDa	Aktin	
p21 ^{CIP1/WAF1}		ATM		

1.5 Signalwege der Apoptose

Die Induktion der Apoptose erfolgt durch zwei unterschiedliche Signalwege, die auch als intrinsische bzw. extrinsische Form der Apoptose bezeichnet werden. Bei der intrinsischen Signalübertragung führen verschiedene Stimuli wie die Exposition mit γ - und UV-Strahlung, die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 oder eine Schädigung der DNA zu einer Aktivierung der Mitochondrien, was zur Induktion der Initiator-Caspase-9 führt und schließlich die Aktivierung der Effektor-Caspasen zur Konsequenz hat. Die extrinsische Form wird auch als Rezeptor-vermittelte Apoptose bezeichnet, da in diesem Fall die Bindung von zytotoxischen Liganden an so genannte „Todesrezeptoren“ für die Aktivierung der Caspasen-Kaskade verantwortlich ist (RIEDL & SHI, 2004).

1.5.1 Die Funktion der Mitochondrien in der intrinsischen Apoptose

Die Mitochondrien werden als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet. Sie tragen unter anderem den biochemischen Apparat der oxidativen Phosphorylierung und sind essentiell für die zelluläre aerobe Atmung. Seit längerem ist bekannt, dass sie darüber hinaus eine bedeutende Funktion innerhalb der Apoptose besitzen. So ist beispielsweise während der Apoptose ein Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\psi_m$) noch vor der DNA-Fragmentierung zu beobachten (PETIT et al., 1995; ZAMZAMI et al., 1995). Ursächlich für diesen Vorgang, den man Permeabilitäts-Transition (PT) nennt, ist dabei das Öffnen von Poren innerhalb der äußeren bzw. inneren Mitochondrienmembran. Ein bisher nur teilweise charakterisierter Komplex bestehend aus dem Nukleotidtransporter ANT (Adeninnukleotid Transporter), dem Spannungs-abhängigen Anionenkanal VDAC (voltage-dependent anion channel), der Hexokinase, dem Bezodiazapin Rezeptor und Cyclophilin D bildet dabei die so genannte PT-Pore aus, die unter anderem an der Regulation der Kalziumkonzentration und des pH-Wertes der mitochondrialen Matrix beteiligt ist (HALESTRAP et al., 2002). Ein längerfristiges Öffnen der Pore führt zum Kollabieren des $\Delta\psi_m$, was mit einer osmotisch-bedingten Volumenzunahme der Matrix verbunden ist (LY et al., 2003). Letzteres kann das Abplatzen der äußeren Mitochondrienmembran zur Folge haben, wodurch im intramembranären Zwischenraum lokalisierte, pro-apoptische Proteine wie Pro-Caspase-2, AIF (apoptosis inducing factor) und Cytochrom *c* ins Zytoplasma gelangen (SUSIN et al., 1999a; SUSIN et al., 1999b; LIU et al., 1996). Cytochrom *c*, welches in vitalen Zellen als Elektronenüberträger innerhalb der Atmungskette fungiert, nimmt in der mitochondrialen Apoptose ebenfalls eine zentrale Stellung ein. In einer ATP/dATP-abhängigen Reaktion bindet es im Zytoplasma den allosterischen Faktor Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), was eine Konformationsänderung von Apaf-1 bewirkt und eine Exposition der CARD-Domäne zur Folge hat. Über diese wird schließlich Pro-Caspase-9 durch eine CARD/CARD-Interaktion rekrutiert (vgl. 1.4). Zusammen bilden sie das Holoenzym, das so genannte Apoptosom (vgl. Abb. 1.6), das in der Lage ist, die Effektor-Caspasen-3 und -7 zu aktivieren und somit den Zelltod einzuleiten (LI et al., 1997; SLEE et al., 1999).

1.5.1.1 Die Rolle der Bcl-2-Proteinfamilie in der Mitochondrien-abhängigen Apoptose

Eine weitere Form der apoptotischen Mitochondrien-Aktivierung wird durch Mitglieder der Bcl-2-Familie (B-Cell Lymphoma-2) vermittelt. Diese Proteinfamilie umfasst 15 Mitglieder, die alle mindestens eins von vier konservierten Sequenzmotiven tragen, die als Bcl-2-homologe Domänen (BH) bezeichnet und mit BH1-4 unterschieden werden. Funktionell lassen sich die Proteine in pro- und anti-apoptotische Faktoren unterteilen, wobei die anti-apoptotischen Faktoren, zu denen Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w und Mcl-1 gehören, mindestens eine BH1 und BH2 Domäne besitzen. Die pro-apoptotischen Faktoren werden aus zwei Untergruppen gebildet. Bax und Bak gehören zur Gruppe der BH1-3 tragenden Faktoren und stehen damit den so genannten „BH3-only“ Proteinen gegenüber, wie Bid, Bim, Bad, Bcl-X_S, Puma und Noxa, die ausschließlich die BH3 Domäne enthalten (GROSS et al., 1999). Die beiden antagonistischen Faktoren Bcl-X_S und Bcl-X_L werden dabei von dem selben Gen kodiert und sind auf alternatives Spleißen der entsprechenden prä-mRNA zurückzuführen (CHAO & KORSMEYER, 1998).

Einige Proteine wie z.B. Bcl-2 oder Bcl-X_L weisen eine zusätzliche Transmembrandomäne im C-Terminus auf, mit der sie in der äußeren Mitochondrienmembran, aber auch in der Membran des ER oder des Kerns verankert sein können (KRAJEWSKI et al., 1993). Sequenzhomologien zwischen Bcl-X_L und verschiedenen Poren-bildenden bakteriellen Toxinen (z.B. Diphtheria-Toxin und Colicin) lieferten erste Hinweise auf eine Beteiligung dieser Proteinfamilie an der Regulation der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran während der Apoptose (MUCHMORE et al., 1996; MINN et al., 1997). Für Bax, Bcl-2, Bcl-X_L und der prozessierten Form von Bid, tBid (truncated Bid) konnte diese Porenbildende Aktivität durch *in vitro* Untersuchungen bestätigt werden (ANTONSSON et al., 1997; SCHLESINGER et al., 1997; SCHENDEL et al., 1997; SCHENDEL et al., 1998). Unter Apoptose-induzierenden Bedingungen führt nach heutiger Vorstellung eine direkte oder tBid-induzierte Oligomerisierung von Bax und Bak zur Insertion und Ausbildung von Kanälen in der äußeren Mitochondrienmembran, über die schließlich die Freisetzung der pro-apoptotischen Faktoren wie Cytochrom *c* verläuft. Die Feinregulation dieses Prozesses unterliegt dabei der Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie, die mittels ihrer BH-Domänen wechselwirken und sich durch Bildung von Homo- und Heterodimeren gegenseitig regulieren können (GROSS et al., 1999).

1.5.2 Apoptose als Rezeptor-vermittelter Prozeß

Apoptose kann direkt durch die Bindung von extrazellulären, zytotoxischen Liganden an membranständige Rezeptoren auf der Zelloberfläche induziert werden. Dieser als extrinsisch bezeichnete Signalweg der Apoptose wird durch diverse Mitglieder der TNF-Rezeptor Superfamilie (Tumor Necrosis Factor) wie CD95, TNFR1 oder den TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) Rezeptoren DR4 und DR5 vermittelt, die man „Todesrezeptoren“ nennt (BAKER & REDDY, 1996). Die Rezeptoren sind allesamt Typ I-Transmembranproteine mit einem hochkonservierten extrazellulären Bereich, bestehend aus zwei bis sechs Cystein-reichen Domänen (CRD), wobei jeweils 6 Cysteinreste eine CRD bilden und die einzelnen Domänen durch 40 Aminosäuren voneinander getrennt sind (SMITH et al., 1994). Darüber hinaus weisen die Todesrezeptoren, im Gegensatz zu

anderen Mitgliedern der TNF-Rezeptor-Familie, zusätzlich eine ca. 80 Aminosäuren-umfassende intrazelluläre Domäne auf, die für die Apoptose-Induktion essentiell ist und als „Todesdomäne“ (DD, Death Domain) bezeichnet wird (TARTAGLIA et al., 1993). Die Rezeptoraktivierung erfolgt durch Bindung der korrespondierenden trimerisierten Liganden, was zur Tri- bzw. Oligomerisierung des Rezeptors führt und die intrazelluläre Aktivierung der Caspasen-Kaskade zur Folge hat (SMITH et al., 1994). Alle Liganden gehören mit Ausnahme von NGF (Nerve Growth Factor) der TNF-Familie an und besitzen im extrazellulären C-Terminus eine ebenfalls hochkonservierte Region, die für die Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor verantwortlich ist (GRUSS, 1996). Am Beispiel des CD95-Systems werden die Signalwege der Rezeptor-vermittelten Apoptose näher erläutert.

1.5.2.1 Das CD95-System

Die physiologische Bedeutung der CD95-vermittelten Apoptose liegt vorwiegend in der Regulation der Immunsystem-Homöostase. Nach Beendigung einer Immunantwort werden bspw. nicht mehr benötigte aktive T-Zellen über das CD95-System eliminiert, was als „Aktivierungs-induzierter Zelltod“ (AICD, Activation-Induced Cell Death) bezeichnet wird (DHEIN et al., 1995; PETER et al., 1997). Darüber hinaus ist das CD95-System an der Regulation der Leberhomöostase beteiligt und dient zytotoxischen T-Zellen zur Entfernung von entarteten bzw. Virus-infizierten Zellen (ROUVIER et al., 1993; OWEN-SCHAUB et al., 1992). Der CD95-Rezeptor, auch Apo-1 oder FAS genannt, ist ein aus 325 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 48 kDa, das in den meisten Geweben exprimiert ist (LEITHÄUSER et al., 1993; WATANABE-FUKUNAGA et al., 1992). Es enthält drei für die Aktivierung essentielle CRDs und eine 70 Aminosäuren-umfassende DD (ORLINICK et al., 1997, ITOH et al., 1991). Der korrespondierende CD95-Ligand (CD95L) ist ein 281 Aminosäuren-umfassendes Typ II-Transmembranprotein, ebenfalls glykosyliert und besitzt eine molare Masse von 37 kDa (SUDA et al., 1993; TAKAHASHI et al., 1994; YU et al., 1999). Im Gegensatz zum Rezeptor ist die Expression des CD95L - von wenigen „Immun-privilegierten“ Organbereichen abgesehen - auf das hämatopoetische System beschränkt (GREEN & FERGUSON, 2001). Interessanterweise zeigen auch einige neoplastische Gewebe eine Expression des CD95L, was als möglicher Resistenzmechanismus gegenüber den Angriffen des Immunsystems diskutiert und als „Tumor Counterattack“ bezeichnet wird. Aufgrund der CD95L-Expression ist die Tumorzelle in der Lage die CD95-abhängige Apoptose in den attackierenden zytotoxischer T-Zellen auszulösen, wodurch der Tumor die T-Zellen abtötet und nicht umgekehrt (IGNEY & KRAMMER, 2002).

Die CD95-Rezeptor-vermittelte Apoptose-Induktion erfolgt physiologisch durch die Bindung des trimeren CD95L, kann aber auch durch agonistische Antikörper wie Anti-Apo-1 oder CH11 hervorgerufen werden (TRAUTH et al., 1989; DEBATIN et al., 1990). In beiden Fällen hat dies die Trimerisierung bzw. Multimerisierung des Rezeptors zur Folge, was zur intrazellulären Aggregation der DDs und der Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD (Fas Associated Protein with Death Domain) führt (BANNER et al., 1993; CHINNAIYAN et al., 1995). Neben der DD, über die FADD an die DD des Rezeptorkomplexes assoziiert, trägt das Molekül eine DED, die nach Bindung an CD95 einer Konformationsänderung unterliegt und dadurch an eine der DEDs von Pro-Caspase-8 binden kann (BOLDIN et al., 1996; CHINNAIYAN et al., 1996). Durch die Rekrutierung von Pro-Caspase-8 an den Rezeptorkomplex aus CD95 und FADD wird der so genannte DISC (Death Inducing Signalling Complex) gebildet, der nach dem „close proximity“-Modell sterisch die auto-proteolytische

Aktivierung von Pro-Caspase-8 ermöglicht. Die aktive Caspase-8 wird daraufhin ins Zytoplasma entlassen und aktiviert schließlich die Effektor-Caspasen, während die Pro-Domäne am Rezeptor verbleibt (KISCHKEL et al., 1995; MUZIO et al., 1996).

Abhängig vom Zelltyp kann auch eine Beteiligung der Mitochondrien innerhalb der CD95-abhängigen Apoptose beobachtet werden. Sie übernehmen eine Art Verstärkerfunktion in Zellen, die eine reduzierte DISC-Bildung und daher eine geringere Caspase-8-Aktivität aufweisen (SCAFFIDI et al., 1998). In diesen so genannten „Typ II-Zellen“ (vorwiegend lymphoide Zellen) erfolgt die Mitochondrien-Aktivierung durch Caspase-8 gespaltenes, trunkiertes Bid (tBid), was schließlich zur Aktivierung von Caspase-9 führt und dadurch die Aktivierung der Effektor-Caspasen gewährleistet (LUO et al., 1998; LI et al., 1998). Die Tatsache, dass die CD95-abhängige Apoptose in diesen Zellen vollständig durch eine Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-X_L inhibiert werden kann, demonstriert die Bedeutung des mitochondrialen Signalweges am Gesamtverlauf der Apoptose (SCAFFIDI et al., 1998). Im Gegensatz dazu erfolgt in den „Typ I-Zellen“ (vorwiegend epitheloide Zellen) eine direkte Caspase-8-vermittelte Aktivierung von Caspase-3, wobei sich eine Bcl-2- bzw. Bcl-X_L-Überexpression nicht signifikant auf das Apoptose-Ausmaß auswirkt. (SCAFFIDI et al., 1998). In Abbildung 1.6 ist die CD95-abhängige Apoptose der Typ I- und Typ II-Zellen schematisch dargestellt.

1.5.2.2 Die Funktion der JNK im CD95-System

Neben der Caspase-Aktivierung kann die Bindung des CD95 Liganden auch zur Aktivierung der JNK/SAPK (c-Jun N_H₂-terminalen Kinase/Stress-Aktivierte Protein Kinase) führen (LATINIS & KORETZKI, 1996; GOILLOT et al., 1997), einer Serin/Threonin-Kinase, die zur Familie der MAP (Mitogen Aktivierten Protein) Kinasen gehört und die Genexpression durch Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, JunB oder JunD reguliert (KYRIAKIS et al., 1994). JNK wird durch eine Reihe extrazellulärer Stimuli aktiviert und ist an der Regulation von diversen zellulären Prozessen wie Stress-Adaption, Apoptose und Proliferationskontrolle beteiligt (WADA & PENNINGER, 2004). Nach dem allgemeinen Prinzip der MAPK Aktivierung induziert CD95L eine hierarchische Phosphorylierungs-Kaskade, die von einer MAP3K (MAPK Kinase Kinase) über eine MAP2K (MAPK Kinase) zur Aktivierung von JNK führt (ICHIJO, 1999). Die Signaltransduktion zwischen CD95 und der entsprechenden MAP3K kann sowohl Caspase-abhängig als auch –unabhängig verlaufen und ist vermutlich Zelltyp-spezifisch (HOFMANN et al., 2001; YANG et al., 1997; CHANG et al., 1998). In diesem Zusammenhang wurde die MAP3K MEKK1 als putativer Aktivator beschrieben, welche nach Caspase-vermittelter Spaltung die Aktivierung der JNK induziert (CARDONE et al., 1997). Auf der anderen Seite ist mit Daxx ein CD95-Adapterprotein identifiziert worden, das die Caspase-unabhängige Aktivierung von JNK vermittelt. Analog zu FADD bindet Daxx nach CD95-Aktivierung an den intrazellulären Bereich des CD95-Rezeptors, was die Rekrutierung und Aktivierung der MAP3K ASK1 (Apoptose Signal-regulierende Kinase1) induziert und nachfolgend zur Aktivierung der JNK führt (YANG et al., 1997; CHANG et al., 1998; vgl. 1.6.5.1). Die Bindung von Daxx und FADD an CD95 erfolgt dabei weder kompetitiv noch kooperativ (CHANG et al., 1999).

Das pro-apoptotische Potential der aktiven JNK wird vornehmlich durch die Transkription pro-apoptotischer Gene wie *Bim* oder *CD95L* vermittelt (FARIS et al., 1998; WHITFIELD et al., 2001), kann aber, wie *in vitro* Untersuchungen zeigten, auch mit der Phosphorylierungs-bedingten Inaktivierung der anti-apoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-X_L verbunden sein (MAUNDRELL et al., 1997;

YAMAMOTO et al., 1999). JNK-vermittelte Effekte scheinen allerdings nicht grundlegend an der CD95-abhängigen Apoptose beteiligt zu sein, sondern sind vermutlich Zelltyp-spezifisch. So hatte die Überexpression dominant-negativer Formen von Faktoren des JNK-Signalweges in HEK293- und L929-Zellen bspw. eine deutliche Reduktion der CD95-abhängigen Apoptose zur Folge, während dies in HeLa- und Jurkat-Zellen nicht der Fall war (YANG et al., 1997; HOFMANN et al., 2001).

1.5.3 Die Zytostatika-vermittelte Apoptose

„Zytostatika“ ist der Sammelbegriff für eine Reihe meist niedermolekularer, organischer Substanzen, die aufgrund ihrer Proliferations-hemmenden Effekte auf eukaryotische Zellen als Chemotherapeutika in der Tumortherapie eingesetzt werden. Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass die Wirkungsweise dieser Substanzen darin besteht, die Zellzyklusprogression der Tumorzellen in bestimmten Phasen zu blockieren, was zur Aktivierung des Apoptose-Prozesses führen kann und letztlich eine Reduktion des Tumors zur Folge hat (BARRY et al., 1990; HICKMAN, 1992). Die meisten Zytostatika sind entweder geno-toxische oder mito-toxische Substanzen, die eine Schädigung der DNA oder des Spindelapparates während der Mitose hervorrufen.

1.5.3.1 p53 – der zentrale Regulator von Zellzyklus und Apoptose

Geno-toxische Substanzen wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Topoisomerase-Hemmer Etoposid, Topotecan (Inhibitoren der Topoisomerase I) und Doxorubicin (Inhibitor der Topoisomerase II) induzieren eine fehlerhafte DNA-Replikation, was zu Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen der DNA führt und die Aktivierung des G2/M Kontrollpunktes zur Folge hat (NORBURY & ZHIVOTOVSKY, 2004). Eine Schlüsselfunktion übernimmt hierbei das Genprodukt des Tumorsuppressorgens *p53*, das als Stresssensor der Zelle fungiert und über das weitere Schicksal der Zelle entscheidet, indem es den Zellzyklus-Arrest oder die Apoptose einleiten kann (LOWE et al., 1993; LANE, 1992). P53 ist ein nukleäres aus 393 Aminosäuren bestehendes Phosphoprotein und stellt einen multifunktionalen Transkriptionsfaktor dar, der die Expression von einer Vielzahl an Genen steuert und darüber neben der Zellzykluskontrolle und Apoptose ebenfalls an den Prozessen der DNA-Reparatur, der zellulären Seneszenz, und Angiogenese beteiligt ist (vgl. Abb. 1.3). P53 stellt somit einen zentralen Regulator der Zelle dar. (VOGELSTEIN et al., 2000). Das Protein besitzt eine N-terminale Transaktivierungsdomäne, eine spezifische DNA-Bindestelle und eine regulatorische Domäne im C-Terminus, über die p53-Monomere nach Aktivierung transkriptionell aktive Tetramere bzw. Oligomere bilden können (VOGELSTEIN et al., 2000). Mit ca. 6-20 min hat das Protein eine relativ geringe Halbwertszeit, wobei die p53-Stabilität im Wesentlichen durch eine auto-regulatorische Schleife von MDM2 (Murine double minute-2; das humane Homolog: HDM2) kontrolliert wird (AMUNDSON et al., 1998). P53 induziert die Expression der Ubiquitin-Ligase MDM2, die zum einen direkt an p53 bindet und dessen Transaktivierungsaktivität inhibiert und zum anderen die Ubiquitin-vermittelte Degradation von p53 fördert, wodurch die zelluläre p53-Konzentration auf einem relativ niedrigem Niveau gehalten wird (CHEN et al., 1994; AMUNDSON et al., 1998). Unter normalen physiologischen Bedingungen ist das „p53-System“ daher inaktiv. Erst durch zellulären Stress, wie bspw. die Schädigung der DNA (vgl. 1.5.3.2) oder der Onkogen-vermittelten Aktivierung von DAP-

Kinase (vgl. 1.6.4.1) wird p53 aktiviert bzw. stabilisiert und leitet die Zelle, zur Unterdrückung der zellulären Transformation, entweder in den Zellzyklusarrest oder die Apoptose (VOGELSTEIN et al., 2000). Im aktiven Zustand unterliegt p53 der Regulation durch weitere Faktoren, wie z.B. Daxx (vgl. 1.6.5.2), ASPP (Apoptosis-stimulating protein for p53) oder iASPP (inhibitor of ASPP), welche die transkriptionelle Aktivität von p53 modulieren können (SAMUELS-LEV et al., 2001; BERGAMASCHI et al., 2003; vgl. Abb. 1.3).

Die Tatsache, dass p53 in mehr als 50% der humanen Tumoren mutiert ist, reflektiert die Bedeutung dieses Tumorsuppressorgens. So konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der p53-Aktivität mit der Anhäufung onkogener Mutationen verbunden ist (VOUSDEN & LU, 2002; LEVINE, 1997). Mit p63 und p73 sind mittlerweile zwei Homologe von p53 identifiziert worden, die ebenfalls in der Lage sind die Expression von p53-Zielgenen zu regulieren, aber in humanen Tumoren - im Gegensatz zu p53 - selten durch Mutation inaktiviert sind (IRWIN & KAELIN, 2001).

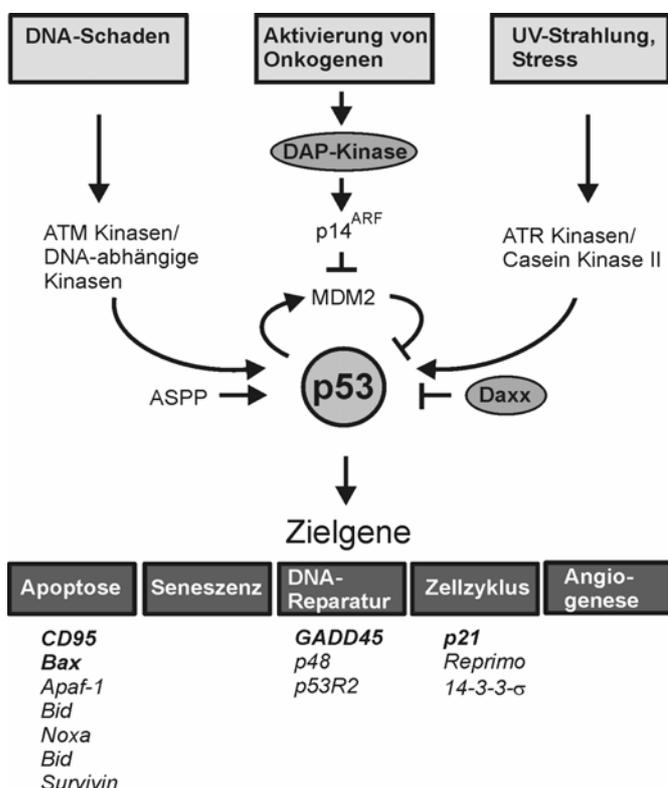


Abb. 1.3: Schematische Übersichtsdarstellung verschiedener p53-Signalwege.

Während die Schädigung der DNA eine Aktivierung von p53 über ATM-Kinasen bzw. DNA-abhängigen Kinasen bewirkt, erfolgt die p53-Aktivierung nach Exposition mit UV-Strahlung sowie nach verschiedenen Arten von zytotoxischem Stress, durch die Casein Kinase II bzw. Kinasen der ATR-Familie (Ataxia telangiectasia related). Die Onkogen-induzierte Aktivierung von p53 verläuft über die DAP-Kinase-vermittelte Aktivierung von p14^{ARF}. Die Aktivierung von p53 führt schließlich zur transkriptionellen Aktivierung der p53-Zielgene, über die p53 bei zellulären Prozessen wie Apoptose, DNA-Reparatur, Zellzyklus, Angiogenese oder Seneszenz involviert ist. Aus Gründen der Übersicht, sind nur exemplarische p53-Zielgene aufgeführt. In dieser Arbeit untersuchte Faktoren sind hervorgehoben. Für Details, siehe Text. (Verändert nach VOGELSTEIN et al., 2000)

1.5.3.2 Apoptose als Folge der DNA-Schädigung

Die durch geno-toxische Verbindungen wie Etoposid, Topotecan oder Doxorubicin induzierten DNA Schäden führen zur Aktivierung von verschiedenen Proteinkinasen der ATM (Ataxia telangiectasia mutated)-Familie, die durch die Phosphorylierung verschiedener Regulatorproteine die Aktivierung bzw. Stabilisierung von p53 induzieren (NORBURY & ZHIVOTOVSKY, 2004). Sowohl p53 als auch MDM2 sind bspw. Substrate der DNA-abhängigen Proteinkinase und die Phosphorylierung der beiden Proteine verhindert deren Interaktion, was zur Stabilisierung und Aktivierung bzw. Oligomerisierung von p53 führt (SMITH & FORNACE, 1995). Bei geringen DNA Schäden kann die p53-Aktivierung die Reparatur der DNA einleiten, wobei p53 die Expression von DNA-Reparaturgenen wie bspw.

GADD45 induziert (SMITH et al., 1994; VOGELSTEIN et al., 2000). Bei größeren Schäden arretiert p53 die Zellen durch Induktion des CDK2-Inhibitors (Cyclin-dependent kinase-2) p21^{CIP1/WAF} (im Folgenden p21 genannt) im Zellzyklus (KASTAN et al., 1991; KUERBITZ et al., 1992; ATTARDI et al., 1996) oder eliminiert diese durch die Aktivierung des Apoptoseprogrammes (LOTTEM & SACHS, 1993). Die p53-abhängige Apoptose verläuft dabei vermutlich zum Großteil durch die transkriptionelle Aktivierung von pro-apoptotischen p53-Zielgenen wie *Bid*, *Bim*, *Bax*, *Puma*, *Noxa*, *Apaf-1* oder *CD95* (YU et al., 1999; NORBURY & ZHIVOTOVSKY, 2004) bzw. der transkriptionellen Repression anti-apoptotischer Gene wie *Survivin* (ZHOU et al., 2002; vgl. 1.6.1). Während die Bcl-2-homologen Proteine die intrinsische Apoptose fördern, führt die Hochregulation von CD95 wahrscheinlich zu einer Sensitivierung der geschädigten Zelle gegenüber der CD95L-induzierten Eliminierung durch zytotoxische T-Zellen (CHAKRABORTY et al., 2003). Darüber hinaus kann nach p53-Aktivierung auch eine autokrine Form der CD95-abhängigen Apoptose beteiligt sein, wobei sich benachbarte Tumorzellen nach Hochregulation des CD95-Rezeptors gegenseitig über das CD95-System abtöten (FRIESEN et al., 1997). Durch die direkte Bindung und Aktivierung von Bax, Bak oder Bcl-X_L ist p53 ferner in der Lage, die mitochondriale Apoptose auch Transkriptions-unabhängig zu induzieren (CHIPUK et al., 2004; MIHARA et al., 2003; LEU et al., 2004). Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Untersuchungen in denen gezeigt wurde, dass die p53-abhängige Apoptose nicht zwingend mit einer *de novo* RNA-/Protein-Biosynthese assoziiert sein muss (CAELLES et al., 1994).

1.5.3.2 Die Taxol-induzierte Apoptose

Im Gegensatz zu geno-toxisch wirkenden Zytostatika induzieren Zytoskelett-interferierende Substanzen wie bspw. Taxol eine fehlerhafte Spindelapparat-Ausbildung während der Mitose. Taxol gehört zur Gruppe der Mikrotubuli-stabilisierenden Zytostatika. Es fördert den Polymerisationsprozess von Tubulin und stabilisiert das Tubulinpolymer, wodurch die Dynamik zwischen Auf- und Abbau der Mikrotubuli insbesondere während der Mitose massiv gestört wird (SCHIFF & HORWITZ, 1980; SCHIFF et al., 1979; JORDAN et al., 1996). Ein nicht regelhaft-ausgebildeter Spindelapparat führt dabei zur Aktivierung des so genannten G2/M Kontrollpunktes und hat die Arretierung des Zellzyklus bzw. die Induktion der Apoptose zur Folge (JORDAN et al., 1993). Die molekularen Mechanismen der Taxol-abhängigen Apoptose sind nicht vollständig verstanden, scheinen aber sowohl p53-abhängig wie auch -unabhängig zu verlaufen. (WOODS et al., 1995; BLAGOSKLONNY et al., 1995). Interessanterweise konnte bei bestimmten Krebsformen ein Funktionsverlust von p53 mit der Sensitivität gegenüber Taxol korreliert werden, was vermuten lässt, dass p53 innerhalb der Taxol-abhängigen Apoptose eine inhibierende Funktion besitzen kann (WAHL et al., 1996). Eine Reihe von Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieser Effekt auf die Expression des p53 Zielgens *p21* beruht, da eine „antisense“-RNA-vermittelte Inaktivierung der p21-Proteinexpression in Mammakarzinom-Zellen eine Sensitivierung gegenüber Taxol zur Folge hatte und auch in Glioblastomzellen eine p21-abhängige Taxol-Resistenz beobachtet werden konnte (YU et al., 1998; LI et al., 2002). P21 fungiert als direkter Inhibitor der für die G2/M Transition essentiellen Kinase CDK1 (p34^{cdcd2}) und scheint durch deren Inhibition den Taxol-abhängigen Zelltod zu unterdrücken. Dafür sprechen Ergebnisse, die gezeigt haben, dass die Überexpression einer dominant-negativ-Form von CDK1 ausreichend ist, um die Taxol-abhängige Apoptose zu blockieren (YU et al., 1998). Ein zentraler Aspekt der Taxol-abhängigen Apoptose ist vermutlich die Phosphorylierungs-bedingte Inaktivierung von Bcl-2, die direkt bzw.

indirekt durch die Kinase Raf-1 vermittelt wird (BLAGOSKLONNY et al., 1996). Die Aktivierung von Raf-1 ist eine direkte Folge der Mikrotubuli-Schädigung und kann neben der Phosphorylierung von Bcl-2 auch die Aktivierung von p53 und p21 induzieren (BLAGOSKLONNY et al., 1996; BLAGOSKLONNY et al., 1995). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Taxol konzentrationsabhängig unterschiedliche Effekte vermittelt. Während bereits geringe Dosen Taxol (nM Bereich) einen mitotischen Arrest induzieren, wirkt sich die Behandlung mit höheren Konzentrationen (μ M Bereich) auf die komplette Architektur des Zytoskeletts aus, was mit der Aktivierung von MAP-Kinase-Signalwegen und einer veränderten Expression von Apoptose-relevanten Genen wie *Bax*, *Bak* und *TNF- α* assoziiert sein kann (WANG et al., 1998; LEE et al., 1998).

1.6 Regulatoren der Apoptose

Im Hinblick auf die „tödlichen“ Konsequenzen für die Zelle nach erfolgter Apoptose-Induktion, die nicht zuletzt auf die Irreversibilität der Caspase-vermittelten Substratspaltung zurückzuführen sind, ist es nicht verwunderlich, dass Zellen zusätzliche Mechanismen und Faktoren zur Feinregulation des Apoptoseprozesses besitzen, von denen die wichtigsten im folgenden näher erläutert werden.

1.6.1 Inhibition der Apoptose durch Proteine der IAP-Familie

Neben der bereits beschriebenen Proteinfamilie der Bcl-2-ähnlichen Faktoren, die sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirkende Proteine umfasst (vgl. 1.5.1.1), sind die Mitglieder der „Inhibitor of Apoptosis Protein“ (IAP)-Familie ebenfalls maßgeblich an der Regulation der Apoptose beteiligt. Sie sind in der Lage, Zellen unterschiedlichen Gewebes vor Liganden-induzierter, sowie Chemotherapeutika- und Strahlungs-vermittelter Apoptose zu schützen (DEVERAUX et al., 1997; ROY et al., 1998; TAMM et al., 1998; DUCKETT et al., 1996). Die ersten Vertreter der IAPs wurden in Baculoviren entdeckt, bei denen sie in der Wirtszelle für die Unterdrückung der Apoptose-Antwort als Folge der Virusinfektion verantwortlich sind (CROOK et al., 1993; BIRNBAUM et al., 1994). Darüber hinaus sind Spezies-übergreifend auch zelluläre Mitglieder identifiziert worden, wobei sich alle IAPs durch den Besitz von 1-3 so genannter BIR-Domänen (Baculoviral IAP-Repeat) auszeichnen; einer Zink-bindenden Region, die ca. 70 Aminosäuren umfasst und bei der Mehrheit der IAPs essentiell für die Apoptose-Inhibition ist (WRZESIEN-KUS et al., 2004). Bisher sind acht humane IAP-Proteine nachgewiesen worden, von denen XIAP (X-chromosome-linked IAP), c-IAP1 und c-IAP2 (cellular IAP1/2) sowie NAIP (neural apoptosis inhibitory protein) alle drei BIR-Domänen besitzen, während Survivin und BRUCE (BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme) lediglich die Domäne BIR1 und ML-IAP (Melanoma IAP) und ILP2 (IAP-like protein 2) ausschließlich BIR3 enthalten (SCHIMMER, 2004). Obwohl alle BIR-Domänen-tragenden Proteine per Definition als IAPs angesehen werden, scheinen nicht alle auch wirklich eine anti-apoptotische Funktion zu besitzen, so dass die BIR-enthaltene Proteine BIRCs (BIR containing proteins) von tatsächlichen IAPs unterschieden werden (UREN et al., 1998; MILLER, 1999). Primär unterdrücken IAPs die Apoptose durch eine direkte Caspase-Bindung und -Inhibition. In Säugern sind Caspase-3, -7 und -9 Ziele der IAP-Proteine, wobei XIAP gegenüber allen Caspasen die stärkste Inhibition vermittelt. BIR3 von XIAP ist dabei für die spezifische Inhibition der prozessierten Caspase-9 und die Region zwischen

BIR1 und BIR2 ist für die Interaktion und Inhibierung von Caspase-3 und -7 verantwortlich (RIEDL & SHI, 2004). Überexpressions-Untersuchungen haben darüber hinaus gezeigt, dass XIAP vor Bax- und CD95-vermittelter Apoptose schützt (DEVERAUX et al., 1997). Die Beobachtung, dass eine erhöhte Expression von IAP-Proteinen mit einer verminderten zellulären Apoptose-Bereitschaft verbunden ist spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass Tumore häufig eine abnormal hohe Expression einzelner IAPs aufweisen (TAMM et al., 2000; ADIDA et al., 2000).

Neben der Apoptose-Inhibition sind einige IAPs vermutlich auch an der Zellzyklusregulation beteiligt. So ist Survivin bspw. während Zellproliferation fundamental an der Regulation der Zytokinese beteiligt und auch für XIAP wird eine Rolle innerhalb der Zellzyklusregulation diskutiert (LI et al., 1999; LEVKAU et al. 2001).

1.6.2 Antagonisten der IAP-Proteine

Die IAP-Proteine stehen ihrerseits unter der Kontrolle der beiden mitochondrial-lokalisierten Proteine Smac/DIABLO (second mitochondrial derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI) und HtrA2/Omi (high temperature requirement A). Unter Apoptose-induzierenden Bedingungen werden Smac/DIABLO und HtrA2/Omi zusammen mit Cytochrom *c* nach der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran ins Zytosol entlassen, wobei Smac/DIABLO und HtrA2/Omi, die als Vorläuferproteine mit einer mitochondrialen N-terminalen Signalsequenz synthetisiert werden, prozessiert und in ihre aktive Form überführt werden. Im aktiven Zustand binden und inaktivieren sie IAP-Proteine und wirken daher pro-apoptotisch (VERHAGEN et al., 2000; DU et al., 2000; VERHAGEN et al., 2002; SUZUKI et al., 2001). Mutationsanalysen und Untersuchungen mit synthetischen Peptiden haben gezeigt, dass die inhibitorische Funktion dabei durch die vier N-terminalen Aminosäuren der prozessierten Proteine vermittelt wird (ARNT et al., 2002; LIU et al., 2000), zu denen homologe Sequenzen auch die IAP-Antagonisten Reaper, Hid, Grim und Sickie aus *Drosophila melanogaster* aufweisen (GOYAL et al., 2000). Die Konsensussequenz des hochkonservierten Motivs mit der Abfolge A-(K/T/V/I)-(P/A/E)-(F/E/I/S/Y) wird als IBM (IAP-binding motif) bezeichnet und findet sich darüber hinaus auch in Caspase-9 (SRINIVASULA et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass XIAP über diese Domäne mit Caspase-9 assoziiert und Smac/DIABLO durch kompetitive Bindung von XIAP in der Lage ist, die XIAP-vermittelte Caspase-9-Bindung/-Inhibition aufzuheben (SRINIVASULA et al., 2001). Die XIAP-bedingte Inhibition der Effektorcaspasen -3 und -7 kann durch Smac/DIABLO ebenfalls neutralisiert werden (HUANG et al., 2003; vgl. auch Abb. 1.6).

1.6.3 Faktoren der DAP-Familie

Im Gegensatz zu anderen Proteinfamilien, wie der Bel-2-Familie, umfasst die DAP (Death-assoiated protein)-Familie keine evolutionär-verwandten und homologen Proteine. In ihr werden eine Reihe pro-apoptotisch-wirkender Proteine eingeordnet, die mit Hilfe eines genetischen, auf „antisense“-cDNA-basierendem „Knock-Out-Screening“ identifiziert und mit DAP1 bis DAP5 bezeichnet wurden (DEISS & KIMCHI, 1991; DEISS et al., 1995; KISSIL et al., 1995; LEVY-STRUMPF et al., 1997; KIMCHI, 1998). Lediglich die Proteine DAP2 (auch als DAP-Kinase bezeichnet), DAP3 und DAP5 sind bisher genauer

charakterisiert worden. *DAP3* kodiert für ein 46 kDa Protein, welches drei putative GTP-Bindedomänen besitzt und primär in den Mitochondrien lokalisiert ist (KISSIL et al., 1995; CAVDAR KOC et al., 2001). Es ist sowohl an der Rezeptor-vermittelten Apoptose als auch an der Apoptose-bedingten Fragmentierung der Mitochondrien beteiligt. Im Gegensatz zu Cytochrom *c* wird *DAP3* während der Apoptose allerdings nicht ins Zytosol entlassen (KISSIL et al., 1999; MUKAMEL & KIMCHI, 2004). Darüber hinaus ist *DAP3* an der Apoptose beteiligt, die in Zellen als Folge des Kontaktverlustes zur extrazellulären Matrix induziert wird; ein Prozess der als Anoikis bezeichnet wird (MIYAZAKI et al., 2004). *DAP5* ist ein 97 kDa Protein und homolog zu dem Translations-Initiationsfaktor eIF4G (LEVY-STRUMPF et al., 1997). Das Protein ist zwar an der Translation beteiligt, steuert aber im Gegensatz zu eIF4G, von so genannten IRES (internal Ribosome entry site) Sequenzen ausgehend, ausschließlich die Cap-unabhängige Translation von mRNAs. (LEVY-STRUMPF et al., 1997, HENIS-KORENBLIT et al., 2000). Während der Apoptose ist *DAP5* vermutlich so für die Translation von Apoptose-relevanten Genen verantwortlich, die wie *Apaf-1*, *c-Jun* oder auch *DAP5* selbst IRES Sequenzen in den korrespondierenden mRNAs enthalten (NEVINS et al., 2003).

Neben den DAP-Proteinen gehört auch der Faktor Daxx dieser Familie an. Daxx wird auch als „Death-associated Protein XX“ bezeichnet, wurde aber nicht im Rahmen des „Knock-Out-Screening“ entdeckt, sondern innerhalb eines „Yeast-Two-Hybrid“-Ansatzes als Interaktionspartner von CD95 identifiziert (YANG et al., 1997). Untersuchungen von sowohl Daxx als auch DAP-Kinase (*DAP2*) sind die Kernbestandteile der vorliegenden Arbeit, sodass auf diese beiden Faktoren im Folgenden detaillierter eingegangen wird.

1.6.4 *DAP-Kinase* - ein potentielles Tumorsuppressorgen

DAP-Kinase (*DAPK*, *DAP2*) ist eine ubiquitär-exprimierte, pro-apoptotische Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-Proteinkinase mit einem Molekulargewicht von 160 kDa. Das Protein besitzt eine Multi-Domänenstruktur (vgl. Abb. 1.4) und weist neben der katalytischen Kinase-Domäne eine Ca^{2+} /Calmodulin-regulatorische Domäne, acht Ankyrin-Wiederholungssequenzen und eine Zytoskelett-Bindungsregion auf sowie zwei Nukleotid-bindende, so genannte „P-Loops“ und eine C-terminale DD (COHEN et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass *DAP-Kinase* an einer Vielzahl von Apoptoseprozessen beteiligt ist, wie bspw. ausgelöst durch TNF- α (Tumor Necrosis factor- α), IFN- γ (Interferon- γ), TGF- β (Transforming Growth factor- β), CD95L, Ceramide, den Onkogenen c-Myc und E2F oder durch Kontaktverlust zur extrazellulären Matrix (DEISS et al., 1995; COHEN et al., 1997; INBAL et al., 1997; COHEN et al., 1999; RAVEH et al., 2001; JANG et al., 2002; PELLÉ et al., 2002; YAMAMOTO et al., 2002). Die Zelltod-fördernde Aktivität wird dabei sowohl durch die DD als auch durch die katalytische Kinaseaktivität vermittelt und ist insgesamt von der korrekten Lokalisation des Proteins am Zytoskelett abhängig (COHEN et al., 1997). Im aktiven Zustand ist *DAP-Kinase* in der Lage das Apoptose-typische „membrane blebbing“ zu induzieren, was vermutlich mit der direkten Phosphorylierung des *DAP-Kinase* Substrates MLC (*Myosin Light Chain*) verbunden ist (INBAL et al., 2002; RAVEH & KIMCHI, 2001; KUO et al., 2003). Neben MLC sind in neuronalen Zellen mit Synaptin-1A und der Kinase CaMKK (*Calmodulin regulierte Protein Kinase Kinase*) zwei weitere Substrate der *DAP-Kinase* identifiziert worden, wobei die biologische Relevanz dieser Prozesse zum Teil noch recht unklar ist (SCHUMACHER et al., 2004; TIAN et al., 2003). Aufgrund der verbreiteten Expression des Proteins ist es notwendig, dass die *DAP-Kinase* einer strengen Regulation unterliegt,

so dass sie unter normalen Wachstumsbedingungen im inaktiven Zustand vorliegt (COHEN et al., 1997). Die Kontrolle der pro-apoptotischen Kinase-Aktivität erfolgt dabei molekular vermutlich auf zwei Ebenen: Zum einen wirkt die Calmodulin-bindende Region im Grundzustand inhibitorisch auf die katalytische Domäne und erst die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin hebt diesen Effekt auf (COHEN et al., 1997). Zum anderen wird durch die Autophosphorylierung von Serin³⁰⁸, das innerhalb der Calmodulin-bindende Region liegt, diese Auto-Inhibition weiter verstärkt und zugleich die Affinität zu Calmodulin herabgesetzt (SHOHAT et al., 2001). Bisher ist jedoch noch keine Phosphatase bekannt, die DAP-Kinase *in vivo* durch spezifische Dephosphorylierung an Serin³⁰⁸ aktiviert. Mittels „Yeast-Two-Hybrid“-Untersuchungen wurde allerdings die MAP-Kinase ERK (Extracellular signal-regulated kinase) als direkter Interaktionspartner der DAP-Kinase identifiziert, die in der Lage ist, DAP-Kinase durch Phosphorylierung an Serin⁷³⁵ zu aktivieren.

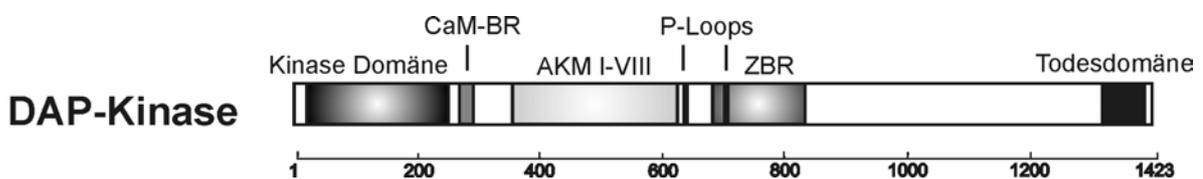


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des DAP-Kinase-Proteins. Die unterschiedlichen Domänen des Proteins sind durch die in Graustufen-unterlegten Kästen symbolisiert. Die untere Skala stellt die Aminosäureabfolge dar. Abkürzungen - Cam-BR: Calmodulin-bindende Region; AKM: Akyrinmotiv; ZBR: Zytoskelett-bindende Region. Verändert nach KIMCHI, 1998.

Die beiden Proteine unterliegen dabei einer wechselseitigen Regulation, indem DAP-Kinase von ERK aktiviert wird und ERK wiederum durch DAP-Kinase aus dem Kern rekrutiert wird, wodurch die ERK-vermittelte Aktivierung von anti-apoptotischen Signalwegen inhibiert wird (CHEN et al., 2005). In neuronalen Zellen ist mit dem Netrin-1 Rezeptor UNC5H2 darüber hinaus ein Protein identifiziert worden, das DAP-Kinase zwar nicht aktiv dephosphoryliert, aber die Auto-phosphorylierung von Serin³⁰⁸ unterdrückt und so die Apoptose-fördernde Wirkung von DAP-Kinase aktiviert (LLAMBI et al., 2005). Neben der pro-apoptotischen Aktivität von DAP-Kinase sprechen einige Daten auch für eine zytoprotektive Funktion des Proteins. So ist die Unterdrückung der DAP-Kinase Expression interessanterweise mit einer erhöhten Rate an Spontanapoptosen verbunden und führt in HeLa- und HASMC-Zellen zu einer Sensitivierung gegenüber TNF- α -induzierter Apoptose (JIN & GALLAGHER, 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass DAP-Kinase in verschiedenen nicht-apoptotischen Geweben, wie dem Kortex und dem Hippocampus auch in der aktiven Form exprimiert vorliegt. Sie ist dort an der Regulation der Exozytose von Neurotransmittern beteiligt, was insgesamt vermuten lässt, dass DAP-Kinase Zelltyp-spezifisch in unterschiedlichen zellulären Prozessen involviert sein kann (YAMAMOTO et al., 1999; SCHUMACHER et al., 2002).

1.6.4.1 Die Rolle von DAP-Kinase in Tumoren

Es existieren diverse Hinweise, die auf DAP-Kinase als potentielles Tumorsuppressorprotein hindeuten. Im Gegensatz zum verbreiteten Expressionsmuster von DAP-Kinase konnte in verschiedenen Tumor-abgeleiteten Zelllinien wider Erwarten keine DAP-Kinase-Expression nachgewiesen werden (KISSIL et al., 1997). Studien zur chromosomalen Lokalisation kartierten das

DAP-Kinase-Gen auf Chromosom 9[q34.1], ein Abschnitt der in leukämischen Erkrankungen häufig einer Gentranslokation unterliegt (DE KLEIN et al., 1982; ELLISEN et al., 1991) und im Harnblasen-Karzinom durch LOH (Loss of Heterozygosity) partiell inaktiviert sein kann (KNOWLES, & CURRIE, 1993). Interessanterweise konnte die Expression in einigen der *DAP-Kinase*-negativen Zelllinien durch Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Aza-2'-Desoxycytidin wiederhergestellt werden, was auf einen DNA-Methylierungs-basierenden Mechanismus zur Inaktivierung der *DAP-Kinase*-Expression hinweist, wie er bereits bei anderen Tumorsuppressorgenen wie z.B. *p16* oder *p15* beobachtet worden ist (KISSIL et al., 1997, NG et al., 1997; WONG et al., 2000). Untersuchungen von Primärtumoren mittels Methylierungs-spezifischer PCR (MSP) bestätigten diesen Befund. So konnte unter anderem im Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (TANG et al., 2000), im Zervixkarzinom (DONG et al., 2001), Magenkarzinom (KANG et al., 2001) und Neoplasien des Hals- und Kopfbereichs (SANCHEZ-CESPEDES et al., 2000) sowie in malignen B- und T-Zell-Erkrankungen (KATZENELLENBOGEN et al., 1999) eine Hypermethylierung des *DAP-Kinase*-Promotors bzw. des 5'-UTR-Bereichs nachgewiesen werden. Beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und den Tumoren des Hals- und Kopfbereichs korrelierte die Hypermethylierung des *DAP-Kinase*-Promotors mit der Tumor-Aggressivität und war mit einer schlechteren Prognose verbunden (TANG et al., 2000; SANCHEZ-CESPEDES et al., 2000). Im Lungenkarzinom war die Hypermethylierung darüber hinaus mit einer Apoptoseresistenz gegenüber TRAIL assoziiert (TANG et al., 2005). Allerdings sind in Tumoren der Hypophyse sowie des Magen und Darmtraktes auch Methylierungs-unabhängige Inaktivierungsmechanismen der *DAP-Kinase*-Expression beobachtet worden (SIMPSON et al., 2002; SATOH et al., 2002).

Untersuchungen an murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) haben gezeigt, dass *DAP-Kinase* bereits an der Unterdrückung der onkogenen Transformation von Zellen beteiligt ist und somit einen frühen Kontrollpunkt zur Vermeidung von entartetem Zellwachstum darstellt. Die Fehlregulation zellulärer Proto-Onkogene wie *c-Myc*, *Ras* oder *E2F* führt dabei zu einer Induktion der *DAP-Kinase*, was wiederum in einer $p14^{\text{ARF}}$ -vermittelten Stabilisierung von p53 resultiert (vgl. Abb. 1.3). Die Induktion der p53-abhängigen Apoptose hat schließlich die Eliminierung der prä-malignen Zelle zur Folge (RAVEH et al., 2001). $P14^{\text{ARF}}$ ist ein direkter Inhibitor von MDM2, dessen Inhibition indirekt die Stabilisierung von p53 fördert (SHERR & WEBER, 2000). *DAP-Kinase* ist daher ein indirekter Aktivator von p53. Eine Inaktivierung der *DAP-Kinase*-Expression ist somit ein selektiver Vorteil potentiell Tumor-bildender Zellen, diesen frühen p53-abhängigen Kontrollpunkt zu überwinden (RAVEH et al., 2001). Ergebnisse aus Untersuchungen am Tiermodell sprechen ebenfalls für eine Beteiligung der *DAP-Kinase* am Prozess der Metastasierung. Der Verlust der *DAP-Kinase*-Expression in murinen Lewis Lungenkarzinom-Zellen konnte bspw. mit einem erhöhten Metastasierungspotential der Zellen korreliert werden. Die transgene Wiederherstellung der *DAP-Kinase*-Expression auf physiologischem Niveau führte sowohl zu einer Reduktion der Metastasenbildung als auch zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums (INBAL et al., 1997). Die Unterdrückung der *DAP-Kinase*-Expression fördert hierbei vermutlich die Anoikis-Resistenz der Tumorzellen, wobei die molekularen Zusammenhänge zwar noch weitgehend unverstanden sind, aber vermutlich p53-unabhängig verlaufen (RAVEH et al., 2001).

1.6.5 Der Apoptose-Regulator Daxx

Daxx (Death-associated Protein XX) wurde erstmals 1997 innerhalb einer „Yeast-Two-Hybrid“-Analyse als Interaktionspartner des CD95-Rezeptors identifiziert (YANG et al., 1997). Es ist ein ubiquitär-exprimiertes Protein, vorwiegend im Kern lokalisiert und an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, wie Apoptose, Regulation der Transkription sowie der Signaltransduktion als Folge von oxidativem und metabolischem Stress (MICHAELSON, 2000; SONG & LEE, 2003; SONG & LEE, 2004). Das *Daxx*-Gen ist auf Chromosom 6[p21.3] lokalisiert, umfasst ca. 3,5 kb und ist in sieben Exons unterteilt (KIRIAKIDOU et al., 1997). Es kodiert für ein aus 740 Aminosäuren bestehendes Protein, wobei Daxx rechnerisch ein Molekulargewicht von 81,4 kDa besitzt, das Protein aber aufgrund seines relativ hohen Anteils an sauren Aminosäuren ein irreguläres elektrophoretisches Migrationsverhalten aufweist und im SDS-Gel mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 120 kDa detektiert wird (YANG et al., 1997; KIRIAKIDOU et al., 1997). Daxx besitzt zwei putative amphipatische Helices-bildende Regionen sowie eine „coiled-coiled“-Region und zwei nukleäre Lokalisationssignalsequenzen (NLS). Außerdem enthält es einen Bereich mit hohem Anteil an Glutamat- und Aspartatresten, diverse potentielle Phosphorylierungsstellen sowie eine Serin/Prolin/Threonin-reiche, regulatorische Domäne im C-Terminus (KIRIAKIDOU et al., 1997; HOLLENBACH et al., 1999; vgl. Abb. 1.5), über die das Protein mit verschiedenen Proteinen interagiert (vgl. Tab. 7.1, Anhang). Mittels dieser Domäne assoziiert Daxx auch an die DD von CD95 (YANG et al., 1997).

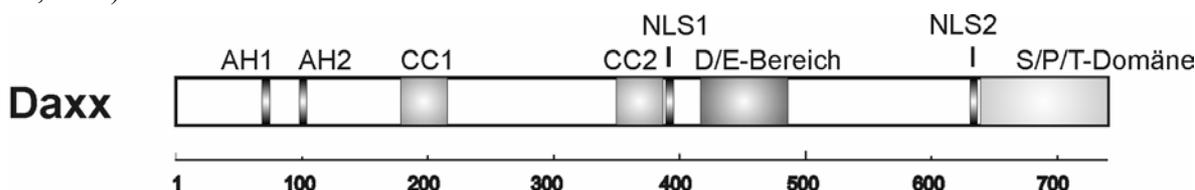


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Daxx-Proteins. Die Bereiche zur Ausbildung von gepaarten amphipatischen Helices (AH; Aminosäuren 67-75 und 95-107), der „Coiled-Coil“ Regionen (CC; Aminosäuren 179-211 und 355-387), des Bereiches mit hohem Anteil an sauren Aminosäuren (D/E; Aminosäuren 435-485), der Serin/Prolin/Threonin-reichen Region (S/P/T; Aminosäuren 625-740) sowie die beiden nukleären Lokalisationssignale (NLS; Aminosäuren 389-394 und 628-634) sind durch die in Graustufen-unterlegten Kästen symbolisiert. Die untere Skala stellt die Aminosäureabfolge dar.

1.6.5.1 Die Funktion von Daxx in der Apoptose

Daxx ist sowohl an der Rezeptor-vermittelten Apoptose (bspw. induziert durch CD95L, TGF- β oder TRAIL) als auch an der intrinsischen, durch Chemotherapeutika-induzierten Apoptose beteiligt (YANG et al., 1997; PERLMAN et al., 2001; BOEHRER et al., 2005). Innerhalb des CD95-Systems bildet Daxx neben der FADD/Caspase-8-Kaskade einen alternativen Signalweg der CD95-abhängigen Apoptose, der mit der Aktivierung der JNK verbunden ist, primär Caspase-unabhängig und, analog zu der CD95-abhängigen Apoptose in Typ II-Zellen, sensitiv gegenüber der Bcl-2-Überexpression ist (YANG et al., 1997). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass er im Vergleich zum FADD/Caspase-8-vermittelten Signalweg zeitlich stark verzögert verläuft (CHARETTE et al., 2000). Daxx fungiert dabei als Adapterprotein zwischen CD95 und ASK1, indem es mit dem C-Terminus (Aminosäuren 625-740) an CD95 bindet und über den intramolekularen Bereich zwischen Aminosäure 501-625 ASK1 in den Komplex rekrutiert. Die dadurch bedingte Konformationsänderung von ASK1 führt zu dessen katalytischen Aktivierung und induziert nachfolgend eine

Phosphorylierungskaskade, die zur Aktivierung von JNK und letztlich in die Apoptose führt (CHANG et al., 1998). Daxx wirkt als Verstärker der CD95-abhängigen Apoptose und ist *per se* nicht in der Lage, Apoptose auszulösen (YANG et al., 1997; TORII et al., 1999). Um mit dem CD95-Rezeptor zu interagieren, ist eine Translokation von Daxx aus dem Kern ins Zytoplasma notwendig, welche unter anderem von ASK1 vermittelt wird (KO et al., 2001). ASK1 und Daxx unterliegen somit einer wechselseitigen Regulation. Es konnte gezeigt werden, dass eine Daxx Deletionsmutante, bestehend aus den 112 C-terminalen Aminosäuren (DaxxC) als dominant-negativ-Form wirkt und sowohl die Daxx-vermittelte ASK1- bzw. JNK-Aktivierung als auch die Daxx-abhängige CD95-Apoptose inhibiert (YANG et al., 1997; CHANG et al., 1998). Auch durch zelluläre Faktoren kann die Funktion von Daxx auf verschiedenen Ebenen inhibiert werden. So blockiert das Hitzeschockprotein HSP27 (Heat shock Protein 27 kDa) die Translokation von Daxx aus dem Kern, wodurch die Daxx-vermittelte CD95-Apoptose unterdrückt wird (CHARETTE et al., 2000). Der Caspase-8-Inhibitor Flip_L ist ebenfalls in der Lage, Daxx zu binden und dadurch die CD95-abhängige Aktivierung der JNK zu supprimieren (KIM et al., 2003). Neben der Aktivierung des JNK-Signalweges durch zytoplasmatisches Daxx scheint auch nukleäres Daxx an der Regulation der Apoptose beteiligt zu sein. Hierbei assoziiert es mit PML (Promyelocytic Leukemia Protein) in den sogenannten PODs (TORII et al., 1999; ZHONG et al., 2000; vgl. 1.6.5.2). PODs (PML-oncogenic Domains), die auch als ND10 (nuclear domain 10) oder NB (nuclear bodies) bezeichnet werden, sind subnukleäre Strukturen, die per Definition PML enthalten und vermutlich eine Art „Protein-Depot“ der Zelle darstellen (NEGOREV & MAUL, 2001; ISHOV et al., 1999). In Abbildung 1.6 sind neben den allgemeinen Apoptose-Signalwegen auch die verschiedenen Signalwege von Daxx schematisch dargestellt.

Aufgrund teilweise widersprüchlicher Beobachtungen wird die Rolle von Daxx als pro-apoptotischer Faktor innerhalb der (CD95-)Apoptose allerdings kontrovers diskutiert. So konnten Torii et al. bspw. keine Interaktion zwischen Daxx und dem CD95-Rezeptor feststellen (TORII et al., 1999) und in vielen Zelltypen konnte keine Beteiligung von Daxx an der CD95-abhängigen Apoptose bzw. JNK-Aktivierung nachgewiesen werden (HOLLENBACH et al., 1999; HOFMANN et al., 2001; VILLUNGER et al., 2000). Auch die Tatsache, dass sowohl FADD-defiziente als auch Caspase-8-defiziente Zellen gegenüber der CD95-abhängigen Apoptose resistent sind, lässt vermuten, dass der Daxx-abhängige Signalweg der CD95-Apoptose eine eher untergeordnete Rolle spielt bzw. Zelltyp-spezifisch ist. (JUO et al., 1998; ZHANG et al., 1998). Die Vorstellung das Daxx auch eine anti-apoptotische Funktion besitzen könnte wird durch den Befund gestützt, dass die siRNA-vermittelte Unterdrückung der endogenen Daxx-Expression mit einer Sensitivierung von Zellen gegenüber verschiedener Apoptosestimuli wie UV-Strahlung, Behandlung mit TNF- α oder CD95-agonistischen Antikörpern verbunden ist und ebenfalls eine Erhöhung der basalen Apoptosehäufigkeit zur Folge hat (CHEN & CHEN, 2003; MICHAELSON & LEDER, 2002). Dies wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass die Daxx-„Knock Out“-Maus embryonal lethal ist und nicht, wie für den Verlust eines pro-apoptotischen Gens zu erwarten wäre, mit einer Hyperproliferations-Störung assoziiert ist (MICHAELSON et al., 1999; ISHOV et al., 2004).

1.6.5.2 Daxx als Regulator der Transkription

Neben der Apoptose ist Daxx auch an der Regulation der Genexpression beteiligt, wobei es entsprechend seiner geringen Homologie mit dem transkriptionellen Ko-Repressor Sin3 aus

Saccharomyces cerevisiae vornehmlich als Repressor der Transkription fungiert (HOLLENBACH et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Daxx direkt mit den Transkriptionsfaktoren Pax3, Pax5 und Pax7, ETS1, Smad4, dem Androgenen Rezeptor (AR), dem Glucocorticoid-Rezeptor (GR), dem Mineralcorticoid-Rezeptor (MR) sowie p53 und p73 interagiert (HOLLENBACH et al., 1999; EMELYANOV et al., 2002; LIN et al., 2003; LI et al., 2000; CHANG et al., 2005; LIN et al., 2004; KIM et al., 2003; ZHAO et al., 2004; GOSTISSA et al., 2004). In den meisten Fällen reprimiert Daxx hierbei deren transkriptionelle Aktivität, vermutlich indem es zunächst mit denen an die DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren interagiert und anschließend HDAC (Histon Deacetylase)-Moleküle rekrutiert, was zur Kondensierung des Chromatins und schließlich zur Inaktivierung der Transkription führt (LI et al., 2000; HOLLENBACH et al., 2002). Die Ergebnisse aus fraktionierten Chromatographieanalysen lassen vermuten, dass Daxx hierbei in einem Multikomponentenkomplex zusammen mit anderen Faktoren assoziiert ist (HOLLENBACH et al., 2002). Tatsächlich konnten neben verschiedenen Histonen mit Dek und ATRX zwei weitere Daxx Interaktionspartner isoliert werden, die an der Regulation der Chromatinstrukturierung und DNA-Topologie beteiligt sind (ISHOV et al., 2004). Neben den Bereichen des kondensierten Chromatins ist Daxx in den so genannten PODs lokalisiert, wo es mit PML assoziiert ist (ISHOV et al., 1999; LI et al., 2000; ZHONG et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass mit SUMO-1 (small ubiquitin-related modifier-1) konjugiertes PML die Transkriptions-reprimierende Funktion von Daxx kontrolliert, indem es Daxx aus den Bereichen kondensierten Chromatins in die PODs rekrutiert, was mit einer Aufhebung der Transkriptions-Repression verbunden ist (LI et al., 2000; LIN et al., 2003; LEHEMBRE et al., 2001). Auf der anderen Seite aktiviert HIPK1 (Homeodomain-interacting Protein kinase 1) die Repressor-Funktion von Daxx, indem es zum einen die Interaktion zwischen Daxx und PML inhibiert und Daxx aus den PODs rekrutiert und zum anderen die Interaktion zwischen Daxx und HDACs fördert (ECSEDY et al., 2003). Des Weiteren scheint die Akkumulation von Daxx in den PODs bzw. an den Heterochromatinbereichen Zellzyklus-abhängig zu sein. So konnte gezeigt werden, dass Daxx vornehmlich in der späten S-Phase am Heterochromatin assoziiert, während es in der G1- und G2-Phase ausschließlich in den PODs lokalisiert ist. Interessanterweise zeigen Daxx-defiziente Zellen eine beschleunigte S-G2/M Transition und weisen zudem vermehrt Doppelkerne auf, was auf eine zentrale Rolle von Daxx innerhalb der Zellzyklusregulation hinweist (ISHOV et al., 2004). Daxx reguliert darüber hinaus die transkriptionelle Aktivität eines essentiellen Faktors der Zellzyklusregulation, p53 (vgl. 1.5.3.1), der zudem an der Regulation der Apoptose beteiligt. Hierdurch besteht eine Verknüpfung der Funktionen von Daxx als Apoptose-relevanter Faktor und Transkriptions-Repressor zu fungieren. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Daxx eine Sensitivierung gegenüber der p53-abhängigen Apoptose vermittelt, indem Daxx selektiv die p53-abhängige Transkription von Zellzyklus-assoziierten Genen reprimiert, während die Transkription der Apoptose-relevanten p53-Zielgene nicht beeinflusst wird (GOSTISSA et al., 2004).

1.6.5.3 Die Rolle von Daxx in malignen Erkrankungen

Es existieren Hinweise, wonach Daxx an der Ausbildung von malignen Erkrankungen beteiligt sein kann. Daxx interagiert bspw. mit PML, welches in der akuten promyelozytischen Form der Leukämie (APL) involviert ist. Zum überwiegenden Teil ist bei APL Erkrankungen das *pml*-Gen aufgrund einer chromosomalen t(15; 17) Translokation an das Gen fusioniert, welches für den Retinsäurerezeptor α

(RAR α) kodiert (LIN et al., 1999). Das resultierende Fusionsprotein PML-RAR α interagiert zwar ebenfalls mit Daxx, kann dessen Repressoraktivität allerdings nicht mehr inhibieren, was wahrscheinlich entscheidend ist für die Ausbildung der APL (LI et al., 2000).

In ähnlicher Weise ist Daxx vermutlich an der Ausbildung des alveolaren Rhabdomyosarkoms beteiligt. Diesem malignen Tumor des Skelettmuskels liegt auch eine chromosomale Translokation zu Grunde, wodurch ein Fusionsprotein aus Pax3 und dem Transkriptionsfaktor FKHR entsteht, welches im Gegensatz zu Pax3, durch Daxx nicht reprimiert werden kann (HOLLENBACH et al., 1999). Die Tatsache, dass Daxx auch die Androgenrezeptor-abhängige Transkription inhibiert und eine siRNA-vermittelte Unterdrückung der endogenen Daxx-Expression in LNCaP-Zellen mit einer vermehrten Expression des Prostata-spezifischen Antigens verbunden ist, deutet darauf hin, dass Daxx möglicherweise auch innerhalb des Prostatakarzinogenese involviert ist (LIN et al., 2004).

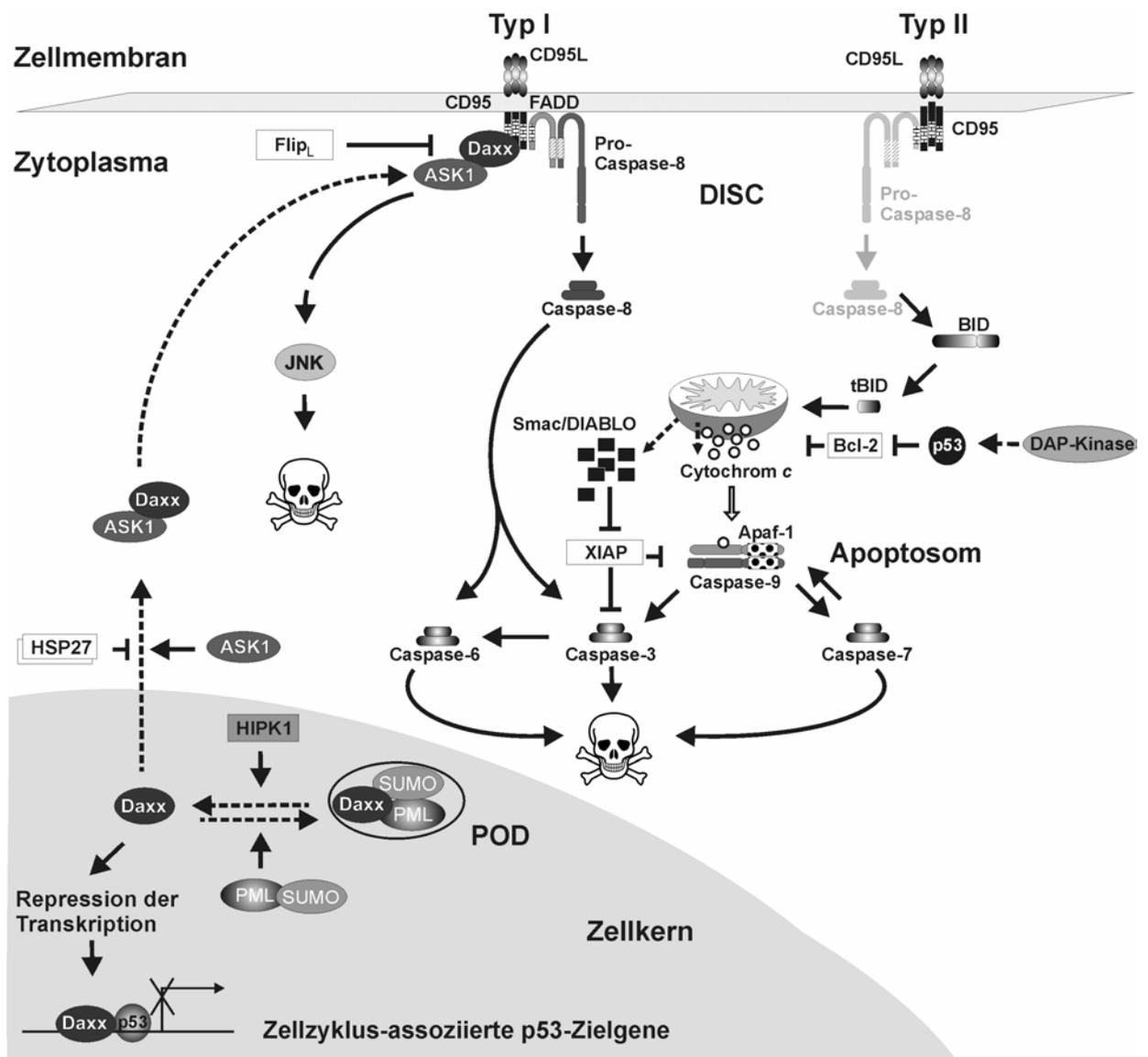


Abb. 1.6: Schematische Darstellung zellulärer Apoptose-Signalwege. (Für Erläuterungen siehe Text).

1.7 Ziel der Arbeit

Apoptose ist ein fundamentaler Prozess innerhalb der Entwicklung und Differenzierung von mehrzelligen Organismen, dessen Fehlregulation eine der Hauptursachen für die Ausbildung von Tumorerkrankungen ist. Hierbei ist die physiologische Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren gestört, indem bspw. eine vermehrte Expression anti-apoptotischer Proteine stattfindet bzw. ein Funktionsverlust von pro-apoptotischen Proteinen vorliegt. Eine niedrige Apoptosefrequenz ist die Folge, was zu unkontrolliertem bzw. entartetem Zellwachstum und somit zur Tumorentstehung beiträgt. Darüber hinaus ist die Dysregulation der Apoptose maßgeblich an der häufig zu beobachtenden Resistenz von Tumoren gegenüber konventionellen Chemo- und Strahlentherapien beteiligt. Eine bessere Kenntnis der molekularen Abläufe der Apoptose ist daher essentiell für die Klärung der Pathogenese von Tumoren und bildet ebenfalls die Basis zur Entwicklung neuer Therapieansätze. Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Bedeutung der pro-apoptotischen Faktoren Daxx und DAP-Kinase für das humane Nierenzellkarzinom, einem Tumor der sich ebenfalls durch eine weitgehende Apoptose- und Therapieresistenz auszeichnet. Die initiale Frage war, ob eine funktionelle Inaktivierung von Daxx und/oder DAP-Kinase im Nierenzellkarzinom vorliegt und damit zu dem gestörten Verhältnis zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren beiträgt. Dabei sollten insbesondere folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

- Im Hinblick auf den häufig zu verzeichnenden Expressionsverlust der DAP-Kinase in anderen Tumorarten, sollte die DAP-Kinase Expression im humanen Nierenzellkarzinom anhand eines statistisch-relevanten Tumorprobenkollektivs analysiert werden.
Da die Expression in anderen Tumorarten überwiegend durch Hypermethylierung des DAP-Kinase Promotors abgeschaltet wird, sollten abhängig von den Ergebnissen aus der Expressionsanalyse weiterführende Untersuchungen zum Mechanismus der DAP-Kinase-Inaktivierung im RCC durchgeführt werden.
- Des Weiteren sollte die DAP-Kinase Expression auch in ruhenden bzw. Mitogen-stimulierten primären, nicht-neoplastischen Lymphozyten untersucht werden, um über die daraus erhaltenen Erkenntnisse Vergleiche bezüglich der DAP-Kinase Expression zwischen entartet-proliferierenden Zellen (Nierenzellkarzinom-Gewebe) und physiologisch-proliferierenden Zellen (nicht-neoplastischen Lymphozyten) anstellen zu können.

Neben der DAP-Kinase-Expression sollte auch die Expression von Daxx im humanen Nierenzellkarzinom analysiert werden. Im Rahmen von Voruntersuchen konnten in Nierenkarzinom-Zelllinien dabei zwei neue Spleißvarianten von Daxx identifiziert werden, sodass anstelle der Daxx-Expression die Rolle des alternativen Spleißens der Daxx-mRNA im humanen Nierenzellkarzinom untersucht werden sollte. Die Frage hierbei war, ob das Spleißen von Daxx möglicherweise einen Mechanismus des Tumors zur funktionellen Inaktivierung des *Daxx*-Gens darstellt. Zur Klärung dieser Fragestellung sollte wie folgt vorgegangen werden:

- Zunächst sollten die in der vorliegenden Arbeit neu identifizierten Daxx-Spleißvarianten im Vergleich zur Hauptform strukturell und funktionell bezüglich ihres CD95- und p53-Apoptose-fördernden bzw. p53-Transkriptions-modulierenden Potentials charakterisiert werden.
- Im Anschluss daran sollten die Auswirkungen der Spleißvarianten-Überexpression auf die CD95- und p53-abhängige Apoptose im humanen Nierenzellkarzinom analysiert werden, um potentielle dominant-negativ-Funktionen der neu identifizierten Daxx-Spleißvarianten als Mechanismus der Daxx-Inaktivierung im humanen Nierenzellkarzinom aufzudecken/untersuchen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Plastikgefäße und Einwegartikel

Plastik- und Einwegartikel wurden von den Firmen Falcon/Becton-Dickinson (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen, LightCycler Glaskapillaren wurden von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

2.1.2 Filmmaterial

Zur Visualisierung von Chemolumineszenz und radioaktiven Signalen wurden „Lumi-Film Chemiluminescent Detection“ Filme (Roche Diagnostics, Mannheim) und Biomax MS Filme von Kodak (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet.

2.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien mit dem Reinheitsgrad *pro Analysis* (p.A.) wurden falls nicht anderweitig gekennzeichnet von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Gibco BRL Life Technologies (Eggenstein) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

2.1.4 Zytostatika und Apoptose-Induktoren/-Inhibitoren

Tab. 2.1.1: Verwendete Zytostatika, Apoptose-Induktoren sowie -Inhibitoren

Substanz	Bezugsquelle	Lösungsmittel	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
CH11	Immunotech, Hamburg	PBS/Glyzerol	500 ng/µl	10-1000 ng/ml
Caspase-8-Inhibitor	R&D Systems GmBH, Wiesbaden	DMSO	20 mM	50 µM
Topotecan (Hycamtin)	Smith Kline Beecham, München	PBS	2 mg/ml	2 ng/ml-2 µg/ml
Etoposid	Sigma, Deisenhofen	DMSO	2,5 mg/ml	0,1-50 µg/ml
Taxol	Bristol-Meyers Squibb GmbH, München	Cremophor	6 mg/ml	0,01-10 µg/ml
Doxorubicin	Sigma, Deisenhofen	PBS	5 mg/ml	0,01-10 µg/ml

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primärantikörper

Die in Tabelle 2.1.2 aufgelisteten Primärantikörper wurden von den Firmen DakoCytomation (Hamburg), Sigma (Deisenhofen), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg), Calbiochem (Schwalbach), Novocastra Laboratories (Newcastle, UK), Novus Biologicals (Littleton, USA), Serotec (Düsseldorf), Cell Signaling (Schwalbach) Upstate/Biomol (Hamburg) sowie Clontech, Transduction Laboratories, und Pharmingen (alle Becton-Dickinson, Heidelberg) bezogen.

Tab. 2.1.2: Liste der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Klon	Isotyp/Spezies	Bezugsquelle	Applikation	Verdünnung
Daxx	36H11	M; IgG2bk	Novocastra	WB	1:500
Daxx		K; IgG	Santa Cruz	IP	1:20
β-Aktin	AC-15	M; IgG1	Sigma,	WB	1:5000
DAP-Kinase	17	M; IgG1	Transduction Laboratories	WB	1:250
DAP-Kinase	H-300	K; IgG	Santa Cruz	IP	1:20
A.v. Monoclonal Antibody (GFP)	JL-8	M; IgG2a	Clontech	WB	1:1000 - 1:2000
Full-Lenght A.v. polyclonal Antibody (GFP)		K	Clontech	IP	1:150
JNK		K; IgG	Santa Cruz	WB	1:1000
				IP	1:20
PARP		K	Cell Signaling	WB	1:500
CD95		K; IgG	Santa Cruz	WB	1:250
CD95-FITC	LOB 3/17	M; IgG1	Serotec	DZ	1:100
Maus-FITC	W3/25	M; IgG1	DakoCytomation	DZ	1:100
HSP27		M; IgG1	Cell Signaling	WB	1:1000
Flip		K; IgG	Upstate	WB	1:750
p53	Ab-6	M; IgG2ak	Calbiochem	IF	1:1000
PML	PG-M3	M; IgG1	Santa Cruz	IF	1:1000
Survivin		K; IgG	Novus Biologicals	WB	1:1000
HA	262K	M; IgG1	Cell Signaling	WB	1:1000
				IP	1:150
Caspase-3	3G2	M; IgG1	Cell Signaling	WB	1:1000
Caspase-6		K	Cell Signaling	WB	1:500
Caspase-7	B-94-1	M; IgG1	Pharmingen	WB	1:500
Caspase-8	1C12	M; IgG1	Cell Signaling	WB	1:1000
Caspase-9		K	Cell Signaling	WB	1:500
Maus		K; IgG	DakoCytomation	IP	1:150

Abkürzungen: WB.: „Western Blot“, IP.: Immunpräzipitation, IF.: Immunfluoreszenz, DZ.: Durchflusszytometrie, K.: Kaninchen, M.: Maus

2.1.5.2 Sekundärantikörper

Die für „Western Blot“-Analysen verwendeten Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper HRP-Anti-Maus (Spezies: Schaf; Isotyp IgG) und HRP-Anti-Kaninchen (Spezies: Esel; Isotyp IgG) wurden von Amersham Life Technologies (Freiburg) bezogen und 1:5000 (HRP-Anti-Maus) bzw. 1:3000 (HRP-Anti-Kaninchen) eingesetzt. Der für die Immunfluoreszenz verwendete TRITC-gekoppelte Anti-Maus Antikörper (Spezies Ziege) wurde von der Firma Beckman Coulter GmbH (Krefeld) bezogen.

2.1.6 Plasmide

In Tabelle 2.1.3 sind sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet, wobei die Konstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden mit Kombinationen aus den unter 2.2.2 beschriebenen Methoden generiert bzw. verifiziert wurden. Eine detaillierte Beschreibung der entsprechenden Klonierungsstrategie ist im Anhang dargestellt.

Tab. 2.1.3: Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid	Resistenz	Beschreibung	Referenz
pLEGFP-C1	Amp ^R , Neo ^R	Retroviraler Expressionsvektor zur Generierung von <i>GFP</i> -Genfusionen.	Clontech, (Becton-Dickinson, Heidelberg)
pDSRed2-C1	Kan ^R , Neo ^R	Expressionsvektor zur Generierung von <i>DSRed2</i> -Genfusionen.	Clontech, (Becton-Dickinson, Heidelberg)
pEGFP-Daxx	Kan ^R , Neo ^R	Fehlerhafter Daxx-Expressionsvektor mit Stop-Kodon zwischen <i>GFP</i> und <i>Daxx</i> .	Freundlicherweise bereitgestellt von Frau Dr. Marion Déjosez
pLEGFP-Daxx- α	Amp ^R , Neo ^R	<i>Sall</i> / <i>Cla</i> I Klonierung von <i>Daxx-α</i> in pLEGFP-C1 zur Herstellung einer <i>GFP</i> -Fusion.	Diese Arbeit
pLEGFP-Daxx- β	Amp ^R , Neo ^R	<i>Sall</i> / <i>Cla</i> I Klonierung von <i>Daxx-β</i> in pLEGFP-C1 zur Herstellung einer <i>GFP</i> -Fusion.	Diese Arbeit
pLEGFP-Daxx- γ	Amp ^R , Neo ^R	<i>Sall</i> / <i>Cla</i> I Klonierung von <i>Daxx-γ</i> in pLEGFP-C1 zur Herstellung einer <i>GFP</i> -Fusion.	Diese Arbeit
pLDSRed2-Daxx- α	Amp ^R , Neo ^R	pLEGFP-Daxx- α : Austausch von <i>GFP</i> gegen <i>DSRed2</i> (Quelle: pDSRed2-C1) über <i>Agel</i> / <i>Xho</i> I Klonierung.	Diese Arbeit
pLDSRed2-Daxx- β	Amp ^R , Neo ^R	pLDSRed2-Daxx- α : Austausch von <i>Daxx-α</i> gegen <i>Daxx-β</i> über <i>Sall</i> / <i>Cla</i> I Klonierung.	Diese Arbeit
pLDSRed2-Daxx- γ	Amp ^R , Neo ^R	pLDSRed2-Daxx- α : Austausch von <i>Daxx-α</i> gegen <i>Daxx-γ</i> über <i>Sall</i> / <i>Cla</i> I Klonierung.	Diese Arbeit
pLHA-C1	Amp ^R , Neo ^R	Insertion einer <i>Xho</i> I bzw. <i>Sall</i> -Schnittstellen-flankierenden und <i>Agel</i> -Schnittstelle-beinhaltenden HA-Tag-Expressionskassette in pLEGFP-C1. Anschließend Entfernung von <i>GFP</i> durch <i>Agel</i> -Restriktion und Religation des Vektors.	Diese Arbeit
pLHA-Daxx- α	Amp ^R , Neo ^R	<i>Sall</i> / <i>Cla</i> I Klonierung von <i>Daxx-α</i> in pLHA-C1 zur Herstellung einer HA-Tag-Fusion.	Diese Arbeit
pLHA-Daxx- β	Amp ^R , Neo ^R	<i>Sall</i> / <i>Cla</i> I Klonierung von <i>Daxx-β</i> in pLHA-C1 zur Herstellung einer HA-Tag-Fusion.	Diese Arbeit
pLHA-Daxx- γ	Amp ^R , Neo ^R	<i>Sall</i> / <i>Cla</i> I Klonierung von <i>Daxx-γ</i> in pLHA-C1 zur Herstellung einer HA-Tag-Fusion.	Diese Arbeit
pcDNA3-HA-ASK1	Amp ^R , Neo ^R	Expressionsvektor für HA-Tag-fusioniertes ASK1.	Freundlicherweise bereitgestellt von Herrn Dr. Jacques Landry
pcDNA3-HA-ASK1KM	Amp ^R , Neo ^R	Expressionsvektor für die HA-Tag-fusionierte ASK1 Mutante (K709M). Der Aminosäureaustausch führt zu einem Verlust der Kinaseaktivität.	Freundlicherweise bereitgestellt von Herrn Dr. Jacques Landry
pEBFP-PML	Kan ^R , Neo ^R	Expressionsvektor für BFP-fusioniertes PML.	Freundlicherweise bereitgestellt von Herrn Dr. Pier Paolo Pandolfi
pKEX-Apo-1	Amp ^R	Expressionsvektor für CD95.	Freundlicherweise bereitgestellt von Herrn Dr. Ingo Schmitz
pcDNA-p53-GFP	Amp ^R	Expressionsvektor für GFP-fusioniertes p53.	Freundlicherweise bereitgestellt von Frau Inka Seil
pEYFP-p53	Kan ^R , Neo ^R	Expressionsvektor für YFP-fusioniertes p53.	Freundlicherweise bereitgestellt von Herrn Dr. Frank Essmann
pRL-EF-1a	Amp ^R	Expressionsvektor für die <i>Renilla</i> -Luciferase. Die Expression steht unter der Kontrolle eines EF-1a-Promotors.	Freundlicherweise bereitgestellt von Herrn Jörg Liebmann
p53-Luc	Amp ^R	Expressionsvektor für die <i>Firefly</i> -Luciferase. Die Expression steht unter der Kontrolle eines p53-responsiven Promotors.	Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA)
pEGFP-Survivin	Kan ^R , Neo ^R	Expressionsvektor für GFP-fusioniertes Survivin.	Freundlicherweise bereitgestellt von Herrn Dr. Michael Wenzel

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Primer), die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, sind in der nachfolgenden Tabelle 2.1.4 aufgeführt. Die jeweilige Sequenz ist in 5'→3'-Richtung angegeben, wobei (degenerierte) Basen zum Einführen von Restriktionsschnittstellen hervorgehoben sind. Die Primersequenzen für die MSP-Analyse (gekennzeichnet durch *) sind entnommen von KATZENELLENBOGEN et al. (1999). Sämtliche Primer wurden von MWG (Ebersberg), TIB MOLBIOL (Berlin) oder Carl Roth (Karlsruhe) hergestellt.

Tab. 2.1.4: Zusammenstellung der eingesetzten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Gen (NCBI-Nr.)	Applikation
DAP-up1	TGA CCA CGG ACG GAA AGA C	<i>DAP-Kinase</i> (X76104)	LightCycler-PCR
DAP-do	TGC GGC TCC TCA CAC TCA		LightCycler-PCR
DAP-KinaseLOWER	GGG TCG GGG CCA CAA ACA C		RT-PCR
DAP-KinaseUPPER	TGC GGC CAA CGG AAT C		RT-PCR
DAP-Kinase-M-F *	GGA TAG TCG GAT CGA GTT AAC GTC		MSP
DAP-Kinase-M-R *	CCC TCC CAA ACG CCG A		MSP
DAP-Kinase-UM-F *	GGA GGA TAG TTG GAT TGA GTT AAT GTT		MSP
DAP-Kinase-UM-R *	CAA ATC CCT CCC AAA CAC CAA		MSP
Daxx up1	CTT CCT TCA ATG GAG GCG T	<i>Daxx</i> (AF015956)	LightCycler-PCR
Daxx do1	CCG AGG AGG CTG TGA ATG		LightCycler-PCR
Daxx-Sall	ACT TCC TCC GTC GAC GGG ATT GGA TCC C		Klonierungs-PCR
Daxx-outer3	TCC GGT GGA TCG ATG CAG CTA ATC AG		Klonierungs-PCR
Daxx-β1	ATG TGG AAA GGC AAA GCC CGG CTG TCC CAA AC		Klonierungs-PCR
Daxx-β2	GTT TGG GAC AGC CGG GCT TTG CCT TTC CAC AT		Klonierungs-PCR
Daxx-γ1	GGC CAT TAG GAA ACA GCC CGG CTG TCC CAA AC		Klonierungs-PCR
Daxx-γ2	GTT TGG GAC AGC CGG GCT GTT TCC TAA TGG CC		Klonierungs-PCR
Daxx S	ACC GCT AAC AGC ATC GTG		DNA-Sequenzierung
Daxx S1	GTG GTC CCA TTC CTC TAT AA		DNA-Sequenzierung
Daxx S2	AAA CAC TGC CTC TCA GTC TC		DNA-Sequenzierung
Daxx S3	CCT GAT ACC TTC CCT GAC TA		DNA-Sequenzierung
Daxx S4	GTC GCA AGA CAA AAG TGA GG		DNA-Sequenzierung
Daxx S5	AGG ATG ATG AAG AGG AGG AC		DNA-Sequenzierung
Daxx S6	CCT GTG TCT CAG CTC TTT		DNA-Sequenzierung
Daxx AS	TCA TTG ATG TAG ACA TAG AG		DNA-Sequenzierung
GAPDH se	AAC AGC GAC ACC CAC TCC TC	<i>GAPDH</i> (J04038)	LightCycler-PCR
GAPDH as	GGA GGG GAG ATT CAG TGT GGT		LightCycler-PCR
GAPDH Fw	ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC G		RT-PCR
GAPDH Rv	CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG		RT-PCR
p21-up	GAG GCC CGT GAG CGA TGG A	<i>p21</i> (NM 000389)	RT-PCR
p21-do	CAG CCG GCG TTT GGA GTG G		RT-PCR
Bax-up	GCG GGA GCG GCG GTG ATG	<i>Bax</i> (AY893312)	RT-PCR
Bax-do	CGG CCC CAG TTG AAG TTG C		RT-PCR
GADD45-up	AAG GGG CTG AGT GAG TTC AA	<i>GADD45</i> (M60974)	RT-PCR
GADD45-do	TTT TCC TTC CTG CAT GGT TC		RT-PCR
CD95-up	TCA AGG AATGCA CAC	<i>CD95</i> (NM 000043)	RT-PCR
CD95-do	CAT TGA CAC CAT TCT TTC GAA CAA AG		RT-PCR
HA-III	GAT CTA CCG GTC GCC ACC ATG GCT TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCG G		Konstruktion eine Oligonukleotid-Kassette
HA-IV	TCG ACC GCG TAA TCT GGA ACA TCG TAT GGG TAA GCC ATG GTG GCG ACC GGT A		Konstruktion eine Oligonukleotid Kassette
GFP-C	CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT G	<i>GFP</i> (U55763)	DNA-Sequenzierung
DSRed2	AAC GAG GAC TAC ACC ATC GTG	<i>DSRed2</i>	DNA-Sequenzierung

2.1.8 Bakterienstämme

In Tabelle 2.1.5 sind die Genotypen der verwendeten Bakterienstämme zusammengestellt. Alle Stämme wurden zur Klonierung von Plasmiden benötigt, wobei der Stamm GM2163 insbesondere zur Klonierung Methylierungs-freier Plasmid-DNA eingesetzt wurde.

Tab. 2.1.5: Verwendete *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
DH5α	F ⁻ , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>phoA</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻ <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169	HANAHA (1983)
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ZΔM15Tn10(Tet ^R)]	BULLOCK et al. (1987)
GM2163	F ⁻ , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>fhuA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx78</i> , <i>glnV44</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>mcrA</i> , <i>dcm-6</i> , <i>hisG4</i> , <i>rfdB1</i> , <i>rpsL136</i> , <i>dam13::Tn9</i> , <i>xylA5</i> , <i>mtf-1</i> , <i>thi-1</i> , <i>mcrB1</i> , <i>hsdR2</i>	WOODCOCK (1989)

2.1.9 Humane Zelllinien

2.1.9.1 Nierenkarzinom-Zelllinien

Grundlage für einen Teil der Versuche waren verschiedene Nierenkarzinom-Zelllinien, die aus Primärtumoren der Niere isoliert wurden und nach THOENES et al. (1986) dem klarzelligen (clearCa), dem chromophil/papillären (chromophil) oder dem chromophoben (chromophob) histologischen Subtyp des Nierenzellkarzinoms zugeordnet wurden (GERHARZ et al., 1994; GERHARZ et al., 1995; GERHARZ et al., 1996).

2.1.9.2 Sonstige Zelllinien

Tab. 2.1.6: Sonstige verwendete Zelllinien

Zelllinie	Gewebetyp	Referenz
HeLa	Zervixkarzinom	JONES et al., 1971
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom	KNOWLES et al., 1980
HEK293	Embryonale Niere	GRAHAM et al., 1977
Raji	Burkitt-Lymphom	PULVERTAFT, 1964

2.1.10 Nierenzellkarzinom-Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden RNA-Proben von 72 Nierenzellkarzinomen verwendet (vgl. Tab.3.1.1). Histologischer Subtyp, Differenzierungsgrad und Tumorstadium der Tumorproben wurden nach den Vorschriften der WHO (MOSTOFI & DAVIS, 1998; THOENES et al., 1986) und der UICC bestimmt (SOBIN & WITTEKIND, 1997). Von zehn Tumorproben wurden ebenfalls RNA-Proben des korrespondierenden nicht-neoplastischen Nierentubulsepithelgewebes verwendet.

2.1.11 Software und Server

Tab. 2.1.7: Übersicht der verwendeten Software und Server

Software

Lasergene DNASTar, Version 4.03
 SPSS Software, Version 9.0.1
 Roche LightCycler Software, Version 3.5
 Ryttest Tina20 Densitometrie Software, Version 2.09g
 Applied Imaging International Ltd. CytoVision 3.1
 Zeiss LSM Image Browser Version 3.5.0.376
 Diagnostic Instruments SpotAdvanced, Version 3.5
 Joseph Trotter WinMDI, Version 2.8

Server

Adresse

BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
ClustlW	http://www.ebi.ac.uk/clustalw
Boxshade	http://www.ch.embnet.org/software/Box_form/html
ExpASy Molecular Biology Server	http://www.expasy.ch/tools
PSORT II Prediction	http://www.psort.ims.u-tokyo.ac.jp
PROSCAN (PROSITEScan)	http://www.npsa-pbil.ibcp.fr
NetGene2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Nährmedien

Folgende Nährmedien wurden in dieser Arbeit eingesetzt:

LB-Medium (LB):	1% (w/v) 0,5% (w/v) 1% (w/v)	Trypton oder Pepton Hefeextrakt NaCl	YT-Medium (YT):	0,8% (w/v) 0,5% (w/v) 0,25%(w/v)	Trypton oder Pepton Hefeextrakt NaCl
YT/Agar:	1,5% (w/v)	Agar gelöst in YT			

Alle Medien wurden entweder sterilfiltriert oder 30 min bei 120°C autoklaviert.

Um geeignete Selektionsbedingungen herzustellen, mussten den abgekühlten Medien entsprechende Antibiotika in den in Tabelle 2.2.1 beschriebenen Endkonzentrationen zugegeben werden, wobei alle Antibiotika vor Gebrauch sterilfiltriert wurden.

Tab. 2.2.1: Konzentrationen verwendeter Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	50 mg/ml gelöst in 50% Ethanol	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml gelöst in H ₂ O	50 µg/ml

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung der RNA aus eukaryotischen Zellen wurde mit Hilfe des „RNeasy mini Kit“ nach den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) durchgeführt, wobei die RNA mit RNase-freiem DEPC-H₂O eluiert wurde. Anschließend wurde die Konzentration photometrisch bestimmt (2.2.2.5) und die RNA daraufhin direkt weiter verarbeitet oder bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v)	DEPC gelöst in H ₂ O
-----------------------	------------	---------------------------------

2.2.2.2 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Genomische DNA wurde mit Hilfe des „QIAamp DNA mini kits“ nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) isoliert und diente als „Template“ für die PCR (2.2.2.7) oder wurde nach einer chemischen Umwandlung durch Behandlung mit Natrium-Bisulfit (2.2.2.7.4.1) in PCR-Reaktionen zum Nachweis von methylierten DNA-Abschnitten eingesetzt (2.2.1.7.4.2).

2.2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmide wurden aus *E. coli*-Zellen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert (BIRNBOIM & DOLY, 1979). Diese Methode nutzt die unterschiedlichen Präzipitationseigenschaften von Plasmid-

DNA, chromosomaler DNA, RNA und Proteinen im Bakterienlysat aus (SAMBROOK et al., 1989). In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Präparationsansätze angewendet: die „Minipräparation“, „Spinpräparation“ und „Maxipräparation“.

2.2.2.3.1 „Minipräparation“

1,5 ml einer 3 ml-Übernachtskultur (YT + Antibiotikumzusatz) wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und 3 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und resuspendiert. Es wurden 200 µl Lysepuffer zupipettiert, der Ansatz durch mehrmaliges Schwenken gemischt und 3 min bei RT zur vollständigen Lyse der Zellen stehengelassen. Danach wurde 200 µl (eisgekühlter) Neutralisationspuffer zugegeben, der Ansatz wiederum durch Schwenken gemischt und bei 20000 x g und 4°C 20 min lang zentrifugiert. Der Überstand (etwa 600 µl) wurde zu 450 µl Isopropanol p.A. in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und die Plasmid-DNA 10 min auf Eis gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation (20 min bei 20000 x g und 4°C) wurde zur Entfernung von Salzresten mit 300 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, die Plasmid-DNA 5 min nach den oben genannten Bedingungen sedimentiert und getrocknet. Im Anschluß daran wurde die Plasmid-DNA in 40 µl 10 mM Tris/HCl; pH 8,5 oder H₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Derart isolierte Plasmid-DNA war unter anderem noch mit bakterieller RNA kontaminiert, konnte jedoch für Transformationen oder nach Zugabe von RNase (0,1 mg/ml) für Restriktionsanalysen verwendet werden.

Resuspensions- puffer:	50 mM 50 mM 10 mM	Tris/HCl; pH 8,0 Glukose EDTA	Lysepuffer:	1% (w/v) 0,2% (w/v)	SDS NaOH
Neutralisations- puffer:	3 M	Kaliumacetat/ Essigsäure; pH 4,8			

2.2.2.3.2 „Mini-Spin-Präparation“

Diese Form der Plasmidisolierung erfolgte mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) mit der Abwandlung, dass 8 ml Übernachtskulturen verarbeitet wurden. So präparierte DNA war im Allgemeinen kontaminationsfrei und wurde zum einen für Restriktionen oder Modifikationen in Vorbereitung von Ligationen und zum anderen für DNA-Sequenzanalysen eingesetzt. Von allen Bakterienkulturen wurden jeweils 900 µl mit 300 µl Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.2.2.3.3 „Maxi-Präparation“

Für Anwendungen, bei denen größere Mengen an Plasmid-DNA nötig waren, wie z.B. der Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen (2.2.3.5), wurden „Maxi Präparationen“ mit Hilfe des „QIAMaxipräp Kits“ durchgeführt. Hierbei wurde nach den Vorgaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) verfahren mit der Abwandlung, dass für so genannte „high copy“ Plasmide eine Bakterienkultur von 100 ml und für „low copy“ Plasmide sowie allen retroviralen Expressionsvektoren eine 250 ml Bakterienkultur verarbeitet wurde.

2.2.2.4 Fällung von DNA und RNA

Nach Zugabe von 0,1fachem Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und dreifachem Volumen Ethanol p.A. (100%) wurde die DNA bzw. RNA 15 min bei -20°C gefällt und anschließend durch Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge für 10 min bei 20000 x g und 4°C sedimentiert. Zur Entfernung von Salzresten wurde der Niederschlag mit 70%-igem Ethanol p. A. gewaschen, 5 min wie oben zentrifugiert und getrocknet. Danach wurde die DNA in EB-Puffer oder H₂O und die RNA in DEPC-H₂O aufgenommen und bei -20°C bzw. längerfristig bei -80°C gelagert.

Puffer EB: 10 mM Tris/HCl; pH 8,5

2.2.2.5 Photometrische Bestimmungen von RNA- und DNA-Konzentrationen

Die Konzentrationen von RNA- und DNA-Lösungen wurden durch Absorptionsmessungen an einem Bio Photometer von Eppendorf (Hamburg) bei einer Wellenlänge (λ) von 260 nm photometrisch ermittelt, wobei eine Absorption von 1.0 bei 260 nm einer Konzentration von 50 μ g doppelsträngiger DNA/ml und 40 μ g einzelsträngiger RNA/ml entspricht (SAMBROOK et al., 1989). Eventuelle Verunreinigungen durch Proteine ließen sich durch zusätzliche Messungen bei 280 nm (Absorption aromatischer Aminosäuren) nachweisen.

2.2.2.6 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Für die Durchführung von PCR-Reaktionen auf poly (A⁺)-RNA musste zunächst der komplementäre DNA-Strang synthetisiert werden. Zur Reversen Transkription wurde nach folgendem Pipettierschema vorgegangen.

Pipettierschema:	1-5 μ g	Gesamt-RNA
	1 μ g	Hexanukleotid-Gemisch
	1 mM	dNTP-Mix
	0,5 U	RNasin (Ribonuclease Inhibitor)
	5 mM	MgCl ₂
	5 μ l	Reverse Transkriptase Puffer (10fach konzentriert))
	15 U	AMV Reverse Transkriptase
	ad 20 μ l	H ₂ O

Die Synthese von cDNA durch die Verlängerung von Hexanukleotid-Primern gewährleistet, dass auch längere mRNA Moleküle vollständig in cDNA transkribiert werden. Der dNTP-Mix enthält gleiche Konzentrationen an dATP, dCTP, dGTP und dTTP von jeweils 250 μ M (Promega, Mannheim). Er ist notwendig für die Verlängerung der Primer. RNasin (Promega, Mannheim) diene vorbeugend zur Inhibition eventuell im Reaktionsansatz befindlicher RNAsen. Als Reverse Transkriptase wurde die *Avian Myeloblastosis Virus* Reverse Transkriptase (AMV) eingesetzt. MgCl₂ diene als Kofaktor für die AMV und der PCR-Puffer (Promega) zur Optimierung der Reaktionsbedingungen der Transkriptase. Die Reverse Transkription von wurde nach folgendem Standardprogramm durchgeführt.

Standardprogramm:	1.	55°C	60 min	Primerverlängerung („Extension“)
		↓		
	2.	95°C	5 min	Denaturierung der AMV
		↓		
	3.	4°C	> 0 min	Kühlung nach Beendigung der Reaktion

Da die AMV bei Temperaturen bis zu 58°C noch aktiv ist, war eine Extension bei 55°C möglich, was den Grad an Sekundärstrukturbildung der RNA minimiert, sodass auf einen initialen Denaturierungsschritt verzichtet werden konnte. Aufgrund limitierten Probenmaterials wurde die resultierende cDNA unter Umständen 1:5 verdünnt.

2.2.2.7 Verwendete PCR-Techniken

Verschiedene PCR-Techniken wurden in dieser Arbeit verwendet, um cDNA, genomische oder plasmidäre DNA zu verstärken (amplifizieren), definierte DNA-Bereiche zu sequenzieren, oder Fusionen von DNA-Fragmenten zu konstruieren. Des Weiteren wurde die Methylierungs-spezifische PCR (MSP) zur Untersuchung des *DAP-kinase*-Promotorbereichs eingesetzt und ein „Real-Time-PCR-Assay“ für die semiquantitative Analyse der *DAP-Kinase*-Expression entwickelt. Alle konventionellen PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe eines Personal Cyclers von Biometra (Göttingen) oder eines Gene Amp PCR Systems 2400 von Perkin Elmer Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt und alle „Real-Time-PCR“-Reaktionen wurde mit Hilfe des LightCyclers (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt.

2.2.2.7.1 Amplifikation von Gensequenzen aus genomischer oder plasmidärer DNA

Zur Amplifikation von Gensequenzen aus genomischer oder plasmidärer DNA wurde nach folgendem Pipettierschema vorgegangen.

Pipettierschema:	50-300 ng	genomische oder plasmidäre DNA
	10-50 pmol	Primer 1 („sense“)
	10-50 pmol	Primer 2 („antisense“)
	200 µM	dNTP-Mix
	0-5 mM	MgSO ₄ , bzw. MgCl ₂
	5 µl	PCR-Puffer (10fach konzentriert)
	1-5 U	<i>Taq</i> -oder <i>Pfu</i> -Polymerase
	ad 50 µl	H ₂ O

Primer 1 bzw. 2 definieren die jeweilige Zielsequenz der genomischen oder plasmidären DNA. Der dNTP-Mix enthält gleiche Konzentrationen an dATP, dCTP, dGTP und dTTP von jeweils 25 µM, MgSO₄ bzw. MgCl₂ dienen als Kosubstrat und der PCR-Puffer (Qiagen bzw. Promega) zur Optimierung der Reaktionsbedingungen. Als DNA-Polymerase wurde die *Taq*-Polymerase (Qiagen) verwendet mit Ausnahme von PCR-Reaktionen, deren Produkte kloniert werden sollten; hier wurde die *Pfu*-Polymerase (Promega) eingesetzt, da sie ein bifunktionales Enzym ist und sowohl eine 5'→3'-DNA-Polymeraseaktivität als auch eine 3'→5'-Exonuklease-Proofreading-Aktivität besitzt. Letztere steigert die Präzision der DNA-Synthese, indem sie am 3'-Ende falsch angeheftete und gepaarte Nukleotide entfernt und stattdessen korrekt gepaarte einfügt (LUNDBERG et al., 1991), wodurch sie eine etwa zwölfmal höhere Genauigkeit als die *Taq*-Polymerase aufweist (NEWTON & GRAHAM, 1994). Die variabel gewählten Temperaturen für die Primerbindung berücksichtigen die unterschiedlichen Schmelztemperaturen (T_m) der jeweiligen Primer zur Anlagerung an spezifische Zielsequenzen. Dabei gilt generell, dass die Temperatur des „Annealing“ niedriger gewählt werden muss als T_m . Mit folgender Formel kann T_m berechnet werden (nach NEWTON & GRAHAM, 1994):

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\text{GC-Gehalt in } \%) - 675/\text{Primerlänge}$$

Die Amplifikationen von Gensequenzen aus genomischer oder plasmidärer DNA wurden nach folgendem Standardprogramm durchgeführt.

Standardprogramm:	1.	95°C	5 min	Prädenaturierung
		↓		
	2.	95°C	1 min	Denaturierung
		↓		
	3.	45°C- 72°C	30 s- 1 min	Primerbindung („Annealing“)
	↓			
	4.	72°C	1 min/ 500 bp	Primerverlängerung („Extension“)
		↓		
	5.	4°C	> 0 min	Kühlung nach Beendigung der Reaktion

35
Amplifikations-
zyklen



Die Temperatur der Primerverlängerung („Extension“) von 72°C entspricht etwa dem Aktivitätsoptimum der hier verwendeten Polymerasen (HOGREFE et al., 2001).

2.2.2.7.2 Amplifikation von Gensequenzen aus cDNA (RT-PCR)

Untersuchungen zur Genexpression wurden sowohl durch konventionelle PCR-Reaktionen als auch durch semiquantitative „Real-Time-PCR“ durchgeführt, in denen cDNA als „Template“ diente. Zur konventionellen Amplifikation von Gensequenzen aus cDNA wurde nach folgendem Pipettierschema vorgegangen.

Pipettierschema:	4-5 µl	cDNA-Synthese Reaktionsansatz
	10-50 pmol	Primer 1 („sense“)
	10-50 pmol	Primer 2 („antisense“)
	200 µM	dNTP-Mix
	0-5 mM	MgCl ₂
	5 µl	PCR-Puffer (10fach konzentriert)
	1-5 U	Taq-Polymerase
	ad 50 µl	H ₂ O

Das verwendete Programm entspricht dem in 2.2.2.7.1 beschriebenen, wobei die Zahl der Amplifikationszyklen mit 25 bis 37 Zyklen der jeweiligen PCR-Dynamik nach variiert wurde, um nicht in den Sättigungsbereich der PCR-Reaktion zu gelangen.

2.2.2.7.3 Semi-quantitative „Real-Time-PCR“

Zur semi-quantitativen Analyse der *DAP-Kinase*-Genexpression wurde ein „Real-Time-PCR-Assay“ für den LightCycler (Roche Diagnostics) entwickelt. Im Gegensatz zur Endpunktanalyse konventioneller PCR-Reaktionen ermöglicht die „Real-Time“-Messung eine kinetische Quantifizierung, wodurch eine Analyse in der logarithmisch-linearen Phase der PCR bei konstanter Amplifikationseffizienz möglich ist (Technical Note No. LC 13/2001, Roche Applied Science). Zur Normalisierung der *DAP-Kinase*-Expression wurde das Haushaltsgen *Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)* als Referenz separat amplifiziert. Alle PCR-Reaktionen wurden mit Hilfe des „FastStart DNA Master SYBR Green I“ Kits (Roche Diagnostics) durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I interkaliert dabei während der PCR-Reaktionen Sequenz-unspezifisch in die neu synthetisierten doppelsträngigen DNA-Moleküle, was eine Zunahme der SYBR Green I-emittierten Fluoreszenz bei 520 nm zur Folge hat. Da die Einlagerung des Farbstoffes proportional zur DNA-Menge ist, stellt die Fluoreszenz ein Maß für die DNA-Menge dar.

Zur semiquantitativen „Real-Time“-Amplifikation von *DAP-Kinase*- und *GAPDH*-Gensequenzen aus cDNA wurde nach folgendem Pipettierschema vorgegangen.

Pipettierschema:	4 μ l	cDNA-Synthese Reaktionsansatz
	0,5 μ M	Primer 1 („sense“)
	0,5 μ M	Primer 2 („antisense“)
	3 mM	MgCl ₂
	2 μ l	FastStart Reaktions Mix (10fach konzentriert)
	0,5 U	Uracil-N-DNA-Glykosylase (thermolabil)
	ad 20 μ l	H ₂ O

Der FastStart Reaktions-Mix enthält neben dem SYBR Green I-Farbstoff den dNTP-Mix mit dUTP anstelle von dTTP, den 10fach konzentrierten PCR-Puffer und die *Taq*-Polymerase. MgCl₂ diene als Kofaktor der Polymerase. Die Zugabe der thermolabilen Uracil-N-DNA-Glykosylase ermöglichte den selektiven enzymatischen Verdau potentiell kontaminierender dUTP-haltiger Amplifikate früherer PCR-Reaktionen während eines initialen Inkubationsschrittes bei 30°C für 20 min. Direkt nach Beendigung der PCR erfolgte eine Schmelzpunktanalyse der generierten PCR-Produkte. Bei permanenter Messung der Fluoreszenz wird die Temperatur hierbei kontinuierlich von 82°C auf 95°C erhöht, was die Aufschmelzung der doppelsträngigen PCR-Produkte bewirkt. Die Trennung der komplementären DNA-Stränge hat die Freisetzung der interkalierten SYBR Green I-Moleküle zur Folge, was zu einer Abnahme der Fluoreszenz führt. Der T_m-Wert der Amplifikate ist als die Temperatur mit der höchsten Änderung der Fluoreszenz pro Zeitintervall (dF/dt_{max}) definiert und diene zur Identifikation von PCR-Produkten. Die Amplifikationen von *DAP-Kinase*- und *GAPDH*-Gensequenzen aus cDNA wurden nach folgendem Standardprogramm durchgeführt.

Standardprogramm:	1.	30°C	20 min	Abbau dUTP-haltiger Amplifikate (potentielle Kontaminationsquelle)
		↓		
	2.	95°C	10 min	Prä-Denaturierung
		↓		
	3.	95°C	< 1 s	Denaturierung
		↓		
50 Amplifikations- zyklen	4.	66°C-	10 s	Primerbindung („Annealing“)
		↓		
	5.	72°C	20 s	Primerverlängerung („Extension“)
		↓		
	6.	72°C	< 1 s	Fluoreszenzdetektion
		↓		
		Schmelzpunktanalyse		

Nach Beendigung der Schmelzpunktanalyse werden die PCR-Produkte auf 30°C heruntergekühlt wodurch sich die komplementären DNA-Stränge wieder aneinander anlagern konnten („Re-Annealing“), so dass anschließend eine gel-elektrophoretische Auftrennung (2.2.2.10) der Reaktionsansätze möglich war.

2.2.2.7.4 Methylierungs-spezifische PCR (MSP)

Die Methylierungsspezifische PCR (MSP) zur Analyse des Methylierungsstatus des *DAP-Kinase*-Promotors wurde nach der Methode von KATZENELLENBOGEN et al. (1999) durchgeführt, wobei die genomische DNA zuvor durch die Behandlung mit Natrium-Bisulfit chemisch modifiziert werden musste. Hierbei werden alle nicht-methylierten Cytosinreste innerhalb der DNA zu Uracilresten desaminiert, während methylierte Cytosinreste von dieser Modifikation nicht betroffen sind (WANG et al., 1980). In einer anschließenden PCR mit der so modifizierten DNA als „Template“ können

Primerpaare gewählt werden, die spezifisch nur an ursprünglich unmethylierte (in Sequenz: C → U Konversion) bzw. methylierte (in Sequenz: C^{met} → C) DNA-Bereiche binden und diese amplifizieren. Anhand des Primerpaares, das innerhalb der PCR ein Fragment liefert kann auf den Methylierungszustand der unmodifizierten Ausgangs-DNA rück geschlossen werden (HERMAN et al., 1996).

2.2.2.7.4.1 Natrium-Bisulfit-Umwandlung von genomischer DNA

Nach einer Methode von FROMMER et al. (1992) wurden 1-2 µg genomischer DNA in 50 µl H₂O verdünnt und durch Zugabe von 5,5 µl 2 M NaOH für 10 min bei 37°C denaturiert. Im Anschluss daran wurden 30 µl 10 mM Hydroquinon sowie 520 µl einer 3 M Natrium-Bisulfit Lösung (pH 5,0) hinzu pipettiert, durchgemischt und für 16 h bei 50°C inkubiert, wobei eine Übersichtung mit Mineralöl das Kondensieren der Lösung am Gefäßdeckel verhinderte. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Mineralöl entfernt, die modifizierte DNA (DNA_{mod}) mit Hilfe des „QIAquick PCR Purifikation Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 50 µl H₂O eluiert. Durch Zugabe von 5,5 µl einer 3 M NaOH Lösung wurde die DNA_{mod} für 5 min bei RT denaturiert und anschließend gefällt (2.2.2.4) wobei Heringssperma-DNA als Träger-DNA diente. Die präzipitierte DNA_{mod} wurde anschließend in 20 µl H₂O aufgenommen, direkt weiter verarbeitet oder bei -80°C gelagert.

2.2.2.7.4.2 Amplifikation von Gensequenzen aus DNA nach Natrium-Bisulfit-Modifikation

Zur Amplifikation von Gensequenzen aus Natrium-Bisulfit modifizierter DNA wurde nach folgendem Pipettierschema vorgegangen.

Pipettierschema:	3 µl	genomische DNA _{mod}
	15 pmol	Primer 1 („sense“)
	15 pmol	Primer 2 („antisense“)
	200 µM	dNTP-Mix
	5 µl	PCR-Puffer (10fach konzentriert)
	1,25 U	Taq -Polymerase
	ad 50 µl	H ₂ O

Primer 1 und 2 (KATZENELLENBOGEN et al., 1999) definieren die jeweilige Zielsequenz der genomischen DNA_{mod}, wobei ein Primerpaar spezifisch nur methylierte DNA-Bereiche binden konnte und ein zweites spezifisch für unmethylierte DNA-Bereiche war. Durch zwei separate PCR-Reaktionen mit identischem „Template“ und jeweils einem Primerpaar konnte je nach erfolgter Amplifikation auf den Methylierungszustand der Ausgangs-DNA rück geschlossen werden.

Die Amplifikationen von Gensequenzen aus genomischer DNA_{mod} wurden nach folgendem Standardprogramm durchgeführt

Standardprogramm:	1.	95°C	5 min	Prä-Denaturierung
		↓		
	2.	95°C	1 min	Denaturierung
		↓		
	3.	66°C-	1 min	Primerbindung („Annealing“)
	↓			
	4.	72°C	1 min	Primerverlängerung („Extension“)
	↓			
	5.	4°C	> 0 min	Kühlung nach Beendigung der Reaktion

40 Amplifikationszyklen



2.2.2.7.5 Direkte PCR-Amplifikation auf bakteriellen Kolonien: „colony screening“

Mit dieser Methode wurden bakterielle Zellklone auf das Vorhandensein definierter DNA-Sequenzen getestet. Dazu wurden Aliquots einzelner Kolonien von einer zu untersuchenden Agarplatte mit Hilfe steriler Zahnstocher zunächst in 40 µl H₂O, dann in 300 µl YT-Medium mit Antibiotikumzusatz übertragen. Für die direkte PCR-Amplifikation wurden die angeimpften H₂O-Proben zunächst 5 min in einer Mikrowelle gekocht und die durch die Hitzedenaturierung entstandenen Zelltrümmer 1 min bei 20000 x g abzentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden dann in die PCR eingesetzt. Das verwendete Programm entspricht dem in 2.2.2.7.1 beschriebenen.

Pipettierschema:	15 pmol	Primer 1 („sense“)
	15 pmol	Primer 2 („antisense“)
	200 µM	dNTP-Mix
	5 µl	PCR-Puffer (10fach konzentriert)
	2 U	Taq-Polymerase
	ad 40 µl	H ₂ O
	+ 10 µl	plasmidhaltige Suspension hitzedenaturierter Zellklone

2.2.2.7.6 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzanalysen wurden mit dem „BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ von Applied Biosystems (Weiterstadt) modifiziert nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als „Templates“ wurden sowohl PCR-Amplifikate als auch Plasmide verwendet. Daraus ergaben sich folgende Pipettierschemata (A für PCR-Amplifikate und B für Plasmid-DNA).

Pipettierschema A:	5 pmol	Primer
	100 ng	PCR-Amplifikate
	2 µl	Terminator Ready Reaction Mix
	ad 10 µl	H ₂ O
Pipettierschema B:	10 pmol	Primer
	0,8 µg	Plasmid-DNA
	2 µl	Terminator Ready Reaction Mix
	ad 10 µl	H ₂ O

In Abweichung von den Angaben im mitgelieferten Manual wurden die Konzentrationen sowohl an Primer als auch an PCR-Amplifikaten bzw. Plasmid-DNA verdoppelt.

Beim vorgegebenen Standardprogramm wurden die Amplifikationszyklen von 25 auf 30 erhöht.

Standardprogramm:	1.	95°C	5 min	Prä-Denaturierung
		↓		
	2.	95°C	10 s	Denaturierung
		↓		
	3.	50°C	5 s	Primerbindung („Annealing“)
		↓		
	4.	60°C	4 min	Primerverlängerung („Extension“)
		↓		
	5.	4°C	> 0 min	Kühlung nach Beendigung der Reaktion

30 Amplifikationszyklen



Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Reaktionsansätze mit dem „Dye Ex-Spin Kit“ (Qiagen, Hilden) nach den Protokollangaben des Herstellers aufgereinigt in Sequenzierröhrchen

überführt und mit Hilfe des Genetic Analyzer 310 von Applied Biosystems (Weiterstadt) analysiert. Die Auswertung von Sequenzierreaktionen erfolgte mit der Software „DNA-Star“.

2.2.2.7.7 Zweistufige PCR

Die Zweistufige PCR wurde modifiziert nach HO et al. (1989) durchgeführt. Dazu wurden zunächst getrennt ein 5'- und ein 3'-Amplifikat nach dem Pipettierschema und Standardprogramm in 2.2.2.7.1 erzeugt. Die dabei eingesetzten nicht-flankierenden Primer waren dabei in Teilbereichen komplementär zueinander, so dass eine Anlagerung, Paarung und Verlängerung der beiden Amplifikate in einer zweiten PCR möglich war. Diese zweite PCR wurde nach folgendem Pipettierschema und Standardprogramm durchgeführt.

Pipettierschema:	200 ng	Amplifikat des 5'-Fragments
	200 ng	Amplifikat des 3'-Fragments
	15 pmol	flankierender 5'-Primer
	15 pmol	flankierender 3'-Primer
	200 µM	dNTP-Mix
	5 µl	PCR-Puffer (10fach konzentriert)
	2 U	<i>Pfu</i> -Polymerase
	ad 50 µl	H ₂ O

Standardprogramm:	1.	95°C	5 min	Prä-Denaturierung
		↓		
	2.	95°C	1 min	Denaturierung
		↓		
	3.	45°C- 60°C	30 s- 1 min	Anlagerung der Amplifikate
	↓			
	4.	72°C	500 bp/ min	Paarung und Verlängerung der Amplifikatpopulationen
	↓			
	5.	4°C	> 0 min	Kühlung nach Beendigung der Reaktion

35-40 Amplifikationszyklen

Die Amplifikate der zweiten PCR wurden entweder phosphoryliert und in „blunt-end“-restringierte Plasmide oder nach Restriktion in entsprechende „sticky-end“-restringierte Plasmide kloniert.

2.2.2.8 DNA-Restriktion

Restriktionsansätze wurden meist in einem Volumen von 20 µl durchgeführt und anschließend auf einem Agarosegel aufgetragen. Die optimalen Reaktionsbedingungen der jeweiligen Restriktionsenzyme (Puffermedien, Temperatur etc.) wurden entsprechend den Angaben der Herstellerfirmen (MBI Fermentas [St. Leon-Rot], NEB [Schwalbach] bzw. Gibco BRL [Eggenstein]) gewählt.

Pipettierschema:	< 2 µg	DNA
	2 µl	Restriktionspuffer (10fach konzentriert)
	2-10 U	Restriktionsenzym
	ad 20 µl	H ₂ O

2.2.2.9 Enzymatische DNA-Modifikation

Restringierte Plasmid-DNA, DNA-Fragmente oder PCR-Amplifikate mußten unter bestimmten Bedingungen zur Vorbereitung von Ligationsansätzen durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase (CIAP) oder T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) modifiziert werden. Dabei wurden die Ansätze meistens auf ein Volumen von 20 µl begrenzt und sowohl die mitgelieferten Reaktionspuffer

verwendet, als auch die optimalen Reaktionsbedingungen (Temperatur etc.) nach Angaben der Hersteller (MBI Fermentas [St. Leon-Rot], NEB [Schwalbach] bzw. Gibco BRL [Eggenstein]) eingehalten.

2.2.2.9.1 Behandlung mit Alkalischer Phosphatase

Vektoren wurden nach der Restriktion mit Alkalischer Phosphatase aus Kälbermagen (CIAP) 30 min bei 37°C dephosphoryliert, um unerwünschte Religationen zu verhindern.

Pipettierschema:	< 2 µg	Vektor-DNA
	2 µl	CIAP-Puffer (10fach konzentriert)
	1 U	Alkalische Phosphatase (CIAP)
	ad 20 µl	H ₂ O

2.2.2.9.2 Behandlung mit T4-Polynukleotidkinase

PCR-Amplifikate mußten vor der Ligation in einen restringierten und dephosphorylierten Vektor durch eine T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) phosphoryliert werden, da die bei der PCR benutzte *Pfu*-Polymerase „glatte“, nichtphosphorylierte Enden erzeugt.

Pipettierschema:	< 2 µg	PCR-Amplifikate
	2 µl	T4-PNK-Puffer (10fach konzentriert)
	10 U	T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)
	10 µM	ATP
	ad 20 µl	H ₂ O

2.2.2.10 Native Agarose-Gelelektrophorese

Restringierte Plasmidvektoren, DNA-Fragmente und PCR-Amplifikate wurden nach ihrer Größe (Basenpaaranzahl) in horizontalen Agarosegelen elektrophoretisch voneinander getrennt. Bei präparativen Gelen, aus denen DNA herausgeschnitten und extrahiert werden sollte, wurde eine konstante Spannung von 80 V, bei analytischen Gelen, auf die „Kontrollrestriktionen“ aufgetragen wurden, eine von 120 V angelegt. Dabei diente TBE als Laufpuffer. Verwendet wurden SeaPlaque GTG Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf) oder Low Melting Agarose (peqLab, Erlangen) für präparative und peqGold Agarose (peqLab, Erlangen) für analytische Gele. Die Elektrophoresekammern stammten von Pharmacia Biotech (Freiburg). Als Größenstandard wurde die 100 bp-Leiter oder die 1 Kb-Leiter von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Dokumentiert wurden die gelelektrophoretischen Auftrennungen von DNA mit Hilfe eines Video Copy Processor Systems von Mitsubishi (Mitsubishi - German Branch, Ratingen).

Zusammensetzung der einzelnen Komponenten:

TBE-Puffer:	90 mM Tris/Borsäure; pH 8,0	5xDNA-Gelladepuffer:	100 mM Tris/Borat; pH 8,0
	90 mM Borsäure		Glycerin
	2 mM EDTA		SDS
			Bromphenolblau

Agarosegel: (nativ)	0,8-3,5% (w/v)	Agarose in 100 ml TBE-Medium gekocht, nach Abkühlung auf unter 60°C versetzt mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml Stammlösung)
------------------------	----------------	---

2.2.2.11 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Integrität isolierter RNA wurde diese auf horizontalen Agarosegelen unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und anhand der 28S- und 18S-rRNA Banden die Qualität der Gesamt-RNA abgeschätzt. Die Proben wurden zuvor für 5 min bei 65°C inkubiert, mit RNA-Gelladepuffer versetzt und schließlich mit einer konstanten Spannung von 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. In diesem Fall diente FA als Laufpuffer versetzt mit 7,4% (v/v) Formaldehyd, um die Rückbildung von Sekundärstrukturen der RNA während der Elektrophorese zu unterbinden. Die Dokumentation erfolgte wie unter 2.2.2.10 beschrieben.

FA-Puffer:	20 mM MOPS, pH7,0 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA	5xRNA-Gelladepuffer:	80 mM MOPS, pH 7,0 20 mM Natriumacetat 4 mM EDTA 20% (v/v) Glycerin 14% (v/v) Formaldehyd 30% (v/v) Formamid 0,1% (w/v) Bromphenolblau
Agarosegel: (denaturierend)	1,2% (w/v) 5 µl 7,4% (v/v)	Agarose in 77 ml FA-Medium gekocht nach Abkühlung auf unter 60°C versetzt mit Ethidiumbromid (10 mg/ml Stammlösung) Formaldehyd	

Alle Lösungen wurden mit DEPC-H₂O hergestellt.

2.2.2.12 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

PCR-Produkte und restringierte (und gegebenenfalls modifizierte) DNA-Fragmente wurden nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung unter UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction kit“ nach Angaben des Herstellers (Qiagen) eluiert.

2.2.2.13 DNA-Ligation

Aus präparativen Agarosegelen extrahierte DNA-Fragmente wurden (Vektor- und Insertionsfragmente in einem molaren Verhältnis von 1:3) mit T4-DNA-Ligase und entsprechendem Reaktionspuffer (beide von MBI Fermentas oder NEB) versetzt und der Ansatz mindestens 3 h bei 16°C oder 12h bei 4°C inkubiert.

Pipettierschema:	50-100 ng 2 µl 5 U ad 20 µl	Vektor- und Insertionsfragmente in einem molaren Verhältnis von 1:3 T4-DNA-Ligasepuffer (10fach) T4-DNA-Ligase H ₂ O
------------------	--------------------------------------	--

2.2.2.14 Insertion einer Oligonukleotidenkassette

Oligonukleotidpaare wurden als doppelsträngige DNA-Kassetten in Plasmide eingeführt. Dazu wurden zunächst die einzelsträngigen komplementären Oligonukleotide (hergestellt von MWG, Ebersberg) auf eine Endkonzentration von 2 pmol/µl in H₂O verdünnt, auf 100°C erhitzt und dann bei Raumtemperatur abgekühlt, um die Anlagerung der komplementären Bereiche der Oligonukleotide zu gewährleisten. Anschließend wurden die überhängenden Enden durch die T4-Polynukleotidkinase 1 h bei 37°C phosphoryliert, die Reaktion 20 min bei 65°C abgestoppt und die komplementären,

phosphorylierten Oligonukleotidkassetten nach dem folgenden Pipettierschema in restringierte Plasmid-Vektoren durch Ligation inseriert.

Pipettierschema:	2 pmol	Oligonukleotidkassette (5'-phosphoryliert)
	50 ng	Plasmid-Vektor (restringiert und dephosphoryliert)
	2 μ l	T4-DNA-Ligasepuffer (10fach)
	5 U	T4-DNA-Ligase
	ad 20 μ l	H ₂ O

2.2.2.15 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Zellen wurden nach einer Methode von HANAHAN (1983) hergestellt. Dazu wurden 200 ml YT 1:100 mit einer 5 ml-Übernachtskultur angeimpft, bis zu einer OD bei 600 nm von 0,4-0,5 wachsen gelassen und 10 min bei 5000 x g und 4°C pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml TFB 1 resuspendiert, 10 min auf Eis gekühlt und nochmals bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 8 ml TFB 2 resuspendiert, in 100 μ l-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

TFB 1:	30 mM	Kaliumacetat/Essigsäure; pH 5,8	TFB 2:	10 mM	MOPS; pH 7,0
	50 mM	MnCl ₂		75 mM	CaCl ₂
	100 mM	RbCl		10 mM	RbCl
	10 mM	CaCl ₂		15% (v/v)	Glycerin
	15% (v/v)	Glycerin			

2.2.2.16 Transformation

Ein 100 μ l-Aliquot kompetenter Zellen wurde aufgetaut, mit präparierter Plasmid-DNA (> 10 ng) oder Ligationsansatz (10-20 μ l) versetzt, gemischt und 20 min auf Eis gekühlt. Darauf folgend wurde der Transformationsansatz 90 s auf 42°C erhitzt und 2 min ins Eisbad gestellt. Danach wurden 900 μ l YT zugegeben, der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert und schließlich auf Selektionsplatten (YT/Agar mit entsprechenden Antibiotikazusätzen) ausgestrichen.

Abhängig vom Zielvektor und des zu transformierenden Bakterienstammes bestand die Möglichkeit, mit Hilfe der Lac-Selektionsmethode (BROWN, 1991) Klone zu detektieren, in deren Plasmide restringierte Fragmente oder PCR-Amplifikate inseriert wurden. Für diese Nachweisreaktion wurden 80 μ l Bluo-gal (2% [w/v] in Dimethylformamid) und 10 μ l IPTG (2% [w/v] in H₂O) direkt vorm Ausplattieren transformierter Zellen ausgestrichen.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von humanen Zelllinien

In dieser Arbeit wurden verschiedene Nierenkarzinom-Zelllinien, sowie HEK293-, HepG2- und HeLa-Zellen (alle adhären wachsend) und die leukämischen Suspensionszelllinien Raji verwendet (vgl. Tab. 2.1.6). Alle adhären Zellen wurden in der Regel mit 0,4 ml Medium/cm² Kulturgefäßfläche und Raji mit 4 x 10⁵ Zellen pro ml Medium kultiviert, wobei die Zellen kontinuierlich in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten wurden, um eine Selektion und Synchronisation der Zellen zu vermeiden.

2.2.3.1.1 Kultivierung von Nierenkarzinom-Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Nierenkarzinom-Zelllinien sind aus Primärtumoren vom histologisch klarzelligen, chromophil/papillären und chromophoben Subtyp des Nierenzellkarzinoms etabliert worden (GERHARZ et al., 1993). Die Zellen wurden bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% (v/v) CO₂ in folgendem Nährmedium kultiviert:

DMEM-Medium ergänzt mit	10% (v/v)	FBS (nicht Hitze inaktiviert)
	2 mM	Glutamin
	200 mg/l	Arginin
	72 mg/l	Asparagin
	10 mM	HEPES, pH 7,4
	100 U/ml	Penicillin
	100 µg	Streptomycin

2.2.3.1.2 Kultivierung sonstiger Zelllinien

HEK293-, HepG2- und HeLa-Zellen wurden in folgendem Nährmedium bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% (v/v) CO₂ kultiviert:

DMEM-Medium ergänzt mit	10% (v/v)	FBS (Hitze inaktiviert)
	2 mM	Glutamin
	100 U/ml	Penicillin
	100 µg	Streptomycin

Raji-Zellen wurden bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% (v/v) CO₂ in folgender Nährlösung kultiviert:

RPMI-Medium ergänzt mit	10% (v/v)	FBS (Hitze inaktiviert)
	2 mM	Glutamin
	100 U/ml	Penicillin
	100 µg	Streptomycin

Das Ablösen der adhären-wachsenden Zellen zum Passagieren oder Ernten erfolgte durch Inkubation der Zellkultur mit 20-50 µl/cm² PBS versetzt mit 0,05% (v/v) EDTA (Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) für 5-10 min oder durch Inkubation mit 20-50 µl/cm² PBS versetzt 0,05% (v/v) EDTA (Gibco) und 10% (v/v) Trypsin (Sigma) für 30–60 s.

2.2.3.2 Isolierung und Stimulierung von mononukleären Zellen aus humanem peripheren Blut (peripheral blood mononuclear cells - PBMCs)

Mononukleären Zellen wurden aus tagfrischen Blutkonserven von nicht miteinander verwandten Spendern, mittels Dichtegradienten-Zentrifugation in Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech) aus peripherem Blut isoliert. 80-100 ml Blut wurden hierfür mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 175 ml verdünnt, in 5 x 50 ml Falcon-Röhrchen auf vorgelagten 15 ml Ficoll-Hypaque-Kissen überschichtet und mit 580 x g für 20 min bei RT zentrifugiert. Die Lymphozyten und Monozyten sammeln sich hierbei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen dem Überstand, der das Plasma und die Thrombozyten enthält, und dem Ficoll-Hypaque an. Das Zentrifugationspellet bilden Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte besitzen. Die Interphase wurde vorsichtig abgesaugt und in ein neues 50 ml Falcon Röhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und bei 260 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet, das die PBMCs enthielt, wurde mit 2 ml 0,8% (w/v) NH₄Cl resuspendiert und für 5 min bei 4°C inkubiert, um restliche in der

PBMC-Population verbliebene Erythrozyten zu lysieren. Daraufhin wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen, bei 260 x g für 5 min bei RT zentrifugiert und das resultierende Pellet in 10 ml Raji-Zellen-Medium (2.2.3.1.2) resuspendiert. Diese Zellen stellten eine Mischpopulation aus B- und T-Zell-Lymphozyten dar. Die Zellzahl wurden nach der unter 2.2.3.3 beschriebenen Methode bestimmt und 50% der Zellen in 5×10^5 Zellen/ml Medium ausgesät. Der Anteil nicht ausgesäter Zellen wurde bei 260 x g für 5 min abzentrifugiert und direkt lysiert oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.3.2.1 Selektive Aktivierung von T-Zell-Lymphozyten und deren Kultivierung

Um die ruhenden PBMCs zur Proliferation zu aktivieren wurde das Medium mit 10 µg/ml des Lektins Concanavalin A (Sigma) ergänzt, das als polyklonales Mitogen wirkt und selektiv T-Zell-Lymphozyten zur Teilung stimuliert (PALACIOS, 1982). Die Zellen wurden 3-6 Tage kultiviert und nach Einsetzen der Proliferation (lichtmikroskopisch erkennbar an der typischen Blastenbildung) durch Zentrifugation bei 260 x g für 5 min geerntet, anschließend in dem jeweiligen Lysepuffer resuspendiert und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.2.3.3 Zellzahlbestimmung mit der „Neubauer-Kammer“

Die Zellzahl wurde durch lichtmikroskopisches Auszählen eines Aliquots Zellsuspension (bei Suspensionszellen direkt aus der Kultur entnommen und bei adhären Zellen nach Ablösen der Zellen vom Untergrund (2.2.3.1.2) nach Färbung mit 0,2% (v/v) Trypanblau (Seromed Biochrom KG, Berlin) in einer Neubauerzählkammer ermittelt. Der Farbstoff färbt dabei aufgrund seiner Membranundurchlässigkeit lediglich tote Zellen blau an, lebende erscheinen weiß. Die lebenden Zellen in allen 8 Eckquadraten der Neubauerkammer wurden gezählt und die Zellkonzentration der Zellsuspension mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl}_{\text{Susp.}} [\text{Zellen/ml}] = n/8 \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

„n“ steht für die Menge an gezählten Zellen, 10^4 stellt den Kammerfaktor dar und der Verdünnungsfaktor ergibt sich durch die Zugabe des entsprechenden Volumens an Trypanblau oder PBS.

2.2.3.4 Messung der Zellproliferation durch „MTT-Assay“

Die Messung der Zellproliferation durch „MTT-Assay“ wurde nach einer Methode von MOSMANN (1983) durchgeführt. Sie basiert auf der Umsetzung des gelb gefärbten 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromid (MTT, Thiazolyl Blue, Sigma) zu einem dunkelbraun gefärbten Formazanprodukt durch mitochondriale Dehydrogenasen. Die relative Menge an Endprodukt ist durch Absorptionsmessung bestimmbar und direkt proportional zur Lebendzellzahl. Die MTT-Messung erfolgte in 96-well-Zellkulturplatten, in denen je nach Zelltyp und experimentellem Hintergrund zwischen 2500 und 10000 Zellen pro „well“ in 150 µl Medium ausgesät wurden. Zum Zeitpunkt der Zellzahlbestimmung wurden 50 µl MTT-Lösung (5 mg/ml PBS) in jedes „well“ pipettiert und die Zellkulturplatte daraufhin 4 h bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% (v/v) CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurde das komplette Medium/MTT-Gemisch abgenommen und die Zellen durch Zugabe von 150 µl DMSO pro „well“ unter schütteln 10 min bei RT lysiert. Die Absorption wurde mit einem

Multiscan Plus ELISA-Reader von Titertek (Huntsville, Alabama, USA) bei 570 nm gemessen. Die Zellzahl wurde anschließend anhand einer vorher erstellten Standardkurve ermittelt oder prozentual relativ zur jeweils spezifischen Kontrolle angegeben.

2.2.3.5 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Unter dem Begriff „Transfektion“ versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen, was entweder durch physikalische und/oder chemische Methoden erreicht werden kann. Bei denen in dieser Arbeit verwendeten chemischen Transfektionsreagenzien „PolyFect“ (Qiagen) und „Fugene“ (Roche Diagnostics) handelt es sich um aktivierte Dendrimere (PolyFect) bzw. ionische Lipidgemische (Fugene), die mit der zu transfizierenden DNA Komplexe ausbilden, die eine erhöhte Affinität zur Zellmembran besitzen. Durch Fusionieren mit der Zellmembran und Endozytoseprozessen gelangt die DNA ins Zellinnere und kann schließlich exprimiert werden. Für die transiente Transfektion von HeLa- und HEK293-Zellen mit PolyFect wurde modifiziert nach den Protokollangaben des Herstellers verfahren und für folgende Zellkulturformate jeweils eingesetzt:

Zelllinie	Format	ausgesäte Zellzahl	DNA (μg)	PolyFect (μl)
Hela	6-well	5×10^5	2	12
	10 cm-Schale	4×10^6	8	50
HEK293	6-well	6×10^5	2,5	20
	10 cm-Schale	3×10^6	10	80

HepG2-Zellen wurden mit PolyFect gemäß dem Protokoll für HeLa-Zellen transfiziert. Bei allen Transfektionen mit Fugene wurde entsprechend den Herstellerangaben ein DNA-Fugene Verhältnis von 1:3 gewählt.

48 h nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen geerntet und in der Regel lysiert oder über FACS-Messung (2.2.3.7) bzw. Bestimmung der Luciferaseaktivität (2.2.3.9) weiter analysiert.

2.2.3.6 Herstellung stabiler Transduktanten durch Retroviralen Gentransfer

Da sich Nierentumorzelllinien neben einer starken Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Strahlentherapie (vgl. 1.1.1) auch durch eine schlechte Transfizierbarkeit mit herkömmlichen Transfektionsmethoden auszeichnen, wurde ein retrovirales Transduktionssystem zur genetischen Manipulation der Nierentumorzellen verwendet. Hiefür wurden zuvor sogenannte Verpackungs-Zellen mit dem retroviralen Zielplasmid transient transfiziert. Diese Zellen enthalten stabil ins Genom inkorporierte Virus-Gene und sind in der Lage, zusammen mit den auf dem retroviralen Zielplasmid kodierten Virus-Genen, vollständige, infektiöse und das Ziel-Gen enthaltene Viruspartikel zu produzieren. Diese werden von den Verpackungs-Zellen ins Medium abgegeben und konnten geerntet und zur Infektion der (Nierenkarzinom-) Zielzellen eingesetzt werden.

2.2.3.6.1 Herstellung virushaltiger Überstände

Die Hüllproteine der Retroviren bestimmen ihre Wirtsspezifität, indem sie nur an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und über diese ins Zellinnere gelangen können. Im Vorfeld ist daher eine Überprüfung der Zielzellen hinsichtlich der Expression entsprechender Oberflächenrezeptoren notwendig. Derartige Rezeptoren sind zum Beispiel der Natrium-abhängige

Phosphatsymporter Ram-1, über den amphotrope Viren in die Zielzelle eindringen können (KAVANAUGH et al., 1994). Da Nierenkarzinom-Zelllinien diesen Rezeptor ebenfalls auf der Zelloberfläche exprimieren (unveröffentlichte Daten, persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Mohammed Hassan), wurde die Verpackungs-Zelllinie BD AmphoPack™ der Firma Clontech verwendet, welche die virale RNA in amphotrope Viren verpackt. Einen Tag vor Transfektion wurden hierfür $4,5 \times 10^6$ Zellen der Verpackungs-Zelllinie in einer 10 cm-Schalen ausgesät, nach 24 h wie unter 2.2.3.5 beschrieben mit 20 µg Plasmid-DNA und 60 µl Fugene in 7 ml Zielzellmedium transfiziert und für 48 h bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% (v/v) CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurde das Virus-enhaltenen Medium von den Zellen abgenommen, sterilfiltriert (Filter mit 0,45 µm Porengröße, Millipore, Schwalbach), wie unter 2.2.3.6.2. beschrieben direkt weiter verarbeitet oder bei -80°C den Sicherheitsvorschriften für Gentechnik entsprechenden gelagert.

Alle infektiösen Überstände wurden in den Laboren der Kinderklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Helmut Hanenberg hergestellt.

2.2.3.6.2 Retrovirale Infektion und Selektionierung stabiler Transduktanten

24 h vor Infektion wurden 5000 Zellen der zu infizierenden Zelllinie in einer 10 cm-Schale ausgesät und bei 37°C und einer Atmosphäre von 5% (v/v) CO₂ inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 48 h mit 7 ml sterilfiltriertem infektiösen Überstand aus der unter 2.2.3.6.1 beschriebenen transienten Transfektion der Verpackungs-Zelllinie inkubiert. Für eine Erhöhung der Virusaffinität zur Zellmembran (und der damit verbundenen Transduktionseffizienz) wurde das Medium zusätzlich mit 10 µg/ml des Polykations Protaminsulfat (Sigma) versetzt. 48 h nach Beginn der Infektion wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS frisches Medium zu den Zellen gegeben. Da das in dieser Arbeit verwendete retrovirale Plasmid für eine G418/Neomycin Resistenz kodiert, wurde das Medium mit 0,8 mg/ml des Antibiotikums Geneticin (Gibco) ergänzt, wodurch nicht stabil transduzierte Zellen aus der Zellkultur heraus selektioniert werden konnten. Innerhalb von > 21 Tagen konnte so eine 80-100% stabil-transduzierte Zelllinie generiert werden. Um die Heterogenität der Nierenkarzinom-Zelllinien aufrecht zu erhalten, wurde keine klonale Selektion der transduzierten Zellen vorgenommen.

2.2.3.7 Durchflusszytometrische Analysen (FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting)

In dieser Arbeit wurden FACS-Analysen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz durchgeführt und dienten zur Bestimmung der Apoptosehäufigkeit. Alle Messungen wurden mit einem FACSCalibur (Becton, Dickinson, Heidelberg) im entsprechenden Fluoreszenzkanal durchgeführt, wobei jeweils 10000 Ereignisse aufgenommen wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software WinMDI Version 2.8.

2.2.3.7.1 Bestimmung der Transfektionseffizienz durch GFP Detektion

Zur FACS-Analyse von GFP- bzw. GFP-Fusionsprotein-überexprimierender Zellen nach Transfektion bzw. Transduktion wurden diese wie unter 2.2.3.1.2 beschrieben mit Trypsin abgelöst, in 15 ml Falcon Röhrchen überführt und für 5 min mit 300 x g bei RT abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit PBS resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Der

Überstand wurde daraufhin verworfen, das Zellpellet in 4 ml 70% (v/v) Ethanol in PBS aufgenommen und die Zellen 16 h bei 4°C fixiert. Nach Beendigung der Fixierung wurden die Zellen mit 300 x g bei RT für 5 min zentrifugiert, erneut mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet entsprechend der Zellmenge in 0,5 bis 3 ml FACS-Puffer (3% (v/v) FBS in PBS) aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.3.7.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz durch Färbung des CD95-Rezeptors

Die Transfektion und damit verbundene Expression des CD95-Rezeptors diente in erster Linie als Apoptose-Induktor wurde aber zugleich zur durchflusszytometrischen Bestimmung der jeweiligen Transfektionseffizienz verwendet. Hierfür wurden die zu untersuchenden Zellen abgelöst (2.2.3.1.2), in 15 ml Falcon Röhrchen überführt und für 5 min mit 300 x g bei RT abzentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde mit PBS gewaschen und für die Zellzahlbestimmung ein Zellaliquot entnommen (2.2.3.3). Die restlichen Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 100 µl FACS-Puffer pro 1×10^5 Zellen resuspendiert. 100 µl Zellsuspension wurden anschließend mit 20 µl einer 1/20 Verdünnung des FITC-gekoppelten CD95-Antikörpers (Serotec) bzw. der entsprechenden Isotypenkontrolle (DakoCytomation) versetzt und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran wurden 8 ml PBS hinzu gegeben, der Ansatz erneut mit 300 x g für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand danach dekantiert. Die Zellen wurden daraufhin in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und im FACS-Gerät analysiert.

2.2.3.7.3 Apoptose-Bestimmung durch Annexin-V Färbung

Die Quantifizierung der Apoptosehäufigkeit von Zellen erfolgte mit dem „Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit“ (Becton-Dickinson) und wurde modifiziert nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Annexin V ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin (RAYNAL & POLLARD, 1994). Während der Apoptose wird Phosphatidylserin in der äußeren Hälfte der Zellmembran exponiert (VERMES et al., 1995), was mit Hilfe von Annexin V, hier konjugiert mit dem Farbstoff Phycoerythrin (PE), detektiert werden kann. Über diese Methode ist somit ein Quantifizierung apoptotischer Zellen möglich (VAN ENGELAND et al., 1996). Die zu untersuchenden Zellen wurden hierfür nach Ablösen mit Trypsin (2.2.3.1.2) gezählt (2.2.3.3) mit PBS gewaschen und in 15 ml Falcon Röhrchen für 5 min mit 300 x g bei RT abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Bindungs-Puffer pro 1×10^5 Zellen aufgenommen und 100 µl Zellaliquots wurden mit jeweils 5 µl Annexin V-PE- und/oder 5 µl 7-AAD-Färbelösung versetzt. Nach 15 min Inkubation bei RT im Dunkeln wurden die Ansätze mit jeweils 200 µl Bindungs-Puffer ergänzt, in FACS-Röhrchen überführt und durchflusszytometrisch analysiert. Apoptotische Zellen waren dabei sowohl Annexin V-PE als auch 7-AAD positiv. Der ermittelte Prozentsatz an apoptotischen Zellen nach Transfektion pro apoptotischer Gene wurde in allen Experimenten auf die jeweilige Transfektionseffizienz (2.2.3.7.1/2) normiert.

2.2.3.8 Inkubation von Säugerzellen mit Zytostatika, Apoptose-Aktivatoren und -Inhibitoren

Zur Induktion der Apoptose wurden Zellen mit den in Tabelle 2.1.1 aufgeführten Zytostatika und Apoptose-Induktoren in der jeweils angegebenen Endkonzentration inkubiert. Die Zellen wurden hierfür mit einer Zelldichte von $2-3 \times 10^4$ Zellen/cm² in 6-well-Zellkulturschalen oder 10 cm-Schalen ausgesät, nach 24 h zweimal mit PBS gewaschen und schließlich mit dem Apoptose-Aktivator- oder Zytostatika-haltigem Medium versetzt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und durch Zentrifugation mit 300 x g bei RT für 5 min geerntet. Die Zellen wurden daraufhin direkt lysiert oder über FACS-Analyse auf das Ausmaß der Apoptose hin überprüft (2.2.3.7.3).

2.2.3.8.1 Erstellen von Zelltodkinetiken

Die Bestimmung von Zelltodkinetiken nach Behandlung mit Apoptose-Induktoren und Zytostatika erfolgte in 96-well-Zellkulturschalen mittels „MTT-Assay“ (2.2.3.4). Hierfür wurden Zelltyp-abhängig pro „well“ 2500-10000 Zellen in 150 µl Medium ausgesät und nach 24 h durch Zugabe von 50 µl Medium, versetzt mit 4fachen konzentriertem Induktor, stimuliert. Bei der Apoptoseinduktion unter Einfluss von spezifischen Inhibitoren (vgl. Tabelle 2.1.1) wurden diese zur Vorinkubation 24 h vor Stimulation, entsprechend verdünnt in 50 µl Medium, auf die Zellen gegeben, die zuvor in 100 µl Medium ausgesät worden waren. Zum Zeitpunkt der Zellzahlbestimmung wurde die Lebendzellzahl mittels „MTT-Assay“ analysiert (2.2.3.4). Die relativen Lebendzellzahlen (prozentual zur spezifischen Kontrolle) der einzelnen Zeitpunkte wurden in einem Diagramm gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

2.2.3.9 „Dual-Luciferase-Reporter-Assay“

Die Analysen zur Daxx-vermittelten Modulation der p53-abhängigen Transkription wurden mit Hilfe von „Luciferase-Reporter-Assays“ durchgeführt. Nach Transfektion des Reporterplamides p53-Luc (Stratagene) steht die Expression der *Firefly* (*Photinus pyralis*)-Luciferase unter der Kontrolle eines p53-responsiven Promotorelements, so dass die Expression der Luciferase ein direktes Maß für die p53-Aktivität darstellt. Da sich die Aktivität der Luciferase proportional zur Proteinmenge verhält, ist die Luciferaseaktivität ein indirektes Maß für die Aktivität von p53 und wurde ermittelt. Für diese Untersuchung wurden in Hela-Zellen transiente Transfektionen (2.2.3.5) nach folgendem Pipettierschema durchgeführt.

Transfektionsansatz:
(6-well-Zellkulturformat)

Konstrukt	Menge der DNA
p53-Luc	200 ng
p53-GFP	50 ng
pLHA-Daxx- α / β / γ	400 ng
pRL-EF-1a	20 ng
pLHA-C1	ad 2 µg

Um die *Firefly*-Luciferasewerte auf die jeweilige Transfektionseffizienz normieren zu können, wurden alle Transfektionsansätze mit 20 ng des *Renilla* (*Renilla muelleri*)-Expressionsvektors pRL-EF-1a ergänzt. Die Bestimmung der beiden Luciferaseaktivitäten erfolgte mit Hilfe des „Dual-Luciferase-Kits“ von Promega nach Angaben des Herstellers mit dem Luminometer LB9506 von Berthold

(Bundoora, Australien), wobei die Werte der *Firefly*-Luciferase relativ zu denen der *Renilla* Luciferase angegeben wurden.

2.2.3.10 Fluoreszenzmikroskopische Analysen

Die subzelluläre Lokalisation von GFP- und YFP-fusionierten Proteinen wurden nach Transfektion der entsprechend kodierenden Plasmide in HeLa-Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Zellen wurden wie unter 2.2.3.5 beschrieben auf zuvor in die Zellkulturschale eingebrachte Deckgläschen ausgesät und transfiziert. Nach 48 h wurden das Medium abgenommen, die Zellen durch Inkubation mit PBS gewaschen und mit 2% (w/v) Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Daraufhin wurden die Zellen durch Waschen mit PBST (PBS + 0,1% (v/v) Triton X-100) permeabilisiert und im Anschluss mit DAPI-Färbelösung (0,1 µg DAPI/ml PBST) für 10 min inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen auf Objektträgern in Mounting-Medium eingebettet (2.2.3.10.1) und mit einem Axioskop 20 fluoreszenzmikroskopisch oder einem LSM510 META (beide Zeiss, Jena) konfokal-fluoreszenzmikroskopisch analysiert bzw. bis zur Ansicht bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.3.10.1 Antikörperfärbung

Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von endogenen zellulären Proteinen, wurde diese mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern angefärbt. Die Zellen wurden hierfür auf zuvor in die Zellkulturschale eingebrachte Deckgläschen ausgesät und zum geeigneten Zeitpunkt wie unter 2.2.3.10 beschrieben mit 2% (w/v) Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Die Zellen wurden danach zweimal für jeweils 5 min mit PBST bei RT gewaschen und anschließend für 10 min mit PBST permeabilisiert. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern wurden die Zellen daraufhin zunächst für 1 h in Blockierungspuffer (PBST + 5% BSA) und anschließend für 1 h mit dem Primärantikörper in Blockierungspuffer mit der entsprechenden Verdünnung bei RT inkubiert. Es schlossen sich drei Waschschritte in PBST für jeweils 5 min bei RT an, bevor der Sekundärantikörper in Blockierungspuffer mit der entsprechenden Verdünnung für 1 h bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBST und danach dreimal mit PBS für jeweils 5 min bei RT gewaschen, wobei innerhalb des ersten PBST Waschschrilles je nach experimentellem Hintergrund eine Anfärbung der Zellkerne durch Inkubation mit DAPI (0,1 µg DAPI/ml PBST) vorgenommen wurde. Daraufhin wurden die Deckgläschen auf Objektträgern in Mounting-Medium eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch analysiert oder bis zur Ansicht bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Mounting-Medium:	100 mM	Tris/HCl; pH 8,5
	10% (w/v)	Mowiol 4-88
	2,5% (w/v)	DABCO
	22% (v/v)	Glycerin

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen

Für die Proteinextraktion wurden die entsprechenden Zellen zunächst mit PBS gewaschen, um eine Verunreinigung der Proteinlysate durch Reste von Medium und dem darin enthaltenen FBS zu

verhindern. Anschließend wurden bei adhären wachsenden Zellen je nach Zellkulturformat 100 µl (6-well) bzw. 300 µl (10 cm-Schale) des entsprechenden Lysepuffers (siehe unten) direkt auf den Zellrasen gegeben und die jeweilige Zellkulturschale für 1 bis 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt, kurz gevortext und zur vollständigen Lyse für 20 min auf Eis inkubiert. Im Fall von Suspensionszellen wurden diese in 15 ml Falcon Röhrchen durch Zentrifugation mit 300 x g für 5 min bei RT geerntet, die Zellen in PBS resuspendiert und erneut bei 300 x g abzentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Pellet abhängig von der Zellmenge ebenfalls in 100-300 µl des jeweiligen Lysepuffers resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation der Proben mit 20000 x g für 20 min bei 4°C wurden restliche Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde als Proteinfraktion gewertet, in ein anderes Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Je nach experimentellem Hintergrund war es mitunter nötig die Proteine mit unterschiedlichen Lysepuffern zu extrahieren, da pH-Wert, Ionenstärke sowie Art und Konzentration der im Puffer enthaltenen Detergenzien die Interaktion zwischen wechselwirkenden Proteinen und die biologische bzw. enzymatische Aktivität entscheidend beeinflussen können. Im Allgemeinen diente Puffer L zur Extrahierung von Proteinen, die zur elektrophoretischen Auftrennung mit anschließender Immundetektion im „Western Blot“ bestimmt waren (2.2.4.5 und 2.2.4.5.1). Puffer KL wurde zur Herstellung von Proteinlysaten verwendet, mit denen Aktivitätsbestimmungen von Kinasen durchgeführt werden sollten (2.2.4.6). Die Puffer CL1–3 wurden verwendet, um Protein-Protein Interaktionen mittels Ko-Immunpräzipitation zu analysieren (2.2.4.3.1). Zur Inhibition von Serinproteasen wurden alle Puffer mit 4,16% (v/v) eines Proteaseinhibitor-Mix nach Angaben des Herstellers versetzt (Roche Diagnostics).

Puffer L:	10 mM 100 mM 1 mM 1% (v/v)	Tris/HCl; pH 7,6 NaCl EDTA NP-40	Puffer CL2:	50 mM 250 mM 5 mM 0,1% (v/v)	HEPES; pH 7,0 NaCl EDTA NP-40
Puffer KL:	20 mM 25 mM 10 mM 2 mM 40 mM 1 mM 1% (v/v)	HEPES; pH 7,5 MgCl ₂ EGTA Natriumorthovanadat β-Glycerolphosphat DTT NP-40	Puffer CL3:	50 mM 50 mM 5 mM 10% (v/v) 0,1% (v/v)	HEPES; pH 7,0 NaCl EDTA Glycerin NP-40
Puffer CL1:	50 mM 150 mM 1 mM 2 mM 10% (v/v) 1% (v/v)	HEPES; pH 7,4 NaCl EDTA DTT Glycerin NP-40			

2.2.4.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach einer Methode von SEDMAK & GROSSBERG (1977) durchgeführt. Sie basiert im Wesentlichen auf der unspezifischen Anlagerung des Säurefarbstoffes Coomassie-Brillantblau G 250 an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen und wurde mit dem Protein-Assay Farbreagenz von Biorad Laboratories (München) durchgeführt. Eine Proteinlösung wurde dabei mit H₂O auf 800 µl aufgefüllt, bevor 200 µl Farbreagenz zugegeben

wurden. Die Absorption bei 595 nm wurde in einem DU640 Spektralphotometer (Beckmann Instruments, München) gegen eine Referenz ohne Protein gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Eichgeraden, erstellt mit 5 bis 20 µg BSA (Rinderserumalbumin), ermittelt.

2.2.4.3 Immunpräzipitation

Zur Anreicherung spezifischer Proteine aus Gesamtproteinzelextrakten wurde eine Immunpräzipitation modifiziert nach ANDERSON & BLOBEL (1983) durchgeführt. Hierbei wird der Proteinextrakt zunächst mit einem gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper inkubiert und anschließend mit einem Protein A-Sepharose Konjugat versetzt. Dies bindet an den Immunkomplex, über Wechelswirkungen zwischen der Fc-Region des Antiköpers und dem Protein A, wodurch das Zielprotein (gebunden an den Antikörper-Protein A-Sepharose-Komplex) nach Zentrifugation pelletiert und durch Dekantieren des Überstandes vom übrigen Protein getrennt werden kann. 100-500 µg Gesamtprotein wurden hierfür mit dem entsprechend verdünnten Antikörper (vgl. Tab. 2.1.2) in 250 µl des jeweiligen Lysepuffers gemischt und bei 4°C in einem Rotator inkubiert. Nach 1 h wurden 35 µl der Protein A-Sepharose Lösung (Sigma) hinzu gegeben und anschließend für 16 h bei 4°C unter Rotation weiter inkubiert. Der Ansatz wurde daraufhin mit 20000 x g für 2 min bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das den Immunkomplex enthaltene Pellet in 250 µl des entsprechenden Lysepuffers aufgenommen. Es schlossen sich 3-5 Waschschrte an aus Zyklen von Zentrifugation mit 20000 x g bei 4°C für 1 min, nachfolgender Dekantierung des Überstandes und erneutes Resuspendieren des Pellets in 250 µl des entsprechenden Lysepuffers. Nach Ende des letzten Waschschrtes wurde das resultierende Pellet in der Regel wie unter 2.2.4.4 beschrieben in Proteingelladepuffer resuspendiert, 5 min bei 95°C denaturiert und der Überstand nach 1 min Zentrifugation (20000 x g bei 4°C) elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.4.3.1 Ko-Immunpräzipitation

Die Detektion von Protein-Protein Wechselwirkungen wurde mit Hilfe der Ko-Immunpräzipitation durchgeführt. Die Methode basiert auf der Tatsache, dass viele Proteininteraktionen auch nach Zellyse mit nativen Extraktionspuffern weiterhin bestehen bleiben, so dass durch eine Immunpräzipitation das Zielprotein sowie daran assoziierte Proteine spezifisch angereichert werden können. Mittels dieser Methode wurden potentielle Interaktionspartner der Proteine ASK1, CD95, PML und p53 untersucht. Die für die jeweiligen Proteine kodierenden Plasmide wurden dabei wie unter 2.2.3.5 beschrieben in äquimolarem Verhältnis in HEK293-Zellen ko-transfiziert, nach 48 h in dem entsprechenden Extraktionspuffer lysiert und Gesamtproteinextrakte generiert (2.2.4.1). Anschließend wurde eine Immunpräzipitation wie unter 2.2.4.3 beschrieben mit folgenden Parametern durchgeführt:

Zielprotein	Lysepuffer	Proteinmenge	Antikörper	Anzahl der Waschschrte
HA-ASK1	CL1	500µg	Anti-HA	3
p53-GFP	CL2	500µg	Anti-GFP	5
CD95	CL3	450µg	Anti-CD95	3
BFP-PML	CL2	500µg	Anti-GFP	4

Da die Interaktion zwischen Maus IgG und Protein A sehr schwach ist, wurden bei Immunpräzipitationen mit monoklonalen Maus-Antikörpern neben der Protein A-Sepharose Lösung

ein „Kaninchen Anti-Maus“ Kopplungsantikörpers (DakoCytomation) im Verhältnis 1:20 hinzu gegeben. Nach Beendigung der Immunpräzipitation wurden die Proben wie unter 2.2.4.4 beschrieben in Protein-Gelladepuffer resuspendiert, 5 min bei 95°C denaturiert und der Überstand nach 1 min Zentrifugation (20000 x g bei 4°C) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden danach auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und durch Immundetektion (2.2.4.5) auf Ko-immunpräzipitiertes Daxx-Protein hin untersucht.

2.2.4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

In dieser Arbeit wurde die denaturierende diskontinuierliche SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970) angewendet, wobei 6- bis 15%-ige Polyacrylamid-Trenngele nach der Polymerisation mit 5%-igen Sammelgelen überschichtet wurden. Alle Gelelektrophoresen wurden dabei in einem vertikalen System von Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA) durchgeführt. Bei unzureichend hoher Konzentrierung wurden die Proteinsuspensionen vor der elektrophoretischen Auftrennung mit Aceton nach SCOPES (1994) gefällt. Molekulargewichtsbestimmungen erfolgten mit Hilfe des „prestained kaleidoscope markers“ von Biorad Laboratories (München).

Nachfolgend ist die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten dargestellt.

Trenngel:	20-50% (v/v)	Acrylamid-Bisacrylamid-Mix (30%; 37,5:1)	Sammelgel:	17% (v/v)	Acrylamid-Bisacrylamid-Mix (30%; 37,5:1)
	375 mM	Tris/HCl; pH 8,8		125 mM	Tris/HCl; pH 6,8
	0,1% (w/v)	SDS		0,1% (w/v)	SDS
	0,03% (v/v)	TEMED		0,08% (v/v)	TEMED
	0,04% (w/v)	APS		0,1% (w/v)	APS
Elektrophorese-Puffer:	25 mM	Tris	Protein-Gelladepuffer:	100 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	192 mM	Glycin		1 mM	EDTA
	0,1% (w/v)	SDS		12,5% (v/v)	Glycerin
	pH stellt sich auf 8,3 ein			2% (w/v)	SDS
				2% (v/v)	β-Mercaptoethanol
				0,01% (w/v)	Bromphenolblau

Die (gefällten, präzipitierten) Proben wurden mit Protein-Gelladepuffer versetzt, durch Vortexen resuspendiert, 30 s bei 20000 x g zentrifugiert und aufgetragen. Alle Proben wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung 5 min lang im Wasserbad oder in der Mikrowelle bei 95-100°C erhitzt.

Gelfärbung:

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Gel wurden zunächst 15 min in Entfärbelösung fixiert, dann mindestens 15 min in Färbelösung inkubiert und schließlich 2 h in Entfärbelösung entfärbt.

Färbelösung:	50% (v/v)	Methanol	Entfärbelösung :	25% (v/v)	Methanol
	5% (v/v)	Essigsäure		5% (v/v)	Essigsäure
	0,05% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva Blau R 250)			

2.2.4.5 Proteintransfer („Western Blot“)

Unter der Methode „Western Blot“ wird der Elektrotransfer von Proteinen auf einen Träger (z. B. Nitrocellulosemembranen) mit anschließender Detektion (Radioaktivität oder Chemolumineszenz) subsumiert (LOTTSPREICH & ZORBAS, 1998). Der Elektrotransfer, der in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Schleicher und Schuell, Dassel) erfolgte für 1 bis 2 h in einer mit Transfer-Puffer gefüllten, gekühlten Transfer-Kammer von Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA) bei konstanter Spannung von 100 V zwischen zweimal zwei Lagen Filterpapier. Vor jenem Überführen wurden das ungefärbte Gel, das Filterpapier und die Nitrocellulosemembran in Transfer-Puffer getränkt.

Transfer-Puffer:	25 mM	Tris/HCl; pH 7,5
	192 mM	Glyzin
	20% (v/v)	Methanol

Die Effektivität des Transfers wurde durch eine reversible Proteinfärbung (gebrauchsfertige 0,2%-ige Ponceau S-Lösung in 3% TCA von Serva, Heidelberg) auf der Nitrocellulosemembran überprüft.

2.2.4.5.1 Immundetektion von Proteinen

Nach dem Elektrotransfer und der Überprüfung durch die reversible Färbung der geblotteten Proteine mit Ponceau S-Lösung wurde die Nitrocellulosemembran zweimal für 10 min in TBST Puffer gewaschen. Danach erfolgte das Blockieren von freien, unspezifischen Bindestellen auf der Membran durch Inkubation mit Blockierungspuffer für 1 h bei RT worauf sich erneut drei Waschschritte mit TBST für je 10 min anschlossen. Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (vgl. Tab. 2.1.2) für 16 h bei 4°C. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran 1 h lang mit dem spezifischen „horseradish peroxidase“ konjugierten Zweitantikörper in einer 1:5000 (Anti-Maus) bzw. 1:3000 (Anti-Kaninchen) Verdünnung (ebenfalls in Blockierungspuffer) bei RT inkubiert, bevor sich wiederum drei Waschschritte in TBST für je 10 min anschlossen. Anschließend wurden je 2 ml der Detektionsreagenzien I + II aus dem „ECL Western blotting system“ der Firma Roche Diagnostics, das aus dem Peroxidasesubstrat Luminol und einem chemischen Lumineszenzverstärker besteht, direkt auf die Membran pipettiert und diese 1 min in der Lösung geschwenkt. Durch die Peroxidase (konjugiert mit dem Sekundärantikörper) wurde die Oxidation des Substrates Luminol katalysiert, welche in Anwesenheit eines chemischen Verstärkers eine Chemolumineszenz-Reaktion (Enhanced ChemoLuminescence) hervorrief, die durch Exposition auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden konnte.

TBST-Puffer:	100 mM	Tris/HCl; pH 7,5	Blockierungs-		
	150 mM	NaCl	puffer:	3% (w/v)	Milchpulver
	0,2% (v/v)	Tween-20		1% (w/v)	BSA (gelöst in TBST)

2.2.4.6 „Kinase-Assay“

Zur Aktivitätsanalyse von Proteinkinasen wurden radioaktive *in vitro* „Kinase-Assays“ durchgeführt. Hierbei wird die entsprechende Kinase durch Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern angereichert und anschließend in einer Kinase-reaktion mit einem Kinase-spezifischen Peptidsubstrat (vgl. Tab. 2.2.2) in Anwesenheit von [γ -³²P] ATP (Hartmann Analytisch, Braunschweig) inkubiert. Je nach Aktivierungszustand der betreffenden Kinase wird das Substrat phosphoryliert und damit

radioaktiv markiert, was nach elektrophoretischer Auftrennung der Reaktion durch Exponieren des Gels mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

2.2.4.6.1 *In vitro* Phosphorylierung von Peptidsubstraten

Die auf Aktivität bestimmter Kinasen hin zu untersuchenden Zellen wurden geerntet und durch Lyse mit 100–300 µl Puffer KL wurden Proteinextrakte hergestellt (2.2.4.1). 25-100 µg Gesamtprotein wurden daraufhin wie unter 2.2.4.3 beschrieben einer Immunpräzipitation mit dem entsprechend verdünnten Kinase-spezifischen Antikörper unterzogen (vgl. Tab. 2.1.2), wobei die beiden letzten Waschschrte in diesem Fall mit Kinase-Puffer durchgeführt wurden. Anschließend wurde das gewaschene Immunpräzipitat in 15 µl Kinase-Puffer resuspendiert, mit folgendem Ansatz ergänzt und für 30 min bei 37°C inkubiert:

Pipettierschema:	1–2 µg	Peptidsubstrat
	1 µl	[γ - ³² P] ATP (10 mCi/ml)
	ad 15 µl	Kinase-Puffer

Nach Beendigung der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 µl 2fach konzentriertem Protein-Gelladepuffer abgestoppt, danach für 5 min bei 95°C Hitze denaturiert und wie unter 2.2.4.6.2 beschrieben weiter verarbeitet.

Kinase-Puffer:	12,5 mM	MOPS; pH 7,5
	12,5 mM	β-Glyzerolphosphat
	7,5 mM	MgCl ₂
	0,5 mM	EGTA
	0,5 mM	NaF
	0,5 mM	Vanadat

Tab. 2.2.2: Parameter der „Kinase Assays“

Kinase	Expressionslevel	Proteinmenge	IP-Antikörper	Substratmenge
ASK1	überexprimiert (HA-ASK1)	25 µg	Anti-HA (1:150)	2 µg MBP (Sigma)
JNK	Endogen	100 µg	Anti-JNK (1:20)	1 µg GST-c-jun (Santa Cruz)
DAP-Kinase	Endogen	100 µg	Anti-DAP-Kinase (1:20)	2 µg Peptidsubstrat (Tocris Biotrend, Köln)

2.2.4.6.2 Detektion phosphorylierter Peptidsubstrate über γ ³²P-Phosphat

Zur Detektion der *in vitro* phosphorylierten Peptidsubstrate wurde der komplette Kinasereaktionsansatz nach erfolgter Denaturierung (2.2.4.6.1) auf ein 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.4.4). Nach Erreichen der gewünschten Auftrennung wurde die Elektrophorese beendet, das Gel wie unter 2.2.4.4 beschrieben fixiert und mit Coomassie angefärbt. Anschließend wurde das gefärbte Gel zwischen zwei Lagen Filterpapier und Cellophanfolie luftblasenfrei eingebettet und in einem Gelrockner (583 Gel Dryer, Biorad Laboratories) für 1 h bei 80°C getrocknet. Im Anschluss daran konnten γ ³²P-Phosphat markierte Peptidsubstrate durch Exposition mit einem Röntgenfilm und Abgleich mit dem Coomassie gefärbten Gel sichtbar gemacht und identifiziert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur funktionellen Inaktivierung der DAP-Kinase im RCC

Ein ausgewogenes Verhältnis von Proliferation und Apoptose ist entscheidend für einen regelhaften Entwicklungsverlauf mehrzelliger Organismen. Die funktionelle Inaktivierung von pro-apoptotischen Genen wie z.B. *p53* ist mit einer Apoptose-Dysregulation verbunden und kann zu unkontrolliertem Zellwachstum und damit zur Tumorenstehung beitragen (WAGENER, 1999). Wie *p53* sind auch DAP-Kinase und *Daxx* pro-apoptotische Faktoren (YANG et al., 1997; KIMCHI, 1998), dessen Rolle für das humane Nierenzellkarzinom (RCC, renal cell carcinoma) im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Insbesondere sollte überprüft werden, ob eine funktionelle Inaktivierung von *Daxx* und *DAP-Kinase* vorliegt und diese somit potentiell kritische Gene für die Tumorgenese des RCC darstellen. Im Hinblick auf den häufig zu beobachtenden Verlust der DAP-Kinase-Expression in humanen Tumoren (NG, 2002; BIALIK & KIMCHI, 2004) wurde zunächst der Expressionsstatus dieses Gens im humanen RCC analysiert.

3.1.1 Expression der DAP-Kinase-mRNA in humanen RCC-Zelllinien

Für die Analyse der DAP-Kinase-Expression im humanen RCC wurde ein „Real-Time“-RT-PCR Ansatz gewählt, um im Vergleich zur Expression eines so genannten „Housekeeping Gens“ semi-quantitative Aussagen über das mRNA-Expressionsniveau der DAP-Kinase treffen zu können. Zunächst wurde der Expressionsstatus des *DAP-Kinase*-Gens in 20 RCC-Zelllinien untersucht. Hierfür wurde wie unter 2.2.2.6 beschrieben jeweils 1 µg der entsprechenden Gesamt-RNA in cDNA transkribiert und anschließend in einer „Real-Time“-PCR mit DAP-Kinase-spezifischen Primern amplifiziert (vgl. 2.2.2.7.3). Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I interkaliert dabei während der PCR-Reaktionen in die neu synthetisierten, doppelsträngigen DNA-Moleküle, was eine Zunahme der emittierten Fluoreszenz bei 520 nm zur Folge hat, die direkt proportional zur DNA-Menge zum Zeitpunkt der Messung ist. Da es sich bei SYBR Green I um einen Sequenz-unspezifischen Fluoreszenzfarbstoff handelt, dürfen in der PCR keine Konkurrenzprodukte generiert werden, damit die emittierte Fluoreszenz eindeutig mit der Menge an spezifischem PCR-Produkt korreliert werden kann. Die Lage der Primer wurde daher so gewählt, dass sie einen Bereich des Gens verstärken, der für keinen vollständigen funktionellen Proteinbereich der DAP-Kinase kodiert, was die Wahrscheinlichkeit der Amplifikation homologer Gene minimiert. Abbildung 3.1.1. zeigt, dass in allen der 20 untersuchten RCC-Zelllinien ungeachtet ihres histologischen Subtyps die Expression des DAP-Kinase-Transkriptes nachgewiesen werden konnte. Neben HeLa-Zellen (Positivkontrolle) war das DAP-Kinase-Transkript ebenfalls in zwei Gewebeproben nicht-neoplastischen Nierentubulusepithels nachweisbar. Die DAP-Kinase-Transkripte wurden in der PCR zwischen Zyklus 22 und 26 detektiert (vgl. Abb. 3.1.1.B). Die elektrophoretische Auftrennung (vgl. Abb. 3.1.1.A) sowie die Schmelzpunktanalyse der PCR-Reaktion (vgl. Abb. 3.1.1.C) zeigen, dass abgesehen von einer schwachen Primer-Dimer-Bildung, ausschließlich das erwartete, dem DAP-Kinase-Transkript entsprechende 368 bp-Fragment amplifiziert wurde. Durch DNA-Sequenzierung konnte dies eindeutig als DAP-Kinase-Sequenz identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

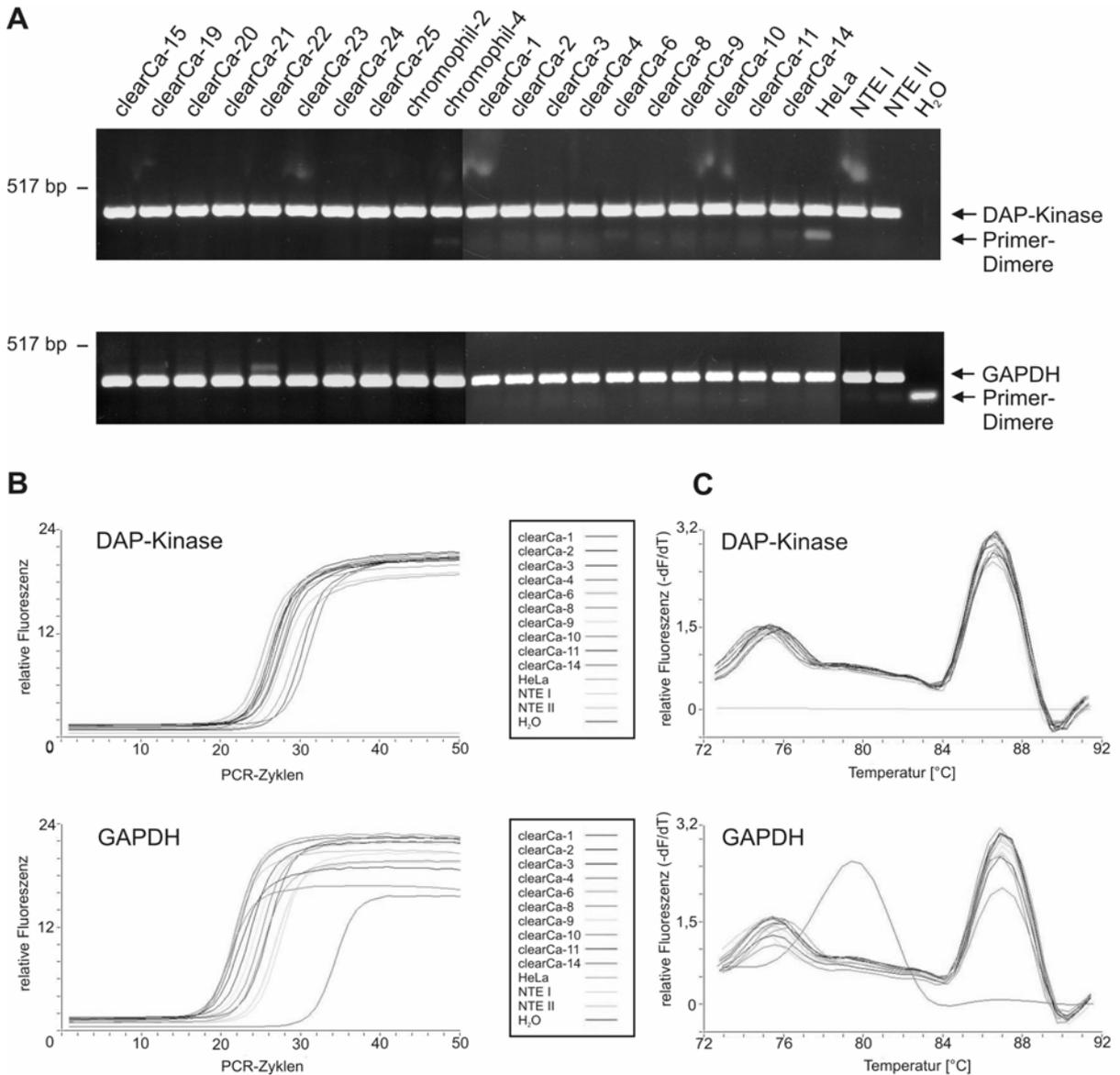


Abb. 3.1.1: Nachweis der DAP-Kinase- und GAPDH-mRNA-Expression in 20 RCC-Zelllinien mittels „Real-Time“-RT-PCR. **A:** Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktion zeigt sowohl für DAP-Kinase als auch für GAPDH distinkte, spezifische Banden der erwarteten Größe von 368 bp für das DAP-Kinase-Transkript und 257 bp für das von GAPDH. Die Amplifikationskurven exemplarischer DAP-Kinase- und GAPDH-PCR-Reaktion (**B**) zeigen den typischen sigmoiden Verlauf, wobei die SYBR Green I-vermittelte Fluoreszenz einmal pro Zyklus gemessen wurde und direkt proportional zur DNA-Menge der entsprechenden Probe zum Zeitpunkt der Messung war. **C:** Die Schmelzpunktanalyse der entsprechenden PCR-Reaktionen liefert ebenfalls diskrete Maxima für das DAP-Kinase-Produkt bei 86,5°C und das GAPDH-Produkt bei 87°C, wobei die Negativkontrolle der GAPDH-PCR ein zusätzliches Maximum bei 79,5°C aufweist, das dem Schmelzpunkt der Primer-Dimere entspricht. Abkürzungen: NTE: Nierentubulusepithel.

Das „Housekeeping-Gen“ *Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)* wurde als nicht reguliertes Referenzgen amplifiziert, das bereits für die relative Quantifizierung und Normalisierung anderer Apoptose-relevanter Faktoren im humanen RCC herangezogen wurde (MAHOTKA et al., 2002; YAN et al., 2004). Die PCR lieferte ebenfalls eine distinkte Bande mit der erwarteten Produktgröße von 257 bp (vgl. Abb. 3.1.1.A), wobei das GAPDH-Transkript zwischen Zyklus 18 bis 24 detektiert werden konnte und einen Schmelzpunkt von 87°C aufweist (vgl. Abb. 3.1.1.B und C). Bei dem Amplifikationsprodukt der GAPDH-Negativkontrolle ab Zyklus 31 handelt es sich um Primer-Dimere, die sich in Größe (ca. 100 bp) und Schmelzpunkt (79,5°C) deutlich von dem spezifischen Produkt

unterscheiden. Da diese erst in späten Phasen der PCR entstehen, die Quantifizierung nach der „second derivative maximum“-Methode aber bereits in der frühen logarithmischen Phase der PCR abläuft, wird die Berechnung der Ausgangsmenge an Transkript durch eventuell zusätzlich gebildete Primer-Dimere nicht beeinflusst (Technical Note No. LC 13/2001, Roche Applied Science).

Die GAPDH-Amplifikation diente zur Normalisierung der DAP-Kinase-PCR, um eventuelle Schwankungen in der Ausgangsmenge an cDNA der verschiedenen Proben zu nivellieren, so dass das Expressionsverhältnis von DAP-Kinase zu GAPDH einen relativen Wert für das DAP-Kinase-Expressionsniveau in der entsprechenden Probe darstellte.

3.1.2 Relative Quantifizierung der DAP-Kinase-mRNA-Expression

Um die semi-quantitative Analyse der DAP-Kinase-mRNA-Expression relativ zur GAPDH-Expression verschiedener Proben aus unterschiedlichen PCR-Ansätzen miteinander vergleichen zu können, war zuvor die Erstellung einer externen Standardkurve notwendig (vgl. Abb. 3.1.2). Diese fungierte als „Kalibrator“ aller PCR-Reaktionen, wodurch eventuelle Schwankungen in der PCR-Dynamik der verschiedenen Ansätze nivelliert werden konnten und diese somit untereinander vergleichbar waren. Zu diesem Zweck wurden GAPDH-PCRs mit einer HeLa-cDNA verschiedener Verdünnungsstufen als „Template“ durchgeführt und daraus eine GAPDH-Standardkurve erstellt. Die Zyklennummer zum Zeitpunkt der Transkriptdetektion, der so genannte „Crossing Point“, wurde dabei logarithmisch gegen den durch die LightCycler Software nach der „second derivative maximum“-Methode errechneten Verdünnungsfaktor (Konzentration) aufgetragen, wobei jeweils 2fach Messungen der einzelnen Verdünnungsstufen durchgeführt wurden. Ein Regressionskoeffizient von $r = -1$ verdeutlicht die logarithmisch-lineare Beziehung zwischen dem berechneten Verdünnungsfaktor der cDNA-Transkripte und des entsprechenden „Crossing Points“ über den dargestellten Konzentrationsbereich von drei Zehnerpotenzen.

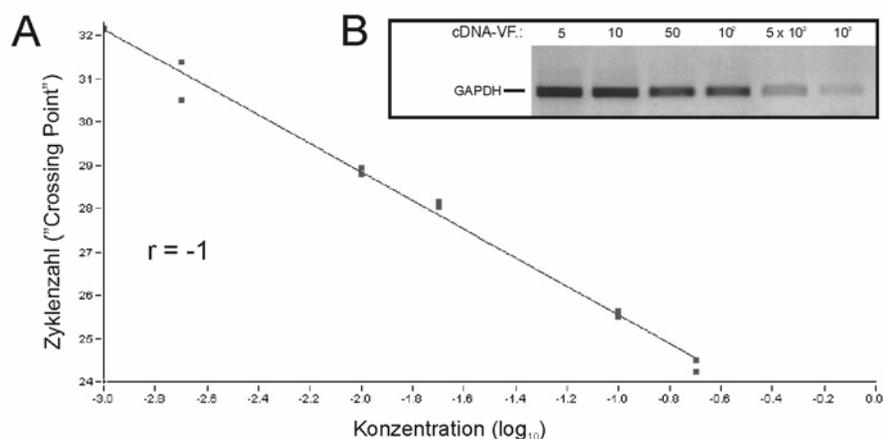


Abb. 3.1.2: Externe GAPDH-Standardkurve zur relativen Quantifizierung und Normalisierung von DAP-Kinase- und GAPDH-Expressionswerten. Sechs Verdünnungsstufen (von 5fach bis 1000fach, jeweils in Duplikaten) einer HeLa-cDNA-Verdünnungsreihe dienten als Matrize für eine GAPDH-Amplifikation mit 35 PCR Zyklen. Die durch die LightCycler Software bestimmten Ausgangsmengen an Transkript entsprechen den jeweiligen Verdünnungsfaktoren und sind im Diagramm logarithmisch gegen den entsprechenden „Crossing Point“ aufgetragen (A). Der Regressionskoeffizient $r=-1$ verdeutlicht den logarithmischen-linearen Zusammenhang zwischen Transkriptmenge und Zyklenzahl. B: Exemplarisch wurde jeweils eine Reaktion der Doppleansätze nach Ende der PCR gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Etidiumbromid gefärbt. Abkürzungen - VF: Verdünnungsfaktor

In allen PCR-Reaktionen zur Detektion von DAP-Kinase- bzw. GAPDH-Transkripten wurden daraufhin zwei Verdünnungsstufen der HeLa-cDNA-Verdünnungsreihe als externe Standards definiert und als „Template“ in separaten GAPDH-PCRs eingesetzt. Auf der Basis dieser Standards wurden (unter der Annahme gleicher PCR-Effizienzen) sowohl die DAP-Kinase- wie auch die GAPDH-Expressionswerte der analysierten Tumorproben auf die externe Standardkurve bezogen. GAPDH-normalisierte DAP-Kinase-Expressionswerte aus verschiedenen Ansätzen waren somit untereinander vergleichbar und konnten statistisch ausgewertet werden.

3.1.3 Die Expression der DAP-Kinase-mRNA in RCC-Primärtumoren

Für die Untersuchung der DAP-Kinase-Expression in Primärtumoren des humanen RCC mittels semi-quantitativer „Real-Time“-RT-PCR standen RNA-Proben aus Nephrektomien von 72 Patienten zur Verfügung. 58 Tumorproben waren vom histologisch klarzelligen Typ, 12 vom chromophil/papillären und zwei vom chromophoben Typ. In Tabelle 3.1.1 ist das Probenkollektiv mit den klinisch-pathologischen Parametern Tumorstadium („Staging“ - pT) und Differenzierungsgrad („Grading“ - G) des Tumors dargestellt. Jeweils 1 µg der entsprechenden RNA wurde zunächst in cDNA transkribiert und anschließend amplifiziert. Alle Werte für die DAP-Kinase-mRNA-Expression wurden gegen die von GAPDH normalisiert und statistisch mit dem Mann-Whitney-Test ausgewertet. In insgesamt 92% (66/72) aller untersuchten RCC-Proben konnte unabhängig vom histologischen Subtyp, dem Differenzierungsgrad und Stadium des Tumors eine DAP-Kinase-mRNA-Expression nachgewiesen werden. In 8% (6/72) der Proben waren auch nach PCR-Zyklus 50 keine DAP-Kinase-mRNA-Transkripte detektierbar. Fünf dieser DAP-Kinase-negativen Tumoren gehörten dem klarzelligen Typ und eine Probe dem chromophil/papillären Typ an, was einem Anteil von 95% (55/58) klarzelliger und 92% (11/12) chromophiler Tumore mit DAP-Kinase-mRNA-Expression entspricht. Die DAP-Kinase-mRNA-Expression konnte bei Tumorproben des pT1-Stadiums durchschnittlich ab PCR-Zyklus 25 detektiert werden, in Proben, die dem pT2-Stadium angehörten durchschnittlich ab Zyklus 32 und in denen des pT3-Stadiums ab PCR-Zyklus 29. In Abbildung 3.1.3 sind repräsentative Amplifikationskurven von Proben unterschiedlicher Stadien dargestellt.

Tab. 3.1.1: Übersicht des Patientenkollektivs. Klinisch-pathologische Parameter wie histologischer Subtyp des Tumors, Tumorstadium (pT) und Differenzierungsgrad (G) der untersuchten RCC sind aufgeführt.

RCC-Typ	Differenzierungsgrad	Tumorstadium
Klarzellig [#] (n = 58)	G1: n = 0	pT1: n = 23
	G2: n = 50	pT2: n = 21
	G3: n = 7	pT3: n = 14
chromophil/papillär (n = 12)	G1: n = 0	pT1: n = 10
	G2: n = 10	pT2: n = 2
	G3: n = 2	pT3: n = 0
chromophob (n = 2)	G1: n = 0	pT1: n = 1
	G2: n = 2	pT2: n = 1
	G3: n = 0	pT3: n = 0
Σ	n = 72	n = 72

[#] Bei einer Tumorprobe des histologisch klarzelligen Typs lagen keine Daten zum Differenzierungsgrad vor, folglich ist die Summe 57.

3.1.3.1 Tumorstadien-abhängige Expression der DAP-Kinase-mRNA im RCC

Für eine Reihe von Genen, die mit der Apoptosebereitschaft von Zellen assoziiert sind, konnte gezeigt werden, dass sich deren Expressionsniveaus im Laufe der Tumorprogression derart verändern, so dass der Tumor einen zunehmend anti-apoptotischen Charakter erhält. Für das RCC ist beispielsweise bekannt, dass die Expression des IAP-Proteins XIAP in späten Tumorstadien signifikant erhöht ist gegenüber der Expression in früheren Tumorstadien (YAN et al., 2004). Die Expression der DAP-Kinase-mRNA wurde daher ebenfalls auf vergleichbare Unterschiede hinsichtlich der Expressionsstärke in unterschiedlichen Tumorstadien klarzelliger RCC untersucht, wobei Tumorproben des Stadiums pT1 und pT2 zusammengefasst und mit der Expression in Proben des Tumorstadiums pT3 verglichen wurden.

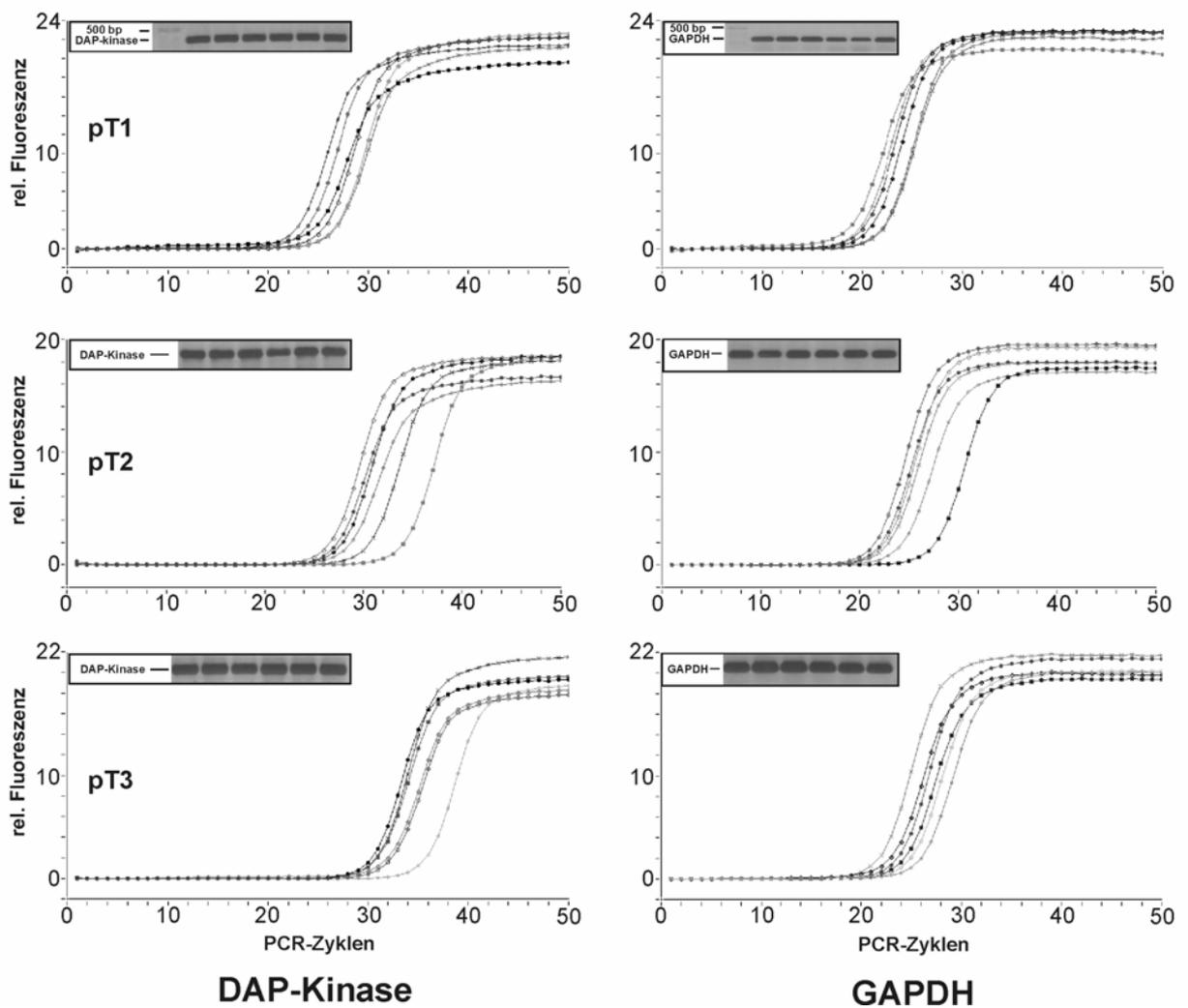


Abb. 3.1.3: Detektion der DAP-Kinase- und GAPDH-Transkripte in RCC-Primärtumoren verschiedener Tumorstadien. Repräsentative DAP-Kinase- und GAPDH-Amplifikationskurven ($n = 6$) für Tumorproben des pT1- (oben), pT2- (Mitte) und pT3-Stadiums (unten). Die SYBR Green I-vermittelte Fluoreszenz wurde einmal pro PCR-Zyklus gemessen und ist an der Y-Achse gegen die Zyklenzahl (x-Achse) aufgetragen. Gleiche Symbole der DAP-Kinase- und GAPDH-Kurven kennzeichnen identische Proben. Die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte wurden anschließend mit Etidiumbromid gefärbt und dokumentieren die Spezifität der PCR (umrahmter Kasten).

Dies erschien sinnvoll, da Tumore der Stadien pT1 und pT2 beide auf die Niere begrenzt sind und sich lediglich in der Größe voneinander unterscheiden ($pT1 \leq 7$ cm; $pT2 \geq 7$ cm), während pT3 Tumore dadurch charakterisiert sind, dass sie bereits eine Infiltration in die perirenale Fettkapsel, die Nebenniere oder Nierenvenen aufweisen und damit ein höheres Potential an Invasivität besitzen (MOSTOFI & DAVIS, 1998; THOENES et al., 1986; SOBIN & WITTEKIND, 1997). Wie aus Abbildung 3.1.4.A ersichtlich, konnte keine signifikante Änderung der GAPDH-normalisierten DAP-Kinase-mRNA-Expression zwischen den zusammengefassten pT1- und pT2-Tumorproben ($n = 44$) und den pT3-Proben ($n = 14$) klarzelliger RCC festgestellt werden ($p = 0,525$). Vergleicht man dagegen die relativen DAP-Kinase-mRNA-Expressionsniveaus aller Tumorstadien untereinander, so wird interessanterweise eine signifikante Abnahme der GAPDH-normalisierten DAP-Kinase-Expression in Tumorproben des pT2-Stadiums erkennbar (vgl. Abb. 3.1.4.B). Unter der Annahme, dass sich ein Tumor aus frühen pT1-Stadien über das Stadium pT2 hin zum pT3-Tumor entwickelt, deutet dies auf eine temporäre Abnahme der DAP-Kinase-Expression während der Tumorentwicklung hin, mit einer erneuter Re-Expression des Gens in späten Phasen der Tumorentwicklung.

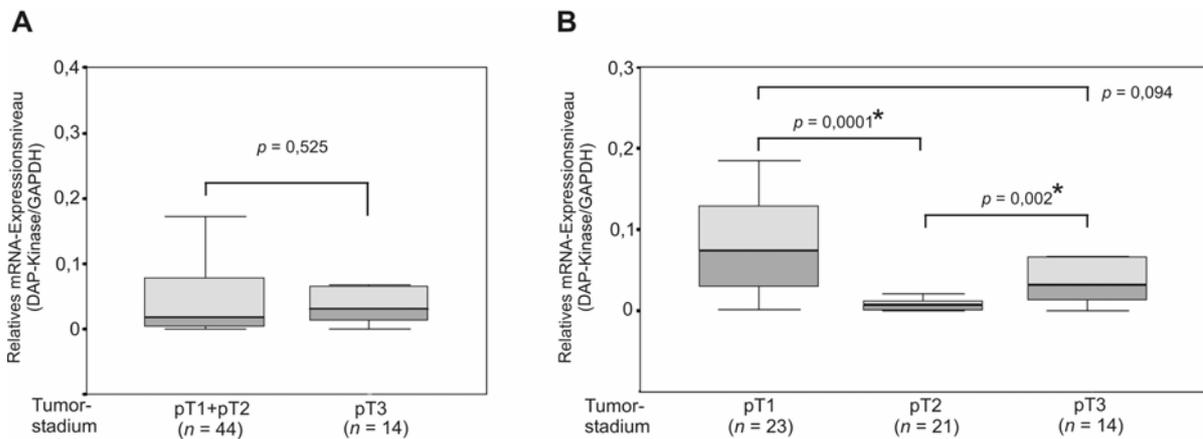


Abb. 3.1.4: DAP-Kinase-mRNA-Expressionsniveaus im Vergleich zwischen verschiedenen Tumorstadien klarzelliger RCC. A: Tumorproben der Stadien pT1 und pT2 zusammengefasst zeigen keine signifikante Änderung der GAPDH-normalisierten DAP-Kinase-mRNA-Expressionsstärken im Vergleich zu pT3-Tumorproben. **B:** Der Vergleich aller Tumorstadien untereinander zeigt ein signifikantes Absinken der relativen DAP-Kinase-Expression in pT2-Tumoren im Vergleich zu Tumoren des pT1-Stadiums ($p = 0,001$) und Tumorproben des pT3-Stadiums ($p = 0,002$). Die statistischen Analysen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test durchgeführt, wobei ein p -Wert $\leq 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet wurde und mit einem Sternchen gekennzeichnet ist (*).

3.1.3.2 Expression der DAP-Kinase-mRNA in histologischen Subtypen des RCC

Die verschiedenen Subtypen des RCC unterscheiden sich in diversen klinisch-pathologischen Parametern wie der Histomorphologie des Tumors, genetische Anomalien oder das Ansprechen auf die Behandlung mit Wachstumsfaktoren (vgl. 1.1). Zudem ist die Aggressivität der Tumore vom histologisch klarzelligem Typ höher als die des chromophil/papillären Typs (GERHARZ et al., 1994; RAMP et al., 2000). Um die Expression der DAP-Kinase in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp des Tumors zu untersuchen, wurden die relativen DAP-Kinase-mRNA-Expressionsniveaus von 23 klarzelliger mit denen von 10 chromophil/papillären Tumorproben verglichen. Da das Probenkollektiv vorwiegend chromophil/papilläre Tumore des Stadiums pT1 umfasste (vgl. Tab. 3.1.1), wurde die Analyse aus Gründen der Vergleichbarkeit ausschließlich mit pT1-Proben durchgeführt. Das Ergebnis

ist in Abbildung 3.1.5 in Form eines Boxplots dargestellt und zeigt, dass hierbei keine signifikanten Unterschiede der DAP-Kinase-Expressionsstärken nachweisbar waren ($p = 0,802$). Aufgrund einer zu geringen Fallzahl an Tumorproben des chromophoben RCC (vgl. Tab. 3.1.1) konnten keine statistischen Analysen zu den Verhältnissen der DAP-Kinase-mRNA-Expression zwischen klarzelligem und chromophoben, sowie zwischen chromophil/papillären und chromophoben Tumormaterial durchgeführt werden.

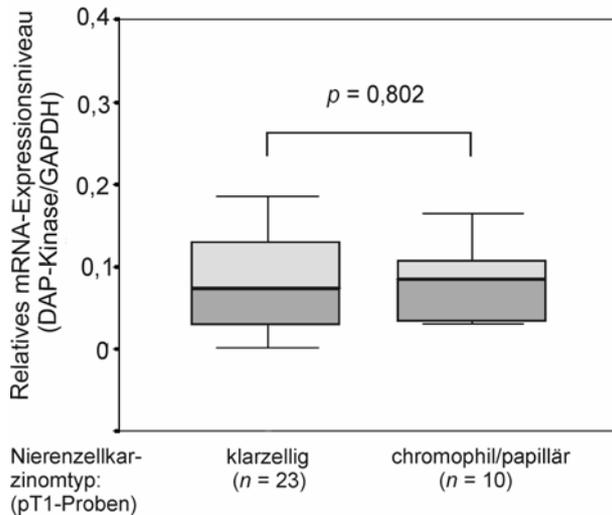


Abb. 3.1.5: Vergleich der relativen DAP-Kinase-mRNA-Expressionsniveaus zwischen klarzelligem und chromophil/papillären RCC. Der p -Wert von 0,802 zeigt, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expressionsstärke der DAP-Kinase-mRNA zwischen 23 RCC des klarzelligen und 10 des chromophil/papillären Typs nachweisbar sind. Für die Analyse wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit nur relative DAP-Kinase-Expressionswerte aus Tumorproben des Stadiums pT1 verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test.

3.1.4 Methylierungsanalyse des *DAP-Kinase*-Promotors im humanen RCC

In den meisten aller bisher untersuchten Tumorarten konnte gezeigt werden, dass die *DAP-Kinase*-Genexpression zu einem erheblichen Anteil durch CpG-Methylierung des *DAP-Kinase*-Promotorbereichs abgeschaltet ist (vgl. 1.6.4). Um zu überprüfen, ob in den 8% (6/72) der RCC ohne nachweisbare DAP-Kinase-mRNA-Expression ebenfalls eine Hypermethylierung des *DAP-Kinase*-Promotors vorliegt, wurden zehn repräsentative Tumorproben der 72 RCC und die jeweils korrespondierenden nicht-neoplastischen Nierentubulusepithelgewebe auf den Methylierungszustand des *DAP-Kinase* Promotors hin untersucht. Hierfür wurde zunächst die genomische DNA aus den Proben extrahiert und nach chemischer Modifikation durch die Behandlung mit Natrium-Bisulfit mittels Methylierungs-spezifischer PCR (MSP) wie unter 2.2.2.7.4 beschrieben analysiert. Aus Gründen des limitierten Probenmaterials waren in den ausgewählten Tumorproben lediglich zwei der insgesamt sechs Proben ohne nachweisbare DAP-Kinase-mRNA-Expression enthalten. Genomische DNA aus HeLa- und Raji-Zelllinien dienten als Positivkontrollen für unmethylierte bzw. methylierte *DAP-Kinase*-Promotorbereiche (KATZENELLENBOGEN et al., 1999). Wie in Abbildung 3.1.6 gezeigt, konnten durch die MSP-Analysen sowohl in den Tumorproben wie auch dem korrespondierenden Normalgewebe ausschließlich unmethylierte Allele des *DAP-Kinase*-Promotors detektiert werden. Selbst in den Tumorproben ohne nachweisbare DAP-Kinase-mRNA-Expression war dies der Fall. Allein in der Raji-Probe war, wie erwartet, eine Methylierung des *DAP-Kinase*-Promotors nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in den 8% der RCC-Proben ohne DAP-Kinase-mRNA-Expression keine CpG-Methylierung des *DAP-Kinase*-Promotors vorliegt und ein anderer Mechanismus für den Verlust der DAP-Kinase-mRNA-Expression in diesen Tumoren verantwortlich zu sein scheint.

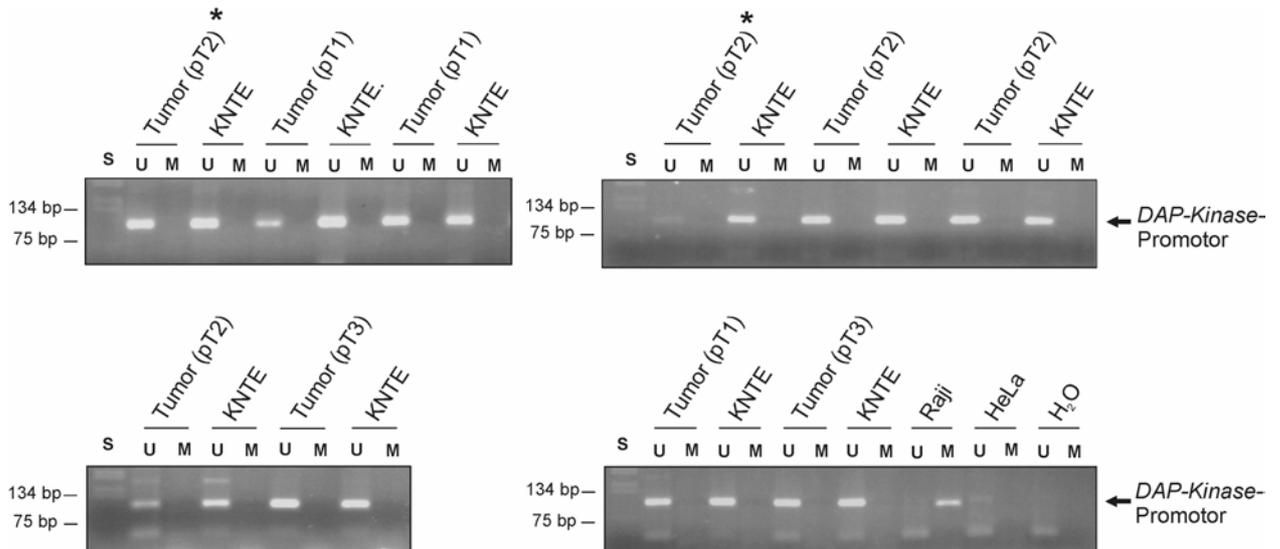


Abb. 3.1.6: MSP-Analyse des *DAP-Kinase*-Promotors in repräsentativen RCC-Proben und korrespondierendem nicht-neoplastischem Normalgewebe. 5 µg genomischer DNA wurden durch Behandlung mit Natrium-Bisulfit chemisch modifiziert und anschließend mit *DAP-Kinase*-Promotor-Methylierungs-spezifischen Primern in einer 40 Zyklen-umfassenden MSP amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem 3,5%-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei Tumor- und korrespondierendes nicht-neoplastisches Nierentubulusepithelgewebe jeweils nebeneinander aufgetragen wurden. DNA-Proben aus Raji- und HeLa-Zellen fungierten als Positivkontrollen für methylierte bzw. unmethylierte *DAP-Kinase*-Promotorbereiche. Das für unmethylierte Promotorsequenzen spezifische PCR-Produkt besitzt eine Größe von 106 bp und das dem methylierten *DAP-Kinase*-Promotor entsprechende Fragment weist eine Größe von 98 bp auf. Die Produkte kleiner als 75 bp sind Primer-Dimere. Tumorproben, in denen durch die „Real-Time“-PCR-Analyse keine Expression der *DAP-Kinase*-mRNA nachgewiesen werden konnte sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. Abkürzungen – S: DNA Standard; U: MSP mit Primern spezifisch für unmethylierte DNA-Bereiche; M: MSP mit Primern spezifisch für methylierte DNA-Bereiche; KNTC: korrespondierendes Nierentubulusepithelgewebe.

3.1.5 *DAP-Kinase*-Proteinexpression im humanen RCC

Um die Ergebnisse der *DAP-Kinase*-mRNA-Expressionsanalyse auf Proteinebene zu verifizieren, wurden zunächst Proteinproben von 12 RCC-Zelllinien aller histologischer Subtypen hergestellt und im „Western Blot“ auf die Expression des *DAP-Kinase*-Proteins untersucht. Wie Abbildung 3.1.7.A zeigt, konnte die spezifische *DAP-Kinase*-Bande mit dem apparenten Molekulargewicht von 160 kDa in 11 der 12 getesteten RCC-Zelllinien detektiert werden. Dies entspricht einem Anteil von 92% und ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus der mRNA-Expressionsanalyse der primären RCC-Proben. Lediglich die Zelllinie chromophob-1 zeigte keine Bande auf der entsprechenden Höhe. Zusätzlich zur spezifischen 160 kDa-Bande war in allen Zelllinien eine weitere Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 100 kDa nachweisbar. Vergleicht man die spezifischen *DAP-Kinase*-Banden der RCC-Zelllinien mit der des HeLa-Proteinextraktes, so ist ein geringer Größenunterschied erkennbar, der bei längerer Auftrennung der Proben in einer 6%-igen SDS-PAGE noch deutlicher ausgeprägt war (vgl. Abb. 3.1.7.B). Um zu überprüfen, ob es sich bei dem kleineren Protein der RCC-Proben tatsächlich um *DAP-Kinase* handelt, wurde eine Immunpräzipitation (IP) von Gesamtprotein der RCC-Zelllinie clearCa-5 mit einem zweiten gegen *DAP-Kinase* gerichteten Antikörper (Santa Cruz) durchgeführt und anschließend in einer 6%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Gesamtprotein des HeLa- und clearCa-5-Rohextraktes wurden als Referenzproben ebenfalls aufgetragen.

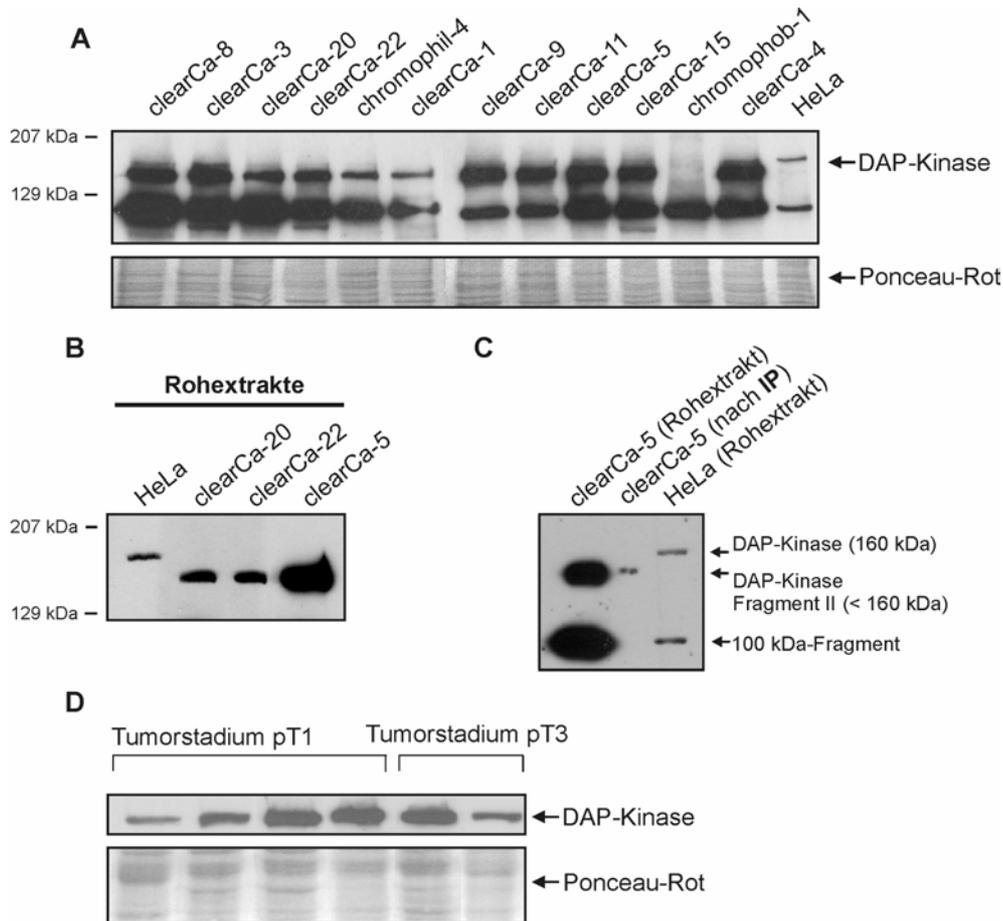


Abb. 3.1.7: DAP-Kinase-Proteinexpression im humanen RCC. **A:** 20 µg Gesamtprotein von 12 verschiedenen RCC-Zelllinien wurden zusammen mit einem Proteinextrakt aus HeLa-Zellen (Positivkontrolle) in einer 8%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ mit einem Anti-DAP-Kinase (Transduction Laboratories) und dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Eine Ponceau-Rot Färbung veranschaulicht, dass vergleichbare Proteinmengen vorlagen. **B:** Detektion der DAP-Kinase nach längerer Auftrennung ausgewählter Proben in einer 6%-igen SDS-PAGE. **C:** Identifizierung der DAP-Kinase-Banden durch Immunpräzipitation. 100 µg Gesamtprotein der RCC-Zelllinie clearCa-5 wurden in einer IP mit einem zweiten Anti-DAP-Kinase Antikörper (Santa Cruz) analysiert. Im „Western Blot“ konnte die kleinere Nierenzellkarzinom-spezifische Bande durch den zuvor eingesetzten Anti-DAP-Kinase Antikörper ebenfalls detektiert werden und somit als DAP-Kinase-Protein identifiziert werden. **D:** Jeweils 100 µg Gesamtprotein sechs primärer RCC (vier des Stadiums pT1 und zwei vom Stadium pT3) wurden im „Western Blot“ exemplarisch auf die DAP-Kinase-Expression hin untersucht. Eine Ponceau-Rot Färbung verdeutlicht vergleichbare Proteinladungsmengen.

Im „Western Blot“ wurden die Proben mit dem nicht in der IP verwendeten Anti-DAP-Kinase Antikörper (Transduction Laboratories) und dem entsprechenden Sekundärantikörper analysiert. Wie in Abbildung 3.1.7.C dargestellt, konnte die kleinere Bande auch im Immunpräzipitat nachgewiesen und somit als DAP-Kinase-spezifische Bande identifiziert werden. Die zuvor im Rohextrakt zusätzlich detektierte Bande mit dem apparenten Molekulargewicht von 100 kDa konnte dagegen nicht detektiert werden, was auf eine unspezifische Bindung des im „Western Blot“ verwendeten Antikörpers hindeutet. Exemplarisch wurde die DAP-Kinase-Proteinexpression darüber hinaus in sechs Proben des Primärtumorkollektivs untersucht, zwei des Stadiums pT1 und vier des pT3-Stadiums. (vgl. Abb. 3.1.7.D). In allen Proben konnte dabei eine DAP-Kinase-Proteinexpression nachgewiesen werden. Zusammen mit den Ergebnissen zur DAP-Kinase-Proteinexpression in den RCC-Zelllinien untermauert dies die Daten der mRNA-Expressionsanalyse sowie die der Methylierungsanalyse des

DAP-Kinase-Promotors und deutet auf eine Aufrechterhaltung der *DAP-Kinase*-Expression im humanen RCC hin.

3.1.6 Der Aktivitätszustand der *DAP-Kinase* im RCC

Da alle bisher dargestellten Ergebnisse auf eine Beibehaltung der *DAP-Kinase*-Expression im humanen RCC hindeuten, wurde mit Hilfe eines *in vitro* „Kinase-Assays“ der basale Aktivitätszustand des Proteins in 11 *DAP-Kinase*-exprimierenden RCC-Zelllinien (vgl. Abb. 3.1.7) untersucht. Zur spezifischen Anreicherung des *DAP-Kinase*-Proteins wurde Gesamtprotein der jeweiligen unter Normalbedingungen kultivierten RCC-Zelllinie mit einem Anti-*DAP-Kinase* Antikörper immunpräzipitiert, aufgereinigt und anschließend wie unter 2.2.4.6.1 beschrieben in einer Kinasereaktion auf die enzymatische Aktivität hin analysiert. Wie in Abbildung 3.1.8.A dargestellt, konnte lediglich in der RCC-Zelllinie *clearCa-1* eine basale Aktivität der *DAP-Kinase* nachgewiesen werden. In zehn der elf getesteten Zelllinien war keine Kinaseaktivität des Proteins detektierbar.

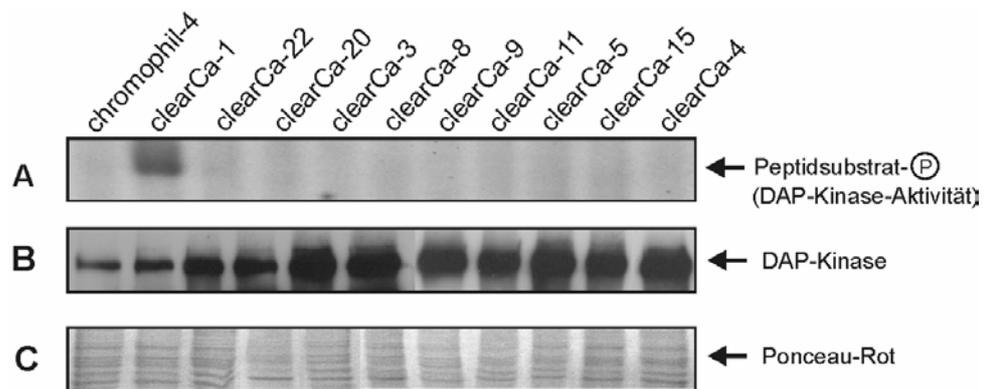


Abb. 3.1.8: Detektion der basalen *DAP-Kinase*-Aktivität in 11 humanen RCC-Zelllinien. **A:** „Kinase-Assay“. 100 µg Gesamtprotein der jeweiligen RCC-Zelllinie wurden mit einem *DAP-Kinase*-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und anschließend mit radioaktivem [γ - 32 P]-ATP und dem *DAP-Kinase*-Peptidsubstrat (Tocris, Köln) inkubiert. Die kompletten Reaktionsansätze wurden durch eine 12%-ige SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und nach Trocknen des Gels wurden die phosphorylierten Substrate autoradiographisch detektiert. Aus Gründen der Übersicht sind die „Western Blot“ Daten zum Expressionsnachweis der *DAP-Kinase* zusätzlich mit aufgeführt (**B**). Eine Ponceau-Rot Färbung diente als Nachweis, dass vergleichbare Proteinmengen vorlagen (**C**).

3.1.7 *DAP-Kinase*-Expression in mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Neben dem RCC wurde die *DAP-Kinase*-mRNA- und -Proteinexpression auch in humanen nicht-neoplastischen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) untersucht. Die darin enthaltenen T-Zell-Lymphozyten, lassen sich durch die Behandlung mit mitogenen Substanzen wie zum Beispiel Concanavalin A (Con A) zur Zellproliferation stimulieren und stellen als Zellkulturmodell damit im Vergleich zu den malignen, entartet-proliferierenden Tumorzellen ein physiologisch-proliferierendes Zellsystem dar (FUKUDA et al., 2002). Für die Analyse der *DAP-Kinase*-Expression in ruhenden und stimulierten Lymphozyten wurden PBMCs aus Vollblutkonserven von vier verschiedenen, nicht miteinander verwandten Spendern isoliert. Ein Teil der ruhenden Zellen wurde direkt als unstimulierte Fraktion geerntet, die restlichen Zellen wurden mit 10 µg/ml Con A

versetzt, für 6 bis 10 Tage kultiviert und nach Einsetzen der Proliferation, ebenfalls geerntet. Die Analyse zur DAP-Kinase-mRNA-Expression wurde mit Hilfe der RT-PCR durchgeführt. Wie Abbildung 3.1.9 zeigt, konnte in den jeweils ruhenden PBMCs aller vier Spender eine deutliche Expression der DAP-Kinase-mRNA nachgewiesen werden. Eine Amplifikation des „Housekeeping-Gens“ *GAPDH* diente als Abgleich um Schwankungen innerhalb der cDNA-Synthese zu nivellieren. Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten zeigt vergleichbare Werte für die GAPDH-normalisierten DAP-Kinase-mRNA-Expressionswerte in allen vier Spendern. Interessanterweise wurde in den zur Proliferation stimulierten PBMCs bei konstanter GAPDH-Expression eine deutlich verringerte DAP-Kinase-Expression detektiert. Im Vergleich zur jeweils unstimulierten Fraktion entsprach das einer Abnahme der GAPDH-normalisierten DAP-Kinase-Expression um Faktoren zwischen 6,9 (Spender I) und 13,3 (Spender II).

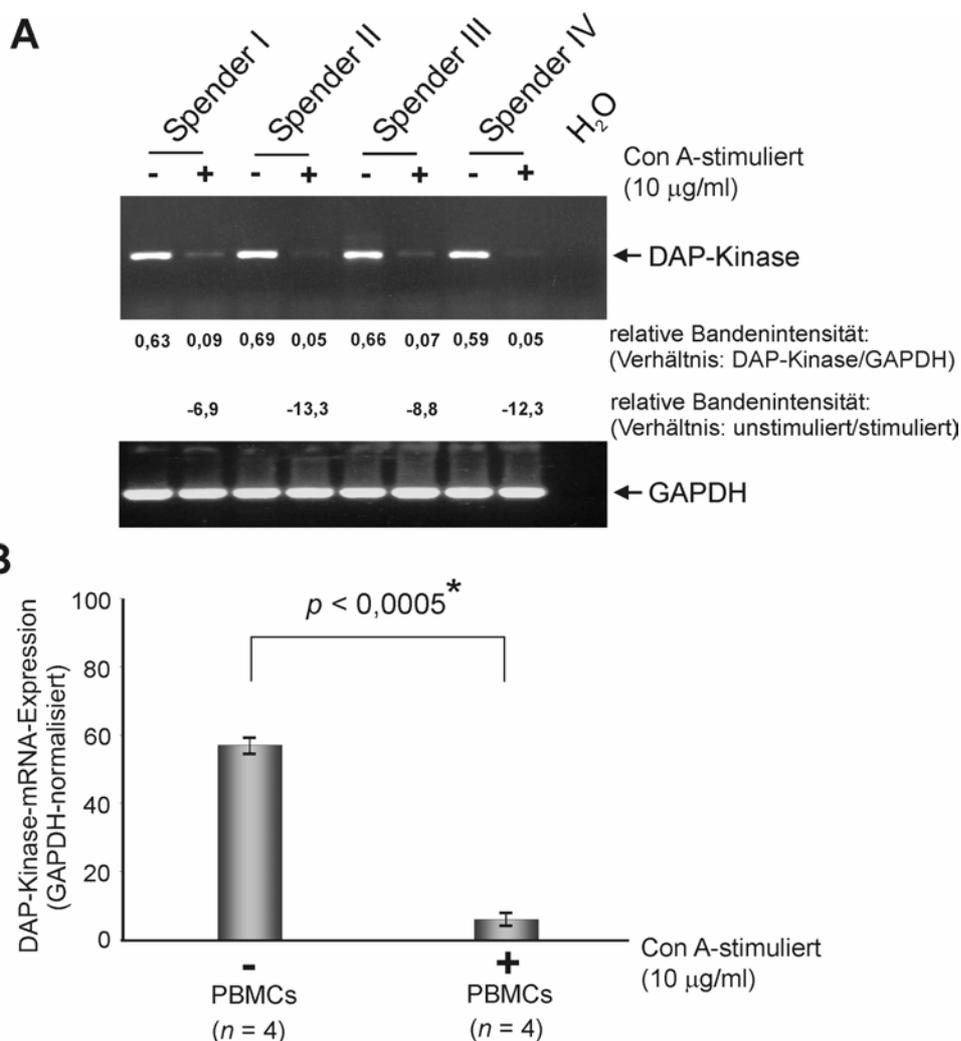


Abb. 3.1.9: Detektion der DAP-Kinase-mRNA-Expression in ruhenden und Con A-stimulierten mononukleären Zellen. **A:** Jeweils 1 μ g RNA von unstimulierten bzw. Con A-stimulierten PBMCs vier verschiedener Spender wurde in cDNA transkribiert und in einer 30 Zyklen-umfassenden PCR mit DAP-Kinase- und GAPDH-spezifischen Primern amplifiziert. Die PCR-Reaktionen wurden anschließend auf einem 1,5%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und lieferten distinkte Banden mit den Größen 496 bp für DAP-Kinase und 210 bp für GAPDH. Alle Bandenintensitäten wurden densitometrisch ausgewertet. Die Verhältnisse der GAPDH-normalisierten DAP-Kinase-Expressionsniveaus von unstimulierten und stimulierten Proben sind zur Veranschaulichung der Expressionsabnahme als Negativwerte dargestellt. **B:** Balkendiagrammdarstellung der Mittelwerte aller GAPDH-normalisierten DAP-Kinase-Expressionsniveaus inklusive der Standardabweichung. Die Statistik wurde mit Hilfe des Student's t-Test durchgeführt, wobei ein p -Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet wurde und mit einem Sternchen gekennzeichnet ist (*). Abkürzung – Con A: Concanavalin A

Die statistische Analyse der mittleren DAP-Kinase-Expressionsänderung aller vier Spender belegt durch einen p-Wert $< 0,0005$, dass die beobachtete Abnahme der DAP-Kinase-Expression hoch signifikant war (vgl. Abb. 3.1.9.B). Da die Expressionsänderung in den PBMCs aller vier Spender zu beobachten war, sind Spender-spezifische Effekte als Ursache hierfür auszuschließen. Um die DAP-Kinase-mRNA-Expressionsdaten auf Proteinebene zu verifizieren, wurden „Western Blot“-Analysen mit Gesamtprotein der unstimulierten und stimulierten PBMC-Proben durchgeführt. Abbildung 3.1.10 zeigt, dass auch auf Proteinebene eine Abnahme der DAP-Kinase-Expression in den stimulierten PBMCs zu verzeichnen war. Interessanterweise war gerade in den unstimulierten Proben, die auf mRNA-Ebene eine schwächere DAP-Kinase-Expression zeigten, eine stärkere Expression auf Proteinebene vorhanden (vgl. Abb. 3.1.9/10 Spender I und IV). Die DAP-Kinase-Expression in den unstimulierten Proben von Spender II und III war auf Proteinebene dagegen nur sehr schwach erkennbar. Neben der DAP-Kinase-Expression wurde ebenfalls die Expression von Survivin untersucht. Survivin ist ein Mitglied der IAP-Familie, das Zellzyklus-abhängig exprimiert wird und als Proliferationsmarker eingesetzt werden kann (FUKUDA et al., 2002). Wie erwartet war in allen Concanavalin A-stimulierten Proben eine deutliche Zunahme der Survivin Expression zu verzeichnen, was die Proliferationsaktivität in den Mitogen-stimulierten PBMCs belegt. DAP-Kinase und Survivin werden hier gegenläufig exprimiert, was für DAP-Kinase im Gegensatz zu Survivin auf eine Proliferations (und evtl. Differenzierungs)-gekoppelte Suppression der Expression hindeutet (vgl. Abb. 3.1.10).

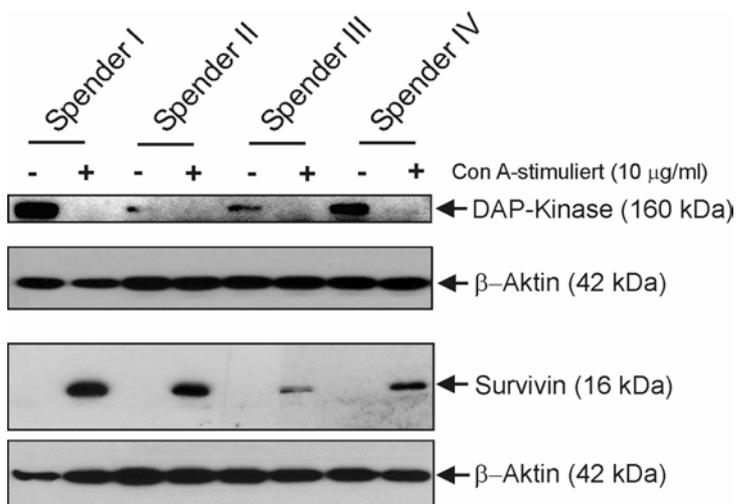


Abb. 3.1.10: DAP-Kinase-Protein-expression in unstimulierten und Mitogen-aktivierten PBMCs. Jeweils 30 μg Gesamtprotein der PBMCs wurden durch eine 8%-ige SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ auf die Expression von DAP-Kinase, Survivin und β -Aktin hin analysiert. Die Detektion von Survivin diente als Proliferationsnachweis der Con A-stimulierten PBMCs und die Detektion von β -Aktin wurde zur Veranschaulichung vergleichbarer Proteinladungsmengen eingesetzt. Abkürzungen – Con A: Concanavalin A.

3.1.7.1 Methylierungsanalyse des *DAP-Kinase*-Promotors in mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die Ergebnisse aus der DAP-Kinase-Expressionsanalyse in unstimulierten und Mitogen-stimulierten PBMCs lieferten Hinweise für eine Proliferations-bedingte Abnahme bzw. Abschaltung der *DAP-Kinase*-Genexpression. Es wurde daher der Methylierungszustand des *DAP-Kinase*-Promotors in ruhenden und zur Proliferation stimulierten PBMCs untersucht, um zu überprüfen, ob eine DNA-Methylierung im *DAP-Kinase*-Promotorbereich für die Abschaltung der Genexpression in stimulierten PBMCs verantwortlich sein kann. Exemplarisch wurde hierfür die genomische DNA aus stimulierten

und unstimulierten PBMCs zweier weiterer Spender isoliert und nach Natrium-Bisulfit-Modifikation mittels MSP auf den Methylierungszustand des *DAP-Kinase*-Promotors analysiert. Abbildung 3.1.11 zeigt, dass sowohl in den unstimulierten wie auch stimulierten Proben jeweils ausschließlich unmethylierte Allele der *DAP-Kinase*-Promotorregion detektiert werden konnten, was auf einen Methylierungs-unabhängigen Mechanismus zur Regulation der *DAP-Kinase*-Expression hinweist. Aufgrund der limitierten Fallzahl der Proben ist allerdings lediglich eine tendenzielle Aussage hierzu möglich. Wie bereits für die MSP-Untersuchung der primären Nierezellkarzinomproben diente genomische DNA der Zelllinien Raji und HeLa als Positivkontrollen für methylierte bzw. unmethylierte *DAP-Kinase*-Promotorbereiche, und lieferten die jeweils erwarteten Ergebnisse.

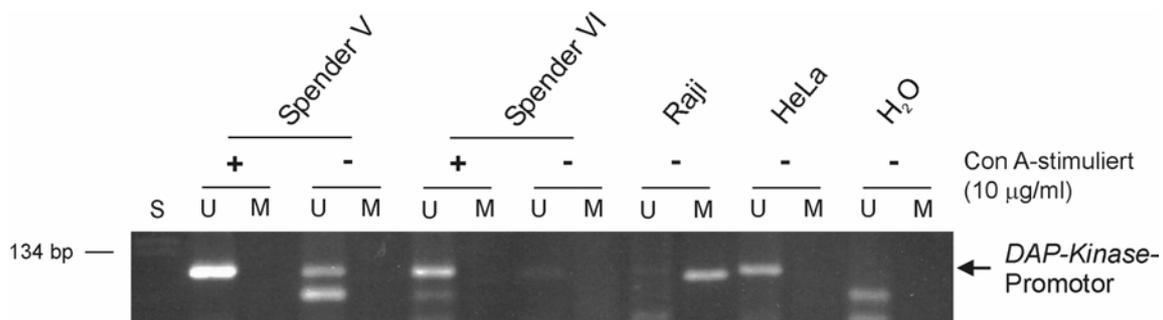


Abb. 3.1.11: MSP-Analyse des *DAP-Kinase*-Promotors in stimulierten und unstimulierten PBMCs. 5 µg genomischer DNA wurden durch Behandlung mit Natrium-Bisulfit chemisch modifiziert, anschließend mit *DAP-Kinase*-Promotor-Methylierungs-spezifischen Primern in einer 40 Zyklen-umfassenden MSP amplifiziert und die PCR-Produkte auf einem 3,5%-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Genomische DNA von Raji- und HeLa-Zellen fungierte dabei als Positivkontrolle für methylierte bzw. unmethylierte *DAP-Kinase*-Promotorbereiche. Das für unmethylierte Promotorsequenzen spezifische PCR-Produkt besitzt eine Größe von 106 bp und das dem methylierten *DAP-Kinase*-Promotor entsprechende Fragment weist eine Größe von 98 bp auf. Abkürzungen – Con A: Concanavalin A; S: DNA-Standard; U: MSP mit Primern spezifisch für unmethylierte DNA-Bereiche; M: MSP mit Primern spezifisch für methylierte DNA-Bereiche.

3.1.8 Analyse des Survivin/*DAP-Kinase*-Expressionsverhältnisses im RCC

Die Apoptosebereitschaft einer Zelle wird entscheidend durch das Verhältnis von pro- zu anti-apoptischen Faktoren bestimmt. Hohe Expressionslevel des anti-apoptischen Proteins c-FLIP im Verhältnis zum direkten Interaktionspartner Caspase-8 sind beispielsweise mit einer zunehmenden Resistenz gegenüber der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose im Blasenkarzinom verbunden (JONSSON et al., 2003). Außerdem konnte für das RCC ein im Laufe der Tumorprogression steigendes Ungleichgewicht der Expressionsniveaus von XIAP und Smac/DIABLO gezeigt werden (YAN et al., 2004). Darüber hinaus kann auch das Verhältnis von pro- und anti-apoptischen Proteinen, die nicht direkt miteinander assoziiert sind oder sich direkt antagonistisch beeinflussen von prognostischer Bedeutung sein, wie für die Survivin Expression im Verhältnis zur Expression des CD95-Rezeptors im Neuroblastom und manchen pädiatrischen Tumoren gezeigt werden konnte (SANDLER et al., 2002; TAKAMIZAWA et al., 2001).

Da die Ergebnisse zur *DAP-Kinase*-Expression in ruhenden bzw. Mitogen-aktivierten PBMCs für eine antagonistisch regulierte Expression der pro-apoptischen *DAP-Kinase* und des anti-apoptischen Proteins Survivin während der Zellproliferation sprechen, wurde das Verhältnis der jeweils GAPDH-normalisierten Survivin- und *DAP-Kinase*-mRNA-Expressionsniveaus in unterschiedlichen Stadien

von klarzelligen RCC-Proben untersucht (die entsprechenden Werte für die Survivin-Expressionsniveaus wurden mir freundlicherweise von Herrn Thomas Krieg zur Verfügung gestellt). Hierfür wurden die Expressionsratios von neun pT1-Tumorproben mit denen von 12 Tumorproben des pT3-Stadiums verglichen. Aufgrund der drastischen Abnahme der DAP-Kinase-Expressionswerte in Tumorproben des pT2-Stadiums (vgl. Abb. 3.1.4) wurden diese in die Analyse nicht miteinbezogen. Wie in Abbildung 3.1.12 dargestellt, ist hierbei eine hochsignifikante Zunahme der Survivin-mRNA-Expression im Verhältnis zur DAP-Kinase-mRNA-Expression im pT3-Stadium erkennbar ($p = 0,006$), was auf eine Zunahme des anti-apoptotischen Charakters von Tumoren in fortgeschrittenen Stadien hindeutet. Da die Apoptoseresistenz eines Tumors vielfach mit einer Dysregulation der Proliferation verbunden ist (WAGENER, 1999), spiegelt das geänderte Survivin/DAP-Kinase-Verhältnis in den fortgeschrittenen RCC auch die in den PBMCs beobachtete antagonistisch regulierte Expression von Survivin und DAP-Kinase wider, wonach in proliferierenden Zellen die DAP-Kinase-Expression ab- und die Survivin-Expression zunimmt.

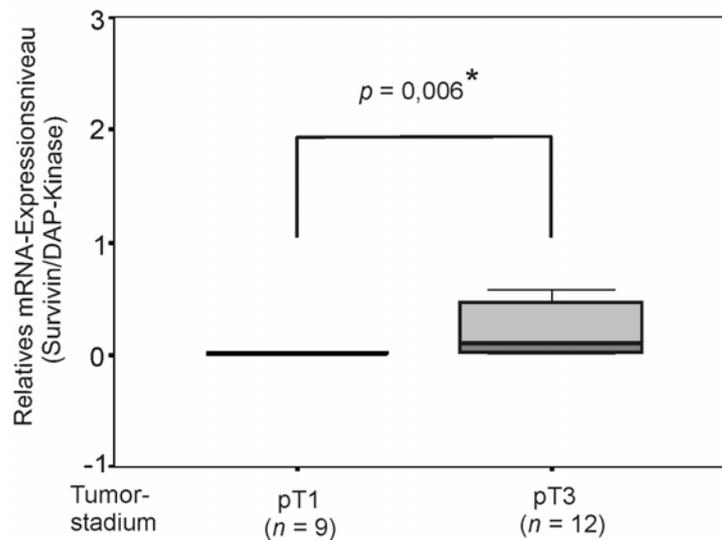


Abb.3.1.12: Survivin/DAP-Kinase-mRNA-Expressionsratios im Vergleich zwischen klarzelligen Nierenzellkarzinomen des pT1- und pT3-Stadiums. Die jeweils GAPDH-normalisierten DAP-Kinase- und Survivin-Expressionswerte von 9 pT1- und 12 pT3-Proben wurden analysiert. Der p -Wert von 0,006 zeigt, dass die Survivin-mRNA-Expression im Verhältnis zur DAP-Kinase-mRNA-Expression signifikant ansteigt (gekennzeichnet durch *). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test.

3.2 Untersuchungen zur funktionellen Inaktivierung des *Daxx*-Gens im humanen RCC

Neben der Analyse zur Expression und funktionellen Inaktivierung des pro-apoptotischen *DAP-Kinase*-Gens wurde auch die funktionelle Bedeutung des Apoptose-relevanten Faktors *Daxx* im humanen Nierezellkarzinom untersucht. Da auch *Daxx* einen pro-apoptotischen Faktor darstellt, indem es bspw. als Verstärker der CD95-abhängigen Apoptose fungiert (YANG et al., 1997; CHANG et al., 1998; CHARETTE et al., 2000) wurde untersucht, ob im RCC eine funktionelle Inaktivierung des *Daxx*-Gens vorliegt, welche möglicherweise zu einer Fehlregulation der Apoptose in diesem Tumor beitragen könnte.

3.2.1 Expression von *Daxx* in humanen RCC-Zelllinien

Analog zu den *DAP*-Kinase-betreffenden Untersuchungen wurde mittels RT-PCR zunächst der *Daxx*-Expressionsstatus im humanen RCC anhand von 22 RCC-Zelllinien histologisch-unterschiedlicher Subtypen analysiert. Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde zunächst in cDNA transkribiert und anschließend in einer PCR mit *Daxx*-spezifischen Primern amplifiziert. Als nicht reguliertes „Housekeeping-Gen“ wurde *GAPDH* amplifiziert. Wie in Abbildung 3.2.1 dargestellt, konnte in 20 der 22 getesteten RCC-Zelllinien das dem *Daxx*-Transkript entsprechende 316 bp-Fragment detektiert werden, welches durch DNA-Sequenzierung schließlich als *Daxx*-Sequenz identifiziert wurde (Daten nicht gezeigt). Neben dem erwarteten *Daxx*-Fragment trat in nahezu allen Proben eine weitere Bande, unterhalb der 200 bp-Marke auf. In den Zelllinien clearCa-6, -20, -21 und chromophil-4 sowie einer RCC-Zelllinie unbekannter Histologie, war darüber hinaus noch eine weitere, darunter liegende Bande sichtbar.

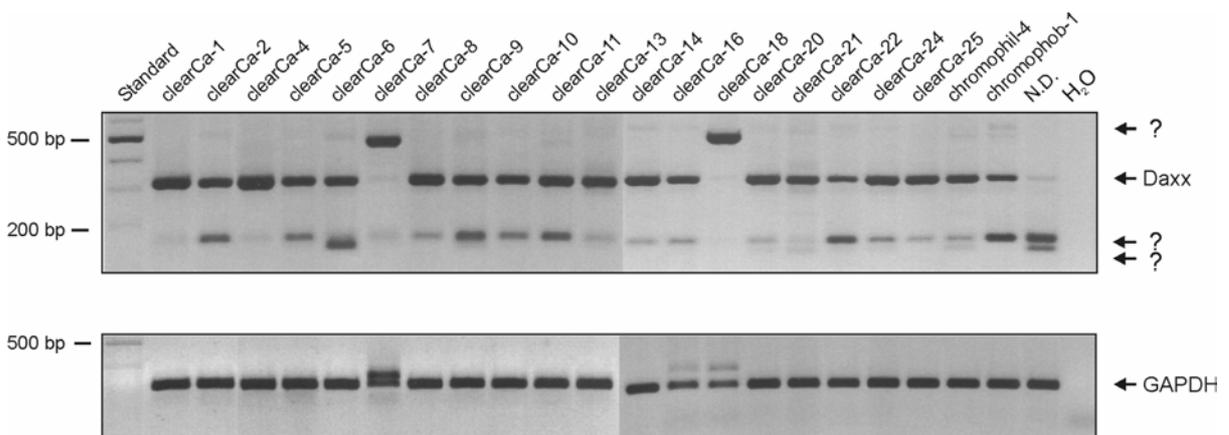


Abb. 3.2.1: *Daxx*-mRNA-Expression in 22 verschiedenen RCC-Zelllinien. Jeweils 1 µg RNA wurde in cDNA transkribiert und daraufhin in einer 50 Zyklen-umfassenden „Real-Time“-PCR mit *Daxx*-spezifischen Primern amplifiziert. *GAPDH* wurde in einer separaten PCR als Referenzgen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2,5%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die PCR mit den *Daxx*-spezifischen Primern lieferte ein 316 bp-Produkt und die *GAPDH*-PCR lieferte ein Fragment von 257 bp. Zu dem histologischen Subtyp einer RCC-Zelllinie lagen keine Daten vor (N.D.: nicht determiniert).

Die Zelllinien clearCa-7 und -18 wiesen anstelle des 316 bp-Fragments eine dominante Bande mit einer apparenten Größe von ca. 500 bp auf. Die Tatsache, dass eine Amplifikation von genomischer DNA einem 476 bp-Produkt entsprechen würde (NCBI AccNr.: Z97183) und die Beobachtung, dass in den korrespondierenden GAPDH-PCRs der clearCa-7- und clearCa-18-Probe neben dem erwarteten 257 bp-Fragment ebenfalls ein weiteres, größeres Fragment amplifiziert wurde, deuteten daraufhin, dass in diesen Proben eine Kontamination mit genomischer DNA vorgelegen haben könnte und es sich bei den zusätzlich detektierten Banden um DNA-basierte Amplifikationsprodukte handelte. Zur Überprüfung wurden daher Kontroll-PCRs mit Daxx-spezifischen Primern durchgeführt, in denen genomische DNA analysiert wurde. Um statistisch Patienten-spezifische Effekte bzw. Unterschiede aufgrund der Entartung des Gewebes als Ursachen für das Auftreten von zusätzlichen Banden ausschließen zu können, wurden DNA-Proben von neun verschiedenen Nierentumoren und den jeweils korrespondierenden, nicht-neoplastischen Nierentubulusepithelgeweben untersucht. In allen PCR-Reaktionen konnte lediglich eine distinkte Bande mit der erwarteten Fragmentgröße von 476 bp detektiert werden (vgl. Abb. 3.2.2), die den beobachteten Banden in den Proben clearCa-7 und -18 entspricht und diese demnach als „genomischen Ursprungs“ identifiziert. Die entsprechenden RNA-Proben wurden somit als „DNA-kontaminiert“ identifiziert, so dass die Ergebnisse bezüglich der Daxx-Expression für die Zelllinien clearCa-7 und -18 nicht aussagekräftig waren. Die in der RT-PCR zusätzlich aufgetretenen Banden unterhalb der 200 bp-Markerbande wurden in der Kontroll-PCR nicht detektiert und schienen somit keine DNA-basierten Amplifikationsprodukte darzustellen.

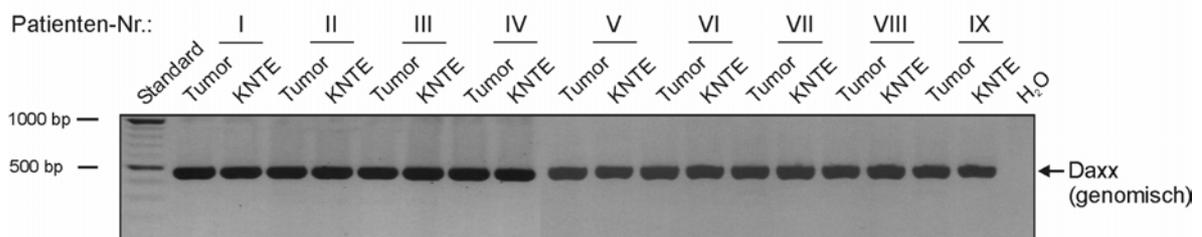


Abb. 3.2.2: PCR mit Daxx-spezifischen Primern zur Detektion von DNA-basierten Amplifikationsprodukten. Jeweils 300 ng genomischer DNA von neun verschiedenen primären RCC-Proben und den entsprechenden nicht-neoplastischen Nierentubulusepithelgeweben wurden in einer 50 Zyklen-umfassenden „Real-Time“-PCR mit Daxx-spezifischen Primern amplifiziert, anschließend auf einem 1,5%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die PCR mit genomischer DNA als „Template“ lieferte ein distinktes 476 bp-Fragment. Jeweils korrespondierendes Tumor- und nicht-neoplastisches Nierentubulusepithelgewebe eines Patienten wurden nebeneinander aufgetragen (symbolisiert durch einen Querbalken). Abkürzung – KNTE: korrespondierendes nicht-neoplastisches Nierentubulusepithelgewebe.

3.2.2 Identifizierung der Daxx-Spleißvarianten Daxx- β und Daxx- γ

Die DNA-Sequenzanalyse der zwei kleineren (< 200 bp) in der RT-PCR amplifizierten Fragmente ergab, dass es sich bei beiden Produkten um eine Daxx-mRNA-Sequenz handelte, wobei im Falle des kleineren Fragmentes die ersten 170 nt des Exon 6 Bereichs deletiert sind und im Falle des größeren Fragmentes die ersten 18 nt von Exon 6 erhalten sind und die folgenden 152 nt fehlen. Die Größen der beiden PCR-Produkte entsprechen somit 146 bp bzw. 164 bp (vgl. Abb. 3.2.1). Das dem größeren Fragment entsprechende Transkript wird im Folgenden Daxx- β und das zum kleineren Fragment

korrespondierende Transkript wird Daxx- γ genannt. Der Verlust von Teilen des Exon 6 innerhalb der mRNA-Sequenz weist auf alternatives Spleißen der Daxx-prä-mRNA hin. Mit Hilfe der NetGene2 Software wurde die genomische Sequenz von *Daxx* auf das Vorkommen potentieller „kryptischer“ Spleißdonor- und - Akzeptorstellen in Exon 6 überprüft.

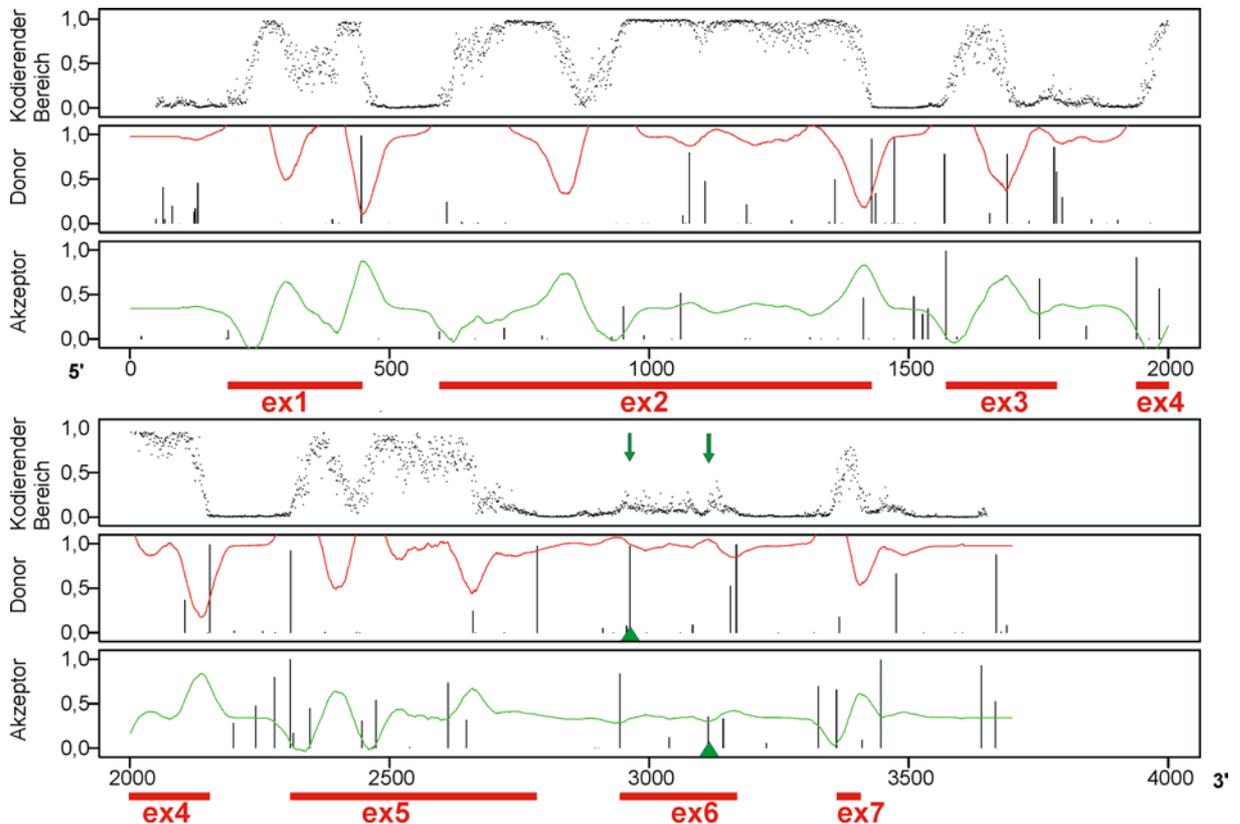


Abb. 3.2.3: Ergebnis der NetGene2-Analyse potentieller Spleißdonor- und Akzeptorstellen innerhalb des *Daxx*-Gens. Der obere Kasten zeigt die Wahrscheinlichkeit einer kodierenden Region an, wobei Werte um 1 einer hohen Wahrscheinlichkeit entsprechen. Der mittlere und der untere Kasten zeigen jeweils die Übereinstimmung der entsprechenden Sequenz mit den Konsensussequenzen für Spleißdonor- und -akzeptorstellen an, wobei die roten und grünen Kurven dem jeweiligen 90%-igen Schwellenwert entsprechen. Die reguläre Exon (Ex)-Abfolge ist in 5' → 3' Richtung durch rote Querbalken dargestellt. Die grünen Pfeile demonstrieren die in Daxx- β und Daxx- γ verwendeten kryptischen Spleißdonor- und -Akzeptorstellen.

Die Analyse zeigt, dass die in Daxx- β fehlende 152 nt-umfassende Sequenz des Exon 6 von potentiellen Spleißdonor- und -akzeptorstellen flankiert wird (vgl. Abb. 3.2.3), die, obwohl die kryptische Spleißdonorstelle knapp unterhalb des 90%-igen Schwellenwertes liegt, mit der Konsensussequenz herkömmlicher Spleißdonor- ($\{C/A\}$ AG | GT $\{A/G\}$ AGT) und Spleißakzeptorstellen ($\{T/C\}_{11}$ N $\{C/T\}$ AG | G) weitestgehend übereinstimmen (MOUNT, 1982; STADEN, 1984; vgl. Abb. 3.2.4).

Bei der Bildung von Daxx- γ wird die reguläre Spleißdonorstelle der Daxx-prä-mRNA am Exon 5/Intron Übergang mit der „kryptischen“ Spleißakzeptorstelle innerhalb von Exon 6 verwendet, was zur Deletion der kompletten ersten 170 nt von Exon 6 führt. Daxx- β und Daxx- γ stellen somit alternative Spleißprodukte der Daxx-prä-mRNA dar. In Abbildung 3.2.5 ist die Konsequenz des unterschiedlichen Spleißens schematisch dargestellt.

Daxx- β aus 36 Aminosäuren besteht, die den Nukleotiden 19-71 des alternative gespleißten Exon 6 und 56 Nukleotiden des ursprünglichen Exon 7 entsprechen. Das Protein Daxx- β ist mit 688 Aminosäuren um 52 Aminosäurereste kürzer als Daxx- α und hat ein entsprechend geringeres kalkuliertes Molekulargewicht von 76,3 kDa. Darüber hinaus unterscheidet sich Daxx- β im molaren Extinktionskoeffizienten ($36190 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \pm 5\%$) und besitzt mit 4,72 einen weniger sauren Isoelektrischen Punkt, wodurch die Ladung bei $\text{pH} = 7$ weniger negativ ist, als die von Daxx- α (vgl. Tab. 3.2.1).

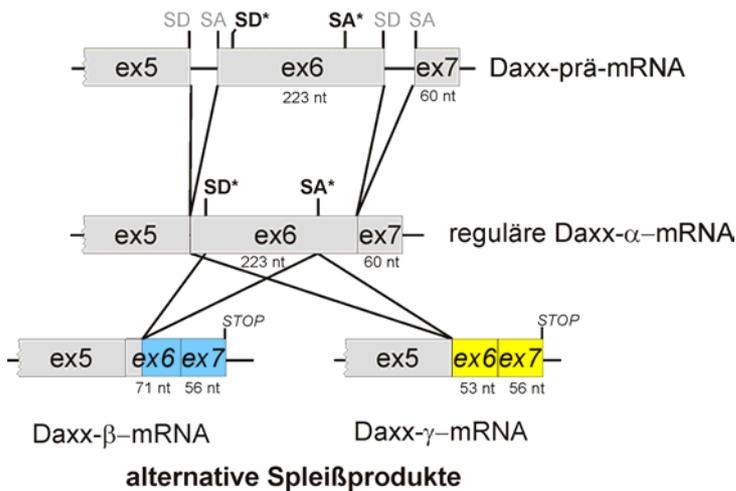


Abb. 3.2.5: Schematische Darstellung des alternativen Spleißens. Bei beiden alternativ gespleißten Transkripten kommt es zu einer Leserahmenverschiebung (blau bzw. gelb dargestellt), wodurch in Exon 7 ein neues Stop-Kodon generiert wird, welches 4 nt vor dem regulären lokalisiert ist. Abkürzungen – SD: Spleißdonorstelle; SA: Spleißakzeptorstelle. * kennzeichnet die kryptischen Spleißdonor- und Akzeptorstellen.

Zur Identifizierung relevanter Proteindomänen und möglicher posttranslationaler Modifikationsbereiche wurde die Aminosäuresequenz von Daxx- β mit Hilfe der PROSITEscan Software analysiert. Wie in Abbildung 3.2.6 dargestellt, sind durch die Änderung der Aminosäuresequenz zwei potentielle Proteinkinase C (PKC)- und vier Caseinkinase II (CK2)-Phosphorylierungsstellen sowie zwei N-Myristylierungsstellen deletiert worden, während gleichzeitig neue Phosphorylierungsstellen für PKC an Aminosäureposition 676 und 679 bzw. für CK2 an Position 679-682 entstanden sind. Zusätzlich entsteht an Position 655 bis 661 eine N-6-Methylase-Signatur, die in Daxx- α nicht vorhanden ist.

Tab. 3.2.1: Biochemische Grunddaten der Daxx-Varianten

Analyse*	Daxx- α	Daxx- β	Daxx- γ
Molekulargewicht [g/mol]	81375	76329	75566
Anzahl der Aminosäuren	740	688	682
Molarer Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]	$29580 \pm 5\%$	$36190 \pm 5\%$	$34910 \pm 5\%$
Isoelektrischer Punkt	4,69	4,72	4,71
Ladung bei $\text{pH} = 7$ [C]	-46,96	-43,04	-43,04

*Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Software DNASTar (Lasergene; Version 4.03)

Da bei der Bildung von Daxx- γ die reguläre Spleißdonorstelle an der Exon 5/Intron Grenzen mit der kryptischen Spleißakzeptorstelle innerhalb des Exon 6 verwendet wird, sind die kompletten ersten 170 nt von Exon 6 deletiert, was zu einem im Vergleich zu Daxx- β um 6 Aminosäuren (entsprechend 18 nt) verkürzten C-Terminus führt. Die Spleißakzeptor-Stelle ist mit der von Daxx- β identisch, so dass

die gleiche Leserasterverschiebung stattfindet und die entstandenen Modifikationen im Carboxyterminus von Daxx- γ daher (bis auf eine fehlende CK II-Phosphorylierungsstelle) identisch mit der von Daxx- β sind (vgl. Abb. 3.2.6). Daxx- γ stellt mit 682 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 75,6 kDa somit die kleinste der drei Daxx-Isoformen dar. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit von Daxx- γ zu Daxx- β unterscheiden sich die beiden Varianten hinsichtlich des molaren Extinktionskoeffizienten und des Isoelektrischen Punktes nicht wesentlich voneinander (vgl. Tab. 3.2.1). Der veränderte C-Terminus von Daxx- β und Daxx- γ hat unter Umständen auch Auswirkungen auf die Faltung des Proteins. Eine *in silico* Analyse zur Vorhersage von Sekundärstrukturelementen zeigt, dass im Gegensatz zu Daxx- α im C-terminalen Proteinbereich von Daxx- β kaum und dem von Daxx- γ keine β -Faltblattbereiche ausgebildet werden. Trotz der hohen Sequenzähnlichkeit von Daxx- β und Daxx- γ sind daher auch Unterschiede in der Tertiärstruktur zwischen diesen beiden Daxx-Isoformen denkbar. Daxx- β und Daxx- γ weisen im Gegensatz zu Daxx- α einen erhöhten Anteil an „Coil“-Bereichen auf, α -helicale Bereiche werden nach dem Algorithmus von Chou und Fasman (CHOU & FASMAN, 1978) weder für den C-Terminus von Daxx- α noch für den von Daxx- β und Daxx- γ vorhergesagt (vgl. Abb. 7.1, Anhang).

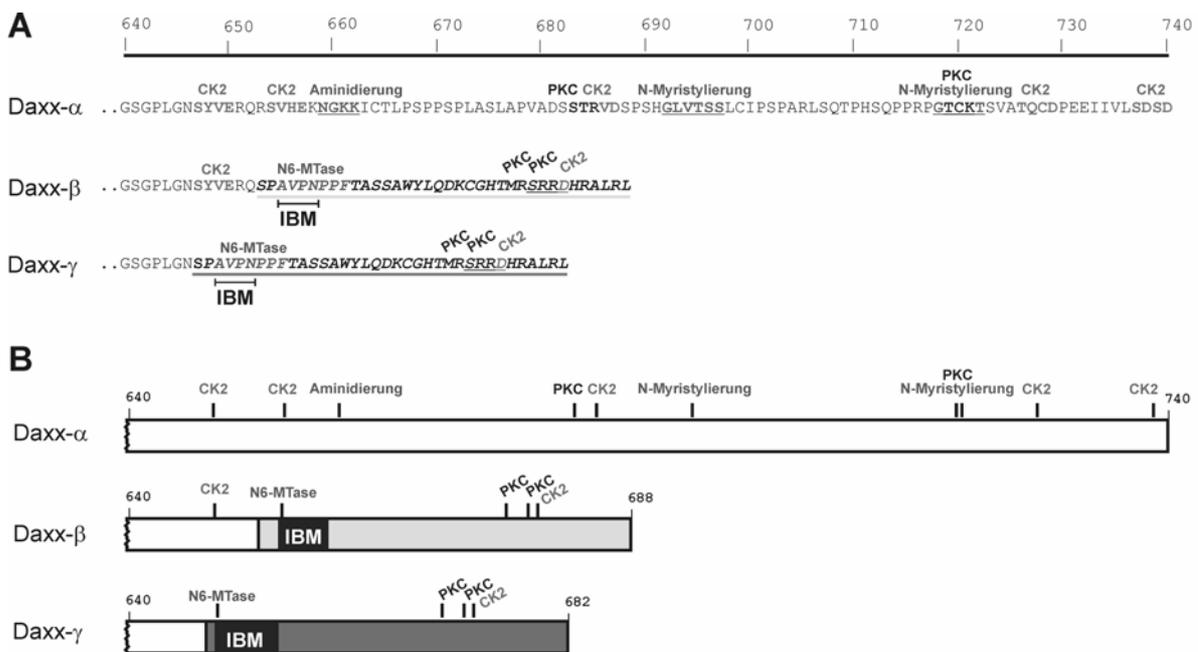


Abb. 3.2.6: Schematische Darstellung der Daxx-Isoformen. **A:** Das alternative Spleißen zur Bildung von Daxx- β und Daxx- γ hat eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge, wodurch sich die Aminosäuresequenz ab Position 653 in Daxx- β (hellgrau unterstrichen) und ab Position 647 in Daxx- γ (grau unterstrichen) ändert. **B:** Schematische Darstellung der drei Daxx-Varianten mit den entsprechenden potentiellen, durch PROSITE identifizierten posttranslationalen Modifikationsstellen und dem in Daxx- β und Daxx- γ neu entstandenen IBM-Motiv (vgl. 3.2.3.1). Die jeweiligen potentiellen posttranslationalen Modifikationsbereiche sind auch in **A** auf Sequenzebene durch die entsprechenden Graustufen hervorgehoben. Abkürzungen – CK2: Caseinkinase II-Phosphorylierungsstelle; PKC: Proteinkinase C-Phosphorylierungs-stelle; N6-MTase: N-6-Methylase-Signatur; IBM: IAP-Bindemotiv.

3.2.3.1 Daxx- β und Daxx- γ enthalten ein potentielles IAP-Bindemotiv

Neben der N-6-Methylase-Signatur ist in Daxx- β und Daxx- γ eine weitere, neue Proteindomäne entstanden, die in Daxx- α nicht vorkommt. An Aminosäure Position 655 (Daxx- β) bzw. 649 (Daxx- γ)

ist ein sogenanntes IAP-Bindungsmotiv (IBM) lokalisiert, das dem *Drosophila-RHG*-Motiv bei *reaper*, *hid* und *grim* entspricht, sowie bei Caspase-9, Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 zu finden ist (SALVESEN & DUCKETT, 2002). Diese Domäne wird durch die Aminosäurekonsensussequenz Alanin-Valin-Prolin-Isoleucin (AVPI) gebildet und ist für Bindung an Proteine der Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-Familie verantwortlich. Smac/DIABLO beispielsweise bindet über diese Domäne das Protein XIAP, wodurch wiederum dessen Bindung und die damit assoziierte Inaktivierung von Caspase-9 verhindert wird (vgl. 1.6.2). Der in Abbildung 3.2.7 dargestellte Sequenzvergleich des Daxx- β -/ γ -IBM-Motivs zeigt die Ähnlichkeit zu den IBM-Motiven anderer Proteine.

Faktoren	IAP-Bindungsmotiv (IBM)
Smac/DIABLO	- A V P I A Q K S E P H
Daxx- β -/ γ	S A V P N P P F T A S S
Omi/HtrA2	- A V P S P P P A S P R
Murine Caspase-9	- A V P Y Q E G P R P L
Humane Caspase-9	- A T P F Q E G L R T F
<i>D. melanogaster</i> Reaper	M A V A F Y I P D Q A T
<i>D. melanogaster</i> Hid	M A I P F F E E E H A P
<i>D. melanogaster</i> Grim	M A I A Y F I P D Q A Q
<i>D. melanogaster</i> Skl	M A I P F F E E E H A P

Abb. 3.2.7: Vergleich des IBM-Motivs von Daxx- β und Daxx- γ mit IBM-Sequenzen anderer Proteine. Dargestellt ist das Ergebnis eines mit ClustalW (erweitert mit Boxshade) durchgeführten, multiplen Sequenzvergleiches der IBM-Motive von Daxx- β bzw. Daxx- γ und anderen Faktoren. Konservierte Aminosäuren sind hierbei schwarz unterlegt. Der Kasten symbolisiert die 4 zur Ausbildung des IBM-Motives essentiellen Aminosäuren.

Im Vergleich zu Smac/DIABLO ist beispielsweise lediglich der Isoleucinrest des AVPI-Motivs durch einen Asparaginrest ersetzt. Eine Stammbaumanalyse verdeutlicht darüber hinaus die ausgeprägte Homologie der Sequenz; demnach weist das IBM-Motiv der Daxx-Varianten die größte Homologie zur Serin-Protease Omi/HtrA2 auf (vgl. Abb. 3.2.8). Für die biologische Aktivität des IAP-Motivs muss dies allerdings N-terminal exponiert sein oder durch eine Prozessierung des Proteins N-terminal freigesetzt werden. So wird Smac/DIABLO zunächst in einer Pro-Form mit einer aminoterminalen, mitochondrialen Zielsequenz gebildet, die beim Import in die Mitochondrien proteolytisch abgespalten wird und das IBM-Motiv danach das aminoterminal Ende des Proteins bildet (VERHAGEN et al., 2000; WU et al., 2000; SUZUKI et al., 2001). PSORT II-Analysen der Daxx- β - und Daxx- γ -Aminosäuresequenz lieferten allerdings keinen Hinweis auf das Vorhandensein vergleichbarer Signalpeptid- oder Zielsequenzen, die zur Prozessierung und der damit verbundenen Freisetzung des IBM-Motivs führen könnten (Daten nicht gezeigt).

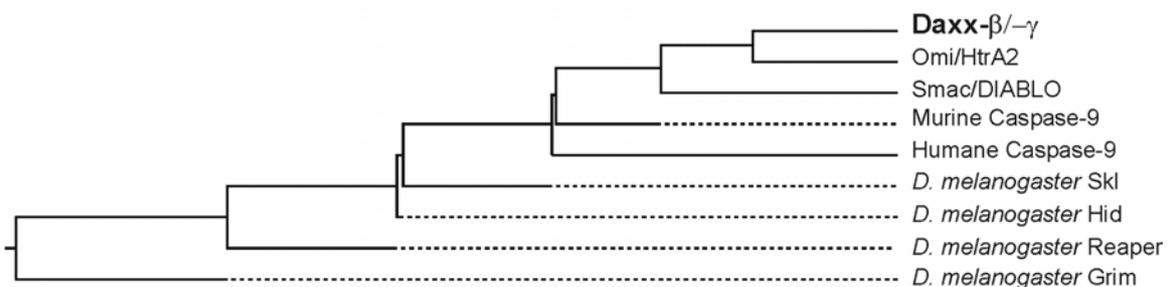


Abb. 3.2.8: Stammbaumanalyse der potentiellen IAP-Bindungsmotive in Daxx- β und Daxx- γ . Der Grad der Homologie mit den IBM-Sequenzen anderer Proteine ist graphisch dargestellt. Die Analyse wurde mit der Software DNASar (Lasergene; Version 4.03) durchgeführt.

Zur Identifizierung möglicher Erkennungsschnittstellen zellulärer Proteasen, deren Spaltung die Freisetzung des IBM-Motivs als Konsequenz hätte, wurde die Daxx- β - und Daxx- γ -Aminosäuresequenz mit Hilfe der „Pepdicutter“ Software (Expasy-tools) analysiert. Mit Ausnahme von diversen bakteriellen Proteaseschnittstellen und Erkennungssequenzen recht unspezifischer Proteasen wie Trypsin oder Proteinase K konnten allerdings keine Spaltungsstellen bekannter zellphysiologisch-relevanter Proteasen detektiert werden (vgl. Abb. 7.2, Anhang).

3.2.4 Funktionelle Charakterisierung von Daxx- β und Daxx- γ

Um die Funktion der Daxx-Varianten Daxx- β und Daxx- γ im Hinblick auf eventuelle Unterschiede zur Hauptform Daxx- α zu untersuchen, wurden die cDNA-Sequenzen aller drei Daxx-Isoformen mit Kombinationen aus den unter 2.2.2 beschriebenen Methoden kloniert. Zunächst wurden Klonierungs-PCRs mit Daxx-Transkript-flankierenden Primern durchgeführt und der komplette, aufgereinigte Reaktionsansatz in einen Klonierungsvektor ligiert. Die resultierenden Klone enthielten dabei allerdings ausschließlich das Daxx- α -Transkript, was auf die Dominanz der Daxx- α -Expression im Verhältnis zur Expressionsstärke von Daxx- β und Daxx- γ schließen lässt. Die Varianten Daxx- β und Daxx- γ wurden daher in einer Zwei-Stufen-PCR mit Daxx- α als „Template“ wie unter 2.2.2.7.7 beschrieben generiert und, wie auch Daxx- α , als GFP-Genfusionen hergestellt. Aufgrund der unterschiedlichen C-Termini der Daxx-Varianten ist GFP hierbei N-terminal fusioniert. Eine DNA-Sequenzierung diente zur Verifizierung der Konstrukte. Im Anhang ist die Klonierungsstrategie schematisch dargestellt (vgl. Abb. 7.3/4).

3.2.4.1 Rekombinante Expression von Daxx- α , Daxx- β und Daxx- γ

Für den Nachweis der Proteinexpression wurden die für GFP-Daxx- α , GFP-Daxx- β und GFP-Daxx- γ kodierenden Expressionsvektoren sowie der korrespondierende Leervektor (bezeichnet als „Mock“-Kontrolle) in HepG2-Zellen transfiziert. Gesamtproteinextrakte wurden hergestellt und im „Western Blot“ auf die Expression der Varianten hin analysiert. Hierbei wurde sowohl der jeweilige Rohextrakt, als auch durch Daxx-Immunpräzipitation spezifisch angereichertes Protein untersucht. Wie in Abbildung 3.2.9 dargestellt, konnte in allen Rohextrakten eine deutlich ausgeprägte Bande mit einem apparenten Molekulargewicht ≥ 129 kDa detektiert werden, wobei sich die Größen von GFP-Daxx- α , GFP-Daxx- β und GFP-Daxx- γ entsprechend den verschiedenen Molekulargewichten der Daxx-Varianten geringfügig unterscheiden (vgl. Tab. 3.2.1). Die in den Daxx-Immunpräzipitaten detektierte Bande ist jeweils identisch mit der dominanten Bande des entsprechenden Rohextraktes, was diese somit als GFP-fusioniertes Daxx-Protein identifiziert. Aufgrund des hohen Anteils saurer Aminosäuren in der Region von Aminosäure 435-485 (vgl. Abb. 1.5) zeigt Daxx ein irreguläres elektrophoretisches Laufverhalten wodurch Daxx nicht entsprechend seines Molekulargewichtes als 80 kDa Protein detektiert wird (vgl. Tab. 3.2.1), sondern ein apparentes Molekulargewicht von etwa 120 kDa aufweist (KIRIAKIDOU et al., 1997). Die Fusion von Daxx- α mit GFP (27 kDa) resultiert daher theoretisch in ein ca. 147 kDa-Fusionsprotein, was mit dem „Western Blot“ Ergebnis recht gut übereinstimmt. Da der saure Aminosäurebereich in den Varianten Daxx- β und Daxx- γ erhalten ist, zeigen auch diese ein irreguläres elektrophoretisches Laufverhalten. In den pLEGFP-C1-transfizierten

Zellen konnte erwartungsgemäß weder im Rohextrakt noch nach Immunpräzipitation eine entsprechende Bande detektiert werden.

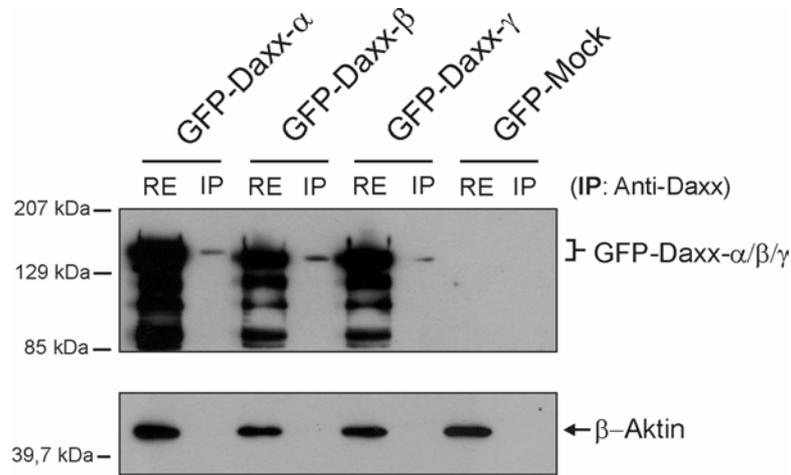


Abb. 3.2.9: Rekombinante Expression der Daxx-Varianten als GFP-Fusionen in HepG2-Zellen. Jeweils 10 µg Gesamtproteinextrakt pLEGFP-Daxx-α-, -Daxx-β-, -Daxx-γ- sowie pLEGFP-C1 (Mock)-transfizierter HepG2-Zellen wurden zusammen mit Daxx-Immünpräzipitaten der Zellextrakte in einer 8%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ mit einem Anti-GFP Antikörper und dem entsprechenden Sekundäntikörper analysiert. Die Immunpräzipitationen wurden mit jeweils 100 µg Gesamtprotein und einem gegen den N-Terminus von Daxx gerichtetem Antikörper (M-112, Santa Cruz) durchgeführt. Die Detektion von β-Aktin diente als Nachweis vergleichbarer Proteinladungsmengen. Abkürzungen – RE: Rohextrakt; IP: Immunpräzipitat.

3.2.4.2 Die subzelluläre Lokalisation von Daxx-β und Daxx-γ

Daxx-α ist ursprünglich als direkter Interaktionspartner des Todesrezeptors CD95 identifiziert worden (YANG et al., 1997), was auf eine cytoplasmatische Lokalisation des Proteins hinweist. Allerdings interagiert es darüber hinaus mit diversen, im Kern lokalisierten Proteinen, wie PML oder p53 und besitzt selbst zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS) an Aminosäurepositionen 389-394 und 628-634, was auf eine nukleäre Lokalisation des Proteins hindeutet (PLUTA et al., 1998). In den Daxx-Varianten sind die NLS erhalten, was auch für Daxx-β und Daxx-γ auf eine nukleäre Lokalisation hindeutet. Eine Analyse der Primärstruktur mit der Software PSORT II ermöglicht eine erste Vorhersage zur subzellulären Lokalisation von Proteinen.

Tab.3.2.2: Ergebnis der PSORT II-Analyse zur subzellulären Lokalisation der Daxx-Isoformen

Subzelluläres Kompartiment	Daxx-α	Daxx-β	Daxx-γ
Zytoplasma	4,3%	4,3%	4,3%
Zytoskelett	13,0%	13,0%	13,0%
Zellkern	69,6%	69,6%	69,6%
Golgi-Apparat	4,3%	4,3%	4,3%
Mitochondrien	0%	0%	0%
Peroxisomen	0%	0%	0%
ER	0%	0%	0%
Lysosomen	4,3%	4,3%	4,3%
Plasmamembran	4,3%	4,3%	4,3%

Hierbei werden durch die Anwendung des *k-nearest neighbour* (k-NN)-Algorithmus (HORTON & NAKAI, 1997) mehrere Programme zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation eines Proteins aus seiner Aminosäurezusammensetzung zusammenfasst. Demnach handelt es sich bei allen drei Daxx-Isoformen um Kernproteine (vgl. Tab. 3.2.2). Zur zellbiologischen Verifizierung dieser Vorhersage wurden fluoreszenzmikroskopische Analysen nach Transfektion der GFP-Daxx- α -, -Daxx- β - und -Daxx- γ -kodierenden Vektoren in HeLa-Zellen durchgeführt. In Abbildung 3.2.10 sind Aufnahmen der DAPI-, und GFP-Fluoreszenzen sowie der überlagerten Fluoreszenzsignale dargestellt. Es zeigte sich, dass sowohl GFP-Daxx- α als auch die GFP-fusionierten Varianten Daxx- β und Daxx- γ ausschließlich im Kern lokalisiert sind, was die Vorhersage durch die PSORT II-Analysen bestätigt.

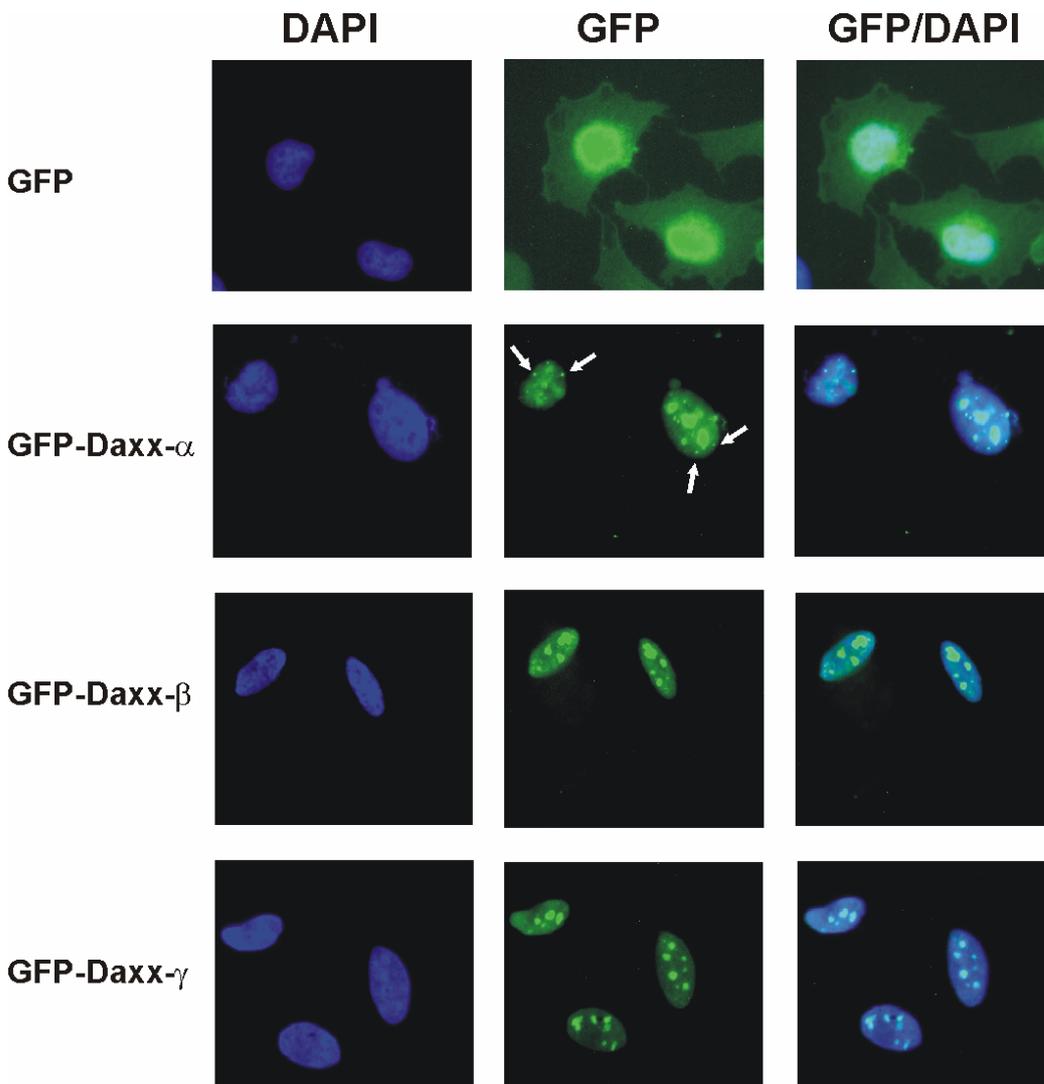


Abb. 3.2.10: Fluoreszenzmikroskopische Analyse zur zellulären Lokalisation der Daxx-Isoformen. GFP-Daxx- α -, -Daxx- β bzw. -Daxx- γ wurden in HeLa-Zellen überexprimiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Zellkerne waren dabei durch den DNA-Farbstoff DAPI angefärbt. Die GFP- bzw. DAPI-Einzelfluoreszenzen wurden jeweils bei einer 63fachen Vergrößerung aufgenommen und anschließend mit Hilfe der SPOTAdvanced Software überlagert (GFP/DAPI Darstellung). Die weißen Pfeile kennzeichnen spezielle, subnukleäre Strukturen, die vermutlich die PODs darstellen und vornehmlich in GFP-Daxx- α -exprimierenden Zellen beobachtet worden sind.

Im Gegensatz dazu war GFP alleine transzellulär verteilt, so dass GFP nicht für die nukleäre Lokalisation der Daxx-Isoformen verantwortlich war. Interessanterweise zeigte Daxx- α im Vergleich zu Daxx- β und Daxx- γ ein etwas anderes Verteilungsmuster innerhalb des Kerns. Daxx- α war vornehmlich in kleinen subnukleären Strukturen lokalisiert, die als helle, intensiv-fluoreszierende „Spots“ erkennbar waren (vgl. Abb. 3.2.10, weiße Pfeile). Dies sind vermutlich PODs (PML-oncogenic Domains), in denen Daxx mit PML (Promyelocytic Leukemia Protein) assoziiert ist (ISHOV et al., 1999; LI et al., 2000; ZHONG et al., 2000). In GFP-Daxx- β - und GFP-Daxx- γ -exprimierenden Zellen waren dagegen vorwiegend, größere, „Plaque“-ähnliche Strukturen erkennbar und die Ausbildung kleinerer, punktförmiger Bereiche war unterrepräsentiert. Diese größeren „Plaque“-ähnlichen Daxx-Akkumulationen waren neben den POD-(ähnlichen) Strukturen auch in GFP-Daxx- α -exprimierenden Zellen zu beobachten. Um zu überprüfen, ob es sich bei den distinkten „Spots“, in denen Daxx- α vornehmlich lokalisierte, tatsächlich um PODs handelte, wurden konfokal-fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt und die Daxx-„Spots“ hinsichtlich einer Ko-Lokalisation mit PML analysiert.

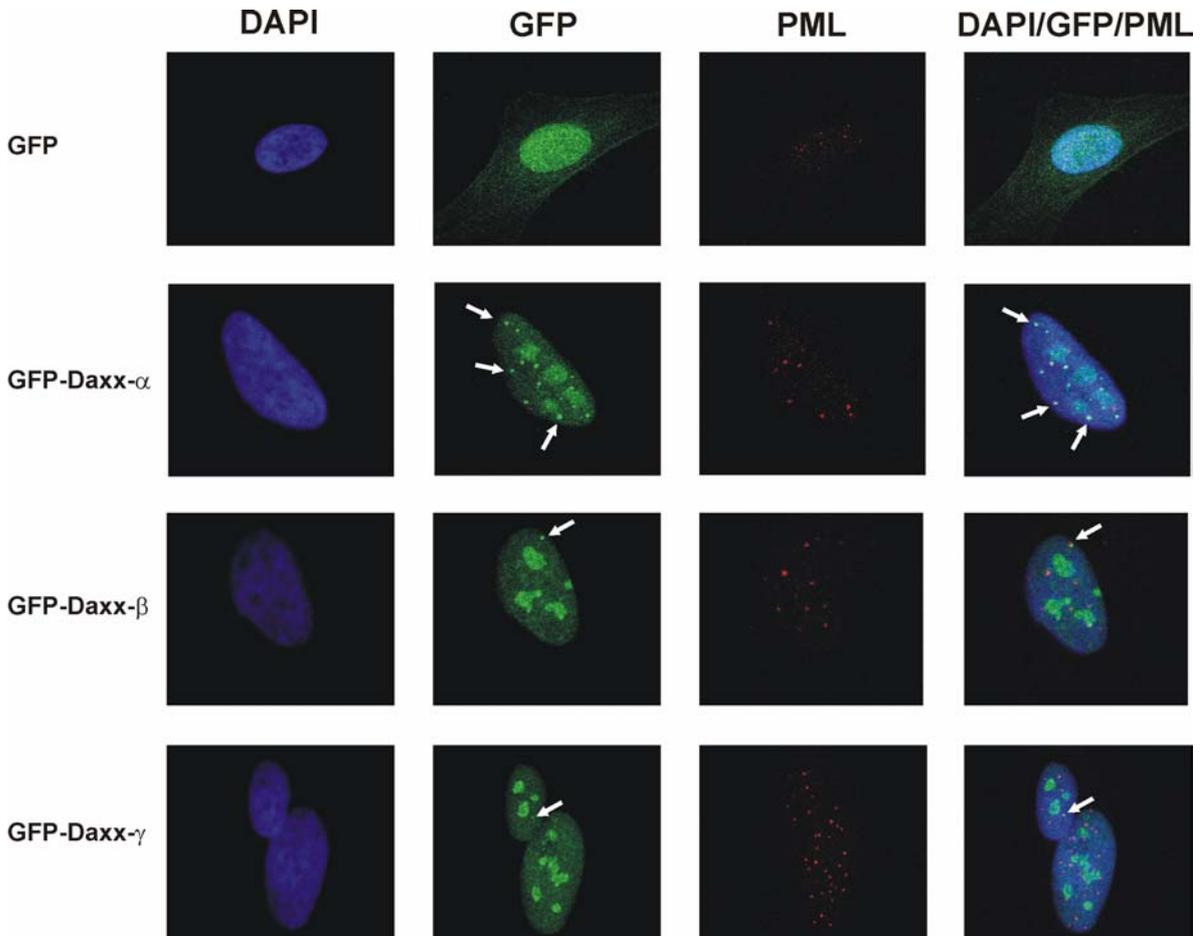


Abb. 3.2.11: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Ko-Lokalisation von Daxx- α , Daxx- β und Daxx- γ mit PML. GFP-Daxx- α , -Daxx- β bzw. -Daxx- γ wurden in HeLa-Zellen überexprimiert und konfokal-fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Zellkerne waren dabei durch den DNA-Farbstoff DAPI angefärbt. PML wurde immuzytochemisch mit einem Anti-PML sowie einem korrespondierendem TRITC-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt. Die GFP-, PML- bzw. DAPI-Einzelfluoreszenzen wurden jeweils bei einer 40fachen Vergrößerung detektiert und anschließend mit Hilfe der LSM Image Software überlagert (DAPI/GFP/PML Darstellung). Die weißen Pfeile kennzeichnen die subnukleäre Strukturen, in denen die entsprechende Daxx-Variante mit PML ko-lokalisiert ist.

GFP-Daxx- α , -Daxx- β bzw. -Daxx- γ wurden hierfür in HeLa-Zellen überexprimiert und endogenes PML wurde immunzytochemisch nach der unter 2.2.3.10.1 beschriebenen Methode mit einem gegen PML gerichteten Primärantikörper sowie dem korrespondierenden TRITC-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt. Entsprechend den vorherigen Beobachtungen waren auch hier die intensiv fluoreszierenden „Spots“ vorwiegend in den Daxx- α -überexprimierenden Zellen zu finden. Diese ließen sich bei Übereinanderlagerung mit dem PML-Verteilungsmuster in der Mehrzahl als Ko-Lokalisationsbereiche zwischen PML und Daxx- α und somit als PODs identifizieren (vgl. Abb. 3.2.11). In den GFP-Daxx- β bzw. -Daxx- γ überexprimierenden Zellen war die Anzahl dieser „Spots“ drastisch reduziert. Wie die quantitative Auswertung zeigt, wiesen Daxx- α -überexprimierende Zellen durchschnittlich ca. 12 „Spots“ pro Zelle auf, während es in Daxx- β - bzw. Daxx- γ -überexprimierenden Zellen im Durchschnitt lediglich ca. 2 „Spots“ pro Zelle waren (vgl. Abb. 3.2.12.A). Bei Übereinanderlagerung mit dem jeweiligen PML Verteilungsmuster konnten auch die „Spots“ in Daxx- β - bzw. Daxx- γ -überexprimierenden Zellen zum Teil als PODs identifiziert werden (vgl. Abb. 3.2.11). Anhand des PML-Verteilungsmuster wird deutlich, dass die Anzahl der PODs (per Definition PML-enthaltene „Spots“, ISHOV et al., 1999) nicht durch die Überexpression einzelner Daxx-Varianten beeinflusst wird. So war die Anzahl der PML-„Spots“ pro Zelle vergleichbar zwischen Daxx- α -, Daxx- β - und Daxx- γ -überexprimierenden Zellen und lag in allen Fällen durchschnittlich zwischen ca. 7 bis 9 „Spots“ pro Zelle. Die quantitative Auswertung der Ko-Lokalisation zwischen PML und den jeweils GFP-fusionierten Daxx-Varianten zeigt dementsprechend ein drastisch verringertes Ausmaß der prozentualen PML-Ko-Lokalisation von Daxx- β und Daxx- γ im Vergleich zu der von Daxx- α . Während Daxx- α zu ca. 90% in PODs lokalisierte, waren für Daxx- β nur in ca. 30% und für Daxx- γ in lediglich ca. 20% eine Ko-Lokalisation zu beobachten (vgl. Abb. 3.2.12.B).

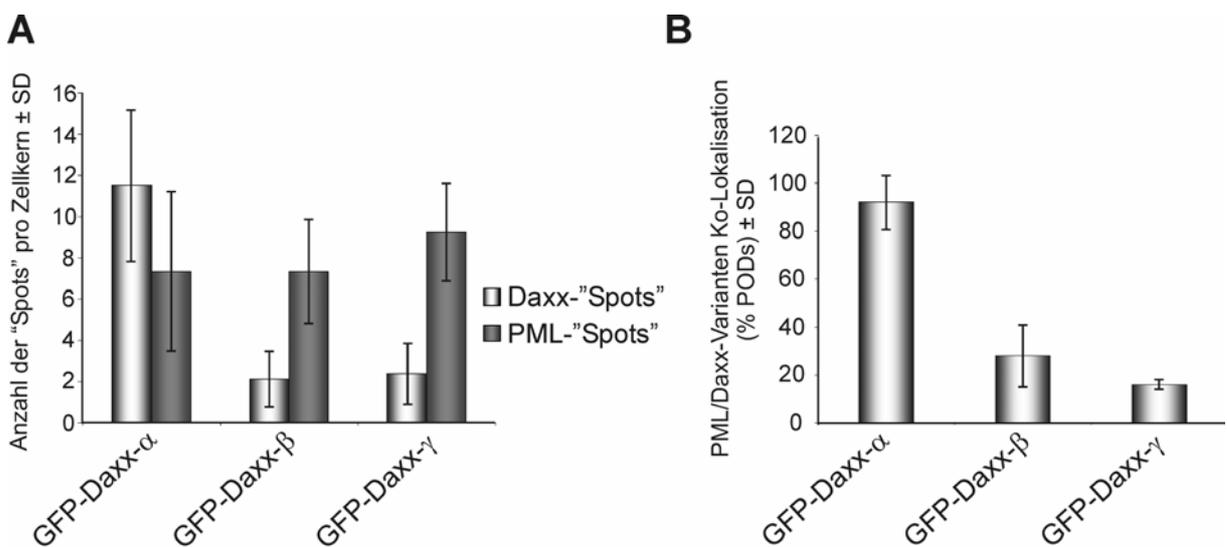


Abb. 3.2.12: Quantitative Auswertung der Ko-Lokalisation von Daxx- α , Daxx- β und Daxx- γ mit PML. **A:** Dargestellt ist die totale Anzahl der GFP-Daxx- α -, -Daxx- β - bzw. -Daxx- γ -„Spots“ und PML-„Spots“ pro Zelle. **B:** Dargestellt ist die prozentuale Anzahl der GFP-Daxx- α -, -Daxx- β - bzw. -Daxx- γ -„Spots“, die eine Ko-Lokalisation mit PML zeigen. Die Anzahl der PML-„Spots“ wurde hier als 100% definiert.

3.2.4.3 Analyse der Interaktionen von Daxx- β und Daxx- γ mit PML

Da die immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen auf eine direkte aber drastisch reduzierte Interaktion zwischen den neuen Daxx Spleiß-Varianten und PML hindeuteten, wurde Ko-Immunpräzitationsanalysen durchgeführt um die Wechselwirkung zwischen PML und Daxx- β bzw. Daxx- γ mit einer alternativen Methode zu verifizieren. Da der PML-Expressionsvektor für ein Fusionsprotein aus BFP (Blau Fluoreszierendes Protein - ist eine Variante von GFP mit veränderten Fluoreszenzeigenschaften) und PML kodiert, wurden die Daxx-Varianten zuvor mit dem fluoreszierenden Protein DSRed2 fusioniert (vgl. Abb. 7.5, Anhang). In Abbildung 3.2.13 ist die Expression der DSRed2-fusionierten Daxx-Varianten anhand von „Western Blot“-Analysen exemplarisch dargestellt. Für die Ko-Immunpräzitationen wurden die Vektoren pLDSRed2-Daxx- α , pLDSRed2-Daxx- β und pLDSRed2-Daxx- γ jeweils mit äquivalenten Mengen an pEBFP-PML in HEK293-Zellen ko-transfiziert. Die Ko-Transfektion eines für GFP-Survivin-kodierenden Expressionsvektors mit pDSRed2-Daxx- α wurde als Kontrolle durchgeführt. Nach 48h wurden Proteinextrakte generiert und in einer gegen GFP/BFP gerichteten Immunpräzitation eingesetzt. Der hierbei verwendete Antikörper unterscheidet dabei nicht zwischen den Proteinen GFP und BFP (persönliche Mitteilung eines Mitarbeiters der Firma Clontech). Die resultierenden Immunkomplexe wurden im „Western Blot“ durch Inkubation mit einem Anti-Daxx Antikörper sowie dem entsprechenden Sekundäntikörper analysiert.

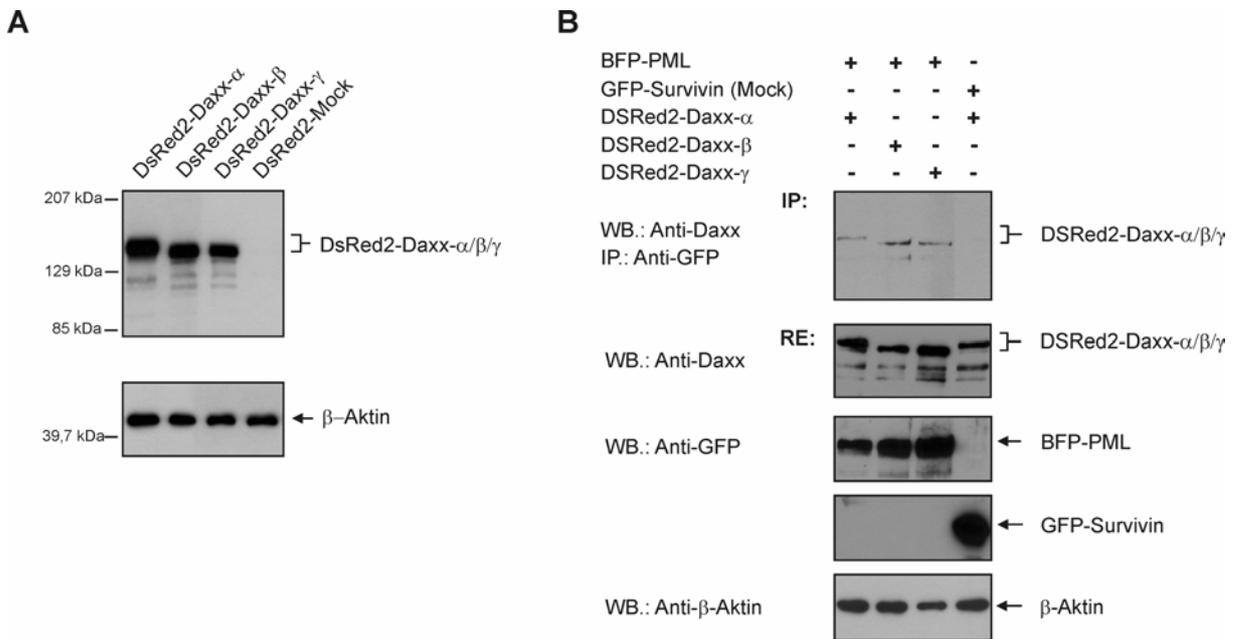


Abb. 3.2.13: Ko-Immunpräzitation von BFP-PML mit den DSRed2-fusionierten Daxx-Isoformen. **A:** Expression der DSRed2-fusionierten Daxx-Varianten. Jeweils 10 μ g Gesamtproteinextrakt von DSRed2-Mock-Vektor- bzw. DSRed2-Daxx- α -, -Daxx- β - und -Daxx- γ -exprimierender HEK293-Zellen wurden in einer 8%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ mit einem Anti-Daxx Antikörper analysiert. Der Abgleich mit β -Aktin demonstriert, dass vergleichbare Proteinmengen aufgetragen waren. **B:** Jeweils 500 μ g Proteinextrakt aus DSRed2-Daxx- α -, DSRed2-Daxx- β - bzw. DSRed2-Daxx- γ -Ko-Expressionen mit pEBFP-PML sowie der Kontroll-Ko-Transfektion von pEGFP-Survivin und DSRed2-Daxx- α wurden in einer Immunpräzitation (IP) mit einem Anti-GFP Antikörper eingesetzt. Die resultierenden Immunkomplexe wurden in einer 8%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ mit einem Anti-Daxx Antikörper analysiert. Die „Western Blot“-Analysen der Rohextrakte (RE) demonstrieren, dass äquivalente Mengen der entsprechenden, überexprimierten Proteine vorlagen.

Wie erwartet konnte DSRed2-Daxx- α in dem Immunpräzipitat der BFP-PML/DSRed2-Daxx- α Ko-Expression detektiert werden (vgl. Abb. 3.2.13.B) und bestätigt damit frühere Beobachtungen von Li et al. und Ishov et al., wonach Daxx- α mit PML interagiert (Li et al., 2000; ISHOV et al., 1999). Darüber hinaus konnten auch DSRed2-Daxx- β und DSRed2-Daxx- γ in den entsprechenden Immunkomplexen detektiert werden, was sie ebenfalls als PML-interagierende Proteine identifiziert und die Ergebnisse aus den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen bestätigt. In der Anti-GFP Immunpräzipitation der DSRed2-Daxx- α /GFP-Survivin-Kontrolle konnte kein DSRed2-Daxx- α im entsprechenden Immunkomplex nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.2.13.B). Dies belegt, dass die Interaktion zwischen PML und den Daxx-Varianten spezifisch und nicht durch BFP oder Protein A-vermittelt war bzw. artifiziell durch unspezifische Bindungen des Antikörpers an Daxx oder DSRed2 hervorgerufen wurde. Insgesamt gesehen hat der veränderte C-Terminus von Daxx- β und Daxx- γ somit zwar eine Reduktion der PML-Affinität zur Folge, die Trunkierung ist aber nicht ausreichend, um die Interaktion mit PML vollständig zu unterbinden.

3.2.5 Untersuchungen zur Funktion der Daxx-Isoformen in der CD95-abhängigen Apoptose

Daxx fungiert als pro-apoptotischer Faktor innerhalb der Apoptose, indem es durch die direkte Bindung an die „Todesdomäne“ von CD95 die CD95-Rezeptor-vermittelte Apoptose über die Aktivierung von ASK1 und JNK in einer Caspase-8-unabhängigen Weise fördert (YANG et al., 1997; CHANG et al., 1998). Darüber hinaus ist Daxx in der Lage durch Ko-Lokalisation mit PML in den PODs, die CD95-abhängige Apoptose zu verstärken, wobei keine direkte Interaktion zwischen dem CD95-Rezeptor und Daxx stattfindet (TORII et al., 1999; ZHONG et al., 2000). Entscheidend und konsistent hierbei ist die Bedeutung des carboxyterminalen Bereichs von Daxx. Dieser wurde als Interaktionsdomäne von Daxx mit der Todesdomäne von CD95 identifiziert und ist auch für die Verstärkung der CD95-abhängigen Apoptose durch nukleär-lokalisiertes Daxx verantwortlich (YANG et al., 1997; TORII et al., 1999). Darüber hinaus ist der C-Terminus von Daxx für die Interaktion mit weiteren Faktoren essentiell (vgl. Tab. 7.1). Im Hinblick auf eine potentielle dominant-negativ Funktion der Daxx-Varianten wurde daher untersucht, wie sich das die C-terminale Trunkierung/Modifikation von Daxx- β bzw. Daxx- γ und ihr verringertes PML-Interaktionspotential auf die CD95-abhängige Apoptose auswirkt.

3.2.5.1 Die Interaktion von Daxx- β und Daxx- γ mit ASK1

ASK1 kontrolliert die subzelluläre Lokalisation von Daxx, indem es Daxx bindet und aus dem Kern ins Zytoplasma rekrutiert, wo sowohl Daxx (direkt über den C-Terminus) als auch ASK1 (indirekt über Daxx) mit dem CD95-Rezeptor interagieren (KO et al., 2001; CHANG et al., 1998). Nach Stimulierung des Rezeptors verstärkt Daxx durch die Aktivierung von ASK1 die JNK-vermittelte CD95-Apoptose (YANG et al., 1997; CHANG et al., 1998). Für die Bindung an ASK1 ist der Bereich zwischen Aminosäuren 501-625 verantwortlich, der vom Spleißen nicht betroffen und in Daxx- β und Daxx- γ vollständig erhalten ist (vgl. Abb. 3.2.6; Tab. 7.1). Da der veränderte C-Terminus der Daxx-Varianten, wie unter 3.2.3 beschrieben, wahrscheinlich die Ausbildung der Sekundärstrukturen des

Proteins beeinflusst, sind trotz konservierter Aminosäurereste Proteinfaltungs-bedingte Änderungen der ASK1-Bindungsaffinität denkbar. Zur Untersuchung der potentiellen Interaktion zwischen ASK1 und den Daxx-Spleißvarianten Daxx- β und Daxx- γ wurden daher Ko-Immunpräzitationsanalysen durchgeführt. Hierfür wurden die Vektoren pLEGFP-Daxx- α , pLEGFP-Daxx- β und pLEGFP-Daxx- γ sowie der GFP-Kontrollvektor jeweils mit äquivalenten Mengen pcDNA3-HA-ASK1 in HEK293-Zellen ko-transfiziert. Eine Ko-Transfektion des GFP-Leervektors und pLEGFP-Daxx- α wurde als weitere Kontrolle durchgeführt. Nach 48 h wurden Proteinextrakte generiert und in einer gegen HA-ASK1 gerichteten Immunpräzitation nach der unter 2.2.4.3.1 beschriebenen Methode eingesetzt. Die resultierenden Immunkomplexe wurden im „Western Blot“ durch Inkubation mit einem Anti-GFP Antikörper analysiert. Wie erwartet, konnte GFP-Daxx- α in dem Immunpräzitat der ASK1/GFP-Daxx- α -Ko-Expression detektiert werden, was Daxx- α als ASK1-interagierendes Protein verifiziert (vgl. Abb. 3.2.14).

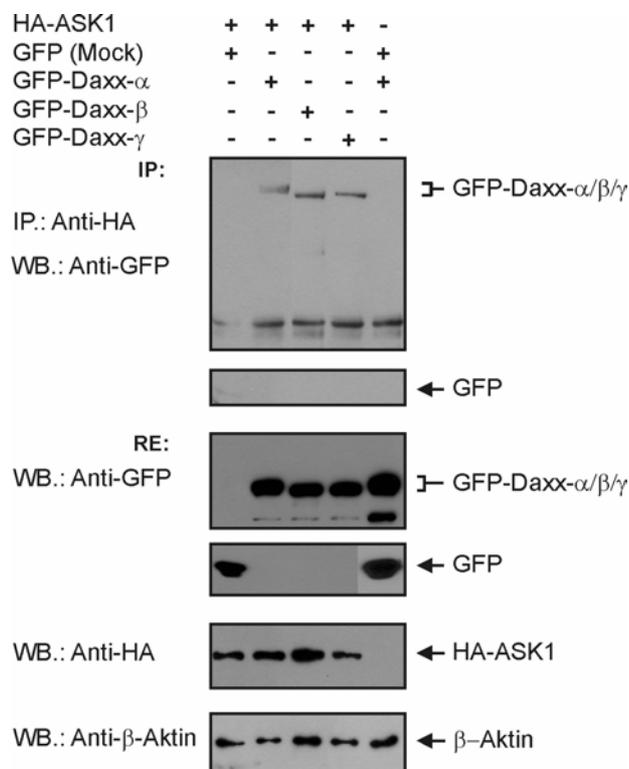


Abb. 3.2.14: Ko-Immunpräzitation von ASK1 und den GFP-fusionierten Daxx-Isoformen. Jeweils 500 μ g Proteinextrakt der pLEGFP-C1 (Mock), pLEGFP-Daxx- α , -Daxx- β bzw. -Daxx- γ Ko-Transfektionen mit pcDNA3-HA-ASK1 sowie der Kontroll-Ko-Transfektion von pLEGFP-C1 und pLEGFP-Daxx- α wurden in einer Immunpräzitation (IP) mit einem Anti-HA Antikörper eingesetzt. Die resultierenden Immunkomplexe wurden in einer 8%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ mit einem Anti-GFP Antikörper analysiert. „Western Blot“-Analysen der Rohextrakte (RE) demonstrieren, dass äquivalente Mengen der entsprechenden, überexprimierten Proteine vorlagen.

GFP-Daxx- β und GFP-Daxx- γ waren in den korrespondierenden Immunkomplexen ebenfalls nachweisbar, was darauf hindeutet, dass der veränderte C-Terminus sich nicht auf die Bindung zu ASK1 auswirkt. In den Immunpräzitationen der Kontrolltransfektionen pcDNA3-HA-ASK1/pLEGFP-C1 und pLEGFP-C1/pLEGFP-Daxx- α konnte weder GFP noch GFP-Daxx- α detektiert werden. Die beobachtete Interaktion zwischen ASK1 und den Daxx-Varianten war daher spezifisch und nicht durch GFP oder Protein A vermittelt bzw. artifiziell durch unspezifische Bindungen des Anti-HA Antikörpers an Daxx hervorgerufen. Der HA-Affinitäts-Tag zeigte ebenfalls keine Wechselwirkungen mit den GFP-fusionierten Daxx-Isoformen (Daten nicht gezeigt). „Western Blot“-Analysen der Rohextrakte belegen, dass in allen Proben vergleichbare Mengen der entsprechenden überexprimierten Proteine vorlagen.

3.2.5.2 Analyse des ASK1-Aktivierungspotentials der Daxx-Spleißvarianten

Da die Daxx-Varianten Daxx- β und Daxx- γ , wie unter 3.2.5.1 gezeigt, trotz des veränderten C-Terminus in Lage sind ASK1 zu binden, wurde der Frage nachgegangen, ob diese Bindung, wie im Fall von Daxx- α , ebenfalls zu einer Aktivierung von ASK1 führt. Die Bindung zwischen Daxx- β bzw. Daxx- γ und ASK1 ohne eine damit verbundene ASK1-Aktivierung wäre ein möglicher Hinweis auf die Funktion der Daxx-Spleißvarianten als dominant-negativ-Formen zu wirken. Zur Bestimmung des ASK1-Aktivierungspotentials von Daxx- β und Daxx- γ wurden daher *in vitro* „Kinase-Assays“ durchgeführt. Die einzelnen GFP-fusionierten Daxx-Varianten wurden hierfür mit HA-ASK1 in HEK293-Zellen ko-exprimiert. Als Negativkontrollen wurden GFP mit HA-ASK1 und GFP-Daxx- α mit der ASK1-Mutante HA-ASK1KM ko-exprimiert. Diese Mutante besitzt eine Punktmutation, die einen K709M-Aminosäureaustausch zur Folge hat, was mit dem Verlust der Kinaseaktivität verbunden ist (ICHIJO et al., 1997). In Abbildung 3.2.15.A ist ein repräsentativer „Kinase-Assay“ dargestellt. Das Maß der ASK1-Aktivierung entspricht der Bandenintensität von phosphoryliertem Substrat. Diese wurde jeweils densitometrisch ausgewertet und auf die GFP-Kontrolle normiert.

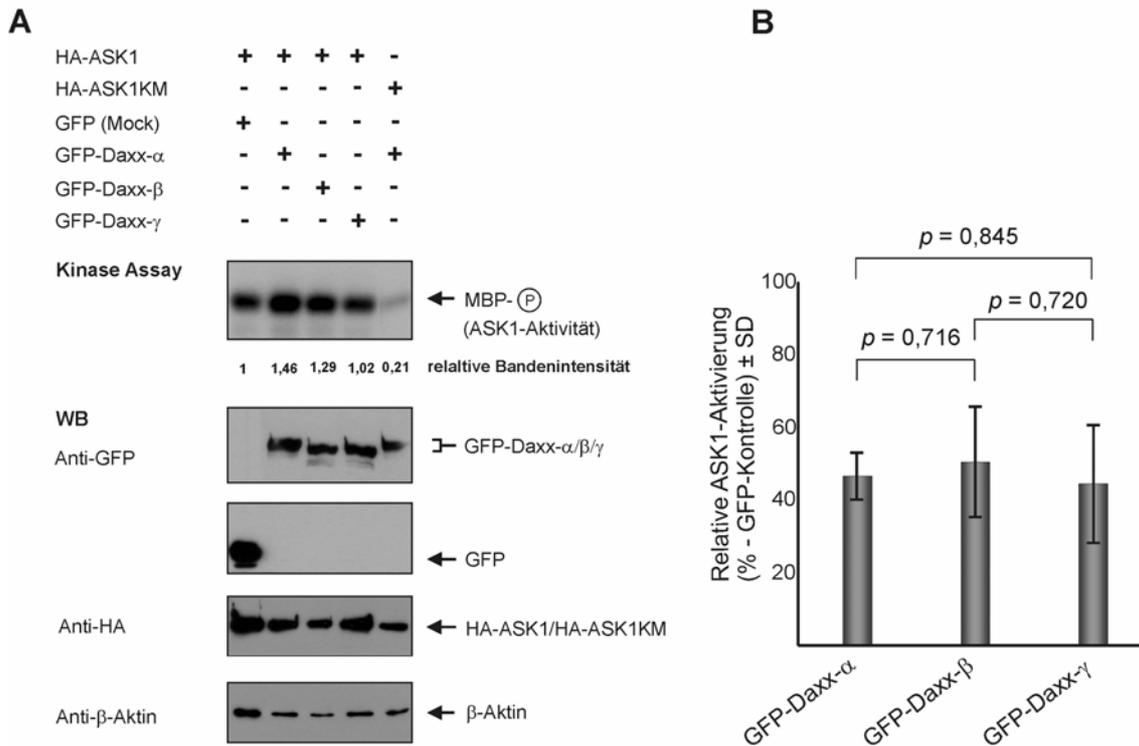


Abb. 3.2.15: ASK1-„Kinase-Assay“ nach Ko-Expression der GFP-fusionierten Daxx-Varianten mit HA-ASK1. A: Die Expressionsvektoren der GFP-Daxx-Varianten wurden jeweils mit pcDNA3-HA-ASK1 bzw. -HA-ASK1KM im Verhältnis 3:1 in HEK293-Zellen transfiziert und nach 48 h wurden Kinaseextrakte hergestellt. Mit jeweils 25 μg wurden Anti-HA Immunpräzipitationen zur Anreicherung von ASK1 bzw. ASK1KM durchgeführt und diese in einer Kinasereaktion mit dem Substrat „Myelin Basic Protein“ (MBP) sowie [γ - ^{32}P]-ATP inkubiert. Die phosphorylierten und radioaktiv markierten Substrate wurden in einer 12%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Die Bandenintensität war ein Maß für die ASK1-Aktivität und wurde densitometrisch ausgewertet. Die jeweils auf die GFP-Kontrolle-normierten Werte sind angegeben. „Western Blot“-Analysen der Rohextrakte demonstrieren, dass vergleichbare Mengen an überexprimiertem Protein vorlagen, wobei jeweils 10 μg Protein des entsprechenden Rohextraktes aufgetragen wurden. **B:** Gesamtauswertung der GFP-Daxx-Varianten-vermittelten ASK1-Aktivierung aus vier unabhängigen Versuchen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der prozentualen Zunahme der ASK1-Aktivierung (jeweils bezogen auf die GFP-Kontrolle). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's t-Test.

Wie erwartet bewirkt die Ko-Expression von GFP-Daxx- α eine deutliche Aktivierung von ASK1 (+1,46). Eine Ko-Expression von GFP-Daxx- β bzw. GFP-Daxx- γ zeigt mit +1,29 (Daxx- β) und +1,02 (Daxx- γ) nur eine geringere Erhöhung der ASK1-Aktivität im Verhältnis zu GFP (Mock-Kontrolle). „Western Blot“-Analysen belegen dabei, dass vergleichbare Mengen der jeweils überexprimierten Proteine vorlagen. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf Schwankungen innerhalb der jeweiligen Immunpräzipitation-Effizienzen zurückzuführen, da die Mittelwerte von vier Versuchen im Verhältnis zur GFP-Kontrolle eine deutliche Zunahme (> 40%) der ASK1-Aktivierung durch sowohl GFP-Daxx- α , wie auch GFP-Daxx- β und GFP-Daxx- γ zeigen (vgl. Abb. 3.2.15.B). Die statistische Analyse verdeutlicht, dass es sich hierbei um ähnliche ASK1-Aktivierungsniveaus handelt (keine signifikanten Unterschiede). Der Vergleich zwischen GFP/ASK1 (per Def. = 1) und der Negativkontrolle GFP-Daxx- α /ASK1KM (0,21) demonstriert, dass die Phosphorylierung der Substrate ASK1-vermittelt ist und nicht durch unspezifisch ko-präzipitierte Kinasen des Zellextraktes hervorgerufen wurden. Der Anteil an phosphoryliertem Substrat innerhalb der GFP/ASK1-Probe repräsentierte daher das basale Aktivitätsniveau von ASK1, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass sowohl GFP als auch die Transfektion *per se* eine Modulation der ASK1-Aktivität zur Folge haben kann.

3.2.5.3 Die Auswirkungen der Daxx-Varianten auf die CD95-abhängige Apoptose in HEK293-Zellen

Die Untersuchungen zur Beteiligung der Daxx-Varianten an der CD95-abhängigen Apoptose wurden mit Hilfe von Ko-Expression des CD95-Rezeptors und den einzelnen Daxx-Varianten in HEK293-Zellen durchgeführt. Die Überexpression des CD95-Rezeptors führt in diesem Fall zur Akkumulation verschiedener Rezeptormoleküle und damit zur Multimerisierung ihrer „Todesdomänen“, was mit einer Liganden-induzierten Trimerisierung vergleichbar ist und ebenfalls die Apoptosekaskade auslöst (BOLDIN et al., 1995a). Eine Ko-Expression von Daxx- α sollte dabei entsprechend den Beobachtungen von Yang et al. (1997) eine Verstärkung des „apoptotischen Todes“ zur Folge haben, die bei der Ko-Expression von Daxx- β und Daxx- γ aufgrund des veränderten C-Terminus möglicherweise unterbunden ist. Aus technischen Gründen wurden die Daxx-Varianten zuvor anstelle des GFP mit einem HA-Affinitäts-Tag fusioniert (vgl. Abb. 7.6, Anhang). In Abbildung 3.2.16.B ist die Expression der HA-fusionierten Daxx-Varianten exemplarisch dargestellt, wobei 10 μ g Gesamtproteinextrakt entsprechend transfizierter HEK293-Zellen im „Western Blot“ mit Hilfe eines Anti-HA Antikörpers analysiert wurden. Zur Induktion der Apoptose wurden jeweils äquivalente Mengen der CD95- und HA-Daxx- α -, -Daxx- β - bzw. -Daxx- γ -Expressionsvektoren sowie des HA-Kontrollvektors in HEK293-Zellen ko-transfiziert. Nach 48 h wurde das Ausmaß der Apoptose im Durchflußzytometer durch eine Annexin V-PE/7-AAD-Doppelfärbung nach der unter 2.2.3.7.3 beschriebenen Methode analysiert. Doppelpositive Zellen entsprechen hierbei den in späten Phasen der Apoptose befindlichen Zellen (VERMES et al., 1995). Eine parallel durchgeführte Färbung des überexprimierten CD95-Rezeptors mit einem FITC-gekoppelten Anti-CD95 Antikörper ermöglichte die Bestimmung der entsprechenden Transfektionseffizienz auf die jeweils die detektierte Apoptosehäufigkeit normiert wurde (vgl. Abb. 3.2.16.A; vgl. 2.2.3.7.2).

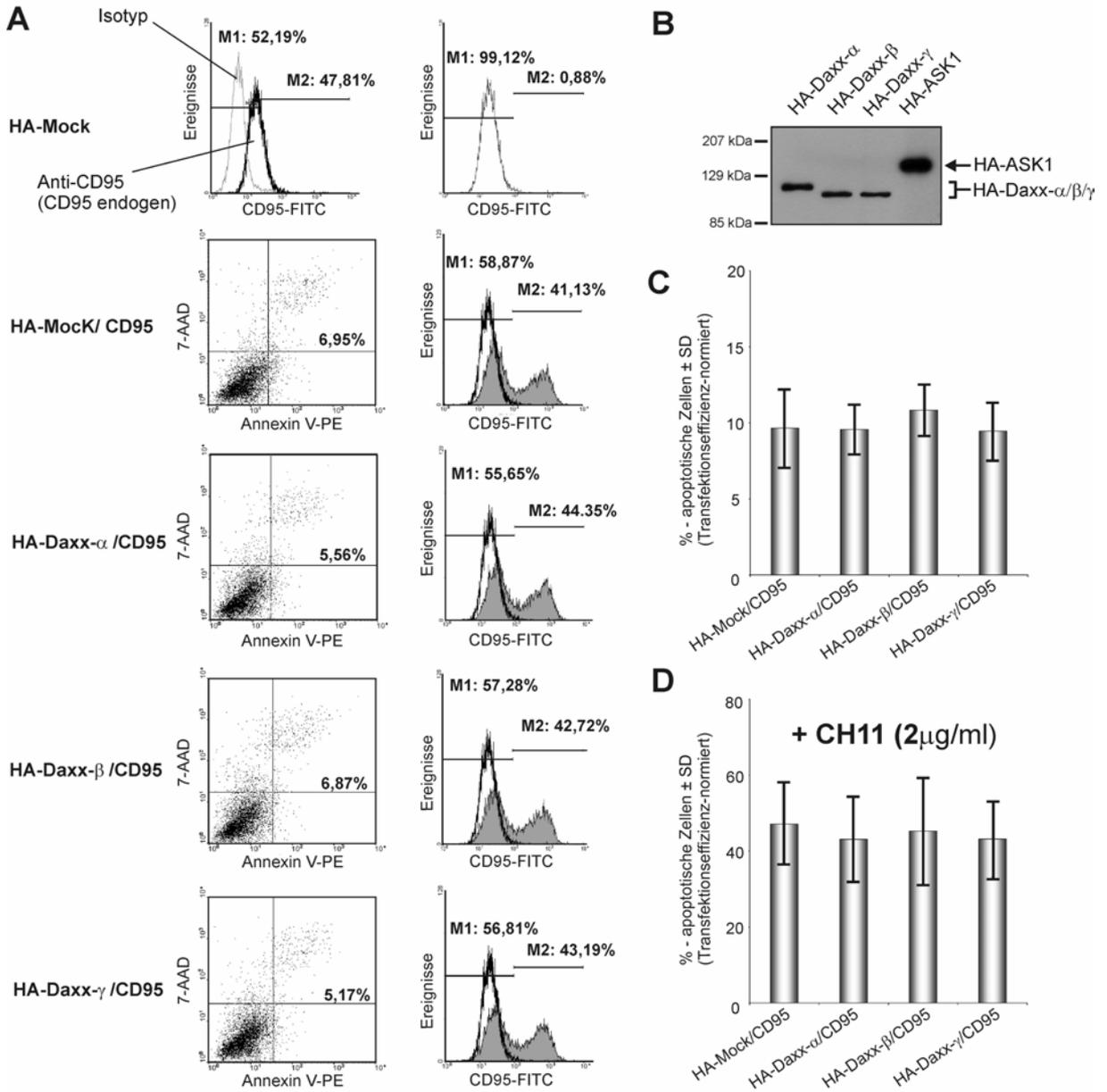


Abb. 3.2.16: Bestimmung des Apoptose-Ausmaßes nach Ko-Expression von CD95 mit den HA-fusionierten Daxx-Varianten. Jeweils äquivalente Mengen der Expressionsvektoren für CD95 und HA-Daxx- α , HA-Daxx- β bzw. HA-Daxx- γ sowie des HA-Kontrollvektors wurden in HEK293-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurde das Ausmaß der Apoptose im Durchflußzytometer durch Annexin V-PE/7-AAD-Doppelfärbung ermittelt, wobei jeweils 10000 Ereignisse analysiert wurden. **A:** Darstellung einer repräsentativen Annexin V-PE/7-AAD-Färbung sowie der Bestimmung der korrespondierenden Transfektionseffizienz durch Markierung des CD95-Rezeptors mittels eines FITC-gekoppelten Anti-CD95 Antikörper. Die FACS-Einstellungen für die Annexin V-PE-Färbung wurden zuvor mit Etoposid-behandelten HEK293-Zellen optimiert. Die Einstellungen zur Markierung des CD95-Oberflächenrezeptors wurden mit HA-Mock-transfizierten HEK293-Zellen vorgenommen, wobei der Unterschied zwischen der Isotypenkontrolle-vermittelten und der Anti-CD95-vermittelten Fluoreszenz dem endogenen CD95-Expressionsniveau entspricht und für die Transfektionsversuche als Nullwert definiert wurde (M2 = 0,88%). **B:** Exemplarische Darstellung der Proteinexpression der HA-fusionierten Daxx-Varianten durch „Western Blot“-Analysen nach elektrophoretischer Auftrennung von jeweils 10 μ g Gesamtproteinextrakten transfizierter HEK293-Zellen durch eine 8%-ige SDS-PAGE. Ein nach pcDNA3-HA-ASK1-Transfektion generierter Zellextrakt diente als Positivkontrolle. **C:** Darstellung der Transfektionseffizienz-normierten Apoptosehäufigkeiten nach Ko-Expression des CD95-Rezeptors und der HA-fusionierten Daxx-Varianten bzw. der HA-Vektorkontrolle. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte inklusive Standardabweichung aus $n = 5$ unabhängigen Versuchen. **D:** Darstellung der jeweils Transfektionseffizienz-normierten Apoptosehäufigkeiten nach zusätzlicher Stimulierung des überexprimierten CD95-Rezeptors mit 2 μ g/ml CH11 für 12 h. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte inklusive Standardabweichung aus $n = 4$ unabhängigen Versuchen.

Durch die Differenz der Fluoreszenzen, die durch einen ungerichteten, ebenfalls FITC-gekoppelten Antikörper des gleichen Isotyps (Isotypenkontrolle) und dem spezifischen Anti-CD95-FITC Antikörper detektiert wurden, konnte der endogene Gehalt an CD95 bestimmt werden. Dieser wurde für die Bestimmung der Transfektionseffizienz als Null definiert. Wie in Abbildung 3.2.16.C dargestellt, konnte das Ausmaß der CD95-vermittelten Apoptose weder durch die Ko-Expression von HA-Daxx- α , noch durch die von HA-Daxx- β oder HA-Daxx- γ gesteigert bzw. moduliert werden und lag in allen Proben durchschnittlich bei ca. 10%. Eine zusätzliche Stimulierung des überexprimierten Rezeptors durch Inkubation mit 2 $\mu\text{g/ml}$ des CD95-agonistischen Antikörpers CH11 für 12 h steigerte zwar die Apoptosehäufigkeit auf durchschnittlich ca. 45%. Ein Verstärkungseffekt oder eine Änderung der Apoptosehäufigkeit durch die Ko-Expression der HA-fusionierten Daxx-Varianten war aber auch hier nicht detektierbar (vgl. Abb. 3.2.16.D). Eine Verlängerung der Inkubationszeit mit CH11 auf 24 h bzw. der Transfektionszeit auf 72 h hatte ebenfalls keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt). Ergänzend zu den FACS-Ergebnissen ist in Abbildung 3.2.17.A ein „Western Blot“ der Daxx-Varianten/CD95-Ko-Expression dargestellt.

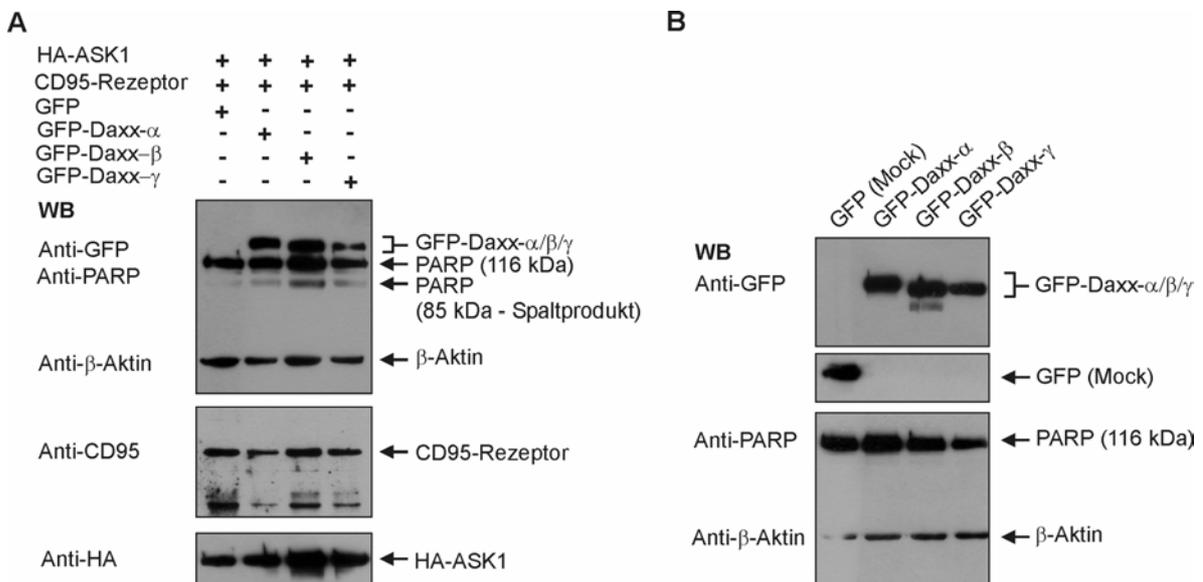


Abb. 3.2.17: PARP-Detektion im „Western Blot“ nach Expression der GFP-fusionierten Daxx-Varianten. **A:** Jeweils 10 μg HEK293-Gesamtproteinextrakt nach Ko-Expression von CD95 und HA-ASK1 mit den einzelnen GFP-fusionierten Daxx-Varianten wurden in einer 8%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ durch Inkubation mit Antikörpern gegen PARP, GFP, CD95, HA und β -Aktin analysiert. **B:** Jeweils 10 μg Gesamtproteinextrakt nach Expression der einzelnen GFP-fusionierten Daxx-Varianten wurden in einer 8%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ auf PARP-Spaltung und das Expressionsniveau der einzelnen Daxx-Varianten hin analysiert. Die Detektion von β -Aktin veranschaulicht, dass äquivalente Proteinladungsmengen vorlagen.

Hierbei wurden in HEK293-Zellen neben den GFP-fusionierten Daxx-Varianten und dem CD95-Rezeptor zur zusätzlichen Verstärkung des Apoptosereizes HA-fusioniertes ASK1 ko-exprimiert. Die Detektion des 85 kDa-Spaltprodukts von PARP unterstützt die erhaltenen Daten aus der Annexin V-Färbung und belegt, dass es sich um einen apoptotischen Prozess handelt. Die „Western Blot“-Daten sind dabei lediglich qualitativer Art, da Gesamtzellextrakte analysiert wurden und somit die zum Teil recht unterschiedlichen Transfektionseffizienzen nicht berücksichtigt wurden, was den unterschiedlichen Gehalt an PARP Spaltprodukt erklärt (vergleiche bspw. PARP Spaltung mit ASK1 Gehalt in GFP-Daxx- β - und GFP-Daxx- γ -Probe). Die alleinige Überexpression der GFP-fusionierten

Daxx-Varianten in HEK293-Zellen war nicht ausreichend um die Apoptose auszulösen, was konsistent mit früheren Beobachtungen (Daxx- α betreffend) ist (YANG et al., 1997; TORII et al., 1999). Wie in Abbildung 3.2.17.B dargestellt, konnte im „Western Blot“ lediglich das ungespaltene 116 kDa-PARP nachgewiesen werden. Die Detektion von GFP sowie der GFP-fusionierten Daxx-Varianten veranschaulicht, dass in diesem Fall vergleichbare Transfektionseffizienzen vorlagen und der Abgleich mit β -Aktin demonstriert, dass äquivalente Proteinmengen aufgetragen wurden.

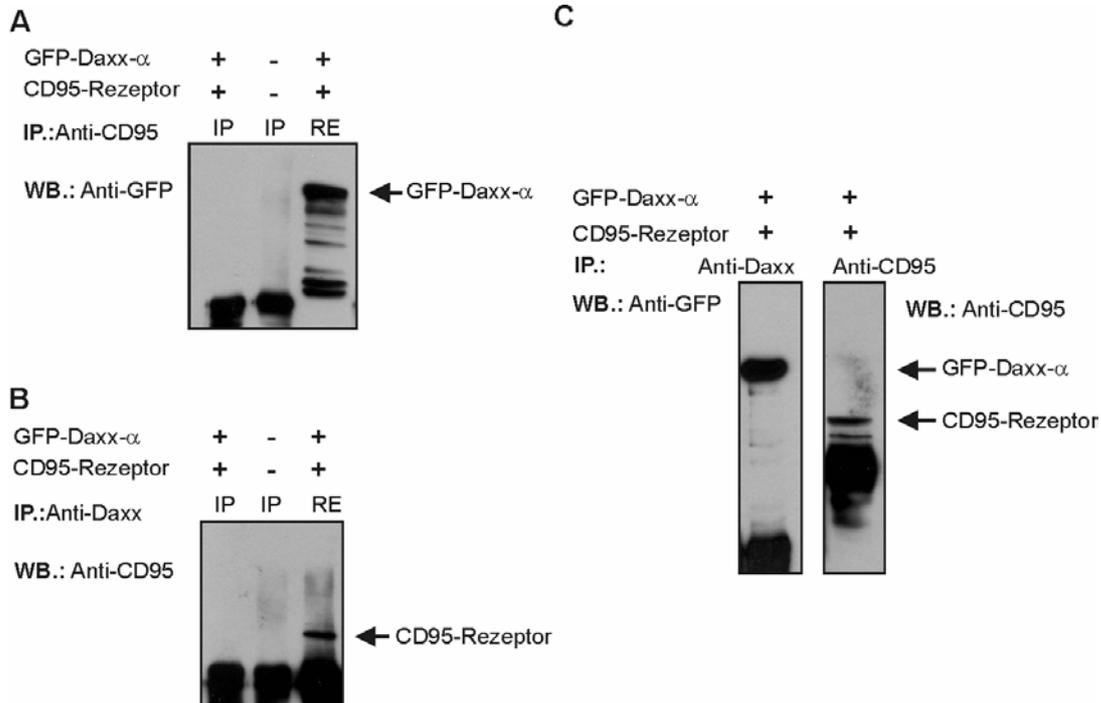


Abb. 3.2.18: Ko-Immünpräzipitationsanalysen von CD95 und GFP-Daxx- α . Äquivalente Mengen an CD95- und GFP-Daxx- α -Expressionsvektoren wurden in HEK293-Zellen transfiziert und nach 48 h wurden Proteinextrakte generiert. Jeweils 450 μ g Gesamtprotein wurden mit einem Anti-Daxx oder einem Anti-CD95 Antikörper immunpräzipitiert. Die resultierenden Immunkomplexe wurden anschließend durch eine 10%-ige SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ analysiert. **A:** Nach Immunpräzipitation (IP) mit dem Anti-CD95 Antikörper konnte GFP-Daxx- α im korrespondierenden Immunkomplex nicht nachgewiesen werden. Die Detektion von GFP-Daxx- α im entsprechenden Rohextrakt (RE) belegt die Transfektions-bedingte Überexpression von GFP-Daxx- α . **B:** Nach der Immunpräzipitation mit dem Anti-Daxx Antikörper konnte der CD95-Rezeptor im korrespondierenden Immunkomplex ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Detektion von CD95 im Rohextrakt verdeutlicht, dass neben GFP-Daxx- α auch CD95 überexprimiert vorlag. **C:** Die Analyse der Immunpräzipitate im „Western Blot“ mit zur IP äquivalenten Antikörpern zeigte, dass sowohl GFP-Daxx- α , als auch CD95 im Immunkomplex vorlagen und prinzipiell präzipitierbar waren.

Entgegen früheren Beobachtungen von Yang et al. (1997) deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Daxx in HEK293-Zellen keine Verstärkung der CD95-abhängigen Apoptose vermittelt. Obendrein konnten durch Ko-Immünpräzipitationsanalysen keine Interaktion zwischen Daxx- α und dem CD95-Rezeptor nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.2.18). In Proteinextrakten von CD95 und GFP-Daxx- α überexprimierenden HEK293-Zellen konnte weder GFP-Daxx- α durch die Immunpräzipitation mit einem Anti-CD95 ko-präzipitiert werden, noch konnte CD95 nach der IP mit einem Anti-Daxx Antikörper im anschließenden „Western Blot“ nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.2.18). Der für die IP verwendete Anti-Daxx Antikörper bindet dabei am N-Terminus von Daxx (Daxx M-112, Santa Cruz), so dass die durch den C-Terminus vermittelte Interaktion zwischen Daxx und CD95 nicht beeinträchtigt sein sollte. Die Analyse der Immunpräzipitate im „Western Blot“ zeigte, dass

erwartungsgemäß sowohl GFP-Daxx- α , als auch CD95 im Immunkomplex vorlagen und prinzipiell präzipitierbar waren (vgl. Abb. 3.2.18.C). Auch nach zusätzlicher Ko-Expression des CD95/Daxx Interaktions-Vermittlers ASK1 (HA-ASK1) zusammen mit GFP-Daxx- α und CD95 konnte durch Ko-Immunpräzipitationsanalysen keine Wechselwirkung zwischen GFP-Daxx- α und dem CD95-Rezeptor festgestellt werden. Im Immunkomplex nach Anti-HA Immunpräzipitation war lediglich GFP-Daxx- α detektierbar, was den Ergebnissen aus 3.2.5.1 entspricht (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt die Beobachtungen von Torii et al., die ebenfalls keine Wechselwirkung zwischen Daxx und dem CD95-Rezeptor nachweisen konnten (TORII et al., 1999).

Nach den unter 3.2.5.3 beschriebenen Ergebnissen scheint Daxx, entgegen den Beobachtungen durch andere Arbeitsgruppen, in HEK293-Zellen nicht an der CD95-abhängigen Apoptose beteiligt zu sein. Um die Funktion der Daxx-Spleißvarianten Daxx- β und Daxx- γ im Vergleich zur Hauptform Daxx- α innerhalb der CD95-abhängigen Apoptose untersuchen zu können, musste daher ein anderer Zelltyp gewählt werden. Die Tatsache, dass die Daxx-Spleißvarianten im humanen RCC identifiziert wurden deutet daraufhin, dass Daxx in diesem Zelltyp eine physiologische Relevanz besitzen könnte. Die folgenden Untersuchungen zur Funktion von Daxx und seinen Spleißvarianten als Apoptose-Regulatoren wurden daher an den beiden klarzelligen RCC-Zelllinien clearCa-2 und clearCa-6 durchgeführt. ClearCa-6 ist dadurch charakterisiert, dass sie sensitiv gegenüber der CD95-abhängigen Apoptose ist, während clearCa-2 weitgehend resistent ist (GERHARZ et al., 1999). Mit Hilfe dieser Zelllinien sollte untersucht werden, ob die Überexpression von Daxx- α zu einer weiteren Sensitivierung von clearCa-6 führt bzw. ausreichend ist, um clearCa-2 gegenüber der CD95-abhängigen Apoptose zu sensitivieren und wie sich die Überexpression der Varianten Daxx- β und Daxx- γ auf die CD95-abhängige Apoptose in den beiden Zelllinien auswirkt.

3.2.5.4 Etablierung stabiler Daxx- α -, Daxx- β - und Daxx- γ -überexprimierender RCC-Zelllinien

RCC-Zelllinien zeichnen sich neben der weitgehenden Resistenz gegenüber Zytostatika und Chemotherapeutika ebenfalls dadurch aus, dass sie sich mit herkömmlichen Transfektionsreagenzien nicht effizient transfizieren lassen (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. C. Mahotka). Aus diesem Grund wurde ein retrovirales Transduktionssystem zur Herstellung von stabilen GFP-, GFP-Daxx- α -, GFP-Daxx- β - bzw. GFP-Daxx- γ -überexprimierenden clearCa-2- bzw. clearCa-6-Zelllinien etabliert. Nach der unter 2.2.3.5 beschriebenen Methode wurden die entsprechenden Expressionsvektoren zunächst transient in die AmphoPack™-Zelllinie (Clontech) transfiziert, um infektiöse Viren zu generieren. Nach 48 h wurden die Virus-enthaltenden Medien abgenommen und zur Infektion der Zielzellen clearCa-2 und clearCa-6 eingesetzt. Der Anteil an transduzierten Zellen wurde weiter erhöht, indem die Zelllinien anschließend für > 21 Tage mit G418 selektioniert wurden. Um den heterogenen Charakter der RCC-Zelllinien weitgehend aufrechtzuerhalten, wurde von einer klonalen Selektionierung der transduzierten Zelllinien abgesehen. Wie in Abbildung 3.2.19 dargestellt, konnten so stabile GFP- bzw. GFP-Daxx- α -, GFP-Daxx- β - sowie GFP-Daxx- γ -überexprimierende clearCa-2- und clearCa-6-Zelllinien hergestellt werden. Durchflußzytometrische Analysen zur Bestimmung des Anteils GFP-positiver Zellen zeigten, dass die Zelllinien bis zu 95% transduziert waren (vgl. Abb. 3.2.19.B und D) und „Western Blot“-Analysen der stabilen Zelllinien belegen, dass GFP bzw. die GFP-fusionierten Daxx-Varianten in den Zellen überexprimiert waren. Im Vergleich zur endogenen

Expression waren die GFP-fusionierten Daxx-Varianten sowohl in den clearCa-2- wie auch den clearCa-6-Zelllinien deutlich stärker exprimiert (vgl. Abb. 3.2.19.A und C).

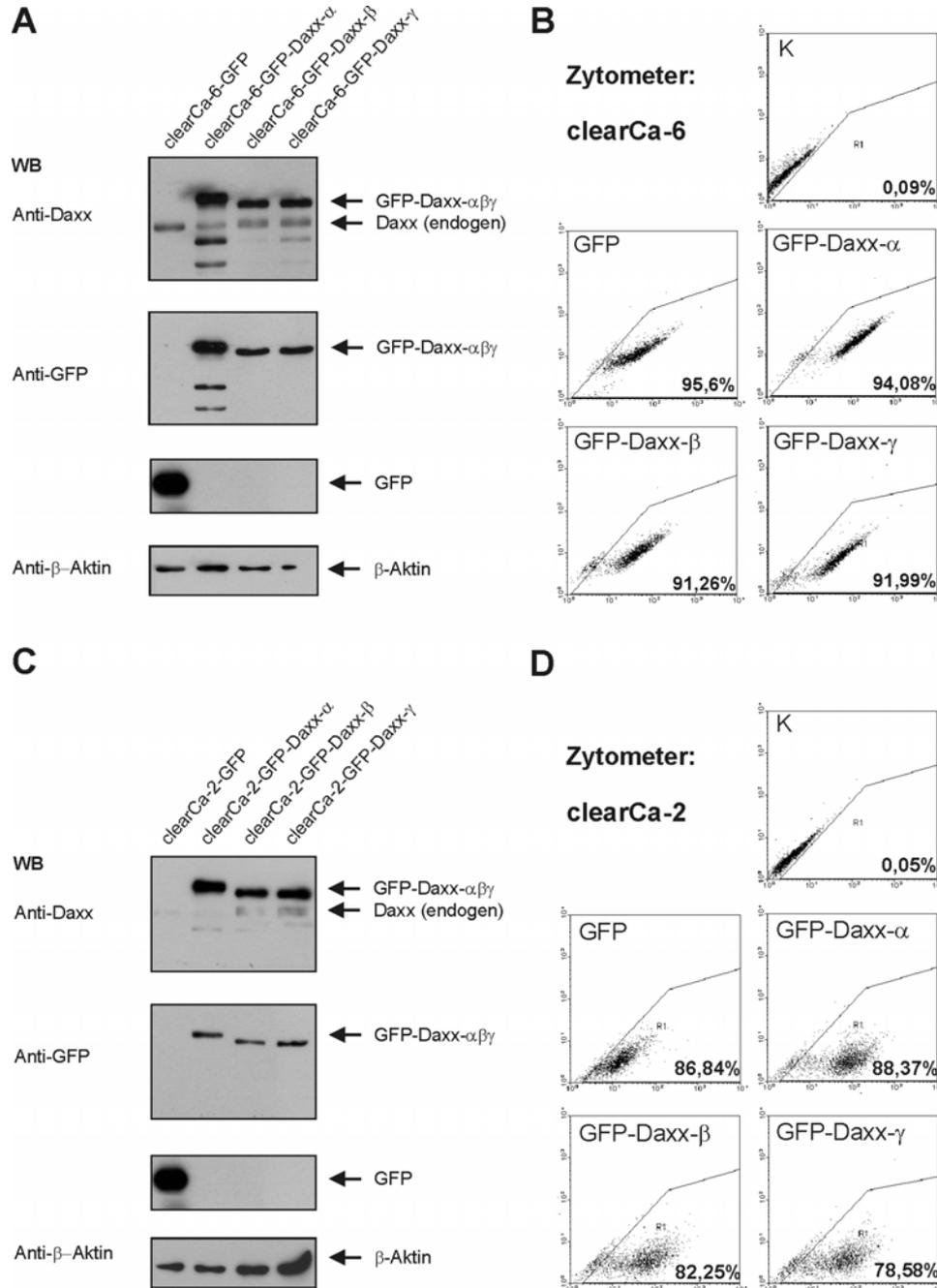


Abb. 3.2.19: Dokumentation der stabli-transduzierten RCC-Zelllinien clearCa-2 und clearCa-6. Nachweis der Überexpression von GFP, GFP-Daxx- α , -Daxx- β bzw. -Daxx- γ . **A** und **C**: „Western Blot“-Analysen der stabilen clearCa-2- und clearCa-6-Zelllinien. Jeweils 20 μ g Gesamtprotein der transduzierten Zelllinien wurden in einer 8%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ mittels GFP- und Daxx-spezifischen Antikörpern analysiert. Der Abgleich mit β -Aktin verdeutlicht, dass vergleichbare Proteinmengen vorlagen. Die zusätzlichen Banden neben der endogenen Daxx-Bande sind vermutlich verschiedene Phospho-Formen von Daxx (HOLLENBACH et al., 1999). **B** und **D**: Durchflußzytometrische Analysen der stabilen clearCa-2- und clearCa-6-Zelllinien zur Bestimmung des Anteils an GFP-positiven Zellen. Jeweils 10000 Ereignisse wurden im FITC-Fluoreszenzkanal gegen den PI-Fluoreszenzkanal analysiert. Die FITC-Fluoreszenz ist in allen Diagrammen an der x-Achse aufgetragen und die von PI an der y-Achse. Als Kontrollen dienten jeweils nicht infizierte clearCa-2 bzw. clearCa-6 Zellen (K).

3.2.5.5 Der Einfluss der Daxx-Varianten auf die CD95-abhängige Apoptose in der CD95-sensitiven RCC-Zelllinie clearCa-6

Für die Untersuchung der Rolle der Daxx-Varianten in der CD95-abhängigen Apoptose von clearCa-6 wurde in den stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien durch Inkubation mit dem CD95-agonistischen Antikörper CH11 die Apoptose induziert und die Auswirkungen auf die Lebendzellzahl ermittelt. Nach der unter 2.2.3.8.1 beschriebenen Methode wurden hierfür jeweils 7500 Zellen der Zelllinien clearCa-6-GFP-Daxx- α , -Daxx- β bzw. -Daxx- γ sowie der Kontroll-Zelllinie clearCa-6-GFP in separaten 96-well-Platten ausgesät und 24 h später durch Behandlung mit 500 ng/ml CH11 stimuliert. Nach jeweils 1, 2, 3 und 6 h wurde die Lebendzellzahl mittels „MTT-Assay“ bestimmt, jeweils bezogen auf die entsprechende, unbehandelte Kontrolle.

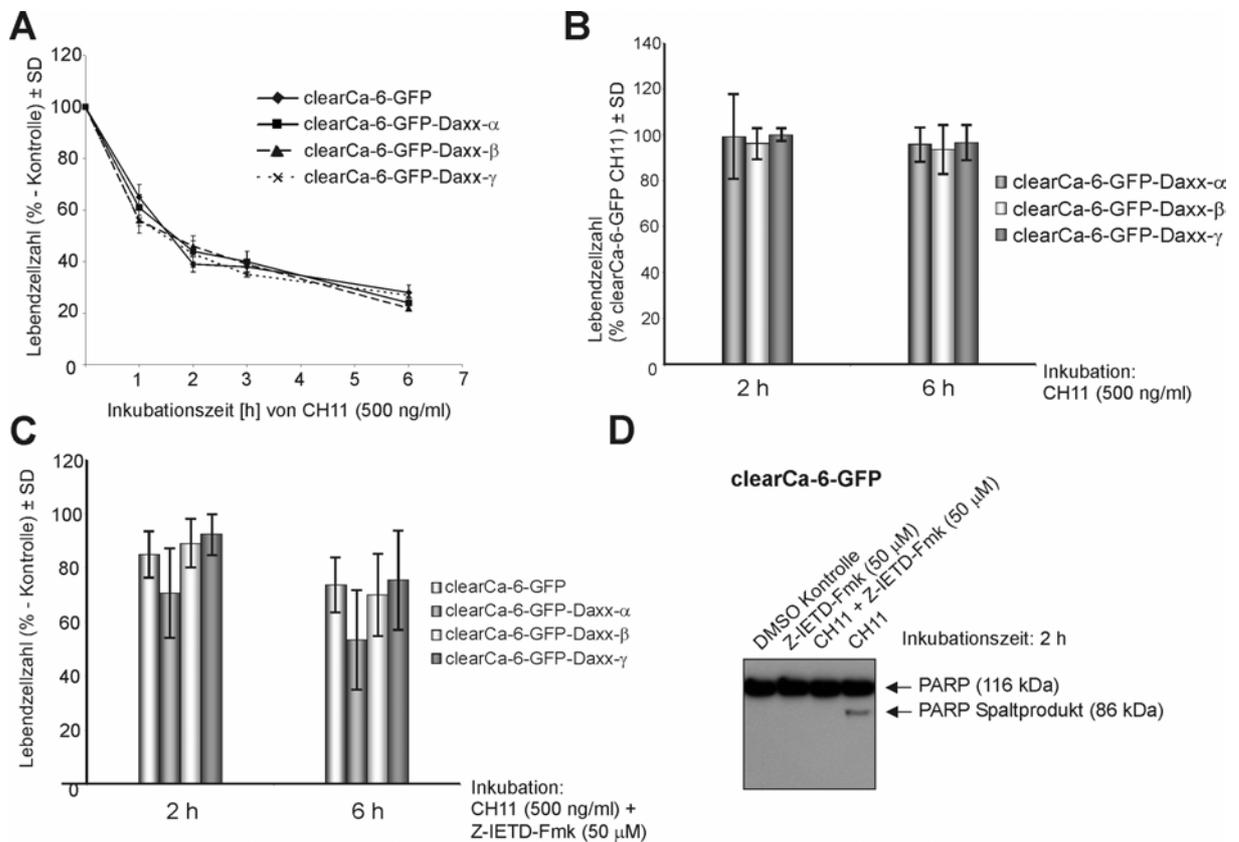


Abb. 3.2.20: Einfluss der GFP-fusionierten Daxx-Varianten auf die CD95-abhängige Apoptose in der RCC-Zelllinie clearCa-6. **A:** Repräsentative Überlebenskurven der stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien nach CD95-Stimulation. Jeweils äquivalente Zellzahlen von clearCa-6-GFP, clearCa-6-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ wurden in 96-well-Zellkulturplatten ausgesät und 24 h später mit 500 ng/ml CH11 behandelt. Nach 1, 2, 3 und 6 h wurden die relativen Lebendzellzahlen mittels „MTT-Assay“ ermittelt, jeweils bezogen auf die entsprechende unbehandelte Kontrollzelllinie. **B:** Darstellung der Lebendzellzahl nach 2 h bzw. 6 h Inkubation mit 500 ng/ml CH11. Die Zellzahlen von clearCa-6-GFP-Daxx- α , -Daxx- β , und -Daxx- γ sind hierbei auf die Werte der ebenfalls mit CH11-behandelten clearCa-6-GFP-Kontrollzelllinie bezogen worden. Die Mittelwerte inklusive Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt. **C:** Darstellung der Lebendzellzahl nach 2 h bzw. 6 h Inkubation mit 500 ng/ml CH11 unter Caspase-8-Hemmung. Jeweils äquivalente Zellzahlen von clearCa-6-GFP, clearCa-6-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ wurden in 96-well-Zellkulturplatten ausgesät und mit 50 μ M des Caspase-8-Inhibitors Z-IETD-Fmk vorinkubiert. 24 h später wurden die Zellen mit 500 ng/ml CH11 behandelt und nach 2 und 6 h wurde die relative Lebendzellzahl mittels „MTT-Assay“ bestimmt, jeweils bezogen auf die entsprechende mit DMSO-behandelte Kontrollzelllinie. Die Mittelwerte inklusive Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt. **D:** Zur Bestätigung einer vorliegenden Inhibierung der Caspase-8 wurden Proteinextrakte der behandelten clearCa-6-GFP Zellen hergestellt und nach elektrophoretischer Auftrennung durch eine 10%-ige SDS-PAGE im „Western Blot“ auf die Spaltung von Caspase-8 hin analysiert.

In Abbildung 3.2.20.A ist die resultierende Überlebenskurve eines repräsentativen Experimentes dargestellt. Es zeigt sich, dass alle vier stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien sensitiv gegenüber der Behandlung mit CH11 reagieren und die prozentualen Lebendzellzahlen im zeitlichen Verlauf kontinuierlich abnehmen. Nach 1 h ist bereits eine Abnahme der Zellzahlen auf ca. 60% zu beobachten und nach 6 h haben sich die Lebendzellzahlen auf einen Wert von ca. 30% weiter reduziert. Vergleicht man die verschiedenen Vitalitätskurven miteinander, so ist im Rahmen der Standardabweichung kein signifikanter Unterschied in der Kinetik des Zelltodes zwischen der GFP-überexprimierenden und der GFP-Daxx- α -überexprimierenden clearCa-6-Zelllinie sowie zwischen clearCa-6-GFP-Daxx- α und den Zelllinien clearCa-6-GFP-Daxx- β bzw. clearCa-6-GFP-Daxx- γ zu verzeichnen. In Abbildung 3.2.20.B sind die Mittelwerte der Lebendzellzahlen nach 2 h bzw. 6 h Inkubation mit CH11 aus mindestens drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Zellzahlen sind in diesem Fall auf die Werte der ebenfalls mit CH11-behandelten clearCa-6-GFP-Kontrollzelllinie bezogen worden. Im Rahmen der Standardabweichung sind erneut keine signifikanten Unterschiede zwischen den GFP-Daxx- α -, und GFP-Daxx- β - bzw. GFP-Daxx- γ -exprimierenden Zelllinien erkennbar.

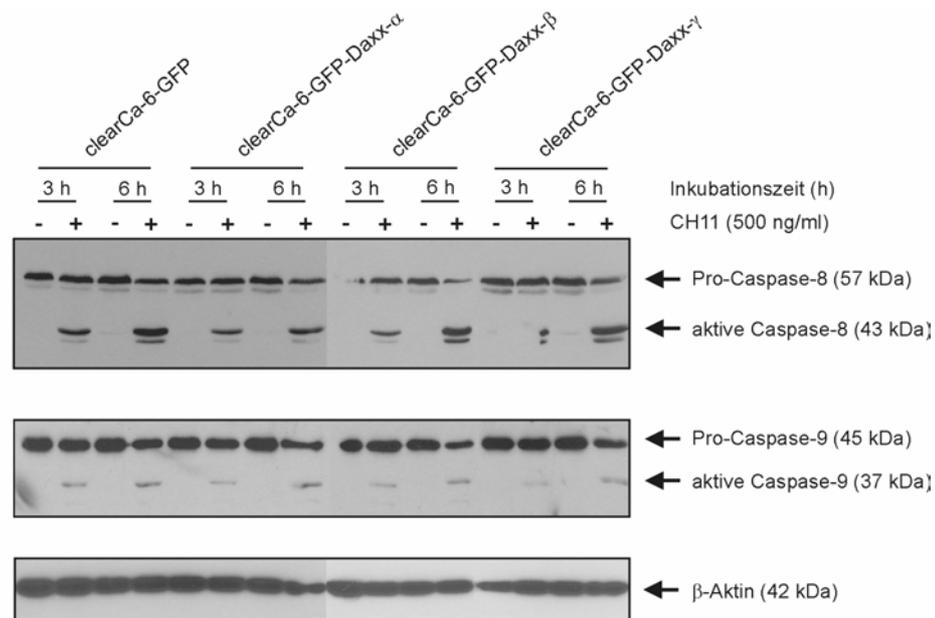


Abb. 3.2.21: „Western Blot“-Analyse der CH11-behandelten clearCa-6-GFP, -Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ Zelllinien. Jeweils 30 μ g Gesamtproteinextrakte von unbehandelten sowie 3 h bzw. 6 h mit 500 ng/ml CH11-behandelten clearCa-6-GFP, GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ Zellen wurden in einer 10%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ mit Antikörpern gegen Caspase-8 und Caspase-9 analysiert. Die Detektion von β -Aktin diente zur Veranschaulichung vergleichbarer Proteinladungsmengen.

Die Tatsache, dass sich alle Werte um 100% bewegen, demonstriert, dass ebenfalls kein signifikanter Unterschied zur Bezugskontrolle clearCa-6-GFP bestand. Mit Hilfe von „Western Blot“-Analysen wurden Proteinextrakte von 3 h und 6 h CH11-behandelter clearCa-6-GFP- bzw. clearCa-6-GFP-Daxx- α -, -Daxx- β - und -Daxx- γ -Zelllinien auf die Spaltung von Caspase-8 und Caspase-9 untersucht. In allen CH11-behandelten Zelllinien war eine Spaltung von Caspase-8 und Caspase-9 nachweisbar, wobei jeweils die Menge an Spaltprodukt nach 6 h CH11-Behandlung erwartungsgemäß höher war als nach 2 h. Das Ausmaß der Caspase-8-Spaltung war dabei jeweils höher als das der Caspase-9 (vgl.

Abb. 3.2.21). Zwischen clearCa-6-GFP, clearCa-6-GFP-Daxx- α , clearCa-6-GFP-Daxx- β und clearCa-6-GFP-Daxx- γ war das Ausmaß der Caspase-Spaltungen insgesamt vergleichbar, was die Ergebnisse aus den „MTT-Analysen“ unterstützt. In den Zellextrakten der unbehandelten Kontrollen konnten ausschließlich die ungespaltenen Caspasen detektiert werden (vgl. Abb. 3.2.21). Aufgrund der Tatsache, dass Daxx die CD95-abhängige Apoptose durch die Aktivierung des ASK1/JNK-Signalweges auch unabhängig von Caspase-8 fördert (YANG et al., 1997) wurde untersucht, ob in den stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien die Daxx-vermittelte Apoptose unter Caspase-8-Hemmung eine stärkere Bedeutung erlangt. Hierfür wurden äquivalente Zellzahlen von clearCa-6-GFP bzw. clearCa-6-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ ausgesät und mit 50 μ M des Caspase-8-Inhibitors Z-IETD-Fmk für 24 h vorinkubiert. Die Apoptose wurde daraufhin mit 500 ng/ml CH11 induziert und nach 2 h und 6 h die Lebezellzahl mittels „MTT-Assay“ bestimmt. Da der Caspase-8-Inhibitor in DMSO gelöst ist, sind die Zellzahlen jeweils auf die entsprechende, mit DMSO-behandelte Kontrolle bezogen. In Abbildung 3.2.20.C sind die Mittelwerte der Lebendzellzahlen nach 2 h bzw. 6 h Inkubation aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Tatsache, dass die Lebendzellzahlen auch nach 6 h CH11-Inkubation noch bei 80% liegen, belegt, dass durch eine Caspase-8-Hemmung das Ausmaß der Apoptose zu einem erheblichen Teil inhibiert wird, aber nicht vollständig aufgehalten werden kann. „Western Blot“-Untersuchungen, die exemplarisch an Proteinextrakten von CH11- bzw. CH11 in Kombination mit Z-IETD-Fmk-behandelten clearCa-6-GFP-Zellen durchgeführt wurden, demonstrieren, dass die Caspase-8-Spaltung nach 2h CH11-Behandlung unter Anwesenheit des Caspase-8-Inhibitors Z-IETD-Fmk erwartungsgemäß unterbunden ist (vgl. Abb. 3.2.20.D). Im Rahmen der Standardabweichung sind auch nach Caspase-8-Hemmung keine signifikanten Unterschiede zwischen der GFP- und der GFP-Daxx- α -überexprimierenden clearCa-6-Zelllinie sowie zwischen clearCa-6-GFP-Daxx- α und den Daxx-Spleißvarianten-überexprimierenden Zelllinien detektierbar. Es ist lediglich ein leichter Trend erkennbar, nachdem clearCa-6-GFP-Daxx- α sowohl nach 2 h als auch nach 6 h eine geringere Lebendzellzahl aufweist als clearCa-6-GFP bzw. clearCa-6-GFP-Daxx- β und -Daxx- γ . Die Tatsache, dass in der GFP-Daxx- α -überexprimierenden Zelllinie im Vergleich zur GFP-Kontrollzelllinie keine signifikanten Unterschiede in der Caspase-8-unabhängigen Apoptose auftreten deutet daraufhin, dass der Caspase-8-unabhängige Anteil der Apoptose in clearCa-6 vermutlich nicht Ursache einer Daxx-vermittelten Apoptose durch eine Aktivierung der JNK ist.

3.2.5.6 Analyse der CD95-abhängigen JNK-Aktivierung in clearCa-6

Der Befund, dass die Änderung der Lebendzellzahl nach CD95-Aktivierung in den stabil-transduzierten clearCa-6-Zellen gleichartig verläuft und die Beobachtung, dass der Anteil der Caspase-8-unabhängigen Apoptose sich ebenfalls nicht signifikant unterscheidet (vgl. 3.2.5.5) deuten darauf hin, dass die Überexpression von GFP-Daxx- α (und den Spleißvarianten -Daxx- β und -Daxx- γ) in clearCa-6 zu keiner Verstärkung der CD95-abhängigen Apoptose führt. Da der Daxx-vermittelte Anteil der CD95-abhängigen Apoptose durch die Aktivierung von ASK1 und JNK verläuft, wurde untersucht, ob in clearCa-6-Zellen eine Beeinträchtigung dieser Signaltransduktionskaskade besteht, die dafür verantwortlich sein könnte, dass Daxx hier nicht als Verstärker der CD95-Apoptose wirken kann. Mit Hilfe von *in vitro* „Kinase-Assays“ wurde daher die JNK-Aktivität in unbehandelten sowie mit CH11-behandelten clearCa-6-GFP- bzw. clearCa-6-GFP-Daxx- α -, GFP-Daxx- β - und GFP-Daxx- γ -Zellen analysiert. Zur spezifischen Anreicherung der JNK wurde 100 μ g Gesamtprotein des

jeweiligen Kinaseextraktes mit einem Anti-JNK Antikörper immunpräzipitiert, aufgereinigt und anschließend wie unter 2.2.4.6.1 beschrieben in einer Kinasereaktion mit radioaktivem [γ - 32 P]-ATP und dem JNK Substrat c-Jun (GST-c-Jun) inkubiert. Wie in Abbildung 3.2.22 dargestellt, konnte nach elektrophoretischer Auftrennung der Reaktionen in allen mit CH11-behandelten Zelllinien eine deutliche JNK-Aktivität nachgewiesen werden, wobei in der clearCa-6-GFP-Daxx- α -Probe interessanterweise die geringste JNK-Aktivität detektierbar war. „Western Blot“-Analysen der Kinaseextrakte zeigen in allen Proben ein gleich bleibendes Expressionsniveau der JNK und demonstrieren somit, dass die detektierte JNK-Aktivität auf einer tatsächlichen Zunahme der Kinaseaktivität beruht und nicht artifiziell durch eine Erhöhung der Proteinexpression hervorgerufen wurde. Die Detektion von β -Aktin diente als Nachweis vergleichbarer Proteinladungsmengen (vgl. Abb. 3.2.22).

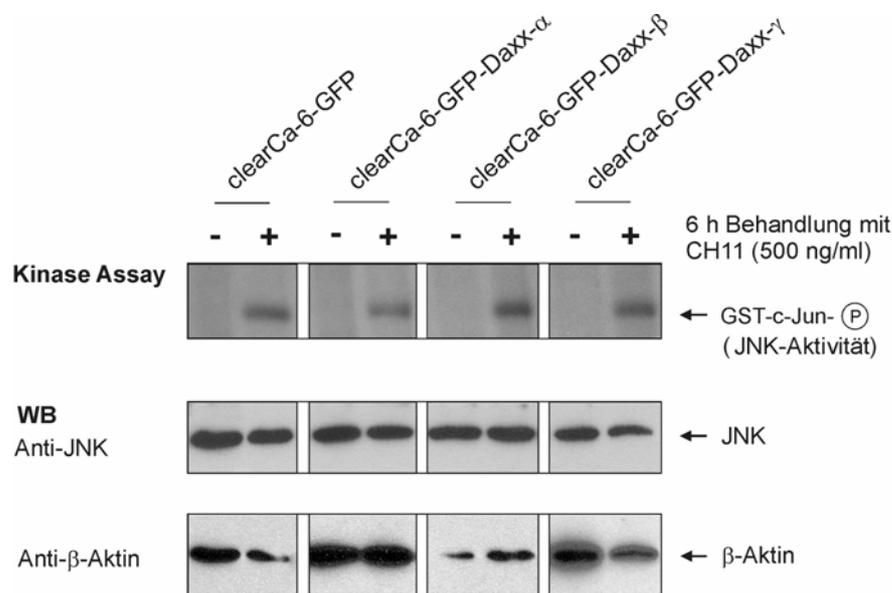


Abb. 3.2.22: Analyse der CH11-induzierten JNK-Aktivierung in den stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien. Mit jeweils 100 μ g Gesamtprotein von 6 h CH11-behandelter clearCa-6-GFP-, clearCa-6-GFP-Daxx- α -, -Daxx- β - und -Daxx- γ -Zellen sowie den entsprechenden unbehandelten Kontrollen wurden zur Anreicherung der JNK Immunpräzipitationen mit einem Anti-JNK Antikörper durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden in einer Kinasereaktion mit dem GST-fusionierten Substrat c-Jun sowie [γ - 32 P]-ATP inkubiert. Anschließend wurden die phosphorylierten und radioaktiv markierten Substrate in einer 12%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch detektiert, wobei die Bandenintensität ein Maß für die JNK-Aktivität war. „Western Blot“-Analysen der Proteinextrakte mit Anti-JNK und Anti- β -Aktin Antikörpern demonstrieren, dass vergleichbare Expressionsniveaus von JNK vorlagen, wobei jeweils 30 μ g Protein des entsprechenden Rohextraktes aufgetragen wurden.

Die Tatsache, dass eine Überexpression von GFP-Daxx- α in clearCa-6 keine Auswirkungen auf die CD95-abhängigen Apoptose zeigt, ist demnach nicht durch eine beeinträchtigte JNK-Aktivierung begründet. Um auszuschließen, dass die Zellbehandlung mit 500 ng/ml CH11 einen Sättigungsbereich der CD95-abhängigen Apoptose darstellt und eine Überexpression von Daxx keine zusätzliche Sensitivierung bewirken kann, wurde eine Dosiskinetik mit verschiedenen CH11-Konzentrationen durchgeführt. Jeweils gleiche Zellzahlen von clearCa-6-GFP und clearCa-6-GFP-Daxx- α wurden mit 10, 75, 125 und 250 ng/ml CH11 behandelt. Nach 24 h Inkubation wurde die resultierende Lebendzellzahl mittels „MTT-Assay“ bestimmt, jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Wie in Abbildung 3.2.23 dargestellt, reagieren beide Zelllinien sensitiv auf die Behandlung mit CH11 ab

einer Konzentration von 75 ng/ml, wobei die resultierenden Lebendzellzahlen mit steigender CH11-Konzentration abnehmen, was belegt, dass keine Sättigung der Apoptose-Induktion bzw. -Transduktion vorliegt. Vergleicht man die resultierenden Lebendzellzahlen von clearCa-6-GFP und clearCa-6-GFP-Daxx- α , so ist im Rahmen der Standardabweichung allerdings kein signifikanter Unterschied in der Kinetik des Zelltodes zu verzeichnen.

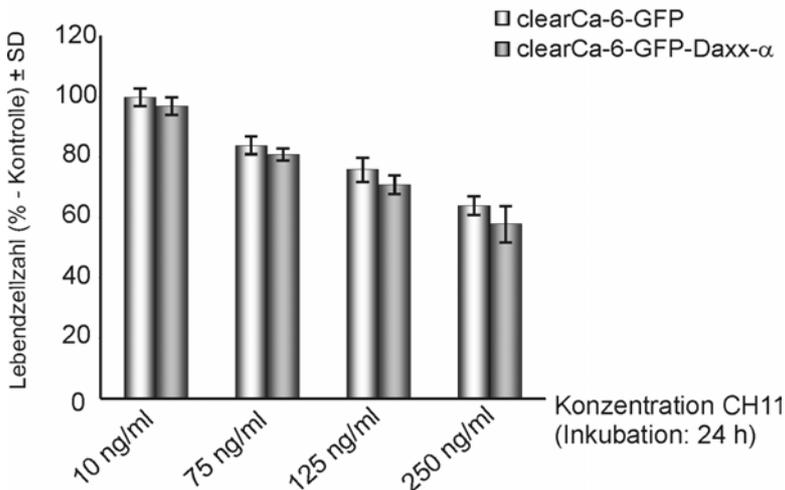


Abb. 3.2.23: Einfluss verschiedener CH11-Konzentration auf die Lebendzellzahl der stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien. Jeweils äquivalente Zellzahlen von clearCa-6-GFP und clearCa-6-GFP-Daxx- α wurden in 96-well-Zellkulturplatten ausgesät und für 24 h mit 10, 75, 125 bzw. 250 ng/ml CH11 behandelt. Die resultierenden Lebendzellzahlen wurden durch „MTT-Assay“ ermittelt und sind jeweils auf die unbehandelte Kontrolle bezogen.

3.2.5.7 Der Einfluss der Daxx-Varianten auf die CD95-abhängige Apoptose in der CD95-resistenten RCC-Zelllinie clearCa-2

Um zu untersuchen, ob die Überexpression von Daxx- α in der resistenten RCC-Zelllinie clearCa-2 zu einer Sensitivierung gegenüber der CD95-abhängigen Apoptose führt und wie sich die Überexpression von Daxx- β und Daxx- γ auswirkt, wurde der Einfluss verschiedener CH11-Konzentrationen auf die Lebendzellzahl der stabil-transduzierten clearCa-2-Zelllinien ermittelt. Wie bereits für die Analyse von clearCa-6 beschrieben, wurden jeweils gleiche Zellzahlen der vier stabil-transduzierten Zelllinien clearCa-2-GFP, clearCa-2-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ ausgesät und mit CH11 behandelt. Aufgrund der ausgeprägten Resistenz gegenüber der CD95-abhängigen-Apoptose wurden die Zellen in diesem Fall mit 100, 250, 500 und 1000 ng/ml CH11 für 24 h inkubiert. Die relative Lebendzellzahl wurde ebenfalls mittels „MTT-Assay“ bestimmt und jeweils auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. In Abbildung 3.2.24 ist die entsprechende CH11-Dosiskinetik dargestellt. Auch nach der Behandlung mit 1 μ g/ml CH11 hatte sich nach 24 h in allen Zelllinien die Lebendzellzahl auf lediglich ca. 90% reduziert, wobei wie im Fall von clearCa-6 keine signifikanten Differenzen zwischen den resultierenden Lebendzellzahlen von clearCa-2-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ sowie der GFP-Kontrollzelllinie zu verzeichnen waren. Eine Überexpression von Daxx ist demzufolge nicht ausreichend um die Resistenz von clearCa-2 gegenüber der CD95-abhängigen Apoptose aufzuheben. Nach den hier beschriebenen Ergebnissen scheint Daxx nicht an der CD95-abhängigen Apoptose in den RCC-Zelllinien clearCa-2 und clearCa-6 beteiligt zu sein. Aufgrund dessen wurde in den GFP- bzw. GFP-Daxx- α -überexprimierenden Zelllinien clearCa-2 und clearCa-6 mittels „Western Blot“-Analysen die Expression der Daxx-Inhibitoren HSP27 und Flip_L untersucht. Wie in Abbildung 3.2.24.B dargestellt, konnte in allen Zelllinien eine deutliche Expression der beiden Proteine detektiert

werden, wobei die CD95-resistente Zelllinie clearCa-2 eine stärkere Expression von HSP27 zeigte und in den clearCa-6-Zellen im Vergleich mit den clearCa-2-Zellen ein geringfügig höheres Expressionsniveau von Flip_L vorlag. Die Überexpression von GFP-Daxx- α wirkte sich in beiden Zelllinien nicht auf das Expressionsniveau von HSP27 und Flip_L aus, wie am Vergleich mit der jeweils GFP-überexprimierenden Kontrollzelllinie deutlich wird.

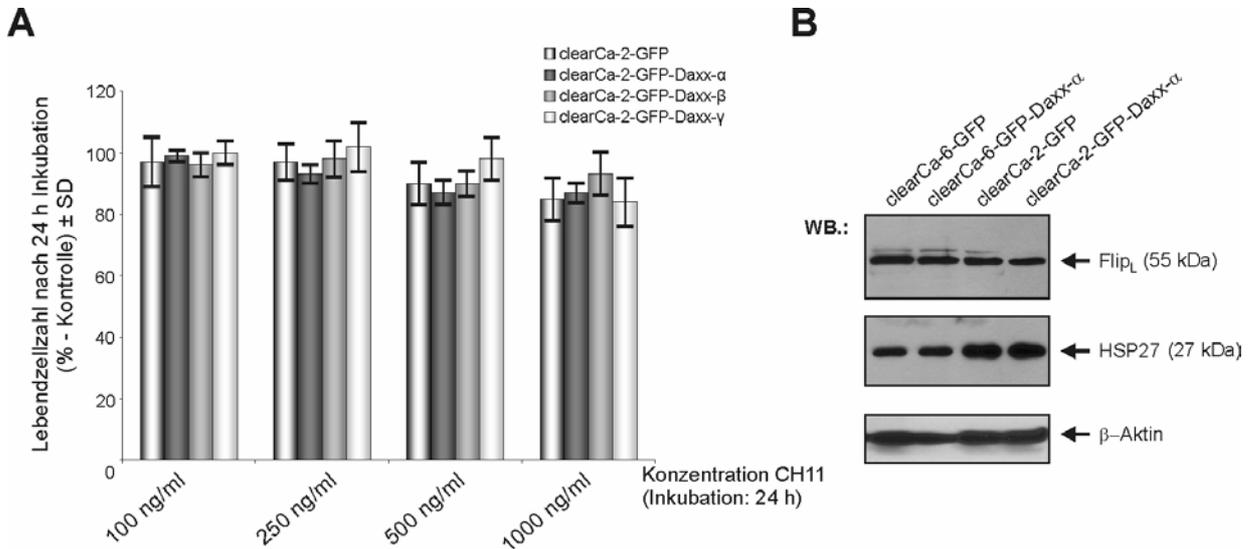


Abb. 3.2.24: Das Ausmaß der CD95-abhängigen Apoptose in den stabil-transduzierten clearCa-2-Zelllinien. A: Jeweils äquivalente Zellzahlen von clearCa-2-GFP, clearCa-2-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ wurden ausgesät und mit 100, 250, 500 und 1000 ng/ml des CD95-agonistischen Antikörpers CH11 behandelt. Nach 24 h Inkubation wurden die Lebendzellzahlen durch „MTT-Assay“ analysiert, wobei die Werte jeweils auf die unbehandelten Kontrollen bezogen worden sind. **B:** „Western Blot“ Untersuchung zur HSP27- und Flip_L-Expression in den GFP- bzw. GFP-Daxx- α -überexprimierenden clearCa-2- und clearCa-6-Zelllinien. Jeweils 25 μ g Gesamtprotein wurden in einer 12%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. Die Detektion von β -Aktin demonstriert vergleichbare Proteinladungsmengen.

3.2.6 Die Funktion der Daxx-Isoformen als Regulatoren der p53-abhängigen Transkription

Entsprechend seiner nukleären Lokalisation, ist Daxx auch an der Regulation der Transkription beteiligt. Als eine Art Ko-Repressor bindet Daxx verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. p53, reprimiert diese und reguliert so indirekt die Transkription (LI et al., 2000; EMELYNOW et al., 2002; LEHEMBRE et al., 2001; CHANG et al., 2005). SUMO-konjugiertes PML wirkt dabei als Daxx-Inhibitor, indem es Daxx von den Bereichen kondensierten Chromatins entfernt und in die PODs transportiert, was zu einer Reaktivierung der Transkription führt (LI et al., 2000). Im Fall von p53 reprimiert Daxx über die direkte Bindung zu p53 die p53-abhängige Transkription und reguliert darüber die p53-abhängige Apoptose (ZHAO et al., 2004; GOSTISSA et al., 2004; KIM et al., 2003). Für die Bindung von Daxx an p53 ist ebenfalls der durch das Spleißen betroffene C-terminale Bereich von Daxx verantwortlich (ZHAO et al., 2004; GOSTISSA et al., 2004; KIM et al., 2003). Die Bindung zu p53 wird darüber hinaus vermutlich zusätzlich durch einen Bereich im N-Terminus von Daxx unterstützt (KIM et al., 2003). Um zu überprüfen, ob sich die Daxx-Varianten diesbezüglich funktionell von Daxx- α unterscheiden, wurde das Bindungsverhalten von Daxx- β und Daxx- γ gegenüber p53 sowie der Einfluss der Daxx-Varianten auf die p53-abhängige Transkription und Apoptose untersucht.

3.2.6.1 Analyse der Interaktionen zwischen p53 und Daxx- β bzw. Daxx- γ

Für die Analyse der Wechselwirkungen zwischen p53 und den Daxx-Spleißvarianten wurden zunächst Ko-Immunpräzipitationen in HEK293-Zellen durchgeführt. Die Expressionsvektoren pLDSRed2-Daxx- α , pLDSRed2-Daxx- β und pLDSRed2-Daxx- γ wurden hierfür jeweils mit äquivalenten Mengen des p53-GFP Expressionsplasmids in HEK293-Zellen ko-transfiziert. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich die Ko-Transfektion des GFP-Leervektors mit pLDSRed2-Daxx- α durchgeführt, um artifizielle, durch GFP-vermittelte Interaktionen identifizieren zu können. Nach 48 h wurden Proteinextrakte generiert und in einer gegen GFP gerichteten Immunpräzipitation eingesetzt. Die daraus resultierenden Immunkomplexe wurden im „Western Blot“ durch Inkubation mit einem Anti-Daxx Antikörper auf ko-präzipitiertes Daxx analysiert. Wie in Abbildung 3.2.25 dargestellt, konnte DSRed2-Daxx- α im p53-GFP Immunkomplex detektiert werden, was die von Zhao et al., Gostissa et al. und Kim et al. postulierte Daxx-p53 Interaktion bestätigt (GOSTISSA et al., 2004; ZHAO et al., 2004; KIM et al., 2003).

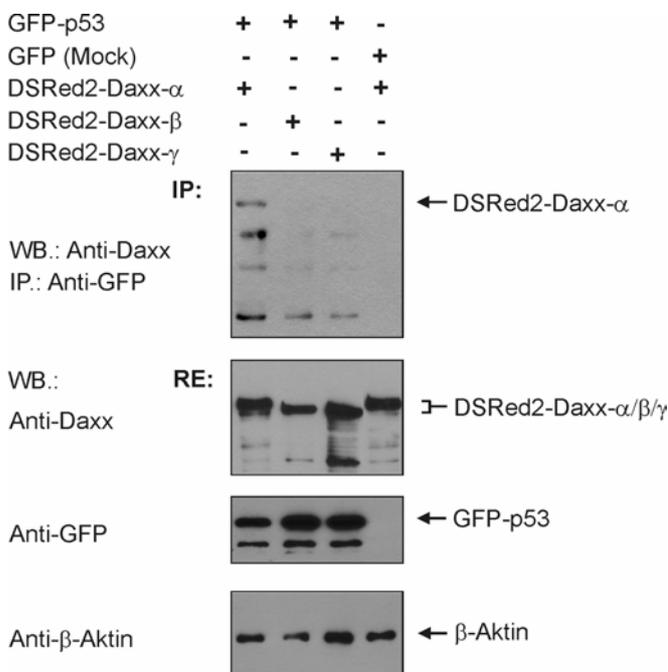


Abb. 3.2.25: Ko-Immunpräzipitationen von p53-GFP mit den DSRed2-fusionierten Daxx-Isoformen. A: Jeweils 500 μ g Proteinextrakt, der DSRed2-Daxx- α -, DSRed2-Daxx- β - bzw. DSRed2-Daxx- γ -Ko-Expression mit p53-GFP sowie der Kontroll-Ko-Transfektion des GFP-Leervektors und pLDSRed2-Daxx- α wurden in einer Immunpräzipitation mit einem Anti-GFP Antikörper eingesetzt. Die resultierenden Immunkomplexe wurden in einer 8%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ mit einem Anti-Daxx Antikörper analysiert. Die „Western Blot“-Analysen der Rohextrakte (RE) demonstrieren, dass äquivalente Mengen der entsprechenden überexprimierten Proteine vorlagen und vergleichbare Proteinmengen geladen waren.

Die DSRed2-fusionierten Varianten Daxx- β und Daxx- γ waren in den entsprechenden Immunkomplexen dagegen nicht detektierbar, obwohl „Western Blot“-Analysen der Rohextrakte vergleichbare Mengen an überexprimierten p53-GFP aufwiesen und der Gehalt von DSRed2-Daxx- β bzw. -Daxx- γ mit dem von -Daxx- α ebenfalls vergleichbar war. Lediglich bei einer Exposition der Membran über einen Zeitraum von mehr als 24 h waren vergleichsweise schwache Signale von DSRed2-Daxx- β und -Daxx- γ detektierbar (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass in der Anti-GFP Immunpräzipitation der DSRed2-Daxx- α /GFP-Mock-Kontrolle auch nach 24 h Exposition der Membran kein DSRed2-Daxx- α nachgewiesen werden konnte belegt, dass die Interaktion mit p53 spezifisch ist. Daxx- β und Daxx- γ besitzen aufgrund der C-terminalen Modifikation demnach eine drastisch reduzierte p53-Bindekapazität. Die differentielle Interaktion zwischen p53 und den Daxx-Isoformen wurde ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Hierfür wurden die GFP-fusionierten

Daxx-Varianten mit YFP-fusioniertem p53 in HeLa-Zellen ko-exprimiert und konfokal-mikroskopisch analysiert. Als Kontrolle diente eine Ko-Transfektion des GFP-Leervektors mit dem für YFP-p53-kodierenden Expressionsvektor, um artifizielle Interaktionen, basierend auf Wechselwirkungen zwischen den beiden Fluoreszenzproteinen, identifizieren zu können. In Abbildung 3.2.26 sind Aufnahmen der GFP-, und YFP-vermittelten Fluoreszenz sowie der überlagerten Fluoreszenzsignale dargestellt. Es zeigte sich dass, YFP-p53 mit GFP-Daxx- α in den subnukleären distinkten „Spots“ ko-lokalisiert, was die Daten aus der Ko-Immpräzipitationsanalyse bestätigt. Wie unter 3.2.4.2 beschrieben, konnten diese „Spots“ in der Mehrzahl als PODs identifiziert werden, in denen Daxx- α zusammen mit PML ko-lokalisiert. Die Tatsache, dass Daxx- α in diesen „Spots“ mit p53 ko-lokalisiert, unterstützt frühere Beobachtungen, wonach auch p53 mit PML interagiert und in den PODs lokalisiert sein kann (GUO et al., 2000).

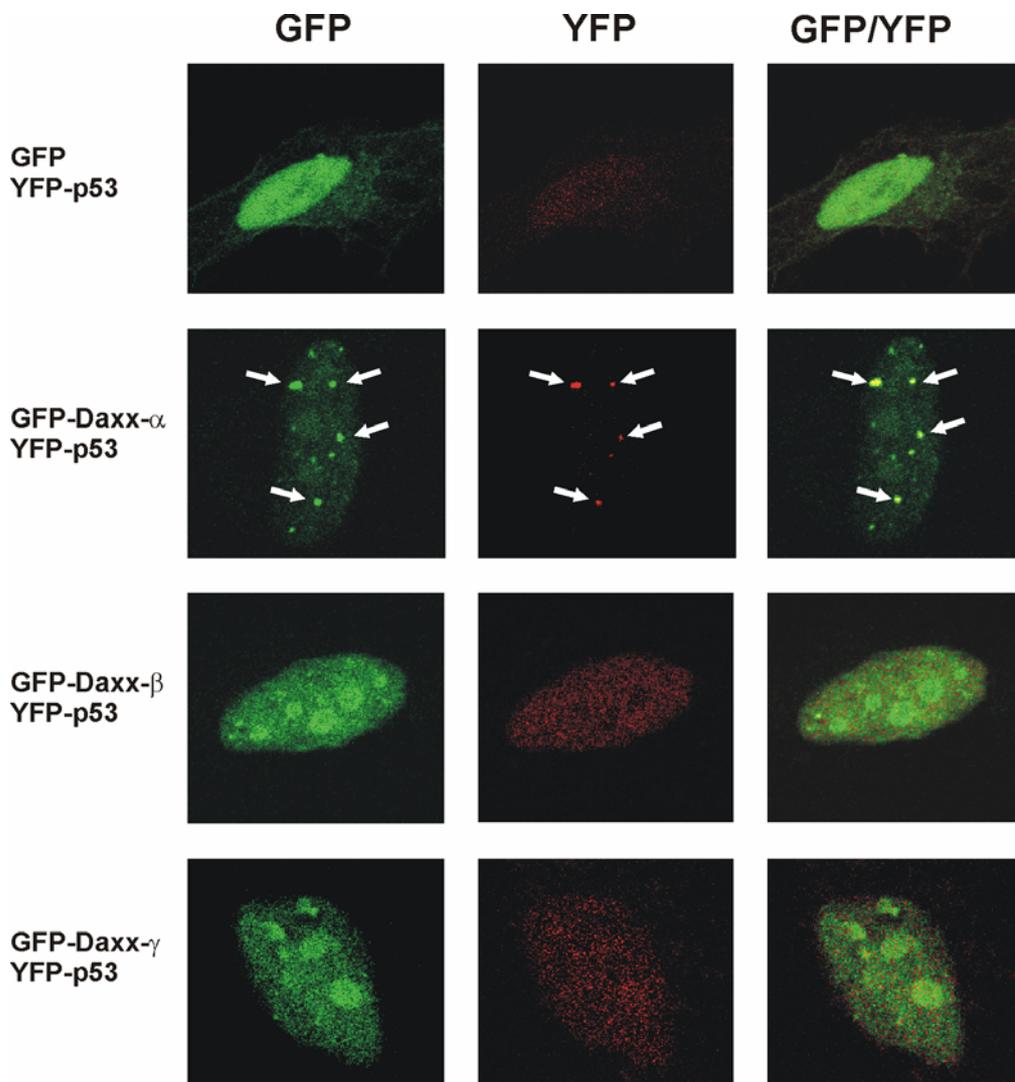


Abb. 3.2.26: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der differentiellen Interaktion zwischen den Daxx-Isoformen und p53. GFP-Daxx- α , -Daxx- β bzw. -Daxx- γ wurden in HeLa-Zellen mit YFP-p53 ko-exprimiert und konfokal-fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die GFP- und YFP-Einzelfluoreszenzen wurden jeweils bei einer 63fachen Vergrößerung detektiert und anschließend mit Hilfe der LSM Image Software überlagert (GFP/YFP Darstellung). Die weißen Pfeile kennzeichnen die subnukleäre Strukturen, in denen Daxx- α mit p53 ko-lokalisiert ist.

In den korrespondierenden Analysen nach Ko-Expression von YFP-p53 mit GFP, GFP-Daxx- β bzw. -Daxx- γ war p53-YFP dagegen diffus im Kern verteilt und akkumulierte nicht in derartigen „Spots“. In Übereinstimmung mit den unter 3.2.4.2 beschriebenen Ergebnissen waren sowohl Daxx- β als auch Daxx- γ hierbei vorwiegend in den „Plaques“-ähnlichen Strukturen lokalisiert, wobei in dem Großteil der analysierten Zellen keine Ko-Lokalisation mit YFP-p53 ersichtlich war (vgl. Abb. 3.2.26). In einzelnen Zellen konnte allerdings neben der diffusen nukleären Verteilung von YFP-p53 eine vergleichsweise schwache Überlagerung mit dem GFP-Daxx- β - bzw. -Daxx- γ - Verteilungsmuster detektiert werden. Dies entspricht ebenfalls den Ergebnissen aus der Ko-Immunpräzipitationsanalyse, wonach die Interaktion zwischen p53 und Daxx- β bzw. Daxx- γ zwar erheblich reduziert, aber nicht gänzlich unterbunden ist.

Zusammenfassend weisen Daxx- β und Daxx- γ im Vergleich zu Daxx- α demnach ein drastisch verringertes p53-Bindungsverhalten auf. Zudem zeigen die konfokal-mikroskopischen Analysen eine Daxx(- α)-abhängige Verteilung von p53: während p53 nach Ko-Expression mit GFP bspw. diffus im Zellkern verteilt ist, akkumuliert es in YFP-p53/GFP-Daxx- α ko-exprimierenden Zellen ausschließlich in den distinkten „Spots“, in denen Daxx- α lokalisiert ist.

3.2.6.2 Der Einfluss der Daxx-Varianten auf die p53-abhängige Transkription

Da die Bindung zwischen Daxx- α und p53 mit einer Repression der p53-abhängigen Transkription verbunden ist (GOSTISSA et al., 2004; ZHAO et al., 2004; KIM et al., 2003), wurde überprüft, in wie weit sich die reduzierte p53-Interaktion von Daxx- β bzw. Daxx- γ auf die p53-abhängige Transkription auswirkt. Hierfür wurden „Luciferase-Reporter-Assays“ nach der unter 2.2.3.9 beschriebenen Methode durchgeführt. Jeweils 200 ng des p53-Reporterplasmides p53-Luc, 50 ng des p53-GFP-Expressionsvektors, 400 ng des entsprechenden HA-Daxx-Varianten-Expressionsplasmids sowie 20 ng des *Renilla-Luciferase*-Vektors pRL-EF-1a wurden in HeLa-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität analysiert. Die Aktivität der *Firefly*-Luciferase wurde hierbei in Relation zur *Renilla*-Luciferaseaktivität ermittelt und dadurch auf die entsprechende Transfektionseffizienz normiert. In Abbildung 3.2.27.A sind die Mittelwerte der normierten Luciferasewerte aus sechs unabhängigen Experimenten dargestellt. Wie erwartet resultiert die Ko-Expression von HA-Daxx- α mit p53-GFP in einer signifikanten Reduktion der p53-abhängigen Luciferase-Aktivität verglichen mit der Luciferase-Aktivität nach alleiniger p53-GFP-Expression ($p > 0,001$). Dies bestätigt damit frühere Beobachtungen, dass Daxx die p53-abhängige Transkription reprimiert (GOSTISSA et al., 2004; ZHAO et al., 2004; KIM et al., 2003). Im Gegensatz dazu zeigte die Ko-Expression von p53-GFP mit HA-Daxx- β ($p = 0,710$) bzw. HA-Daxx- γ ($p = 0,203$) keine Reduktion der relativen Luciferaseaktivität, sondern lieferte vergleichbare Werte zu denen, die nach alleiniger Expression von p53-GFP erhalten wurden (vgl. Abb. 3.2.27.A). Dementsprechend war im Vergleich zur Daxx- α /p53-GFP-Probe auch ein signifikanter Anstieg der Luciferase-Aktivität in den HA-Daxx- β /p53-GFP- ($p = 0,006$) und HA-Daxx- γ /p53-GFP-Proben ($p > 0,001$) zu verzeichnen. „Western Blot“-Analysen der jeweiligen Proteinextrakte zeigten dabei ein vergleichbares Expressionsniveau der HA-fusionierten Daxx-Varianten sowie eine ebenfalls vergleichbare p53-GFP-Expression in den unterschiedlichen Proben (vgl. Abb. 3.2.27.B), so dass ungleiche Expressionsstärken der verschiedenen Daxx-Isoformen bzw. unterschiedliche Ko-Transfektionseffizienzen nicht ursächlich für die differentielle p53-abhängige Transkription sein

konnten. Dies deutet daraufhin, dass Daxx- β und Daxx- γ aufgrund ihrer verminderten Bindung an p53 nicht in der Lage sind, die p53-abhängige Transkription zu reprimieren. Interessanterweise zeigten auch die Kontrolltransfektionen von pLHA-Daxx- β bzw. -Daxx- γ ohne p53-GFP-Überexpression eine höhere Luciferase-Aktivität als die vergleichbare pLHA-Daxx- α -Probe, was vermutlich auf die Modulation der endogenen p53-Aktivität der HeLa-Zellen zurückzuführen war (vgl. Abb. 3.2.27.A). Eine direkte Aktivierung der Luciferase-Expression von Daxx- β und Daxx- γ durch Bindung an den Promotor des p53-Luc-Vektors kann ausgeschlossen werden, da dieser Effekt in HEK293-Zellen nicht beobachtet wurde. Allerdings konnte hier auch keine Reduktion der p53-abhängigen Transkription durch Daxx- α beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die Daxx- α -abhängige Modulation der p53-abhängigen Transkription Zelltyp-spezifisch ist (Daten nicht gezeigt).

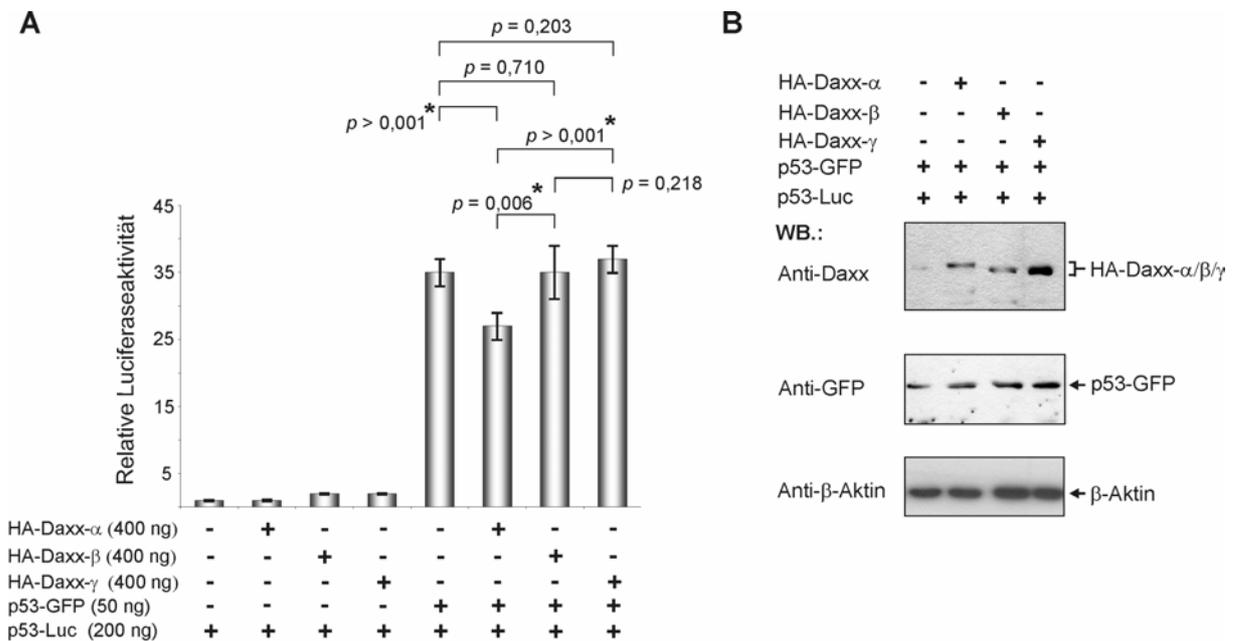


Abb. 3.2.27: Analyse der Daxx- α -, Daxx- β - bzw. Daxx- γ -vermittelten Modulation der p53-abhängigen Transkription in HeLa-Zellen. **A:** Balkendiagrammdarstellung der Luciferasewerte nach transienter Ko-Transfektion von 400 ng der Expressionsvektoren für HA-Daxx- α , HA-Daxx- β bzw. HA-Daxx- γ mit 50 ng pcDNA-p53-GFP und 200 ng des Reporterplasmids p53-Luc. 20 ng des *Renilla*-Luciferase-Expressionsvektors pRL-EF-1a wurden ebenfalls ko-transfiziert, wobei die Aktivität der *Renilla*-Luciferase zur Normierung der *Firefly*-Luciferase-Werte diente. Die jeweilige Gesamtmenge an zu transfizierender DNA wurde durch Zugabe des Leervektors pLHA-C1 konstant auf 2 μ g gehalten. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität wurde bestimmt. Dargestellt sind die normierten Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten, wobei die Luciferaseaktivität nach alleiniger Transfektion des Reporterkonstrukts p53-Luc als 1 definiert wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem „Student’s t-Test“. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant betrachtet und ist mit einem Sternchen gekennzeichnet (*). **B:** Die „Western Blot“-Analyse von exemplarischen Luciferaseproben (jeweils 15 μ g Proteinextrakt) demonstriert eine vergleichbare Expression von p53-GFP und den entsprechenden HA-fusionierten Daxx-Isoformen in den verschiedenen Transfektionen. Die Detektion von β -Aktin diente zur Veranschaulichung vergleichbarer Proteinladungsmengen.

3.2.7 Untersuchungen zur Funktion der Daxx-Varianten im humanen RCC

Das unterschiedliche Potential der Daxx-Spleißvarianten, die p53-abhängige Transkription zu reprimieren, könnte sich ebenfalls differentiell auf die p53-abhängige Apoptose auswirken. So reprimiert Daxx- α selektiv die Transkription von Zellzyklus-assoziierten p53-Zielgenen (GOSTISSA et al., 2004). Eine Störung des Gleichgewichtes zwischen der Expression pro-apoptotischer und Zellzyklus-relevanter p53-Zielgene ist die Folge, wodurch Daxx- α indirekt die p53-abhängige

Apoptose fördert (GOSTISSA et al., 2004). Der Verlust des p53-Repressionspotentials von Daxx- β und Daxx- γ könnte sich somit anti-apoptotisch auswirken. Vor dem Hintergrund einer potentiellen dominant-negativ-Funktion von Daxx- β und Daxx- γ im RCC als Mechanismus zur Inaktivierung von Daxx- α wurde daher der Einfluss der Daxx-Varianten auf die p53-abhängige Transkription und – Apoptose in RCC-Zelllinien untersucht.

3.2.7.1 Die Bedeutung der Daxx-Varianten für die p53-abhängige Transkription in der RCC-Zelllinie clearCa-2

Anhand der stabil-transduzierten Zelllinien clearCa-2-GFP sowie clearCa-2-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ wurde mittels RT-PCR die mRNA-Expression der Apoptose-relevanten p53-Zielgene *CD95* und *Bax* sowie der Zellzyklus-assoziierten p53-Zielgene *p21* und *GADD45* analysiert. Für die Induktion der p53-abhängigen Transkription wurden die Zellen für 24 h mit 2 $\mu\text{g/ml}$ des Topoisomerase I-Inhibitors Topotecan inkubiert, ein Zytostatikum, das erwiesenermaßen die Aktivierung von p53 induziert (MULLER et al., 1997; FRIESEN et al., 1997). Unbehandelte Zellen wurden dabei ebenfalls analysiert, um den Einfluss der Überexpression von Daxx- α , Daxx- β bzw. Daxx- γ auf das basale Expressionsniveau der p53-Zielgene zu untersuchen. Jeweils 1 μg Gesamt-RNA wurde hierfür wie unter 2.2.2.6 und 2.2.2.7.2 beschrieben zunächst in cDNA transkribiert und anschließend in PCR-Reaktionen zur Amplifikation der jeweiligen Transkripte eingesetzt.

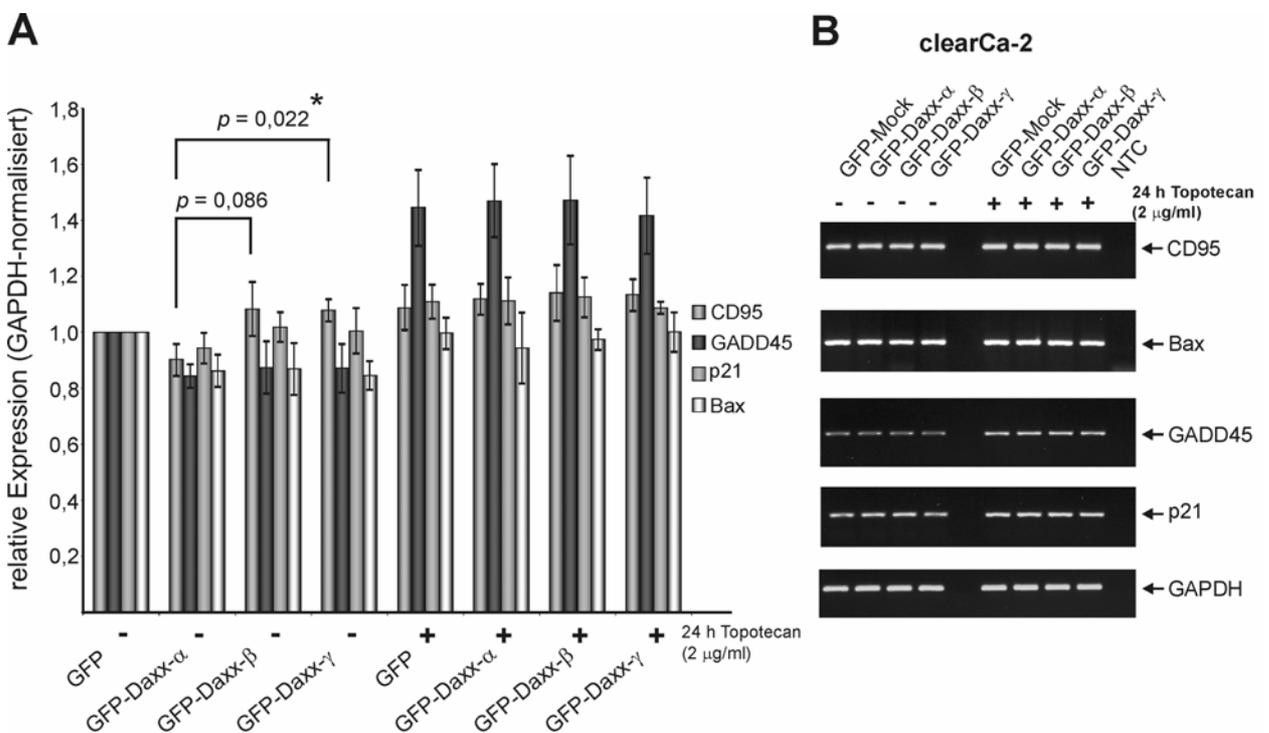


Abb. 3.2.28: RT-PCR-Analyse der Expression von p53-Zielgenen in den stabilen clearCa-2-Zelllinien. A: Balkendiagrammdarstellung der relativen (GAPDH-normalisierten) mRNA-Expressionsniveaus von CD95, GADD45, p21 und Bax in clearCa-2-GFP, clearCa-2-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ vor und nach Stimulierung der Zellen mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Topotecan für 24 h. Die jeweilige relative Expression der Transkripte in unbehandelten clearCa-2-GFP-Zellen wurde als 1 definiert und diente als Bezugsgröße für die Expressionswerte der restlichen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem „Student's t-Test“, wobei signifikante Unterschiede mit einem Sternchen gekennzeichnet sind (*). **B:** Agarosegeldarstellung repräsentativer RT-PCRs. Jeweils 5 μl der zuvor 1/5 verdünnten cDNA wurde in die entsprechende PCR eingesetzt, die zur Amplifikation von GAPDH 35 Zyklen und zur Amplifikation der restlichen Transkripte 37 Zyklen umfasste.

Die resultierenden PCR-Produkte wurden daraufhin gelelektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechenden Bandenintensitäten, als Maß für die Expressionsstärke, densitometrisch ausgewertet. Die Expressionsstärke der einzelnen Gene wurde dabei in allen Fällen auf das Expressionsniveau des Referenzgens *GAPDH* normiert. Die relative Expression der Gene in der unbehandelten clearCa-2-GFP-Kontrollzelllinie wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit als 1 definiert und diente als Bezugsgröße für die Expressionsniveaus der restlichen Proben. In Abbildung 3.2.28.A sind die relativen Expressionswerte von *CD95*, *Bax*, *p21* und *GADD45* der vier Zelllinien vor und nach Topotecan-Behandlung in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Vergleicht man die relativen Expressionswerte von *CD95*, *Bax*, *p21* und *GADD45* der unbehandelten Zelllinien untereinander, so ist ausschließlich im Fall von *CD95* ein differentielles Expressionsmuster zwischen clearCa-2-GFP-Daxx- α und den GFP-Daxx- β - bzw. GFP-Daxx- γ -überexprimierenden clearCa-2-Zellen zu verzeichnen, das allerdings nur im Vergleich zwischen clearCa-2-GFP-Daxx- α und -Daxx- γ auch statistisch signifikant ist ($p = 0,022$). *Bax*, *p21* und *GADD45* sind in den vier Zelllinien auf basalem Niveau annähernd gleichartig exprimiert. Nach Behandlung mit Topotecan ist eine deutliche Zunahme der *GADD45*-Expression in allen vier Zelllinien zu beobachten, was belegt, dass in allen Zellen eine Aktivierung von p53 stattgefunden hat (vgl. Abb. 3.2.28.A und B). Im Gegensatz zu *GADD45* zeigen die Apoptose- und Zellzyklus-relevanten Gene *CD95*, *Bax* und *p21* allerdings eine lediglich schwache Expressionszunahme. Vergleicht man die einzelnen Expressionsniveaus von *CD95*, *Bax*, *p21* und *GADD45* zwischen den behandelten clearCa-2-GFP-, clearCa-2-GFP-Daxx- α -, -Daxx- β - und -Daxx- γ -Zellen, sind darüber hinaus im Rahmen der Standardabweichung keine signifikanten Unterschiede erkennbar. Die auf basaler Ebene detektierten Unterschiede hinsichtlich der *CD95*-Expression konnten hier nicht nachgewiesen werden. Dies deutet daraufhin, dass sich die Überexpression der einzelnen Daxx-Varianten in clearCa-2 nach p53-Aktivierung nicht auf die Transkription von *CD95*, *GADD45*, *Bax* und *p21* auswirkt.

3.2.7.2 Der Einfluss der Daxx-Varianten auf die p53-abhängige Apoptose in der RCC-Zelllinie clearCa-6

Die Überexpression von Daxx- α führt sowohl in der T-lymphoblastischen Zelllinie Jurkat, wie auch der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 zu einer Sensitivierung gegenüber der Topotecan- bzw. Doxorubicin-induzierten p53-abhängigen Apoptose (MO et al., 2004; BOEHRER et al., 2005). Nach den Beobachtungen von Gostissa et al. (2004) ist dies auf die selektive Repression von Zellzyklus-assoziierten p53-Zielgenen durch Daxx zurückzuführen. Obwohl die RT-PCR Analysen zeigen, dass sich die Überexpression von Daxx- α , sowie von Daxx- β und Daxx- γ in der Zelllinie clearCa-2 nicht wesentlich auf die Transkription von *CD95*, *GADD45*, *Bax* und *p21* auswirkt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression andere p53-Zielgene durch die Daxx-Varianten differentiell reprimiert wird. Aus diesem Grund sollte der Einfluss der Überexpression von Daxx- α , Daxx- β bzw. Daxx- γ auf die p53-abhängige Apoptose analysiert werden. Die Annahme war, dass falls die Expression funktionell-relevanter p53-Zielgene durch die Daxx-Varianten differentiell reprimiert würde, sich dies in einer unterschiedlichen Sensitivität der Zelllinien gegenüber der p53-abhängigen Apoptose auswirken sollte. Hierzu wurden die stabilen GFP-, GFP-Daxx- α -, -Daxx- β - bzw. -Daxx- γ -überexprimierenden RCC-Zelllinien clearCa-2 und clearCa-6 mit Topotecan, Doxorubicin, Etoposid

und Taxol behandelt. Die Änderung der Lebendzellzahl im zeitlichen Verlauf wurde mittels „MTT-Assay“ analysiert und als Maß der Sensitivität gewertet. Anhand der stabilen clearCa-6-Zelllinien wurden zunächst Dosiskinetiken der einzelnen Zytostatika erstellt, um geeignete Konzentration für eine zeitkinetische Zellbehandlung zu bestimmen. Hierfür wurden jeweils äquivalente Zellzahlen von clearCa-6-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ sowie der GFP-überexprimierenden Kontrollzelllinie mit verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Zytostatika behandelt. Nach 24 h wurden die entsprechenden Lebendzellzahlen mittels „MTT-Assays“ bestimmt. Anhand der in Abbildung 3.2.29 dargestellten resultierenden „Überlebenskurven“ wird deutlich, dass alle stabilen clearCa-6-Zelllinien sensitiv auf die Zytostatika-Behandlung reagieren. Die Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid, 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin, 2 $\mu\text{g/ml}$ Topotecan oder 1 $\mu\text{g/ml}$ Taxol führte nach einer Inkubationszeit von 24 h zu einer Reduktion der Lebendzellzahl um ca. 50%. Im Rahmen der Standardabweichung sind allerdings bei keiner der getesteten Konzentrationen signifikante Unterschiede zwischen der resultierenden Zellzahl der GFP-Daxx- α - und der GFP-überexprimierender bzw. zwischen der GFP-Daxx- α - und den -Daxx- β - und -Daxx- γ -überexprimierenden Zellen zu verzeichnen. Die Tatsache, dass nach der Behandlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Taxol weniger Zellen überleben als durch die Gabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ ist vermutlich auf die unterschiedlichen, konzentrationsabhängigen Effekte von Taxol zurückzuführen (TORRES & HORWITZ, 1998).

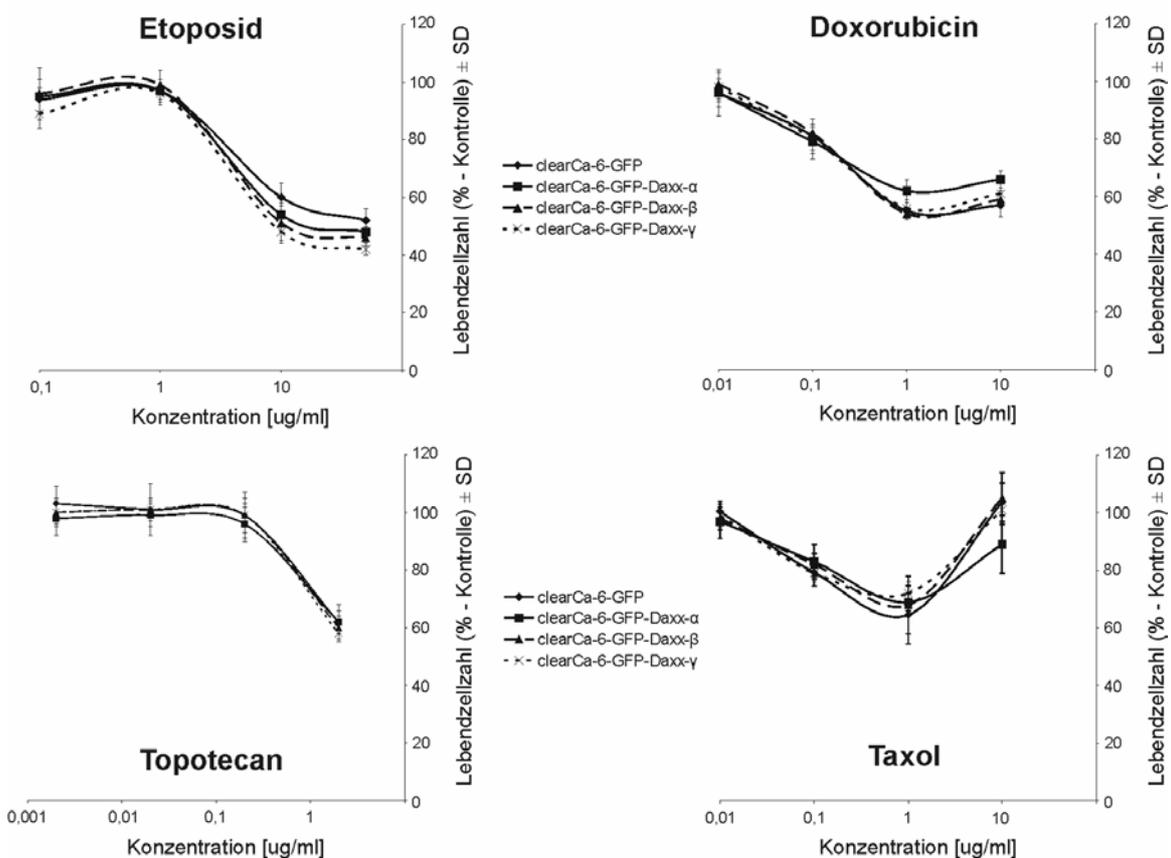


Abb. 3.2.29: Die Auswirkungen verschiedener Konzentrationen von Etoposid, Doxorubicin, Topotecan bzw. Taxol auf die Lebendzellzahl der stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien. Äquivalente Zellzahlen von clearCa-6-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ sowie der GFP-überexprimierenden Kontrollzelllinie wurden in 96-well-Zellkulturschalen ausgesät und mit verschiedenen Konzentration an Etoposid (0,1; 1; 10 und 50 $\mu\text{g/ml}$), Doxorubicin (0,01; 0,1; 1 und 10 $\mu\text{g/ml}$), Topotecan (0,002; 0,02; 0,2 und 2 $\mu\text{g/ml}$) und Taxol (0,01; 0,1; 1 und 10 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. Nach 24 h wurden die resultierenden Lebendzellzahlen durch „MTT-Assay“ ermittelt, jeweils bezogen auf die entsprechende Kontrolle.

Mit den Konzentrationen, die nach 24 h eine ca. 50%-ige Letalität erzielten, wurden zeitabhängige Untersuchungen durchgeführt. Wie zuvor wurden jeweils äquivalente Zellzahlen von clearCa-6-GFP, clearCa-6-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ ausgesät und mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin, 2 $\mu\text{g/ml}$ Topotecan, 10 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid bzw. 1 $\mu\text{g/ml}$ Taxol behandelt. Nach 9, 12, 24, 48 und 72 h wurden die resultierenden relativen Zellzahlen durch „MTT-Assay“ ermittelt, mit denen schließlich die in Abbildung 3.2.30 gezeigten „Überlebenskurven“ erstellt wurden. Wie erwartet, nahmen die Zellzahlen im Laufe der Inkubationszeit stetig ab und erreichen nach 72 h in allen Fällen Werte um bzw. unter 20%.

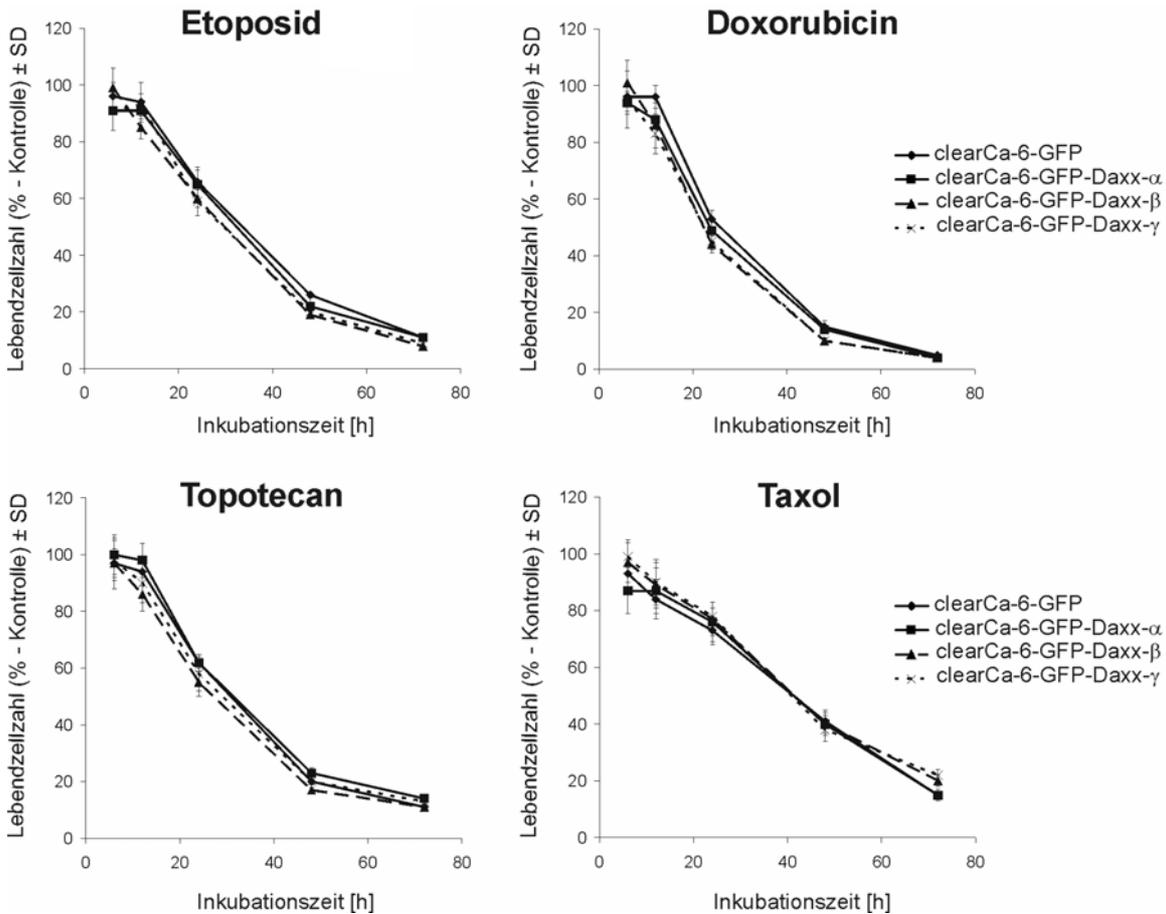


Abb. 3.2.30: Die Auswirkungen von Etoposid, Doxorubicin, Topotecan bzw. Taxol auf die Lebendzellzahl der stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien im zeitlichen Verlauf. Äquivalente Zellzahlen von clearCa-6-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ sowie clearCa-6-GFP (Kontrollzelllinie) wurden in 96-well-Zellkulturschalen ausgesät und mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid, 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin, 2 $\mu\text{g/ml}$ Topotecan bzw. 1 $\mu\text{g/ml}$ Taxol behandelt. Nach 9, 12, 24, 48 und 72 h wurden die entsprechenden Lebendzellzahlen durch „MTT-Assay“ ermittelt, jeweils bezogen auf die entsprechende Kontrolle. Die Überlebenskurven wurden erstellt, indem die relative Zellzahl (y-Achse) gegen die Inkubationszeit (x-Achse) aufgetragen wurde.

Im Rahmen der Standardabweichung sind allerdings zu keinem der getesteten Zeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen der resultierenden Zellzahl der GFP-Daxx- α - und der GFP-überexprimierenden bzw. zwischen der GFP-Daxx- α - und den GFP-Daxx- β - und GFP-Daxx- γ -überexprimierenden Zellen zu verzeichnen. Dies deutet daraufhin, dass sich die Überexpression der Daxx-Varianten in clearCa-6 nicht auf die Kinetik des Doxorubicin-, Topotecan-, Etoposid- bzw. Taxol-induzierten Zelltodes auswirkt. „Western Blot“-Analysen der Proteinextrakte behandelter clearCa-6-GFP-Zellen belegen, dass es sich bei dem Zelltod in allen Fällen um apoptotische Prozesse

handelt. In allen Proben konnte die Spaltung des Apoptose-Markers PARP detektiert werden, wobei das Ausmaß der PARP-Spaltung nach Taxol-Behandlung deutlich geringer war als nach Doxorubicin-, Topotecan-, oder Etoposid-Behandlung (vgl. Abb. 3.2.32).

3.2.7.3 Die Auswirkungen der Daxx-Varianten auf die p53-abhängige Apoptose in der RCC-Zelllinie clearCa-2

Ergänzend zu den Zytostatika-Experimenten mit den stabil-transduzierten clearCa-6-Zellen wurden Untersuchungen mit den stabilen clearCa-2-Zelllinien durchgeführt. Gleiche Zellzahlen von clearCa-2-GFP, clearCa-2-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ wurden, wie bereits für die transduzierten clearCa-6-Zelllinien beschrieben mit Doxorubicin (1 $\mu\text{g/ml}$), Topotecan (2 $\mu\text{g/ml}$), Etoposid (10 $\mu\text{g/ml}$) bzw. Taxol (1 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. Nach jeweils 9, 12, 24, 48 sowie 72 h Inkubation wurden die relativen Zellzahlen wiederum durch „MTT-Assay“ ermittelt.

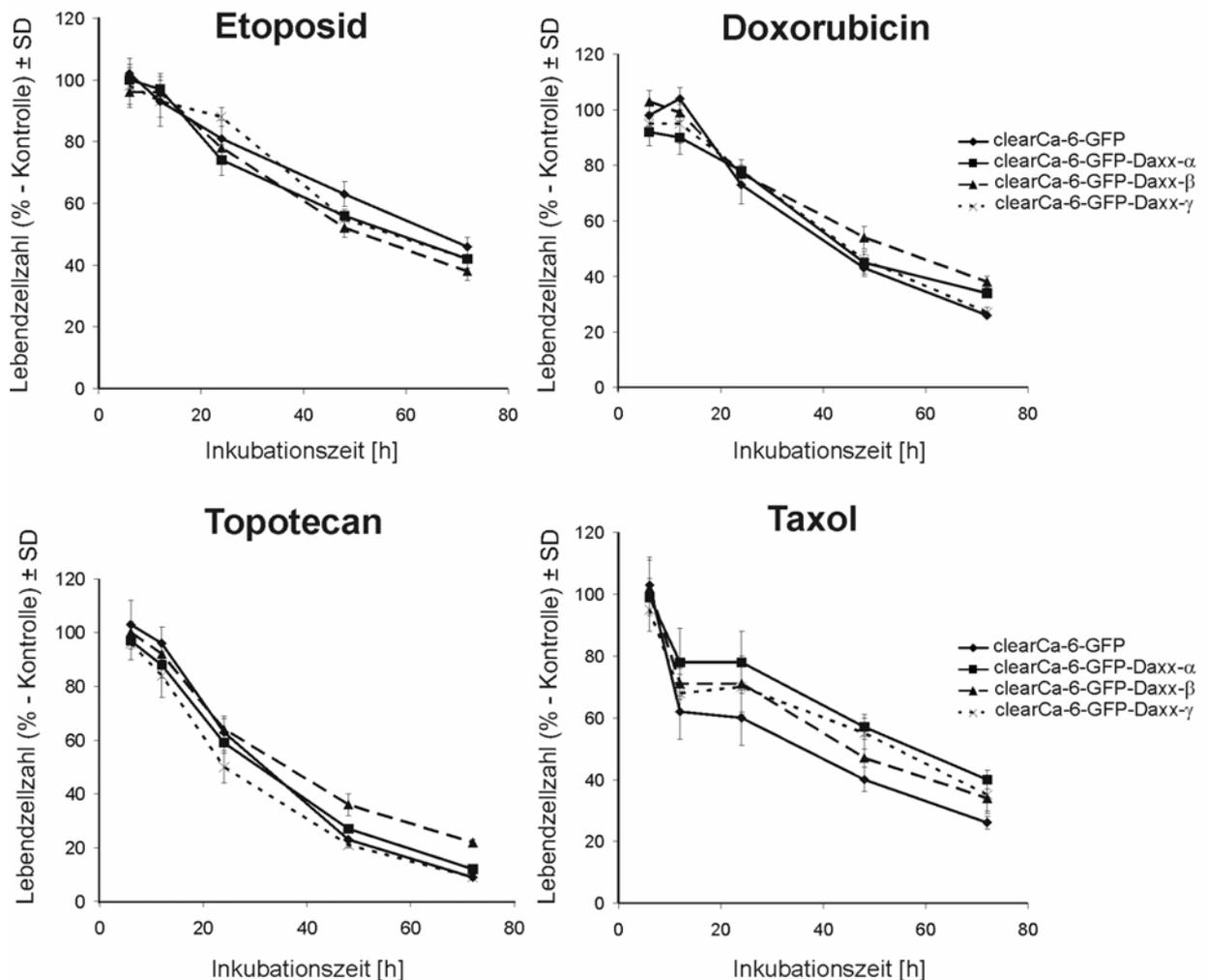


Abb. 3.2.31: Die Auswirkungen von Etoposid, Doxorubicin, Topotecan bzw. Taxol auf die Lebendzellzahl der stabil-transduzierten clearCa-2-Zelllinien im zeitlichen Verlauf. Äquivalente Zellzahlen von clearCa-2-GFP sowie clearCa-2-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ wurden in 96-well-Zellkulturschalen ausgesät und mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid, 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin, 2 $\mu\text{g/ml}$ Topotecan bzw. 1 $\mu\text{g/ml}$ Taxol behandelt. Nach 9, 12, 24, 48 und 72 h wurden die Lebendzellzahlen durch „MTT-Assay“ ermittelt, jeweils bezogen auf die entsprechende Kontrolle. Die Überlebenskinetiken wurden erstellt, indem die relative Zellzahl (y-Achse) gegen die Inkubationszeit (x-Achse) aufgetragen wurde.

Anhand der daraus resultierenden „Überlebenskurven“ wird deutlich, dass auch die stabil-transduzierten clearCa-2-Zelllinien auf alle vier Zytostatika sensitiv reagieren, da die entsprechenden Lebendzellzahlen mit fortschreitender Inkubationszeit abnehmen (vgl. Abb. 3.2.31). Im Vergleich zu clearCa-6 weisen die stabil-transduzierten clearCa-2-Zelllinien allerdings eine geringfügig erhöhte Resistenz gegenüber Etoposid, Doxorubicin und Taxol auf, da der Anteil lebender Zellen nach 72 h im Gegensatz zu dem der clearCa-6-Zelllinien deutlich über 20% liegt. Am Beispiel der Etoposid-Behandlung ist dies besonders ersichtlich, hier liegt die prozentuale Lebendzellzahl der clearCa-2-Transduktanten nach 72 h noch bei über 40%, während sich die prozentuale Lebendzellzahl bei den stabilen clearCa-6-Zelllinien bereits auf einen Wert unter 10% reduziert hat. Die Sensitivität gegenüber Topotecan ist bei beiden Gruppen von Zelllinien vergleichbar mit resultierenden Lebendzellzahlen von jeweils < 20% nach einer Inkubation von 72 h.

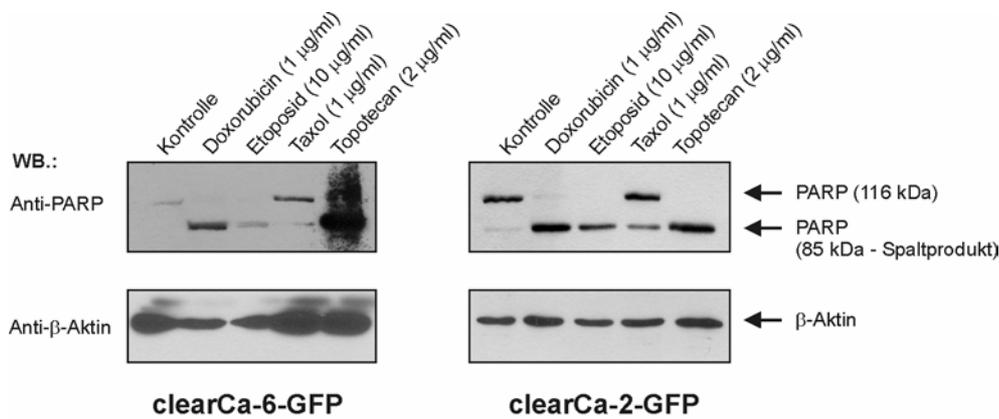


Abb. 3.2.32: „Western Blot“-Analyse zum Nachweis der PARP-Spaltung in den Zytostatika-behandelten clearCa-2-GFP- und clearCa-6-GFP-Zelllinien. Jeweils 20 µg Gesamtprotein Doxorubicin-, Topotecan-, Etoposid- bzw. Taxol-behandelter clearCa-2-GFP- und clearCa-6-GFP-Zellen wurden im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. Die Detektion von β-Aktin diente zur Veranschaulichung, dass vergleichbare Proteinmengen vorlagen.

Abgesehen von geringen Schwankungen, sind bei den Behandlungen mit Etoposid, Doxorubicin und Topotecan keine markanten Unterschiede zwischen den „Überlebenskurven“ der GFP-Daxx- α - und der GFP-überexprimierenden bzw. zwischen der GFP-Daxx- α - und den GFP-Daxx- β - bzw. GFP-Daxx- γ -überexprimierenden clearCa-2-Zellen zu verzeichnen. Zu einigen Zeitpunkten, wie z.B. dem 48 h-Wert der Topotecan-Behandlung oder dem 72 h-Wert der Doxorubicin-Behandlung, unterscheiden sich die Zellzahlen auch über das Maß der Standardabweichung hinaus. Diese Differenzen sind aber vermutlich nicht auf die Überexpression der entsprechenden Daxx-Variante, sondern auf klonale Effekte innerhalb der Zelllinie zurückzuführen, da es sich bei den stabil-transduzierten RCC-Zelllinien um jeweils heterogene Zellpopulationen handelt (vgl. 3.2.5.4). Die Tatsache, dass dieses Phänomen in den clearCa-6-Zelllinien nicht zu beobachten war, ist vermutlich auf den generell eher sensitiven Charakter dieser Zelllinie zurückzuführen (GERHARZ et al., 1999). Im Gegensatz zur Inkubation mit Etoposid, Doxorubicin und Topotecan reagieren die verschiedenen clearCa-2-Transduktanten unterschiedlich auf die Behandlung mit Taxol. Während die Lebendzellzahl von clearCa-2-GFP bereits nach 12 h Inkubation mit Taxol auf einen Wert von knapp 60% abgesunken ist, beträgt die Lebendzellzahl der GFP-Daxx- α -überexprimierenden Zellen zum gleichen Zeitpunkt noch ca. 80%. Die Werte von clearCa-2-GFP-Daxx- β und -Daxx- γ liegen mit jeweils ca.

70% dazwischen. In Abbildung 3.2.33 sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Anhand der Signifikanzniveaus wird deutlich, dass sich die resultierenden Lebendzellzahlen von clearCa-2-GFP eindeutig von denen der clearCa-2-GFP-Daxx- α -Zellen unterscheiden. Nach 12 h ist bereits eine starke Tendenz erkennbar ($p = 0,07$), die nach längeren Inkubationszeiten (24 h, $p = 0,024$; 48 h, $p = 0,009$; 72 h, $p = 0,046$) auch statistisch signifikant wird (vgl. Abb. 3.2.33.A). Vergleicht man die relativen Lebendzellzahlen der GFP-Daxx- α -überexprimierenden Zelllinie mit denen der GFP-Daxx- β - und GFP-Daxx- γ -überexprimierenden Zellen, so ist eine tendenzielle Abnahme der Zellzahlen von clearCa-2-GFP-Daxx- α nach -Daxx- β und schließlich nach -Daxx- γ hin zu verzeichnen, die allerdings statistisch nicht signifikant ist (vgl. Abb. 3.2.33.B). „Western Blot“-Analysen der Proteinextrakte von Doxorubicin-, Topotecan-, Etoposid- bzw. Taxol-behandelten clearCa-2-GFP-Zellen zeigen ebenfalls eine PARP-Spaltung und belegen, dass die Zytostatika-Behandlung auch in den clearCa-2-Zellen mit einer Apoptose-Induktion verbunden ist. Äquivalent zu clearCa-6-GFP weist auch die Taxol-behandelte clearCa-2-GFP-Zelllinie den geringsten Anteil an PARP-Spaltung auf (vgl. Abb. 3.2.32).

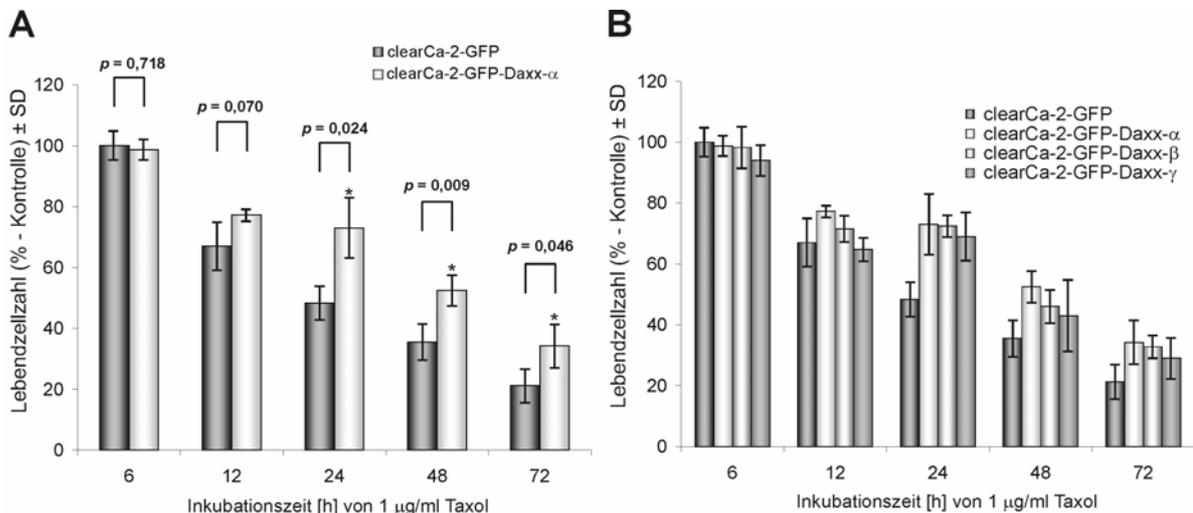


Abb. 3.2.33: Ausmaß des Taxol-induzierten Zelltodes in den stabil-transduzierten clearCa-2-Zelllinien. Jeweils äquivalente Zellzahlen von clearCa-2-GFP, clearCa-2-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ wurden in 96-well-Zellkulturschalen ausgesät und mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Taxol behandelt. Nach 9, 12, 24, 48 und 72 h wurden die Lebendzellzahlen durch „MTT-Assay“ ermittelt, jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte der resultierenden Lebendzellzahlen aus mindestens vier unabhängigen Versuchen. In **A** sind aus Gründen der Übersicht lediglich die Werte der Zelllinien clearCa-2-GFP und clearCa-2-GFP-Daxx- α einander gegenüber gestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem „Student's t-Test“, wobei ein p -Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet und mit einem Sternchen gekennzeichnet wurde (*). **B** zeigt die mittleren Lebendzellzahlen von allen vier stabilen clearCa-2-Zelllinien.

3.2.8 Untersuchungen zur Rolle von Daxx im Taxol-induzierten Zelltod

Die unter 3.2.7.3 beschriebenen Beobachtungen deuten auf eine zytoprotektive Rolle von Daxx innerhalb des Taxol-vermittelten Zelltodes hin. Mittels RT-PCR wurde analysiert, ob die Daxx-Varianten-Überexpression Auswirkungen auf die Taxol-induzierte Expression von p53-Zielgenen hat, die wie bspw. *Bax* und *p21* kritisch in der Regulation des Taxol-vermittelten Zelltodes involviert sind (TISHLER et al., 1995; GIANNAKAKOU et al., 2001). Hierzu wurde jeweils 1 μg Gesamt-RNA der Taxol-behandelten bzw. der korrespondierenden unbehandelten clearCa-2-GFP- und clearCa-2-GFP-Daxx- α -Zellen wie unter 2.2.2.6 und 2.2.2.7.1 beschrieben in cDNA transkribiert und anschließend in

PCR-Reaktionen eingesetzt, um die relative mRNA-Expression von CD95, Bax, p21 und GADD45 zu analysieren. Die PCR-Reaktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechenden Bandenintensitäten als Maß für die Expressionsstärke densitometrisch quantifiziert und wie bereits unter 3.2.7.1 beschrieben ausgewertet. In Abbildung 3.2.34 sind die GAPDH-normalisierten mRNA-Expressionsniveaus von CD95, Bax, p21 und GADD45 in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Nach 24 h Taxol-Behandlung ist ein Anstieg der GADD45-mRNA Expression erkennbar, der allerdings im Vergleich zur Behandlung mit Topotecan deutlich geringer ist (vgl. Abb. 3.2.28).

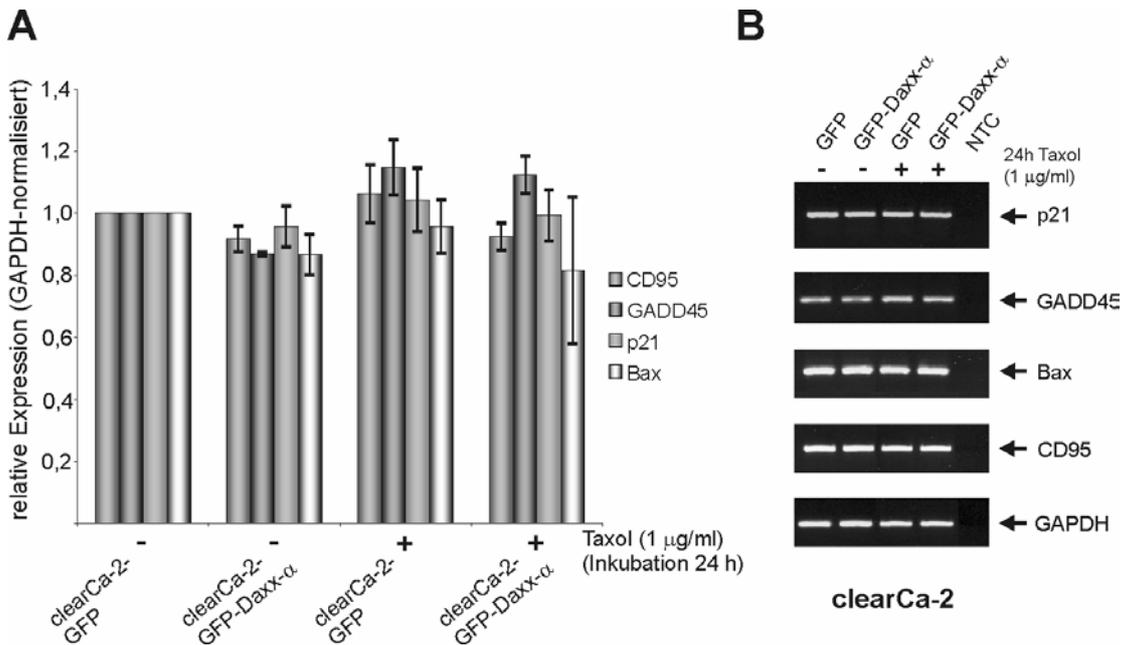


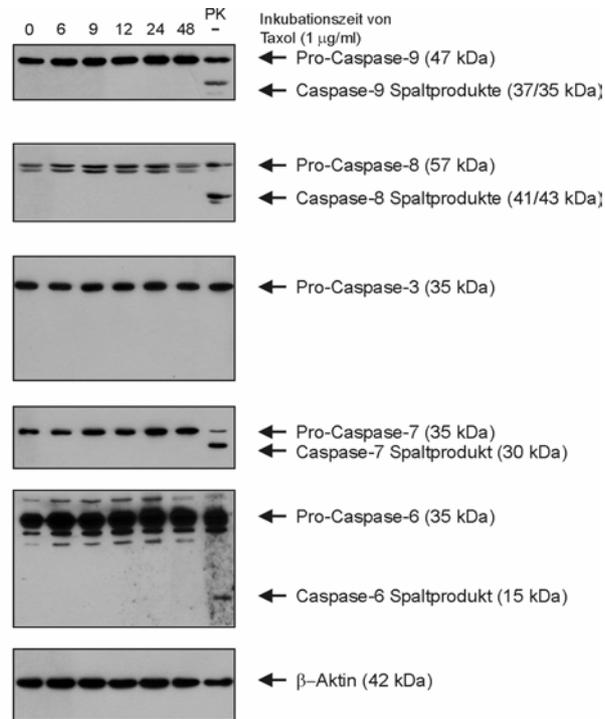
Abb. 3.2.34: RT-PCR-Analyse der Expression von p53-Zielgenen in Taxol-behandelten clearCa-2-Transduktanten.

A: Balkendiagrammdarstellung der relativen (GAPDH-normalisierten) Expressionsniveaus von CD95, GADD45, p21 und Bax in clearCa-2-GFP und clearCa-2-GFP-Daxx-α vor und nach Stimulierung der Zellen mit 1 µg/ml Taxol für 24 h. Die jeweilige relative Expression der Transkripte in unbehandelten clearCa-2-GFP-Zellen wurde als 1 definiert und diente als Bezugsgröße für die Expressionswerte der restlichen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. **B:** Agarosegeldarstellung repräsentativer RT-PCRs. Jeweils 5 µl einer 1/5 Verdünnung der cDNA wurde in die entsprechende PCR eingesetzt, die zur Amplifikation von GAPDH 35 Zyklen und zur Amplifikation der restlichen Transkripte 37 Zyklen umfasste.

Die mRNA-Expressionsniveaus von p21, CD95 und Bax sind nach Behandlung mit Taxol im Rahmen der Standardabweichung unverändert. Insgesamt sind im Vergleich zwischen clearCa-2-GFP und clearCa-2-GFP-Daxx-α im Rahmen der Standardabweichung keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression von GADD45, p21, CD95 und Bax erkennbar. Um zu überprüfen, ob die im Vergleich zur Zelllinie clearCa-2-GFP erhöhte Taxol-Resistenz von clearCa-2-GFP-Daxx-α mit einer zeitlich verzögerten Caspase-Aktivierung korreliert, wurden Proteinextrakte von 6, 9, 12, 24 und 48 h mit Taxol behandelten clearCa-2-GFP- bzw. clearCa-2-GFP-Daxx-α-Zellen im „Western Blot“ auf die Spaltung verschiedener Caspasen hin untersucht. Auch nach 48 h Inkubation mit Taxol konnte allerdings weder in der clearCa-2-GFP- noch in clearCa-2-GFP-Daxx-α-Zelllinie eine Spaltung von Caspase-8, -9, -3, -6 und -7 detektiert werden, wie in Abbildung 3.2.35 anhand der clearCa-2-GFP-Proben exemplarisch dargestellt ist. Dies deutet daraufhin, dass Taxol in clearCa-2-Zellen eine Caspase-unabhängige Form des Zelltodes induziert, was den unter 3.2.7.2/3 beschriebenen Daten entspricht, wonach die Taxol-behandelten Zelllinien das geringste Ausmaß an PARP-Spaltung

aufwiesen. Vorläufige Untersuchungen deuten daraufhin, dass womöglich eine Daxx-vermittelte JNK-Aktivierung an der erhöhten Resistenz gegenüber Taxol beteiligt sein könnte.

Abb. 3.2.35: „Western Blot“-Analyse der Caspase-Spaltung in Taxol-behandelten clearCa-2-GFP-Zellen. Jeweils 25 µg Proteinextrakt von 0, 6, 9, 12, 24 und 48 h Taxol-behandelter Zellen wurden in einer 10%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und im „Western Blot“ mit Antikörpern gegen Caspase-9, -8, -7, -6 und -3 sowie den korrespondierenden Sekundärantikörpern analysiert. Ein Proteinextrakt von 6 h CH11-behandelten clearCa-6-GFP-Zellen diente (mit Ausnahme der Caspase-3 Spaltung) als Positivkontrolle (PK). Die Detektion von β -Aktin diente zur Veranschaulichung, dass vergleichbare Proteinladungsmengen vorlagen.



Die in Abbildung 3.2.36 dargestellten „Kinase-Assay“-Analysen zeigen, dass in clearCa-2-GFP-Daxx- α -Zellen nach Taxol-Behandlung eine frühere Aktivierung der JNK erfolgt (Maximum bereits nach 12 h) als in der GFP-Kontrollzelllinie (Maximum nach 24 h). Dies steht im Konsens mit dem Befund, dass sich die Taxol-Resistenz von clearCa-2-GFP-Daxx- α nicht signifikant von der in clearCa-2-GFP-Daxx- β und -Daxx- γ Zellen unterscheidet, da alle drei Daxx-Varianten in der Lage sind JNK zu aktivieren und sich die Varianten, im Gegensatz zum p53-Repressionspotential, bezüglich des ASK1/JNK-Aktivierungspotentials nicht signifikant voneinander unterscheiden (vgl. 3.2.5.2).

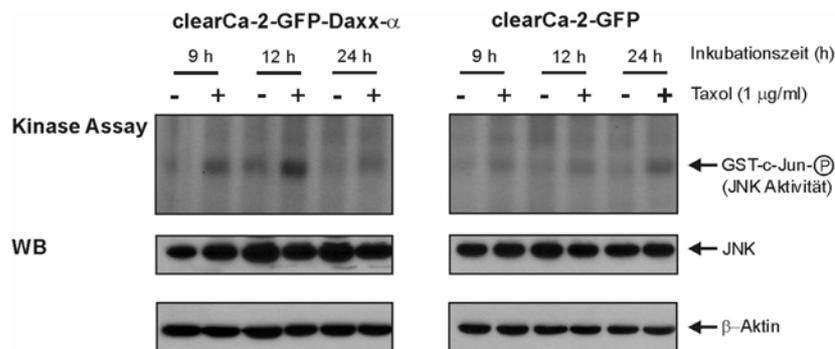


Abb. 3.2.36: Analyse der Taxol-induzierten JNK-Aktivität in clearCa-2-GFP- und clearCa-2-GFP-Daxx- α -Zellen. Jeweils 100 µg Gesamtprotein aus Taxol-behandelten bzw. unbehandelten clearCa-2-GFP- und clearCa-2-GFP-Daxx- α -Zellen wurden nach JNK-Immünpräzipitation in einer Kinasereaktion mit 1 µg des Substrates GST-c-Jun sowie [γ - 32 P]-ATP inkubiert. Die phosphorylierten und radioaktiv markierten Substrate wurden anschließend in einer 12%-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert, wobei die Intensität der Bande ein Maß für die JNK-Aktivität darstellte. „Western Blot“-Analysen der Proteinextrakte demonstrieren vergleichbare Expressionsniveaus der JNK in den jeweiligen Taxol-behandelten sowie den unbehandelten Zellen und die Detektion von β -Aktin veranschaulicht, dass vergleichbare Proteinladungsmengen vorlagen.

4 Diskussion

Apoptose ist ein fundamentaler Prozess, der in mehrzelligen tierischen Organismen neben der Kontrolle der Zellproliferation entscheidend für einen regelhaften Entwicklungsverlauf ist (THOMPSON, 1995; CARSON & RIBEIRO, 1993). Die Tatsache, dass eine Fehlregulation der Apoptose eng mit der Ausbildung von verschiedensten Erkrankungen assoziiert ist, demonstriert die Bedeutung dieses Prozesses. Humane Neoplasien weisen z.B. häufig Mutationen oder genetische Anomalien auf, die zu einem Funktionsverlust von pro-apoptotischen Genen bzw. zu einer verstärkten Expression von anti-apoptotischen Genen führen (HANAHAHAN & WEINBERG, 2000). Ein gestörtes Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Faktoren ist dabei die Folge, welches maßgeblich zur Entstehung von Tumoren beiträgt und zudem für die zu beobachtende Apoptoseresistenz von Tumoren verantwortlich zu sein scheint (VOGELSTEIN et al., 2000; TSUJIMUTO et al., 1985; TAMM et al., 2000). In mehr als 50% aller humanen Tumortypen liegt beispielsweise eine Mutation des *p53*-Gens vor und viele Tumortypen zeigen eine deutliche Erhöhung der Expression von anti-apoptotischen Faktoren wie z.B. Survivin oder XIAP (VOUSDEN & LU, 2002; LEVINE, 1997; TAMM et al., 2000; ADIDA et al., 2000; YAN et al., 2004). Wie *p53* ist auch *DAP-Kinase* ein pro-apoptotisches Tumorsuppressorgen, das allerdings in Tumoren, im Gegensatz zu *p53*, vorwiegend epigenetisch, durch Methylierung des *DAP-Kinase*-Promotors inaktiviert wird (KATZENELLENBOGEN et al., 1999; NAKATSUKA et al., 2003; SANCHEZ-CSEPEDES et al., 2000). Daxx wurde initial ebenfalls als pro-apoptotischer Faktor identifiziert, wobei nachfolgende Untersuchungen dieses Bild relativierten, so dass die Rolle von Daxx mittlerweile kontrovers diskutiert wird und dieses Protein vermutlich Zelltyp-abhängig sowohl pro- als auch anti-apoptotische Funktionen besitzen kann (YANG et al., 1997; CHARETTE et al., 2000; MICHAELSON et al., 1999; MICHAELSON & LEDER, 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Untersuchungen durchgeführt werden, dessen Ergebnisse auf die Rollen von *DAP-Kinase* und Daxx im humanen Nierenzellkarzinom (RCC, renal cell carcinoma) schließen lassen, einem Tumor der sich durch eine weitgehende Therapie- und Apoptose-Resistenz auszeichnet. Die initiale Fragestellung hierbei war, ob eine funktionelle Inaktivierung von Daxx und *DAP-Kinase* im RCC vorliegt, welche potentiell zur Apoptose-Dysregulation in diesem Tumor beitragen könnte. Im Hinblick auf den häufig zu verzeichnenden Verlust der *DAP-Kinase*-Expression vieler Tumortypen wurde daher der Expressionsstatus des *DAP-Kinase*-Gens im humanen RCC analysiert. Zudem wurde die Expression von Daxx untersucht, wobei die Daxx-Spleißvarianten Daxx- β und Daxx- γ identifiziert werden konnten. Dies führte zu der Frage, ob Daxx im RCC möglicherweise auf Ebene des alternativen Spleißens inaktiviert sein könnte, indem Daxx- β und Daxx- γ als natürliche Antagonisten gegenüber der Hauptform Daxx- α wirken und auf diese Weise das pro-apoptotische Potential von Daxx reduziert wird. Zur Klärung dieser Annahme wurden die Daxx-Varianten strukturell und funktionell bezüglich ihres CD95- und p53-Apoptose fördernden bzw. p53-Transkriptions-modulierenden Potentials charakterisiert und anschließend anhand von RCC-Zelllinien hinsichtlich ihrer Bedeutung bzw. Funktion im humanen RCC analysiert.

4.1 Die DAP-Kinase-Expression im humanen RCC

Die Analyse der DAP-Kinase-mRNA-Expression im humanen RCC wurde mit Hilfe einer „Real-Time“-RT-PCR durchgeführt. Anhand von 20 RCC-Zelllinien wurde die Spezifität der PCR überprüft und es konnte gezeigt werden, dass sowohl in der DAP-Kinase-PCR als auch in der zur Normalisierung dienenden GAPDH-PCR ausschließlich die erwarteten Produkte generiert wurden (vgl. Abb. 3.1.1). Eine relative Quantifizierung der DAP-Kinase-Expression im Verhältnis zur GAPDH-Expression war daher möglich. Ungeachtet des histologischen Subtyps konnte in allen 20 analysierten Zelllinien eine DAP-Kinase-Expression detektiert werden. Dies steht im Widerspruch zu den Beobachtungen von Kissil et al. (1997), die ebenfalls diverse RCC-Zelllinien bezüglich der DAP-Kinase-Expression untersucht haben und in zwei von fünf getesteten Zelllinien keine und in einer eine vergleichsweise geringe DAP-Kinase-Expression nachweisen konnten. Die Diskrepanz mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist dabei vermutlich auf den Umfang des von Kissil et al. verwendete Probenkollektivs von fünf Zelllinien zurückzuführen, da Ergebnisse mit derartigen Fallzahlen statistischen Schwankungen unterlegen sein können.

Mit Hilfe des „Real-Time“-RT-PCR-Systems wurde die DAP-Kinase-mRNA-Expression in primären RCC unterschiedlicher histologischer Subtypen von insgesamt 72 Patienten untersucht (vgl. Tab. 3.1.1). In 92% (66/72) der analysierten Tumorproben konnte dabei eine DAP-Kinase-mRNA-Expression nachgewiesen werden, lediglich 8% (6/72) zeigten keine Expression. Im Vergleich zu anderen malignen Tumorerkrankungen (vgl. Tab. 4.1) stellt dies einen sehr hohen prozentualen Anteil an Tumoren mit DAP-Kinase-Expression dar. Leukämische Erkrankungen, wie z.B. das Burkitt-Lymphom zeigen eine teilweise vollständige Inaktivierung der DAP-Kinase-Expression (KATZENELLENBOGEN et al., 1999; NAKATSUKA et al., 2003; vgl. Tab. 4.1). Auch solide Tumore, wie bspw. das Magenkarzinom (bis zu 70%), Hepatozelluläre Karzinom (63%), Harnblasenkarzinom (bis zu 58%) oder das Prostatakarzinom (36%) weisen im Vergleich zum RCC einen deutlich höheren prozentualen Anteil auf, in dem die DAP-Kinase-Expression abgeschaltet ist (CHAN et al., 2005; MATSUMOTO et al., 2003; CHAN et al., 2002; YAMANAKA et al., 2003; vgl. Tab. 4.1). Lediglich im Pankreaskarzinom konnte in einem vergleichbaren Probenkollektiv ($n = 45$) mit 2% ein geringerer Anteil an Tumorproben ohne DAP-Kinase-Expression bzw. Tumoren mit hypermethyliertem *DAP-Kinase*-Promotor detektiert werden (UEKI et al., 2000). Dies deutet daraufhin, dass neben dem Pankreaskarzinom das RCC eine weitere Ausnahmestellung einnimmt hinsichtlich der Aufrechterhaltung der DAP-Kinase-(mRNA-) Expression.

4.1.1 Die DAP-Kinase-mRNA-Expression im Verlauf der Tumorprogression

In einigen Tumortypen weist der Verlust der DAP-Kinase-Expression eine Koinzidenz mit klinisch-pathologischen Parametern auf oder ist mit einer schlechteren Prognose für die betreffenden Patienten verbunden (vgl. Tab. 4.1). Im Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs ist der DAP-Kinase-Expressionsverlust bspw. mit einem signifikant erhöhtem Auftreten von Lymphknotenmetastasen verbunden (HASEGAWA et al., 2002) und im Nicht-Kleinzelligem Lungenkarzinom steht die Abschaltung der Expression in Zusammenhang mit Tumorstadium, -größe sowie einer Beteiligung der Lymphknoten (KIM et al., 2001).

Tab.4.1: Verlust der DAP-Kinase-Expression in humanen Tumoren

Tumortyp	Hypermethylierung/Verlust der Expression	Prognostische Bedeutung	Referenz
Burkitt-Lymphom	100% (9)		KATZENELLENBOGEN et al., 1999
Non-Hodgkin Lymphom (B-Zell)	84% (25)		KATZENELLENBOGEN et al., 1999
Non-Hodgkin Lymphom (T-Zell)	0% (4)		KATZENELLENBOGEN et al., 1999
Akute myeloische Leukämie (pädiatrisch)	70% (28)		EKMEKCI et al., 2004
Akute myeloische Leukämie (adult)	55% (28)		EKMEKCI et al., 2004
Akute myeloische Leukämie	28% (160)		VOSO et al., 2004
Akute lymphatische B-Zell Leukämie (pädiatrisch)	35% (99)		GUTIERREZ et al., 2003
Akute lymphatische T-Zell Leukämie (pädiatrisch)	13% (30)		GUTIERREZ et al., 2003
Maligne T-Zell Erkrankung	47% (19)		NAKATSUKA et al., 2003
Maligne B-Zell Erkrankung	79% (34)		NAKATSUKA et al., 2003
Maligne NK-Zell Erkrankung	63% (24)		NAKATSUKA et al., 2003
Myelodysplastisches Syndrom	47% (34)		VOSO et al., 2004
Blastozytom (B-Zell Erkrankung)	67% (36)		NG et al., 2001
Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom	25% (185)	Korreliert mit Tumor-stadium, -größe sowie Beteiligung der Lymph-knoten	KIM et al., 2001
Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom	28% (75)		YANAGAWA et al., 2003
Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom (Stadium I)	44% (135)	Korreliert mit einer schlechteren Prognose	TANG et al., 2000
Lungenkarzinom	37% (38)		TOYOOKA et al., 2003
Magenkarzinom	69% (107)		CHAN et al., 2005
Maligne Tumore des Magen	70% (54)		LEE et al., 2002
Mammakarzinom	25% (128)	Prognostischer Marker	LEVY et al., 2004
Lobuläres Mammakarzinom	53% (19)		LEHMANN et al., 2002
Duktales Mammakarzinom	9% (85)		LEHMANN et al., 2002
Prostatakarzinom	36% (109)		YAMANAKA et al., 2003
Hepatozelluläres Karzinom	63% (43)	Prognostischer Marker	MATSUMOTO et al., 2003
Barett-Karzinom	70% (10)		SCHILDHAUS et al., 2005
Tumor des gastro-ösophagealem Übergang	92% (12)		SCHILDHAUS et al., 2005
Adenokarzinom des Ösophagus	19% (41)		BROCK et al., 2003
RCC	24% (49)		MORRIS et al., 2003
Wilms Tumor	11% (39)		MORRIS et al., 2003
	0% (31)		HARADA et al., 2002
Maligne Tumore des Kopf- und Halsbereichs	18% (95)	Korreliert mit Tumor-stadium und Beteiligung der Lymphknoten	SANCHEZ-CESPEDES et al., 2000
Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs	24% (80)	Korreliert mit der Bildung von Lymphknoten-metastasen	HASEGAWA et al., 2002
Karzinom des Hals- und Rachenraums	75% (32)		WONG et al., 2002
Oberflächlich-wachsendes Harnblasenkarzinom	29% (55)	Korreliert mit Rate der Neuerkrankungen	TADA et al., 2002
Blasenkarzinom	58% (98)		CHAN et al., 2002
Leiomyosarkom	22% (45)		KAWAGUCHI et al., 2004
Karzinom der Gallenwege	21% (37)	Korreliert mit einer schlechteren Prognose	TOZAWA et al., 2004
Maligner Tumor der Zervix	45% (82)		NARAYAN et al., 2003
Maligne Tumore des Dickdarms	55% (122)		YAMAGUCHI et al., 2003
Hypophysentumor	34% (32)	Korreliert mit Invasivität	SIMPSON et al., 2002
Pankreaskarzinom	2% (45)		UEKI et al., 2000
Malignes Lymphom der Schilddrüse	84% (19)		NAKASTUKA et al., 2000
Malignes Melanom der Haut	19% (86)	Korreliert mit Invasivität	HOON et al., 2004

Da die Ergebnisse der DAP-Kinase-mRNA-Expressionsanalyse auf keine generelle Abschaltung der DAP-Kinase-Expression im RCC hindeuteten, wurde untersucht, ob sich das relative (GAPDH-normalisierte) DAP-Kinase-Expressionsniveau im Verlauf der Tumorprogression klarzelliger RCC verändert. Im Vergleich zwischen 44 Tumorproben des pT1- (n = 23) und pT2-Stadiums (n = 21) gegenüber 14 Proben des pT3-Stadiums waren allerdings keine signifikanten Unterschiede erkennbar (vgl. Abb. 3.1.4.A). Die Stadien pT1 und pT2 wurden dabei zusammengefasst, da diese sich lediglich in der Tumorgröße voneinander unterscheiden, während Tumore des pT3-Stadiums dadurch

gekennzeichnet sind, dass sie nicht mehr ausschließlich auf die Niere begrenzt sind (MOSTOFI & DAVIS, 1998; THOENES et al., 1986; SOBIN & WITTEKIND, 1997). Interessanterweise war bei dem Vergleich der DAP-Kinase-Expressionsniveaus aller separaten Tumorstadien eine signifikant erniedrigte DAP-Kinase-Expression in Tumoren des pT2-Stadiums erkennbar (vgl. Abb. 3.1.4.B). Unter der Annahme, dass jeder Tumor zunächst als pT1-Tumor vorliegt und sich über das Stadium pT2 zum pT3-Tumor entwickelt, deutet dieser Befund auf eine temporäre Abnahme der DAP-Kinase-Expression in frühen Phasen der Tumorprogression hin (pT1 → pT2 Übergang) mit einer anschließenden Re-Expression in weiter fortgeschrittenen Tumorstadien (pT2 → pT3 Übergang). Die Tatsache, dass ein vergleichbares Expressionsmuster im selben Tumorprobenkollektiv für das *Survivin*-Gen, nicht aber für *Smac/DIABLO* beobachtet worden ist (YAN et al., 2004; MAHOTKA et al., 2002; persönliche Mitteilung von Herrn Jörg Liebmann und Herrn Thomas Krieg), lässt vermuten, dass es sich hierbei um einen Gen-spezifischen Effekt handelt. Da DAP-Kinase ein pro-apoptotisches Protein darstellt, ist eine verstärkte Expression in pT3-Stadien vermutlich mit einer erhöhten Apoptosehäufigkeit verbunden. Dies würde den Beobachtungen von Todd et al. (1996) entsprechen, nach denen in RCC fortgeschrittener Stadien eine Zunahme der Apoptosefrequenz festgestellt werden konnte. Der Befund, dass sich die DAP-Kinase-Expressionsniveaus von Tumoren des pT1-Stadiums nicht signifikant von denen des pT3-Stadiums unterscheiden, lässt sich hiermit allerdings nicht vereinbaren.

4.1.2 DAP-Kinase-mRNA-Expression in klarzelligen und chromophil/papillären RCC

Am Beispiel des Mammakarzinoms wird deutlich, dass sich das Ausmaß des DAP-Kinase-Expressionsverlustes bzw. der Hypermethylierung des *DAP-Kinase*-Promotors in verschiedenen Subtypen eines Tumors drastisch unterscheiden kann. Während das lobuläre Mammakarzinom in 53% aller Tumore eine Promotor-Hypermethylierung aufweist, zeigt das duktales Mammakarzinom dies in lediglich 9% der untersuchten Tumorproben (LEHMANN et al., 2002). Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleich der DAP-Kinase-Expressionsniveaus zwischen klarzelligen RCC und solchen des histologisch chromophil/papillären Typs keine signifikant-unterschiedlichen DAP-Kinase-Expressionswerte (vgl. Abb. 3.1.5). Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden hierbei ausschließlich Tumorproben des pT1-Stadiums analysiert. Darüber hinaus ist der prozentuale Anteil an Tumorproben ohne DAP-Kinase-Expression bei klarzelligen RCC mit 8,6% (5/58) insgesamt ähnlich zu dem der chromophil/papillären Tumore mit 8,3% (1/12) und jeweils vergleichbar mit dem Anteil an Proben ohne DAP-Kinase-Expression im Gesamtprobenkollektiv (6/72; 8,3%). Das Expressionsmuster der DAP-Kinase in klarzelligen und chromophil/papillären Subtypen des RCC kann somit als gleichartig angesehen werden.

4.1.3 Der Methylierungszustand des *DAP-Kinase*-Promotors im RCC

Der Verlust der DAP-Kinase-Expression ist in den meisten Tumortypen auf eine *de novo* Methylierung des *DAP-Kinase*-Promotors zurückzuführen (KISSIL et al., 1997; BIALIK & KIMCHI, 2004). Anhand von zehn repräsentativen RCC-Proben sowie dem jeweils korrespondierendem

Normalgewebe wurde daher mittels Methylierungs-spezifischer PCR (MSP) untersucht, ob dies ebenfalls für die in den 8% der analysierten Tumorproben beobachteten Abwesenheit der DAP-Kinase-Expression verantwortlich ist. Aufgrund von limitierten Probenmaterials konnten in dieser Analyse lediglich zwei der sechs Tumorproben ohne nachweisbare DAP-Kinase-Expression berücksichtigt werden. Weder in diesen, noch in den übrigen Tumorproben sowie den Proben des korrespondierenden Normalgewebes konnten dabei methylierte Allele des *DAP-Kinase*-Promotors detektiert werden (vgl. Abb. 3.1.6). Die Tatsache, dass in der als Positivkontrolle dienenden Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji ausschließlich methylierte Allele des *DAP-Kinase*-Promotors amplifiziert wurden, bestätigt dass diese prinzipiell nachweisbar waren (KATZENELLENBOGEN et al., 1999). Insgesamt ist das Probenkollektiv zu gering, um *DAP-Kinase*-Promotor-Methylierungen im RCC vollständig auszuschließen zu können. Zusammen mit dem Befund, dass der überwiegende Anteil der analysierten Proben eine Aufrechterhaltung der DAP-Kinase-Expression zeigt, deuten diese Daten allerdings daraufhin, dass eine Hypermethylierung des *DAP-Kinase*-Promotors im RCC nicht vorliegt. Dies entspricht der Annahme, dass maligne Tumorerkrankungen der Niere generell ein geringeres Ausmaß an Hypermethylierung aufweisen als beispielsweise Tumore des gastrointestinalen Traktes (wie Ösophagus, Magen und Darm) oder Lymphome (ESTELLER, 2002; MEYER et al., 2000). Für die 8% der analysierten Tumorproben ohne nachweisbare DAP-Kinase-Expression deutet die Abwesenheit von Promotor-Hypermethylierungen (zumindest in den experimentell untersuchten Tumorproben) auf die Existenz eines alternativen Mechanismus zur Abschaltung der DAP-Kinase-Expression hin, wie es zum Teil auch für das Lungenkarzinom, das Magenkarzinom, malignen Tumoren der Hypophyse oder das Leiomyosarkom beobachtet worden ist (SATO et al., 2002; TOYOOKA et al., 2003; SIMPSON et al., 2002). Neben Hypermethylierung der DNA sind in diesen Tumortypen auch Histon-Deacetylierungen innerhalb der *DAP-Kinase*-Promotorregion sowie Allel-Deletionen für den Verlust der Expression verantwortlich. Insgesamt zeigt die Tatsache, dass 92% der untersuchten RCC-Proben eine DAP-Kinase-Expression aufweisen, dass eine Inaktivierung der DAP-Kinase-Expression nicht essentiell für die Tumorgenese des humanen RCC zu sein scheint. Der genaue Mechanismus zur Abschaltung der Expression wurde in der vorliegenden Arbeit daher nicht näher untersucht.

4.1.4 DAP-Kinase-Proteinexpression und -Aktivität im humanen RCC

Um auszuschließen, dass DAP-Kinase auf mRNA-Ebene exprimiert vorliegt, das Protein aufgrund einer spezifischen Inhibition der Translation aber nicht existiert, wurde die Proteinexpression der DAP-Kinase im RCC ebenfalls untersucht. Die „Western Blot“-Analyse der RCC-Zelllinien zeigte dabei, dass in 11 der 12 untersuchten Zelllinien eine der DAP-Kinase entsprechenden Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 160 kDa detektiert werden konnte (vgl. Abb. 3.1.7). Lediglich die Zelllinie chromophob-1 (auf mRNA Ebene nicht untersucht) lieferte keine vergleichbare Bande, was einem Anteil von 91,6% (11/12) an DAP-Kinase-exprimierenden Zelllinien entspricht und sehr gut mit den Ergebnissen der mRNA-Expressionsanalyse übereinstimmt. In allen Proteinextrakten von sechs zufällig ausgewählten primären RCC konnte zudem eine DAP-Kinase-Expression nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.1.7), was vermuten lässt, dass die DAP-Kinase-Expression im RCC nicht auf die mRNA-Ebene beschränkt ist und auch auf Proteinebene besteht. Interessanterweise zeigen die „Western Blot“-Daten darüber hinaus, dass im RCC das DAP-Kinase-Protein ein geringeres apparentes Molekulargewicht besitzt als in HeLa-Zellen. Immunpräzipitationsanalysen

belegen allerdings, dass es sich bei diesem Protein tatsächlich um DAP-Kinase handelt (vgl. Abb. 3.1.7). Dies deutet darauf hin, dass im RCC möglicherweise eine andere Form der DAP-Kinase exprimiert, bzw. das Protein post-translational modifiziert wird. Vor diesem Hintergrund wurde mit Hilfe von *in vitro* „Kinase-Assays“ die basale Aktivität des Proteins in den 11 DAP-Kinase-exprimierenden RCC-Zelllinien untersucht. Es stellte sich heraus, dass DAP-Kinase in fast allen Zelllinien im inaktiven Zustand vorliegt. Lediglich in der Zelllinie clearCa-1 konnte eine basale Aktivität detektiert werden (vgl. Abb. 3.1.8). Interessanterweise wird in dieser Zelllinie neben der Expression selbst die Apoptose-vermittelnde enzymatische Aktivität des Proteins toleriert (COHEN et al., 1997). Darüber hinaus ist hierdurch ersichtlich, dass die Ursache für das differentielle Molekulargewicht der DAP-Kinase nicht die funktionelle Inaktivierung des Proteins zur Folge hat.

Die Tatsache, dass DAP-Kinase in vitalen Zellen prinzipiell durch einen auf Auto-Phosphorylierung basierendem Mechanismus inaktiv vorliegt (SOHAT et al., 2001), das Protein in der Zelllinie clearCa-1 aber eine basale Aktivität zeigt, deutet darauf hin, dass das minimal geringere Molekulargewicht der DAP-Kinase im RCC möglicherweise auf eine fehlende Auto-Phosphorylierung des Proteins zurückzuführen ist. Da allerdings alle Zelllinien vital sind und clearCa-1 bezüglich der basalen Aktivität die Ausnahme bildet, würde diese Annahme die Existenz von kompensatorischen Mechanismen postulieren, die in clearCa-1 (nicht auto-phosphoryliert → aktiv → kompensatorische Mechanismen → Zellen nicht apoptotisch) auf einer anderen Ebene greifen als in den übrigen analysierten Zelllinien (nicht auto-phosphoryliert → kompensatorische Mechanismen → inaktiv → Zellen nicht apoptotisch). Offensichtlich führen diese putativen Mechanismen aber in allen Zelllinien dazu, dass die Apoptose-induzierende Wirkung der (aktiven) DAP-Kinase unterdrückt wird. Unabhängig von derartigen Spekulation zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass die mRNA- und Protein-Expression der DAP-Kinase im humanen RCC im Gegensatz zu anderen Tumortypen zum überwiegenden Teil (92%) aufrecht erhalten ist und nicht durch Hypermethylierung des *DAP-Kinase*-Promotors inaktiviert wird.

Dieser Befund steht im Konflikt mit den Beobachtungen von Morris et al. (2003), die während des Zeitraums, in dem die Experimente zur vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, eine Studie zum Methylierungszustand des *DAP-Kinase*-Promotors im humanen RCC veröffentlicht haben. Mit 49 primären RCC haben Morris et al. ein kleineres Tumorprobenkollektiv analysiert, in dem sie mittels Methylierung-spezifischer PCR (MSP) in 24% der untersuchten Primärtumore eine Hypermethylierung des *DAP-Kinase*-Promotors detektieren konnten. Tumorproben des histologisch klarzelligen Subtyps zeigten dabei mit 19% ein geringeres Ausmaß an Promotormethylierung als Tumore des chromophil/papillären Typs (43%). Eine Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern wie Tumorstadium, Differenzierungsgrad des Tumors oder Patientenalter konnte von Morris et al. nicht festgestellt werden. Des Weiteren konnten sie eine Promotormethylierung in 11% (4/39) der analysierten Wilm's Tumore (Nephroblastom) nachweisen. Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit könnte das limitierte Probenkollektiv (10 Tumor- und 10 Normalgewebeproben) darstellen, welches in dieser Arbeit bezüglich der Hypermethylierung des *DAP-Kinase*-Promotors analysiert wurde. Andererseits zeigen die Daten der mRNA-Expressionsanalyse eindeutig, dass eine DAP-Kinase-Expression in dem überwiegenden Anteil der Tumorproben (92%) stattfindet. Darüber hinaus belegen immunhistochemische Analysen sowie RT-PCR-Analysen an durch Laser-Mikrodissektion generierten, homogenen RCC-Zellansammlungen, dass diese Expression tatsächlich in den Tumorzellen stattfindet und sich nicht

durch „kontaminierendes“ Normalgewebe innerhalb der analysierten Tumorproben ableiten lässt (WETHKAMP et al., 2006). Harada et al. (2002), die ebenfalls den Methylierungszustand des *DAP-Kinase*-Promotors im Wilm's Tumor analysiert haben, konnten im Gegensatz zu Morris et al. keine Hypermethylierung nachweisen, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. Ferner zeigen jüngste Untersuchungen, dass eine *de novo* Methylierungen innerhalb der *DAP-Kinase*-Promotorregion, die von Morris et al. (sowie der in der vorliegenden Arbeit) mittels MSP analysiert wurde, nicht unmittelbar mit einer Abschaltung der Genexpression zusammenhängen muss (TOYOOKA et al., 2003). Zudem scheint eine komplette Unterdrückung der Genexpression vom Grad sowie Dichte der Methylierungen innerhalb von Promotorregionen abzuhängen, die durch reine MSP-Untersuchungen nicht berücksichtigt werden können (BAYLIN et al., 1998; ZINGG & JONES, 1997). In diversen Studien zum Methylierungszustand des *DAP-Kinase*-Promotors wurden daher zusätzliche Methoden wie bspw. die Bisulfit-Sequenzierung der entsprechenden DNA-Bereiche durchgeführt (HOON et al., 2004; TOYOOKA et al., 2003). In jedem Fall ist die Analyse der Expression aber die einzige Möglichkeit die biologische Relevanz von Promotormethylierungen nachzuweisen.

4.2 Expression der DAP-Kinase in nicht-neoplastischen Lymphozyten

Neben dem RCC als Tumormodell wurde die DAP-Kinase-Expression auch in proliferierenden nicht-neoplastischen T-Lymphozyten analysiert, um die Expression zwischen entartet- und physiologisch-proliferierendem Gewebe vergleichen zu können. Die Analyse ruhender sowie Mitogen-stimulierter T-Lymphozyten lässt vermuten, dass die Unterdrückung der DAP-Kinase-Expression neben Tumorgeweben auch in physiologisch-proliferierenden Zellsystemen von Bedeutung ist. In isolierten T-Lymphozyten von vier nicht miteinander verwandten Spendern, konnte vor der Stimulation in allen Fällen eine deutliche DAP-Kinase-mRNA-Expression detektiert werden, die nach Einsetzen der Zellproliferation hoch signifikant reduziert war (vgl. Abb. 3.1.9). Auch auf Proteinebene konnte dies bestätigt werden (vgl. Abb. 3.1.10). Dass die mitogene Stimulation tatsächlich die Zellproliferation einleitete, konnte auf molekularer Ebene anhand der drastischen Zunahme der Survivin-Expression belegt werden (FUKUDA et al., 2002). Survivin ist ein Mitglied der IAP-Familie, das neben der Apoptose-Inhibition auch an der Regulation der Proliferation bzw. Zytokinese beteiligt ist (AMBROSINI et al., 1997). Survivin wird dabei selbst Zellzyklus-abhängig exprimiert, wobei die Expression überwiegend auf proliferierendes Embryonalgewebe beschränkt ist (ALTIERI, 2003). Ausnahmen bilden hierbei, abgesehen von adulten Thymozyten und CD34⁺-Stammzellen, proliferierende T-Lymphozyten, was die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen (FUKUDA et al., 2002; ALTIERI, 2003). Neben der bereits beschriebenen Proliferations-gekoppelten Expression von Survivin weisen die Daten der vorliegenden Arbeit erstmalig auf eine Proliferations- bzw. Differenzierungs-gekoppelte Suppression der DAP-Kinase-Expression hin. Die Expression wird demnach, wie in den (meisten) entartet-proliferierenden Tumorgeweben, auch in physiologisch-proliferierenden Zellen auf Transkriptelevel abgeschaltet. Die Methylierungsanalysen des *DAP-Kinase*-Promotors von stimulierten Lymphozyten weisen darauf hin, dass es sich hierbei nicht um einen auf Promotormethylierung basierenden Mechanismus handelt (vgl. Abb. 3.1.11). Wie auch in den 8% der RCC-Proben ohne nachweisbare DAP-Kinase-Expression scheinen hier Methylierungs-unabhängige Mechanismen zur Abschaltung der Expression vorzuliegen. Die Tatsache, dass in vielen Tumortypen, wie dem Lungenkarzinom (MONZO et al., 1999) oder dem Mammakarzinom (TANAKA et al., 2000)

neben dem Verlust der DAP-Kinase-Expression auch eine Re-Expression von Survivin zu beobachten ist, lässt vermuten, dass eine reziproke Expression von DAP-Kinase und Survivin (wie in den ruhenden bzw. proliferierenden Lymphozyten) auch für die Expansion/Proliferation von Tumorzellen von Bedeutung sein könnte. Da sich im RCC, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, das DAP-Kinase-Expressionsniveau nicht signifikant zwischen frühen und fortgeschrittenen Tumorstadien unterscheidet und auch die Survivin-Expression nicht signifikant verändert ist (MAHOTKA et al., 2002), wurden die Ratios zwischen der Survivin- und DAP-Kinase-Expression im Laufe der Tumورprogression analysiert. Hierbei stellte sich heraus, dass diese statistisch hoch signifikant verändert waren. Im Vergleich zu frühen Tumorstadien, war das Expressionsniveau von Survivin relativ zu dem von DAP-Kinase deutlich erhöht, was das Expressionsmuster der proliferierenden Lymphozyten widerspiegelt (vgl. Abb. 3.1.12). Eine relative Expression der beiden Gene zueinander scheint im RCC daher potentiell von prognostischer Bedeutung zu sein.

4.3 Die Aufrechterhaltung der DAP-Kinase-Expression im humanen RCC

Ungeachtet der Diskrepanz zu den Beobachtungen durch Morris et al. (2003) weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf eine Aufrechterhaltung der DAP-Kinase-Expression im RCC hin. Zusammen mit dem Pankreaskarzinom und dem Nephroblastom bildet es diesbezüglich eine Ausnahme gegenüber den übrigen bisher analysierten Tumorarten, in denen ein teilweise vollständige Hypermethylierung des *DAP-Kinase*-Promotors bzw. Abschaltung der *DAP-Kinase*-Genexpression beobachtet werden kann (HARADA et al., 2002; UEKI et al., 2000; vgl. Tab. 4.1). Wie bereits unter 4.1 beschrieben, konnte in lediglich 8% (6/72) der untersuchten RCC dagegen *keine* DAP-Kinase-Expression nachgewiesen werden, wobei hierfür (zumindest in den experimentell untersuchten Proben) keine Hypermethylierung des *DAP-Kinase*-Promotors, sondern vermutlich alternative Mechanismen verantwortlich sind. Dies deutet daraufhin, dass im Gegensatz zu anderen Tumorarten eine Inaktivierung der DAP-Kinase-Expression nicht essentiell für die Tumorgenese des RCC zu sein scheint. Hierfür sind verschiedene Gründe denkbar: Zunächst konnte anhand von RCC-Zelllinien gezeigt werden, dass DAP-Kinase zwar exprimiert wird, das Protein aber weitgehend inaktiv vorliegt und in einer Zelllinie selbst in aktiver Form nicht ausreichend ist, den Zelltod zu induzieren. Im Gegensatz zu einer epigenetischen Inaktivierung der DAP-Kinase-Expression scheint im RCC daher eine Inaktivierung auf Proteinebene vorzuliegen, welche DAP-Kinase im enzymatisch inaktiven Zustand hält bzw. die pro-apoptotisch wirkende Aktivität des Proteins durch bisher unbekannte kompensatorische Mechanismen unterdrückt. Hierdurch unterscheidet sich das RCC letztlich nicht von anderen Tumoren, lediglich die Stufe der Inaktivierung ist eine andere. Da DAP-Kinase ubiquitär exprimiert wird und unter physiologischen Bedingungen ebenfalls vorwiegend in inaktivem Zustand vorliegt (COHEN et al., 1997), ist die Bedeutung dieser post-translationellen Inaktivierung für die Tumorgenese des RCC fraglich.

DAP-Kinase wirkt darüber hinaus als Tumorsuppressor, indem es in frühen Phasen der Tumorbildung durch die p14^{ARF}-vermittelte Aktivierung der p53-abhängigen Apoptose die onkogene Transformation von Zellen unterdrückt (RAVEH et al., 2001). Die p53-abhängige Apoptose ist im RCC allerdings von untergeordneter Bedeutung, so treten p53-Mutationen in diesem Tumor vergleichsweise selten auf (SOUSSI et al., 2000; IARC p53 Database). Während in anderen Tumorarten p53-Mutationen mit einer erhöhten Radio- und Chemotherapieresistenz assoziiert sind (WALLACE-BRODEUR & LOWE, 1999),

zeigt das RCC trotz einer geringen p53-Mutationshäufigkeit eine ausgeprägte Resistenz gegenüber diesen Therapien (HARTMANN & BOKEMEYER, 1999). In diesem Zusammenhang postulieren Gurova et al. (2004), dass generell im Nierengewebe ein dominant-negativ-Signalweg existiert, der p53 - unabhängig von den bisher bekannten Regulatoren wie MDM2 und p14^{ARF} - inhibiert und vermutlich für die Unterdrückung der p53-abhängigen Apoptose verantwortlich ist. Anhand von embryonalen Rattenfibroblasten konnte gezeigt, dass die DAP-Kinase-vermittelte Suppression der zellulären Transformation tatsächlich durch dominant-negatives p53 inhibiert wird (RAVEH et al., 2001). Es ist daher denkbar, dass im RCC eine Aufrechterhaltung der DAP-Kinase-Expression toleriert wird, da der molekulare Signalweg auf Ebene der p53-vermittelten Apoptose bzw. Aktivierung der DAP-Kinase unterdrückt ist. Jüngste Analysen zeigen, dass *DAP-Kinase* selbst ein direktes p53-Zielgen ist und mit p14^{ARF} einen regulatorischen „p53-Feedback-Loop“ bildet (MARTORIATI et al., 2005), der im Nierengewebe möglicherweise aufgrund des dominant-negativ-Signalweges nicht funktionell ist.

Untersuchungen an p53^{-/-} bzw. p19^{ARF}^{-/-} (murines Homolog zu p14^{ARF}) murinen embryonalen Fibroblasten demonstrieren, dass DAP-Kinase auch p53-unabhängige Effekte vermittelt. So zeigen diese Zellen nach Überexpression einer aktiven Form des Proteins ein gehäuftes Auftreten von vielkernigen Zellen, was nach Raveh et al. (2001) auf die Unterdrückung der Zytokinese zurückzuführen ist. Über diesen Mechanismus ist DAP-Kinase wahrscheinlich in der Lage die Apoptose auch p53-unabhängig zu fördern, was erklärt, weshalb ein Verlust der DAP-Kinase-Expression auch in Tumorarten beobachtet werden kann, die sich durch eine hohe p53-Mutationshäufigkeit auszeichnen, wie z.B. den malignen Tumoren des Dickdarms, der Lunge oder der Harnblase (RAVEH et al., 2001; NG 2002; VOGELSTEIN et al., 2000). Hinsichtlich der Tatsache, dass DAP-Kinase als putativer Inhibitor der Zytokinese fungiert, ist der Befund interessant, dass die Survivin-Expression relativ zur DAP-Kinase-Expression während der Tumorprogression des RCC signifikant zunimmt. Survivin stellt einen fundamentalen Regulator der Zytokinese dar (ALTIERI, 2003). Ein „antisense“-cDNA-vermittelter „Knock out“ der Survivin-Expression oder die Expression von dominant-negativ-Mutanten ist bspw. mit letalen Zellteilungsdefekten verbunden, wobei speziell die Zytokinese nicht vollständig abläuft. Vielkernige Zellen sind auch hier die Folge (LI et al., 1999). Da die Ergebnisse aus der DAP-Kinase-Expressionsanalyse der T-Lymphozyten auch auf eine gegensätzliche Expression bzw. Funktion von DAP-Kinase und Survivin während der Zellproliferation/Zytokinese hindeuten, wäre es denkbar, dass im RCC eine DAP-Kinase-Expression aufgrund der vergleichsweise starken Survivin-Expression toleriert werden kann. Das Zytokinesefördernde Potential von Survivin könnte in diesem Fall ausreichend sein, um das inhibitorische Potential der DAP-Kinase zu nivellieren, was - zusammen mit dem dominant-negativ-p53-Signalweg - eine Aufrechterhaltung der DAP-Kinase-Expression im RCC gewährleistet. Zukünftige Experimente sind hierzu jedoch zweifelsohne notwendig, um die auf Expressionsanalysen basierenden Annahmen zur funktionellen Beziehung zwischen Survivin und DAP-Kinase während der Zellproliferation/Zytokinese genauer herauszustellen.

Letztlich könnte die DAP-Kinase-Expression im Nierenzellkarzinom auch auf eine Gewebespezifische Funktion des Proteins zurückzuführen sein. So wird DAP-Kinase in verschiedenen Geweben wie dem Hippocampus oder der Hirnrinde exprimiert und liegt dort sogar in aktiver Form vor (SAKAGAMI et al., 1997; YAMAMOTO et al., 1999; SCHUMACHER et al., 2002). Durch die Phosphorylierung von Syntaxin-1A ist DAP-Kinase hier an nicht-apoptotischen Prozessen wie der Regulation der Neurotransmitter Exozytose beteiligt (TIAN et al., 2003). Unter Berücksichtigung der

Multi-Domänen Struktur des Proteins ist es durchaus denkbar, dass DAP-Kinase in verschiedenen Prozessen involviert ist und bspw. auch im Nierengewebe eine zur Apoptose-Induktion alternative Funktion vermittelt. Eine Inaktivierung der Expression wäre in diesem Zusammenhang möglicherweise nicht essentiell für die Tumorgenese des RCC. Zudem zeigen DAP-Kinase „Knock-out“-Studien, dass sich auch ein Verlust der Expression Apoptose-fördernd auswirken kann, was insgesamt auf eine komplexe und vermutlich Zelltyp-abhängige Funktion und Regulation der DAP-Kinase hindeutet (JIN & GALLAGHER, 2003).

Zusammenfassend sind also verschiedene Ursachen für die Sonderstellung des RCC bezüglich der Aufrechterhaltung der DAP-Kinase-Expression vorstellbar, wobei zukünftig funktionelle Analysen erforderlich sind diese hypothetischen Annahmen experimentell zu verifizieren. Eine genauere Kenntnis zur Funktion des Proteins im gesunden Nierengewebe ist dabei vermutlich förderlich. Es ist nicht auszuschließen, dass DAP-Kinase in der Niere eine zur Apoptose alternative Funktion ausübt, wodurch das Protein im RCC keinen Tumorsuppressor darstellt und eine Inaktivierung der DAP-Kinase-Expression daher nicht essentiell für die Tumorgenese des RCC wäre.

4.4 Identifizierung von neuen Daxx-Spleißvarianten -Daxx- β und Daxx- γ - in humanen RCC-Zelllinien

Entsprechend den Untersuchungen zur potentiellen Inaktivierung der DAP-Kinase-Expression, wurde auch der Expressionsstatus von Daxx im humanen RCC zunächst anhand von 22 verschiedenen RCC-Zelllinien analysiert. Mittels RT-PCR konnte in 20 der 22 untersuchten Zelllinien das Daxx-Transkript detektiert werden, was demonstriert, dass Daxx wie DAP-Kinase in der Mehrzahl der RCC-Zelllinien exprimiert wird (vgl. Abb. 3.2.1). Zudem konnte in den Proben der beiden Zelllinien ohne nachweisbares Daxx-Transkript kontaminierende DNA Präparations-Rückstände nachgewiesen werden, so dass die Ergebnisse bezüglich der nicht detektierten Daxx-Expression in diesen beiden Zelllinien nicht aussagekräftig waren. Neben dem erwarteten Daxx-Transkript traten in nahezu allen Zelllinien ein bzw. zwei weitere Fragmente auf, die mit Hilfe von DNA-Sequenzierung und einer NetGene2-Analyse der genomischen *Daxx*-Sequenz als alternative Spleißformen von Daxx identifiziert werden konnten (vgl. Abb. 3.2.3). Sequenzvergleiche zeigten außerdem, dass die jeweiligen alternativen Spleißdonor- und -akzeptorsequenzen weitgehend mit der entsprechenden von Mount (1982) und Staden (1984) postulierten Konsensussequenz übereinstimmen (vgl. Abb. 3.2.4). Die beiden Daxx-Spleißvarianten wurden darauf hin als Daxx- β und Daxx- γ bezeichnet. Die Verwendung der alternativen Spleißdonor und -akzeptorstellen führt dazu, dass in Daxx- β die Nukleotide 19 bis 170 von Exon 6 deletiert sind. Bei der Bildung von Daxx- γ wird die reguläre Spleißdonorstelle am Exon 5/Intron-Übergang der Daxx-prä-mRNA mit der „kryptischen“ - Akzeptorstelle innerhalb des Exon 6 verwendet, wodurch die ersten 170 nt von Exon 6 in Daxx- γ vollständig deletiert werden.

Neben einer Vielzahl von Proteinen wie bspw. Bcl-X (AKGUL et al., 2004; CHAO & KORSMEYER, 1998), Survivin (MAHOTKA et al., 1999), Smac/DIABLO (FU et al., 2003), CD95 (HUGHES & CRISPE, 1995), FLIP (GOLKS et al., 2005), p53 (GHOSH et al., 2004), TRAIL (KRIEG et al., 2003) oder Caspase-2, -9 und -10 (COTE et al., 2001; SEOL & BILLIAR, 1999; NG et al., 1999) stellt Daxx somit einen weiteren Apoptose-relevanten Faktor dar, der auch auf der Ebene des alternativen Spleißens reguliert werden kann. Die Tatsache, dass diese Spleißvarianten von Daxx in früheren

Expressionsanalysen von Yang et al. (1997) und Kiriakidou et al. (1997) bisher nicht nachgewiesen wurden, lässt sich zum Teil dadurch erklären, dass hierbei vorwiegend „Norther Blot“-Analysen durchgeführt wurden. Da Daxx- α eine Transkriptlänge von ca. 2,6 kb besitzt (KIRIAKIDOU et al., 1997) und sich Daxx- β und Daxx- γ diesbezüglich nur durch die Deletion von 152 bzw. 170 nt von der α -Form unterscheiden, ist es möglich, dass die verschiedenen Transkripte in den hierbei verwendeten 1,5%-igen Agarosegelen elektrophoretisch nicht voneinander aufgetrennt wurden. Zudem wurden Sonden verwendet, die dem 3'-Bereichs des Daxx-Transkriptes entsprechen und somit in dem Sequenzbereich hybridisieren, der in den Daxx-Varianten verändert ist (YANG et al., 1997).

Da die initiale Analyse der Daxx-Expression anhand der RCC-Zelllinien keine Hinweise auf eine Inaktivierung von Daxx auf Ebene der Expression lieferte, wurde untersucht, ob Daxx im RCC möglicherweise durch den Mechanismus des alternativen Spleißens inaktiviert werden könnte. Diese Art der Inaktivierung ist in anderen Zelltypen bereits für verschiedene pro-apoptotische Faktoren beschrieben worden wie bspw. CD95, wo das alternative Spleißen zur Bildung verschiedener Rezeptor-Isoformen führen kann. So ist im Fall der CD95Exo6Del-Variante aufgrund alternativen Spleißens die Transmembrandomäne des Rezeptors deletiert, der auf diese Weise als löslicher, sogenannter „Decoy“-Rezeptor wirkt und durch Kompetetion mit dem membrangebundenen Rezeptor die Apoptose-Induktion inhibiert (CHENG et al., 1994; CASCINO et al., 1995). Bei der Variante CD95Exo8Del führt das alternatives Spleißen zur Deletion von Exon 8 und zu einer Verschiebung des Leserahmens, wodurch dieser Variante die „Death Domain“ fehlt. CD95Exo8Del unterdrückt ebenfalls die Apoptose, indem es als dominat-negativ-Form wirkt (CASCINO et al., 1996). Auch das pro-apoptotische Potential von Caspasen kann durch den Mechanismus des alternativen Spleißens reprimiert werden, wie am Beispiel von Caspase-2 und-9 beobachtet werden konnte (WANG et al., 1994; JIANG et al., 1998; SEOL & BILLIAR, 1999). Um zu untersuchen, ob im RCC eine vergleichbare Form der Inaktivierung für Daxx- α vorliegen könnte, wurden die Spleißvarianten Daxx- β und Daxx- γ strukturell und funktionell hinsichtlich einer potentiellen dominat-negativ-Form charakterisiert.

4.5 Strukturelle Charakterisierung von Daxx- β und Daxx- γ

Das alternative Spleißen von Daxx- β und Daxx- γ führt in beiden Varianten zu einer identischen Verschiebung des Leserahmens in den restlichen Teilen von Exon 6 bzw. in Exon 7. Hierdurch wird ein alternatives Stop-Kodon generiert, so dass Exon 7 in Daxx- β und Daxx- γ um 4 nt verkürzt ist (vgl. Abb. 3.2.5). Auf Proteinebene resultiert dies in einer veränderten Aminosäuresequenz ab der Aminosäureposition 647 (Daxx- γ) bzw. 653 (Daxx- β), welches in beiden Varianten zur Bildung eines neuen Carboxyterminus führt (vgl. Abb. 3.2.6). Daxx- β ist mit insgesamt 688 Aminosäureresten um 52 Aminosäuren verkürzt gegenüber der Hauptform Daxx- α . Daxx- γ stellt mit 682 Aminosäuren die kleinste der drei Isoformen dar und unterscheidet sich zu Daxx- β lediglich darin, dass die Aminosäurereste 647-653 von Daxx- β (bzw. Daxx- α) deletiert sind. Eine Sekundärstrukturanalyse nach dem Algorithmus von Chou und Fasman (CHOU & FASMAN, 1978) zeigt allerdings, dass trotz der hohen Sequenzähnlichkeit zwischen Daxx- β und Daxx- γ Unterschiede bezüglich der Ausbildung von β -Faltblattstrukturen wahrscheinlich sind (vgl. Abb. 7.1; Anhang), was wiederum unterschiedliche Proteinfaltungen von Daxx- β und Daxx- γ zur Folge haben könnte. Aufgrund der reduzierten Anzahl an Aminosäuren besitzen Daxx- β mit ca. 76,3 kDa und Daxx- γ mit ca. 75,6 kDa ein geringeres Molekulargewicht als Daxx- α (81,4 kDa) und weisen ebenfalls Unterschiede in biochemischen

Parametern wie dem Isoelektrischen Punkt bzw. dem Extinktionskoeffizienten auf (vgl. Tab. 3.2.1). Immunpräzipitations- und „Western Blot“-Analysen von GFP-Daxx- α -, GFP-Daxx- β - bzw. GFP-Daxx- γ -überexprimierenden HepG2-Zellen zeigen, dass sich die unterschiedlichen Molekulargewichte der Daxx-Varianten auch in einem differentiellen elektrophoretischem Migrationsverhalten widerspiegeln. Aufgrund des relativ hohen Anteils an sauren Aminosäuren (Aminosäuren 435-485), der in den Spleißvarianten konserviert ist, weisen Daxx- α , Daxx- β und Daxx- γ ein irreguläres elektrophoretisches Laufverhalten auf, wodurch Daxx- α bspw. ein apparentes Molekulargewicht von 120 kDa besitzt und nicht als 80 kDa-Protein detektiert wird (KIRIAKIDOU et al., 1997). Durch die Fusion mit dem 27 kDa-Protein GFP führt dies für GFP-Daxx- α somit zu einem apparenten Molekulargewicht von ca. 150 kDa. GFP-Daxx- β und -Daxx- γ zeigen gemäß dem geringen Molekulargewichtsunterschied ein entsprechend verringertes apparentes Molekulargewicht (vgl. Abb. 3.2.9).

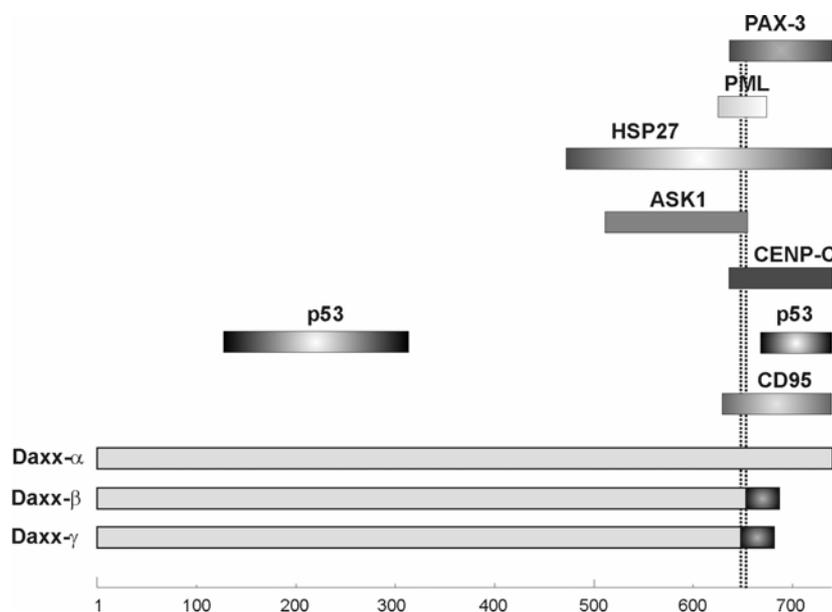


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Daxx-Varianten hinsichtlich der Bindungsregion verschiedener Interaktionspartner. Die gestrichelte Linie begrenzt die in den Daxx-Varianten konservierte Proteinregion. Die unterschiedlichen C-Termini von Daxx- β bzw. Daxx- γ sind hervorgehoben. Die untere Skala stellt die Aminosäureabfolge dar.

Neben einer putativen N6-Methylase-Signatur und diversen potentiellen Casein Kinase II- bzw. Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen ist im neuen C-Terminus von Daxx- β und Daxx- γ ein potentielles IAP-Bindungs Motiv (IBM) lokalisiert, das stark homolog zu dem IBM-Motiv der Serin Protease Omi/HtrA2 ist (vgl. Abb. 3.2.7/8). Dies deutet auf eine mögliche pro-apoptotische Funktion von Daxx- β und Daxx- γ hin, indem sie - vergleichbar mit Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 - Proteine der IAP-Familie binden und deren Funktion als Apoptoseinhibitoren neutralisieren (SALVESEN & DUCKETT, 2002). Für eine biologische Aktivität des IBM-Motivs sollte dieses allerdings N-terminal exponiert sein bzw. durch eine Prozessierung N-terminal frei gesetzt werden (VERHAGEN et al., 2000; WU et al., 2000; SUZUKI et al., 2001). Erste *in silico* Analysen der Primärsequenzen weisen aber weder auf die Existenz von Erkennungssequenzen bekannter zellulärer Proteasen noch auf eine Signalsequenz hin, dessen Abspaltung bzw. Prozessierung die N-terminale Freisetzung des IBM-Motivs in Daxx- β und Daxx- γ zur Folge hätte (vgl. Abb. 7.2; Anhang). Welche biologische Relevanz das IBM-Sequenzmotiv in Daxx- β und Daxx- γ besitzt, werden zukünftige Experimente daher zeigen müssen.

4.6 Funktionelle Charakterisierung von Daxx- β und Daxx- γ

Auf Molekülebene hat die veränderte Aminosäuresequenz in Daxx- β und Daxx- γ die Trunkierung bzw. Modifikation des regulatorischen C-Terminus von Daxx zur Konsequenz, der für die Interaktion mit einer Vielzahl an Proteinen verantwortlich ist (vgl. Abb. 4.1; vgl. Tab. 7.1, Anhang). Der Bereich von Aminosäure 625 bis 661 bzw. 740 ist bspw. essentiell für die Bindung an CD95, PML (hier 625-661) oder HSP27 (YANG et al., 1997; ISHOV et al., 1999; CHARETTE et al., 2000) und in den neuen Daxx-Spleißvarianten lediglich bis Aminosäure 647 (Daxx- γ) bzw. 653 (Daxx- β) erhalten. Für die Bindung an p53 sind C-terminal die Reste 667-740 verantwortlich (KIM et al., 2003), die in den Varianten vollständig deletiert sind, so dass Unterschiede zwischen Daxx- α und Daxx- β bzw. Daxx- γ bezüglich ihrer Fähigkeit mit den verschiedenen Proteinen zu interagieren zu postulieren sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dies zusammen mit den damit verbundenen funktionellen Konsequenzen insbesondere hinsichtlich der subzellulären Lokalisation der Daxx-Varianten und ihrer Beteiligung an der CD95-abhängigen Apoptose und der p53-abhängigen Transkription und –Apoptose analysiert.

4.6.1 Die subzelluläre Lokalisation von Daxx- β und Daxx- γ

Obwohl Daxx- α ursprünglich als Interaktionspartner des transmembranären Todesrezeptor CD95 identifiziert wurde, ist das Protein, wie das Vorkommen von zwei NLS Sequenzen vermuten lässt, vorwiegend im Kern lokalisiert (YANG et al., 1997; ISHOV et al., 1999; HOLLENBACH et al., 1999; PLUTA et al., 1998). Die beiden NLS befinden sich an Aminosäurepositionen 389-394 und 628-634 (KIRIAKIDOU et al., 1997) und sind somit in den Daxx-Spleißvarianten erhalten, was auf eine ebenfalls nukleäre Lokalisation von Daxx- β und Daxx- γ hindeutet. Das Ergebnis einer PSORT II-Analyse lieferte zudem mit 69,6% für alle drei Daxx-Isoformen eine identische Wahrscheinlichkeit im Zellkern vorzuliegen (vgl. Tab. 3.2.2). Die Überexpression der GFP-fusionierten Daxx-Varianten in HeLa-Zellen bestätigte diese Vorhersage. Hierbei waren sowohl GFP-Daxx- α , wie auch -Daxx- β und -Daxx- γ ausschließlich im Kern lokalisiert. Da nach Transfektion des korrespondierenden Leervektors ein transzelluläres Verteilungsmuster von GFP in der Zelle beobachtet wurde, kann ausgeschlossen werden, dass die GFP-Fusion für die nukleäre Lokalisation der einzelnen Daxx-Varianten verantwortlich war (vgl. Abb. 3.2.10). Abgesehen von der generell nukleären Lokalisation zeigten Daxx- β und Daxx- γ im Vergleich zu Daxx- α Unterschiede bezüglich der subnukleären Verteilung. Während Daxx- α vornehmlich in kleinen distinkten „Spots“ lokalisierte, akkumulierte Daxx- β und Daxx- γ überwiegend in großflächigen „Plaques“-ähnlichen Strukturen. Die Ausbildung kleiner distinkter „Spots“ war sowohl in Daxx- β - als auch in Daxx- γ -überexprimierender Zellen deutlich unterrepräsentiert (vgl. Abb. 3.2.10). Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nach Überexpression von GFP-Daxx- α und der immunzytochemischen Markierung des endogenen PML, konnten die Daxx- α -enthaltenen distinkten „Spots“ in der Mehrzahl als PML-oncogenic Domains (PODs) identifiziert werden, in denen Daxx- α (über die C-terminalen Aminosäuren 625-661) mit PML ko-lokalisiert (ISHOV et al., 1999; LI et al., 2000; ZHONG et al., 2000; vgl. Abb. 3.2.11). Im Gegensatz dazu konnten in den entsprechenden Analysen nach Überexpression von GFP-Daxx- β und GFP-Daxx- γ deutlich weniger „Spots“ identifiziert werden, in denen Daxx- β bzw. Daxx- γ mit PML ko-lokalisierte. Der überwiegende Anteil von Daxx- β und Daxx- γ lag hier in den „Plaques“-ähnlichen Strukturen vor (vgl.

Abb. 3.2.11 und Abb. 3.2.12). Die quantitative Auswertung zeigte, dass die Anzahl der PODs (per Def.: PML-enhaltene „Spots“; ISHOV et al., 1999) in den einzelnen Daxx- α -, Daxx- β - bzw. -Daxx- γ überexprimierenden Zellen dabei annähernd identisch war. Dies weist darauf hin, dass die POD-Bildung durch die Daxx-Varianten nicht beeinflusst wird (vgl. Abb. 3.2.12.A). Im Vergleich zu Daxx- α war der prozentuale Anteil an Ko-Lokalisationen zwischen Daxx- β und PML bzw. Daxx- γ und PML deutlich verringert (vgl. Abb. 3.2.12.B). Bezüglich der von Ishov et al. (1999) identifizierten PML-Interaktionsdomäne sind in Daxx- β 8 der 36 essentiellen Aminosäuren (22%) und in Daxx- γ 14 (38%) deletiert. Diese Trunkierung/Modifikation des C-Terminus scheint eine verringerte Bindungsaffinität für PML zur Folge zu haben, so dass Daxx- β und Daxx- γ im Vergleich mit Daxx- α zu einem geringeren Ausmaß von PML in die PODs rekrutiert werden. Wenngleich drastisch reduziert, so ist die Interaktion mit PML aber nicht vollständig unterbunden, wie auch mittels Ko-Immunpräzipitationsanalysen bestätigt werden konnte (vgl. Abb. 3.2.13).

Die großflächigeren „Plaques“, in denen Daxx- β und Daxx- γ überwiegend lokalisieren ähneln dem Verteilungsmuster, das Ishov et al. (1999) für Daxx- α in PML-defizienten Zellen beobachten konnten. In diesen Strukturen, die als Bereiche von Heterochromatin identifiziert wurden, akkumulierte Daxx- α alternativ in Abwesenheit von PML. Eine Re-Expression von PML hatte dementsprechend eine Re-Lokalisation von Daxx- α in die PODs zur Folge (ISHOV et al., 1999). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die duale subnukleäre Lokalisation von Daxx zudem Zellzyklus-abhängig ist, wobei es in der G1-Phase in den PODs akkumuliert, während der späten S-Phase am Heterochromatin assoziiert und anschließend in der G2-Phase zurück in die PODs rekrutiert wird (ISHOV et al., 2004). Dies erklärt, weshalb die „Plaques“-ähnlichen Strukturen zum Teil auch in Daxx- α -überexprimierenden Zellen zu finden waren (vgl. Abb. 3.2.11). Insgesamt deutet dies daraufhin, dass es sich bei den Daxx- β - und Daxx- γ -„Plaques“ ebenfalls um Bereiche von Heterochromatin handeln könnte, in denen die Spleißvarianten, infolge der reduzierten Bindungsaffinität gegenüber PML, häufiger lokalisieren als in den PODs. Zukünftig wäre es interessant zu analysieren, in wie weit eine Zellzyklus-abhängige Lokalisationsänderung auch für die Spleißvarianten vorliegt, oder ob der überwiegende Anteil von Daxx- β und Daxx- γ aufgrund der verminderten PML-Bindungsaffinität konstitutiv am Heterochromatin assoziiert bleibt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle drei Daxx-Isoformen nukleäre Proteine darstellen, die sich aber aufgrund der unterschiedlichen Bindungsaffinität zu PML hinsichtlich der subnukleären Lokalisation unterscheiden. Während Daxx- α durch die starke Interaktion mit PML vornehmlich in den PODs vorliegt, akkumulieren Daxx- β und Daxx- γ dagegen verstärkt in alternativen Strukturen, die Bereiche des Heterochromatins darstellen könnten.

4.6.2 Die Bedeutung der Daxx-Varianten für die CD95-abhängige Apoptose

Verschiedene Hinweise deuten darauf hin, dass Daxx als Verstärker der CD95-abhängigen Apoptose fungiert. So bindet Daxx nach Aktivierung von CD95 an die Todesdomäne des Rezeptors und fördert durch die Aktivierung von ASK1 die JNK-vermittelte Apoptose (YANG et al., 1997; CHANG et al., 1998). Andererseits scheint nukleäres Daxx die CD95-abhängige Apoptose JNK-unabhängig von den PODs aus zu verstärken, wobei keine direkte Interaktion zwischen Daxx und dem CD95-Rezeptor erfolgt (TORII et al., 1999). Da ebenfalls Beobachtungen gemacht wurden, die auf keine Apoptose-verstärkende Funktion von Daxx schließen lassen, wird die Rolle von Daxx als pro-apoptotischer

Faktor in der CD95-abhängigen Apoptose insgesamt kontrovers diskutiert (VILLUNGER et al., 2000; CHEN & CHEN; 2003). Konsistent bei allen Beobachtungen, die für eine Involvierung von Daxx sprechen, ist allerdings die Bedeutung des C-Terminus (Aminosäuren 625-740), über den Daxx mit der Todesdomäne von CD95 interagiert (YANG et al., 1997) und der die Apoptose-fördernde Wirkung von nukleärem Daxx vermittelt. So hatte die Deletion dieser Domäne die Unterdrückung des proapoptotischen Potentials von nukleärem Daxx zur Folge und war mit einer De-Lokalisation von Daxx aus den PODs verbunden (TORII et al., 1999). Die Tatsachen, dass die Daxx-Spleißvarianten eine trunkierte CD95-Interaktionsdomäne aufweisen (vgl. Abb. 4.1) und überwiegend außerhalb der PODs lokalisieren, lassen vermuten, dass sich Daxx- β und Daxx- γ bezüglich der Fähigkeit die CD95-Apoptose zu verstärken gegenüber Daxx- α unterscheiden könnten.

Der Einfluss der Daxx-Varianten auf die CD95-abhängige Apoptose in HEK293-Zellen

Um die Funktion der Daxx-Varianten in der CD95-Apoptose zu analysieren, wurden in HEK293-Zellen Ko-Expressionen der einzelnen HA-fusionierten Daxx-Varianten mit dem CD95-Rezeptor durchgeführt. Die Überexpression des CD95-Rezeptors führt dabei zur Akkumulation verschiedener Rezeptormoleküle, welches die Multimerisierung ihrer Todesdomänen, zur Folge hat und ebenfalls die Apoptosekaskade auslöst (BOLDIN et al., 1995a). Das Ausmaß der CD95-abhängigen Apoptose wurde hierbei mittels durchflußzytometrischer Detektion des Anteils an Annexin V/7-AAD-positiver Zellen bestimmt. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Yang et al. (1997) konnte durch die Ko-Expression von Daxx- α in HEK293-Zellen keine Verstärkung der CD95-abhängigen Apoptose festgestellt werden. Sowohl die Ko-Expression von CD95 und HA-Daxx- α als auch die Ko-Expression von CD95 mit dem korrespondierenden HA-Leervektor resultierten in einer durchschnittlichen Apoptosehäufigkeit von ca. 10%. Die Apoptosehäufigkeiten nach Ko-Expression von CD95 und HA-fusioniertem Daxx- β bzw. -Daxx- γ lagen ebenfalls bei ca. 10% (vgl. Abb. 3.2.16.C). Eine zusätzliche Stimulierung des jeweils überexprimierten CD95-Rezeptors mit der hohen Dosis von 2 μ g/ml des CD95-agonistischen Antikörpers CH11 hatte zwar in allen Transfektionsversuchen eine deutliche Erhöhung der durchschnittlichen Apoptosehäufigkeit zur Folge, allerdings zeigte auch hier im Vergleich zur Kontrolle weder die Überexpression von Daxx- α noch die der Spleißvarianten Daxx- β und Daxx- γ einen Effekt auf das Apoptoseausmaß, das in allen Experimenten bei ca. 45% lag. „Western Blot“-Analysen bestätigen zusätzlich den zugrunde liegenden Apoptoseprozeß, da nach allen Ko-Expressionen von CD95 mit den einzelnen Daxx-Varianten (sowie ASK1 zur Verstärkung des Apoptosestimulus) eine Spaltung des Caspase-Substrates PARP nachweisbar war (vgl. Abb. 3.2.17.A). Diese konnte nach alleiniger Überexpression von Daxx- α bzw. Daxx- β oder Daxx- γ nicht detektiert werden, was die Ergebnisse früherer Beobachtungen bestätigt, wonach Daxx- α *per se* nicht in der Lage ist, die Apoptose auszulösen (YANG et al., 1999; TORII et al., 1999). Wie die Daten zeigen, ist die Überexpression von Daxx- β bzw. Daxx- γ ebenfalls nicht ausreichend Apoptose auszulösen (vgl. Abb. 3.2.17.B). Die Tatsache, dass die Apoptosehäufigkeit durch zusätzliche Stimulierung des Rezeptors gesteigert werden konnte demonstriert, dass das Ausbleiben des Daxx- α -vermittelten Verstärkungseffektes nicht auf eine „Apoptose-Sättigung“ durch eine Limitierung von intrazellulären Komponenten der Signalkaskade zurückzuführen war. Da der Daxx vermittelte Anteil der CD95-Apoptose im Gegensatz zum FADD/Caspase-8-vermittelten zeitlich verzögert verläuft (CHARETTE et al., 2000; CHANG et al., 1999), wurde die Apoptosehäufigkeit auch zu späteren Zeitpunkten bestimmt.

Hierbei konnte allerdings ebenfalls keine Änderung des Apoptoseausmaßes durch die Daxx- α -, Daxx- β - bzw. Daxx- γ -Ko-Expression detektiert werden (Daten nicht gezeigt), so dass diese Ergebnisse insgesamt darauf hindeuten, dass weder Daxx- α noch Daxx- β und Daxx- γ an der CD95-abhängigen Apoptose in HEK293-Zellen beteiligt ist.

Die Auswirkungen der Daxx-Varianten auf die CD95-abhängige Apoptose im RCC

Um Zelltyp-spezifische Ursachen für das Ausbleiben einer Daxx-vermittelte Verstärkung der CD95-Apoptose auszuschließen, wurde der Einfluss der Daxx-Varianten-Überexpression auf die CD95-Apoptose ergänzend in den RCC-Zelllinien clearCa-2 und clearCa-6 untersucht. ClearCa-6 ist dadurch charakterisiert, dass sie sensitiv gegenüber der CD95-abhängigen Apoptose ist, während die Zelllinie clearCa-2 weitgehend resistent ist (GERHARZ et al., 1999). Die Fragestellung war, ob die Überexpression von Daxx- α zu einer weiteren Sensitivierung von clearCa-6 führt bzw. ausreichend ist, um clearCa-2 gegenüber der CD95-Apoptose zu sensitivieren und wie die Auswirkungen der Überexpression von Daxx- β und Daxx- γ auf die CD95-abhängige Apoptose ist. Mit Hilfe retroviraler Transduktion wurden hierfür zunächst stabile GFP-, GFP-Daxx- α -, GFP-Daxx- β - bzw. GFP-Daxx- γ -überexprimierende clearCa-2- und clearCa-6-Zelllinien hergestellt. „Western Blot“- und durchflußzytometrische Analysen der transduzierten Zelllinien bestätigten die Überexpression der entsprechenden Proteine und zeigten, dass die Zelllinien bis zu 95% transduziert waren (vgl. Abb. 3.2.19).

Vergleichbar zu den Ergebnissen, die mit den HEK293-Zellen erhalten wurden, vermittelte auch in der Zelllinie clearCa-6 weder die Überexpression von GFP-Daxx- α noch die der GFP-fusionierten Varianten Daxx- β und Daxx- γ einen CD95-Apoptose-verstärkenden Effekt. Nach CD95-Stimulation durch die Behandlung mit jeweils 500 ng/ml CH11 konnten zwischen der GFP-, der GFP-Daxx- α - und der GFP-Daxx- β - bzw. GFP-Daxx- γ -überexprimierenden Zelllinien im zeitlichen Verlauf über 6 Stunden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zelltodkinetik detektiert werden (vgl. Abb. 3.2.20.A+B). ClearCa-6-GFP, clearCa-6-GFP-Daxx- α , clearCa-6-GFP-Daxx- β und clearCa-6-GFP-Daxx- γ reagierten gleichermaßen sensitiv auf die Behandlung mit CH11 und zeigten nach 6-stündiger CH11-Inkubation jeweils eine Zellzahlreduktion auf ca. 30% (vgl. Abb. 3.2.20.A). „Western Blot“-Analysen demonstrieren, dass es sich bei dem Zelltod erwartungsgemäß um Apoptose handelte. In allen mit CH11 behandelten Zelllinien war nach 3 und 6 Stunden Inkubation eine Spaltung der Caspasen-8 und -9 zu verzeichnen, wobei das Ausmaß der Spaltung nach 6-stündiger Inkubation jeweils entsprechend höher war (vgl. Abb. 3.2.21). Die Tatsache, dass sich das Ausmaß der Caspase-Spaltung zwischen clearCa-6-GFP, clearCa-6-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ nicht unterschied, unterstützt die Ergebnisse aus der Analyse der Zelltodkinetik. Das sowohl Caspase-8 als auch Caspase-9 aktiviert wurde zeigt, dass während der Apoptose in allen vier Zelllinien sowohl der extrinsische als auch intrinsische, Mitochondrien-abhängige Signalweg beteiligt ist und lässt vermuten, dass die Signaltransduktion der Apoptose in allen Zelllinien insgesamt über die gleichen Faktoren verläuft.

Nach früheren Beobachtungen verstärkt Daxx die CD95-abhängige Apoptose überwiegend Caspase-8-unabhängig durch die Aktivierung des ASK1/JNK-Signalweges (YANG et al., 1997; CHARETTE et al., 2000). Es wurde daher untersucht, ob sich die Überexpression der Daxx-Varianten unter Caspase-8-Inhibition stärker bzw. differentiell auf die CD95-abhängige Apoptose auswirkt. Abgesehen von einer

gewissen Tendenz, wonach in der GFP-Daxx- α -überexprimierenden Zelllinie sowohl nach 2 als auch nach 6 Stunden Inkubation mit CH11 die geringste Überlebensrate zu verzeichnen war, konnten auch in Anwesenheit des Caspase-8-Inhibitors Z-IETD-Fmk keine signifikanten Unterschiede in der resultierenden Überlebendzellzahl zwischen den Zelllinien clearCa-6-GFP, clearCa-6-GFP-Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ detektiert werden (vgl. Abb. 3.2.20.C). Die Tatsache, dass die relative Lebendzellzahl nach 6-stündiger Behandlung lediglich auf einen durchschnittlichen Wert von ca. 80% gesunken ist verdeutlicht den Caspase-8-abhängigen Anteil der CD95-Apoptose. Nur 20% der CD95-abhängigen Apoptose verlaufen demnach über einen alternativen Weg. Da die Überexpression von GFP-Daxx- α bzw. GFP-Daxx- β und -Daxx- γ auch unter Caspase-8-Inhibition keine Verstärkung der CD95-Apoptose zur Folge hat, ist der Daxx-abhängige Signalweg hierfür wahrscheinlich nicht verantwortlich.

Um auszuschließen, dass die Behandlung mit 500 ng/ml CH11 einen „Sättigungsbereich“ der CD95-Apoptose darstellte, weshalb ein Daxx-vermittelter Verstärkungseffekt der Apoptose nicht nachweisbar war, wurden die Auswirkungen von verschiedenen, geringeren CH11-Konzentrationen auf die Lebendzellzahl von clearCa-6-GFP und clearCa-6-GFP-Daxx- α ermittelt. Allerdings konnten hierbei ebenfalls keine signifikanten Unterschiede detektiert werden, so dass eine „Apoptosesättigung“ als Ursache auszuschließen war (vgl. Abb. 3.2.23). Die Überexpression der GFP-fusionierten Daxx-Varianten hatte darüber hinaus keine Auswirkung auf die CD95-Resistenz von clearCa-2. Selbst die Behandlung mit 1 μ g/ml CH11 hatte lediglich eine 10%-ige Reduktion der Lebendzellzahl zur Folge, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen der GFP-, der GFP-Daxx- α -, GFP-Daxx- β und GFP-Daxx- γ -überexprimierenden Zelllinie zu verzeichnen waren (vgl. Abb. 3.2.24).

Die Tatsache, dass in allen stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien nach 6-stündiger CH11-Behandlung eine deutliche JNK-Aktivierung nachweisbar war zeigt, dass keine Beeinträchtigung der ASK1/JNK-Signaltransduktion für die Insuffizienz von Daxx, als Verstärker der CD95-Apoptose zu fungieren, verantwortlich war (vgl. Abb. 3.2.22). Diese Daten belegen somit insgesamt, dass Daxx- α und die Daxx-Varianten neben der Zelllinie HEK293 auch in den beiden RCC-Zelllinien clearCa-2 und clearCa-6 nicht in der CD95-abhängigen Apoptose involviert sind. In Übereinstimmung damit konnte durch Ko-Immupräzipitationsanalysen zudem keine Interaktion zwischen dem CD95-Rezeptor und Daxx- α nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.2.18). Dies steht im Widerspruch zu den Beobachtungen von Yang et al. (1997), Chang et al. (1999) bzw. Charette et al. (2000), wonach Daxx als Verstärker der CD95-Apoptose fungiert und direkt mit der Todesdomäne des Rezeptors interagiert. Da der Großteil dieser Untersuchungen ebenfalls anhand von HEK293-Zellen durchgeführt wurde, sind Zelltyp-spezifische Effekte als Ursachen für diese Diskrepanz unwahrscheinlich. Von Bedeutung ist aber, dass in vielen Überexpressions-Untersuchungen zur Funktion von Daxx nicht das humane *Daxx* sondern, das murine Homolog verwendet wurde, dessen Genprodukt lediglich eine 72%-ige Identität mit der Aminosäuresequenz des humanen Daxx aufweist (KIRIAKIDOU et al., 1997; YANG et al., 1997; PLUTA et al., 1998). Beispielsweise haben Yang et al. (1997) zwar eine Interaktion zwischen murinem Daxx und der Todesdomäne des CD95-Rezeptor gezeigt, eine direkte Bindung zwischen Vollängen CD95 und dem humanen Daxx konnte wie in der vorliegenden Arbeit aber auch von Torii et al. (1999) und Hollenbach et al. (1999) dagegen nicht nachgewiesen werden. Während Torii et al. (1999) abgesehen davon durchaus eine CD95-Apoptose-verstärkende Funktion von humanem Daxx beobachten konnten, war nach Hollenbach et al. (1999) keine Beteiligung von humanem Daxx hierbei nachweisbar. Auch für Lymphoidzellen konnte dies bestätigt werden, in denen Daxx weder eine

Aktivierung der JNK noch eine Verstärkung der CD95-abhängigen Apoptose vermittelte (VILLUNGER et al., 2000). Unabhängige Untersuchungen belegen zudem, dass eine siRNA-vermittelte Unterdrückung der endogenen Daxx-Expression mit einer Sensitivierung gegenüber der CD95- und Stress-induzierten Apoptose sowie mit einer Erhöhung des basalen Apoptoseausmaßes verbunden sein kann (CHEN & CHEN, 2003; MICHAELSON & LEDER, 2003). Dies spricht gegen eine pro-apoptotische Funktion von Daxx, was durch die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützt wird. Der Phänotyp der *Daxx*-„Knock out“-Maus weist ebenfalls auf eine anti-apoptotische Funktion von Daxx hin. Der Verlust des *Daxx*-Gens ist embryonal letal, charakterisiert durch „globale“ Apoptose im kompletten Embryo (MICHAELSON et al., 1999; ISHOV et al., 2004) und ist nicht, wie für den Verlust eines pro-apoptotischen Gens zu vermuten wäre, mit einer Hyperproliferationsstörung assoziiert, wie dies bspw. für *CD95*-, *FADD*- bzw. *Caspase-8*-defiziente Mäuse zu beobachten ist. (YEH et al., 1998; ZHANG et al., 1998; VARFOLOMEEV et al., 1998; ADACHI et al., 1995; ADACHI et al., 1996). Die genetische Deletion von *FADD* ist zwar auch embryonal letal, allerdings durch eine drastische Akkumulation von Erythrozyten und kardiologischen Defekten gekennzeichnet, was vermutlich auf eine verminderte Apoptosefrequenz zurückzuführen ist (YEH et al., 1998; ZHANG et al., 1998). *Caspase-8*- bzw. *FADD*-defiziente Zellen sind im Übrigen resistent gegenüber der CD95-abhängigen Apoptose, was ebenfalls für eine untergeordnete Rolle der Daxx-abhängigen CD95-Apoptose spricht (JUO et al., 1998; ZHANG et al., 1998). Ein Teil der widersprüchlichen Beobachtungen bezüglich der Funktion von Daxx als Verstärker der CD95-Apoptose zu fungieren lässt sich durch die Tatsache erklären, dass Daxx durch die Faktoren Flip_L und HSP27 inhibiert wird (KIM et al., 2003; CHARETTE et al., 2000). Zelltyp-abhängig variierende Expressionsniveaus dieser beiden Proteine könnten demnach für die Inhibition von Daxx in verschiedenen Zelltypen verantwortlich sein. „Western Blot“-Analysen der GFP- bzw. GFP-Daxx- α -überexprimierenden RCC-Zelllinien clearCa-2 und clearCa-6 zeigen bspw. eine deutliche Expression dieser Faktoren (vgl. Abb. 3.2.24.B). Inwieweit dies für den ausbleibenden Effekt der Daxx- α - bzw. Daxx- β - und Daxx- γ -Überexpression auf die CD95-Apoptose verantwortlich ist, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen, in denen äquivalente Experimente bspw. unter siRNA-vermittelter Suppression der HSP27- bzw. FLIP-Expression durchgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich die Diskrepanz der Daten aus der vorliegenden Arbeit mit früheren Beobachtungen, die auf eine CD95-Apoptose-verstärkende Funktion von Daxx hindeuten nicht zufriedenstellend klären. Festzustellen bleibt allerdings, dass in der Literatur ebenfalls stichhaltige Hinweise existieren, die gegen eine pro-apoptotischen Funktion von Daxx sprechen, was durch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse unterstützt wird.

4.6.3 Die Bedeutung der Daxx-Varianten für die p53-abhängige Transkription

Daxx ist auch ein Regulator der Transkription, indem es mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie bspw. ETS1, Smad4, diversen Faktoren der Pax-Familie sowie p53 interagiert und deren Aktivität moduliert (KIM et al., 2003; ZHAO et al., 2004; GOSTISSA et al., 2004; HOLLENBACH et al., 1999; EMELYANOV et al., 2002; LI et al., 2000; CHANG et al., 2005). Entsprechend seiner geringen Homologie zu dem transkriptionellen Ko-Repressor Sin3 aus *Saccharomyces cerevisiae* fungiert Daxx dabei primär als Repressor der Transkription (HOLLENBACH et al., 1999). Speziell die Interaktion mit und Regulation von p53 durch Daxx stellte einen weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit dar. P53 ist ein zentraler Faktor in der Zellzyklus- und Apoptoseregulation (VOGELSTEIN et al., 2000),

dessen transkriptionelle Aktivität unter anderem durch Daxx kontrolliert wird (KIM et al., 2003; GOSTISSA et al., 2004; ZHAO et al., 2004). So reprimiert Daxx selektiv die Transkription von p53-abhängigen Zielgenen, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, wie etwa p21 (GOSTISSA et al., 2004). Dies führt zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen der Expression pro-apoptotischer und Zellzyklus-assoziiierter p53-Zielgene, wodurch Daxx indirekt die p53-abhängige Apoptose fördert (GOSTISSA et al., 2004). Analog zur Interaktion von Daxx mit anderen Transkriptionsfaktoren wird das Repressionspotential von Daxx auf die p53-abhängige Transkription durch die Wechselwirkung mit PML inhibiert. PML bindet Daxx dabei kompetitiv mit p53 und rekrutiert Daxx vermutlich in die PODs, wie es bereits für die Inhibition der Daxx-vermittelten transkriptionellen Repression von Pax3 und des Glukokortikoidrezeptors beobachtet worden ist (KIM et al., 2003; LIN et al., 2003; LEHEMBRE et al., 2001). Die Bindung zwischen p53 und Daxx wird in erster Linie durch den C-Terminus von Daxx und der Oligomerisierungsdomäne von p53 vermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, wie sich der trunke bzw. modifizierte C-Terminus von Daxx- β und Daxx- γ auf die Interaktion zu p53 auswirkt und ob sich die Daxx-Spleißvarianten gegenüber Daxx- α hinsichtlich der Funktion die p53-abhängige Transkription zu reprimieren unterscheiden.

Die Daxx-Varianten unterscheiden sich in ihrer p53-Bindungsaffinität

Mittels Ko-Immunpräzipitationsanalysen von GFP-fusioniertem p53 und den DSRed2-fusionierten Daxx-Varianten konnte erwartungsgemäß eine Interaktion zwischen Daxx- α und p53 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.2.25). Daxx- β und Daxx- γ zeigten dagegen eine drastisch reduzierte Interaktion mit p53 und konnten im korrespondierendem „Western Blot“ bspw. erst nach 24-stündiger Exposition der entsprechenden Membran detektiert werden. Dies belegt, dass gemäß den Ergebnissen von Kim et al. (2003) und Gostissa et al. (2004) primär die C-terminalen Aminosäuren 667-740 von Daxx für die Interaktion mit p53 verantwortlich sind. Die Tatsache, dass die Trunkierung/Modifikation des C-Terminus von Daxx- β und Daxx- γ ab Aminosäure 653 bzw. 647 aber nicht ausreichend ist, um diese Wechselwirkung vollständig zu unterbinden, stimmt mit der Beobachtung überein, wonach auch N-terminale Bereiche von Daxx in die Interaktion mit p53 involviert sein können (ZHAO et al., 2004).

Fluoreszenzmikroskopische Analysen bestätigten die differentielle Interaktion der Daxx-Varianten mit p53. Nach Ko-Expression von GFP-Daxx- α und YFP-p53 war eine deutliche Ko-Lokalisation der beiden Proteine in den distinkten „Daxx- α -Spots“ erkennbar, die, wie unter 4.6.1 beschrieben, mehrheitlich als PODs identifiziert werden konnten. Im Gegensatz dazu war p53 nach Ko-Expression mit Daxx- β bzw. Daxx- γ diffus im kompletten Zellkern verteilt und eine Ko-Lokalisation in den „Plaques“-ähnlichen Daxx- β - bzw. Daxx- γ -Akkumulationen war deutlich unterrepräsentiert (vgl. Abb. 3.2.26). Die Tatsache, dass p53 mit Daxx- α in den PODs ko-lokalisiert, unterstützt frühere Beobachtungen von Guo et al. (2000), die zeigen konnten, dass p53 durch die Interaktion mit PML in die PODs rekrutiert wird. Ergänzend dazu deuten die vorliegenden Ergebnisse daraufhin, dass hierbei nicht PML sondern Daxx bzw. Daxx- α für die Rekrutierung von p53 in die PODs verantwortlich ist, da nach Ko-Expression mit Daxx- β bzw. Daxx- γ p53 nicht in den PODs lokalisiert war. Da die zelluläre Anzahl der PODs, wie unter 4.6.1 dargestellt, durch die Daxx-Varianten nicht beeinflusst wird, kann eine Reduktion der POD-Bildung als Ursache hierfür ausgeschlossen werden. Zusammenfassend weisen die Daten daher auf einen „Huckepack“-Mechanismus für die Rekrutierung von p53 in die PODs hin: Daxx- α bindet an PML und wird so in die PODs rekrutiert wobei p53 -

gebunden an Daxx- α - indirekt „mit-rekrutiert“ wird. Daxx- β und Daxx- γ zeigen dagegen aufgrund der C-terminalen Trunkierung/Modifikation im Vergleich zu Daxx- α eine erheblich reduzierte Interaktion mit p53 und sind aufgrund dessen, sowie als Folge der ebenfalls verringerten PML-Interaktion vermutlich nicht mehr in der Lage, p53 in die PODs zu „diregieren“.

Daxx- β und Daxx- γ wirken nicht als Repressor der p53-abhängigen Transkription

Mit Hilfe von „Luciferase-Reporter-Assays“ wurden in HeLa-Zellen die funktionellen Konsequenzen der differentiellen p53-Interaktion von Daxx- α , Daxx- β und Daxx- γ untersucht. Hierbei zeigte sich, dass im Vergleich zur alleinigen Expression von p53-GFP die Ko-Expression von HA-Daxx- α mit GFP-p53 erwartungsgemäß eine signifikante Reduktion der p53-abhängigen Transkription zur Folge hatte (vgl. Abb. 3.2.27.A). Dies bestätigt, dass die Bindung von Daxx- α an p53 mit einer Repression der p53-abhängigen Transkription assoziiert ist (KIM et al., 2003; GOSTISSA et al., 2004; ZHAO et al., 2004). Im Gegensatz dazu war die Ko-Expression der HA-fusionierten Varianten Daxx- β bzw. Daxx- γ mit p53-GFP nicht mit einer Reduktion der p53-abhängigen Transkription verbunden, wobei „Western Blot“-Analysen ein vergleichbares Expressionsniveau der entsprechenden Proteine demonstrierten (vgl. Abb. 3.2.27.B). Im Vergleich zur alleinigen Überexpression von GFP-p53 war hier jeweils eine nahezu identische transkriptionellen p53-Aktivität detektierbar. Konsequenterweise waren signifikante Unterschiede bezüglich der p53-abhängigen Transkription zwischen der HA-Daxx- α /p53-GFP-Überexpression und der HA-Daxx- β /p53-GFP- bzw. HA-Daxx- γ /p53-GFP-Überexpression zu verzeichnen. In den Kontrollexperimenten ohne p53-GFP-Überexpression konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden. Hier war die basale Luciferaseaktivität (transkriptionelle p53-Aktivität) nach Daxx- α -Überexpression deutlich geringer als nach Daxx- β - oder Daxx- γ -Überexpression, was vermutlich auf die differentielle Interaktion der Daxx-Varianten mit dem endogenen p53-Protein der HeLa-Zellen zurückzuführen war.

Diese Daten belegen, dass Daxx- β und Daxx- γ im Gegensatz zu Daxx- α keine Repression der p53-abhängigen Transkription vermitteln und das Spleißen von Daxx dadurch auch auf funktioneller Ebene eine Konsequenz besitzt. Neben Proteinen wie bspw. Bcl-X (AKGUL et al., 2004), Survivin (MAHOTKA et al., 1999), Smac/DIABLO (FU et al., 2003), TRAIL (KRIEG et al., 2003) oder Flip (GOLKS et al., 2005) stellt Daxx somit einen weiteren in der Apoptose involvierten Faktor dar, der auf der Ebene des alternativen Spleißens reguliert werden kann und dessen Spleißformen sich auch funktionell voneinander unterscheiden. Die Tatsache, dass hinsichtlich der regulatorischen Interaktion mit p53 kein signifikanter Unterschied zwischen Daxx- β und Daxx- γ vorliegt lässt vermuten, dass sich diese beiden Proteine möglicherweise in anderen Prozessen funktionell gegeneinander abgrenzen.

4.7 Das Spleißen von Daxx – ein Resistenzmechanismus des RCC gegenüber der p53-abhängigen Apoptose?

Die Tatsache, dass die Daxx-Spleißvarianten in humanen RCC-Zelllinien identifiziert wurden, lässt vermuten, dass das Spleißen von Daxx- β und Daxx- γ einen selektiven Vorteil für den Tumor darstellen könnte. Daxx- α bindet p53 und reprimiert spezifisch die Zellzyklus-relevanten p53-Zielgene, so dass eine Störung des Gleichgewichts zwischen der Expression pro-apoptotischer und Zellzyklus-assoziiertes p53-Zielgene die Folge ist, wodurch Daxx indirekt die p53-abhängige

Apoptose fördert (GOSTISSA et al., 2004). Tatsächlich bewirkt die Überexpression von Daxx- α eine Sensitivierung gegenüber der p53-abhängigen Apoptose und ist in der Osteosarkom-Zelllinie U2OS bspw. mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber der Cisplatin-vermittelten Apoptose verbunden (GOSTISSA et al., 2004). Auch in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7- bzw. der T-lymphoblastischen Zelllinie Jurkat führt die Überexpression zu einer Sensitivierung gegenüber der Behandlung mit den Topoisomerase-Inhibitoren Topotecan bzw. Doxorubicin (BOEHRER et al., 2005; MO et al., 2004). Da sowohl Daxx- α , als auch Daxx- β und Daxx- γ aus einem Daxx-prä-mRNA „Pool“ generiert werden, führt das alternative Spleißen zur Bildung von Daxx- β und Daxx- γ , unter der Voraussetzung einer konstanten Daxx-mRNA-Expression, zu einer relativen Verringerung des Daxx- α -Transkriptes. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, weisen Daxx- β und Daxx- γ im Vergleich zu Daxx- α eine drastisch reduzierte Affinität zu p53 auf und sind im Gegensatz zu Daxx- α nicht in der Lage, die p53-abhängige Transkription zu reprimieren. Das Spleißen zur Bildung von Daxx- β und Daxx- γ hat demnach effektiv eine Reduktion des Daxx-vermittelten p53-Repressionspotentials und damit verbunden eine Reduktion des pro-apoptotischen Potentials zur Folge. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Daxx- β und Daxx- γ deutlich schwächer mit PML interagieren als Daxx- α , so dass - unter der Annahme PML wäre bspw. limitierend in der Zelle - der inhibitorische Einfluss von PML auf das Repressionspotential von Daxx- α „stöchiometrisch verstärkt“ werden könnte. Da Daxx- α in der Lage ist über den N-Terminus Dimere auszubilden (TORII et al., 1999) wäre eine Homo/Heterodimerisierungs-bedingte Regulation der Daxx-Varianten ebenfalls vorstellbar. Funktionelle Unterschiede zwischen α/α -Homodimeren und α/β - bzw. α/γ -Heterodimeren könnten eine weitere Stufe der Daxx-Regulation darstellen, wie es bspw. auch wie es auch für die Spleißformen von Survivin beobachtet worden ist (CALDAS et al., 2005). Darüber hinaus ist auch eine dominant-negativ-Funktion von Daxx- β und Daxx- γ gegenüber Daxx- α denkbar, indem sie bspw. N-terminal-bindende Proteine wie MSP58, ATRX (LIN & SHIN, 2002; ISHOV et al., 2004; vgl. Tab. 7.1) oder bisher unbekannte akzessorische Proteine abfangen, die für eine Daxx- α -vermittelte Repression der p53-abhängigen Transkription notwendig sind. Das Spleißen von Daxx könnte somit einen Mechanismus zur Erhöhung der Apoptoseresistenz des Tumors gegenüber der Behandlung mit Chemotherapeutika darstellen, wie es bereits für andere durch Spleißen regulierte Faktoren beschrieben wurde (AKGUL et al., 2004; BRACCO & KEARSEY, 2003). Diese Hypothese wurde für das RCC anhand stabiler GFP-Daxx- α -, -Daxx- β - bzw. -Daxx- γ -überexprimierenden RCC-Zelllinien untersucht.

4.7.1 Die Auswirkung der Daxx-Varianten auf die p53-abhängige Transkription im RCC

Entscheidend für die Daxx- α -vermittelte Förderung der p53-induzierten Apoptose ist nach den Beobachtungen von Gostissa et al. (2004), dass selektiv die Transkription von p53-Zielgenen reprimiert wird, die wie bspw. *p21* an der Zellzyklusregulation beteiligt sind. Die Transkription Apoptose-relevanter Zielgene wie *Bax*, *Bim*, *PUMA*, *Apaf-1* oder *CD95* wird dagegen vermutlich nicht inhibiert, was zu einem gestörten Gleichgewicht zu Gunsten der pro-apoptotischen Faktoren führt (GOSTISSA et al., 2004). Dies wurde für das RCC exemplarisch anhand der Zelllinie clearCa-2 hinsichtlich der Expression der Zellzyklusregulatoren p21 und GADD45 sowie der Apoptose-relevanten p53-Zielgene *Bax* und *CD95* untersucht. Äquivalent dazu wurden die Auswirkungen von

Daxx- β und Daxx- γ analysiert, um zu untersuchen, ob diese entsprechend den Ergebnissen aus den „Luciferase-Reporter-Assays“ keinen Einfluss auf die Expression von *p21*, *Bax*, *CD95* und *GADD45* ausüben. Mittels RT-PCR wurde hierfür in den stabilen GFP-, GFP-Daxx- α -, GFP-Daxx- β - bzw. GFP-Daxx- γ -überexprimierenden clearCa-2-Zelllinien zunächst das basale Expressionsniveau dieser Gene analysiert. Lediglich für *CD95* konnte dabei ein differentielles Expressionsmuster nachgewiesen werden. ClearCa-2-GFP-Daxx- α zeigte hierbei im Vergleich zu clearCa-2-GFP-Daxx- β ein tendenziell verringertes bzw. im Vergleich zu clearCa-2-GFP-Daxx- γ ein signifikant verringertes *CD95*-Expressionsniveau. *Bax* aber auch *GADD45* sowie *p21* waren in den einzelnen Zelllinien dagegen vergleichbar exprimiert, was im Gegensatz zu den Beobachtungen von Gostissa et al. (2004) steht, wonach Daxx als Repressor der Transkription Zellzyklus-assoziierten p53-Zielgene fungiert (vgl. Abb. 3.2.28). Durch die Behandlung der Zelllinien mit dem Topoisomerase I-Inhibitor Topotecan wurde die Aktivierung von p53 induziert, um so den potentiell differentiellen Einfluss der Daxx-Varianten auf die Transkription dieser p53-Zielgene möglicherweise stärker hervorzuheben. Abgesehen von einer generellen Zunahme der einzelnen Expressionsniveaus, wie insbesondere dem von *GADD45*, konnte allerdings zwischen den verschiedenen Zelllinien auch nach Aktivierung von p53 keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression von *Bax*, *p21* bzw. *GADD45* detektiert werden. Auch eine differentielle *CD95*-Expression war hierbei nicht mehr erkennbar, was darauf hindeutet, dass die Unterschiede bezüglich der basalen *CD95*-Expression artifiziell waren und auf Selektionseffekten während der Herstellung der stabil-transduzierten Zelllinien beruhten.

Daxx- α vermittelt in clearCa-2 demnach keinen (selektiv) repressiven Effekt auf die Transkription der Zellzyklus-assoziierten p53-Zielgene *p21* und *GADD45*. Wie auch *Bax* und *CD95* sind *p21* und *GADD45* in der GFP- und der GFP-Daxx- α -überexprimierenden Zelllinie gleichartig exprimiert. Folglich wirkt sich auch das differentielle p53-Repressionspotential von Daxx- β und Daxx- γ hierbei nicht aus, so dass insgesamt in allen vier transduzierten Zelllinien vergleichbare Expressionsniveaus von *p21*, *CD95*, *Bax* und *GADD45* detektiert wurden. Unabhängig davon wird insbesondere am Beispiel der Topotecan-induzierten Expressionszunahme von *GADD45* deutlich, dass p53 in der Zelllinie clearCa-2 funktionell ist. Eine Beeinträchtigung der p53-Aktivität ist somit nicht für das Ausbleiben einer Daxx- α -vermittelten Repression der *p21*- und *GADD45*-Transkription verantwortlich.

4.7.2 Die Bedeutung der Daxx-Varianten für die p53-abhängige Apoptose im RCC

Um zu untersuchen, ob die Expression anderer p53-Zielgene als *p21*, *CD95*, *Bax* und *GADD45* durch die Daxx-Varianten differentiell reguliert wird, wurde der Einfluss der Daxx- α -, Daxx- β - bzw. Daxx- γ -Überexpression auf die p53-abhängige Apoptose analysiert. Die Annahme war, dass falls die Expression funktionell-relevanter p53-Zielgene durch die Daxx-Varianten differentiell reprimiert würden, sich dies in unterschiedlichen Sensitivitäten der entsprechenden Zelllinien gegenüber der p53-abhängigen Apoptose widerspiegeln sollte. Vor dem Hintergrund der oben aufgestellten Hypothese, wonach das Spleißen von Daxx einen selektiven Vorteil des Tumors implizieren könnte, wurde hierbei erwartet, dass die GFP-Daxx- α -Überexpression, entsprechend früheren Beobachtungen, eine Sensitivierung gegenüber der p53-abhängigen Apoptose zur Folge hat (BOEHRER et al., 2005; MO et al., 2004; GOSTISSA et al., 2004). Die Überexpression von GFP-Daxx- β bzw. GFP-Daxx- γ sollte sich

diesbezüglich dagegen nicht signifikant zur GFP-überexprimierenden Kontrollzelllinie unterscheiden. Zur Induktion der p53-abhängigen Apoptose wurden die stabil-transduzierten clearCa-2- und clearCa-6-Zelllinien mit jeweils 10 µg/ml Etoposid, 2 µg/ml Topotecan, 1 µg/ml Doxorubicin bzw. 1 µg/ml Taxol behandelt; Chemotherapeutika, die erwiesenermaßen die p53-abhängige Apoptose induzieren (BLAGOSKLONNY et al., 1995; YANG et al., 1996; CHRESTA et al., 1996; LIEM et al., 2003). Die jeweiligen Zytostatikakonzentrationen entsprachen denen, die zuvor im Rahmen von Dosiskinetiken anhand der stabil-transduzierten clearC-6-Zelllinien als diejenigen Konzentrationen ermittelt wurden, welche nach 24 h Inkubation eine jeweils ca. 50%-ige Letalität zu Folge hatten (vgl. Abb. 3.2.29). Mittels „MTT-Assay“ wurde der Einfluss der jeweils überexprimierten Daxx-Variante auf die Zytostatikasensitivität von clearCa-2- und clearCa-6-Zellen analysiert, wobei die resultierende Lebendzellzahl im zeitlichen Verlauf als Maß für die Sensitivität gewertet wurde. Entgegen den Erwartungen hatte die Überexpression von GFP-Daxx- α weder in clearCa-2 noch clearC-6 eine weitere Sensitivierung gegenüber der Etoposid-, Doxorubicin- bzw. Topotecan-induzierten Apoptose zur Folge (vgl. Abb. 3.2.30/31). Abgesehen von einigen vermutlich klonal-bedingten Schwankungen in den stabil-transduzierten clearCa-2-Zelllinien waren im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der resultierenden Lebendzellzahlen zwischen den jeweils GFP-, GFP-Daxx- α -, GFP-Daxx- β - und GFP-Daxx- γ -überexprimierenden Zelllinien zu verzeichnen. Dies entspricht den Ergebnissen aus der RT-PCR-Expressionsanalyse, wonach die Daxx-Varianten in clearCa-2 keinen wesentlichen Einfluß auf die p53-induzierte Transkription von p21, CD95, Bax und GADD45 zeigten. Anhand der im „Western Blot“ detektierten PARP-Spaltung konnte demonstriert werden, dass es sich bei dem Etoposid-, Doxorubicin- bzw. Topotecan-induzierten Zelltod erwartungsgemäß um Apoptose handelte (vgl. Abb. 3.2.32).

Während sich die stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien ebenfalls nicht signifikant hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber der Behandlung mit Taxol unterschieden, war in den korrespondierenden clearCa-2-Analysen interessanterweise eine erhöhte Resistenz der GFP-Daxx- α -überexprimierenden Zelllinie im Vergleich zur GFP-Kontrollzelllinie erkennbar (vgl. Abb. 3.2.30/31). Bereits nach 12 h Taxol-Behandlung zeichnete sich diesbezüglich eine Tendenz ab, die nach 24, 48 und 72 h Inkubation auch statistische Signifikanz erreichte (vgl. Abb. 3.2.33.A). Die Überexpression von Daxx- β bzw. Daxx- γ hatte ebenfalls eine Erhöhung der Taxol-Resistenz zur Folge, wobei sich das Daxx- β - bzw. Daxx- γ -vermittelte Resistenzniveau nicht signifikant von der Daxx- α -vermittelten Taxol-Resistenz unterschied (vgl. Abb. 3.2.33.B). Zusammenfassend zeigt dies, dass die Überexpression von Daxx- α entgegen den Erwartungen keine Sensitivierung gegenüber der Topotecan-, Doxorubicin- und Etoposid-induzierten p53-abhängigen Apoptose zur Folge hatte, sondern mit einer erhöhten Resistenz gegenüber der Behandlung mit Taxol verbunden war. Zusammen mit den Ergebnissen aus der RT-PCR-Analyse (vgl. 4.7.1) deutet dies darauf hin, dass Daxx- α und eine Daxx- α -vermittelte transkriptionelle Repression von p53-Zielgenen in diesen Zelllinien nicht an der p53-abhängigen Apoptose beteiligt ist. Das differentielle p53-Repressionspotential von Daxx- β und Daxx- γ kann sich dementsprechend nicht anti-apoptotisch auswirken, so dass die Überexpression von Daxx- β bzw. Daxx- γ ebenfalls keinen Einfluss auf die Sensitivität von clearCa-2 bzw. clearCa-6 gegenüber der p53-abhängigen Apoptose hat. Unter der Annahme endogenes Daxx- α wäre bereits „ausreichend“ vorhanden und eine Überexpression von GFP-Daxx- α hätte keinen zusätzlichen Effekt, würde dies bedeuten, dass die Daxx-Spleißvarianten im RCC diesbezüglich keine dominant-negativ-Formen zu Daxx- α darstellen würden. Allerdings zeigt das Ergebnis der Daxx-Varianten-vermittelten Taxol-

Resistenz in clearCa-2, dass eine Sättigung durch endogenes Daxx vermutlich nicht vorliegt. Es ist daher anzunehmen, dass sowohl Daxx- α , als auch Daxx- β und Daxx- γ in clearCa-2 und clearCa-6 nicht an der p53-abhängigen Apoptose beteiligt sind.

4.8 Die Funktion der Daxx-Varianten beim Taxol-induzierten Zelltod

Die Tatsache, dass der Daxx-Varianten-vermittelte zytoprotektive Effekt gegenüber dem Taxol-induzierten Zelltod nur in der Zelllinie clearCa-2, nicht aber der clearCa-6-Zelllinie aufgetreten ist, lässt vermuten, dass dem Zelltyp-spezifische Ursachen zugrunde liegen. Vor diesem Hintergrund ist die Beobachtung interessant, dass der Funktionsverlust von p53 mit einer Sensitivierung gegenüber der Behandlung mit Taxol verbunden sein kann (WAHL et al., 1996). Obwohl der p53-Mutationsstatus von clearCa-2 bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte, demonstrieren die Ergebnisse aus der *p21*-, *CD95*-, *Bax*- und *GADD45*-Expressionsanalyse, dass p53 in dieser Zelllinie funktionell und genetisch demnach putativ Wildtyp ist (vgl. 4.7.1). ClearCa-6 exprimiert dagegen eindeutig eine mutierte Form von p53 (Arg₂₉₀ → His₂₉₀; RAMP et al., 2001). Im Hinblick auf die funktionelle Verknüpfung zwischen Daxx und p53 wäre es denkbar, dass der unterschiedliche p53-Mutationsstatus für die differentielle Ausprägung der Daxx-vermittelten Taxol-Resistenz in clearCa-2 und clearCa-6 verantwortlich ist. RT-PCR-Analysen der Taxol-behandelten GFP- bzw. GFP-Daxx- α -überexprimierenden clearCa-2-Zelllinien zeigten allerdings, dass p53 in der Daxx-vermittelten Taxol-Resistenz vermutlich nicht involviert ist. So war bspw. das Expressionsniveau von p21, einem zentralen Faktor innerhalb des Taxol-induzierten Zelltodes (YU et al., 1998; LI et al., 2002), in der Taxol-behandelten clearCa-2-GFP- und clearCa-2-GFP-Daxx- α -Zelllinie nahezu identisch (vgl. Abb. 3.2.34). Die in diesem Zusammenhang zusätzlich analysierten p53-abhängigen Faktoren Bax, CD95 und GADD45 waren darüber hinaus ebenfalls gleichartig exprimiert und daher vermutlich auch nicht für den zytoprotektiven Effekt von Daxx verantwortlich. Es ist allerdings möglich, dass die Expression anderer p53-Zielgene während der Taxol-Behandlung durch Daxx reguliert wird. Anhand von humanen Fibroblasten konnte bspw. gezeigt werden, dass die einer Paclitaxel-Behandlung (Wirkstoff von Taxol) vorgeschaltete Inhibition von MDM2 eine Stabilisierung von p53 zur Folge hat und mit einem Zellzyklusarrest verbunden ist. Die Zellen erreichen daher nicht die Mitose, in der Paclitaxel wirken kann, so dass dies letztlich eine Resistenz gegenüber dem Paclitaxel-induzierten Zelltod vermittelt (CARVAJAL et al., 2005). Eine durch GFP-Daxx- α -reprimierte Expression des p53-Zielgens *MDM2* hätte in der Zelllinie clearCa-2-GFP-Daxx- α im Vergleich zu clearCa-2-GFP unter Umständen einen äquivalenten Effekt zur Folge, der aufgrund der p53-Mutation in den korrespondierenden clearCa-6-Zelllinien nicht zum Tragen käme. Dies könnte erklären, weshalb die Daxx-vermittelte Taxol-Resistenz ausschließlich in clearCa-2 zu beobachten war. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass die Überexpression der Daxx-Spleißvarianten Daxx- β und Daxx- γ einen zu Daxx- α -vergleichbaren zytoprotektiven Effekt vermittelte. Da Daxx- β und Daxx- γ aber kein p53-Repressionspotential besitzen (vgl. 4.6.3), deutet dies, wie auch die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse, auf einen p53-unabhängigen Mechanismus der Daxx-vermittelten Taxol-Resistenz hin. Zudem hat im Vergleich zu Topotecan die Behandlung mit Taxol eine deutlich geringere Expressionszunahme von bspw. GADD45 zur Folge, was darauf schließen lässt, dass die p53-Aktivierung beim Taxol-induzierten Zelltod von clearCa-2 von untergeordneter Bedeutung ist. Dies wird auch durch jüngste Beobachtungen bestätigt, wonach die

Taxol-Sensitivität des RCC im Gegensatz zu anderen Tumorarten nicht durch den p53-Mutationsstatus bestimmt wird (REINECKE et al., 2005). Taxol induziert im RCC vermutlich einen p53-unabhängigen Zelltod, wie es auch für die Mammarkarzinom-Zelllinie MCF-7 beschrieben wurde (BACUS et al., 2001).

Mittels „Western Blot“-Analysen wurde überprüft, ob die Daxx-vermittelte Taxol-Resistenz mit einer verzögerten Aktivierung von Caspasen verbunden ist. Das Ergebnis deutet allerdings darauf hin, dass der Taxol-induzierte Zelltod Caspase-unabhängig verläuft. Auch nach 72 h Inkubation mit Taxol konnte in der sensitiveren Zelllinie clearCa-2-GFP keine Spaltung der Initiator-Caspasen-8 und -9 sowie der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 detektiert werden (vgl. Abb. 3.2.35). Die Tatsache, dass im Vergleich zur Behandlung mit Topotecan, Doxorubicin oder Etoposid sowohl in den Taxol-behandelten clearCa-2- wie auch clearCa-6-Zelllinien ein deutlich schwächeres Ausmaß an PARP-Spaltung detektiert wurde, ist ebenfalls ein Hinweis auf einen Caspase-unabhängigen Prozeß (vgl. Abb. 3.2.32). Der Zelltod verläuft hierbei anstelle von Caspasen möglicherweise über Proteasen der Cathepsin-Familie, wie es auch für den Taxol-induzierten Zelltod in Zelllinien des Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinoms beobachtet worden ist (BROKER et al., 2004). Abschließende Analysen zeigen, dass womöglich eine Daxx-vermittelte JNK-Aktivierung an der zu beobachtenden Taxol-Resistenz beteiligt ist. So belegen *in vitro* „Kinase-Assays“ das in Taxol-behandelten clearCa-2-GFP-Daxx- α -Zellen bereits nach 12 h Inkubation eine deutliche JNK-Aktivierung vorliegt, während dies in der Kontrollzelllinie clearCa-2-GFP erst nach 24 h Stunden erfolgt (vgl. Abb. 3.2.36). Wie in der Zervixkarzinom-Zelllinie SiHa scheint eine Aktivierung der JNK auch in clearCa-2-Zellen einen zytoprotektiven Effekt gegenüber dem Paxlitaxel- bzw. Taxol-induzierten Zelltod zu vermitteln (LIU et al., 2001). Äquivalent zur Daxx-vermittelten JNK-Aktivierung nach CD95-Stimulation ist hier die Aktivierung der JNK durch Daxx via ASK1 denkbar (YANG et al., 1997; CHANG et al., 1998). Da sich Daxx- α , Daxx- β und Daxx- γ hinsichtlich der Bindung zu ASK1 sowie dem ASK-Aktivierungspotential im Gegensatz zu ihrem p53-Repressionspotential nicht signifikant voneinander unterscheiden (vgl. Abb. 3.2.14/15), könnte dies auch erklären, weshalb die Daxx-vermittelte Taxol-Resistenz in den Daxx- α -, Daxx- β - und Daxx- γ -überexprimierenden clearCa-2-Zelllinien vergleichbar ausgeprägt ist. Weitere Untersuchungen sind hierzu allerdings notwendig, um insbesondere zu klären, in wieweit diesbezüglich Unterschiede zwischen den Zelllinien clearCa-2 und clearCa-6 vorliegen.

4.9 Die Rolle der Daxx-Varianten im humanen RCC

Die Hypothese, wonach das alternative Spleißen von Daxx möglicherweise einen selektiven Vorteil für den Tumor darstellt, indem auf diese Weise das p53-Apoptose fördernde Potential von Daxx- α verringert wird, kann für das RCC aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht aufrechterhalten werden. Entgegen den Erwartungen ist Daxx- α in den beiden RCC-Zelllinien clearCa-2 und clearCa-6 offensichtlich nicht an der p53-abhängigen Apoptose beteiligt. Die Überexpression des Proteins führte zu keiner Sensitivierung gegenüber der Behandlung mit den Zytostatika Topotecan, Doxorubicin und Etoposid und hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression von p53-abhängigen Zielgenen, wie am Beispiel von *p21*, *CD95*, *Bax* und *GADD45* gezeigt werden konnte. Da Daxx- α im RCC demnach nicht als Repressor der p53-abhängigen Transkription fungiert, kann sich auch der Verlust des p53-Repressionspotentials von Daxx- β bzw. Daxx- γ nicht differentiell auswirken. Die Überexpression von Daxx- β wie auch Daxx- γ hatte demzufolge ebenfalls keinen Einfluss auf die p53-abhängige Apoptose.

Das Spleißen von Daxx hat diesbezüglich also keine Konsequenz, da bereits die Hauptform Daxx- α hierbei keine Funktion besitzt. Das Spleißen von Daxx stellt in diesem Zusammenhang daher vermutlich keinen Mechanismus zur Inaktivierung von Daxx dar. Darüber hinaus sind weder Daxx- α noch Daxx- β und Daxx- γ an der CD95-abhängigen Apoptose beteiligt sondern vermitteln im Gegenteil einen zytoprotektiven Effekt gegenüber dem Taxol-induzierten Zelltod. Für diesen Effekt sind vermutlich N-terminale Bereiche von Daxx verantwortlich, da die Daxx-vermittelte Taxol-Resistenz in Daxx- α -, Daxx- β - und Daxx- γ -überexprimierenden Zellen vergleichbar ist. Im Hinblick auf die kontrovers diskutierte Rolle von Daxx innerhalb der Apoptose sprechen die erhaltenen Ergebnisse daher gegen eine pro-apoptotische Funktion von Daxx im RCC (MICHAELSON, 2000). Ähnlich wie in hämatopoetischen Vorläuferzellen, wo die Überexpression von Daxx ebenfalls mit einem zytoprotektiven Effekt verbunden ist und die CD34-vermittelte Apoptose inhibiert (CERMAK et al., 2002), scheint Daxx auch im humanen RCC eine eher anti-apoptotische Rolle einzunehmen. Eine Inaktivierung von Daxx würde demzufolge vermutlich keinen selektiven Vorteil für den Tumor bedeuten. Da sich Daxx- α , Daxx- β und Daxx- γ hinsichtlich des Taxol-inhibierenden Potentials nicht voneinander unterscheiden und sich ihre differentielle Wechselwirkung mit p53 im RCC nicht funktionell äußert, kann zur funktionellen Konsequenz des Spleißens von Daxx für das RCC keine Aussagen getroffen werden. Weitere Untersuchungen sind daher notwendig um die jeweils spezifische Funktion der drei Daxx-Isoformen im RCC aufzuklären. Vor dem Hintergrund der differentiellen Interaktion bzw. Regulation zwischen p53 und den Daxx-Isoformen wäre es zukünftig interessant die Bedeutung von Daxx- β und Daxx- γ in Tumor- bzw. Zelltypen zu analysieren, in denen Daxx- α erwiesenmaßen einen Einfluss auf die p53-abhängige Apoptose ausübt.

4.10 Perspektiven

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Apoptose-Dysregulation im RCC nicht auf eine Inaktivierung der Apoptose-relevanten Faktoren DAP-Kinase und Daxx zurückzuführen ist und diese vermutlich nicht als „kritische“ Faktoren in der Tumorgenese des humanen RCC anzusehen sind. DAP-Kinase und Daxx stellen in diesem Tumor somit keine potentiellen „Ziele“ für zukünftige gentherapeutische Behandlungsstrategien dar. Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, um die molekularen Grundlagen der Apoptose-Dysregulation im humanen RCC besser verstehen zu können und auf dieser Basis neue Therapieansätze zu entwickeln.

Die Identifizierung der Daxx-Spleißvarianten Daxx- β und Daxx- γ stellt Daxx als weiteren Apoptose-relevanten Faktor heraus, der auf der Ebene des alternativen Spleißens reguliert werden kann. Da sich das differentielle p53-Repressionspotential der Daxx-Spleißvarianten im humanen RCC nicht auswirkt, müssen zukünftige Analysen aufzeigen, wie sich die Daxx-Isoformen in diesem Tumor funktionell voneinander abgrenzen.

5 Zusammenfassung

Apoptose ist ein elementarer Prozess in der Entwicklung und Differenzierung von mehrzelligen (tierischen) Organismen, durch den Zellen sterben, die ihre Funktion verloren haben oder eine potentielle Gefahr für den Gesamtorganismus darstellen. Eine Fehlregulation dieses Prozesses ist mit der Ausbildung von verschiedensten Erkrankungen assoziiert und eine der Hauptursachen für die Entstehung von Tumoren. Das physiologische Verhältnis zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren ist hierbei oftmals gestört, indem vermehrt Apoptose-inhibierende Faktoren gebildet werden oder pro-apoptotische Faktoren funktionell inaktiviert sind. Die „Death-associated Proteins“ Daxx und DAP-Kinase sind pro-apoptotische Faktoren und wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer potentiellen Beteiligung innerhalb der Apoptose-Dysregulation des humanen Nierenzellkarzinoms (RCC, renal cell carcinoma) untersucht. Die zentrale Fragestellung hierbei war, ob im RCC eine funktionelle Inaktivierung dieser Faktoren vorliegt, die möglicherweise zur Tumorgenese sowie der ausgeprägten Apoptose- und Therapieresistenz dieses Tumors beitragen könnte.

Im Hinblick auf den häufig zu verzeichnenden Expressionsverlust in anderen Tumorarten wurde der Expressionsstatus der DAP-Kinase im RCC anhand eines statistisch relevanten Kollektivs von Nierentumorpatienten untersucht. In 92% der analysierten Primärtumoren (unterschiedlicher histologischer Subtypen) konnte dabei eine DAP-Kinase-Expression festgestellt werden, lediglich 8% der Tumorproben zeigten keine Expression. Die histologisch klarzelligen und chromophilzelligen Subtypen des RCC wiesen dabei ein ähnliches DAP-Kinase-Expressionsniveau auf und im Verlauf der Tumorprogression konnten im Vergleich zwischen frühen und fortgeschrittenen Tumorstadien ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich der DAP-Kinase-Expression detektiert werden. Analysen zum Methylierungszustand des *DAP-Kinase*-Promotors deuten darauf hin, dass in den 8% der Tumore ohne nachweisbare DAP-Kinase-Expression keine Promotor-Hypermethylierung vorliegt und vermutlich alternative Mechanismen für die Abschaltung der *DAP-Kinase*-Genexpression verantwortlich sind. In weiterführenden Untersuchungen an verschiedenen RCC-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass DAP-Kinase zwar exprimiert wird, das Protein aber enzymatisch weitgehend inaktiv vorliegt, so dass die Daten insgesamt auf eine post-translationelle Inaktivierung der DAP-Kinase im RCC schließen lassen. Aufgrund der Tatsache, dass DAP-Kinase auch in nicht-neoplastischen Zellen exprimiert wird und dort ebenfalls inaktiv vorliegt, ist die Bedeutung dieser post-translationellen Inaktivierung des Proteins für die Tumorgenese des RCC allerdings fraglich. Alternative Ursachen, die im RCC eine Aufrechterhaltung der DAP-Kinase-Expression gewährleisten sind daher denkbar, wobei abschließende Untersuchungen in diesem Zusammenhang auf eine mögliche funktionelle Beteiligung des IAP-Proteins Survivin hinweisen.

Die Analyse der Daxx-Expression in verschiedenen Nierenkarzinom-Zelllinien lieferte ebenfalls keine Hinweise, die auf eine Inaktivierung von Daxx auf Ebene der Expression schließen lassen. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten zwei neue Spleißvarianten von Daxx identifiziert werden, so dass eine mögliche Inaktivierung des *Daxx*-Gens aufgrund des Mechanismus des alternativen Spleißens untersucht wurde. Die Charakterisierung der Spleißvarianten Daxx- β und Daxx- γ zeigte, dass sich diese in verschiedenen Aspekten von der Hauptform Daxx- α unterscheiden: Sowohl Daxx- β als auch Daxx- γ besitzen einen veränderten C-Terminus, was zu

einer Modifikation des Proteinbereichs führt, der für die Interaktion von Daxx mit verschiedenen Faktoren wie PML, CD95 und p53 verantwortlich ist. Wie gezeigt werden konnte besitzen Daxx- β und Daxx- γ eine deutlich geringere Affinität gegenüber PML, was sich auf ihre subzelluläre Lokalisation auswirkt. Während Daxx- α durch die Bindung an PML in die so genannten PODs rekrutiert wird, sind Daxx- β und Daxx- γ zwar ebenfalls im Kern lokalisiert, akkumulieren hier aber vorwiegend in alternativen Strukturen, die vermutlich Bereiche kondensierten Chromatins entsprechen. Darüber hinaus weisen Daxx- β und Daxx- γ im Vergleich zu Daxx- α eine stark reduzierte Affinität zu p53 auf, was dazu führt, dass sie im Gegensatz zu Daxx- α nicht in der Lage sind, die p53-abhängige Transkription zu reprimieren. Vor dem Hintergrund, dass Daxx- α über die transkriptionelle Repression von ausschließlich Zellzyklus-assoziierten p53-Zielgenen die p53-abhängige Apoptose indirekt fördert, wurde untersucht, ob das alternative Spleißen von Daxx zur Bildung von Daxx- β und Daxx- γ im humanen RCC einen Resistenz-Mechanismus gegenüber der p53-abhängigen Apoptose darstellen könnte. Überexpressions-Untersuchungen in verschiedenen RCC-Zelllinien zeigten jedoch, dass die p53-induzierte Transkription und -Apoptose im RCC unabhängig von Daxx verläuft. Weitere Untersuchungen lieferten ebenfalls keinen Hinweis auf eine Beteiligung von Daxx an der CD95-abhängigen Apoptose. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der Daxx-Varianten einen zytoprotektiven Effekt gegenüber der Behandlung mit dem Zytostatikum Taxol vermittelt, wobei die Resistenzniveaus nach Daxx- α -, Daxx- β - bzw. Daxx- γ -Überexpression vergleichbar waren.

Insgesamt sprechen die Daten der vorliegenden Arbeit gegen eine pro-apoptotische Funktion von Daxx im humanen Nierenzellkarzinom, so dass im Hinblick auf die zu untersuchende Fragestellung eine Inaktivierung dieses Faktors vermutlich nicht essentiell für die Tumorgenese des RCC zu sein scheint. Das alternative Spleißen von Daxx stellt demzufolge vermutlich keinen Inaktivierungsmechanismus dar, sondern dient womöglich der Feinregulation von Daxx im RCC.

Welche Relevanz die post-transkriptionelle Inaktivierung der DAP-Kinase im RCC besitzt wird durch zukünftige Analysen herauszufinden sein.

6 Literaturverzeichnis

- Adachi M., Suematsu S., Kondo T., Ogasawara J., Tanaka T., Yoshida N., & Nagata S. (1995) Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat.Genet.* **11**, 294-300.
- Adachi M., Suematsu S., Suda T., Watanabe D., Fukuyama H., Ogasawara J., Tanaka T., Yoshida N., & Nagata S. (1996) Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 2131-2136.
- Adida C., Recher C., Raffoux E., Daniel M.T., Taksin A.L., Rousselot P., Sigaux F., Degos L., Altieri D.C., & Dombret H. (2000) Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br.J.Haematol.* **111**, 196-203.
- Akgul C., Moulding D.A., & Edwards S.W. (2004) Alternative splicing of Bcl-2-related genes: functional consequences and potential therapeutic applications. *Cell Mol.Life Sci.* **61**, 2189-2199.
- Altieri D.C. (2003) Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* **22**, 8581-8589.
- Ambosini G., Adida C., & Altieri D.C. (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* **3**, 917-21.
- Amundson S.A., Myers T.G., & Fornace A.J., Jr. (1998) Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* **17**, 3287-3299.
- Anderson D.J. & Blobel G. (1993) Immunoprecipitation of proteins from cell-free translations. *Methods. Enzymol.* **96**, 111-20.
- Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., Montessuit S., Lewis S., Martinou I., Bernasconi L., Bernard A., Mermod J.J., Mazzei G., Maundrell K., Gambale F., Sadoul R., & Martinou J.C. (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* **277**, 370-372.
- Aravind L., Dixit V.M., & Koonin E.V. (1999) The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. *Trends Biochem.Sci.* **24**, 47-53.
- Arnt C.R., Chiorean M.V., Heldebrant M.P., Gores G.J., & Kaufmann S.H. (2002) Synthetic Smac/DIABLO peptides enhance the effects of chemotherapeutic agents by binding XIAP and cIAP1 in situ. *J.Biol.Chem.* **277**, 44236-44243.
- Attardi L.D., Lowe S.W., Brugarolas J., & Jacks T. (1996) Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *EMBO J.* **15**, 3693-3701.
- Bacus S.S., Gudkov A.V., Lowe M., Lyass L., Yung Y., Komarov A.P., Keyomarsi K., Yarden Y., & Seger R. (2001) Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene* **20**, 147-155.
- Baker S.J. & Reddy E.P. (1996) Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* **12**, 1-9.
- Banner D.W., D'Arcy A., Janes W., Gentz R., Schoenfeld H.J., Broger C., Loetscher H., & Lesslauer W. (1993) Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* **73**, 431-445.
- Barry M.A., Behnke C.A., & Eastman A. (1990) Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem.Pharmacol.* **40**, 2353-2362.
- Baylin S.B., Herman J.G., Graff J.R., Vertino P.M., & Issa J.P. (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv.Cancer Res* **72**, 141-196.
- Bergamaschi D., Samuels S., O'Neil N.J., Trigiant G., Crook T., Hsieh J.K., O'Connor D.J., Zhong S., Campargue I., Tomlinson M.L., Kuwabara P.E., & Lu X. (2003) iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat. Genet.* **33**, 162-7.
- Bialik S. & Kimchi A. (2004) DAP-kinase as a target for drug design in cancer and diseases associated with accelerated cell death. *Semin. Cancer. Biol.* **14**, 283-94.
- Bichler K.H. & Wechsel H.W. (1999) The problematic nature of metastasized renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* **19**, 1463-6.
- Bimbaum M.J., Clem R.J., & Miller L.K. (1994) An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J.Virol.* **68**, 2521-2528.
- Bimboim H.C. & Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Blagosklonny M.V., Schulte T., Nguyen P., Trepel J., & Neckers L.M. (1996) Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res* **56**, 1851-1854.
- Blagosklonny M.V., Schulte T.W., Nguyen P., Mimnaugh E.G., Trepel J., & Neckers L. (1995) Taxol induction of p21 WAF1 and p53 requires c-raf-1. *Cancer Res* **55**, 4623-4626.

- Boehrer S., Nowak D., Hochmuth S., Kim S.Z., Trepohl B., Afkir A., Hoelzer D., Mitrou P.S., Weidmann E., & Chow K.U. (2005) Daxx overexpression in T-lymphoblastic Jurkat cells enhances caspase-dependent death receptor- and drug-induced apoptosis in distinct ways. *Cell Signal.* **17**, 581-595.
- Boellmann F., Guettouche T., Guo Y., Fenna M., Mnayer L., & Voellmy R. (2004) DAXX interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 4100-4105.
- Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V., & Wallach D. (1996) Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**, 803-815.
- Boldin M.P., Mett I.L., Varfolomeev E.E., Chumakov I., Shemer-Avni Y., Camonis J.H., & Wallach D. (1995a) Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J.Biol.Chem.* **270**, 387-391.
- Boldin M.P., Varfolomeev E.E., Pancer Z., Mett I.L., Camonis J.H., & Wallach D. (1995b) A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J.Biol.Chem.* **270**, 7795-7798.
- Bracco L. & Kearsy J. (2003) The relevance of alternative RNA splicing to pharmacogenomics. *Trends Biotechnol.* **21**, 346-353.
- Brakebusch C., Nophar Y., Kemper O., Engelmann H., & Wallach D. (1992) Cytoplasmic truncation of the p55 tumour necrosis factor (TNF) receptor abolishes signalling, but not induced shedding of the receptor. *EMBO J.* **11**, 943-950.
- Brock M.V., Gou M., Akiyama Y., Muller A., Wu T.T., Montgomery E., Deasel M., Germonpre P., Rubinson L., Heitmiller R.F., Yang S.C., Forastiere A.A., Baylin S.B., & Herman J.G. (2003) Prognostic importance of promoter hypermethylation of multiple genes in esophageal adenocarcinoma. *Clin.Cancer Res* **9**, 2912-2919.
- Broker L.E., Kruyt F.A., & Giaccone G. (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin.Cancer Res.* **11**, 3155-3162.
- Brown T.A. (1991) Generation and identification of recombinant clones. In: *Essentiell Molecular Biology – A Practical Approach (Vol 1)*; edited by Brown T.A., Oxford University Press, Oxford-New York.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., & Short J.M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-378.
- Caelles C., Helmbert A., & Karin M. (1994) p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* **370**, 220-223.
- Caldas H., Jiang Y., Holloway M.P., Fangusaro J., Mahotka C., Conway E.M., & Altura R.A. (2005) Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene* **24**, 1994-2007.
- Cardone M.H., Salvesen G.S., Widmann C., Johnson G., & Frisch S.M. (1997) The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* **90**, 315-323.
- Carson D.A. & Ribeiro J.M. (1993) Apoptosis and disease. *Lancet* **341**, 1251-1254.
- Carvajal D., Tovar C., Yang H., Vu B.T., Heimbrook D.C., & Vassilev L.T. (2005) Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors. *Cancer Res* **65**, 1918-1924.
- Cascino I., Fiucci G., Papoff G., & Ruberti G. (1995) Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J. Immunol.* **154**, 2706-13.
- Cascino I., Papoff G., De Maria R., Testi R., & Ruberti G. (1996) Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* **156**, 13-7.
- Cavdar K.E., Ranasinghe A., Burkhardt W., Blackburn K., Koc H., Moseley A., & Spremulli L.L. (2001) A new face on apoptosis: death-associated protein 3 and PDCD9 are mitochondrial ribosomal proteins. *FEBS Lett.* **492**, 166-170.
- Cermak L., Simova S., Pintzas A., Horejsi V., & Andera L. (2002) Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-1 cells. Roles of transcription Daxx expression, and adhesion molecules. *J.Biol.Chem.* **277**, 7955-7961.
- Chakraborty M., Abrams S.I., Camphausen K., Liu K., Scott T., Coleman C.N., & Hodge J.W. (2003) Irradiation of tumor cells up-regulates Fas and enhances CTL lytic activity and CTL adoptive immunotherapy. *J.Immunol.* **170**, 6338-6347.
- Chan A.W., Chan M.W., Lee T.L., Ng E.K., Leung W.K., Lau J.Y., Tong J.H., Chan F.K., & To K.F. (2005) Promoter hypermethylation of Death-associated protein-kinase gene associated with advance stage gastric cancer. *Oncol.Rep.* **13**, 937-941.
- Chan M.W., Chan L.W., Tang N.L., Tong J.H., Lo K.W., Lee T.L., Cheung H.Y., Wong W.S., Chan P.S., Lai F.M., & To K.F. (2002) Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin.Cancer Res* **8**, 464-470.

- Chang C.C., Lin D.Y., Fang H.I., Chen R.H., & Shih H.M. (2005) Daxx mediates the small ubiquitin-like modifier-dependent transcriptional repression of Smad4. *J.Biol.Chem.* **280**, 10164-10173.
- Chang H.Y., Nishitoh H., Yang X., Ichijo H., & Baltimore D. (1998) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* **281**, 1860-1863.
- Chang H.Y., Yang X., & Baltimore D. (1999) Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun N-terminal kinase activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 1252-1256.
- Chao D.T. & Korsmeyer S.J. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu.Rev.Immunol.* **16**, 395-419.
- Charette S.J., Lavoie J.N., Lambert H., & Landry J. (2000) Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol.Cell Biol.* **20**, 7602-7612.
- Chen C.H., Wang W.J., Kuo J.C., Tsai H.C., Lin J.R., Chang Z.F., & Chen R.H. (2005) Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *EMBO J.* **24**, 294-304.
- Chen C.Y., Oliner J.D., Zhan Q., Fornace A.J., Jr., Vogelstein B., & Kastan M.B. (1994) Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 2684-2688.
- Chen L.Y. & Chen J.D. (2003) Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol.Cell Biol.* **23**, 7108-7121.
- Cheng J., Zhou T., Shapiro J.P., Brauer M.J., Kiefer M.C., Barr P.J., & Mountz J.D. (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. **263**, 1759-62.
- Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewari M., & Dixit V.M. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512.
- Chinnaiyan A.M., Tepper C.G., Seldin M.F., O'Rourke K., Kischkel F.C., Hellbardt S., Krammer P.H., Peter M.E., & Dixit V.M. (1996) FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* **271**, 4961-4965.
- Chipuk J.E., Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Droin N.M., Newmeyer D.D., Schuler M., & Green D.R. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010-1014.
- Chou P.Y. & Fasman G.D. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol.* **47**, 45-148.
- Chresta C.M., Masters J.R., & Hickman J.A. (1996) Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio. *Cancer Res* **56**, 1834-1841.
- Cohen O., Feinstein E., & Kimchi A. (1997) DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J.* **16**, 998-1008.
- Cohen O., Inbal B., Kissil J.L., Raveh T., Berissi H., Spivak-Kroizaman T., Feinstein E., & Kimchi A. (1999) DAP-kinase participates in TNF- α - and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain. *J.Cell Biol.* **146**, 141-148.
- Cote J., Dupuis S., Jiang Z., & Wu J.Y. (2001) Caspase-2 pre-mRNA alternative splicing: Identification of an intronic element containing a decoy 3' acceptor site. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 938-943.
- Crook N.E., Clem R.J., & Miller L.K. (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J.Virol.* **67**, 2168-2174.
- de Klein A., van Kessel A.G., Grosveld G., Bartram C.R., Hagemeyer A., Bootsma D., Spurr N.K., Heisterkamp N., Groffen J., & Stephenson J.R. (1982) A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **300**, 765-767.
- Debatin K.M., Goldmann C.K., Bamford R., Waldmann T.A., & Krammer P.H. (1990) Monoclonal-antibody-mediated apoptosis in adult T-cell leukaemia. *Lancet* **335**, 497-500.
- Decker H.J. & Storkel S. (1998) Molekulargenetische Diagnostik und Histopathologie epithelialer Nierentumore. *Der Onkologe* **4**, 214-220.
- Deiss L.P., Feinstein E., Berissi H., Cohen O., & Kimchi A. (1995) Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev.* **9**, 15-30.
- Deiss L.P. & Kimchi A. (1991) A genetic tool used to identify thioredoxin as a mediator of a growth inhibitory signal. *Science* **252**, 117-120.
- Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., & Reed J.C. (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-304.

- Dhein J., Walczak H., Baumler C., Debatin K.M., & Krammer P.H. (1995) Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/Fas/CD95. *Nature* **373**, 438-441.
- Dong S.M., Kim H.S., Rha S.H., & Sidransky D. (2001) Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin.Cancer Res* **7**, 1982-1986.
- Du C., Fang M., Li Y., Li L., & Wang X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.
- Duckett C.S., Nava V.E., Gedrich R.W., Clem R.J., Van Dongen J.L., Gilfillan M.C., Shiels H., Hardwick J.M., & Thompson C.B. (1996) A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* **15**, 2685-2694.
- Earnshaw W.C., Martins L.M., & Kaufmann S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.* **68**, 383-424.
- Ecsedy J.A., Michaelson J.S., & Leder P. (2003) Homeodomain-interacting protein kinase 1 modulates Daxx localization, phosphorylation, and transcriptional activity. *Mol.Cell Biol.* **23**, 950-960.
- Ekmekci C.G., Gutierrez M.I., Siraj A.K., Ozbek U., & Bhatia K. (2004) Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia. *Am.J.Hematol.* **77**, 233-240.
- Ellisen L.W., Bird J., West D.C., Soreng A.L., Reynolds T.C., Smith S.D., & Sklar J. (1991) TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* **66**, 649-661.
- Emelyanov A.V., Kovac C.R., Sepulveda M.A., & Birshtein B.K. (2002) The interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx can result in transcriptional activation in B cells. *J.Biol.Chem.* **277**, 11156-11164.
- Esteller M. (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**, 5427-5440.
- Faris M., Latinis K.M., Kempiak S.J., Koretzky G.A., & Nel A. (1998) Stress-induced Fas ligand expression in T cells is mediated through a MEK kinase 1-regulated response element in the Fas ligand promoter. *Mol.Cell Biol.* **18**, 5414-5424.
- Fojo A.T., Shen D.W., Mickley L.A., Pastan I., & Gottesman M.M. (1987) Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene. *J.Clin.Oncol.* **5**, 1922-1927.
- Friesen C., Fulda S., & Debatin K.M. (1997) Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. *Leukemia* **11**, 1833-1841.
- Frisch S.M. & Francis H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J.Cell Biol.* **124**, 619-626.
- Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Molloy P.L., & Paul C.L. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 1827-1831.
- Fu J., Jin Y., & Arend L.J. (2003) Smac3, a novel Smac/DIABLO splicing variant, attenuates the stability and apoptosis-inhibiting activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein. *J.Biol.Chem.* **278**, 52660-52672.
- Fukuda S., Foster R.G., Porter S.B., & Pelus L.M. (2002) The antiapoptosis protein survivin is associated with cell cycle entry of normal cord blood CD34(+) cells and modulates cell cycle and proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells. *Blood* **100**, 2463-2471.
- Gerharz C.D., Hildebrandt B., Moll R., Ramp U., Sarbia M., Storkel S., Koldovsky P., & Gabbert H.E. (1996) Chromophilic renal cell carcinoma: cytomorphological and cytogenetic characterisation of four permanent cell lines. *Br. J. Cancer.* **74**, 1605-14.
- Gerharz C.D., Moll R., Storkel S., Ramp U., Hildebrandt B., Molsberger G., Koldovsky P., & Gabbert H.E. (1995) Establishment and characterization of two divergent cell lines derived from a human chromophobe renal cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **146**, 953-62.
- Gerharz C.D., Moll R., Storkel S., Ramp U., Thoenes W., & Gabbert H.E. (1993) Ultrastructural appearance and cytoskeletal architecture of the clear, chromophilic, and chromophobe types of human renal cell carcinoma in vitro. *Am.J.Pathol.* **142**, 851-859.
- Gerharz C.D., Ramp U., Dejosez M., Mahotka C., Czarnotta B., Bretschneider U., Lorenz I., Müller M., Krammer P.H., & Gabbert H.E. (1999) Resistance to CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in human renal cell carcinomas: an important factor for evasion from negative growth control. *Lab Invest* **79**, 1521-1534.
- Gerharz C.D., Ramp U., Olert J., Moll R., Storkel S., Marx N., & Gabbert H.E. (1994) Cytomorphological, cytogenetic, and molecular biological characterization of four new human renal carcinoma cell lines of the clear cell type. *Virchows Arch.* **424**, 403-409.
- Ghosh A., Stewart D., & Matlashewski G. (2004) Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol.Cell Biol.* **24**, 7987-7997.
- Giannakakou P., Robey R., Fojo T., & Blagosklonny M.V. (2001) Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogene* **20**, 3806-3813.

- Goillot E., Ringeaud J., Ranger A., Tepper R.I., Davis R.J., Harlow E., & Sanchez I. (1997) Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 3302-3307.
- Golks A., Brenner D., Fritsch C., Krammer P.H., & Lavrik I.N. (2005) c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* **280**, 14507-14513.
- Gostissa M., Morelli M., Mantovani F., Guida E., Piazza S., Collavin L., Brancolini C., Schneider C., & Del Sal G. (2004) The transcriptional repressor hDaxx potentiates p53-dependent apoptosis. *J.Biol.Chem.* **279**, 48013-48023.
- Goyal L., McCall K., Agapite J., Hartwig E., & Steller H. (2000) Induction of apoptosis by Drosophila reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *EMBO J.* **19**, 589-597.
- Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., & Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* **36**, 59-74.
- Green D.R. & Ferguson T.A. (2001) The role of Fas ligand in immune privilege. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 917-924.
- Gross A., McDonnell J.M., & Korsmeyer S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 1899-1911.
- Gruss H.J. (1996) Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *Int.J.Clin.Lab.Res* **26**, 143-159.
- Guo A., Salomoni P., Luo J., Shi A., Zhong S., Gu W., & Pandolfi P.P. (2000) The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **2**, 730-6.
- Gurova K.V., Hill J.E., Razorenova O.V., Chumakov P.M., & Gudkov A.V. (2004) p53 pathway in renal cell carcinoma is repressed by a dominant mechanism. *Cancer Res* **64**, 1951-1958.
- Gutierrez M.I., Siraj A.K., Bhargava M., Ozbek U., Banavali S., Chaudhary M.A., El Solh H., & Bhatia K. (2003) Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia* **17**, 1845-1850.
- Halestrap A.P., McStay G.P., & Clarke S.J. (2002) The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* **84**, 153-166.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-80.
- Hanahan D. & Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Harada K., Toyooka S., Maitra A., Maruyama R., Toyooka K.O., Timmons C.F., Tomlinson G.E., Mastrangelo D., Hay R.J., Minna J.D., & Gazdar A.F. (2002) Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. *Oncogene* **21**, 4345-4349.
- Hartmann J.T. & Bokemeyer C. (1999) Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Anticancer Res* **19**, 1541-1543.
- Hasegawa M., Nelson H.H., Peters E., Ringstrom E., Posner M., & Kelsey K.T. (2002) Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* **21**, 4231-4236.
- Heath C.W., Jr., Lally C.A., Calle E.E., McLaughlin J.K., & Thun M.J. (1997) Hypertension, diuretics, and antihypertensive medications as possible risk factors for renal cell cancer. *Am.J.Epidemiol.* **145**, 607-613.
- Hengartner M.O. & Horvitz H.R. (1994) Programmed cell death in Caenorhabditis elegans. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **4**, 581-586.
- Henis-Korenblit S., Strumpf N.L., Goldstaub D., & Kimchi A. (2000) A novel form of DAP5 protein accumulates in apoptotic cells as a result of caspase cleavage and internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol.Cell Biol.* **20**, 496-506.
- Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S., Nelkin B.D., & Baylin S.B. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 9821-9826.
- Hickman J.A. (1992) Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.* **11**, 121-139.
- Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., & Pease L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Hofmann T.G., Moller A., Hehner S.P., Welsch D., Droge W., & Schmitz M.L. (2001) CD95-induced JNK activation signals are transmitted by the death-inducing signaling complex (DISC), but not by Daxx. *Int.J.Cancer* **93**, 185-191.
- Hofmann T.G., Stollberg N., Schmitz M.L., & Will H. (2003) HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Res* **63**, 8271-8277.
- Hogrefe H.H., Cline J., Lovejoy A.E., & Nielson K.B. (2001) DNA polymerases from hyperthermophiles. *Methods Enzymol.* **334**, 91-116.

- Hollenbach A.D., McPherson C.J., Mientjes E.J., Iyengar R., & Grosveld G. (2002) Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J.Cell Sci.* **115**, 3319-3330.
- Hollenbach A.D., Sublett J.E., McPherson C.J., & Grosveld G. (1999) The Pax3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx. *EMBO J.* **18**, 3702-3711.
- Hoon D.S., Spugnardi M., Kuo C., Huang S.K., Morton D.L., & Taback B. (2004) Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. *Oncogene* **23**, 4014-4022.
- Horton P. & Nakai K. (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc.Int.Conf.Intell.Syst.Mol.Biol.* **5**, 147-152.
- Huang Y., Rich R.L., Myszkowski D.G., & Wu H. (2003) Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac. *J.Biol.Chem.* **278**, 49517-49522.
- Hughes D.P. & Crispe I.N. (1995) A naturally occurring soluble isoform of murine Fas generated by alternative splicing. *J.Exp.Med.* **182**, 1395-1401.
- IARC p53 Database. www.IARC.fr/p53/index.html.
- Ichijo H. (1999) From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* **18**, 6087-6093.
- Ichijo H., Nishida E., Irie K., ten Dijke P., Saitoh M., Moriguchi T., Takagi M., Matsumoto K., Miyazono K., & Gotoh Y. (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **275**, 90-94.
- Igney F.H. & Krammer P.H. (2002) Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J.Leukoc.Biol.* **71**, 907-920.
- Inbal B., Bialik S., Sabanay I., Shani G., & Kimchi A. (2002) DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J.Cell Biol.* **157**, 455-468.
- Inbal B., Cohen O., Polak-Charcon S., Kopolovic J., Vadai E., Eisenbach L., & Kimchi A. (1997) DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* **390**, 180-184.
- Irwin M.S., & Kaelin W.G. (2001) p53 family update: p73 and p63 develop their own identities. *Cell Growth Differ.* **12**, 337-49.
- Ishov A.M., Sotnikov A.G., Negorev D., Vladimirova O.V., Neff N., Kamitani T., Yeh E.T., Strauss J.F., III, & Maul G.G. (1999) PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J.Cell Biol.* **147**, 221-234.
- Ishov A.M., Vladimirova O.V., & Maul G.G. (2004) Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX. *J.Cell Sci.* **117**, 3807-3820.
- Itoh N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S., Sameshima M., Hase A., Seto Y., & Nagata S. (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**, 233-243.
- Jacobson M.D., Weil M., & Raff M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354.
- Jang C.W., Chen C.H., Chen C.C., Chen J.Y., Su Y.H., & Chen R.H. (2002) TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat.Cell Biol.* **4**, 51-58.
- Jiang Z.H., Zhang W.J., Rao Y., & Wu J.Y. (1998) Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 9155-60.
- Jin Y. & Gallagher P.J. (2003) Antisense depletion of death-associated protein kinase promotes apoptosis. *J.Biol.Chem.* **278**, 51587-51593.
- Jones H.W., Jr., McKusick V.A., Harper P.S., & Wu K.D. (1971) George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet.Gynecol.* **38**, 945-949.
- Jonsson G., Paulie S., & Grandien A. (2003) High level of cFLIP correlates with resistance to death receptor-induced apoptosis in bladder carcinoma cells. *Anticancer Res* **23**, 1213-1218.
- Jordan M.A., Toso R.J., Thrower D., & Wilson L. (1993) Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 9552-9556.
- Jordan M.A., Wendell K., Gardiner S., Derry W.B., Copp H., & Wilson L. (1996) Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* **56**, 816-825.
- Junn E., Taniguchi H., Jeong B.S., Zhao X., Ichijo H., & Mouradian M.M. (2005) Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **102**, 9691-9696.

- Juo P., Kuo C.J., Yuan J., & Blenis J. (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr.Biol.* **8**, 1001-1008.
- Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., & Craig R.W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* **51**, 6304-6311.
- Katzenellenbogen R.A., Baylin S.B., & Herman J.G. (1999) Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood* **93**, 4347-4353.
- Kavanaugh M.P., Miller D.G., Zhang W., Law W., Kozak S.L., Kabat D., & Miller A.D. (1994) Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 7071-7075.
- Kawaguchi K., Oda Y., Saito T., Yamamoto H., Takahira T., Tamiya S., Iwamoto Y., & Tsuneyoshi M. (2004) Death-associated protein kinase (DAP kinase) alteration in soft tissue leiomyosarcoma: Promoter methylation or homozygous deletion is associated with a loss of DAP kinase expression. *Hum.Pathol.* **35**, 1266-1271.
- Kerr J.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.
- Kim D.H., Nelson H.H., Wiencke J.K., Christiani D.C., Wain J.C., Mark E.J., & Kelsey K.T. (2001) Promoter methylation of DAP-kinase: association with advanced stage in non-small cell lung cancer. *Oncogene* **20**, 1765-1770.
- Kim E.J., Park J.S., & Um S.J. (2003) Identification of Daxx interacting with p73, one of the p53 family, and its regulation of p53 activity by competitive interaction with PML. *Nucleic Acids Res* **31**, 5356-5367.
- Kim Y.Y., Park B.J., Seo G.J., Lim J.Y., Lee S.M., Kimm K.C., Park C., Kim J., & Park S.I. (2003) Long form of cellular FLICE-inhibitory protein interacts with Daxx and prevents Fas-induced JNK activation. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **312**, 426-433.
- Kimchi A. (1998) DAP genes: novel apoptotic genes isolated by a functional approach to gene cloning. *Biochim.Biophys.Acta* **1377**, F13-F33.
- Kiriakidou M., Driscoll D.A., Lopez-Guisa J.M., & Strauss J.F., III (1997) Cloning and expression of primate Daxx cDNAs and mapping of the human gene to chromosome 6p21.3 in the MHC region. *DNA Cell Biol.* **16**, 1289-1298.
- Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., & Peter M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **14**, 5579-5588.
- Kissil J.L., Cohen O., Raveh T., & Kimchi A. (1999) Structure-function analysis of an evolutionary conserved protein, DAP3, which mediates TNF-alpha- and Fas-induced cell death. *EMBO J.* **18**, 353-362.
- Kissil J.L., Deiss L.P., Bayewitch M., Raveh T., Khaspekov G., & Kimchi A. (1995) Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon-gamma-induced cell death. *J.Biol.Chem.* **270**, 27932-27936.
- Kissil J.L., Feinstein E., Cohen O., Jones P.A., Tsai Y.C., Knowles M.A., Eydmann M.E., & Kimchi A. (1997) DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* **15**, 403-407.
- Knowles B.B., Howe C.C., & Aden D.P. (1980) Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**, 497-499.
- Knowles M.A. & Currie G.A. (1993) Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet* **342**, 1184.
- Ko Y.G., Kang Y.S., Park H., Seol W., Kim J., Kim T., Park H.S., Choi E.J., & Kim S. (2001) Apoptosis signal-regulating kinase 1 controls the proapoptotic function of death-associated protein (Daxx) in the cytoplasm. *J.Biol.Chem.* **276**, 39103-39106.
- Kovacs G., Fuzesi L., Emanuel A., & Kung H.F. (1991) Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes Chromosomes.Cancer* **3**, 249-255.
- Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M.J., Fenton W., & Reed J.C. (1993) Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* **53**, 4701-4714.
- Krieg A., Krieg T., Wenzel M., Schmitt M., Ramp U., Fang B., Gabbert H.E., Gerharz C.D., & Mahotka C. (2003) TRAIL-beta and TRAIL-gamma: two novel splice variants of the human TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) without apoptotic potential. *Br. J. Cancer* **88**, 918-27.
- Kuerbitz S.J., Plunkett B.S., Walsh W.V., & Kastan M.B. (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 7491-7495.

- Kuo J.C., Lin J.R., Staddon J.M., Hosoya H., & Chen R.H. (2003) Uncoordinated regulation of stress fibers and focal adhesions by DAP kinase. *J. Cell Sci.* **116**, 4777-4790.
- Kyriakis J.M., Banerjee P., Nikolakaki E., Dai T., Rubie E.A., Ahmad M.F., Avruch J., & Woodgett J.R. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, 156-160.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lalioi V.S., Vergarajauregui S., Pulido D., & Sandoval I.V. (2002) The insulin-sensitive glucose transporter, GLUT4, interacts physically with Daxx. Two proteins with capacity to bind Ubc9 and conjugated to SUMO1. *J. Biol. Chem.* **277**, 19783-19791.
- Lane D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.
- Latinis K.M. & Koretzky G.A. (1996) Fas ligation induces apoptosis and Jun kinase activation independently of CD45 and Lck in human T cells. *Blood* **87**, 871-875.
- Lee L.F., Li G., Templeton D.J., & Ting J.P. (1998) Paclitaxel (Taxol)-induced gene expression and cell death are both mediated by the activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK). *J. Biol. Chem.* **273**, 28253-28260.
- Lee T.L., Leung W.K., Chan M.W., Ng E.K., Tong J.H., Lo K.W., Chung S.C., Sung J.J., & To K.F. (2002) Detection of gene promoter hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma. *Clin. Cancer Res* **8**, 1761-1766.
- Lehembre F., Muller S., Pandolfi P.P., & Dejean A. (2001) Regulation of Pax3 transcriptional activity by SUMO-1-modified PML. *Oncogene* **20**, 1-9.
- Lehmann U., Celikkaya G., Hasemeier B., Langer F., & Kreipe H. (2002) Promoter hypermethylation of the death-associated protein kinase gene in breast cancer is associated with the invasive lobular subtype. *Cancer Res* **62**, 6634-6638.
- Leithauser F., Dhein J., Mechtersheimer G., Koretz K., Bruderlein S., Henne C., Schmidt A., Debatin K.M., Krammer P.H., & Moller P. (1993) Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* **69**, 415-429.
- Leu J.I., Dumont P., Hafey M., Murphy M.E., & George D.L. (2004) Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mc11 complex. *Nat. Cell Biol.* **6**, 443-450.
- Levine A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-331.
- Levkau B., Garton K.J., Ferri N., Kloke K., Nofer J.R., Baba H.A., Raines E.W., & Breithardt G. (2001) xIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappaB : new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. *Circ. Res* **88**, 282-290.
- Levy D., Plu-Bureau, Decroix Y., Hugol D., Rostene W., Kimchi A., & Gompel A. (2004) Death-associated protein kinase loss of expression is a new marker for breast cancer prognosis. *Clin. Cancer Res* **10**, 3124-3130.
- Levy-Strumpf N., Deiss L.P., Berissi H., & Kimchi A. (1997) DAP-5, a novel homolog of eukaryotic translation initiation factor 4G isolated as a putative modulator of gamma interferon-induced programmed cell death. *Mol. Cell Biol.* **17**, 1615-1625.
- Li F., Ackermann E.J., Bennett C.F., Rothermel A.L., Plescia J., Tognin S., Villa A., Marchisio P.C., & Altieri D.C. (1999) Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat. Cell Biol.* **1**, 461-466.
- Li H., Leo C., Zhu J., Wu X., O'Neil J., Park E.J., & Chen J.D. (2000) Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1784-1796.
- Li H., Zhu H., Xu C.J., & Yuan J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., & Wang X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489.
- Li R., Pei H., Watson D.K., & Papas T.S. (2000) EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes. *Oncogene* **19**, 745-753.
- Li Y., Dowbenko D., & Lasky L.A. (2002) AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. *J. Biol. Chem.* **277**, 11352-11361.
- Liem A.A., Appleyard M.V., O'Neill M.A., Hupp T.R., Chamberlain M.P., & Thompson A.M. (2003) Doxorubicin and vinorelbine act independently via p53 expression and p38 activation respectively in breast cancer cell lines. *Br. J. Cancer* **88**, 1281-1284.
- Lin D.Y., Fang H.I., Ma A.H., Huang Y.S., Pu Y.S., Jenster G., Kung H.J., & Shih H.M. (2004) Negative modulation of androgen receptor transcriptional activity by Daxx. *Mol. Cell Biol.* **24**, 10529-10541.

- Lin D.Y., Lai M.Z., Ann D.K., & Shih H.M. (2003) Promyelocytic leukemia protein (PML) functions as a glucocorticoid receptor co-activator by sequestering Daxx to the PML oncogenic domains (PODs) to enhance its transactivation potential. *J.Biol.Chem.* **278**, 15958-15965.
- Lin D.Y. & Shih H.M. (2002) Essential role of the 58-kDa microspherule protein in the modulation of Daxx-dependent transcriptional repression as revealed by nucleolar sequestration. *J.Biol.Chem.* **277**, 25446-25456.
- Lin R.J., Egan D.A., & Evans R.M. (1999) Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. *Trends Genet.* **15**, 179-184.
- Liu B., Fang M., Lu Y., Lu Y., Mills G.B., & Fan Z. (2001) Involvement of JNK-mediated pathway in EGF-mediated protection against paclitaxel-induced apoptosis in SiHa human cervical cancer cells. *Br.J.Cancer* **85**, 303-311.
- 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.
- Liu Z., Sun C., Olejniczak E.T., Meadows R.P., Betz S.F., Oost T., Herrmann J., Wu J.C., & Fesik S.W. (2000) Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature* **408**, 1004-1008.
- Llambi F., Lourenco F.C., Gozuacik D., Guix C., Pays L., Del Rio G., Kimchi A., & Mehlen P. (2005) The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *EMBO J.* **24**, 1192-1201.
- Lotem J. & Sachs L. (1993) Regulation by bcl-2, c-myc, and p53 of susceptibility to induction of apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation-competent and -defective myeloid leukemic cells. *Cell Growth Differ.* **4**, 41-47.
- Lottspeich F. & Zorbas H. (1998) Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin.
- Lowe S.W., Ruley H.E., Jacks T., & Housman D.E. (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* **74**, 957-967.
- Lundberg K.S., Shoemaker D.D., Adams M.W., Short J.M., Sorge J.A., & Mathur E.J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**, 1-6.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., & 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.
- Ly J.D., Grubb D.R., & Lawen A. (2003) The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis.* **8**, 115-128.
- Mahotka C., Krieg T., Krieg A., Wenzel M., Suschek C.V., Heydthausen M., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. (2002) Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int.J.Cancer* **100**, 30-36.
- Mahotka C., Wenzel M., Springer E., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. (1999) Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* **59**, 6097-6102.
- Martoriati A., Doumont G., Alcalay M., Bellefroid E., Pelicci P.G., & Marine J.C. (2005) *dapk1*, encoding an activator of a p19ARF-p53-mediated apoptotic checkpoint, is a transcription target of p53. *Oncogene* **24**, 1461-1466.
- Matsumoto H., Nagao M., Ogawa S., Kanehiro H., Hisanaga M., Ko S., Ikeda N., Fujii H., Koyama F., Mukogawa T., & Nakajima Y. (2003) Prognostic significance of death-associated protein-kinase expression in hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* **23**, 1333-1341.
- Maudrell K., Antonsson B., Magnenat E., Camps M., Muda M., Chabert C., Gillieron C., Boschert U., Vial-Knecht E., Martinou J.C., & Arkinstall S. (1997) Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTP-binding protein Rac1. *J.Biol.Chem.* **272**, 25238-25242.
- Meyer A.J., Hernandez A., Florl A.R., Enczmann J., Gerharz C.D., Schulz W.A., Wernet P., & Ackermann R. (2000) Novel mutations of the von hippel-lindau tumor-suppressor gene and rare DNA hypermethylation in renal-cell carcinoma cell lines of the clear-cell type. *Int.J.Cancer* **87**, 650-653.
- Michaelson J.S. (2000) The Daxx enigma. *Apoptosis.* **5**, 217-220.
- Michaelson J.S., Bader D., Kuo F., Kozak C., & Leder P. (1999) Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev.* **13**, 1918-1923.
- Michaelson J.S. & Leder P. (2003) RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *J.Cell Sci.* **116**, 345-352.
- Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P., & Moll U.M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol.Cell* **11**, 577-590.
- Miller L.K. (1999) An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol.* **9**, 323-328.

- Minn A.J., Velez P., Schendel S.L., Liang H., Muchmore S.W., Fesik S.W., Fill M., & Thompson C.B. (1997) Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* **385**, 353-357.
- Miyazaki T., Shen M., Fujikura D., Tosa N., Kim H.R., Kon S., Uede T., & Reed J.C. (2004) Functional role of death-associated protein 3 (DAP3) in anoikis. *J.Biol.Chem.* **279**, 44667-44672.
- Mo Y.Y., Yu Y., Ee P.L., & Beck W.T. (2004) Overexpression of a dominant-negative mutant Ubc9 is associated with increased sensitivity to anticancer drugs. *Cancer Res* **64**, 2793-2798.
- Monzo M., Rosell R., Felip E., Astudillo J., Sanchez J.J., Maestre J., Martin C., Font A., Barnadas A., & Abad A. (1999) A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J.Clin.Oncol.* **17**, 2100-2104.
- Morris M.R., Hesson L.B., Wagner K.J., Morgan N.V., Astuti D., Lees R.D., Cooper W.N., Lee J., Gentle D., Macdonald F., Kishida T., Grundy R., Yao M., Latif F., & Maher E.R. (2003) Multigene methylation analysis of Wilms' tumour and adult renal cell carcinoma. *Oncogene* **22**, 6794-6801.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Mostofi, F. K. & Davis, C. J. (1998) Histological typing of kidney tumors. WHO international classification of tumors, 2nd ed. New York: Springer-Verlag.
- Motzer R.J., Russo P., Nanus D.M., & Berg W.J. (1997) Renal cell carcinoma. *Curr.Probl.Cancer* **21**, 185-232.
- Mount S.M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* **10**, 459-472.
- Muchmore S.W., Sattler M., Liang H., Meadows R.P., Harlan J.E., Yoon H.S., Nettesheim D., Chang B.S., Thompson C.B., Wong S.L., Ng S.L., & Fesik S.W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**, 335-341.
- Mukamel Z. & Kimchi A. (2004) Death-associated protein 3 localizes to the mitochondria and is involved in the process of mitochondrial fragmentation during cell death. *J.Biol.Chem.* **279**, 36732-36738.
- Muller M., Strand S., Hug H., Heinemann E.M., Walczak H., Hofmann W.J., Stremmel W., Krammer P.H., & Galle P.R. (1997) Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J.Clin.Invest* **99**, 403-413.
- Muromoto R., Sugiyama K., Takachi A., Imoto S., Sato N., Yamamoto T., Oritani K., Shimoda K., & Matsuda T. (2004) Physical and functional interactions between Daxx and DNA methyltransferase 1-associated protein, DMAP1. *J.Immunol.* **172**, 2985-2993.
- Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J.D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E., & Dixit V.M. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-827.
- Nakatsuka S., Takakuwa T., Tomita Y., Hoshida Y., Nishiu M., Yamaguchi M., Nishii K., Yang W.I., & Aozasa K. (2003) Hypermethylation of death-associated protein (DAP) kinase CpG island is frequent not only in B-cell but also in T- and natural killer (NK)/T-cell malignancies. *Cancer Sci.* **94**, 87-91.
- Nakatsuka S., Takakuwa T., Tomita Y., Miwa H., Matsuzuka F., & Aozasa K. (2000) Role of hypermethylation of DAP-kinase CpG island in the development of thyroid lymphoma. *Lab Invest* **80**, 1651-1655.
- Narayan G., Arias-Pulido H., Koul S., Vargas H., Zhang F.F., Vilella J., Schneider A., Terry M.B., Mansukhani M., & Murty V.V. (2003) Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. *Mol.Cancer* **2**, 24.
- Negorev D. & Maul G.G. (2001) Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* **20**, 7234-7242.
- Neumann H.P., Bender B.U., Berger D.P., Laubenberger J., Schultze-Seemann W., Wetterauer U., Ferstl F.J., Herbst E.W., Schwarzkopf G., Hes F.J., Lips C.J., Lamiell J.M., Masek O., Riegler P., Mueller B., Glavac D., & Brauch H. (1998) Prevalence, morphology and biology of renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau disease compared to sporadic renal cell carcinoma. *J.Urol.* **160**, 1248-1254.
- Nevins T.A., Harder Z.M., Korneluk R.G., & Holcik M. (2003) Distinct regulation of internal ribosome entry site-mediated translation following cellular stress is mediated by apoptotic fragments of eIF4G translation initiation factor family members eIF4GI and p97/DAP5/NAT1. *J.Biol.Chem.* **278**, 3572-3579.
- Newton C.R. & Graham, A. (1994) PCR. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin.
- Ng M.H. (2002) Death associated protein kinase: from regulation of apoptosis to tumor suppressive functions and B cell malignancies. *Apoptosis.* **7**, 261-270.

- Ng M.H., Chung Y.F., Lo K.W., Wickham N.W., Lee J.C., & Huang D.P. (1997) Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma. *Blood* **89**, 2500-2506.
- Ng M.H., To K.W., Lo K.W., Chan S., Tsang K.S., Cheng S.H., & Ng H.K. (2001) Frequent death-associated protein kinase promoter hypermethylation in multiple myeloma. *Clin.Cancer Res* **7**, 1724-1729.
- Ng P.W., Porter A.G., & Janicke R.U. (1999) Molecular cloning and characterization of two novel pro-apoptotic isoforms of caspase-10. *J.Biol.Chem.* **274**, 10301-10308.
- Nicholson D.W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death.Differ.* **6**, 1028-1042.
- Norbury C.J. & Zhivotovsky B. (2004) DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* **23**, 2797-2808.
- Obradovic D., Tirard M., Nemethy Z., Hirsch O., Gronemeyer H., & Almeida O.F. (2004) DAXX, FLASH, and FAF-1 modulate mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated transcription in hippocampal cells--toward a basis for the opposite actions elicited by two nuclear receptors? *Mol.Pharmacol.* **65**, 761-769.
- Orlinick J.R., Vaishnav A., Elkon K.B., & Chao M.V. (1997) Requirement of cysteine-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand. *J.Biol.Chem.* **272**, 28889-28894.
- Owen-Schaub L.B., Yonehara S., Crump W.L., III, & Grimm E.A. (1992) DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. *Cell Immunol.* **140**, 197-205.
- Palacios R. (1982) Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation. *J.Immunol.* **128**, 337-342.
- Pelled D., Raveh T., Riebeling C., Fridkin M., Berissi H., Futerman A.H., & Kimchi A. (2002) Death-associated protein (DAP) kinase plays a central role in ceramide-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons. *J.Biol.Chem.* **277**, 1957-1961.
- Perlman R., Schiemann W.P., Brooks M.W., Lodish H.F., & Weinberg R.A. (2001) TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat.Cell Biol.* **3**, 708-714.
- Peter M.E., Kischkel F.C., Scheuerpflug C.G., Medema J.P., Debatin K.M., & Krammer P.H. (1997) Resistance of cultured peripheral T cells towards activation-induced cell death involves a lack of recruitment of FLICE (MACH/caspase 8) to the CD95 death-inducing signaling complex. *Eur.J.Immunol.* **27**, 1207-1212.
- Petit P.X., Lecoer H., Zorn E., Dauguet C., Mignotte B., & Gougeon M.L. (1995) Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J.Cell Biol.* **130**, 157-167.
- Pluta A.F., Earnshaw W.C., & Goldberg I.G. (1998) Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with HDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death. *J.Cell Sci.* **111 (Pt 14)**, 2029-2041.
- Pulvertaft J.V. (1964) Cytology of Burkitt's tumour (african lymphoma). *Lancet* **39**, 238-240.
- Ramp U., Caliskan E., Mahotka C., Krieg A., Heikaus S., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. (2003) Apoptosis induction in renal cell carcinoma by TRAIL and gamma-radiation is impaired by deficient caspase-9 cleavage. *Br.J.Cancer* **88**, 1800-1807.
- Ramp U., Dejosez M., Mahotka C., Czarnotta B., Kalinski T., Wenzel M., Lorenz I., Muller M., Krammer P., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. (2000) Deficient activation of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: a potential factor of multidrug resistance in human renal cell carcinoma. *Br.J.Cancer* **82**, 1851-1859.
- Ramp U., Mahotka C., Kalinski T., Ebel E., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. (2001) Topotecan (Hycamtin) responsiveness in human renal carcinoma cell lines of the clear cell and papillary types. *Anticancer Res* **21**, 3509-3517.
- Raveh T., Droguett G., Horwitz M.S., DePinho R.A., & Kimchi A. (2001) DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat.Cell Biol.* **3**, 1-7.
- Raveh T. & Kimchi A. (2001) DAP kinase-a proapoptotic gene that functions as a tumor suppressor. *Exp.Cell Res* **264**, 185-192.
- Raynal P. & Pollard H.B. (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1197**, 63-93.
- Reed J.C. (1999) Dysregulation of apoptosis in cancer. *J.Clin.Oncol.* **17**, 2941-2953.
- Reinecke P., Kalinski T., Mahotka C., Schmitz M., Dejosez M., Gabbert H.E., & Gerharz C.D. (2005) Paclitaxel/Taxol sensitivity in human renal cell carcinoma is not determined by the p53 status. *Cancer Lett.* **222**, 165-171.
- Riedl S.J., Fuentes-Prior P., Ratus M., Kairies N., Krapp S., Huber R., Salvesen G.S., & Bode W. (2001) Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 14790-14795.

- Riedl S.J. & Shi Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **5**, 897-907.
- Roche Applied Science (2001) LightCycler – Relative Quantification. Technical Note No. LC13/2001.
- Rocheat-Steiner V., Becker K., Micheau O., Schneider P., Burns K., & Tschopp J. (2000) FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J.Exp.Med.* **192**, 1165-1174.
- Rotonda J., Nicholson D.W., Fazil K.M., Gallant M., Gareau Y., Labelle M., Peterson E.P., Rasper D.M., Ruel R., Vaillancourt J.P., Thornberry N.A., & Becker J.W. (1996) The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat.Struct.Biol.* **3**, 619-625.
- Rouvier E., Luciani M.F., & Golstein P. (1993) Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J.Exp.Med.* **177**, 195-200.
- Roy R., Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., & Reed J.C. (1997) The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* **16**, 6914-25.
- Ryu S.W., Chae S.K., & Kim E. (2000) Interaction of Daxx, a Fas binding protein, with sentrin and Ubc9. *Biochem.Biophys.Res Commun.* **279**, 6-10.
- Sakagami H. & Kondo H. (1997) Molecular cloning and developmental expression of a rat homologue of death-associated protein kinase in the nervous system. *Brain Res Mol.Brain Res* **52**, 249-256.
- Salvesen G.S. & Duckett C.S. (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**, 401-410.
- Sambrook J., Fritsch E.F., & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York.
- Samuels-Lev Y., Connor D.O., Bergamaschi D., Trigiant G., Hsieh J., Zhong S., Campargue I., Naumovski L., Crook T., & Lu X. (2001) ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol. Cell.* **8**, 781-94.
- Sanchez-Cespedes M., Esteller M., Wu L., Nawroz-Danish H., Yoo G.H., Koch W.M., Jen J., Herman J.G., & Sidransky D. (2000) Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* **60**, 892-895.
- Sandler A., Scott D., Azuhata T., Takamizawa S., & O'Dorisio S. (2002) The survivin:Fas ratio is predictive of recurrent disease in neuroblastoma. *J.Pediatr.Surg.* **37**, 507-511.
- Satoh A., Toyota M., Itoh F., Kikuchi T., Obata T., Sasaki Y., Suzuki H., Yawata A., Kusano M., Fujita M., Hosokawa M., Yanagihara K., Tokino T., & Imai K. (2002) DNA methylation and histone deacetylation associated with silencing DAP kinase gene expression in colorectal and gastric cancers. *Br.J.Cancer* **86**, 1817-1823.
- Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., & Peter M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-1687.
- Schaefer-Prokop, C.M. (1998) Bildgebende Diagnostik des Nierenzellkarzinoms. *Der Onkologe* **4**, 221-228.
- Schendel S.L., Montal M., & Reed J.C. (1998) Bcl-2 family proteins as ion-channels. *Cell Death.Differ.* **5**, 372-380.
- Schendel S.L., Xie Z., Montal M.O., Matsuyama S., Montal M., & Reed J.C. (1997) Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 5113-5118.
- Schiff P.B., Fant J., & Horwitz S.B. (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**, 665-667.
- Schiff P.B. & Horwitz S.B. (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **77**, 1561-1565.
- Schildhaus H.U., Krockel I., Lippert H., Malfertheiner P., Roessner A., & Schneider-Stock R. (2005) Promoter hypermethylation of p16INK4a, E-cadherin, O6-MGMT, DAPK and FHIT in adenocarcinomas of the esophagus, esophagogastric junction and proximal stomach. *Int.J.Oncol.* **26**, 1493-1500.
- Schimmer A.D. (2004) Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* **64**, 7183-7190.
- Schlesinger P.H., Gross A., Yin X.M., Yamamoto K., Saito M., Waksman G., & Korsmeyer S.J. (1997) Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 11357-11362.
- Schumacher A.M., Schavocky J.P., Velentza A.V., Mirzoeva S., & Watterson D.M. (2004) A calmodulin-regulated protein kinase linked to neuron survival is a substrate for the calmodulin-regulated death-associated protein kinase. *Biochemistry* **43**, 8116-8124.
- Schumacher A.M., Velentza A.V., Watterson D.M., & Wainwright M.S. (2002) DAPK catalytic activity in the hippocampus increases during the recovery phase in an animal model of brain hypoxic-ischemic injury. *Biochim.Biophys.Acta* **1600**, 128-137.

- Scopes R.K. (1994) Protein purification – principles and practice. 3rd edition, Springer, New York.
- Sedmak J.J. & Grossberg S.E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal.Biochem.* **79**, 544-552.
- Seol D.W. & Billiar T.R. (1999) A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis. *J.Biol.Chem.* **274**, 2072-2076.
- Sherr C.J. & Weber J.D. (2000) The ARF/p53 pathway. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **10**, 94-99.
- Shohat G., Spivak-Kroizman T., Cohen O., Bialik S., Shani G., Berrisi H., Eisenstein M., & Kimchi A. (2001) The pro-apoptotic function of death-associated protein kinase is controlled by a unique inhibitory autophosphorylation-based mechanism. *J.Biol.Chem.* **276**, 47460-47467.
- Simpson D.J., Clayton R.N., & Farrell W.E. (2002) Preferential loss of Death Associated Protein kinase expression in invasive pituitary tumours is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion. *Oncogene* **21**, 1217-1224.
- Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.A., Newmeyer D.D., Wang H.G., Reed J.C., Nicholson D.W., Alnemri E.S., Green D.R., & Martin S.J. (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J.Cell Biol.* **144**, 281-292.
- Smith C.A., Gruss H.J., Davis T., Anderson D., Farrah T., Baker E., Sutherland G.R., Brannan C.I., Copeland N.G., Jenkins N.A., & . (1993) CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* **73**, 1349-1360.
- Smith M.L., Chen I.T., Zhan Q., Bae I., Chen C.Y., Gilmer T.M., Kastan M.B., O'Connor P.M., & Fornace A.J., Jr. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* **266**, 1376-1380.
- Smith M.L. & Fornace A.J., Jr. (1995) Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr.Opin.Oncol.* **7**, 69-75.
- Sobin, L. H. & Wittekind, C.H. (1997) TNM classification of malignant tumors, 5th ed. New York: Wiley Liss.
- Song J.J. & Lee Y.J. (2003) Catalase, but not MnSOD, inhibits glucose deprivation-activated ASK1-MEK-MAPK signal transduction pathway and prevents relocalization of Daxx: hydrogen peroxide as a major second messenger of metabolic oxidative stress. *J.Cell Biochem.* **90**, 304-314.
- Song J.J. & Lee Y.J. (2004) Tryptophan 621 and serine 667 residues of Daxx regulate its nuclear export during glucose deprivation. *J.Biol.Chem.* **279**, 30573-30578.
- Soussi T., Dehouche K., & Beroud C. (2000) p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum.Mutat.* **15**, 105-113.
- Speicher M.R., Schoell B., du M.S., Schrock E., Ried T., Cremer T., Storkel S., Kovacs A., & Kovacs G. (1994) Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinomas revealed by comparative genomic hybridization. *Am.J.Pathol.* **145**, 356-364.
- Srinivasula S.M., Hegde R., Saleh A., Datta P., Shiozaki E., Chai J., Lee R.A., Robbins P.D., Fernandes-Alnemri T., Shi Y., & Alnemri E.S. (2001) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**, 112-116.
- Staden R. (1984) Computer methods to locate signals in nucleic acid sequences. *Nucleic Acids Res* **12**, 505-519.
- Staehler G. & Brkovic D. (1999) [The role of surgery in renal cell carcinoma]. *Urologe A* **38**, 452-459.
- Storkel S. (1999) [Epithelial tumors of the kidney. Pathological subtyping and cytogenetic correlation]. *Urologe A* **38**, 425-432.
- Suda T., Takahashi T., Golstein P., & Nagata S. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**, 1169-1178.
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Brenner C., Larochette N., Prevost M.C., Alzari P.M., & Kroemer G. (1999a) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J.Exp.Med.* **189**, 381-394.
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., & Kroemer G. (1999b) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.
- Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., & Takahashi R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol.Cell* **8**, 613-621.
- Tada Y., Wada M., Taguchi K., Mochida Y., Kinugawa N., Tsuneyoshi M., Naito S., & Kuwano M. (2002) The association of death-associated protein kinase hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancers. *Cancer Res* **62**, 4048-4053.

- Takahashi T., Tanaka M., Inazawa J., Abe T., Suda T., & Nagata S. (1994) Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int.Immunol.* **6**, 1567-1574.
- Takamizawa S., Scott D., Wen J., Grundy P., Bishop W., Kimura K., & Sandler A. (2001) The survivin:fas ratio in pediatric renal tumors. *J.Pediatr.Surg.* **36**, 37-42.
- Tamm I., Kornblau S.M., Segall H., Krajewski S., Welsh K., Kitada S., Scudiero D.A., Tudor G., Qui Y.H., Monks A., Andreeff M., & Reed J.C. (2000) Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin.Cancer Res* **6**, 1796-1803.
- Tamm I., Wang Y., Sausville E., Scudiero D.A., Vigna N., Oltersdorf T., & Reed J.C. (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* **58**, 5315-5320.
- Tanaka K., Iwamoto S., Gon G., Nohara T., Iwamoto M., & Tanigawa N. (2000) Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin.Cancer Res* **6**, 127-134.
- Tang X., Khuri F.R., Lee J.J., Kemp B.L., Liu D., Hong W.K., & Mao L. (2000) Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **92**, 1511-1516.
- Tang X., Wu W., Sun S.Y., Wistuba I.I., Hong W.K., & Mao L. (2004) Hypermethylation of the death-associated protein kinase promoter attenuates the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Mol.Cancer Res* **2**, 685-691.
- Tartaglia L.A., Ayres T.M., Wong G.H., & Goeddel D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**, 845-853.
- Thoenes W., Storkel S., & Rumpelt H.J. (1986) Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol.Res Pract.* **181**, 125-143.
- Thompson C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.
- Tian J.H., Das S., & Sheng Z.H. (2003) Ca²⁺-dependent phosphorylation of syntaxin-1A by the death-associated protein (DAP) kinase regulates its interaction with Munc18. *J.Biol.Chem.* **278**, 26265-26274.
- Tishler R.B., Lamppu D.M., Park S., & Price B.D. (1995) Microtubule-active drugs taxol, vinblastine, and nocodazole increase the levels of transcriptionally active p53. *Cancer Res* **55**, 6021-6025.
- Todd D., Yang G., Brown R.W., Cao J., D'Agati V., Thompson T.S., & Truong L.D. (1996) Apoptosis in renal cell carcinoma: detection by in situ end-labeling of fragmented DNA and correlation with other prognostic factors. *Hum.Pathol.* **27**, 1012-1017.
- Torii S., Egan D.A., Evans R.A., & Reed J.C. (1999) Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *EMBO J.* **18**, 6037-6049.
- Torres K. & Horwitz S.B. (1998) Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res* **58**, 3620-3626.
- Toyooka S., Toyooka K.O., Miyajima K., Reddy J.L., Toyota M., Sathyanarayana U.G., Padar A., Tockman M.S., Lam S., Shivapurkar N., & Gazdar A.F. (2003) Epigenetic down-regulation of death-associated protein kinase in lung cancers. *Clin.Cancer Res* **9**, 3034-3041.
- Tozawa T., Tamura G., Honda T., Nawata S., Kimura W., Makino N., Kawata S., Sugai T., Suto T., & Motoyama T. (2004) Promoter hypermethylation of DAP-kinase is associated with poor survival in primary biliary tract carcinoma patients. *Cancer Sci.* **95**, 736-740.
- 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**, 301-305.
- Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E., & Croce C.M. (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**, 1440-3.
- Ueki T., Toyota M., Sohn T., Yeo C.J., Issa J.P., Hruban R.H., & Goggins M. (2000) Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **60**, 1835-1839.
- Uren A.G., Coulson E.J., & Vaux D.L. (1998) Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem.Sci.* **23**, 159-162.
- van Engeland M., Ramaekers F.C., Schutte B., & Reutelingsperger C.P. (1996) A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* **24**, 131-139.
- Varfolomeev E.E., Schuchmann M., Luria V., Chiannikulchai N., Beckmann J.S., Mett I.L., Rebrikov D., Brodianski V.M., Kemper O.C., Kollet O., Lapidot T., Soffer D., Sobe T., Avraham K.B., Goncharov T., Holtmann H., Lonai P., & Wallach D. (1998) Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity.* **9**, 267-276.

- Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., & Vaux D.L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53.
- Verhagen A.M., Silke J., Ekert P.G., Pakusch M., Kaufmann H., Connolly L.M., Day C.L., Tikoo A., Burke R., Wrobel C., Moritz R.L., Simpson R.J., & Vaux D.L. (2002) HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J.Biol.Chem.* **277**, 445-454.
- 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**, 39-51.
- Villunger A., Huang D.C., Holler N., Tschopp J., & Strasser A. (2000) Fas ligand-induced c-Jun kinase activation in lymphoid cells requires extensive receptor aggregation but is independent of DAXX, and Fas-mediated cell death does not involve DAXX, RIP, or RAIDD. *J.Immunol.* **165**, 1337-1343.
- Vogelstein B., Lane D., & Levine A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
- Voso M.T., Scardocci A., Guidi F., Zini G., Di Mario A., Pagano L., Hohaus S., & Leone G. (2004) Aberrant methylation of DAP-kinase in therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood* **103**, 698-700.
- Vousden K.H. & Lu X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat.Rev.Cancer* **2**, 594-604.
- Wada T. & Penninger J.M. (2004) Stress kinase MKK7: savior of cell cycle arrest and cellular senescence. *Cell Cycle* **3**, 577-579.
- Wagener C. (1999) Molekulare Onkologie, 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Wahl A.F., Donaldson K.L., Fairchild C., Lee F.Y., Foster S.A., Demers G.W., & Galloway D.A. (1996) Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nat.Med.* **2**, 72-79.
- Walker N.P., Talanian R.V., Brady K.D., Dang L.C., Bump N.J., Ferez C.R., Franklin S., Ghayur T., Hackett M.C., Hammill L.D., & . (1994) Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**, 343-352.
- Wallace-Brodeur R.R. & Lowe S.W. (1999) Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol.Life Sci.* **55**, 64-75.
- Wang L., Miura M., Bergeron L., Zhu H., & Yuan J. (1994) Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* **78**, 739-50.
- Wang R.Y., Gehrke C.W., & Ehrlich M. (1980) Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* **8**, 4777-4790.
- Wang T.H., Wang H.S., Ichijo H., Giannakakou P., Foster J.S., Fojo T., & Wimalasena J. (1998) Microtubule-interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways. *J.Biol.Chem.* **273**, 4928-4936.
- Watanabe-Fukunaga R., Brannan C.I., Copeland N.G., Jenkins N.A., & Nagata S. (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**, 314-317.
- Wethkamp N., Ramp U., Geddert H., Schulz W.A., Florl A.R., Suschek C.V., Hassan M., Gabbert H.E., & Mahotka C. (2005) Expression of death-associated protein kinase during tumour progression of human renal cell carcinomas: Hypermethylation-independent mechanisms of inactivation. *Eur. J. Cancer* **42**, 264-74.
- Whitfield J., Neame S.J., Paquet L., Bernard O., & Ham J. (2001) Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* **29**, 629-643.
- Williams G.T., Smith C.A., McCarthy N.J., & Grimes E.A. (1992) Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends Cell Biol.* **2**, 263-267.
- Wilson K.P., Black J.A., Thomson J.A., Kim E.E., Griffith J.P., Navia M.A., Murcko M.A., Chambers S.P., Aldape R.A., Raybuck S.A., & Livingston D.J.(1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**, 270-5.
- Wong I.H., Ng M.H., Huang D.P., & Lee J.C. (2000) Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood* **95**, 1942-1949.
- Wong T.S., Chang H.W., Tang K.C., Wei W.I., Kwong D.L., Sham J.S., Yuen A.P., & Kwong Y.L. (2002) High frequency of promoter hypermethylation of the death-associated protein-kinase gene in nasopharyngeal carcinoma and its detection in the peripheral blood of patients. *Clin.Cancer Res* **8**, 433-437.
- Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S.S., Michael M.Z., & Graham M.W. (1989) Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**, 3469-3478.

- Woods C.M., Zhu J., McQueney P.A., Bollag D., & Lazarides E. (1995) Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol.Med.* **1**, 506-526.
- Wrzesien-Kus A., Smolewski P., Sobczak-Pluta A., Wierzbowska A., & Robak T. (2004) The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. *Apoptosis*. **9**, 705-715.
- Wu G., Chai J., Suber T.L., Wu J.W., Du C., Wang X., & Shi Y. (2000) Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* **408**, 1008-1012.
- Wunderlich H., Schumann S., Janitzky V., Moravek P., Podhola M., Kosmehl H., & Schubert J. (1999) [Increased incidence of renal cell carcinoma in central Europe. Does diagnostic increase reflect a true increase in incidence?]. *Urologe A* **38**, 252-257.
- Yamaguchi S., Asao T., Nakamura J., Ide M., & Kuwano H. (2003) High frequency of DAP-kinase gene promoter methylation in colorectal cancer specimens and its identification in serum. *Cancer Lett.* **194**, 99-105.
- Yamamoto K., Ichijo H., & Korsmeyer S.J. (1999) BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol.Cell Biol.* **19**, 8469-8478.
- Yamamoto M., Hioki T., Ishii T., Nakajima-Iijima S., & Uchino S. (2002) DAP kinase activity is critical for C(2)-ceramide-induced apoptosis in PC12 cells. *Eur.J.Biochem.* **269**, 139-147.
- Yamamoto M., Takahashi H., Nakamura T., Hioki T., Nagayama S., Ooashi N., Sun X., Ishii T., Kudo Y., Nakajima-Iijima S., Kimchi A., & Uchino S. (1999) Developmental changes in distribution of death-associated protein kinase mRNAs. *J.Neurosci.Res* **58**, 674-683.
- Yamanaka M., Watanabe M., Yamada Y., Takagi A., Murata T., Takahashi H., Suzuki H., Ito H., Tsukino H., Katoh T., Sugimura Y., & Shiraishi T. (2003) Altered methylation of multiple genes in carcinogenesis of the prostate. *Int.J.Cancer* **106**, 382-387.
- Yan Y., Mahotka C., Heikaus S., Shibata T., Wethkamp N., Liebmann J., Suschek C.V., Guo Y., Gabbert H.E., Gerharz C.D., & Ramp U. (2004) Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas. *Br.J.Cancer* **91**, 1349-1357.
- Yanagawa N., Tamura G., Oizumi H., Takahashi N., Shimazaki Y., & Motoyama T. (2003) Promoter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Sci.* **94**, 589-592.
- Yang B., Eshleman J.R., Berger N.A., & Markowitz S.D. (1996) Wild-type p53 protein potentiates cytotoxicity of therapeutic agents in human colon cancer cells. *Clin.Cancer Res* **2**, 1649-1657.
- Yang X., Khosravi-Far R., Chang H.Y., & Baltimore D. (1997) Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* **89**, 1067-1076.
- Yeh W.C., Pompa J.L., McCurrach M.E., Shu H.B., Elia A.J., Shahinian A., Ng M., Wakeham A., Khoo W., Mitchell K., El Deiry W.S., Lowe S.W., Goeddel D.V., & Mak T.W. (1998) FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* **279**, 1954-1958.
- Yu D., Jing T., Liu B., Yao J., Tan M., McDonnell T.J., & Hung M.C. (1998) Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol.Cell* **2**, 581-591.
- Yu J., Zhang L., Hwang P.M., Rago C., Kinzler K.W., & Vogelstein B. (1999) Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 14517-14522.
- Yu K.Y., Kwon B., Ni J., Zhai Y., Ebner R., & Kwon B.S. (1999) A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J.Biol.Chem.* **274**, 13733-13736.
- Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M., & Horvitz H.R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641-652.
- Yuan J.M., Castelao J.E., Gago-Dominguez M., Ross R.K., & Yu M.C. (1998a) Hypertension, obesity and their medications in relation to renal cell carcinoma. *Br.J.Cancer* **77**, 1508-1513.
- Yuan J.M., Castelao J.E., Gago-Dominguez M., Yu M.C., & Ross R.K. (1998b) Tobacco use in relation to renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **7**, 429-433.
- Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Zanin C., Vayssiere J.L., Petit P.X., & Kroemer G. (1995) Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J.Exp.Med.* **181**, 1661-1672.
- Zhang J., Cado D., Chen A., Kabra N.H., & Winoto A. (1998) Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* **392**, 296-300.
- Zhao L.Y., Liu J., Sidhu G.S., Niu Y., Liu Y., Wang R., & Liao D. (2004) Negative regulation of p53 functions by Daxx and the involvement of MDM2. *J.Biol.Chem.* **279**, 50566-50579.

Zhong S., Salomoni P., Ronchetti S., Guo A., Ruggero D., & Pandolfi P.P. (2000) Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J.Exp.Med.* **191**, 631-640.

Zhou M., Gu L., Li F., Zhu Y., Woods W.G., & Findley H.W. (2002) DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **303**, 124-131.

Zingg J.M. & Jones P.A. (1997) Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* **18**, 869-882.

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**, 405-413.

7 Anhang

7.1 Tabellen und Abbildungen

Tab. 7.1: Auflistung verschiedener Daxx-Interaktionspartner

Daxx-Interaktionspartner	Verantwortliche Domäne von Daxx (AS-Position)	Funktion	Referenz
CD95	625 - 740	Apoptose	YANG et al., 1997
Flip _L	625 - 740	Apoptose	KIM et al., 2003
DJ-1	638 - 740	Apoptose	JUNN et al., 2005
HSP27	625 - 740	Apoptose	CHARETTE et al., 2000
TGF- β RII	489 - 740	Apoptose	PERLMAN et al., 2001
HIPK2	1 - 188	Apoptose	HOFMANN et al., 2003
ASK1	501 - 625	Apoptose, Transkription	CHANG et al., 1998
PML	625 - 740	Apoptose, Transkription	ISHOV et al., 1999
p53, p63, p73	131 - 311; 667 - 740	Apoptose, Transkription	KIM et al., 2003; ZHAO et al., 2004; GOSTISSA et al., 2004
Pax3, Pax7	635 - 740	Transkription	HOLLENBACH et al., 1999
Pax5	626 - 740	Transkription	EMEL'YANOV et al., 2002
Androgen Rezeptor	N. D.	Transkription	LIN et al., 2004
Glukokortikoid Rezeptor	501 - 740	Transkription	LIN et al., 2003
Mineralortikoid Rezeptor	N. D.	Transkription	OBRADOVIC et al., 2004
ETS1	567 - 740	Transkription	LI et al., 2000
HSF1	492 - 740	Transkription	BOELLMANN et al., 2004
MSP58	1 - 501	Transkription	LIN & SHIN, 2002
DMAP1	1 - 240	Transkription	MUROMOTO et al., 2004
HDAC	1 - 399; 658 - 740	Transkription	LI et al., 2000
HDACII	C-Terminus	Transkription	HOLLENBACH et al., 2002
HIPK1	N. D.	Transkription	ECSEDY et al., 2003
Smad4	625 - 740	Transkription	CHANG et al., 2005
Histone H4	N. D.	Transkription	HOLLENBACH et al., 2002
ATRX	N-Terminus	Zellzyklusregulation	ISHOV et al., 2004
CENP-C	636 - 740	N. D.	PLUTA et al., 1998
HIPK3	N. D.	N. D.	ROCHAT-STEINER et al., 2000
Ubc9	625 - 740	N. D.	RYU et al., 2000
DNA-Methyltransferase I	1 - 287; 512 - 655	N. D.	MICHAELSON et al., 1999
Sentrin-1	625 - 740	N. D.	RYU et al., 2000
„Steroidogenic Factor-1 like element“	N. D.	N. D.	KIRIAKIDOU et al., 1997
Glut-4	661 - 740	N. D.	LALIOTI et al., 2002

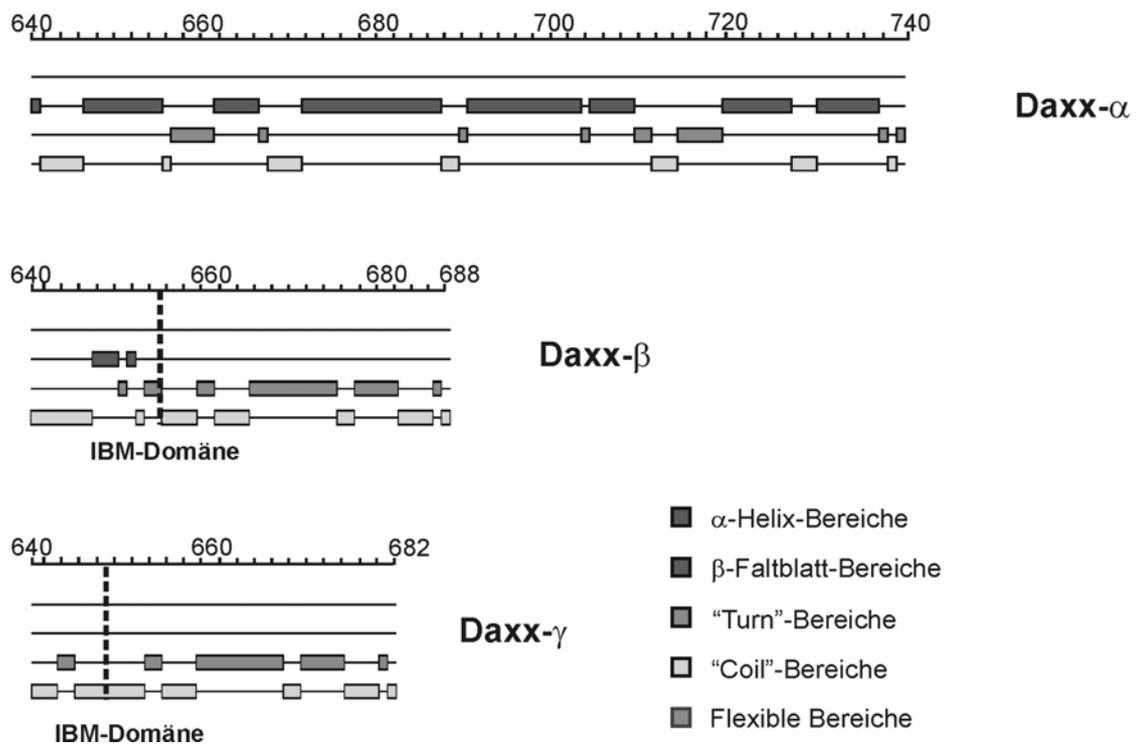


Abb. 7.1: Ergebnis der Sekundärstrukturanalyse der Daxx-Isoformen. Die Aminosäuresequenzen der C-Termini (ab Aminosäure 640) von Daxx- α , Daxx- β und Daxx- γ wurden nach dem Algorithmus von Chou und Fasman (1978) hinsichtlich der Ausbildung von Sekundärstrukturen analysiert. Die Analyse wurde mit Hilfe der DNASTar Software Protean durchgeführt. Die Lokalisation der IBM-Domäne ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. In Daxx- β ist das IBM Motiv an Aminosäureposition 655 und in Daxx- γ an –Position 649 lokalisiert.

A

```

ArgC Clost Therm Tryps
Ch lo ProtK|
ProtK Therm||
ArgC Clost Therm Tryps||
Ch lo|||
ArgC AspN Clost Tryps |||||
ArgC Clost Tryps| |||||
ArgC Clost Tryps || |||||
CNBr Ch lo| || |||||
ProtK Therm|| || |||||
LysC NTCB Tryps ||| || |||||
AspN | ||| || |||||
Ch lo Pn1.3 Pn2 ProtK| | ||| || |||||
Ch hi Ch lo Pn1.3 Pn2 ProtK Therm|| | ||| || |||||
BNPS Ch hi Ch lo Iodo Pn1.3 ProtK||| | ||| || |||||
Pn1.3 ProtK||| | ||| || |||||
Therm||| | ||| || |||||
ProtK ||| | ||| || |||||
ProtK Therm| ||| | ||| || |||||
Ch hi Ch lo ProtK|| ||| | ||| || |||||
Therm|| ||| | ||| || |||||
ProtK ||| | ||| || |||||
ProtK| ||| | ||| || |||||
Therm|| ||| | ||| || |||||
ArgC Clost Tryps ||| ||| || |||||
Glu Staph| ||| ||| || |||||
ProtK|| ||| ||| || |||||
Ch hi Ch lo Pn1.3 ProtK Therm||| ||| ||| || |||||
Pn1.3||| ||| ||| || |||||
Ch lo ProtK ||| | ||| || |||||
Pn1.3 Pn2 Therm| ||| | ||| || |||||
|| ||| ||| ||| || |||||
SGPLGNSYVERQSPAVPNPPFTASSAWYLQDKCGHTMRSRRDHRALRL
Protein: Daxx-β AS.: 640-----+-----+-----+-----+----- 688

```

B

```

ArgC Clost Therm Tryps
Ch lo ProtK|
ProtK Therm||
ArgC Clost Therm Tryps||
Ch lo|||
ArgC AspN Clost Tryps |||||
ArgC Clost Tryps| |||||
ArgC Clost Tryps || |||||
CNBr Ch lo| || |||||
ProtK Therm|| || |||||
LysC NTCB Tryps ||| || |||||
AspN | ||| || |||||
Ch lo Pn1.3 Pn2 ProtK| | ||| || |||||
Ch hi Ch lo Pn1.3 Pn2 ProtK Therm|| | ||| || |||||
BNPS Ch hi Ch lo Iodo Pn1.3 ProtK||| | ||| || |||||
Pn1.3 ProtK||| | ||| || |||||
Therm||| | ||| || |||||
ProtK ||| | ||| || |||||
ProtK Therm| ||| | ||| || |||||
Ch hi Ch lo ProtK|| ||| | ||| || |||||
Therm|| ||| | ||| || |||||
ProtK ||| | ||| || |||||
ProtK| ||| | ||| || |||||
Therm|| ||| | ||| || |||||
Ch lo ProtK ||| ||| || |||||
Pn1.3 Pn2 Therm| ||| ||| || |||||
|| ||| ||| ||| || |||||
SGPLGNSPAVPNPPFTASSAWYLQDKCGHTMRSRRDHRALRL
Protein: Daxx-γ AS.: 640-----+-----+-----+-----+----- 682

```

Abb. 7.2: Ergebnis der „Peptidcutter“-Analyse von Daxx-β und Daxx-γ. Die Aminosäuresequenzen der C-Termini (ab Aminosäure 640) von Daxx-β (A) und Daxx-γ (B) wurden mit Hilfe des „Expasy-tools - Peptidcutter“ hinsichtlich der Existenz potentieller Proteaseschnittstellen analysiert, dessen Spaltung zur Freisetzung der IBM-Domäne (AVP-Motiv) in Daxx-β und Daxx-γ führen könnte. Es konnten keine Spaltstellen für Caspase1, Caspase2, Caspase3, Caspase4, Caspase5, Caspase6, Caspase7, Caspase8, Caspase9, Caspase10, Enterokinase, Faktor Xa, Ameisensäure, Granzym B, Hydroxylamin, Prolin-Endopeptidase und Thrombin identifiziert werden.

Abkürzungen: ArgC: Arginin-C Proteinase, AspN: Asparagin-N Endopeptidase, BNPS-skatole: 2-(2-Nitrophenylsulfenyl)-3-Methylindol, CNBr: Cyanbromid, Ch_lo: Chymotrypsin („low specificity“), Ch_hi: Chymotrypsin („high specificity“), Clost: Clostridiopeptidase B, Iodo: Iodosobenzoessäure, LysC: Lysin C Lysyl Endopeptidase, NTCB: 2-Nitro-5-Thiocyanobenzoessäure, Pn1.3: Pepsin (pH = 1,3), Pn2: Pepsin (pH > 2), Prot K: Proteinase K, Therm: Thermolysin, Tryps: Trypsin, Glu: Glutamy Endopeptidase, Staph: Staphylococcus Peptidase I

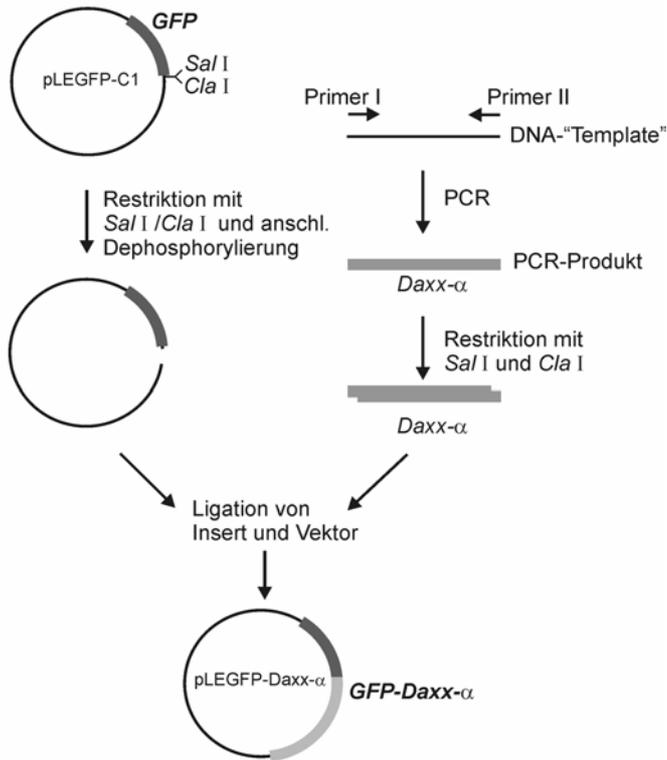


Abb. 7.3: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung des pLEGFP-Daxx- α Expressionsvektors.

Innerhalb einer PCR mit den Primern "Daxx-Sal I" und "Daxx-outer3" sowie dem Vektor pEGFP-Daxx als "Template" wurde das Daxx- α Gen amplifiziert, wobei das im Vektor pEGFP-Daxx befindliche Stop-Kodon eliminiert wurde. Das resultierende PCR-Produkt wurde daraufhin mit den Restriktionsendonukleasen *Sal I* und *Cla I* restringiert und anschließend in den ebenfalls *Sal I/Cla I* restringierten Expressionsvektor pLEGFP-C1 ligiert. Mittels DNA Sequenzierung wurde die korrekte Basenabfolge verifiziert.

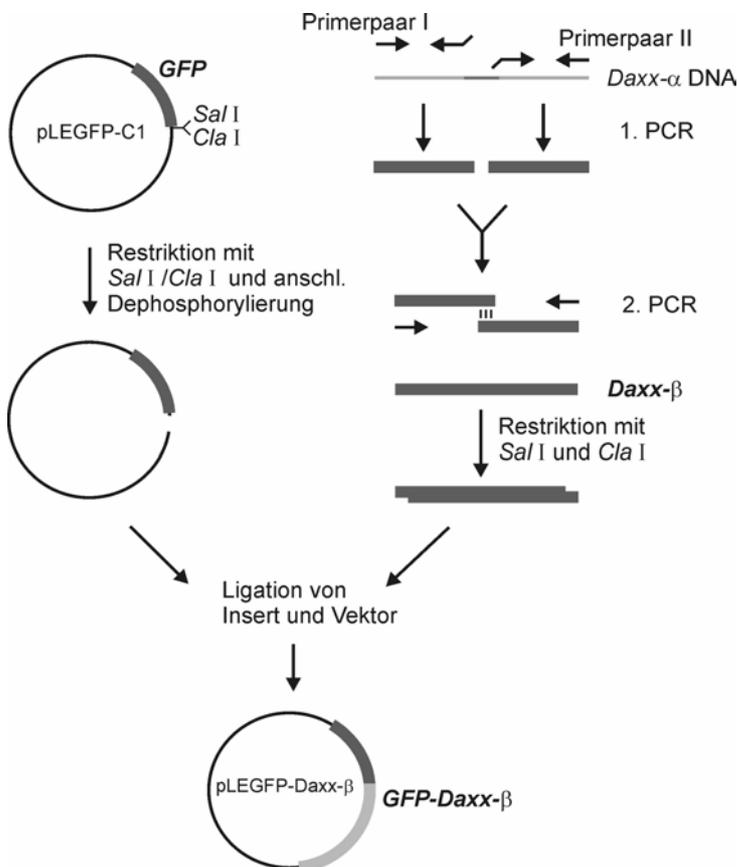


Abb. 7.4: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren pLEGFP-Daxx- β und pLEGFP-Daxx- γ am Beispiel von pLEGFP-Daxx- β .

Innerhalb zwei getrennter PCR Reaktionen mit den Primerpaaren "Daxx-Sal I" und "Daxx- β 2" bzw. "Daxx- β 1" und "Daxx-outer3" sowie dem Vektor pLEGFP-Daxx- α als "Template" wurden zwei PCR Produkte generiert. Diese wurden vereinigt und innerhalb einer zweiten PCR mit den Primern "Daxx-Sal I" und "Daxx-outer3" fusioniert. Das resultierende PCR-Produkt enthielt die Gensequenz von Daxx- β und wurde nach Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen *Sal I* und *Cla I* in den ebenfalls *Sal I/Cla I* restringierten Expressionsvektor pLEGFP-C1 ligiert. Mittels DNA Sequenzierung wurde die korrekte Basenabfolge von pLEGFP-Daxx- β bzw. -Daxx- γ verifiziert.

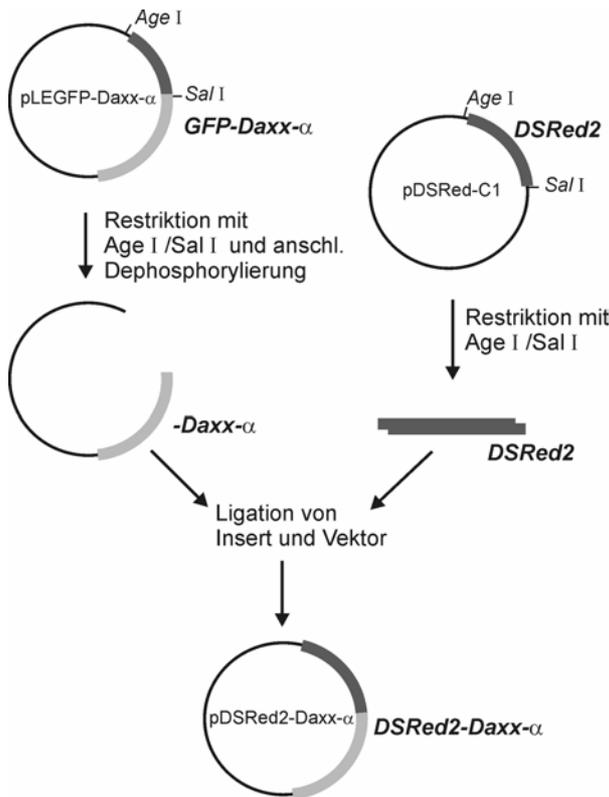


Abb. 7.5: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren pDSRed2-Daxx-α, pDSRed2-Daxx-β und pDSRed2-Daxx-γ am Beispiel von pDSRed2-Daxx-α. Durch Restriktion mit den Restriktions-endonukleasen AgeI und XhoI wurde GFP aus dem Vektor pLEGFP-Daxx-α heraus geschnitten. Ebenfalls durch Restriktion mit AgeI und XhoI wurde DSRed2 aus dem Vektor pDSRed2-C1 heraus geschnitten und anschließend in den restringierten pLEGFP-Daxx-α Vektor ligiert. Mittels DNA Sequenzierung wurde die korrekte Basenabfolge und der einheitliche Leserahmen verifiziert.

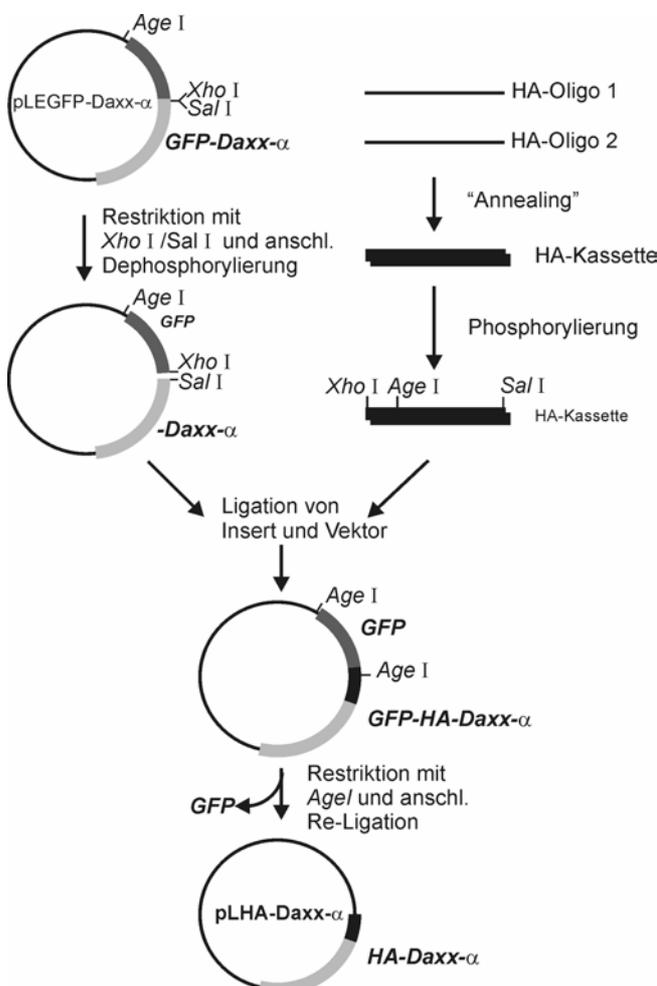


Abb. 7.6: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren pLHA-C1, pLHA-Daxx-α, pLHA-Daxx-β und pLHA-Daxx-γ am Beispiel von pLHA-Daxx-α. Zunächst wurde eine doppelsträngige HA-Tag Expressionskassette generiert indem die komplementären einzelsträngigen Oligonukleotide HAIII und HAIV vereinigt und "Annealt" wurden. Die einzelnen Oligonukleotide waren dabei so designt, dass die Kassette XhoI bzw. SalI kompatible überhängende DNA Enden besaß. Nach Phosphorylierung der HA-Tag-Kassette wurde diese in den SalI und XhoI restringierten pLEGFP-Daxx-α Vektor ligiert. Da die HA-Tag-Kassette eine zusätzliche interne AgeI Schnittstelle besaß, wurde GFP über eine AgeI Restriktion herausgeschnitten und der Vektor anschließend re-ligiert. Mittels DNA Sequenzierung wurde die korrekte Basenabfolge verifiziert.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen während der Nekrose und Apoptose.....	3
Abb. 1.2	Die Familie der Apoptose-relevanten Caspasen.....	4
Abb. 1.3	Schematische Übersichtsdarstellung der verschiedenen p53-Signalwege.....	11
Abb. 1.4	Schematische Darstellung des DAP-Kinase-Proteins.....	16
Abb. 1.5	Schematische Darstellung des Daxx-Proteins.....	18
Abb. 1.6	Schematische Darstellung zellulärer Apoptose-Signalwege.....	21
Abb. 3.1.1	Nachweis der DAP-Kinase- und GAPDH-mRNA-Expression in 20 RCC-Zelllinien mittels „Real-Time“-RT-PCR.....	54
Abb. 3.1.2	Externe GAPDH-Standardkurve zur relativen Quantifizierung und Normalisierung von DAP-Kinase- und GAPDH-Expressionswerten.....	55
Abb. 3.1.3	Detektion der DAP-Kinase- und GAPDH-Transkripte in RCC-Primärtumoren verschiedener Tumorstadien.....	57
Abb. 3.1.4	DAP-Kinase-mRNA-Expressionsniveaus im Vergleich zwischen verschiedenen Tumorstadien klarzelliger RCC.....	58
Abb. 3.1.5	Vergleich der relativen DAP-Kinase-mRNA-Expressionsniveaus zwischen klarzelligen und chromophil/ päpillären RCC.....	59
Abb. 3.1.6	MSP-Analyse des <i>DAP-Kinase</i> -Promotors in repräsentativen RCC-Proben und korrespondierendem nicht-neoplastischem Normalgewebe.....	60
Abb. 3.1.7	DAP-Kinase-Proteinexpression im humanen RCC.....	61
Abb. 3.1.8	Detektion der basalen DAP-Kinase-Aktivität in 11 humanen RCC-Zelllinien.....	62
Abb. 3.1.9	Detektion der DAP-Kinase-mRNA-Expression in ruhenden und Con A-stimulierten mononukleären Zellen.....	63
Abb. 3.1.10	DAP-Kinase-Proteinexpression in unstimulierten und Mitogen-aktivierten PBMCs.....	64
Abb. 3.1.11	MSP-Analyse des <i>DAP-Kinase</i> -Promotors in stimulierten und unstimulierten PBMCs.....	65
Abb. 3.1.12	Survivin/DAP-Kinase-mRNA-Expressionsratios im Vergleich zwischen klarzelligen Nierenzellkarzinomen des pT1- und pT3-Stadiums.....	66
Abb. 3.2.1	Daxx-mRNA-Expression in 22 verschiedenen RCC-Zelllinien.....	67
Abb. 3.2.2	PCR mit Daxx-spezifischen Primern zur Detektion von DNA-basierten Amplifikationsprodukten.....	68
Abb. 3.2.3	Ergebnis der NetGene2-Analyse potentieller Spleißdonor- und Akzeptorstellen innerhalb des <i>Daxx</i> -Gens.....	69
Abb. 3.2.4	Darstellung des alternativen Spleißens von Daxx auf Sequenzebene.....	70
Abb. 3.2.5	Schematische Darstellung des alternativen Spleißens.....	71
Abb. 3.2.6	Schematische Darstellung der Daxx-Isoformen.....	72
Abb. 3.2.7	Vergleich des IBM-Motifs von Daxx- β und Daxx- γ mit IBM-Sequenzen anderer Proteine.....	73
Abb. 3.2.8	Stammbaumanalyse der potentiellen IAP-Bindungsmotive in Daxx- β und Daxx- γ	73
Abb. 3.2.9	Rekombinante Expression der Daxx-Varianten als GFP-Fusionen in HepG2-Zellen.....	75
Abb. 3.2.10	Fluoreszenzmikroskopische Analyse zur zellulären Lokalisation der Daxx-Isoformen.....	76
Abb. 3.2.11	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Ko-Lokalisation von Daxx- α , Daxx- β und Daxx- γ mit PML.....	77
Abb. 3.2.12	Quantitative Auswertung der Ko-Lokalisation von Daxx- α , Daxx- β und Daxx- γ mit PML.....	78
Abb. 3.2.13	Ko-Immunpräzipitation von BFP-PML mit den DSRed2-fusionierten Daxx-Isoformen.....	79
Abb. 3.2.14	Ko-Immunpräzipitation von ASK1 und den GFP-fusionierten Daxx-Isoformen.....	81
Abb. 3.2.15	ASK1-„Kinase-Assay“ nach Ko-Expression der GFP-fusionierten Daxx-Varianten mit HA-ASK1.....	82
Abb. 3.2.16	Bestimmung des Apoptose-Ausmaßes nach Ko-Expression von CD95 mit den HA-fusionierten Daxx-Varianten.....	84
Abb. 3.2.17	PARP-Detektion im „Western Blot“ nach Expression der GFP-fusionierten Daxx-Varianten.....	85
Abb. 3.2.18	Ko-Immunpräzipitationsanalysen von CD95 und GFP-Daxx- α	86
Abb. 3.2.19	Dokumentation der stabli-transduzierten RCC-Zelllinien clearCa-2 und clearCa-6.....	88

Abb. 3.2.20	Einfluss der GFP-fusionierten Daxx-Varianten auf die CD95-abhängige Apoptose in der RCC-Zelllinie clearCa-6.....	89
Abb. 3.2.21	„Western Blot“-Analyse der CH11-behandelten clearCa-6-GFP, -Daxx- α , -Daxx- β und -Daxx- γ Zelllinien.....	90
Abb. 3.2.22	Analyse der CH11-induzierten JNK-Aktivierung in den stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien.....	92
Abb. 3.2.23	Einfluss verschiedener CH11-Konzentration auf die Lebendzellzahl der stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien.....	93
Abb. 3.2.24	Das Ausmaß der CD95-abhängigen Apoptose in den stabil-transduzierten clearCa-2-Zelllinien.....	94
Abb. 3.2.25	Ko-Immunpräzipitationen von p53-GFP mit den DSRed2-fusionierten Daxx-Isoformen.....	95
Abb. 3.2.26	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der differentiellen Interaktion zwischen den Daxx-Isoformen und p53.....	96
Abb. 3.2.27	Analyse der Daxx- α -, Daxx- β - bzw. Daxx- γ -vermittelten Modulation der p53-abhängigen Transkription in HeLa-Zellen.....	98
Abb. 3.2.28	RT-PCR-Analyse der Expression von p53-Zielgenen in den stabilen clearCa-2-Zelllinien.....	99
Abb. 3.2.29	Die Auswirkungen verschiedener Konzentrationen von Etoposid, Doxorubicin, Topotecan bzw. Taxol auf die Lebendzellzahl der stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien.....	101
Abb. 3.2.30	Die Auswirkungen von Etoposid, Doxorubicin, Topotecan bzw. Taxol auf die Lebendzellzahl der stabil-transduzierten clearCa-6-Zelllinien im zeitlichen Verlauf.....	102
Abb. 3.2.31	Die Auswirkungen von Etoposid, Doxorubicin, Topotecan bzw. Taxol auf die Lebendzellzahl der stabil-transduzierten clearCa-2-Zelllinien im zeitlichen Verlauf.....	103
Abb. 3.2.32	„Western Blot“-Analyse zum Nachweis der PARP-Spaltung in den Zytostatika-behandelten clearCa-2-GFP- und clearCa-6-GFP-Zelllinien.....	104
Abb. 3.2.33	Ausmaß des Taxol-induzierten Zelltodes in den stabil-transduzierten clearCa-2-Zelllinien.....	105
Abb. 3.2.34	RT-PCR-Analyse der Expression von p53-Zielgenen in Taxol-behandelten clearCa-2-Transduktanten.....	106
Abb. 3.2.35	„Western Blot“-Analyse der Caspase-Spaltung in Taxol-behandelten clearCa-2-GFP-Zellen.....	107
Abb. 3.2.36	Analyse der Taxol-induzierten JNK-Aktivität in clearCa-2-GFP- und clearCa-2-GFP-Daxx- α -Zellen....	107
Abb. 4.1	Schematische Darstellung der Daxx-Varianten hinsichtlich der Bindungsregion verschiedener Interaktionspartner.....	119
Abb. 7.1	Ergebnis der Sekundärstrukturanalyse der Daxx-Isoformen.....	154
Abb. 7.2	Ergebnis der „Peptidcutter“-Analyse von Daxx- β und Daxx- γ	155
Abb. 7.3	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung des pLEGFP-Daxx- α Expressionsvektors.....	156
Abb. 7.4	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren pLEGFP-Daxx- β und pLEGFP-Daxx- γ am Beispiel von pLEGFP-Daxx- β	156
Abb. 7.5	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren pDSRed2-Daxx- α , pDSRed2-Daxx- β und pDSRed2-Daxx- γ am Beispiel von pDSRed2-Daxx- α	157
Abb. 7.6	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der Expressionsvektoren pLHA-C1, pLHA-Daxx- α , pLHA-Daxx- β und pLHA-Daxx- γ am Beispiel von pLHA-Daxx- α	157

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Auflistung verschiedener Caspase-Substrate.....	5
Tab. 2.1.1	Verwendete Zytostatika, Apoptose-Induktoren sowie –Inhibitoren.....	24
Tab. 2.1.2	Liste der verwendeten Primärantikörper.....	25
Tab. 2.1.3	Liste der verwendeten Plasmide.....	26
Tab. 2.1.4	Zusammenstellung der eingesetzten Oligonukleotide.....	27
Tab. 2.1.5	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	27
Tab. 2.1.6	Sonstige verwendete Zelllinien.....	28
Tab. 2.1.7	Übersicht der verwendeten Software und Server.....	28
Tab. 2.2.1	Konzentrationen verwendeter Antibiotika.....	29
Tab. 2.2.2	Parameter der „Kinase Assays“.....	52
Tab. 3.1.1	Übersicht des Patientenkollektivs.....	56
Tab. 3.2.1	Biochemische Grunddaten der Daxx-Varianten.....	71
Tab.3.2.2	Ergebnis der PSORT II-Analyse zur subzellulären Lokalisation der Daxx- Isoformen.....	75
Tab.4.1	Verlust der DAP-Kinase-Expression in humanen Tumoren.....	110
Tab. 7.1	Auflistung verschiedener Daxx Interaktionspartner.....	153

7.4 Abkürzungsverzeichnis

7- AAD	7-Aminoactomycin D	CENP-C	Centromer-Protein C
Abb.	Abbildung	Ci	Curie
Acinus	„Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus“	c-IAP	„cellular IAP“
AICD	„Activation-induced cell death“	CIAP	„Calf intestinal alkaline phosphatase“
AIDS	„Acquired immunodeficiency syndrome“	CK	Casein Kinase
AIF	„Apoptosis inducing factor“	cm	Zentimeter
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz	CO ₂	Kohlendioxid
ANT	Adeninnukleotid Transporter	Con A	Concanavalin A
Apaf-1	„Apoptotic protease activity factor-1“	cPLA2	cytosolische Phospholipase A2
APC	„Adenomatous polyposis coli oncosuppressor protein“	CRD	Cystein-reiche Domäne
APL	Akute Promyelozyten Leukämie	d.h.	das heißt
APS	Ammoniumperulfat	D4-GDI	Rho GDP-Dissoziationsinhibitor D4
AR	Androgen-Rezeptor	DABCO	Diazabicyclo[2,2,2]octan
ARF	„Alternative reading frame“	DAP	„Death-associated protein“
ASK1	Apoptose Signal-regulierende	DAPK	„Death-associated protein kinase“
ASPP	„Apoptosis-stimulating protein for p53“	DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
ATM	„Ataxia telangiectasia mutated“	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat	Daxx	„Death associated protein XX“
ATR	„Ataxia telangiectasia related“	dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ATRX	„Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked“	DD	„Death domain“
β-APP	„Amyloid- β precursor protein“	DED	„Death effector domain“
Bak	„Bcl-2-antagonist/killer“	DEPC	Diethylpyrocarbonat
Bax	„Bcl-2 associated X protein“	DFF45/I-CAD	45 kDa-Komponente des DNA-Fragmenierungsfaktors („Inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease“)
BCL-2	„B-Cell Lymphoma-2“	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Bcl-X _{L/S}	lange (L) bzw. kurze (s) Form des Bcl-2-ähnlichen Genproduktes X	DIABLO	„Direct IAP binding protein with low pI“
BFP	„Blue fluorescent protein“	DISC	„Death inducing signalling complex“
BH	Bcl-2-Homolog	DMAP	DNA methyltransferase 1 (DNMT1)-associated protein
Bid	„BH3 interacting domain death agonist“	DMEM	„Dulbecco's modified eagle's medium“
Bim	„Bcl-2 interacting mediator of cell death“	DMSO	Dimethylsulfoxid
BIR	„Baculoviral IAP Repeat“	DNA	„Desoxyribonucleic acid“
BIRC	„BIR containing proteins“	DNA _{mod}	Modifizierte DNA
bp	Basenpaare	DNA-PK _{cs}	katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase
BRUCE	„BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme“	DNA-RFC140	140 kDa-Untereinheit des DNA-Replikationsfaktors C
BSA	Rinderserumalbumin	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Bspw.	Beispielsweise	DR	„Death Receptor“
°C	Grad Celsius	DSRed	„Red fluorescent protein from <i>Discosoma sp.</i> “
C	Coulomb	DTT	Dithiothreitol
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
CaCl ₂	Kalziumchlorid	DZ	Durchflusszytometrie
CaMK-iV	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase IV	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
CaMKK	Calmodulin regulierte Protein Kinase Kinase	ER	Endoplasmatisches Retikulum
CARD	„Caspase recruitment domain“	ERK	„Extracellular signal-regulated kinase“
CD	„Cluster of differentiation“	et al.	<i>et alii</i>
CD95L	CD95-Ligand	Ex	Exon
CDK	„Cyclin dependent kinase“	FACS	„Fluorescence activated cell sorting“
cDNA	„complementary DNA“	FADD	„FAS-associated protein with death domain“
		FAK	„Focal adhesion kinase“
		FBS	„Fetal bovine serum“

FITC	Fluoresceinisothiocyanat	LB	Luria broth
FKHR	„Forkhead (Drosophila) homolog 1 (rhabdomyosarcoma)	LOH	„Loss of Heterozygosity“
Flip	„Flice inhibitory protein“	M	Molare Masse
g	Erdbeschleunigung	MAPK	„Mitogen activated protein kinase“
g	Gramm	MBP	„Myelin Basic Protein“
G	Tumorgrading	Mcl-1	„Myeloid leukemia sequence 1“
G418	Geneticin	MCM3	„Minichromosome maintenance protein 3“
GADD45	„Growth arrest and DNA-damage 1 inducible“	MDM2	„Murine double minute-2“
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	Mdr	„Multidrug resistance“
Gas2	„Growth arrest-specific gene product 2“	MEF	Murine embryonale Fibroblasten
GFP	„Green fluorescent protein“	MEKK-1	MEK-Kinase 1
Glut-4	Glukose-Transporter 4	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
GR	Glukokortikoid-Rezeptor	MgSO ₄	Magnesiumsulfat
GrzB	Granzym B	min	Minute
GST-c-Jun	Glutathion-S-Transferase-c-Jun	MLC	„Myosin light chain“
h	Stunde	ML-IAP	„Melanoma-IAP“
H ₂ O	Wasser	MnCl ₂	Manganchlorid
HA	Hemagglutinin	MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
HCl	Salzsäure	MR	Mineralkortikoid-Rezeptor
HDAC	Histon-Deacetylase	mRNA	„messenger RNA“
HEK	„Human embryonic kidney“	MSP	Methylierungs-spezifische PCR
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure	MSP58	„58 kDa microspherule protein“
	heteronukleäres Ribonukleoprotein U	Mst1	Säugetierhomolog der Ste20-Kinase (Hefe)
HIPK1	„Homeodomain interacting protein kinase 1“	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid
HIPK2	„Homeodomain interacting protein kinase 2“	n	Anzahl
HIPK3	„Homeodomain interacting protein kinase 3“	N.D.	Nicht determiniert
hnRNP-A1	heteronukleäres Ribonukleoprotein A1	N6-MTase	N-6-Methylasesignatur
hnRNP-C1/C2	Heteronukleäre Ribonukleoproteine C1 und C2	NaCl	Natrimchlorid
HRP	„Horseradish peroxidase“	NaF	Natriumfluorid
HSF1	„Heat shock factor 1“	NaOH	Natriumhydroxid
HSP27	„Heat shock protein 27 kDa“	NB	„Nuclear body“
Hsp90	„Heat shock protein 90 kDa“	NCBI	„National center for biotechnology information“
HtrA2	„High temperature requirement A“	ND10	„Nuclear domain 10“
IAP	„Inhibitor of apoptosis protein“	Neo ^R	Neomycin-Resistenz
iASPP	„Inhibitor of ASPP“	NF- κ B	„Nuclear factor- κ B“
IBM	„IAP-binding motiv“	NGF	„Nerve growth factor“
ICE	„Interleukin-1 β -converting enzyme“	NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
IFN	Interferon	NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
Ig	Immunglobulin	nt	Nukleotid
ILP2	„IAP-like protein 2“	NuMa	„Nuclear-mitotic apparatus protein“
IP	Immunpräzipitation	Nup153	153 kDa-Nukleoprotein
IPTG	Isopropylthiogalaktosid	OD	Optische Dichte
IRES	„internal ribosome entry side“	p.A.	<i>pro Analysis</i>
I κ B α	α -Isoform des Rel/NF- κ B Inhibitors	p21 ^{CIP/WAF1}	p21 kDa-Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen
JNK	„c-Jun N-terminale kinase“	p27 ^{KIP1}	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor (27 kDa)
Kan^R	Kanamycin-Resistenz	p28BAP31	Bcl-2-interagierendes Protein (28 kDa)
kDa	Kilodalton	p53	Tumorsuppressorprotein (53 kDa)
	Kinase 1	p59 ^{FYN}	Src-ähnliche Tyrosinkinase p59 FYN
KNTE	korrespondierendes Nierentubulusepithel	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
LAP2	„Lamin associated protein 2“	PAK2	p21-aktivierte Protein-Kinase
		PARP	„Poly-ADP-ribosyl-polymerase“
		Pax	„Paired box gene“
		PBMC	„Peripheral blood mononuclear cells“

PBS	„Phosphat buffered saline“	TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
PCR	„Polymerase chain reaction“	U	„Unit“
PE	Phycoerythrin	U1-70 kDa	70 kDa-Komponente des U1“small nuclear“ Ribonucleoproteins
PI	Propidiumjodid	UBF	„Upstream binding factor“
PITSLRE kinase	p34 ^{CD2} -ähnliche Proteinkinase	UbqCE NEDD4	„Ubiquitin-conjugating enzyme neural-expressed developmentally downregulated gene 4 protein“
PKB	Proteinkinase B	UICC	„International union against cancer“
PKC	Proteinkinase C	UTR	„untranslated region“
PKN	Proteinkinase N	UV	Ultraviolett
PML	„Promyelocytic leukemia protein“	V	Volt
PNK	Polynukleotidkinase	v	Volumen
POD	„PML-oncogenic domain“	VDAC	„Voltage-dependent anion channel“
PP2A	Proteinphosphatase 2A	vgl.	vergleiche
PRK2	„Protein kinase C-related kinase 2“	VHL	Von Hippel-Lindau (Syndrom)
proIL-16	Pro-Interleukin-16	w	„weight“
PT	Permeabilitäts-Transition	WB	„Western Blot“
pT	Tumorstadium	Wee1	Wee1 Kinase, Inhibitor von CDK2 und Cdc2
Puma	„p53 upregulated modulator of apoptosis“	WHO	„World health organisation“
Rabaptin-5	Rab5 GTPase-Effektorprotein	XIAP	„X-chromosome-linked IAP“
Rad51	Säugetierhomolog zu RecA	YFP	„Yellow fluorescent protein“
Raf1	Ras aktivierter/assoziierter Faktor 1	YT	„Yeast Trypton“
RAR α	„Retinoic acid receptor α “	z.B.	zum Beispiel
RasGAP	Ras GTPase-aktivierendes Protein		
Rb	Retinoblastoma-Genprodukt		
RbCl ₂	Rubidiumchlorid		
RCC	„Renal cell carcinoma“		
RE	Rohextrakt		
rel.	relativ		
RNA	„Ribonucleic acid“		
Rock I	Rho-assoziierte Kinase I		
RT	Raumtemperatur		
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR		
s	Sekunde		
S	Svedberg-Einheit		
SAF-A/hnRNP-U	„Scaffold attachment factor A“/		
SD	„standard deviation“		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
siRNA	„small interfering RNA“		
Smac	„Second mitochondrial-derived activator of caspase“		
SREBP	„Sterol responsive element binding protein“		
SRPp72	72 kD-Protein des “Signal recognition particle“		
STAT1	„Signal transducer and activator of transcription factor 1“		
SUMO	„Small ubiquitin-like modifier“		
Tab.	Tabelle		
TBS	„Tris buffered saline“		
TCA	Trichloressigsäure		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid		
TGF	„Transforming growth factor“		
TGF- β RII	TGF- β Rezeptor II		
T _m	Schmelztemperatur		
TNF	„Tumor necrosis factor“		
TNFR	TNF-Rezeptor		
TRAIL	„TNF-related apoptosis inducing ligand“		
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan		

Danksagung

Allen, die mich während meiner Promotion unterstützt haben, danke ich herzlich.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. H. E. Gabbert für die freundliche Aufnahme am Institut für Pathologie, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die sehr guten Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. C. D. Gerharz für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas, für die stete Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. W. Kunz für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. J. Ernst für die Übernahme des 2. Koreferats und als hauptamtlicher Betreuer meiner Arbeit zu fungieren.

Herrn Dr. C. Mahotka für die sehr gute Betreuung, die vielen anregenden Diskussionen und das Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Dr. H. Hanenberg für die Hilfe bei der Herstellung der stabilen Zelllinien.

Herrn Prof. Dr. P. P. Pandolfi, Herrn Prof. Dr. J. Landry, Herrn Dr. I. Schmitz, Herrn Dr. F. Essmann, Frau I. Seil und Herrn J. Liebmann für die Bereitstellung der Expressionsvektoren.

Frau Dr. W. Wetzel für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der konfokal-fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen.

Frau Dr. B. Andree für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Micro-Array Analysen (auch wenn die Ergebnisse nicht mehr in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt werden konnten).

Dem kompletten derzeitigen sowie ehemaligen Laborteam insbesondere Janine, Sigrid, Sandra, Verena und meinen damaligen „Mitreitern“ Thomas, Ercan und Jörg für die vielen Hilfestellungen und die super Atmosphäre im Labor, die so machen Frust-geladenen Tag erträglich gemacht haben. Darüber hinaus bedanke ich mich bei Janine für die kompetente Einführung in die FACS-Analyse.

Den „Jungs“ vom Biologen-Fußball insbesondere Jörg, Rutger und Christoph für die notwendige Ablenkung und die vielen anregenden Diskussionen...im Scotti's.

Meinen Freunden

Meinen Eltern für die in jeder Hinsicht großartige Unterstützung und den steten Rückhalt.

Und nicht zuletzt meiner Freundin Nina, die immer an mich geglaubt hat, mir die nötige Kraft gegeben hat und somit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat (♥).

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 01.03.2006

(Nils Wethkamp)