

**Lokalisation und Funktion von pro- und
antiapoptotischen Faktoren in
Abhängigkeit von verschiedenen
Apoptose-Induktoren**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Jörg Liebmann

aus Wuppertal

Düsseldorf, März 2007

Aus dem Institut für Molekulare Medizin, Forschungsgruppe Immunbiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Herr PD Dr. C.V. Suschek
Koreferent 1: Herr Prof. Dr. W. Kunz
Koreferent 2: Herr Univ.-Prof. Dr. H. Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 30.05.2007

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Publikationen:

1. C. Mahotka, J. Liebmann, M. Wenzel, C.V. Suschek, M. Schmitt, H.E. Gabbert, C.D. Gerharz (2002) *Differential subcellular localisation of functionally divergent survivin splice variants*. Cell Death Differ, Dec 9 (12), 1334-1342
2. Y. Yan, C. Mahotka, S. Heikhaus, T. Shibata, N. Wethkamp, J. Liebmann, C.V. Suschek, H.E. Gabbert, C.D. Gerharz and U Ramp (2004) *Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas*. Br J Cancer, Oct 4, 91 (7), 1349-1357

Poster und mündliche Vorträge:

1. J. Liebmann, C. Mahotka, V. Kolb-Bachofen, C.V. Suschek (2004) Non-enzymatic NO formation via UVA-induced decomposition of nitrite inhibits Caspase-3 activity. 9. NO-Forum der deutschsprachigen Länder, Mainz, Oct. 5-6
2. J. Liebmann, V. Kolb-Bachofen, C.V. Suschek (2005) Non-enzymatic NO formation via UVA-induced decomposition of nitrite results in caspase-independent apoptosis probably mediated by AIF. EJCB, March 84, Suppl. 55, 113
3. J. Liebmann, V. Kolb-Bachofen, C.V. Suschek (2005) UVA-induzierte Spaltung von Nitrit resultiert in Caspase-unabhängiger Apoptose die wahrscheinlich durch Apoptosis-Inducing-Factor (AIF) vermittelt wird. 10. NO-Forum der deutschsprachigen Länder, Köln, Oct. 6-7
4. J. Liebmann, V. Kolb-Bachofen, C.V. Suschek (2005) UVA-induzierte Spaltung von Nitrit resultiert in Caspase-unabhängigem Zelltod und Translokation des Apoptosis-Inducing-Factors (AIF). 11. Workshop „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung, Xanten, Dec. 8-10
5. J. Liebmann, A. Paunel-Görgülü, V. Kolb-Bachofen, C.V. Suschek (2006) Nitrite and nitrosothiol-derived NO is an important physiological signal during UV-irradiation in human skin. Nitric Oxide, June 14, 4, A13

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

Düsseldorf, den

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Apoptose.....	1
1.1.1 Physiologische Funktion.....	1
1.1.2 Morphologische Charakteristika.....	2
1.1.3 Caspasen.....	3
1.1.4 Mechanismen der Apoptoseinduktion.....	4
1.1.5 Feinregulierung apoptotischer Prozesse: Bcl-2 und IAP's.....	7
1.1.6 Inhibitoren der IAP's: Smac/DIABLO.....	10
1.1.7 Verbindung von Zellzyklus und Apoptose: Survivin.....	12
1.1.8 Caspase-unabhängige Apoptose: AIF.....	15
1.2 Stickstoffmonoxid (NO).....	18
1.2.1 Eigenschaften des NO-Radikals.....	21
1.2.2 NO und Apoptose.....	23
1.3 UV-Strahlung: Einfluss auf Physiologie und Pathophysiologie der Haut.....	25
1.4 Aufgabenstellung.....	28
 2. Material und Methoden.....	 29
2.1 Material.....	29
2.1.1 Chemikalien.....	29
2.1.2 Enzyme.....	29
2.1.3 Antikörper.....	30
2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze.....	30
2.1.5 Kits.....	31
2.1.6 Transfektionsagenzien.....	31
2.1.7 Puffer und Lösungen.....	31
2.1.8 Oligonukleotide.....	33

2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Zellkulturen.....	34
2.2.2 Zellzahlbestimmung und Wachstumskurven.....	34
2.2.3 Bestimmung lebender Zellen mittels Trypanblau.....	35
2.2.4 UVA-Bestrahlung.....	35
2.2.5 Quantifizierung apoptotischer Zellen.....	36
2.2.6 Quantifizierung nekrotischer Zellen.....	36
2.2.7 Immuncytochemische Untersuchungen mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern.....	36
2.2.8 Mikroskopische Analysen.....	37
2.2.9 Zell-Lyse und Proteinisolierung.....	37
2.2.10 SDS-PAGE.....	38
2.2.11 Western-Blot.....	38
2.2.12 Transfektionen.....	39
2.2.13 Cycloheximid Behandlung.....	39
2.2.14 RT-PCR und Real-Time PCR.....	39
2.2.15 Klonierungen.....	40
2.2.16 Nachweis nitrosierter Proteine mit Hilfe der Chemilumineszenzdetektion (CLD).....	41
 3. Ergebnisse.....	 43
3.1 Analyse der Smac/DIABLO Expression in verschiedenen Tumorstufen und Graden im humanen Nierenzellkarzinom (RCC).....	43
3.2 Funktion und Lokalisation von Survivin und seinen Spleißvarianten.....	45
3.2.1 Differentielle subzelluläre Lokalisation apoptotischer und antiapoptotischer Survivin Spleißvarianten.....	45
3.2.2 Unterschiedliche Proteinstabilität bei ectopisch exprimiertem Survivin-ΔEx3-EGFP und Survivin-EGFP.....	45
3.2.3 Subzelluläre Lokalisation der Survivin-Varianten während der Mitose.....	47

3.2.4	Zweigeteiltes nukleäres Lokalisationssignal (NLS) bei Survivin- ΔEx3: Implikationen für die subzelluläre Lokalisation.....	52
3.2.5	Deletionsanalyse des zweigeteilten NLS in Survivin-ΔEx3.....	54
3.2.6	Inhibition von UVA-induzierter Apoptose durch Survivin in HaCaT-Zellen.....	55
3.2.7	Verlust der antiapoptotischen Wirkung von Survivin durch die Anwesenheit von Nitrit während der Bestrahlung.....	57
3.3	Stickstoffmonoxid und Caspase-unabhängige Apoptose.....	59
3.3.1	Veränderter Kernphänotyp durch die Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit.....	59
3.3.2	Caspase-3 Inhibition <i>in vitro</i>	60
3.3.3	Zunahme nitrosierter Proteine durch photolytisch generiertes NO.....	62
3.3.4	Caspase-3 Inhibition <i>in vivo</i>	63
3.3.5	Spaltung von AIF (apoptosis-inducing-factor) durch photolytisch generiertes NO.....	65
3.3.6	NO-abhängige Translokation von AIF in den Nukleus.....	67
4.	Diskussion.....	70
4.1	Gestörte Balance der Expression von Smac/DIABLO und XIAP: Ursachen für die Therapieresistenz bei Nierenzell-Karzinomen (RCC).....	70
4.2	Unterschiedliche Proteinstabilität der Survivin-Varianten.....	71
4.3	Differentielle subzelluläre Lokalisation der Survivin Spleißvarianten.....	73
4.4	Zweigeteiltes nukleäres Lokalisationssignal (NLS): Auswirkungen auf die Lokalisation.....	74
4.5	Schützende Wirkung der Survivin-Expression bei UVA-induzierter Apoptose.....	76
4.6	Die schützende Wirkung von Survivin wird durch die Photolyse von Nitrit aufgehoben: Hinweise auf einen alternativen apoptotischen Signalweg!.....	77

4.7	Inhibition der Caspase-3-Aktivität <i>in vitro</i> durch photolytisch generiertes Stickstoffmonoxid.....	79
4.8	Inhibition von Caspasen in humanen Keratinozyten durch photolytisch generiertes NO führt zu einer AIF- vermittelten Form des Zelltodes.....	80
5.	Zusammenfassung/Abstract.....	84
6.	Literatur.....	86
7.	Abkürzungen.....	100
8.	Danksagung.....	103
9.	Lebenslauf.....	104

1. Einleitung

1.1 Apoptose

Die Tatsache, dass Zellen unter physiologischen Bedingungen absterben, beschrieb erstmals Carl Vogt im Jahr 1842. Er beobachtete sterbende Zellen im neuronalen System von Kaulquappen der Geburtshelferkröte. In den folgenden Jahrzehnten befassten sich noch viele Entwicklungsbiologen mit diesem Phänomen (Glücksmann, 1951). Doch erst Kerr und Kollegen prägten 1972 den Begriff „Apoptose“ (aus dem Griechischen: herausfallen), als sie die Morphologie von Leberzellen die Toxinen ausgesetzt waren beobachteten. Seitdem wird Apoptose als Überbegriff für den Zelltod mit dieser speziellen, von ihnen untersuchten Morphologie (Kerr *et al.*, 1972) verwendet.

1.1.1 Physiologische Funktion

Die Apoptose ist ein aktiver, Energie verbrauchender, physiologischer Prozess, der bei multizellulären Organismen essentiell für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase benötigt wird. Sie tritt während der Entwicklung und Morphogenese (Glücksmann, 1951; Saunders, 1966) auf, um unerwünschte Zellen zu entfernen (Hammar *et al.*, 1971). Sie dient weiterhin als Verteidigungsmechanismus, um infizierte, mutierte, oder geschädigte Zellen zu eliminieren. Viele Krankheiten stehen mit übermäßigem oder vermindertem Zelltod in Verbindung (AIDS, Autoimmunerkrankungen, Krebs). Beim Menschen werden in jeder Sekunde ungefähr 100.000 Zellen durch Mitose erschaffen und eine ähnliche Anzahl stirbt in dieser Zeit durch programmierten Zelltod.

1.1.2 Morphologische Charakteristika

Wird das Selbstmordprogramm der Zelle eingeleitet, durchläuft die Zelle einige grundsätzliche morphologische Veränderungen (Abbildung 1.1). Die Zelle rundet sich ab, die Membran wirft Bläschen („blebbing“), schrumpft zusammen („shrinkage“), und das Chromatin kondensiert. Biochemisch werden diese Veränderungen von einer Phosphatidylserin-Exposition auf der äußeren Zellmembran und der Aktivierung einer Endonuclease, die die genomische DNA in distinkte internucleosomale Fragmente spaltet, begleitet. Im Gegensatz dazu wird die klassische Nekrose durch traumatische Verletzungen oder hohe Exposition von Schadstoffen induziert. Sie ist durch die irreversible Schädigung der Plasmamembran, mitochondriale Dysfunktion und Zelllyse gekennzeichnet (Abbildung 1.1).

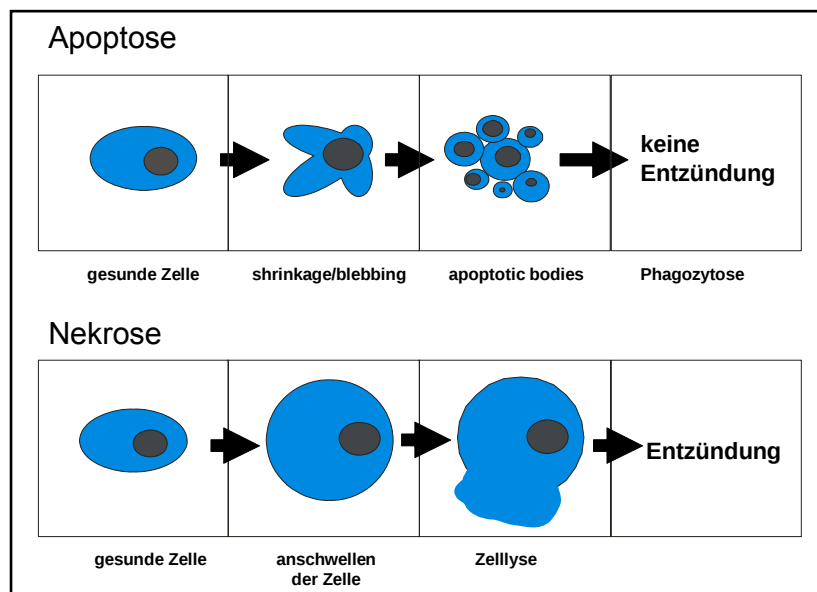


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der verschiedenen morphologischen Charakteristika von apoptotischen und nekrotischen Prozessen.

1.1.3 Caspasen

Caspasen sind Cystein-Proteasen und die zentralen Komponenten der Apoptose. Die morphologischen Veränderungen der Zelle während der Apoptose werden zum größten Teil von diesen Proteasen vermittelt. Sie sind homolog zueinander und Teil einer großen Proteinfamilie, den cystein aspartate-specific proteases (Caspasen) (Alnemri *et al.*, 1996). Sie treten evolutionär hoch konserviert auf und konnten in Vertebraten und Insekten bis hin zu Nematoden und Hydren nachgewiesen werden. (Budihardjo *et al.*, 1999; Cikala *et al.*, 1999; Earnshaw *et al.*, 1999).

Alle bekannten Caspasen besitzen ein Cystein im aktiven Zentrum und spalten ihre Substrate an Asp-X Bindungen (also nach einem Asparaginsäure Rest). Caspasen, einmal aktiviert, prozessieren selektiv ein eingeschränktes Kontingent von Substraten, was meist zur Inaktivierung dieses Substrats führt. Sie aktivieren aber auch bestimmte Proteine, z.B. durch Abspaltung von negativen Regulatordomänen anderer Caspasen (Abbildung 1.2) und setzen so eine Caspase-Kaskade in Gang. Je nach Funktion innerhalb der Kaskade werden die Caspasen als Initiator- oder Effektor-Caspasen bezeichnet. Zu den Initiator-Caspasen gehört unter anderem Caspase-8, die die Effektor-Caspase-3 proteolytisch aktiviert, welche dann wiederum ihre spezifischen Substrate spaltet.

Zu diesen Substraten zählen die Caspase-aktivierte DNase (CAD), Lamine, Proteine des Zytoskeletts, wie Fodrin und Gelsolin und verschiedene regulatorische Proteine, wie beispielsweise PAK-2, ein Mitglied der p21-aktivierten Kinase Familie (Buendia *et al.*, 1999; Kothakota *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1996; Rudel *et al.*, 1997; Wyllie, 1980). Der Abbau dieser Substrate ist für die meisten in Abbildung 1.1 beschriebenen morphologischen Veränderungen verantwortlich.

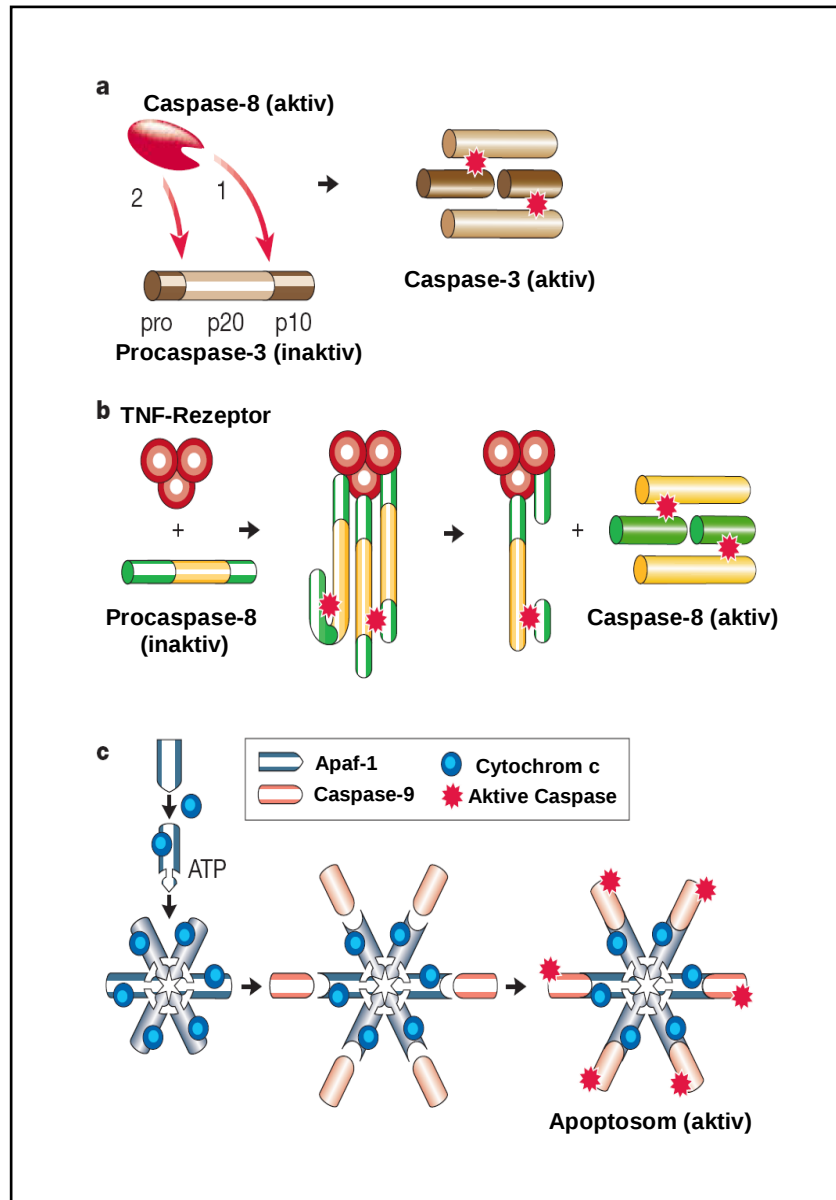


Abbildung 1.2: Aktivierungsmechanismen von Caspasen. **a)** Proteolytische Aktivierung durch eine Initiator-Caspase, die vorher aktiviert wurde. **b)** Aktivierung durch induzierte Nähe zu weiteren Molekülen dieser Caspase und autokatalytische Spaltung (z.B. Caspase-8). **c)** Aktivierung durch die Assoziation mit einer regulatorischen Untereinheit. Hier assoziiert Caspase-9 mit dem Co-Faktor Apaf-1 und wird im Komplex zusammen mit Cytochrom c aktiviert. (nach Hengartner, 2000)

1.1.4 Mechanismen der Apoptoseinduktion

Die Mechanismen der Apoptoseinduktion sind vielfältig und erfolgen z.B. über Oberflächenrezeptoren und ihre zugehörigen extrazellulären Liganden (Abbildung 1.3). Diese Rezeptoren sind in der Lage, zytotoxische

Signale in das Zytoplasma der Zelle zu vermitteln, wobei sie in den meisten Fällen noch ein breites Spektrum anderer Funktionen besitzen. Sie sind an der Induktion der Zellaktivierung, der Differenzierung oder der Proliferation beteiligt. Ob die ankommenden Signale Zelltod oder Aktivierung auslösen, ist stark vom Zustand und Typ der Zelle abhängig.

Zu den „Todesrezeptoren“ gehören z.B. CD95/Fas, TNF-R1 und TRAIL-R1 (Anderson *et al.*, 1997; Bodmer *et al.*, 1997; Nocentini *et al.*, 1997). Einer der am besten untersuchten Rezeptoren ist der CD95-Rezeptor, der zur Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Superfamilie gehört (Li-Weber *et al.*, 2003). CD95 wird auf der Zelloberfläche als Homotrimer exprimiert. Es vollzieht, aufgrund der Bindung seines spezifischen Liganden (CD95L) (Abbildung 1.3), eine Konformationsänderung und begünstigt so die Assoziation von zytoplasmatischen Adaptoren (Boldin *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1995; Itoh *et al.*, 1993; Siegel *et al.*, 2000). Die Interaktion dieser Adaptoren mit Caspase-8, einer Cystein-Protease, führt zur Bildung des *death-inducing-signaling-complex* (DISC) (Peter *et al.*, 2003). Eine effiziente DISC-Bildung legt den Grundstein für die Akkumulation dieser Cystein-Proteasen, die autoproteolytisch gespalten und aktiviert werden und so die Caspase-Kaskade in Gang setzten.

Apoptose kann aber auch zellintern ausgelöst werden (Abbildung 1.3), z.B. über die Mitochondrien (Ferri *et al.*, 2001). Diese sind nicht nur die Kraftwerke der Zelle und liefern die nötige Energie für das apoptotische Programm, sondern beinhalten auch eine Vielfalt proapoptotischer Faktoren, die aufgrund verschiedener Reize ausgeschüttet werden können. Zu diesen zählen der Verlust von Wachstumsfaktoren, Hypoxie, oxidativer Stress und DNA Schäden. Diese verschiedenen Reize lösen Signaltransduktionswege aus, die zur mitochondrialen Membran-Permeabilisierung (MMP) führen (Ferri *et al.*, 2001; Kroemer, 1997; Kroemer *et al.*, 1997). Eine MMP wirkt selektiv auf die innere sowie die äußere mitochondriale Membran (Martinou *et al.*, 2001; Zamzami *et al.*, 2001). Dabei wird die äußere Membran komplett durchlässig, was die Ausschüttung zytotoxischer Faktoren bedingt. Diese kontrollieren dann die Degradierungsphase der Apoptose. Zu den zytotoxischen Faktoren gehört Cytochrom c. In der intakten Zelle Teil der Atmungskette, wo es für den

Elektronentransfer zwischen Komplex III und IV verantwortlich ist, ist es während der Apoptose zusammen mit Apaf-1 ein wichtiger Co-Faktor bei der Aktivierung von Caspase-9 im Cytosol der Zelle. (Li *et al.*, 1997b). Caspase-9 spaltet nun wiederum andere Caspasen, unter anderem Caspase-3 und setzt so die schon beschriebene Caspase-Kaskade in Gang.

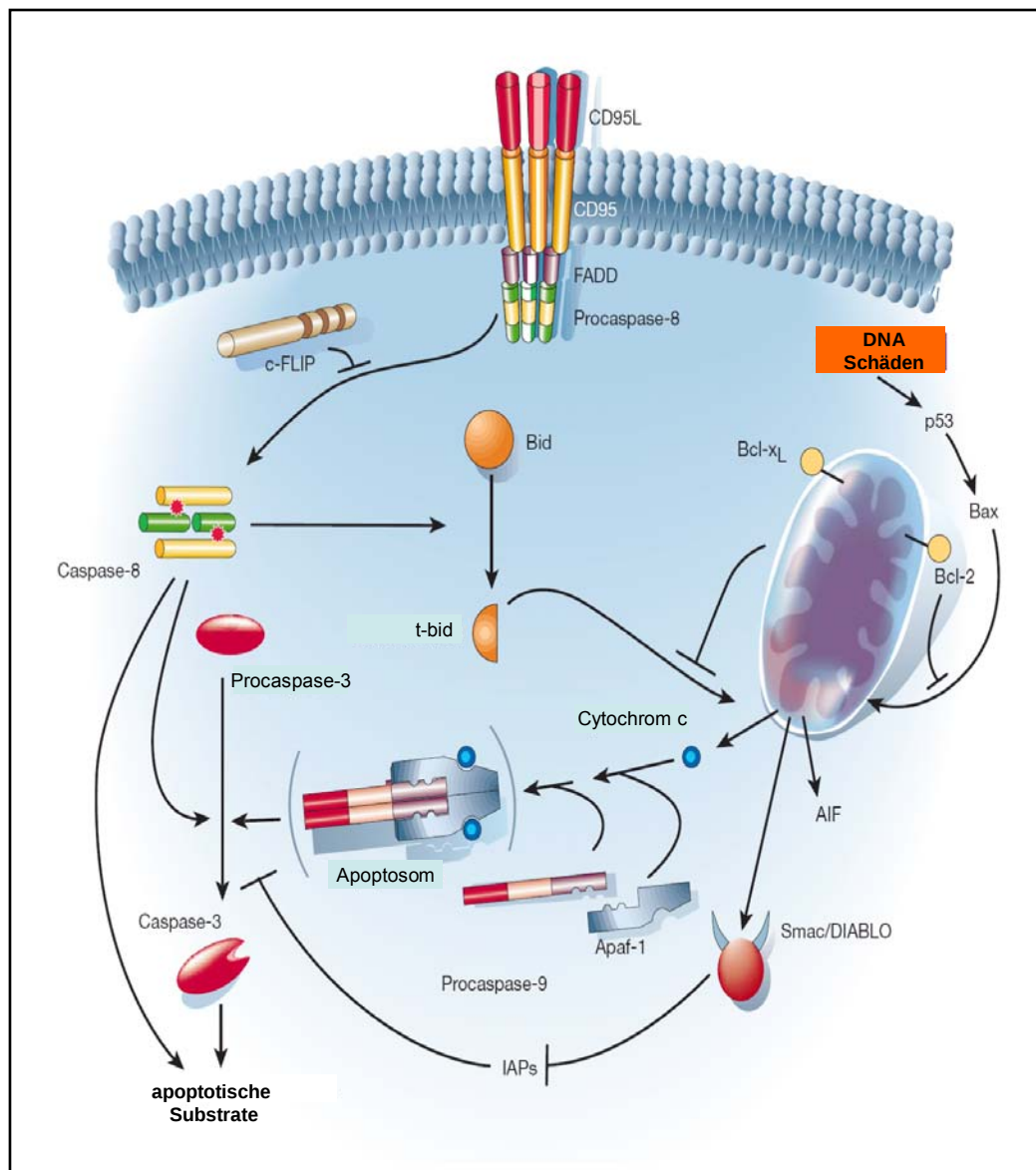


Abbildung 1.3: Mechanismen und Signalwege der Apoptoseinduktion. Apoptose kann durch Oberflächenrezeptoren, wie z.B. dem CD95-Rezeptor ausgelöst werden. Adaptermoleküle wie Fas (TNFRSF6)-associated via death domain (FADD) vermitteln die Bindung von Caspase-8, die dann autokatalytisch gespalten und aktiviert wird. Sie spaltet und aktiviert dann weitere Caspasen, was letztendlich zur Degradierung apoptotischer Substrate und zum Zelltod führt. DNA-Schäden lösen einen internen Signalweg aus, der zur Ausschüttung proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien führt und ebenfalls in der Aktivierung von Effektor-Caspasen und Zelltod resultiert. Verbunden sind beide Signalwege über das Protein Bid, das ebenfalls auf die Mitochondrien wirkt und die Ausschüttung proapoptotischer Faktoren begünstigt. (nach Hengartner, 2000)

1.1.5 Feinregulierung apoptotischer Prozesse: Bcl-2 und IAP's

Ein Prozess, der das Absterben bestimmter Zellen innerhalb eines Organismus auslöst, muss stringent kontrolliert werden. Die Regulation erfolgt auf unterschiedlichsten Ebenen der Zelle. Hierbei spielen die Neusynthese von Proteinen, die Expression verschiedener Proteasen als inaktive Proform, die Retention in verschiedenen Zellkompartimenten sowie die aktive Inhibition verschiedener proapoptotischer Faktoren eine entscheidende Rolle.

Die Protein-Protein-Interaktion besitzt hier eine wichtige Funktion bei einem Teil der Apoptose-Regulatoren, den Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilie (B-cell CCL/lymphoma 2) (Tsujimoto *et al.*, 1985). Sie wurden, basierend auf strukturellen und funktionellen Kriterien, in drei Gruppen eingeteilt. (Adams *et al.*, 1998; Antonsson *et al.*, 2000). Mitglieder der Gruppe I besitzen antiapoptotische Aktivität, Mitglieder der Gruppen II und III sind proapoptotisch (Abbildung 1.4).

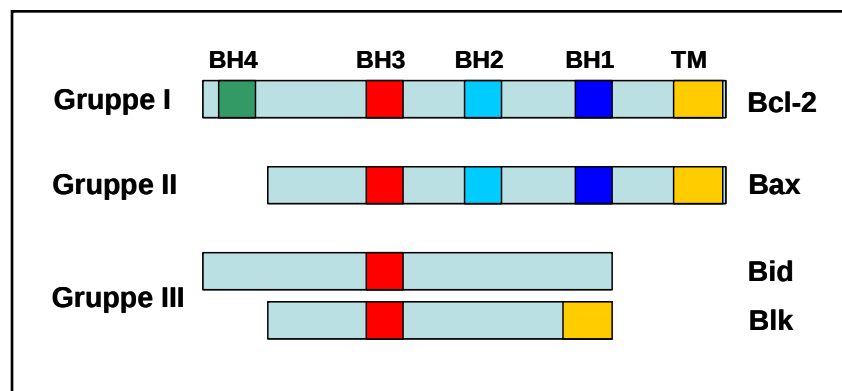


Abbildung 1.4: Einige Mitglieder der Bcl-2 Protein-Familie. Gruppe I Mitglieder sind antiapoptotisch, Mitglieder der Gruppe II und III sind proapoptotisch. BH: Bcl-2 Homologie Domäne; TM: Transmembran Domäne.

Die Feinregulation apoptotischer Prozesse durch diese Proteinfamilie erfolgt zum einen durch Homo- und Heterodimerbildung, um sich so in ihren Funktionen gegenseitig zu beeinflussen. Zum anderen wirken sie auch direkt auf die Mitochondrien und regulieren dort die Ausschüttung pro- und

antiapoptotischer Faktoren (Loeffler *et al.*, 2000; Muchmore *et al.*, 1996; Reed, 1997).

Eine weitere Klasse von Apoptose-regulierenden Proteinen sind die *inhibitor of apoptosis proteins* (IAP's). Diese Proteine wurden erstmals in Baculoviren beschrieben (Crook *et al.*, 1993) und anschließend in vielen

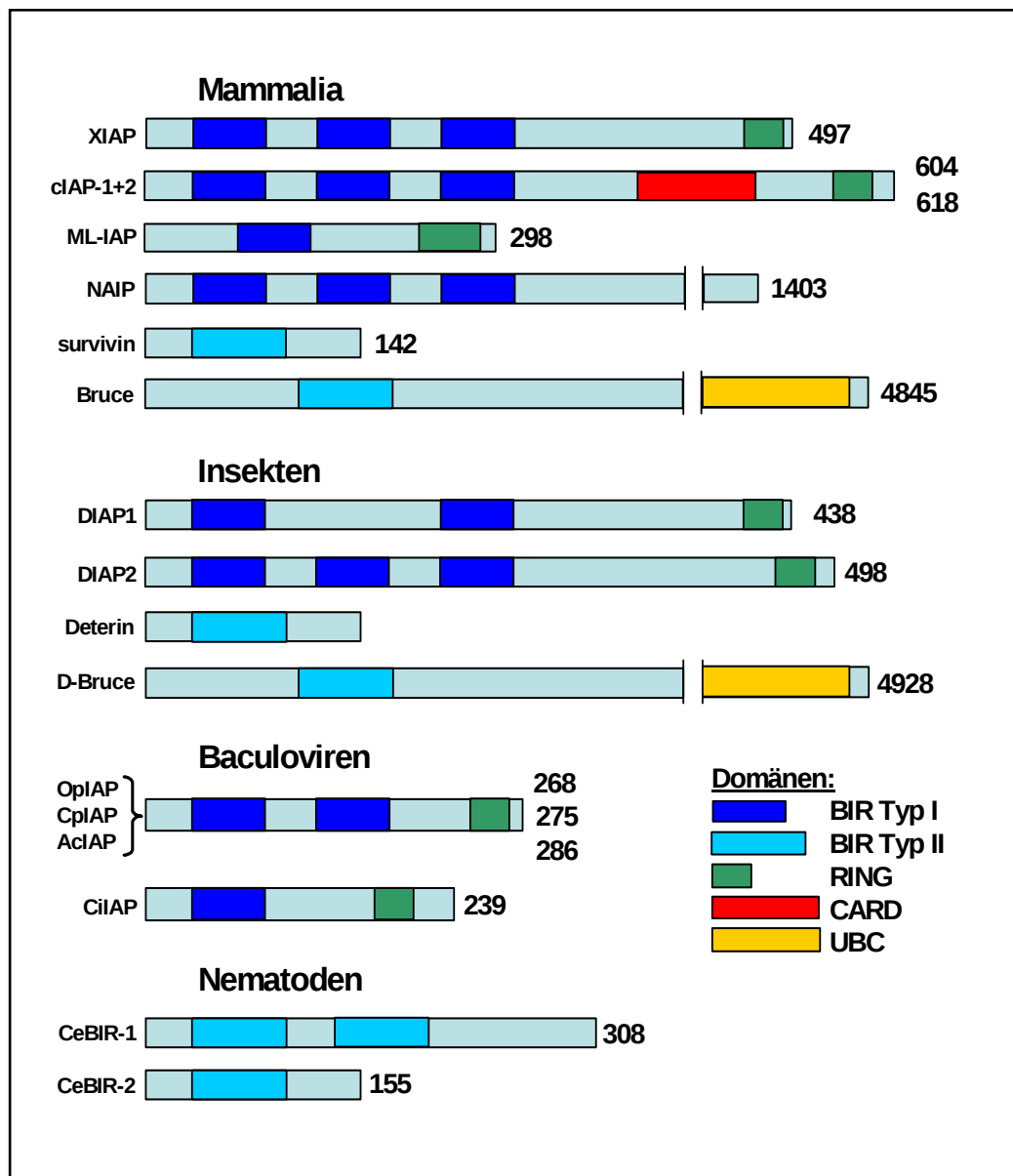


Abbildung 1.5: Strukturelle Charakteristika der IAP-Proteinfamilie. Diese Proteinfamilie ist hoch konserviert und konnte bis heute in Mammalia, Insekten, Baculoviren, Hefen und Nematoden nachgewiesen werden. Sie beinhalten ein bis drei BIR-Motive, die durch einen Zink-Finger charakterisiert sind. Weitere Domänen, die jedoch nicht allen IAP's gemeinsam sind, sind das RING-Motiv (*really interesting new gene*), die CARD-Domäne (*caspase recruiting domain*) sowie die UBC-Domäne (*ubiquitin conjugating domain*) (nach Verhagen *et al.*, 2001).

anderen Organismen von Insekten bis Vertebraten nachgewiesen (Abbildung 1.5) (Duckett *et al.*, 1996; Hay *et al.*, 1995; Rothe *et al.*, 1995; Uren *et al.*, 1996).

Alle IAP's enthalten ein bis drei *Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat* Motive (BIR), deren wichtigstes Charakteristikum ein von einem Histidin und drei Cysteinen koordiniertes Zink-Ion, ein so genannter Zink-Finger, ist (Hinds *et al.*, 1999). BIR's sind ungefähr 70 Aminosäuren lang und bestehen strukturell aus vier oder fünf α -Helices und einem β -Faltblatt, das den Zink Finger beinhaltet (Sun *et al.*, 2000). Diese BIR-Domänen vermitteln zusammen mit anderen strukturellen Domänen bei einigen IAP's die direkte Interaktion mit verschiedenen Caspasen und inhibieren sie auf diese Weise. Sie sind also für ihre antiapoptotische Funktion unerlässlich.

Eine zweite Domäne, die in fast allen IAP's im carboxyterminalen Teil gefunden wurde, ist die so genannte RING-Domäne (Abbildung 1.5). Sie besteht aus einem Set von invariablen, metallbindenden Resten (C_3H_4), die zwei Zink-Ionen koordinieren (Freemont, 1993). Bei *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP) und *cellular-IAP-1* (c-IAP-1) zeigen Analysen, dass diese Domäne Ubiquitin-Protein-Ligase-Aktivität besitzt und so die Selbst-Ubiquitinierung und nachfolgende Degradierung reguliert (Yang *et al.*, 2000). XIAP wird in vielen Geweben exprimiert (Liston *et al.*, 1996; Uren *et al.*, 1996). Es hat eine zytoplasmatische Lokalisation und inhibiert apoptotische Prozesse nach Induktion mit verschiedensten Stimuli. Zu diesen gehören ultraviolette Strahlung (UV), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Fas-Ligand (FasL) und verschiedene toxische Agenzien (LaCasse *et al.*, 1998). XIAP interagiert und hemmt sehr effizient aktive Caspasen, unter anderem Caspase-3, -7 und -9 (Deveraux *et al.*, 1999; Deveraux *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1998). Es wurde als direkter Interaktionspartner von Survivin identifiziert. Die Interaktion von Survivin mit XIAP führt zum Schutz dieser Proteine vor Ubiquitin/Proteasom vermitteltem Abbau (Dohi *et al.*, 2004). Auch die anderen IAP's wie c-IAP-1, *cellular-IAP-2* (c-IAP-2) und Mammalier-IAP (ML-IAP) wirken direkt oder indirekt über die Inhibition aktiver Caspasen.

Eine zweite Gruppe von IAP's, die nur eine BIR-Domäne enthalten, variiert in ihrer Struktur und Größe stark zu den schon beschriebenen. Zu

ihnen gehört Survivin/BIRC5, Bruce/BIRC6 bei den Säugern sowie BIR-1 und BIR-2 bei *C. elegans*, SpBIR1P und ScBIR1P in der Hefe und die Proteine dBruce und Deterin bei *D. melanogaster* (Ambrosini *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 1999; Hauser *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2000; Uren *et al.*, 1999) (Abbildung 1.5). Die Tatsache, dass Survivin-ähnliche IAP's in so stark variierenden Organismen und mit konservierter Funktion vorkommen, legt den Schluss nahe, dass sie eine der frühesten BIR-Proteine darstellen.

1.1.6 Inhibitoren der IAP's: Smac/DIABLO

Die Dysfunktion apoptotischer Prozesse spielt eine kritische Rolle während der Tumorgenese und Tumorprogression. Die Folge sind eine Akkumulation transformierender Mutationen und eine enorme Widerstandsfähigkeit gegenüber Chemotherapeutika. Vermittelt wird diese Resistenz in vielen Fällen von antiapoptotischen Faktoren, wie den IAP's.

Einer der Hauptantagonisten der IAP's ist das proapoptotische **Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low PI** (Smac/DIABLO) (Verhagen *et al.*, 2002). Es ist in den Mitochondrien lokalisiert und wird aufgrund eines apoptotischen Stimulus ins Zytosol entlassen. Dort wird es proteolytisch prozessiert. So kann es dann die inhibitorische Bindung von beispielsweise XIAP an verschiedenen Caspasen aufheben (Srinivasula *et al.*, 2001; van Loo *et al.*, 2002; Verhagen *et al.*, 2002). Es interagiert mit BIR2 und BIR3 von XIAP, obwohl es eine Präferenz für BIR3 aufweist. Das N-terminale Tetrapeptid von Smac/DIABLO ist dem N-terminalen Tetrapeptid der p12 Untereinheit von Caspase-9 sehr ähnlich und vermittelt die kompetitive Bindung an die BIR3 Domäne von XIAP. Genau wie bei der Verdrängung von Caspase-9 interagiert Smac/DIABLO mit der Linker-Region vor dem BIR2-Motiv von XIAP, um Caspase-3 und -7 kompetitiv zu verdrängen (Abbildung 1.6).

Die Inhibition der Apoptose durch IAP's scheint eine bedeutende Rolle bei der Tumorprogression zu spielen. Da XIAP und Smac/DIABLO Gegenspieler sind, ist anzunehmen, dass die Expression bzw. die Aktivität

beider Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorenstehung und Progression hat.

Es konnte belegt werden, dass es eine Zunahme der relativen XIAP mRNA-Expression in Korrelation mit der Tumorstufe im humanen Nierenzellkarzinom (RCC) gibt. Die relative mRNA Expression nimmt von frühen Tumorstadien (pT1) zu späten, fortgeschrittenen Tumorstadien (pT3) signifikant zu. Besonders die Tumore, die aus der Niere heraus metastasieren, zeigen eine deutlich erhöhte XIAP Expression, verglichen mit denen, die noch auf die Niere beschränkt sind (Yan *et al.*, 2004). Diese Korrelation besteht auch im Hinblick auf den Differenzierungsgrad und Typ dieser Tumore. Hier haben die gut differenzierten Tumore (G1+2) eine niedrigere XIAP Expression als die schlecht differenzierten (G3). RCC's des klarzelligen Typs mit einer schlechten Prognose haben eine deutlich erhöhte XIAP Expression (Yan *et al.*, 2004). Basierend auf dem Expressionsmuster von XIAP in diesen Tumoren liegt es nahe, auch die Expression von Smac/DIABLO in diesen RCC's zu untersuchen.

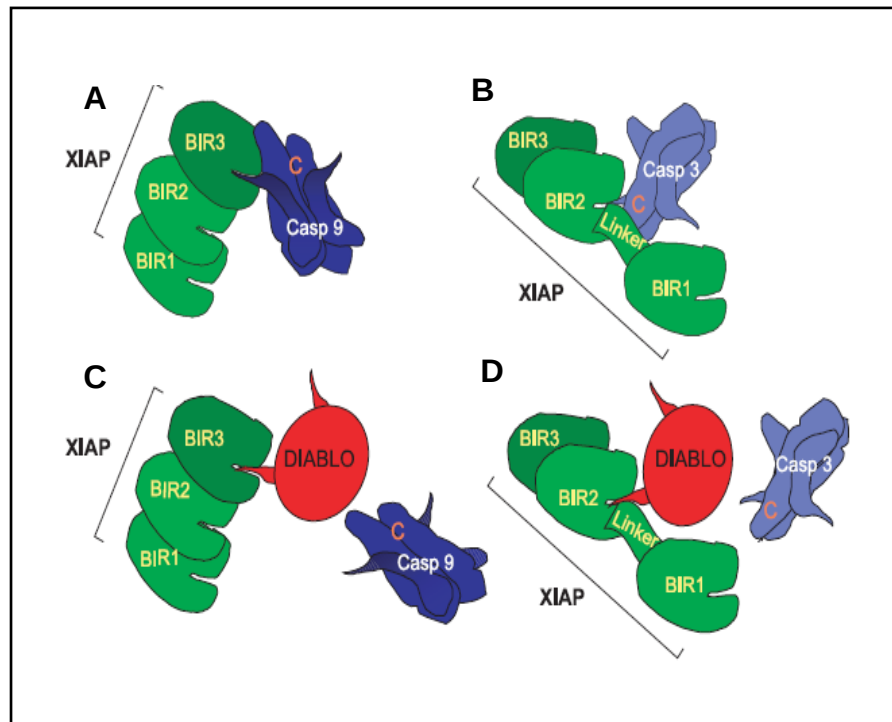


Abbildung 1.6: Kompetitive Bindung von Smac/DIABLO an XIAP. Das N-terminale Tetrapeptid von Smac/DIABLO bindet kompetitiv an dieselbe Stelle wie Caspase-9 und kann sie so verdrängen. Um Caspase-3 und -7 kompetitiv zu verdrängen, bindet Smac/DIABLO an die Linker-Region vor dem BIR2-Motiv. Die kompetitive Bindung von Smac/DIABLO an XIAP führt zum Verlust der Inhibition der Caspasen. Sie können nun ihre Substrate spalten und so die Apoptose ausführen. (nach Verhagen *et al.*, 2001)

1.1.7 Verbindung von Zellzyklus und Apoptose: Survivin

Survivin, das zur zweiten Gruppe der IAP's gehört (Abbildung 1.5), wurde ursprünglich als Apoptoseinhibitor beschrieben (Ambrosini *et al.*, 1997). In den letzten Jahren offenbarte sich jedoch, dass Survivin eine zweite Funktion besitzt und für die Regulation mitotischer Prozesse unerlässlich ist. Dies steht im Konsens mit den hochkonservierten Homologen von Survivin in der Hefe und *C. elegans*, die auch mitotische Regulatoren darstellen und deren BIR-Domäne die von Survivin widerspiegelt (Fraser *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1998; Uren *et al.*, 1999). Survivin ist ein 16,5 kD großes Protein und ist somit das kleinste Mitglied der IAP-Proteinfamilie in Säugetieren (Salvesen *et al.*, 2002). Das korrespondierende Gen lokalisiert auf Chromosom 17q25 beim Menschen

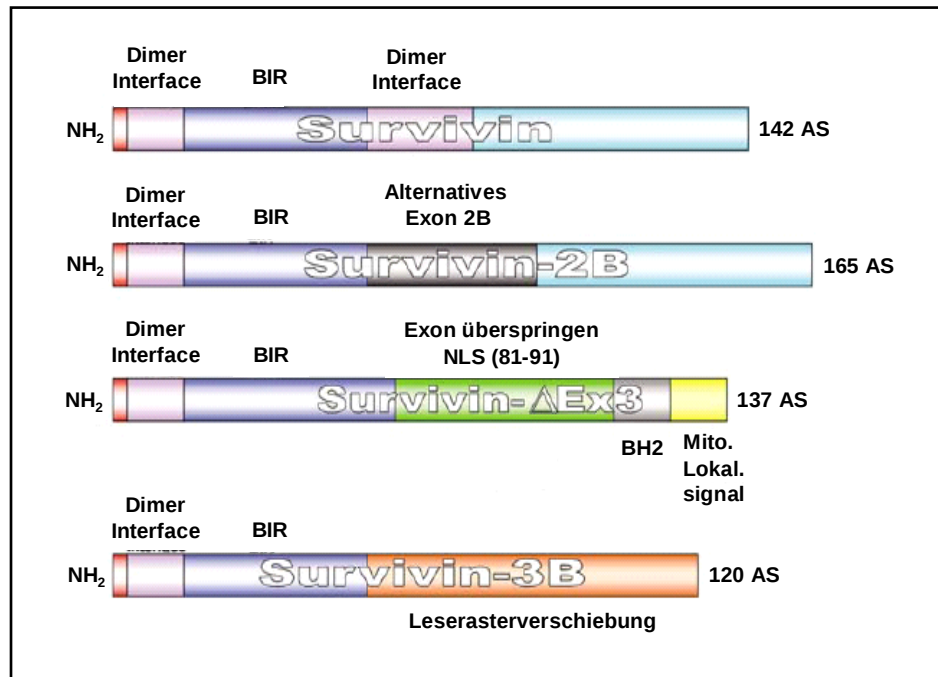


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Proteindomänenstruktur von Survivin, Survivin-2B, Survivin-ΔEx3 und Survivin-3B. Survivin-2B besitzt eine verkürzte BIR-Domäne durch die Insertion eines alternativen Exons (grau), jedoch dasselbe C-terminale Ende wie Survivin. Bei Survivin-ΔEx3 hingegen kommt es durch das Überspringen des Exons drei zu einer Leserasterverschiebung, was zu einem geänderten C-Terminus, verglichen mit dem von Survivin, führt. Hier findet sich nun ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS, grün) eine BH2-Domäne (grau) und ein mitochondriales Lokalisationssignal (gelb). Durch eine Leserasterverschiebung kommt es bei Survivin-3B zu einem frühzeitigen Stopp-Codon und einem veränderten C-Terminus (orange). (nach Caldas *et al.*, 2005)

(Li *et al.*, 1998) und auf Chromosom 11E2 bei der Maus (Li *et al.*, 1999). Das resultierende Protein besitzt nur eine BIR-Domäne und eine alpha-helicale coiled-coil Domäne am C-Terminus (Abbildung 1.7) (Ambrosini *et al.*, 1997). Röntgenstrukturanalysen des humanen (Chantalat *et al.*, 2000; Verdecia *et al.*, 2000) und des Mäuse-Proteins (Muchmore *et al.*, 2000) belegen, dass Survivin ein stabiles Homodimer bilden kann, wobei die C-terminalen alpha Helices aus dem Dimer herausragen.

Survivin konnte in *in situ* Hybridisierungs-Experimenten in einer Reihe fötaler Gewebe, in mitotisch aktiven adulten Geweben, wie Plazenta und Thymus, jedoch nicht in anderen adulten Geweben nachgewiesen werden (Adida *et al.*, 1998b).

Interessanterweise ließ sich eine Expression von Survivin in den meisten humanen Krebsarten, unter anderem in Karzinomen der Lunge, des Magens, des Darms, der Brust und Prostata sowie in nicht-Hodgkin

Lymphomen belegen (Ambrosini *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Krebszellen zu einem fötalen Survivin-Expressionsmuster zurückkehren. Dies könnte zur Resistenz gegenüber cytotoxischen Chemotherapeutika beitragen. Tatsächlich zeigen immunhistologische Studien in Neuroblastomen und Krebsarten des Verdauungssystems eine Korrelation zwischen Survivin-Expression und schlechter Patientenprognose (Adida *et al.*, 1998a; Kawasaki *et al.*, 1998).

Survivin wird strikt zellzyklusabhängig gebildet. Dies ist hauptsächlich auf seine transkriptionelle Kontrolle zurückzuführen und wird von mehreren *cell cycle dependent elements/cell cycle homology regions* (CDE/CHR) Boxen im Promotor des Survivin-Gens (Badie *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 1999), die als G1-Repressorelemente fungieren, gesteuert. Survivin wird aber auch posttranskriptional reguliert, z.B. über seine Proteinstabilität. Stark exprimiert in der G2/M Phase des Zellzyklus wird es nach Beendigung des Zellzyklus rasch über den Ubiquitin-Proteasomen Signalweg abgebaut und hat eine Halbwertszeit von nur 30 Minuten (Zhao *et al.*, 2000). Zusätzlich konnte belegt werden, dass die Phosphorylierung von Survivin an Thr34 durch den p34cdc2-Cyclin B1 Komplex entscheidend für die Stabilität und Funktion des Proteins ist. Phosphorylierungsdefekte Mutanten verlieren nicht nur ihr antiapoptotisches Potential, sondern wirken in Überexpressionstudien sogar proapoptotisch (Mesri *et al.*, 2001; O'Connor *et al.*, 2002).

Für Survivin existieren fünf alternative Spleißvarianten. Neben dem Wildtyp Survivin (142 AS) werden noch Survivin-2B (165 AS) durch Insertion eines kryptischen Exons in Exon 2, Survivin-ΔEx3 (137 AS) durch Verlust des dritten Exons, Survivin-3B (120 AS) durch Einfügen eines neuen Exons 3B und Survivin-2alpha (74 AS), das nur aus Exon 1 und Exon 2 besteht, gebildet (Abbildung 1.7).

Obwohl bei Survivin-ΔEx3 die BIR-Domäne verkürzt ist, ist sein antiapoptotisches Potential nach Apoptoseinduktion über den CD95-Rezeptor komplett erhalten. Survivin-2B hingegen, mit einer verlängerten BIR-Domäne, hat sein antiapoptotisches Potential verloren (Mahotka *et al.*, 2002b; Mahotka *et al.*, 1999). Kürzlich wurde ein neues antiapoptotisches Protein, das durch den offenen Leserahmen K7 des Kaposi-Sarcoma

assoziiertem Herpesvirus kodiert wird, entdeckt. Es spiegelt strukturell Survivin- Δ Ex3 wider (Wang *et al.*, 2002). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die antiapoptotische Wirkung dieser Spleißvariante.

Ob und wie die Expression der verschiedenen Spleißvarianten die Survivin Funktion reguliert, ist unklar, jedoch könnte die Heterodimerisierung der verschiedenen Varianten einen Mechanismus darstellen. Hier spielt wahrscheinlich auch die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der verschiedenen Survivin Formen eine entscheidende Rolle. Survivin-2B kann ausschließlich im Zytoplasma der Zelle nachgewiesen werden, wobei Survivin- Δ Ex3 nur im Nukleus der Zelle zu finden ist. Survivin wurde hauptsächlich als cytoplasmatisch lokalisiert beschrieben, konnte aber auch im Nukleus gefunden werden (Fortugno *et al.*, 2002). Hier ist Survivin ein so genanntes *Chromosomal-Passenger-Protein* und hat eine wichtige Funktion während der Zellteilung. Es bindet in der Prophase/Metaphase an die Centromere der Chromosomen und lässt sich an den Mikrotubuli der Teilungsspindel - der so genannten *Midzone* – während der Anaphase/Telophase nachweisen (Li *et al.*, 1998; Uren *et al.*, 2000). Es kolokalisiert dort mit anderen *Chromosomal-Passenger-Proteinen*, wie *inner-centromer-binding-protein* (INCENP) und *aurora kinase B* (Aurora B) (Bischoff *et al.*, 1999; Uren *et al.*, 2000). Andere Arbeitsgruppen fanden Survivin zusätzlich an den Kinetochoren der Teilungsspindel (Skoufias *et al.*, 2000). Die Eliminierung von Survivin resultiert in Zellteilungsdefekten.

1.1.8 Caspase-unabhängige Apoptose: apoptosis-inducing-factor (AIF)

Die Mitochondrien beinhalten Faktoren, die unabhängig von Caspasen den Tod der Zelle bewirken. Endonuclease G (EndoG) und apoptosis-inducing-factor (AIF) translozieren beispielsweise während der Apoptose von den Mitochondrien in den Nukleus und induzieren dort DNA-Fragmentierung.

AIF wurde erstmals 1996 als bioaktives, mitochondriales Protein erwähnt, das unabhängig von Caspasen, Apoptose induziert (Susin *et al.*, 1996; Zamzami *et al.*, 1996). Das AIF-Gen ist hoch konserviert zwischen Mensch und Maus mit einer Homologie von 92% (Susin *et al.*, 1999). Das unprozessierte AIF ist ein 67-kDa Protein, das in drei Domänen aufgeteilt werden kann: Die N-terminalen 100 Aminosäuren beinhalten eine mitochondriale Lokalisationssequenz (MLS), auf die folgt eine Platzhalter-Sequenz mit unbekannter Funktion und eine C-terminale Oxidoreduktase-Sequenz, die ebenfalls zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS) enthält (Abbildung 1.8).

Nach dem Import des unprozessierten Proteins ins Mitochondrium wird das N-terminale MLS abgespalten und es entsteht so das 57-kDa große,

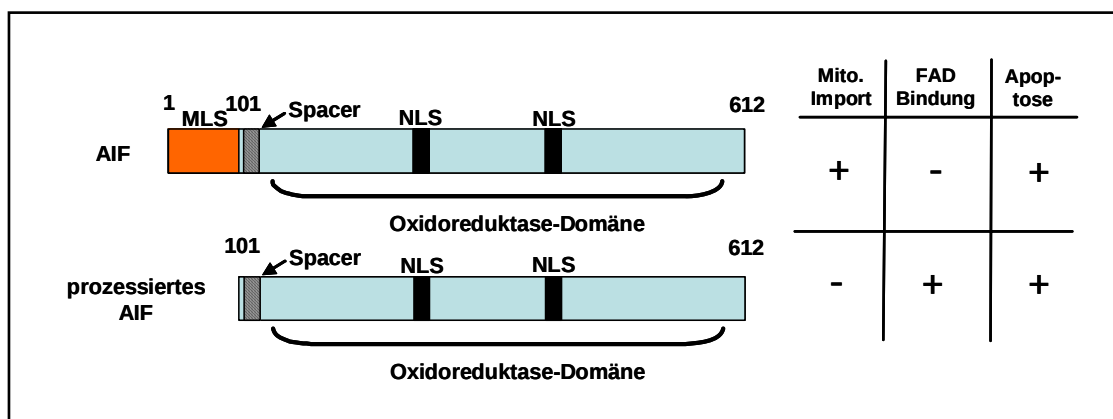


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des AIF-Proteins und seiner prozessierten Form. Nach dem Import in die Mitochondrien wird die mitochondriale Lokalisationssequenz (MLS) abgespalten. Erst in dieser Form kann AIF FAD binden. Experimente an isolierten HeLa-Zellkernen zeigten, dass beide Formen Zelltod auslösen können. Die Funktion der Platzhaltersequenz (Spacer) ist unbekannt. Die Oxidoreduktase-Domäne beinhaltet zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS)

prozessierte AIF. Auf einen apoptotischen Reiz hin transloziert AIF ins Zytosol sowie in den Nukleus und induziert dort periphere Chromatinkondensation und eine DNA Fragmentierung in ca. 50 kbp große DNA Stücke. Es wird angenommen, dass die mitochondrial-nukleäre Translokation von AIF eine universelle Charakteristik beim Zelltod von humanen und murinen Zellen darstellt. Sie führt zur ersten Stufe des apoptotischen Prozesses, charakterisiert durch eine wellenförmige Kontur des Zellkerns und eine eher unvollständige Chromatinkondensation.

Während dieser ersten Stufe ist die Cytochrom c-Ausschüttung noch unvollständig. Erst in der späteren, zweiten Stufe der nukleären Apoptose mit starker Chromatinkondensation und der Bildung der apoptotischen Körperchen werden beide mitochondrialen Faktoren gemeinsam ausgeschüttet. Die Anwesenheit von Caspase-Inhibitoren arretiert die nucleäre Apoptose in der ersten Stufe und legt die Schlussfolgerung nahe, dass diese Stufe Caspase-unabhängig ist und von AIF vermittelt wird.

Die Überexpression von Bcl-2 blockiert die Umverteilung von AIF in Säugerzellen. Dies liefert Hinweise auf die Beteiligung der mitochondrialen *permeability transition pore* (PTP) im Umverteilungsprozess dieses apoptogenetischen Faktors (Daugas *et al.*, 2000; Susin *et al.*, 1999; Susin *et al.*, 1996).

Wie Cytochrom c besitzt auch AIF eine zweite enzymatische Funktion, die nicht mit ihrem apoptotischen Potential in Verbindung steht. Da es stabil Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) binden kann, gehört es systematisch zu den Flavoproteinen. Darüber hinaus zeigt es Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase- (NAD(P)H) und Monodehydroascorbat-Reduktase-Aktivität. Zusätzlich ist es in der Lage, die Reduktion von Cytochrom c in Anwesenheit von NAD(P)H zu katalysieren (Miramar *et al.*, 2001). AIF ist eindeutig bifunktional, da es unabhängig von der An- oder Abwesenheit von FAD oder NAD(P)H nucleäre Apoptose induzieren kann (Abbildung 1.8). Dies belegt, dass die apoptotische und Oxidoreduktase-Funktion unabhängig voneinander sind (Miramar *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2002). Kürzlich wurde ein endogener Inhibitor von AIF beschrieben, nämlich das *heat shock protein* (Hsp) 70. Hsp70 interagiert physikalisch mit AIF und inhibiert seine apoptotische Funktion (Ravagnan *et al.*, 2001).

Die inzwischen ermittelte Kristallstruktur des humanen AIF zeigt, dass die Oberfläche des Proteins ein starkes positives elektrostatisches Potential aufweist (Ye *et al.*, 2002). Die elektrostatische Interaktion von AIF mit der DNA ist nicht von der Sequenz der DNA abhängig, aber essentiell für die proapoptotische Funktion des Proteins (Ye *et al.*, 2002). Wie AIF zur Kondensierung des Chromatins beiträgt, ist Gegenstand aktueller Forschung. Es wird angenommen, dass AIF aufgrund seiner DNA-Bindung als Gerüst für die Bindung weiterer Proteine fungiert, die zum so genannten

Degradosom sterbender Zellen gehören (Parrish *et al.*, 2003). Hier scheint die Bindung von Cyclophilin A an AIF eine entscheidende Rolle zu spielen, da diese Interaktion zu einer verstärkten proapoptotischen Aktivität von AIF führt (Cande *et al.*, 2004).

1.2 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Radikal, das als Signalmolekül vielfältige Funktionen in verschiedenen Geweben und Zellen ausübt. Es wird enzymatisch durch Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) oder durch den Zerfall von Nitrit und nitrosierten Proteinen gebildet.

Die NOS-Enzyme katalysieren in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und NADPH die Oxidation von L-Arginin zu äquimolaren Mengen NO und L-Citrulin (Abbildung 1.9/ A) (Alderton *et al.*, 2001; Stuehr *et al.*, 1991).

Drei NOS-Isoformen sind bekannt, wobei zwei der Enzyme konstitutiv exprimiert werden. Dazu gehören erstens die endotheliale NOS (eNOS) (Marsden *et al.*, 1992) sowie zweitens die neuronale NOS (nNOS) (Nakane *et al.*, 1993). Sie führen zur Synthese niedriger Konzentrationen (pM) von NO, das in diesem Fall als Signalmolekül fungiert. Die eNOS bedingt die Relaxation glatter Muskelzellen und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus (Ignarro *et al.*, 2001). Das durch die nNOS produzierte NO dient unter anderem als Neurotransmitter und reguliert so wichtige Funktionen des zentralen und peripheren Nervensystems (Bredt *et al.*, 1990). Die dritte Isoform der NO-Synthasen ist induzierbar (iNOS) und wird nicht konstitutiv exprimiert. Induktoren sind unter anderem proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β und INF- γ), Lipopolysaccharide (LPS) (Liew *et al.*, 1991) oder UV-Strahlung (Kuhn *et al.*, 1998). Die iNOS produziert über einen Zeitraum von wenigen Stunden bis hin zu mehreren Tagen hohe NO-Konzentrationen (μ M) (Drapier *et al.*, 1988).

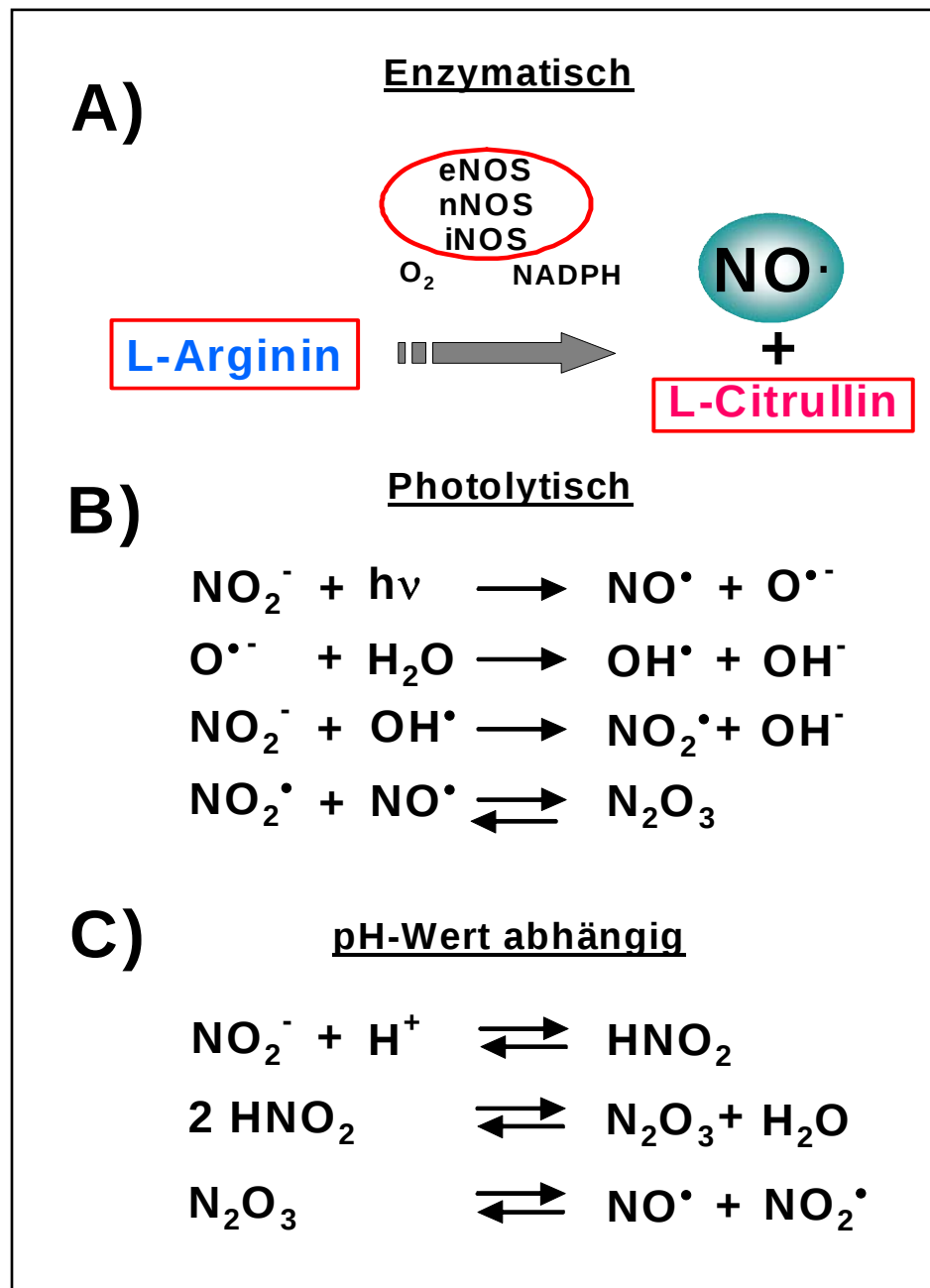


Abbildung 1.9: **A)** Enzymatische Stickstoffmonoxid (NO) Bildung durch die Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS). Sie katalysieren die Oxidation von L-Arginin zu NO und L-Citrullin unter Verbrauch von Sauerstoff und NADPH. Die endotheliale NOS (eNOS) und die neuronale NOS (nNOS) werden konstitutiv gebildet. Die Expression der induzierbaren NOS (iNOS) wird durch verschiedene Faktoren, wie proinflammatorische Zytokine oder UVA-Strahlung, vermittelt.

B) Mechanismus der UVA-induzierten Photolyse von Nitrit. Die Reaktion von Nitrit Ionen und Licht (360nm) führt zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO[•]) und einem Sauerstoff-Anion-Radikal (O^{•-}). In wässriger Lösung reagiert das Sauerstoff-Anion-Radikal mit Wasser und bildet so das hoch reaktive Hydroxylradikal (OH[•]) und ein Hydroxyl Anion (OH⁻). Ist Nitrit im Überschuss vorhanden, reagiert es mit dem Hydroxylradikal, und es entsteht OH⁻ und das sehr reaktive Stickstoffdioxid Radikal (NO₂[•]), das schnell mit NO Di-Stickstoff Trioxid bildet.

C) In wässriger Lösung liegt das Nitrit-Anion (NO₂⁻) in einem Gleichgewicht mit seiner konjugierten Säure, der salpetrigen Säure (HNO₂), vor. Wegen dieses Gleichgewichts ist ständig eine kleine Menge HNO₂ vorhanden, die wiederum im Gleichgewicht mit Di-Stickstoff Trioxid (N₂O₃) steht. Dieses homolysiert zu NO[•] und NO₂[•]. Unter sauren Bedingungen wird das Gleichgewicht verschoben und führt zur vermehrten Bildung von NO[•] über das Zwischenprodukt N₂O₃.

1955 beobachtete Furchgott eine Relaxation von glatter Gefäßmuskulatur (Furchgott, 1955) in Anwesenheit von Tageslicht. Diese Photorelaxation ist mit einer Zunahme der cyclischen Guanosinmonophosphat-Bildung (cGMP) (Karlsson *et al.*, 1984) verbunden und wird nicht durch NOS-Inhibitoren beeinflusst (Matsunaga *et al.*, 1989). Diese Experimente lieferten erste Hinweise, dass der beobachtete Effekt auf den Zerfall einer photolabilen Substanz in der Gefäßwand zurückzuführen ist, die NO freisetzt. Hier zeigte sich schnell, dass unter anderem S-Nitrosothiole (RS-NO) als ein solcher NO-Speicher in Frage kommen. Sie weisen ein UV-Absorptionsmaximum bei 330-340 nm auf und werden photolytisch gespalten. Dies bewirkt eine Freisetzung von NO (Wood, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Weitere Moleküle, die als NO-Speicher in Frage kommen, sind z.B. N-Nitrosamine (RN-NO, Abs._{max}: 340-390 nm) (Rao, 1981), Eisen-Schwefel Nitrosylkomplexe (Abs._{max}: 360-370 nm) (Bourassa, 1997) und Nitrosylmyoglobin (MbNO, Abs._{max}: 420-422 nm) (Kharitonov, 1996).

Einen weiteren Kandidaten für einen solchen NO-Speicher stellt Nitrit dar (Abbildung 1.9/ B). Es tritt extra- bzw. intrazellulär in jedem biologischen System auf und hat ein Absorptionsmaximum von 354-399 nm (Jankowski, 1999). In verschiedenen Experimenten wurde belegt, dass die Photorelaxation durch die Gabe von Nitritlösungen verstärkt wird (Furchgott, 1991; Wigilius *et al.*, 1990). 2003 bewiesen Suschek *et al.* erstmals, dass Nitrit durch UVA-Strahlung zu bioaktivem NO zerfällt und eine vergleichbare Wirkung hat wie das enzymatisch gebildete (Paunel *et al.*, 2005; Suschek *et al.*, 2005; Suschek *et al.*, 2003). Der Hauptunterschied zum enzymatisch gebildeten NO ist, dass bei dieser Reaktion gleichzeitig reaktive Sauerstoffverbindungen entstehen (Abbildung 1.9/ B), die, wie NO auch, zur Bildung sekundärer Reaktionsprodukte führen. Hier spielt die Oxidierung und Nitrosierung verschiedenster Proteine eine entscheidende Rolle. Nitrit kann aber auch pH-Wert abhängig reduziert werden (Abbildung 1.9/ C) und unter sauren Bedingungen NO freisetzen. Es hat besonders unter ischämischen Bedingungen eine physiologische bzw. pathophysiologische Bedeutung (Benjamin *et al.*, 1994; Lauer *et al.*, 2001; Lundberg *et al.*, 1994). Nitrit steht hier bei einer Ischämie-induzierten Azidose als Quelle für

NO zur Verfügung, da unter diesen sauerstoffarmen Bedingungen die enzymatische NO-Produktion gehemmt wird, weil das NOS-Enzym sauerstoffabhängig ist. Das entstehende NO reguliert die lokale Durchblutung während einer Ischämie, Hypoxie und in Zeiten erhöhter metabolischer Aktivität. Es gewährleistet so die Regeneration der Energie- und Sauerstoffvorräte (Guyton, 1996).

1.2.1 Eigenschaften des NO-Radikals

NO ist ein anorganisches Gas, das in wässrigen Lösungen gut löslich ist (bis 2 mM) und daher in biologischen Systemen, wo es im μM -Bereich vorkommt, in gelöster Form vorliegt. Es reagiert hauptsächlich mit ungepaarten Elektronen, also z.B. mit Metall-Ionen oder molekularem Sauerstoff. Es kann als ungeladenes, lipophiles Molekül frei durch Zellen diffundieren, wobei auch die Zellmembran keine Barriere darstellt. Es besitzt eine Halbwertszeit von mehreren Sekunden und ist damit - verglichen mit anderen Radikalen - nicht sehr reaktiv (Moncada *et al.*, 1991).

Unter aeroben Bedingungen reagieren zwei Moleküle NO mit einem Molekül Sauerstoff zu den Oxidationsprodukten Nitrit und Nitrat. Diese Reaktion läuft über so genannte Reaktive-Stickstoff-Spezies (RNS), wie z.B. $\text{NO}_2^\bullet$, N_2O_3 und N_2O_4 ab, die eine weit höhere Reaktivität als NO selber aufweisen. Hier ist die Konzentration des produzierten NO's entscheidend, denn je höher die NO Konzentration ist, umso wahrscheinlicher ist die Bildung dieser RNS. Diese RNS können ebenfalls mit verschiedenen Substraten reagieren und sind so ebenfalls Signalmoleküle.

Die biologischen Effekte von NO sind vielfältig und lassen sich in direkte (von NO selbst vermittelt) und indirekte (von RNS vermittelt) unterteilen (Wink *et al.*, 1998). Direkte Effekte sind relativ schnelle Reaktionen, die bei geringen NO-Konzentrationen ablaufen, wobei das NO z.B. direkt mit der Eisengruppe von Häm-Proteinen reagiert und dadurch die Enzymaktivität moduliert. Hier ist die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) ein Beispiel für eine solche Reaktion (Abbildung 1.10) (Lowenstein *et al.*, 1992; Nathan *et al.*, 1994).

NO reguliert Enzyme auch negativ. Am Beispiel der Cytochrom c-Oxidase konnte gezeigt werden, dass NO hier an das katalytische Zentrum bindet und so die mitochondriale Atmungskette unterbricht. Es reguliert somit auch den Sauerstoffverbrauch und die ATP Produktion (Haddad *et al.*, 1996; Stamler, 1994).

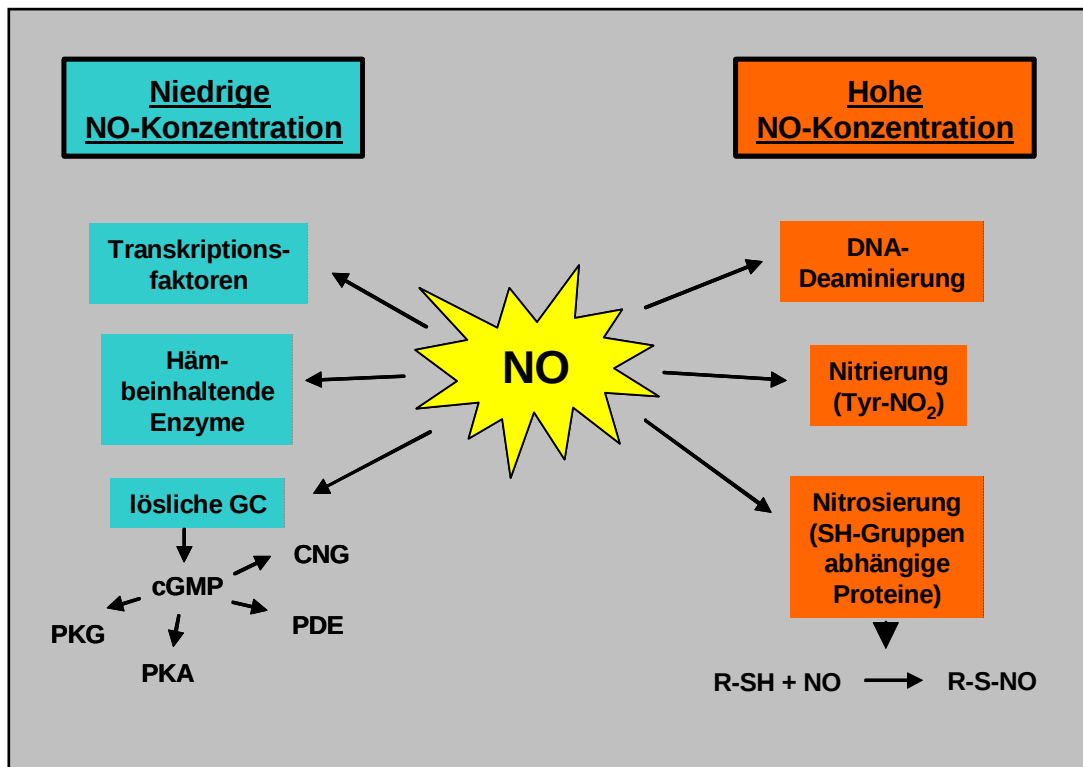


Abbildung 1.10: Differenzielle Wirkmechanismen niedriger und hoher Konzentrationen von Stickstoffmonoxid (NO). Niedrige Konzentrationen wirken beispielsweise auf die lösliche Guanylat-Zyklase (sGC) und führen zu einem Anstieg der cGMP Konzentration. Hohe Konzentrationen werden für DNA-Schäden und die Modifizierung verschiedener Proteinreste verantwortlich gemacht.

Bei hohen Konzentrationen von NO kann die Proteinaktivität auch über Nitrosierung gesteuert werden, wobei der Nitrosierungsprozess in der Regel nicht direkt von NO, sondern von seinem Reaktionsprodukt N_2O_3 vermittelt wird. Hierbei wird ein Nitrosonium-Ion (NO^+) auf Thiol- oder Amin-Reste, die oft essentiell für die enzymatische Aktivität verschiedener Proteine sind, übertragen. Dies bewirkt die Bildung von S-Nitrosothiolen oder N-Nitrosaminen (Williams, 1988). Die S-Nitrosierung einer Vielzahl von Proteinen stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus dar (Abbildung 1.10) (Stamler *et al.*, 2001). Sie ist reversibel und reguliert z.B. die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren und ist somit an der

Signaltransduktion beteiligt. Hier bewirkt die Nitrosierung der so genannten Zink-Finger, die die DNA-Bindung dieser Faktoren vermitteln, eine Freisetzung des koordinierten Zink²⁺-Ions. Ohne dieses Zink²⁺-Ion kann der Transkriptionsfaktor nicht mehr an die entsprechenden DNA-Elemente binden, um die Transkription spezifischer Proteine zu induzieren (Kröncke *et al.*, 1994; Tabuchi *et al.*, 1994). S-Nitrosierte Proteine sind auch ein Speicher für NO, da die reversible Bindung unter bestimmten Bedingungen wieder zerfällt, und das gebundene NO freigesetzt wird (Kröncke *et al.*, 1997).

Die Tatsache, dass NO ein multifunktionales Molekül ist, zeigt sich vor allen Dingen in seiner Eigenschaft in hohen Konzentrationen oxidativen oder nitrosativen Stress auszulösen. Hierbei entsteht beispielsweise Peroxinitrit (ONOO⁻) durch die Reaktion des Sauerstoffanionradikals mit NO. Dieses Molekül ist hochreaktiv. Es oxidiert und nitriert eine Vielzahl von Molekülen und Proteinen und verändert somit deren Funktionen (Kröncke *et al.*, 1997; Wink *et al.*, 1998). So ließ sich beweisen, dass die Deaminierung der N-nitrosierten DNA-Basen durch RNS, wie Peroxinitrit, zu Strangbrüchen und DNA-Mutationen führt, was wiederum in einer erhöhten p53 Expression resultiert (Messmer *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1992). Weiterhin wurde belegt, dass hohe NO-Konzentrationen in Makrophagen, Thymozyten und Lymphozyten Apoptose induzieren (Fehsel *et al.*, 1995). Unter anderen Umständen wirkt NO protektiv. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass NO sowohl durch die Nitrosierung von Caspasen (Dimmeler *et al.*, 1997a) als auch durch die Induktion von Bcl-2 und Repression von Bax sowie die Inhibition der Lipidperoxidation bei UVA-induziertem Zelltod (Suschek *et al.*, 2001; Suschek *et al.*, 1999) antiapoptotisches Potential besitzt.

1.2.2 NO und Apoptose

Heutzutage wird angenommen, dass die Mitochondrien ein Hauptziel bei der NO-vermittelten Apoptose darstellen. Dabei gibt es drei Mechanismen, die relevant für apoptotische Prozesse sind: 1. die Inhibition

der mitochondrialen Atmungskette, 2. die Stimulation der Superoxid-, Wasserstoffperoxid- und Peroxinitrit-Produktion und 3. eine Induktion der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran (*mitochondrial permeability transition*: MPT). Dabei inhibiert NO im nanomolaren Bereich direkt die Atmungskette durch eine selektive, aber reversible Inhibition der Cytochrom c-Oxidase. Entstehende Reaktive-Stickstoff-Spezies hemmen unselektiv und irreversibel verschiedene mitochondriale Komponenten (Brown, 1999; Brown, 2001; Brown *et al.*, 1994; Cassina *et al.*, 1996).

Die MPT Induktion erhöht die Permeabilität für kleine Moleküle dramatisch und gipfelt in der Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und dem Verlust der ATP-Produktion. Dies endet in apoptotischem oder nekrotischem Zelltod (Bernardi *et al.*, 2001; Borutaite *et al.*, 2000; Crompton, 1999; Halestrap, 1999). Welche Art des Zelltodes eingeleitet wird, ist stark vom Zelltyp und verschiedenen weiteren Faktoren, wie z.B. der Aktivierung von proapoptotischen Bcl-2 Proteinen oder der ATP Verfügbarkeit abhängig. Eine ATP-Depletion löst wahrscheinlich eher Nekrose aus (Chai *et al.*, 2000). Die Ausschüttung von Cytochrom c, AIF oder Smac/DIABLO induziert eher Apoptose. Es gibt auch Hinweise, dass RNS direkt die Thiole des Adenin-Nucleotid-Translocators, eine Schlüsselkomponente der MPT-Pore, oxidieren (Vieira *et al.*, 2001).

In den letzten Jahren wurde NO vermehrt mit Zelltod in Verbindung gebracht, der nicht von Caspasen vermittelt wird. Ein Beispiel hierfür sind die Pathogenesen verschiedener akuter und chronischer neurodegenerativer Erkrankungen. Hier scheint die Überproduktion von NO zu einer Calcium vermittelten Aktivierung von Calpainen zu führen. Dies resultiert dann in der Freisetzung von AIF und Cytochrom c aus den Mitochondrien und anschließendem Zelltod. Eine Caspase-Aktivierung konnte in diesem Prozess nicht nachgewiesen werden (Volbracht *et al.*, 2005). In einem Modell von sich entwickelnden Oligodendrozyten führte die Exposition von NO in hohen Dosen zu mitochondrialer Dysfunktion und Zelltod. Auch hier wurden keine Anzeichen für Caspase-Aktivierung gefunden, jedoch kam es zu einer Umverteilung von AIF in den Zellkern (Baud *et al.*, 2004).

1.3 UV-Strahlung: Einfluss auf Physiologie und Pathophysiologie der Haut

Sonnenlicht besteht aus einem breiten Spektrum elektromagnetischer Strahlung, das sich aus sichtbarem Licht, langwelliger infrarot Strahlung (IR) und kurzwelliger ultravioletter Strahlung (UV) zusammensetzt. Der Anteil der UV-Strahlung beträgt nur 5%, ist jedoch für viele biologische Prozesse verantwortlich. Die UV-Strahlung kann weiter in drei Bereiche unterteilt werden: kurze Wellenlängen (< 280 nm, UVC), UVB (280-320 nm) und lange Wellenlängen (320-400 nm, UVA). Da das Ozon unserer Stratosphäre Strahlung der Wellenlängen unter 290 nm komplett absorbiert, ist die humane Haut nur UVB- und UVA-Strahlung ausgesetzt. Dabei ist die Menge der UVA-Strahlung, die die Erdoberfläche erreicht, 20 Mal größer als

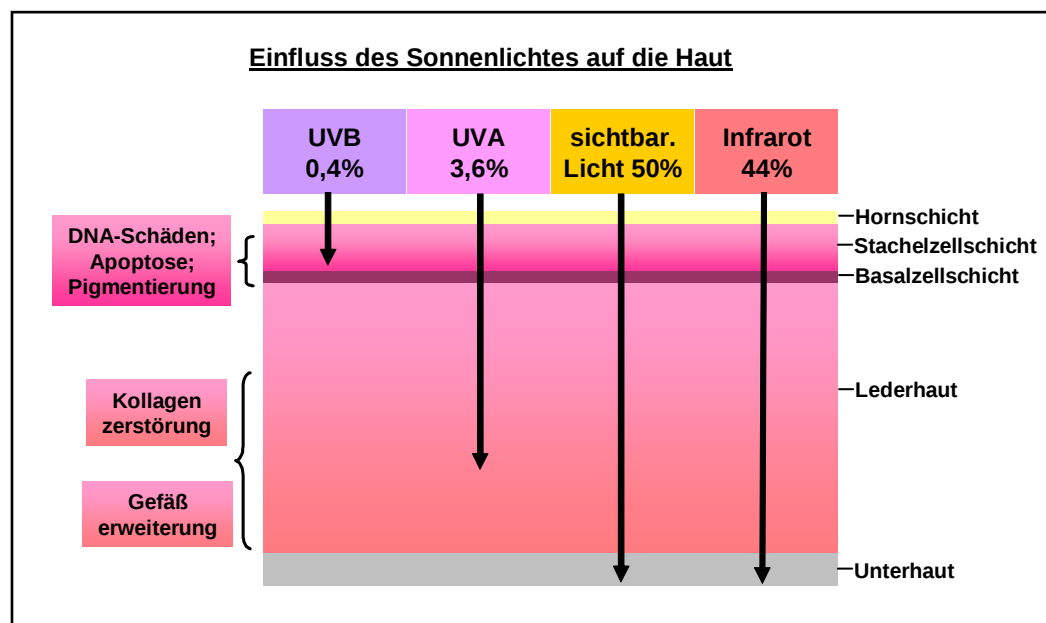


Abbildung 1.11: Einfluss des Sonnenlichtes auf die Haut. Die verschiedenen Anteile des Sonnenlichtes beeinflussen unterschiedliche Schichten der Haut. UVB-Strahlung dringt nur etwa 0,5 mm tief in die Haut ein und erreicht so nur die oberen Hautschichten. UVA-Strahlung hingegen dringt bis zu 1 mm tief in die Haut vor und erreicht somit alle Zelltypen der Haut.

die der UVB-Strahlung. UVB-Strahlung dringt etwa 0,5 mm tief in die Haut ein, wohingegen die UVA-Strahlung bis zu 1 mm tief in die Haut eindringt und somit alle Zelltypen der Epidermis und Dermis erreicht (Abbildung 1.11)

(Grether-Beck *et al.*, 1997). Mit Ausnahme der Bildung von Vitamin-D3 in der Haut sind beinahe alle bekannten Effekte der UV-Strahlung Ausdruck eines molekularbiologischen Schadens.

Ein neuzeitliches Phänomen ist der Abbau der Ozonschicht, die unsere Erde vor dem Einfluss schädlicher Strahlung schützt. Hierdurch nimmt die UV-Strahlung auf der Erdoberfläche zu. So kommt es in unserer Haut, die ständiger UV-Strahlung ausgesetzt ist, vermehrt zu Schäden durch diese Strahlungszunahme. Hier nimmt besonders die Bildung von radikalen Sauerstoffspezies (ROS), die sowohl durch UVA- als auch durch UVB-Strahlung in unserem Hautgewebe gebildet werden, eine pathophysiologische Rolle ein. Diese Schäden werden hauptsächlich durch die Bildung von Singulett-Sauerstoff, Superoxid-Anion-Radikalen und die damit verbundene Produktion und Anreicherung von Wasserstoffperoxid vermittelt. Normalerweise werden diese ROS durch verschiedene Enzyme eingefangen und unschädlich gemacht. Hierzu gehören unter anderem Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathion-Peroxidase (GSHPx) und Catalase. Auch kleine molekulare Antioxidantien, wie Glutathion (GSH), Vitamin-C und α -Tocopherol helfen bei der Entgiftung dieser freien Radikale. Kommt es jedoch zu einer Überproduktion dieser Radikale, ist das endogene Entgiftungssystem nicht mehr in der Lage, diese abzufangen. Dann spricht man von oxidativem Stress. Eine vermehrte ROS-Bildung führt in den Zellen unserer Haut zur Schädigung von Proteinen, Lipiden, DNA und Kohlenhydraten. Dies kann letztendlich Hautalterung, Phototoxizität und sogar Hautkrebs verursachen (Kraemer, 1997; Kraemer *et al.*, 1997; Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997; Wlaschek *et al.*, 1993).

Hier spielt insbesondere die Interaktion von Hydroxyl-Radikalen mit den Deoxyriboseresten der DNA eine wichtige Rolle. Dies resultiert in Strangbrüchen mit verschiedenen Ribosemodifikationen. Auch die oxidative Modifizierung verschiedener Basen wird durch ROS vermittelt. Besonders die C4-C5 Doppelbindung des Pyrimidins ist sensitiv gegenüber einem Hydroxylradikal Angriff. Aber auch eine Interaktion des Hydroxylradikals mit Purinen der DNA bewirkt beispielsweise die Bildung von 8-Hydroxyguanin, welches hoch mutagen ist. Nicht repariertes 8-Hydroxyguanin bindet an Adenin, statt Thymidin und resultiert letztendlich in einer G-T-Transition

(Guyton *et al.*, 1993; Le Page *et al.*, 1995; Peak *et al.*, 1985; Peak *et al.*, 1987). Diese Schäden treten nicht nur im Zellkern, sondern auch in den Mitochondrien auf, wo eine vermehrte Mutationsrate der mitochondrialen DNA (mtDNA) mit schnellerer Hautalterung und erhöhtem Krebsrisiko in Verbindung gebracht wird (Berneburg *et al.*, 1997; Shigenaga *et al.*, 1994; Yakes *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1995). In den letzten Dekaden wurde eine deutliche Zunahme von Hautkrebs, Basalzell- und Stachelzell-Karzinomen festgestellt. Diese entstehen aus Keratinozyten der Basalzellschicht, die im Normalfall die kontinuierliche Hautregeneration sicherstellen. Gerade UVA-Strahlen, die lange Zeit als harmlos in Bezug auf die Entstehung von Hautkrebs galten, dringen tief bis in die Keratinozyten-Zellschicht ein und führen hier zu Mutationen, die diese hoch proliferativen Zellen anfällig für Krebs machen.

1.4 Aufgabenstellung:

Die Regulation apoptotischer Prozesse spiegelt eine feine Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren wider, die sich gegenseitig beeinflussen. Viele Krankheiten, wie beispielsweise Krebs, Autoimmunerkrankungen und degenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems, stehen mit einer Dysregulation apoptotischer Prozesse in Verbindung und zeichnen sich durch verminderten oder erhöhten Zelltod aus. Für effektive Therapieformen ist es daher unerlässlich, diese Prozesse zu kennen, um regulierend eingreifen zu können. Survivin ist ein Protein, das in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit erlangt hat, da es in fast allen bekannten Tumoren exprimiert wird, aber nicht in adulten ausdifferenzierten Zellen auftritt. Es könnte somit ein Zielprotein bei der Therapie verschiedenster Krebsformen darstellen. In der hier durchgeführten Arbeit soll die Wechselwirkung von Survivin und seinen bis dahin bekannten zwei Spleißvarianten, die unterschiedliche apoptotische Eigenschaften aufweisen, untersucht werden. Hier soll zum einen, im Hinblick auf die mögliche Heterodimerisierung der Varianten miteinander oder der Bindung gleicher Interaktionspartner, die subzelluläre Lokalisation der verschiedenen Varianten untersucht werden, über die bis zu diesem Zeitpunkt wenig bekannt war. Zum anderen wird die unterschiedliche antiapoptotische Funktion der Varianten durch Apoptoseinduktion mit UVA-Licht in einem Modellsystem der Haut an einer humanen Keratinozytenzelllinie (HaCaT) untersucht. Die antiapoptotischen Eigenschaften von Survivin beruhen auf einer funktionellen BIR-Domäne die einen Zink-Finger enthält. Da bekannt ist das Stickstoffmonoxid mit solchen Strukturen durch S-Nitrosierung des koordinierenden Cysteins interagiert, wird des Weiteren der Einfluss von photolytisch generiertem Stickstoffmonoxid auf das antiapoptotische Potential der Survivin Varianten untersucht. Zusätzlich werden Caspase-unabhängige Signalwege die zum Tod der Zelle führen in diesem Haut-Modell untersucht. Hier wird insbesondere der *apoptosis inducing factor* (AIF) analysiert, der auch in anderen Modellsystemen mit NO-vermitteltem Zelltod in Verbindung gebracht wird.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Albumin aus Rinderserum: BSA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); L-Ascorbat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Caspase-3-Substrat (Colorimetrisch) (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland); cPTIO [2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid.Natriumsalz]: (Alexis, Grünberg, Deutschland); Complete, Mini Protease Inhibitor (Roche, Mannheim, Deutschland); Cycloheximid: 3-[2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl]glutarimide (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); DABCO: 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Dimethylsulfoxid: DMSO (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Dodecylsulfat-Na-Salz: SDS (Serva, Heidelberg, Deutschland); Ethylendinitrilo-tetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat: EDTA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Mowiol4-88 (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland); N-Ethylmaleimid: NEM (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Hepes Buffer Solution (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland); bisBenzimide Hoechst 33342 trihydrochloride (2'-[Ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidodazol) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Hybond™-ECL™-Membran und Hyperfilm™ ECL (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland); 2-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland); Natriumnitrit (Merck, Darmstadt, Deutschland); Opti-MEM-Zellkulturmedium (Gibco, Eggerstein, Deutschland); Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) Ponceau-S (Serva, Heidelberg, Deutschland); Trishydroxymethylaminomethan (Tris) (Roth, Karlsruhe, Deutschland); Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Deutschland); Trypanblau (Gibco, Eggerstein, Deutschland); Viralex Trypsin (0,25 %) (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland); Polyoxyethylensorbitan Monolaurat: Tween 20 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Z-VAD-FMK: Z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketone (Alexis, Grünberg, Deutschland);

2.1.3 Enzyme

Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) und AMV Reverse Transcriptase (Promega, Mannheim, Deutschland); Restriktionsenzyme

Kpn, BamH1 (NewEnglandBiolabs, Ipswich, USA); T4-DNA-Ligase (Fermentas, Heidelberg, Deutschland).

2.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper:

- Polyklonaler Kaninchen-anti-AIF Antikörper (Chemicon International, Temecula, USA)
- Monoklonaler Maus-anti-AIF Antikörper (E-1) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
- Monoklonaler Maus-anti- β -Aktin Antikörper (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Polyklonaler Kaninchen-anti-Survivin Antikörper (Novus Biologicals, Littleton, USA)
- Polyklonaler Kaninchen-anti-Cenp-F Antikörper (Calbiochem, San Diego, USA)
- Monoklonaler Maus-anti-GFP Antikörper (JL-8) (Clontech, Heidelberg, Deutschland)
- Polyklonaler Kaninchen-anti-PARP Antikörper (Cell Signaling, Danvers, USA)

Sekundäre Antikörper:

- Texas-Red gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA)
- Alexa Fluor 594 Ziege-anti-Maus IgG (H+L) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen Antikörper, HRP gekoppelt (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- Polyklonaler Ziege-anti-Maus Antikörper, HRP gekoppelt (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)

2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM: Dulbeccos minimal essentiell medium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland); FCS: Fetal calf serum (High-Quality) (PAA Laboratories, Linz, Österreich); Genitacin G418 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland); Glutamax: (L-Alanyl-Glutamin) 100-fach (PAA Laboratories, Linz, Österreich); HEPES (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland); Pen-Strep: Penicillin-Streptomycin (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland); Standard RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland); Cycloheximid: 3-[2-(3,5-

Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl]glutarimide (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

2.1.5 Kits

- Bio-Rad Dc Protein Assay (Bio-Rad, München, Deutschland)
- SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Perbio, Bonn, Deutschland)
- QiaFilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- QiaFilter Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

2.1.6 Transfektionsagenzien

- Polyfect (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Lipofectin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.7 Puffer und Lösungen

PBS (20×):	160,06 g NaCl 4,02g KCl 28,48 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 4,08 g KH_2PO_4 Ad 1L dH ₂ O
PBS (1×) + 0,02% EDTA:	50 ml PBS (20×) 200 mg EDTA ad 1L dH ₂ O
PBST (1×)	50ml PBS (20×) 1ml Tween 20 Ad 1L dH ₂ O
RIPA-Puffer:	5 ml PBS (20×) 1 % NP 40

	0,5 % Sodium deoxycholate 0,1 % SDS Ad 100 ml dH ₂ O
Wasch-Puffer (Western-blot)	60ml NaCl (5M) 20ml Tris (1M), pH 7,5 20ml Tween 20 (20%) Ad 2L dH ₂ O
Blocking-Puffer (Western-blot)	3,0g Milchpulver 1,0g BSA auf 100ml Waschpuffer
NuPAGE® Antioxidant, NuPAGE® LDS Sample Buffer (4×), NuPAGE® Sample Reducing Agent (10×), NuPAGE™ 7% Tris-Acetate Gel, NuPAGE® Transfer Buffer (20×) und NOVEX® Tris-Acetate SDS Running Buffer (20×), alle von Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland.	
Wasch-Puffer (Immunfluoreszenz)	PBST (1×)
Blocking-Puffer (Immunfluoreszenz)	5,0g BSA Auf 100ml PBST (1×)
Caspase-Assay-Puffer	50mM Hepes, pH 7,4 100mM NaCl 0,1% CHAPS 10mM DTT 0,1mM EDTA 10% Glycerol
Lysepuffer (Caspase-Assay)	50mM Hepes, pH 7,4 100mM NaCl 0,1% CHAPS 1mM DTT 0,1mM EDTA 0,1% Triton-X-100
Mowiol	6,0g Glycerol 2,4g Mowiol 6ml dH ₂ O 12ml Tris (0,2M), pH 8,5

40g PFA

Primer	Sequenz
Survivin s	5'-GTC GTC GGT ACC ATG GGT GCC CCG ACG TTG-3'
Survivin as	5'-CAG CAG GGA TCC ATC CAT GGC AGC CAG CTG CTC-3'
Survivin-2B s	5'-GTC GTC GGT ACC ATG GGT GCC CCG ACG TTG-3'
Survivin-2B as	5'-CAG CAG GGA TCC ATC CAT GGC AGC CAG CTG CTC-3'
Survivin-ΔEx3 s	5'-GTC GTC GGT ACC ATG GGT GCC CCG ACG TTG-3'
Survivin-ΔEx3 as	5'-CAG CAG GGA TCC AGACAT TGC TAA GGG GCC CAC A-3'
1Survivin-ΔEx3 ^{NLS} s	5'-GTC GTC GGT ACC ATG GGT GCC CCG ACG TTG-3'

1Survivin-ΔEx3 ^{NLS} as	5'-TTG CAT GGG GTC GTC AT-3'
2Survivin-ΔEx3 ^{NLS} s	5'-GCC GTG CCA TCG AGC-3'
2Survivin-ΔEx3 ^{NLS} as	5'-CAG CAG GGA TCC AGA CAT TGC TAA GGG GCC CAC-3'
Smac/DIABLO s	5'-TGT GAC GAT TGG CTT TGG AGT AAC-3'
Smac/DIABLO as	5'-TTC AAT CAA CGC ATA TGT GGT CTG-3'
GAPDH s	5'-TTG GTA TCG TGG AAG GAC TCA-3'
GAPDH as	5'-TGT CAT CAT ATT TGG CAG GTT T-3'

s = sense; as = anti-sense

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturen

Die Zelllinie HaCaT (humane Keratinozyten Zelllinie) stammt aus dem DKFZ Heidelberg und wird in RPMI 1640 mit 10% FCS kultiviert. Die HepG2 (humane Hepathozyten Zelllinie) und Hela (humanes Cervix Karzinom) werden von ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) bezogen und in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgt im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ bis zu einer Konfluenz von ungefähr 70 % und nachfolgender Passagierung. Alle Kulturen werden in regelmäßigen Zeitabständen auf Mycoplasmen-Kontaminationen getestet.

2.2.2 Zellzahlbestimmung und Wachstumskurven

Zellzahlbestimmungen und Wachstumskurven werden mit dem Vitalfarbstoff Neutralrot durchgeführt. Die Zellen werden für 60 Minuten im Dunkeln mit einer 1:100 Verdünnung einer 3%-Lösung inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen, getrocknet und mit Isopropanol / 1% HCl lysiert. Die Extinktion der Überstände, welche eine lineare Korrelation mit der Zellzahl aufweist, wird im Spektralphotometer bei 530 nm bestimmt.

2.2.3 Bestimmung lebender Zellen mittels Trypanblau

Zur Quantifizierung lebender Zellen nach UVA- oder NO-Donor-Behandlung wird ein Farbtest mit Trypanblau durchgeführt. Die Zellen werden für 5 Minuten mit dem Farbstoff inkubiert, und die gefärbten Zellen lichtmikroskopisch bestimmt. Während lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen, zeigt das Zytoplasma toter Zellen eine intensive Blaufärbung. Der Anteil toter Zellen wird in % angegeben bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen.

2.2.4 UVA-Bestrahlung

Zur Untersuchung der Effekte von UVA auf apoptoserelevante Prozesse werden Zellen mit toxischen Dosen zwischen 30 und 60 J/cm² in verschiedenen Zellkulturschalen mit PBS auf einem Blatt Watman-Papier bestrahlt. Das Auftreten einer UVA-induzierten Apoptose wird in Keratinozyten erst bei Intensitäten größer als 30 J/cm² beobachtet. Als

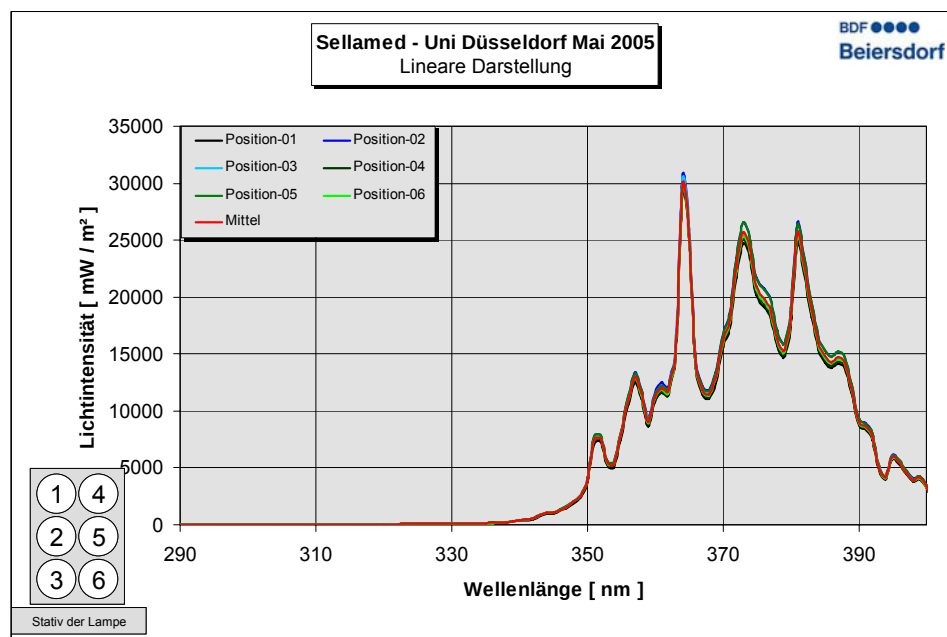


Abbildung 2.1: Spektrum der verwendeten UVA-Lampe, die für die Bestrahlungsexperimente der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT eingesetzt wurde.

UVA-Quelle wird eine Sellas-4000 Lampe (Sellas Medizinische Geräte, Gevelsberg, Deutschland) verwendet, die ein UVA1-Spektrum von 340-390 nm emittiert. Zur Bestimmung der Bestrahlungsdosis wird die Strahlungsintensität vor jedem einzelnen Versuch mittels UVA Detektor

gemessen. Zur Bestrahlung der Zellen in Anwesenheit von Nitrit werden die Zellen 10-15 Minuten vor Beginn der Bestrahlung mit den entsprechenden Konzentrationen Nitrit, in PBS gelöst, inkubiert.

2.2.5 Quantifizierung apoptotischer Zellen

2-48 Stunden nach UVA-Bestrahlung werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem DNA-Farbstoff H33342 (4 µg/ml) für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz der Zellkerne wird mittels eines Zeiss Fluoreszenz Mikroskop (Extinktion: 355 nm, Emission 465 nm) gemessen. Zur Auswertung werden mindestens 400 Zellen gezählt. Die Auswertung erfolgt als %-Angabe der kondensierten oder fragmentierten Zellkerne im Verhältnis zur Gesamtzellzahl.

2.2.6 Quantifizierung nekrotischer Zellen

Die Quantifizierung nekrotischer Zellen wird durch den Einbau des roten DNA-Farbstoffs Propidium Iodid (PI) durchgeführt. PI-positive Zellen werden mittels eines Zeiss Fluoreszenz Mikroskop (Extinktion: 520 nm, Emission 610 nm) bestimmt. Zur Auswertung werden mindestens 400 Zellen gezählt. Die Auswertung erfolgt als %-Angabe der nekrotischen Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl.

2.2.7 Immuncytochemische Untersuchungen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern

Die zu untersuchenden Zellen werden entweder in 6-Well Kulturschalen auf darin ausgelegten Deckgläschen oder in 2er Glas Chamberslides zu je 2×10^5 Zellen ausgesät und unter den beschriebenen Standard-Zellkulturbedingungen für mindestens 24 Stunden kultiviert und dann mit verschiedenen exogenen Stimuli behandelt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wird das Medium der Zellen entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, mit 2-4% para-Formaldehyd für 10-15 Minuten fixiert und anschließend wiederum mit PBS gewaschen. Danach werden die Proben für 10 Minuten in PBST inkubiert, um eine gute Permeabilisierung zu gewährleisten. Um eine unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper zu vermeiden, müssen die Proben zunächst in Blocking-Puffer für 60

Minuten bei 25°C inkubiert werden. Anschließend werden die Proben mit dem entsprechenden Primär-Antikörper in Blocking-Puffer für eine Stunde bei 25°C inkubiert. Um die Reste des Primär-Antikörpers, die nicht gebunden haben, zu entfernen, müssen die Proben dreimal je 10 Minuten mit PBST bei 25°C unter leichtem Schütteln gewaschen werden. Nun erfolgt die Inkubation mit den entsprechenden Sekundär-Antikörpern in Blocking-Puffer für 60 Minuten bei 25°C. Da es sich um Fluoreszenz-Antikörper handelt, muss dieser Inkubationsschritt im Dunkeln durchgeführt werden. Nach dem abschließenden Waschen der Proben mit PBST wird eine Kernfärbung mit Hoechst (H33342) durchgeführt. Abschließend müssen die Proben noch 2-mal mit PBS gewaschen und mit Mowiol + 1% DABCO eingedeckelt werden.

2.2.8 Mikroskopische Analysen

AIF Kerntranslokation, Hoechst und Propidium-Iodid gefärbte Präparate sowie die EGFP transfizierten Zellen werden mit Hilfe eines Zeiss Epifluoreszenz-Mikroskops (Excitation 355 nm, Emission 465 nm für Hoechst; Excitation 520 nm, Emission 610 nm für Propidium-Iodid sowie Alexa-594 markiertes AIF; Excitation 488nm, Emission 530nm für EGFP) analysiert. Die Kollokalisierung von CENP-F und Survivin wird mit einem Leica TCS-NT Konfokalem Laserscanning System (ein Argon-Krypton-Laser auf einem Leica DM IRB invertiertem Mikroskop) nachgewiesen. Die konfokalen Bilder werden über zwei Kanäle bei 488nm (grün) und 568nm (rot) Excitation und einer Emission von 530nm (grün) bzw. 590nm (rot) aufgenommen. Es werden nur gleichzeitig und identisch behandelte Proben verglichen. Hierbei ist zu beachten, dass die Einstellungen des Mikroskops stets die gleichen für sämtliche Präparate sind.

2.2.9 Zell-Lyse und Proteinisolierung

Die Isolation von Proteinen aus HaCaT Keratinozyten unter reduzierenden Bedingungen erfolgt durch Zugabe von 250µl RIPA-Puffer + Protease-Inhibitoren-Cocktail pro 10 cm Gewebekulturschale und Ablösen der adhären Zellen mit einem Cell Lifter (Corning Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande). Die Zellsuspension wird im Anschluss mehrmals gevortext und für 20 Minuten und länger auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14000 rpm wird die Proteinkonzentration in den gesammelten Überständen unter Anwendung

des Bio-Rad Dc Protein Assay Kits und Beachtung der Herstellerangaben ermittelt. Die restliche Proteinlösung wird bei -80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

2.2.10 SDS-PAGE

Die Proben werden mit 4 × NuPAGE LDS Probenpuffer versetzt und jeweils 10-20 µg Protein auf ein 7 %iges Tris-Acetat Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wird NOVEX® Tris-Acetat SDS Laufpuffer (20×) verwendet. Für die Vorbereitung von reduzierten Proteinproben werden diese mit 4× NuPAGE LDS Probenpuffer und NuPAGE® Sample Reducing Agent (10×) gemischt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei einer konstanten Stromspannung von 150 V für 1 Stunde in einer Novex Xcell II Mini Cell Kammer. Bei der Auftrennung reduzierter Proben werden 50 ml 1× Laufpuffer in der oberen Pufferkammer mit 125 µl NuPAGE® Antioxidant versetzt, wodurch eine Proteinreoxidation im Laufe der Elektrophorese verhindert wird.

2.2.11 Western-Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden durch Elektrotransfer auf eine Nylonmembran übertragen und für die anschließende Immundetektion immobilisiert. Der Transfer erfolgt bei konstanten 30 V für 1 Stunde in einer Novex Xcell II Mini Cell. Als Puffer dient NuPAGE® Transferpuffer mit 10 % Methanol. Die Überprüfung des Transfers erfolgt durch Färbung der Membran mit Ponceau S-Lösung für 10 Minuten, die sich im Anschluss mit destilliertem Wasser auswaschen lässt. Die Detektion erfolgt nach Blocken der Membran mit Blockpuffer (PBS/0,1 % Tween 20 + 3 % Milchpulver + 1% BSA) für 1-2 Stunden bei RT. Die Membran wird mit den entsprechenden Antikörpern in Block-Puffer(ant-AIF wurde 1:1000; anti-GFP 1:2000; anti-PARP 1:2000; anti-β-Aktin 1:5000 verdünnt) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Wasch-Puffer für jeweils 10 Minuten wird die Membran mit einem für den Erstantikörper spezifischen Zweitantikörper (anti-Maus 1:2000, anti-Kaninchen 1:2000), der HRP gekoppelt ist, für eine weitere Stunde bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend mehrmals mit Wasch-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgt mit dem *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* nach Angaben des Herstellers.

2.2.12 Transfektionen

Für die Transfektion werden $1,5 \times 10^5$ Zellen in 6×Well Platten ausgesät, in die vorher Deckgläschen gelegt werden, um die Zellen auf diesen anzuzüchten. Die Transfektion erfolgt 24-30 Stunden nach der Aussaat. Die Transfektion der HeLa-Zelllinie wird mit Hilfe des Polyfect Transfektionsreagenzes durchgeführt, wobei die Angaben des Herstellers Verwendung finden. 2µg des entsprechenden EGFP Plasmids und 10µl des Transfektionsreagenzes werden separat in je 100µl DMEM-Medium ohne Zusätze (kein FCS, kein Antibiotikum) angesetzt und nach 10 Minuten Inkubationszeit gemischt. Nach weiteren 45 Minuten Inkubation zur Bildung der DNA-Polyfect Komplexe wird der gesamte Ansatz auf 1ml aufgefüllt. Mit diesem Volumen werden die Zellen nach kurzem Waschen mit PBS überschichtet und mindestens 24 Stunden inkubiert. Die Transfektion der HaCaT Zellen wird mit Lipofectin durchgeführt und geschieht nach dem gleichen Prinzip, wie schon für die HeLa Zellen beschrieben. Hier werden ebenfalls 2µg DNA transfiziert, jedoch 4µl Transfektionsreagenz verwendet, und die Reaktion wird in Optimem-Medium angesetzt. Nach 6 Stunden Inkubation mit dem Transfektionsreagenz wird dieses abgesaugt und durch normales RPMI Medium mit allen Zusätzen (FCS, Antibiotikum) ersetzt. Der Ansatz muss für weitere 18 Stunden inkubiert werden, bevor die entsprechenden Versuche durchgeführt werden können.

2.2.13 Cycloheximid Behandlung

18 Stunden nach der Transfektion der HeLa Zellen werden die Zellen mit 50µg/ml Cycloheximid behandelt, um die Protein-Neusynthese zu unterbinden. Die Zellen werden nach 12, 24 und 48 lysiert und die Proteinlysate im Western-Blot Analysiert.

2.2.14 RT-PCR und Real-Time PCR

Die Real-Time PCR Analyse von smac/DIABLO im humanen Nierenzellkarzinom wird mit dem Light-Cycler (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wird aus 66 Tumor-Gewebeproben von Patienten, die sich einer Nephrectomie unterzogen hatten, RNA isoliert. Für die cDNA Synthese wird 1µg total RNA in einem Gesamtvolumen von 20µl revers transkribiert (RT). Die Reaktionsmischung enthält 15µM von jedem dNTP (Roche, Mannheim, Deutschland), 10U des rekombinanten RNasin

RNAse Inhibitors (Promega, Heidelberg, Deutschland) und 2,5U AMV Reverse Transkriptase mit dem korrespondierenden 1×RT Puffer (Promega, Heidelberg, Deutschland). Für die Reaktion werden ein Smac/DIABLO-spezifischer Primer (10 pmol; 5'-TTC AAT CAA CGC ATA TGT GGT CTG-3') und ein GAPDH spezifischer Primer (10pmol; 5'-TGT CAT CAT ATT TGG CAG GTT T-3') verwendet. Die cDNA Transkription für smac/DIABLO und GAPDH als Referenz wird in demselben Ansatz durchgeführt, um eine Variation der Transkriptionseffizienz bei der cDNA Synthese zu verhindern. Die RT-Reaktionsmischung wird für eine Stunde bei 55°C inkubiert. Die Real-Time Analyse wird mit einem Gesamtvolumen von 20µl durchgeführt. Der Ansatz enthält 2 µl 10×SYBR Green I Fast Start Reaction Mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 3mM MgCl₂, 25pmol der smac/DIABLO und GAPDH spezifischen oligonucleotide Primer (siehe Tabelle 2.1) und je Probe 2µl des cDNA Templates aus der RT Reaktion, bzw. Wasser als negativ Kontrolle. Die Real-Time PCR wird in Glass-Kapillaren durchgeführt, mit einem Initialen Denaturierungsschritt für 10 Minuten bei 95°C, gefolgt von 50 Zyklen 10 Sekunden 95°C, einem Annealing von 10 Sekunden bei 61°C und einer Elongation von 10 Sekunden bei 72°C. Im Anschluss wird noch eine Schmelzkurve erstellt. Die Spezifität der PCR Produkte wird durch eine DNA Sequenzierung bestätigt. Die Sequenzierung wird mit dem ABI-Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI, Weiterstadt, Deutschland) und den entsprechenden sense und anti-sense Primern, die auch in der Real-Time PCR verwendet wurden, unter Verwendung des ABI-Prism 310 durchgeführt.

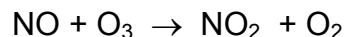
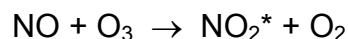
2.2.15 Klonierungen

Das NLS deletierte Survivin-ΔEx3-EGFP Konstrukt (es fehlen die Aminosäuren Arg76 bis Cys92; Survivin-ΔEx3^{NLS}-EGFP) wird wie folgt hergestellt: Beide flankierenden Sequenzen des NLS werden separat mit den in Tabelle 2.1 angegebenen Primer-Paaren durch eine PCR Reaktion amplifiziert. Anschließend werden die beiden PCR Produkte aufgereinigt. Die Ligation erfolgt, nach einem Restriktionsverdau der beiden Fragmente mit den Enzymen HindIII und BamHI in den pEGFP-N3 Vektor nach einem Standardprotokoll. Hierzu werden die Fragmente im Verhältnis von drei zu eins (DNA-Enden zu Vektor) zusammen mit der T4-DNA-Ligase und 2µl 10×Ligationspuffer in einem Gesamtvolumen von 20µl für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. 10µl des Ligationsansatzes werden in Bakterien transformiert und auf LB-Platten, die Kanamycin als Selektions-Antibiotikum enthalten, ausplattiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C werden die

gewachsenen Bakterienkolonien einzeln gepickt und einer Mini-Präparation unterzogen. Die isolierten Plasmide werden nun wieder mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI verdaut und die resultierenden Fragmente mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese ausgewertet. Klone, die ein Fragment der entsprechenden Länge enthalten, werden einer DNA Sequenzierung unterzogen. Dies soll die fehlerfreie Klonierung bestätigen.

2.2.16 Nachweis von nitrosierten Proteinen mit Hilfe der Chemilunineszenzdetektion (CLD)

Der Nachweis, dass bei der UVA Bestrahlung der Zellkulturen tatsächlich eine Zunahme der Nitrosierung verschiedener Proteine geschieht, wird mit Hilfe der CLD-Messung (CLD 88AM sp, Eco Physics, München, Deutschland) durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass Stickstoffmonoxid (NO) mit Ozon (O₃) zu NO₂^{*} im elektrisch angeregten Zustand reagiert:



Dies geschieht bei 20% der Reaktion. Beim Übergang in den Grundzustand wird Licht mit der Wellenlänge von 600-3000nm emittiert. Dieses Licht wird mit Hilfe eines Photomultipliers verstärkt und in einen elektrischen Impuls umgewandelt. Diese Impulse werden dann in einem Diagramm, als Zunahme der Spannung (mV) in einem zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Fläche unter dem so entstehenden Peak ist proportional zur Menge freigesetzten Stickstoffmonoxids. Um das gebundene NO zu messen, müssen die Proben in eine Reaktionskammer, die eine 60°C warme Jodid/Trijodid-Lösung enthält, injiziert werden. Hier geht das gebundene NO in die Gasphase über. Durch die Lösung wird ein Trägergas (Helium) geleitet, das das entstehende NO zur CLD transportiert. Die Reaktionslösung besteht aus 45mM Kaliumjodid (KJ) und 10mM Jod, das in 7,4ml destilliertem Wasser gelöst wird. Dieser Ansatz wird mit 100ml Eisessig aufgefüllt. Die Lösung muss immer vor Messbeginn frisch angesetzt werden und kann nicht gelagert werden. Das Trägergas wird nach der Reaktionskammer noch durch eine 1M Natriumhydroxid-Lösung (4°C) geleitet, um Reste von Säure und Jodid zu entfernen. Die Konzentration des entstandenen NO's wird über eine Standardreihe bestimmt, bei der verschiedene Nitritkonzentrationen (0-100nM) als Vergleichsmessungen dienen. Um die

Nitrosoverbindungen separat zu messen, muss zuerst das gesamte Nitrit aus der Probe entfernt werden. Hierzu werden die Proben mit 0,5% Sulfanilamid in 1N Salzsäure versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. So entsteht aus Nitrit ein stabiles Diazoniumion, das in der Reaktionslösung nicht zu NO reduziert werden kann. Die übrig gebliebenen Nitrosoverbindungen können nun gemessen werden.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der Smac/DIABLO Expression in verschiedenen Tumorstufen und Graden im humanen Nierenzellkarzinom (RCC)

Wie schon einleitend in Abschnitt 1.1.6 erwähnt, ist Smac/DIABLO der Hauptantagonist des antiapoptotischen XIAP. Basierend auf dem Expressionsmuster von XIAP in verschiedenen Nierenzellkarzinomen (RCC) (Yan *et al.*, 2004), wird hier nun auch die Expression des proapoptotischen Faktors Smac/DIABLO in den entsprechenden RCC's untersucht. Dazu werden Real-Time PCR-Analysen von Resektaten verschiedener Nierenzellkarzinomen durchgeführt, die unterschiedlichen Stufen (pT1-pT3), verschiedenen Differenzierungsgraden (G1-G3) und verschiedenen Typen (klarzellig, papillär) angehören. Eine mRNA Expression von Smac/DIABLO kann in allen RCC's (n = 66) unabhängig von der Stufe, Differenzierungsgrad und Typ nachgewiesen werden (Abbildung 3.1). Die relative mRNA Expression des proapoptotischen Proteins zeigt keine signifikante Änderung zwischen den frühen und fortgeschrittenen Tumorstadien (Abbildung 3.1/A+B) oder zwischen niedrigen und hohen Tumorgraden (Abbildung 3.1/C). Gleiche Smac/DIABLO mRNA Mengen werden auch in den verschiedenen Tumortypen entdeckt (Abbildung 3.1/D) (Yan *et al.*, 2004).

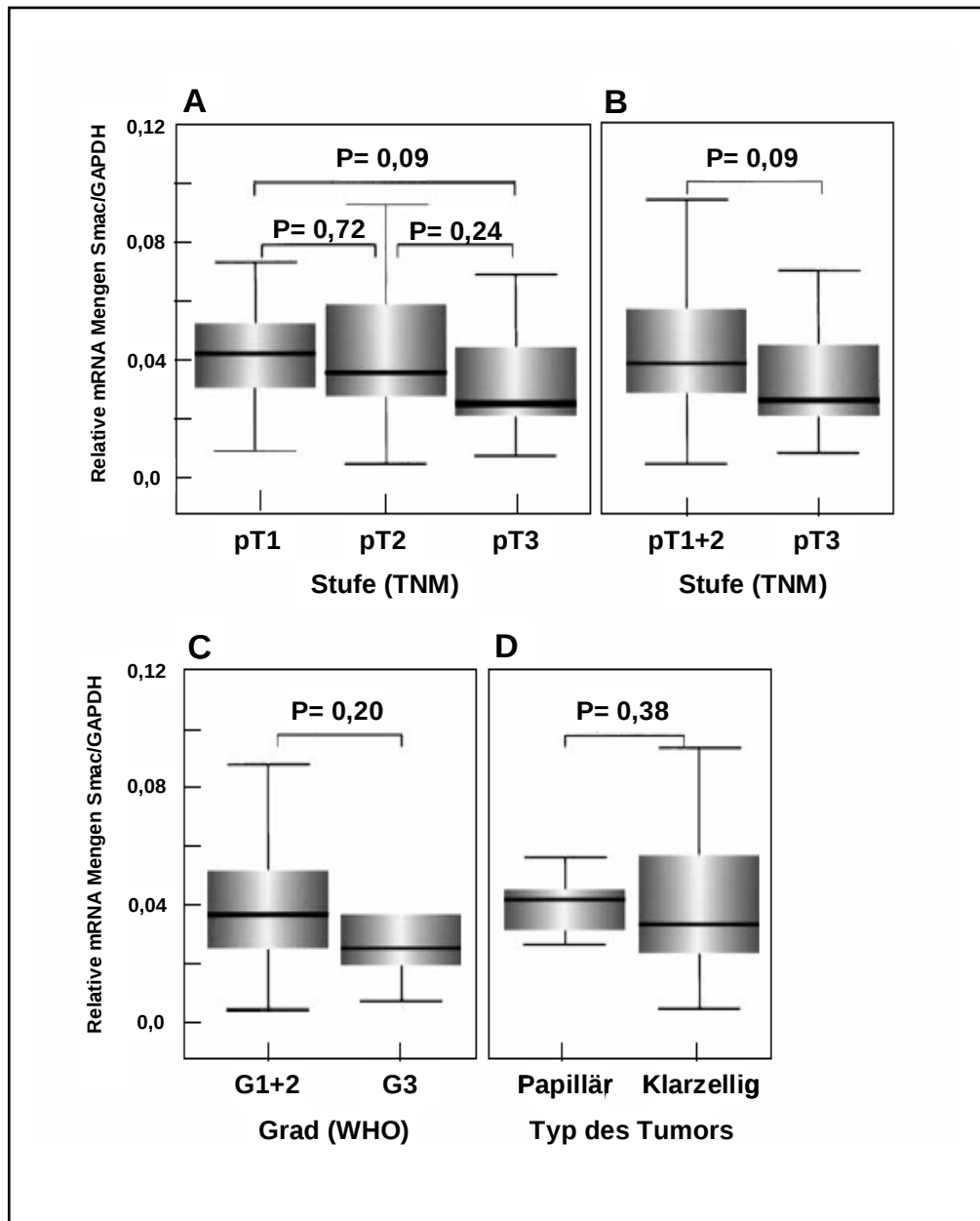


Abbildung 3.1: Analyse der GAPDH-normalisierten Smac/DIABLO mRNA Expression in Nierenzellkarzinomen (RCC). **A)+B)** Es konnte keine signifikante Änderung der Smac/DIABLO mRNA Expression von frühen (pT1) zu fortgeschrittenen (pT3) Tumorstadien und solchen RCC's, die aus der Niere metastasieren (pT3) sowie denen, die noch im Organ selber verbleiben, (pT1+2) festgestellt werden. **C)+D)** Ebenfalls keine signifikante Änderung der mRNA Expression konnte im Vergleich von niedrigen (G1+2) und hohen Tumorgraden (G3) noch in Abhängigkeit vom Typ des Tumors (Papillär gegen Klarzellig) festgestellt werden. (TNM = Stadieneinteilung von malignen Tumoren; T = Tumor, N = Nodus, M = Metastasen)

3.2 Funktion und Lokalisation von Survivin und seinen Spleißvarianten

3.2.1 Differentielle subzelluläre Lokalisation apoptotischer und antiapoptotischer Survivin Spleißvarianten

Wie einleitend in Abschnitt 1.1.7 erwähnt, werden von Survivin verschiedene Spleißvarianten gebildet. Aufgrund der unterschiedlichen antiapoptotischen Eigenschaften der verschiedenen Spleißvarianten (Mahotka *et al.*, 2002b; Wenzel *et al.*, 2000) wurde schon kurz nach deren Entdeckung über eine eventuelle kompetitive Bindung an Interaktionspartner spekuliert. Auch eine Heterodimerisierung der Varianten ist denkbar, da die Dimerisierung-Domäne (Abbildung 1.6) in allen Spleißvarianten erhalten ist. Dies könnte ein Mechanismus für die Feinregulation ihrer Funktionen sein (Islam *et al.*, 2000; Mahotka *et al.*, 1999). Da eine solche kompetitive Bindung oder Heterodimerisierung eine identische subzelluläre Lokalisation für eine physikalischen Interaktion voraussetzt, wird diese im Folgenden, vergleichend für alle drei bis dahin bekannten Survivin Varianten, in ruhenden und mitotisch aktiven Zellen untersucht (Mahotka *et al.*, 2002b). Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit existierten keine spezifischen Antikörper, die zuverlässig die drei Spleißvarianten unterscheiden konnten. Daher werden die folgenden Experimente mit Zellen durchgeführt, die mit den entsprechenden Survivin-EGFP Konstrukten transfiziert sind.

3.2.2 Unterschiedliche Proteinstabilität von ectopisch exprimiertem Survivin-ΔEx3-EGFP und Survivin-EGFP

Computergestützte Sequenzanalysen mit Hilfe des PSORT II Programms, das Sortierungssignale und Lokalisationssequenzen erkennt, sagen für Survivin und Survivin-2B eine zytoplasmatische Lokalisation

voraus. Survivin- Δ Ex3 hingegen weist eine rein nukleäre Akkumulation auf. Dies konnte experimentell bestätigt werden (Mahotka *et al.*, 2002b). Zusätzliche Immunfärbungen für das Ki-67 Protein, das während sämtlicher aktiver Zellzyklusphasen (späte G1, S, G2, M) exprimiert wird, nicht aber in G0-Phase Zellen, zeigten eine Akkumulation von Survivin und Survivin-2B in Ki-67 positiven und negativen Zellen. Survivin- Δ Ex3 dagegen ließ sich nur in Ki-67 positiven Zellen nachweisen. Da das Survivin- Δ Ex3-EGFP Konstrukt unter der Kontrolle des CMV Promotors steht, kann es nicht zellzyklusabhängig exprimiert werden. Für die selektive Akkumulation von Survivin- Δ Ex3 in sich teilenden Zellen ist möglicherweise eine zellzyklusspezifische Translation der mRNA verantwortlich. Auch eine rasche Degradierung des Proteins in ruhenden G0 Zellen ist denkbar. Diese ist bei Survivin über den Ubiquitin-Proteasom Signalweg reguliert und hauptsächlich vom Carboxyterminus des Proteins abhängig (Zhao *et al.*, 2000). Gerade bei Survivin- Δ Ex3 ist im Vergleich zu Survivin selbst, dieser Carboxyterminus verändert. Dies könnte entscheidend für eine rasche Degradierung des Proteins sein, sodass es nur in mitotisch aktiven Zellen zu beobachten ist. Durch eine Überexpression der Konstrukte Survivin-EGFP, Survivin- Δ Ex3-EGFP und dem pEGFP-N3 Plasmid als Kontrolle soll die unterschiedliche Proteinstabilität untersucht werden. Aus diesem Grunde werden die transfizierten Zellen in Anwesenheit von Cycloheximid kultiviert, das die Protein-Neusynthese verhindert. Die Proteinmengen der entsprechenden Varianten werden nach 12, 24 und 48 Stunden mit Hilfe einer Western-Blot Analyse verglichen. Survivin selbst zeigt sogar nach 48 Stunden keine nennenswerte Verringerung der Proteinmenge, ähnlich wie das zur Kontrolle exprimierte EGFP (Abbildung 3.2). Die Halbwertszeit von Survivin- Δ Ex3-EGFP hingegen liegt zwischen 12 und 24 Stunden. Nach 48 Stunden ist es kaum mehr nachzuweisen (Abbildung 3.2). Dies bestätigt, dass ectopisch exprimiertes Survivin- Δ Ex3-EGFP tatsächlich schneller abgebaut wird als Survivin-EGFP selbst.

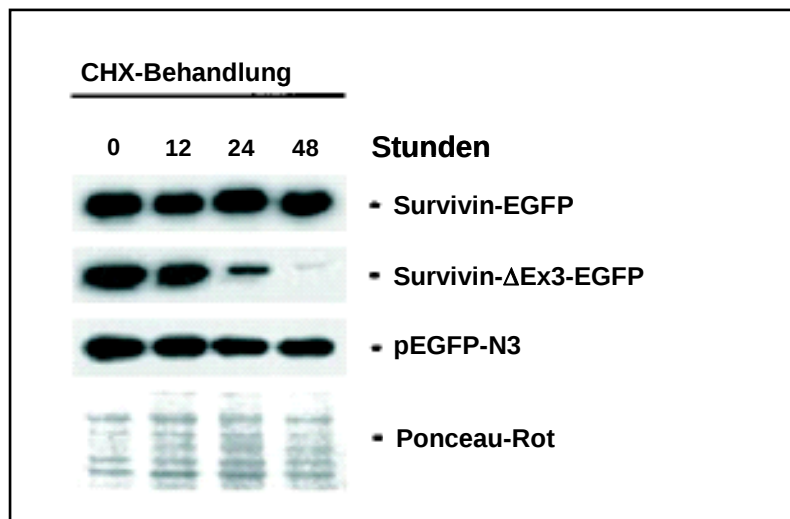


Abbildung 3.2: Vergleich der Proteinstabilität von Survivin-EGFP und Survivin-ΔEx3-EGFP nach Überexpression in HeLa Zellen. Nach der Inhibierung der Translation mit Cycloheximid wird Survivin-ΔEx3-EGFP deutlich schneller abgebaut als Survivin-EGFP oder das EGFP der Vektor-Kontrolle. Das Experiment zeigt einen repräsentativen Blot aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. EGFP wurde als zusätzliche Kontrolle für Proteinstabilität nach der Cycloheximide-Behandlung verwendet. Vergleichbare Proteinmengen wurden durch eine Ponceau-Rot Färbung der Membran gezeigt.

3.2.3 Subzelluläre Lokalisation der Survivin-Varianten während der Mitose

Die Forschung beschreibt Survivin unter anderem als *Chromosomal-Passenger-Protein*, das während der Mitose an die Zentromere der Chromosomen bindet. Bei der Trennung der Schwesterchromatiden wird es an die Spindelmikrotubuli umverteilt und lokalisiert während der Telophase im Midbody an den dort gebündelten Mikrotubuli (Skoufias *et al.*, 2000). Daher liegt es nahe, die Lokalisation der verschiedenen Survivin-Varianten auch auf diese Bindungseigenschaften hin mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Techniken zu untersuchen. In Überexpressionsstudien mit den entsprechenden Survivin-EGFP Konstrukten wird die Lokalisation der verschiedenen Varianten während unterschiedlicher Phasen des Zellzyklus untersucht (Abbildung 3.3/A+B+C). Für die gleichzeitige Markierung der Zentromere wird ein Antikörper gegen CENP-F, ein weiteres Zentromer-assoziiertes Protein (Liao *et al.*, 1995), eingesetzt. In Korrelation mit

früheren Beobachtungen ist Survivin in Zellen der Interphase zytoplasmatisch lokalisiert (Abbildung 3.3/A,a). Es transloziert während der Mitose an die Zentromere, wie durch die punktuelle Akkumulation im Nukleus und die enge Kolokalisation mit CENP-F gezeigt wird (Abbildung 3.3/A,b). Im Gegensatz dazu ist der Verlust der nukleären Membran während der Mitose mit einer Umverteilung von Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B durch die gesamte Zelle verbunden (Abbildung 3.3/B,b+C,b). Weder für Survivin- Δ Ex3 noch für Survivin-2B kann eine Kolokalisation mit CENP-F - wie für Survivin selbst - nachgewiesen werden (Abbildung 3.3/ B,b+C,b). In extrem seltenen Fällen tritt bei Survivin- Δ Ex3, jedoch nicht bei Survivin-2B, eine Kolokalisation mit CENP-F auf (Abbildung 3.3/B,b). Eine CENP-F Immunfärbung ist charakteristischerweise an den zwei Foci zu erkennen, die die Zentromere der Chromosomen darstellen. Interessanterweise lässt sich in den Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B Transfektanten eine gestörte Lokalisation von CENP-F aufzeigen. Hier sind die zwei Foci nicht mehr eindeutig zu erkennen (Abbildung 3.3/B,b+C,b). Auch die zweite Charakteristik eines *Chromosomal-Passenger-Proteins*, nämlich die Lokalisation im Midbody der Ana-/Telophase der sich teilenden Zelle, kann nur für Survivin, nicht aber für Survivin- Δ Ex3 oder Survivin-2B gezeigt werden (Abbildung 3.3/B,c+C,c). Dieses Ergebnis lässt auf eine gestörte Interaktion dieser beiden Spleißvarianten mit den sich dort befindlichen Mikrotubuli schließen.

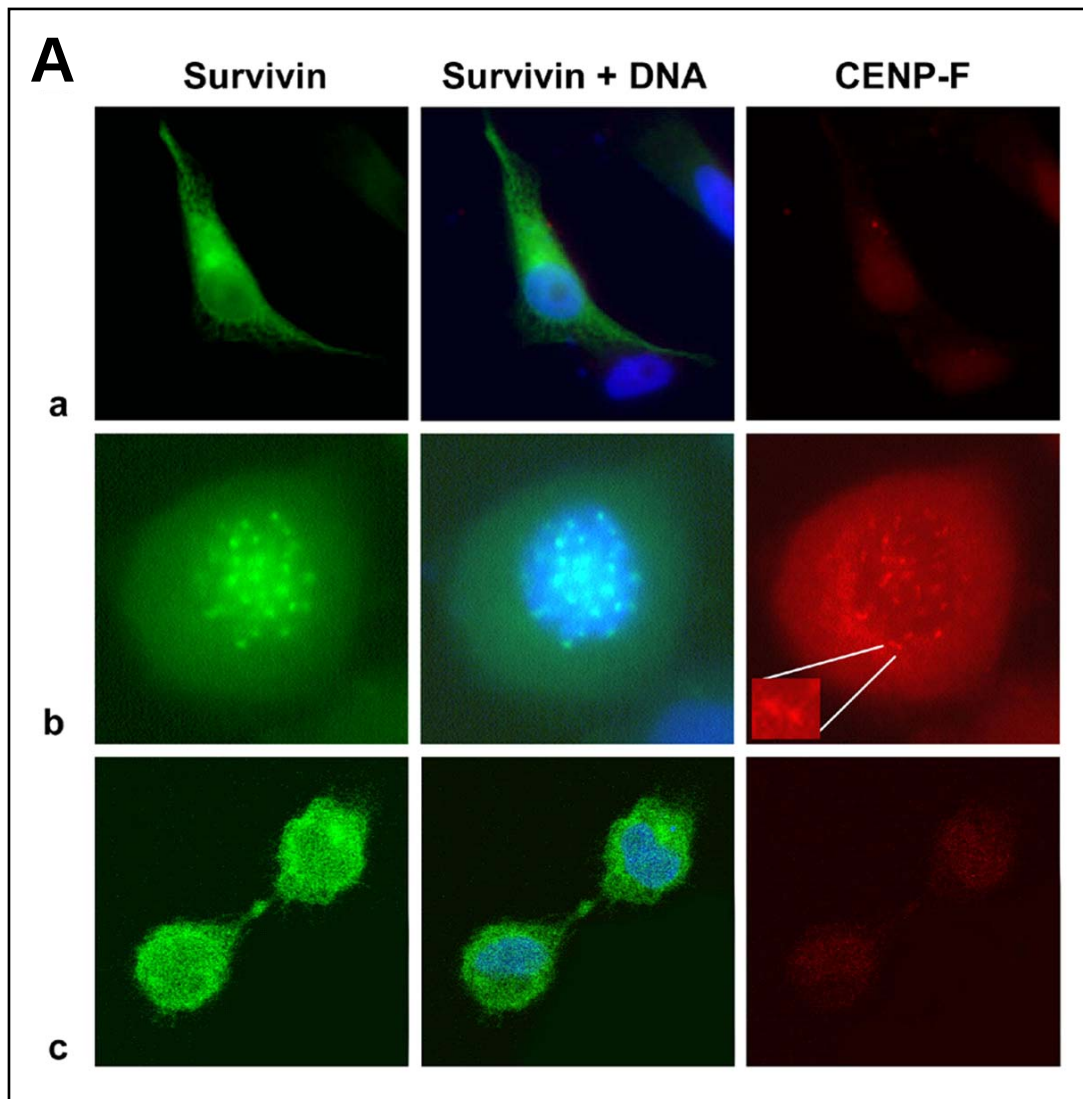


Abbildung 3.3/A: Subzelluläre Lokalisation von Survivin-EGFP während des Zellzyklus. CENP-F akkumuliert graduell während des Zellzyklus an den Zentromeren mit den höchsten Leveln in der G2- und M-Phase und wird nach Beendigung der Mitose schnell degradiert. Dort bildet es duale Foci, da es die äußeren Bereiche an beiden Seiten des Kinetochors bindet und so als Zentromermarker dient. Survivin-EGFP ist während der Interphase hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert **(a)**, akkumuliert in distinkten Foci an den Zentromeren in der Metaphase **(b)** und kann im Midbody während der Zytokinese nachgewiesen werden **(c)** (Vergrößerung 650 fach).

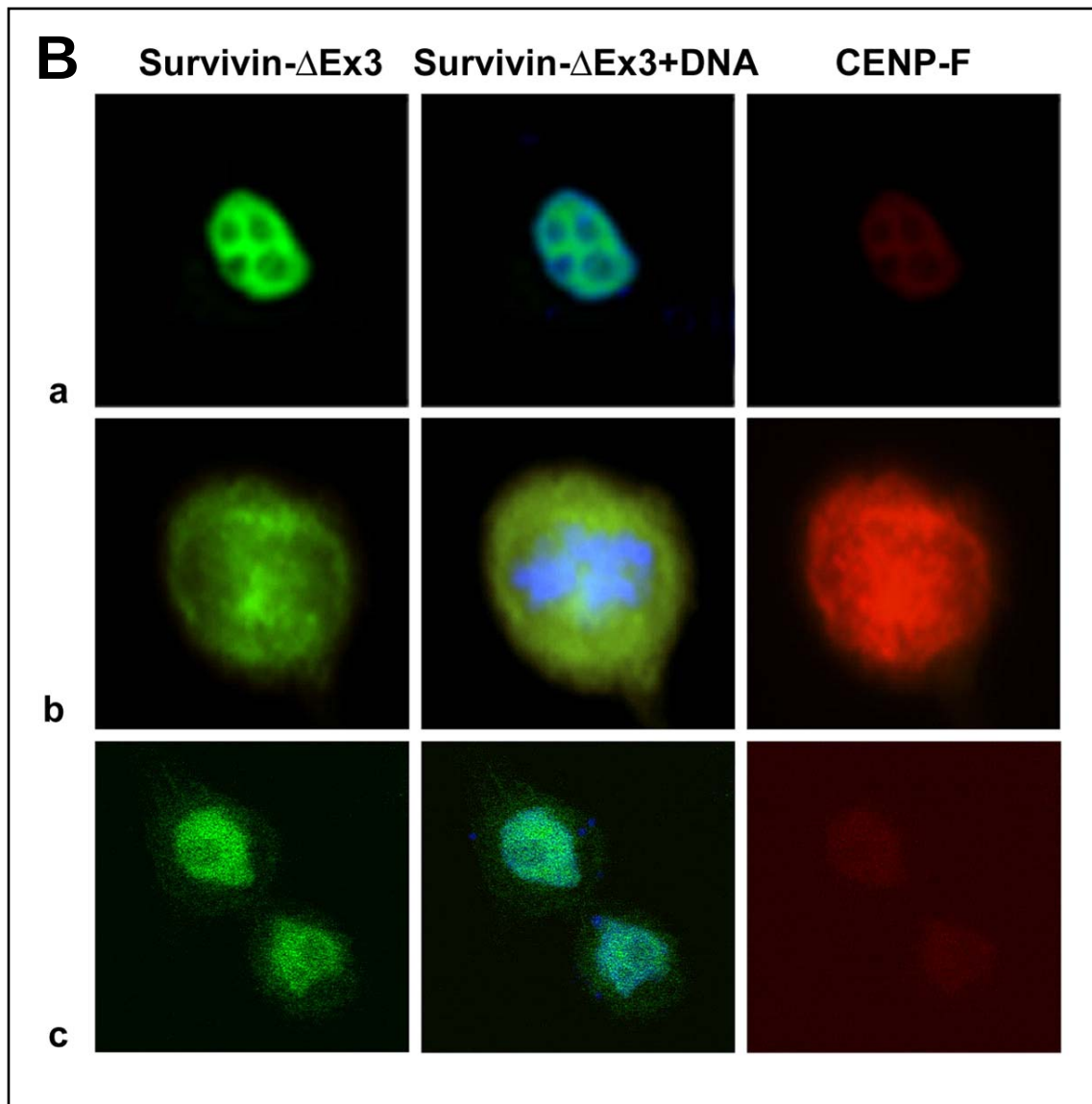


Abbildung 3.3/B: Subzelluläre Lokalisation von Survivin- Δ Ex3-EGFP während des Zellzyklus. Survivin- Δ Ex3-EGFP ist in der Interphase ausschließlich im Zellkern lokalisiert **(a)**. In Metaphase-Zellen **(b)** ist Survivin- Δ Ex3-EGFP in der gesamten Zelle verteilt, wahrscheinlich durch den Verlust der nukleären Kompartimentierung nach Auflösung der Zellkernmembran. Im Vergleich mit der engen Kolo­kalisation von Survivin-EGFP und CENP-F **(vergl. A/b)** kann für Survivin- Δ Ex3-EGFP nur in wenigen Fällen bei einer Minderheit der Zellen eine Kolo­kalisation mit CENP-F nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigen die Survivin- Δ Ex3-EGFP Transfektanten eine Abweichung von der sonst charakteristischen Akkumulation von CENP-F in dualen Foci **(b)** Survivin- Δ Ex3-EGFP kann nicht in den Midbodies detektiert werden **(c)** (Vergrößerung 650 fach).

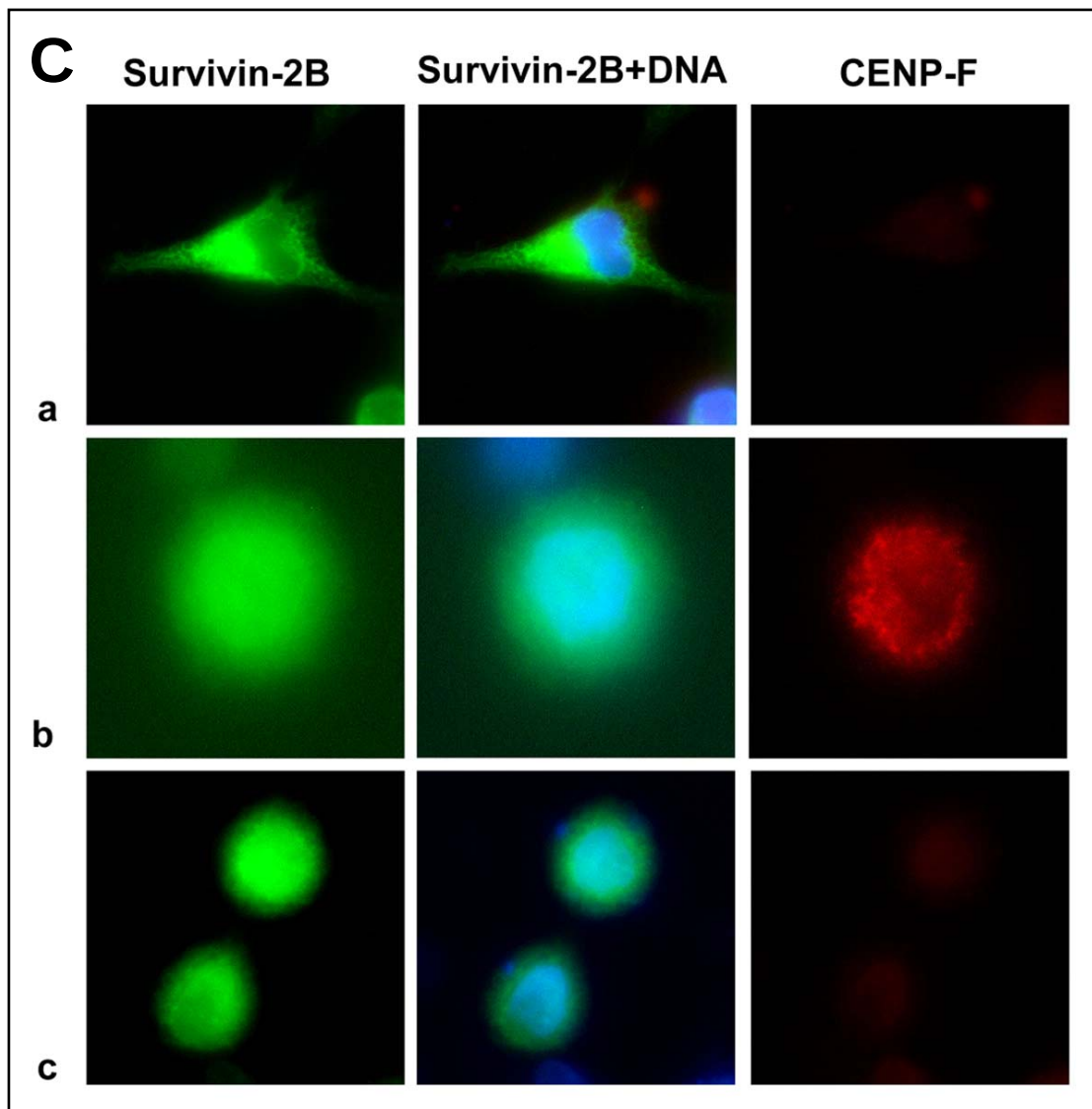


Abbildung 3.3/C: Subzelluläre Lokalisation von Survivin-2B während des Zellzyklus. Survivin-2B-EGFP ist während der Interphase im Zytoplasma lokalisiert **(a)**. In Metaphase-Zellen **(b)** zeigt Survivin-2B-EGFP keine Zentromerassoziation. In der Telophase **(c)** konnte Survivin-2B-EGFP nicht in den Midbodies detektiert werden (Vergrößerung 650 fach).

3.2.4 Zweigeteiltes nukleäres Lokalisationssignal (NLS) bei Survivin-ΔEx3: Implikationen für die subzelluläre Lokalisation

Da für Survivin-ΔEx3 eine nukleäre Anreicherung vorhergesagt und auch experimentell bestätigt wurde, benutzen wir die PSORT II Analyse für die Identifizierung von drei nukleären Lokalisationsignal-Erkennungsmustern. Obwohl kein „pat4“ Muster in einer der drei Survivin Varianten gefunden wird, kann das „pat7“ Erkennungsmuster die NLS Sequenz *PTIRRK*N als Teil des zweigeteilten NLS *RKPTIRRK*NLRKLRRKC in Survivin-ΔEx3 identifizieren. Dies ist in den beiden anderen Spleißvarianten nicht der Fall. Dieses zweigeteilte NLS in Survivin-ΔEx3 wird beim Spleißen erzeugt und resultiert aus einer Leserahmenverschiebung in Exon 4. Das zweigeteilte NLS erstreckt sich über 11 Aminosäuren und hat hohe Homologie mit anderen bereits identifizierten, zweigeteilten Kernlokalisierungssignalen (Abbildung 3.4) (Konsensus Sequenz nach Jans und Hübner: (K/R)(K/R) - (10 -12 Aminosäuren Platzhalter) - (K/R)(K/R)(K/R)) (Jans *et al.*, 1996). Interessanterweise weist das erst kürzlich identifizierte Schweine-Homolog von Survivin-ΔEx3, Survivin-ΔEx118 (Wenzel *et al.*, 2000), ein sehr ähnliches NLS auf (Abbildung 3.5). All diese Analysen legen nahe, dass es sich bei dem in Survivin-ΔEx3 gefundenem NLS um ein funktionelles Signal handelt, das die Akkumulation von Survivin-ΔEx3 im Zellkern bewirkt.

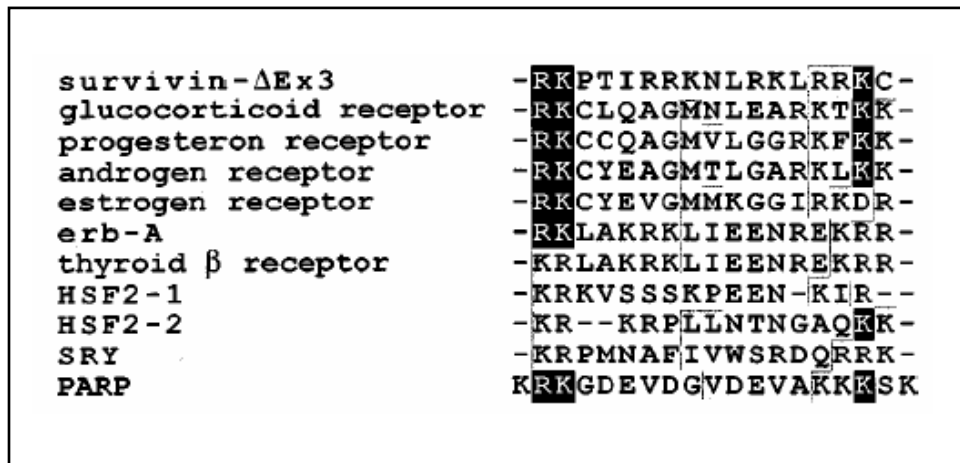


Abbildung 3.4: Alignment des zweigeteilten nukleären Lokalisationssignals (NLS) von Survivin-ΔEx3 und anderen Proteinen. Das zweigeteilte NLS von Survivin-ΔEx3 weist eine hohe Homologie zum NLS verschiedener Steroidrezeptoren auf. Interessanterweise umfasst das zweigeteilte NLS von Survivin-ΔEx3 auch die basischen Aminosäuren des „pat7“-NLS PTIRRKN. Das Alignment wurde mit ClustalW durchgeführt und mit Boxshade nachbearbeitet. Dunkle Schattierungen markieren hoch konservierte Bereiche.

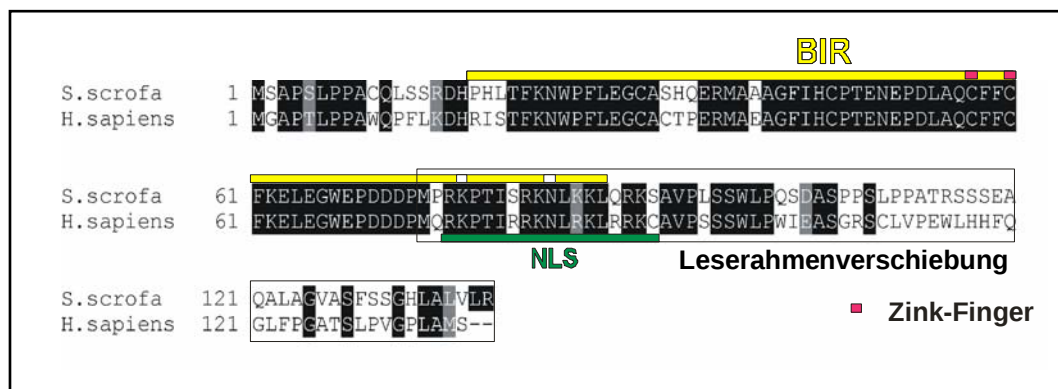


Abbildung 3.5: Alignment der kompletten Sequenz von Survivin-ΔEx3 und dem Homolog aus *S. scrofa*, Survivin-Δ118. Der erste Teil des Carboxyterminus, einschließlich des NLS, ist in beiden Homologen hoch konserviert. Der zweite Teil des Carboxyterminus von Survivin-Δ118 aus *S. scrofa* zeigt nur schwache Homologie. BIR = „baculoviral inhibitor of apoptosis repeat“; NLS = „nuclear localisation signal“; Leserahmenverschiebung ist mit schwarzem Kasten markiert

3.2.5 Deletionsanalyse des zweigeteilten NLS in Survivin- Δ Ex3

Um die Relevanz für die subzelluläre Lokalisation des hier gefundenen NLS zu demonstrieren, wird eine NLS deletierte Mutante hergestellt. Dieses Survivin- Δ Ex3^{NLS}-EGFP Fusionsprotein wird in HeLa Zellen exprimiert. Zur Kontrolle der Überexpression werden Western-Blot Experimente durchgeführt, um die Expression der NLS-Mutante mit der Expression der nicht deletierten Spleißvariante, Survivin- Δ Ex3, zu vergleichen (Abbildung 3.6/B). Hier zeigt sich, dass die Expressionstärke der NLS-Mutante mit der des Survivin- Δ Ex3 vergleichbar ist. Zur Kontrolle der fehlerfreien Deletion wird die hergestellte Deletionsmutante einer DNA Sequenzierung unterzogen (Abbildung 3.6/C). Diese ergibt, dass keine zusätzlichen Mutationen durch die verschiedenen Klonierungsschritte aufgetreten sind. Bei der Analyse der Lokalisation der Deletionsmutante zeigt sich, dass trotz fehlendem NLS die Kernlokalisierung von Survivin- Δ Ex3 erhalten bleibt. Jedoch ist zusätzlich eine zytoplasmatische Lokalisation zu beobachten (Abbildung 3.6/A). Korrespondierende Ergebnisse konnten auch von anderen Arbeitsgruppen gemacht werden (Otterlei et al., 1998). Sie beobachteten nach der Deletion des essentiellen NLS, das an der nukleären Lokalisation der humanen Uracil-DNA-Glykosylase beteiligt ist, ein ähnliches Lokalisationsmuster. Dieses in Survivin- Δ Ex3 gefundene, zweigeteilte NLS ist also funktionell aktiv. Es ist jedoch nicht ausschließlich für die selektive Akkumulation im Nukleus zuständig, sondern bewirkt offenbar die vollständige Beseitigung von Survivin- Δ Ex3 aus dem Zytoplasma.

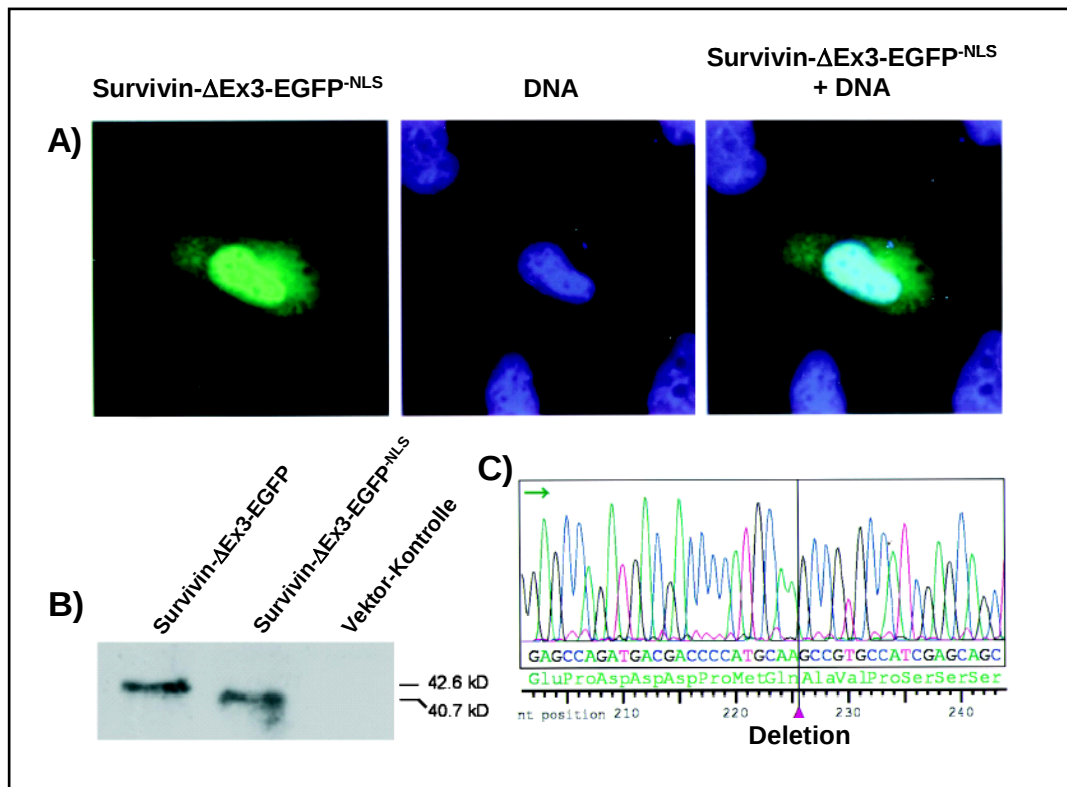


Abbildung 3.6: **A)** Die Deletion des zweigeteilten NLS in Survivin-ΔEx3-EGFP^{NLS} resultiert in zytoplasmatischer sowie nukleärer Akkumulation (Vergrößerung 650 fach). **B)** Die Expression von Survivin-ΔEx3-EGFP^{NLS} wird durch Immunoblotting mit einem anti-Survivin Antikörper kontrolliert. **C)** Die fehlerfreie Deletion wird mit Hilfe einer DNA Sequenzierung bewiesen (Deletion kennzeichnet die Stelle wo sich vorher das NLS befunden hat).

3.2.6 Inhibition von UVA-induzierter Apoptose durch Survivin in HaCaT-Zellen

Um die Apoptose-inhibierende Wirkung der Survivin-EGFP Konstrukte, die für den rezeptorvermittelten Weg der Apoptoseinduktion bestätigt ist (Ambrosini *et al.*, 1997; Mahotka *et al.*, 1999), auch auf andere Apoptoseinduktoren hin zu untersuchen, wird UVA-Strahlung eingesetzt. Diese spricht den mitochondrialen Signalweg der Apoptose an (Godar, 1999). Es ist bekannt, dass Survivin überexprimierende Zellen zu einem gewissen Grad vor Apoptoseinduktion durch UVB Strahlung geschützt sind (Grossman *et al.*, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass UVA-induzierte Apoptose auch Survivin-Signalwege beeinflusst (He *et al.*, 2004). Daher liegt es nahe, dass antiapoptotische Potential von Survivin und

seinen Spleißvarianten auch nach UVA-Bestrahlung zu untersuchen. Dazu werden die Survivin-EGFP Konstrukte in HaCaT Zellen, einer Keratinozytenzelllinie der menschlichen Haut, die natürlicherweise viel mit Sonnenlicht in Berührung kommt, exprimiert. Die Bestrahlung der transfizierten Zellen wird mit 40 und 60 J/cm² UVA durchgeführt (Abbildung 3.7). Die Analyse der Apoptoseinduktion erfolgt mit Hilfe der Hoechst-Färbung, die eine Beurteilung der Kernmorphologie erlaubt. Hier zeigt sich, dass die Survivin-EGFP transfizierten Zellen tatsächlich signifikant vor Apoptose geschützt sind (Abbildung 3.7/A). Die Survivin-ΔEx3-EGFP und Survivin-2b-EGFP transfizierten Zellen weisen dagegen, verglichen mit den Vektor-Kontrollen, eine deutlich erhöhte Apoptoserate auf (Abbildung 3.7/B+C). In Analogie zu anderen Apoptoseinduktoren (Mahotka *et al.*, 2002b; Mahotka *et al.*, 1999) ist die Survivin-2b Variante also auch unter den hier gewählten Bedingungen proapoptotisch. Interessanterweise zeigt Survivin-ΔEx3-EGFP in der Überexpression keine schützende Wirkung im Hinblick auf UVA induzierte Apoptose (Abbildung 3.7/B). Für dieses Konstrukt ließ sich bei rezeptorvermittelter Apoptose (CH-11 induziert) (Mahotka *et al.*, 2002b; Mahotka *et al.*, 1999) noch eine apoptoseinhibierende Wirkung nachweisen.

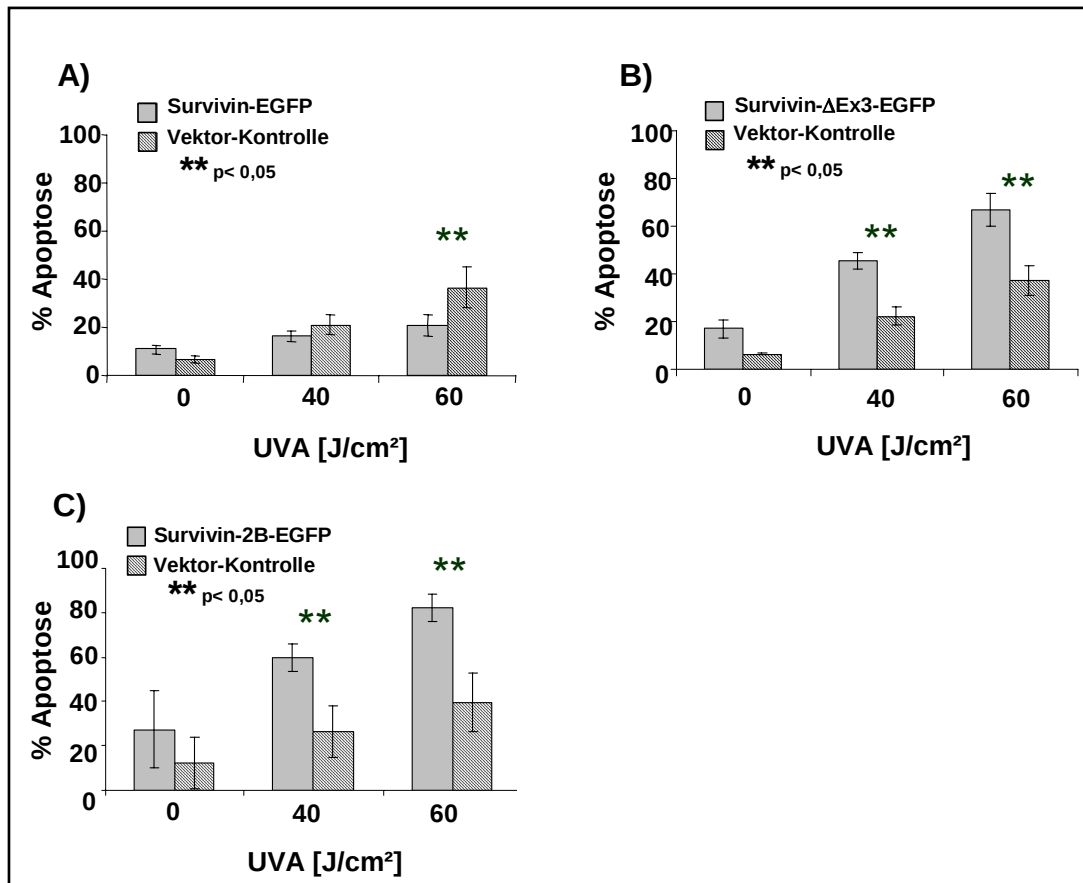


Abbildung 3.7: Differenzielles antiapoptotisches Potential der Survivin Spleißvarianten transfiziert als EGFP-Konstrukte in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT. Der Zelltod wird mit UVA-Strahlung induziert und die apoptotische Kernmorphologie nach 24 Stunden mit der Hoechstfärbung untersucht. **(A)** Survivin-EGFP inhibiert signifikant die UVA induzierte Apoptose. **(B+C)** Survivin-ΔEx3-EGFP und Survivin-2B-EGFP hingegen verstärken die Apoptose eher im Vergleich zur Kontrolle.

3.2.7 Verlust der antiapoptotischen Wirkung von Survivin durch die Anwesenheit von Nitrit während der Bestrahlung

Analysen belegen, dass Nitrit während der UVA Bestrahlung photolytisch unter anderem zu bioaktivem Stickstoffmonoxid (NO) gespalten wird. Daher stellt sich die Frage, ob dieses so generierte NO einen Einfluss auf die apoptoseinhibierende Wirkung von Survivin hat. Survivin verfügt über eine BIR-Domäne, die auf einem funktionellen Zink-Finger beruht, und es konnte belegt werden, dass diese Domäne entscheidend an der Apoptoseinhibition beteiligt ist. Es ist anzunehmen, dass das bei der Bestrahlung entstehende NO mit dem Zink-kordinierenden Cystein durch

S-Nitrosierung wechselwirkt. Dies führt zu einer Verdrängung des Zinks mit einhergehendem Funktionsverlust der Domäne und sollte sich in einem Verlust des antiapoptotischen Potentials zeigen. Um diese Hypothese zu experimentell zu belegen, werden HaCaT-Zellen, die die verschiedenen Survivin-Konstrukte überexprimieren, mit 40 und 60 J/cm² UVA in Anwesenheit von 500 µM Nitrit bestrahlt. Die Apoptoserate in Anwesenheit von Nitrit während der Bestrahlung ist generell höher als mit UVA alleine. Tatsächlich zeigt die Survivin Überexpression hier keine antiapoptotische Wirkung mehr (Abbildung 3.8/A). Dies könnte bedeuten, dass das entstehende NO mit der Funktion des Zink-Fingers interferiert und so die antiapoptotische Wirkung von Survivin aufhebt. Eine andere Erklärung für das beobachtete Ergebnis ist ein alternativer apoptotischer Weg, der nicht von Survivin inhibiert wird. Dies wird nun in weiteren Experimenten untersucht.

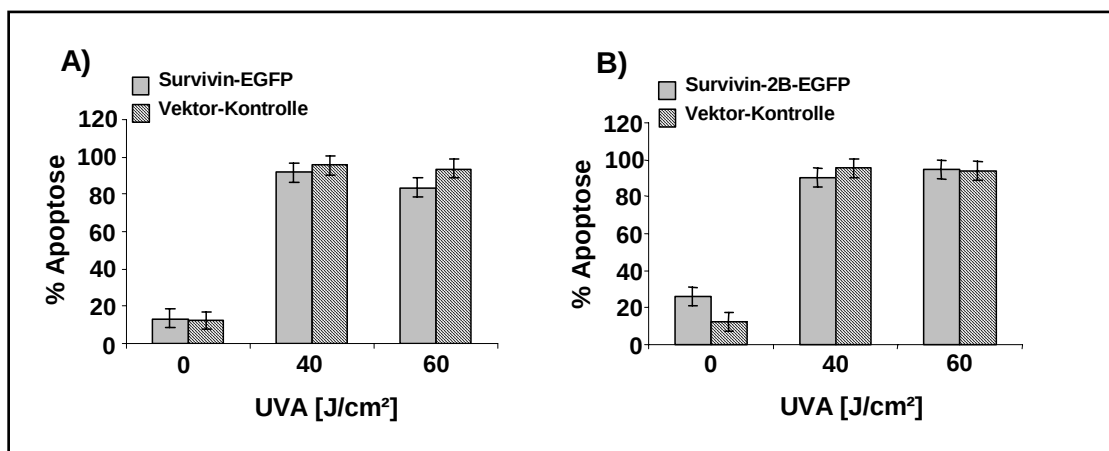


Abbildung 3.8: Differentielles antiapoptotisches Potential der Survivin Spleißvarianten transfiziert als EGFP-Konstrukte in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT. Der Zelltod wird mit UVA-Strahlung in Anwesenheit von Nitrit [500 µM] induziert und die apoptotische Kernmorphologie nach 24 Stunden mit der Hoechstfärbung untersucht. Die Apoptoserate ist generell höher bei einer Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit (Vergleich Abbildung 3.7). Weder **(A)** Survivin-EGFP noch **(B)** Survivin-2B-EGFP inhibieren signifikant die UVA induzierte Apoptose in Anwesenheit von Nitrit.

3.3 Stickstoffmonoxid und Caspase-unabhängige Apoptose

3.3.1 Veränderter Kernphänotyp durch die Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit

Die Annahme, dass das bei UVA-Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit generierte NO vielleicht zu einer anderen Art des Zelltodes führt als eine UVA induzierte Apoptose, wird durch die Kernmorphologie der Nitrit/UVA behandelten Zellen unterstützt. Hier zeigt sich, dass die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Nitrit und UVA nicht den klassischen apoptotischen Kernphänotyp repräsentiert, der sich durch die Bildung kleiner DNA Fragmente, den so genannten „apoptotic bodies“, auszeichnet (Abbildung 3.9/A). Stattdessen weisen die UVA/Nitrit behandelten Zellkerne zwar eine Kondensierung des Chromatins auf, jedoch bleibt die Bildung der „apoptotic bodies“ aus (Abbildung 3.9/B). Dies liefert Hinweise auf einen alternativen, Caspase-unabhängigen Zelltod.

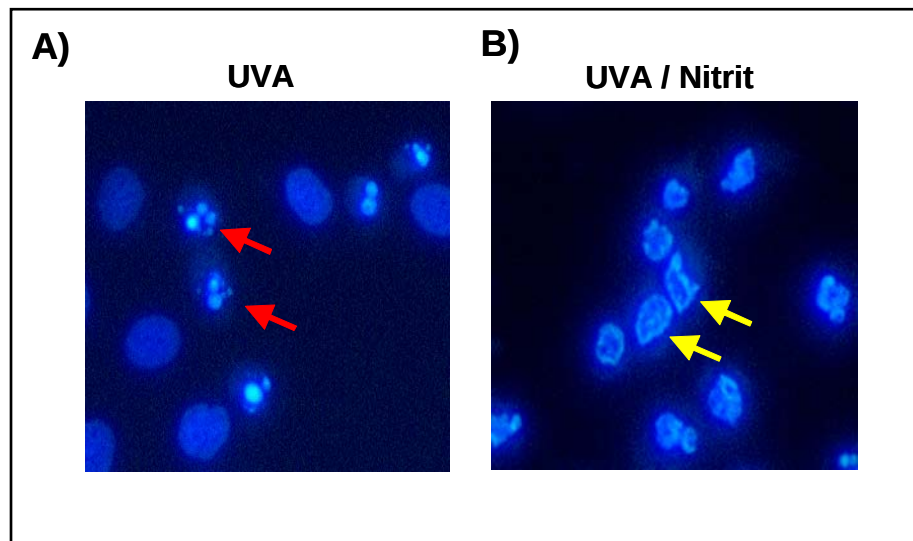


Abbildung 3.9: Differentielle Kernmorphologie nach Behandlung von humanen Keratinozyten mit UVA (**A**) sowie UVA und Nitrit (**B**). Zellen werden mit 50J/cm² UVA und bei (**B**) zusätzlich mit 500µM Nitrit behandelt und nach 12h Hoechst gefärbt und mikroskopisch analysiert. (**A**) Deutlich sind hier die „apoptotic bodies“ zu erkennen (Pfeile rot). (**B**) Trotz kondensiertem Chromatin ist keine Caspase-abhängige Bildung der „apoptotic bodies“ zu erkennen (Pfeile gelb) (Vergrößerung 400 fach).

3.3.2 Caspase-3 Inhibition *in vitro*

Die Hypothese, dass die Anwesenheit von Nitrit tatsächlich zu einem alternativen, nicht von Caspasen vermitteltem Zelltod führt, soll in weiteren Versuchen geklärt werden. Dazu wird zunächst untersucht, ob das photolytisch generierte NO, ähnlich wie enzymatisch gebildetes (Rossig *et al.*, 1999) in der Lage ist, Caspasen durch S-Nitrosierung des Cysteins im aktiven Zentrum zu hemmen. Aus diesem Grund wird ein *in vitro* Aktivitätstest mit Caspase-3 durchgeführt. Dazu werden die entsprechenden Reaktionen mit verschiedenen Konzentrationen Nitrit versetzt und mit unterschiedlichen Intensitäten UVA behandelt. Die Aktivität der Caspase ist dabei proportional zur Bildung eines Farbstoffs (Ac-DEVD-pNA), der als Substrat für die Caspase-3 dient. Dieser Farbstoff kann in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 405nm nachgewiesen werden. In diesem Experiment kann gezeigt werden, dass die Aktivität der Caspase durch UVA-Bestrahlung per se dosisabhängig bis zu 30% gehemmt wird (Abbildung 3.10/A). Die Anwesenheit von Nitrit während der Bestrahlung führt zu einer Inhibition der Aktivität der Caspase von bis zu 90%. Dies macht, verglichen mit den nur UVA behandelten Proben, eine zusätzliche Inhibition von 60% aus (Abbildung 3.10/A). Die Inhibition ist sowohl von der UVA-Dosis als auch von der Nitrit-Konzentration abhängig. Die Inkubation der Reaktionsansätze mit Nitrit ohne UVA-Bestrahlung weist keine signifikante Änderung der Caspase-3-Aktivität auf (Abbildung 3.10/B). Die Behandlung der Proben mit N-Ethyl-Maleimid (NEM), das Schwefelreste - wie die des Cysteins im Aktiven Zentrum von Caspase-3 - alkylieren kann und somit die Enzymaktivität hemmt, zeigt ebenfalls eine deutliche Inhibition der Aktivität von 30% (Abbildung 3.11). Erstaunlicherweise zeigt die gleichzeitige Behandlung mit NEM und UVA eine viel stärkere Aktivitätsreduktion von bis zu 60% (Abbildung 3.11). Dies deutet darauf hin, dass das UVA-Licht noch einen anderen, bisher unbekannten Effekt auf die Caspase-3-Aktivität besitzt. Die Alkylierung alleine sollte schon das aktive Zentrum inhibieren und das Enzym damit inaktivieren. Die stärkste Inhibition der Caspase-Aktivität tritt bei gleichzeitiger Behandlung mit Nitrit, UVA und NEM auf. Hier ist die Aktivität, verglichen mit den unbehandelten Kontrollen, um 80% reduziert. Die hier erzielten Ergebnisse belegen, dass die

Caspase-3-Aktivität in Anwesenheit von Nitrit während der UVA-Bestrahlung deutlich vermindert ist.

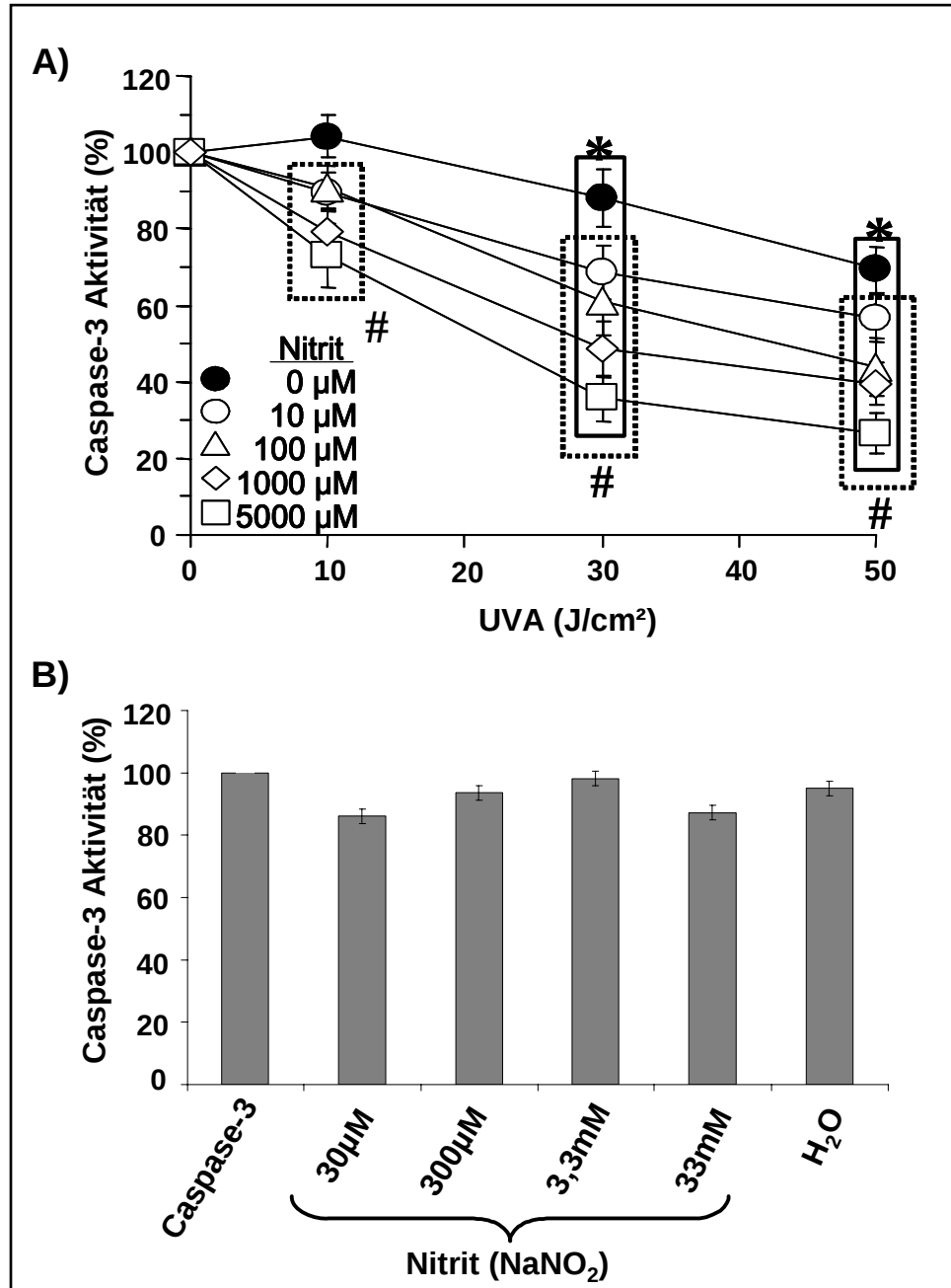


Abbildung 3.10: *In vitro* Caspase-3 Aktivitätsassay nach Behandlung mit UVA und Nitrit **(A)**. Caspase-3-Aktivität wird durch UVA-Bestrahlung alleine um 30% inhibiert. Die Anwesenheit von Nitrit während der Bestrahlung reduziert die Aktivität der Caspase bis zu 90%. **(B)** Zur Kontrolle werden die Proben mit Nitrit ohne UVA-Bestrahlung inkubiert, und es kann kein signifikanter Effekt auf die Aktivität der Caspase beobachtet werden.

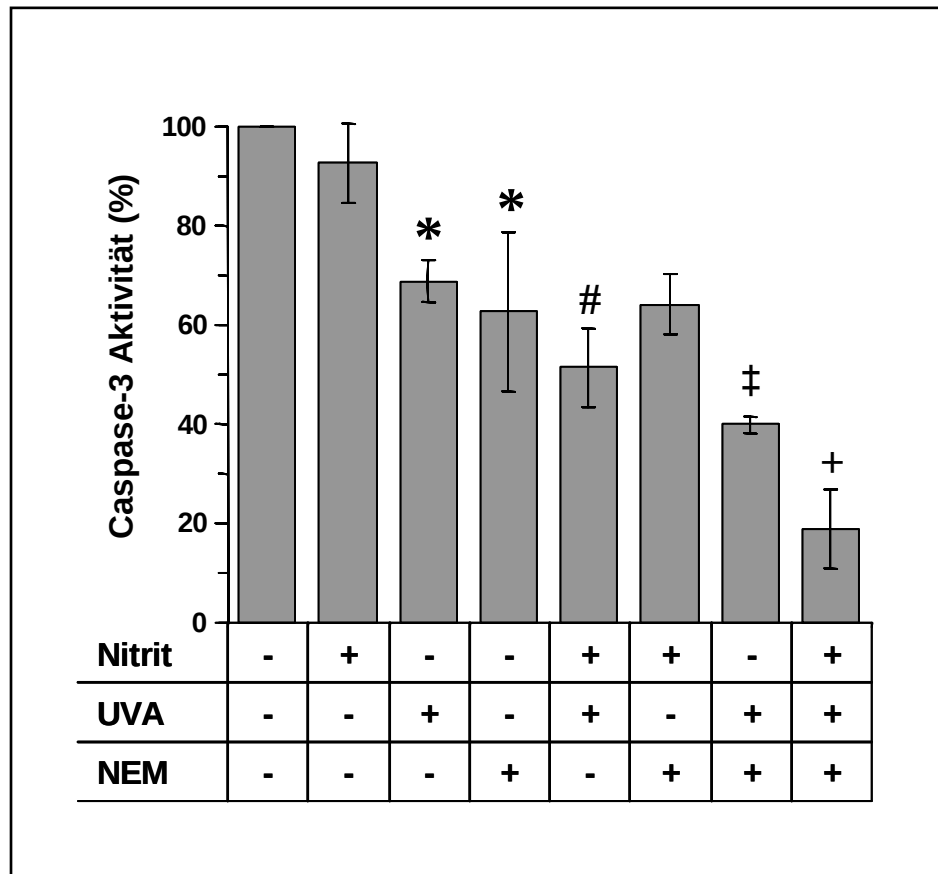


Abbildung 3.11: In vitro Caspase-3 Aktivitätsassay nach Behandlung mit UVA [50J/cm²], Nitrit [500µM] und NEM [1mM]. NEM alleine zeigt eine Hemmung der Caspase-3-Aktivität von 30%. Erstaunlicherweise zeigt NEM in Verbindung mit UVA sowie mit UVA in Anwesenheit von Nitrit einen synergistischen Effekt auf die Aktivität von Caspase-3.

3.3.3 Zunahme nitrosierter Proteine durch photolytisch generiertes NO

Als Nachweis, dass der Versuchsaufbau auch auf zellulärer Ebene zu einer Zunahme der Nitrosierung von Proteinen führt, wird ein Zellkultursystem adaptiert. Dazu werden HaCaT Zellen in An- und Abwesenheit von verschiedenen Mengen Nitrit mit 50J/cm² UVA-Licht bestrahlt. Um die entstandenen nitrosierten Proteine zu messen, müssen die Zellen nach der Behandlung direkt lysiert werden. Der Nachweis der S- und N-Nitrosoverbindungen (zusammen: RX-NO) erfolgt mit Hilfe der Chemilumineszenz Detektion (CLD). Hier bestätigt sich, dass die Zugabe von Nitrit während der Bestrahlung tatsächlich eine dosisabhängige Zunahme der S- und N-nitrosierten Proteine bewirkt (Abbildung 3.12). Die

Zugabe von Vitamin C verstärkt diesen Effekt noch. Nitrit alleine hat keinen Effekt auf die Menge der S- und N-nitrosierten Proteine.

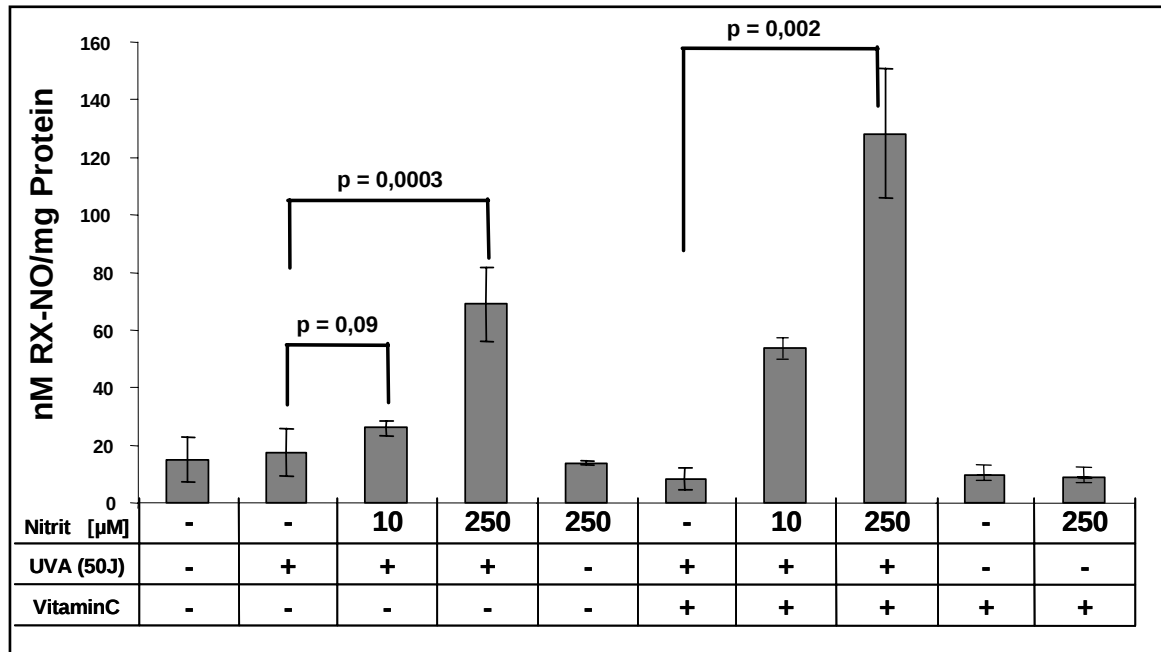


Abbildung 3.12: Die Anwesenheit von Nitrit während der Bestrahlung von HaCaT Zellen mit UVA führt zu einer dosisabhängigen Zunahme der S- und N-nitrosierten Proteine (RX-NO). Die Zugabe von Vitamin C verstärkt diesen Effekt. Nitrit alleine steigert die RX-NO Bildung nicht. (UVA = 50J/cm², Vitamin C = 1mM) Die Messungen werden mit der Chemilumineszenz Detektion durchgeführt.

3.3.4 Caspase-3 Inhibition *in vivo*

Um nachzuweisen, dass eine Caspase-Inhibition auch intrazellulär stattfindet, werden Western-Blot Experimente durchgeführt. Hierzu wird die Spaltung von Poly(ADP)-ribose Polymerase (PARP), ein direktes Substrat von aktiver Caspase-3 (Kaufmann *et al.*, 1993), untersucht. Dazu werden HaCaT Zellen in An- und Abwesenheit von 500µM Nitrit mit je 50J/cm² UVA bestrahlt und nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die so erhaltenen Proteinlysate können nun im Western-blot mit einem PARP-spezifischen Antikörper untersucht werden. Dieser Antikörper erkennt sowohl das intakte 116kD große Protein als auch eines seiner Abbauprodukte, das eine Größe von 89kD hat. Tritt also die kleinere Bande bei 89kD auf, ist dies ein Beweis für Caspase-induzierte Spaltung von PARP und ein direkter Hinweis auf die

Aktivität von Caspase-3. Hier kann gezeigt werden, dass die Behandlung mit UVA alleine schon nach vier Stunden Inkubationszeit eine deutliche PARP-Spaltung bewirkt. Dies ist an dem kleineren Spaltprodukt unterhalb der 116kD Bande des intakten PARP zu erkennen (Abbildung 3.13/A). Auch im korrespondierenden Kernphänotyp, der eine deutliche Fragmentierung des Chromatins aufweist und die apoptotischen Körperchen bildet (Kerr *et al.*, 1972), die typisch für Caspase-abhängige Apoptose sind, ist dies zu erkennen. Nach der Behandlung mit UVA und Nitrit jedoch (Abbildung 3.13/B) ist auch nach 12 Stunden nur eine minimale Menge des Spaltproduktes von PARP zu detektieren. Hier zeigt der Kernphänotyp der so behandelten Zellen keine für die Caspase-abhängige Apoptose typische Kernfragmentierung. Die Morphologie der Zellkerne wird mit Hilfe der Hoechstfärbung dargestellt und gleichzeitig mit der Propidium-Iodid Färbung

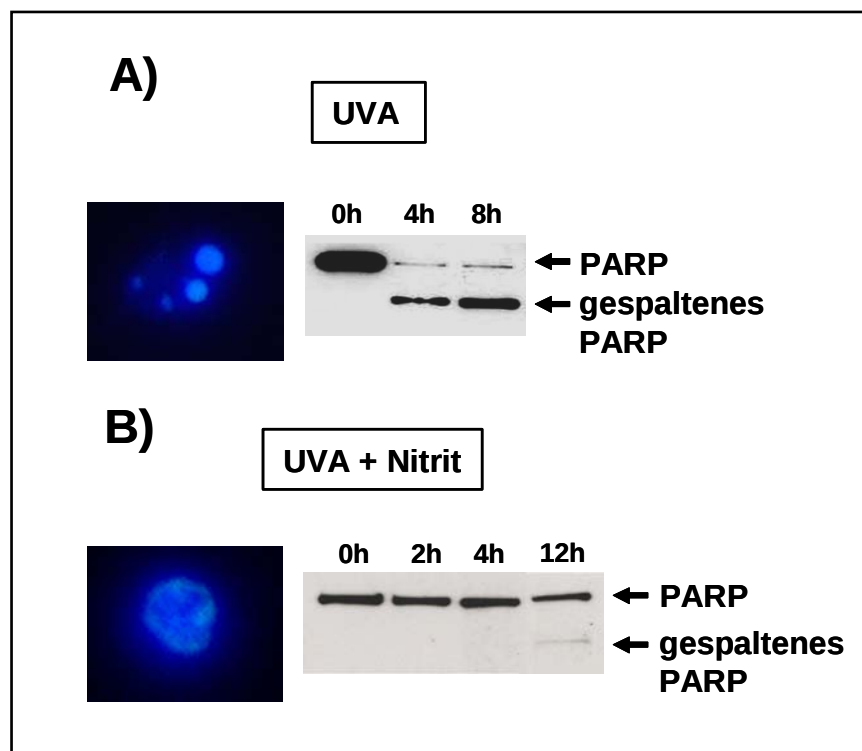


Abbildung 3.13: HaCaT Zellen wurden mit 50J UVA **(A)**, oder mit 50J UVA in Anwesenheit von 500µM Nitrit **(B)** bestrahlt, nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert und im Western-Blot analysiert. **(A)** Werden die Zellen nur mit UVA bestrahlt, erkennt man schon nach vier Stunden eine deutliche PARP-Spaltung, ein sicheres Indiz für aktivierte Caspase-3. Dies spiegelt sich auch im korrespondierenden Kernphänotyp mit den typischen apoptotischen Körperchen wider. **(B)** Werden die Zellen mit UVA in Anwesenheit von Nitrit bestrahlt, ist selbst nach 12 Stunden nur eine schwache Bande des PARP-Spaltproduktes zu erkennen, und der Kernphänotyp weist auch keine Caspase-abhängigen Phänotyp auf (Vergrößerung 650 fach).

eine Nekrose ausgeschlossen.

Um auszuschließen, dass die Zellen vielleicht gar keinen Zelltod vollziehen und deswegen keine PARP-Spaltung zu beobachten ist, werden in parallelen Versuchen Zelltoxizitätsassays (Abbildung 3.14) mit Hilfe der Neutralrot-Färbung durchgeführt. Hier zeigt sich, dass die Bestrahlung mit UVA durch Zugabe von Nitrit dosisabhängig zu einer Verstärkung der Zelltodrate führt.

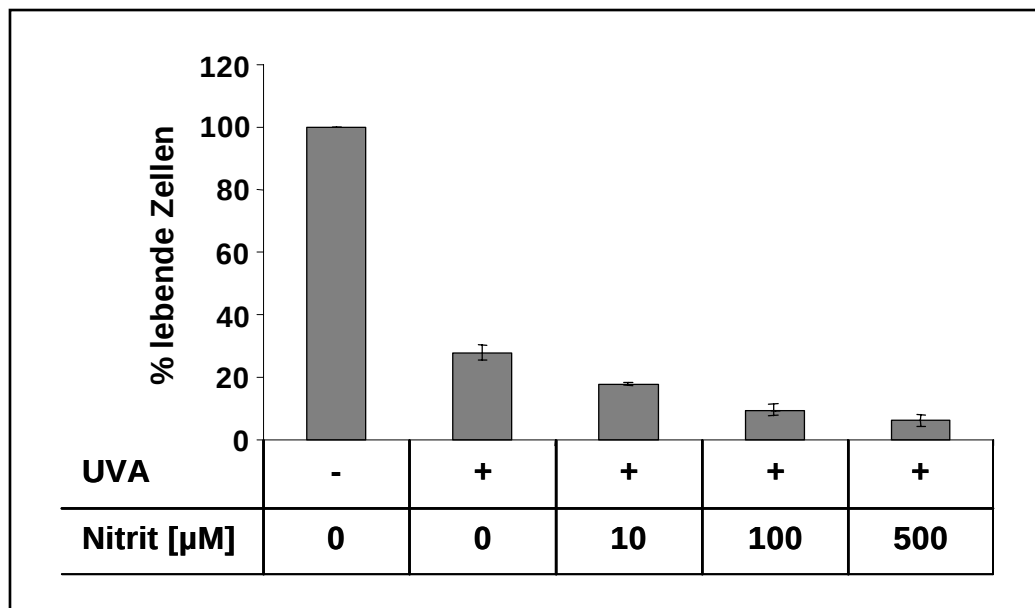


Abbildung 3.14: HaCaT Zellen werden mit $50\text{J}/\text{cm}^2$ UVA und den angegebenen Mengen Nitrit behandelt und nach 24h mit Hilfe der Neutral-Rot Färbung auf Vitalität untersucht. Die Zellzahl nimmt dosisabhängig mit steigenden Nitritkonzentrationen ab.

3.3.5 Spaltung von AIF (apoptosis-inducing-factor) durch photolytisch generiertes NO

Da das bei der photolytischen Spaltung von Nitrit entstehende NO *in vitro* sowie *in vivo* Caspasen hemmt, stellte sich nun die Frage, auf welchem Signalweg der Zelltod abläuft, wenn die Caspasen nicht aktiv sind. Seit einiger Zeit werden immer wieder Caspase-unabhängige Wege des Zelltodes diskutiert. Einer dieser Wege wird von AIF (*apoptosis-inducing-factor*) vermittelt. Wie einleitend erwähnt, handelt es sich hierbei um ein mitochondriales Protein, das nach Induktion des Zelltodes proteolytisch

gespalten wird. Daraufhin transloziert es aus dem Mitochondrium in den Nukleus, um dort die eine Fragmentierung der DNA in distinkte Teilstücke zu vermitteln. Der dabei entstehende Kernphänotyp ist dem der UVA/Nitrit behandelten Zellen sehr ähnlich, sodass dieses Protein näher untersucht wird. Um eine Beteiligung von AIF an den hier beobachteten Prozessen zu analysieren, werden HaCaT Zellen mit UVA in An- und Abwesenheit von Nitrit bestrahlt und nach 0, 4 und 8 Stunden die Proteine isoliert. Mit diesen Proteinlysaten werden Western-blot Experimente durchgeführt und AIF mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Tatsächlich zeigt sich, dass in Anwesenheit von Nitrit während der UVA-Bestrahlung nach ca. 4 Stunden eine Zunahme des kleineren Spaltproduktes von AIF detektierbar ist (Abbildung 3.15/B). Bei der Behandlung der Zellen mit UVA alleine ist dies nicht der Fall (Abbildung 3.15/A). Dieses Ergebnis belegt eindeutig, dass AIF während apoptotischer Prozesse bei den UVA/Nitrit behandelten Zellen aktiviert wird.

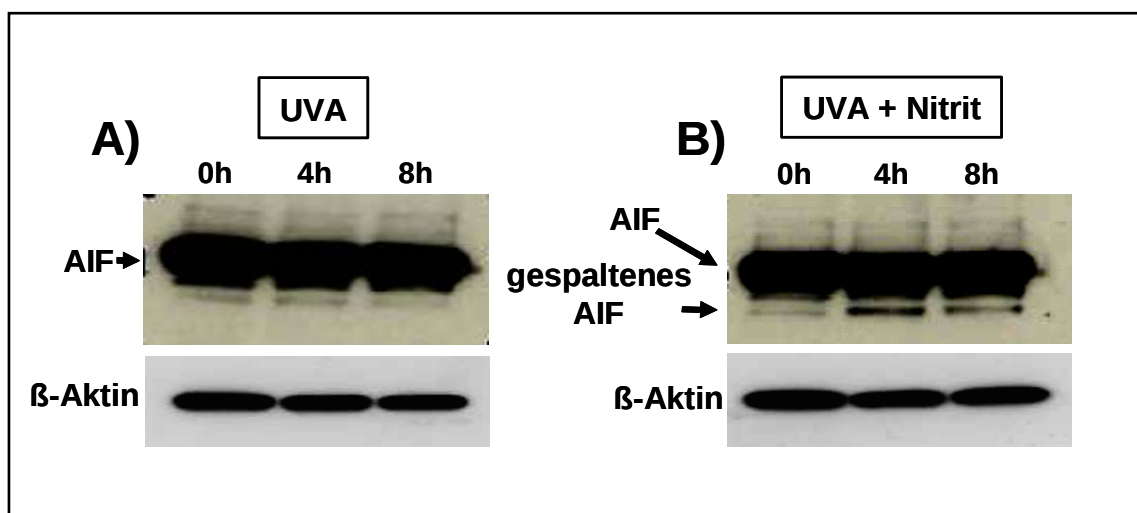


Abbildung 3.15: HaCaT Zellen werden mit 50J UVA **(A)** oder mit 50J UVA in Anwesenheit von 500μM Nitrit **(B)** bestrahlt, nach den angegebenen Zeitpunkten lysiert und im Western-Blot analysiert. **(A)** Nach der Behandlung mit UVA tritt kein kleineres Fragment von AIF auf. **(B)** Bei der gleichzeitigen Behandlung mit UVA und Nitrit ist nach 4h eine deutliche Zunahme des kleineren AIF-Spaltproduktes zu erkennen.

3.3.6 NO-abhängige Translokation von AIF in den Nukleus

Um nun die Translokation des AIF in den Nukleus nachzuweisen, wird die subzelluläre Lokalisation des Proteins in HaCaT Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen untersucht. Hier stellt sich heraus, dass AIF nach der Behandlung mit UVA und Nitrit tatsächlich im Zellkern zu finden ist (Abbildung 3.16/B), was bei Zellen, die mit UVA alleine behandelt werden, nicht der Fall ist (Abbildung 3.16/A). Da bei der photolytischen Spaltung von Nitrit nicht nur NO entsteht, sondern auch Sauerstoffradikale in großen Mengen produziert werden, kann es sein, dass die beobachtete AIF Translokation nicht vom entstehenden NO, sondern von den Sauerstoffradikalen induziert wird. Um die Effekte der unterschiedlichen Moleküle differenzieren zu können, werden HaCaT-Zellen in An- und Abwesenheit von Nitrit bestrahlt, zusätzlich jedoch mit cPTIO, einem NO-Radikalfänger oder mit Vitamin C, einem Sauerstoff-Radikalfänger, inkubiert. Ist die AIF Spaltung und anschließende Translokation in den Nukleus NO-abhängig, müsste dies durch die Zugabe von cPTIO, jedoch nicht in Anwesenheit von Vitamin C, verhindert werden. Die Immunfluoreszenzanalyse macht hier deutlich, dass die Anwesenheit von Vitamin C die AIF Translokation nicht hemmt (Abbildung 3.14/C). Jedoch verhindert die Zugabe von cPTIO eine Akkumulation von AIF im Nukleus (Abbildung 3.16/D), was eindeutig einen NO-abhängigen Effekt demonstriert. Dies bestätigt sich auch in der statistischen Auswertung der Präparate (Abbildung 3.17). Hier wird sichtbar, dass die AIF-Translokation nach UVA-Bestrahlung alleine nicht signifikant zunimmt. Bei gleichzeitiger Behandlung mit UVA/Nitrit nimmt die Kernlokalisation bei einer Dosis von 250µM Nitrit signifikant zu. Die Zugabe von Vitamin C verhindert hier nicht die Kernlokalisation von AIF, die jedoch durch die Behandlung mit cPTIO fast vollständig unterdrückt werden kann. Die Kontrollbehandlung mit Nitrit alleine weist keinen besonderen Effekt auf.

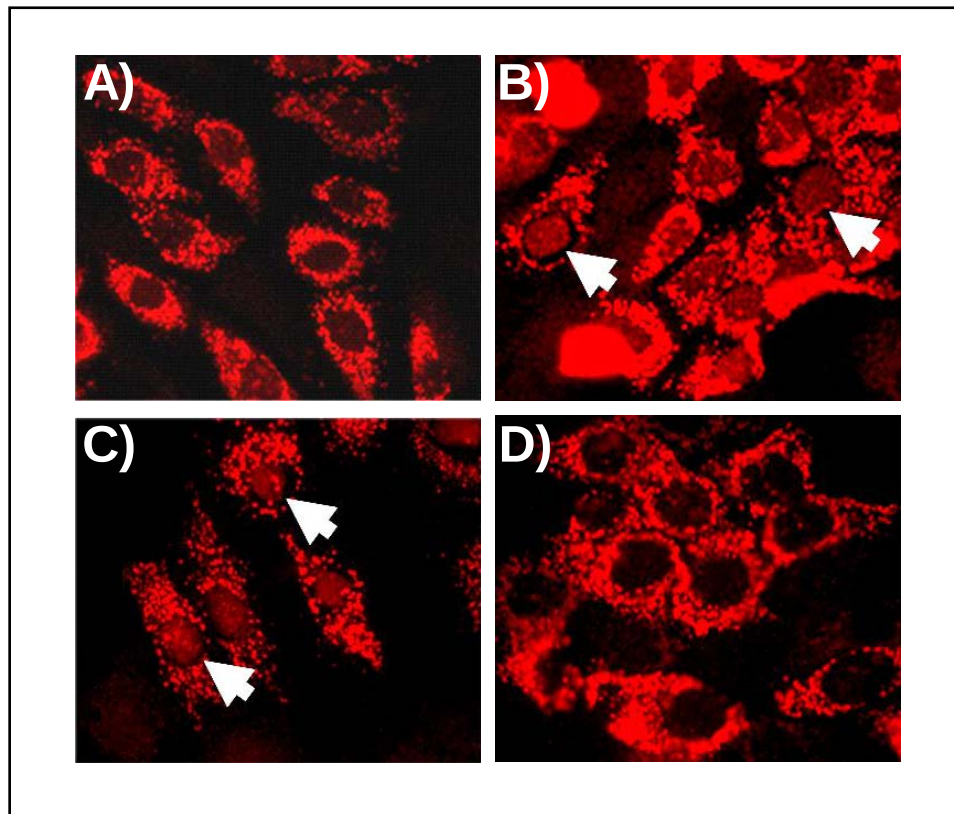


Abbildung 3.16: Immunfluoreszenz Analyse der AIF-Lokalisation in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit **A)** $40\text{J}/\text{cm}^2$ UVA, **B)** $40\text{J}/\text{cm}^2$ UVA und $500\mu\text{M}$ Nitrit, **C)** $40\text{J}/\text{cm}^2$ UVA und $500\mu\text{M}$ Nitrit in Anwesenheit von Vitamin C und **D)** $40\text{J}/\text{cm}^2$ UVA und $500\mu\text{M}$ Nitrit in Anwesenheit von cPTIO. Die gleichzeitige Behandlung mit UVA und Nitrit führt zu einer AIF-Translokation in den Nukleus (**B, Pfeile**). Interessanterweise verhindert die Zugabe von Vitamin C als Sauerstoffradikalfänger nicht die Translokation (**C, Pfeile**). Die Zugabe von cPTIO, einem NO-Radikalfänger, jedoch verhindert die Kerntranslokation von AIF, was einen NO-abhängigen Effekt demonstriert (Vergrößerung 400fach).

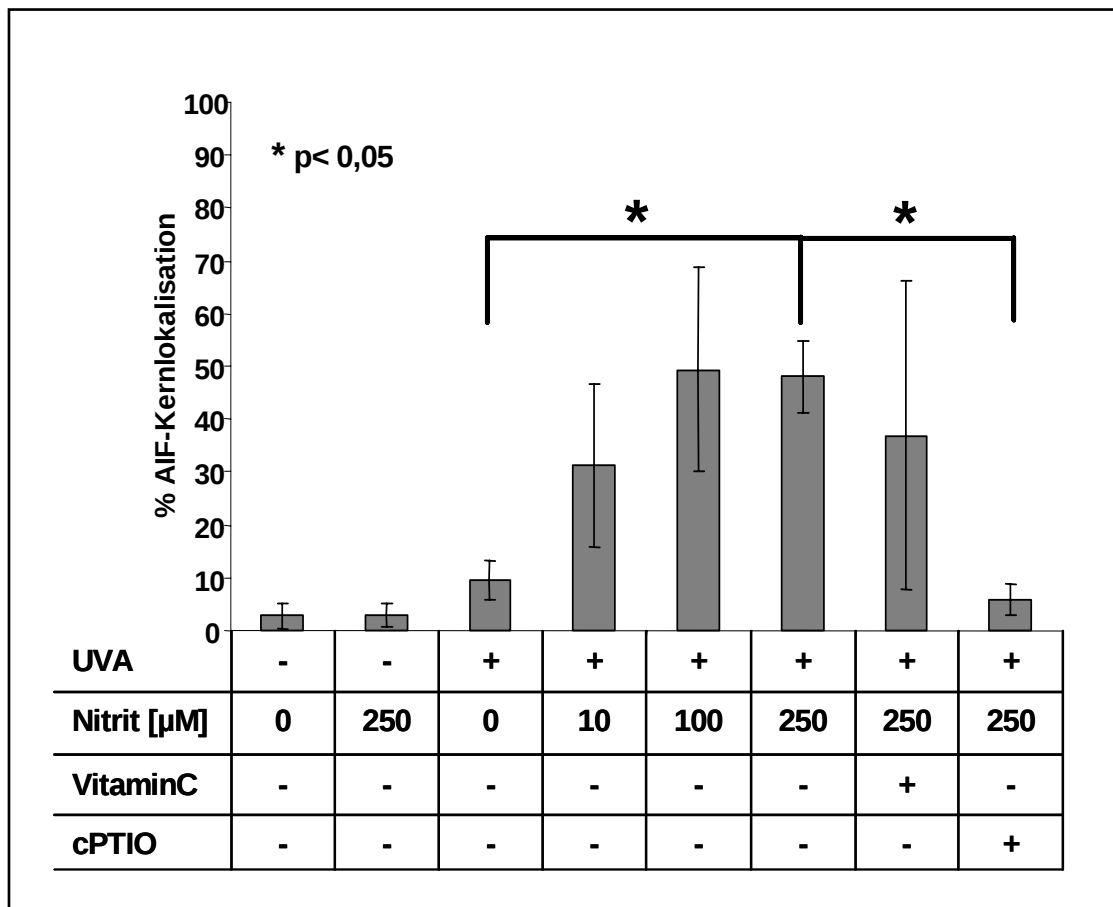


Abbildung 3.17: HaCaT Zellen werden mit $50\text{J}/\text{cm}^2$ UVA in An- und Abwesenheit von Nitrit VitaminC [1mM] und cPTIO [100 μM] bestrahlt und nach vier Stunden Inkubation einer Immunfluoreszenzanalyse unterzogen. Anschließend werden die verschiedenen Präparate auf AIF Kerntranslokation hin untersucht und dies statistisch ausgewertet. Die Zellen zeigen mit steigenden Nitritkonzentrationen auch eine vermehrte AIF-Akkumulation im Nukleus, was nicht durch Vitamin C, jedoch durch die Zugabe von cPTIO verhindert werden kann.

4. Diskussion

4.1 Gestörte Balance der Expression von Smac/DIABLO und XIAP: Ursachen für die Therapieresistenz bei Nierenzell-Karzinomen (RCC)

Eine Supprimierung der Apoptose fördert die Tumorprogression sowie die Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung (Gerharz *et al.*, 1999; Igney *et al.*, 2002; Mahotka *et al.*, 2002a; Mahotka *et al.*, 2002b; Mahotka *et al.*, 1999; Reed, 1999). Dabei scheint die Balance der Expression von pro- und antiapoptotischen Faktoren in diesen Tumoren von entscheidender Bedeutung für den Therapieerfolg zu sein. Hier nimmt XIAP eine Schlüsselposition bei der Apoptoseresistenz durch die Inhibierung der Caspase-3, -7 und -9 ein (Deveraux *et al.*, 1999; Srinivasula *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001a; Suzuki *et al.*, 2001b). Eine hohe Expression von XIAP konnte in vielen malignen Tumoren nachgewiesen werden. Hierzu zählen Karzinome der Brust, der Ovarien, der Prostata, der Lunge, des Pancreas und der Gebärmutter (Ferreira *et al.*, 2001a; Ferreira *et al.*, 2001b; Gerhard *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2001; Parton *et al.*, 2002; Sui *et al.*, 2002). Die XIAP Expression steht in direkter Verbindung mit der Apoptoseresistenz nach Behandlung mit Chemotherapeutika und ionisierender Strahlung (Asselin *et al.*, 2001; Holcik *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2000). Die Herunterregulierung von XIAP mit Hilfe von Antisense-Vektoren dagegen erhöht die Apoptosesensitivität von Karzinomzelllinien (Holcik *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2000).

Proapoptotisches Smac/DIABLO, einer der Hauptantagonisten von XIAP, fördert die Apoptose durch die Bindung an diesen Faktor. Dabei verhindert es die Bindung von XIAP an verschiedene Caspasen und unterdrückt somit sein antiapoptotisches Potential. Die Überexpression von Smac/DIABLO sensitiviert Tumorzellen für die Behandlung mit Chemotherapeutika und TRAIL-induzierter Apoptose (Guo *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2001). Überdies hat das XIAP-Protein eine E3-Ligase Funktion bei der Ubiquitinierung von Smac/DIABLO und fördert so

dessen Degradierung (MacFarlane *et al.*, 2002). Dies belegt die enge Regulation dieser beiden gegensätzlichen Faktoren und zeigt, dass eher das Expressionsverhältnis beider Faktoren und nicht die Menge eines einzelnen für die Sensitivität gegenüber einer Apoptoseinduktion verantwortlich ist.

Die von mir durchgeführte Real-Time RT-PCR Analyse belegt, dass die mRNA Expression von Smac/DIABLO in allen untersuchten Proben unabhängig vom Grad und der Stufe der Tumoren keine signifikante Änderung aufweist. Im Gegensatz hierzu kann in derselben Studie eine deutlich erhöhte Expression der XIAP mRNA mit fortschreitender Stufe und Grad dieser Tumoren festgestellt werden (Yan *et al.*, 2004). Das Resultat ist ein deutlich erhöhtes Verhältnis der Expression von XIAP zu Smac/DIABLO während der Tumorprogression zu Gunsten von XIAP. Dies zeigt, dass die feine Balance beider Faktoren während der Tumorprogression in RCC's gestört ist. Hieraus resultiert ein Unvermögen von Smac/DIABLO, dem antiapoptotischen Potential von XIAP entgegenzuwirken. Dies fördert die Apoptoseresistenz, die mit dazu beiträgt, dass gerade RCC's sehr unempfindlich gegenüber Krebsmedikamenten und ionisierender Strahlung als Therapieform sind.

4.2 Unterschiedliche Proteinstabilität der Survivin-Varianten

Survivin gehört genau wie XIAP zu den *inhibitor of apoptosis* Proteinen. Es wird in den meisten bekannten Tumoren überexprimiert und trägt wahrscheinlich ebenfalls entscheidend zur Therapieresistenz verschiedener maligner Tumoren bei. Es existieren mehrere Spleißvarianten von Survivin mit unterschiedlichem antiapoptotischem Potential. Daher wurde schon früh die Hypothese aufgestellt, dass hier ein Regulationsmechanismus besteht in dem sich die Spleißvarianten gegenseitig beeinflussen. Interessanterweise konnte in einer Studie von Mahotka *et al.* (Mahotka *et al.*, 2002b) Survivin- Δ Ex3 nur in Ki-67 positiven Zellen nachgewiesen werden. Die Expression von endogenem Survivin und seinen Varianten wird transkriptionell und post-transkriptionell reguliert. Der

gemeinsame Einfluss von G1-transkriptionellen Repressorelementen im Survivin Promotor sowie der Abbau des Proteins durch den Ubiquitin-Proteasom Signalweg resultieren in einer Expressionsinduktion von Survivin während der G2/M-Phase des Zellzyklusses und einer Degradierung zum Ende des Zellzyklusses. Endogenes Survivin wird recht schnell abgebaut und hat eine Halbwertszeit von nur 30 Minuten. Wenig ist bis jetzt über die endogenen Proteinmengen und Halbwertszeiten von Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B bekannt, nicht zuletzt durch das Fehlen spezifischer Antikörper. Studien zu der Expression aller drei Varianten in verschiedenen Tumortypen haben gezeigt, dass die Menge an Survivin mRNA die der Spleißvarianten in allen untersuchten Proben übertrifft (Krieg *et al.*, 2002; Mahotka *et al.*, 2002a; Mahotka *et al.*, 1999). Da die G1 Repressorelemente im Survivin Promotor für die Transkription aller drei Varianten relevant sind, wäre eine zellzyklusspezifische Expression der beiden Varianten denkbar. Die tatsächlichen Proteinmengen von endogenem Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B jedoch werden zum einen vom Spleißapparat bestimmt, der die relativen mRNA-Mengen der einzelnen Varianten bestimmt. Zum anderen sind sie von der mRNA- und Proteinstabilität und damit vom Abbausystem abhängig. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu wissen, dass wohl nicht alle Varianten Substrate für den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg sind. Ein effektiver Abbau ist im Fall von Survivin vom Carboxyterminus abhängig, der bei Survivin- Δ Ex3, jedoch nicht bei Survivin-2B, verändert ist (Zhao *et al.*, 2000). Hier spielt auch die subzelluläre Lokalisation eine Rolle, weil das Ubiquitin-Proteasom-System hauptsächlich im Zytoplasma aktiv ist. So könnte die nukleäre Akkumulation sowie der stark veränderte Carboxyterminus Survivin- Δ Ex3 effektiv vor einer schnellen Degradierung schützen. Die von mir durchgeführten Cycloheximid-Experimente zeigen jedoch, dass der Umsatz von Survivin- Δ Ex3 schneller stattfindet als der von Survivin selbst. Dies lässt auf einen alternativen, nicht Ubiquitin-Proteasom basierenden Abbauweg schließen. Die von mir erzielten Ergebnisse bezüglich der Proteinstabilität geben keinen weiteren Aufschluss, ob hier eine regulatorische Interaktion von Survivin und Survivin- Δ Ex3 möglich ist. Eine solche kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

4.3 Differentielle subzelluläre Lokalisation der Survivin Spleißvarianten

Alternatives Spleißen stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus für viele Proteine dar. Dies scheint sich auch für die Feinregulierung von Survivin und seine Spleißvarianten zu bestätigen. In enger Analogie zu anderen Apoptose-Regulatoren, wie beispielsweise Bcl-X_L und Bcl-X_S, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die proapoptotische Variante Survivin-2B der Funktion des antiapoptotischen Survivin und Survivin-ΔEx3 entgegenwirkt. Ein solcher funktioneller Antagonismus könnte aus der kompetitiven Bindung an gemeinsame Interaktionspartner resultieren. Eine andere Möglichkeit in Bezug auf die entdeckte Homodimer-Bildung von Survivin (Chantalat *et al.*, 2000; Muchmore *et al.*, 2000; Verdecia *et al.*, 2000) ist die Formation von inaktiven Survivin:Survivin-2B oder Survivin-ΔEx3:Survivin-2B Heterodimeren. Eine wichtige Voraussetzung für eine solche Interaktion wäre eine gleiche subzelluläre Lokalisation. Erste Hinweise hierfür liefert eine von mir durchgeführte computergestützte Analyse (PSORT II) von Lokalisationssequenzen in den verschiedenen Spleißvarianten. Diese sagt eine zytoplasmatische Lokalisation für Survivin-2B und eine nukleäre Akkumulation für Survivin-ΔEx3 voraus, die auch experimentell bestätigt werden konnte (Mahotka *et al.*, 2002b).

Survivin wird unter anderem als *Chromosomal-Passenger-Protein* beschrieben, das mit *inner-centromer-binding-protein* (INCENP) und *aurora kinase B* (Aurora-B) während der Mitose assoziiert. Darum analysierte ich die Lokalisation der drei Spleißvarianten auch in diesen Zellzyklusphasen. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen zeigt Survivin eine enge Kolokalisation mit den Zentromeren. Dies kann für keine der untersuchten Spleißvarianten bestätigt werden. Der Verlust der nukleären Membran bedingt eher eine gleichmäßige Verteilung der beiden Varianten in der gesamten Zelle. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass Survivin-ΔEx3 auch eine regulatorische Funktion während des Zellzyklus ausübt, da in einigen wenigen Fällen eine Kolokalisation mit Cenp-F beobachtet wird. Auch scheint die Anordnung der Zentromere in den Survivin-ΔEx3 transfizierten Zellen gestört zu sein. Survivin-ΔEx3 kann nicht im *Midbody*

der sich teilenden Zelle gefunden werden, was auf eine gestörte Interaktion mit den Mikrotubuli des mitotischen Spindelapparates hinweist. Diese Interaktion wird bei Survivin vom Carboxyterminus vermittelt, der bei Survivin- Δ Ex3 stark verändert ist und keine coiled-coil Domäne für die Mikrotubuliinteraktion beinhaltet. Obwohl für Survivin-2B *in vitro* eine solche Mikrotubulibindung gezeigt werden konnte (Islam *et al.*, 2000), kann dies in den hier durchgeführten Experimenten nicht bestätigt werden. Dieses Ergebnis wird durch weitere Versuche anderer Arbeitsgruppen untermauert: Survivin Mutanten mit verkürzter BIR-Domäne sowie verändertem oder deletiertem Carboxyterminus wiesen ebenfalls keine Bindungseigenschaften für Zentromere und Mikrotubuli auf (Skoufias *et al.*, 2000). Die von mir durchgeführte Analyse zeigt, dass eine Lokalisation von Survivin-2B und Survivin- Δ Ex3 an denselben Strukturen wie für Survivin nicht nachgewiesen werden kann. Die gestörte Anordnung der Zentromere in den Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B expremierenden Zellen liefert jedoch erste Hinweise, dass hier eine Interaktion mit Survivin stattfindet. Eine ähnlich gestörte Anordnung der Zentromere konnte auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden. In diesen Experimenten führt die Deletion von Survivin oder eines der anderen *Chromosomal-Passenger-Proteine* zu einer ähnlich fehlerhaften Anordnung der Zentromere (Lens *et al.*, 2006; Vader *et al.*, 2006).

4.4 Zweigeteiltes nukleäres Lokalisationssignal (NLS): Auswirkungen auf die Lokalisation

NLS-Sequenzen sind in einer Vielzahl von Proteinen identifiziert worden. Sie bestehen normalerweise aus einem oder mehreren Clustern von positiv geladenen Aminosäuren. Sie können in N-terminalen sowie C-terminalen Regionen auftreten. Zusätzlich ist die Phosphorylierung von flankierenden Sequenzen und die Nähe zu neutralen oder sauren Resten oft wichtig für den nukleären Import. In Survivin- Δ Ex3 ist ein zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal vorhanden, das nicht in den beiden anderen Varianten gefunden wird. Dieses Signal könnte für die selektive

Akkumulation von Survivin- Δ Ex3 im Nukleus der Zelle verantwortlich sein. Es weist hohe Homologie zu bereits identifizierten Lokalisationssignalen in anderen nukleären Proteinen auf. In Transfektionsexperimenten mit einer NLS deletierten Survivin- Δ Ex3 Variante konnte ich jedoch zeigen, dass das so veränderte Survivin- Δ Ex3^{NLS} im Zytoplasma und im Nukleus zu finden ist. Das zweigeteilte NLS ist also nicht direkt für die nukleäre Akkumulation verantwortlich, sondern vermittelt eher die Beseitigung von Survivin- Δ Ex3 aus dem Zytoplasma. Ähnliche Beobachtungen konnten auch von Otterlei et al. gemacht werden, die Deletionsanalysen der humanen Uracil-DNA-Glycosylase durchführten. Hier stellte sich heraus, dass das gefundene NLS sehr komplex aufgebaut ist und sich auf weit über 100 Aminosäuren downstream des eigentlichen N-terminalen NLS erstreckt. Diese N-terminale NLS-Sequenz ist zwar essentiell, aber nicht ausreichend für die komplette nukleäre Akkumulation. Zusätzlich zu einem zweigeteilten Motiv basischer Aminosäuren sind Sequenz-Regionen, die bis in die katalytische Domäne des Proteins hereinreichen, notwendig, um eine vollständige Kerntranslokation zu gewährleisten (Otterlei et al., 1998).

Zusammenfassend konnte ich bei der hier durchgeführten Charakterisierung der Survivin-Spleißvarianten zeigen, dass die beiden Varianten Survivin-2B und Survivin- Δ Ex3 - im Gegensatz zu Survivin selbst - während der Mitose nicht als *Chromosomal-Passenger-Proteine* fungieren. Ob tatsächlich eine Interaktion der verschiedenen Varianten miteinander stattfindet konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die gestörte Anordnung der Zentromere in den Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B transfizierten Zellen liefert erste Hinweise, dass hier eine Fehlverteilung von Survivin oder eines der anderen *Chromosomal-Passenger-Proteine* vorliegt. Dies deutet auf eine Interaktion der beiden Varianten mit Survivin oder einem Interaktionspartner von Survivin hin, da diese für die korrekte Anordnung des Zentromers essentiell sind.

4.5 Schützende Wirkung der Survivin-Expression bei UVA-induzierter Apoptose

Die Apoptose-inhibierende Wirkung von Survivin ist für die verschiedensten Induktoren beschrieben worden. Hierzu zählen die Stimulation mit dem CD95-Ligand (Fas-L), UVB-Strahlung und verschiedene Chemotherapeutika (Ambrosini *et al.*, 1997; Grossman *et al.*, 2001; Hofmann *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 1999; Mahotka *et al.*, 1999; Mirza *et al.*, 2002; Tamm *et al.*, 1998). Die von mir durchgeführten Analysen zeigen, dass eine Überexpression von Survivin auch die UVA-induzierte Apoptose inhibiert. Jedoch besitzt die Spleißvariante Survivin- Δ Ex3, die beispielsweise CD95 induzierten Zelltod hemmen kann, nach UVA-Bestrahlung kein antiapoptotisches Potential mehr.

Neue Experimente belegen, dass die Apoptose-inhibierende Funktion von Survivin durch XIAP vermittelt wird (Dohi *et al.*, 2004). Dabei bindet Survivin an XIAP und vermittelt so die erhöhte Stabilität des XIAP-Proteins, indem es vor proteasomaler Degradierung schützt. Die Bildung solcher Heterodimere von Survivin und XIAP basiert auf einer Assoziation der BIR-Domäne von Survivin mit den BIR-Domänen von XIAP. Diese Bindung kann an allen drei BIR-Domänen erfolgen, jedoch mit unterschiedlicher Affinität. So könnte auch die Interaktion mit anderen Bindungspartnern, wie beispielsweise Smac/DIABLO oder den Caspasen-3, -7 und -9 beeinflusst werden. Insbesondere die Prozessierung und Aktivität von Caspase-9 und dem Apoptosom ist in Anwesenheit des XIAP-Survivin Komplexes stark reduziert. Da UVA-Strahlung hauptsächlich den mitochondrialen Weg der Apoptose induziert, ist die apoptoseinhibierende Wirkung der Überexpression von Survivin aller Wahrscheinlichkeit nach auf einen Antagonismus des Apoptosoms und damit auf die Blockierung der Caspase-9 Aktivität zurückzuführen. Dies müsste mit einer Interaktion von Survivin mit XIAP einhergehen. Sie hängt von der Wechselwirkung der BIR-Domänen in XIAP und Survivin und somit von den dort lokalisierten Zink-Fingern ab.

Caldas *et al.* konnten im Verlauf der von mir durchgeführten Arbeit in Kotransfektions-Experimenten mit Survivin und Survivin- Δ Ex3 zeigen, dass

die Lokalisation der überexprimierten Proteine deutlich anders ist als in Zellen, die nur mit jeweils einer Variante transfiziert wurden. Werden beide Proteine koexprimiert, ist eine Akkumulation in den Mitochondrien zu beobachten (Caldas *et al.*, 2005). Sie beruht auf der Bindung der beiden Varianten miteinander. Zusätzlich sind die kotransfizierten Zellen effektiver vor Zelltodinduktion durch Chemotherapeutika geschützt. Dies könnte erklären, warum in den hier von mir durchgeführten Experimenten Survivin- Δ Ex3 keine schützende Wirkung zeigt, da hier nur die einzelnen Plasmide transfiziert wurden und so keine mitochondriale Lokalisation gewährleistet ist. Aber gerade diese Assoziation mit den Mitochondrien könnte entscheidend für die Inhibition des UVA-induzierten Weges der Apoptose sein.

4.6 Die schützende Wirkung von Survivin wird durch die Photolyse von Nitrit aufgehoben: Hinweise auf einen alternativen apoptotischen Signalweg!

Bei der Bestrahlung von Nitritlösungen entsteht photolytisch generiertes Stickstoffmonoxid (NO). Dieses NO ist bioaktiv und bewirkt beispielsweise eine Nitrosierung von SH-Gruppen abhängigen Proteinen. Hier spielt besonders die Verdrängung von koordiniertem Zink in Zink-Fingern durch S-Nitrosierung des Cysteins eine entscheidende Rolle. Der Verlust des Zink-Ions führt zum Funktionsverlust der Domäne, wie für Transkriptionsfaktoren gezeigt werden konnte (Kröncke *et al.*, 1994; Tabuchi *et al.*, 1994). Beruht die in Abschnitt 4.5 diskutierte, antiapoptotische Wirkung von Survivin tatsächlich auf einer Interaktion seiner BIR-Domäne mit der BIR-Domäne von XIAP, sollte sich diese durch Eliminierung der Zink-Finger Aktivität unterdrücken lassen.

Tatsächlich zeigen die von mir durchgeführten Bestrahlungen im Beisein von Nitrit, dass die Überexpression von Survivin unter diesen Bedingungen keine schützende Wirkung hat. Die UVA bedingte Photolyse von Nitrit führt hier zur Bildung großer Mengen von NO. Zusätzlich entstehen hier aber auch Sauerstoffradikale, die wiederum mit NO zu den

weit aus reaktiveren Stickstoffspezies, wie beispielsweise $\text{NO}_2\bullet$, N_2O_3 und N_2O_4 , reagieren können. Wahrscheinlich bewirken gerade diese hoch reaktiven Stickstoffintermediate, insbesondere das N_2O_3 , die Nitrosierung verschiedener Proteine. Neben dem durch NO bedingten Funktionsverlust von Survivin durch S-Nitrosierung des Cysteins im Zink-Finger könnte aber auch ein alternativer, nicht von Survivin beeinflussbarer, apoptotischer Signalweg durch die experimentellen Bedingungen induziert werden.

In den letzten Jahren hat die Erforschung alternativer, nicht ausschließlich Caspase-abhängiger Signalwege, die ebenfalls zum Tod der Zelle führen, an Bedeutung gewonnen. Hier spielt insbesondere die Freisetzung von *apoptosis-inducing-factor* (AIF) und Endonuklease G (EndoG) aus den Mitochondrien eine entscheidende Rolle. Wird AIF aus den Mitochondrien ausgeschüttet, transloziert es in den Zellkern und bedingt die Fragmentierung der DNA in distinkte 50kbp große Fragmente. Dies führt zu einem speziellen Kernphänotyp, der sich deutlich von dem unterscheidet, der von Caspasen vermittelt wird (Susin *et al.*, 1999). Genau solch ein Phänotyp tritt in den hier von mir durchgeführten Experimenten auf, wenn die UVA-Bestrahlung in Anwesenheit von Nitrit ausgeführt wird.

Es wird angenommen, dass die Translokation von AIF in den Zellkern ein universelles Charakteristikum der Apoptose vieler Zelltypen ist. Es stellt den ersten Schritt in einem mehrteiligen Prozess dar, der zum Tod der Zelle führt. Erst nach einer initialen Translokation von AIF kommt es in manchen Systemen zur Ausschüttung von Cytochrom c und anschließender Caspase-Aktivierung. Eine letztendliche Caspase-Aktivierung ist jedoch nicht unbedingt nötig, um den Zelltod zu bewirken. Die von AIF induzierten Veränderungen des Nukleus sind ausreichend, um das Absterben der Zelle zu gewährleisten. Interessanterweise wurde die Translokation eines AIF-Homologs während apoptotischer Prozesse in der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* beobachtet. Dieser Pilz besitzt keine Caspasen (Arnoult *et al.*, 2001). Es handelt sich also um einen evolutionär konservierten, Caspase-unabhängigen Weg, der zum Untergang der Zellen führt.

4.7 Inhibition der Caspase-3-Aktivität *in vitro* durch photolytisch generiertes Stickstoffmonoxid

Die Beteiligung von Stickstoffmonoxid an apoptotischen Prozessen ist in einer Vielzahl von Geweben und Zellen nachgewiesen worden (Dimmeler *et al.*, 1997b; Nicotera *et al.*, 1997). Neben anderen Mechanismen zeigten Studien, dass NO durch die Nitrosierung des Cysteins im aktiven Zentrum von Caspasen die Apoptose inhibieren kann (Dimmeler *et al.*, 1997a; Haendeler *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997a). Dass dieser Mechanismus auch von photolytisch generiertem NO vermittelt werden kann, konnte ich in einem *in vitro* Caspase-3 Aktivitätstest nachweisen.

Schon die UVA-Bestrahlung ohne Nitrit reduziert die Caspase-3-Aktivität um 30%. Hier spielen sicherlich die sich bildenden Sauerstoffradikale eine entscheidende Rolle, die bei der Bestrahlung einer wässrigen Lösung mit UVA-Licht entstehen. Sie sind im Allgemeinen sehr reaktiv und können zur Oxidierung verschiedenster Substrate führen. Zu diesen Substraten gehören ebenfalls die SH-Gruppen von Cysteinen, die oft essentiell für die katalytischen Eigenschaften von Enzymen sind. So auch im Fall der Caspasen, die ein hoch konserviertes Cystein und ein Histidin im aktiven Zentrum aufweisen die für die Katalyse essentiell sind. In Anwesenheit von Nitrit während der Bestrahlung wird die Caspase-3-Aktivität bis zu 90% inhibiert. Hier wird zusätzlich zu den Sauerstoffradikalen auch NO in sehr hohen Konzentrationen freigesetzt. NO reagiert in Anwesenheit von Sauerstoff unter anderem zu Distickstofftrioxid (N_2O_3) und Peroxinitrit (ONOO^-). Diese hoch reaktiven Verbindungen sind in der Lage, Thiolgruppen, wie die des Cysteins in Caspasen, zu nitrosieren.

Dass in Anwesenheit von Nitrit viel mehr und weitaus reaktivere Radikale entstehen, erklärt, warum die Inhibition der Caspase-Aktivität um 60% höher ist als mit UVA alleine. Erstaunlicherweise zeigt die gleichzeitige Gabe von N-Ethyl-Maleimid (NEM) mit UVA und Nitrit einen synergistischen Effekt. NEM sollte alleine schon in der Lage sein, die Caspase-Aktivität komplett zu blockieren. Hierfür könnte der Größenunterschied zwischen dem NEM-Molekül und NO eine Erklärung darstellen. NO ist im Vergleich zu NEM sehr klein und kann wahrscheinlich einfacher die katalytische Spalte,

in der das Cystein liegt, erreichen. Die Tatsache dass trotzdem ein Effekt bei der Inkubation mit NEM alleine zu erkennen ist, könnte bedeuten, dass NEM noch andere leichter zugängliche Gruppen modifiziert, die ebenfalls wichtig für die Aktivität der Protease sind und so vielleicht zu einem gewissen Aktivitätsverlust der Caspase führt. Es existieren immerhin noch sieben weitere Cysteine in Caspase-3 (Positionen: 47, 116, 148, 169, 184, 220 und 264). Cysteine sind oft an der Bildung von Di-Sulfidbrücken innerhalb von Proteinen beteiligt, die für die Tertiär- und Quartärstruktur essentiell sind. Eine korrekte Quartärstruktur ist Voraussetzung für die Aktivität von Enzymen. Die Alkylierung durch NEM könnte also mit der Strukturbildung der Caspase interferieren und so zu einem Aktivitätsverlust beitragen.

4.8 Inhibition von Caspasen in humanen Keratinozyten durch photolytisch generiertes NO führt zu einer AIF-vermittelten Form des Zelltodes

Eine Inhibition von Caspasen stellt nicht immer auch einen Schutz vor Zelltod dar. Dies konnte von vielen Arbeitsgruppen gezeigt werden. Insbesondere Analysen apoptotischer Prozesse in Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) belegen, dass hier ein alternativer Signalweg existiert (Chu *et al.*, 2005; Culmsee *et al.*, 2005; Volbracht *et al.*, 2005). Dieser wird durch die Translokation von AIF aus den Mitochondrien in den Nukleus der Zelle vermittelt. Er ist unabhängig von einer Caspase-Aktivierung und somit auch nicht durch Caspase-Inhibitoren zu stoppen.

In der von mir durchgeführten Arbeit kann erstmalig belegt werden, dass ein solcher Prozess auch in humanen Keratinozyten stattfindet. Photolytisch generiertes Stickstoffmonoxid (NO) bewirkt hier eine Form des Zelltodes, die nicht auf der Aktivität von Caspasen beruht. Dies bestätigt sich durch Analysen des Caspase-3 Substrats Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP). Induziert man in humanen Keratinozyten durch die Bestrahlung mit UVA, Apoptose, wird dieses Substrat Caspase-abhängig gespalten und inaktiviert. In Anwesenheit von Nitrit während der

Bestrahlung bleibt diese Spaltung aus. Trotzdem sterben die Zellen. Die Kernmorphologie ist bei den Bestrahlungen mit und ohne Nitrit deutlich verschieden. Der Mechanismus, der zum Tod der Zellen führt, ist eindeutig von AIF abhängig, da hier gezeigt werden kann, dass es zu einer Translokation dieses Faktors in den Zellkern kommt.

AIF-induzierter Zelltod wird auch in anderen Arbeiten mit NO in Verbindung gebracht. 2005 zeigten Volbracht *et al.* (Volbracht *et al.*, 2005), dass große Mengen NO in Zellen des ZNS zu einer Calcium abhängigen Aktivierung von Calpainen führen. Diese Calcium-abhängigen Cystein-Proteasen sind in diesem System verantwortlich für die Freisetzung von apoptogenetischen Faktoren aus den Mitochondrien, wie Cytochrom c und AIF. Trotz der Ausschüttung von Cytochrom c konnte hier keine Caspase-Aktivität nachgewiesen werden. Stattdessen beobachteten sie eine proteolytische, Calpain-abhängige Spaltung von Caspase-9 zu inaktiven Fragmenten. In den von mir durchgeführten Experimenten konnte zum ersten Mal für humane Keratinozyten gezeigt werden, dass die AIF Translokation aus den Mitochondrien NO-abhängig ist. Die Zugabe von Sauerstoffradikalfängern, wie Vitamin C, kann der Translokation nicht entgegenwirken. Im Gegensatz dazu verhindert der NO-Radikalfänger cPTIO die Translokation vollständig.

Die innere mitochondriale Membran wird durch ein Transmembranpotential ($\Delta\Psi_m$) charakterisiert, das durch die Aktivität der Protonen-Pumpen der Atmungskette generiert wird. NO inhibiert direkt die Atmungskette, indem es selektiv an die Cytochrom-Oxidase bindet. Entstehende reaktive Stickstoffspezies wirken eher unselektiv, hemmen jedoch irreversibel verschiedene Komponenten der Mitochondrien. Alle diese Ereignisse führen letztendlich zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktionen. Dies resultiert in einer Schädigung der Ionenpumpen, die das Transmembranpotential aufrechterhalten. Der Verlust dieses $\Delta\Psi_m$ ist ein frühes Ereignis in der Apoptose (Zamzami *et al.*, 1995). Dennoch beinhaltet die innere Membran noch verschiedenste Matrixproteine. Das beweist, dass die Permeabilisation der Membran nur teilweise erfolgt. Dies scheint jedoch ausreichend für die Ausschüttung verschiedener proapoptotischer Faktoren zu sein. Der genaue Signalweg

der Ausschüttung von AIF aus den Mitochondrien konnte in der von mir durchgeführten Arbeit nicht geklärt werden. Man kann spekulieren, dass vielleicht die Aktivierung von Calpainen eine Rolle in dem hier beobachteten Signalweg spielt. Ebenso denkbar wäre die Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmungskette und ein damit verbundener Zusammenbruch des Transmembranpotentials. Eine dritte Möglichkeit ist ein Mechanismus, der Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) involviert. Übermäßige Aktivierung des nukleären Enzyms PARP-1 spielt eine prominente Rolle in verschiedenen Modellen von zellulären Schädigungen (Virag *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003). PARP-1-abhängige Toxizität scheint Caspase-unabhängig zu sein und ist hier eine Voraussetzung für die Translokation von AIF bei N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), - einem DNA-alkylierendem Agens - induziertem Zelltod (Kang *et al.*, 2004; Wesierska-Gadek *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2002). Interessanterweise ist dieses Agens auch ein NO-Donor. Da auch unter UVA-Bestrahlung und besonders in Anwesenheit von ROS und RNS die Wahrscheinlichkeit für eine Schädigung der DNA gegeben ist, ist zu vermuten, dass hier ein ähnlicher Signalweg angeschaltet wird. Dieser PARP-vermittelte Weg des Zelltodes wird auch unter transienten cerebralen ischämischen Bedingungen induziert. Hier konnte eine Inhibition der PARP-Aktivität die Zellen vor AIF-vermitteltem Zelltod schützen (Culmsee *et al.*, 2005). Ischämische Bedingungen sind dem UVA-Nitrit Modell sehr ähnlich, da die resultierende Azidose und die damit verbundene pH-Wert Erniedrigung ideale Voraussetzungen bieten, um Nitrit pH-abhängig zu spalten und NO freizusetzen. Leider ist nichts über die Menge an Nitrit im hier verwendeten Maus Modell der fokalen cerebralen Ischämie bekannt, sodass eine konkrete Aussage nicht möglich ist.

Zusammenfassend konnte ich in diesem Teil der Arbeit zeigen, dass in humanen Keratinozyten bei der Bestrahlung mit UVA in Anwesenheit von Nitrit ein Caspase-unabhängiger Signalweg existiert, der zum Absterben der Zellen führt. Dies ist auf die photolytische Bildung von Stickstoffmonoxid zurückzuführen, dass hier die Aktivität von Caspasen hemmt und die Translokation von AIF in den Zellkern induziert.

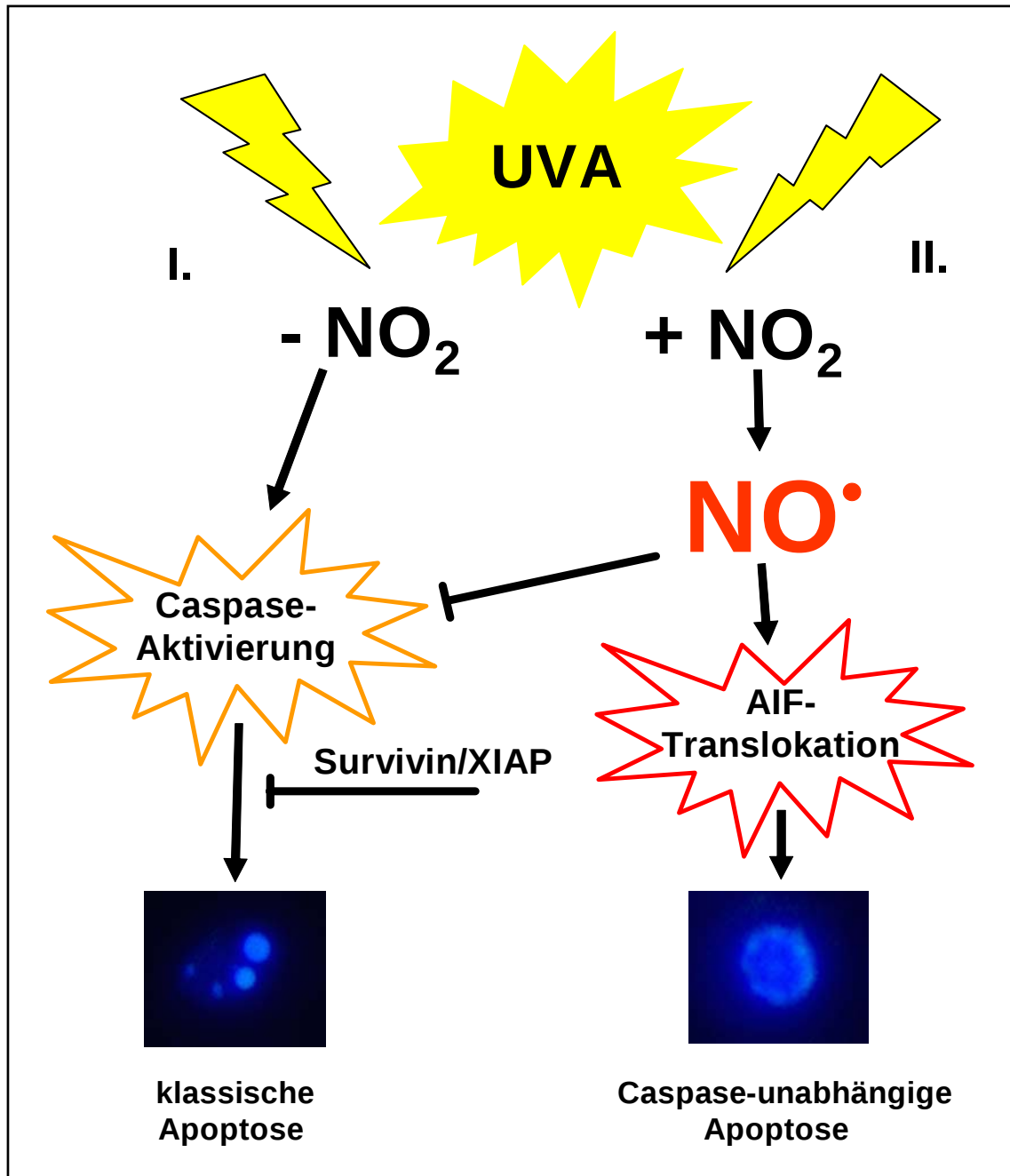


Abbildung 4.1: (I.) Die UVA-Bestrahlung in Abwesenheit von Nitrit führt zur Aktivierung von Caspasen und dem klassischen apoptotischen Phänotyp. Dieser Signalweg kann von Survivin inhibiert werden. (II.) Die photolytische Bildung von NO aus Nitrit während der UVA-Bestrahlung resultiert in einem alternativen, Caspase-unabhängigen Signalweg, der auf einer AIF-Translokation aus den Mitochondrien in den Zellkern beruht und für den NO essentiell ist.

5. Zusammenfassung

Eine gestörte Regulation apoptotischer Vorgänge stellt eine Ursache für viele schwere Krankheiten, wie beispielsweise neurodegenerative Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Krebs dar. Die Kenntnis des Zusammenspiels verschiedener pro- und antiapoptotischer Proteine ist daher essentiell für die Entwicklung neuer Therapieformen und Medikamente. Die von mir durchgeführte Real-Time RT-PCR-Analyse der mRNA-Expression von Smac/DIABLO im Vergleich zu vorangegangenen Untersuchungen von XIAP, einem *inhibitor of apoptosis* Protein (IAP), zeigt eine gestörte Balance beider Faktoren während der Tumorprogression in humanen Nierenzellkarzinomen (RCC). Dies fördert wahrscheinlich die Therapieresistenz von RCC's, die sehr unempfindlich gegenüber Krebsmedikamenten und ionisierender Strahlung als Therapieform sind. Survivin, ein weiteres IAP, wird in den meisten bekannten Krebsarten überexprimiert. Die Entdeckung verschiedener Spleißvarianten dieses Proteins mit unterschiedlichem antiapoptotischen Potential legt die Vermutung nahe, dass hier ein Regulationsmechanismus durch die unterschiedliche Expression und Funktion der verschiedenen Varianten in Bezug auf eine Heterodimerisierung und/oder kompetitive Bindung an gleiche Interaktionspartner besteht. Dies setzt eine zumindest zeitweise gleiche Kompartimentierung der Varianten innerhalb der Zelle voraus. In diesem Zusammenhang wurde von mir eine Charakterisierung der beiden Spleißvarianten, mit Hilfe von EGFP markierten Vektorkonstrukten, durchgeführt. Diese zeigt, dass Survivin, wie auch Survivin-2B in Zellen der Interphase im Zytoplasma lokalisiert. Während der späten G1-Phase und der frühen S-Phase des Zellzyklus transloziert Survivin in den Nukleus und fungiert dort als *Chromosomal-Passenger-Protein*. Dort assoziiert es mit den Zentromeren und bindet im späteren Midbody der sich teilenden Zelle an die Spindelmikrotubuli. Eine solche Lokalisation konnte für die beiden Spleißvarianten nicht nachgewiesen werden. Von mir durchgeführte computergestützte Analysen von Lokalisationssequenzen mit Hilfe des PSORT II Programms zeigen, dass Survivin-ΔEx3 durch eine Leserasterverschiebung ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) besitzt und im Kern zu finden ist. Eine Deletionsanalyse zeigt, dass dieses NLS funktionell ist. Durch eine Überexpressionstudie mit den verschiedenen Survivin-Vektorkonstrukten kann ich beweisen, dass Survivin die UVA-induzierte Apoptose in humanen Keratinozyten inhibiert. Diese Inhibition wird in Anwesenheit von Nitrit während der Bestrahlung, das photolytisch zu Stickstoffmonoxid (NO) gespalten wird, aufgehoben. Das hier generierte NO inhibiert Caspasen *in vitro* sowie in humanen Keratinozyten, wie ich mit Hilfe eines Aktivitätstests für Caspase-3 und Western-blot Analysen der behandelten Zellen zeigen konnte. Die Kernmorphologie der in Anwesenheit von Nitrit bestrahlten Zellen weist auf einen parallelen apoptotischen Signalweg hin, der Caspase-unabhängig ist und durch *apoptosis-inducing-factor* (AIF) vermittelt wird. Anhand von Immunfluoreszenzanalysen kann ich eine Translokation dieses Faktors in den Zellkern nachweisen, wofür das photolytisch generierte NO essentiell notwendig ist.

5. Abstract

Deregulation of apoptosis is a major cause for several severe diseases including autoimmune diseases, neurodegenerative disorders and cancer. Therefore understanding the interaction of pro- and antiapoptotic proteins is essential for the development of new therapies and drugs. The real time RT-PCR analysis of the mRNA expression of apoptotic Smac/DIABLO in comparison to previous measurements of XIAP, shows a disturbed balance of both factors during tumor progression in human renal cell carcinoma (RCC) favouring XIAP. This potentially promotes therapy resistance of RCC's which are generally insensitive towards treatment with anti cancer drugs and ionising radiation.

Survivin, which belongs to the same protein family as XIAP, is overexpressed in nearly all known tumor types but absent in differentiated adult tissues. Because of the discovery of different splice variants with different antiapoptotic properties, it is tempting to speculate that there is a regulatory mechanism of apoptotic signalling involving heterodimerisation or competitive binding of the different splice variants with the same substrates. A similar localisation within the cell would be a prerequisite for such an interaction. In this context I performed overexpression studies with EGFP-labeled vector-constructs to characterise these two splice-variants. This analysis shows that Survivin as well as Survivin-2B are localised in the cytoplasm during interphase. During mitosis Survivin translocates to the nucleus and associates with the centromeres and the spindle microtubuli acting as a chromosomal passenger protein. This could not be shown for the two splicevariants. Computer assisted sequence-analysis of lokalisation signals with the PSORT II program reveals that Survivin- Δ Ex3 contains a nuclear localisation signal (NLS) and accumulates in the nucleus. A deletion analysis of this NLS-sequence shows that the signal is functionally active. Performing overexpression studies with the different vector-constructs I could show for the first time that Survivin inhibits UVA induced apoptosis in human keratinocytes. This inhibition is abrogated in the presence of photolytically generated nitric oxide (NO). This generated nitric oxide inhibits the activity of Caspase-3 *in vitro* and in human keratinocytes as I could show via Caspase-3 activity assays and western-blot experiments. The nuclear morphology of the UVA/nitrite treated cells provides evidence that the treatment results in the induction of a parallel apoptotic pathway which is caspase-independent and mediated by apoptosis-inducing-factor (AIF). On the basis of an immunfluorescence analysis I can show that there is translokation of AIF into the nucleus, for which the presence of NO is essential.

6. Literatur

- ADAMS, J.M. & CORY, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-6.
- ADIDA, C., BERREBI, D., PEUCHMAUR, M., REYES-MUGICA, M. & ALTIERI, D.C. (1998a). Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet*, **351**, 882-3.
- ADIDA, C., CROTTY, P.L., MCGRATH, J., BERREBI, D., DIEBOLD, J. & ALTIERI, D.C. (1998b). Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol*, **152**, 43-9.
- ALDERTON, W.K., COOPER, C.E. & KNOWLES, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, **357**, 593-615.
- ALNEMRI, E.S., LIVINGSTON, D.J., NICHOLSON, D.W., SALVESEN, G., THORNBERRY, N.A., WONG, W.W. & YUAN, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**, 171.
- AMBROSINI, G., ADIDA, C. & ALTIERI, D.C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, **3**, 917-21.
- ANDERSON, D.M., MARASKOVSKY, E., BILLINGSLEY, W.L., DOUGALL, W.C., TOMETSKO, M.E., ROUX, E.R., TEEPE, M.C., DuBOSE, R.F., COSMAN, D. & GALIBERT, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, **390**, 175-9.
- ANTONSSON, B. & MARTINOU, J.C. (2000). The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res*, **256**, 50-7.
- ARNOULT, D., TATISCHEFF, I., ESTAQUIER, J., GIRARD, M., SUREAU, F., TISSIER, J.P., GRODET, A., DELLINGER, M., TRAINCARD, F., KAHN, A., AMEISEN, J.C. & PETIT, P.X. (2001). On the evolutionary conservation of the cell death pathway: mitochondrial release of an apoptosis-inducing factor during Dictyostelium discoideum cell death. *Mol Biol Cell*, **12**, 3016-30.
- ASSELIN, E., MILLS, G.B. & TSANG, B.K. (2001). XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res*, **61**, 1862-8.
- BADIE, C., ITZHAKI, J.E., SULLIVAN, M.J., CARPENTER, A.J. & PORTER, A.C. (2000). Repression of CDK1 and other genes with CDE and CHR promoter elements during DNA damage-induced G(2)/M arrest in human cells. *Mol Cell Biol*, **20**, 2358-66.
- BAUD, O., LI, J., ZHANG, Y., NEVE, R.L., VOLPE, J.J. & ROSENBERG, P.A. (2004). Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *Eur J Neurosci*, **20**, 1713-26.
- BENJAMIN, N. & VALLANCE, P. (1994). Plasma nitrite as a marker of nitric oxide production. *Lancet*, **344**, 960.
- BERNARDI, P., PETRONILLI, V., DI LISA, F. & FORTE, M. (2001). A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci*, **26**, 112-7.
- BERNEBURG, M., GATTERMANN, N., STEGE, H., GREWE, M., VOGELSANG, K., RUZICKA, T. & KRUTMANN, J. (1997). Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. *Photochem Photobiol*, **66**, 271-5.

- BISCHOFF, J.R. & PLOWMAN, G.D. (1999). The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol*, **9**, 454-9.
- BODMER, J.L., BURNS, K., SCHNEIDER, P., HOFMANN, K., STEINER, V., THOME, M., BORNAND, T., HAHNE, M., SCHROTER, M., BECKER, K., WILSON, A., FRENCH, L.E., BROWNING, J.L., MACDONALD, H.R. & TSCHOPP, J. (1997). TRAMP, a novel apoptosis-mediating receptor with sequence homology to tumor necrosis factor receptor 1 and Fas(Apo-1/CD95). *Immunity*, **6**, 79-88.
- BOLDIN, M.P., VARFOLOMEEV, E.E., PANCER, Z., METT, I.L., CAMONIS, J.H. & WALLACH, D. (1995). 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**, 7795-8.
- BORUTAITE, V., MORKUNIENE, R. & BROWN, G.C. (2000). Nitric oxide donors, nitrosothiols and mitochondrial respiration inhibitors induce caspase activation by different mechanisms. *FEBS Lett*, **467**, 155-9.
- BOURASSA, J., DEGRAFF, W., KUDO, S., WINK, D.A., MITCHELL, J.B. AND FORD, P.C. (1997). *J Am Chem Soc*, **119**, 2853-2860.
- BREDT, D.S., HWANG, P.M. & SNYDER, S.H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, **347**, 768-70.
- BROWN, G.C. (1999). Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta*, **1411**, 351-69.
- BROWN, G.C. (2001). Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*, **1504**, 46-57.
- BROWN, G.C. & COOPER, C.E. (1994). Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett*, **356**, 295-8.
- BUDIHARDJO, I., OLIVER, H., LUTTER, M., LUO, X. & WANG, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 269-90.
- BUENDIA, B., SANTA-MARIA, A. & COURVALIN, J.C. (1999). Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci*, **112** (Pt 11), 1743-53.
- 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.
- CANDE, C., VAHSEN, N., KOURANTI, I., SCHMITT, E., DAUGAS, E., SPAHR, C., LUBAN, J., KROEMER, R.T., GIORDANETTO, F., GARRIDO, C., PENNINGER, J.M. & KROEMER, G. (2004). AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene*, **23**, 1514-21.
- CASSINA, A. & RADI, R. (1996). Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*, **328**, 309-16.
- CHAI, J., DU, C., WU, J.W., KYIN, S., WANG, X. & SHI, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, **406**, 855-62.
- CHANTALAT, L., SKOUFIAS, D.A., KLEMAN, J.P., JUNG, B., DIDEBERG, O. & MARGOLIS, R.L. (2000). Crystal structure of human survivin reveals a

- bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol Cell*, **6**, 183-9.
- CHINNAIAN, 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**, 505-12.
- CHU, C.T., ZHU, J.H., CAO, G., SIGNORE, A., WANG, S. & CHEN, J. (2005). Apoptosis inducing factor mediates caspase-independent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in dopaminergic cells. *J Neurochem*, **94**, 1685-95.
- CIKALA, M., WILM, B., HOBMAYER, E., BOTTGER, A. & DAVID, C.N. (1999). Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol*, **9**, 959-62.
- CROMPTON, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, **341** (Pt 2), 233-49.
- CROOK, N.E., CLEM, R.J. & MILLER, L.K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, **67**, 2168-74.
- CULMSEE, C., ZHU, C., LANDSHAMER, S., BECATTINI, B., WAGNER, E., PELLECCIA, M., BLOMGREN, K. & PLESNILA, N. (2005). Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J Neurosci*, **25**, 10262-72.
- DAUGAS, E., NOCHY, D., RAVAGNAN, L., LOEFFLER, M., SUSIN, S.A., ZAMZAMI, N. & KROEMER, G. (2000). Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett*, **476**, 118-23.
- DEVERAUX, Q.L., LEO, E., STENNICKE, H.R., WELSH, K., SALVESEN, G.S. & REED, J.C. (1999). Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo J*, **18**, 5242-51.
- 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**, 300-4.
- DIMMELER, S., HAENDELER, J., NEHLS, M. & ZEIHNER, A.M. (1997a). Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med*, **185**, 601-7.
- DIMMELER, S. & ZEIHNER, A.M. (1997b). Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide*, **1**, 275-81.
- DOHI, T., OKADA, K., XIA, F., WILFORD, C.E., SAMUEL, T., WELSH, K., MARUSAWA, H., ZOU, H., ARMSTRONG, R., MATSUZAWA, S., SALVESEN, G.S., REED, J.C. & ALTIERI, D.C. (2004). An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 34087-90.
- DRAPIER, J.C., WIETZERBIN, J. & HIBBS, J.B., JR. (1988). Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur J Immunol*, **18**, 1587-92.
- 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**, 2685-94.

- 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.
- FEHSEL, K., KRONCKE, K.D., MEYER, K.L., HUBER, H., WAHN, V. & KOLB-BACHOFEN, V. (1995). Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol*, **155**, 2858-65.
- FERREIRA, C.G., VAN DER VALK, P., SPAN, S.W., JONKER, J.M., POSTMUS, P.E., KRUYT, F.A. & GIACCONE, G. (2001a). Assessment of IAP (inhibitor of apoptosis) proteins as predictors of response to chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*, **12**, 799-805.
- FERREIRA, C.G., VAN DER VALK, P., SPAN, S.W., LUDWIG, I., SMIT, E.F., KRUYT, F.A., PINEDO, H.M., VAN TINTEREN, H. & GIACCONE, G. (2001b). Expression of X-linked inhibitor of apoptosis as a novel prognostic marker in radically resected non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*, **7**, 2468-74.
- FERRI, K.F. & KROEMER, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*, **3**, E255-63.
- FORTUGNO, P., WALL, N.R., GIODINI, A., O'CONNOR, D.S., PLESCIA, J., PADGETT, K.M., TOGNIN, S., MARCHISIO, P.C. & ALTIERI, D.C. (2002). Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci*, **115**, 575-85.
- FRASER, A.G., JAMES, C., EVAN, G.I. & HENGARTNER, M.O. (1999). *Caenorhabditis elegans* inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Curr Biol*, **9**, 292-301.
- FREEMONT, P.S. (1993). The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann N Y Acad Sci*, **684**, 174-92.
- FURCHGOTT, R.F. (1991). Endothelium-dependent relaxation, endothelium-derived relaxing factor and photorelaxation of blood vessels. *Semin Perinatol*, **15**, 11-5.
- FURCHGOTT, R.F. (1955). The pharmacology of vascular smooth muscle. *Pharmacol Rev*, **7**, 183-265.
- GERHARD, M.C., SCHMID, R.M. & HACKER, G. (2002). Analysis of the cytochrome c-dependent apoptosis apparatus in cells from human pancreatic carcinoma. *Br J Cancer*, **86**, 893-8.
- GERHARZ, C.D., RAMP, U., DEJOSEZ, M., MAHOTKA, C., CZARNOTTA, B., BRETSCHNEIDER, U., LORENZ, I., MULLER, 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**, 1521-34.
- GLÜCKSMANN, A. (1951). Cell death in normal vertebrate ontology. *Biol. Rev.*, **26**, 59-86.
- GODAR, D.E. (1999). UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *J Invest Dermatol*, **112**, 3-12.
- GRETHER-BECK, S., BUETTNER, R. & KRUTMANN, J. (1997). Ultraviolet A radiation-induced expression of human genes: molecular and photobiological mechanisms. *Biol Chem*, **378**, 1231-6.
- GROSSMAN, D., KIM, P.J., BLANC-BRUDE, O.P., BRASH, D.E., TOGNIN, S., MARCHISIO, P.C. & ALTIERI, D.C. (2001). Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *J Clin Invest*, **108**, 991-9.

- GUO, F., NIMMANAPALLI, R., PARANAWITHANA, S., WITTMAN, S., GRIFFIN, D., BALI, P., O'BRYAN, E., FUMERO, C., WANG, H.G. & BHALLA, K. (2002). Ectopic overexpression of second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/DIABLO) or cotreatment with N-terminus of Smac/DIABLO peptide potentiates epothilone B derivative-(BMS 247550) and Apo-2L/TRAIL-induced apoptosis. *Blood*, **99**, 3419-26.
- GUYTON, A.C.A.H., J.E. (1996). *Textbook of Medical Physiology*: W.B Saunders Company, Philadelphia, PA.
- GUYTON, K.Z. & KENSLER, T.W. (1993). Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br Med Bull*, **49**, 523-44.
- HADDAD, I.Y., ZHU, S., CROW, J., BAREFIELD, E., GADILHE, T. & MATALON, S. (1996). Inhibition of alveolar type II cell ATP and surfactant synthesis by nitric oxide. *Am J Physiol*, **270**, L898-906.
- HAENDELER, J., WEILAND, U., ZEIHNER, A.M. & DIMMELER, S. (1997). Effects of redox-related congeners of NO on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide*, **1**, 282-93.
- HALESTRAP, A.P. (1999). The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem Soc Symp*, **66**, 181-203.
- HAMMAR, S.P. & MOTTET, N.K. (1971). Tetrazolium salt and electron-microscopic studies of cellular degeneration and necrosis in the interdigital areas of the developing chick limb. *J Cell Sci*, **8**, 229-51.
- HAUSER, H.P., BARDOFF, M., PYROWOLAKIS, G. & JENTSCH, S. (1998). A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol*, **141**, 1415-22.
- HAY, B.A., WASSARMAN, D.A. & RUBIN, G.M. (1995). Drosophila homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell*, **83**, 1253-62.
- HE, Y.Y., HUANG, J.L., SIK, R.H., LIU, J., WAALKES, M.P. & CHIGNELL, C.F. (2004). Expression profiling of human keratinocyte response to ultraviolet A: implications in apoptosis. *J Invest Dermatol*, **122**, 533-43.
- HENGARTNER, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-6.
- HINDS, M.G., NORTON, R.S., VAUX, D.L. & DAY, C.L. (1999). Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol*, **6**, 648-51.
- HOFMANN, H.S., SIMM, A., HAMMER, A., SILBER, R.E. & BARTLING, B. (2002). Expression of inhibitors of apoptosis (IAP) proteins in non-small cell human lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, **128**, 554-60.
- HOLCIK, M., GIBSON, H. & KORNELUK, R.G. (2001). XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis*, **6**, 253-61.
- IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WEI, L.H., BAUER, P.M., WU, G. & DEL SOLDATO, P. (2001). Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4202-8.
- IGNEY, F.H. & KRAMMER, P.H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, **2**, 277-88.
- ISLAM, A., KAGEYAMA, H., HASHIZUME, K., KANEKO, Y. & NAKAGAWARA, A. (2000). Role of survivin, whose gene is mapped to 17q25, in human neuroblastoma and identification of a novel dominant-negative isoform, survivin-beta/2B. *Med Pediatr Oncol*, **35**, 550-3.

- ITO, N. & NAGATA, S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem*, **268**, 10932-7.
- JANKOWSKI, J.J., KIEBER, D.J. AND MOPPER, K. (1999). Development and intercalibration of ultraviolet solar actinometers. *Photochem Photobiol*, **70**, 319-328.
- JANS, D.A. & HUBNER, S. (1996). Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev*, **76**, 651-85.
- JONES, G., JONES, D., ZHOU, L., STELLER, H. & CHU, Y. (2000). Deterin, a new inhibitor of apoptosis from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*, **275**, 22157-65.
- KANG, Y.H., YI, M.J., KIM, M.J., PARK, M.T., BAE, S., KANG, C.M., CHO, C.K., PARK, I.C., PARK, M.J., RHEE, C.H., HONG, S.I., CHUNG, H.Y., LEE, Y.S. & LEE, S.J. (2004). Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Cancer Res*, **64**, 8960-7.
- KARLSSON, J.O., AXELSSON, K.L. & ANDERSSON, R.G. (1984). Effects of ultraviolet radiation on the tension and the cyclic GMP level of bovine mesenteric arteries. *Life Sci*, **34**, 1555-63.
- KAUFMANN, S.H., DESNOYERS, S., OTTAVIANO, Y., DAVIDSON, N.E. & POIRIER, G.G. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*, **53**, 3976-85.
- KAWASAKI, H., ALTIERI, D.C., LU, C.D., TOYODA, M., TENJO, T. & TANIGAWA, N. (1998). Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res*, **58**, 5071-4.
- 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**, 239-57.
- KHARITONOV, V.G., BONAVENTURA, J. AND SHARMA, V.S. (1996). Methods in Nitric Oxide Research. ed Feilish, M.a.S., J.S. pp. 39-45: Wiley, Chichester, UK.
- KIM, Y.M., TALANIAN, R.V. & BILLIAR, T.R. (1997). Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem*, **272**, 31138-48.
- KOBAYASHI, K., HATANO, M., OTAKI, M., OGASAWARA, T. & TOKUHISA, T. (1999). Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1457-62.
- KOTHAKOTA, S., AZUMA, T., REINHARD, C., KLIPPEL, A., TANG, J., CHU, K., MCGARRY, T.J., KIRSCHNER, M.W., KOTHS, K., KWIATKOWSKI, D.J. & WILLIAMS, L.T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, **278**, 294-8.
- KRAEMER, K.H. (1997). Sunlight and skin cancer: another link revealed. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11-4.
- KRAEMER, S.M. & WALDREN, C.A. (1997). Chromosomal mutations and chromosome loss measured in a new human-hamster hybrid cell line, ALC: studies with colcemid, ultraviolet irradiation, and ¹³⁷Cs gamma-rays. *Mutat Res*, **379**, 151-66.
- KRIEG, A., MAHOTKA, C., KRIEG, T., GRABBSCH, H., MULLER, W., TAKENO, S., SUSCHEK, C.V., HEYDTHAUSEN, M., GABBERT, H.E. & GERHARZ, C.D. (2002). Expression of different survivin variants in gastric carcinomas:

- first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *Br J Cancer*, **86**, 737-43.
- KROEMER, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*, **3**, 614-20.
- KROEMER, G., ZAMZAMI, N. & SUSIN, S.A. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*, **18**, 44-51.
- KRÖNCKE, K.D., FEHSEL, K. & KOLB-BACHOFEN, V. (1997). Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? *Nitric Oxide*, **1**, 107-20.
- KRÖNCKE, K.D., FEHSEL, K., SCHMIDT, T., ZENKE, F.T., DASTING, I., WESENER, J.R., BETTERMANN, H., BREUNIG, K.D. & KOLB-BACHOFEN, V. (1994). Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem Biophys Res Commun*, **200**, 1105-10.
- KUHN, A., FEHSEL, K., LEHMANN, P., KRUTMANN, J., RUZICKA, T. & KOLB-BACHOFEN, V. (1998). Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol*, **111**, 149-53.
- LACASSE, E.C., BAIRD, S., KORNELOUK, R.G. & MACKENZIE, A.E. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, **17**, 3247-59.
- LAUER, T., PREIK, M., RASSAF, T., STRAUER, B.E., DEUSSEN, A., FEELISCH, M. & KELM, M. (2001). Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12814-9.
- LE PAGE, F., MARGOT, A., GROLLMAN, A.P., SARASIN, A. & GENTIL, A. (1995). Mutagenicity of a unique 8-oxoguanine in a human Ha-ras sequence in mammalian cells. *Carcinogenesis*, **16**, 2779-84.
- LENS, S.M., VADER, G. & MEDEMA, R.H. (2006). The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 616-22.
- LI, F. & ALTIERI, D.C. (1999). The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res*, **59**, 3143-51.
- LI, F., AMBROSINI, G., CHU, E.Y., PLESCIA, J., TOGNIN, S., MARCHISIO, P.C. & ALTIERI, D.C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, **396**, 580-4.
- LI, J., BILLIAR, T.R., TALANIAN, R.V. & KIM, Y.M. (1997a). Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun*, **240**, 419-24.
- LI, J., SASAKI, H., SHENG, Y.L., SCHNEIDERMAN, D., XIAO, C.W., KOTSUJI, F. & TSANG, B.K. (2000). Apoptosis and chemoresistance in human ovarian cancer: is Xiap a determinant? *Biol Signals Recept*, **9**, 122-30.
- LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIHARDJO, I., SRINIVASULA, S.M., AHMAD, M., ALNEMRI, E.S. & WANG, X. (1997b). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-89.
- LIAO, H., WINKFEIN, R.J., MACK, G., RATTNER, J.B. & YEN, T.J. (1995). CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J Cell Biol*, **130**, 507-18.
- LIEW, F.Y., LI, Y., SEVERN, A., MILLOTT, S., SCHMIDT, J., SALTER, M. & MONCADA, S. (1991). A possible novel pathway of regulation by murine T helper

- type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur J Immunol*, **21**, 2489-94.
- LISTON, P., ROY, N., TAMAI, K., LEFEBVRE, C., BAIRD, S., CHERTON-HORVAT, G., FARAHANI, R., MCLEAN, M., IKEDA, J.E., MACKENZIE, A. & KORNELUK, R.G. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*, **379**, 349-53.
- LIU, S.S., TSANG, B.K., CHEUNG, A.N., XUE, W.C., CHENG, D.K., NG, T.Y., WONG, L.C. & NGAN, H.Y. (2001). Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur J Cancer*, **37**, 1104-10.
- LI-WEBER, M. & KRAMMER, P.H. (2003). Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin Immunol*, **15**, 145-57.
- LOEFFLER, M. & KROEMER, G. (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*, **256**, 19-26.
- LOWENSTEIN, C.J. & SNYDER, S.H. (1992). Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*, **70**, 705-7.
- LUNDBERG, J.O., WEITZBERG, E., LUNDBERG, J.M. & ALVING, K. (1994). Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut*, **35**, 1543-6.
- MACFARLANE, M., MERRISON, W., BRATTON, S.B. & COHEN, G.M. (2002). Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem*, **277**, 36611-6.
- MAHOTKA, C., KRIEG, T., KRIEG, A., WENZEL, M., SUSCHEK, C.V., HEYDTHAUSEN, M., GABBERT, H.E. & GERHARZ, C.D. (2002a). Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer*, **100**, 30-6.
- MAHOTKA, C., LIEBMANN, J., WENZEL, M., SUSCHEK, C.V., SCHMITT, M., GABBERT, H.E. & GERHARZ, C.D. (2002b). Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ*, **9**, 1334-42.
- 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**, 6097-102.
- MARSDEN, P.A., SCHAPPERT, K.T., CHEN, H.S., FLOWERS, M., SUNDELL, C.L., WILCOX, J.N., LAMAS, S. & MICHEL, T. (1992). Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett*, **307**, 287-93.
- MARTINO, J.C. & GREEN, D.R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 63-7.
- MATSUNAGA, K. & FURCHGOTT, R.F. (1989). Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, **248**, 687-95.
- MESRI, M., WALL, N.R., LI, J., KIM, R.W. & ALTIERI, D.C. (2001). Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest*, **108**, 981-90.
- MESSMER, U.K., ANKARCORONA, M., NICOTERA, P. & BRUNE, B. (1994). p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett*, **355**, 23-6.
- MIRAMAR, M.D., COSTANTINI, P., RAVAGNAN, L., SARAIVA, L.M., HAOUI, D., BROTHERS, G., PENNINGER, J.M., PELEATO, M.L., KROEMER, G. & SUSIN,

- S.A. (2001). NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem*, **276**, 16391-8.
- MIRZA, A., MCGUIRK, M., HOCKENBERRY, T.N., WU, Q., ASHAR, H., BLACK, S., WEN, S.F., WANG, L., KIRSCHMEIER, P., BISHOP, W.R., NIELSEN, L.L., PICKETT, C.B. & LIU, S. (2002). Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, **21**, 2613-22.
- MONCADA, S. & HIGGS, E.A. (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*, **21**, 361-74.
- MUCHMORE, S.W., CHEN, J., JAKOB, C., ZAKULA, D., MATAYOSHI, E.D., WU, W., ZHANG, H., LI, F., NG, S.C. & ALTIERI, D.C. (2000). Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin. *Mol Cell*, **6**, 173-82.
- 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**, 335-41.
- NAKANE, M., SCHMIDT, H.H., POLLOCK, J.S., FORSTERMANN, U. & MURAD, F. (1993). Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett*, **316**, 175-80.
- NATHAN, C. & XIE, Q.W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, **78**, 915-8.
- NG, C.P., ZISMAN, A. & BONAVIDA, B. (2002). Synergy is achieved by complementation with Apo2L/TRAIL and actinomycin D in Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis of prostate cancer cells: role of XIAP in resistance. *Prostate*, **53**, 286-99.
- NGUYEN, T., BRUNSON, D., CRESPI, C.L., PENMAN, B.W., WISHNOK, J.S. & TANNENBAUM, S.R. (1992). DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3030-4.
- NICOTERA, P., BRUNE, B. & BAGETTA, G. (1997). Nitric oxide: inducer or suppressor of apoptosis? *Trends Pharmacol Sci*, **18**, 189-90.
- NOCENTINI, G., GIUNCHI, L., RONCHETTI, S., KRAUSZ, L.T., BARTOLI, A., MORACA, R., MIGLIORATI, G. & RICCARDI, C. (1997). A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6216-21.
- O'CONNOR, D.S., WALL, N.R., PORTER, A.C. & ALTIERI, D.C. (2002). A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell*, **2**, 43-54.
- OTTERLEI, M., HAUG, T., NAGELHUS, T.A., SLUPPHAUG, G., LINDMO, T. & KROKAN, H.E. (1998). Nuclear and mitochondrial splice forms of human uracil-DNA glycosylase contain a complex nuclear localisation signal and a strong classical mitochondrial localisation signal, respectively. *Nucleic Acids Res*, **26**, 4611-7.
- PARRISH, J.Z. & XUE, D. (2003). Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*. *Mol Cell*, **11**, 987-96.
- PARTON, M., KRAJEWSKI, S., SMITH, I., KRAJEWSKA, M., ARCHER, C., NAITO, M., AHERN, R., REED, J. & DOWSETT, M. (2002). Coordinate expression of apoptosis-associated proteins in human breast cancer before and during chemotherapy. *Clin Cancer Res*, **8**, 2100-8.
- PAUNEL, A.N., DEJAM, A., THELEN, S., KIRSCH, M., HORSTJANN, M., GHARINI, P., MURTZ, M., KELM, M., DE GROOT, H., KOLB-BACHOFEN, V. & SUSCHEK, C.V. (2005). Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA

- challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms. *Free Radic Biol Med*, **38**, 606-15.
- PEAK, J.G., PEAK, M.J., SIKORSKI, R.S. & JONES, C.A. (1985). Induction of DNA-protein crosslinks in human cells by ultraviolet and visible radiations: action spectrum. *Photochem Photobiol*, **41**, 295-302.
- PEAK, M.J., PEAK, J.G. & CARNES, B.A. (1987). Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms. *Photochem Photobiol*, **45**, 381-7.
- PETER, M.E. & KRAMMER, P.H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*, **10**, 26-35.
- RAO, C.N.R.A.B., K.R. (1981). In the Chemistry of Nitro and Nitroso Groups, ed Feuer, H. pp. 153-154: Krieger, Huntington, NY.
- RAO, L., PEREZ, D. & WHITE, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*, **135**, 1441-55.
- RAVAGNAN, L., GURBUXANI, S., SUSIN, S.A., MAISSE, C., DAUGAS, E., ZAMZAMI, N., MAK, T., JAATTELA, M., PENNINGER, J.M., GARRIDO, C. & KROEMER, G. (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*, **3**, 839-43.
- REED, J.C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*, **387**, 773-6.
- REED, J.C. (1999). Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*, **17**, 2941-53.
- ROSSIG, L., FICHTLSCHERER, B., BREITSCHOPF, K., HAENDELER, J., ZEIHNER, A.M., MULSCH, A. & DIMMELER, S. (1999). Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem*, **274**, 6823-6.
- ROTHE, M., PAN, M.G., HENZEL, W.J., AYRES, T.M. & GOEDEL, D.V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*, **83**, 1243-52.
- RUDEL, T. & BOKOCH, G.M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science*, **276**, 1571-4.
- SALVESEN, G.S. & DUCKETT, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 401-10.
- SASAKI, H., SHENG, Y., KOTSUJI, F. & TSANG, B.K. (2000). Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells. *Cancer Res*, **60**, 5659-66.
- SAUNDERS, J.W., JR. (1966). Death in embryonic systems. *Science*, **154**, 604-12.
- SCHARFFETTER-KOCHANKE, K., WLASCHEK, M., BRENNEISEN, P., SCHAUEN, M., BLAUDSCHUN, R. & WENK, J. (1997). UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol Chem*, **378**, 1247-57.
- SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M. & AMES, B.N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10771-8.
- SIEGEL, R.M., FREDERIKSEN, J.K., ZACHARIAS, D.A., CHAN, F.K., JOHNSON, M., LYNCH, D., TSIEN, R.Y. & LENARDO, M.J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, **288**, 2354-7.

- SKOUFIAS, D.A., MOLLINARI, C., LACROIX, F.B. & MARGOLIS, R.L. (2000). Human survivin is a kinetochore-associated passenger protein. *J Cell Biol*, **151**, 1575-82.
- 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**, 112-6.
- STAMLER, J.S. (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, **78**, 931-6.
- STAMLER, J.S., LAMAS, S. & FANG, F.C. (2001). Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, **106**, 675-83.
- STUEHR, D.J., KWON, N.S., NATHAN, C.F., GRIFFITH, O.W., FELDMAN, P.L. & WISEMAN, J. (1991). N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem*, **266**, 6259-63.
- SUI, L., DONG, Y., OHNO, M., WATANABE, Y., SUGIMOTO, K. & TOKUDA, M. (2002). Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol*, **21**, 315-20.
- SUN, C., CAI, M., MEADOWS, R.P., XU, N., GUNASEKERA, A.H., HERRMANN, J., WU, J.C. & FESIK, S.W. (2000). NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem*, **275**, 33777-81.
- SUSCHEK, C.V., BRIVIBA, K., BRUCH-GERHARZ, D., SIES, H., KRONCKE, K.D. & KOLB-BACHOFEN, V. (2001). Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ*, **8**, 515-27.
- SUSCHEK, C.V., KRISCHEL, V., BRUCH-GERHARZ, D., BERENDJI, D., KRUTMANN, J., KRONCKE, K.D. & KOLB-BACHOFEN, V. (1999). Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation. *J Biol Chem*, **274**, 6130-7.
- SUSCHEK, C.V., PAUNEL, A. & KOLB-BACHOFEN, V. (2005). Nonenzymatic nitric oxide formation during UVA irradiation of human skin: experimental setups and ways to measure. *Methods Enzymol*, **396**, 568-78.
- SUSCHEK, C.V., SCHROEDER, P., AUST, O., SIES, H., MAHOTKA, C., HORSTJANN, M., GANSER, H., MURTZ, M., HERING, P., SCHNORR, O., KRONCKE, K.D. & KOLB-BACHOFEN, V. (2003). The presence of nitrite during UVA irradiation protects from apoptosis. *Faseb J*, **17**, 2342-4.
- SUSIN, S.A., LORENZO, H.K., ZAMZAMI, N., MARZO, I., SNOW, B.E., BROTHERS, G.M., MANGION, J., JACOTOT, E., COSTANTINI, P., LOEFFLER, M., LAROCLETTE, N., GOODLETT, D.R., AEBERSOLD, R., SIDEROVSKI, D.P., PENNINGER, J.M. & KROEMER, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**, 441-6.
- SUSIN, S.A., ZAMZAMI, N., CASTEDO, M., HIRSCH, T., MARCHETTI, P., MACHO, A., DAUGAS, E., GEUSKENS, M. & KROEMER, G. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med*, **184**, 1331-41.
- SUZUKI, Y., NAKABAYASHI, Y., NAKATA, K., REED, J.C. & TAKAHASHI, R. (2001a). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem*, **276**, 27058-63.

- SUZUKI, Y., NAKABAYASHI, Y. & TAKAHASHI, R. (2001b). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8662-7.
- TABUCHI, A., SANO, K., OH, E., TSUCHIYA, T. & TSUDA, M. (1994). Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1. *FEBS Lett*, **351**, 123-7.
- TAKAHASHI, R., DEVERAUX, Q., TAMM, I., WELSH, K., ASSA-MUNT, N., SALVESEN, G.S. & REED, J.C. (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem*, **273**, 7787-90.
- 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**, 5315-20.
- TSUJIMOTO, Y., COSSMAN, J., JAFFE, E. & CROCE, C.M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science*, **228**, 1440-3.
- UREN, A.G., BEILHARZ, T., O'CONNELL, M.J., BUGG, S.J., VAN DRIEL, R., VAUX, D.L. & LITHGOW, T. (1999). Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10170-5.
- UREN, A.G., PAKUSCH, M., HAWKINS, C.J., PULS, K.L. & VAUX, D.L. (1996). Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4974-8.
- UREN, A.G., WONG, L., PAKUSCH, M., FOWLER, K.J., BURROWS, F.J., VAUX, D.L. & CHOO, K.H. (2000). Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol*, **10**, 1319-28.
- VADER, G., KAUW, J.J., MEDEMA, R.H. & LENS, S.M. (2006). Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO Rep*, **7**, 85-92.
- VAN LOO, G., SAELENS, X., VAN GURP, M., MACFARLANE, M., MARTIN, S.J. & VANDENABEELE, P. (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ*, **9**, 1031-42.
- VERDECIA, M.A., HUANG, H., DUTIL, E., KAISER, D.A., HUNTER, T. & NOEL, J.P. (2000). Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol*, **7**, 602-8.
- VERHAGEN, A.M., COULSON, E.J. & VAUX, D.L. (2001). Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol*, **2**, REVIEWS3009.
- VERHAGEN, A.M. & VAUX, D.L. (2002). Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis*, **7**, 163-6.
- VIEIRA, H.L., BELZACQ, A.S., HAOUZI, D., BERNASSOLA, F., COHEN, I., JACOTOT, E., FERRI, K.F., EL HAMEL, C., BARTLE, L.M., MELINO, G., BRENNER, C., GOLDMACHER, V. & KROEMER, G. (2001). The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal. *Oncogene*, **20**, 4305-16.
- VIRAG, L. & SZABO, C. (2002). The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*, **54**, 375-429.

- VOLBRACHT, C., CHUA, B.T., NG, C.P., BAHR, B.A., HONG, W. & LI, P. (2005). The critical role of calpain versus caspase activation in excitotoxic injury induced by nitric oxide. *J Neurochem*, **93**, 1280-92.
- WANG, H.W., SHARP, T.V., KOUMI, A., KOENTGES, G. & BOSHOFF, C. (2002). Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus which resembles a spliced variant of human survivin. *Embo J*, **21**, 2602-15.
- WENZEL, M., MAHOTKA, C., KRIEG, A., BACHMANN, A., SCHMITT, M., GABBERT, H.E. & GERHARZ, C.D. (2000). Novel survivin-related members of the inhibitor of apoptosis (IAP) family. *Cell Death Differ*, **7**, 682-3.
- WESIERSKA-GADEK, J., GUEORGUEVA, M., SCHLOFFER, D., UHL, M. & WOJCIECHOWSKI, J. (2003). Non-apoptogenic killing of hela cervical carcinoma cells after short exposure to the alkylating agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). *J Cell Biochem*, **89**, 1222-34.
- WIGILIUS, I.M., AXELSSON, K.L., ANDERSSON, R.G., KARLSSON, J.O. & ODMAN, S. (1990). Effects of sodium nitrite on ultraviolet light-induced relaxation and ultraviolet light-dependent activation of guanylate cyclase in bovine mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun*, **169**, 129-35.
- WILLIAMS, D.L.H. (1988). *Nitrosation*.
- WINK, D.A. & MITCHELL, J.B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, **25**, 434-56.
- WLASCHEK, M., BOLSEN, K., HERRMANN, G., SCHWARZ, A., WILMROTH, F., HEINRICH, P.C., GOERZ, G. & SCHARFFETTER-KOCHANKE, K. (1993). UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived-collagenase by IL-6: a possible mechanism in dermal photodamage? *J Invest Dermatol*, **101**, 164-8.
- WOOD, P.D. (1996). *Photochem Photobiol* 64. 518-524.
- WYLLIE, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-6.
- YAKES, F.M. & VAN HOUTEN, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 514-9.
- 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**, 1349-57.
- YANG, J.H., LEE, H.C. & WEI, Y.H. (1995). Photoageing-associated mitochondrial DNA length mutations in human skin. *Arch Dermatol Res*, **287**, 641-8.
- YANG, Y., FANG, S., JENSEN, J.P., WEISSMAN, A.M. & ASHWELL, J.D. (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*, **288**, 874-7.
- YE, H., CANDE, C., STEPHANOU, N.C., JIANG, S., GURBUXANI, S., LAROCLETTE, N., DAUGAS, E., GARRIDO, C., KROEMER, G. & WU, H. (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol*, **9**, 680-4.

- YU, S.W., WANG, H., DAWSON, T.M. & DAWSON, V.L. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol Dis*, **14**, 303-17.
- YU, S.W., WANG, H., POITRAS, M.F., COOMBS, C., BOWERS, W.J., FEDEROFF, H.J., POIRIER, G.G., DAWSON, T.M. & DAWSON, V.L. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, **297**, 259-63.
- ZAMZAMI, N. & KROEMER, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 67-71.
- ZAMZAMI, N., MARCHETTI, P., CASTEDO, M., ZANIN, C., VAYSSIÈRE, 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**, 1661-72.
- ZAMZAMI, N., SUSIN, S.A., MARCHETTI, P., HIRSCH, T., GOMEZ-MONTERREY, I., CASTEDO, M. & KROEMER, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med*, **183**, 1533-44.
- ZHANG, X.D., ZHANG, X.Y., GRAY, C.P., NGUYEN, T. & HERSEY, P. (2001). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of human melanoma is regulated by smac/DIABLO release from mitochondria. *Cancer Res*, **61**, 7339-48.
- ZHANG, Y.Y., XU, A.M., NOMEN, M., WALSH, M., KEANEY, J.F., JR. & LOSCALZO, J. (1996). Nitrosation of tryptophan residue(s) in serum albumin and model dipeptides. Biochemical characterization and bioactivity. *J Biol Chem*, **271**, 14271-9.
- ZHAO, J., TENEV, T., MARTINS, L.M., DOWNWARD, J. & LEMOINE, N.R. (2000). The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci*, **113 Pt 23**, 4363-71.

7. Abkürzungen

AIF	<i>apoptosis-inducing-factor</i>
Apaf-1	<i>apoptotic peptidase activating factor-1</i>
Asp-X	Asparaginsäure (X ist eine beliebige Aminosäure)
ATP	Adenosin-Triphosphat
Aurora B	<i>aurora-kinase B</i>
Bax	<i>BCL2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell CCL/lymphoma-2</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIR	<i>Baculoviral Inhibitor of apoptosisRepeat</i>
Caspase	<i>cystein aspartate-specific protease</i>
CD95/Fas	<i>TNF receptor superfamily, member 6</i>
CDE/CHR	<i>cell cycle dependent element/cell cycle homology region</i>
CENP-F	<i>centromere protein F</i>
c-IAP	<i>cellular IAP</i>
CLD	Chemilumineszenz Detektion
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EndoG	Endonuclease G
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase
FADD	<i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
sGC	lösliche Guanylatzyklase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
GSH	Glutathion
GSHPx	Glutathion Peroxidase
HaCaT	humane Keratinozytenzelllinie
Hsp70	<i>heat shock protein 70</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
INCENP	<i>inner-centromer-binding-protein</i>

MLS	mitochondriale Lokalisationssequenz
MMP	mitochondriale Membran Permeabilisation
MNNG	N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin
MPT	<i>mitochondrial permeability transition</i>
NEM	N-Ethyl-Maleimid
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NO	Stickstoffmonoxid
N ₂ O ₃	Di-Stickstoff Trioxid
NO ₂ ⁻	Nitrit Anion
NO ₂ [•]	Stickstoffdioxid Radikal
NOS	Stickstoffmonoxid Synthasen
eNOS	endotheliale NOS
iNOS	induzierbare NOS
nNOS	neuronale NOS
ONOO ⁻	Peroxinitrit
OH [•]	Hydroxylradikal
O ^{•-}	Sauerstoff Anion Radikal
OH ⁻	Hydroxyl Anion
PAK-2	p21-aktivierte Kinase-2
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
cPTIO	2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid
p34cdc2	<i>cell division cycle 2</i>
PTP	<i>permeability transition pore</i>
RCC	Nierenzellkarzinom
mRNA	<i>messenger RNA</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RN-NO	N-Nitrosamin
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RS-NO	S-Nitrosothiol
Smac/DIABLO	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/DirectIAP Binding Protein with Low PI</i>
SOD	Superoxid-Dismutase

TNF-R	<i>Tumor-Nekrose-Faktor-receptor</i>
TRAIL-R1	<i>TNF receptor superfamily, member 10a</i>
UV-Strahlung	ultraviolette Strahlung
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
ZNS	zentrales Nervensystems
$\Delta\Psi_m$	mitochondriales Transmembranpotential

8. Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. C.V. Suschek und Herrn PD Dr. C. Mahotka für das Thema, die Betreuung und die angeregten Diskussionen bei der hier angefertigten Arbeit.

Frau Prof. Dr. V. Kolb-Bachofen danke ich für die ebenfalls intensive Betreuung und die Bereitstellung der Mittel, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. W. Kunz und Herrn Univ.-Prof. Dr. H. Mehlhorn danke ich für die Übernahme der Betreuung in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums immer wieder unterstützt haben und nie die Hoffnung verloren haben, dass ich meinen Abschluss doch noch mache. Ebenso danken möchte ich meiner Schwester Bettina Liebmann.

Ebenfalls großen Dank schulde ich meiner Freundin Petra Maldei, die diese Arbeit mehr als einmal Korrektur gelesen hat. Sie hat außerdem meine „komischen“ Arbeitszeiten ertragen ohne zu murren und mich immer unterstützt, diese Arbeit endlich fertig zu stellen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kolleginnen aus dem Labor. Frau Marija Lenzen für die netten Kaffeepausen und die Organisation des Labors und aller Bestellungen. Bei ihr ist nichts unmöglich! Frau Christa Wilkens-Roth danke ich ebenfalls für die netten Kaffeepausen und die Lebensberatung, die man manchmal so braucht.

Ebenfalls bedanken will ich mich bei:

Frau Dr. Miriam Cortese für die gute Zusammenarbeit und die Erkenntnis, dass Zink essen sehr wichtig ist.

Frau Dr. Adnana Paunel-Gorgülü für die Vorarbeiten zu photolytisch generiertem NO und Anregungen in verschiedenen Labordingen.

Frau Dr. Sabine Koch und Frau Dr. Nicole Fitzner für die gemeinsam verbrachte Zeit im Labor.

Frau Dipl. Biol. Daniela Krämer für die netten Gespräche und die Begleitung auf diverse Kongresse.

Ebenfalls einen großen Dank an alle meine Freunde, die lange Abwesenheit und Wochenendarbeit nicht davon abgehalten haben, zu mir zu stehen:

Lutz Krause und Janna Rübenstrunk, Jörn Schmalz, Corina Roep, Steffi Krause, Peter Kaul und Birgit Brink und ganz besonders Nils Wethkamp, Rutger Leliveld und Nora Hinsen für viele bierselige Abende der Entspannung und angeregten wissenschaftlichen Diskussionen.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinem Freund Christof Segbert.

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Jörg Liebmann
Geburtsdatum: 24.08.1973
Geburtsort: Wuppertal
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

1979 – 1983 Grundschole Birkenhöhe, Wuppertal
1983 – 1985 Gymnasium Bayreutherstraße, Wuppertal
1985 – 1993 Gesamtschole Else-Lasker-Schülerstraße
Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

10/1994 – 08/2000 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
10/1999 – 07/2000 Diplomarbeit im Institut für Genetik an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Thema: „Die Rolle von DIAP1 während der frühen Entwicklung von *Drosophila melanogaster*.“
Abschluss: Diplom-Biologe
11/2000 – 02/2001 Wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Transplantationsmedizin und Zelltherapeutika (ITZ) der medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
02/2001 – 02/2003 Wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Pathologie der medizinischen Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
seit 05/2003 Wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Molekulare Medizin, Forschungsgruppe Immunbiologie der medizinischen

Einrichtungen der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf