

Molekulargenetische und Zellbiologische Untersuchungen zur Par-4-induzierten Apoptose

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Meike Boosen

aus

Hamburg

Bonn im Dezember 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Diese Arbeit ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Erscheinungsjahr: 2007

Erstgutachterin:	PD. Dr. Ute Preuß
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann
Fachnaher Gutachter:	Prof. Dr. Norbert Koch
Fachangrenzende Gutachterin:	PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert

Tag der Promotion: 20.04.07

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis **I**

Abkürzungsverzeichnis **V**

Allgemeine Abkürzungen ----- V

Buchstabensymbole der Aminosäuren ----- VIII

1. Einleitung **1**

1.1 Apoptose ----- **1**

 1.1.1 Bedeutung der Apoptose ----- 1

 1.1.2 Morphologische Merkmale der Apoptose ----- 2

 1.1.3 Molekulare Grundlagen der Apoptose ----- 3

 1.1.3.1 Caspasen und ihre Regulatoren ----- 3

 1.1.3.2 Rezeptor-vermittelte Apoptose ----- 5

 1.1.3.3 Intrinsische Apoptose ----- 6

 1.1.1.4 Zytoskelett und Apoptose ----- 9

1.2 Das pro-apoptotische Protein Par-4 ----- **10**

1.3 Die DAP-like kinase (Dlk) ----- **14**

1.4 Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose ----- **16**

1.5 Zielsetzung der Arbeit ----- **17**

2 Material **19**

2.1 Chemikalien ----- **19**

2.2 Allgemeine Puffer und Stammlösungen ----- **19**

2.3 Kits ----- **20**

2.4 Kultur von Bakterien ----- **20**

 2.4.1 Medien für die Kultur von Bakterien ----- 20

 2.4.2 Bakterienstämme ----- 21

2.5 Kultur von Säugerzellen ----- **21**

 2.5.1 Medien für die Kultur von Säugerzellen ----- 21

 2.5.2 Zelllinien ----- 22

2.6 Kultur von Hefen ----- **22**

 2.6.1 Medien für die Kultur von Hefen ----- 22

 2.6.2 Hefestämme ----- 23

2.7 Plasmide ----- **23**

2.8 Oligonukleotide ----- **24**

2.9 Antikörper ----- **26**

3. Methoden	27
3.1 Allgemeine Methoden	27
3.1.1 Restriktionsverdau	27
3.1.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	27
3.1.3 Ligation	27
3.1.4 Agarosegelelektrophorese	28
3.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	28
3.1.6 Analytische Plasmidpräparation	28
3.1.7 Präparative Plasmidisolierung mittels Affinitätschromatographie	29
3.1.8 Phenol-Chloroform Extraktion	29
3.1.9 Natriumacetat-Fällung von Nukleinsäuren	30
3.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
3.1.11 Herstellung kompetenter Zellen	31
3.1.12 Transformation	32
3.1.13 Polymerase-Kettenreaktion	32
3.1.14 Northern Blot-Hybridisierung	33
3.2 Proteinchemische Techniken	34
3.2.1 Herstellung von Zellextrakten	34
3.2.2 Fraktionierung in Kern- und Zytoplasmaextrakte	35
3.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford	35
3.2.4 [³⁵ S]-Methionin-Markierung von Proteinen	36
3.2.5 In vitro Translation	36
3.2.6 Immunpräzipitation	36
3.2.7 In vitro Kinasetest	38
3.2.8 Phosphorsäure-Analyse mittels saurer Hydrolyse	39
3.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.2.10 Western Blot	41
3.2.11 Regeneration von Western Blots	43
3.2.12 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine	43
3.2.13 In vitro Bindungsstudien mit Glutathion Sepharose	44
3.2.14 In vitro Filament-Bindung	44
3.3 Arbeiten mit Hefen	45
3.3.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System(THS)	45
3.3.2 Transformation von Hefen (nach Gietz)	46
3.3.3 Transformation von Hefen mit einer cDNA-Bank	47
3.3.4 Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen	48
3.3.5 β-Galaktosidasetest	49
3.3.6 Plasmidpräparation aus Hefezellen	50
3.4 Zellkultur und immunhistochemische Techniken	50
3.4.1 Kultur von Säugerzellen	50
3.4.2 Transiente Transfektion von Säugerzellen	51
3.4.3 Herstellung stabil transfizierter Zelllinien	51
3.4.4 Metabolische Markierung von Proteinen in Säugerzellen	52
3.4.5 Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung	52
3.4.6 Dapi- und Propidiumjodid-Färbung der DNA	53
3.4.7 Phalloidin-färbung des Aktin Zytoskeletts	53
3.4.8 Heterokaryon-Assay	54
3.4.9 Bestimmung der Apoptoserate anhand morphologischer Merkmale	54

4. Ergebnisse	55
4.1 Identifizierung von neuen Par-4 Interaktionspartnern	55
4.1.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (THS)	55
4.1.1.1 Analyse der potentiellen Par-4 Interaktionspartner	56
4.1.2 Amida als Interaktionspartner von Par-4	57
4.1.2.1 Retransformationskontrolle und Kartierung der Interaktionsdomänen im THS	58
4.1.2.2 Expressionsanalyse von Amida auf RNA-Ebene	61
4.1.2.3 In vitro Transkription/Translation von Amida	62
4.1.2.4 in vitro Bindungsstudien	63
4.1.2.5 Koimmunpräzipitation von Amida und Par-4	64
4.1.2.6 Expression von Amida in Säugerzellen	67
4.1.2.7 Studien zur nukleo-zytoplasmatischen Translokation von Amida	69
4.1.2.8 Koexpressionsstudien von Amida und Par-4 in Säugerzellen	70
4.1.2.9 Aktin-Bindungs- und Polymerisationsstudien mit Amida und Par-4	72
4.1.2.10 Apoptoseinduktion durch Koexpression von Par-4 und Amida	75
4.1.2.11 Identifizierung einer funktionellen NES von Amida	77
4.1.2.12 Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts für die Par-4/Amida-induzierte Apoptose	80
4.1.2.13 Bedeutung der Par-4/Amida Komplexbildung für die Apoptose	82
4.2 Bedeutung der Phosphorylierung für die Par-4-vermittelte Apoptose	84
4.2.1 Phosphorylierung des Par-4 Proteins in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose	84
4.2.1.1 Koexpression von Par-4 und Dlk in Säugerzellen	84
4.2.1.2 in vivo Bindungsstudien mit Par-4 und Dlk	86
4.2.1.3 Identifizierung potentieller Dlk-Phosphorylierungsstellen im Par-4 Protein	87
4.2.1.4 Par-4 als Substrat verschiedener Kinasen	88
4.2.1.5 Herstellung von Par-4 Phosphorylierungsmutanten	91
4.2.1.6 Expression der Par-4 Phosphorylierungsmutanten	92
4.2.1.7 Identifizierung der Dlk-Phosphorylierungsstellen im Par-4 Protein	93
4.2.1.8 Identifizierung der PKA-Phosphorylierungsstellen im Par-4 Protein	96
4.2.1.9 In vivo Phosphorylierung von Par-4	97
4.2.1.10 Apoptoseinduktion nach Koexpression der Dlk mit verschiedenen Par-4 Phosphorylierungsmutanten	99
4.2.1.11 Bindungsstudien mit Dlk und den verschiedenen Par-4 Phosphorylierungsmutanten	102
4.2.1.12 Nachweis der Threonin 155 Phosphorylierung durch die Dlk	103
4.2.1.13 Nachweis der Par-4 Phosphorylierung an der Aminosäure T155 in Säugerzellen	104
4.2.1.14 Koexpresssion von Amida und den verschiedenen Par-4-Phosphorylierungsmutanten	107
4.2.2 Phosphorylierung des Amidaproteins	108
4.2.2.1 Phosphoaminosäureanalyse des in vivo markierten Amida Proteins	108
4.2.2.2 Amida als Substrat der Dlk	109
4.2.2.3 Identifizierung der Dlk-Phosphorylierungsstelle von Amida	111
4.2.3 Amida als Interaktionspartner von Dlk	112
4.2.3.1 In vivo Bindungsstudien mit Amida und Dlk	112
4.2.3.2 Komplexbildung von Amida, Par-4 und Dlk	113

5. Diskussion	115
5.1 Amida, der neue Par-4 Interaktionspartner	115
5.1.1 Identifizierung des neuen Par-4 Interaktionspartners Amida	116
5.1.2 Lokalisation des überexprimierten Amida Proteins in Rattenfibroblasten	118
5.1.3 Rekrutierung von Amida an das Aktin-Zytoskelett und Apoptoseinduktion nach Koexpression von Amida und Par-4	121
5.2 Bedeutung der Par-4 Phosphorylierung für die pro-apoptotische Funktion des Par-4 Proteins	126
5.3 Das Amida Protein als Substrat der Dlk	133
5.4 Ausblick	136
6. Zusammenfassung	138
7. Literaturverzeichnis	139

Danksagung

Erklärung

Lebenslauf

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Allgemeine Abkürzungen

A	Adenin oder Ampère
<i>a</i>	Anti-
Abb	Abbildung
A.bidest	zweifach destilliertes Wasser
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bidest	bidestilliert
bp	Nukleotid-Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
C	Cytosin
C-	carboxy
Ci	Curie (1 Ci = 3,7x 10 ¹⁰ Zerfälle pro Minute)
CIP	<i>Calf intestinal phosphatase</i> , Kälberdarm-Phosphatase
CytD	Cytochalasin D
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
DD	Death domain
DMEM	Dulbecco's Modifies Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	Ethylenglycol-tetraessigsäure
et al.	et alteri
Etbr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>
h	Stunde
IP	Immunpräzipitation
K	Kalium
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KAc	Kaliumacetat
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LP	Large plate, 100 mm Plastik-Gewebekulturschale
Lsg.	Lösung
LT	großes T-Antigen des Simian Virus 40
LZ	Leucin-Zipper
M	Molarität
mCi	Millicurie
µM	micromolar
µmol	Mikromol
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
Mol	Mol, Stoffmenge ($6,023 \times 10^{23}$)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
N-	amino-
Na	Natrium
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
NEM	N-Ethylmaleinimid
NH₄Ac	Ammoniumacetat

NLS	nuclear localisation signal, Kernlokalisationsignal
nm	nonometer
Noc	Nocodazol
NP-40	Nonidet P-40
OD_x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
[³²P]	Phosphorisotop 32
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konz.
PLP	Phosphatlysispuffer
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pu	Purin
Py	Pyrimidin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
s	Sekunde
[³⁵S]	Schwefelisotop 35
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodocylsulfat
SP	Small plate, 60 mm Plastik-Gewebekulturschale
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer
TBS	Tris buffered saline, Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tertramethylrhodamin-Isothiocyanat
tRNA	transfer-RNA
Tween-20	Polyoxyethylensorbitant-monolaurat
U	Uracil oder Unit, Enzymeinheit
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen

vgl.	vergleiche
WB	Westernblot
Wdh.	Wiederholung(en)
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-Galactosid
z.B.	zum Beispiel

Buchstabensymbole der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1. EINLEITUNG

1.1 Apoptose

1.1.1 Bedeutung der Apoptose

Der Begriff der Apoptose läßt sich aus dem Griechischen ableiten und bedeutet sinnbildlich: „das Fallen der Blätter im Wind“ und bezeichnet den kontrollierten Zerfall der Zellen als letzte Phase ihrer Entwicklung (Kerr et al., 1972). Die Apoptose stellt eine Form des physiologischen und genetisch kontrollierten (programmierten) Zelltodes dar und ist für einen vielzelligen Organismus essentiell, da sie an der Regulation der Embryonalentwicklung, Differenzierung und Homöostase von Geweben und Organismen beteiligt ist. Durch Apoptose werden z.B. die Interdigitalfalten während der Embryonalentwicklung zurückgebildet, autoreaktive T-Lymphozyten aus dem Organismus entfernt oder die Zellzahl im Endometrium, dem Darmepithel oder der Haut reguliert. Die Apoptose kann jedoch auch als Folge von Wachstumsfaktorentzug, Strahlung, chemischen Mutagenen und Onkogenen auftreten und schützt somit den Organismus vor Zellen, deren Wachstum nicht mehr korrekt reguliert werden kann.

Die Zellen eines Organismus unterliegen in jeder Phase der Entwicklung und Differenzierung dem Einfluss verschiedenster Faktoren, die eine feine Balance zwischen Apoptose und Zellproliferation gewährleisten. Die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen diesen beiden Prozessen ist genetisch streng reguliert und muß in der Zelle genau koordiniert werden. Intrazelluläre Signalwege, die am Zellwachstum bzw. mitotischen Prozessen beteiligt sind, sind daher häufig mit Signalwegen verknüpft, die zur Apoptose führen (Chau und Wang, 2003; McCarthy et al., 2001). Diese Regulation, die unter anderem nicht mehr benötigte oder potentiell gefährliche Zellen eliminiert, ist für einen gesunden Organismus unerlässlich und kann bei einer Störung des Systems katastrophale Folgen für den Gesamtorganismus nach sich ziehen. Eine verstärkte Apoptose kann zu einer Vielzahl pathologischer Zustände wie z.B. neurodegenerativen Erkrankungen (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington) oder HIV führen (Gougeon, 1997; Stefanis et al., 1997; Engidawork et al., 2001), wohingegen eine verminderte Apoptoserate zu malignen Erkrankungen, Fehlbildungen oder Autoimmunkrankheiten führen kann (Jellinger, 2001; Zörnig et al., 2001).

1.1.2 Morphologische Merkmale der Apoptose

Es können prinzipiell zwei unterschiedliche Arten des Zelltodes unterschieden werden: die Nekrose und die Apoptose. Im Gegensatz zur Nekrose, die passiv und zumeist unkontrolliert verläuft, handelt es sich bei der Apoptose um einen genetisch regulierbaren, aktiven biochemischen Prozeß. Die Nekrose wird durch die Aktivierung des Komplementsystems, Infarkte oder bestimmte Chemikalien ausgelöst und führt zur Ausschüttung des Zellinhaltes in die Umgebung der Zelle. Dies hat meist eine inflammatorische Reaktion und somit eine Schädigung des umgebenden Gewebes zur Folge (Afanas'ev et al., 1986; Golstein et al., 1991; Kroemer et al., 1998). Im Gegensatz dazu verläuft die Apoptose kontrolliert und wird durch das Auftreten pro-apoptotischer Signale oder den Verlust von anti-apoptotischen Signalen induziert. Letztlich entscheidet die intrazelluläre Balance zwischen den pro- und anti-apoptotischen Signalen über das weitere Schicksal einer Zelle.

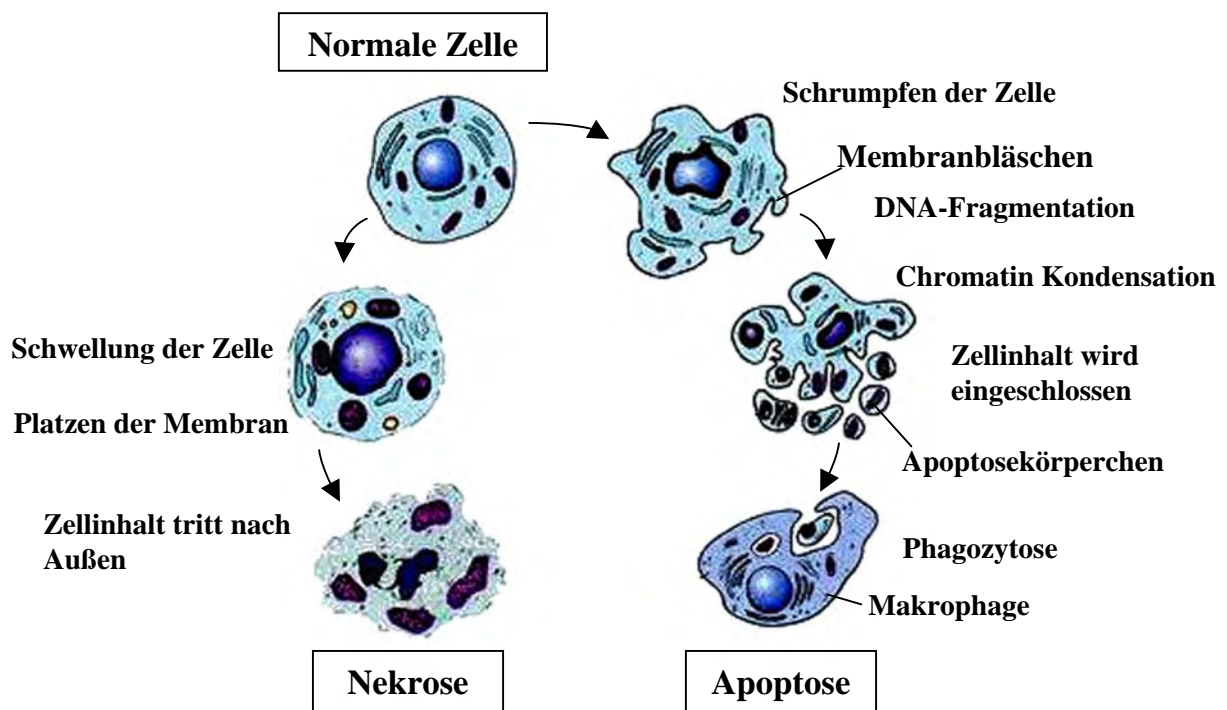


Abb.1: Schematische Darstellung der Morphologie von nekrotischen und apoptotischen Zellen. Bei der **Nekrose**, die z.B. bei Verletzungen auftritt, schwellen die Zellen zunächst an und platzen auf. Der Zellinhalt tritt in das umgebende Gewebe aus und ruft eine inflammatorische Reaktion hervor. Die **Apoptose** verläuft nach einem festgelegten Programm, bei dem die Zelle zunächst schrumpft. Das Zytoplasma und das Chromatin kondensieren. Im weiteren Verlauf wird der Kern und die DNA fragmentiert und Vesikel werden von der Zytoplasmamembran abgeschnürt. Diese Apoptosekörperchen können von Makrophagen phagozytiert und durch lysosomale Enzymen verdaut werden (Abbildung entnommen und modifiziert nach www.resveratrolnews.com).

Im Verlauf der Apoptose treten charakteristische biochemische und morphologische Merkmale in den Zellen auf. Die Zellen beginnen zu schrumpfen, verlieren den Zellkontakt,

das Zytoplasma und das Chromatin kondensieren, es kommt zu einer Kern- und Chromatin-Fragmentation und durch Membranabschnürungen („*membrane blebbing*“) werden kleine Apoptosekörperchen („*apoptotic bodies*“) gebildet. Im Unterschied zur Nekrose bleibt hier die Membranintegrität mit ihrer Funktion als Permeabilitätsbarriere bis zur letzten Phase bestehen. Es kommt zu keiner Ausschüttung von Zellinhalten in die Umgebung und die apoptotischen Körperchen werden durch Zellen des Immunsystems phagozytiert, ohne dass es zu einer Entzündungsreaktion kommt (Kerr et al., 1972; Kerr und Harmon, 1991; Majno und Joris, 1995).

1.1.3 Molekulare Grundlagen der Apoptose

Die Apoptose kann über eine große Anzahl an verschiedenen Stimuli ausgelöst werden. Daher sind an ihrer Ausführung verschiedenste, dem auslösenden Stimulus nachfolgende, Signaltransduktionswege mit einer Vielzahl an Proteinfamilien (z.B. Caspase-, Bcl-2 Familie) beteiligt (Reed, 1998; Li und Yuan, 1999; Salvesen, 2002). Abhängig vom Zelltyp, der Art des apoptotischen Stimulus und den Wachstumsbedingungen werden verschiedene apoptotische Mechanismen aktiviert. Grundsätzlich wird jedoch zwischen zwei apoptotischen Signalwegen unterschieden, die beide zu einer Aktivierung der Caspase-Kaskade und somit zur Apoptose führen (Salvesen und Dixit, 1997; Reed et al., 1998; Reed, 2000). Durch extrazelluläre Signale anderer Zellen (z.B. zytotoxische T-Zellen) wird der extrinsische, Rezeptor-vermittelte Signalweg ausgelöst. Intrazelluläre Signale führen dahingegen zur Auslösung des intrinsischen Signalweges, bei dem die Mitochondrien die zentralen Vermittler der Apoptose darstellen. Beide Signalwege und ihre wichtigsten Komponenten, die Caspasen, werden im Folgenden näher erläutert (siehe auch Abbildung 2).

1.1.3.1 Caspasen und ihre Regulatoren

Bereits der Name der Caspasen beschreibt ihre Zugehörigkeit zu der Familie der Cysteinproteasen („*Cysteinylyl aspartate specific proteinases*“) (Nicholson und Thornberry, 1997). Die Caspasen sind eine evolutionär vom Insekt bis zum Menschen hoch konservierte Proteinfamilie. Sie besitzen in ihrem aktiven Zentrum einen Cysteinrest und spalten ihre Substrate nach einem C-terminalen Aspartatrest, dem eine spezifische Tetrapeptid Erkennungssequenz vorrausgeht und der für die einzelnen Mitglieder der Caspasefamilie sehr variabel ist (Thornberry et al., 1997). Alle Mitglieder der Caspasefamilie werden als Proenzyme synthetisiert, die drei Domänen enthalten: die variable N-terminale Prodomäne,

eine große Untereinheit (20 kDa) und eine kleine Untereinheit (10 kDa). In nicht-apoptotischen Zellen liegen die Caspasen als inaktive Zymogene im Zytoplasma vor. Ihre proteolytische Aktivierung erfolgt durch die Entfernung der N-terminalen Prodomäne und durch die Spaltung in eine kleine und eine große Untereinheit. Aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten bildet sich ein Tetramer, das zwei katalytische Zentren beinhaltet (Wilson et al., 1994; Rotonda 1996; Thornberry und Lazebnik, 1998). Die Liste ihrer Substrate umfasst neben weiteren Caspasen zahlreiche Strukturproteine (z.B. Aktin, Lamin, Gelsolin), Inhibitoren (z.B. ICAD, *Inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease* (CAD)) und Enzyme, die an der DNA-Reparatur (PARP, *poly(ADP-ribose)polymerase*), der Steuerung des Zellzyklus (z.B. Mdm-2, *murine double minute Gen 2*, Rb Protein, *Retinoblastoma Protein*), DNA-Replikation (Replikationsfaktor C) oder der Bildung von Membranbläschen und Apoptosekörperchen beteiligt sind (PAK-2, *p21-activated kinase 2*), Rock-I (*Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1*) (Übersicht in Stroh und Schulze Osthoff, 1998 und Thornberry und Lazebnik, 1998; Coleman et al., 2001). Die Caspasen tragen somit entscheidend zu der spezifischen Degradation zellulärer Komponenten während der Apoptose bei.

Die apoptotischen Vertreter der Caspasen können in zwei Gruppen unterteilt werden: die Initiator- und die Effektorcaspasen (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) zeichnen sich durch eine verlängerte Prodomäne aus, über die eine Anbindung an Adapterproteine wie Apaf-1 oder FADD vermittelt wird. So können Homodimere entstehen, die sich mit geringer Basalaktivität entweder selbst autokatalytisch oder gegenseitig aktivieren (Salvesen und Dixit, 1999). Die Initiatorcaspasen sind für die Weiterleitung des apoptotischen Signals verantwortlich und ihre Substrate sind die Effektorcaspasen, die ihrerseits ausschließlich durch Caspasen aktiviert werden. Die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) spalten z.T. weitere Caspasen und verstärken somit das apoptotische Signal (Slee, et al., 1999), hauptsächlich sind sie jedoch durch die Spaltung ihrer zellulären Substrate für die Ausführung des Zelltodes verantwortlich (Übersicht in Salvesen, 2002). Jedoch sind nicht alle Caspasen an apoptotischen Prozessen beteiligt. Einige Vertreter dieser Proteinfamilie sind an der posttranslationalen Prozessierung von Cytokinen bei Entzündungsprozessen beteiligt (Caspase-1, -4, -5, -13) (Übersicht in Thornberry und Lazebnik, 1998) und der Caspase-14 wird eine Rolle bei der Differenzierung von Keratinozyten zugeschrieben (Eckart et al., 2000).

Um in nicht apoptotischen Zellen den inaktiven Status der Caspasen aufrecht zu erhalten, bedarf es einer exakten und effizienten Regulation. Eine wichtige Gruppe von Proteinen, die

die Aktivität der Caspasen kontrolliert, sind die IAP (*inhibitors of apoptosis*) Proteine. Sie binden an spezifische Sequenzen der Procaspasen und bewirken somit ihre Inhibition. Bisher sind sechs humane Mitglieder dieser anti-apoptotischen IAP-Familie bekannt: NIAP, C-IAP1, C-IAP2, XIAP, Survivin und BRUCE (Deveraux und Reed, 1999; Deveraux et al., 1999).

1.1.3.2 Rezeptor-vermittelte Apoptose

Die über einen Rezeptor auf der Zelloberfläche (extrinsisch) ausgelöste Apoptose wurde zum ersten Mal im Jahre 1975 bei Tumorzellen beobachtet, die mit einem von Makrophagen produzierten Faktor, dem Tumor Nekrose Faktor (TNF) inkubiert wurden (Carswell et al.; 1975). Es stellte sich im Laufe der Forschung heraus, dass TNF als Ligand an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche binden kann und auf diese Weise Apoptose auslöst. Diese sogenannten Todesrezeptoren sind eine Unterfamilie der TNF-Rezeptorfamilie. Sechs Mitglieder dieser Unterfamilie sind an der Induktion der Apoptose beteiligt, darunter die bekanntesten und am besten charakterisierten Vertreter Fas (CD95/APO-1) und TNF α -R (Ashkenazi und Dixit, 1998; Locksley, 2001). Die übrigen TNF-Rezeptoren vermitteln Proliferations-, Überlebens- und Differenzierungssignale (Locksley, 2001; Übersicht in Igney und Krammer, 2002). Sowohl die Fas- als auch die TNF-vermittelte Apoptose ist entscheidend an den Prozessen der Immunantwort und der Reifung und Entwicklung von Immunzellen beteiligt.

Der Mechanismus der Apoptoseinduktion über Todesrezeptoren ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt. Der Fas-Ligand bzw. TNF α werden als transmembrane Zelloberflächenmoleküle z.B. auf Lymphozyten oder Makrophagen gebildet, können jedoch auch in der truncierten löslichen Form als Liganden für die entsprechenden Todesrezeptoren aktiv werden. Beide Liganden kommen als Homotrimere vor und induzieren durch diese Struktur auch die Trimerisierung des korrespondierenden Rezeptormoleküls bei einer Bindung an dessen extrazelluläre cysteinreiche Domäne (Schneider et al., 1997; Locksley, 2001). Ein charakteristisches Merkmal der Todesrezeptoren ist eine intrazelluläre Region, die als Todesdomäne (*Death domain*, DD) bezeichnet wird. Durch die Trimerisierung der Rezeptoren wird es Adaptermolekülen wie z.B. FADD (*Fas associated protein with death domain*) ermöglicht, mit ihrer eigenen Todesdomäne an den aktivierten Rezeptorkomplex zu binden. FADD verfügt über eine sogenannte Todeseffektordomäne (*Death effector domain*, DED), wie sie auch in der Prodomäne der Procaspase-8 zu finden ist. Die Procaspase-8 wird über diese Domäne an einen Multiproteinkomplex rekrutiert, der als DISC (*death inducing signaling complex*) bezeichnet wird. Dieser Komplex enthält aufgrund seiner trimären

Struktur mehrere Procaspase-8 Moleküle, die durch autokatalytische und gegenseitige Spaltung am DISC aktiviert werden. Die aktivierte Initiatorcaspase kann im Weiteren Procaspasen (z.B. Procaspase-3, -6, -7) proteolytisch spalten und aktivieren und somit das apoptotische Signal bis zu den Effektorcaspasen weiterleiten, die durch Spaltung ihrer zellulären Substrate letztendlich den Zelltod verursachen (Ashkenazi und Dixit 1998; Übersicht in Krammer, 1999).

1.1.3.3 Intrinsische Apoptose

Der über die Mitochondrien vermittelte intrinsische Signalweg kann über verschiedene apoptotische Stimuli wie z.B. Wachstumsfaktorentzug, Hypoxie, Chemotherapeutika oder DNA-Schäden ausgelöst werden und wird über die selektive Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma reguliert (Green und Reed, 1998; Granville und Gottlieb 2002).

Wie aus der schematischen Darstellung in Abbildung 2 zu entnehmen ist, spielen bei der Einleitung der intrinsischen Apoptose die Mitglieder der Bcl-2 Genfamilie eine bedeutende Rolle (Reed, 1998). Zur Zeit sind ca. 20 Mitglieder dieser Genfamilie bekannt, die sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirken können. Die pro-apoptotischen Mitglieder dieser Genfamilie wie Bax, Bad, Bid, Bim und Bmf sind an der Aktivierung der Mitochondrien beteiligt. Die anti-apoptotischen Familienmitglieder Bcl-2 und Bcl-X_L hingegen blockieren die Aktivierung der Mitochondrien. Die pro-apoptotischen Mitglieder werden derzeit in zwei Untergruppen eingeteilt: zum einen die Bax Familie, zu der Bad und Bax gehören und die über die Bcl-2 Homologiedomänen BH1, BH2 und BH3 verfügen. Zu der zweiten Unterfamilie, der BH3-only-Proteinfamilie, gehören diejenigen Mitglieder, die lediglich eine BH3 Domäne besitzen (Huang und Strasser, 2000; Bouillet und Strasser, 2002). Die Bcl-2 Proteine interagieren durch ein komplexes Netzwerk von Homo- und Heterodimeren miteinander und tragen auf diese Weise zur Regulation der Apoptose bei. Ein Dimer aus zwei Bax Proteinen trägt z.B. positiv zur Induktion der Apoptose bei. Jedoch haben sowohl die Homodimerisierung von Bcl-2 als auch die Heterodimerisierung von Bcl-2 mit Bax die gegensätzliche Funktion, nämlich das Überleben der Zelle zu unterstützen. Das relative Expressionsniveau der einzelnen Bcl-2 Proteine nach einem apoptotischen Reiz und die daraus resultierende Zusammensetzung der Heterodimere entscheidet somit über die Aktivierung der Mitochondrien, die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren und den Fortlauf des apoptotischen Programms (Übersicht in Desagher and Martinou, 2000).

Bax und Bak sind, wie in Abbildung 2 beschrieben, die direkten Aktivatoren der Mitochondrien. Sie werden durch Mitglieder der BH3-only-Familie aktiviert, indem z.B. die durch Caspase-8 oder -10 trunkeerte Form von Bid (tBid) eine Konformationsänderung des zytosolischen Bax induziert. Dadurch wird Bax aus einem inhibitorischen Komplex mit Bcl-2 freigesetzt, homooligomerisiert und bildet kanalähnliche Strukturen in der äußeren Mitochondrienmembran, die zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen apoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum in das Zytoplasma führen (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). Das freigesetzte Cytochrom c bindet im Zytoplasma an Apaf-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor-1*), dessen Caspaserekrutierungsdomäne (CARD) daraufhin, bei

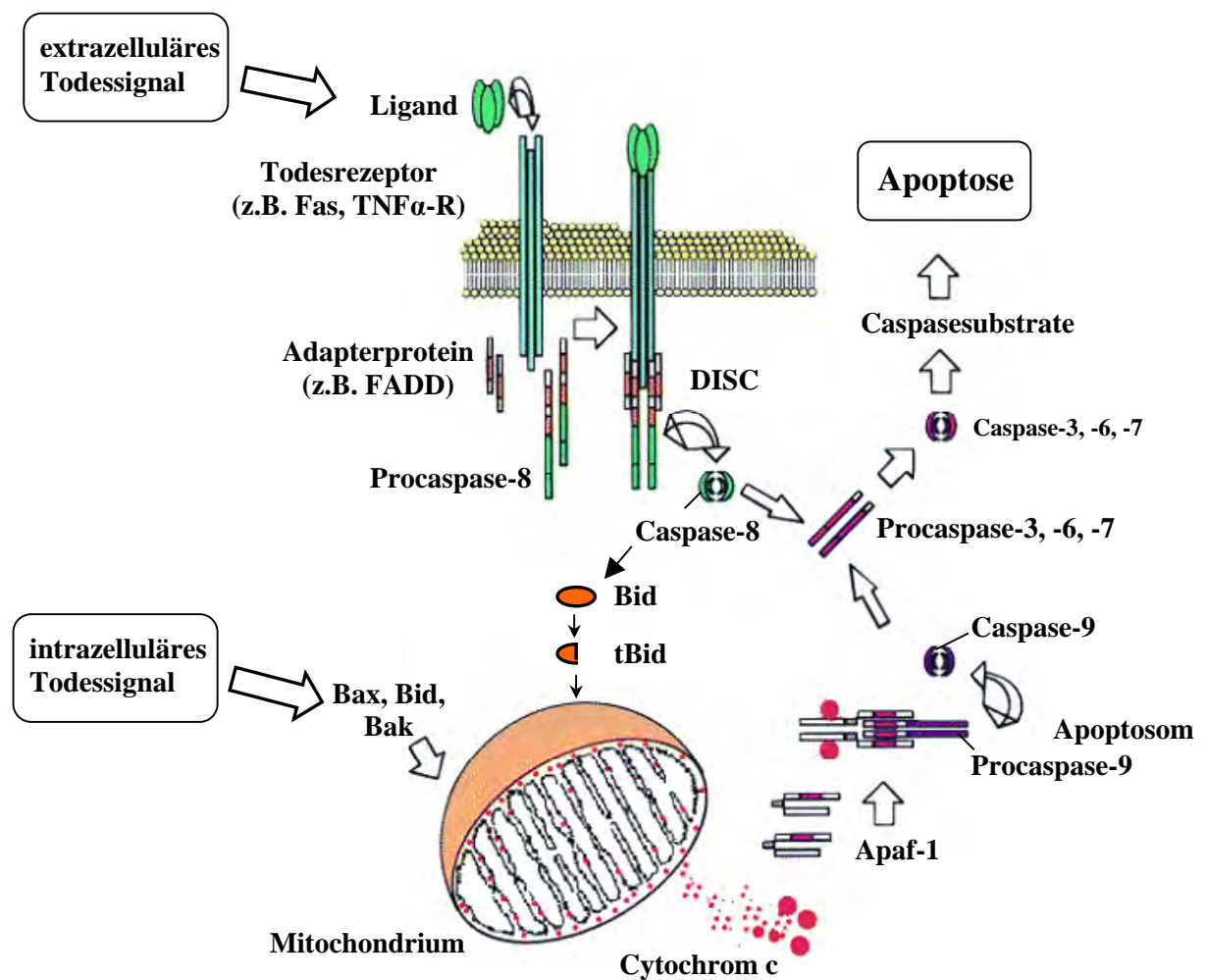


Abb. 2: Schematische Darstellung des extrinsischen und des intrinsischen Apoptoseweges. Der Rezeptorvermittelte Signalweg verläuft über die Trimerisierung eines Rezeptors nach Bindung seines Liganden. Es kommt zu einer FADD-vermittelten Rekrutierung der Procaspase-8 an den *death inducing signaling complex* (DISC) an dem sie proteolytisch gespalten und aktiviert wird. Dies führt dann zur Aktivierung weiterer Effektorcaspasen und der Caspase-Kaskade, die den Zelltod einleitet. Der mitochondriale Weg der Apoptoseinduktion geht von einem intrazellulären apoptotischen Reiz aus, der über die Mitglieder der Bcl-2 Familie zu den Mitochondrien geleitet wird. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, das sich zusammen mit Apaf-1 zum sogenannten „Apoptosom“ zusammenschließt und Procaspase-9 rekrutiert. Am Apoptosom wird die Procaspase-9 autokatalytisch prozessiert und aktiviert, die daraufhin Effektorcaspasen aktivieren kann (entnommen aus und modifiziert nach Green, 1998).

Anwesenheit von dATP, freigelegt wird. Diese bewirkt eine Oligomerisierung und durch autokatalytische Spaltung eine Aktivierung der Procaspase-9 innerhalb des Komplexes (Apoptosom) (Salvesen und Renatus, 2002). Die aktivierte Caspase-9 kann durch proteolytische Spaltung weiter stromabwärts gelegene Effektorcaspasen aktivieren, was zur Verstärkung des apoptotischen Signals und letztlich zum Zelltod führt (Zamzami und Kroemer, 2001).

Eine Verknüpfung des Rezeptor-vermittelten und des intrinsischen apoptotischen Weges erfolgt unter anderem über die Caspase-8 und das von ihr gespaltene Protein Bid. Die am DISC-Komplex aktivierte Caspase-8 erzeugt durch proteolytische Spaltung das trunkierte, aktivierte Bid, das im Zusammenspiel mit Bax und Bak zur Freisetzung von Cytochrom c und zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges beiträgt (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Krammer, 2000).

Neben Cytochrom c werden noch weitere apoptotische Faktoren wie z.B. Smac/Diablo aus den Mitochondrien freigesetzt. Smac/Diablo (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI*) inhibiert die Proteine der *inhibitors of apoptosis* Familie (IAPs), die ihrerseits durch die Inhibition der Procaspasen in nicht apoptotischen Zellen eine spontane Aktivierung der Caspase-Kaskade unterbinden (Deveraux et al., 1997; Deveraux und Reed 1999).

Auch die Freisetzung des *Apoptosis inducing factors* (AIF) trägt zur Apoptose bei. AIF wird ebenfalls nach einem apoptotischen Signal aus den Mitochondrien freigesetzt und transloziert daraufhin in den Kern. Dort wird AIF eine entscheidende Rolle bei der von den Caspasen unabhängigen Degradation von zellulären Komponenten zugeschrieben (Green und Reed 1998; Cande et al., 2002). Das Protein AIF bewirkt die Kondensation von Chromatin und die Degradation von DNA in 50 kb Fragmente, nicht jedoch in nukleosomale Fragmente (Susin et al., 1999). Eine ähnliche Funktion wird auch der, ebenfalls aus den Mitochondrien freigesetzten und in den Kern translozierenden Nuklease, Endonuklease G, zugeschrieben (Li et al., 2001 Nature).

Kürzlich erschienene Studien haben gezeigt, dass neben den hier beschriebenen apoptotischen Signalwegen noch weitere existieren. Besonders zu nennen wäre dabei ein Signalweg, der über eine Antwort auf ER-Stress zum Zelltod führt und insbesondere im neuronalen Zelltod z.B. bei der Alzheimer und der Parkinson Erkrankung auftritt (Nakagawa et al., 2000; Imaizumi et al., 2001). Einige Mitglieder der Bcl-2 Familie sind an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert und regulieren dort die Membran-

permeabilität und damit den Ca^{2+} -Ausstrom aus dem ER, was als ein Schlüsselereignis in der Apoptoseinduktion über das ER beschrieben wird. Der Calcium-Ausstrom aktiviert die am ER lokalisierte Protease Calpain, die ihrerseits als Antwort auf den ER Stress, neben einer Reihe pro-apoptotischen Faktoren, Caspase-12 und -4, die ebenfalls am ER lokalisiert sind, spalten und aktivieren (Nakagawa und Yuan, 2000; Hitomi et al., 2004)). In Folge dessen wird die nachfolgende Caspase-Kaskade angeschaltet und der Zelltod eingeleitet.

1.1.1.4 Zytoskelett und Apoptose

Das Aktin-Zytoskelett spielt eine große und bedeutende Rolle bei der Vermittlung zellulärer Antworten auf interne oder externe Signale. Die Reorganisation des Aktin-Zytoskelett als erste Reaktion auf Stress- und apoptotische Reize ist ein fundamentaler Prozess in vielen eukaryotischen Zellen. Filopodien und Lamelliopodien werden daraufhin zurückgezogen, Stressfasern depolymerisieren und die Zelle verliert infolgedessen ihre Anheftung an ihre Matrix (Mills et al. 1999; Huot et al., 1998). Eine Zelle mit gestörter Aktin-Dynamik ist nicht in der Lage, adäquat auf Stresssignale zu antworten. Für einen Organismus scheint es daher sinnvoll, solche Zellen zu eliminieren. Dies erfordert die Kopplung der Aktin-Dynamik mit intrazellulären Signalwegen, die am Überleben und am Tod der Zellen beteiligt sind, so dass die Aktin-Dynamik sowohl die Signalwege kontrolliert als auch selbst über diese reguliert werden kann. Einige deutliche Hinweise auf das Vorhandensein solcher Signalwege stammen aus Versuchen mit Substanzen, die die Aktin-Dynamik in Säugerzellen beeinflussen. So führt z.B. die Stabilisierung von Aktinfilamenten durch das Gift Jasplakinolide des Schwammes *Jaspis johnstoni* zur Induktion der Apoptose (Posey und Bierer, 1999; Odaka et al., 2000; White et al., 2001). Weiterhin kann die Inhibition der Aktin-Polymerisation und die daraus resultierende Destabilisierung der Aktinfilamente durch geringe Dosen des antibiotischen Pilzmetaboliten Cytochalasin D die Apoptose verhindern (Cotter et al., 1992; Suarez-Huerta et al., 2000; Ailenberg und Silverman, 2003). Diese Ergebnisse lassen eine aktive Beteiligung des Aktinfilament-Systems an apoptotischen Signalwegen vermuten, jedoch sind die genauen Mechanismen und Wirkungsweisen weitgehend unklar und die Datenlage z.T. kontrovers. Die irreversible Schädigung des Aktin-Zytoskeletts durch höhere Dosen von Cytochalasin D kann z.B. auch die Apoptose einleiten (Rubtsova et al., 1998; Yamazaki et al., 2000). Ebenso konnte gezeigt werden, dass durch die Depolymerisation der Aktinfilamente durch Cytochalasin D Behandlung die Aktivierung des Todesrezeptors Fas eingeleitet werden kann (Kulms et al., 2002). Andererseits wurde berichtet, dass die Fas-vermittelte Apoptose durch die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts inhibiert werden kann (Bando et al., 2002).

Einer der bekanntesten physiologischen Regulatoren des Aktinfilament-Systems, der zugleich auch eine Rolle bei der Auslösung der Apoptose spielt, ist das Protein Gelsolin. Dieses Protein hat eine Funktion bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts als Antwort auf Veränderungen in der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und in der Beweglichkeit der Zelle (Kwiatkowski, 1999). Die Überexpression von Gelsolin kann z.B. die Apoptoseinduktion nach einem apoptotischen Stimulus inhibieren, indem es den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und die Aktivierung der entsprechenden Caspasen verhindert (Ohtsu et al., 1997; Koya et al., 2000). Weitere Studien lassen darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen der Aktin-depolymerisierenden Wirkung des Gelsolin und seiner anti-apoptotischen Wirkung vermuten. Laut dieser Studien ist die Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts eine Schlüsselfunktion des Gelsolin in der Apoptoseinhibition (Harms et al., 2004).

Der über das Protein Bmf (*Bcl-2 modifying factor*) vermittelte Signalweg gehört zu den wenigen bisher aufgeklärten apoptotischen Mechanismen, die nachweislich eine aktive Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts erfordern. Bmf gehört zu der Bcl-2 Familie und ist ein BH-3-only Protein, das an die leichte Kette des Dynein-II, einem Bestandteil des Myosin V Motorkomplexes des Aktinfilament-Systems, bindet. Durch Veränderungen des Zytoskeletts, wie Ablösung der Zelle von ihrem Substrat oder die Destabilisierung der Aktinfilamente, wird Bmf aus seiner Zytoskelett-Assoziation freigesetzt und interagiert mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2. Durch diese Interaktion wird die anti-apoptotische Funktion des Bcl-2 Proteins neutralisiert und der Zelltod wird über den Mitochondrien-vermittelten Signalweg eingeleitet (Puthalakath et al., 2001).

Ebenso wurde eine Verbindung zwischen dem Ras/cAMP-vermittelten Signalweg und dem Aktin-Zytoskelett beschrieben, die das Überleben von Hefezellen reguliert. Dabei können Zellen mit reduzierter Aktin-Dynamik keine Signale an den Ras-Signaltransduktionsweg zurücksenden und werden daraufhin durch Apoptose aus der Hefe-Population eliminiert (Ho und Bretscher, 2001; Gourlay und Ayscough, 2005). In diesem beschriebenen Fall kann die Aktin-Dynamik als eine Art Biosensor für das Wohlergehen der Zelle betrachtet werden, der letztendlich über Leben und Sterben der Zelle mitentscheidet.

1.2 Das pro-apoptotische Protein Par-4

Das *par-4* (*prostate apoptosis response-4*)-Gen wurde ursprünglich auf der Suche nach Genen identifiziert, die nach der Apoptoseinduktion mit Ionomycin in Androgen-unabhängigen Prostatakarzinomzellen hochreguliert werden (Sells et al., 1994). Par-4 ist evolutionär hoch konserviert und wird ubiquitär in den Geweben des Ektoderms, Mesoderms und Endoderms

exprimiert. Bald nach der Isolierung des *par-4*-Gens aus *rattus norvegicus* wurde auch das humane Par-4 als ein Interaktionspartner des Wilms Tumor protein 1 (WT1) (Johnstone et al., 1996) und der atypischen Proteinkinase C ζ (Diaz-Meco et al., 1996) isoliert. Das Ratten Par-4 Protein weist eine hohe AS-Sequenzidentität zu dem Maus (93%) und humanen Ortholog (75%) auf. Insbesondere in den putativ funktionellen Bereichen des Par-4 Proteins weisen die Orthologe aus Mensch, Maus und Ratte eine Sequenzidentität von 100% auf (El-Guendy und Rangnekar, 2003).

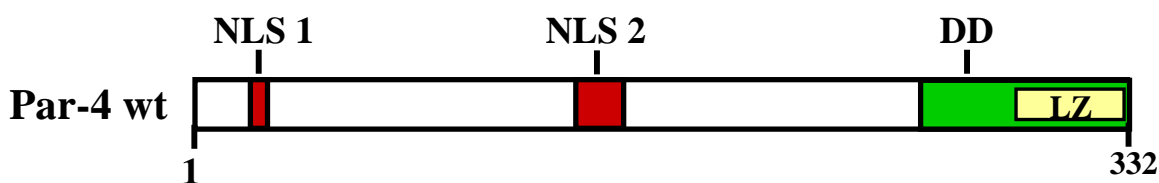


Abb. 3: Schematische Darstellung des Par-4 Proteins. Par-4 wt besteht aus 332 Aminosäuren. Im N-terminalen Teil des Par-4 befinden sich zwei Kernlokalisationssequenzen (**NLS1** und **NLS2**) die sich über die Aminosäuren 20-25 und 137-153 erstrecken. Im C-Terminus von Par-4 befindet sich eine Todesdomäne (**DD**), die die Aminosäuren 258-332 überspannt und die mit einem Leucin-Zipper (**LZ**, AS 292-332) überlappt.

Das Par-4 Protein der Ratte besteht aus 332 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von 38 kDa. In der N-terminalen Hälfte des Proteins befinden sich zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS1 und NLS2), die sich über die Aminosäuren 20-25 und 137-153 erstrecken. Trotz dieser beiden NLS-Motive weist das Par-4 Protein in den meisten normalen Zelllinien und Geweben eine zytoplasmatische Lokalisation und z.T. eine Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett auf (Boghaert et al., 1997; Sells et al., 1997; Guo et al., 1998; Vetterkind et al., 2005a). Nur in einigen Prostatazellen, Prostata-Karzinom Zellen und einigen weiteren Krebszellen ist das Protein sowohl im Kern als auch im Zytoplasma zu finden (Boghaert et al., 1997; El Guendy und Rangnekar, 2003). Die NLS2 scheint dabei für die Kernlokalisation von Par-4 essentiell zu sein (El-Guendy and Rangnekar, 2003). Am C-Terminus des Proteins befindet sich eine potentielle Todesdomäne, wie sie auch in anderen pro-apoptotischen Proteinen wie Fas oder FADD zu finden ist (Feinstein et al., 1995; Rangnekar, 1998). Innerhalb dieser Domäne besitzt das Par-4 Protein ferner ein Leucin-Zipper Motiv, das Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann und die Aminosäuren 292-332 überspannt (vgl. Abb. 3). Es wurde bisher gezeigt, dass der C-Terminus von Par-4 mit den überlappenden, sich jedoch strukturell gegenseitig ausschließenden, Domänen die Interaktionen mit allen bisher bekannten Interaktionspartnern vermittelt (Johnstone et al., 1996; Diaz-Meco et al., 1996; Page et al., 1999; Roussigne et al., 2003; Guo und Xie, 2004; Xie and Guo, 2004; Goswami et

al., 2005; Park et al., 2005; Gao et al., 2006). Welche der beiden Strukturen tatsächlich unter physiologischen Bedingungen funktionell ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

Eine eingehende Sequenzanalyse im Hinblick auf mögliche posttranslationale Modifikationsstellen im Par-4 Protein identifizierte eine Reihe von putativen Konsensussequenzen für N-Glykosylierungsstellen, N-Myristoylierungsstellen, Phosphorylierungsstellen für die Caseinkinase II, PKC, PKA sowie potentielle Sumoylierungsstellen. Das Auftreten dieser Vielzahl von Modifikations- und Interaktions-Motiven weist darauf hin, dass die Funktion des Par-4 Proteins möglicherweise stark durch posttranslationale Modifikationen, Lokalisation oder Bindung mit physiologisch bedeutsamen Interaktionspartnern reguliert werden könnte.

Die Vermutung, dass Par-4 an der Regulation der Apoptose beteiligt ist, konnte in einer großen Anzahl von Studien bestätigt werden. Generell zeigte sich, dass die Ausschaltung der Par-4 Expression, z.B. in Tumoren oder auch experimentell, durch die Antisense-Technik, zu einer erhöhten Apoptoseresistenz führt (Guo et al., 1998). Verschiedene Studien haben des weiteren gezeigt, dass die Par-4 Expression in einer Reihe von Tumoren herunterreguliert ist, wie z.B. im Nierenzellkarzinom (Cook et al., 1999), Melanom (Lucas et al., 2001), Prostatakarzinom (Chakraborty et al., 2001) und auch in verschiedenen Zelllinien die aus primären Tumoren des ZNS gewonnen wurden (Vetterkind et al., 2005b). Übereinstimmend mit diesen Befunden zeigte sich, dass eine verminderte Expression von Par-4 für die Ras-induzierte Transformation essentiell ist und dass Par-4 als ein wichtiger Inhibitor der zellulären Transformation anzusehen ist (Barradas et al., 1999; Qiu et al., 1999b). Eine Überexpression von Par-4 hingegen ist in den meisten Tumorzellen ausreichend, um die Apoptose einzuleiten (Nalca et al., 1999; Chakraborty et al., 2001; Lucas et al., 2001; El-Guendy und Rangnekar, 2003; Vetterkind et al., 2005b). Andererseits kann Par-4 in nicht transformierten, normalen Zellen keine Apoptose induzieren, sensibilisiert diese jedoch für apoptotische Stimuli wie z.B. Wachstumsfaktorentzug, TNF- α Behandlung, UV- oder γ -Strahlung oder Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Sells et al., 1997; Mattson et al., 1999; Boehrer et al., 2001; Cook et al., 1999; Diaz-Meco et al., 1996.).

Die Deletion des Par-4 Leucin-Zippers führt zum Verlust der pro-apoptotischen Funktion von Par-4. Der Leucin-Zipper wurde daher zunächst als diejenige Domäne charakterisiert, die für die Apoptose-sensibilisierende Wirkung von Par-4 essentiell ist (Sells et al., 1994). Neuere Studien konnten die Apoptose-auslösende Domäne des Par-4 Proteins jedoch auf eine kleine Region zwischen den Aminosäuren 137-195 eingrenzen. Die Expression dieser 59 Aminosäuren des Ratten Par-4 Protein löst in Tumorzellen sehr effektiv Apoptose aus, nicht

jedoch in normalen Zellen. Daher wurde diese Domäne als „SAC-Domäne“ (*selective for apoptosis induction in cancer cells*) bezeichnet (El-Guendy et al., 2003). Verantwortlich für die selektive Wirkungsweise der SAC Domäne in Krebszellen scheint ihre Phosphorylierung an der Aminosäure Threonin 155 zu sein, die möglicherweise durch die PKA vermittelt wird. Die PKA Aktivität ist in Tumorzellen deutlich gesteigert und könnte somit für die Phosphorylierung des Par-4 Proteins innerhalb der SAC-Domäne und daher für die erhöhte apoptotische Aktivität verantwortlich sein (Tortora und Ciardiello, 2002; Gurumurthy et al., 2005).

Bisher wurde deutlich, dass Par-4 an einer Vielzahl von apoptotischen Prozessen und ihrer Regulation beteiligt ist, doch die genauen Mechanismen der Par-4-vermittelten Apoptose sind bis dato ungeklärt. Die aktuelle Datenlage spricht jedoch dafür, dass Par-4 auf zwei Ebenen der Apoptoseregulation agiert: der Inhibition von Überlebenssignalen und der Aktivierung von zellulären Komponenten des Zelltodes. Eine bedeutende inhibitorische Wirkung auf proliferationsfördernde Signale übt Par-4 durch die Wechselwirkung mit seinem Interaktionspartner WT1 aus (*Wilms` tumor protein 1*) (Johnstone et al., 1996). Das Protein WT1 spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung des Wilms Tumors, einer embryonalen malignen Nierenerkrankung. WT1 ist ein Transkriptionsfaktor, der je nach Spleißform und zellulärem Kontext sowohl als Aktivator als auch als Repressor für die Gene verschiedener Wachstumsfaktoren fungieren kann. Eines der durch WT1 aktivierten Zielgene ist das anti-apoptotische *bcl-2*-Gen. Die transkriptionelle Aktivierung von Bcl-2 durch WT1 wird jedoch durch die Bindung mit Par-4 inhibiert, da Par-4 zusammen mit WT1 an den Promotor des *bcl-2*-Gens bindet, die Transkription inhibiert und dadurch die Apoptose ausgelöst wird (Qiu et al., 1999a; Richard et al., 2001).

Der am besten untersuchte Mechanismus, über den Par-4 zur Induktion der Apoptose führt, verläuft über die Inhibition der atypischen Proteinkinase C zeta (PKC ζ) (Diaz-Meco et al., 1996; Moscat und Diaz-Meco, 2003). Die atypischen Proteinkinasen C sind essentielle Aktivatoren des anti-apoptotischen Transkriptionsfaktors NF- κ B, der eine regulative Rolle in der Apoptose und Zellproliferation spielt (Berra et al., 1997; Perkins, 2000). Die aktivierte PKC ζ phosphoryliert dabei die I κ B-Kinase β (IKK β), die wiederum den Inhibitor von NF- κ B (I κ B) phosphoryliert und somit das Protein für die proteasomale Degradation markiert. NF- κ B kann daraufhin in den Zellkern translozieren und dort seine Zielgene aktivieren, darunter die anti-apoptotischen Caspase-Inhibitoren IAPs, die *Bcl-2-like factors* und die *TNF-receptor-associated factors* (TRAF1, TRAF2) (Barkett und Gilmore, 1999). Durch die Interaktion mit der PKC ζ und der damit einhergehenden Hemmung der Kinase ist Par-4 in der Lage, den NF-

κ B-Signalweg zu inhibieren und die Zellen für die Apoptose zu sensibilisieren C. Der inhibitorische Effekt von Par-4 auf die PKC ζ kann durch die zusätzliche Bindung des Proteins p62 und der Bildung eines ternären Komplexes aufgehoben werden, wodurch die Aktivität der PKC ζ reaktiviert und die Zellproliferation gefördert wird (Chang et al., 2002).

Es scheint, dass die meisten Zellen durch die wachstums- und proliferationshemmende Wirkung von Par-4 lediglich sensibler für apoptotische Signale werden. In Androgen-unabhängigen Krebszellen hingegen führt die Überexpression von Par-4 direkt zu einer Apoptoseinduktion. Dieser Effekt ist nicht nur auf die Inhibition des NF- κ B-Signalweges durch Par-4 zurückzuführen, sondern zusätzlich auf die Par-4-induzierte Translokation von Fas und FasL an die Zytoplasmamembran (Chakraborty et al., 2001). Durch die Translokation von Fas und FasL wird der Rezeptor-vermittelte apoptotische Signalweg angeschaltet und Par-4 kann somit auch als ein Aktivator des extrinsischen apoptotischen Signalweges betrachtet werden. Ebenso trägt Par-4 zur Ausbildung des DISC bei, da neueren Studien zufolge sowohl Par-4 als auch die PKC ζ direkt an den DISC gebunden sein können (Leroy et al., 2005).

1.3 Die DAP-like kinase (Dlk)

Ein bekannter Interaktionspartner des Par-4 Proteins ist die Serin/Threonin Kinase *DAP-like kinase* (Dlk) aus der Ratte, die Ihren Namen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur DAP-Kinase (*death-associated protein kinase*) erhalten hat (Kawai et al., 1998; Kögel et al., 1998). Die Ca²⁺/Calmodulin regulierte DAP-Kinase spielt eine Rolle beim Interferon γ - und TNF α -induzierten Zelltod und ist im Zytoplasma am Aktin-Zytoskelett lokalisiert (Cohen et al., 1997). Die Dlk und die DAP-Kinase bilden zusammen mit drei weiteren Mitgliedern (DRP-1/DAPK2, DRAK1 und DRAK2) die DAP-Kinasefamilie, deren Mitglieder sich durch eine hohe Sequenzidentität in ihrer Kinasedomäne auszeichnen und alle mit der Regulation der Apoptose in Verbindung gebracht werden (Cohen und Kimchi, 2001; Shohat et al., 2002). Die Mitglieder der DAP-Kinasefamilie werden ubiquitär exprimiert und sind alleine oder durch Interaktion mit anderen Proteinen in der Lage, Apoptose auszulösen (Kögel et al., 2001). Im Gegensatz zu der DAP-Kinase besitzen die Dlk aus der Ratte und ihr humanes Ortholog, die ZIP-Kinase (*Zipper interacting protein kinase*), keine Todesdomäne, sondern weisen am C-Terminus ein Leucin-Zipper Motiv auf, das eine Homo- wie auch eine Heterodimerisierung vermitteln kann. Zu den bekannten Dlk-Interaktionspartnern, die über den Leucin-Zipper der Kinase interagieren, gehören AATF (*Apoptosis antagonizing transcription factor*) und CDC5 (*cell division control protein 5*) (Page et al., 1999, Engemann et al., 2002). Für die ZIP-

Kinase wurde eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor ATF4 (*activating transcription factor 4*) beschrieben, die über den Leucin-Zipper der ZIP-Kinase vermittelt wird (Kawai et al., 1998). Die Dlk besitzt eine molekulare Masse von 52 kDa und weist somit eine deutlich geringere molekulare Masse als die DAP-Kinase (160 kDa) auf. Die DAP-Kinase beinhaltet in ihrem N-terminus eine Ca^{2+} /Calmodulin Bindedomäne über die Ca^{2+} /Calmodulin an das Protein binden und auf diese Weise die Aktivität der Kinase regulieren kann. Die Dlk besitzt im Gegensatz dazu keine Ca^{2+} /Calmodulin Bindedomäne und ihre Aktivität wird durch Ca^{2+} /Calmodulin nicht beeinflusst. In der Zelle ist die Dlk vorwiegend nukleär lokalisiert und ist im Zellkern mit punktförmigen Strukturen, den sogenannten „Speckeln“, assoziiert. Anhand von Immunfluoreszenzanalysen konnte eine partielle Kollokalisierung mit den *Promyelocytic Leukemia nuclear Bodies* (PML-NBs) gezeigt werden (Kögel et al., 1998). Die PML-NBs sind subnukleäre Multiproteinkomplexe, die vorwiegend aus dem PML Protein und darüber hinaus aus einer Vielzahl verschiedener Proteine bestehen. Ihnen wird eine Rolle in der Transkriptionsregulation, Tumorsuppression, Wachstumskontrolle, zellulären Seneszenz und der Apoptose zugeschrieben (Salomoni und Pandolfi, 2002). Interessanterweise wurde auch für das Par-4 Protein in primären humanen Fibroblasten und Endothelzellen eine Lokalisation in den PML-NBs nachgewiesen (Roussigne et al., 2003), in denen Par-4 mit der ZIP-Kinase interagiert und deren Interaktion mit dem pro-apoptotischen Protein Daxx (*Fas death domain-associated protein*) vermittelt. Die Bildung dieses ternären Komplexes führt dann zu einer verstärkten Apoptoseinduktion nach $\text{IFN-}\gamma$ oder As_2O_3 (Arsentrioxid) Behandlung (Kawai et al., 2003).

Sowohl die Dlk als auch die ZIP-Kinase besitzen eine starke autokatalytische Aktivität. Für die ZIP-Kinase konnte kürzlich gezeigt werden, dass durch Autophosphorylierung der Aminosäuren S180, T225 und T265 die Aktivität der Kinase und durch die Phosphorylierung der Aminosäure T299 die Lokalisation der Kinase reguliert werden kann (Graves et al., 2005). Darüber hinaus kann die Dlk aber auch eine Vielzahl von Substraten phosphorylieren; darunter die leichte Kette des Myosin II (*myosin light chain*, MLC), die von allen Mitgliedern der DAP-Kinasefamilie zumindest *in vitro* phosphoryliert wird (Komatsu und Ikebe, 2004) und deren Phosphorylierung mit dem apoptotischen „membrane blebbing“ in Verbindung gebracht wird (Mills et al., 1998). Ferner zählen das Histon H3 (Kögel et al., 1998; Preuss et al., 2003a) und das Par-4 Protein (Page et al., 1999) zu den Substraten der Dlk. Für die Proteine MYPT-1 (*myosin phosphatase targeting protein-1*) (McDonald et al., 2001), Mdm2 und p21^{waf1} (Burch et al., 2004) konnte des weiteren gezeigt werden, dass sie ein Substrat für die ZIP-Kinase darstellen.

Neuere Befunde deuten darüber hinaus auch auf eine essentielle Rolle der Dlk in der Mitose, speziell in der Zytokinese, hin. Während der Mitose ist die Dlk mit den Centrosomen, den Centromeren und dem kontraktilen Aktomyosinring assoziiert (Preuss et al., 2003b). Die Dlk vermittelt eine neuartige Phosphorylierung des H3 Proteins, die sowohl auf die Mitose als auch auf das Centromer-assoziierte H3 Protein beschränkt ist. Diese Phosphorylierung korreliert exakt mit der Assoziation der Dlk an den Centromeren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Dlk am kontraktilen Ring mit der leichten Kette des Myosin II kolokalisiert, wenn MLC an der Aminosäure Serin 19 phosphoryliert ist. Diese Korrelationen lassen eine Rolle der Dlk beim Kinetochorassembly und/oder bei der Zytokinese, möglicherweise bei der Koordination von Karyo- und Zytokinese vermuten (Preuss et al., 2003b).

1.4 Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose

Die Proteinkinase Dlk ist nach Überexpression in Ratten-Fibroblasten im Zellkern lokalisiert, wohingegen das Par-4 Protein mit zytoplasmatischen Aktinfilamenten assoziiert ist. Während die alleinige Überexpression von Par-4 bzw. Dlk keine Apoptose auslöst, führt die Koexpression beider Proteine zu einer Relokalisation der Kinase aus dem Zellkern und zu einer Kolokalisation mit Par-4 an den Spannungsfasern der Zelle. Die Koexpression von Par-4 und Dlk ist mit einer dramatischen Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, einer starken Kontraktion der Aktomyosinfilamente und der Induktion der Apoptose verbunden. Für die Einleitung der apoptotischen Prozesse sind sowohl ein intakter Leucin-Zipper von Par-4, die Aktinassoziation des Par-4 Proteins sowie die Kinaseaktivität der Dlk essentiell (Page et al., 1999; Vetterkind et al., 2005). Die Koexpression von Par-4 und Dlk führt darüber hinaus zu einer verstärkten MLC Phosphorylierung an der Aminosäure Serin 19 (Vetterkind et al., 2005a). Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass eine erhöhte MLC-Phosphorylierung sowohl für die Zellmotilität von Fibroblasten (Komatsu und Ikebe, 2004), als auch für die Induktion der Apoptose eine wichtige Rolle spielt (Coleman et al., 2001; Petrache et al., 2003; Kuo et al., 2003). Zusammenfassend läßt sich aus diesen Befunden ein Modell für die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose ableiten (siehe Abb. 4).

Das zytoplasmatische Par-4 Protein bindet über seinen N-Terminus an Aktinfilamente. Dort scheint es die Rekrutierung regulatorischer Proteine, wie z.B. die Dlk an das Aktin-Zytoskelett über einen bisher nicht näher bekannten Mechanismus zu bewirken. Die apoptotische Aktivität der Dlk erfordert die Translokation der Kinase aus dem Kern in das Zytoplasma und ihre Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett, die über die Bindung an den C-

Terminus des Par-4 Proteins erreicht wird. Nach ihrer Rekrutierung an die Aktinfilamente ist die Dlk in der Lage, ihr Substrat MLC zu phosphorylieren, was zu einer Kontraktion des Aktomyosin-Systems und zur Induktion apoptotischer Prozesse führt (Vetterkind et al., 2005a). Inwieweit es sich bei diesem Modell um einen allgemeingültigen Mechanismus der Par-4-vermittelten Apoptose handelt, oder ob dieser Weg der Apoptoseinduktion auf die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose beschränkt ist, sollte in der vorliegenden Doktorarbeit näher untersucht werden.

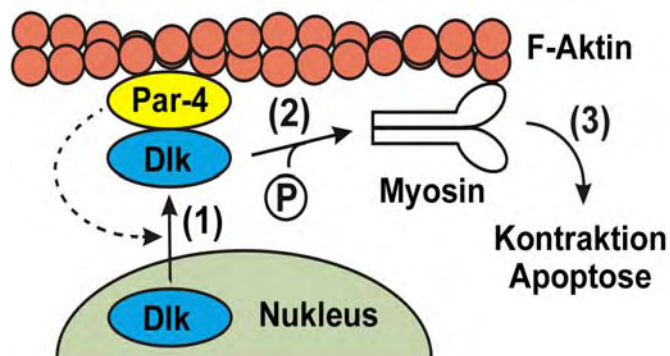


Abb. 4: Modell der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose. Par-4 kann über seinen N-Terminus an das Aktin-Zytoskelett binden. Nach der Bindung an das Mikrofilamentsystem bewirkt das Par-4 Protein die Rekrutierung der kernständigen Dlk und möglicherweise anderer regulatorischer Proteine an die Aktinfilamente. Die apoptotische Aktivität der Kinase erfordert deren Translokation aus dem Kern in das Zytoplasma und die Assoziation an das Aktin-Zytoskelett. Diese Assoziation wird über die Bindung der Dlk an den C-Terminus des Par-4 Proteins erreicht (1). Nach der Rekrutierung an das Aktin-Zytoskelett kann die Dlk ihr Substrat MLC phosphorylieren (2), was zu einer starken Kontraktion des Aktomyosin-Systems und nachfolgend zur Induktion der Apoptose führt (3). Die Mechanismen, über die das Par-4 Protein die Translokation der Kinase aus dem Kern bewirkt, sind bisher unbekannt (dargestellt durch den gestrichelten Pfeil in Schritt 1) (entnommen aus und modifiziert nach Vetterkind et al., 2005a).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil sollte nach neuen Par-4 Interaktionspartnern gesucht werden, die möglicherweise in die bis dato weitgehend unbekanntenen Mechanismen der Par-4/Dlk-induzierten Apoptose involviert sind. Die methodische Basis bildete das Hefe-Zwei-Hybrid-System, mit dem Protein-Protein Interaktionen analysiert werden können. Der im Rahmen dieser Untersuchung isolierte neue Interaktionspartner des Par-4 Proteins, der als das pro-apoptische Protein Amida identifiziert wurde, sollte eingehender charakterisiert werden und die Interaktion mit dem Par-4 Protein *in vitro* und *in vivo* verifiziert werden.

Mit Hilfe von *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass das Par-4 Protein ein Substrat der Dlk darstellt. Darüber hinaus erwies sich auch das Amida Protein im Laufe dieser Arbeit als ein potentielles Dlk Substrat. Welchen Einfluss die Phosphorylierung auf die Par-4/Dlk- und die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose ausübt, war jedoch bisher unbekannt und sollte im zweiten Teil dieser Doktorarbeit näher untersucht werden. Durch die Herstellung und eingehende Charakterisierung verschiedener Par-4 bzw. Amida Phosphorylierungsmutanten, sollten die potentiellen Dlk Phosphorylierungsstellen identifiziert werden und die Bedeutung der Phosphorylierung für die Par-4/Dlk- und die Par-4/Amida-induzierte Apoptose analysiert werden.

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen AppliChem, Biomol, Biozym, Roth, Fluka, Gibco, Invitrogen, La Roche, Merck, Serva und Sigma bezogen. Radionukleotide wie [³⁵S]-Methionin, [α -³²P]dCTP oder [³²P] γ -ATP stammten von Amersham Biosciences.

Enzyme wurden von den Firmen La Roche, NEB, Promega, Peqlab und Qiagen bezogen.

Zellkulturmedien stammten von der Firma Sigma, Plastikmaterial von Falcon und Sarstedt, Blotmembranen von der Firma Machery und Nagel und Amersham Buchler. Die Kinasen und ihre Inhibitoren wurden von Calbiochem und Promega bezogen.

2.2 Allgemeine Puffer und Stammlösungen

Alle Lösungen wurde mit H₂O_{bidest} angesetzt und wenn nötig autoklaviert.

<u>PBS⁺ (pH 7,2):</u>	Na ₂ HPO ₄	0,2 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
	NaCl	8 g/l
	KCl	0,2 g/l
	CaCl ₂	0,1 g/l
	MgCl ₂	0,1 g/l
	<u>PBS⁻:</u>	PBS ⁺ ohne CaCl ₂ und MgCl ₂
<u>TBE-Puffer (10x):</u>	Tris	1 M
	Borat	0,83 M
	EDTA	10 mM
<u>TE:</u>	Tris-HCl	10 mM
	EDTA pH 8	1 mM
<u>SSC (20x):</u>	NaCl	3 M
	Trinatriumcitrat	0,3 M
	EDTA	60 mM
	SDS	6 % (w/v)

<u>DNA-Ladepuffer (6x):</u>	Xylenblau	0,25 % (w/v)
	Glycerin	30 % (w/v)
	EDTA	105 mM
	NaAcetat	0,1 M
	Tris-Eisessig pH 7,9	0,2 M
<u>Elektrophoresepuffer SDS-PAGE (10x):</u>	Tris	0,25 M
	Glycin	1,92 M
	SDS	1 % (w/v)
<u>TAE-Puffer (50x):</u>	Tris-Eisessig pH 7,9	2 M
	NaAcetat	1 M
	EDTA	50 mM

2.3 Kits

QIAquick Gel Extraktion Kit	Gelextraktion von DNA	(Qiagen)
TNT [®] T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	<i>in vitro</i> Transkription/Translation	(Promega)
JETSTAR Plasmid Purification Kit	Isolierung von Plasmid DNA	(Genomed)
Megaprime [™] DNA Labelling systems	Markierung von DNA-Sonden	(Amersham Pharmacia)
SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate	ECL-Reaktion von Western Blots	(Pierce)

2.4 Kultur von Bakterien

2.4.1 Medien für die Kultur von Bakterien

Die Medien wurden autoklaviert und gegebenenfalls vor Gebrauch mit dem entsprechenden Antibiotikum komplementiert.

<u>LB-Medium:</u>	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1 l
	evtl. Agar	15 g/l

<u>dYT-Medium pH 7,0:</u>	Trypton	16 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1 l
<u>YB-Medium:</u>	KCL	10 mM
	MgSO ₄	20 mM
	in dYT-Medium	
<u>Ampicillin:</u>	Endkonzentration	100 µM
<u>Kanamycin:</u>	Endkonzentration	20 µM

2.4.2 Bakterienstämme

Es handelt sich bei den verwendeten Klonierungsstämmen um *Escherichia coli* K-12 Derivate. Die Expressionsstämmen sind proteasedefiziente B-Stamm Derivate ($\Delta lon/ompT$).

DH5α	F ⁻ , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁻), <i>supE44</i> , $\Phi 80d$, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>thi1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\Delta lacU169$	(Hannahan, 1983)
XL1-Blue	(<i>mcrA</i>)183, Δ (<i>mcrCB</i> ⁻ <i>hsdSMR</i> ⁻ <i>mrr</i>)173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> (F ⁻) <i>proABlaq1q</i> Z Δ M15Tn10 (Tet ^f)C	(Stratagene)
TOP 10	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsd</i> RMS- <i>mcrBC</i>) $\Phi 80d$, <i>lacZ</i> Δ M15, $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> <i>nupG</i>	(Invitrogen)
BL21 (DE3)pLysS	F ⁻ , <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	(Novagen)

2.5 Kultur von Säugerzellen

2.5.1 Medien für die Kultur von Säugerzellen

Die verwendeten Medien wurden von Sigma und PAA bezogen, das FCS von Seromed, Invitrogen und Biochrom. Die Medien enthielten, sofern nicht anders angegeben, 1% Glutamin und 1% Pen/Strep-Lösung sowie 5-10% hitzeinaktiviertes FCS (56°C, 30 min).

DMEM: „Dulbeccos Modified Eagle“ Medium mit 1000 mg/L bzw. 4500 mg/L Glukose
Ham's F12: *Nutrient Mixture F12* für die Kultivierung von Hamsterzellen

RPMI: „Roswell Park Memorial Institute“ Medium

Pen/Strep-Lösung pH 8,2: Penicillin 0,6 %
Streptomycin 1 %
in PBS⁺

Trypsin-Lösung pH7,8: NaCl 136,5 mM
KCl 5,4 mM
Glucose 5,5 mM
EDTA 0,7 mM
Trypsin 0,4 %

2.5.2 Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<i>Histologische Herkunft</i>	<i>Transformationsstatus</i>	<i>Spezies</i>
REF52.2	embryonale Fibroblasten	immortal	Ratte
NIH-3T3	„swiss mouse embryo“ Fibroblasten	immortal	Maus
E14-2	fötale Gehirnzellen	SV-40 immortalisiert	Ratte
MCF-7	Brust Adenokarzinomzelllinie	transformiert	Mensch
CHO	„chinese Hamster Ovary“	immortal	Hamster
HeLa	cervikale Adenokarzinomzelllinie	transformiert	Mensch
C2C12	prämyoblastische Vorläuferzellen	immortal	Maus

2.6 Kultur von Hefen

2.6.1 Medien für die Kultur von Hefen

YPD (Vollmedium): Pepton (Difco) 20 g
Hefeextrakt (Difco) 10 g
Glukose 2 % (v/v)
H₂O_{bidest} ad 1 l

SD-Agar: Agar 18 g/l
3-Amino Triazol 30-50 mM
SD-Medium ad 1 l

<u>SD-Medium:</u>	YNB ohne AS und (NH ₄) ₂ SO ₄	1,7 g/l
	Ammoniumsulfat	5 g/l
	AS-Mix	1 x
	Glukose	2 %
<u>AS-Mix (10x):</u>	L-Isoleucin	300 mg/l
	L-Valin	1500 mg/l
	L-Adenin	200 mg/l
	L-Arginin	200 mg/l
	L-Histidin	200 mg/l
	L-Leucin	1000 mg/l
	L-Lysin	300 mg/l
	L-Methionin	200 mg/l
	L-Phenylalanin	500 mg/l
	L-Threonin	2000 mg/l
	L-Tryptophan	200 mg/l
	L-Tyrosin	300 mg/l
	L-Uracil	200 mg/l
	L-Glutamat	1000 mg/l
	L-Aspartat	1000 mg/l
	L-Serin	4000 mg/l

Die Medien wurden autoklaviert und anschließend mit den Aminosäuren, 3-Amino Triazol und Glukose komplementiert. Leucin, Histidin und Tryptophan wurden dabei je nach Bedarf variiert.

2.6.2 Hefestämme

<u>Y190:</u>	MATa, gal4, gal80, his3, trp1-901, ade2-101, ura3-52, leu2-3, 112+URA3::GAL-lacZ, LYS::GAL-(UAS)-HIS3cyhr	(Stratagene)
---------------------	---	--------------

2.7 Plasmide

pEGFP-C1	(Clontech)	eukaryotischer Expressionsvektor mit N-terminalem GFP
pEGFP-N1	(Clontech)	eukaryotischer Expressionsvektor mit C-terminalem GFP
pEYFP-C1	(Clontech)	eukaryotischer Expressionsvektor mit N-terminalem YFP

pECFP-N1	(Clontech)	eukaryotischer Expressionsvektor mit C-terminalem CFP
pCMV-Tag2A,-B, C	(Stratagene)	eukaryotischer Expressionsvektor mit N-terminalem FLAG-Signal
pBD-Gal4	(Stratagene)	Hefe-Expressionsvektor mit N-terminaler GAL-4 DNA-Bindedomäne
pAD-Gal4	(Stratagene)	Hefe-Expressionsvektor mit N-terminaler GAL-4 Aktivierungsdomäne
pGBT9	(Clontech)	Hefe-Expressionsvektor mit N-terminaler GAL-4 DNA-Bindedomäne
pGAD424	(Clontech)	Hefe-Expressionsvektor mit N-terminaler GAL-4 Aktivierungsdomäne
pGEX-6T	(Prof. W. Wille)	prokaryotischer Expressionsvektor mit N-terminalem GST
pAD-Gal4-Par-4	(Page, 1999)	Expression von AD-Par-4 in Hefe
pBD-Gal4-Par-4	(Boosen, 2001)	Expression von BD-Par-4 in Hefe
pBD-Gal4-Dlk	(Page, 1999)	Expression von BD-Dlk in Hefe
pEGFP-N1-Par-4	(Boosen, 2001)	Expression von Par-4-GFP
pCMV-Tag2B-Par-4	(Boosen, 2001)	Expression von FLAG-Par-4
pCMV-Tag2A-Par-4 Δ N41-332	(Vetterkind, 2003)	Expression von FLAG-Par-4 Δ N41-332
pCMV-Tag2B-Par-4 Δ C1-233	(Vetterkind, 2003)	Expression von FLAG-Par-4 Δ C1-233
pCMV-Tag2B-Par-4 Δ C1-266	(Vetterkind, 2003)	Expression von FLAG-Par-4 Δ C1-266
pCMV-Tag2B-Par-4 L3	(Koplin, 2004)	Expression von FLAG-Par-4 L3
pBD-Gal-4-Par-4 L3	(Koplin, 2004)	Expression von BD-Par-4 L3
pEGFP-N1-Par-4 L3	(Koplin, 2004)	Expression von Par-4 L3-GFP
pEGFP-C1-Dlk	(Kögel, 1998)	Expression von GFP-Dlk
pCMV-Tag2B-Dlk	(Boosen, 2001)	Expression von FLAG-Dlk
pCMV-Tag2B-Dlk K42A	(Boosen, 2001)	Expression von FLAG-Dlk K42A
pET23a(+)-Par-4	(Kubicek, 2005)	Expression von Strep-Par-4 in Bakterien
pET23a(+)-Amida	(Kubicek, 2005)	Expression von His-Amida in Bakterien
pSG5-PML	(de Thé, 1991)	Expression von PML
pcDNA3-hnRNP-C2	(Nakielny, 1996)	Expression von FLAG-hnRNP-C2

2.8 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen. Sie wurden in H₂O_{bidest} bis zu einer Endkonzentration von 100 pmol/ μ l gelöst. Nachfolgend sind die Sequenzen aller verwendeter Oligonukleotide unter Angabe ihrer Sequenz und ihrer Position in der Ratten cDNA von Par-4 und Amida aufgelistet.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz (5'-3')</i>	<i>Position</i>
Par-4 775-795forward	CGAACAGATAGAAGTGGCTTC	775-795
Par-4 795-775reverse	GAAGCCACTTCTATCTGTTCG	795-775
5'Par-4-103-123	AGCACCACGGACTTCCTGGAG	103-123
GFP-seq 2	GCCCTGAGCAAAGACCCC	1230-1250
Par-4 AgeI reverse	CCACCGGTCCCCTTGTCAGCTGCCC	1078-1054
5'Par4-mut-S230	GCAGATACAAAGCCACAATCAGTGC	719-743
3'Par4-mut-S230	GCACTGATTGTGGCTTTGTATCTGC	743-719
5'Par4-mut-T164	AAGCGCCGCTCCGCTGGCGTGGTCAAC	523-549
3'Par4-mut-T164A	GTTGACCACGCCAGCGGAGCG	549-529
5'Par4mutS257	GCTTCAGTAGACACAACAGAGATACCGCC GCG	790-822
5'Par4-mut-S154	AAGCGCCGCGCTACCGGCGTG	523-543
3'Par4-mut-S154	CACGCCGGTAGCGCGGCGCTT	543-523
5'Par-4-ST154AA	AAGCGCCGCGCAGCTGGCGTGGTCAAC	523-549
3'Par-4-ST154AA	CACGCCAGCTGCGCGGCG	543-523
3'Par4S96A*	CAATAGGACACTCGTCCTCCGGCCGCCGA GCGCCG	388-354
5'mutPar4S135A	TCGGGGCCCGCTGCCAGGAAAGGCAAAGG	466-494
3'mutPar4S135A	TTTGCCTTTCCTGGCAGCGGGCCCCGAGC	492-464
5'mutPar4T236A	AATAGATATCCCCGAGCCGAT	763-783
5'GFP-Par4-EcoRI	GTGTGGTGGAATTCAGGCG	(-8)-12
3'Par4-Eco-Stop2	TGGAATTCCTACCTTGTCAGCTGCCC	1079-1054
5'Amida-BglII	GAAGATCTGAATTCGGCACGAGG	(-29)-(-7)
3'Amida-BamHI	CGGGATCCTTAGTCAAAGGGTGG	788-766
5'Amida-Eco-299for	CGGAATTCAGACTCCAGCAGGAGC	327-350
3'Amida-BamHI-311rev	CGGGATCCAGTTATCCTTTGCACC	338-315
3'AmidaHindIIIneu	GGGGAAGCTTTTAGTCAAAGGGTGG	790-766
5'AmidaS200A	CCACGAGCAGCAGCCTCATTG	586-606
3'AmidaS200A	CAATGAGGCTGCTGCTCGTGG	606-586
SacAmidaNES-EcoFor	TCCGAGCTCTGGCTCTGCCTCCCTTGTTTG GTGGCCACATCCTAGAATTCGAGC	68-121
Amida(330-315)EcoBam	GCCCTAGGAATTCAGTTATCCTTTGCACC	343-315
5'AmidaL37/41	CATCGCTGAAAGTGAGGCTGAGAC	105-128
3'AmidaL37/41	GTCTCAGCCTCACTTTCAGCGATG	128-105
5'AmidaL26/28/31B	CAGAGGCCGCTGCTCCTCCCGCTTTT	71-96
3'AmidaL26/28/31B	AAAAGCGGGAGGAGCAGCGGCCTCTG	96-71
5'Amida-delta-NES	GGCTCAGGAAGTGAGCTAGAG	67-75/115-126
3'Amida-delta-NES	TAGCTCACTCTCTGAGCCTGG	123-115/75-64

2.9 Antikörper

<i>Erstantikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Quelle</i>	<i>IP</i>	<i>IF</i>	<i>WB</i>
anti-FLAG	Maus (monoklonal)	Stratagene	1 µl/mg	1:8000	1:4000
anti-GFP	Kaninchen (polyklonal)	Clontech	0,3 µl/mg	-/-	-/-
anti-GFP	Maus (monoklonal)	Clontech	-/-	-/-	1:4000
anti-Par-4	Maus (monoklonal)	Santa Cruz	-/-	1:4000	-/-
anti-Par-4	Kaninchen (polyklonal)	Santa Cruz	-/-	1:4000	1:8000
anti-Amida	Kaninchen (polyklonal)	Pineda	1 µl/mg	-/-	-/-
anti-Par-4(P)T155	Kaninchen (polyklonal)	Pineda	1 µl/mg	1:10000	-/-
anti- α -Tubulin	Maus (monoklonal)	Sigma	-/-	-/-	1:10000
anti-Dlk	Kaninchen (polyklonal)	Pineda	10 µl/mg	-/-	-/-
anti-PML	Maus (monoklonal)	(Stuurmann,1992)	-/-	1:50	-/-
anti-SC35	Maus (monoklonal)	BD-Biosciences	-/-	1:100	-/-

<i>Zweitantikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Quelle</i>	<i>IF</i>	<i>WB</i>
anti-Kaninchen Cy3	Ziege	Dianova	1:4000	-/-
anti-Kaninchen FITC	Ziege	Dianova	1:1500	-/-
anti-Kaninchen HRP	Ziege	Nordic	-/-	1:8000
anti-Kaninchen Alexa 488	Ziege	MoBiTec	1:1000	-/-
anti-Maus Cy3	Ziege	Dianova	1:4000	-/-
anti-Maus FITC	Ziege	Dianova	1:400	-/-
anti-Maus HRP	Kaninchen	Nordic	-/-	1:2000

3. METHODEN

3.1 Allgemeine Methoden

3.1.1 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typ II verwendet. Diese Enzyme schneiden ein DNA-Molekül an einer spezifischen, kurzen, palindromischen Erkennungsstelle. Der Restriktionsverdau erfolgte in der Regel mit 0,5–1 U Enzym/µg DNA in einem vom Hersteller gestellten Puffersystem unter den dort empfohlenen Temperaturbedingungen für 0,5 bis 4 h. Für analytische Zwecke wurden 1 µg DNA in einem 10 µl Ansatz verdaut. Für Klonierungen wurde ein präparativer Verdau von 2–10 µg DNA mit 5–20 U Enzym in einem Volumen von 20 µl durchgeführt.

3.1.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um eine Religation der zuvor durch Restriktionsendonukleasen gespaltenen Vektor-DNA zu vermeiden, sollten Phosphatreste am 5'-Ende der linearisierten DNA dephosphoryliert werden. Dies erfolgte nach der Restriktion im gleichen Ansatz unter Zugabe von 0,1 U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestinal phosphatase*, CIP) pro 2 pmol 5'-Enden und entsprechendem Volumen 10 x CIP-Puffer. Der Ansatz wurde für 1h bei 37°C inkubiert. Da die Phosphatase für ihre Aktivität Zn^{2+} Ionen benötigt, läßt sich die Reaktion durch Komplexierung dieser Ionen mit 25 mM EGTA abstoppen. Zusätzlich erfolgte eine Hitzeinaktivierung für 15 min bei 75°C

<u>CIP-Puffer (10x):</u>	ZnCl ₂	10 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Tris-HCl pH 8,3	100 mM

3.1.3 Ligation

Bei der Ligation werden endständige 3'-Hydroxylgruppen mit endständigen 5'-Phosphatgruppen kovalent, unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verbunden. Diese Reaktion erfolgte durch die T4-DNA-Ligase in einem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem. Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 10 µl sollte einen DNA-Gehalt

von max. 100 ng aufweisen. Die Vektor-DNA und das zu inserierende DNA Fragment wurden dabei in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Der Ansatz wurde zunächst 5 min bei 37°C und anschließend 1-2 h bei RT oder ÜN bei 16°C inkubiert und wurde anschließend in kompetente Bakterien transformiert (3.1.12).

3.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von negativ geladenen DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Der Agarosegehalt und der damit verbundene Vernetzungsgrad bestimmen hierbei den Trennbereich. Es wurden Gele mit einem Agarosegehalt von 0,7-2% (w/v) in TAE-Puffer verwendet. Als Größenstandards wurden 100 bp und 1 kb-Marker der Firma Peqlab verwendet. Den Agarosegelen wurden zur Visualisierung der DNA auf einem UV-Transilluminator (*Image master VDS*, Pharmacia) 0,5 µg/ml (w/v) des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid zugesetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 1/6 Volumen 6x Ladepuffer versetzt und anschließend die Elektrophorese bei 60-100 V durchgeführt. Als Laufpuffer in der Gelkammer wurde 1x TAE-Puffer verwendet.

3.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Zur Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten, die für eine Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden die gewünschten Banden nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel ausgeschnitten. Die isolierte DNA wurde mittels “MinEluteTM Gel Extraction Kit“ von der Firma Qiagen aufgereinigt. Hierbei wurde nach Firmenprotokoll vorgegangen.

3.1.6 Analytische Plasmidpräparation

Die analytische Plasmidpräparation dient zur schnellen Präparation und Analyse von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab. Hier wurde eine Plasmid-Minipräparation durch alkalische Lyse durchgeführt (abgewandelt nach Birnboim und Doly, 1979). 1-3 ml LB Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum wurden mit einer Einzelkolonie transformierter *E.coli*-Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1,5 ml der ÜN-Kultur wurden sedimentiert (14000 rpm, 5 min) und die Zellen in 100 µl kalter Lösung I resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte eine Lyse der Zellen durch Zugabe von 200 µl Lösung II. Der Ansatz wurde durch Invertieren gemischt und nach einer Inkubation von 5 min auf Eis

wurden hochmolekulare DNA und Proteine mit 150 µl Lösung III gefällt und anschließend weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden erneut zentrifugiert und die im Überstand befindliche Plasmid-DNA mit 0,7 x Volumen Isopropanol (RT) für 10 min gefällt. Die Plasmid DNA wurde anschließend mit 70% igem EtOH gewaschen, bei 55°C getrocknet und in 10-30 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur vollständigen Lösung wurde die Plasmid-DNA 15 min bei 60°C inkubiert.

Lösung I: EDTA pH 8,0 10 mM
 Tris-HCl pH 8,0 50 mM
 RNase 100 µg/ml

Lösung II: SDS 1 %
 NaOH 0,2 N

Lösung III: K-Acetat pH 5,5

3.1.7 Präparative Plasmidisolierung mittels Affinitätschromatographie

Die präparative Plasmid-Midipräparation ermöglicht es, Plasmid-DNA in größeren Mengen und in einem höheren Reinheitsgrad zu gewinnen. Bei dieser Präparationsmethode wurde die oben beschriebene alkalische Lysemethode mit einer Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine Anionenaustauschersäule kombiniert. Hierfür wurde das “*JETstar Plasmid Purification MIDI Kit*“ der Firma Genomed verwendet. 25-30 ml einer LB ÜN-Kultur, die mit einer Einzelkolonie angeimpft wurde, wurden sedimentiert (4500 rpm, 10 min) und die Resuspension, alkalische Lyse und Proteinfällung laut Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA über eine äquilibrierte Midi-/Maxisäule nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie über eine Silikat-Säule aufgereinigt. Nach der Elution wurde die Plasmid-DNA mit 0,7 x Volumen Isopropanol gefällt (RT), abzentrifugiert (Beckman, JS13, 12000 rpm, 30 min), mit 70% eiskaltem EtOH gewaschen und schließlich in 200-400 µl TE-Puffer aufgenommen. Mit dieser Methode konnte eine Ausbeute von ca. 200-300 µg DNA pro Ansatz erreicht werden.

3.1.8 Phenol-Chloroform Extraktion

Für die Reinigung der DNA von Proteinen wurde die DNA mit einem Volumenanteil TE-gesättigtem Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und ca. 20 sek kräftig durchmischt, bis eine homogene Emulsion entstand. Anschließend erfolgte die Phasentrennung durch

Zentrifugation (14000 rpm, 2 min, 4°C). Der klare Überstand (wässrige Phase) wurde abgenommen und zur Entfernung von Phenolresten mit einem Volumenanteil Chloroform versetzt. Nach erneuter sorgfältiger Mischung und anschließender Phasentrennung unter gleichen Bedingungen wurde die wässrige, obere Phase in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und die DNA aus dieser Phase mittels Natriumacetat-Fällung präzipitiert (3.1.9).

3.1.9 Natriumacetat-Fällung von Nukleinsäuren

Die DNA-oder RNA-Lösung (in TE pH 8,0 oder steriles Wasser) wurde mit 0,1 Volumen 3 M NaAc (pH 5,5) und 2,5x Volumen kaltem 100%igem Ethanol gefällt. Alternativ kann wie bei der Plasmid Midipräparation mit 0,7x Volumina Isopropanol bei RT gefällt werden. Der gut durchmischte Ansatz wurde 30-120 min bei -70°C oder ÜN bei -20°C präzipitiert. Nach Sedimentation des Präzipitates (14000 rpm, 5 min) wurde der Überstand verworfen, das Sediment in 70% Ethanol gewaschen und die luftgetrocknete DNA/RNA bei RT in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder sterilem Wasser aufgenommen.

3.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Anhand einer photometrischen Messung können sowohl Konzentration, als auch Reinheit der Nukleinsäuren bestimmt werden. DNA hat bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum, während Proteine ein Maximum bei 280 nm aufweisen. Ein Absorptionswert von $A_{260}=1$ entspricht bei doppelsträngiger DNA und bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm, einer Konzentration von 50 µg/ml. Bei RNA liegt dieser Wert bei 40 µg/ml (Sambrook et al., 1989). Mit dem gemessenen Wert bei einer Wellenlänge von 260 nm kann somit die DNA-oder RNA-Konzentration bestimmt werden.

Der Quotient der mit dem Spektralphotometer gemessenen Absorptionwerte bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gibt zusätzlich Aufschluß über den Reinheitsgrad der DNA-Probe. Liegt der Quotient zwischen 1,8 und 1,9, so ist die DNA-Präparation sehr rein. Eine Verunreinigung mit Proteinen läßt diesen Wert sinken, wohingegen RNA ihn erhöht.

Konzentrationsabschätzung im Agarosegel

DNA unbekannter Konzentration wurde neben einem Standardmarker im Agarosegel aufgetragen, dessen prozentuale Anteile an der Gesamt-DNA bekannt sind. Hier wurde der λIII-Marker verwendet. Es handelt sich dabei um λ-DNA, die mit den Restriktionsenzymen

EcoRI und *HindIII* verdaut wurden. Es entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, die alle einen bestimmten Anteil der Gesamt-DNA beinhalten. Insgesamt wurden als Marker 500 ng λ -DNA eingesetzt. Anschließend wurde das Gel bei einer Wellenlänge von 312 nm auf einem UV-Transiluminator photographiert und die DNA-Konzentration abgeschätzt, indem die Fluoreszenzintensität der unbekanntes Bande mit den Intensitäten der Banden bekannter λ -DNA verglichen wurde.

3.1.11 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung von kompetenten *E.coli*-Bakterien, die in der Lage sind, fremde Plasmid-DNA aufzunehmen, wurde ein verändertes Protokoll nach Hanahan (Hanahan, 1983) verwendet. Mit dieser Methode kann eine Transformationseffizienz von 5×10^7 - 5×10^8 Klone/ μg Plasmid-DNA erreicht werden. 2-3 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie als ÜN-Kultur angeimpft. Am nächsten Tag wurde YB-Medium mit dieser ÜN-Kultur 1:100 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,6 angezogen. Danach wurden die Bakterien 10-15 min auf Eis abgekühlt und anschließend sedimentiert (4500 rpm, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 1/5 Volumen kaltem TFB I-Puffer resuspendiert und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet dann in 1/25 Kulturvolumen kaltem TFB II-Puffer resuspendiert. Die Zellen sind dann zur sofortigen Transformation bereit oder können auf einer Ethanol-Trockeneis-Mischung zu je 100 μl in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort bei -70°C eingefroren werden.

<u>TFB I-Puffer:</u>	NaAcetat pH 6,0	30 mM
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	50 mM
	NaCl	100 mM
	CaCl ₂	10 mM
	Glyzerin	15 % (v/v)

<u>TFB II-Puffer:</u>	MOPS pH 7,0	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	NaCl	100 mM
	Glyzerin	15 % (v/v)

3.1.12 Transformation

100 µl kompetenter Bakterien wurden im Eis-Bad aufgetaut und die zu transformierende DNA zugegeben (1 ng DNA, oder 10 µl Ligationsansatz). Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde der Transformationsansatz für 2 min einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen und danach sofort wieder auf Eis gestellt. Zur Ausbildung des Resistenzmarkers wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und die Bakteriensuspension für 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert und der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen. Der Ansatz wurde nun auf Antibiotikum-haltige LB-Agar-Platten zur Selektion gewünschter Klone ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

3.1.13 Polymerase-Kettenreaktion

Das *in-vitro* Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient zur exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Abschnitte aus einer geringen DNA-Ausgangsmenge. Durch wiederholte Folgen von Denaturierung, Hybridisierung mit synthetischen Oligonukleotiden (MWG) und Strang-Synthese mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase führt die PCR zu einer Amplifikation der gewünschten DNA Abschnitte. Sie wurde in dieser Arbeit vorwiegend zur zielgerichteten Einführung von Punktmutationen oder Restriktionsschnittstellen verwendet.

Zur Vervielfältigung der DNA-Fragmente wurden synthetische Oligonukleotide verwendet, die idealerweise ca. 21 Basen lang waren und zu den 5'- bzw. 3'-Überhängen der zu amplifizierenden DNA homolog waren. Nach Möglichkeit wurde ein Bereich ausgewählt, der einen GC-Gehalt von <60% aufwies. Die Anlagerungstemperatur für die Oligonukleotide wurde hier nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 \times \log_{10}(\text{Na}^{2+} = 0,05 \text{ M}) + 0,41(\text{GC in \%}) - \frac{600}{\text{Länge}},$$

Zusätzlich zu der *Taq-Polymerase* (Promega), die hauptsächlich für einfache Kontroll-PCRs eingesetzt wurde, wurde je nach Anwendung die *HotStar Taq* (Quiagen), das *Expand long Template PCR System* (Roche) oder das *GC-rich PCR system* (Roche) verwendet. Die Spezifität und Effizienz einer PCR ist jedoch von einer Vielzahl verschiedener Parameter abhängig und muß für jedes Oligonukleotidpaar und jede Polymerase neu optimiert werden. Der folgende 50 µl Ansatz kann aber als ein Richtwert betrachtet werden:

<u>PCR Ansatz:</u>	Matritzen DNA	1-10 ng
	Oligonukleotide	je 50 pmol
	10xPuffer	5 μ l
	MgCl ₂	1,5 mM
	dNTP-Gemisch	200 μ M
	Polymerase	0,5-2,5 U
	H ₂ O _{bidest}	ad 50 μ l

<u>PCR Bedingungen:</u>	Anfangs-Denaturierung	95 °C	5 min	
	Denaturierung	95 °C	45 sek	} 30-40x
	Oligonukleotid-Anlagerung	X °C	60 sek	
	Strang-Synthese	72 °C	Y min	
	Abschluß-Strang-Synthese	72 °C	7 min	
	Pause	4 °C		

X=T_m (s.o.); Y=60 sek/ kb PCR-Produkt

3.1.14 Northern Blot-Hybridisierung

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonde für die Northern Blot-Hybridisierung wurde mit Hilfe des *Megaprime DNA Labelling Kit* (Amersham) durchgeführt. 50 ng DNA wurden entsprechend den Instruktionen des Herstellers mit 4 μ l [α -³²P]dCTP (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol) radioaktiv markiert. Im Anschluß an die Markierungsreaktion wurde die Sonde durch Zentrifugation über eine Sephadex G 50-Säule (3 min, 1500 rpm) von nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden gereinigt. Der Erfolg der Markierungsreaktion wurde durch Messung eines Aliquots der radioaktiv markierten Sonde im Szintillationsmeßgerät (Beckmann) überprüft. Pro 50 ng Sonde sollte eine Gesamtaktivität von etwa 4×10^7 cpm erreicht werden. Die Blot-Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht im Rollinkubator bei 42°C in einer Prähybridisierungs-Lösung vorinkubiert. Direkt vor der Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde für 10 min bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und dann zu der Prähybridisierungslösung in die Hybridisierungsröhre pipettiert. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C im Rollinkubator. Nach der Hybridisierung wurde der Northern Blot in $2 \times$ SSC mit 0,1% SDS bei 55-60°C zunächst für 10 min gewaschen. Je nach Bindungseigenschaften der Sonde folgten weitere, stringente Waschschrte mit niedrigerer SSC-Konzentration und höherer Temperatur. Mit dem Handmonitor wurde nach jedem Waschschrte die auf dem Blot verbliebene spezifische Aktivität gemessen. Der Waschvorgang wurde beendet, wenn noch

etwa 50 bis 150 cpm auf der Blotmembran meßbar waren. Danach wurde der Blot in Folie eingeschweißt. Die Detektion von Signalen erfolgte mit einem Röntgenfilm (*X-OMAT AR*, Kodak) und einer Verstärkerfolie bei -70°C . Vor einer erneuten Hybridisierung wurde die Membran mit 0,1% SDS in H_2O für 30 min bei 90°C gewaschen.

<u>50x Denhardt`s:</u>	Ficoll (Typ 400)	1 % (w/v)
	Polyvinylpyrrolidon	1 % (w/v)
	BSA	1 % (w/v)
<u>(Prä-) Hybridisierungslösung:</u>	deionisiertes Formamid	50 % (w/v)
	SSC	5 x
	SDS	0,5 % (w/v)
	50x Denhardt`s	5 x
	Heringssperma-DNA	0,01 % (w/v)
	<i>E.coli</i> -tRNA	0,01 % (w/v)

3.2 Proteinchemische Techniken

3.2.1 Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung von Zellextrakten wurde ein detergenzhaltiger Phosphatlysispuffer verwendet. Der Puffer enthält eine hohe Konzentration an Phosphationen, die während der Zellyse die Phosphatasen hemmen, so dass die Proteine in ihrem ursprünglichen Phosphorylierungszustand gewonnen werden können (Scheidtmann et al., 1982). Die Proteine bleiben in ihrer nativen Form erhalten, lösliche Proteine aus Zytoplasma und Kern werden extrahiert und unlösliche Proteinstrukturen wie Zytoskelett, Kernskelett und Chromatin bleiben erhalten. Das nicht-ionische Detergenz NP-40 zerstört dabei die Zytoplasma- und die Kernmembran, DTT sorgt für ein reduzierendes Milieu im Ansatz .

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf eine 10 cm \varnothing Zellkulturschale. Bei kleineren Kulturgefäßen wurden entsprechend kleinere Volumina eingesetzt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Gummischabers von der Kulturschale abgeschabt und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Nach der Sedimentation (1500 rpm, 3 min) wurden die Zellen noch 2x mit kaltem PBS^+ gewaschen und anschließend auf Eis für 30 min in 20-600 μl PLP lysiert. Um konzentriertere Zellextrakte für Western Blot Analysen zu erhalten, wurde das Zellpellet in ca. 50 μl PLP aufgenommen, für Immunpräzipitationen wurde ein größeres Volumen von ca. 600 μl gewählt. Anschließend wurden die Kerne und die im Überstand befindlichen

Zellstrukturen abzentrifugiert (14000 rpm, 15 min, 4°C) und der proteinhaltige Überstand bei -20°C eingefroren.

<u>Phosphatlysispuffer:</u>	NaPO ₄	20 mM
	NaCl	140 mM
	MgCl ₂	3 mM
	NP-40	0,5 %
	DTT	1 mM
	Leupeptin	50 µM
	PMSF	1 mM

3.2.2 Fraktionierung in Kern- und Zytoplasmaextrakte

Die Zellen wurden zunächst so behandelt wie zur Herstellung von Gesamtzellextrakt (siehe 3.2.1). Die Lyse mit PLP wurde jedoch auf 15 min verkürzt und konnte je nach Versuchsansatz und gesuchtem Protein noch variiert werden. Lösliche Kernproteine werden schon nach relativ kurzer Lysezeit aus dem Kern gelöst und finden sich später im Zytoplasmaextrakt, wohingegen Zytoskelett-assoziierte Proteine bei sehr kurzen und milden Lysebedingungen am Zytoskelett gebunden bleiben und mit den Kernstrukturen abzentrifugiert werden. Anschließend wurden die Kerne bei 1500 rpm für 5 min bei 4°C sedimentiert. Der zytoplasmatische Überstand wurde abgenommen und das Kernpellet nochmals in einem Volumen von 20 µl PLP aufgenommen. Zur Kernlyse folgte zunächst eine Inkubation von 30 min auf Eis mit 5 U der Nuklease Benzonase[®] (Merck), um die genomische DNA zu zerschneiden und die Viskosität des Kernextraktes zu verringern. Der Aufschluß der Kerne erfolgte dann mit 500 mM NaCl für 15 min auf Eis. Zur Reinigung von Zelltrümmern wurde anschließend sowohl der Zytoplasma- als auch der Kernextrakt mit 15000 rpm bei 4°C abzentrifugiert.

3.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung von Zellextrakten wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Es wurden 800 µl einer 1:80-1:800-Verdünnung des Zellextraktes mit 200 µl *Protein Assay Dye Reagent* (Bio-Rad) versetzt, gemischt und für 5 min inkubiert (RT). Anschließend wurde die OD_{595 nm} gemessen. Die Proteinkonzentration der Probe wurde anhand einer mitgeführten Eichreihe mit verschiedenen BSA-Konzentrationen (0-20 µg) ermittelt.

3.2.4 [³⁵S]-Methionin-Markierung von Proteinen

Durch den Einbau von radioaktivem [³⁵S]-Methionin während der Proteinbiosynthese in eukaryotische Zellen lassen sich die im Markierungszeitraum synthetisierten Proteine sensitiv nachweisen. Um die radioaktive Markierung vorzubereiten und um zu gewährleisten, dass das [³⁵S]-Methionin möglichst vollständig während der Proteinsynthese eingebaut wird, erfolgte zunächst eine Vorinkubation der Zellen mit 1,5 ml Methionin-freiem Medium (MEM, 10% dialysiertes FCS). Die Markierung erfolgte durch den Zusatz von 150 µCi [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml, 1000 Ci/mmol) in das Medium und Inkubation der Zellen für 2 h im Brutschrank bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen 3x mit kaltem PBS⁺ gewaschen und die Zellextrakte wie unter 3.2.1 beschrieben, gewonnen.

3.2.5 *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des *TNT[®]T7/T3 coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für einen Translationsansatz wurde 1 µg DNA eingesetzt. Da in diesem System die T3 oder T7 – Polymerase verwendet wird, sollte der eingesetzte Vektor entweder einen T3 oder einen T7 Promotor besitzen. Für die radioaktive Markierung der *in vitro*-translatierten Proteine wurde 4 µl [³⁵S]-Methionin (10 mCi/ml, 1000 Ci/mmol) zugesetzt. Die Translation erfolgte bei 30°C für 90 min. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei RT mit 20 µg RNase A behandelt und 1 µg Leupeptin zugesetzt.

3.2.6 Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation können Proteine aus Zellextrakten in ihrer nativen Konformation mit spezifischen Antikörpern aufgereinigt, oder auch Protein-Protein Interaktionen nachgewiesen werden. Dabei können die Antikörper über ihre F_C-Region an das Protein A von *Staphylococcus aureus* gebunden werden, das kovalent an die Matrix-Sepharose gekoppelt ist. Monoklonale Mausantikörper weisen eine höhere Affinität zu Protein G, polyklonale Kaninchenantikörper eine höhere Affinität zu Protein A auf. Zur Volumenvergrößerung und zur besseren Handhabung wurde die Protein A- bzw. G-Sepharose hier im Gemisch 1:2 mit Sepharose 4B verwendet. Um Proteine, die unspezifisch an die Protein A-Sepharose binden, aus dem Zellextrakt zu entfernen, wurde eine Vorinkubation der Zellextrakte mit 30 µl Sepharose 4B durchgeführt. Die Zellextrakte wurden für 1 h bei 4°C

rotierend inkubiert und die Sepharose 4B anschließend sedimentiert (13000 rpm, 30 sek, 4°C). Der Überstand wurde dann mit einer geeigneten Menge des entsprechenden Antikörpers für mindestens 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Um diese Antikörper-Antigen Komplexe an die Matrix zu binden, wurden zunächst 10 µl PAS mit 20 µl Sepharose 4B pro Ansatz gemischt und 2 x mit PLP gewaschen, zum Zellextrakt gegeben und für weitere 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Matrix sedimentiert, 3 x mit PLP und 1 x mit 10 mM Tris-HCl pH 8 gewaschen. Die Pellets konnten dann in Kinasepuffer aufgenommen und für einen Kinasetest (siehe 3.2.7) verwendet werden, oder das Protein wurde von der Matrix eluiert durch Zugabe von 30 µl 2 x SDS-Probenpuffer (0,5 M Tris, 80 mM DTT, 13,2% (w/v) SDS, pH 6,8), 5 minütiger Inkubation bei 60°C und anschließender Sedimentation der Sepharose.

Kovalente Kopplung von Antikörpern an die Sepharose-Matrix

Dieses Verfahren wurde angewendet, wenn eine Elution der Antikörper von der Matrix und eine Auftrennung der Antikörper mit den Proteinproben auf einer SDS-PAGE vermieden werden sollte. Die schwere Kette der Antikörper weist ein apparentes Molekulargewicht von ca. 50 kDa und die leichte Kette eines von 25 kDa auf. Wenn die zu untersuchenden Proteine ein ähnliches Molekulargewicht wie die große Kette der Antikörper aufweisen, kann die Identifizierung der einzelnen Proteinbanden erschwert werden. Des Weiteren kann im Western Blot eine Kreuzreaktion zwischen den aufgetrennten Antikörpern und den für die Immunfärbung des Blottes verwendeten Antikörpern erfolgen. Dieses Problem kann durch die kovalente Kopplung der Antikörper an eine Matrix umgangen werden.

Zur Bindung wurde zunächst Sepharose A oder G mit der gewünschten Menge Antikörper in Kopplungspuffer A (50 mM Tris pH 7,5-8; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,1% (v/v) NP-40) für mindestens 2 h rotierend bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Matrix jeweils 1 x mit Puffer A, Boratpuffer pH 8 (0,16 M Borat; 0,14 M NaCl) und Boratpuffer pH 9 (0,16 M Borat; 0,14 M NaCl) gewaschen. Die kovalente Verknüpfung der Antikörper mit der Matrix erfolgte durch eine Inkubation mit 1 ml Pimelidatlösung (15,5 mg Dimethyl pimelinediimidat dihydrochlorid in 1 ml Boratpuffer, pH 9,0 genau eingestellt) rotierend ÜN bei 4°C. Nach einer Sedimentation der Sepharose (13000 rpm, 4°C) wurde sie 3 x mit 0,2 M Etanolamin/HCl pH 9 und 2 x mit PLP gewaschen und konnte dann für eine Immunpräzipitation eingesetzt werden.

3.2.7 *In vitro* Kinasetest

Der Kinasetest wurde in dieser Arbeit verwendet, um gereinigte Proteine und ihre Mutanten auf ihre Phosphorylierbarkeit durch verschiedene Kinasen hin zu untersuchen. Die entsprechenden Kinasen wurden in einem Testansatz mit den isolierten Proteinen in Gegenwart von 1 μCi [^{32}P]-markiertem γ -ATP inkubiert. Der Kinasetest umfasste ein Volumen von 50 μl Kinasepuffer, dem 0,2-2 μg Substrat und jeweils 1 μg Dlk (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jan Kubicek, Forschungszentrum Jülich), 10 U PKA (*cAMP-dependent Protein kinase, catalytic Subunit*, Promega) oder 2 U PKC (*Protein kinase C, catalytic subunit*, Calbiochem) hinzugefügt wurden. Die Phosphorylierung erfolgte dann für 30 min bei 37°C und wurde durch die Zugabe von 5 x SB und anschließender Denaturierung der Proteine bei 100°C für 5 min abgestoppt. Nach Zugabe von 1/3 NEM (2,5% NEM, 33% (v/v) mit Bromphenolblau gesättigtes Glycerin) und 15 minütiger Inkubation bei RT konnten die Proben in einer SDS-PAGE aufgetrennt werden. Der Nachweis der Phosphorylierung der Testsubstrate erfolgt dann über Autoradiographie.

<u>Dlk-Kinasepuffer:</u>	Tris-HCl	50 mM
	NaCl	100 mM
	DTT	1 mM
	MnCl ₂	5 mM
	Aprotinin	0,001 % (w/v)
	PMSF	1 mM

<u>PKC-Kinasepuffer:</u>	Hepes pH 7,4	50 mM
	EGTA	1,25 mM
	MgCl ₂	12,5 mM
	PMSF	1 mM

<u>PKA-Kinasepuffer:</u>	Hepes pH 7,4	10 mM
	KCl	50 mM
	MgCl ₂	5 mM
	ATP	0,2 mM
	DTT	1 mM
	EGTA	0,2 mM
	Aprotinin	0,001 % (w/v)
	Pepstatin	1 μM

3.2.8 Phosphorsäure-Analyse mittels saurer Hydrolyse

Die Phosphorsäureanalyse wurde in dieser Arbeit verwendet, um die *in vitro* oder *in vivo* phosphorylierten Aminosäuren eines Proteins zu analysieren. Mit dieser Methode können die phosphorylierten Aminosäuren Threonin, Serin und Tyrosin anhand ihres unterschiedlichen Laufverhaltens in einer Elektrophorese unterschieden werden.

Dazu wurde das zu untersuchende Protein zunächst wie unter (3.2.7) beschrieben *in vitro* phosphoryliert, in einer SDS-PAGE (3.2.9) aufgetrennt und mittels Western Blot (3.2.10) auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Die Detektion des [³²P]-markierten Proteins erfolgte dann durch Autoradiographie. Anhand dieses Verfahrens können die phosphorylierten Proteine aus dem Proteingemisch des Kinaseansatzes isoliert werden. Die radioaktiv markierten Proteinbanden wurden aus der Nitrocellulosemembran ausgeschnitten und in ein 500 µl Reaktionsgefäß mit 300 µl PVP (0,5% (v/v) Polyvinylpyrrolidone in 0,1 M Essigsäure) überführt. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT wurde die Membran 2 x mit H₂O_{bidest} und 1 x mit ABC (50 mM Ammoniumbicarbonat, pH 7,8) gewaschen. Anschließend wurde das Protein auf der Membran für 3 h bei 37°C mit 20 µg/ml TPCK Trypsin in ABC verdaut. Die Inkubation wurde so lange durchgeführt, bis mindestens die Hälfte des vorhandenen Proteins von der Membran abverdaut war und sich im Überstand befand. Die Menge an gelöstem, radioaktiv markiertem und tryptisch verdautem Protein wurde in einem Szintillationszähler überprüft. Der radioaktive Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml H₂O_{bidest} aufgefüllt und lyophilisiert. Die Lyophilisierung wurde 2 x wiederholt bevor die saure Hydrolyse der Aminosäuren in 6N HCl bei 110°C für 2 h erfolgte. Zur Vorbereitung für die Elektrophorese wurden die Proben mit 200 µl H₂O_{bidest} aufgefüllt, lyophilisiert und in 3-5 µl Elektrophoresepuffer pH 3,5 (0,5% (v/v) Pyridin, 4,5% (v/v) Essigsäure in H₂O_{bidest}) aufgenommen.

Die Auftrennung der hydrolysierten Aminosäuren erfolgte mittels Elektrophorese auf Dünnschichtchromatographieplatten, die mit Cellulose beschichtet waren (DC-Fertigplatten Cellulose, MERCK). Dazu wurden die gelösten Aminosäuren in 0,25 µl Schritten auf die Platte aufgetropft. Als Standard wurden 0,5 µg (1 µg/µl) eines Gemisches aus Phosphothreonin, -serin und -tyrosin aufgetropft. Die Elektrophorese erfolgte dann bei 1200 V für 50 min in Elektrophoresepuffer pH 1,9 (1,25% (v/v) Essigsäure, 0,25% (v/v) Pyridin, titriert mit Ameisensäure). Die aufgetrennten Aminosäuren wurden anschließend auf der DC-Platte durch Benetzung mit Ninhydrin (0,25% (w/v) in EtOH) und einer nachfolgenden Farbentwicklung für 10 min bei 60°C sichtbar gemacht werden. Die Detektion der phosphorylierten Aminosäuren erfolgte mittels Autoradiographie.

3.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine in Gegenwart von SDS (Sodium Dodecylsulfat) elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. SDS bewirkt eine vollständige Entfaltung bzw. Denaturierung von Proteinen, und lagert sich in einem konstanten Verhältnis an die Proteine an. Sie erhalten somit eine der Länge der Aminosäurekette proportionale negative Ladung, wobei ihre Eigenladung maskiert wird und somit vernachlässigbar ist. Daraus resultiert eine Laufstrecke der Proteine im SDS-PAGE, die umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes ist. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli (1970) wurden die Proben zunächst in einem 4,5%igen Sammelgel mit pH 6,8 bei 20 mA zu einer Lauffront konzentriert. Im engerporigen 7,5-13%igen Trenngel (pH 8,8) erfolgte dann die Auftrennung der Proteine bei einer Stromstärke von 40 mA in Abhängigkeit von ihrer Molekularmasse und ihrer Nettoladung. Als Molekulargewichtsstandard wurde der vorgefärbte *Page RulerTM*, *Prestained protein ladder* (Fermentas) verwendet.

Sammelgelpuffer		Trenngelpuffer	
Tris HCl pH 6,8	0,5 M	Tris HCl pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)	SDS	0,4 % (w/v)

Sammelgel		Trenngel (10 %)	
Sammelgelpuffer	1,25 ml	Trenngelpuffer	4 ml
H ₂ O _{bidest}	3 ml	H ₂ O _{bidest}	6,7 ml
Acrylamidlösung	0,75 ml	Acrylamidlösung	5,3 ml
APS	15 µl	APS	80 µl
TEMED	5 µl	TEMED	4 µl

Acrylamidlösung.: 30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid

Zur Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE wurden diese mit Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 100°C inkubiert. Die Proteine werden während dieses Prozesses denaturiert und mit SDS beladen. Das im Probenpuffer enthaltene DTT reduziert die Disulfidbrücken im Protein zu Sulfhydrylgruppen. Um eine Wiederausbildung dieser Bindung zu verhindern, wurde nach der Inkubation 1/3 Volumen NEM zum Ansatz gegeben, das die Sulfhydrylgruppen alkyliert. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei RT wurden die Proben

dann auf das Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) aufgetragen, oder bei -20°C gelagert. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde das Gel je nach Versuchsziel weiterbehandelt.

Coomassiefärbung von PAA-Gelen

Die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden direkt mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Dazu wurde das Gel für 30 min in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert, wobei die Essigsäure der Färbelösung die Proteine im Gel fixiert. Der überschüssige Farbstoff wurde anschließend mit Entfärbelösung aus dem Gel entfernt. Diese Inkubation erfolgte solange auf einem Schüttler, bis die Proteinbanden deutlich im Gel zu erkennen waren. Zur Archivierung wurden die Gele gegebenenfalls auf Filterpapier unter Vakuum für 40 min bei 80°C getrocknet. Der Nachweis von [^{32}P]-markierten Proteine erfolgte nach dem Trocknen der Gele durch Autoradiographie.

<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	Coomassie-Brilliant-Blau	0,1 % (w/v)
	Isopropanol	25 %
	Essigsäure	10 %
	H ₂ O _{bidest}	65 %

<u>Entfärbelösung:</u>	Isopropanol	10 %
	Essigsäure	10 %
	H ₂ O _{bidest}	80 %

Fluorographie

Durch Fluorographie wurden [^{35}S]-markierte Proteine in PAA-Gelen nachgewiesen. Dabei wurde die schwache β -Strahlung des ^{35}S genutzt, um einen Fluoreszenzfarbstoff anzuregen, und so die Schwärzung eines Röntgenfilms zu verstärken. Um die Proteine im Gel zu fixieren, wurde das Gel zunächst 30 min bei RT in Fixierlösung (10% (v/v) Essigsäure, 25% (v/v) Isopropanol) inkubiert. Anschließend wurde das Gel für weitere 30 min mit *Amplify*-Lösung (Amersham) behandelt, in H₂O_{bidest} gewässert und getrocknet (40 min, 80°C unter Vakuum). Der Nachweis der radioaktiv markierten Proteinbanden erfolgte über Autoradiographie.

3.2.10 Western Blot

Um Proteine immunologisch nachzuweisen, wurde ein Western-Blot durchgeführt. Im Western-Blot werden die Proteine durch Elektrotransfer aufgrund ihrer starken negativen Ladung aus einem PAA-Gel auf eine geeignete Trägermembran, hier Nitrocellulose (0,45 μm

Porengröße, Schleicher & Schuell), transferiert. Anschließend können die auf der Membran immobilisierten Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Proteintransfer:

Der Transfer der Proteine erfolgte nach ihrer Auftrennung in einem SDS-PAGE. Die Nitrocellulosemembran wurde auf die Größe des zu blottenden Gels zurechtgeschnitten und gemeinsam mit Whatman-Filterpapieren und zwei Schwammtüchern in Blotpuffer äquilibriert. Der Blotaufbau bestand aus einer Lage Schwammtuch, zwei Lagen Filterpapier, dem Gel, der Nitrocellulosemembran, zwei Lagen Filterpapier und wieder einem Schwammtuch. Dieser Aufbau wurde in einer zur Blotapparatur (Biorad) gehörenden Gitterkassete eingeschlossen und mit der Gelseite zur Kathode in die Blotkammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 80 V und 4°C in vorgekühltem 1x Blotpuffer. Zur Überprüfung des Proteintransfers auf die Membran wurde diese mit 20% (v/v) Ponceau-Lösung (0,1% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure in H₂O) für 1 min gefärbt. Vor der immunologischen Detektion der Proteine wurde die Membran durch Inkubation in TBS-Tween wieder entfärbt.

<u>Blotpuffer:</u>	Tris-HCl pH 8,3	25 mM
	Glycin	150 mM

Immunologischer Proteinnachweis:

Die Detektion der auf der Nitrocellulose immobilisierten Proteine erfolgte mittels eines ersten spezifischen Antikörpers, eines Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers und Luminol als chromogenem Substrat.

Um unspezifische Bindungen des ersten Antikörpers zu vermeiden, und um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran zunächst für 1 h (RT) oder ÜN (4°C) in Blockierungslösung (5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Tween) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in TBS-Tween (je nach Antikörper mit oder ohne 5% Magermilchpulver) für 1 h (RT) oder ÜN (4°C). Nach der Inkubation wurde 3 x für 10 min mit TBS-Tween gewaschen und die Membran für 30 min mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach weiteren drei Waschsritten wurden die Protein-Antikörper-Komplexe mit Hilfe des *SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate* (Perbio Science) detektiert. Nach der Inkubation wurde die überschüssige Flüssigkeit abgenommen, die Membran in Folie eingeschweißt und ein Röntgenfilm (Cronex 5, AGFA) aufgelegt. Abhängig von der Intensität des Signals wurde die Expositionszeit variiert.

<u>TBS-Tween:</u>	Tris-HCl pH 7,5	10 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,05 %

3.2.11 Regeneration von Western Blots

Western Blot Membranen wurden mehrfach verwendet, um mehrere Proteine immunologisch auf derselben Membran zu detektiert, oder um einen Proteinabgleich durchzuführen. Um die Antikörper einer vorherigen Immunfärbung von der Membran zu entfernen, wurde sie für 30 min bei 50°C in „Blot-Strip-Puffer“ inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift in TBS-Tween stand die Membran für weitere Analysen zur Verfügung.

<u>Blot-Strip-Puffer pH 6,7:</u>	Tris-HCl	62,5 mM
	SDS	2 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	100 mM

3.2.12 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine

Für die *in vitro* Interaktionsstudien wurden gereinigte rekombinante Proteine verwendet. Hierfür wurde der *E.coli* BL21 (DE3) Expressionsstamm mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert. Eine 15 ml Expressionskultur wurde 1:50 mit einer ÜN-Kultur der transformierten Bakterien angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ 0,6-0,8 angezogen. Die Induktion der rekombinanten Proteine erfolgte dann durch die Zugabe von 1 mM IPTG in die Expressionskultur und einer weiteren Inkubation bei 37°C für 2-3 h im Schüttler. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (15 min, 4500 rpm) und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren. Zur Kontrolle der Induktion und der Expression des zu untersuchenden Proteins wurden der Expressionskultur zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots entnommen, die in SB-Puffer aufgenommen und in einer SDS-PAGE aufgetragen und analysiert werden konnten.

In dieser Arbeit wurden Proteine verwendet, die an die Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert waren. Nach Induktion konnten diese Proteine dann mit Hilfe des GST-Bindungspartners Glutathion aus einem Zelllysate aufgereinigt werden.

Das nach der Induktion mit IPTG erhaltene Zellpellet wurde 1 x mit PBS⁺ gewaschen und in ca. 1/15 Volumen der Expressionskultur PBS⁺ aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von 0,5 mg/ml Lysozym für 30 min auf Eis. Um die Viskosität des Lysates zu verringern und um die Löslichkeit des gewünschten Proteins zu erhöhen, folgte eine weitere

Inkubation für 30 min auf Eis mit 5 U Benzonase[®] (Merck), 1% Triton X-100 und 2 mM MgCl₂. Anschließend wird das Lysat zentrifugiert (13500 rpm, 5 min, 4°C) und die Überstände, die das gelöste Protein enthielten, für mindestens 1 h mit 50 µl Glutathion Sepharose rotierend bei 4°C inkubiert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden in 3 Waschschritten mit PLP entfernt und das gesuchte Protein mit 50 mM Tris-HCl und 15 mM Glutathion in aufsteigenden pH Stufen von der Matrix eluiert. Die einzelnen Elutionsschritte erfolgten für 5 min auf Eis und durch anschließende Sedimentation der Sepharose (30 sek, 13500 rpm, 4°C). Zur Kontrolle der einzelnen Elutionsschritte wurden Aliquots der Eluate in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie gefärbt.

3.2.13 *In vitro* Bindungsstudien mit Glutathion Sepharose

Für die *in vitro* Bindungsstudien mit GST-gereinigtem und *in vitro*-translatiertem Protein wurde ein „Pulldown assay“ durchgeführt. Hierzu wurden 15 µl GT-Sepharose zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit ca. 500 µg Zellextrakt vorinkubiert. (1 h rotierend, 4°C). Nach einem Waschschriff mit PLP wurden 15 µl eines Eluates (siehe 3.2.12) in PLP zu der Sepharose gegeben und die GST-Fusionsproteine während der Inkubation (1 h rotierend, 4°C) auf der Matrix immobilisiert. Nach der Inkubation wurde die Matrix 3 x mit PLP gewaschen und anschließend 5 µl des *in vitro*-translatierten und [³⁵S]-markierten Interaktionspartners zur *in vitro* Bindung zugegeben und wie oben in PLP pH 8-9 inkubiert. Es folgte 3 maliges Waschen mit PLP und die Elution der Proteinkomplexe von der Matrix mit 2 x SB und 5 minütigem Denaturieren bei 100°C. Die Proben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiv markierten Proteine mittels Fluorographie (3.2.9) detektiert. Als Negativkontrolle diente hier eine Probe, bei der statt eines GST-Fusionsproteins GST alleine auf der Matrix immobilisiert wurde.

3.2.14 *In vitro* Filament-Bindung

Diese Methode, mit der man die Bindung von Proteinen an Aktin sowie den Einfluss von Proteinen auf die Aktin-Polymerisation untersuchen kann, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Susanne Illenberger (Technische Universität Braunschweig) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde gereinigtes Aktin (Sigma) in einer Konzentration von 30 µM durch Inkubation für 1 h bei 37°C in Polymerisierungs-Puffer polymerisiert. Es folgte eine Inkubation von 3 µM Aktin in Sedimentations-Puffer in An- oder Abwesenheit von 1 µM des zu untersuchenden Proteins

für 2 h bei 37°C. Die Aktinfilamente wurden durch Inkubation (1 h, 37 °C) mit TRITC-Phalloidin (Sigma) angefärbt. Die Analyse der Ansätze erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie.

<u>Polymerisierungs-Puffer:</u>	Tris-HCl pH 7,2	20 mM
	KCl	100 mM
	MgCl ₂	2 mM
	ATP	1 mM
	DTE	0,2 mM

<u>Sedimentations-Puffer:</u>	Tris-HCl pH 7,2	20 mM
	KCl	25 mM
	MgCl ₂	2 mM
	ATP	1 mM
	DTE	0,2 mM

3.3 Arbeiten mit Hefen

3.3.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System(THS)

Bei dem von Fields und Song (1989) entwickelten Two-Hybrid-System handelt es sich um ein Hefe-gestütztes Verfahren zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen. Das System gewährleistet eine sehr hohe Sensitivität, so dass auch schwache Interaktionen nachweisbar sind. Das Prinzip des Systems beruht darauf, dass eukaryotische Transkriptionsfaktoren, wie in diesem Fall GAL4 der Hefe, eine transaktivierende und eine DNA-Bindedomäne aufweisen. Beide Domänen sind alleine nicht in der Lage, die Aktivierung eines Promotors und somit die Transkription eines Reportergens auszulösen. Werden sie jedoch in enge räumliche Nähe gebracht, kann durch die Interaktion der beiden Domänen die volle Funktionalität des Transkriptionsfaktors hergestellt werden. Bei dem hier verwendeten Hefestamm Y190 befinden sich die Reportergene *lacZ* (β -Galaktosidase) und *HIS3* (Imidazolglyzerinphosphat-Dehydratase) unter der Kontrolle einer UAS (*upstream activating sequence*). Die genannten Gene können über diese Erkennungs- bzw. Bindesequenz von dem vollständigen GAL4 Transkriptionsfaktor aktiviert werden. In dieser Arbeit wurde die HybriZAPTM (Stratagene; Short et al., 1988) Version des THS verwendet. Diese beinhaltet sowohl den pBD-Gal4-Vektor, der die kodierende Sequenz für die DNA-Bindedomäne trägt, als auch den pAD-Gal4-Vektor, der für die Transaktivierungsdomäne kodiert. Die auf ihre

Interaktion hin zu untersuchenden Proteine, oder auch eine vollständige cDNA-Bank, die durchmustert werden soll, können in diese Vektoren kloniert und in den Hefezellen als Fusionsproteine mit der entsprechenden funktionellen Domänen exprimiert werden. Findet eine Interaktion der beiden Proteine in der Zelle statt, werden die Aktivierungs- und die Bindedomäne in enge räumliche Nähe gebracht, der vollständige Transkriptionsfaktor wird rekonstituiert und die Transkription der Reportergene wird induziert.

Der pGAD-Vektor kodiert die Transaktivierungsdomäne von GAL4 und trägt als Selektionsmarker das Gen *LEU2* (β -Isopropylmalat-Dehydrogenase), das die Leucin-Synthese katalysiert. Der pBD-Vektor kodiert die DNA-Bindedomäne und beinhaltet als Selektionsmarker ein Gen (N-(5'-Phosphoribosyl)-Anthranilat-Isomerase), das die Tryptophan-Synthese katalysiert.

3.3.2 Transformation von Hefen (nach Gietz)

Bei der hier verwendeten Methode nach Gietz et al. (1992) handelt es sich um ein sehr effizientes Verfahren, durch das die Zellen in einem Schritt kompetent gemacht und anschließend direkt mit dem gewünschten Plasmid transformiert werden. In dieser Arbeit wurde der Hefestamm Y190 verwendet. Es wurde eine 10 ml Kultur Y190 in YPD-Medium angeimpft und ÜN bei 30°C inkubiert. Mit 1-2 ml dieser Kultur wurden am nächsten Tag 50 ml YPD-Medium angeimpft (entspricht einer OD₆₀₀ von 0,2) und in etwa vier Stunden bei 30°C bis auf eine OD₆₀₀ von 0,4-0,6 kultiviert. Die Zellen wurden sedimentiert (2000 rpm, 5 min), 2 x mit 1 ml H₂O_{bidest} gewaschen und wieder sedimentiert. Im Anschluß daran wurden die Zellen zunächst 1 x mit 1 ml 1xLiAc/TE gewaschen und endgültig in 1 ml LiAc/TE resuspendiert. Die Zellen waren danach für die Transformation bereit.

Dazu wurde ein Transformationsansatz wie folgt zusammenpipettiert:

<u>Transformationsansatz:</u>	Hefesuspension	50 μ l
	Plasmid-DNA	1 μ g
	Heringssperma-DNA	50 μ g
	1 x PEG-LiAc/TE	300 μ l

Die Heringssperma-DNA, die hier als Carrier-DNA verwendet wird, wurde vor der Verwendung durch 10 minütiges Kochen denaturiert. Der gesamte Ansatz wurde anschließend für 30 min bei 30°C schüttelnd inkubiert und danach einem Hitzeschock von 42°C für 15 min unterzogen. Die Zellen wurden bei 2500 rpm sedimentiert, in 150 μ l TE-

Puffer resuspendiert und auf SD-Agarplatten, ohne die entsprechenden Selektionsmarker (-His, -Leu oder -Trp) ausplattiert. Da im Hefestamm Y190 das *His3* Reporter gen konstitutiv aktiv ist bzw. auch durch geringe unspezifische Interaktionen angeschaltet werden kann, wurde den SD-Platten 30 mM 3-Aminotriazol (3AT) zugegeben. Es handelt sich dabei um einen kompetitiven Inhibitor der Imidazolglyzerinphosphat-Dehydratase, des Produktes des *His3* Reporter gens, der somit die Auxotrophie der Zelle gegenüber Histidin wieder herstellt. Durch Zusatz von 3AT wird das unspezifische Wachstum von Hefekolonien unterdrückt. Die Platten wurden so lange bei 30°C inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von mindestens 1 mm erreicht hatten.

<u>1 x LiAc/TE:</u>	LiAc	100 mM
	TE pH 7,5	10 mM

<u>PEG-LiAc/TE:</u>	LiAc	100 mM
	TE pH 7,5	10 mM
	PEG ₃₃₅₀	40 %

3.3.3 Transformation von Hefen mit einer cDNA-Bank

Zur Transformation der SV52-cDNA-Bank, die aus SV40 transformierten Rattenembryonen-Fibroblasten hergestellt wurde, wurde ein etwas abgewandeltes Protokoll nach Gietz et al (1992) verwendet. Die Abweichung bestand unter anderem darin, dass die mit der Bank zu transformierenden Hefen bereits mit dem gewünschten „Köder“, dem BD-Par-4-Fusionsprotein, wie unter 3.3.2 beschrieben vortransformiert waren.

Zunächst wurde eine 50 ml ÜN-Kultur der vortransformierten Hefen in 500 ml YPD-Medium verdünnt, so dass diese eine OD₆₀₀ von 0,2-0,4 aufwies. Nach ca. 3-4 h schüttelnder Inkubation bei 30°C war eine OD₆₀₀ von 0,5-0,8 der Kultur erreicht. Die Hefesuspension wurde für 10 min bei 3000 rpm sedimentiert, mit 100 ml H₂O_{bidest} gewaschen, in 50 ml LISORB resuspendiert und anschließend 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach einer erneuten Sedimentation (10 min, 3000 rpm) und anschließender Resuspension in 625 µl LISORB auf Eis standen die Zellen für die Transformation mit der cDNA-Bank zur Verfügung. Dafür wurde in einem zweiten Röhrchen Lachs- und Heringssperma DNA (10 min bei 100°C denaturiert) mit LISORB und der cDNA-Bank vermischt und anschließend zu den gekühlten Hefen gegeben. Dieser Ansatz wurde mit PEG-LiAc/TE versetzt und nach gründlichem Mischen für 30 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

<u>Transformationsansatz:</u>	Hefesuspension	625 µl
	cDNA-Bank	80 µg
	Lachs-u. Heringssperma-DNA	je 4 mg
	1 x PEG-LiAc/TE	11,25 ml
	LISORB	800 µl

Das Gemisch wurde dann in einen sterilen 500 ml Glaskolben überführt und für 6 min bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Zur schnelleren Abkühlung nach dem Hitzeschock wurde dem Ansatz 200 ml kaltes SD-Medium (-His, -Trp, -Leu) zugegeben, die Hefen für 10 min bei 3000 rpm sedimentiert und erneut in 100 ml SD-Medium resuspendiert. Um die Transformationseffizienz zu überprüfen, wurden diesem Ansatz 100 µl entnommen und auf eine SD-Agarplatte (-Trp, -Leu) ausgestrichen. Die mit der cDNA-Bank transformierten Hefezellen wurden für 3 h bei 30°C schüttelnd inkubiert, anschließend wie oben sedimentiert, in 6 ml SD-Medium (-His, -Trp, -Leu) resuspendiert und auf SD-Agarplatten (-His, -Trp, -Leu) ausgestrichen (ca. 350 µl/15 cm Ø Platte). Die Platten wurden bis zu zwei Wochen bei 30°C bebrütet, bis sich deutliche Kolonien mit einem Durchmesser von ca. 3 mm zeigten.

<u>LISORB:</u>	LiAc	100 mM
	Tris-HCl pH 8,4	10 mM
	EDTA	1 mM
	Sorbitol	1 M

3.3.4 Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen

Um eine Expression der Fusionsproteine in den Hefezellen nachzuweisen, wurde zunächst eine ÜN-Flüssigkultur in der logarithmischen Phase bei einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 geerntet. 7,5 x OD₆₀₀ dieser Kultur wurden in ein vorgekühltes und halb mit Eis gefülltes 50 ml Polypropylenröhrchen (Falcon) überführt und die Zellen durch Zentrifugation (3000 rpm, 10 min, 4°C) sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet sofort mit 50 ml kaltem H₂O_{bidest} resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Es wurde sofort auf Trockeneis schockgefroren und bei -70°C bis zur endgültigen Verarbeitung gelagert. Die Präparation von Proteinextrakten erfolgte immer mit frisch angesetzttem Aufschlußpuffer, der vor der Verwendung auf 70°C vorgewärmt wurde. Die gefrorenen Hefepellets wurden durch Zugabe von 100 µl vorgewärmtem Aufschlußpuffer pro 7,5 x OD₆₀₀ schnell aufgetaut und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 80 µl Glasperlen (glas beads, acid washed, 425-600 µm, Sigma) überführt und bei 70°C für 10 min inkubiert.

Nach gründlicher Mischung (ca. 1 min) wurden Zelltrümmer und nicht aufgebrochene Zellen durch Zentrifugation (14000 rpm, 5 min) pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Das Zellpellet wurde in 50 µl frischem vorgewärmtem Aufschlußpuffer resuspendiert und 3-5 min bei 95°C inkubiert. Nach erneuter gründlicher Mischung wurden die Zelltrümmer wie zuvor pelletiert und der Überstand mit dem Ersten vereinigt (Gesamthefezelleextrakt 150 µl). Dieser Proteinextrakt wurde sofort auf ein PAA-Gel (3.2.9) aufgetragen und mittels Western Blot analysiert.

<u>Aufschlußpuffer:</u>	Harnstoff	8 M
	SDS	5 % (w/v)
	Tris-HCl, pH 6,8	40 mM
	EDTA	0,1 mM
	Bromphenolblau	0,4 mg/ml
	β-Mercaptoethanol	1 % (v/v)
	Proteaseinhibitorgemisch	1 x

3.3.5 β-Galaktosidasetest

Der β-Galaktosidase-Test (Breedon und Nasmyth, 1985) dient der Identifizierung von Hefeklonen, bei denen eine Aktivierung des Reportergens *lacZ* aufgrund der Rekonstitution des Transkriptionsfaktors GAL4 stattgefunden hat.

Für den Test wurde ein Whatman-Filterpapier in eine Petrischale gelegt und mit 3-4 ml frischem Z-Puffer getränkt. Auf die mit Hefekolonien bewachsenen Agarplatten wurde eine Hybond-C-extra Nitrocellulosemembran (Amersham) gelegt und leicht angedrückt. Sobald die Membran vollständig durchfeuchtet war, wurde sie vorsichtig von der Kulturschale abgezogen und für ca. 10 sek in flüssigem Stickstoff eingefroren. Durch diesen Frier-/Tauzyklus wird die Zellwand der Hefen porös und somit durchlässig für den Farbstoff X-Gal. Danach wurde die Membran bei RT aufgetaut und mit der Kolonieseite nach oben auf das Z-Puffer getränkte Whatman-Filterpapier gelegt. Die Membran wurde anschließend 30 min bis 48 h bei 37°C inkubiert. Die Blaufärbung der Hefekolonien zeigt die Aktivierung des *lacZ*-Gens an.

<u>Z-Puffer (pH 7,0):</u>	Na ₂ HPO ₄	60 mM
	NaH ₂ PO ₄	40 mM
	KCl	10 mM
	MgSO ₄	1 mM
	β-Mercaptoethanol	50 mM
	X-Gal	0,001 %

3.3.6 Plasmidpräparation aus Hefezellen

Um Plasmide aus Hefezellen zu isolieren, wurde zunächst eine 5 ml Übernachtskultur in SD-Medium unter entsprechendem Selektionsdruck angezogen, am nächsten Tag sedimentiert (5 min, 3000 rpm, RT) und in H₂O_{bidest} gewaschen. Um die Zellen zu lysieren konnten sie vorab durch Inkubation in Lyticasepuffer (675 U Lyticase in TE-Puffer) für 30 min bei 37°C protoplastiert werden. Dies war jedoch nur bei schwierigen Präparationen notwendig. Ansonsten wurden die Zellen direkt in 200 µl Lysispuffer aufgenommen. Dieser Suspension wurde ein Volumen von ca. 200 µl Glaskugeln (glas beads, acid washed, 425-600 µm, Sigma) und 200 µl Phenol/Chloroform-Lösung (1:1) zugesetzt und der Ansatz für 2 min intensiv gevortext. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 14000 rpm und RT wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die enthaltenen Plasmide mit 2,5 x Volumen EtOH_{absolut} und 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 gefällt. Es folgte eine Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4°C) und ein Waschschrift mit 70% EtOH. Das Pellet konnte danach in H₂O oder TE-Puffer aufgenommen und direkt für eine Transformation in kompetente Bakterien eingesetzt werden (siehe 3.1.12).

<u>Hefelysispuffer:</u>	Tris-HCl pH 8	10 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA	1 mM
	SDS	1 %
	Triton X-100	2 %
	PMSF	1 mM

3.4 Zellkultur und immunhistochemische Techniken

3.4.1 Kultur von Säugerzellen

Die Kultivierung von Säugerzellen erfolgte bei 37°C entsprechend den Zelllinien in einer 5- oder 10% igen CO₂- Atmosphäre. Zur Passage der Zellen, die als adhärenente Monolayer wachsen, wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen, durch Trypsinbehandlung vom Boden der Kulturschale abgelöst und nach der Zentrifugation (1200 rpm, 5 min) in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:20 in frischem Medium aufgenommen in Abhängigkeit vom geplanten Zeitpunkt der Verwendung und von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. Zur langfristigen Lagerung wurden exponentiell wachsende Zellen nach Trypsinierung in einer Konzentration von 1-2 x 10⁶ Zellen/ml in Einfriermedium (DMEM, 20% (v/v) FCS, 1% (v/v) Pen/Strep, 20% (v/v)

DMSO) aufgenommen und schrittweise (2 h bei -20°C , ÜN bei -70°C) bis zur endgültigen Lagerung in flüssigem Stickstoff (-180°C) eingefroren.

3.4.2 *Transiente Transfektion von Säugerzellen*

Die Transfektion ist eine generelle Bezeichnung für das Verfahren zur Einschleusung von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Man unterscheidet dabei zwischen transienter und stabiler Transfektion. Bei der transienten Transfektion wird die eingeschleuste DNA nach ca. 72-96 h wieder abgebaut, weshalb die Analyse des eingebrachten Gens 24-72 h nach der Transfektion erfolgt. Stabile Transfektionen führen zu einer stabilen Integration der eingeführten DNA in das zelluläre Genom, wodurch eine permanente oder induzierbare Expression des gewünschten Gens erreicht wird.

Für die transiente Transfektion wurden ca. $1,5\text{-}2,5 \times 10^4$ Zellen am Vortag in 24-Loch-Kulturplatten auf Deckgläschen ausplattiert. Zur Transfektion wurde das *JetPEI*-Transfektionsreagenz (Qiagen) verwendet. Es handelt sich dabei um ein lineares Polyethylenimin, das mit der DNA Komplexe bildet, die durch Endozytose von der Zelle aufgenommen werden. Pro Ansatz der 24-Loch-Kulturplatte wurden $0,5 \mu\text{l}$ Reagenz und 250 ng DNA, die jeweils in $12,5 \mu\text{l}$ 150 mM NaCl verdünnt wurden, eingesetzt. Die beiden Lösungen wurden gründlich gemischt, für 30 min bei RT inkubiert und zu $225 \mu\text{l}$ Medium auf den Zellen pipettiert. Der Transfektionsansatz verblieb bis zur Analyse auf den Zellen. Für eine $5 \text{ cm } \varnothing$ Kulturschale wurde der 8 fache und für eine $10 \text{ cm } \varnothing$ Kulturschale der 15 fache Ansatz verwendet.

3.4.3 *Herstellung stabil transfizierter Zelllinien*

Zur Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien wurden die Zellen zunächst wie unter 3.4.2 beschrieben in 24-Loch-Kulturschalen ausplattiert und transfiziert. Nach 48-72 h wurden die Zellen trypsinisiert und je Ansatz auf zwei $10 \text{ cm } \varnothing$ Kulturschalen unter Zugabe des entsprechenden Selektionsantibiotikums ausplattiert. In dieser Arbeit wurden nur Vektoren zur stabilen Transfektion verwendet, die ein Neomycinresistenzgen beinhalten. Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde dem Medium daher zunächst 1 mg/ml Geneticin (G418) zugesetzt. Nach der Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie wurde die G418-Konzentration auf $400 \mu\text{g/ml}$ reduziert. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Die verbliebenen Zellen wurden aber weiterhin unter Selektionsdruck belassen, bis nach einigen Tagen aus einzelnen

transfizierten und resistenten Zellen Klone von 1-3 mm \varnothing herangewachsen waren. Diese wurden mit Hilfe von Klonierungszylindern isoliert und nach Trypsinierung in neue Kulturgefäße überführt. Die Expression des gewünschten Proteins wurde anschließend durch Immunfluoreszenz- oder Western Blot-Analysen überprüft (siehe 3.4.5 und 3.2.10).

3.4.4 Metabolische Markierung von Proteinen in Säugerzellen

Zur metabolischen Markierung von Proteinen wurden die Zellen mit radioaktivem Orthophosphat inkubiert. Die zu markierenden Zellen wurden in der Zellkulturschale zweimal mit TBS gewaschen und 1 h mit 1,5 ml Phosphat-freiem Medium, komplementiert mit dialysiertem FCS, im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 0,3 mCi [^{32}P]-Orthohosphat (10 mCi/ml, Amersham) in das Medium gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Kulturschale verteilt. Die Inkorporation des radioaktiv markierten Phosphates erfolgte während einer Inkubation von 4 h bei 37°C im Brutschrank. Aufgrund des geringen Mediumvolumens wurden die Zellkulturschalen dabei auf einem Schüttler bewegt. Nach der metabolischen Markierung erfolgte die Herstellung von Zellextrakten wie unter (3.2.1) beschrieben.

3.4.5 Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung

24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS⁺ gewaschen und für 20 min in 3% Paraformaldehyd in PBS⁺ fixiert. Alternativ konnte die Fixierung mit Methanol für 5 min bei -20°C durchgeführt werden. Nach einem Waschschrift mit PBS⁺ und einem mit H₂O, wurden die fixierten Zellen direkt eingebettet, oder einer Immunfärbung unterzogen werden.

Immunfluoreszenzfärbung:

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz wurde die subzelluläre Lokalisation von Proteinen in der Zelle nachgewiesen. Die Methode beinhaltet in dieser Arbeit den direkten Nachweis von GFP-Fusionsproteinen (green fluorescent protein) (Pines, 1995) sowie den Antikörpervermittelten Nachweis von Flag-markierten Fusionsproteinen oder Proteinen, für die spezifische Antikörper zur Verfügung standen. Alle Inkubationen wurden bei RT auf einem Schüttler durchgeführt. Es erfolgte zunächst für 1 h eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 5% Magermilchpulver in PBS⁺, das zusätzlich 1% Ziegen Serum und zur Permeabilisierung der Zellemembran 0,1% Triton X-100 enthielt. Anschließend wurden die Zellen 3 x 10 min mit PBS⁺ gewaschen und für 1 h mit 200 μl der Primärantikörperverdünnung in PBS⁺ (0,1% (v/v) Triton X-100, 1% (v/v) Ziegen Serum) inkubiert. Nach drei

weiteren 10 minütigen Waschschritten wurde der Primärantikörper durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (Dianova) nachgewiesen. Die Sekundärantikörperinkubation erfolgte ebenfalls in einem Volumen von 200 µl in PBS⁺ (0,1% (v/v) Triton X-100, 1% (v/v) Ziegen Serum) für 30 min. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit PBS⁺ und einmaligem wässern in H₂O_{bidest} wurden die Deckgläschen dann in Einbettmedium (*PERMAFLUOR Aqueous Mounting Medium*, Immunotech) eingebettet oder die Zellen weiteren Färbungen mit DAPI oder Phalloidin (3.4.7) unterzogen.

Die Fluoreszenzmikroskopische Analyse erfolgte an einem Axiophot Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss) mit entsprechender Filtereinstellung oder einem Konfokalen Axioplan Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss) gekoppelt mit einem Zeiss LSM510.

3.4.6 Dapi- und Propidiumjodid-Färbung der DNA

Der DNA-interkalierende Farbstoff 4', 6'-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI) wurde hier zum spezifischen Anfärben von chromosomaler DNA und somit des Zellkerns verwendet. Diese Methode eignet sich z.B. zu einer Analyse von apoptotischen Zellen anhand morphologischer Merkmale. Dazu wurden fixierte Zellen mit 0,5 µg/ml DAPI (Sigma) in PBS⁺ für 15 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS⁺ für jeweils 10 min wurden die Deckgläschen auf Objektträger eingebettet.

In der Zelle interkaliert Propidiumiodid (PI) in die DNA und wurde hier ebenso wie der Farbstoff DAPI zum spezifischen Anfärben von Zellkernen verwendet. Bei bereits fixierten und permeabilisierten Zellen wurde zunächst eine 30 minütige Inkubation der Zellen bei RT mit 20 µg/ml RNase2000 (Gemisch aus RNaseA und RNaseT1, Roche) vorgenommen, um eine zusätzliche Anfärbung der RNA zu vermeiden. Die PI-Färbung folgte im Anschluß mit einer 0,2 µg/ml Propidiumiodid-Lösung (Sigma) in PBS für 15 min bei RT. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS⁺ für jeweils 10 min und einmaligem Wässern konnten die Deckgläschen auf Objektträger eingebettet werden.

3.4.7 Phalloidinfärbung des Aktin Zytoskeletts

Zur spezifischen Anfärbung von Aktinfilamente in der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde Phalloidin (Sigma), wahlweise gekoppelt an die Fluoreszenzfarbstoffe TRITC oder FITC, verwendet. Phalloidin ist ein Gift des Knollenblätterpilzes, welches mit hoher Affinität an Aktinfilamente bindet, diese stabilisiert und deren Depolymerisation hemmt (Wulf et al., 1979). Zur Färbung wurden die fixierten Zellen zunächst für 5 min mit 0,1 % (v/v)

Triton-X 100 in PBS⁺ bei RT permeabilisiert. Die Färbung erfolgte dann mit 50 ng/ml TRITC-Phalloidin bzw. 500 ng/ml FITC-Phalloidin in PBS⁺ für 15 min. Im Anschluß daran wurden die Zellen 2 x 10 min mit PBS⁺ gewaschen, 1 x gewässert und eingebettet.

3.4.8 Heterokaryon-Assay

Um die Funktionalität eines Kernexportsignals (*nuclear export signal*, NES) und den Transfer eines Proteins zwischen Zellkern und Zytoplasma zu untersuchen, wurde ein Heterokaryon-Assay durchgeführt (Pinol-Roma und Dreyfuss, 1992). Hierzu wurden entweder HeLa Zellen oder stabil transfizierte CHO Zelllinien in einer Dichte von 3×10^5 Zellen auf einer 6-Loch Kulturschale ausplattiert. Die HeLa-Zellen wurden mit den zu untersuchenden Proteinen wie unter 3.4.2 beschrieben transfiziert. Nach 24 h wurde die gleiche Zellzahl NIH-3T3 Zellen oder C2C12 Myoblasten, die zuvor für 45 min in Gegenwart von 75 µg/ml Cycloheximid (Sigma) inkubiert wurden, in das selbe Kulturgefäß ausgesät. Die Zellen wurden in Gegenwart von 75 µg/ml Cycloheximid inkubiert, um die *de novo* Proteinsynthese zu unterbinden. Nach 3,5 h erfolgte die Fusion der Zellen mit 50% PEG₃₃₅₀ in H₂O für 2,5 min. Die Zellen wurden anschließend vorsichtig gewaschen und für weitere 3 h in Anwesenheit von 100 µg/ml Cycloheximid inkubiert. Zur Unterscheidung von murinen und humanen Zellkernen in einer multinukleären Zelle wurden die Zellen nach der Fixierung mit DAPI gefärbt (siehe 3.4.6). Die Analyse erfolgte durch Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie.

3.4.9 Bestimmung der Apoptoserate anhand morphologischer Merkmale

Die Zellen wurden entsprechend dem Versuchsansatz nach den unter 3.4.5 beschriebenen Methoden für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert und einer Kernfärbung unterzogen (3.4.6). Apoptotische Zellen wurden anhand ihrer morphologischen Eigenschaften (fragmentierte Zellkerne, Chromatinkondensation, Blasenbildung der Zytoplasmamembran) identifiziert. Pro Versuchsreihe wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. In jedem Experiment wurden je Ansatz mindestens 200 transfizierte Zellen ausgezählt und der Prozentsatz an apoptotischen Zellen anhand der charakteristischen morphologischen Merkmale bestimmt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Identifizierung von neuen Par-4 Interaktionspartnern

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte nach neuen Par-4 Interaktionspartnern gesucht werden, die möglicherweise in die bis dato weithin unbekanntenen Mechanismen der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose involviert sind. Die methodische Basis bildete das Hefe-Zwei-Hybrid-System, mit dem Protein-Protein Interaktionen charakterisiert werden können. Um Par-4 bei dieser Untersuchung als Köder einzusetzen, wurde die komplette Par-4 Ratten cDNA Sequenz in den pBD-Gal4 Phagemidvektor inseriert (Boosen, 2001). Dieser Vektor wurde zusammen mit einer cDNA-Bank, die aus SV40 transformierten Rattenembryo-Fibroblasten hergestellt und in den pAD-Gal4-Vektor kloniert worden war (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Gockel), in den Hefestamm Y190 transformiert. Aus den Hefekolonien wurde die cDNA der potentiellen Kandidaten isoliert, in Bakterien vermehrt und sequenziert. Gleichzeitig erfolgte zur Kontrolle eine Retransformation der gewonnenen cDNA und ein X-Gal-Test der Hefezellen. Die Klone, die eine positive Interaktion zeigten, wurden im Folgenden eingehender auf RNA-, DNA -und Proteinebene, sowie in der Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

4.1.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (THS)

Das THS (*Two-Hybrid-System*) beruht auf der Tatsache, dass sich eukaryotische Transkriptionsfaktoren in zwei verschiedene funktionelle Domänen einteilen lassen: Die DNA-Bindedomäne und die Transaktivierungsdomäne. Werden diese Domänen in eine enge räumliche Nähe gebracht, so wird der Transkriptionsfaktor rekonstituiert und die Transkription der Reportergene *LacZ* und *His3* initiiert. Wachstum auf Histidin-Mangelnährboden oder eine Blaufärbung einzelner Hefekolonien zeigt somit die Aktivierung der Reportergenexpression an und ermöglicht die Detektion derjenigen Hefeklone, in denen eine Interaktion der transformierten Fusionsproteine stattgefunden hat.

Für den Einsatz eines Proteins im THS ist es erforderlich, die physiologischen Eigenschaften des Proteins zu kennen. Bei Proteinen, die selbst eine transaktivierende Domäne besitzen, muß diese vor dem Einsatz in einem THS deletiert werden, um eine Autotransaktivierung zu verhindern. Um zu untersuchen, ob das Par-4 Protein eine transaktivierende Domäne besitzt, wurde eine Reihe von Kontrolltransformationen durchgeführt. Da eine Autotransaktivierung durch Par-4 mit einer unerwünschten Expression der Reportergene nicht beobachtet wurde,

konnte die vollständige Par-4 cDNA als Köder für die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern eingesetzt werden (Boosen, 2001). Ferner konnte anhand von Western Blot Analysen gezeigt werden, dass das BD-Par-4-Fusionsprotein in den Hefezellen korrekt exprimiert wird (Boosen, 2001). Diese Kontrollversuche zur Autotransaktivierung und Expression des Köderproteins bildeten somit eine sichere Grundlage für den Einsatz des pBD-Gal4-Par-4-Konstruktes im Hefe-Zwei-Hybrid-System.

Für die Transformation der cDNA-Bank in den Hefestamm Y190 wurden Hefezellen verwendet, die bereits mit pBD-Par-4 vortransformiert waren. Die Hefezellen wurden in YPD-Medium ohne Selektionsdruck angezogen, um die Transformationseffizienz zu steigern. In diese vortransformierten Hefezellen wurden wie unter 3.3.2 beschriebenen 80 µg der SV52-cDNA-Bank kotransformiert und auf SD-Agarplatten (-His, -Trp, -Leu) ausgestrichen. Nach zwei Wochen waren auf den SD-Agarplatten mehrere hundert Hefekolonien unterschiedlicher Größe gewachsen. Da durch eine Protein-Protein-Interaktion das Histidin-Reporter gen exprimiert wird und diese Hefekolonien entsprechend einen Wachstumsvorteil aufweisen, wurden 74 der größten Kolonien mit einem Durchmesser von mindestens 3 mm auf eine separate SD-Agarplatte (-His, -Trp, -Leu) überimpft. Nach dem Überimpfen wuchsen 40 der isolierten Hefekolonien an, die im Folgenden für weitere Wachstumstest herangezogen wurden.

Die Hefekolonien wurden einem β -Galaktosidasetest unterzogen, um die Transaktivierung des zweiten Reporter gens zu untersuchen und eine positive Interaktion zu bestätigen. Es zeigte sich hierbei, dass eine Vielzahl der Hefekolonien nur das Histidin-Reporter gen, nicht aber das β -Galaktosidase-Reporter gen exprimierten. Nur 7 der 40 getesteten Hefeklone (Nr. 8, 10, 21, 22, 35, 53, 66) zeigten durch Blaufärbung der Kolonien eine Aktivierung des zweiten Reporter gens an. Diese 7 Hefeklone, die aufgrund einer positiven Interaktion von Par-4 mit potentiellen Bindungspartnern eine Aktivierung beider Reporter gene zeigten, wurden ausgewählt und für weitere Analysen herangezogen.

4.1.1.1 Analyse der potentiellen Par-4 Interaktionspartner

Um die potentiellen Interaktionspartner von Par-4 zu identifizieren und genauer zu charakterisieren, wurden die im THS transformierten Plasmide aus den Hefezellen isoliert und in kompetente Bakterienzellen transformiert. Die aus den Bakterien isolierten Plasmide wurden zunächst mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* verdaut, da die cDNA-Bank über diese beiden Restriktionsschnittstellen in den pAD-Gal4-Vektor kloniert worden war. Die cDNA-Sequenzen aus dem pAD-Gal4 Plasmid konnten somit anhand dieses

Restriktionsverdau vollständig ausgeschnitten werden. Diese Restriktionsanalyse ermöglichte es, die Größe der inserierten cDNA zu bestimmen und diejenigen Bakterienklone zu identifizieren, die nur mit dem eingesetzten Köderplasmid pBD-Gal4-Par-4 transformiert waren. Alle Plasmide, die das Restriktionsmuster des pBD-Par-4 Plasmids aufwiesen, wurden verworfen und keinen weiteren Analysen unterzogen. Wiesen die Plasmide nach dem Restriktionsverdau jedoch andere Fragmente als bei der Restriktion des Vektors pBD-Gal4-Par-4 auf, wurden weitere Restriktionsanalysen mit den Enzymen *BglI* + *BglIII*, *DraI* und *SmaI* durchgeführt. Aufgrund eines identischen Restriktionsmusters und einer identischen Insertgröße von 850 bp wurde vermutet, dass die Hefeklone Nr. 8, 10, 21, 22 und 35 die gleiche cDNA-Sequenz aufwiesen. Die anderen beiden Hefeklone (Nr. 53 und 66) unterschieden sich von diesen sowohl in der Insertgröße, als auch in ihrem Restriktionsmuster. Zur Identifizierung der isolierten cDNA-Sequenzen wurden insgesamt fünf Klone (Nr. 8, 10, 35, 53 und 66) sequenziert. Die vergleichenden Analysen mit Hilfe des Analyse-Programms „megablast“ von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zeigten, dass die cDNA-Sequenz der Hefeklone Nr. 8, 10 und 35 eine 99%-ige Homologie zu der cDNA des Proteins Amida der Spezies *rattus norvegicus* (Datenbank-Zugangsnummer AB030495) aufwiesen. Jedoch enthielt nur Klon Nr. 8 die vollständige cDNA-Sequenz von Amida. Den anderen beiden Klonen (Nr. 10 und 35) fehlten im 5'-Bereich jeweils 5 Basen, einschließlich des Startcodons. Daher wurde Klon Nr. 8 für weitere Klonierungen und Analysen ausgewählt. Klon Nr. 53 enthielt eine 663 bp lange cDNA-Sequenz, die eine 89%-ige Homologie zu einem nicht näher benannten oder charakterisierten Protein der Spezies *mus musculus* mit der Datenbank-Zugangsnummer NM_134105 aufwies. Klon Nr. 66 enthielt ein cDNA-Insert von 1586 Basenpaaren, die mit den Basen 537-2122 der Par-4 cDNA aus der Spezies *rattus norvegicus* (Datenbank-Zugangsnummer U05989) übereinstimmten. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ausschließlich mit dem neuen Par-4 Interaktionspartner Amida weiter gearbeitet, obwohl auch die anderen potentiellen Interaktionspartner interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen darstellten.

4.1.2 Amida als Interaktionspartner von Par-4

Amida wurde ursprünglich aus einer Ratten-Hippocampus cDNA-Bank als ein Interaktionspartner des Gehirn-spezifischen „immediate early gene“ Arc (*Activity regulated cytoskeleton associated protein*) isoliert, das die Plastizität von Dendriten durch zytoskelettäre Veränderungen reguliert (Lyford et al., 1995). Für Amida wurde, im Gegensatz zu Arc, eine pro-apoptotische Funktion nachgewiesen (Irie et al., 2000). Aufgrund dieser Aktivität wurde

das Protein nach der buddhistischen Gottheit „Amida“ benannt, die zu den Sterbenden kommt und ihnen einen angenehmen Tod bereitet und das Erreichen des Paradieses ermöglicht. Die Amida cDNA enthält ein offenes Leseraster von 780 Nukleotiden, die für ein 259 AS großes Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 43 kDa kodieren. Amida besitzt zwei neuartige Kernlokalisationssignale (NLS1 + NLS2), die durch eine hohe Anzahl an Argininresten anstatt Lysinresten gekennzeichnet sind. Bei der Sequenzanalyse der Amida cDNA wurde eine putative α -helikale coiled-coil region (CC) zwischen den Aminosäuren 79 und 108 identifiziert, die möglicherweise eine Protein-Protein-Interaktion vermitteln kann. Die Proteindomänenstruktur von Amida ist in Abbildung 5A schematisch dargestellt. Überexprimiertes Amida ist in Cos-7 Zellen nukleär lokalisiert und löst nach 72 h Apoptose aus (Irie et al., 2001). Eine Überexpression von Arc kann diesem pro-apoptotischen Effekt von Amida jedoch entgegen wirken. Des Weiteren haben neuere Studien gezeigt, dass Amida an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist (Gan et al., 2003). Eine Überexpression von Amida führt zu einem Zellzyklusarrest in der S-Phase, der den Eintritt in die Mitose verhindert. In diesem Zusammenhang wurde Amida als ein Substrat der Zyklin-abhängigen Kinase cdc2 und als ein DNA-bindendes Protein beschrieben (Gan et al., 2003). Amida scheint abhängig vom Zelltyp, seiner subzellulären Lokalisation und seinen verfügbaren Interaktionspartnern, verschiedene Funktionen innerhalb der Zelle wahrnehmen zu können. Da aber sowohl Amida als auch Par-4 eine deutliche pro-apoptotische Aktivität aufweisen, wurde in dieser Arbeit ein Schwerpunkt auf die Untersuchung des Einflusses von Amida auf die Par-4-induzierte Apoptose und das Zusammenspiel dieser beiden Proteine gelegt.

4.1.2.1 Retransformationskontrolle und Kartierung der Interaktionsdomänen im THS

Um die Interaktion von Par-4 und seinem potentiellen Interaktionspartner Amida zu verifizieren, und um die Interaktionsdomänen beider Proteine zu kartieren, wurde eine Retransformationskontrolle mit den Wildtyp Proteinen und verschiedenen Deletionsmutanten durchgeführt.

Wie schematisch in der Abbildung 5A dargestellt ist, besitzt das Wildtyp Par-4 Protein neben zwei Kernlokalisationssignalen (NLS1 + NLS2) eine sogenannte Todesdomäne (*death domain*, DD) und innerhalb dieser Struktur ein Leucin-Zipper-Motiv, das Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann. Da alle bisher beschriebenen Interaktionspartner von Par-4 im C-terminalen Teil des Proteins binden, wurde zur Kartierung der Interaktionsdomäne neben den Par-4 Deletionsmutanten Δ C1-233 und Δ C1-266 (Vetterkind et al., 2003a) auch eine

Leucin-Zipper-Punktmutante (Par-4 L3) verwendet, bei der die drei Leucinreste (L295, L316, L330) in der α -helikalen Struktur zu Alaninresten ausgetauscht wurden (Koplin, 2004). Alle Par-4 Mutanten wurden als pBD-Gal4-Fusionsproteine im Hefe-Zwei-Hybrid-System eingesetzt. Zur Kartierung der Interaktionsdomäne von Amida wurden die zwei pBD-Gal4-Amida-Deletionsmutanten Amida Δ C1-110 und Amida Δ N113-259 mit Hilfe der Oligonukleotide „5'AmidaBglIII“ und „3'AmidaBamHI311rev“ sowie „5'AmidaEco299for“ und „3'AmidaBamHI“ hergestellt, wobei die coiled-coil Struktur bei der Mutante Amida Δ N113-259 deletiert wurde. Sowohl das 356 bp lange PCR-Produkt der Mutante Amida Δ C1-110 als auch das 459 bp lange PCR-Produkt der Mutante Amida Δ N113-259 wurden mit *EcoRI* und *BamHI* verdaut und in den pGAD424 Vektor kloniert (siehe Abb. 5A). Als Positivkontrolle in der Retransformationkontrolle diente der bereits bekannte Interaktionspartner pBD-Dlk und das pAD-Par-4 Plasmid (Page et al., 1999). Als Negativkontrollen wurden der Vektor pBD-Par-4 mit dem leeren Vektor pGAD424 und der Vektor pAD-Amida mit dem leeren Vektor pBD-Gal4 kotransformiert (siehe Schema in Abb. 5B). Eine positive Interaktion wurde durch ein Wachstum der Kolonien auf Histidin-Mangelnährboden angezeigt. Die Kotransformationsansätze der verschiedenen Plasmide sind dem Transformationsschema in Abbildung 4B zu entnehmen.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, die in Abbildung 5B dargestellt sind, dass Amida nur mit Par-4 wt und nicht mit den Deletionsmutanten Δ C1-233 und Δ C1-266 interagieren kann, bei denen der Leucin-Zipper und die überlappende Todesdomäne deletiert wurde. Auch die Hefezellen, die mit pAD-Amida und der Leucin-Zipper-Punktmutante pBD-Par-4 L3 transformiert waren, zeigten keinerlei Wachstum auf Histidin-Mangelnährboden, was darauf hindeutet, dass die Interaktion mit Amida durch den Leucin-Zipper von Par-4 vermittelt wird. Die Deletionsmutante pBD-Amida Δ N113-259 zeigte eine positive Interaktion mit pAD-Par-4 wohingegen die Mutante pBD-Amida Δ C1-110 nicht dazu in der Lage war. Dies zeigt, dass die Deletion des C-Terminus von Amida die Interaktion mit Par-4 vollständig verhindert. Die Negativkontrollen aus den Vektoren pAD-Amida und pBD-Par-4 zusammen mit den leeren Vektoren pBD-Gal4 und pGAD424 konnten die Aktivierung der Reportergene nicht auslösen. Die Ergebnisse demonstrieren, dass die coiled-coil-Struktur im Amidaprotein keinen Einfluss auf die Interaktion von Par-4 und Amida hat. Es handelt sich bei Amida um einen neuen spezifischen Interaktionspartner von Par-4 und die Interaktion beider Proteine wird über den Leucin-Zipper von Par-4 und den C-Terminus von Amida vermittelt. Die Ergebnisse der Retransformation konnten in einem β -Galaktosidasetest bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

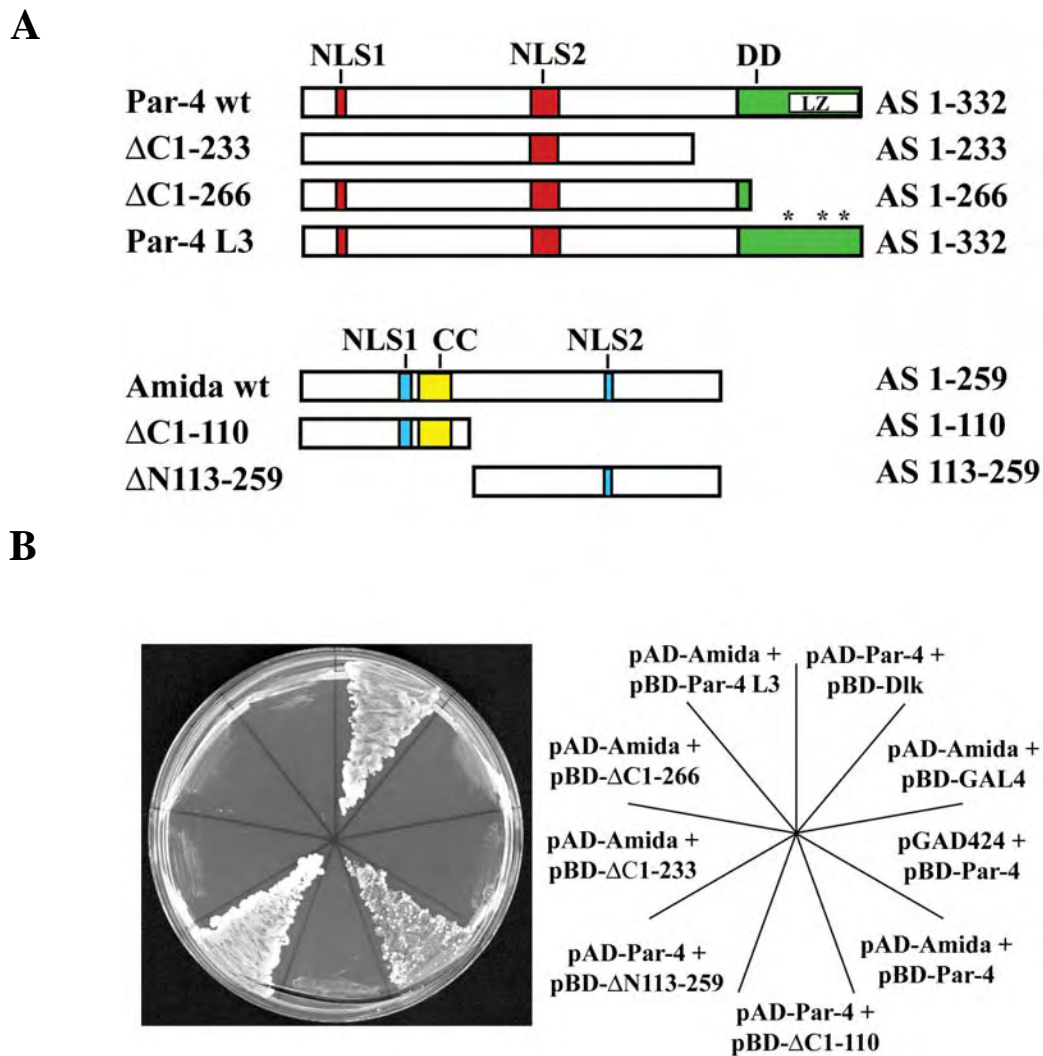


Abb. 5: Retransformationskontrolle und Kartierung der Interaktionsdomänen von Amida und Par-4. **(A)** Schematische Darstellung der Proteindomänenstruktur von Par-4 und Amida. Die Konstrukte wurden als Fusionsproteine mit der Gal-4-Aktivierungsdomäne (**AD**) oder der Gal-4-Bindedomäne (**BD**) exprimiert. Par-4 wt besteht aus 332 Aminosäuren. Im N-terminalen Teil des Par-4 Proteins befinden sich zwei Kernlokalisationssequenzen (**NLS1** und **NLS2**), die sich über die Aminosäuren 20-25 und 137-153 erstrecken. Im C-Terminus von Par-4 befindet sich eine Todesdomäne (**DD**), die die Aminosäuren 258-332 überspannt und die mit einem Leucin-Zipper (**LZ**, AS 292-332) überlappt. Die C-terminalen Deletionsmutanten Δ C1-233 und Δ C1-266 bestehen aus den Aminosäuren 1-233 bzw. 1-266. Die Leucin-Zipper-Punktmutante Par-4 L3 enthält drei Punktmutationen, bei denen Leucinreste zu Alaninresten ausgetauscht wurden (L295A, L316A, L330A, durch Sterne markiert). Amida besteht aus 259 Aminosäuren und besitzt zwei Kernlokalisationssequenzen (**NLS1**, AS 68-75 und **NLS2**, AS 190-192). Das Protein besitzt im N-Terminus eine putative coiled-coil-Region (**CC**), die sich über die Aminosäuren 79-108 erstreckt. Die Deletionsmutanten Amida Δ C1-110 und Amida Δ N113-259 bestehen aus den Aminosäuren 1-110 bzw. 113-259. **(B)** Hefezellen des Stammes Y190 wurden mit den im Schema auf der rechten Seite dargestellten Konstrukten transformiert und auf Histidin-freiem Nährboden kultiviert. Das Wachstum der Hefezellen zeigt eine Aktivierung des His-Reportergens und damit eine Interaktion an. Als Negativkontrollen wurden die Vektoren pBD-Par-4 und pAD-Amida mit den leeren Hefevektoren kotransfiziert. Als Positivkontrolle diente die Transformation von pAD-Par-4 mit pBD-Dlk.

4.1.2.2 Expressionsanalyse von Amida auf RNA-Ebene

Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits zwei Originalarbeiten über Amida erschienen, die Daten zur Expression von Amida auf RNA-Ebene in verschiedenen Rattengeweben enthielten. Es bestand jedoch eine erhebliche Diskrepanz zwischen der Arbeit von Irie et al. (2000), die Amida als ubiquitär exprimiertes Transkript mit der stärksten Expression im Gehirn beschrieben haben und der Arbeit von Gan et al. (2001), die eine sehr starke Expression des Amidatranskriptes in Hodengewebe und nur eine sehr schwache Expression im Gehirn beschrieben haben. Aufgrund dieser Diskrepanz wurde auch im Rahmen dieser Doktorarbeit das Expressionsmuster von Amida in verschiedenen Rattengeweben durch Northern Blot-Analyse mittels einer kommerziell erworbenen Multi-Gewebe Northern Blot-Membran (Clontech) untersucht. Die verwendete Northern Blot-Membran enthielt jeweils 2 µg gelelektrophoretisch aufgetrennte mRNA der Gewebe Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Hoden. Die Membran wurde mit einer [³²P]-α-dCTP markierten Sonde, die die vollständige Amida cDNA umfasste, hybridisiert. Zum Mengenabgleich der aufgetrennten mRNA diente hier eine erneute Hybridisierung der Membran mit einer GAPDH-Sonde (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase).

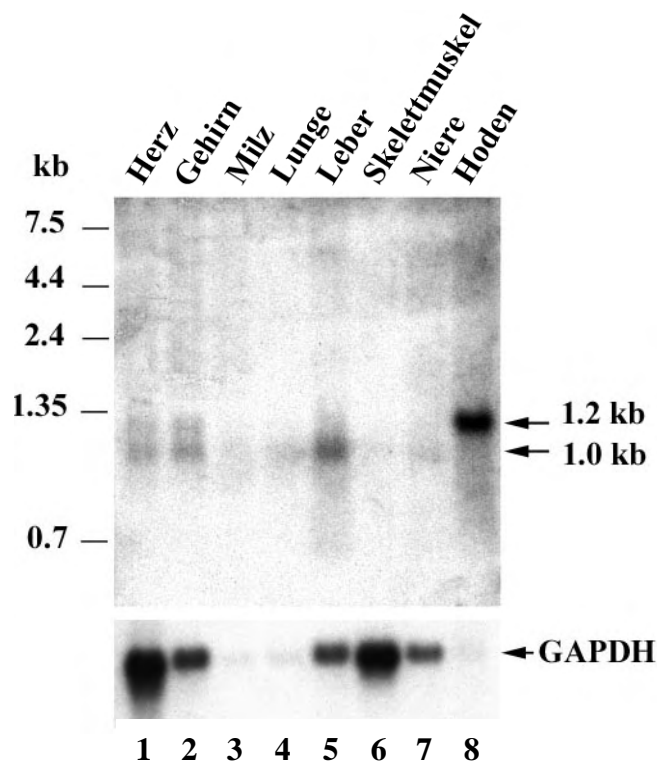


Abb. 6: Northern-Blot-Analyse der Amida-Expression in verschiedenen Gewebetypen der Ratte. Eine kommerziell erhältliche Northern Blot-Membran (Clontech), auf der je 2 µg mRNA aus verschiedenen Rattengeweben aufgetrennt worden sind, wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde der vollständigen Amida cDNA hybridisiert (oben). Eine erneute Hybridisierung der Membran mit einer GAPDH-Sonde diente als Mengenabgleich (unten). Spur 1, Herz; Spur 2, Gehirn; Spur 3, Milz; Spur 4, Lunge; Spur 5, Leber; Spur 6, Skelettmuskel; Spur 7, Niere; Spur 8, Hoden.

Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, treten zwei Transkripte von Amida mit einer Größe von etwa 1,0 und 1,2 kb in den Geweben auf. Das 1,0 kb Transkript ist am stärksten in der Leber vertreten (Abb. 6, Spur 5), weniger stark in Herz und Gehirn (Abb. 6, Spur 1, und 2) und wird in Milz, Lunge, Skelettmuskel, Niere und Hoden nur sehr schwach exprimiert (Abb. 6, Spur 3, 4, 6, 7, 8). Das größere Transkript von 1,2 kb wird besonders stark in Hodengewebe exprimiert (Abb. 6, Spur 8), aber ein schwächeres Signal wird auch in Herz, Gehirn und Leber detektiert (Abb. 6, Spur 1, 2, 5). In Milz, Lunge, Skelettmuskel und Niere ist es dagegen kaum nachzuweisen (Abb. 6, Spur 3, 4, 6, 7). Es ist jedoch bei diesen Ergebnissen zu beachten, dass die exprimierten Mengen der Transkripte nur sehr schwer abzuschätzen sind, da GAPDH, das als Haushaltsgen eigentlich in allen Geweben in gleichen Mengen auftritt, in diesem Northern Blot starke Expressionsunterschiede in den verschiedenen Geweben aufweist.

4.1.2.3 *In vitro* Transkription/Translation von Amida

Um die korrekte Translation der isolierten Amida cDNA zu überprüfen, wurde die cDNA zunächst mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* aus dem pAD-Gal4-Vektor ausgeschnitten und in den pCMV-Tag 2B Vektor (Stratagene) stromabwärts des T3-Promotors kloniert. Dies ermöglichte ein Ablesen der Amida cDNA durch die T3-Polymerase des verwendeten TNT-Kits (Promega). Die Transkriptions-/Translationsreaktion wurde wie unter 3.2.5 beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis war ein Proteinprodukt, das in der SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht von ca. 43 kDa aufwies (Abb. 7, Spur 1). Die Größe des Produktes stimmte somit nicht mit der vorhergesagten Molekularmasse von ca. 30 kDa überein, korrelierte jedoch mit den Daten von Irie et al. (2000), die das veränderte Laufverhalten in der SDS-PAGE durch einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren im Amida Protein erklären.

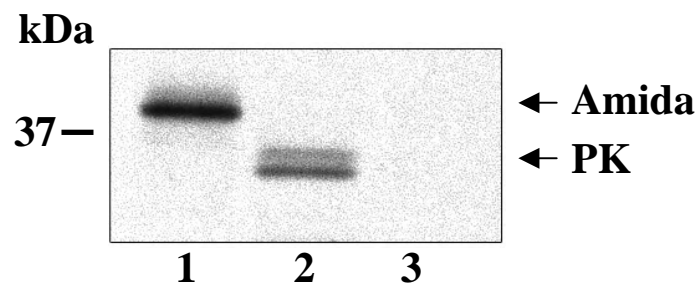


Abb. 7: *In vitro* Transkription/Translation von Amida. Die Amida cDNA wurde stromabwärts des T3-Promotors in den pCMV-TAG 2B Vektor kloniert und mit Hilfe eines Retikulozytenextraktes *in vitro* transkribiert und translatiert (Spur 1). Als Positivkontrolle (PK) diente ein pCMV-TAG 2B-cDNA-Konstrukt, das in der SDS-PAGE ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa aufweist (Spur 2). Als Negativkontrolle wurde der leere pCMV-TAG 2B Vektor eingesetzt (Spur 3).

4.1.2.4 *in vitro* Bindungsstudien

Um die Komplexbildung von Amida und Par-4 genauer zu untersuchen, wurde ein *in vitro* GST-Bindungstest durchgeführt. Dazu wurde zunächst das 1,4 kb *EcoRI*-Fragment der Par-4 cDNA in den Vektor pEGFP-C1 kloniert und von dort über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *XhoI* in den prokaryotischen Expressionsvektor GEX-6T subkloniert. Zur heterologen Expression des Par-4 Proteins wurde der Vektor pGEX-6T-Par-4 in *E.coli* transformiert, und das exprimierte Par-4-GST-Fusionsprotein über eine Glutathion-Sepharose-Chromatographie gereinigt. Die Sepharose-Matrix wurde vor dem Bindungsexperiment mit unmarkiertem Zellextrakt vorinkubiert, um die unspezifische Bindung von Amida an die Matrix zu unterbinden. Anschließend wurde gereinigtes GST oder GST-Par-4 auf der Matrix immobilisiert, so dass sie als Affinitätsmatrix für [³⁵S]-markiertes *in vitro* translatiertes Amida dienen konnte. Nach der Kopplung wurde stringent gewaschen, um unspezifisch gebundenes Amida zu entfernen. In diesem Experiment konnte eine eindeutige Bindung zwischen GST-Par-4 und Amida gezeigt werden (Abb. 8, Spur 3), wohingegen GST alleine, das in diesem Experiment als Negativkontrolle diente (Abb. 8, Spur 2) nicht in der Lage war, an Amida zu binden. In Abb. 8, Spur 1 wurde 1/10 des eingesetzten [³⁵S]-markierten *in vitro* translatierten Amida Proteins als Größenstandard aufgetragen.

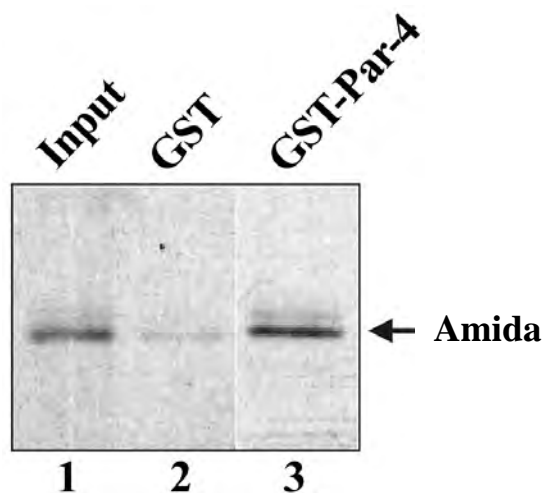


Abb. 8: *In vitro* Bindung von Amida an GST-Par-4. Par-4 wurde als GST-Fusionsprotein exprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und als Affinitätsmatrix für [³⁵S]-Methionin-markiertes Amida verwendet. GST alleine fungierte als Negativkontrolle (Spur 2). 1/10 des Translationsansatzes dienten als Größenstandard (Spur 1). Die Proben wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Fluorographie.

4.1.2.5 Koimmunpräzipitation von Amida und Par-4

Um die Interaktion von Par-4 und Amida nachzuweisen und die Ergebnisse der bisherigen Bindungsstudien zu bestätigen, wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die Amida cDNA zunächst in einen GFP-Expressionsvektor kloniert. Ein 805 bp langes Amida Fragment wurde mit den Oligonukleotiden „5'Amida-BgIII“ und „3'Amida-BamHI“ hergestellt und über die in den Oligonukleotiden enthaltenen Restriktionsschnittstellen *BgIII* und *BamHI* in den Vektor pEGFP-C1 (Clontech) kloniert. Dieser Vektor wurde anschließend dazu verwendet, eine CHO-Zelllinie zu etablieren, in der das GFP-Amida Konstrukt stabil exprimiert wurde.

Für den Nachweis der *in vivo* Interaktion von Amida und Par-4 wurde die GFP-Amida exprimierende CHO Zelllinie mit FLAG-Par-4 oder als Kontrolle mit leerem FLAG-2B-Vektor transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Herstellung der Zellextrakte und die Immunpräzipitation der Proteine mit dem polyklonalen Kaninchen anti-GFP Antikörper (Clontech) oder dem monoklonalen Maus anti-FLAG M2 Antikörper (Stratagene). Die präzipitierten Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte entweder mit dem polyklonalen Kaninchen anti-Par-4 Antikörper (Santa Cruz) oder mit einem monoklonalen Maus anti-GFP Antikörper (Clontech).

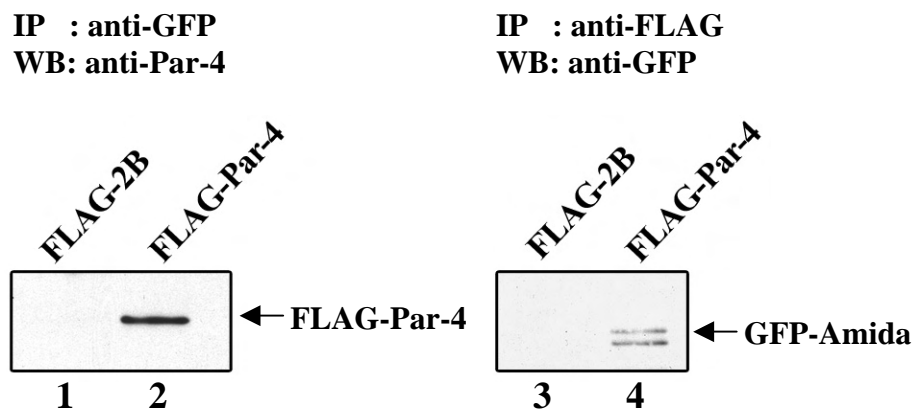


Abb. 9: Koimmunpräzipitation von GFP-Amida und FLAG-Par-4. Eine stabil GFP-Amida exprimierende CHO-Zelllinie wurde mit FLAG-Par-4 (Spur 2 und 4) oder mit leerem FLAG-Vektor als Kontrolle transfiziert (Spur 1 und 3). 48 h nach der Transfektion wurden Zellextrakte gewonnen und diese einer Immunpräzipitation mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper (Spur 1 und 2) oder einem monoklonalen anti-FLAG M2 Antikörper (Spur 3 und 4) unterzogen. Die Proteine wurde in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot mittels eines polyklonalen anti-Par-4 Antikörpers (Spur 1 und 2) oder eines monoklonalen anti-GFP Antikörpers (Spur 3 und 4) immunologisch detektiert.

Wie dem Ergebnis in Abbildung 9 zu entnehmen ist, wurde aus den GFP-Amida-transfizierten Zellen mit dem anti-GFP Antikörper ein 48 kDa Protein kopräzipitiert, dessen Größe dem FLAG-Par-4 Fusionsprotein entsprach und das von dem anti-Par-4 Antikörper spezifisch im Western Blot detektiert wurde (Abb. 9, Spur 2). In den Zellen, die nur mit dem leeren FLAG-Vektor transfiziert waren, konnte diese Bande nicht detektiert werden (Abb. 9, Spur 1). Wurde andererseits FLAG-Par-4 mit dem anti-FLAG Antikörper präzipitiert, konnte ein 68 kDa Protein kopräzipitiert werden, das dem GFP-Amida-Fusionsprotein entsprach und spezifisch von dem verwendeten anti-GFP Antikörper detektiert wurde (Abb. 9, Spur 4). Das Protein konnte auch hier nur in den Präzipitaten von Par-4 transfizierten Zellen, nicht aber in den mit leerem FLAG-Vektor transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 9, Spur 3).

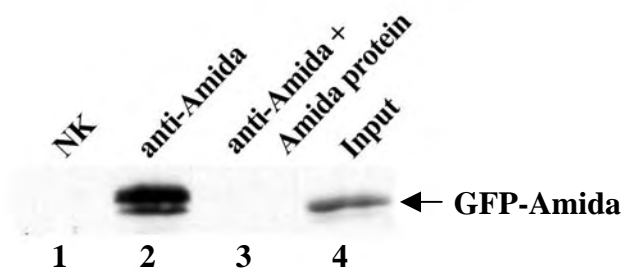
Da bisher nur die Interaktion von überexprimiertem Amida und Par-4 nachgewiesen wurde, folgte im nächsten Schritt eine nähere Analyse der Interaktion zwischen den endogenen Proteinen. Dazu wurde ein polyklonaler Kaninchen anti-Amida Antikörper unter Verwendung von rekombinantem gereinigtem His-Amida wt Protein (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jan Kubicek, Forschungszentrum Jülich) hergestellt (Pineda). Die Kontrollen zur Spezifität des Antikörpers sind in Abbildung 10A dargestellt. Der anti-Amida Antikörper präzipitierte spezifisch das GFP-Amida-Fusionsprotein aus Zellextrakten der stabil GFP-Amida exprimierenden CHO-Zellen (siehe Abb. 10A, Spur 2). Im Gegensatz dazu war ein Kontroll-IgG, nicht in der Lage das GFP-Amida Fusionsprotein zu präzipitieren (Abb. 10A, Spur 1). Die Spezifität des Antikörpers wurde weiterhin durch die Inhibition mit gereinigtem His-Amida-Protein demonstriert. Wurde dieses gereinigte Protein als kompetitiver Inhibitor des Amida Proteins für eine IP mit Zellextrakten der stabil GFP-Amida exprimierender CHO Zellen eingesetzt, konnte es durch spezifische Bindung an den anti-Amida Antikörper die Präzipitation von GFP-Amida aus dem Zellextrakt durch den anti-Amida Antikörper vollständig verhindern (siehe Abb. 10A, Spur 3).

Um die Interaktion von endogenem Amida mit endogenem Par-4 zu überprüfen, wurde der anti-Amida Antikörper für eine Immunpräzipitation mit Zellextrakt von REF52.2, E14-2 und NIH-3T3 Zellen eingesetzt, von denen bekannt war, dass sie sowohl Amida als auch Par-4 in ausreichender Menge exprimieren. Als Negativkontrolle diente ein Ziegen-Kontrollserum. Die Präzipitate wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot unter Verwendung des polyklonalen anti-Par-4-Antikörpers analysiert. Die Ergebnisse in Abbildung 10B zeigten, dass bei allen getesteten Zelllinien zusammen mit endogenem Amida auch endogenes Par-4 kopräzipitiert werden konnte (siehe Abb. 10B, Spur 1, 4, 7),

wohingegen kein Par-4 Protein in den Negativkontrollen zu erkennen war (vgl. Abb. 10B, Spur 2, 5, 8). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der Komplexbildung von Amida und Par-4 um eine spezifische Interaktion handelt, die weder auf Ratten Zellen noch auf Fibroblasten beschränkt ist. Zusätzlich zu den Präzipitaten wurde der „Input“ aufgetragen, der aus jeweils 20 µg des Gesamtzellextraktes bestand und der als Größenstandard für die präzipitierten Proteine verwendet wurde (Abb. 10B, Spur 3, 6, 9).

A

IP : anti-Amida
WB: anti-GFP



B

IP : anti-Amida
WB: anti-Par-4

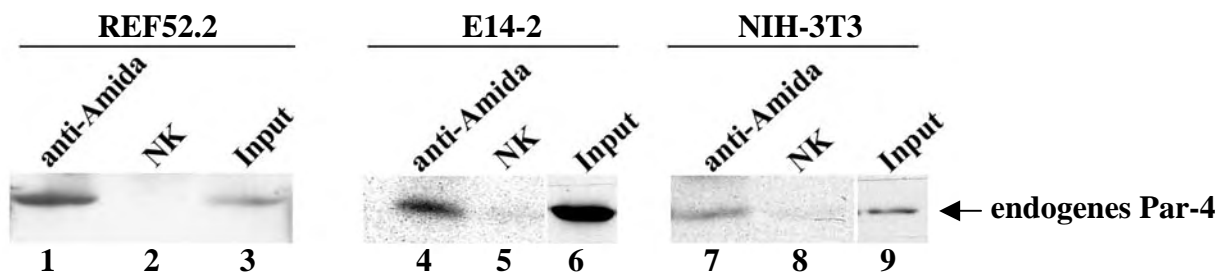


Abb. 10: Koimmunpräzipitation von endogenem Par-4 und Amida. **(A)** Zellextrakte aus stabil GFP-Amida exprimierenden CHO Zellen wurden für eine Immunpräzipitation mit einem polyklonalen anti-Amida Antikörper (Spur 2 und 3) oder einem Ziegen-Kontrollserum (NK, Spur 1) eingesetzt. Nach der Auftrennung der Proteine in einer 10%igen SDS-PAGE folgte ein Western Blot und die immunologische Detektion der Proteine mittels eines monoklonalen anti-GFP Antikörpers (Spur 1-4). Der Input (Spur 4) beträgt 20 µg des Gesamtzellextraktes und diente hier als Größenstandard. In Spur 3 wurde dem anti-Amida Antikörper zusätzlich zum Zellextrakt rekombinantes Amida Protein als Kompetitor hinzugefügt. **(B)** Zellextrakte von REF52.2 Zellen (Spur 1-3), E14-2 Zellen (Spur 4-6) und NIH-3T3 Zellen (Spur 7-8) wurden für eine Immunpräzipitation mit polyklonalem anti-Amida Antikörper (Spur 1, 4, 7) oder Ziegen-Kontrollserum (NK, Spur 2, 5, 8) eingesetzt. Die Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und kopräzipitiertes Par-4 wurde im Western Blot mit einem polyklonalen anti-Par-4 Antikörper nachgewiesen. Der „Input“ repräsentiert 20 µg des Gesamtzellextraktes als Größenstandard (Spur 3, 6, 9).

4.1.2.6 Expression von Amida in Säugerzellen

Amida ist nach Überexpression in Cos-7 Zellen als ein nukleär lokalisiertes Protein beschrieben worden (Irie et al., 2000). Um die subzelluläre Lokalisation des Proteins auch in den hier verwendeten Rattenfibroblasten zu überprüfen, wurden REF52.2 Zellen mit GFP-Amida transient transfiziert, nach 24 h bzw. 48 h fixiert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Wie in Abb. 11A zu erkennen ist, zeigte Amida nach Expression in REF52.2 Zellen keine ausschließlich nukleäre Lokalisation (N), sondern in 19,9% bzw. 37,7% der Fälle nach 24 h bzw. 48 h eine nukleo-zytoplasmatische Verteilung (N/Z).

Die mikroskopische Analyse der Zellen ergab weiterhin, dass GFP-Amida in den REF52.2 Zellen häufig in punktförmigen Strukturen im Zellkern akkumulierte. Um diese Strukturen zu identifizieren, wurde eine Koimmunfluoreszenzfärbung der GFP-Amida transfizierten Zellen mit verschiedenen nukleären Markern durchgeführt, die in Kerndomänen wie z.B. Splicingzentren, Replikationszentren oder nukleären Körperchen lokalisiert sind (Abb. 11B). Zunächst wurde eine Kolokalisation von GFP-Amida (Abb. 11Ba) und dem „promyelocytic protein“ (PML) untersucht (Abb. 11Bb), das im Zellkern in PML nukleären Körperchen (PML-NBs) oder auch POD`s (PML oncogenic domains) lokalisiert ist. Diese Domänen stellen Multiprotein Komplexe dar, die neben PML eine Vielzahl an Proteinen beinhalten, die an apoptotischen, Proliferations-, Alterungs- und Splicingprozessen beteiligt sind. Die GFP-Amida transfizierten Zellen wurden mit einem monoklonalen anti-PML Antikörper angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Überlagerung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigte eine eindeutige Kolokalisation von GFP-Amida und PML (Abb. 11Bc). Im Gegensatz dazu konnte keine Kolokalisation von GFP-Amida und dem SC35 Protein nach Immunfärbung mit einem monoklonalen anti-SC35 Antikörper beobachtet werden (Abb. 11Bf), das in Splicingzentren im Kern lokalisiert ist (Fu und Maniatis, 1990). Amida konnte somit als eine neue Komponente der PML-NBs identifiziert werden.

Nur eine begrenzte Anzahl der in den PML-NBs akkumulierten Proteinen geht eine direkte und funktionelle Interaktion mit dem PML-Protein ein. PML selbst fungiert *in vivo* als ein Tumorsuppressor und wurde als ein wichtiger Vermittler verschiedener apoptotischer Signalwege beschrieben (Wang et al., 1998a,b). Um nicht nur die Kolokalisation von Amida mit PML, sondern auch eine mögliche direkte Interaktion der beiden pro-apoptotischen Proteine näher zu analysieren, wurde zunächst die PML cDNA (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H. de Thé) mit *EcoRI* aus dem Vektor pSG5-PML ausgeschnitten und in den pCMV-Tag 2B Expressionsvektor subkloniert. Anschließend wurden die stabil GFP-Amida exprimierenden CHO Zellen mit dem FLAG-PML Konstrukt transfiziert und 24 h

nach der Transfektion Zellextrakte hergestellt, die für eine Immunpräzipitation mit dem monoklonalen anti-FLAG Antikörper eingesetzt wurden. Die präzipitierten Proteine wurden

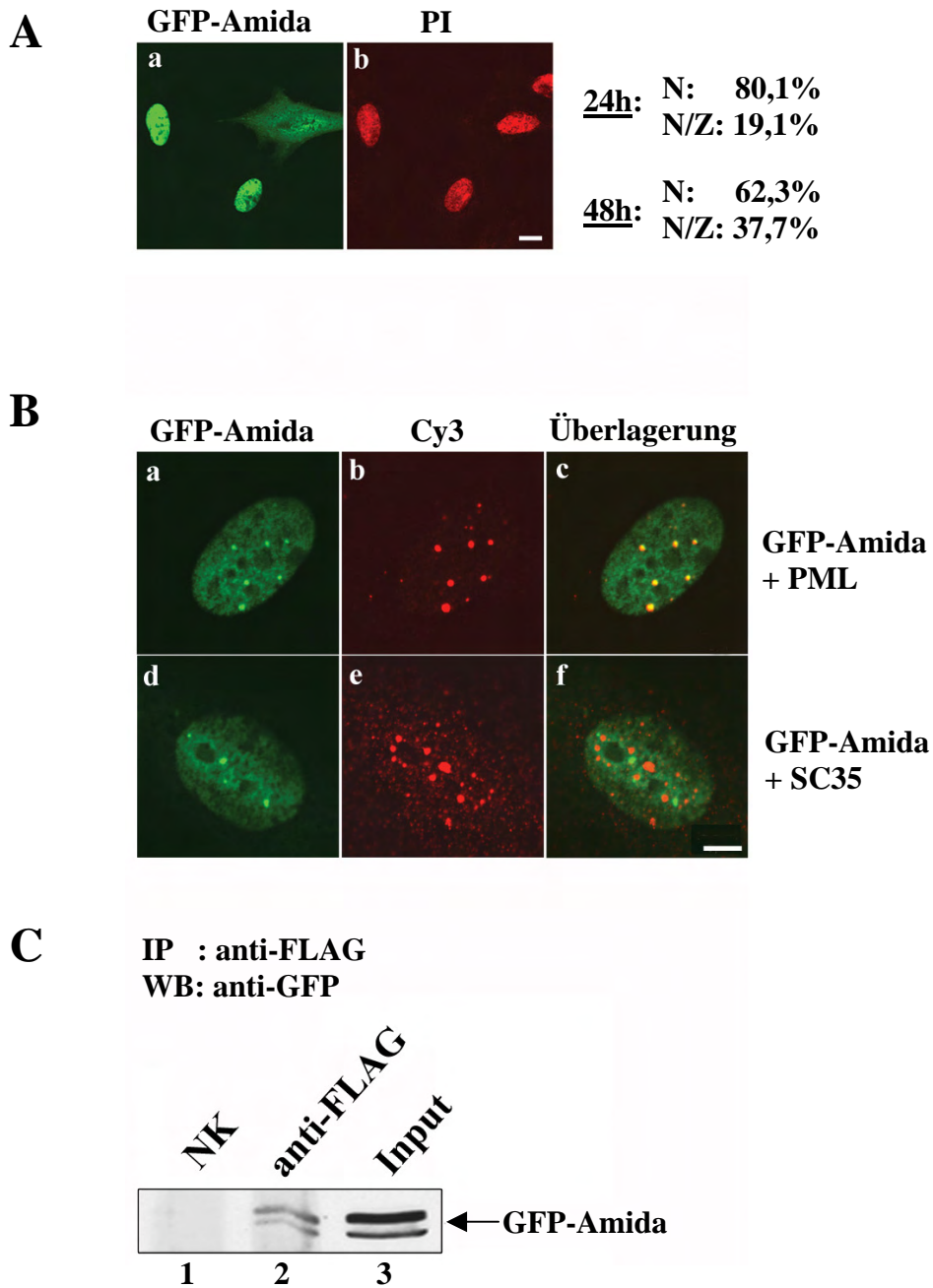


Abb. 11: Lokalisation von GFP-Amida in Rattenfibroblasten. **(A)** REF52.2 Zellen wurden transient mit GFP-Amida transfiziert, nach 24 h und 48 h fixiert und mit Propidiumiodid (PI) gefärbt, um die Kerne sichtbar zu machen. Der prozentuale Anteil der Zellen in denen Amida ausschließlich nukleär (N) oder aber nukleär-zytoplasmatisch (N/Z) lokalisiert ist, ist rechts neben der Abbildung A aufgelistet. Balken, 10 µm. **(B)** In transient GFP-Amida exprimierenden REF52.2 Zellen (a, d) wurden die nukleären Marker PML (b) und SC35 (e) mit einem monoklonalen anti-PML oder einem monoklonalen anti-SC35 Antikörper sowie mit einem Cy3-gekoppelten sekundären Maus-IgG angefärbt. Die Überlagerung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigte eine Kolokalisation von Amida mit PML (c), nicht aber mit SC35 (f). Balken, 5 µm. **(C)** Koimmunpräzipitation von Amida und PML. Stabil GFP-Amida exprimierende CHO Zellen wurden mit FLAG-PML transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Zellextrakte in einer Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Maus anti-FLAG M2 Antikörper (Spur 2) oder einem Ziegen-Konrollserum eingesetzt (Spur 1). Die Präzipitate wurden in einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot immunologisch mittels monoklonalem anti-GFP Antikörper analysiert. Der Input betrug 40 µg des Gesamtzellextraktes (Spur 3).

in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und im nachfolgenden Western Blot mit einem monoklonalen anti-GFP Antikörper analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 11C dargestellt. Der anti-Amida Antikörper detektierte in der Western Blot Analyse deutlich ein Protein von ca. 68 kD, das dem GFP-Amida Fusionsprotein entsprach (Abb. 11C, Spur 2). Der anti-FLAG Antikörper ist, im Gegensatz zum eingesetzten Ziegen-Kontroll IgG (Abb. 11C, Spur 1), in der Lage, spezifisch mit dem PML-Protein auch GFP-Amida zu kopräzipitieren. Dies läßt auf eine direkte Interaktion von Amida und PML *in vivo* schließen.

4.1.2.7 Studien zur nukleo-zytoplasmatischen Translokation von Amida

Die Immunfluoreszenzdaten aus 4.1.2.6 haben gezeigt, dass in GFP-Amida transfizierten Zellen der prozentuale Anteil der Zellen mit nukleo-zytoplasmatischer Lokalisation von GFP-Amida mit zunehmender Transfektionsdauer deutlich zunimmt. Daher lag die Vermutung nahe, dass Amida zu einer nukleo-zytoplasmatischen Translokation befähigt sein könnte. Um den nukleären Export von Amida näher zu untersuchen, wurde in einer Kooperation mit Frau Dr. Susanne Illenberger (Technische Universität Braunschweig) ein Interspezies Heterokaryon-Assay durchgeführt. Dazu wurden humane HeLa Zellen mit GFP-Amida und FLAG-hnRNP-C2 als Kontrolle kotransfiziert. Das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein hnRNP-C2 ist ausschließlich im Kern lokalisiert und nicht zu einer nukleo-zytoplasmatischen Translokation fähig und diente somit bei diesen Untersuchungen als Negativkontrolle (Nakielny und Dreyfuss, 1996). 24 h nach der Transfektion wurden die humanen HeLa Zellen mit murinen C2C12 Myoblasten, wie unter 3.4.8 beschrieben, fusioniert. Die Gegenwart von Cycloheximid während der gesamten Versuchsdauer gewährleistete die Unterdrückung der *de novo* Proteinsynthese. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 3 h wurden die Zellen fixiert, mit anti-FLAG Antikörper, fluoreszierendem anti-Maus Sekundärantikörper und DAPI angefärbt und mittels Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 12). Die DAPI-Färbung diente dabei der Unterscheidung von humanen und murinen Zellkernen in den Heterokaryons, da die humanen Zellkerne diffus angefärbt wurden (Abb. 12, „h“), wohingegen die murinen Zellkerne eine punktierte Färbung aufwiesen (Abb. 12, „m“). In Abbildung 12 ist exemplarisch einer der untersuchten Heterokaryons dargestellt, der sowohl GFP-Amida als auch FLAG-hnRNP-C2 exprimierte. Bei 98% aller analysierten Heterokaryons zeigte sich ein ähnliches Bild. GFP-Amida war sowohl in den humanen HeLa als auch in den murinen C2C12 Zellekernen lokalisiert (Abb. 12a). Dieser Befund untermauerte die Vermutung, dass Amida zwischen dem Kern und dem Zytoplasma

transloziert. Das hnRNP-C2 Protein im selben Heterokaryon verblieb im Gegensatz dazu vollständig im humanen HeLa Zellkern (Abb. 12b).

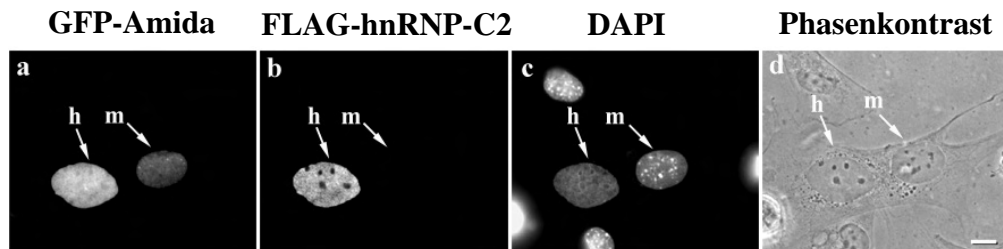


Abb. 12: Interspezies Heterokaryon-Assay. HeLa Zellen wurden transient mit GFP-Amida und FLAG-hnRNP-C2 kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit C2C12 Mausmyoblasten fusioniert und weitere 3 h in Anwesenheit von Cycloheximid inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit anti-FLAG Antikörper, Cy3-gekoppeltem anti-Maus Sekundärantikörper und DAPI gefärbt. GFP-Amida ist in (a), FLAG-hnRNP-C2 in (b) dargestellt. Die DAPI-Färbung in (c) ermöglicht die Unterscheidung zwischen humanen (h) und murinen (m) Zellkernen. Das entsprechende Phasenkontrastbild ist in (d) dargestellt. GFP-Amida ist in beiden Zellkernen zu detektieren, nicht aber FLAG-hnRNP-C2. Der Balken beträgt 10 µm.

4.1.2.8 Koexpressionsstudien von Amida und Par-4 in Säugerzellen

Für Par-4 wurde in fast allen bisher untersuchten Zelllinien eine zytoplasmatische Lokalisation und darüber hinaus in REF52.2 Zellen eine starke Assoziation mit dem Zytoskelett beschrieben (Vetterkind et al., 2005a). Eine Koexpression von Par-4 und seinem bekannten, im Kern lokalisierten, Interaktionspartner Dlk führt zu einer Relokalisation der Kinase aus dem Zellkern ins Zytoplasma. Dort kolokalisiert Dlk mit Par-4 an Aktinfilamenten und ist an der Induktion von apoptotischen Prozessen beteiligt (Page et al., 1999; Vetterkind et al., 2005a). Anhand von Koexpressionsexperimenten sollte daher untersucht werden, inwieweit Par-4 in der Lage ist, auch seinen neuen, ebenfalls im Kern lokalisierten, Interaktionspartner Amida über einen ähnlichen Mechanismus aus dem Zellkern an das Aktin-Zytoskelett zu rekrutieren.

Dafür wurden REF52.2 Zellen mit FLAG-Par-4 und GFP-Amida kotransfiziert, nach 24 h bzw. 48 h fixiert und für die fluoreszenzmikroskopische Analyse mit einem monoklonalen anti-FLAG und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper angefärbt. Die Präparate wurden hinsichtlich der subzellulären Lokalisation der exprimierten Proteine ausgewertet. Diese Untersuchungen zeigten, dass bereits 24 h nach der Transfektion bei 39,8% der kotransfizierten Zellen eine verstärkte Expression von GFP-Amida im Zytoplasma erkennbar war (Abb. 13a-c). Interessanterweise stieg der Prozentsatz des nukleär-zytoplasmatisch lokalisierten GFP-Amida (N/Z) nach 48 h auf 62,2% an (Abb. 13d-f). Ferner

war zu beobachten, dass GFP-Amida nicht mehr nur diffus im Zytoplasma vorlag, sondern deutlich mit Par-4 am Aktin-Zytoskelett kolokalisierte (Abb. 13c und f).

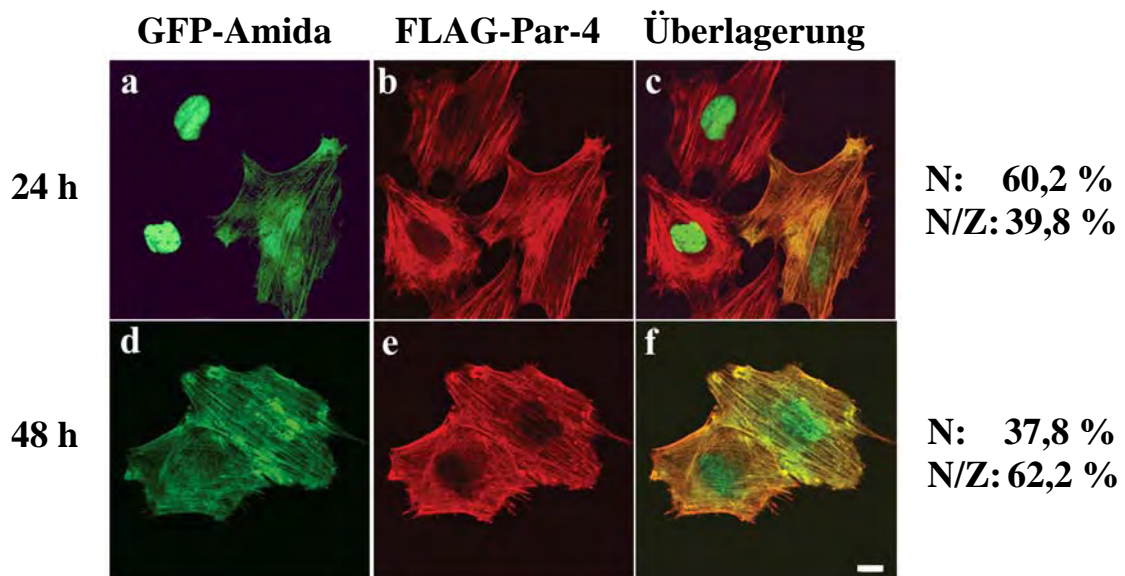


Abb. 13: Koexpression und subzelluläre Lokalisation von Amida und Par-4. REF52.2 Zellen wurden transient mit GFP-Amida und FLAG-Par-4 transfiziert. 24 h und 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und für die indirekte Immunfluoreszenz mit einem monoklonalen anti-FLAG Antikörper und einem fluoreszierenden anti-Maus Sekundärantikörper angefärbt. GFP-Amida ist in grün (a und d), FLAG-Par-4 in rot dargestellt (b und e). Die Kolokalisation von GFP-Amida mit FLAG-Par-4 wird durch die gelbe Färbung in der Überlagerung der Fluoreszenzbilder angezeigt (c und f). Der prozentuale Anteil der Zellen, in denen Amida ausschließlich nukleär (N) oder nukleär-zytoplasmatisch (N/Z) lokalisiert ist, ist rechts neben der Abbildung aufgelistet. Die Bilder wurden mit einem Zeiss Axioplan konfokalen Mikroskop aufgenommen. Der Balken entspricht 10 µm.

Um zu überprüfen, ob die veränderte subzelluläre Lokalisation von Amida tatsächlich auf die Koexpression mit Par-4 zurückzuführen ist, wurden zusätzlich zu den Immunfluoreszenzanalysen Zellfraktionierungs- und Western Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurden REF52.2 Zellen mit GFP-Amida und FLAG-Par-4 transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und in Lysispuffer, sowie nachfolgend in Hochsalzlösung sequentiell extrahiert, um Zytoplasma- und Kernextrakte voneinander zu fraktionieren. Die Fraktionen wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Western Blot immunologisch mit Hilfe eines monoklonalen anti-GFP Antikörpers (Abb. 14, oben) und eines monoklonalen anti-FLAG Antikörpers (Abb. 14, Mitte) analysiert. Die Färbung der selben Blotmembran mit einem monoklonalen anti- α -Tubulin Antikörper diente dem Abgleich der aufgetragenen Proteinmengen (Abb. 14, unten). Ferner stellte die Färbung eine Kontrolle für die Reinheit der einzelnen Fraktionen dar. Das Ergebnis dieses Western Blots ist in Abbildung 14 dargestellt. Sowohl GFP-Amida (Abb. 14, Spur 3 und 4, oben) als auch FLAG-Par-4 (Abb. 14, Spur 5 und 6, Mitte) zeigten dabei eine annähernd

gleichmäßige Verteilung zwischen der Kern- und Zytoplasmafraktion. Nach Koexpression von GFP-Amida und FLAG-Par-4 kam es jedoch zu einer fast vollständig zytoplasmatischen Lokalisation von GFP-Amida (Abb. 14, Spur 7 und 8, oben). Die Lokalisation von FLAG-Par-4 nach Koexpression mit GFP-Amida blieb unverändert. Der größere Anteil des Par-4 Proteins verblieb in der unlöslichen Kernfraktion und nur ein geringer Anteil des Proteins war in der löslichen Zytoplasmafraktion zu detektieren (Abb. 14, Spur 7 und 8, Mitte). Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse, dass die Koexpression von Amida und Par-4 zu einer Translokation von Amida in das Zytoplasma und dort zu einer Kolokalisation von Amida und Par-4 am Aktin-Zytoskelett führt.

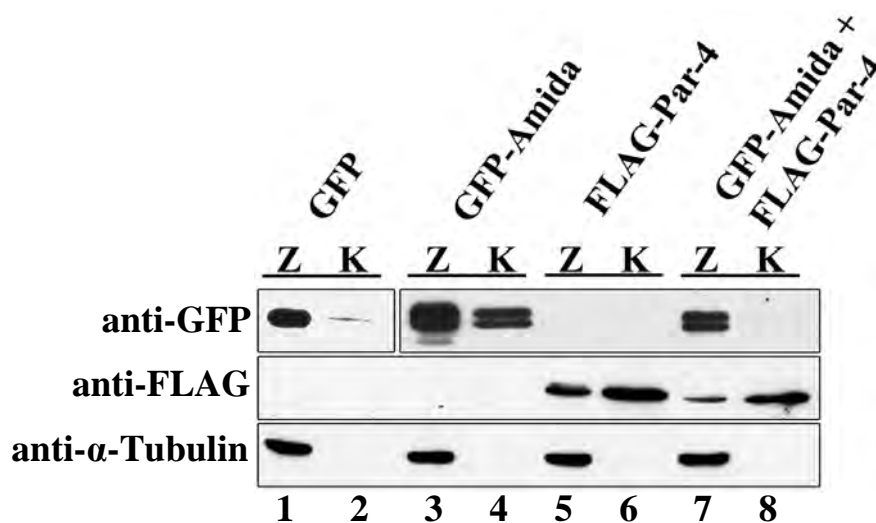


Abb. 14: Subzelluläre Verteilung von Amida und Par-4. REF52.2 Zellen wurde wie oben angegeben mit GFP, GFP-Amida, FLAG-Par-4 oder GFP-Amida und FLAG-Par-4 zusammen transfiziert. Bei der Herstellung der Zellextrakte, 48 h nach der Transfektion, wurden diese durch Extraktion mit Lysispuffer und Hoch-Salz-Lösung in Zytoplasma (Z) und Kernextrakte (K) fraktioniert. Die Proben wurden in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot mittels monoklonalem anti-GFP Antikörper (oben) oder monoklonalem anti-FLAG-Antikörper (Mitte) analysiert. Die Färbung der selben Blotmembran mit einem monoklonalen anti- α -Tubulin Antikörper diente dem Proteinabgleich und veranschaulichte die Reinheit der einzelnen Fraktionen

4.1.2.9 Aktin-Bindungs- und Polymerisationsstudien mit Amida und Par-4

In einer kürzlich erschienenen Studie wurde gezeigt, dass Par-4 die Fähigkeit besitzt, *in vitro* direkt mit Aktin zu interagieren und die Bildung von Aktin-Filament-Bündeln zu induzieren (Vetterkind et al., 2005a). Daher stellte sich in dieser Arbeit die Frage, ob Amida ebenfalls direkt mit Aktin interagieren kann und eine Bündelung von Aktinfilamenten auslöst, oder ob die Rekrutierung von Amida an das Aktin-Zytoskelett über Par-4 vermittelt wird. Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen wurde in Kooperation mit Dr. Susanne Illenberger

(Technische Universität Braunschweig) eine Kosedimentations-Analyse und ein *in vitro*-Filament-Bindungsversuch durchgeführt.

In der Kosedimentationsstudie können Proteine auf ihre Aktin-Bindungseigenschaften hin untersucht werden. Die zu testenden Proteine werden mit relativ langsamer Geschwindigkeit (12000 x g) in Anwesenheit von vorpolymerisiertem Aktin zentrifugiert. Da F-Aktin in Abwesenheit eines weiteren Proteins im Überstand verbleibt und nur sedimentiert wenn es durch ein Aktin-bindendes Protein in höher organisierte Strukturen vernetzt und gebündelt wird, erlaubt diese Kosedimentationsstudie einen direkten Rückschluß auf die Aktin-bindenden Eigenschaften des zu untersuchenden Proteins.

In diesem Versuch wurde vorpolymerisiertes Aktin (3 µM) in An- oder Abwesenheit von gereinigtem rekombinantem Par-4 Protein, das ein N-terminales Strep-Signal enthielt, und/oder einem His-Amida Fusionsprotein, das ein N-terminales 6 x His-Signal enthielt (1 µM) (beides freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jan Kubicek, Forschungszentrum Jülich) für 2 h bei 37°C in Sedimentationspuffer inkubiert. Nach anschließender Sedimentation wurden das Pellet (P) und der Überstand (Ü) in einer 13%igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

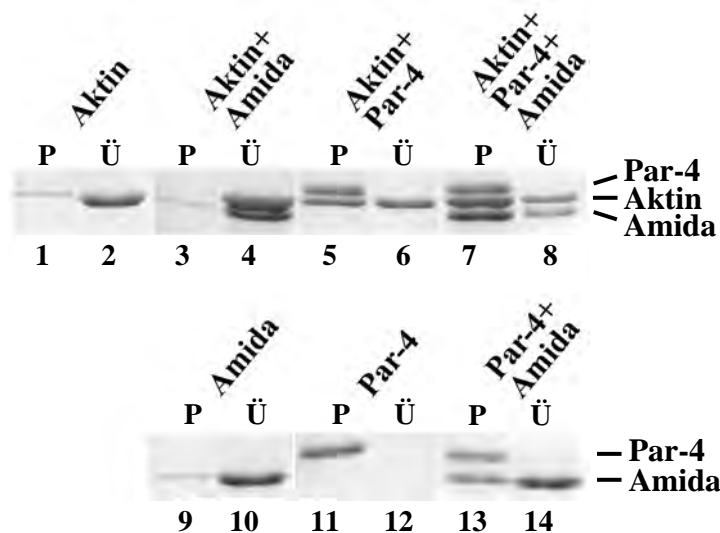


Abb. 15: Kosedimentationsanalyse von F-Aktin, Amida und Par-4. Vorpolymerisiertes Aktin wurde in Abwesenheit (Spur 1 und 2) oder in Anwesenheit von gereinigtem rekombinantem His-Amida (Spur 3 und 4), Strep-Par-4 (Spur 5 und 6) oder beiden Proteinen zusammen (Spur 7 und 8) inkubiert. Die Proben wurden bei 12000 x g zentrifugiert und die Pellet- (P) und Überstand- (Ü) Fraktionen in einer 13%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine im Gel wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Spuren 9-14 stellen Kontrollen dar, in denen Amida (Spur 9, 10), Par-4 (Spur 11, 12) und Par-4+Amida (Spur 13, 14) ohne Aktin aufgetragen wurden. (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Susanne Illenberger, Technische Universität Braunschweig).

Das Ergebnis in Abbildung 15 zeigte, dass F-Aktin alleine nach der Zentrifugation hauptsächlich im Überstand verblieb (Abb. 15, Spur 2) und nur sehr schwach im Pellet auftrat (Abb. 15, Spur 1). Die Anwesenheit von Par-4 führte jedoch zu einer Sedimentation der Aktin-Filamente (Abb. 15, Spur 5) und zu einer Abnahme des F-Aktin im Überstand (Abb. 15, Spur 6). Eine Inkubation mit Amida hatte keinen Einfluss auf die Sedimentation des F-Aktins, das sich nach der Zentrifugation, ebenso wie Amida selbst, fast ausschließlich im Überstand befand (Abb. 15, Spur 4) und im Pellet kaum zu detektieren war (Abb. 15, Spur 3). Wurden allerdings Par-4 und Amida zusammen mit F-Aktin inkubiert, sedimentierte der überwiegende Anteil von Par-4 und Amida zusammen mit dem F-Aktin (Abb. 15, Spur 7) und nur ein geringer Teil des F-Aktin und des Amida Proteins verblieb im Überstand (Abb. 15, Spur 8). Die Kontrollen in den Spuren 9-14 zeigen die Sedimentationseigenschaften der gereinigten Proteine in Abwesenheit von F-Aktin. Par-4 war dabei auch alleine in der Pelletfraktion zu detektieren (Abb. 15, Spur 11), was auf eine unspezifische Bindung des rekombinanten Par-4 Proteins an das Reaktionsgefäß zurückzuführen sein könnte. Amida verblieb im Gegensatz dazu ausschließlich im Überstand (Abb. 15, Spur 10). Ein verändertes Sedimentationsverhalten der Proteine trat jedoch nach einer Vorinkubation von Amida und Par-4 auf. Nach der Zentrifugation war eine etwa gleich große Menge an Amida und Par-4 Protein im Pellet nachzuweisen (Abb. 15, Spur 13), was deutlich die Komplexbildung von Par-4 mit Amida demonstriert.

Um den Einfluss von Par-4 und Amida auf die Aktinfilament-Organisation zu visualisieren und die Ergebnisse aus der Kosedimentationsanalyse zu verifizieren, wurde zusätzlich ein *in vitro*-Filament-Bindungsversuch durchgeführt. Dazu wurde vorpolymerisiertes Aktin wie oben beschrieben mit gereinigtem rekombinantem Strep-Par-4 und/oder His-Amida inkubiert und die Aktin-Fasern nach der Inkubation mit fluoreszenz-markiertem Phalloidin für 1 h bei 37°C angefärbt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse in der Abbildung 16 zeigte, dass sich nach der Inkubation von Aktin mit Par-4 dicke Aktinfilament-Bündel gebildet hatten (Abb. 16, oben rechts), wohingegen im Kontrollansatz, der nur Aktin enthielt, keine Filament-Bündelung zu beobachten war (Abb. 16, oben links und vgl. Vetterkind et al., 2005a). Eine Inkubation von Aktin mit Amida führte zu keiner erkennbaren Aktinfilament Bündelung. Das fluoreszenz-markierte Aktin war nicht in höhere Strukturen organisiert und entsprach in seinem Erscheinungsbild der Negativkontrolle (Abb. 16, unten links). Dagegen führte die Koinkubation von Amida, Par-4 und Aktin zu einer starken Bündelung von Aktinfilamenten (Abb. 16, unten rechts). Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass Amida keinerlei

Aktinbündelungs-Aktivität aufweist und die Komplexbildung von Par-4 und Amida die Aktin-Bindungseigenschaften von Par-4 nicht beeinflusst. Ferner wird Amida lediglich indirekt über eine Bindung an Par-4 an das Aktin-Zytoskelett rekrutiert nicht jedoch über eine direkte Bindung an F-Aktin.

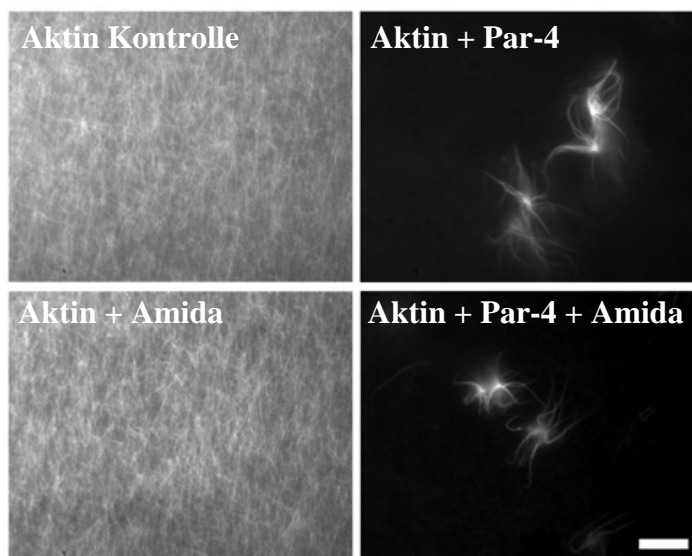


Abb. 16: *In vitro*-Filament-Bindungsversuch mit Aktin, Amida und Par-4. Vorpolymerisiertes Aktin wurde in Abwesenheit (oben links) oder in Anwesenheit von gereinigtem Strep-Par-4 (oben rechts), gereinigtem His-Amida (unten links) oder Strep-Par-4 und His-Amida zusammen (unten rechts) für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Aktin-Filamente wurden mit TRITC-markiertem Phalloidin für 1 h bei 37°C angefärbt und direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Der Balken entspricht 25 µm. (Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Susanne Illenberger, Technische Universität Braunschweig).

4.1.2.10 Apoptoseinduktion durch Koexpression von Par-4 und Amida

Par-4 ist ein pro-apoptotisches Protein, dessen alleinige Expression in REF52.2 Zellen keine Apoptose auslöst, wohingegen die Koexpression mit dem bekannten Interaktionspartner Dlk zu einer Translokation der Kinase in das Zytoplasma, zu starken Veränderungen des Zytoskeletts und zur Auslösung der Apoptose führt (Page et al., 1999). Um zu untersuchen inwieweit auch die Kolokalisation von Amida und Par-4 am Aktin-Zytoskelett zu einer Induktion der Apoptose führt, wurden REF52.2 Zellen mit GFP-Amida und FLAG-Par-4 transient transfiziert, nach 48 h fixiert und immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG Antikörper angefärbt. Die Visualisierung der Kerne erfolgte mittels einer DAPI-Färbung. Die Apoptoserate wurde anhand morphologischer Merkmale der Apoptose durch Analyse der Präparate am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, führte die Koexpression von Amida und Par-4 48 h nach der Transfektion zu einer Kolokalisation beider Proteine am Aktin-Zytoskelett (Abb. 17Aa und b; und vgl. Abb. 13f).

Darüber hinaus wiesen die Par-4/Amida koexprimierenden Zellen morphologische Anzeichen der Apoptose wie kondensiertes Chromatin, fragmentierte Kerne und Membranbläschen (Abb. 17Ac) auf. Um die pro-apoptotische Wirkung von Amida und Par-4 zu quantifizieren, wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 100- bis 200 Par-4/Amida kotransfizierte Zellen analysiert und die Apoptoserate prozentual bestimmt (Abb. 17B). Dabei zeigte sich, dass 53% der Par-4/Amida koexprimierende Zellen 48 h nach der Transfektion die Apoptose induzierten, während die Expression der einzelnen Proteine lediglich eine Apoptoserate von 19% (Par-4) und 9% (Amida) zeigten. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Rekrutierung von Amida durch Par-4 an das Aktin-Zytoskelett in der Tat zu einer starken Induktion der Apoptose führt.

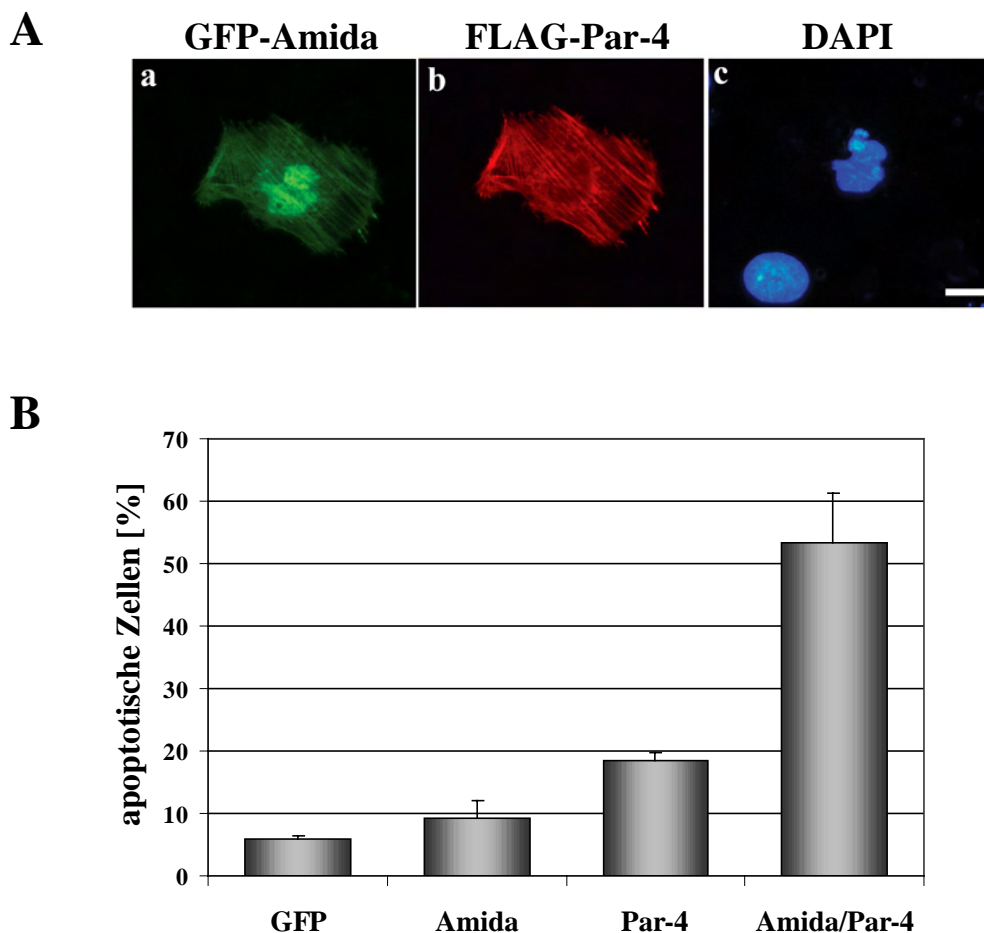


Abb. 17: Apoptoseinduktion durch Koexpression von Par-4 und Amida. **(A)** REF52.2 Zellen wurden mit FLAG-Par-4 (b) und GFP-Amida (a) transfiziert, 48 h nach der Transfektion fixiert und mit dem monoklonalen anti-FLAG M2 Antikörper gefärbt. Die Kerne wurden einer DAPI-Kernfärbung unterzogen (c). Der Balken entspricht 10 μ m. **(B)** Quantifizierung der Apoptoserate nach Koexpression von FLAG-Par-4 und GFP-Amida in REF52.2 Zellen. Die Zellen wurden wie unter (A) beschrieben transfiziert, fixiert und gefärbt. Die Quantifizierung der Apoptose erfolgte anhand morphologischer Merkmale der Par-4/Amida kotransfizierten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils 100-200 Zellen je Ansatz ausgewertet wurden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

4.1.2.11 Identifizierung einer funktionellen NES von Amida

Die Fähigkeit von Amida zwischen dem Kern- und dem zytoplasmatischen Kompartiment zu translozieren, wurde bereits mit Hilfe eines Interspezies Heterokaryon-Assay demonstriert (Abschnitt 4.1.2.7). Durch Sequenzanalysen des Amida Proteins sollten nun potentielle Motive, die für den Kernexport von Amida verantwortlich sein könnten, innerhalb des Proteins identifiziert werden. Viele der Proteine, die zu einer nukleo-zytoplasmatischen Translokation fähig sind, besitzen eine leucinreiche Konsensussequenz $LX_{2-3}hX_{2-3}LXL$, die einen Kernexport ermöglicht. X kann dabei jede beliebige Aminosäure sein, und h entweder die Aminosäurereste F, I, L, V oder M repräsentieren (Mattajj und Englmeier, 1998). Nach eingehender Untersuchung der Amida AS-Sequenz wurde ein dieser Konsensussequenz entsprechendes leucinreiches Motiv zwischen den Aminosäureresten 27 und 39 des Amida Proteins identifiziert. Dieses potentielle nukleäre Export Signal (NES) ähnelte in seiner Sequenz sehr stark der NES des HIV-1 Rev Proteins, das in HIV infizierten Zellen den Export von viraler mRNA in das Zytoplasma ermöglicht und selber über einen CRM1-Rezeptor (*chromosomal region maintenance 1*) abhängigen Mechanismus aus dem Kern exportiert werden kann (Fornerod et al., 1997). In Abbildung 18A ist ein Sequenzvergleich der entsprechenden Abschnitte in der AS-Sequenz von Rev und Amida abgebildet. Die mutmaßlich für den Kernexport entscheidenden Leucinreste sind grau unterlegt. Um zu analysieren inwieweit es sich bei der 13 Aminosäuren langen Sequenz aus dem Amida Protein tatsächlich um eine funktionelle NES handelt, wurde die kodierende Sequenz der Aminosäuren 26-28 in den pEGFP-C1 Vektor kloniert. Dazu wurden in einer PCR-Reaktion die Oligonukleotide „SAC-Amida-NES-Eco-for“, das eine *SacI* und eine *EcoRI* Schnittstelle enthält, und „Amida(330-315)Eco/Bam“, das eine *BamHI* und eine *EcoRI* Schnittstelle enthält, verwendet. Das amplifizierte 264 bp PCR-Fragment wurde über *SacI* und *BamHI* in den pEGFP-C1 Vektor kloniert. Anschließend wurde der Vektor mit *EcoRI* verdaut, was zu einer Deletion der Basenpaare 39-111 der Amida cDNA führte. Das resultierende Konstrukt wurde GFP-Amida-NES²⁶⁻³⁸ genannt und enthielt die kodierende Sequenz der putativen NES des Amida Proteins. Das GFP-Amida-NES²⁶⁻³⁸ Konstrukt, sowie der leere GFP-Vektor als Kontrolle, wurden in REF52.2 Zellen transfiziert, 24 h nach der Transfektion fixiert und einer DAPI Kernfärbung unterzogen. Der Einfluss der putativen Amida NES auf die subzelluläre Lokalisation des GFP Proteins wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Das Ergebnis in Abbildung 18B zeigte eine vollständig zytoplasmatische Lokalisation von GFP-Amida-NES²⁶⁻³⁸ (Abb. 18Bc), während der allein transfizierte GFP-Vektor eine diffuse Färbung sowohl im Zytoplasma als auch im Kern zeigte (Abb. 18Ba). Die Ergebnisse dieses

Experimentes haben gezeigt, dass die Amida-NES Sequenz zwischen den Aminosäuren 26-38 ausreicht, um eine zytoplasmatische Lokalisation des GFP Reporterproteins zu bewirken.

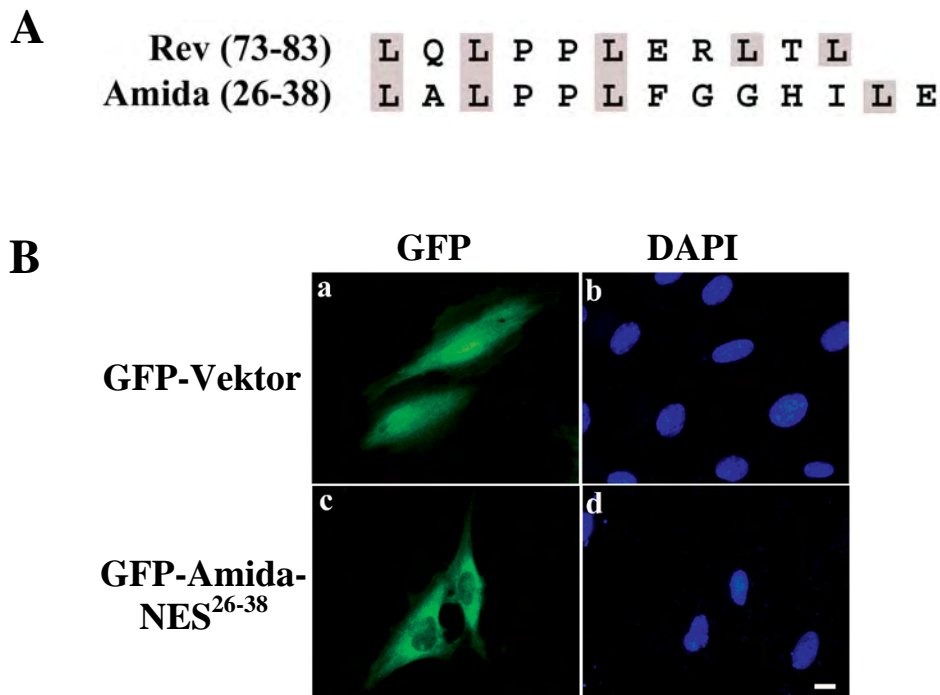


Abb. 18: Nachweis einer putativen NES im N-terminalen Teil des Amida Proteins. (A) Sequenzvergleich der NES- Motive des HIV-1 Rev und Amida Proteins. In Klammern sind die Positionen der NES-Sequenz im Gesamtprotein angegeben. Die vermutlich für die Aktivität der NES ausschlaggebenden Leucine sind grau unterlegt. (B) Subzelluläre Lokalisation der Amida-NES. REF52.2 Zellen wurden mit leerem GFP-Vektor (a und b) oder GFP-Amida-NES²⁶⁻³⁸ (c und d) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, mit DAPI gefärbt (b und d) und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Balken, 10 µm.

Um nicht nur die Funktionalität der putativen NES, sondern auch ihren Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Amida Proteins zu untersuchen, wurden zwei weitere Amida Mutanten erzeugt, in denen die potentielle NES-Sequenz deletiert oder mutiert wurde. Dies war zum einen die Mutante GFP-Amida-ΔNES, bei der die Aminosäuren 26-38, und somit die vollständige NES, deletiert wurden, und zum anderen die Mutante GFP-Amida-NES^{mut}, bei der die Leucinreste innerhalb der NES-Sequenz (L26, L28, L31, L37, L41) zu Alaninen ausgetauscht wurden. Für die Herstellung der Mutante GFP-Amida-ΔNES wurden zunächst zwei PCR-Reaktionen mit den Oligonukleotiden „GFP-seqII“ und „3'Amida-delta-NES“ sowie den Oligonukleotiden „5'Amida-delta-NES“ und „3'Amida HindIIIneu“ durchgeführt, die zur Deletion der Basenpaare 76 bis 114 in der Amida cDNA und damit den Aminosäuren 26-38 führten. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden über eine weitere PCR-Reaktion, in der sie sich in den überlappenden Bereichen selber als Matrizen dienten, verbunden, mit *EcoRI* und *SmaI* geschnitten und in den pEGFP-Amida Expressionsvektor subkloniert. Die Mutante GFP-Amida-NES^{mut} wurde mit Hilfe der Oligonukleotide „5'AmidaL26/L28/L31B“

und „3'AmidaL26/L28/L31B“ sowie „5'AmidaL37/L41“ und „3'AmidaL37/L41“ hergestellt. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurde in einer weiteren PCR-Reaktion als Matrize eingesetzt, zusammengefügt und entsprechend der Mutante GFP-Amida- Δ NES in den GFP-Amida Expressionsvektor inseriert. Die beiden NES Mutanten GFP-Amida-NES^{mut} und GFP-Amida- Δ NES sowie GFP-Amida wt als Kontrolle wurden in REF52.2 Zellen transfiziert, 48 h nach der Transfektion fixiert und einer DAPI Kernfärbung unterzogen. Die subzelluläre Lokalisaiton der einzelnen Amida Konstrukte wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert und die zytoplasmatische Lokalisation der einzelnen Konstrukte prozentual bestimmt. Wie in der Abbildung 19 graphisch dargestellt, zeigte das Amida wt Protein 48 h nach der Transfektion in 38% der transfizierten Zellen eine zytoplasmatische Lokalisation. Im Gegensatz dazu wiesen nur 21% der GFP-Amida-NES^{mut} und 20% der GFP-Amida- Δ NES transfizierten Zellen eine zytoplasmatische Lokalisation der GFP-Amida Fusionsproteine auf. Dies deutet darauf hin, dass das leucinreiche NES-Motiv zwischen den Aminosäuren 26-38 des Amida Proteins einen bedeutenden Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins hat.

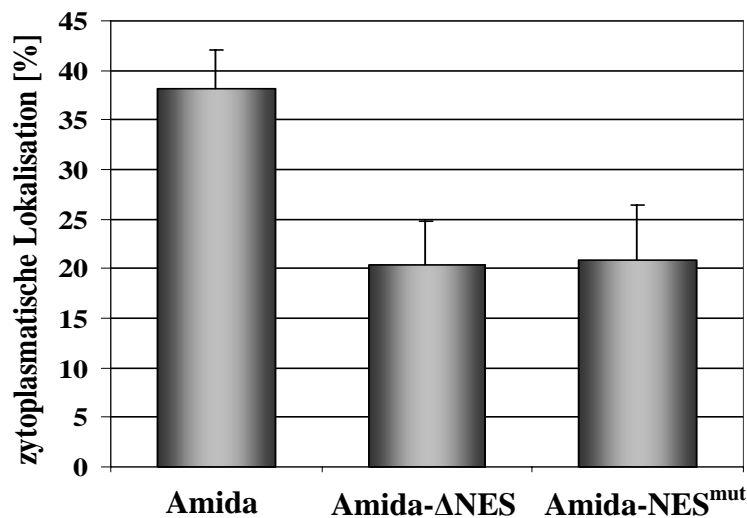


Abb. 19: Quantifizierung der zytoplasmatischen Lokalisation von Amida, Amida- Δ NES und Amida-NES^{mut} in REF52.2 Zellen. REF52.2 Zellen wurden mit GFP-Amida, GFP-Amida- Δ NES oder GFP-Amida-NES^{mut} transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und der prozentuale Anteil der Amidakonstrukte, der in den transfizierten Zellen zytoplasmatisch lokalisiert war, wurde durch Immunfluoreszenzanalyse ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils 100-200 transfizierte Zellen je Ansatz ausgewertet wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Da es sich bei dem Export von Proteinen mit einer leucinreichen NES aus dem Kern häufig um einen CRM1-abhängigen Mechanismus handelt, wurde die Möglichkeit eines CRM1-vermittelten Transportes auch für Amida überprüft. REF52.2 Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert und nach 5 h mit 10-20 ng/ml Leptomycin B (LMB) behandelt, das

den CRM1-vermittelten Kerntransport durch eine direkte Bindung an den Rezeptor hemmt. Die Zellen wurden danach fixiert und die subzelluläre Verteilung von GFP-Amida 48 h nach der Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Konzentrationen von bis zu 20 ng/ml LMB beeinflusste den Kernexport von GFP-Amida jedoch nicht (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei der Translokation von Amida um einen CRM1 unabhängigen Mechanismus handelt.

4.1.2.12 Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts für die Par-4/Amida-induzierte Apoptose

In REF52.2 Rattenfibroblasten liegt Par-4 fest assoziiert mit dem Aktinfilament-System vor. Die Aktinbindung wird dabei über den N-Terminus von Par-4 vermittelt. So zeigt z.B. eine Par-4 Mutante, bei der die Aminosäuren 1-41 deletiert wurden (bezeichnet als Par-4 Δ N41-332) nicht nur eine stark verringerte Assoziation mit dem Mikrofilamentsystem, sondern auch eine deutlich verringerte Apoptoseinduktion nach Koexpression mit dem bekannten Interaktionspartner Dlk. Die Aktinbindung von Par-4 spielt somit eine entscheidende Rolle in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose (Vetterkind et al., 2005a). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Par-4 auch Amida an das Aktin-Zytoskelett rekrutiert und dies ebenfalls zur Auslösung der Apoptose führt, sollte die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts auch für die Par-4/Amida-induzierte Apoptose eingehender analysiert werden. Um die Apoptoserate quantifizieren zu können, wurden FLAG-Par-4 wt und die Deletionsmutante FLAG-Par-4 Δ N41-332 zusammen mit GFP-Amida wt in REF52.2 Zellen exprimiert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG M2 Antikörper und einem Cy3-markierten anti-Maus-IgG Antikörper angefärbt und einer DAPI Kernfärbung unterzogen. Die Apoptoserate wurde anhand morphologischer Merkmale der transfizierten Zellen durch Analyse der Präparate am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Im Vergleich zu der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme der Par-4 wt/Amida wt koexprimierenden Zelle (siehe Abb. 13) zeigte die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der FLAG-Par-4 Δ N41-332/GFP-Amida koexprimierenden Zelle in Abbildung 20A ein verändertes Bild. FLAG-Par-4 Δ N41-332 wies eine stark verringerte Assoziation mit den Aktinfasern der Zelle und eine diffuse Verteilung im Zytoplasma auf (Abb. 20Ab). Interessanterweise war auch Amida nicht mehr in der Lage mit Aktinfilamenten zu koloalisieren. Es kam zu einer Translokation von Amida aus dem Kern in das Zytoplasma, dort jedoch zu keiner Koloaliation von Amida mit Par-4 an Aktinfilamenten (Abb. 20Aa). Dies Ergebnis läßt vermuten, dass die Rekrutierung von Amida an das Zytoskelett über Par-4

vermittelt wird. Wie in der graphischen Darstellung der Abbildung 20B zu erkennen ist, betrug die Apoptoserate nach Koexpression von Amida wt mit Par-4 wt 51%. Dagegen führte die Koexpression von Amida wt und Par-4 Δ N41-332 zu einer weit geringeren Apoptoserate von 39%.

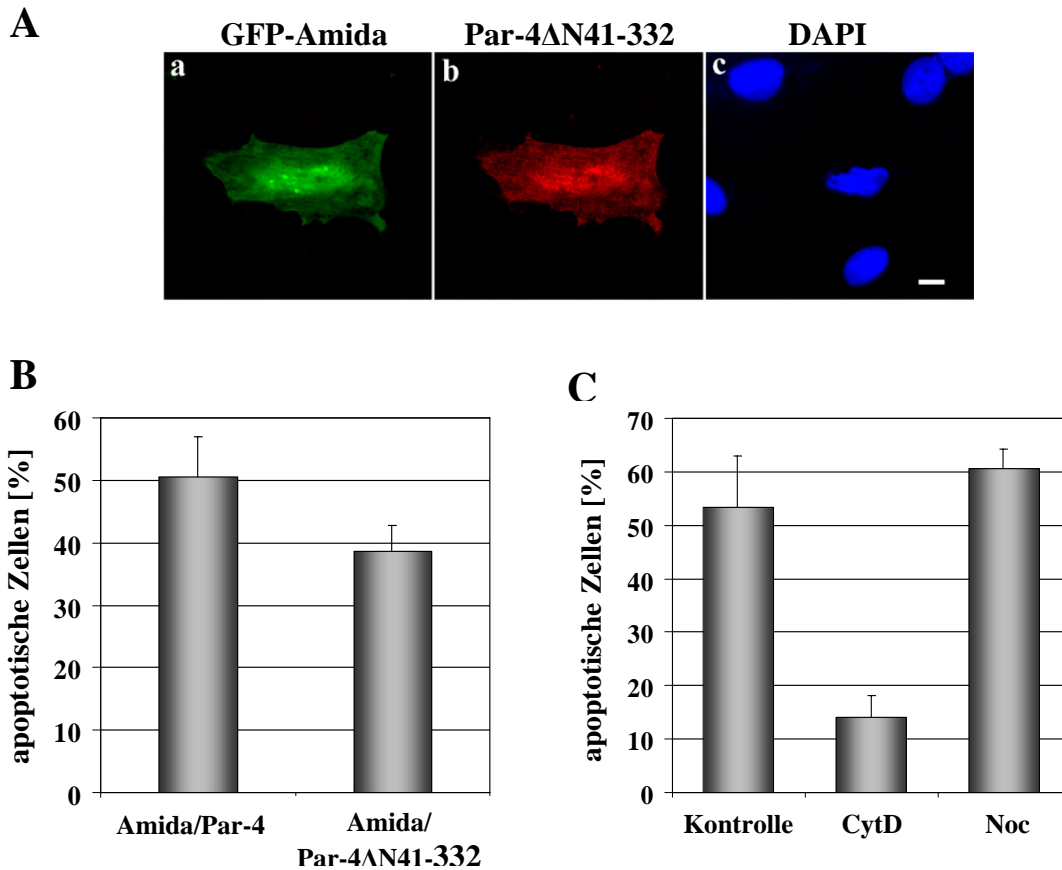


Abb. 20: Die Rolle des Aktin-Zytoskeletts in der Par-4/Amida-vermittelten Apoptose. **(A)** REF52.2 Zellen wurden transient mit GFP-Amida (a) und FLAG-Par-4 Δ N41-332 (b) transfiziert, 48 h nach der Transfektion fixiert und immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG M2 Antikörper gefärbt. Die Kerne wurden mit DAPI angefärbt (c). Der Balken entspricht 10 μ m. **(B)** REF52.2 Zellen wurden mit GFP-Amida und FLAG-Par-4 bzw. FLAG-Par-4 Δ N41-332 transfiziert und wie unter (A) fixiert und gefärbt. Die Rate apoptotischer Zellen wurde durch Immunfluoreszenzanalyse ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils 100-200 transfizierte Zellen je Ansatz ausgewertet wurden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. **(C)** Inhibition der Par-4/Amida-induzierten Apoptose durch Cytochalasin D. REF52.2 Zellen wurden mit GFP-Amida und FLAG-Par-4 kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h einer Behandlung mit Cytochalasin D (CytD, 0,5 μ g/ml) bzw. Nocodazol (Noc, 0,1 μ g/ml) unterzogen. Die Kontrollansätze blieben unbehandelt (Kontrolle). Der Prozentsatz der FLAG-Par-4/GFP-Amida kotransfizierten Zellen mit apoptotischer Morphologie wurde immunfluoreszenzmikroskopisch ermittelt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils 100-200 Zellen je Ansatz ausgezählt wurden.

Um zu bestätigen, dass die reduzierte Apoptoserate ursächlich mit der verringerten Aktinassoziation von Par-4 Δ N41-332 in Zusammenhang steht, wurde die Apoptoseinduktion nach Koexpression von Par-4 und Amida und nach der vollständigen Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts untersucht. Dazu wurden GFP-Amida und FLAG-Par-4 kotransfizierte Zellen

24 h nach der Transfektion mit 0,5 µg/ml Cytochalasin D, einem Inhibitor der Aktinpolymerisation, oder alternativ mit 0,1 µg/ml Nocodazol, einem Inhibitor der Mikrotubulopolymerisation, behandelt. Als Kontrollansätze dienten unbehandelte GFP-Amida und FLAG-Par-4 transfizierte Zellen. Die Zellen wurden nach weiteren 24 h fixiert, immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG M2 Antikörper angefärbt und einer DAPI Kernfärbung unterzogen. Die Effizienz der Cytochalasin D- bzw. der Nocodazol-Behandlung wurde durch Anfärbung des Zytoskeletts mit Phalloidin bzw. durch Immunfärbung der Mikrotubuli mit einem monoklonalen anti- α -Tubulin Antikörper überprüft. Abbildung 20C zeigt das Ergebnis der quantitativen Analyse der Par-4 und Amida koexprimierenden Zellen mit apoptotischer Morphologie. Wie zuvor bereits gezeigt (siehe Abb. 17B), resultierte die Koexpression von Par-4 und Amida in einer starken Induktion der Apoptose (53%). Im Gegensatz dazu führte die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin D zu einer deutlichen Reduktion der Apotoserate auf 14%. Die Behandlung mit Nocodazol hatte dagegen keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil apoptotischen Zellen, da die Apotoserate mit ca. 61% vergleichbar mit den unbehandelten Kontrollzellen war. Diese Analyse demonstrierte, dass die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose durch die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts, jedoch nicht durch die Zerstörung des Mikrotubuli-Zytoskeletts, beeinflusst wird.

4.1.2.13 Bedeutung der Par-4/Amida Komplexbildung für die Apoptose

Wie in Abschnitt 4.1.2.10 gezeigt, führt die Koexpression von Par-4 und Amida zu einer deutlichen Apoptoseinduktion. Darüber hinaus erfordert die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose die Anwesenheit eines intakten Aktin-Zytoskeletts. Weitere Immunfluoreszenzanalysen sollten klären, welche Rolle die Komplexbildung von Amida und Par-4 für die Apoptoseinduktion spielt und inwieweit diese zwingend erforderlich ist. GFP-Amida wurde dazu mit FLAG-Par-4 wt oder der Par-4 Punktmutante FLAG-Par-4 L3, die durch den Austausch von drei Leucinresten gegen Alaninreste im Leucin-Zipper Motiv von Par-4 nicht mehr in der Lage war, mit Amida zu interagieren, in REF52.2 Zellen koexprimiert. Als Kontrollen wurden FLAG-Par-4 und FLAG-Par-4 L3 alleine in REF52.2 Zellen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit einem monoklonalen anti-FLAG Antikörper und einem fluoreszenz-markierten anti-Maus-IgG Antikörper angefärbt. Die Apotoserate wurde anhand der morphologischen Apoptosemerkmale in den transfizierten Zellen durch Analyse der Präparate am Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in Abbildung 21A zeigte nach Koexpression von Amida mit Par-4 L3 eine deutlich veränderte subzelluläre Lokalisation als nach Expression von Par-4 wt und Amida wt (vgl. Abb. 13). FLAG-Par-4 L3 war entsprechend dem Wildtyp Protein im Zytoplasma an den Stressfasern der Zelle lokalisiert (Abb. 21Ab). Nach Koexpression mit GFP-Amida kam es jedoch zu keiner Kolo-kalisation von FLAG-Par-4 L3 mit GFP-Amida am Aktin-Zytoskelett. GFP-Amida war stattdessen vollständig im Zellkern und nicht im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 21Aa).

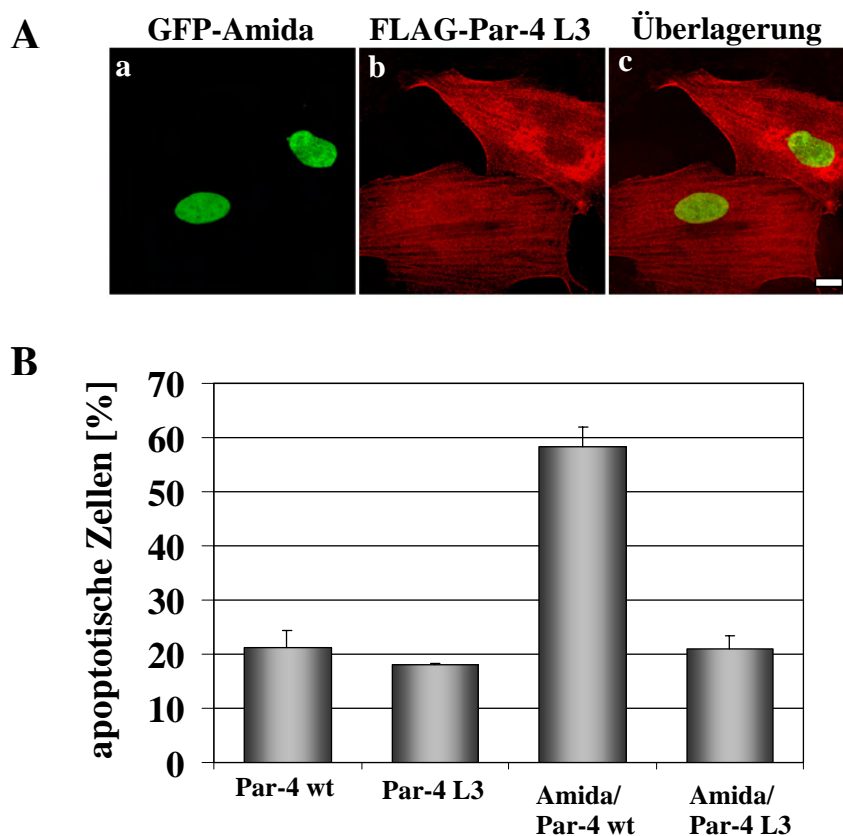


Abb. 21: Koexpression der Leucin-Zipper Punktmutante Par-4 L3 und Amida. (A) REF52.2 Zellen wurden transient mit GFP-Amida und FLAG-Par-4 L3 transfiziert, 48 h nach der Transfektion fixiert und mit einem monoklonalen anti-FLAG M2 Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper angefärbt. Der Balken entspricht 10 μ m. (B) REF52.2 Zellen wurden transient transfiziert mit FLAG-Par-4 wt, FLAG-Par-4 L3, oder kotransfiziert mit GFP-Amida und FLAG-Par-4 bzw. FLAG-Par-4 L3. Die Zellen wurden wie unter (A) beschrieben fixiert, angefärbt und einer DAPI-Färbung unterzogen. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde durch Immunfluoreszenzmikroskopie ermittelt. Die Balken stellen die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar, bei denen 100-200 transfizierte Zellen je Ansatz ausgewertet wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die quantitative Auswertung der Apoptoseinduktion in Abbildung 21B ergab für die GFP-Amida und FLAG-Par-4 wt koexpressierenden Zellen eine Apoptoserate von 58%. Diese sank jedoch nach Koexpression von GFP-Amida mit FLAG-Par-4 L3 deutlich auf 21% ab. Dieser Wert ist vergleichbar mit den Apoptoseraten der Par-4 wt oder Par-4 L3 exprimierenden

Kontrollzellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass für die Amida/Par-4-vermittelte Apoptose nicht nur eine Assoziation von Par-4 an das Aktin-Zytoskelett, sondern ebenso eine stabile Bindung des Amida Proteins an das Par-4 Protein und eine Rekrutierung von Amida an die Mikrofilamente erforderlich ist.

4.2 Bedeutung der Phosphorylierung für die Par-4-vermittelte Apoptose

4.2.1 Phosphorylierung des Par-4 Proteins in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose

In Studien von Page et al. (1999) wurde bereits gezeigt, dass Par-4 ein Interaktionspartner der Serin/Threonin Proteinkinase Dlk ist. Nach der Koexpression der beiden Interaktionspartner in REF52.2 Zellen kommt es zu einer Translokation der kernständigen Kinase aus dem Kern in das Zytoplasma, wo sie mit Par-4 an Aktinfilamenten kolokalisiert. Weiterhin führt die Koexpression der beiden Proteine zu einer dramatischen Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und zur Induktion der Apoptose (Page et al., 1999). Die Mechanismen, die der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose zugrunde liegen, waren bis dato jedoch weitgehend unbekannt und sollten im Folgenden näher untersucht werden.

4.2.1.1 Koexpression von Par-4 und Dlk in Säugerzellen

In vorrausgegangenen Untersuchungen konnte bereits demonstriert werden, dass für die Translokation der Proteinkinase Dlk aus dem Kern in das Zytoplasma nach Koexpression mit Par-4 die Kinaseaktivität der Dlk eine bedeutende Rolle spielt (Page et al., 1999). Um diesen Befund zu verifizieren und um ferner die Abhängigkeit dieser Translokation von einer Interaktion mit Par-4 zu untersuchen, wurden Expressionsstudien in REF52.2 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit Par-4-GFP und FLAG-Dlk und mit Par-4-GFP und der Kinase-negativen Mutante FLAG-Dlk K42A transfiziert. Die FLAG-Dlk Mutante K42A weist aufgrund einer Punktmutation im aktiven Zentrum der Kinase an der Aminosäure Lysin 42 keine Kinaseaktivität mehr auf (Boosen, 2001). Weiterhin wurden die Zellen mit der Leucin-Zipper Punktmutante Par-4 L3-GFP und FLAG-Dlk transfiziert. Für die Transfektion wurde die cDNA der FLAG-Dlk Konstrukte und der verschiedenen Par-4-GFP Konstrukte

stets in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt, da bei diesem Verhältnis die Apoptoseinduktion nach der Koexpression von Dlk und Par-4 am effektivsten war (Page et al., 1999). Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion fixiert, immunzytochemisch mit einem anti-FLAG Antikörper angefärbt und einer DAPI-Kernfärbung unterzogen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Präparate sind in Abbildung 22 dargestellt. Nach Koexpression von Par-4-GFP (Abb. 22a) und FLAG-Dlk (Abb. 22b) zeigte sich eine deutliche Translokation der Dlk aus dem Kern an das Aktin-Zytoskelett und eine Kolokalisation mit Par-4-GFP an den Mikrofilamenten (Abb. 22d). Das Aktin-Zytoskelett der Par-4/Dlk koexprimierenden Zellen wies dramatische morphologische Veränderungen auf und anhand des fragmentierten Kerns war eine eindeutige Induktion der Apoptose zu erkennen (Abb. 22c). Dahingegen verblieb die Kinase-negative Mutante FLAG-Dlk K42A (Abb. 22f) nach Koexpression mit Par-4-GFP (Abb. 22e) vollständig im Kern und kolokalisierte nicht mit Par-4 an Aktinfilamenten. Die Zellen wiesen ein intaktes Zytoskelett auf und es waren keine morphologischen Anzeichen der Apoptose zu erkennen (Abb. 22g). Ein ähnliches Ergebnis ließ sich auch nach Koexpression der Leucin-Zipper Mutante Par-4 L3 (Abb. 22i) mit FLAG-Dlk (Abb. 22j) beobachten: Die Kinase translozierte nicht aus dem Kern in das Zytoplasma und kolokalisierte nicht mit Par-4 L3 am Aktin-Zytoskelett. Par-4 L3 wies allerdings eine veränderte subzelluläre Verteilung im Vergleich zum Wildtyp Par-4 Protein auf. Diese Par-4 Mutante war zum einen mit dem Aktin-Zytoskelett im Zytoplasma assoziiert, andererseits

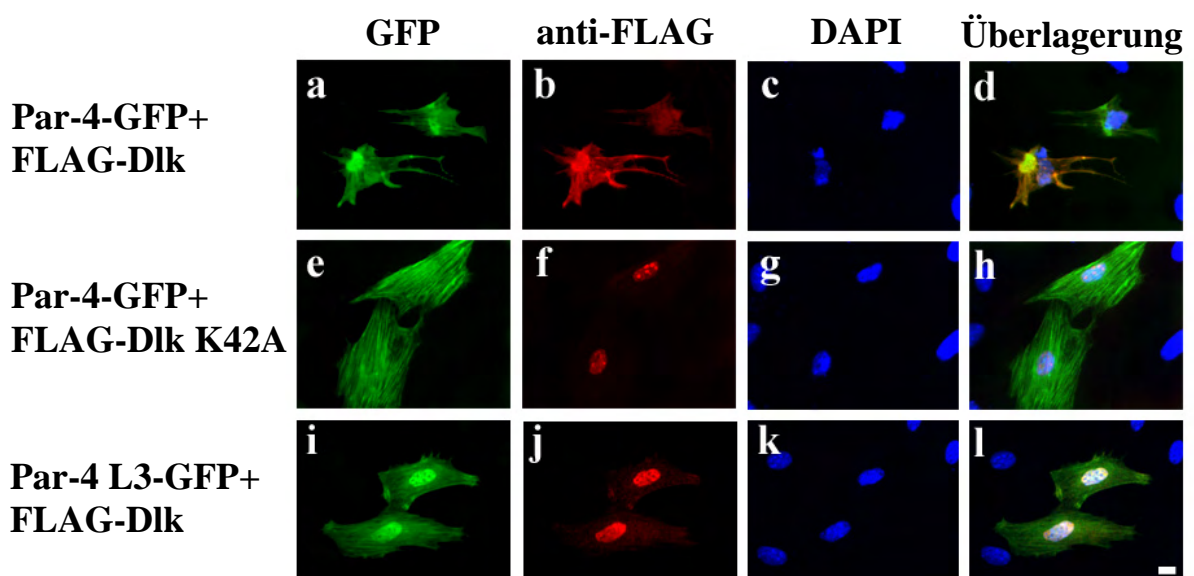


Abb. 22: Translokation der Dlk nach Koexpression mit Par-4. REF52.2 Zellen wurden transient mit Par-4-GFP und FLAG-Dlk (a-d), Par-4-GFP und der Kinase-negativen Mutante FLAG-Dlk K42A (e-h) und mit der Leucin-Zipper Punktmutante Par-4 L3-GFP und FLAG-Dlk kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG M2 Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus-IgG Sekundärantikörper gefärbt (b, f, j). Zur Visualisierung der Kerne wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt (c, g, k). Balken, 10 µm.

wurde eine deutliche Expression im Kern beobachtet (Abb. 22i). Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass für die Translokation der Dlk aus dem Kern in das Zytoplasma nach Koexpression mit Par-4 sowohl die Kinaseaktivität der Dlk als auch die Interaktion mit Par-4 essentiell sind.

4.2.1.2 *in vivo* Bindungsstudien mit Par-4 und Dlk

Da bisher in Studien von Page et al. (1999) nur eine *in vitro* Interaktion zwischen Par-4 und Dlk nachgewiesen werden konnte, sollte diese Interaktion auch *in vivo* für die endogenen Proteine bestätigt werden. Dazu wurden Zellextrakte aus REF52.2 Zellen verwendet, bei denen eine hohe Expression sowohl der Dlk als auch des Par-4 Proteins bekannt war. Für die Immunpräzipitation mit REF52.2 Zellextrakten wurde ein polyklonaler anti-Dlk Peptid-Antikörper eingesetzt, der von der Firma Pineda hergestellt wurde. Als Negativkontrolle diente hierbei ein Ziegen-Kontrollserum. Die präzipitierten Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot unter Verwendung eines polyklonalen anti-Par-4 Antikörpers analysiert. Zusätzlich zu den Präzipitaten wurde auf das PAA-Gel 50 µg des Gesamtzellextraktes als Molekulargewichtsmarker für die präzipitierten Proteine aufgetragen (Abb. 23, Spur 2, Input). Das Ergebnis in Abbildung 23 zeigte, dass der anti-Par-4 Antikörper nach der Immunpräzipitation mit dem anti-Dlk Antikörper eine Proteinbande detektierte, die dem endogenen Par-4 Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 38 kDa entsprach (Abb. 23, Spur1). Das Ziegen-Kontrollserum war dagegen nicht in der Lage ein Protein mit dem entsprechenden Molekulargewicht zu präzipitieren (Abb. 23, Spur 3).

IP : anti-Dlk
WB: anti-Par-4

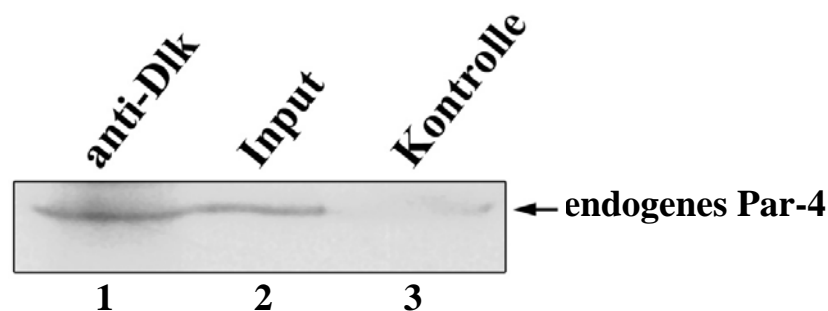


Abb. 23: Koimmunpräzipitation von endogenem Par-4 und Dlk. Zellextrakte von REF52.2 Zellen wurden für eine Immunpräzipitation mit einem polyklonalen anti-Dlk Antikörper (Spur 1) oder einem Ziegen-Kontrollserum (Spur 3) eingesetzt. Die Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und das kopräzipitierte Par-4 Protein wurde in der Western Blot Analyse mit einem polyklonalen anti-Par-4 Antikörper detektiert. Der Input repräsentiert 50 µg des Gesamtzellextraktes (Spur 2).

4.2.1.3 Identifizierung potentieller Dlk-Phosphorylierungsstellen im Par-4 Protein

Die Arbeiten von Page et al. (1999) und auch die Ergebnisse dieser Doktorarbeit haben Par-4 nicht nur als *in vitro* und *in vivo* Interaktionspartner der Proteinkinase Dlk identifiziert, sondern darüber hinaus scheint Par-4 auch ein Substrat für die Dlk zu sein. Daher stellte sich die Frage, inwieweit die Phosphorylierung des Par-4 Proteins für die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose essentiell ist.

Zur Identifizierung der potentiellen Dlk Phosphorylierungsstellen im Par-4 Protein wurde die AS-Sequenz des Ratten Par-4 Proteins einer genaueren Analyse unterzogen und mit den bisher bekannten Substraten der Dlk bzw. des humanen Orthologs, der ZIPK, verglichen (Burch et al., 2004). Die Konsensussequenz der Dlk repräsentiert ein AS-Motiv aus RXXS/TYXR, wobei X jede beliebige Aminosäure und Y kein Prolin sein darf (KH Scheidtmann, unveröffentlichte Daten, Burch et al., 2004). Die Abb. 24A zeigt einen schematischen Sequenzvergleich der Dlk/ZIPK Phosphorylierungsstellen der bekannten Substrate MDM2 (Burch et al., 2004), H3 (Preuss et al., 2003a) MLC (Komatsu und Ikebe, 2004), p21^{waf} (Burch et al., 2004) und den potentiellen Dlk Phosphorylierungsstellen innerhalb des Par-4 Proteins. Anhand des Sequenzvergleiches der bekannten und der

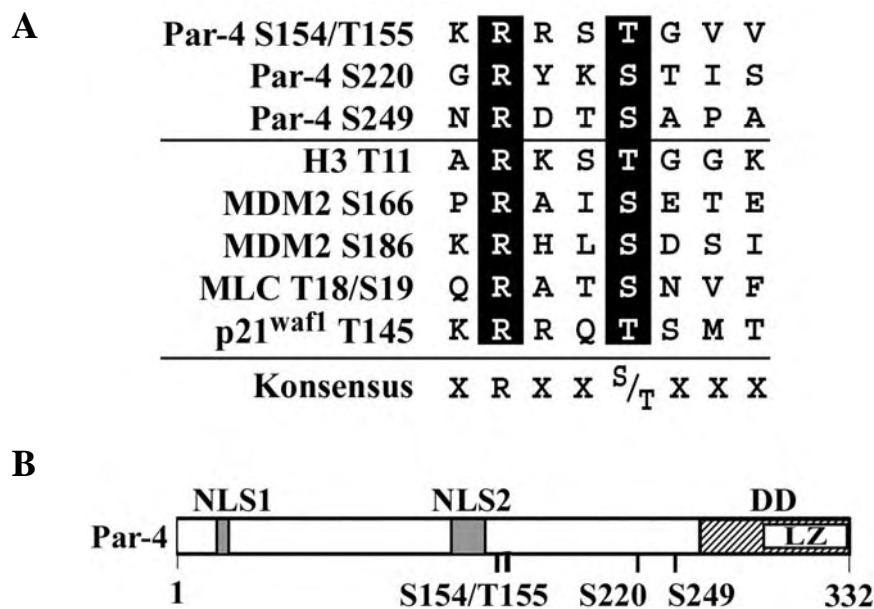


Abb. 24: (A) Sequenzvergleich verschiedener Dlk/ZIPK Substrate. Die putativen Dlk Phosphorylierungsstellen des Par-4 Proteins sind im oberen Abschnitt dargestellt, die bekannten Dlk/ZIPK Substrate H3, MDM2 MLC und p21^{waf} mit ihren Phosphorylierungsstellen sind im unteren Teil abgebildet. Anhand des Sequenzvergleiches wird deutlich, dass ein Argininrest (schwarzer Balken links) in der -3 Position der Phosphoakzeptorstelle (schwarzer Balken rechts) erforderlich ist. Daraus leitet sich eine Konsensussequenz von RXXS/TXXX ab. Die Abbildung (B) zeigt schematisch die Proteindomänenstruktur des Ratten Par-4 wt Proteins. Par-4 besteht aus 332 Aminosäuren und enthält zwei nukleäre Kernlokalisationssignale (NLS1 und NLS2). Im C-Terminus befindet sich ein Leucin-Zipper Motiv (LZ), das in einer putativen Todesdomäne eingebettet ist (DD). Die potentiellen Dlk Phosphorylierungsstellen im Par-4 Protein sind eingezeichnet.

potentiellen Dlk/ZIPK Substrate konnte in allen Dlk/ZIPK Substraten ein Argininrest identifiziert werden, der an der -3 Position der potentiellen Phosphoakzeptorstelle vorransteht. Das minimale Dlk Konsensusmotiv bestehend aus RXXS/T konnte somit bestätigt werden. Durch die Sequenzanalyse wurden drei putative Dlk Phosphorylierungsstellen in der Ratten Par-4 AS-Sequenz an den Positionen T155, S220 und S249 identifiziert. Da der Aminosäure Threonin an der Position 155 innerhalb der Konsensussequenz ein Serinrest an der Position 154 vorrausgeht und der benötigte Argininrest von anderen basischen Aminosäuren umgeben ist, wurde auch die Aminosäure Serin 154 als eine putative Dlk Phosphorylierungsstelle angesehen und in alle nachfolgenden experimentellen Ansätze mit einbezogen. Eine schematische Übersicht über die putativen Dlk Phosphorylierungsstellen, die alle im C-terminalen Bereich des Par-4 Proteins, zwischen der zweiten NLS und der Todesdomäne liegen, ist in Abb. 24 B dargestellt.

4.2.1.4 Par-4 als Substrat verschiedener Kinasen

Bisher war bekannt, dass Par-4 ein *in vitro* und ein *in vivo* Interaktionspartner der Dlk ist. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das Par-4 Protein von einer C-terminal verkürzten Deletionsmutante der Dlk, die zwar eine vollständige Kinaseaktivität, jedoch ein verringertes Molekulargewicht im Vergleich zur wildtyp Dlk aufweist, *in vitro* phosphoryliert werden kann (Page et al., 1999). Um zu untersuchen, ob Par-4 auch ein Substrat der Wildtyp Dlk darstellt, wurde ein zeitabhängiges *in vitro* Phosphorylierungsexperiment durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde 1 µg rekombinantes, aufgereinigtes Par-4 Protein mit rekombinanter aufgereinigter Dlk in Gegenwart von 0,1 µCi [³²P] γ-ATP *in vitro* phosphoryliert (gereinigte Proteine freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jan Kubicek). Die Phosphorylierungsreaktionen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit Probenpuffer abgestoppt, die Proben in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Wie in Abbildung 25A dargestellt, war bereits nach einer Minute Inkubationsdauer der Dlk mit dem Par-4 Protein eine deutliche Phosphorylierung des Par-4 Proteins zu beobachten (Abb. 25A, Spur 2). Eine Verlängerung der Inkubationszeit bis zu 30 Minuten konnte die Effizienz der Phosphorylierung des Par-4 Proteins durch die Dlk jedoch noch erheblich steigern (Abb. 25A, Spur 5). Darüber hinaus zeigte die Kinase eine ausgeprägte Autophosphorylierung, was anhand der radioaktiv markierten Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 52 kDa zu erkennen war. Auffällig war, dass bei Anwesenheit des Par-4 Proteins im Phosphorylierungsansatz die Autophosphorylierung der Dlk schwächer wurde im Gegensatz zum Phosphorylierungsansatz ohne Par-4 (vgl.

Abb. 25A, Spur 6 mit Spur 5 und 7). Die Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass Par-4 für die Dlk ein bevorzugtes Substrat gegenüber der Kinase selbst darstellt. Um zu überprüfen, ob die Phosphorylierung des Par-4 Proteins tatsächlich auf die Kinaseaktivität der Dlk und nicht auf eine weitere Kinase, die bei der Aufreinigung der Proteine mitgereinigt wurde, zurückzuführen ist, wurde die Kinase-negative Dlk Mutante K42A als Kontrolle in einem *in vitro* Kinasetest eingesetzt, die aufgrund einer Punktmutation in aktiven Zentrum der Kinasedomäne an der Position K42 keine Kinasaktivität mehr aufwies (Abb. 25A, Spur 8). In diesem Ansatz trat keine Phosphorylierung des Par-4 Proteins oder der Kinasemutante auf, so dass eine Phosphorylierung des Par-4 Proteins durch eine zusätzlich gereinigte Kinase ausgeschlossen werden konnte.

Es wurde im nächsten Schritt eine Phosphoaminosäureanalyse des Par-4 Proteins durchgeführt, um zu untersuchen welche Aminosäurereste im Par-4 Protein bevorzugt von der Serin/Threonin Kinase Dlk phosphoryliert werden. Dazu wurde aufgereinigtes Par-4 wie vorher beschrieben durch die Dlk phosphoryliert und die Proteine wurden anschließend in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Von der Matrix wurde das radioaktiv markierte Par-4 Protein durch Trypsinverdau eluiert und in Peptidfragmente gespalten. Nach einer Perameisensäureoxidation wurde ein Aliquot des Gesamtverdaus von ca. 500 cpm durch saure Hydrolyse in seine AS-Bausteine zerlegt und für eine Elektrophorese auf einer Dünnschichtchromatographieplatte vorbereitet. Um die Position der verschiedenen aufgetrennten Phosphoaminosäuren nach der Elektrophorese bestimmen zu können, wurde zusammen mit den Proben ein Standard aus Phosphothreonin, -serin und -tyrosin auf derselben Dünnschichtchromatographieplatte aufgetrennt, der nach der Elektrophorese mit Ninhydrin angefärbt und als Marker für die verschiedenen Phosphoaminosäuren verwendet werden konnte. Das Ergebnis der Autoradiographie der elektrophoretisch aufgetrennten Aminosäuren ist in Abbildung 25B dargestellt. Nach der Auftrennung der Phosphoaminosäuren war sowohl an der Position des Phosphoserins als auch an der Position des Phosphothreonins, die anhand der Marker-Phosphoaminosäuren detektiert werden konnten, ein starkes radioaktives Signal zu erkennen. Das Signal an der Position des Phosphoserins war bei dieser Analyse schwächer als das Signal an der Position des Phosphothreonins. Es wurde densitometrisch ermittelt, dass das Par-4 Protein an Serin und Threoninresten in einem Verhältnis von ca. 1:2 von der Dlk phosphoryliert wird. Das Verhältnis der Phosphoaminosäuren zueinander veränderte sich nicht mit zunehmender Inkubationsdauer der *in vitro* Phosphorylierung, so dass keine Aussage über eine konkrete durch die Dlk bevorzugte Aminosäure bei der Phosphorylierung getroffen werden konnte.

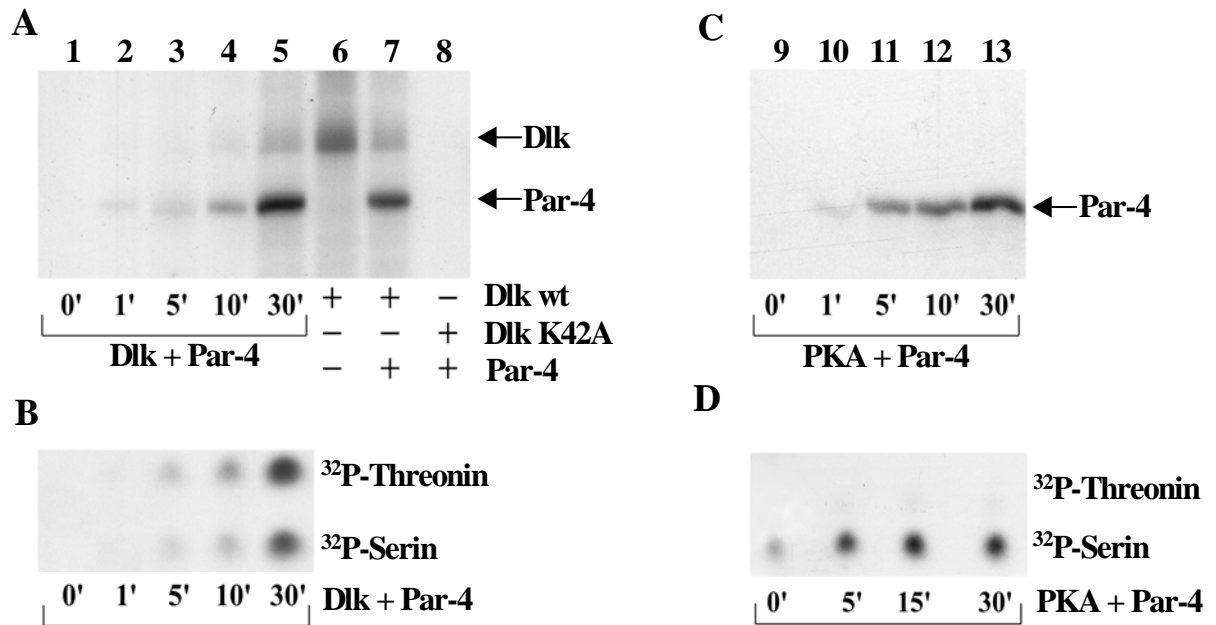


Abb. 25: *In vitro* Phosphorylierung des Par-4 Proteins mit Dlk und PKA. **(A)** Par-4 Phosphorylierung durch Dlk oder als Kontrolle der Kinase-negativen Dlk Mutante K42A. In einem *in vitro* Kinasetest wurde je 1 µg gereinigtes Par-4 mit 0,3 µg aufgereinigter Dlk 0, 1, 5, 10 oder 30 min phosphoryliert, in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Die Positionen des phosphorylierten Par-4 und der autophosphorylierten Dlk sind angezeigt. **(B)** Phosphoaminosäureanalyse des Par-4 Proteins nach Phosphorylierung mit der Dlk. Die Phosphoproteine wurden auf Nitrocellulose geblottet, von der Membran eluiert und einer sauren Hydrolyse unterzogen. Die Phosphoaminosäuren wurden auf einer Dünnschichtchromatographieplatte elektrophoretisch aufgetrennt und über Autoradiographie visualisiert. **(C)** Par-4 Phosphorylierung mit der PKA. Gereinigtes Par-4 wurde wie unter (A) beschrieben mit 10 U PKA *in vitro* phosphoryliert und analysiert. Die Inkubationszeiten des Kinasetests betragen zwischen 0 und 30 min. **(D)** PKA phosphoryliertes Par-4 Protein wurde wie unter (B) beschrieben einer sauren Hydrolyse unterzogen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der Phosphoaminosäuren erfolgte autoradiographisch.

Da anhand von Par-4 AS-Sequenzanalysen auch potentielle Phosphorylierungsstellen für die PKA vorhergesagt wurden und neuere Studien Par-4 als ein wichtiges Substrat der PKA beschrieben haben (Gurumurthy et al., 2005), wurden des weiteren *in vitro* Phosphorylierungsexperimente und Phosphoaminosäureanalysen des Par-4 Proteins nach Phosphorylierung mit der PKA, wie oben entsprechend für die Dlk beschrieben, durchgeführt. Das Ergebnis des *in vitro* Kinasetest ist in Abbildung 25C dargestellt. Bereits nach einer Minute Inkubationsdauer des Par-4 Proteins mit der PKA war eine deutliche radioaktiv markierte Proteinbande auf der Höhe des Par-4 Proteins zu erkennen (Abb. 25C, Spur 10). Wie bereits bei den Phosphorylierungsexperimenten mit der Dlk gezeigt wurde, konnte die Effizienz der Phosphorylierung durch Verlängerung der Inkubationszeit auf 30 min noch gesteigert werden (Abb. 25C, Spur 13).

Um festzustellen welche Aminosäurereste im Par-4 Protein bevorzugt von der PKA phosphoryliert werden, wurde eine Phosphoaminosäureanalyse mit dem Par-4 Protein

durchgeführt, das zuvor *in vitro* mit der PKA phosphoryliert worden war. Dazu wurde das gereinigte, *in vitro* phosphorylierte Par-4 Protein wie oben beschrieben in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und anhand eines Trypsinverdaus von der Matrix eluiert. Das isolierte und phosphorylierte Protein wurde einer sauren Hydrolyse unterzogen und die Phosphoaminosäuren wurden elektrophoretisch auf einer Dünnschichtchromatographieplatte aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Die starke Schwärzung des Röntgenfilms in Abbildung 25D an der Position des Phosphoserins, die Anhand der Marker-Phosphoaminosäuren detektiert werden konnte, demonstrierte deutlich, dass das Par-4 Protein von der PKA ausschließlich an Serinresten phosphoryliert wurde. Auch nach einer Phosphorylierungszeit von bis zu 30 min war keine zusätzliche Phosphorylierung des Par-4 Proteins an Threoninresten zu detektieren.

4.2.1.5 Herstellung von Par-4 Phosphorylierungsmutanten

Um die Dlk Phosphorylierungsstellen im Par-4 Protein zu identifizieren, wurden verschiedene Par-4 Phosphorylierungsmutanten erzeugt, in denen die potentiell durch die Dlk phosphorylierbaren Aminosäurereste S154, T155, S220 und S249 zu Alaninresten mutiert wurden. Die Herstellung der einzelnen Phosphorylierungsmutanten erfolgte mittels PCR-Mutagenese. Für die erste PCR-Reaktion wurden dabei für die Mutanten Par-4 S154A, T155A, S154/T155A und S220A die Oligonukleotide „5' Par-4 103-123“ und „Par-4 AgeI reverse“ verwendet, die den Bereich der Par-4 cDNA von bp103 bis 1071 flankierten. Diese wurden zunächst in Kombination mit den jeweiligen Mutageneseoligonukleotiden „5'Par4-mut-S154“ und „3'Par4-mut-S154“, „5'Par4-mut-T164“ und „3'Par4-mut-T164A“; „5'Par4-ST154AA“ und „3'Par4-ST154AA“ sowie „5'Par4-mut-S230“ und „3'Par4-mut-S230“ eingesetzt, die die jeweils zu mutierende Phosphorylierungsstelle überspannten und bei denen die Sequenzen der potentiell phosphorylierbaren Serine und Threonine zu Sequenzen für Alanine ausgetauscht worden waren. Die aus der ersten PCR-Reaktion resultierenden einzelnen PCR Fragmente der jeweiligen Phosphorylierungsmutanten wurden über eine weitere PCR-Reaktion, in der sie sich in ihren überlappenden Bereichen selber als Matrize dienten, mit den flankierenden Oligonukleotiden „5' Par-4 103-123“ und „Par-4 AgeI reverse“ zusammengefügt. Die PCR-Produkte wurden im Falle der Mutanten S154A und T155A mit den Restriktionsenzymen *PshAI* und *EcoRV*, im Falle der Mutante S154/T155A mit den Restriktionsenzymen *PshAI* und *AccI* oder im Falle der Mutante S220 mit den Restriktionsenzymen *BssHIII* und *AccI* geschnitten und in den pEGFP-N1-Par-4 Vektor,

der ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut worden war, subkloniert. Die erzeugten Par-4-GFP Phosphorylierungsmutanten wurden mit Par-4 S154A-GFP, Par-4 T155A-GFP, Par-4 S154/T155A-GFP und Par-4 S220A-GFP bezeichnet. In einer weiteren PCR-Reaktion wurden die Oligonukleotide „5'Par4mutS257“, das die putative Phosphorylierungsstelle S249 und die Restriktionsschnittstelle des Restriktionsenzym *AccI* überspannte und dessen Sequenz des Serin 249 zu der Sequenz für Alanin ausgetauscht worden war und “Par-4 AgeI reverse“, das das Stop Codon und die Restriktionsschnittstelle des Restriktionsenzym *AgeI* überspannte, eingesetzt. Das daraus resultierende PCR-Produkt wurde mit *AccI* und *AgeI* verdaut und ebenfalls in den pEGFP-N1-Par-4 Vektor subkloniert. Die Par-4 Phosphorylierungsmutante wurde als Par-4 S249A-GFP bezeichnet.

4.2.1.6 Expression der Par-4 Phosphorylierungsmutanten

Um festzustellen, ob die hergestellten Par-4 Phosphorylierungsmutanten nach der Expression zum einen korrekt gefaltet werden, und zum anderen *in vivo* funktionell sind, wurden Expressionsstudien in REF52.2 Zellen vorgenommen in denen die subzelluläre Lokalisation der Par-4 Phosphorylierungsmutanten im Vergleich zum Par-4 wt untersucht wurde. Die Zellen wurden mit den Par-4-GFP Phosphorylierungsmutanten und Par-4-GFP wt zur Kontrolle transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und einer DAPI-Kernfärbung sowie einer Aktin-Färbung mit TRITC-markiertem Phalloidin unterzogen. Wie in Abbildung 26 dargestellt, führte die Expression der Par-4-GFP Phosphorylierungsmutanten S154, T155, S220 und S249 (Abb. 26e, i, m, q) zu einer Lokalisation der GFP-Fusionsproteine an parallel angeordneten zellulären Strukturen, die eine deutliche Kolo-kalisation mit den durch Phalloidin angefärbten Spannungsfasern des Aktin-Zytoskeletts aufwiesen (Abb. 26f, j, n, r). Alle Par-4 Phosphorylierungsmutanten zeigten eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation in REF52.2 Zellen und entsprachen in ihrer subzellulären Lokalisation und Aktinassoziation vollständig der Lokalisation des Wildtyp Par-4 Proteins (Abb. 26a). Dieses Ergebnis zeigte, dass die Mutationen der Par-4 Phosphorylierungsmutanten keinen Einfluss auf die Lokalisation oder Faltung des Proteins haben.

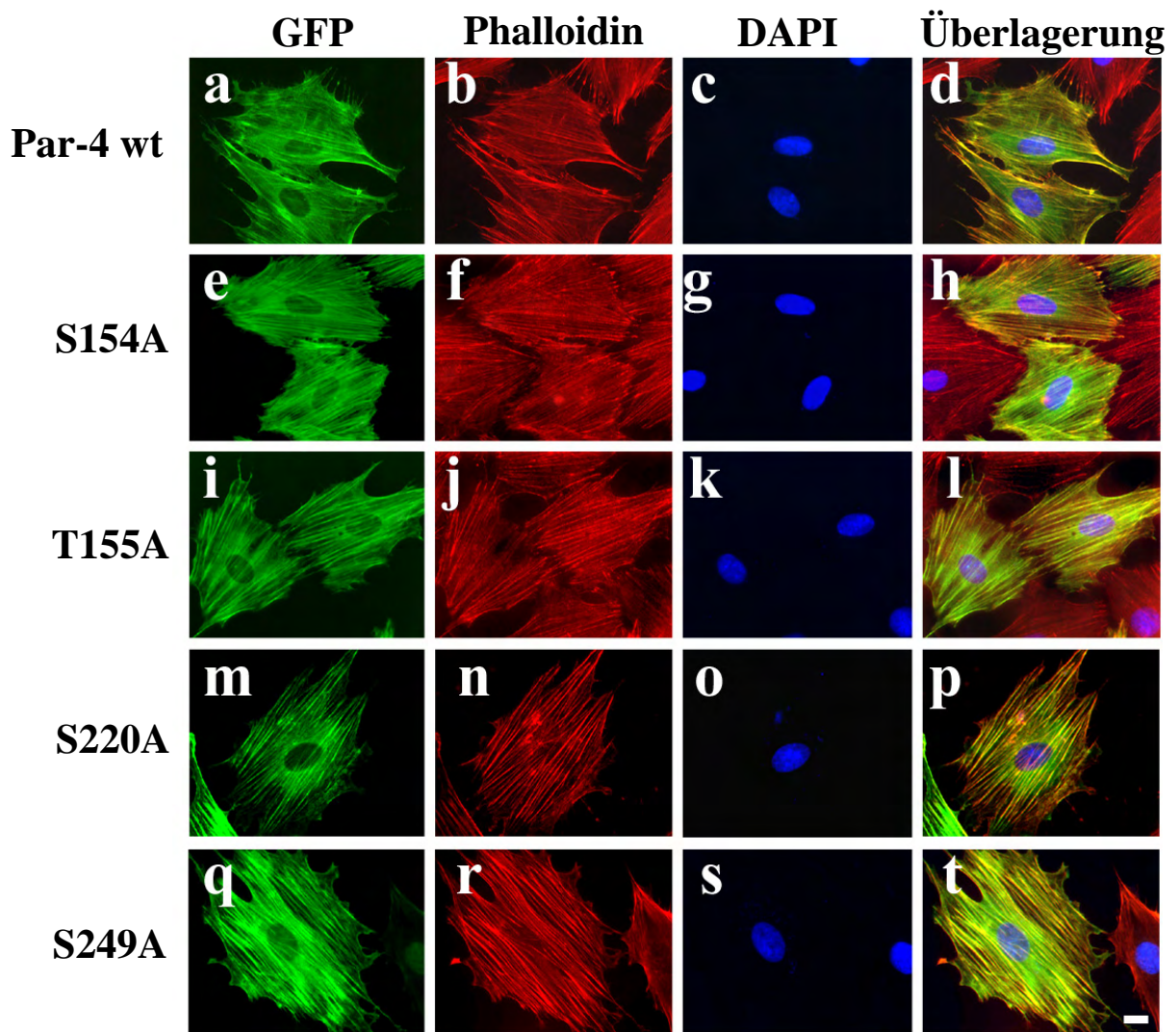


Abb. 26: Subzelluläre Verteilung des Par-4 wt Proteins und verschiedener Par-4 Phosphorylierungsmutanten. REF52.2 Zellen wurden transient transfiziert mit Par-4-GFP wt (a) oder den Par-4-GFP Phosphorylierungsmutanten S154A (e), T155A (i), S220A (m) und S249A (q). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Kerne mit DAPI visualisiert (c, g, k, o, s). Das Aktin-Zytoskelett wurde mit TRITC-markiertem Phalloidin angefärbt (b, f, j, n, r). Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden mit einem Axiophot Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) aufgenommen. Der Balken entspricht 10 μ m.

4.2.1.7 Identifizierung der Dlk-Phosphorylierungsstellen im Par-4 Protein

Zur Identifizierung der Dlk Phosphorylierungsstellen im Par-4 Protein wurde zunächst mit den zuvor hergestellten Par-4 Phosphorylierungsmutanten ein *in vitro* Kinasetest durchgeführt, bei dem das Par-4 wt Protein als Kontrolle eingesetzt wurde. Um die Par-4 Phosphorylierungsmutanten als gereinigte Proteine für dieses Experiment einsetzen zu können, mussten die Par-4 Phosphorylierungsmutanten zunächst in den prokaryotischen Expressionsvektor pET23a(+) umkloniert werden. Dies erfolgte über einen Kassettenaustausch in dem Expressionsvektor pET23a(+)-Par-4 wt, der freundlicherweise von Dr. Jan Kubicek zur Verfügung gestellt worden war (Vetterkind et al., 2005a). Für die

Klonierung wurde ein 619 bp großes Fragment mit den Restriktionsenzymen *Bss*HIII und *Eco*RV aus der cDNA der Par-4-GFP Phosphorylierungsmutanten ausgeschnitten und in den pET23a(+)-Par-4 wt Vektor subkloniert. Die Par-4 Phosphorylierungsmutanten wurden daraufhin heterolog exprimiert und aufgereinigt (gereinigte Proteine freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jan Kubicek). In dem anschließend durchgeführten *in vitro* Phosphorylierungsexperiment wurden dann jeweils 2 µg der rekombinanten, gereinigten Par-4 Phosphorylierungsmutanten oder als Kontrolle das Par-4 wt Protein mit 0,7 µg Dlk in Anwesenheit von 1 µCi [³²P] γ-ATP *in vitro* phosphoryliert. Die Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie Brilliant Blue Färbung und Autoradiographie analysiert.

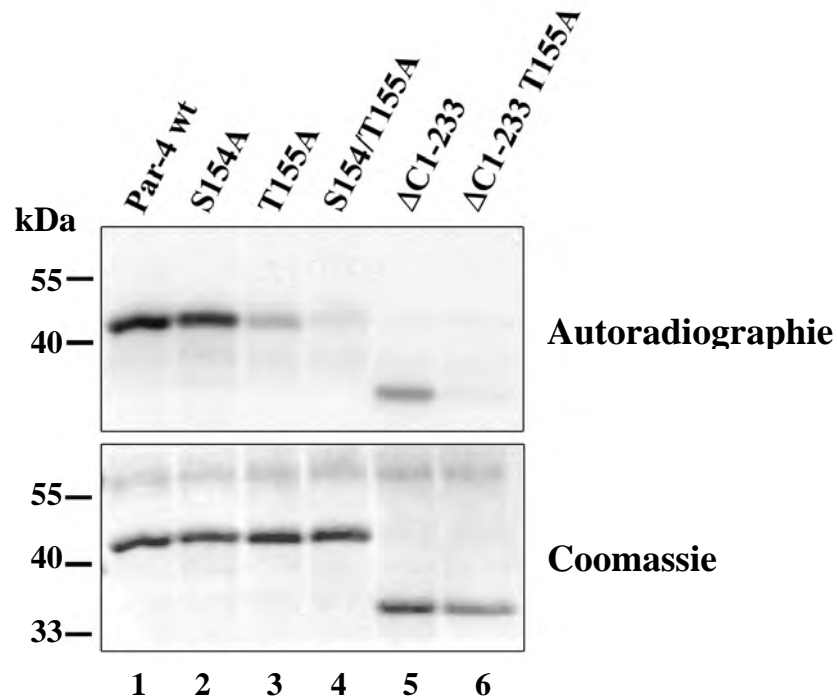


Abb. 27: *In vitro* Phosphorylierung der Par-4 Phosphorylierungsmutanten und des Par-4 wt Proteins mit der Dlk. In einem *in vitro* Kinasetest wurden jeweils 2 µg des gereinigten Par-4 (Spur 1) bzw. Par-4 S154A (Spur 2), Par-4 T155A (Spur 3), Par-4 S154/T155A (Spur 4) oder der Deletionsmutanten Par-4 ΔC1-233 (Spur 5) und Par-4 ΔC1-233 T155A (Spur 6) mit 0,7 µg Dlk in Anwesenheit von 1µCi [³²P] γ-ATP phosphoryliert und anschließend in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (unten) und die phosphorylierten Proteine wurden mittels Autoradiographie detektiert (oben).

Wie im oberen Teil der Abbildung 27 dargestellt, wurde sowohl Wildtyp Par-4 (Abb. 27, Spur 1) als auch die Par-4 Mutante S154A (Abb. 27, Spur 2) deutlich von der Dlk phosphoryliert, was an der radioaktiv markierten Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 38 kDa in der Spur 1 und 2 zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu war bei der Par-4 Mutante T155A nach der Phosphorylierung mit der Dlk eine schwächere phosphorylierte Proteinbande (Abb. 27, Spur 3) und bei der Doppelmutante S154/T155A eine

sehr schwache radioaktive Proteinbande zu erkennen (Abb. 27, Spur 4). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Par-4 Protein von der Dlk an der Position T155 phosphoryliert wird. Da jedoch trotz der Mutagenese der potentiellen Phosphorylierungsstelle T155 eine leichte Phosphorylierung des Par-4 Proteins durch die Dlk beobachtet wurde und die Phosphoaminosäureanalyse eine Phosphorylierung des Par-4 Proteins sowohl an Threonin als auch an Serinresten demonstriert hatte (vgl. Abschnitt 4.2.1.4), wurde eine zusätzliche Phosphorylierung an weiteren Aminosäuren des Par-4 Proteins vermutet. Eine der möglichen Aminosäuren die über das Threonin 155 hinaus phosphoryliert werden könnte, war das Serin an Position 249 des Par-4 Proteins, das eine putative Phosphorylierungsstelle der Dlk darstellte. Jedoch ist die cDNA Sequenz, die für das Serin 249 und die angrenzende Konsensussequenz kodiert innerhalb der Par-4 cDNA-Sequenzen der Maus, des Menschen und der Ratte nicht konserviert und ist in der humanen und murinen cDNA-Sequenz nicht vorhanden. Aus diesem Grund wurde die putative Phosphorylierungsstelle S249 zunächst nicht eingehender untersucht. Da jedoch gezeigt wurde, dass das Serin 249 des Ratten Par-4 Proteins eine inhibitorische Phosphorylierungsstelle der Akt Kinase darstellt (Goswami et al., 2005) wurde diese Aminosäure und ihre mögliche Phosphorylierung wieder in die Überlegungen mit einbezogen. Um die Phosphorylierung des S249 im Par-4 Protein und darüber hinaus aller möglicherweise im C-Terminus von Par-4 vorhandenen potentiellen Phosphorylierungsstellen untersuchen zu können, wurden C-terminale Deletionsmutanten des Par-4 wt und des Par-4 T155A Proteins hergestellt, denen die C-terminalen 99 Aminosäuren inklusive des Serin S249 fehlten, die aber die Dlk Phosphorylierungsstelle T155A noch enthielten. Zur Herstellung der Deletionsmutanten Par-4 Δ C1-233 und Par-4 Δ C1-233 T155A wurden die Vektoren pET23a(+) Par-4 wt und pET23a(+) Par-4 T155A mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *XhoI* geschnitten, wodurch 300 bp der Par-4 cDNA deletiert wurden, und mit dem Klenow Fragment inkubiert, um glatte cDNA-Enden zu erzeugen. Die verkürzten Vektoren wurden religiert und die Proteine von Dr. Jan Kubicek heterolog exprimiert und aufgereinigt. Die C-terminal deletierten Proteine Par-4 Δ C1-233 und Par-4 Δ C1-233 T155A wurden parallel mit den Phosphorylierungsmutanten Par-4 S154A, Par-4 T155A, der Doppelmutante S154/T155A und dem Par-4 wt Protein als Kontrolle in dem *in vitro* Phosphorylierungsexperiment analysiert. In dem Phosphorylierungsansatz mit der Deletionsmutante Par-4 Δ C1-233 konnte eine starke radioaktiv markierte Proteinbande detektiert werden (Abb. 27, Spur 5), wohingegen keine radioaktiv markierte Proteinbande der Mutante Par-4 Δ C1-233 T155A nach der Phosphorylierung mit der Dlk zu beobachten war (Abb. 27, Spur 6). Die Phosphorylierung des T155 durch die Dlk konnte somit *in vitro*

bestätigt werden. Eine zusätzliche Phosphorylierung des Par-4 Proteins an den Serinresten S154 und S249 scheint möglich und wahrscheinlich, da deren Deletion zu einer deutlich verringerten Phosphorylierung des Par-4 Proteins durch die Dlk führte.

4.2.1.8 Identifizierung der PKA-Phosphorylierungsstellen im Par-4 Protein

Nachdem anhand von Sequenzanalysen auch zwei putative Phosphorylierungsstellen für die PKA in der Par-4 AS-Sequenz vorausgesagt wurden (S154 und T155), konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass das Par-4 Protein tatsächlich ein Substrat für die PKA darstellt und durch die PKA ausschließlich an Serinresten phosphoryliert wird (4.2.1.4). Da dies aber im Widerspruch zu kürzlich veröffentlichten Daten steht, die gezeigt haben, dass das Par-4 Protein von der PKA an der Aminosäure Threonin 155 phosphoryliert wird (Gurumurthy et al., 2005), sollte in einem *in vitro* Phosphorylierungsexperiment die Phosphorylierung des Par-4 Proteins mit der PKA analysiert werden. Dazu wurden jeweils 600 ng gereinigtes Par-4 wt, Par-4 S154A, Par-4 T155A, Par-4 S154/T155A, Par-4 Δ C1-233 und Par-4 Δ C1-233 T155A Protein (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jan Kubicek) mit der PKA in Gegenwart von 1 μ Ci [32 P] γ -ATP für 30 min *in vitro* phosphoryliert. Die phosphorylierten Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie Brilliant Blue Färbung (Abb. 28, unten) und Autoradiographie (Abb. 28, oben) analysiert. In Abbildung 28 ist in Spur 1 eine deutliche Phosphorylierung des Par-4 wt anhand der radioaktiv markierten Proteinbande in Höhe des Par-4 Proteins zu erkennen. Auch in den Phosphorylierungsansätzen der Par-4 Phosphorylierungsmutanten S154A und T155A konnte eine radioaktiv markierte Par-4 Proteinbande detektiert werden (Abb. 28, Spur 2 und 3). Dagegen war in dem Phosphorylierungsansatz mit der Doppelmutante S154/T155A nur eine sehr schwache radioaktive Proteinbande zu erkennen (Abb. 28, Spur 4). Um die mögliche Phosphorylierung des Serin S249 oder weiterer im C-Terminus gelegener Aminosäuren zu untersuchen, wurden, wie bereits unter Abschnitt 4.2.1.7 beschrieben, zusätzlich in diesem Phosphorylierungsexperiment die Par-4 Deletionsmutanten Par-4 Δ C1-233 und Par-4 Δ C1-233 T155A eingesetzt, denen die C-Terminalen 99 Aminosäuren des Par-4 Proteins inklusive der putativen Phosphorylierungsstelle S249 fehlten, die die putative PKA Phosphorylierungsstelle T155 jedoch noch enthielt. Beide Par-4 Deletionsmutanten wurden von der PKA phosphoryliert und zeigten radioaktive Proteinbanden in der gleichen Intensität wie das Wildtyp Par-4 Protein nach Phosphorylierung mit der PKA (Abb. 28, Spur 5+6). Da sich außer bei der Par-4 Doppelmutante Par-4 S154/T155A bei den Par-4 Phosphorylierungsmutanten im Vergleich zum Par-4 wt Protein kein Unterschied in der

Phosphorylierungsintensität zeigte, konnte eine Phosphorylierung des Par-4 Proteins durch die PKA an der Position T155 und im C-Terminus des Par-4 Proteins ausgeschlossen werden.

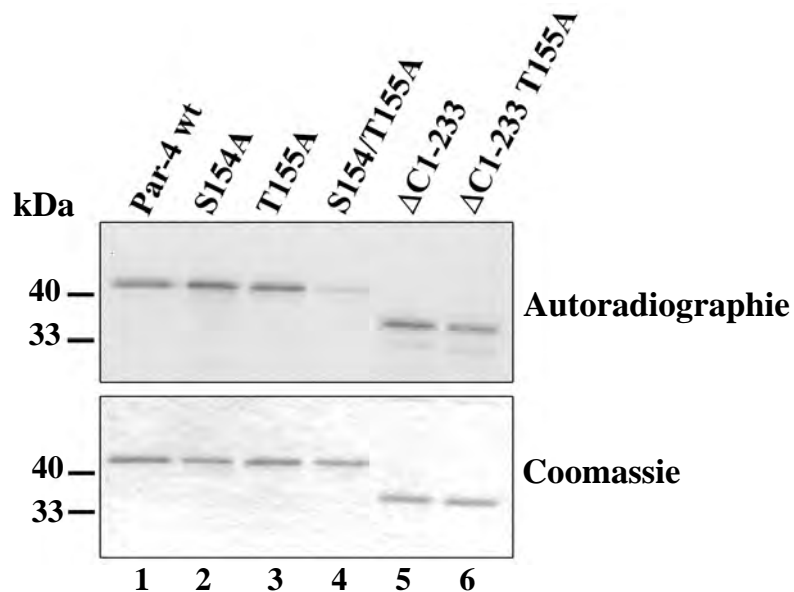


Abb. 28: *In vitro* Phosphorylierung der Par-4 Phosphorylierungsmutanten und des Par-4 wt Proteins mit der PKA. In einem *in vitro* Kinasetest wurden jeweils 600 ng Par-4 wt (Spur 1), Par-4 S154A (Spur 2), Par-4 T155A (Spur 3), Par-4 S154/T155A (Spur 4), Par-4 ΔC1-233 (Spur 5) oder Par-4 ΔC1-233 T155A (Spur 6) mit PKA und 1 μCi [³²P] γ-ATP für 30 min bei 37°C phosphoryliert. Die Proteine wurden anschließend in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (unten). Die Detektion der phosphorylierten Proteine erfolgte mittels Autoradiographie (oben).

4.2.1.9 *In vivo* Phosphorylierung von Par-4

Um den Phosphorylierungsstatus des Par-4 Proteins *in vivo* zu analysieren, wurde eine Phosphoaminosäureanalyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die stabil Par-4-GFP exprimierenden CHO Zellen metabolisch mit 0,1 mCi [³²P]-Orthohosphat für 4 h bei 37°C inkubiert und das radioaktiv markierte Par-4 Protein wurde anschließend mittels einer Immunpräzipitation mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper aus dem Zellextrakt isoliert. Um zu überprüfen, ob das Par-4 Protein *in vivo* von der PKA phosphoryliert wird, wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von cAMP (*zyklisches Adenosinmonophosphat*), einem Aktivator der PKA kultiviert, der eine Ablösung der regulatorischen Untereinheit des PKA-Holoenzym bewirkt und so zu einer Aktivierung der PKA führt (Markierung und IP freundlicherweise durchgeführt von Dr. Stephanie Urschel, Institut für Genetik, Bonn). Anschließend wurden die präzipitierten Proteine in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, wo das radioaktiv markierte Par-4-GFP Protein mittels Autoradiographie identifiziert wurde. Von der Matrix wurde das Protein anschließend anhand eines Trypsinverdaus eluiert, in Peptidfragmente

gespalten und mit Perameisensäure oxidiert. Ein Aliquot des Gesamtverdaus mit ca. 500 cpm wurde durch saure Hydrolyse in seine AS-Bausteine zerlegt und die Phosphoaminosäuren wurden elektrophoretisch auf einer Dünnschichtchromatographieplatte aufgetrennt. Um die Position der verschiedenen aufgetrennten Phosphoaminosäuren nach der Elektrophorese bestimmen zu können, wurde zusammen mit den Proben ein Standard aus Phosphothreonin, -serin und- tyrosin auf der selben Dünnschichtchromatographieplatte aufgetrennt, der nach der Elektrophorese mit Ninhydrin angefärbt und als Marker für die verschiedenen Phosphoaminosäuren verwendet werden konnte. Das Ergebnis ist in Abbildung 29 dargestellt. An der Position des Phosphoserins, die anhand der Marker-Phosphoaminosäuren detektiert werden konnte, war für das Par-4-GFP Protein eine deutliche Schwärzung des Röntgenfilms zu erkennen, wohingegen keine radioaktive Markierung an der Position des Phosphothreonin oder-tyrosins zu detektieren war. Das aus den cAMP-behandelten Zellextrakten isolierte Par-4-GFP Protein zeigte ebenfalls eine deutliche radioaktive Markierung an der Position des Phosphoserins, nicht jedoch an der Position des Phosphothreonins oder -tyrosins. Anhand dieser Analysen zeigte sich, dass das Par-4 Protein *in vivo* deutlich an Serinresten phosphoryliert wird, nicht jedoch an Threonin- oder Tyrosinresten. Ferner konnte durch die Stimulation der PKA mit cAMP weder eine Verstärkung der Serinphosphorylierung noch das Auftreten einer Threoninphosphorylierung des Par-4 Proteins festgestellt werden. Der *in vivo* Phosphorylierungsstatus des Par-4 Proteins blieb auch nach PKA-Aktivierung unverändert.

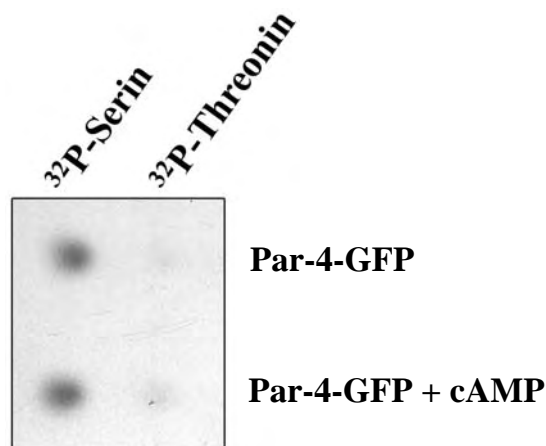


Abb. 29: Phosphoaminosäureanalyse des Par-4-GFP nach metabolischer Markierung mit [³²P]-Orthophosphat. Stabil Par-4-GFP exprimierende CHO Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von cAMP kultiviert und mit 300 µCi [³²P]-Orthophosphat metabolisch markiert. In einer Immunpräzipitation mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper wurde das radioaktiv markierte Par-4-GFP aus dem Zellextrakt isoliert, danach in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Trypsinverdau von der Membran eluiert. Nach saurer Hydrolyse der Phosphoproteine wurden die Phosphoaminosäuren auf einer Dünnschichtchromatographieplatte aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert.

4.2.1.10 Apoptoseinduktion nach Koexpression der Dlk mit verschiedenen Par-4 Phosphorylierungsmutanten

Die Koexpression von Par-4 mit der Dlk führt zu einer Rekrutierung der kernständigen Kinase an Aktinfilamente, nachfolgend zu einer dramatischen Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und zur Induktion der Apoptose. Für die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose ist die Aktin-assoziation von Par-4, eine funktionelle Kinasedomäne der Dlk und eine Interaktion zwischen Par-4 und Dlk erforderlich (Page, Vetterkind). Welchen Einfluss die Phosphorylierung auf die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose ausübt, war jedoch bisher unbekannt und sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit näher untersucht werden. Zunächst wurde die Fähigkeit der Par-4 Phosphorylierungsmutanten analysiert, nach Koexpression mit der Dlk die Kinase an das Aktin-Zytoskelett zu rekrutieren und die Apoptose auszulösen. Zu diesem Zweck wurden die Phosphorylierungsmutanten Par-4 S154A-GFP, Par-4 T155A-GFP, Par-4 S220A-GFP und Par-4 S249A-GFP sowie Par-4-GFP wt als Kontrolle zusammen mit FLAG-Dlk in einem Verhältnis von 3:1 in REF52.2 Zellen exprimiert. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion fixiert, immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG M2 Antikörper und einem fluoreszenz-markierten anti-Maus IgG Sekundärantikörper angefärbt und einer DAPI-Kernfärbung unterzogen. Das Ergebnis der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung ist in Abbildung 30 dargestellt. Wie bereits zuvor gezeigt, führte die Koexpression von Par-4 wt mit Dlk wt zu einer Translokation der Kinase in das Zytoplasma, zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und zur Induktion der Apoptose (Abb. 30a-d). Ein ähnlicher Befund wurde auch nach der Koexpression der Dlk mit den Par-4 Phosphorylierungsmutanten S154A, S220A und S249A beobachtet (Abb. 30e-h, m-p und q-t). Interessanterweise verblieb jedoch die Dlk nach der Koexpression mit der Par-4 Phosphorylierungsmutante T155A fast vollständig im Kern und wurde nicht an die Aktinfilamente rekrutiert (Abb. 30j). Das Aktin-Zytoskelett zeigte keine morphologischen Veränderungen und die Apoptose wurde im Gegensatz zu den anderen Par-4 Phosphorylierungsmutanten nicht ausgelöst (Abb. 30k). Die subzelluläre Verteilung der Kinase nach Koexpression von Par-4 T155A und Dlk war vergleichbar mit der alleinigen Expression der Dlk (Daten nicht gezeigt), oder mit der Koexpression von Par-4 mit der Kinase-negativen Mutante Dlk K42A (vgl. Abb. 22), wo die Kinase ebenfalls im Kern lokalisiert war. Da in einer kürzlich erschienenen Studie demonstriert wurde, dass Par-4 von der PKA bevorzugt an der Aminosäure Threonin 155 phosphoryliert wird und diese Phosphorylierung ein entscheidender Schritt in der Par-4-induzierten Apoptose darstellt (Gurumurthy et al., 2005), wurde in den Koexpressionsstudien auch untersucht, inwieweit die

Inhibition der PKA einen Einfluss auf die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose hat. Dazu wurde ein Koexpressionsexperiment mit FLAG-Dlk und Par-4-GFP in REF52.2 Zellen in Anwesenheit eines Zellmembran permeablen PKA-Inhibitors (PKI) durchgeführt.

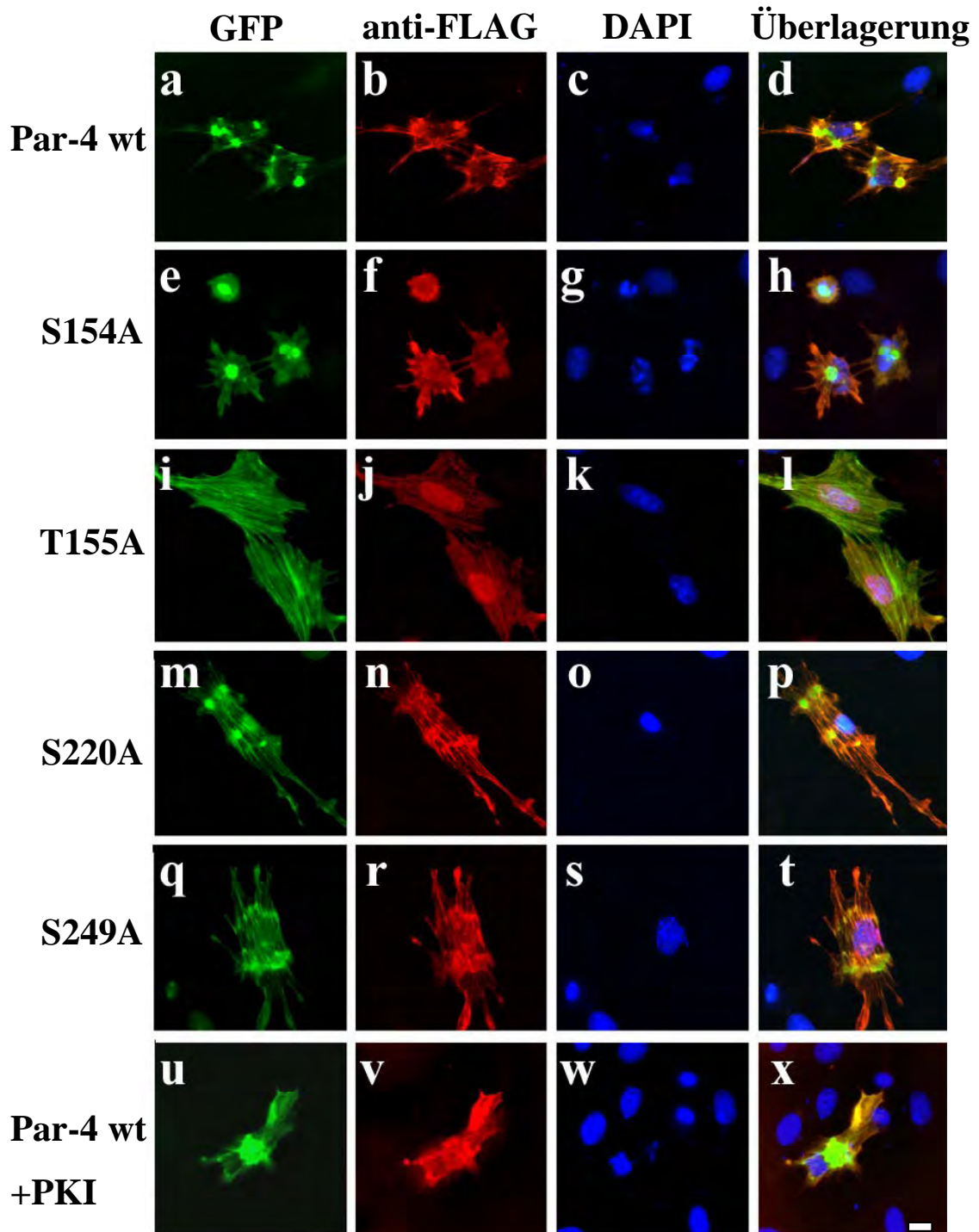


Abb. 30: Koexpression von verschiedenen Par-4 Phosphorylierungsmutanten und Dlk. REF52.2 Zellen wurden mit FLAG-Dlk und Par-4-GFP (a), Par-4 S154A-GFP (e), Par-4 T155A-GFP (i), Par-4 S220A-GFP (m), Par-4 S249A-GFP (q) bzw. mit Par-4-GFP in Anwesenheit von 20 μ M PKA-Inhibitor (PKI) (u) in einem Verhältnis von 1:3 kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, immunzytochemisch mit einem anti-FLAG M2 Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus IgG Sekundärantikörper angefärbt (b, f, j, n, r, v) und einer DAPI Kernfärbung unterzogen (c, g, k, o, s, w). Balken, 10 μ m

Wie in (Abb. 30u-x) dargestellt, ist die Apoptoseinduktion nach Koexpression von Par-4 und Dlk sowie die Translokation der Kinase an Aktinfilamente durch die Inhibition der PKA nicht beeinträchtigt, da die gleiche subzelluläre Verteilung von Par-4 und Dlk und die gleichen morphologischen Veränderungen der Zelle beobachtet wurden wie in der unbehandelten Kontrolle von Par-4/Dlk koexprimierenden Zellen (vgl. Abb. 30a-d). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose nicht durch die Phosphorylierung der PKA beeinflusst wird. Die grundsätzliche Funktionalität des PKA-Inhibitors wurde mit der gleichen Konzentration in einem HeLa-Zellexperiment überprüft (Daten nicht gezeigt).

Zur Quantifizierung der Apoptoserate wurden REF52.2 Zellen wie vorher beschrieben mit FLAG-Dlk und verschiedenen Par-4 Phosphorylierungsmutanten transfiziert. Auch in diesem Experiment wurde der PKA Inhibitor nach Koexpression von Par-4 und Dlk eingesetzt, um den Einfluss der PKA-Inhibition auf die Apoptoserate zu untersuchen. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert, immunzytochemisch mit einem anti-FLAG M2 Antikörper und einem anti-Maus IgG Sekundärantikörper angefärbt und einer DAPI-Kernfärbung unterzogen. Die Apoptoserate der koexprimierenden Zellen wurde anhand morphologischer Merkmale der Apoptose durch Analyse der Präparate am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Wie im Diagramm der Abbildung 31 dargestellt, betrug die Apoptoserate nach der Koexpression von Par-4 wt und Dlk ca. 69%. Diese sank jedoch nach

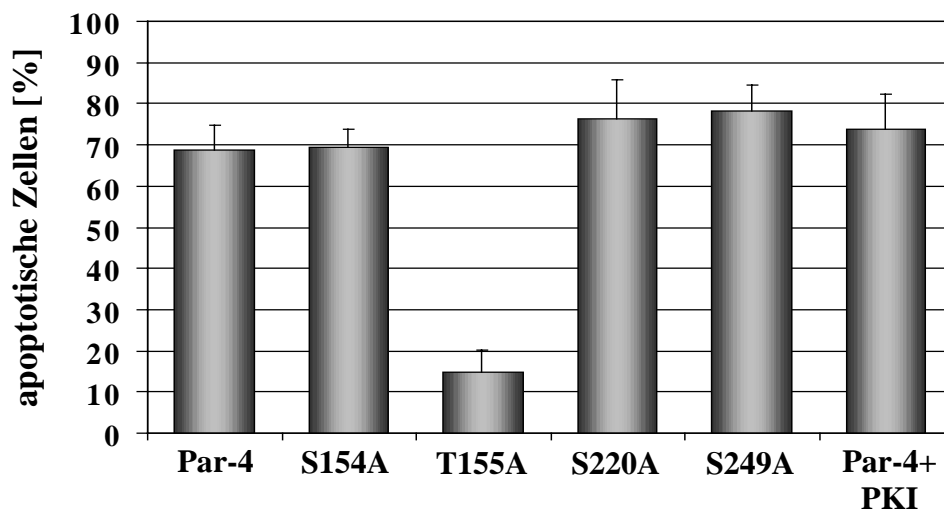


Abb. 31: Induktion der Apoptose nach Koexpression von Dlk und verschiedenen Par-4 Phosphorylierungsmutanten. REF 52.2 Zellen wurden transient transfiziert mit FLAG-Dlk und Par-4-GFP wt, Par-4 S154A-GFP, Par-4 T155A-GFP, Par-4 S220A-GFP, Par-4 S249A-GFP oder Par-4-GFP wt in Anwesenheit von 20 μ M PKA-Inhibitor (PKI). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit einem monoklonalen anti-FLAG M2 Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus IgG Antikörper angefärbt. Um die Kerne zu visualisieren und die apoptotischen Merkmale der koexprimierenden Zellen beurteilen zu können, wurden die Kerne einer DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung der Präparate erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

der Koexpression von der Par-4 Phosphorylierungsmutante T155A und Dlk deutlich auf 15% ab. Dahingegen war die Apoptoserate nach Koexpression der Dlk mit den Par-4 Phosphorylierungsmutanten S154A (69%), S220A (76%) und S249A (78%) vergleichbar mit der Apoptoserate, die nach der Koexpression von Par-4 wt mit der Dlk beobachtet wurde (69%). Auch in diesem Experiment konnte kein Einfluss der PKA-Inhibition auf die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose festgestellt werden, da die Apoptoserate nach der Koexpression mit Par-4 wt und Dlk und dem Einsatz des PKA Inhibitors (74%) vergleichbar zu der unbehandelten Kontrolle von Par-4 wt und Dlk koexprimierenden Zellen war.

4.2.1.11 Bindungsstudien mit Dlk und den verschiedenen Par-4 Phosphorylierungsmutanten

Um auszuschließen, dass die reduzierte Apoptoseinduktion in REF52.2 Zellen nach Koexpression der Par-4 Phosphorylierungsmutante T155A und der Dlk auf eine verminderte Bindungsfähigkeit der Phosphorylierungsmutante mit der Dlk zurückzuführen ist, wurden die Bindungseigenschaften der verschiedenen Par-4 Mutanten und der Dlk näher analysiert. Dies erfolgte mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionstests. Die Par-4 Phosphorylierungsmutanten mussten dazu zunächst mit Hilfe der Oligonukleotide „5'GFP-Par4-EcoRI“ und „3'Par4-Eco-Stop2“, die den kompletten kodierenden Bereich der Par-4 cDNA zwischen den Basen 1 und 1071 eingrenzten und eine *EcoRI* Schnittstelle enthielten, amplifiziert, mit *EcoRI* nachgeschnitten und in den Hefeexpressionsvektor pGAD424 subkloniert werden (bezeichnet als pGAD-Par-4, pGAD-Par-4 S154A, pGAD-Par-4 T155A, pGAD-Par-4 S154/T155A und pGAD-Par-4 S249A). Um die Interaktion der Par-4 Phosphorylierungsmutanten mit der Dlk zu untersuchen, wurden die pGAD-Par-4-Phosphorylierungsmutanten anschließend ebenso wie pGAD-Par-4 wt als Kontrolle zusammen mit pBD-Dlk in den Hefestamm Y190 kotransformiert. Die Kotransformationsansätze der verschiedenen Plasmide sind dem Transformationsschema in Abbildung 32 zu entnehmen. Eine positive Interaktion wurde durch ein Wachstum der Kolonien auf Histidin-Mangelnährboden angezeigt. Wie das Ergebnis des Wachstumstests auf Histidin-Mangelnährboden in Abb. 32 zeigt, wiesen alle Transformationsansätze mit den Par-4 Phosphorylierungsmutanten und der Dlk ein deutliches Wachstum auf Histidin-Mangelnährboden auf. Nur die Negativkontrolle, in der pGAD-Par-4 zusammen mit dem leeren BD-Gal4 Vektor transformiert wurde, zeigte kein Wachstum auf dem Mangelnährboden. Diesem Ergebnis zufolge ist keine der Par-4 Phosphorylierungsmutanten in ihrer Fähigkeit beeinträchtigt, mit der Dlk zu interagieren.

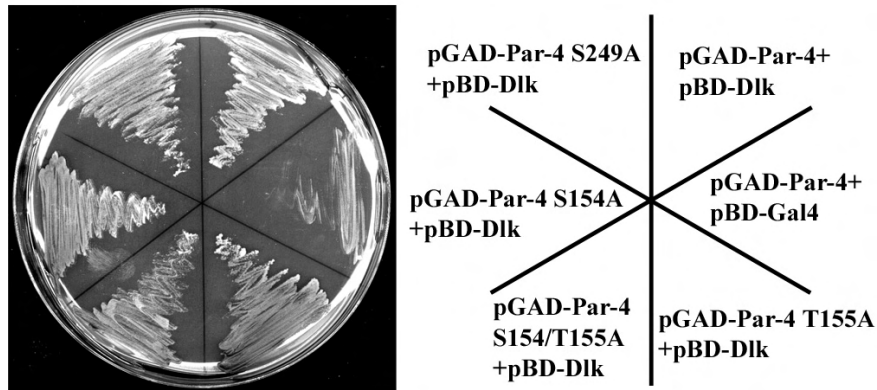


Abb. 32: Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionstest von Par-4 Phosphorylierungsmutanten und Dlk. Hefezellen des Stammes Y190 wurden mit den im Schema auf der rechten Seite dargestellten Konstrukten transformiert und auf Histidinfreiem Nährboden kultiviert. Das Wachstum auf den Platten zeigt eine Aktivierung des His-Reportergens an.

4.2.1.12 Nachweis der Threonin 155 Phosphorylierung durch die Dlk

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Dlk das Par-4 Protein bevorzugt an der Aminosäure T155 phosphoryliert (4.2.1.7) und die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose stark von der Phosphorylierung des Par-4 Proteins an der Aminosäure Threonin 155 abhängt (4.2.1.10), stellte sich im Folgenden die Frage, ob eine Phosphorylierung von Par-4 an der AS T155 auch *in vivo* zu beobachten ist. Für diese Analysen wurde ein polyklonaler Kaninchen Antikörper hergestellt, der gegen ein synthetisches Phosphopeptid mit der AS-Sequenz KRRSpTGTVN gerichtet war (bezeichnet mit anti-Par-4(P)T155). Diese AS-Sequenz entspricht den Aminosäuren 151-159 der Ratten-Par-4 AS-Sequenz, die die phosphorylierte potentielle Dlk Phosphorylierungsstelle T155 beinhaltet. Anhand verschiedener Analysen zeigte sich, dass der phosphospezifische anti-Par-4(P)T155 Antikörper zwar bei Immunpräzitations-experimenten und in Immunfluoreszenzanalysen eingesetzt werden konnte, nicht jedoch für Western Blot Analysen (Daten nicht gezeigt). Daher wurden zum Nachweis der *in vivo* Phosphorylierung des Par-4 Proteins an der Aminosäure T155 zunächst eine Immunpräzitation durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden REF52.2 Zellen mit den Par-4-GFP Phosphorylierungsmutanten S154A und T155A oder Par-4-GFP wt als Kontrolle alleine oder mit FLAG-Dlk zusammen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Zellextrakte einer Immunpräzitation mit dem anti-Par-4(P)T155 Antikörper unterzogen. Die präzipitierten Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mittels eines monoklonalen anti-GFP Antikörpers im Western Blot analysiert. Wie in Abbildung 33 dargestellt, wurde mit dem anti-Par-4(P)T155 Antikörper eine einzelne Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 70 kDa, die dem Par-4-GFP

Protein entsprach, aus den Par-4 wt/Dlk koexprimierenden Zellen präzipitiert (Abb. 33, Spur 3). Eine entsprechende Par-4 Proteinbande konnte auch aus den Zelllysaten der Par-4 S154A/Dlk koexprimierenden Zellen präzipitiert werden (Abb. 33, Spur 5). Im Gegensatz dazu war der anti-Par-4(P)T155 Antikörper nicht in der Lage, aus dem Zelllysate von Par-4 T155A/Dlk koexprimierenden Zellen das phosphorylierte Par-4 Protein zu präzipitieren (Abb. 33, Spur 7). Aus den Zelllysaten von REF52.2 Zellen, die Par-4 wt, Par-4 S154A, Par-4 T155A oder GFP alleine exprimierten, konnte der anti-Par-4(P)T155 Antikörper lediglich eine sehr geringe Menge phosphoryliertes Par-4 Protein präzipitieren (Abb. 33, Spur 2, 4 6 und 1). Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass der anti-Par-4(P)T155 Antikörper das Par-4 Protein deutlich besser präzipitieren konnte, wenn die Zellen zusätzlich zum Par-4 Protein auch die Dlk exprimierten. Dieser Befund verdeutlichte, dass der anti-Par-4(P)T155 Antikörper spezifisch an das Par-4 Protein bindet, wenn Par-4 von der Dlk an der Aminosäure T155 phosphoryliert wurde.

IP : anti-Par-4(P)T155

WB: anti-GFP

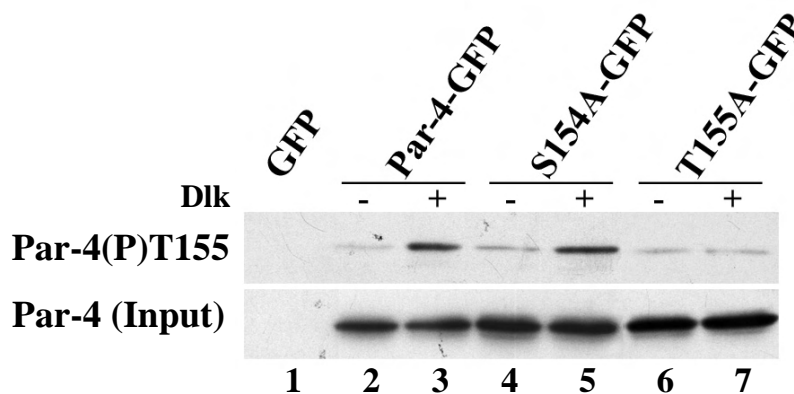


Abb. 33: Immunpräzipitation des Par-4 Proteins mit dem phosphospezifischen anti-Par-4(P)T155 Antikörper. REF52.2 Zellen wurden mit GFP-Vektor alleine (Spur1), Par-4 wt-GFP oder den Par-4 Phosphorylierungsmutanten S154A-GFP und T155A-GFP alleine (Spuren 2, 4, 6) oder mit Dlk zusammen transfiziert (Spuren 3, 5, 7). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Zelllysate wurden in einer Immunpräzipitation mit dem anti-Par-4(P)T155 Antikörper eingesetzt. Die präzipitierten Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot mittels eines monoklonalen anti-GFP Antikörpers analysiert. Der Input beträgt 30 µg des Gesamtzell-extraktes und wurde ebenfalls mit dem monoklonalen anti-GFP Antikörper angefärbt.

4.2.1.13 Nachweis der Par-4 Phosphorylierung an der Aminosäure T155 in Säugierzellen

Anhand von konfokale Immunfluoreszenzanalysen mit dem phosphospezifischen anti-Par-4(P)T155 Antikörper sollte ein weiterer Nachweis der *in vivo* Par-4 Phosphorylierung des

Par-4 Proteins an der Aminosäure T155 erbracht werden. Um diese Untersuchungen durchzuführen, war es zunächst erforderlich, die Par-4- und Dlk-Konstrukte nicht nur als GFP-Fusionsproteine sondern auch als YFP- und CFP-Fusionsproteine exprimieren zu können. Daher wurde die cDNA, die für das GFP Protein kodiert, aus den pEGFP-N1-Par-4 und pEGFP-C1-Dlk Vektoren mit den Restriktionsenzymen *BsrGI* und *AgeI* ausgeschnitten und durch die cDNA, die für das YFP bzw. CFP Protein kodiert, ersetzt. Dieser Klonierungsschritt ermöglichte die Expression der Par-4- und Dlk-Konstrukte als CFP-, YFP- und GFP-Fusionsproteine. REF52.2 Zellen wurden mit Par-4-CFP und YFP-Dlk, Par-4 S154A-CFP und YFP-Dlk, Par-4 T155A-CFP und YFP-Dlk oder mit Par-4-CFP und der Dlk Mutante YFP-Dlk K42A kotransfiziert. Zusätzlich wurden REF52.2 mit Par-4-CFP und YFP-Dlk kotransfiziert und mit einem zellpermeablen PKA Inhibitor (PKI) behandelt, um zu untersuchen ob die Phosphorylierung des Par-4 Proteins an der Aminosäure T155 durch die Inhibition der PKA beeinflusst wird. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit dem polyklonalen anti-Par-4(P)T155 Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG Antikörper angefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Wie in der Abbildung 34 zu erkennen ist, wiesen die Par-4-CFP/YFP-Dlk koexprimierenden Zellen neben einer dramatischen Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Abb. 34a-d) eine deutliche Immunfärbung mit dem anti-Par-4(P)T155 Antikörper auf (Abb. 34c). Ein ähnlicher Befund war auch bei den Par-4 S154/YFP-Dlk koexprimierenden Zellen zu beobachten. Die Par-4 T155A-CFP/YFP-Dlk koexprimierenden Zellen (Abb. 34e-h) konnten jedoch mit dem phosphospezifischen anti Par-4(P)T155 Antikörper nicht angefärbt werden (Abb. 34k), wodurch bestätigt wurde, dass der anti-Par-4(P)T155 Antikörper das Par-4 Protein nur detektiert, wenn es an der Aminosäure T155 phosphoryliert wurde. Um auszuschließen, dass die Par-4 Phosphorylierung an der Aminosäure T155 auf eine Phosphorylierung durch die PKA zurückzuführen ist, wurden Par-4 wt und die Dlk zusätzlich in Anwesenheit des PKI koexprimiert (Abb. 34m-p). Der PKI war auch hier nicht in der Lage, die Phosphorylierung des Par-4 Proteins an der Aminosäure T155 zu inhibieren. Die Par-4/Dlk koexprimierenden Zellen zeigten auch nach der Behandlung mit dem PKA Inhibitor eine deutliche Veränderung des Zytoskeletts und eine starke Färbung durch den Par-4(P)T155 Antikörper (Abb. 34o) genauso wie die unbehandelten Par-4/Dlk koexprimierenden Zellen (Abb. 34a-d). Zur Kontrolle wurden des weiteren REF52.2 Zellen mit Par-4 wt oder den Par-4 Phosphorylierungsmutanten Par-4 S154A und Par-4 T155A alleine transfiziert und mit dem anti-Par-4(P)T155 Antikörper immunzytochemisch angefärbt. Das Ergebnis zeigte, dass nach alleiniger Expression der verschiedenen Par-4-Konstrukte der

anti-Par-4(P)T155 Antikörper nicht in der Lage war, die transfizierten Zellen anzufärben (Daten nicht gezeigt). REF52.2 Zellen, die Par-4 wt und die Kinase-negativen Mutante Dlk K42A koexprimierten (Abb. 34q-t), konnten ebensowenig mit dem anti-Par-4(P)T155 Antikörper immunzytochemisch angefärbt werden (Abb. 34s). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass das Par-4 Protein während der Par-4/Dlk-induzierten Apoptose an der Aminosäure T155 phosphoryliert wird und dass diese spezifische Phosphorylierung durch die Dlk vermittelt wird.

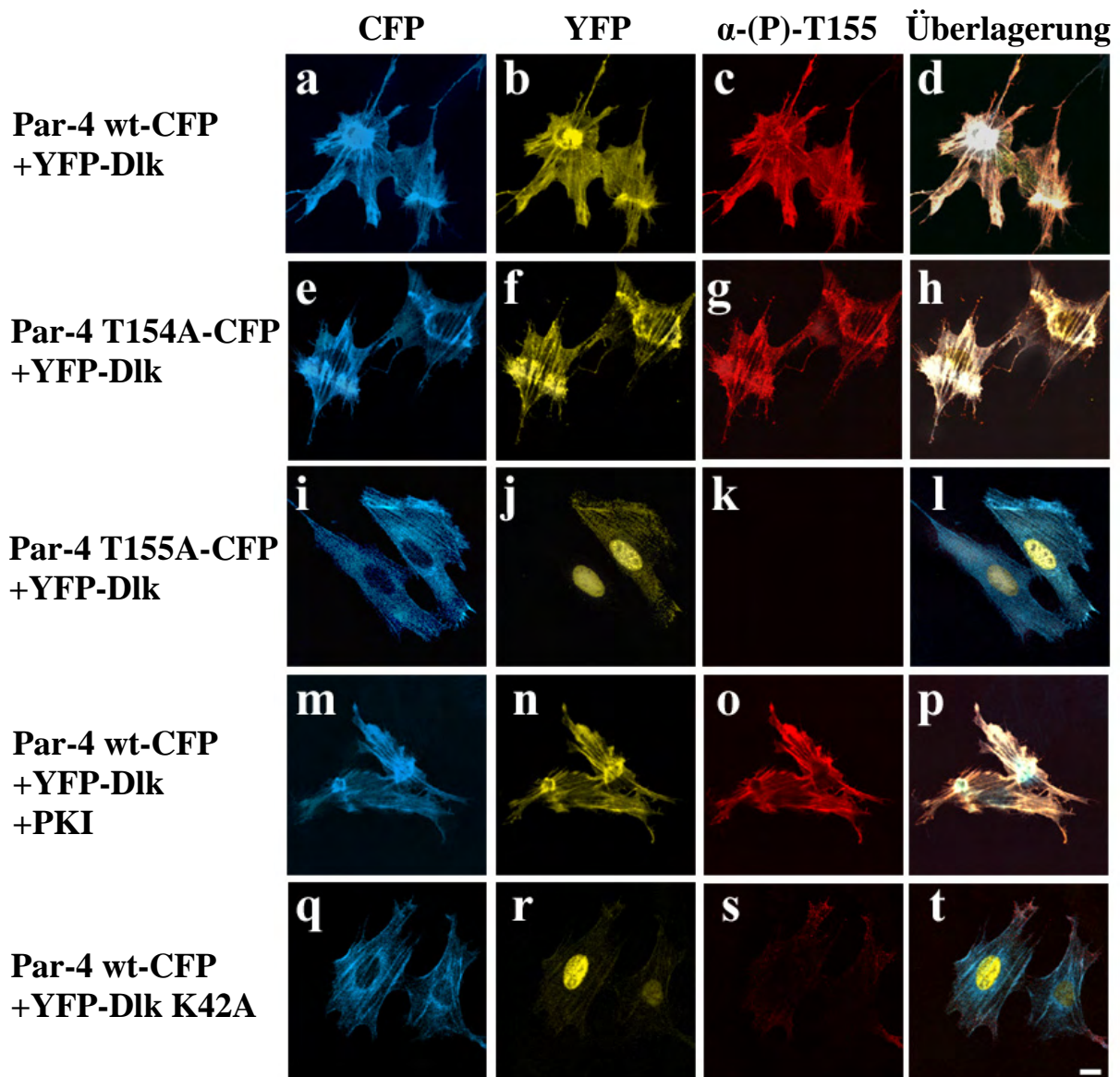


Abb. 34: Immunfärbung von Par-4/Dlk kotransfizierten Zellen mit dem phosphospezifischen anti-Par-4(P)T155 Antikörper. REF52.2 Zellen wurden kotransfiziert mit YFP-Dlk bzw. der kinase-negativen Mutante YFP-Dlk K42A und Par-4-CFP wt (a-d), Par-4 S154A-CFP(e-h), Par-4 T155A-CFP(i-l) oder Par-4-CFP wt in Anwesenheit von 20 μ M PKA-Inhibitor (PKI) (m-p). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit dem anti-Par-4(P)T155 Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper angefärbt. Balken, 10 μ m.

4.2.1.14 Koexpression von Amida und den verschiedenen Par-4-Phosphorylierungsmutanten

Wie in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 4.2.1.10) ist für die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose die Phosphorylierung des Par-4 Proteins durch die Dlk von entscheidender Bedeutung. Anhand von *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten und in Immunfluoreszenzanalysen konnte demonstriert werden, dass vor allem die Phosphorylierung der Aminosäure Threonin 155 des Par-4 Proteins essentiell für die Apoptoseinduktion durch Par-4 und Dk ist. Daher stellte sich die Frage, ob die Phosphorylierung der Aminosäure T155 des Par-4 Proteins nur für die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose von Bedeutung ist, oder ob die Phosphorylierung des Par-4 Proteins einen generellen Mechanismus der Par-4-abhängigen Apoptose darstellt. Daher wurde auch der Einfluss der Par-4 Phosphorylierung, auf die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose in Immunfluoreszenzanalysen näher untersucht. REF52.2 Zellen wurden dazu mit FLAG-Amida und den Par-4-GFP-Phosphorylierungsmutanten Par-4-GFP, Par-4 S154-GFP, Par-4 T155-GFP, Par-4 S154/T155-GFP oder Par-4 7xMut-GFP, bei der alle putativen Dlk, PKC und PKA Phosphorylierungsstellen zu Alaninen mutiert worden waren (PKC: S96, S135, S236; PKA: S154, T155; Dlk: S154, T155, S220, S249) transfiziert. Zur Kontrolle wurden REF52.2 Zellen mit Par-4-GFP wt und FLAG-Amida wt kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG M2 Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus-IgG Sekundäntikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert. Die Apoptoserate wurde durch Analyse der Präparate am Immunfluoreszenzmikroskop anhand morphologischer Anzeichen der Apoptose bestimmt. Wie im Diagramm der Abbildung 35 dargestellt, betrug die Apoptoserate nach der Koexpression des Amida wt Proteins mit dem Par-4 wt Protein 39%. Eine ähnlich hohe Apoptoserate wurde auch nach der Koexpression des Par-4 wt Proteins mit der Phosphorylierungsmutante Par-4 S154A erzielt (36%). Die Apoptoserate sank jedoch deutlich ab nach der Koexpression des Amida Proteins mit den weiteren Par-4 Phosphorylierungsmutanten. Die Apoptoserate betrug 7% nach der Koexpression des Amida Proteins mit der Mutante Par-4 T155A, 5% nach der Koexpression des Amida Proteins mit der Par-4 Doppelmutante Par-4 S154/T155A und ca. 12% nach der Koexpression des Amida Proteins mit der Par-4 Mutante Par-4 7xMut. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass der Par-4 Phosphorylierungsstatus eine entscheidende Rolle bei der pro-apoptischen Funktion des Proteins spielt, wobei die Phosphorylierung der Aminosäure T155 von besonderer funktioneller Bedeutung zu sein scheint.

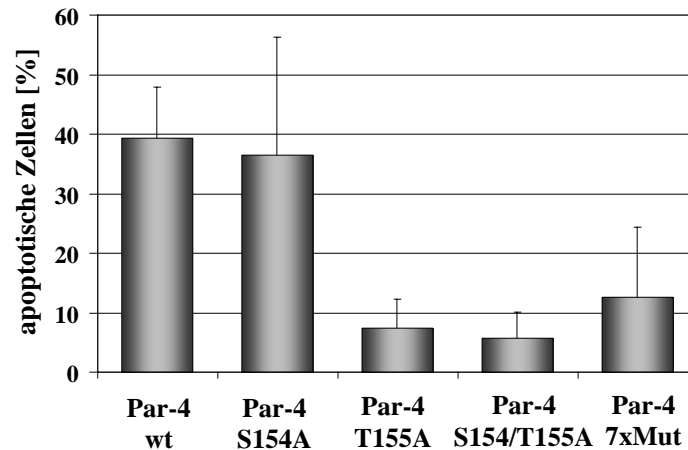


Abb. 35: Induktion der Apoptose nach Kotretransfektion von Amida und verschiedenen Par-4 Phosphorylierungsmutanten. REF 52.2 Zellen wurden transfiziert mit FLAG-Amida und Par-4-GFP, Par-4 S154A-GFP, Par-4 T155A, Par-4 S154/T155A-GFP oder Par-4 7xMut-GFP. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit einem monoklonalen anti-FLAG M2 Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus-IgG Antikörper gefärbt. Um die Kerne zu visualisieren und die apoptotische Merkmale beurteilen zu können, wurden die Kerne einer DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung der Präparate erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

4.2.2 Phosphorylierung des Amidaproteins

Nachdem in dieser und in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass das Par-4 Protein ein Substrat der Dlk ist (Page et al., 1999) und die Phosphorylierung des Par-4 Proteins an der Position T155 essentiell ist für die Par-4/Dlk- (siehe Abschnitt 4.2.1.10) und auch für die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose (siehe Abschnitt 4.2.1.14), stellte sich nun die Frage, inwieweit auch das Amida Protein *in vivo* phosphoryliert wird und evtl. ein Substrat für die Dlk darstellt.

4.2.2.1 Phosphoaminosäureanalyse des *in vivo* markierten Amida Proteins

Dazu wurde zunächst der Phosphorylierungsstatus des Amida Proteins in Säugerzellen mittels einer metabolischen radioaktiven Markierung und einer anschließenden Phosphoaminosäureanalyse ermittelt. Die stabil GFP-Amida exprimierende CHO Zelllinie wurde *in vivo* mit 0,3 mCi [³²P]-Orthohosphat (10 mCi/ml) für 4 h bei 37°C inkubiert. Aus den nach der Markierung hergestellten Zellextrakten wurde GFP-Amida mit Hilfe eines polyklonalen anti-GFP Antikörpers und einer Immunpräzipitation isoliert (Markierung und IP freundlicherweise durchgeführt von Dr. Stephanie Urschel, Institut für Genetik, Bonn). Das radioaktiv [³²P]-markierte und präzipitierte GFP-Amida Protein wurde in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Von der Matrix wurde das

Protein durch Trypsinverdau eluiert und in Peptidfragmente gespalten. Nach Perameisensäureoxidation wurde anschließend ein Aliquot des Gesamtverdaus von ca. 500 cpm durch saure Hydrolyse in seine AS-Bausteine zerlegt und für die Elektrophorese auf einer Dünnschichtchromatographieplatte vorbereitet. Um die Position der verschiedenen aufgetrennten Phosphoaminosäuren nach der Elektrophorese bestimmen zu können, wurde zusammen mit den Proben ein Standard aus Phosphothreonin, -serin und- tyrosin auf die selbe Dünnschichtchromatographieplatte aufgetropft, der nach der Elektrophorese mit Ninhydrin angefärbt und als Marker für die verschiedenen Phosphoaminosäuren verwendet werden konnte. Das Ergebnis der Autoradiographie der elektrophoretisch aufgetrennten Aminosäuren ist in Abbildung 36 dargestellt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der AS war an der Position des Phosposerins, die Anhand der Marker-Phosphoaminosäuren detektiert werden konnte, ein starkes radioaktives Signal zu erkennen, wohingegen keine radioaktive Markierung an Threonin- oder Tyrosinresten zu detektieren war. Anhand dieser Analyse zeigte sich, dass das Amida Protein *in vivo* stark an Serinresten, nicht jedoch an Threonin- oder Tyrosinresten phosphoryliert wurde.

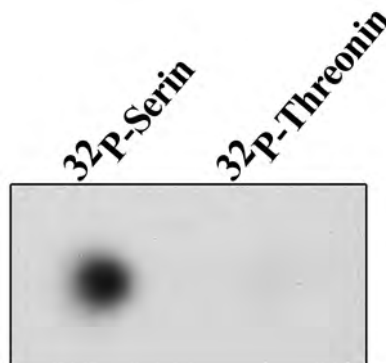


Abb. 36: Phosphoaminosäureanalyse des *in vivo* [³²P]-markierten GFP-Amida Proteins. Stabil GFP-Amida exprimierende CHO Zellen wurden mit 300 µCi [³²P]-Orthophosphat metabolisch markiert. In einer Immunpräzipitation mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper wurde das markierte GFP-Amida Protein aus dem Zellextrakt isoliert, danach in einer SDS-PAGE aufgetrennt und von der Membran eluiert. Nach der sauren Hydrolyse der radioaktiv markierten Proteine wurden die Phosphoaminosäuren auf Dünnschichtchromatographieplatten aufgetrennt und anschließend durch Autoradiographie visualisiert.

4.2.2.2 Amida als Substrat der Dlk

Bei der Suche nach potentiellen Phosphorylierungsstellen innerhalb des Amida Proteins wurden anhand einer eingehenden Sequenzanalyse der Amida AS-Sequenz drei potentielle Phosphorylierungsstellen für die Casein Kinase II, zwei für die Proteinkinase C (PKC) und eine Phosphorylierungsstelle für die Dlk identifiziert. Rekombinant hergestelltes und aufgereinigtes His-Amida Protein, das als Fusionsprotein mit einem 6 x Histidin-Epitop

exprimiert wurde (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jan Kubicek, Forschungszentrum Jülich), wurde daraufhin einem *in vitro* Kinasetest unterzogen, um festzustellen, ob das Amida Protein ein potentielles Substrat der PKC oder der Dlk sein könnte. Amida wurde dazu in Gegenwart von 1 μ Ci [32 P] γ -ATP mit der Dlk (ebenfalls freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Jan Kubicek, Forschungszentrum Jülich) bzw. der PKC *in vitro* für 30 min phosphoryliert, in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anhand einer Autoradiographie analysiert. Das Ergebnis in Abbildung 37A zeigte nach der Phosphorylierung des Amida Proteins durch die Dlk eine dem Amidaprotein entsprechende radioaktiv markierte Bande (Abb. 37A, Spur 2), wohingegen in dem Phosphorylierungsansatz mit der PKC keine radioaktive Amida Proteinbande zu detektieren war (Abb. 37A, Spur 1). Es war ferner ein schwaches Signal auf der Höhe von etwa 50 kDa zu erkennen, das der autophosphorylierten Dlk entsprach und eine gute Kontrolle für die Aktivität der heterolog exprimierten und aufgereinigten Kinase darstellte. Das Ergebnis des Kinastests verdeutlicht, dass Amida von der Dlk phosphoryliert wird, jedoch kein Substrat für die PKC darstellt.

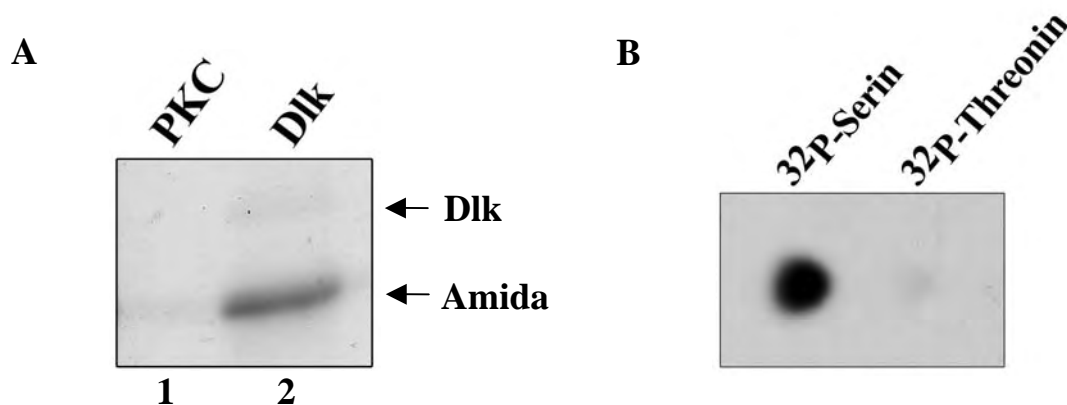


Abb. 37: *In vitro* Phosphorylierung von Amida durch PKC und Dlk. (A) 1 μ g His-Amida wurde *in vitro* mit PKC (A, Spur 1) oder Dlk (A, Spur 2) phosphoryliert, in einer SDS-Page aufgetrennt und über Autoradiographie analysiert. (B) His- Amida wurde *in vitro* mit Dlk phosphoryliert, in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Das phosphorylierte Protein wurde anschließend von der Matrix eluiert und einer sauren Hydrolyse unterzogen. Die Phospho-Aminosäuren wurden auf einer Dünnschichtchromatographieplatte elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert.

Da Amida ein Substrat der Serin/Threonin Kinase Dlk darstellt, sollte im nächsten Schritt geklärt werden, ob Amida von der Dlk bevorzugt an Serin- oder Threoninresten phosphoryliert wird. Dazu wurde *in vitro* phosphoryliertes Amida in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und anhand eines Trypsinverdaus von der Matrix eluiert. Das isolierte und phosphorylierte Protein wurde einer sauren Hydrolyse unterzogen und die Phosphoaminosäuren wurden elektrophoretisch auf

einer Dünnschichtchromatographieplatte aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Die starke Schwärzung des Röntgenfilms in Abbildung 37B an der Position des Phosphoserins, die Anhand der Marker-Phosphoaminosäuren detektiert werden konnte, demonstrierte deutlich, dass Amida von der Dlk ausschließlich an Serinresten phosphoryliert wurde.

4.2.2.3 Identifizierung der Dlk-Phosphorylierungsstelle von Amida

Bei der Suche nach potentiellen Dlk Phosphorylierungsstellen innerhalb der Amida AS-Sequenz, wurde eine AS-Sequenz um das Serin 200 des Ratten Amida Proteins identifiziert, die der Konsensussequenz einer Dlk-Phosphorylierungsstelle von RXXS/T entsprach (siehe Abb. 38A). Um genauere Aussagen über die funktionelle Bedeutung dieses Serins treffen zu können, wurde die Aminosäure S200 gezielt in Alanin mutagenisiert. Dafür wurden zunächst zwei PCR-Reaktionen mit den Oligonukleotiden „5'Amida-BglII“ und „3'AmidaS200A“ sowie „5'AmidaS200A“ und „3'Amida-BamHI“ durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend über eine weitere PCR-Reaktion zusammengefügt, mit *EcoRI* und

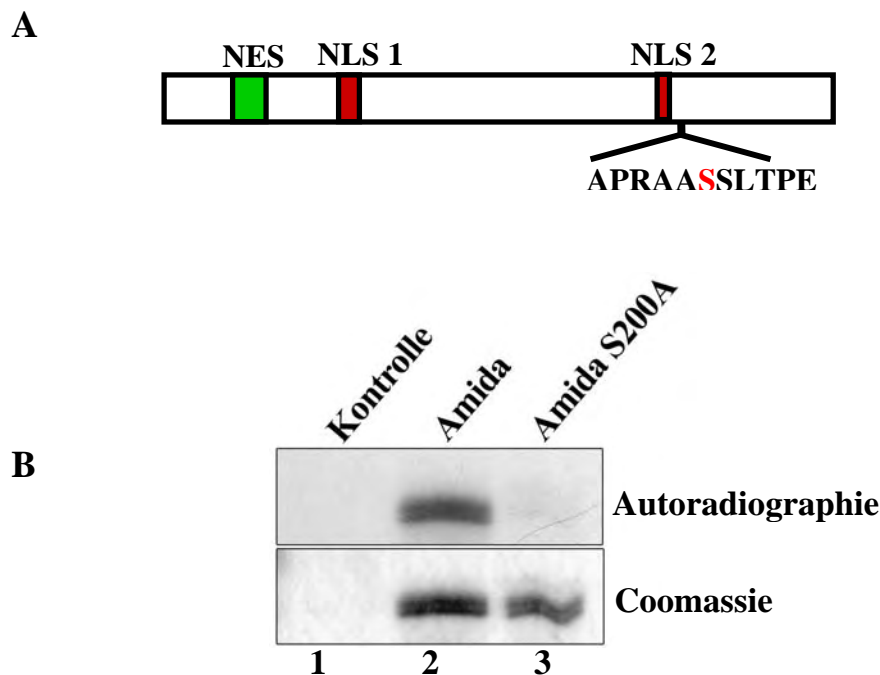


Abb. 38: Dlk phosphoryliert Amida an der Aminosäure S200. **(A)** Schematische Darstellung der Amida Proteinstruktur. Im C-Terminus des Proteins, hinter den beiden Kernlokalisationssequenzen (NLS1 und NLS2) und dem Kernexportsignal im N-Terminus des Proteins (NES) ist die potentielle Dlk-Konsensussequenz, die die AS 195 bis AS 205 umfasst eingezeichnet. Die putative Phosphorylierungsstelle S200 ist rot hervorgehoben. **(B)** *In vitro* Kinasetest mit His-Amida und His-Amida S200A, bei der das Serin an der Position 200 durch ein Alanin ausgetauscht worden ist. Die gereinigten Proteine Amida (Spur 2), Amida S200A (Spur 3) oder ein Ansatz ohne Amida als Kontrolle (Spur 1) wurden *in vitro* mit Dlk phosphoryliert und in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie angefärbt (unten) und die phosphorylierten Banden wurden über Autoradiographie detektiert (oben).

*Bam*HI geschnitten und in den Expressionvektor pEGFP-C1 subkloniert. Abbildung 38A zeigt schematisch die Amida-cDNA mit der putativen Dlk Konsensussequenz. Das zu Alanin mutierte Serin ist rot markiert. Ein *in vitro* Kinasetest sollte Aufschluss darüber geben, ob die Dlk in der Lage ist, nicht nur Amida wt, sondern auch die Amida Mutante S200A zu phosphorylieren. Dazu wurden 1,5 µg heterolog exprimiertes und affinitätsgereinigtes Amida wt Protein und 1,5 µg Protein der Amida Mutante S200A mit der Dlk *in vitro* für 30 min phosphoryliert, in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und über Autoradiographie analysiert. Ferner wurden die aufgetrennten Proteine zum Abgleich der aufgetragenen Proteinmengen mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt (Abb. 38B, unten). Das Ergebnis im oberen Teil der Abbildung 38B zeigte deutlich eine starke Phosphorylierung des Amida wt Proteins, zu erkennen an der radioaktiv markierten Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 43 kDa (Abb 38, Spur 2), wohingegen bei der Mutante Amida S200A keine radioaktiv markierte Proteinbande detektierbar war (Abb 38, Spur 3). Dieses Experiment lieferte einen deutlichen Hinweis darauf, dass Amida ein Substrat der Dlk ist und von dieser ausschließlich an der Aminosäure S200 phosphoryliert wird.

4.2.3 Amida als Interaktionspartner von Dlk

4.2.3.1 *In vivo* Bindungsstudien mit Amida und Dlk

Kinasesubstrate gehen häufig keine direkte und feste Bindung mit den phosphorylierenden Kinasen ein. Nicht selten können die Substrate jedoch Komplexe mit den Kinasen bilden und funktionell und/oder regulatorisch auf diese einwirken. Ob dies auch für die Kinase-Substratverbindung Dlk-Amida zutrifft, wurde in einem proteinbiochemischen Ansatz überprüft. Zellextrakte aus stabil GFP-Dlk wt exprimierenden MCF-7 Zellen (Preuss et al., 2003b) wurden zusätzlich transient mit FLAG-Amida transfiziert und für eine Koimmunpräzipitation mit dem polyklonalen anti-Amida Antikörper eingesetzt. Die präzipitierten Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Mit Hilfe des monoklonalen anti-GFP Antikörpers wurden in der anschließenden Western Blot-Analyse die kopräzipitierten Proteine nachgewiesen. Wie in Abbildung. 39, Spur 1 zu erkennen ist, wurde durch den anti-Amida Antikörper zusammen mit FLAG-Amida ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 80 kDa kopräzipitiert, das dem GFP-Dlk Protein entsprach. Das Ziegen-Kontrollserum war dagegen nicht in der Lage, das GFP-Dlk Protein zu

präzipitieren (Abb. 39, Spur 1). Dieses Ergebnis zeigt, dass Amida *in vivo* auch mit der Dlk einen Komplex eingehen kann.

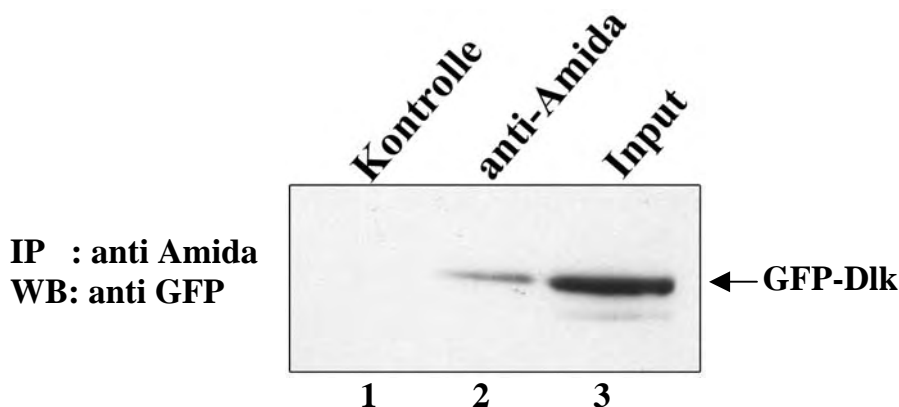


Abb. 39: Koimmunpräzipitation von GFP-Dlk und FLAG-Amida. Stabil GFP-Dlk exprimierende MCF-7 Zellen wurden transient mit FLAG-Amida transfiziert und die Zellextrakte wurden nach 24 h Transfektion für eine Immunpräzipitation mit einem polyklonalen anti-Amida Antikörper (Spur 2) oder einem Ziegen-Kontrollserum (Spur 1) eingesetzt. Die Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western Blot immunologisch mittels eines monoklonalen anti-GFP Antikörpers auf der Membran detektiert. Der Input betrug 30 µg des Gesamtzellextraktes.

4.2.3.2 Komplexbildung von Amida, Par-4 und Dlk

Aufgrund der bisher nachgewiesenen Interaktionen von Amida mit Par-4 und der Dlk, sowie der Interaktion von Par-4 mit der Dlk stellte sich die naheliegende Frage, inwieweit es sich hierbei um konkurrierende Interaktionen handelt, oder ob diese drei Proteine *in vivo* in der Lage sind, einen trimären Komplex zu bilden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde wiederum ein proteinbiochemischer Ansatz gewählt. HeLa Zellen wurden transient mit GFP-Dlk, FLAG-Amida und FLAG-Par-4 im Verhältnis (1:1:1) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Zellextrakte wurden einer Immunpräzipitation mit dem polyklonalen anti-Amida Antikörper (Abb. 40, Spur 1) oder einem Ziegen-Kontrollserum unterzogen (Abb. 40, Spur 2). Die präzipitierten Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Als Größenstandard für die präzipitierten Proteine wurde der Input aufgetragen, der ca. 30 µg des Gesamtzellextraktes betrug (Abb. 40, Spur 3). Die immunologische Detektion der präzipitierten Proteine im Western Blot erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen anti-GFP Antikörpers (Abb. 40, oben) und eines polyklonalen anti-Par-4 Antikörpers (Abb. 40, unten). Wie dem Ergebnis in Abbildung 40 zu entnehmen ist, ließen sich in dem Präzipitat des anti-Amida Antikörper aus den Amida/Dlk/Par-4 koexprimierenden HeLa Zellen sowohl GFP-Dlk als auch FLAG-Par-4 nachweisen (Abb. 40, Spur 1). Im Gegensatz dazu, ließen diese beiden Proteine sich von dem Ziegen-Kontrollserum nicht

kopräzipitieren (Abb. 40, Spur 2). Die Ergebnisse dieses Versuches deuten darauf hin, dass Par-4, Amida und Dlk *in vivo* wenigstens partiell als trimärer Komplex vorliegen. Welche funktionelle Bedeutung dieser Komplex für die Par-4-induzierte Apoptose hat, bleibt zu untersuchen.

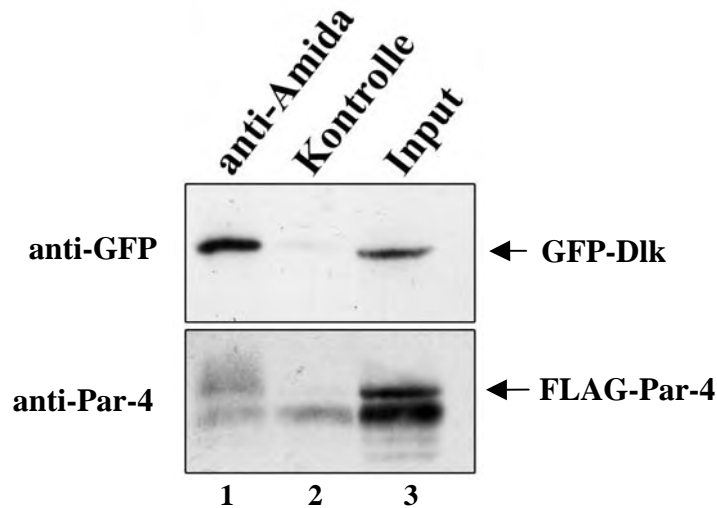


Abb. 40: Koimmunpräzipitation von Par-4, Amida und Dlk. HeLa Zellen wurden transient mit GFP-Dlk, FLAG-Amida und FLAG-Par-4 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und für eine Immunpräzipitation mit einem polyklonalen anti-Amida Antikörper (Spur 1) oder einem Ziege-Kontrollserum (Spur 2) eingesetzt. Die Proteine wurden in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, und im Western Blot immunologisch mittels eines monoklonalen anti-GFP Antikörpers (oben) oder eines polyklonalen anti-Par-4 Antikörpers (unten) detektiert. Der Input (Spur 3) betrug 30 µg des Gesamtzellextraktes.

5. DISKUSSION

5.1 Amida, der neue Par-4 Interaktionspartner

Das pro-apoptotische Protein Par-4 wurde erstmals in Prostatakarzinomzellen entdeckt, in denen es nach Apoptoseinduktion mit Ionomycin hochreguliert wird (Sells et al., 1994). Seitdem sind einige Interaktionspartner des Par-4 Proteins identifiziert worden, die an der Par-4-vermittelten Apoptose beteiligt sind. Die bisher untersuchten Mechanismen der Par-4-induzierten Apoptose beinhalten vorrangig die Störung anti-apoptotischer Signalwege wie z.B. die Inhibition der proliferationsfördernden PKC ζ durch eine direkte Bindung (Diaz-Meco et al., 1996) oder die Herunterregulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 durch eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor WT1 (Johnstone et al., 1996; Camandola und Mattson, 2000; Cheema et al., 2003). Die aktive Beteiligung des Par-4 Proteins an der negativen Regulation der Bcl-2 Expression auf transkriptioneller Ebene weist auf eine nukleäre Funktion des Par-4 Proteins hin, obwohl das Par-4 Protein in den meisten Zelllinien zytoplasmatisch lokalisiert ist. Die Expression des Par-4 Proteins führt in einem Großteil der bisher untersuchten Zelllinien zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber apoptotischen Stimuli. Par-4 scheint darüber hinaus aber auch in der Lage zu sein, auf einem direkten, aktiven Weg die Apoptose auszulösen. Gestützt wird diese Vermutung z.B. von den Befunden, dass die Expression des Par-4 Proteins in einigen Tumorzellen zur direkten Auslösung der Apoptose führt, ohne dass die PKC ζ oder das Bcl-2 Protein herunterreguliert werden (Vetterkind et al., 2005b). Ein möglicher Mechanismus der aktiven Apoptoseinduktion durch das Par-4 Protein verläuft über den Par-4 Interaktionspartner Dlk (*DAP-like kinase*, Kögel et al., 1998; Page et al., 1999; Vetterkind et al., 2005a). Dabei wird die kernständige Kinase nach der Koexpression mit Par-4 in das Zytoplasma und dort an das Aktin-Zytoskelett rekrutiert wo sie mit Par-4 an Aktinfilamenten kolokalisiert. Nach der Rekrutierung an das Aktin-Zytoskelett ist die Dlk in der Lage, ihr Substrat, die leichte Kette des Myosin II, zu phosphorylieren, was zu einer starken Kontraktion der Spannungsfasern und zur Apoptoseinduktion führt (Page et al., 1999; Vetterkind et al., 2005a). Die genauen Mechanismen dieser Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose sind bisher nicht vollständig bekannt und sollten in der vorliegenden Arbeit eingehender untersucht werden.

5.1.1 Identifizierung des neuen Par-4 Interaktionspartners Amida

Um die pro-apoptotische Funktion des Par-4 Proteins auf molekularer Ebene näher zu untersuchen, wurde mit Hilfe der Hefe-Zwei-Hybrid Technik nach neuen Interaktionspartnern von Par-4 gesucht, die möglicherweise als Regulatoren oder stromabwärts liegende Effektoren eine Rolle bei der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose spielen könnten. Im Zuge dieser Hefe-Zwei-Hybrid Suche wurde das pro-apoptotische Protein Amida als ein potentieller Interaktionspartner von Par-4 identifiziert. Amida wurde ursprünglich bei einer Hefe-Zwei-Hybrid Suche nach neuen Interaktionspartnern des gehirnspezifischen Proteins Arc (*Activity regulated cytoskeleton associated protein*) isoliert. Arc reguliert als ein „immediate early gene“ die Plastizität von Dendriten durch zytoskelettäre Veränderungen und ist vermutlich an apoptotischen Prozessen beteiligt (Lyford et al., 1995; Irie et al., 2000). Im Gegensatz zu Arc wird Amida ubiquitär exprimiert, jedoch konnte in vorangegangenen Studien und auch in der vorliegenden Arbeit eine verstärkte Amida Expression in Hodengewebe nachgewiesen werden (Irie et al., 2000). Nach der Überexpression in COS-7 Zellen zeigt Amida eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation und löst nach 72 h Apoptose aus. Aufgrund dieser pro-apoptotischen Funktion erhielt das Protein seinen Namen nach der buddhistischen Gottheit „Amida“, die Sterbenden einen angenehmen Tod bereitet und ihnen den Eintritt in das Paradies ermöglicht (Irie et al., 2000). Neben seiner pro-apoptotischen Wirkung scheint Amida unterschiedliche Funktionen innerhalb der Zelle wahrnehmen zu können, die von der subzellulären Lokalisation des Proteins und dem entsprechenden Interaktionspartner abhängen können. Einerseits weist Amida eine Apoptose fördernde Wirkung auf und führt nach einer Überexpression in COS-7 Zellen zur Apoptoseinduktion, was durch eine Koexpression und Interaktion mit dem Arc Protein inhibiert werden kann (Irie et al., 2000). Des weiteren wird Amida eine Funktion im Zellzyklus zugesprochen. Eine Überexpression von Amida führt in einigen Zellen zu einem Zellzyklusarrest in der S-Phase und verhindert durch die Inhibition der Zellzyklus-Kinase Cdc2 den Eintritt in die Mitose. Amida wird in dieser Funktion als ein DNA-bindendes Protein beschrieben, das unter anderem über eine Phosphorylierung durch die Cdc2 an der Aminosäure S180 reguliert wird (Gan et al., 2003). Die Phosphorylierung an der Aminosäure S180 bewirkt eine verminderte DNA-Bindung des Amida Proteins. Die genauen Mechanismen, über die Amida seine zellulären Funktionen ausübt, sind bislang jedoch ungeklärt. Da sowohl Par-4 als auch sein neuer Interaktionspartner Amida pro-apoptotische Proteine darstellen, wurde in dieser Arbeit die Interaktion dieser beiden Proteine mit verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Bindungstests verifiziert und der Einfluss von Amida auf die Par-4 induzierte Apoptose näher untersucht.

Durch die Kartierung der Interaktionsdomänen von Par-4 und Amida mittels Hefe-Zwei-Hybrid Technik wurde für diese Protein-Protein Interaktion der Leucin-Zipper von Par-4 als interagierende Domäne ermittelt. Dieser Befund entsprach den bisher veröffentlichten Daten anderer Arbeitsgruppen, da alle bisher beschriebenen Interaktionspartner von Par-4 mit dem Par-4 Leucin-Zipper interagieren (Johnstone et al., 1996; Diaz-Meco et al., 1996; Page et al., 1999; Roussigne et al., 2003; Guo und Xie, 2004; Xie and Guo, 2004; Goswami et al., 2005; Park et al., 2005; Gao et al., 2006). Die Leucin-Zipper Mutante von Par-4 (Par-4 L3), bei der drei Leucine des Leucin-Zippers zu Alaninen ausgetauscht wurden, und die Par-4 Deletionsmutanten Par-4 Δ C1-233 und Par-4 Δ C1-266, bei denen der komplette Leucin-Zipper deletiert wurden, waren in diesem Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionstest nicht mehr in der Lage, mit Amida zu interagieren. Diese Befunde deuten daraufhin, dass für eine Par-4/Amida Interaktion ein intakter Leucin-Zipper von Par-4 zwingend erforderlich ist. Mit Hilfe von Sequenzanalysen des Amida Proteins wurde im N-Terminus des Amida Proteins eine coiled-coil Struktur vorhergesagt, die Protein-Protein Interaktionen vermitteln könnte. Die Amida Mutante Amida Δ N113-259, bei der die coiled-coil Struktur deletiert worden war, konnte im Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionstest nach einer Kotransformation mit pAD-Par-4 die Reportergene aktivieren, wohingegen die Amida Mutante Amida Δ N1-110, deren C-Terminus deletiert war, die die vollständige coiled-coil Struktur jedoch enthielt, dazu nicht in der Lage war. Damit lag interessanterweise auch die Interaktionsdomäne von Amida im C-Terminus des Proteins und nicht wie vermutet in der coiled-coil Region. Dies stellt jedoch keinen Widerspruch dar, da bereits gezeigt wurde, dass Leucin-Zipper auch mit anderen strukturellen Domänen interagieren können. Der Leucin-Zipper von Par-4 z.B. interagiert mit der Zink-Finger Interaktionsdomäne seines Interaktionspartners PKC ζ und einer argininreichen Region seines Interaktionspartners Dlk (Diaz-Meco et al., 1996; Page et al., 1999). Die mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System identifizierte Interaktion von Amida und Par-4 konnte des weiteren anhand von GST-Pulldown Experimenten mit heterolog exprimierten und gereinigten Proteine und in Koimmunpräzipitationsexperimenten sowohl für die überexprimierten als auch für die endogenen Proteine bestätigt werden. Die Koimmunpräzipitationsexperimente mit endogenem Amida und Par-4 Protein wurden in verschiedenen Zelllinien wie REF52.2, E14-2 und NIH-3T3 durchgeführt und die Interaktion der beiden Proteine bestätigt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Interaktion von Par-4 und Amida nicht auf Rattenzellen oder Fibroblasten beschränkt ist. Diese Bindungs- und Interaktionssudien bestätigten Amida als einen neuen Interaktionspartner von Par-4 *in vitro* und *in vivo* und ließen eine physiologische Relevanz dieser Protein-Protein Interaktion vermuten.

Neben dem neuen Par-4 Interaktionspartner Amida wurde während der Hefe-Zwei-Hybrid Suche auch das Par-4 Protein selbst als Par-4 Interaktionspartner isoliert. Dieser Befund stimmt gut mit bereits veröffentlichten Studien überein, in denen die Fähigkeit des Par-4 Proteins zur Homodimerisierung über dessen C-Terminus beschrieben wurde (Sells et al., 1997; Berra et al., 1997). Die Homodimerisierung des Par-4 Proteins wird nach der Deletion des C-Terminus ebenso unterbunden wie die Interaktion mit allen bisher bekannten Par-4 Interaktionspartnern. Über die physiologische Bedeutung einer Par-4 Dimerisierung, oder möglicherweise einer Oligomerisierung des Par-4 Proteins kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Möglicherweise spielt die Dimerisierung des Par-4 Proteins eine essentielle Rolle bei der Regulation der apoptotischen Funktion des Par-4 Proteins. Dieser Aspekt der Par-4-vermittelten Apoptose bedarf allerdings noch eingehender Analysen.

5.1.2 Lokalisation des überexprimierten Amida Proteins in Rattenfibroblasten

Das Amida Protein wurde in COS-7 Zellen nach einer ektopischen Expression als ein im Nukleus lokalisiertes Protein mit pro-apoptotischer Funktion beschrieben (Irie et al., 2000). In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des überexprimierten Amida Proteins in REF52.2 Zellen wies Amida ebenfalls eine nukleäre Lokalisation auf und zeigte in Übereinstimmung mit seiner bereits beschriebenen pro-apoptotischen Funktion eine Kolokalisation mit den *Promyelocytic Leukemia nuklear Bodies* (PML-NBs). Die PML-NBs, die auch PODs (PML *oncogenic domains*) genannt werden, sind Multiprotein Komplexe, die aus dem PML Protein und einer Vielzahl weiterer Proteine bestehen, die an zellulären Prozessen wie Apoptose, Zellproliferation und Alterung beteiligt sind (Seeler und Dejean, 1999; Salomoni und Pandolfi, 2002). Das PML Protein fungiert als Tumorsuppressor *in vivo* und ist ein bedeutender Vermittler verschiedener apoptotischer Signalwege (Wang et al., 1998a,b). Die genaue Wirkungsweise des PML Proteins ist jedoch weitgehend ungeklärt. Kürzlich erschienene Studien lassen vermuten, dass eine wichtige Funktionsweise des PML Proteins darin besteht, pro-apoptotische Proteine wie Daxx und p53 zu den PML-NBs zu rekrutieren (Guo et al., 2000, Zhong et al., 2000). Daxx z.B. kann mit dem PML Protein interagieren und akkumuliert daraufhin in den PML-NBs. Wird die Interaktion der beiden Proteine inhibiert, geht auch die pro-apoptotische Funktion von Daxx verloren und das Protein ist nicht mehr in PML-NBs lokalisiert (Zhong et al., 2000). Welche Funktion das Amida Protein in den PML-NBs ausübt, konnte auch in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Neuere Studien haben gezeigt, dass auch der Amida Interaktionspartner Par-4 und dessen neuer Interaktionspartner THAP-1 in den PML-NBs lokalisiert sind (Roussigne et al., 2003).

Interessanterweise wurde des weiteren eine Interaktion von Par-4 mit der ZIP-Kinase, dem humanen homolog der Dlk, beschrieben, die zusammen mit dem pro-apoptotischen Protein Daxx nach Arsenittrioxid (As_2O_3)-Behandlung verstärkt zu den PML-NBs rekrutiert wird. Die Interaktion von Par-4 und der ZIP Kinase fördert die Bildung eines ternären Komplexes aus Par-4, ZIP-Kinase und Daxx in den PML-NBs, der an der Induktion des Zelltods nach Arsenittrioxid Behandlung beteiligt ist (Kawai et al., 2003). Ungeklärt bleibt, ob Par-4 und sein Interaktionspartner Amida, ebenso wie z.B. p53 (Guo et al., 2000; Pearson et al., 2000; D'Orazi et al., 2002), in den PML-NBs posttranslational modifiziert werden und auf diese Weise ihre Funktion beeinflusst wird, oder ob es sich bei den PML-NBs um zelluläre Speicher handelt, in denen Par-4 und seine Interaktionspartner rekrutiert und somit aus dem Pool aktiver Proteine des Zytoplasmas herausgezogen werden (Roussigne et al., 2003), wie es z.B. für das Daxx Protein beschrieben worden ist (Li et al., 2000; Lehembre et al., 2001).

Bisher konnte gezeigt werden, dass das PML Protein nach As_2O_3 Behandlung durch die MAP-Kinase phosphoryliert wird, daraufhin sumoyliert und verstärkt zu den PML-NBs rekrutiert wird, was zum Abbau des Proteins, einer verstärkten Apoptoseinduktion und einer Abnahme der PML-NBs führt (Hayakawa und Privalsky, 2004; Zhu et al., 1997). In vorangegangenen Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnte bisher gezeigt werden, dass Amida diesen Abbau-Prozessen entgegenwirkt und nach der Transfektion in Rattenfibroblasten und nach einer As_2O_3 Behandlung der transfizierten Zellen eine stabilisierende Wirkung auf die PML-NBs hat, was möglicherweise darauf hindeutet, dass das Amida Protein durch die Stabilisierung der PML-NBs deren pro-apoptotische Funktion unterstützen könnte (Scholten, 2003). Die Tatsache, dass Amida, Par-4, die ZIP-Kinase und Daxx in apoptotische Prozesse involviert sind und ihre gemeinsame Lokalisation in den PML-NBs lassen eine funktionelle Beziehung zwischen den Proteinen vermuten. Diese Befunde schließen jedoch keineswegs die Möglichkeit aus, dass Par-4 und Amida zusammen an anderen apoptotischen Signalwegen beteiligt sind, die unabhängig von der Lokalisation der Proteine in PML-NBs ablaufen.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien wies Amida in REF52.2 Zellen 48 h nach der Transfektion eine nicht ausschließlich nukleäre Lokalisation auf, sondern zeigte in 37,7% der transfizierten Zellen zusätzlich eine diffuse Verteilung im Zytoplasma. Diese Ergebnisse standen im Widerspruch zu früheren Studien von Irie et al. (2003), die Amida in COS-7 Zellen als ausschließlich nukleär lokalisiertes Protein beschrieben haben. Daher wurde in einem Interspezies Heterokaryon-Assay untersucht, ob das Amida Protein befähigt ist,

zwischen dem nukleären und zytoplasmatischen Kompartiment zu translozieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Amida aus einem humanen Kern exportiert und in einen murinen Kern importiert werden kann. Im Gegensatz dazu war das nukleäre Kontrollprotein hnRNP-C2 nicht zu einer nukleo-zytoplasmatischen Translokation in der Lage. Die nukleäre Lokalisation von Amida scheint in den COS-7 Zellen von den zwei NLS Sequenzen des Proteins abzuhängen, die auch für die pro-apoptotische Funktion des Proteins notwendig zu sein scheinen (Irie et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich eine putative NES Sequenz innerhalb des Amida Proteins identifiziert, die für den aktiven Export des Proteins aus dem Zellkern verantwortlich sein könnte. Diese Leucin-reiche NES Sequenz überspannt die Aminosäuren 26 bis 38 des Ratten Amida Proteins und zeigt eine hohe Sequenzidentität zu der NES des HIV1 Rev Proteins. Dieses Protein kann aufgrund dieser Domäne aktiv über den CRM1-Rezeptor (*chromosomal region maintenance*) aus dem Kern exportiert werden und trägt in HIV infizierten Zellen dazu bei, dass die virale mRNA aus dem Kern in das Zytoplasma exportiert werden kann (Fornerod et al., 1997). Die Aminosäuren 26 bis 38 des Amida Proteins wurden in REF52.2 Zellen als GFP-Fusionsprotein exprimiert und waren dort ausreichend, um das normalerweise auch nukleär lokalisierte GFP-Protein vollständig aus dem Kern zu exportieren und in das Zytoplasma zu lokalisieren. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die identifizierte NES-Sequenz des Amida Proteins tatsächlich funktionell ist. Des weiteren führte die funktionelle Inaktivierung der putativen NES-Sequenz durch Mutation der Leucine des NES Motivs im Amida Protein zu Alaninen (Amida NES^{mut}) bzw. der Deletion der vollständigen putativen NES-Sequenz (Amida-ΔNES) zu einer stark verringerten zytoplasmatischen Lokalisation (20% bzw. 21%) des Amida Proteins im Vergleich zum Wildtyp Protein (38%). Anhand dieser Versuche zeigte sich jedoch auch, dass die zytoplasmatische Lokalisation des Amida Proteins durch die Mutagenisierung oder Deletion der putativen NES-Sequenz nicht vollständig aufgehoben werden konnte, sondern nur verringert wurde, was auf das Vorhandensein von zusätzlichen Mechanismen hindeutet, die die zytoplasmatische Lokalisation des Amida Proteins bestimmen. Dies wird auch von dem Befund gestützt, dass durch LMB, einem Inhibitor des CRM1-vermittelten Kernexports, der Export von Amida aus dem Kern nicht blockiert werden kann. Die nukleo-zytoplasmatische Translokation des Amida Proteins scheint somit über einen CRM1-unabhängigen Mechanismus zu verlaufen. Ein solcher Mechanismus ist bereits für weitere Proteine wie z.B. den Transkriptionsfaktor WT1 beschrieben worden, deren Kernexport möglicherweise über neuartige, unkonventionelle Exportsignale reguliert wird

(Vajjhala et al., 2003). Der genaue Mechanismus, über den Amida aus dem Kern exportiert wird, bleibt jedoch noch zu untersuchen.

5.1.3 Rekrutierung von Amida an das Aktin-Zytoskelett und Apoptose-induktion nach Koexpression von Amida und Par-4

Nachdem gezeigt werden konnte, dass im Gegensatz zu den Studien von Irie et al. (2000) in Rattenfibroblasten exprimiertes GFP-Amida nicht ausschließlich im Kern, sondern auch zum Teil im Zytoplasma lokalisiert war, wurde anhand von Immunfluoreszenzanalysen auch die subzelluläre Lokalisation von Amida und Par-4 nach Koexpression beider Proteine untersucht. Dabei war zu beobachten, dass Amida nach Koexpression mit Par-4 verstärkt aus dem Kern in das Zytoplasma translozierte und dort mit Par-4 an Aktinfilamenten kolokalisierte. Eine Translokation aus dem Zellkern in das Zytoplasma nach Koexpression mit Par-4 war auch schon für den Par-4 Interaktionspartner Dlk gezeigt worden und konnte für das Amida Protein auch in Zell-Fraktionierungsexperimenten und Western Blot Analysen bestätigt werden. In GFP-Amida exprimierenden Zellen konnte das Amida Protein anhand der Fraktionierungsexperimente fast ausschließlich im Kernextrakt nachgewiesen werden, wohingegen es in den Par-4/Amida koexprimierenden Zellen vollständig im Zytoplasmaextrakt zu finden war. Diese Befunde deuten auf eine spezifische Rekrutierung des Amida Proteins an das Aktin-Zytoskelett durch das Par-4 Protein hin. Die Tatsache, dass auch das Par-4 Protein bei diesen Experimenten sowohl im Kernextrakt als auch im Zytoplasmaextrakt nachzuweisen war, lässt sich zum einen durch experimentelle Schwierigkeiten erklären, die auftreten, wenn zytoplasmatische, jedoch Zytoskelett-assoziierte Proteine, wie auch schon unter 3.2.2 erwähnt, in Fraktionierungsexperimenten untersucht werden sollen. Zytoskelett-assoziierte Proteine sind in der löslichen zytoplasmatischen Fraktion schwer nachzuweisen, da sie mit herkömmlichen und relativ milden Extraktionsbedingungen nicht in die lösliche Zytoplasmafraktion übergehen und daher zusammen mit anderen Zytoskelett-assoziierten Proteinen sedimentiert werden. Zum anderen kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein kleiner Teil des Par-4 Proteins tatsächlich im Kern lokalisiert ist oder temporär zur Rekrutierung des Amida Proteins in den Kern transloziert ist. Diese Vermutung wird von Befunden gestützt, die zeigten, dass das Par-4 Protein sowohl eine zytoplasmatische als auch eine Kernfunktion ausüben kann (Johnstone et al., 1996; Diaz-Meco et al., 1996).

Die Fähigkeit des Par-4 Proteins an Aktinfilamente zu binden, wurde erst kürzlich in Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe beschrieben und stellt einen neuen Aspekt in der Par-4/Dlk--

vermittelten Apoptose dar (Vetterkind et al., 2005a). In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Par-4 Protein *in vitro* direkt an F-Aktin binden kann und die Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett nicht über weitere Effektorproteine vermittelt wird. Darüber hinaus ist das Par-4 Protein in der Lage, vopolymerisiertes F-Aktin in höher organisierte Strukturen zu bündeln (Vetterkind et al., 2005a). In Zusammenarbeit mit Dr. Susanne Illenberger (Technische Universität Braunschweig) konnte in der vorliegenden Arbeit anhand von *in vitro* Kosedimentationsstudien und *in vitro* Filament-Bindungsversuchen gezeigt werden, dass Amida im Gegensatz zum Par-4 Protein nicht direkt an F-Aktin bindet und nicht in der Lage ist, Aktinfasern in höher organisierte Strukturen zu bündeln. Amida sedimentierte in den Kosedimentationsstudien ausschließlich mit Aktinfasern, die zuvor durch das Par-4 Protein vernetzt worden waren. Dies lässt darauf schließen, dass die Assoziation des Amida Proteins mit dem Aktin-Zytoskelett, nach der Koexpression mit Par-4, über das Par-4 Protein vermittelt wird. Par-4 ist somit in der Lage, Amida spezifisch an das Aktin-Zytoskelett zu rekrutieren.

Da eine spezifische Rekrutierung der Kinase Dlk durch das Par-4 Protein an Aktinfilamente mit einer sehr effizienten Apoptoseinduktion einhergeht (Page et al., 1999), wurde ein ähnlicher Effekt auch für die Rekrutierung des Amida Proteins an das Aktin-Zytoskelett überprüft. Anhand von Immunfluoreszenzanalysen wurde die Apoptoserate von REF52.2 Zellen quantifiziert, die Par-4 und Amida alleine oder Par-4 und Amida koexprimierten. Im Gegensatz zu Berichten von Irie et al. (2000), in denen beschrieben wurde, dass die Überexpression von GFP-Amida alleine ausreichend ist, um in COS-7 Zellen nach 72 h Apoptose auszulösen, war ektopisch exprimiertes GFP-Amida alleine in REF52.2 Zellen nicht in der Lage, die Apoptose zu induzieren. Diese Diskrepanz könnte allerdings auf Zelltyp-spezifische Unterschiede zurückgeführt werden, wie sie bereits für das Par-4 Protein beschrieben worden sind, das nur in einigen Tumorzellen in der Lage ist, direkt Apoptose auszulösen, andere Zellen jedoch lediglich für die Apoptose sensibilisiert (Boehrer et al., 2002; El-Guendy und Rangnekar, 2003; Vetterkind et al., 2005b). 48 h nach der Expression von Amida und Par-4 zeigten jedoch ca. 53% der Par-4/Amida koexprimierenden REF52.2 Zellen deutliche morphologische Merkmale der Apoptose. Die Rekrutierung von Amida aus dem Kern in das Zytoplasma an das Aktin-Zytoskelett nach Koexpression mit Par-4 führt über einen bisher unbekanntem Mechanismus zur Induktion des Zelltods, was auf einen funktionellen Zusammenhang von Amida und Par-4 in der Par-4-vermittelten Apoptose schließen lässt.

In den Arbeiten von Vetterkind et al. (2005a) konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktinbindung des Par-4 Proteins und der Auslösung des programmierten Zelltods gezeigt werden. Dabei wurde deutlich, dass der N-Terminus des Par-4 Proteins für die direkte Aktinbindung verantwortlich ist und der C-Terminus des Proteins eine stabilisierende Wirkung auf diese direkte Bindung ausübt. Anhand der Quantifizierung der Apoptoseraten durch verschiedene Par-4 Deletionsmutanten nach Koexpression mit der Dlk konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust der Aktin-Zytoskelett-Bindung mit einer verringerten Apoptoserate korrelierte (Vetterkind et al., 2005a). Da Amida analog zur Dlk nach der Koexpression mit Par-4 in das Zytoplasma transloziert, dort mit Par-4 am Aktin-Zytoskelett kolokalisiert und die Induktion der Apoptose auslöst, wurde auch für die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose der Einfluss der Aktinassoziation des Par-4 Proteins näher untersucht. Nach der Koexpression von Amida mit der N-terminalen Par-4 Deletionsmutante Par-4 Δ N41-332 konnte eine verringerte Apoptoseinduktion im Vergleich zur Koexpression der Wildtyp Proteine gezeigt werden. Bei der Deletionsmutante Par-4 Δ N41-332 war die N-terminale Domäne des Par-4 Proteins, die für die direkte Aktinbindung verantwortlich ist deletiert worden, was zum Verlust der Aktinbindung der Mutante führt. Die verminderte apoptotische Aktivität wird vermutlich durch eine verringerte Aktinbindung der Par-4 Deletionsmutante verursacht geht und nicht durch eine eventuell reduzierte Bindungsfähigkeit zu einem weiteren Interaktionspartner. Diese Vermutung wurde ferner untermauert durch die Behandlung von Par-4/Amida koexprimierenden Zellen mit Cytochalasin D, einem Inhibitor der Aktin-Polymerisation. Die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts, nicht aber die Zerstörung der Mikrotubuli, führte dabei zu einer starken Reduktion der Par-4/Amida-vermittelten Apoptose, was darauf hindeutet, dass das Aktin-Zytoskelett direkt an der Par-4/Amida-vermittelten Apoptose beteiligt ist.

Dass der Verlust der Bindungsfähigkeit zwischen Par-4 und Amida ebenfalls mit einer verringerten Apoptoserate korreliert, konnte anhand der Quantifizierung der Apoptoseraten nach Koexpression von Amida und der Par-4 Leucin-Zipper Punktmutante Par-4 L3 in REF52.2 Zellen gezeigt werden. Die Amida/Par-4 L3 koexprimierenden Zellen zeigten eine deutlich verringerte Apoptoserate im Vergleich zu Amida/Par-4 wt koexprimierenden Zellen. Der Verlust der pro-apoptotischen Funktion der Par-4 Leucin-Zipper Punktmutante Par-4 L3 lässt sich mit einer verminderten Assoziation mit seinem Interaktionspartner Amida erklären. Da jedoch alle bisher identifizierten Interaktionspartner von Par-4 mit dem C-Terminus des Proteins interagieren, der die Todesdomäne und den damit überlappenden Leucin-Zipper enthält (Johnstone et al., 1996; Diaz-Meco et al., 1996; Page et al., 1999; Roussigne et al.,

2003; Guo und Xie, 2004; Xie and Guo, 2004; Goswami et al., 2005; Park et al., 2005; Gao et al., 2006), ist nicht ausgeschlossen, dass die Punktmutante Par-4 L3 nicht mehr in der Lage ist, andere Effektorproteine der Par-4-vermittelten Apoptose zu binden und der Verlust der pro-apoptotischen Aktivität direkt darauf zurückzuführen ist, dass zusätzliche Interaktionspartner nicht mehr gebunden werden können. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose sowohl ein intaktes Aktin-Zytoskelett und eine Assoziation des Par-4 Proteins mit dem Aktin-Zytoskelett erfordert, ebenso wie eine Rekrutierung des Amida Proteins durch Par-4.

Der hier näher untersuchte Mechanismus der Par-4/Amida-induzierten Apoptose ähnelt stark dem Modell der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose, bei dem die kernständige Proteinkinase nach der Koexpression mit Par-4 aus dem Kern in das Zytoplasma transloziert, dort mit Par-4 an Aktinfilamenten kolokalisiert und dies zu einer starken Reorganisation des Aktomyosinsystems und einer verstärkten MLC Phosphorylierung führt (Page et al., 1999; Vetterkind et al., 2005a). Die konstitutive Phosphorylierung des Dlk Substrates MLC kann als ein wichtiger Schritt in der Induktionsphase der Apoptose angesehen werden. Die MLC Phosphorylierung führt zur Ausbildung kontraktile Kräfte, zum Ablösen der Zelle von ihrem Substrat und zur Einleitung der apoptotischen Prozesse (Lai et al., 2003; Croft et al., 2005). Kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass auch die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose mit einer erhöhten MLC Phosphorylierung korreliert (Boosen et al., 2005). Unklar ist dabei, ob diese MLC-Phosphorylierung ebenfalls über die Dlk vermittelt wird, die auch an den Par-4/Amida Komplex rekrutiert wird und dort einen trimären Komplex bildet. Die genauen Effektormoleküle, die zu einer MLC Phosphorylierung und zur nachfolgenden Apoptoseinduktion führen, sind für die Par-4/Amida-induzierte Apoptose derzeit noch nicht bekannt. Denkbar ist jedoch auch die Rekrutierung oder Aktivierung weiterer MLC Kinasen wie z.B. ROCK (*Rho kinase*), MLCK (*Myosin light chain kinase*) oder der DAP-Kinase (*death-associated protein kinase*) als Effektormoleküle an das Zytoskelett, die dort zu einer direkten MLC Phosphorylierung oder einer indirekten MLC-Phosphorylierung z.B. durch die Inhibition der Myosin Phosphatase und zur Apoptoseinduktion führen könnten. Dieser Mechanismus der indirekten MLC Phosphorylierung wurde bereits für die Rho Kinase gezeigt, die durch Phosphorylierung des MYPT Proteins (*myosin phosphatase targeting subunit*) an den inhibitorischen Aminosäuren T696 und T853 der humanen AS-Sequenz eine Inhibition der katalytischen Aktivität und eine Dissoziation des Myosin Phosphatase Holoenzym bewirkt, was letztlich zu einer verstärkten

MLC Phosphorylierung führt (Feng et al., 1999; Fukata et al., 2001; Velasco et al., 2002). Da auch für die ZIP-Kinase eine Phosphorylierung des MYPT Proteins an der Aminosäure T696 beschrieben wurde (McDonald et al., 2001; Endo et al., 2004), ist hier ein ähnlicher Mechanismus zu vermuten, durch den die MLC Phosphorylierung verstärkt werden könnte.

Darüber hinaus bleibt auch die genaue Funktion des Aktin-Zytoskeletts in der Par-4 vermittelten Apoptose ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Interaktion von Par-4 mit dem Aktinfilamentsystem für die Par-4/Amida- und die Par-4/Dlk-induzierte Apoptose unerlässlich ist, sollten auch die beteiligten Mechanismen eingehender untersucht werden. Es wäre denkbar, dass Par-4 durch seine Fähigkeit, Aktin zu reorganisieren direkt zu einer Apoptoseinduktion führt. Auch wenn dies nicht die Hauptfunktion des Par-4 Proteins zu sein scheint, insbesondere in Zelllinien, die ein ausgeprägtes Aktin-Zytoskelett aufweisen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die proapoptische Funktion des Par-4 Proteins u.a. auf eine lokale Aktinbündelungsaktivität zurückzuführen sein könnte.

Ein möglicher und bereits bekannter Mechanismus der Apoptoseinduktion unter Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts beinhaltet die Trimerisierung und Aktivierung der sogenannten Todesrezeptoren. Die genauen Mechanismen sind bisher unbekannt und könnten möglicherweise stark zwischen verschiedenen apoptotischen Stimuli und Zelltypen variieren. In HeLa Zellen konnte z.B. gezeigt werden, dass die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin D die Trimerisierung des CD95 (Fas/APO-1) Rezeptors bewirkt und somit die Apoptose ausgelöst wird (Kulms et al., 2002). Im Gegensatz dazu bewirkt die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts in den B-Zell Lymphomen A20 die Inhibition der Fas-vermittelten Apoptose (Bando et al., 2002). Für die Par-4-vermittelte Apoptose scheint jedoch von Bedeutung zu sein, dass Par-4 die Translokation von Fas und FasL zur Zytoplasmamembran bewirken kann, jedoch ist auch hier der genaue Mechanismus bis dato unbekannt (Chakraborty et al., 2001). Ferner wurde berichtet, dass Par-4 in neoplastischen Lymphozyten die Apoptose über die Hochregulation des CD95 Rezeptors an der Zelloberfläche und die Aktivierung der Caspasen-8 und -10 auslösen kann, die wiederum weitere Effektorcaspasen und den mitochondrialen Apoptoseweg aktivieren (Bergmann et al., 2004). Andererseits konnte in Studien aus unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Koexpression von Par-4 und einer dominant-negativen FADD Mutante nur zu einer geringen Reduktion der Par-4-induzierten Apoptose in Zelllinien, die aus primären neuronalen Tumoren gewonnen wurden, führt. Darüber hinaus bleibt die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose auch durch die Inhibition der Caspase-8 unbeeinflusst (Vetterkind et al., 2005b). Da die Par-4-induzierte Apoptose in

diesen neuronalen Tumorzelllinien somit nur zum Teil über die Aktivierung des Fas/FADD/Caspase-8 Signalwegs verläuft, wird in Abhängigkeit von den jeweiligen zellulären Faktoren die Beteiligung des Par-4 Proteins an zusätzlichen apoptotischen Signalwegen vermutet.

Zusammenfassend deuten die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse darauf hin, dass die Par-4- und die Amida-vermittelte Apoptose über eine Vielzahl von Signalwegen verlaufen können, die von den Interaktionspartnern des Par-4 und Amida Proteins und dem zellulären Kontext beeinflusst werden könnten. In Rattenfibroblasten stellt die Rekrutierung von pro-apoptotischen Effektormolekülen aus dem Kern, oder möglicherweise auch aus anderen Kompartimenten, an das Mikrofilamentsystem der Zelle offenbar einen generellen Mechanismus der Par-4-vermittelten Apoptose dar. Die rekrutierten Proteine scheinen dabei entweder direkt, wie im Fall der Dlk, oder indirekt über weitere bisher unbekannte Effektoren zu einer MLC Phosphorylierung zu führen, die letztendlich zum Ablösen der Zelle von ihrem Substrat und zur Induktion der Apoptose beiträgt.

5.2 Bedeutung der Par-4 Phosphorylierung für die pro-apoptische Funktion des Par-4 Proteins

In der Primärstruktur des Par-4 Proteins finden sich zahlreiche Konsensusmotive für posttranslationale Modifikationen, wie z.B. potentielle N-Myristoylierungsstellen, Sumoylierungsstellen sowie Phosphorylierungsstellen für die Caseinkinase II, Proteinkinase A, Proteinkinase C und die Dlk. In bisherigen Arbeiten von Page et al. (1999) konnte gezeigt werden, dass Par-4 *in vitro* von einer C-terminal verkürzten Deletionsmutante der Dlk, die eine vollständige Kinasedomäne, jedoch ein verringertes Molekulargewicht gegenüber der Wildtyp Kinase aufwies, phosphoryliert wird. Protein Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen können zahlreiche Proteinfunktionen wie z.B. zelluläre Lokalisation, Proteinstabilität, Protein-Protein Interaktionen, Enzymaktivität oder DNA-Bindung direkt regulieren (Hunter, 1995; Whitmarsh und Davis, 2000). Inwieweit eine Par-4 Phosphorylierung auch *in vivo* auftritt und welche Rolle sie für die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose spielt, war bisher unbekannt.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte zunächst verifiziert werden, dass für die Translokation der Kinase aus dem Kern in das Zytoplasma und die Apoptoseinduktion nach der Koexpression von Par-4 und Dlk sowohl die Kinaseaktivität der Dlk, als auch eine Bindung des Par-4 Proteins an die Dlk über den Leucin-Zipper des Par-4 Proteins essentiell

sind. Wurde eine Kinase-negative Mutante der Dlk (Dlk K42A) oder eine Par-4 Punktmutante mit defektem Leucin-Zipper (Par-4 L3) in den Kotransfektionsversuchen mit Par-4 wt bzw. Dlk wt verwendet, kam es im Gegensatz zu den koexprimierten Wildtyp Proteinen nicht zu einer Rekrutierung der Kinase an das Aktin-Zytoskelett und zu keiner Apoptoseinduktion. Darüber hinaus konnte die Interaktion des endogenen Par-4 Proteins mit dem endogenen Dlk Protein anhand von Koimmunpräzipitationsexperimenten in REF52.2 Zellen nachgewiesen werden, was die Relevanz und die physiologische Bedeutung der bisherigen Experimente, die an überexprimierten Proteinen durchgeführt wurden, unterstreicht.

Um die Phosphorylierung des Par-4 Proteins genauer zu untersuchen, wurden *in vitro* Phosphorylierungsexperimente mit den rekombinanten gereinigten Par-4 und Dlk Proteinen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Par-4 wt Protein von der Dlk phosphoryliert wird, und dass Par-4 für die Dlk ein bevorzugtes Substrat gegenüber der Kinase selbst darstellt. Anhand von Phosphoaminosäureanalysen, mit denen die potentiellen Dlk Phosphorylierungsstellen identifiziert werden sollten, zeigte sich, dass die Dlk das Par-4 Protein an verschiedenen Aminosäuren phosphorylieren kann, da sowohl Serinreste als auch Threoninreste in einem Verhältnis von 1:2 phosphoryliert wurden. Dabei scheint keiner der Serin- oder Threoninreste bevorzugt phosphoryliert zu werden, da sich das Verhältnis von phosphorylierten Serin- zu Threoninresten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte unterschied und bereits nach einer Minute Inkubationsdauer von Par-4 und Dlk eine Phosphorylierung der Serin- und Threoninreste in einem Verhältnis von 1:2 zu erkennen war.

Anhand der bisher bekannten Dlk und ZIP-Kinase Substrate und deren Phosphorylierungsstellen konnte eine Konsensussequenz für die Dlk identifiziert werden, die das AS-Motiv RXXS/T beinhaltet. Der in -3 Position der potentiellen Phosphoakzeptorstelle voranstehende Argininrest ist in allen bisher bekannten und untersuchten Substraten der Dlk/ZIP-Kinase wie H3, MDM2, MLC oder p21^{waf} (Burch et al., 2004) identisch und scheint somit essentiell für eine Dlk/ZIP-Kinase Phosphorylierungsstelle zu sein. Durch eine Analyse der Par-4 Aminosäuresequenz wurden vier potentielle Dlk Phosphorylierungsstellen im Par-4 Protein (S154, T155, S220 und S249) identifiziert, die die Bedingungen einer Dlk Konsensussequenz erfüllen. Die Aminosäure S154 entspricht dabei nur bedingt einer putativen Dlk Phosphorylierungsstelle, doch geht dieser Serinrest dem potentiell phosphorylierbaren Threoninrest T155 voraus und weiterhin ist der essentielle Argininrest von anderen basischen Aminosäuren umgeben, so dass die Aminosäure Serin 154 ebenfalls eine potentielle Phosphorylierungsstelle darstellen könnte. Da das Motiv, das die Aminosäuren S154/T155

flankiert darüber hinaus den Diphosphorylierungsstellen der Dlk Substrate H3 (S10/T11) und MYPT (S695/T696) ähnelt (Preuss et al., 2003a; Wooldridge et al., 2004), die von der Dlk und einer weiteren Kinase phosphoryliert werden können, wurden beide potentiellen Phosphorylierungsstellen in die Untersuchungen mit einbezogen.

Um die Phosphorylierungsstellen im Par-4 Protein zu identifizieren, wurden Punktmutanten des Par-4 Proteins hergestellt, in denen die potentiellen Dlk Phosphorylierungsstellen zu Alaninresten ausgetauscht wurden. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation dieser Par-4 Mutanten zeigte keinen Unterschied zur Lokalisation des Wildtyp Proteins. Alle Par-4 Phosphorylierungsmutanten waren im Zytoplasma lokalisiert und mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert. Die Aktinassoziation der Par-4 Proteine und die vollständig zytoplasmatische Lokalisation des Par-4 Proteins sind somit unabhängig von einer möglichen Phosphorylierung an den putativen Dlk Phosphorylierungsstellen.

Anhand von *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten mit den gereinigten Par-4 Phosphorylierungsmutanten und der Dlk konnte die Aminosäure Threonin 155 des Par-4 Proteins eindeutig als eine Dlk Phosphorylierungsstelle identifiziert werden. Die Mutante, bei der das Threonin 155 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (Par-4 T155A), wies in einem *in vitro* Phosphorylierungsexperiment mit der Dlk eine deutlich schwächere Phosphorylierung gegenüber dem Wildtyp Protein auf, wohingegen sich die Phosphorylierung der Mutante Par-4 S154A kaum von der Par-4 wt Kontrolle unterschied. Eine vollständige Inhibition der Par-4 Phosphorylierung durch die Dlk wurde in diesem Phosphorylierungsexperiment jedoch nur durch die zusätzliche Mutation des Serin 154 oder Deletion des C-Terminus (AS 233-332) des Par-4 Proteins erreicht. Daher lässt sich vermuten, dass zusätzlich zur Aminosäure Threonin 155 ein weiterer Serinrest des Par-4 Proteins durch die Dlk phosphoryliert werden kann. Mögliche Kandidaten für diese zusätzliche Phosphorylierung an der Aminosäure Serin könnten der Serinrest 154 und der Serinrest 249 darstellen. Gegen eine Dlk Phosphorylierung an der Aminosäure S154 des Par-4 Proteins spricht jedoch die Tatsache, dass eine Par-4 Mutante, in der der Aminosäurerest S154 zu Alanin ausgetauscht wurde, keine Reduktion in der Phosphorylierung gegenüber dem Par-4 wt Protein zeigte. Im Gegensatz dazu bewirkte die zusätzliche Mutation der Aminosäure S154 in der Par-4 Phosphorylierungsmutante T155A (S154A/T155A) die vollständige Inhibition der Par-4 Phosphorylierung durch die Dlk, was durch die alleinige Mutation der Aminosäure T155 des Par-4 Proteins nicht erreicht wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in den *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Phosphorylierungsstellen S154 und T155 erfolgt. Eine schwache Phosphorylierung des Serin 154 durch die Dlk scheint möglich,

jedoch nur unter der Voraussetzung, dass die bevorzugte Dlk Phosphorylierungsstelle T155 nicht phosphoryliert ist bzw. durch eine Mutation verändert wurde. Die gleichzeitige Phosphorylierung der beiden Aminosäuren Serin 154 und Threonin 155 durch die Dlk scheint sich somit auszuschließen. Bei dem S154/T155 Sequenzmotiv könnte es sich um eine potentielle Diphosphorylierungsstelle handeln, wie sie z.B. bereits in den Dlk/ZIP-Kinase Substraten H3, MYPT oder MLC beschrieben worden ist (Murata-Hori et al., 2000; Preuss et al., 2003a; Wooldridge et al., 2004; Komatsu und Ikebe, 2004). Dabei handelt es sich um regulatorische Sequenzmotive, die von verschiedenen Kinasen modifiziert werden können. Je nach Stimulus kann ein Protein daher durch zwei unterschiedliche Signalwege phosphoryliert und dadurch aktiviert werden. Das MYPT1 Protein kann z. B. an der Aminosäure Serin 695 durch die PKG oder PKA phosphoryliert werden, wodurch auch nach cAMP/cGMP Stimulation die Phosphorylierung der Aminosäure Threonin 696 und die damit einhergehende Inhibition des Myosin Phosphatase Holoenzym verhindert wird (Wooldridge et al., 2004). Aus der Ähnlichkeit des Sequenzmotivs S154/T155 des Par-4 Proteins zu diesem regulatorischen Motiv des MYPT1 Proteins läßt sich die Hypothese ableiten, ob nicht die Phosphorylierung der Aminosäure Serin 154 des Par-4 Proteins durch eine bisher unbekannte Kinase die Phosphorylierung der Aminosäure T155 und somit die pro-apoptotische Funktion des Par-4 Proteins inhibieren und dadurch regulieren kann.

Die zweite potentielle Serin Phosphorylierungsstelle S249 liegt in einem AS-Motiv, das einer Konsensussequenz für die Dlk entspricht. Die Phosphorylierung dieser Aminosäure wurde aber zunächst nicht näher untersucht, da dieser Par-4 Sequenzbereich in der AS-Sequenz verschiedener Spezies wie Maus, Ratte und Mensch nicht konserviert ist und ausschließlich in der Ratten Par-4 AS-Sequenz auftritt. Arbeiten von Goswami et al. (2005) haben jedoch kürzlich das Serin 249 der Par-4 AS-Sequenz als eine Akt-Kinase Phosphorylierungsstelle beschrieben. Der Verlust des Tumorsuppressors PTEN bewirkt die Induktion eines Überlebenssignals, das über den PI3K-Akt Kinase Signalweg vermittelt wird. Die Akt Kinase kann im weiteren Verlauf des Signalweges an den Leucin-Zipper von Par-4 binden, das Protein an der Aminosäure S249 phosphorylieren und die Apoptoseinduktion durch Par-4 inhibieren. Die Phosphorylierung der Aminosäure S249 des Par-4 Proteins tritt dieser Studie zufolge verstärkt in Tumorzellen auf und führt durch die Inhibition der pro-apoptotischen Funktion des Par-4 Proteins möglicherweise zum Überleben von Krebszellen. Welche Serinreste tatsächlich von der Dlk im Par-4 Protein phosphoryliert werden können und welche Relevanz diese Phosphorylierungen möglicherweise auf die Par-4-vermittelte

Apoptose haben, konnte in dieser Arbeit mit den angewendeten Methoden letztlich jedoch nicht geklärt werden

Die Charakterisierung der Par-4 Phosphorylierungsmutanten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte jedoch eindeutigere Ergebnisse. Nach der Koexpression der Par-4 Phosphorylierungsmutante Par-4 T155A mit der Dlk in REF52.2 Zellen konnte eine ähnliche subzelluläre Lokalisation der Kinase und des Par-4 T155A Proteins beobachtet werden wie nach der Koexpression von Par-4 wt mit der Kinase-negativen Mutante der Dlk K42A. Die Kinase war nicht mehr mit Par-4 am Aktin-Zytoskelett assoziiert, verblieb dadurch im Zellkern und die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose wurde inhibiert. Die weiteren Par-4 Phosphorylierungsmutanten, bei denen die potentiellen Dlk Phosphorylierungsstellen zu Alaninen mutiert worden waren und die ebenfalls mit der Dlk in REF52.2 Zellen koexprimiert wurden, zeigten keinen Unterschied in der Apoptoseinduktion im Vergleich zum Par-4 wt Protein. Die Dlk wurde in den koexprimierenden Zellen in das Zytoplasma an Aktinfilamente rekrutiert, es kam zu einer dramatischen Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und zur Induktion der Apoptose. Die Quantifizierung der Apoptosraten der einzelnen Phosphorylierungsmutanten nach der Koexpression mit der Dlk bestätigte, dass eine verminderte Phosphorylierung an der Aminosäure T155 des Par-4 Proteins mit einer verringerten Apoptoserate und einer verringerten zytoplasmatischen Translokation der Kinase korrelierte. Diese Befunde lieferten starke Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung von Par-4 an der Aminosäure T155 eine entscheidende Rolle bei der Apoptoseinduktion durch Par-4 und Dlk spielt.

Zur genaueren Untersuchung der Par-4 Phosphorylierung an der Aminosäure T155 wurde ein phosphorylierungsabhängiger Peptidantikörper hergestellt, der spezifisch das Par-4 Protein erkennt, wenn es an der Aminosäure T155 phosphoryliert ist. Dieser phosphospezifische Antikörper war sowohl in immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen als auch in Western Blot Analysen in der Lage, das Par-4 Protein in Par-4/Dlk koexprimierenden Zellen anzufärben. Für diese Experimente wurden darüber hinaus auch die hergestellten Par-4 Phosphorylierungsmutanten eingesetzt. Nur bei der Koexpression der Mutante Par-4 T155A mit der Dlk war keine Immunanfärbung des Par-4 Proteins mit dem phosphospezifischen Antikörper nachweisbar. In Abwesenheit der Dlk wurde weder überexprimiertes noch endogenes Par-4 Protein durch den Antikörper angefärbt, was darauf hindeutet, dass es sich bei der Phosphorylierung von Par-4 an der Aminosäure Threonin 155 durch die Dlk um eine Apoptose-spezifische posttranslationale Modifikation handelt. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse dieser Analysen und die Charakterisierung der Par-4 Phosphorylierungsmutanten,

dass die Phosphorylierung von Par-4 an der Aminosäure Threonin 155 eine essentielle Rolle bei der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose spielt.

Dass die verminderte Apoptoseinduktion durch die Koexpression von Par-4 T155A und Dlk und die reduzierte Translokation der Kinase aus dem Kern an das Aktin-Zytoskelett allein auf eine verminderte Bindungsfähigkeit der beiden Proteine zurückzuführen ist, konnte in Interaktionsstudien mittels des Hefe-Zwei-Hybrid Systems ausgeschlossen werden. Keine der untersuchten Par-4 Phosphorylierungsmutanten war in der Fähigkeit eingeschränkt, mit der Dlk zu interagieren. Die Translokation der Kinase aus dem Kern in das Zytoplasma steht somit in direktem Zusammenhang mit der Kinaseaktivität der Dlk und darüber hinaus der Verfügbarkeit des Dlk Substrates Par-4 T155. Die genauen Mechanismen dieser phosphorylierungsabhängigen Rekrutierung der Dlk an das Aktin-Zytoskelett sind Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Denkbar ist weiterhin, dass die Phosphorylierung des Par-4 Proteins, und insbesondere an der Aminosäure T155, zusätzlich von anderen Kinasen vermittelt werden kann. Anhand von Sequenzanalysen des Par-4 Proteins wurden die Aminosäurereste S154 und T155 z.B. als potentielle PKA Phosphorylierungsstellen identifiziert. Im Laufe dieser Arbeit wurde von Gurumurthy et al. (2005) eine Par-4 Phosphorylierung durch die PKA an der Aminosäure T155 beschrieben. In diesen Berichten ist die Phosphorylierung des Par-4 Proteins durch die PKA an der Aminosäure Threonin 155 essentiell für die Par-4-vermittelte Apoptoseinduktion in Tumorzellen. Durch *in vitro* Phosphorylierungsexperimente konnte in dieser Doktorarbeit der Nachweis erbracht werden, dass Par-4 tatsächlich ein Substrat für die PKA darstellt. Jedoch zeigte sich bei der Phosphoaminosäureanalyse, dass die PKA, im Gegensatz zu der Dlk, das Par-4 Protein ausschließlich an Serinresten phosphoryliert. Diese Befunde stehen im deutlichen Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Daten von Gurumurthy et al. (2005), aber der Versuch die tatsächliche Phosphorylierungsstelle der PKA im Par-4 Protein zu identifizieren, ergab kein eindeutiges Ergebnis. Weder die Mutagenese der Aminosäure S154 noch der Aminosäure T155 zu Alanin führte zu einer Reduktion der Par-4 Phosphorylierung durch die PKA. Die Mutation beider potentieller Phosphorylierungsstellen führte jedoch zu einer fast vollständigen Inhibition der PKA-vermittelten Par-4 Phosphorylierung. Es scheint somit möglich, dass die PKA sowohl die AS S154 als auch die AS T155 phosphorylieren kann. Dies steht zwar im Widerspruch zu der Phosphoaminosäureanalyse, die zeigte, dass das Par-4 Protein durch die PKA ausschließlich an Serinresten phosphoryliert wird, doch möglicherweise ist die Kinase in der Lage, innerhalb dieser Diphosphorylierungssequenz nach

der Mutation des Serin 154 alternativ auch das Threonin 155 zu phosphorylieren. Unklar bleibt weiterhin, inwieweit sich die Phosphorylierungen der beiden Kinasen Dlk und PKA gegenseitig beeinflussen, und ob beide Phosphorylierungen kompetitiv auftreten, oder sich gegenseitig möglicherweise begünstigen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Aminosäure T155 des Par-4 Proteins nicht nur von der PKA, sondern auch von der Dlk phosphoryliert werden kann, wurden alle bisher verwendeten gereinigten Proteine in *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten unter Verwendung verschiedener Kinaseinhibitoren eingesetzt. Diese Experimente sollten sicherstellen, dass die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Par-4 Phosphorylierung ausschließlich auf die eingesetzten Kinasen zurückzuführen sind, und dass das Par-4 Protein nicht durch mitgereinigte Kinasen phosphoryliert wurde. Ferner wurde die *in vivo* Phosphorylierung des Par-4 Proteins in stabil GFP-Par-4 exprimierenden CHO Zellen auf ihre PKA Abhängigkeit hin untersucht. Das Par-4 Protein, das aus dieser Zelllinie immunpräzipitiert wurde, wies eine Phosphorylierung ausschließlich an Serinresten auf. Durch die zusätzliche Aktivierung der PKA durch cAMP konnte diese Phosphorylierung weder gesteigert noch verändert werden. Des Weiteren konnte der Einsatz von PKA Inhibitoren in keinem der hier durchgeführten experimentellen Ansätze die Phosphorylierung des Par-4 Proteins an der Aminosäure T155 oder die Apoptoseinduktion nach einer Koexpression von Par-4 und Dlk inhibieren. Durch die Ähnlichkeit der Par-4 Phosphorylierungsstelle T155 zu den ROCK Phosphorylierungsstellen im MYPT Protein (T696 u. T853) wurde außerdem vermutet, dass das Par-4 Protein ein ROCK Substrat darstellen könnte. Neuere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe haben jedoch gezeigt, dass auch durch den Einsatz eines ROCK Inhibitors die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose nicht inhibiert werden kann (Vetterkind et al., 2005a). Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass zumindest in den hier verwendeten Zellkulturmodellen weder die PKA noch die ROCK einen Einfluss auf die Dlk-vermittelte Phosphorylierung des Par-4 Proteins oder auf die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose haben.

In der Arbeit von Gurumurthy et al. (2005) konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Par-4 Protein infolge der PKA-vermittelten Phosphorylierung an der Aminosäure T155 in verschiedenen Tumorzellen in den Zellkern transloziert und dort die Apoptose einleitet. Da in dieser Arbeit in den durchgeführten Experimenten keine Translokation des Par-4 Proteins in den Kern nach der Dlk-vermittelten Phosphorylierung der Aminosäure Threonin 155 zu beobachten war, lassen sich zelltypspezifische Unterschiede in der Par-4 Funktion vermuten.

Es wäre denkbar, dass entweder die PKA durch die Phosphorylierung zusätzlicher spezifischer Aminosäuren den Kerntransport in den Tumorzellen bewirkt, oder dass die Dlk zusätzlich zu der Aminosäure Threonin 155 in den hier verwendeten Zellkulturmodellen weitere Aminosäuren phosphoryliert, die den Kerntransport des Par-4 Proteins unterbinden. Vermutlich bestimmt das Gesamtphosphorylierungsmuster des Par-4 Proteins und nicht die Phosphorylierung einer einzelnen Aminosäure die apoptotische Aktivität und die subzelluläre Lokalisation des Par-4 Proteins. Die Phosphorylierungen innerhalb eines Sequenzmotivs könnten von verschiedenen Kinasen ausgeführt werden, die an verschiedenen unabhängigen apoptotischen Signalwegen beteiligt sein könnten. Es wäre denkbar, dass das Par-4 Protein die Signale verschiedener apoptotischer Mechanismen integrieren und weiterleiten kann. Dass mehrere apoptotische Mechanismen existieren, die alle über eine Par-4 Phosphorylierung insbesondere an der Aminosäure T155 vermittelt werden könnten, wird auch von dem Befund untermauert, dass die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose von der Phosphorylierung des Par-4 Proteins an der Aminosäure T155 abhängig ist. Koexpressionsstudien in REF52.2 Zellen zeigten, dass die Par-4/Amida-vermittelte Apoptoserate stark absank nach einer Koexpression von Amida mit der Par-4 Mutante 155A. Bei der Phosphorylierung der Aminosäure Threonin 155 des Par-4 Proteins scheint es sich somit um eine allgemeine und essentielle posttranslationale Modifikation des Par-4 Proteins in der Par-4-vermittelten Apoptoseinduktion zu handeln. Möglicherweise kann diese posttranslationale Modifikation je nach Zellkontext und apoptotischem Signal von verschiedenen Signalwegen und Kinasen wie z.B. der Dlk, ROCK oder auch der PKA vermittelt werden kann.

5.3 Das Amida Protein als Substrat der Dlk

Auch für das Amida Protein wurde bereits eine funktionelle Regulation durch eine spezifische Phosphorylierung beschrieben (Gan et al., 2003). Amida spielt dabei eine bedeutende Rolle in der Regulation des Zellzyklus und verursacht bei Überexpression in COS-7 Zellen nicht nur die Induktion der Apoptose in einer Vielzahl der Zellen, sondern in der Subpopulation der überlebenden Zellen einen Zellzyklusarrest in der S-Phase. Obwohl der genaue Mechanismus bisher unbekannt ist, scheint Amida den Übergang der Zellen von der S- in die M-Phase durch eine Inhibition der Cdc2 Kinase zu verhindern, deren Aktivität für den Übergang der Zellen von der G2-Phase in die Mitose notwendig ist (Nurse, 1990; Gan et al., 2003). Das Amida Protein selbst bindet M-Phasen-spezifisch an die Cdc2 und wird von der Kinase an der Aminosäure S180 phosphoryliert. Die Modifikation der Aminosäure S180 bewirkt eine verringerte DNA-Bindung des Amida Proteins während der M-Phase (Gan et al., 2003). Es

wird vermutet, dass eine Funktion der Cdc2 im Zellzyklus darin besteht, ihre Substrate durch Phosphorylierung von der DNA abzulösen, und es den Chromosomen auf diese Weise zu ermöglichen, während der Mitose in einen noch stärker kondensierten Zustand überzugehen (Moreno und Nurse, 1990; Nurse, 1990).

Der Befund von Gan et al. (2003), dass das Amida Protein einen Zellzyklusarrest hervorrufen kann, konnte in dieser Arbeit anhand der hier verwendeten REF52.2, CHO und HeLa Zelllinien nicht bestätigt werden. Es wurden in dieser Arbeit stabil GFP-Amida exprimierende CHO Zelllinien hergestellt, die keinerlei Beeinträchtigung in ihrem Wachstumsverhalten und ihren Wachstumsraten zeigten. In den stabil GFP-Amida exprimierenden Zellen wurde anhand einer Phosphorsäureanalyse der *in vivo* Phosphorylierungsstatus des Amida Proteins untersucht. Diese Analyse zeigte eine starke nicht Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung Serinresten im Amida Protein, jedoch keinerlei Phosphorylierung der Aminosäure Threonin. Da eine sehr starke Phosphorylierung von Serinresten zu beobachten war, und dies nicht allein auf eine mitotische Phosphorylierung des Serin 180 zurückzuführen sein konnte, wurde eine zusätzliche Phosphorylierung an einem weiteren Serinrest im Amida Protein vermutet. Durch die Analyse der AS-Sequenz des Amida Proteins wurden potentielle Phosphorylierungsstellen für die Dlk (S200) und die PKC (T101, S179) identifiziert. In *in vitro* Phosphorylierungsexperimenten mit gereinigtem Amida wt Protein und der Dlk bzw. der PKC konnte gezeigt werden, dass das Amida Protein ein Substrat der Dlk darstellt. Die PKC war dahingegen nicht in der Lage, das Amida Protein *in vitro* zu phosphorylieren. Um die potentielle Dlk Phosphorylierungsstelle im Amida Protein näher zu untersuchen, wurde die Phosphorylierungsmutante Amida S200A hergestellt, bei der die potentiell phosphorylierbare Aminosäure Serin 200 gegen einen Alaninrest ausgetauscht wurde. Weitere *in vitro* Phosphorylierungsexperimente mit gereinigtem Amida wt Protein und der Phosphorylierungsmutante Amida S200A zeigten, dass das Amida Protein von der Dlk spezifisch an der Aminosäure Serin 200 phosphoryliert werden kann. Darüber hinaus zeigten Koimmunpräzipitationsexperimenten, dass das Amida Protein in der Lage ist, direkt mit der Dlk zu interagieren. In Koexpressionsstudien und immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen der Amida Phosphorylierungsmutante wurde der Einfluss einer Phosphorylierung auf die pro-apoptotische Funktion des Amida Proteins untersucht. Es konnte jedoch mit den hier angewendeten Methoden kein Einfluss der Amida Phosphorylierung auf die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose festgestellt werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Threonin 155 des Par-4 Proteins essentiell ist für die Par-4/Dlk- und die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose. Die

Mutation der Dlk Phosphorylierungsstelle S200 im Amida Protein zu einem Alaninrest hatte im Gegensatz dazu, in den hier durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen, keinen Einfluss auf die Apoptosinduktion nach der Koexpression von Par-4 und der Amida Mutante S200A. Der in Koimmunpräzipitationsanalysen gewonnene Befund, dass Par-4, Amida und die Dlk zur Bildung eines trimären Komplexes fähig sind, und die Kolokalisation von Amida, Par-4 und der Dlk am Aktin-Zytoskelett nach einer Koexpression in REF52.2 Zellen (Daten nicht gezeigt), deutet jedoch auf ein funktionelles Zusammenspiel dieser drei Proteine in der Apoptose hin. Die Phosphorylierung des Amida Proteins an der Aminosäure S200 durch die Dlk scheint jedoch im Gegensatz zu der Phosphorylierung der Aminosäure T155 des Par-4 Proteins nicht essentiell zu sein für die Zytoskelett-abhängige Par-4/Amida-vermittelte Apoptoseinduktion. Sie könnte aber von Bedeutung sein für einen Amida-abhängigen apoptotischen Signalweg, der möglicherweise über die PML-NBs verläuft. Für die Existenz eines solchen apoptotischen Signalweges spricht die Lokalisation von Amida in den PML-NBs, die stabilisierende Wirkung von Amida auf die PML-NBs, und auch das bereits beschriebene pro-apoptotische Potential des Amida Proteins unabhängig von Par-4 (Irie et al., 2000). Ferner könnten auch Par-4 und die Dlk/ZIP Kinase aufgrund ihrer kürzlich beschriebenen Kolokalisation in den PML-NBs an einem solchen PML-vermittelten apoptotischen Signalweg beteiligt sein (Kawai et al., 2003). Da jedoch in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten kein Einfluss der Amida Phosphorylierung auf die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose zu erkennen war, ist auch die Beteiligung des Amida Proteins an Zellzyklusprozessen im Zusammenspiel mit der Dlk denkbar. Die Dlk scheint ebenfalls eine wichtige Rolle in der Mitose zu spielen, wo sie an Centromeren, Centrosomen und dem kontraktilen Aktomyosinring assoziiert vorliegt und unter anderem für spezifische Histon Phosphorylierungen verantwortlich ist (Preuss et al., 2003a,b). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Amida Phosphorylierung durch die Dlk, die Bindung an die Dlk oder auch die Bildung des trimären Komplexes aus Amida, Dlk und Par-4 in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase auftritt und Amida auf diese Weise an der Regulation mitotischer oder zellzyklusregulatorischer Prozesse beteiligt ist. Da bisher wenig über die Funktion von Amida während des Zellzyklus bekannt ist, stellt die Untersuchung der Amida und Dlk abhängigen Zellzyklusregulation ebenfalls ein interessantes neues Forschungsgebiet dar.

5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das pro-apoptotische Protein Amida als ein neuer Interaktionspartner des Par-4 Proteins identifiziert. Das kernständige Amida Protein wird nach der Koexpression mit Par-4 in Rattenfibroblasten an das Aktin-Zytoskelett rekrutiert und die Apoptose wird induziert. Es konnte gezeigt werden, dass für die Auslösung der Apoptose nicht nur in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose sondern auch in der Par-4/Amida-vermittelten Apoptose unter der Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts verläuft. Es lässt sich somit vermuten, dass die Aktinassoziation des Par-4 Proteins und die Rekrutierung von Effektormolekülen an das Aktin-Zytoskelett einen generellen Mechanismus in der Par-4-vermittelten Apoptose darstellt. Obwohl die Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts an apoptotischen Prozessen lange Zeit eher als eine Folgeerscheinung der Apoptose angesehen wurde, wiesen neuere Forschungsergebnisse besonders der konstitutiven MLC Phosphorylierung eine bedeutende Rolle in der Apoptoseinduktion zu. Die MLC-Phosphorylierung erfolgt vermutlich in der Par-4/Dlk-induzierten Apoptose direkt durch die Dlk, da gezeigt werden konnte, dass MLC tatsächlich *in vivo* von der Dlk nach der Rekrutierung an das Aktin-Zytoskelett an der Aminosäure Ser 19 phosphoryliert wird und diese Phosphorylierung für die Motilität von Fibroblasten erforderlich ist (Komatsu und Ikebe, 2004; Vetterkind et al., 2005a). Sie ist darüber hinaus aber auch in der Par-4/Amida-vermittelten Apoptose zu beobachten. Es wäre daher interessant zu untersuchen, inwieweit die Dlk auch eine Rolle für die Par-4/Amida-induzierte Apoptose spielt. Ebenso könnte das pro-apoptotische Potential von Amida darin bestehen, dass Amida als Adapterprotein an der Rekrutierung weiterer pro-apoptotischer Faktoren an das Aktin-Zytoskelett beteiligt ist. Die Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktionspartner von Amida könnte daher dazu beitragen, die Mechanismen der Par-4-vermittelten Apoptose weiter aufzuklären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben darüber hinaus gezeigt, dass die Phosphorylierung des Par-4 Proteins an der Aminosäure T155 essentiell ist für die Par-4/Dlk- und auch die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose. Möglicherweise führt die Phosphorylierung des Par-4 Proteins zu einer Konformationsänderung und/oder Änderung der Bindungsaffinität zu einem Interaktionspartner, die zur Auslösung der apoptotischen Signalkaskade führen könnten. Die Phosphorylierungsstelle T155 im Par-4 Protein ähnelt ferner stark der inhibitorischen Phosphorylierungsstelle T853 im MYPT Protein, die von der ROCK phosphoryliert werden kann. Die Phosphorylierung des MYPT Proteins durch die ROCK führt zur Inhibition der Myosin Phosphatase und infolgedessen zu einer verstärkten MLC Phosphorylierung, wie sie

auch in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose zu beobachten ist. Interessant wäre die Klärung der Frage, inwieweit auch das Par-4 Protein ein Substrat für die ROCK darstellt, und ob Par-4 ebenso zur Inhibition der Myosin Phosphatase beiträgt. Die Identifizierung der Mechanismen, die von der Phosphorylierung des Threonin 155 im Par-4 Protein zur MLC Phosphorylierung und zur Apoptoseinduktion führen, stellen somit sehr interessante und notwendige zukünftige Forschungsziele in der Aufklärung der Par-4-vermittelten Apoptose dar.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Auf der Suche nach neuen Par-4 Interaktionspartnern, die möglicherweise an den bisher nur unvollständig aufgeklärten Mechanismen der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose beteiligt sind, wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems der neue Par-4 Interaktionspartner Amida isoliert und eingehend charakterisiert. Die Interaktion beider Proteine konnte mittels GST-Pulldown- und Koimmunpräzipitationsversuchen verifiziert werden und der Leucin-Zipper von Par-4 sowie der C-Terminus des Amida Proteins wurden als Interaktionsdomänen identifiziert. Die Expression des Amida Proteins in Rattenfibroblasten zeigte eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation und eine Akkumulation in PML-NBs. Amida war in Heterokaryons zu einer nukleo-zytoplasmatischen Translokation fähig und eine potentielle NES-Sequenz konnte im Ratten Amida Protein identifiziert werden. Die Koexpression von Par-4 und Amida in Rattenfibroblasten führte zu einer Relokalisation des kernständigen Amida an zytoplasmatische Aktinfilamente, einer Kolokalisation mit Par-4 und zu einer effizienten Apoptoseinduktion. Dabei erwies sich sowohl die Aktinbindung des Par-4 Proteins als auch die Komplexbildung von Amida und Par-4 als essentiell für die Rekrutierung des Amida Proteins an Aktinfilamente und die Apoptoseinduktion, ähnlich wie es auch schon für die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose gezeigt werden konnte. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse führen somit zu der Vermutung, dass es sich bei der Par-4-vermittelten Rekrutierung von pro-apoptischen Effektormolekülen an das Aktin-Zytoskelett um einen neuen generellen Mechanismus der Par-4-induzierten Apoptose handelt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Par-4 Phosphorylierung für die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose näher untersucht. Es zeigte sich, dass das Par-4 Protein sowohl ein Substrat für die Dlk als auch für die PKA darstellt, das von der Dlk an Serin- und Threoninresten, von der PKA jedoch ausschließlich an Serinresten phosphoryliert wird. Zur Identifizierung der Dlk Phosphorylierungsstellen im Par-4 Protein wurden verschiedene Par-4 Phosphorylierungsmutanten hergestellt und in *in vitro* Phosphorylierungs- und Koexpressionsstudien untersucht und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure T155 im Par-4 Protein bevorzugt von der Dlk phosphoryliert wird, und dass eine Phosphorylierung des Par-4 Proteins an der Aminosäure Threonin 155 essentiell ist für die Einleitung der Par-4/Dlk- und auch für die Par-4/Amida-vermittelte Apoptose. Die Phosphorylierung durch die Dlk sowie die Apoptoseinduktion treten dabei *in vivo* unabhängig von der PKA-Aktivität auf.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Afanas'ev, V. N., Korol, B. A., Mantsygin, YuA, Nelipovich, P. A., Pechatnikov, V. A., and Umansky, S. R. (1986). Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. *FEBS Lett.* **194**, 347-350.
- Ailenberg, M. and Silverman, M. (2003). Cytochalasin D disruption of actin filaments in 3T3 cells produces an anti-apoptotic response by activating gelatinase A extracellularly and initiating intracellular survival signals. *Biochim.Biophys.Acta* **1593**, 249-258.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.
- Bando, M., Miyake, Y., Shiina, M., Wachi, M., Nagai, K., and Kataoka, T. (2002). Actin cytoskeleton is required for early apoptosis signaling induced by anti-Fas antibody but not Fas ligand in murine B lymphoma A20 cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **290**, 268-274.
- Barkett, M. and Gilmore, T. D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6910-6924.
- Barradas, M., Monjas, A., Diaz-Meco, M. T., Serrano, M., and Moscat, J. (1999). The downregulation of the pro-apoptotic protein Par-4 is critical for Ras-induced survival and tumor progression. *EMBO J.* **18**, 6362-6369.
- Bergmann, M., Kukoc-Zivojnov, N., Chow, K. U., Trepohl, B., Hoelzer, D., Weidmann, E., Mitrou, P. S., and Boehrer, S. (2004). Prostate apoptosis response gene-4 sensitizes neoplastic lymphocytes to CD95-induced apoptosis. *Ann.Hematol.* **83**, 646-653.
- Berra, E., Municio, M. M., Sanz, L., Frutos, S., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (1997). Positioning atypical protein kinase C isoforms in the UV-induced apoptotic signaling cascade. *Mol.Cell Biol.* **17**, 4346-4354.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Boehrer, S., Chow, K. U., Puccetti, E., Ruthardt, M., Godziszard, S., Krapohl, A., Schneider, B., Hoelzer, D., Mitrou, P. S., Rangnekar, V. M., and Weidmann, E. (2001). Deregulated expression of prostate apoptosis response gene-4 in less differentiated lymphocytes and inverse expressional patterns of par-4 and bcl-2 in acute lymphocytic leukemia. **2**, 103-107.
- Boehrer, S., Chow, K. U., Beske, F., Kukoc-Zivojnov, N., Puccetti, E., Ruthardt, M., Baum, C., Rangnekar, V. M., Hoelzer, D., Mitrou, P. S., and Weidmann, E. (2002). In lymphatic cells par-4 sensitizes to apoptosis by down-regulating bcl-2 and promoting disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation. *Cancer Res.* **62**, 1768-1775.
- Boghaert, E. R., Sells, S. F., Walid, A. J., Malone, P., Williams, N. M., Weinstein, M. H., Strange, R., and Rangnekar, V. M. (1997). Immunohistochemical analysis of the proapoptotic protein Par-4 in normal rat tissues. *Cell Growth Differ.* **8**, 881-890.

- Boosen, M. 2001. Erzeugung und Charakterisierung von GFP-Par-4-Fusionskonstrukten und von Par-4 Phosphorylierungsmutanten. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Boosen, M., Vetterkind, S., Koplin, A., Illenberger, S., and Preuss, U. (2005). Par-4-mediated recruitment of Amida to the actin cytoskeleton leads to the induction of apoptosis. *Exp.Cell Res.* **311**, 177-191.
- Bouillet, P. and Strasser, A. (2002). BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J.Cell Sci.* **115**, 1567-1574.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
- Breeden, L. and Nasmyth, K. (1985). Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **643-50.**, 643-650.
- Burch, L. R., Scott, M., Pohler, E., Meek, D., and Hupp, T. (2004). Phage-peptide display identifies the interferon-responsive, death-activated protein kinase family as a novel modifier of MDM2 and p21WAF1. *J.Mol.Biol.* **337**, 115-128.
- Camandola, S. and Mattson, M. P. (2000). Pro-apoptotic action of PAR-4 involves inhibition of NF-kappaB activity and suppression of BCL-2 expression. *J.Neurosci.Res.* **61**, 134-139.
- Cande, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* **84**, 215-222.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **72**, 3666-3670.
- Chakraborty, M., Qiu, S. G., Vasudevan, K. M., and Rangnekar, V. M. (2001). Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res.* **61**, 7255-7263.
- Chang, S., Kim, J. H., and Shin, J. (2002). p62 forms a ternary complex with PKCzeta and PAR-4 and antagonizes PAR-4-induced PKCzeta inhibition. *FEBS Lett.* **510**, 57-61.
- Chau, B. N. and Wang, J. Y. (2003). Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat.Rev.Cancer* **3**, 130-138.
- Cheema, S. K., Mishra, S. K., Rangnekar, V. M., Tari, A. M., Kumar, R., and Lopez-Berestein, G. (2003). Par-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter. *J.Biol.Chem.* **278**, 19995-20005.
- Cohen, O., Feinstein, E., and Kimchi, A. (1997). DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J* **16**, 998-1008.

- Cohen, O. and Kimchi, A. (2001). DAP-kinase: from functional gene cloning to establishment of its role in apoptosis and cancer. *Cell Death.Differ.* **8**, 6-15.
- Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat.Cell Biol.* **3**, 339-345.
- Cook, J., Krishnan, S., Ananth, S., Sells, S. F., Shi, Y., Walther, M. M., Linehan, W. M., Sukhatme, V. P., Weinstein, M. H., and Rangnekar, V. M. (1999). Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. *Oncogene* **18**, 1205-1208.
- Cotter, T. G., Lennon, S. V., Glynn, J. M., and Green, D. R. (1992). Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res.* **52**, 997-1005.
- Croft, D. R., Coleman, M. L., Li, S., Robertson, D., Sullivan, T., Stewart, C. L., and Olson, M. F. (2005). Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J.Cell Biol.* **168**, 245-255.
- D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., Piaggio, G., Fanciulli, M., Appella, E., and Soddu, S. (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat.Cell Biol.* **4**, 11-19.
- de Thé, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* **66**, 675-684.
- Desagher, S. and Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **10**, 369-377.
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-304.
- Deveraux, Q. L., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1999). Endogenous inhibitors of caspases. *J.Clin.Immunol.* **19**, 388-398.
- Deveraux, Q. L. and Reed, J. C. (1999). IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* **13**, 239-252.
- Diaz-Meco, M. T., Municio, M. M., Frutos, S., Sanchez, P., Lozano, J., Sanz, L., and Moscat, J. (1996). The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* **86**, 777-786.
- Eckhart, L., Declercq, W., Ban, J., Rendl, M., Lengauer, B., Mayer, C., Lippens, S., Vandenabeele, P., and Tschachler, E. (2000). Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J.Invest Dermatol.* **115**, 1148-1151.
- El-Guendy, N. and Rangnekar, V. M. (2003a). Apoptosis by Par-4 in cancer and neurodegenerative diseases. *Exp.Cell Res.* **283**, 51-66.

- El-Guendy, N., Zhao, Y., Gurumurthy, S., Burikhanov, R., and Rangnekar, V. M. (2003b). Identification of a unique core domain of par-4 sufficient for selective apoptosis induction in cancer cells. *Mol.Cell Biol.* **23**, 5516-5525.
- Endo, A., Surks, H. K., Mochizuki, S., Mochizuki, N., and Mendelsohn, M. E. (2004). Identification and characterization of zipper-interacting protein kinase as the unique vascular smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *J.Biol.Chem.* **279**, 42055-42061.
- Engemann, H., Heinzl, V., Page, G., Preuss, U., and Scheidtmann, K. H. (2002). DAP-like kinase interacts with the rat homolog of *Schizosaccharomyces pombe* CDC5 protein, a factor involved in pre-mRNA splicing and required for G2/M phase transition. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1408-1417.
- Engidawork, E., Gulesserian, T., Yoo, B. C., Cairns, N., and Lubec, G. (2001). Alteration of caspases and apoptosis-related proteins in brains of patients with Alzheimer's disease. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **281**, 84-93.
- Feinstein, E., Kimchi, A., Wallach, D., Boldin, M., and Varfolomeev, E. (1995). The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem.Sci.* **20**, 342-344.
- Feng, J., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D. J., and Nakano, T. (1999). Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J.Biol.Chem.* **274**, 37385-37390.
- Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051-1060.
- Fu, X. D. and Maniatis, T. (1990). Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature* **343**, 437-441.
- Fukata, Y., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2001). Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol.Sci.* **22**, 32-39.
- Gan, Y., Taira, E., Irie, Y., Tanaka, H., Ichikawa, H., Kumamaru, E., and Miki, N. (2001). Amida predominantly expressed and developmentally regulated in rat testis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **288**, 407-412.
- Gan, Y., Taira, E., Irie, Y., Fujimoto, T., and Miki, N. (2003). Arrest of cell cycle by amida which is phosphorylated by Cdc2 kinase. *Mol.Cell Biochem.* **246**, 179-185.
- Gao, S., Wang, H., Lee, P., Melamed, J., Li, C. X., Zhang, F., Wu, H., Zhou, L., and Wang, Z. (2006). Androgen receptor and prostate apoptosis response factor-4 target the c-FLIP gene to determine survival and apoptosis in the prostate gland. *J.Mol.Endocrinol.* **36**, 463-483.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1425.

- Golstein, P., Ojcius, D. M., and Young, J. D. (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol.Rev.* **121**, 29-65.
- Goswami, A., Burikhanov, R., de Thonel, A., Fujita, N., Goswami, M., Zhao, Y., Eriksson, J. E., Tsuruo, T., and Rangnekar, V. M. (2005). Binding and phosphorylation of par-4 by akt is essential for cancer cell survival. *Mol.Cell* **20**, 33-44.
- Gougeon, M. L. (1997). Programmed cell death in HIV infection: dysregulation of BCL-2 and Fas pathways and contribution to AIDS pathogenesis. *Psychoneuroendocrinology* **22**, 33-39.
- Gourlay, C. W. and Ayscough, K. R. (2005). Identification of an upstream regulatory pathway controlling actin-mediated apoptosis in yeast. *J.Cell Sci.* **118**, 2119-2132.
- Granville, D. J. and Gottlieb, R. A. (2002). Mitochondria: regulators of cell death and survival. *ScientificWorldJournal.* **2**, 1569-1578.
- Graves, P. R., Winkfield, K. M., and Haystead, T. A. (2005). Regulation of zipper-interacting protein kinase activity in vitro and in vivo by multisite phosphorylation. *J.Biol.Chem.* **280**, 9363-9374.
- Green, D. R. (1998). Apoptotic pathways: roads to ruin. *Cell* **94**, 695-698.
- Green, D. R. and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W., and Paolo, Pandolfi P. (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat.Cell Biol.* **2**, 730-736.
- Guo, Q., Fu, W., Xie, J., Luo, H., Sells, S. F., Geddes, J. W., Bondada, V., Rangnekar, V. M., and Mattson, M. P. (1998). Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nat.Med.* **4**, 957-962.
- Guo, Q. and Xie, J. (2004). AATF inhibits aberrant production of amyloid beta peptide 1-42 by interacting directly with Par-4. *J.Biol.Chem.* **279**, 4596-4603.
- Gurumurthy, S., Goswami, A., Vasudevan, K. M., and Rangnekar, V. M. (2005). Phosphorylation of Par-4 by protein kinase A is critical for apoptosis. *Mol.Cell Biol.* **25**, 1146-1161.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harms, C., Bosel, J., Lautenschlager, M., Harms, U., Braun, J. S., Hortnagl, H., Dirnagl, U., Kwiatkowski, D. J., Fink, K., and Endres, M. (2004). Neuronal gelsolin prevents apoptosis by enhancing actin depolymerization. *Mol.Cell Neurosci.* **25**, 69-82.
- Hayakawa, F. and Privalsky, M. L. (2004). Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis. *Cancer Cell* **5**, 389-401.
- Hitomi, J., Katayama, T., Taniguchi, M., Honda, A., Imaizumi, K., and Tohyama, M. (2004). Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neurosci.Lett.* **357**, 127-130.

- Ho, J. and Bretscher, A. (2001). Ras regulates the polarity of the yeast actin cytoskeleton through the stress response pathway. *Mol.Biol.Cell* **12**, 1541-1555.
- Huang, D. C. and Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* **103**, 839-842.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-236.
- Huot, J., Houle, F., Rousseau, S., Deschesnes, R. G., Shah, G. M., and Landry, J. (1998). SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J Cell Biol.* **143**, 1361-1373.
- Igney, F. H. and Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat.Rev.Cancer* **2**, 277-288.
- Imaizumi, K., Miyoshi, K., Katayama, T., Yoneda, T., Taniguchi, M., Kudo, T., and Tohyama, M. (2001). The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochim.Biophys.Acta* **1536**, 85-96.
- Irie, Y., Yamagata, K., Gan, Y., Miyamoto, K., Do, E., Kuo, C. H., Taira, E., and Miki, N. (2000). Molecular cloning and characterization of Amida, a novel protein which interacts with a neuron-specific immediate early gene product arc, contains novel nuclear localization signals, and causes cell death in cultured cells. *J.Biol.Chem.* **275**, 2647-2653.
- Jellinger, K. A. (2001). Cell death mechanisms in neurodegeneration. *J.Cell Mol.Med.* **5**, 1-17.
- Johnstone, R. W., See, R. H., Sells, S. F., Wang, J., Muthukkumar, S., Englert, C., Haber, D. A., Licht, J. D., Sugrue, S. P., Roberts, T., Rangnekar, V. M., and Shi, Y. (1996). A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Mol.Cell Biol.* **16**, 6945-6956.
- Kawai, T., Matsumoto, M., Takeda, K., Sanjo, H., and Akira, S. (1998). ZIP kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Mol Cell Biol* **18**, 1642-1651.
- Kawai, T., Akira, S., and Reed, J. C. (2003). ZIP kinase triggers apoptosis from nuclear PML oncogenic domains. *Mol.Cell Biol.* **23**, 6174-6186.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J Cancer* **26**, 239-257.
- Kerr, J. F. and Harmon, B. V. (1991). Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death. New York, Cold Spring Harbor Laboratory press* 5-29.
- Komatsu, S. and Ikebe, M. (2004). ZIP kinase is responsible for the phosphorylation of myosin II and necessary for cell motility in mammalian fibroblasts. *J.Cell Biol.* **165**, 243-254.
- Koplin, A. 2004. Molekulare und Biochemische Untersuchungen zur Funktion eines neuen Thioredoxin-ähnlichen Proteins. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

- Koya, R. C., Fujita, H., Shimizu, S., Ohtsu, M., Takimoto, M., Tsujimoto, Y., and Kuzumaki, N. (2000). Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *J.Biol.Chem.* **275**, 15343-15349.
- Kögel, D., Plöttner, O., Landsberg, G., Christian, S., and Scheidtmann, K. H. (1998). Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones. *Oncogene* **17**, 2645-2654.
- Kögel, D., Prehn, J. H., and Scheidtmann, K. H. (2001). The DAP kinase family of pro-apoptotic proteins: novel players in the apoptotic game. *Bioessays* **23**, 352-358.
- Krammer, P. H. (1999). CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv.Immunol.* **71**, 163-210.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., and Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu.Rev.Physiol* **60**, 619-642.
- Kubicek, J. 2005. Untersuchungen zur Funktion und Kristallisation von heterolog exprimiertem Par-4, Amida und DLK. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Kulms, D., Düßmann, H., Pöppelmann, B., Ständer, S., Schwarz, A., and Schwarz, T. (2002). Apoptosis induced by disruption of the actin cytoskeleton is mediated via activation of CD95 (Fas/APO-1). *Cell Death.Differ.* **9**, 598-608.
- Kuo, J. C., Lin, J. R., Staddon, J. M., Hosoya, H., and Chen, R. H. (2003). Uncoordinated regulation of stress fibers and focal adhesions by DAP kinase. *J.Cell Sci.* **116**, 4777-4790.
- Kwiatkowski, D. J. (1999). Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**, 103-108.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, J. M., Hsieh, C. L., and Chang, Z. F. (2003). Caspase activation during phorbol ester-induced apoptosis requires ROCK-dependent myosin-mediated contraction. *J.Cell Sci.* **116**, 3491-3501.
- Lehembre, F., Müller, S., Pandolfi, P. P., and Dejean, A. (2001). Regulation of Pax3 transcriptional activity by SUMO-1-modified PML. *Oncogene* **20**, 1-9.
- Leroy, I., de Thonel, A., Laurent, G., and Quillet-Mary, A. (2005). Protein kinase C zeta associates with death inducing signaling complex and regulates Fas ligand-induced apoptosis. *Cell Signal.* **17**, 1149-1157.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.
- Li, H. and Yuan, J. (1999). Deciphering the pathways of life and death. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**, 261-266.

- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E. J., and Chen, J. D. (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol.Cell Biol.* **20**, 1784-1796.
- Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.
- Lucas, T., Pratscher, B., Krishnan, S., Fink, D., Gunsberg, P., Wolschek, M., Wacheck, V., Muster, T., Romirer, I., Wolff, K., Pehamberger, H., Eichler, H. G., Rangnekar, V. M., and Jansen, B. (2001). Differential expression levels of Par-4 in melanoma. *Melanoma Res.* **11**, 379-383.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490.
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lanahan, A. A., and Worley, P. F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**, 433-445.
- MacDonald, J. A., Borman, M. A., Muranyi, A., Somlyo, A. V., Hartshorne, D. J., and Haystead, T. A. (2001). Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 2419-2424.
- Majno, G. and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am.J.Pathol.* **146**, 3-15.
- Martinou, J. C. and Green, D. R. (2001). Breaking the mitochondrial barrier. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 63-67.
- Mattaj, I. W. and Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu.Rev.Biochem.* **67**, 265-306.
- Mattson, M. P., Duan, W., Chan, S. L., and Camandola, S. (1999). Par-4: an emerging pivotal player in neuronal apoptosis and neurodegenerative disorders. *J.Mol.Neurosci.* **13**, 17-30.
- McCarthy, N., Mercer, J., and Bennett, M. (2001). Apoptotic proteins. p53 and c-myc related pathways. *Cardiol.Clin.* **19**, 75-89, viii.
- Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J., and Pittman, R. N. (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol.* **140**, 627-636.
- Mills, J. C., Stone, N. L., and Pittman, R. N. (1999). Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase. *J.Cell Biol.* **146**, 703-708.
- Moreno, S. and Nurse, P. (1990). Substrates for p34cdc2: in vivo veritas? *Cell* **61**, 549-551.
- Moscat, J. and Diaz-Meco, M. T. (2003). Par-4 keeps the atypical PKCs at bay. *Cell Cycle* **2**, 71-72.

- Murata-Hori, M., Fumoto, K., Fukuta, Y., Iwasaki, T., Kikuchi, A., Tatsuka, M., and Hosoya, H. (2000). Myosin II regulatory light chain as a novel substrate for AIM-1, an aurora/Ipl1p-related kinase from rat. *J.Biochem.(Tokyo)* **128**, 903-907.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103.
- Nakagawa, T. and Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J.Cell Biol.* **150**, 887-894.
- Nakielnny, S. and Dreyfuss, G. (1996). The hnRNP C proteins contain a nuclear retention sequence that can override nuclear export signals. *J.Cell Biol.* **134**, 1365-1373.
- Nalca, A., Qiu, S. G., el Guendy, N., Krishnan, S., and Rangnekar, V. M. (1999). Oncogenic Ras sensitizes cells to apoptosis by Par-4. *J.Biol.Chem.* **274**, 29976-29983.
- Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem.Sci.* **22**, 299-306.
- Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**, 503-508.
- Odaka, C., Sanders, M. L., and Crews, P. (2000). Jasplakinolide induces apoptosis in various transformed cell lines by a caspase-3-like protease-dependent pathway. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **7**, 947-952.
- Ohtsu, M., Sakai, N., Fujita, H., Kashiwagi, M., Gasa, S., Shimizu, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Sakiyama, Y., Kobayashi, K., and Kuzumaki, N. (1997). Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin. *EMBO J.* **16**, 4650-4656.
- Page, G., Kögel, D., Rangnekar, V., and Scheidtmann, K. H. (1999). Interaction partners of Dlk/ZIP kinase: co-expression of Dlk/ZIP kinase and Par-4 results in cytoplasmic retention and apoptosis. *Oncogene* **18**, 7265-7273.
- Page, G., Lödige, I., Kögel, D., and Scheidtmann, K. H. (1999). AATF, a novel transcription factor that interacts with Dlk/ZIP kinase and interferes with apoptosis. *FEBS Lett.* **462**, 187-191.
- Park, S. K., Nguyen, M. D., Fischer, A., Luke, M. P., Affar, el B., Dieffenbach, P. B., Tseng, H. C., Shi, Y., and Tsai, L. H. (2005). Par-4 links dopamine signaling and depression. *Cell* **122**, 275-287.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., and Pelicci, P. G. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* **406**, 207-210.
- Perkins, N. D. (2000). The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem.Sci.* **25**, 434-440.
- Petrache, I., Birukov, K., Zaiman, A. L., Crow, M. T., Deng, H., Wadgaonkar, R., Romer, L. H., and Garcia, J. G. (2003). Caspase-dependent cleavage of myosin light chain kinase

- (MLCK) is involved in TNF-alpha-mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *FASEB J.* **17**, 407-416.
- Pines, J. (1995). GFP in mammalian cells. *Trends Genet.* **11**, 326-327.
- Pinol-Roma, S. and Dreyfuss, G. (1992). Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* **355**, 730-732.
- Posey, S. C. and Bierer, B. E. (1999). Actin stabilization by jasplakinolide enhances apoptosis induced by cytokine deprivation. *J.Biol.Chem.* **274**, 4259-4265.
- Preuss, U., Landsberg, G., and Scheidtmann, K. H. (2003a). Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res.* **31**, 878-885.
- Preuss, U., Bierbaum, H., Buchenau, P., and Scheidtmann, K. H. (2003b). DAP-like kinase, a member of the death-associated protein kinase family, associates with centrosomes, centromeres, and the contractile ring during mitosis. *Eur.J.Cell Biol.* **82**, 447-459.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C., and Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**, 1829-1832.
- Qiu, G., Ahmed, M., Sells, S. F., Mohiuddin, M., Weinstein, M. H., and Rangnekar, V. M. (1999a). Mutually exclusive expression patterns of Bcl-2 and Par-4 in human prostate tumors consistent with down-regulation of Bcl-2 by Par-4. *Oncogene* **18**, 623-631.
- Qiu, S. G., Krishnan, S., el Guendy, N., and Rangnekar, V. M. (1999b). Negative regulation of Par-4 by oncogenic Ras is essential for cellular transformation. *Oncogene* **18**, 7115-7123.
- Rangnekar, V. M. (1998). Apoptosis mediated by a novel leucine zipper protein Par-4. *Apoptosis* **3**, 61-66.
- Reed, J. C., Zha, H., Aime-Sempe, C., Takayama, S., and Wang, H. G. (1996). Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv.Exp.Med.Biol.* **406**, 99-112.
- Reed, J. C., Jurgensmeier, J. M., and Matsuyama, S. (1998). Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta* **1366**, 127-137.
- Reed, J. C. (1998). Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**, 3225-3236.
- Reed, J. C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *Am.J.Pathol.* **157**, 1415-1430.
- Richard, D. J., Schumacher, V., Royer-Pokora, B., and Roberts, S. G. (2001). Par4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1. *Genes Dev.* **15**, 328-339.
- Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., Thornberry, N. A., and Becker, J. W.

- (1996). The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat.Struct.Biol.* **3**, 619-625.
- Roussigne, M., Cayrol, C., Clouaire, T., Amalric, F., and Girard, J. P. (2003). THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies. *Oncogene* **22**, 2432-2442.
- Rubtsova, S. N., Kondratov, R. V., Kopnin, P. B., Chumakov, P. M., Kopnin, B. P., and Vasiliev, J. M. (1998). Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53. *FEBS Lett.* **430**, 353-357.
- Salomoni, P. and Pandolfi, P. P. (2002). The role of PML in tumor suppression. *Cell* **108**, 165-170.
- Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**, 443-446.
- Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 10964-10967.
- Salvesen, G. S. (2002). Caspases and apoptosis. *Essays Biochem.* **38**, 9-19.
- Salvesen, G. S. and Ratus, M. (2002). Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev.Cell* **2**, 256-257.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour, New York.
- Scheidtmann, K. H., Echle, B., and Walter, G. (1982). Simian virus 40 large T antigen is phosphorylated at multiple sites clustered in two separate regions. *J Virol.* **44**, 116-133.
- Schneider, P., Bodmer, J. L., Holler, N., Mattmann, C., Scuderi, P., Terskikh, A., Peitsch, M. C., and Tschopp, J. (1997). Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction. *J.Biol.Chem.* **272**, 18827-18833.
- Scholten, J. 2004. Molekulargenetische und Zellbiologische Untersuchungen des Par-4 Interaktionspartners Amida. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Seeler, J. S. and Dejean, A. (1999). The PML nuclear bodies: actors or extras? *Curr.Opin.Genet.Dev.* **9**, 362-367.
- Sells, S. F., Wood, D. P., Jr., Joshi-Barve, S. S., Muthukumar, S., Jacob, R. J., Crist, S. A., Humphreys, S., and Rangnekar, V. M. (1994). Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Cell Growth Differ.* **5**, 457-466.
- Sells, S. F., Han, S. S., Muthukkumar, S., Maddiwar, N., Johnstone, R., Boghaert, E., Gillis, D., Liu, G., Nair, P., Monnig, S., Collini, P., Mattson, M. P., Sukhatme, V. P., Zimmer, S. G., Wood, D. P., McRoberts, J. W., Shi, Y., and Rangnekar, V. M. (1997). Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. *Mol Cell Biol* **17**, 3823-3832.

- Shohat, G., Shani, G., Eisenstein, M., and Kimchi, A. (2002). The DAP-kinase family of proteins: study of a novel group of calcium-regulated death-promoting kinases. *Biochim.Biophys.Acta* **1600**, 45-50.
- Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A., and Huse, W. D. (1988). Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* **16**, 7583-7600.
- Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death.Differ.* **6**, 1067-1074.
- Stefanis, L., Burke, R. E., and Greene, L. A. (1997). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Curr.Opin.Neurol.* **10**, 299-305.
- Stroh, C. and Schulze-Osthoff, K. (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death.Differ.* **5**, 997-1000.
- Stuurman, N., de Graaf, A., Floore, A., Josso, A., Humbel, B., de Jong, L., and van Driel, R. (1992). A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. *J.Cell Sci.* **101**, 773-784.
- Suarez-Huerta, N., Mosselmans, R., Dumont, J. E., and Robaye, B. (2000). Actin depolymerization and polymerization are required during apoptosis in endothelial cells. *J.Cell Physiol* **184**, 239-245.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.
- Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T., and Nicholson, D. W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J.Biol.Chem.* **272**, 17907-17911.
- Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Tortora, G. and Ciardiello, F. (2002). Protein kinase A as target for novel integrated strategies of cancer therapy. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **968**, 139-147.
- Vajjhala, P. R., Macmillan, E., Gonda, T., and Little, M. (2003). The Wilms' tumour suppressor protein, WT1, undergoes CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling. *FEBS Lett.* **554**, 143-148.
- Velasco, G., Armstrong, C., Morrice, N., Frame, S., and Cohen, P. (2002). Phosphorylation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. *FEBS Lett.* **527**, 101-104.
- Vetterkind, S. 2003. Untersuchungen zur Beteiligung Aktin-assoziiierter Proteine an intrazellulären Signalwegen. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

- Vetterkind, S., Illenberger, S., Kubicek, J., Boosen, M., Scheidtmann, K. H., and Preuss, U. (2005a). Binding of Par-4 to the actin cytoskeleton is essential for its proapoptotic function. *Exp.Cell Res.* **305**, 392-408.
- Vetterkind, S., Boosen, M., Scheidtmann, K. H., and Preuss, U. (2005b). Ectopic expression of Par-4 leads to induction of apoptosis in CNS tumor cell lines. *Int.J.Oncol.* **26**, 159-167.
- Wang, Z. G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R., and Pandolfi, P. P. (1998a). PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat.Genet.* **20**, 266-272.
- Wang, Z. G., Delva, L., Gaboli, M., Rivi, R., Giorgio, M., Cordon-Cardo, C., Grosveld, F., and Pandolfi, P. P. (1998b). Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science* **279**, 1547-1551.
- White, S. R., Williams, P., Wojcik, K. R., Sun, S., Hiemstra, P. S., Rabe, K. F., and Dorscheid, D. R. (2001). Initiation of apoptosis by actin cytoskeletal derangement in human airway epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **24**, 282-294.
- Whitmarsh, A. J. and Davis, R. J. (2000). Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol.Life Sci.* **57**, 1172-1183.
- Wilson, K. P., Black, J. A., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., and . (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**, 270-275.
- Wooldridge, A. A., MacDonald, J. A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M. A., Hartshorne, D. J., and Haystead, T. A. (2004). Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J.Biol.Chem.* **279**, 34496-34504.
- Wulf, E., Deboben, A., Bautz, F. A., Faulstich, H., and Wieland, T. (1979). Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 4498-4502.
- Xie, J. and Guo, Q. (2004). Par-4 inhibits choline uptake by interacting with CHT1 and reducing its incorporation on the plasma membrane. *J.Biol.Chem.* **279**, 28266-28275.
- Yamazaki, Y., Tsuruga, M., Zhou, D., Fujita, Y., Shang, X., Dang, Y., Kawasaki, K., and Oka, S. (2000). Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. *Exp.Cell Res.* **259**, 64-78.
- Zamzami, N. and Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2**, 67-71.
- Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D., and Pandolfi, P. P. (2000). Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J.Exp.Med.* **191**, 631-640.
- Zhu, J., Koken, M. H., Quignon, F., Chelbi-Alix, M. K., Degos, L., Wang, Z. Y., Chen, Z., and de The, H. (1997). Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 3978-3983.

Zörnig, M., Hueber, A., Baum, W., and Evan, G. (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim.Biophys.Acta* **1551**, 1-37.

Konferenzteilnahmen/ Posterpräsentationen

Boosen M, Vetterkind S, Koplín A, Illenberger S and Preuss U. Par-4-mediated recruitment of Amida to the actin cytoskeleton leads to the induction of apoptosis. (Poster Präsentation). Cell signaling world 2006, Conference Center Luxembourg.

Boosen M, Vetterkind S, Koplín A, Illenberger S and Preuss U. (2005). Par-4-mediated recruitment of Amida to the actin cytoskeleton leads to the induction of apoptosis. (Poster Präsentation). American Society for Cell Biology (ASCB) Meeting 2005, San Francisco.

Luxembourg Apoptosis Meeting 2003, Conference Center Luxembourg.

Eigene Publikationen

Vetterkind S, Appel S, Koplín A, Maertens B, **Boosen M** and Preuss U. EFP1 is an ER stress-induced glycoprotein which interacts with the pro-apoptotic protein Par-4. Manuskript in Vorbereitung.

Boosen M, Vetterkind S, Kubicek J, Scheidtmann KH and Preuss U. Phosphorylation of Par-4 at threonine 155 is essential for Par-4/Dlk-mediated apoptosis. Manuskript in Vorbereitung.

Boosen M, Vetterkind S, Koplín A, Illenberger S and Preuss U. (2005). Par-4-mediated recruitment of Amida to the actin cytoskeleton leads to the induction of apoptosis. *Exp Cell Res.* 311:177-91.

Vetterkind S, Illenberger S, Kubicek J, **Boosen M**, Appel S, Naim H, Scheidtmann KH and Preuss U. (2005). Binding of Par-4 to the actin cytoskeleton is essential for Par-4/Dlk-mediated apoptosis. *Exp Cell Res.* 305:392-408.

Vetterkind S, **Boosen M**, Scheidtmann KH and Preuss U. (2005). Ectopic expression of Par-4 leads to induction of apoptosis in CNS tumor cell lines. *Int J Oncol.* 26:159-67.