

# **Untersuchungen des pro-apoptischen Proteins Par-4 und seiner Interaktionspartner Dlk, Amida und EFP1**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Sarah Appel**

aus

Leverkusen

Bonn im Mai 2007

Die vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Genetik unter der Leitung von PD Dr. Ute Preuß angefertigt.

Diese Arbeit ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

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

Tag der Promotion: 24.08.2007

Erscheinungsjahr: 2007

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

|   |            |
|---|------------|
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>  | <b>VII</b> |
| <b>Allgemeine Abkürzungen</b>   | <b>VII</b> |
| <b>Abkürzungen für Aminosäuren</b>                                      | <b>XI</b>  |
| <b>1. EINLEITUNG</b>  | <b>1</b>   |
| <b>1.1 Apoptose, eine Form des programmierten Zelltods</b>              | <b>1</b>   |
| 1.1.1 Ablauf der Apoptose   | 1          |
| 1.1.2 Auslösung und Regulation der Apoptose                             | 2          |
| 1.1.3 ER-Stress vermittelte Apoptose                                    | 5          |
| <b>1.2 Das pro-apoptotische Protein Par-4</b>                           | <b>6</b>   |
| <b>1.3 Die Interaktionspartner des pro-apoptotischen Proteins Par-4</b> | <b>8</b>   |
| 1.3.1 Die nukleäre Serin/Threonin-Kinase Dlk                            | 9          |
| 1.3.2 Das pro-apoptotische Protein Amida                                | 10         |
| 1.3.3 Das Thioredoxin-ähnliche Protein EFP1                             | 12         |
| <b>1.4 Zielsetzung der Arbeit</b>                                       | <b>13</b>  |
| <b>2. MATERIAL</b>  | <b>14</b>  |
| <b>2.1 Chemikalien und Enzyme</b>                                       | <b>14</b>  |
| <b>2.2 Allgemeine Stammlösungen und Puffer</b>                          | <b>14</b>  |
| <b>2.3 Kultur von Bakterien</b>   | <b>15</b>  |
| 2.3.1 Bakterienstämme   | 15         |
| 2.3.2 Medien für die Bakterienkultur                                    | 16         |
| <b>2.4 Kultur von Säugerzellen</b>                                      | <b>16</b>  |
| 2.4.1 Zelllinien  | 16         |
| 2.4.2 Medien für die Kultur von Säugerzellen                            | 17         |
| 2.4.3 Verwendete Reagenzien in der Zellkultur                           | 18         |
| <b>2.5 Genomische DNA aus primärem Tumorgewebe</b>                      | <b>18</b>  |
| <b>2.6 Plasmide</b>   | <b>21</b>  |
| <b>2.7 Oligonukleotide</b>  | <b>22</b>  |
| <b>2.8 Fluoreszenzmarkierte siRNA-Moleküle</b>                          | <b>23</b>  |
| <b>2.9 Antikörper</b>   | <b>23</b>  |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3. METHODEN</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden</b>                                   | <b>25</b> |
| 3.1.1 Präparation von Nukleinsäuren   | 25        |
| 3.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> nach Birnboim & Doly            | 25        |
| 3.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> durch Affinitätschromatographie | 25        |
| 3.1.1.3 Präparation von Gesamt-RNA mit TRIzol aus Säugerzellen                        | 26        |
| 3.1.1.4 Präparation von genomischer DNA aus Säugerzellen                              | 26        |
| 3.1.2 Enzymatische Behandlung von DNA   | 27        |
| 3.1.2.1 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen                   | 27        |
| 3.1.2.2 Glätten von DNA-Fragmenten mit 5'-Überhängen                                  | 27        |
| 3.1.2.3 Dephosphorylierung von DNA  | 27        |
| 3.1.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten   | 28        |
| 3.1.3 Transformation von Bakterien  | 28        |
| 3.1.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien nach Hanahan (1983)                         | 28        |
| 3.1.3.2 Transformation von Bakterien nach Hanahan (1983)                              | 29        |
| 3.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren                                | 29        |
| 3.1.4.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA in Agarosegelen             | 29        |
| 3.1.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von siRNA-Molekülen                         | 29        |
| 3.1.5 Reinigung, Konzentrierung und Mengenbestimmung von Nukleinsäuren                | 30        |
| 3.1.5.1 Phenol/Chloroform-Aufreinigung von DNA  | 30        |
| 3.1.5.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen                          | 30        |
| 3.1.5.3 Natriumacetat-Fällung von Nukleinsäuren                                       | 30        |
| 3.1.5.4 Konzentrations- und Reinheitsgradbestimmung von Nukleinsäuren                 | 31        |
| 3.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 31        |
| 3.1.7 Umschreiben von RNA in cDNA und RT-PCR  | 32        |
| 3.1.8 Real-Time RT-PCR Analyse  | 33        |
| 3.1.9 Oligonukleotid-Hybridisierung   | 33        |
| <b>3.2 Proteinbiochemische Methoden</b>   | <b>33</b> |
| 3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)                                  | 33        |
| 3.2.2 Western Blot und Immunfärbung   | 34        |
| 3.2.3 Präparation von Gesamtprotein-Zellextrakten                                     | 35        |
| 3.2.4 Immunpräzipitation  | 36        |
| 3.2.5 Entfernung der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide von                    |           |

---

|                      |   |           |
|----------------------|---|-----------|
|                      | Proteinen   | 37        |
| 3.2.6                | Proteinbestimmung nach Bradford   | 37        |
| <b>3.3</b>           | <b>Zellkulturmethoden</b>   | <b>37</b> |
| 3.3.1                | Kultur von Säugerzellen   | 37        |
| 3.3.2                | Transiente Transfektion von Säugerzellen mit DNA oder RNA                               | 38        |
| 3.3.3                | Herstellung stabil transfizierter Zelllinien  | 39        |
| <b>3.4</b>           | <b>Fluoreszenzmikroskopische Analysen</b>   | <b>39</b> |
| 3.4.1                | Ausplattieren und Fixieren von Säugerzellen für die Fluoreszenz-<br>mikroskopie         | 39        |
| 3.4.2                | Kernfärbung mit DAPI  | 39        |
| 3.4.3                | Immunfluoreszenzfärbung   | 39        |
| 3.4.4                | Einbetten von fixierten Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie                           | 40        |
| 3.4.5                | Fluoreszenzmikroskopische Analyse   | 40        |
| <b>3.5</b>           | <b>Methoden zum Nachweis der Apoptose</b>   | <b>40</b> |
| 3.5.1                | Bestimmung der Apoptoserate anhand morphologischer Merkmale                             | 40        |
| 3.5.2                | Nachweis der Caspase-3 Spaltung   | 41        |
| <b>3.6</b>           | <b><i>In vitro</i>-Herstellung von siRNA</b>  | <b>41</b> |
| 3.6.1                | <i>In vitro</i> -Transkription, Hybridisierung und Aufreinigung von RNA                 | 41        |
| 3.6.2                | <i>DICER</i> -Verdau und Aufreinigung der siRNA-Moleküle                                | 42        |
| <b>3.7</b>           | <b>Untersuchung von <sup>5m</sup>C-DNA-Methylierung</b>                                 | <b>42</b> |
| 3.7.1                | Bisulfit-Modifizierung genomischer DNA nach Frommer (1992)                              | 42        |
| 3.7.2                | Polymerase-Kettenreaktion mit Bisulfit-modifizierter DNA (BS-PCR)                       | 43        |
| 3.7.3                | Herstellung und Aufreinigung von PCR-Produkten für die<br>Sequenzierungs-Reaktion       | 43        |
| 3.7.4                | Sequenzierung der PCR-Produkte  | 44        |
| 3.7.5                | Kombinierte Bisulfit-Restriktionsanalyse (COBRA)  | 45        |
| <b>4. ERGEBNISSE</b> |   | <b>47</b> |
| <hr/>                |   |           |
| <b>4.1</b>           | <b>Etablierung eines Systems zur Inhibition von endogenem Par-4 in<br/>Säugerzellen</b> | <b>47</b> |
| 4.1.1                | Herunterregulation von endogenem Par-4 durch RNA-Interferenz                            | 47        |
| 4.1.1.1              | <i>In vitro</i> -Herstellung von siRNA gegen Par-4 und Dlk sowie von<br>Kontroll-siRNA  | 48        |
| 4.1.1.2              | Funktionelle Überprüfung der <i>in vitro</i> hergestellten siRNA gegen Par-4            | 50        |

---

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 4.1.1.3    | Überprüfung der Funktionalität von Cy3-gekoppelter siRNA gegen humanes Par-4 sowie Par-4 aus der Ratte                               | 51        |
| 4.1.1.4    | Herstellung eines Expressionsplasmids für die <i>in vivo</i> -Herstellung von siRNA-Par-4  | 53        |
| 4.1.1.5    | Herstellung einer stabil siRNA-Par-4 exprimierenden Zelllinie  | 55        |
| 4.1.2      | Inhibition der Par-4-Funktion durch den Einsatz dominant-negativer Par-4-Mutanten  | 57        |
| 4.1.2.1    | Untersuchung der Par-4-Mutante Par-4-T155A als potentiell dominant-negative Mutante in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose           | 58        |
| 4.1.2.2    | Untersuchung von Par-4-Deletionsmutanten als potentiell dominant-negative Mutanten in der Par-4/Dlk-induzierten Apoptose             | 60        |
| 4.1.2.3    | Untersuchung der neuen Par-4-Isoform Par-4/p33 als potentiell dominant-negative Mutante in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose       | 62        |
| <b>4.2</b> | <b>Induktion der endogenen Par-4-Expression durch verschiedene Stimuli</b>   | <b>65</b> |
| 4.2.1      | Induktion der Par-4-Expression auf mRNA-Ebene  | 67        |
| 4.2.2      | Induktion der Par-4-Expression auf Proteinebene  | 69        |
| <b>4.3</b> | <b>Untersuchung der MLC-Phosphorylierung nach der Induktion von endogenem Par-4</b>  | <b>71</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Untersuchung der MLC-Phosphorylierung und der Apoptose-Induktion nach Inhibition von Par-4</b>                                    | <b>74</b> |
| 4.4.1      | Die Inhibition von Par-4 hemmt die durch Ionomycin und Thapsigargin induzierte Apoptose  | 76        |
| <b>4.5</b> | <b>Expressionsstudien und Promotor-Methylierungsanalysen von Par-4 und seinen Interaktionspartnern Dlk/ZIPK, Amida/TFPT und EFP1</b> | <b>79</b> |
| 4.5.1      | Untersuchung des Expressionsstatus von Par-4 und seinen Interaktionspartnern ZIPK, TFPT und EFP1 in humanen Tumorzelllinien          | 80        |
| 4.5.1.1    | Expression von Par-4, ZIPK, TFPT und EFP1 auf mRNA-Ebene   | 81        |
| 4.5.1.2    | Par-4-Expression auf Proteinebene  | 83        |
| 4.5.2      | Expression von Par-4, ZIPK und TFPT auf mRNA-Ebene nach 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung   | 84        |
| 4.5.3      | Methylierungsanalysen des Par-4-, ZIPK- und TFPT-Promotors   | 87        |
| 4.5.3.1    | Methylierungsstatus des Par-4-, ZIPK- und TFPT-Promotors in  |           |

---

|  |            |
|--|------------|
| humanen Tumorzelllinien  | 88         |
| 4.5.3.2 Methylierungsstatus des Par-4- und des TFPT-Promotors sowie mRNA-Expression von Par-4 und TFPT in humanem Gliomgewebe            | 93         |
| 4.5.3.3 Methylierungsstatus des Par-4-Promotors in humanem Prostatakarzinomgewebe  | 102        |
| 4.5.4 Computergestützte Promotoranalyse des <i>tfpt</i> -Gens  | 130        |
| <b>4.6 Das Thioredoxin-ähnliche Protein EFP1, ein neuer Interaktionspartner von Par-4</b>  | <b>104</b> |
| 4.6.1 Charakterisierung der zwei EFP1-Proteinvarianten mit unterschiedlichem Molekulargewicht  | 105        |
| 4.6.1.1 Untersuchung der potentiellen alternativen Startcodons von EFP1  | 105        |
| 4.6.1.2 Untersuchung des N-Glykosylierungsstatus des EFP1-Proteins   | 106        |
| 4.6.2 Untersuchung der EFP1-mRNA-Expression nach der Induktion von ER-Stress   | 110        |
| 4.6.3 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Par-4 und EFP1   | 112        |
| 4.6.3.1 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von Par-4 und EFP1 nach der Induktion von ER-Stress | 112        |
| 4.6.3.2 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Par-4 und EFP1 in apoptotischen Zellen            | 114        |
| 4.6.4 Einfluss von EFP1 auf die Par-4-vermittelte Apoptose   | 115        |
| <b>5. DISKUSSION</b>   | <b>118</b> |
| <b>5.1 Untersuchung zur Par-4-vermittelten Apoptose durch die Inhibition der Par-4-Funktion</b>  | <b>118</b> |
| 5.1.1 Identifizierung dominant-negativer Par-4-Mutanten  | 119        |
| 5.1.2 Die Inhibition von Par-4 durch die siRNA-Technik führt zur Verringerung der MLC-Phosphorylierung trotz Induktion von ER-Stress     | 122        |
| 5.1.3 Die Inhibition von Par-4 beeinträchtigt die Apoptose-Induktion nach der Auslösung von ER-Stress                                    | 124        |
| 5.1.4 Par-4 übt möglicherweise eine stabilisierende Funktion auf das Aktin-Zytoskelett aus   | 125        |
| <b>5.2 Methylierungsspezifische DNA-Analysen des Par-4-, Dlk/ZIPK- und Amida/TFPT-Promotors</b>  | <b>126</b> |
| 5.2.1 Das pro-apoptotische Protein Amida/TFPT wird in verschiedenen  |            |

|                                    |  |                |
|------------------------------------|--|----------------|
|                                    | Tumorzelllinien und Gliomen durch DNA-Hypermethylierung stillgelegt  | 127            |
| 5.2.2                              | Die Herunterregulation der Par-4-Expression wird nur in zwei Gliom-Zelllinien durch Promotor-Hypermethylierung induziert | 131            |
| 5.2.3                              | Der Dlk/ZIPK-Promotor ist nicht hypermethyliert  | 133            |
| <b>5.3</b>                         | <b>EFP1, der neue Par-4-Interaktionspartner, ist ein ER-Stress induziertes Glykoprotein</b>                              | <b>134</b>     |
| 5.3.1                              | EFP1 weist Sequenzhomologien zu PDI-Proteinen auf  | 135            |
| 5.3.2                              | EFP1 ist ein ER-ständiges Glykoprotein   | 135            |
| 5.3.3                              | Charakterisierung der Interaktion von Par-4 und EFP1   | 137            |
| 5.3.4                              | Hypothetische Funktion von EFP1 und Par-4 bei ER-Stress  | 138            |
| <b>5.4</b>                         | <b>Ausblick</b>  | <b>139</b>     |
| <br><b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>      |  | <br><b>142</b> |
| <br><b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b> |  | <br><b>143</b> |
| <br><b>ANHANG A</b>                |  | <br><b>160</b> |
|                                    | <b>Promotor-Struktur von Par-4</b>   | <b>160</b>     |
|                                    | <b>Promotor-Struktur der ZIPK</b>  | <b>164</b>     |
|                                    | <b>Promotor-Struktur von TFPT</b>  | <b>168</b>     |
| <br><b>ANHANG B</b>                |  | <br><b>172</b> |
|                                    | <b>Proteinsequenz-Vergleich der EFP1-Orthologe</b>   | <b>172</b>     |
| <br><b>DANKSAGUNG</b>              |  |                |
| <b>ERKLÄRUNG</b>                   |  |                |
| <b>EIGENE PUBLIKATIONEN</b>        |  |                |



---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN

|                 |   |
|-----------------|---|
| (v/v)           | Volumen pro Volumen                         |
| (w/v)           | Gewicht pro Volumen                         |
| <sup>5m</sup> C | 5-Methylcytosin                             |
| °C              | Grad Celsius                                |
| A               | Ampere oder Adenin oder diffuses Astrozytom |
| AA              | anaplastisches Astrozytom                   |
| Abb.            | Abbildung                                   |
| abs.            | absolut                                     |
| Ac              | Acetat                                      |
| ADP             | Adenosindiphosphat                          |
| AK              | Antikörper                                  |
| APS             | Ammoniumperoxodisulfat                      |
| AS              | Aminosäure                                  |
| ATP             | Adenosintriphosphat                         |
| bidest          | zweifach destilliert                        |
| BiP             | <i>Heavy chain binding protein</i>          |
| bp              | Nukleotid-Basenpaar                         |
| BS              | Bisulfit                                    |
| BSA             | Rinderserumalbumin                          |
| bzw.            | beziehungsweise                             |
| C               | Cytosin                                     |
| C-              | Carboxy-                                    |
| C2              | N-Acetyl-D- <i>erythro</i> -Sphingosin      |
| C8              | N-Octanoyl-D- <i>erythro</i> -Sphingosin    |
| Ca              | Calcium                                     |
| ca.             | circa                                       |
| cDNA            | komplementäre DNA                           |
| Cl              | Chlorid                                     |
| cm              | Zentimeter (10 <sup>-2</sup> m)             |
| CO <sub>3</sub> | Carbonat                                    |
| COBRA           | kombinierte Bisulfit-Restriktionsanalyse    |

---

|                |   |
|----------------|---|
| CpG            | Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Dinukleotid               |
| CS             | Coverslip, Deckglas mit 13 mm Durchmesser               |
| Cx             | Connexin  |
| Da             | Dalton  |
| DAPI           | 4', 6'-Diamino-2-Phenylindoldihydrochlorid              |
| dATP           | Desoxyadenosintriphosphat                               |
| DD             | <i>death domain</i> , Todesdomäne                       |
| DHC            | C2-Dihydroceramid                                       |
| dCTP           | Desoxycytidintriphosphat                                |
| dGTP           | Desoxyguanosintriphosphat                               |
| DMDC           | Dimethyl-dicarbonat                                     |
| DMEM           | Dulbecco's Modified Eagle Medium                        |
| DMF            | N, N - Dimethylformamid                                 |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid  |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure                                  |
| dNTP           | Gemisch aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP                      |
| ds             | doppelsträngig  |
| dT             | Desoxythymidin  |
| DTT            | Dithiothreitol  |
| dTTP           | Desoxythymidintriphosphat                               |
| ECL            | <i>enhanced chemiluminescence</i>                       |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                                 |
| EDTA           | Ethylendiamintetraessigsäure                            |
| EndoH          | Endoglykosidase H                                       |
| ER             | Endoplasmatisches Retikulum                             |
| et al.         | <i>et alteri</i>  |
| FCS            | fötale Kälberserum                                      |
| FLAG           | Epitop mit der AS-Folge MDYKDDDDK                       |
| g              | Gramm ( $10^{-3}$ kg) oder Erdbeschleunigung (9,81 m/s) |
| G              | Guanin  |
| G418           | Geneticindisulfat                                       |
| GAPDH          | Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                  |
| GBM            | Glioblastom   |
| GDP            | Guanosindiphosphat                                      |

---

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| GFP                           | grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i> |
| GTP                           | Guanosintriphosphat   |
| H                             | Hydrogen  |
| h                             | Stunde  |
| HCl                           | Salzsäure   |
| HEPES                         | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure                       |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid  |
| HRP                           | Meerrettich-Peroxidase  |
| INF $\gamma$                  | Interferon $\gamma$   |
| IP                            | Immunpräzipitation  |
| k                             | kilo (10 <sup>3</sup> )   |
| K                             | Kalium  |
| kb                            | Nukleotid-Kilobase  |
| l                             | Liter   |
| LB                            | Luria Bertani   |
| Li                            | Lithium   |
| LP                            | Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser                                |
| LZ                            | Leucin-Zipper   |
| $\mu$                         | mikro (10 <sup>-6</sup> )   |
| m                             | milli (10 <sup>-3</sup> )   |
| M                             | Molar [g/mol]   |
| Min                           | Minute  |
| Mg                            | Magnesium   |
| MLC                           | regulatorische leichte Kette von Myosin II                            |
| Mn                            | Mangan  |
| mol                           | Stoffmenge aus $6,02214 \times 10^{23}$ Teilchen                      |
| MOPS                          | 3-Morpholino-propansulfonsäure-Pufferlösung                           |
| MP                            | Zellkulturschale mit 3,5 cm Durchmesser                               |
| mRNA                          | <i>messenger</i> RNA, Boten-RNA                                       |
| n                             | nano (10 <sup>-9</sup> )  |
| N-                            | Amino-  |
| Na                            | Natrium   |
| NEM                           | N-Ethyl-Maleimid  |
| NLS                           | Kernlokalisierungssignal  |

---

|                 |   |
|-----------------|---|
| NP-40           | Nonident P-40   |
| nt              | Nukleotid(e)  |
| OD              | optische Dichte   |
| OH              | Hydroxid  |
| PAA             | Polyacrylamid   |
| PAGE            | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                   |
| PBS             | phosphatgepufferte Salzlösung                                     |
| PCR             | Polymerase-Kettenreaktion   |
| PEG             | Polyethylenglykol   |
| Pen             | Penicillin  |
| pH              | negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| PLP             | Phosphatlysispuffer   |
| PMSF            | Phenylmethylsulphonylfluorid                                      |
| PO <sub>4</sub> | Phosphat  |
| rATP            | Riboadenosintriphosphat   |
| rCTP            | Ribocytidintriphosphat  |
| RFP             | rot fluoreszierendes Protein                                      |
| rGTP            | Riboguanosintriphosphat   |
| RNA             | Ribonukleinsäure  |
| RNase           | Ribonuklease  |
| rNTP            | Gemisch aus rATP, rCTP, rGTP, rTTP                                |
| RPMI            | Roswell Park Memorial Institute                                   |
| RT              | Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase                         |
| rTTP            | Ribothymidintriphosphat   |
| rUTP            | Ribouridintriphosphat   |
| SAC             | <i>sufficient for apoptosis induction in cancer cells</i>         |
| SDS             | Natriumdodecylsulfat  |
| s               | Sekunde   |
| siRNA           | <i>short interfering RNA</i>                                      |
| SO <sub>4</sub> | Sulfat  |
| SP              | Zellkulturschale mit 6 cm Durchmesser                             |
| ss              | einzelsträngig  |
| Strep           | Streptomycin  |
| STS             | Staurosporin  |

---

|                |  |
|----------------|--|
| T              | Thymin                                   |
| THX            | Thioredoxin-Domäne                       |
| T <sub>M</sub> | Schmelztemperatur                        |
| TAE            | Tris/HCl/Acetat/EDTA-Puffer              |
| TBE            | Tris/Borat/EDTA-Puffer                   |
| TBS            | TRIS-gepufferte Salzlösung               |
| TE             | Tris/HCl/EDTA-Puffer                     |
| TEMED          | N', N', N', N' – Tetramethyldiamin       |
| TpG            | Thymin-phosphatidyl-Guanosin-Dinukleotid |
| Tris           | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan         |
| Tween-20       | Polyoxyethylensorbitantaminomethan       |
| U              | Unit (Enzymeinheit) oder Uracil          |
| üN             | über Nacht                               |
| UV             | Ultraviolettes Licht                     |
| V              | Volt                                     |
| WB             | Western Blot                             |
| WHO            | Weltgesundheitsorganisation              |
| wt             | Wildtyp                                  |
| X-Gal          | 5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl-β-D-galaktosid |

### ABKÜRZUNGEN FÜR AMINOSÄUREN

|   |     |              |   |     |            |
|---|-----|--------------|---|-----|------------|
| A | Ala | Alanin       | M | Met | Methionin  |
| C | Cys | Cystein      | N | Asn | Asparagin  |
| D | Asp | Aspartat     | P | Pro | Prolin     |
| E | Glu | Glutamat     | 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, EINE FORM DES PROGRAMMIERTEN ZELLTODS

Der hoch konservierte Mechanismus, der als Apoptose oder programmierter Zelltod bezeichnet wird, ist genetisch festgelegt und findet in allen mehrzelligen Organismen statt (Übersicht bei Kerr *et al.*, 1972). Der kontrollierte Zelltod spielt bei der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und während der Emryonalentwicklung eine ebenso wichtige Rolle wie die Zellproliferation (Übersicht bei Meier *et al.*, 2000). Die Kontrollwege, die zur Induktion von Apoptose führen, sind oft eng verknüpft mit den Regulationsmechanismen der Zellteilung, da eine Koordination beider Prozesse notwendig ist (Übersicht bei Chau & Wang, 2003; Übersicht bei McCarthy *et al.*, 2001). Apoptose findet während der Embryonalentwicklung zur Organ- und Formenbildung sowie zur Eliminierung nicht mehr benötigter Zellen wie zum Beispiel der Zellen des Nervensystems statt. Die T-Zellen des Immunsystems können die Beseitigung autoreaktiver Immunzellen, aber auch Virus-infizierter Zellen oder genetisch entarteter Zellen induzieren (Übersicht bei Ekert & Vaux, 1997). Ein Ausbleiben des programmierten Zelltods kann zu Missbildungen, Autoimmunerkrankungen (Übersicht bei Klimiuk *et al.*, 1995) und malignen Erkrankungen führen (Übersicht bei Zornig *et al.*, 2001). Das Auftreten von verstärkter Apoptose hingegen kann eine Vielzahl pathologischer Zustände auslösen, darunter neurodegenerative Erkrankungen (Engidawork *et al.*, 2001; Übersicht bei Jellinger & Stadelmann, 2000) und AIDS (Übersicht bei Gougeon, 1997).

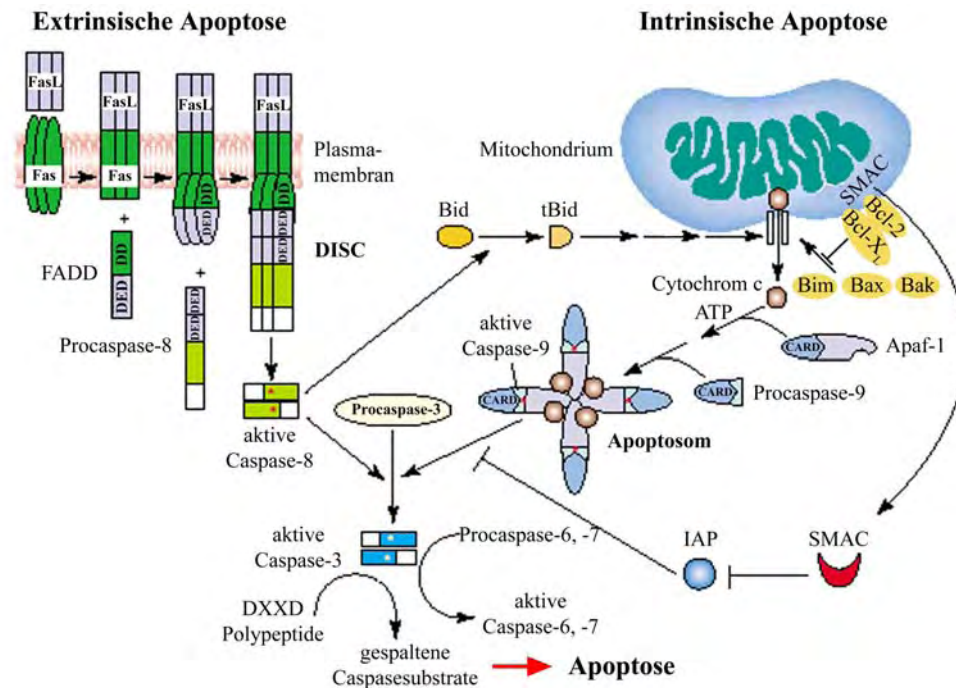
### 1.1.1 Ablauf der Apoptose

Der programmierte Zelltod kann durch eine Vielzahl physiologischer Stimuli induziert werden, wodurch es zur Aktivierung von Apoptose-spezifischen Proteasen und Nukleasen kommt (Übersicht bei Danial & Korsmeyer, 2004). Erste morphologische Auffälligkeiten sind daher die Schrumpfung und Ablösung der Zelle vom Substrat bzw. von ihren Nachbarzellen aufgrund des Abbaus des Zytoskeletts sowie einer Kondensation und Fragmentierung des Zellkerns durch die Spaltung von Lamin und der DNA (Übersicht bei Kerr *et al.*, 1972). Im Unterschied zur Nekrose, bei der die Zellbestandteile der sterbenden Zelle in das Interstitium freigesetzt werden, verpackt eine apoptotische Zelle ihren Zellinhalt durch Membranabschnürung (*membrane blebbing*) in so genannte *apoptotic bodies* (Golstein & Kroemer, 2007). Diese werden durch die Präsentation von Phosphatidylserin, das nach der Apoptose-Induktion auch auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran zu finden ist, von

benachbarten Zellen und Makrophagen erkannt und phagozytiert, so dass eine Entzündungsreaktion vermieden wird (Übersicht bei Schlegel & Williamson, 2001).

### 1.1.2 Auslösung und Regulation der Apoptose

Bei der Auslösung des Selbstmordprogramms einer Zelle wird grundsätzlich zwischen zwei Hauptwegen unterschieden. Wird die Apoptose durch ein Todessignal von außen induziert, spricht man vom extrinsischen Signalweg. Stimuli wie DNA-Schädigung, Wachstumsfaktorentzug, Verlust der Zellzykluskontrolle oder des Zell-Zell-Kontakts aktivieren dagegen den intrinsischen Signalweg (Übersicht bei Jin & El-Deiry, 2005). Bei beiden Signalwegen wird eine Kaskade-artige Aktivierung von Apoptose-spezifischen Proteasen, den so genannten *cysteinyll aspartate specific proteinases* (Caspasen), initiiert. Alle Caspasen werden als inaktive Procaspasen synthetisiert. Sie bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne sowie einer großen und einer kleinen Untereinheit. Erst nach der Induktion der Apoptose erfolgt ihre proteolytische Aktivierung, indem die N-terminale Prodomäne entfernt und eine Spaltung der kleinen und großen Untereinheit erfolgt. Aus jeweils zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten kann sich dann ein aktives Tetramer mit zwei katalytischen Zentren zusammenlagern (Übersicht bei Thornberry & Lazebnik, 1998). Allgemein werden die in den apoptotischen Prozess involvierten Caspase-Mitglieder in zwei Gruppen eingeteilt, die Initiator- und die Effektorcaspasen. Die Initiatorcaspasen, zu denen die Caspasen 2, 8, 9 und 10 gehören, sind den Apoptose-induzierenden Prozessen unmittelbar nachgeschaltet und leiten das apoptotische Signal weiter. Ihre wichtigsten Substrate sind die Pro-Effektorcaspasen, die sie durch proteolytische Spaltung aktivieren. Die Effektorcaspasen, zu denen die Caspasen 3, 6 und 7 gehören, sind die eigentlichen Exekutoren der Apoptose, indem sie eine Vielzahl von lebenswichtigen Proteinen der Zelle zerstören (Übersicht bei Stroh & Schulze-Osthoff, 1998). Zu den Substraten der Effektorcaspasen gehören anti-apoptotische Proteine wie die Mitglieder der Bcl (*B-cell-lymphoma*)-2-Familie Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub>, Proteine des Zytoskeletts wie Aktin, Lamin und Keratin, Proteine des DNA-Reparatursystems wie PARP (*poly(ADP-ribose)polymerase*) sowie Transkriptions- und Replikationsenzyme wie Sp1. Durch die proteolytische Spaltung werden aber auch pro-apoptotische Proteine aktiviert, so zum Beispiel die Procaspasen selbst, das Bcl-2-Familien-Mitglied Bid und die DNase CAD (*caspase-activated DNase*) (Übersicht bei Cryns & Yuan, 1998). Die Aktivierung von CAD beruht dabei auf der Spaltung ihres Bindungspartners und Inhibitors ICAD (*inhibitor of CAD*). Wird dieser abgebaut, kommt es zur Freisetzung von CAD, die dann in ihrem aktiven Zustand in den Zellkern transloziert und zur Degradation der DNA beiträgt (Enari *et al.*, 1998).



**Abb. 1: Apoptose-Induktion durch den extrinsischen und den intrinsischen Signalweg.** Der extrinsische Weg (linker Teil der Abbildung) wird durch die Bindung eines Liganden (zum Beispiel FasL) an seinen Todesrezeptor (zum Beispiel Fas) aktiviert, der sich zu einem Trimer zusammenlagert. Nach der Aktivierung können Adapterproteine (zum Beispiel FADD) auf der zytosolischen Seite an die Todesdomäne (DD) des Rezeptors binden. Über die Todeseffektor-Domäne (DED) der Adapterproteine werden inaktive Procaspase-8-Moleküle rekrutiert. In diesem so genannten *death-inducing signaling complex* (DISC) wird die Procaspase-8 zur aktiven Caspase-8 gespalten. Diese aktiviert Effektorcaspasen wie zum Beispiel die Caspase-3, die dann durch proteolytische Spaltung ihrer Substrate den Zelltod einleitet. Der intrinsische Weg (rechter Teil der Abbildung) wird durch intrazelluläre Todessignale aktiviert. Die pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie leiten diese Signale an die Mitochondrien weiter, wodurch es zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum kommt. Die freigesetzten Cytochrom c-Moleküle lagern sich im Zytosol mit mehreren Apaf-1- und Procaspase-9-Molekülen zum so genannten Apoptosom zusammen. In diesem Multiproteinkomplex wird die Procaspase-9 zur aktiven Caspase-9 prozessiert, die daraufhin Effektorcaspasen aktivieren kann. Durch die Aktivierung der Caspase-Kaskade wird der Tod der Zelle initiiert. Bild modifiziert nach Kaufmann & Hengartner, 2001.

Der extrinsische Signalweg (Abb. 1, links) wird durch die Aktivierung membranständiger Rezeptoren aus der Superfamilie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptoren, so genannter „Todesrezeptoren“, ausgelöst, deren bekannteste Vertreter CD95/Fas und TNF $\alpha$ -R sind. Deshalb spricht man in diesem Zusammenhang auch von der Rezeptor-vermittelten Apoptose. Bindet ein Ligand, der zum Beispiel auf der Oberfläche von zytotoxischen T-Zellen exprimiert wird, an die extrazelluläre Domäne des Todesrezeptors, führt dies zu einer Trimerisierung und damit Aktivierung des Rezeptors. Daraufhin kann die zytoplasmatisch gelegene, so genannte Todesdomäne (*death domain*, DD) des Rezeptors ein Adaptermolekül wie zum Beispiel FADD (*Fas-associated protein with death domain*) rekrutieren, das wiederum über seine Todeseffektor-Domäne (*death effector domain*, DED) die Procaspase-8 rekrutiert. Dieser Multiproteinkomplex, der aus einem Todesrezeptor, einem Adaptermolekül und der Procaspase-8 besteht, wird auch als DISC (*death-inducing signaling complex*)



bezeichnet. Das Modell der induzierten Nähe postuliert, dass sich die zahlreichen gebundenen Procaspase-8-Moleküle in diesem Komplex durch Autoproteolyse gegenseitig aktivieren können. Die aktivierte Caspase-8, die eine Initiatorcaspase darstellt, aktiviert durch proteolytische Spaltung Effektorcaspasen wie die Caspase-3, -6, und -7, die wiederum durch Fragmentierung ihrer Substrate den Zelltod einleiten (Übersicht bei Peter & Kramer, 1998). Der intrinsische Signalweg (Abb. 1, rechts) wird durch zelleigene Stimuli wie DNA-Schädigung oder Wachstumsfaktor-Entzug ausgelöst. Da hier die Mitochondrien die zentralen Vermittler der Apoptose darstellen, wird der Weg auch als Mitochondrien-vermittelte Apoptose bezeichnet. An der Regulation dieses Signalweges sind hauptsächlich die Mitglieder der Bcl-2-Familie beteiligt, zu denen sowohl die pro-apoptotischen Proteine Bim, Bid, Bax und Bak wie auch die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> gehören. In nicht apoptotischen Zellen liegen die pro- und anti-apoptotischen Faktoren in einem Gleichgewicht vor. Durch ihre Fähigkeit, sowohl Homo- wie auch Heterodimere ausbilden zu können, neutralisieren sie sich gegenseitig in ihrer Funktion. Außerdem liegen die pro-apoptotischen Mitglieder in einer nicht apoptotischen Zelle in einem inaktivierten Zustand vor. So wird zum Beispiel Bid proteolytisch aktiviert und Bad von seinem gebundenen Inhibitor befreit, bevor sie ihre apoptotische Wirkung ausüben können (Übersicht bei Korsmeyer, 1999). Wird das in einer normalen Zelle vorliegende Gleichgewicht zwischen den pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Mitgliedern zu Gunsten der pro-apoptotischen Faktoren verschoben, können pro-apoptotische Bcl-2-Mitglieder wie Bax und Bak kanalahnliche Strukturen in der äußeren Mitochondrienmembran ausbilden. Die Kanäle ermöglichen die Freisetzung von Faktoren wie Cytochrom c aus dem Intermembranraum in das Zytoplasma (Antonsson, 2004). Cytochrom c kann im Zytosol an Apaf-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor-1*) binden, wodurch eine Konformationsänderung des Apaf-1-Proteins induziert wird. Die Konformationsänderung ermöglicht eine Oligomerisierung mehrerer Apaf-1-Moleküle und führt zur Freilegung der *caspase recruitment domain* (CARD) von Apaf-1. Jetzt kann die Procaspase-9 mit ihrer CARD an Apaf-1 anbinden. Der entstehende Multiproteinkomplex, der aus mehreren Apaf-1-, Procaspase-9- und Cytochrom c-Molekülen besteht, wird als Apoptosom bezeichnet. In diesem Komplex wird die Procaspase-9 durch Autoproteolyse zur aktiven Initiatorcaspase prozessiert und kann andere Effektorcaspasen aktivieren und dadurch das apoptotische Signal weiterleiten undverstarken (Übersicht bei Green & Kroemer, 2004). Eine Regulation der Apoptose wird, wie oben schon erwähnt, zum einen durch das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Mitgliedern erreicht. Eine weitere wichtige Apoptose regulierende Proteinfamilie stellen die im Zytosol lokalisierten

spezifischen Caspase-Inhibitoren (*inhibitor of apoptosis proteins*, IAPs) dar, die eine spontane Aktivierung der Caspase-Kaskade verhindern sollen (Übersicht bei LeBlanc, 2003). Nach der Aktivierung des Selbstmordprogramms der Zelle würden die IAPs allerdings einen effektiven Ablauf der Apoptose verhindern, so dass es bei der Freisetzung von Cytochrom c zusätzlich zu einer Ausschüttung von SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspases*) aus den Mitochondrien kommt. Das SMAC-Protein wirkt dem inhibitorischen Effekt der IAPs entgegen, so dass eine effektive Aktivierung der Caspasen erfolgen kann (Du *et al.*, 2000).

### 1.1.3 ER-Stress vermittelte Apoptose

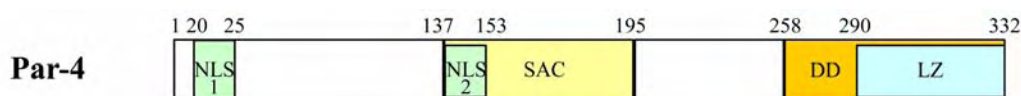
Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist neben den Mitochondrien ein weiteres Zellorganell, das an der intrinsischen Apoptose beteiligt sein kann (Übersicht bei Szegezdi *et al.*, 2006). Seine vorrangige Funktion übt das ER jedoch bei der Synthese von sekretorischen oder membranständigen Proteinen aus. Diese werden in das Lumen des ER synthetisiert, wo sie einerseits durch entsprechende Chaperone bei der Erlangung ihrer endgültigen Konformation unterstützt und außerdem durch die Anheftung N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide modifiziert werden. Bei der N-Glykosylierung von Proteinen werden Vorläufer-Zuckerketten vom „Lipidcarrier“ Dolicholphosphat auf Asparagin-AS-Reste in der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr übertragen, die im weiteren Verlauf der Proteinreifung zu mannosereichen Zuckerketten reduziert werden (Übersicht bei Kornfeld & Kornfeld, 1985). Eine weitere wichtige Aufgabe des ERs ist die Speicherung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die durch die SERCA (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*) aus dem Zytosol ins Innere des ER befördert werden (Übersicht bei Grolach *et al.*, 2006). Der Efflux von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wird hauptsächlich von den Kanälen der IP<sub>3</sub>R (*Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor*)- und den RyR (*Ryanoid-Rezeptor*)-Mitgliedern reguliert (Übersicht bei Berridge, 2002). Eine Akkumulation ungefalteter Proteine im ER-Lumen löst den hoch konservierten *unfolded protein response* (UPR)-Signalweg aus. In diesem Signalweg werden die missgefalteten Proteine durch das ER-Chaperon BiP (*Heavy chain binding protein*)/Grp78 (*Glucose regulated protein 78*) gebunden, woraufhin das Chaperon die ER-Transmembranproteine PERK (*pancreatic ER kinase-like ER kinase*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) und IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*) freigibt. Die durch die Freisetzung aktivierten Transmembranproteine können dann die Herunterregulation der gesamten Proteinbiosynthese sowie die verstärkte Expression von ER-Chaperonen initiieren (Rao *et al.*, 2002). Dauert der durch die akkumulierten Proteine ausgelöste ER-Stress trotzdem an und kann nicht beseitigt werden, wird die Apoptose eingeleitet. Bei dem UPR-Signalweg wie auch bei dem Mitochondrien-vermittelten

apoptotischen Signalweg (siehe 1.1.2) spielen die Mitglieder der Bcl-2-Familie eine wichtige Rolle. Durch die Aktivierung der Signalwege nach anhaltendem ER-Stress werden die anti-apoptotischen Bcl-2-Mitglieder inaktiviert (McCullough *et al.*, 2001; Bassik *et al.*, 2004) und die pro-apoptotischen Bcl-2-Mitglieder aktiviert (Lei & Davis, 2003). Die pro-apoptotischen Faktoren wie Bax, Bak und Bim sind an der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem ER-Lumen und an der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien beteiligt (Nutt *et al.*, 2002). Das freigesetzte Cytochrom c ermöglicht die Ausbildung des Apoptosoms und damit die proteolytische Aktivierung der Initiatorcaspase-9. Durch die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Zytosol werden unter anderem Cystein-Proteasen der Calpain-Familie aktiviert, die die an der ER-Membran lokalisierte Initiatorcaspase-12 spalten (Tan *et al.*, 2006) sowie pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bax (Wood *et al.*, 1998) und Bid (Chen *et al.*, 2001) aktivieren. Durch die Induktion der beschriebenen Signalwege wird die Caspase-Kaskade initiiert und die Zelle in die Apoptose geführt. Ob die Caspase-12 in der ER-Stress vermittelten Apoptose überhaupt eine Rolle spielt, wird allerdings noch kontrovers diskutiert. Bisher wurde nur in Nagern ein funktionelles Gen der Caspase-12 gefunden, wohingegen im menschlichen Genom das humane Ortholog der Caspase-12 durch das Auftreten von mehreren Mutationen im Laufe der Evolution inaktiviert worden ist (Szegezdi *et al.*, 2003). Mehreren Berichten zur Folge kann aber die Caspase-4 möglicherweise ihre Funktion im Menschen übernehmen (Hitomi *et al.*, 2004).

## 1.2 DAS PRO-APOPTOTISCHE PROTEIN PAR-4

Par-4 (*prostate apoptosis response-4*) wurde ursprünglich bei der Suche nach Genen identifiziert, die nach Ionomycin-induzierter Apoptose in Androgen-unabhängigen Prostatakarzinomzellen der Ratte hochreguliert werden (Sells *et al.*, 1994). Kurze Zeit später wurde das humane Ortholog von Par-4 als Interaktionspartner des *Wilms tumor protein 1* (WT1) isoliert (Johnstone *et al.*, 1996). Par-4 wird ubiquitär in den Geweben des Ektoderms, Mesoderms und Endoderms exprimiert. Die Sequenz des Par-4-Proteins ist im Menschen, in der Ratte und in der Maus hoch konserviert und weist besonders in den potentiell funktionellen Bereichen eine 100%ige Homologie auf (Übersicht bei El-Guendy & Rangnekar, 2003). Das Par-4-Protein der Ratte umfasst 332 AS und besitzt eine molekulare Masse von 38 kDa (schematische Übersicht in Abb. 2). Trotz zweier Kernlokalisationssequenzen (NLS 1, AS 20-25; NLS 2, AS 137-153) im N-Terminus von Par-4 ist das Protein in den meisten Zellen im Zytoplasma lokalisiert (Boghaert *et al.*, 1997; Sells *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 1998) und ist dort teilweise mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert (Vetterkind *et al.*,

2005b). Nur in einigen Tumorzellen, wie zum Beispiel in Androgen-abhängigen Prostatakarzinom-Zellen, ist Par-4 ausschließlich im Kern lokalisiert, wobei die Kernlokalisation von der NLS 2 des Par-4-Proteins vermittelt wird (El-Guendy *et al.*, 2003). Am C-Terminus des Par-4-Proteins befindet sich eine potentielle Todesdomäne (DD, AS 258-332), die auch in anderen pro-apoptotischen Proteinen wie zum Beispiel dem Fas-Rezeptor zu finden ist (Feinstein *et al.*, 1995; Rangnekar, 1998). Strukturell überlappt die Todesdomäne des Par-4-Proteins mit einem Leucin-Zipper-Motiv (LZ, AS 290-332), das Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann. Alle bisher bekannten Interaktionspartner binden an den C-Terminus von Par-4 (Boosen *et al.*, 2005; Johnstone *et al.*, 1996; Guo & Xie, 2004; Page *et al.*, 1999; Diaz-Meco *et al.*, 1996; Roussigne *et al.*, 2003). Anhand von computergestützten Sequenzanalysen des Par-4-Proteins konnten viele potentielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase A (PKA), für die Proteinkinase C (PKC) sowie die Caseinkinase II identifiziert werden (Übersicht bei El-Guendy & Rangnekar, 2003). Das Auftreten dieser zahlreichen Konsensusmotive für Proteinkinasen weist auf eine potentielle Regulation des Par-4-Proteins durch posttranslationale Modifikation hin.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des Par-4-Proteins aus der Ratte.** Par-4 besteht aus 332 AS. Das Protein besitzt zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS 1, AS 20-25 und NLS 2, AS 137-153). Die NLS 2 liegt inmitten der so genannten SAC-Domäne (*sufficient for apoptosis induction in cancer cells*, AS 137-195). Am C-Terminus des Proteins befindet sich eine Todesdomäne (DD, AS 258-332), die mit einem Leucin-Zipper-Motiv (LZ, AS 290-332) überlappt.

Das pro-apoptotische Potential von Par-4 kann über mehrere Signalwege vermittelt werden (Übersicht in Ranganathan & Rangnekar, 2005). Am besten untersucht sind bisher die Mechanismen, die zur Unterdrückung von proliferationsfördernden oder apoptotischen Signalen führen. So kann Par-4 zum Beispiel die atypische Proteinkinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) inhibieren (Diaz-Meco *et al.*, 1996), wodurch der NF- $\kappa$ B Signalweg abgeschaltet und anti-apoptotische Gene wie IAPs, die *Bcl-2-like factors* und die *TNF-receptor-associated factors* (TRAF1, TRAF2) nicht mehr exprimiert werden (Barkett & Gilmore, 1999). Der inhibitorische Effekt von Par-4 auf die PKC $\zeta$  kann durch die zusätzliche Bindung von p62 unter der Bildung eines ternären Komplexes wieder aufgehoben werden (Chang *et al.*, 2002). Durch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor WT1 am Promotor des *bcl-2*-Gens kann Par-4 direkt die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 reprimieren (Qiu *et al.*, 1999). Das Par-4-Protein ist weiterhin in der Lage, die Translokation des Fas-Rezeptors sowie des Fas-Liganden an die Zelloberfläche zu induzieren und so die Zellen für die Induktion des

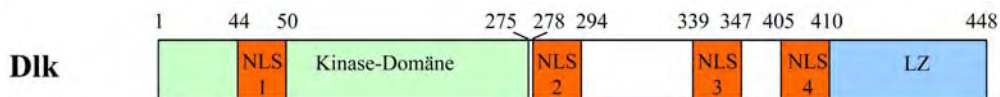
extrinsischen Apoptoseweges zu sensibilisieren (Bergmann *et al.*, 2004). Eine Expression von Par-4 führt trotz Hemmung der Wachstumsstimulation in den meisten normalen, nicht transformierten Zellen nicht zur Auslösung der Apoptose, sondern sensibilisiert die Zellen lediglich für apoptotische Stimuli wie Wachstumsfaktorentzug, UV-Strahlung oder Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen-Konzentration (Sells *et al.*, 1997; Qiu *et al.*, 1999; Camandola & Mattson, 2000; Boehrer *et al.*, 2006). Eine direkte apoptotische Wirkung scheint das Par-4-Protein dagegen in vielen Tumorzellen zu besitzen (Nalca *et al.*, 1999; Lucas *et al.*, 2001; El-Guendy *et al.*, 2003), wie zum Beispiel in Androgen-unabhängigen Prostatakrebszellen (Chakraborty *et al.*, 2001). Auch in vielen Tumorzelllinien des zentralen Nervensystems, in denen die Par-4-Expression herunterreguliert ist, löst die ektopische Expression des Par-4-Proteins vermehrt Apoptose aus (Vetterkind *et al.*, 2005a). In früheren Studien wurde der Leucin-Zipper des Par-4-Proteins als die Domäne charakterisiert, die für die pro-apoptotische Wirkung des Par-4-Proteins verantwortlich ist (Sells *et al.*, 1994). Neuere Studien konnten jedoch zeigen, dass die Apoptose-auslösende Domäne von Par-4 zwischen den AS 137-195 lokalisiert ist. Eine Überexpression dieser Domäne führt selektiv in Tumorzellen zu einer Apoptose-Induktion, weshalb die Region als SAC-Domäne (*selective for apoptosis induction in cancer cells*, siehe auch Abb. 2) bezeichnet wurde (El-Guendy *et al.*, 2003). Für den selektiven pro-apoptotischen Effekt in Krebszellen könnte die Phosphorylierung der AS Threonin<sub>155</sub>, die sich innerhalb der SAC-Domäne befindet, verantwortlich sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die PKA diesen AS-Rest im Par-4-Protein phosphorylieren kann. Tumorzellen weisen oft eine erhöhte PKA-Aktivität auf, so dass es in diesen Zellen durch Phosphorylierung des Par-4-Proteins innerhalb der SAC-Domäne an der AS Threonin<sub>155</sub> zu einer erhöhten apoptotischen Aktivität kommen könnte (Gurumurthy *et al.*, 2005).

### **1.3 DIE INTERAKTIONSPARTNER DES PRO-APOPTOTISCHEN PROTEINS PAR-4**

Für das Par-4-Protein sind bereits zahlreiche Interaktionspartner identifiziert worden, wie zum Beispiel die PKC $\zeta$  (Diaz-Meco *et al.*, 1996), WT1 (Johnstone *et al.*, 1996), THAP1 (Roussigne *et al.*, 2003), p62 (Chang *et al.*, 2002), AATF (*apoptosis antagonizing transcription factor*; Guo & Xie, 2004) und der Androgen-Rezeptor (Gao *et al.*, 2006). Die drei Interaktionspartner Dlk (*DAP-like kinase*), Amida und EFP1 (*EF-hand binding protein 1*), mit denen sich unsere Arbeitsgruppe eingehend beschäftigt und die für die durchgeführten Studien in dieser Arbeit von besonderer Bedeutung sind, werden im Folgenden näher erläutert.

### 1.3.1 Die nukleäre Serin/Threonin-Kinase Dlk

Die Serin/Threonin-Kinase Dlk (*DAP-like kinase*) aus der Ratte ist ein Interaktionspartner von Par-4 (Page *et al.*, 1999), die ihren Namen aufgrund der hohen Sequenzidentität zur DAP-Kinase (*death-associated protein kinase*) erhalten hat (Cohen *et al.*, 1997). Zusammen mit drei weiteren Vertretern bilden die Dlk und die DAP-Kinase eine neue Kinase-Subfamilie, die eine hohe Sequenzhomologie in ihren Kinase-Domänen aufweisen und alle mit der Apoptose in Verbindung gebracht werden konnten (Übersicht bei Kögel *et al.*, 2001). Das Dlk-Protein aus der Ratte, in Abb. 3 schematisch dargestellt, besteht aus 448 AS und hat eine molekulare Masse von 52 kDa. Anhand von Sequenzanalysen wurden insgesamt vier Kernlokalisationssequenzen identifiziert (NLS 1, AS 44-50; NLS 2, AS 278-294; NLS 3, AS 339-347; NLS 4, AS 405-410), wobei scheinbar nur die NLS 4 für die Kernlokalisierung der Dlk verantwortlich ist (Kögel *et al.*, 1999). Im N-Terminus des Dlk-Proteins befindet sich die Kinase-Domäne (AS 1-275), im C-Terminus befindet sich ein Leucin-Zipper-Motiv (AS 411-448). Im Gegensatz zur DAP-Kinase besitzen die Dlk und ihr humanes Ortholog, die ZIPK (*zipper interacting protein kinase*), keine C-terminale Todesdomäne, sondern eine Leucin-Zipper-Domäne, die die Ausbildung von Homo- bzw. Heterodimeren begünstigt. Der Dlk und der ZIPK fehlen außerdem die in der DAP-Kinase vorhandene Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Bindedomäne im N-Terminus.



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Dlk-Proteins aus der Ratte.** Das Dlk-Protein besteht aus 448 AS. N-terminal befindet sich die Kinase-Domäne (AS 1-275), im C-Terminus liegt ein Leucin-Zipper-Motiv (AS 411-448). Im Dlk-Protein befinden sich außerdem vier Kernlokalisationssequenzen (NLS 1, AS 44-50; NLS 2, AS 278-294; NLS 3, AS 339-347; NLS 4, AS 405-410).

Das Dlk-Protein weist in der Zelle eine hauptsächlich nukleäre Lokalisation auf und ist im Zellkern mit punktartigen Strukturen, den so genannten „speckles“ assoziiert. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen konnte eine partielle Kolo-kalisation der Dlk mit den *promyelocytic leukemia nuclear bodies* (PML-NBs) nachgewiesen werden (Kögel *et al.* 1998). Bei den PML-NBs handelt es sich um subnukleäre Multiproteinkomplexe, die zum größten Teil aus dem Protein PML bestehen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass diese nukleären Strukturen eine wichtige Funktion bei der Transkriptionsregulation, Tumorsuppression, Wachstumskontrolle, zellulärer Seneszenz und der Apoptose spielen (Übersicht bei Salomoni & Pandolfi, 2002). Auch für das Par-4-Protein konnte in primären humanen Fibroblasten und Endothelzellen eine Lokalisation in den PML-NBs nachgewiesen

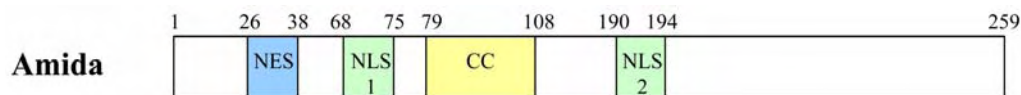
werden (Roussigne *et al.*, 2003). Ferner haben Studien von Kawai *et al.* (2003) gezeigt, dass das Par-4-Protein eine Interaktion zwischen der ZIPK und dem Daxx (*Fas death domain-associated protein*)-Protein in den PML-NBs einer humanen Tumorzelllinie vermitteln kann und so die Apoptosesensitivität der Zellen gesteigert wird.

Frühere Befunde haben gezeigt, dass eine alleinige Überexpression des Par-4-Proteins oder der Dlk nicht zur Induktion von Apoptose in Ratten-Fibroblasten führt, wohl aber die Koexpression beider Proteine. Par-4 ist dabei in der Lage, die kernständige Dlk aus dem Nukleus an die Spannungsfasern des Aktin-Zytoskeletts zu rekrutieren, wo sie mit Par-4 kolokalisiert (Page *et al.*, 1999). Die Rekrutierung der Dlk an das Aktin-Zytoskelett ist nach neuesten Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe abhängig von einer Phosphorylierung des Par-4-Proteins durch die Dlk an der AS Threonin<sub>155</sub> (Doktorarbeit Boosen, 2007). Die Kolokalisation von Par-4 und Dlk am Aktin-Zytoskelett löst eine starke Kontraktion der Aktomyosinfilamente aus, wodurch es zur Induktion der Apoptose kommt (Page *et al.*, 1999). Für die Induktion der Apoptose sind die Kinaseaktivität der Dlk, die Aktin-Assoziation des Par-4-Proteins sowie ein intakter Leucin-Zipper des Par-4-Proteins essentiell (Page *et al.*, 1999; Vetterkind *et al.*, 2005b). Nach der Koexpression des Par-4-Proteins und der Proteinkinase Dlk erfolgt eine verstärkte Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette von Myosin II (MLC) an der AS Serin<sub>19</sub> (Vetterkind *et al.*, 2005b). In früheren Studien wurde eine erhöhte MLC-Phosphorylierung bereits mit dem Phänomen des *membrane blebbing* (siehe 1.1.1) in apoptotischen Zellen in Verbindung gebracht (Mills *et al.*, 1998). Zusammenfassend lässt sich aus diesem Befund ein Modell für die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose in Ratten-Fibroblasten ableiten: Das im Zytoplasma am Aktin-Zytoskelett lokalisierte Par-4-Protein bewirkt über einen bisher nicht bekannten Mechanismus die Translokation der Proteinkinase Dlk aus dem Zellkern, wobei das Par-4-Protein durch die Dlk an der AS Threonin<sub>155</sub> phosphoryliert wird. Nach Rekrutierung an die Aktinfilamente kann die Dlk ihre Substrate wie zum Beispiel die MLC an der AS Serin<sub>19</sub> phosphorylieren, was zur Kontraktion des Aktomyosin-Systems und zur Induktion der Apoptose führt (Vetterkind *et al.*, 2005b; Doktorarbeit Boosen, 2007).

### 1.3.2 Das pro-apoptische Protein Amida

Amida wurde ursprünglich bei einer Hefe-Zwei-Hybrid Suche nach neuen Interaktionspartnern des gehirnspezifischen Proteins Arc (*activity regulated cytoskeleton-associated protein*; Lyford *et al.*, 1995) isoliert (Irie *et al.*, 2000). In unserer Arbeitsgruppe wurde Amida als neuer Interaktionspartner des Par-4-Proteins identifiziert (Boosen *et al.*,

2005). Das Amida-Protein aus der Ratte umfasst 259 AS und hat eine molekulare Masse von 43 kDa. Das Protein enthält zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS 1, AS 68-75 und NLS 2, AS 190-194), die für die hauptsächlich nukleäre Lokalisation verantwortlich sind (Irie *et al.*, 2000). Im Zellkern kolokalisiert das Amida-Protein mit dem PML-Protein in den PML-NBs, wobei eine direkte Interaktion zwischen Amida und PML nachgewiesen werden konnte (Doktorarbeit Boosen, 2007). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Amida-Protein 48 h nach ektoptischer Expression nicht ausschließlich im Zellkern, sondern zu ca. 38 % auch im Zytoplasma von Ratten-Fibroblasten lokalisiert ist. Im Rahmen ihrer Doktorarbeit konnte Meike Boosen (2007) eine potentielle Kernexportsequenz (NES, AS 26-38) im Amida-Protein identifizieren, die eine nukleo-zytoplasmatische Translokation des Amida-Proteins ermöglichen könnte. Des Weiteren beinhaltet das Amida-Protein eine so genannte *Coiled Coil* Region (CC, AS 79-108) in der Mitte des Proteins, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln kann (siehe Abb. 4).



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Amida-Proteins aus der Ratte.** Das Protein Amida besteht aus 259 AS. Es enthält zwei Kernlokalisationssequenzen (NLS 1, AS 68-75 und NLS 2, AS 190-194) sowie eine potentielle Kernexportsequenz (NES, AS 26-38) im N-Terminus. Im Bereich zwischen den AS 79-108 liegt die *Coiled Coil* (CC)-Region.

Amida wird ubiquitär in den Geweben exprimiert, jedoch konnte eine verstärkte Expression im Gehirn und im Testis der Ratte nachgewiesen werden. Nach der Expression in kultivierten COS-7-Zellen löst Amida die Apoptose aus. Daher wurde das Protein nach dem buddhistischen Gott Amida benannt, der Sterbenden einen angenehmen Tod bereitet und sie in das Paradies führt. Durch Koexpression von Amida und seinem Interaktionspartner Arc kann die pro-apoptotische Funktion des Amida-Proteins inhibiert werden (Irie *et al.*, 2000). Des Weiteren scheint Amida eine Funktion bei der Kontrolle des Zellzyklus auszuüben. Die Überexpression des Amida-Proteins kann in COS-7-Zellen einen Zellzyklus-Stopp in der S-Phase induzieren und so den Eintritt in die Mitose verhindern. Amida wird in diesem Zusammenhang als ein DNA-bindendes Protein beschrieben, das durch die Phosphorylierung an der AS Serin<sub>180</sub> durch die *cyclin-dependent kinase 2* (Cdc2) reguliert wird. Die Phosphorylierung der AS Serin<sub>180</sub> führt zu einer verminderten DNA-Bindekapazität des Amida-Proteins (Gan *et al.*, 2003). Das humane Ortholog von Amida, TFPT (*TCF3/E2A fusion partner in childhood leucemia*) bzw. FB1 wurde als Fusionspartner des Transkriptionsfaktors E2A/TCF3 in Patienten mit pre-B ALL (*acute lymphoblastic leucemia*;



Baker & Reddy, 1995) entdeckt (Brambillasca *et al.*, 1999). Ob die durch die Fusion der Proteine bewirkte Inaktivierung von TFPT oder von E2A ursächlich mit der Krankheit in Verbindung steht, konnte bisher nicht geklärt werden. Neuere Studien weisen darauf hin, dass TFPT die Apoptose unabhängig von p53 induziert und dass die Überexpression von TFPT nur in den Zellen zur Apoptose führt, die den G2-Kontrollpunkt überschreiten und in die Mitose eintreten (Franchini *et al.*, 2006). Das Amida-Protein stellt auch ein Substrat der Proteinkinase Dlk dar und wird an der AS Serin<sub>200</sub> von der Dlk phosphoryliert (Dissertation Boosen, 2007). Interessanterweise führt die Koexpression von Par-4 und Amida in Ratten-Fibroblasten zur Translokation des Amida-Proteins aus dem Zellkern und zu einer Kolokalisation mit dem Par-4-Protein am Aktin-Zytoskelett und zur Induktion der Apoptose. Die Rekrutierung von pro-apoptischen Effektormolekülen an das Aktin-Zytoskelett ähnelt stark der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose, da auch hier die Kolokalisation von Amida und Par-4 an den Spannungsfasern zur Induktion der Apoptose und zu einer verstärkten MLC-Phosphorylierung an der AS Serin<sub>19</sub> führt (Boosen *et al.*, 2005).

### 1.3.3 Das Thioredoxin-ähnliche Protein EFP1

Das humane EFP1 (*EF-hand binding protein 1*)-Protein wurde ursprünglich als Interaktionspartner von Duox (*dual oxidase*) identifiziert, einem Protein, das an der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in der Schilddrüse beteiligt ist. Die Funktion von EFP1 konnte in diesem Zusammenhang allerdings nicht aufgeklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass das EFP1-Protein als Chaperon oder als Mitglied der PDI (*protein disulfide isomerase*)-Familie an der korrekten Faltung der Duox-Proteine im ER beteiligt sein könnte (Wang *et al.*, 2005). In unserer Arbeitsgruppe wurde das Ratten-Ortholog von EFP1 bei der Suche nach neuen Interaktionspartnern des Par-4-Proteins identifiziert (Dissertation Boosen, 2007). Das EFP1-Protein der Ratte besteht aus 947 AS und hat eine molekulare Masse von 110 kDa. Anhand von computergestützten Sequenzanalysen konnte Ansgar Koplín im Rahmen seiner Diplomarbeit (2004) zeigen, dass das Protein im N-Terminus eine ER-Signalsequenz enthält (AS 54-83), das für die Translokation des EFP1-Proteins in das ER-Lumen verantwortlich ist. Des Weiteren beinhaltet das Protein zwei potentielle Thioredoxin-Domänen (THX<sub>1</sub>, AS 104-207; THX<sub>2</sub>, AS 659-764), von denen aber nur die C-terminal gelegene THX<sub>2</sub>-Domäne über ein charakteristisches CXXC-Motiv eines katalytischen Zentrums verfügt. Mit einem Insulin-Disulfid-Reduktionstest konnte eine schwache enzymatische Reduktase-Aktivität für das EFP1-Protein nachgewiesen werden. Des Weiteren befindet sich im C-Terminus des Proteins eine Arginin-reiche Sequenz (AS 814-850), ein Leucin-Zipper-Motiv (AS 834-855) sowie eine potentielle Kernlokalisationssequenz (AS 849-865). Weiterhin konnten anhand der

computergestützten Analysen mehrere potentielle PKC-Phosphorylierungsstellen und N-Glykosylierungsstellen identifiziert werden (Diplomarbeit Koplin, 2004). In der Abb. 5 ist das EFP1-Protein der Ratte schematisch dargestellt.



**Abb. 5: Schematische Darstellung des EFP1-Proteins aus der Ratte.** Das EFP1-Protein umfasst 947 AS. Im N-Terminus befindet sich eine ER-Signalsequenz (ER, AS 54-83), die das Protein kotranslational in das ER-Lumen dirigiert. Des Weiteren besitzt das Protein zwei potentielle Thioredoxin-domänen (THX<sub>1</sub>, AS 104-207 und THX<sub>2</sub>, AS 659-764), wobei nur die C-terminal gelegene Thioredoxin-domäne über das charakteristische CXXC-Motiv eines katalytischen Zentrums verfügt. Im C-Terminus befindet sich eine Arginin-reiche Domäne (Arg, AS 814-850), die mit dem potentiellen Leucin-Zipper (LZ, AS 834-855) überlappt. Zusätzlich enthält das Protein eine potentielle Kernlokalisationssequenz (NLS, AS 849-865).

Das 3,4 kb große EFP1-Transkript wird ubiquitär exprimiert, jedoch konnte eine verstärkte Expression in der Leber nachgewiesen werden (Diplomarbeit Maertens, 2003). Diese Daten stimmen gut mit den Daten von Wang *et al.* (2005) überein, die gezeigt haben, dass das humane Ortholog in allen untersuchten Geweben detektiert werden konnte. Eine besonders starke Expression wurde dabei im Prostatagewebe und in der Schilddrüse gefunden. Ektopisch exprimiertes EFP1 weist sowohl in Ratten-Fibroblasten als auch in Hamster-Fibroblasten eine eindeutige Lokalisation im ER auf, was anhand von immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen durch die Kolo-kalisation von EFP1 mit dem ER-ständigen Protein PDI nachgewiesen werden konnte (Diplomarbeit Koplin, 2004). Auch für das ektopisch exprimierte humane EFP1-Ortholog konnte eine Lokalisation im ER von Hamster-Fibroblasten festgestellt werden (Wang *et al.*, 2005).

## 1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich eine Herunterregulation der Par-4-Expression mittels siRNA bzw. durch den Einsatz dominant-negativer Par-4-Mutanten auf das pro-apoptotische Potential des Par-4-Proteins und auf die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose auswirkt. Da in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass die Par-4-Expression in Tumorzelllinien des zentralen Nervensystems herunterreguliert ist, sollte des Weiteren untersucht werden, ob die Expression von Par-4 und seiner Interaktionspartner Amida, Dlk und EFP1 in primärem Tumorgewebe des Gehirns durch DNA-Methylierung stillgelegt wird. Im zweiten Teil der Arbeit sollte der neue Par-4-Interaktionspartner EFP1 eingehender charakterisiert und der Einfluss von EFP1 auf die pro-apoptotische Funktion von Par-4 analysiert werden.

## 2. MATERIAL

### 2.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen AppliChem, Merck, Roth und Sigma bezogen. Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs, Invitrogen, La Roche, Qiagen und PeqLab bezogen. Die Zellkulturmedien stammten von der Firma Sigma, Plastikmaterial von der Firma Sarstedt. Die Nitrozellulose-Membran für die Western Blot-Technik wurde von der Firma Machery & Nagel und von der Firma Amersham Buchler bezogen.

### 2.2 ALLGEMEINE STAMMLÖSUNGEN UND PUFFER

Nachfolgend aufgeführte Puffer und Lösungen wurden für allgemeine Arbeiten verwendet.

|                                  |  |                                  |
|----------------------------------|--|----------------------------------|
| <b>PBS<sup>+</sup></b> (pH 7,2)  | 8,06 mM  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
|                                  | 1,5 mM   | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |
|                                  | 138 mM   | NaCl                             |
|                                  | 2,7 mM   | KCl                              |
|                                  | 0,9 mM   | CaCl <sub>2</sub>                |
|                                  | 0,5 mM   | MgCl <sub>2</sub>                |
| <b>PBS<sup>-</sup></b> (pH 7,2)  | wie PBS <sup>+</sup> , aber ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub> |                                  |
| <b>TBS (10x)</b> (pH 7,5)        | 1,5 M  | NaCl                             |
|                                  | 100 mM   | Tris                             |
| <b>MOPS (10x)</b> (pH 7,0)       | 200 mM   | MOPS                             |
|                                  | 50 mM  | Natrium-Acetat                   |
|                                  | 10 mM  | EDTA                             |
| <b>DNA/RNA-Ladepuffer (6x)</b>   | 0,25 % (w/v)   | Bromphenolblau                   |
|                                  | 0,25 % (w/v)   | Xylencyanolblau                  |
|                                  | 15 % (w/v)   | Ficoll 400                       |
|                                  | 30 % (v/v)   | Glyzerin                         |
|                                  | 50 mM  | EDTA                             |
| <b>TAE Puffer (50x)</b> (pH 7,9) | 2 M  | Tris                             |
|                                  | 0,83 M   | Borsäure                         |
|                                  | 10 mM  | EDTA                             |
| <b>Tris-Puffer (1x)</b>          | 10 mM  | Tris/HCl pH 8,0                  |

|                                  |  |   |
|----------------------------------|--|---|
| <b>TE-Puffer (1x)</b>            | 10 mM<br>1 mM  | Tris/HCl pH 8,0<br>EDTA   |
| <b>TE Puffer für RNA (1x)</b>    | 10 mM<br>0,5 mM  | Tris/HCl pH 7,4<br>EDTA   |
| <b>RNase-freies Wasser</b>       | 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> mit 1 ml DMDC (> 98 %) versetzen,<br>üN bei RT inkubieren |   |
| <b>TBE Puffer (10x) (pH 8,5)</b> | 1 M<br>0,83 M<br>10 mM   | Tris<br>Borsäure<br>EDTA  |
| <b>Protein-Probenpuffer (5x)</b> | 625 mM<br>100 mM<br>16,5 % (w/v)   | Tris/HCl pH 6,8<br>DTT<br>SDS   |
| <b>NEM</b>                       | 25 mg/ml<br>33 % (v/v)   | NEM<br>Glycerin, gesättigt mit Bromphenolblau (0,1 %<br>(w/v))        |
| <b>SDS-Elektrophoresepuffer</b>  | 0,19 M<br>25 mM<br>0,5 mM  | Glycin<br>Tris<br>SDS   |
| <b>Phosphatlysispuffer (PLP)</b> | 20 mM<br>140 mM<br>3 mM<br>0,5 % (v/v)<br>1 mM   | NaPO <sub>4</sub> pH 8,0<br>NaCl<br>MgCl <sub>2</sub><br>NP-40<br>DTT |

Alle Lösungen wurden in zweifach deionisiertem Wasser (H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) angesetzt und bis auf den Ladepuffer für 20 Minuten bzw. für 1 h für RNA-Arbeiten bei 121 °C autoklaviert.

## 2.3 KULTUR VON BAKTERIEN

### 2.3.1 Bakterienstämme

Alle Bakterienstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind K12-Derivate von *E. coli* und sind nachfolgend unter Angabe von Genotyp und Referenz aufgeführt:

**DH5α** F<sup>-</sup>, hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>-</sup>), lambda<sup>-</sup>, supE44, endA1, thi1, gyrA96.relA1 (Hanahan, 1983)

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>Top10</b>      | F- mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 recA1 araD139 $\Delta$ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG (Invitrogen)             |
| <b>K12 ER2925</b> | ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2 (New England Biolabs) |

### 2.3.2 Medien für die Bakterienkultur

Für die Kultivierung von *E. coli*-Zellen wurden die unten aufgeführten Medien verwendet.

|  |  |
|--|--|
| <b>LB-Medium</b> (pH 7,4)<br>(ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> )  | 10 g Bacto-Trypton<br>5 g Hefe-Extrakt<br>5 g NaCl     |
| <b>LB-Agar</b> (pH 7,4)<br>(ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> )    | 32 g LB-Agar (Invitrogen)                              |
| <b>dYT-Medium</b> (pH 7,0)<br>(ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> ) | 10 g Hefe-Extrakt<br>16 g Trypton<br>5 g NaCl          |
| <b>YB-Medium</b> (pH 7,0)  | dYT-Medium<br>+ 10 mM KCl<br>+ 20 mM MgSO <sub>4</sub> |

Die Medien wurden für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Hitzelabile Zusätze und Selektionsantibiotika wurden sterilfiltriert und erst nach dem Abkühlen des Mediums oder des Agars auf 60 °C hinzugefügt.

|                   | <u>Stammlösung</u>                             | <u>Endkonzentration</u> |
|-------------------|--|-------------------------|
| <b>Ampicillin</b> | 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> | 100 µg/ml               |
| <b>Kanamycin</b>  | 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> | 50 µg/ml                |
| <b>X-Gal</b>      | 40 mg/ml in DMF                                | 80 µg/ml                |

## 2.4 KULTUR VON SÄUGERZELLEN

### 2.4.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden verschiedene Fibroblasten-Zelllinien sowie Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft kultiviert. Die Zelllinien sind nachfolgend unter Angabe ihrer histologischen Herkunft und ihrer Spezies aufgelistet:

| Zelllinie | Spezies | Histologische Herkunft             |
|-----------|---------|------------------------------------|
| A172      | Mensch  | Malignes Gliom                     |
| CHO-K1    | Hamster | Ovar                               |
| DU-145    | Mensch  | Prostatakarzinom                   |
| D283      | Mensch  | Medulloblastom                     |
| D425      | Mensch  | Medulloblastom                     |
| Daoy      | Mensch  | Medulloblastom                     |
| HeLa      | Mensch  | Zervixkarzinom                     |
| H1299     | Mensch  | Osteosarkom                        |
| LN229     | Mensch  | Malignes Gliom                     |
| LN319     | Mensch  | Malignes Gliom                     |
| LN428     | Mensch  | Malignes Gliom                     |
| MCF-7     | Mensch  | Adenokarzinom, Brust               |
| Med8A     | Mensch  | Medulloblastom                     |
| Molt-4    | Mensch  | Leukämische T-Zellen               |
| NIH-3T3   | Maus    | Fibroblast, embryonal              |
| N2A       | Maus    | Neuroblastom                       |
| PC-3      | Mensch  | Prostatakarzinom                   |
| REF52.2   | Ratte   | Fibroblasten                       |
| Saos-2    | Mensch  | Osteosarkom                        |
| SH-SY5Y   | Mensch  | Neuroblastom                       |
| U87-MG    | Mensch  | Malignes Gliom                     |
| U178-MG   | Mensch  | Malignes Gliom                     |
| U251-MG   | Mensch  | Malignes Gliom                     |
| U373-MG   | Mensch  | Glioblastom, Astrozytom, Stufe III |

#### 2.4.2 Medien für die Kultur von Säugerzellen

Die verwendeten Zellkulturlösungen- und Medien wurden von der Firma Sigma bezogen, das FCS stammt von der Firma Invitrogen. Alle Medien wurden vor Gebrauch mit 1 % Pen/Strep versetzt. Nachfolgend sind die Kulturbedingungen der verschiedenen Zelllinien aufgeführt:

| Zelllinie | Zellkulturmedium  | FCS  | Antibiotikum | Weitere Zusätze                             | CO <sub>2</sub> -Gehalt im Inkubator |
|-----------|-------------------|------|--------------|---|--------------------------------------|
| A172      | DMEM              | 10 % | 1 %          | -   | 10 %                                 |
| CHO-K1    | F-12 Ham          | 10 % | 1 %          | -   | 5 %                                  |
| C2C12     | DMEM              | 10 % | 1 %          | -   | 10 %                                 |
| C6        | DMEM              | 10 % | 1 %          | -   | 10 %                                 |
| DU-145    | DMEM              | 10 % | 1 %          | -   | 10 %                                 |
| D283      | DMEM              | 10 % | 1 %          | -   | 10 %                                 |
| E14-2     | DMEM              | 10 % | 1 %          | -   | 10 %                                 |
| HeLa      | MEM               | 10 % | 1 %          | 1 % nicht-essentielle AS<br>2 mM L-Glutamin | 5 %                                  |
| H1299     | DMEM              | 10 % | 1 %          | -   | 10 %                                 |
| MCF-7     | RPMI-1640         | 10 % | 1 %          | -   | 5 %                                  |
| Molt-4    | RPMI-1640         | 20 % | 1 %          | -   | 5 %                                  |
| NIH-3T3   | DMEM high glucose | 10 % | 1 %          | -   | 5 %                                  |
| N2A       | MEM               | 10 % | 1 %          | 1 % nicht-essentielle AS<br>2 mM L-Glutamin | 5 %                                  |
| PC-3      | RPMI-1640         | 10 % | 1 %          | -   | 5 %                                  |
| REF52.2   | DMEM              | 10 % | 1 %          | -   | 10 %                                 |
| Saos-2    | DMEM              | 10 % | 1 %          | -   | 10 %                                 |
| SH-SY5Y   | DMEM              | 15 % | 1 %          | -   | 10 %                                 |

|         |                   |      |     |   |      |
|---------|-------------------|------|-----|---|------|
| U87-MG  | DMEM              | 10 % | 1 % | - | 10 % |
| U178-MG | DMEM              | 10 % | 1 % | - | 10 % |
| U251-MG | DMEM              | 10 % | 1 % | - | 10 % |
| U373-MG | DMEM              | 10 % | 1 % | - | 10 % |
| LN229   | DMEM high glucose | 10 % | -   | - | 5 %  |
| LN319   | DMEM high glucose | 10 % | -   | - | 5 %  |
| LN428   | DMEM high glucose | 10 % | -   | - | 5 %  |

**100x Pen/Strep** (pH 8,2)  
(ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>)

6 g Penicillin  
10 g Streptomycin  
8 g NaCl  
0,4 g KCl  
0,95 g Glukose  
0,35 g NaHCO<sub>3</sub>

**Trypsinlösung** (pH 7,8)  
(ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>)

8 g NaCl  
0,4 g KCl  
0,95 g Glukose  
0,35 g NaHCO<sub>3</sub>  
0,2 g EDTA-Na-Salz  
16 ml Trypsin (2,5 % w/v in PBS<sup>-</sup>)

### 2.4.3 Verwendete Reagenzien für die Zellkultur

Folgende Reagenzien kamen in der Zellkultur zum Einsatz:

| Reagenz                                      | Quelle     | Arbeitskonzentration |
|--|------------|----------------------|
| Ionomycin                                    | Calbiochem | 10 µM                |
| Tunicamycin                                  | Calbiochem | 3 µM                 |
| Thapsigargin                                 | Calbiochem | 2-4 µM               |
| Brefeldin A                                  | Calbiochem | 37,5 µM              |
| Cisplatin (Cis-Diamminedichloroplatin (II))  | Calbiochem | 50 µM                |
| Etoposid                                     | Calbiochem | 17 µM                |
| Staurosporin                                 | Sigma      | 10-200 nM            |
| Interferon γ                                 | Sigma      | 1500 U/ml            |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                | AppliChem  | 1 mM                 |
| C2-Ceramid (N-Acetyl-D-erythro-Sphingosin)   | Biotrend   | 50 µM                |
| C8-Ceramid (N-Octanoyl-D-erythro-Sphingosin) | Biotrend   | 50 µM                |
| DHC (C2-Dihydroceramid)                      | Biotrend   | 50 µM                |
| 5-Aza-2'-deoxycytidin                        | Sigma      | 2,5-5 µM             |

## 2.5 GENOMISCHE DNA AUS PRIMÄREM TUMORGEWEBE

Für die Methylierungsanalyse des Par-4-Promoters wurde uns freundlicherweise von Prof. Büttner (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn) genomische DNA aus primärem Prostatakarzinomgewebe (PCA) verschiedener Patienten zur Verfügung gestellt. Als Referenz für die Untersuchungen wurde genomische DNA, die aus dem Gewebe benigner Prostatahyperplasien (BPH) isoliert wurde, verwendet. Die Kontroll-DNA, die aus peripherem Blut von Patienten mit unterschiedlichem Krankheitsbild gewonnen wurde (REF),

wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Waha (Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt. Alle verwendeten Proben sind nachfolgend zusammengefasst:

| <b>Probe</b> | <b>Spezies</b> | <b>Histologische Herkunft</b> |
|--------------|----------------|-------------------------------|
| REF 2        | Mensch         | Blutzellen                    |
| REF 8        | Mensch         | Blutzellen                    |
| REF 12       | Mensch         | Blutzellen                    |
| PCA 8        | Mensch         | Prostatakarzinom              |
| PCA 11       | Mensch         | Prostatakarzinom              |
| PCA 12       | Mensch         | Prostatakarzinom              |
| PCA 45       | Mensch         | Prostatakarzinom              |
| BPH 3        | Mensch         | benigne Prostatahyperplasie   |
| BPH 7        | Mensch         | benigne Prostatahyperplasie   |
| BPH 10       | Mensch         | benigne Prostatahyperplasie   |
| BPH 14       | Mensch         | benigne Prostatahyperplasie   |
| BPH 15       | Mensch         | benigne Prostatahyperplasie   |

Für die Untersuchung der Promoter-Methylierung des *par-4*-Gens und des *tfpt*-Gens wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Reifenberger (Institut für Neuropathologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) und von der Arbeitsgruppe von Deimling (Institut für Neuropathologie, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg) genomische DNA aus primärem Gliomgewebe verschiedener Patienten zur Verfügung gestellt. Als Referenz für diese Untersuchungen diene genomische DNA, die aus grauer und weißer Substanz des Gehirns von Epilepsiepatienten isoliert wurde (bezeichnet als NB, *normal brain*; Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Bonn). Alle verwendeten Proben sind nachfolgend aufgeführt:

| <b>Probennummer</b> | <b>Histologische Herkunft</b> | <b>WHO-Grad</b> |
|---------------------|-------------------------------|-----------------|
| 158-95              | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 302-95              | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 363-95              | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 836-95              | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 871-95              | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 881-95              | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 1096-95             | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 1107-95             | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 45-96               | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 281-97              | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 819-99              | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 655-01              | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 771-02              | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 490-03              | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 558-03              | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 1037-03             | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |
| 189-98              | Primäres Glioblastom          | GBMIV           |



|         |  |       |
|---------|--|-------|
| 379-99  | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 380-99  | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 409-99  | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 126-01  | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 568-01  | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 832-01  | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 1265-02 | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 785-02  | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 416-03  | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 497-03  | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 1139-03 | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 1248-03 | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 1271-03 | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 1290-03 | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 0002-04 | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 0154-04 | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 0264-04 | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 0374-04 | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 0458-04 | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 0547-04 | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 611-04  | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 740-04  | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 896-04  | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 1235-01 | Primäres Glioblastom                                   | GBMIV |
| 934-96  | Glioblastom, Langzeitüberleber                         | GBMIV |
| 201-98  | Glioblastom, Langzeitüberleber                         | GBMIV |
| 54-91   | Glioblastom, Langzeitüberleber                         | GBMIV |
| 375-01  | Glioblastom, Langzeitüberleber                         | GBMIV |
| 445-96  | Primäres Glioblastom mit sarkomatöser Komponente       | GBMIV |
| 1340-98 | Primäres Glioblastom mit sarkomatöser Komponente       | GBMIV |
| 644-00  | Primäres Glioblastom mit sarkomatöser Komponente       | GBMIV |
| 689-01  | Primäres Glioblastom mit sarkomatöser Komponente       | GBMIV |
| 1246-02 | Primäres Glioblastom mit sarkomatöser Komponente       | GBMIV |
| 706-02  | Primäres Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente | GBMIV |
| 1071-03 | Primäres Glioblastom mit oligodendroglialer Komponente | GBMIV |
| 505-89  | Riesenzellglioblastom                                  | GBMIV |
| 862-89  | Riesenzellglioblastom                                  | GBMIV |
| 76-92   | Riesenzellglioblastom                                  | GBMIV |
| 1113-93 | Riesenzellglioblastom                                  | GBMIV |
| 503-96  | Riesenzellglioblastom                                  | GBMIV |
| 303-89  | Sekundäres Glioblastom                                 | GBMIV |
| 523-92  | Sekundäres Glioblastom                                 | GBMIV |
| H492-94 | Sekundäres Glioblastom                                 | GBMIV |
| 537-94  | Sekundäres Glioblastom                                 | GBMIV |
| 18-96   | Sekundäres Glioblastom                                 | GBMIV |
| 1150-96 | Sekundäres Glioblastom                                 | GBMIV |
| 96-98   | Sekundäres Glioblastom                                 | GBMIV |
| H542-98 | Sekundäres Glioblastom                                 | GBMIV |
| 198-01  | Sekundäres Glioblastom                                 | GBMIV |
| 365-02  | Sekundäres Glioblastom                                 | GBMIV |
| 143(K)  | Sekundäres Glioblastom                                 | GBMIV |
| 630(K)  | Sekundäres Glioblastom                                 | GBMIV |
| 752(K)  | Sekundäres Glioblastom                                 | GBMIV |
| 15-88   | Anaplastisches Astrozytom                              | AAIII |
| H71-95  | Anaplastisches Astrozytom                              | AAIII |
| 1107-97 | Anaplastisches Astrozytom                              | AAIII |

|         |                           |       |
|---------|---------------------------|-------|
| 818-98  | Anaplastisches Astrozytom | AAIII |
| 1205-99 | Anaplastisches Astrozytom | AAIII |
| 202-00  | Anaplastisches Astrozytom | AAIII |
| 811-01  | Anaplastisches Astrozytom | AAIII |
| 895-96  | Anaplastisches Astrozytom | AAIII |
| 570-98  | Anaplastisches Astrozytom | AAIII |
| 1278-94 | Astrozytom                | AII   |
| 282-95  | Astrozytom                | AII   |
| 1220-95 | Astrozytom                | AII   |
| 87-96   | Astrozytom                | AII   |
| 1238-96 | Astrozytom                | AII   |
| 981-00  | Astrozytom                | AII   |
| 1041-01 | Astrozytom                | AII   |
| 403-04  | Astrozytom                | AII   |

## 2.6 PLASMIDE

Folgende Klonierungs- und Expressionsvektoren wurden in dieser Arbeit verwendet:

|  |   |
|--|---|
| <b>pCMV-Tag-2A,B,C</b>                                     | Eukaryontischer Expressionsvektor mit N-terminalem FLAG-Epitop (MDYKDDDDK) (Stratagene)   |
| <b>pEGFP-C1</b>  | Eukaryontischer Expressionsvektor mit N-terminalem GFP (Clontech)   |
| <b>pEGFP-N1</b>  | Eukaryontischer Expressionsvektor mit C-terminalem GFP (Clontech)   |
| <b>pSUPER.neo+gfp</b>                                      | Eukaryontischer siRNA-Expressionsvektor mit H1-Promoter (OligoEngine)   |
| <b>pCR 2.1-TOPO</b>  | linearisierter prokaryontischer Klonierungsvektor, besitzt am 5' und am 3' Ende A-Überhänge, die eine direkte Ligation von PCR-Produkten mit T-Überhängen ermöglicht (Invitrogen) |
| <b>pEGFP-N1-Par-4</b>                                      | Expression von Par-4-GFP (Diplomarbeit Boosen, 2001)  |
| <b>pEGFP-N1-Par4<math>\Delta</math>N<sub>266-332</sub></b> | Expression von Par-4- $\Delta$ N <sub>266-332</sub> -GFP (Dissertation Vetterkind, 2003)  |
| <b>pCMV-Tag2B-Par-4</b>                                    | Expression von FLAG-Par-4 (Diplomarbeit Boosen, 2001)   |
| <b>pCMV-Tag2B-Par-4-T155A</b>                              | Expression von FLAG-Par-4-T155A (Dissertation Boosen, 2007)   |
| <b>pEGFP-C1-Dlk</b>  | Expression von Dlk-GFP (Kögel <i>et al.</i> , 1999)   |
| <b>pGEM-T Easy-Cx</b>                                      | RNA-Expressionsplasmid für murines Connexin 47 (Dissertation Odermatt, 2004)  |
| <b>pGEM-T Easy-Dlk</b>                                     | RNA-Expressionsplasmid für Dlk der Ratte (Diplomarbeit Keller, 2003)  |

|                              |  |
|------------------------------|--|
| <b>pCMV-Tag2B-EFP1</b>       | Expression von FLAG-EFP1 (Diplomarbeit Koplin, 2004)     |
| <b>pEGFP-N1-EFP1</b>         | Expression von EFP1-GFP (Diplomarbeit Koplin, 2004)      |
| <b>pEGFP-N1-Par-4/p33</b>    | Expression von Par-4/p33-GFP (Wang <i>et al.</i> , 2006) |
| <b>pHcRFP-N1/1-Par-4/p38</b> | Expression von Par-4/p38-RFP (Wang <i>et al.</i> , 2006) |

## 2.7 OLIGONUKLEOTIDE

Die verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von der Firma MWG Biotech oder von der Firma Invitrogen synthetisiert. Nachfolgend sind alle Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Klonierungs- bzw. Mutagenese-Experimente eingesetzt wurden, mit Angabe ihrer Schmelztemperatur ( $T_M$ ) und ihrer Position aufgeführt.

| Oligonukleotid       | Sequenz (5'→3')  | Position        | $T_M$ [°C] |
|----------------------|--|-----------------|------------|
| 5' Par4-193-EcoRI    | GGAATTCGCCACCATGGATCCAGCCGCC   | 120-132         | 60         |
| Par4 AgeI reverse    | CCACCGGTCCCCTTGTCAGCTGCC   | 996-983         | 60         |
| 5' PAR4 DASH EcoRI   | CGGAATTCTGGGAACATGGCGACC   | (-9)-9          | 57         |
| 3' Par4-771-AgeI     | CCACCGGTGGATATCTGCC  | 701-694         | 57         |
| 3' Par4-870-AgeI     | CCACCGGTAGATCTTCAAT  | 800-790         | 57         |
| 5' Par4-mut-T164     | AAGCGCCGCTCCGCTGGCGTGGTCAAC  | 451-477         | 50         |
| Par-4-795-775reverse | GAAGCCACTTCTATCTGTTCG  | 703-723         | 50         |
| PAR4-bs-f1           | TTTAGTTATTTTTGAATTATTAT  | (-1276)-(-1253) | 54         |
| PAR4-bs-r1           | ACATTCCTAAACTAACAA   | (-1055)-(-1072) | 54         |
| Par4-bs-f1-M13       | CACGACGTTGTAACGACTTTAGTTAT<br>TTTTTGAATTATTAT                        | (-1276)-(-1253) | 50         |
| Par4-bs-r4-M13       | GGATAACAATTCACACAGGCTACAAC<br>CTACCCTA                               | (-958)-(-972)   | 50         |
| 5' siKawSuper        | GATCCCCGATGCAATTACACAACAGATT<br>CAAGAGATCTGTTGTGTAATTGCATCTTT<br>TTA | 577-595         | -          |
| 3' siKawSuper        | AGCTTAAAAAGATGCAATTACACAACAG<br>ATCTCTTGAATCTGTTGTGTAATTGCATC<br>GGG | 595-577         | -          |
| 5' K53NT/Hind        | CCCAAGCTTATGTCGGAATGCGGA   | 1-15            | 65         |
| 3' K53mutATG         | CTGGCGCGCACTAAGCGAGGC  | 171-151         | 65         |
| 5' K53mutATG         | GCCTCGCTTAGTGCAGCGCCAG   | 151-171         | 65         |
| 3' Klon53hScaI       | GAAGGTCAAGTATCCAGGAGGCTGG  | 750-726         | 65         |
| 5' EFP1 ScaI         | AAAAGTACTCGGCTACTTCGAATTCAG  | 694-716         | 53/56      |
| 3' EFP1 Asn295Ser    | CAAGTGATGTGGAGAAATGTCTATG  | 895-871         | 53         |
| 5' EFP1 Asn295Ser    | CATAGACATTTCTCCACATCACTTG  | 871-895         | 53         |
| 3' EFP1 XbaI         | AATAAAAGACTCTAGAGTGAGCTTCACG   | 1896-1869       | 53/53      |
| 3' EFP1 Asn443Ser    | CACTGACTGGGAGACACACAGCTC   | 1338-1315       | 56         |
| 5' EFP1 Asn443Ser    | AGCTGTGTGTCTCCAGTCAGTGG  | 1316-1339       | 56         |
| 5' Klon53Q2          | CCCCATGAGTGCTGTTTACATT   | 582-603         | 55         |
| 3' Klon53Q2          | CGTACTGTTCCCTAGGTAATC  | 800-781         | 55         |
| TCF3-cDNA-f          | GAATTGGAGCAGAGAGAAGG   | 4-23            | 50         |
| TCF3-cDNA-r          | TGCGATTTAATTCCCCTGG  | 238-219         | 50         |
| TFPT-bs-3f           | AGATTTTTGGGTAAATAGGTTGTAA  | (-1263)-(-1239) | 56         |
| TFPT-bs-2r           | CCTCCCAAATACTATAATTACAAA   | (-886)-(-910)   | 56         |
| ZIPK-cDNA-f          | GGTGCATCACCTATATCCTCC  | 610-631         | 54         |
| ZIPK-cDNA-r          | GGGCAATGGTCATTCTCCGC   | 802-782         | 54         |

|               |                          |                 |    |
|---------------|--------------------------|-----------------|----|
| huZIP-bs-f    | TTGGAGGGTTGGGTGGGGTT     | (-1262)-(-1243) | 56 |
| huZIP-bs-r    | AACCTTACCCATCCCTAAAA     | (-1001)-(-1082) | 56 |
| ZIPK-bs-f3    | TTAGGGTTTATTTTAGGAGTTGTT | (-1795)-(-1772) | 54 |
| ZIPK-bs-r3b   | AATACAACCTCACCCTAACTA    | (-1511)-(-1535) | 54 |
| β-Aktin-USP   | CGTGGGCCGCCCTAGGCACCAG   | 182-203         | 60 |
| β-Aktin-DSP   | TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG   | 424-403         | 60 |
| ratGAPDH-for  | AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC | 884-861         | 50 |
| ratGAPDH-rev  | CGGTGTGAACGGATTTGGCCGTAT | 1167-1144       | 50 |
| β2-MG-for     | TGTCTTTCAGCAAGGACTGG     | 221-240         | 57 |
| β2-MG-rev     | GATGCTGCTTACATGTCTCG     | 349-368         | 57 |
| BiP-FORMO/HU  | GAAAGGATGGTTAATGATGCTGAG | 1618-1641       | 55 |
| BiP-REVRAT/MO | GTCTTCAATGTCCGCATCCTG    | 1828-1848       | 55 |
| 921 M13r      | CAGGAAACAGCTATGAC        | -               | 55 |
| 920 M13s      | TTGGGTAACGCCAGGGT        | -               | 55 |

## 2.8 FLUORESZENSMARKIERTE siRNA-MOLEKÜLE

Für die Ausschaltung von endogenem Par-4 in der Zellkultur wurden synthetisch hergestellte siRNA-Moleküle von der Firma Dharmacon verwendet. Diese trugen in ihrem 3'-Bereich 2 nt lange Uridin-Überhänge und waren in ihrem 5'-Bereich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert. Anhand der Markierung konnten transfizierte Zellen mikroskopisch identifiziert werden. Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 keinen Einfluss auf die Aktivität der siRNA ausübt (Dunne *et al.*, 2003). Da die Moleküle bereits hybridisiert vorlagen, wurden sie nur in *siRNA Universal Buffer* (Dharmacon) gelöst. Die Sequenz für die siRNA gegen humanes Par-4 wurde aus der Veröffentlichung von Kawai *et al.* (2003) übernommen. Für das Ratten-Ortholog von Par-4 wurde die gleiche Sequenz ausgewählt, diese allerdings an die Ratten-Sequenz angepasst, die sich in mehreren Basen von dem humanen Ortholog unterschied.

### siRNA-Molekül gegen das humane Par-4, hybridisiert

5' Cy3-GAUGCAAUUACACAACAGA-UU 3'  
 3' UU-CUACGUUAAUGUGUUGUCU-Cy3 5'

### siRNA-Molekül gegen Par-4 aus der Ratte, hybridisiert

5' Cy3-GAUGCUAUCACACAGCAGAUU-UU 3'  
 3' UU-CUACGAUAGUGUGUCGUCU-Cy3 5'

## 2.9 ANTIKÖRPER

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind neben ihrer Bezugsquelle nachfolgend aufgeführt. Die verwendeten Verdünnungen für Immunfluoreszenz (IF)- und Western Blot (WB)-Analysen sind angegeben. Für die Immunpräzipitation (IP) ist die pro mg Gesamtprotein eingesetzte Antikörpermengung aufgeführt.

| <b>Erstantikörper</b>   | <b>Spezies</b>            | <b>Quelle</b>       | <b>IF</b> | <b>WB</b> | <b>IP</b> |
|-------------------------|---------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|
| anti-FLAG-M2            | Maus<br>(monoklonal)      | Stratagene          | 1:10000   | 1:5000    | 1 µl/mg   |
| anti-GFP mono           | Maus<br>(monoklonal)      | Clontech            | -         | 1:2000    | -         |
| anti-GFP poly           | (Kaninchen)<br>polyklonal | Clontech            | -         | -         | 0,5 µl/mg |
| anti-Par-4              | Kaninchen<br>(polyklonal) | Santa Cruz          | 1:2000    | 1:5000    | -         |
| anti-cleaved Caspase-3  | Kaninchen<br>(monoklonal) | New England Biolabs | -         | 1:1000    | -         |
| anti-phospho-MLC 2      | Kaninchen<br>(polyklonal) | New England Biolabs | -         | 1:1000    | -         |
| anti- $\alpha$ -Tubulin | Maus<br>(monoklonal)      | Sigma               | -         | 1:7500    | -         |
| anti-ZIPK               | Kaninchen<br>(polyklonal) | Calbiochem          | -         | 1:2000    | -         |

| <b>Zweitantikörper</b>   | <b>Spezies</b> | <b>Quelle</b>    | <b>IF</b> | <b>WB</b> |
|--------------------------|----------------|------------------|-----------|-----------|
| anti-Maus-HRP            | Ratte          | Nordic           | -         | 1:5000    |
| anti-Kaninchen-HRP       | Ziege          | Nordic           | -         | 1:10000   |
| anti-Maus-Cy3            | Ziege          | Dianova          | 1:2000    | -         |
| anti-Kaninchen-Cy3       | Ziege          | Dianova          | 1:2000    | -         |
| anti-Kaninchen-Alexa 488 | Ziege          | Molecular Probes | 1:2000    | -         |

## 3. METHODEN

### 3.1 ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

#### 3.1.1 Präparation von Nukleinsäuren

##### 3.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* nach Birnboim & Doly

Zur Präparation von Plasmid-DNA in geringem Maßstab (10 µg) wurde die Methode nach Birnboim & Doly (1979, modifiziert) angewandt. Es wurden 1 ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum in ein Reaktionsgefäß gefüllt, mit einer transformierten *E.coli*-Einzelkolonie angeimpft und üN bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Zur Sicherung der Klone wurde die gleiche Bakterienkolonie parallel auf eine LB-Agarplatte mit entsprechendem Selektionsmedium ausgestrichen und ebenfalls üN bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienkultur wurde 1 Min bei 16000 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl Lösung 1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 (1 % SDS (w/v), 0,2 M NaOH) wurde das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert und der Ansatz für 5 Min bei RT inkubiert. Unter diesen alkalischen Bedingungen werden die Zellen lysiert und die DNA sowie die Proteine denaturiert. Durch Zugabe von 150 µl Lösung 3 (3M KAc, pH 5,5) und sofortiges Invertieren wird eine Neutralisation der Lösung erreicht, so dass die DNA während der folgenden 5 Min Inkubationszeit auf Eis wieder renaturieren kann. Anschließend wurden die denaturierten Proteine sowie die genomische DNA für 10 Min bei 16000 x g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dem Überstand wurde zur Fällung der Plasmid-DNA das 0,7 fache des Volumens Isopropanol abs. zugegeben und für 10 Min bei RT inkubiert. Die gefällte DNA wurde anschließend 10 Min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet in eiskaltem 70 %-igen Ethanol gewaschen. Die gereinigte DNA wurde bei 55 °C getrocknet und in 1x TE-Puffer gelöst.

##### 3.1.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* durch Affinitätschromatographie

Um Plasmid-DNA in großen Mengen (200-300 µg) und mit hohem Reinheitsgrad zu isolieren, wurde das *Jetstar Plasmid DNA Purification Kit* (Genomed) verwendet. 25 ml LB-Medium wurden mit einer transformierten *E.coli*-Einzelkolonie angeimpft und üN bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Bakterienkultur wurde 10 Min bei 3500 x g bei RT abzentrifugiert. Resuspension, Lyse und Proteinfällung erfolgten nach Angaben des Herstellers mit den Lösungen des Kits. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie über Silikat-Säulen. Die von den Säulen eluierte DNA wurde mit

0,7 Volumen Isopropanol abs. gefällt und durch Zentrifugation (30 Min 25000 × g, 4 °C) pelletiert. Nach einem Waschschriff mit eiskaltem 70 %-igen Ethanol und 10 minütiger Zentrifugation wie oben wurde die DNA getrocknet und in 200-300 µl 1x TE-Puffer aufgenommen.

### 3.1.1.3 Präparation von Gesamt-RNA mit TRIzol aus Säugerzellen

Die Präparation der RNA aus Säugerzellen wurde mit TRIzol (Invitrogen) durchgeführt. Dazu wurde eine konfluent bewachsene große Zellkulturschale (LP, 10 cm Durchmesser) 3x mit eiskaltem PBS<sup>+</sup> gewaschen, die Zellen mit 1 ml TRIzol auf der LP für 5 Min bei RT lysiert, mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Alternativ wurden bereits abgelöste Zellen im Medium von der Platte geschabt, 3 Min bei 150 x g sedimentiert und 3x mit eiskaltem PBS<sup>+</sup> gewaschen. Die Lyse mit 1 ml TRIzol erfolgte bei diesem Vorgehen im Reaktionsgefäß. Die Extraktion von Proteinen und genomischer DNA erfolgte durch Zugabe von 200 µl Chloroform, gründliches Mischen und nachfolgender Phasentrennung durch 3 minütige Inkubation bei RT und 5 minütiger Zentrifugation bei 16000 × g. Die obere, wässrige Phase wurde zur Fällung der RNA mit 500 µl Isopropanol versetzt und 10 Min bei 16000 × g und 4 °C zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit eiskaltem 70 %-igem Ethanol und Zentrifugation (10 Min 9000 × g, 4 °C) wurde die RNA leicht angetrocknet und bei 65 °C in RNase-freiem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst. Als Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurde 1 µl auf ein Agarosegel aufgetragen und kontrolliert, ob die 28S und 18S RNA als Hauptbande auftraten. Um auszuschließen, dass auch genomische DNA isoliert wurde, wurde mit Hilfe der aus der RNA hergestellten cDNA eine Aktin-PCR durchgeführt (siehe Punkt 3.1.7).

### 3.1.1.4 Präparation von genomischer DNA aus Säugerzellen

Um genomische DNA aus Säugerzellen zu präparieren, wurden 4 konfluent bewachsene Zellkulturschalen (LPs) 2x mit PBS<sup>+</sup> gewaschen, die Zellen mit einem Gummischaber abgeschabt, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 150 x g (5 Min bei RT) sedimentiert. Für die Präparation von genomischer DNA aus Suspensionszellen wurden Zellen aus einer 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche verwendet. Die Zellen wurden zusammen mit dem Medium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, bei 150 x g (5 Min bei RT) sedimentiert und das Zellpellet 2x mit PBS<sup>+</sup> gewaschen. Die Lyse der pelletierten Zellen erfolgte in 10 ml eiskaltem Lysis-Puffer (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) für 15 Min auf Eis. Die Zellkerne wurden durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 150 x g und 4 °C

sedimentiert und mit 3 ml Kern-Lysis-Puffer (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8,2) gewaschen. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Zellkerne und die proteolytische Spaltung der Proteine durch die Zugabe von 3,4 ml Kern-Lysis-Puffer, 220 µl 10 %-iger SDS-Lösung und 555 µl Proteinase K-Lösung (1 % (w/v) SDS, 2 mM EDTA, 3 mg/ml Proteinase K) und Inkubation bei 37 °C üN in einem Drehinkubator. Am nächsten Tag wurden die Proteinfragmente unter Zugabe von 1,1 ml gesättigter NaCl-Lösung und starkem Schütteln für 15 s denaturiert und bei 3500 x g für 30 Min abzentrifugiert. Durch die Zugabe von 5 ml Isopropanol abs. wurde die genomische DNA aus dem Überstand gefällt („DNA-Flocke“). Die gefällte genomische DNA wurde mit Hilfe einer gebogenen Glas-Pasteurpipette aus der Lösung gefischt, in 1 ml eiskalten 70 %-igen Ethanol überführt und gewaschen. Das DNA-Pellet wurde nach kurzer Trocknung an der Luft in 100-200 µl 1x TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und bei 4 °C gelagert.

### **3.1.2 Enzymatische Behandlung von DNA**

#### **3.1.2.1 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Für die Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet, die kurze palindromische Sequenzen erkennen. Innerhalb dieser Sequenz katalysieren sie die Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung in jedem DNA-Strang, so dass DNA-Fragmente mit glatten oder mit überhängenden Enden entstehen (Sambrook *et al.*, 1989). Für den Restriktionsverdau wurde 1 U Enzym/µg DNA in einem Ansatzvolumen von 10-50 µl eingesetzt und im mitgelieferten Puffersystem und bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

#### **3.1.2.2 Glätten von DNA-Fragmenten mit 5'-Überhängen**

Mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase können überhängende Enden von DNA-Fragmenten geglättet werden. Das Enzym ist durch die Wahl entsprechender Reaktionsbedingungen in der Lage, sowohl 5'-Überhänge aufzufüllen wie auch 3'-Überhänge abzuspalten. In dieser Arbeit wurde die T4-DNA-Polymerase nur zum Glätten von 5'-Überhängen eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden 1 µg DNA zusammen mit 100 µM dNTPs, 50 µg/ml BSA und 1x T4-DNA-Polymerase-Puffer für 5 Min bei 37 °C vorinkubiert und anschließend 1U T4-DNA-Polymerase zugegeben. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei 12 °C wurde das Enzym für 15 Min bei 75 °C hitzeinaktiviert.

#### **3.1.2.3 Dephosphorylierung von DNA**

Um eine Religation eines zuvor durch Restriktionsendonukleasen gespaltenen Vektors zu verhindern, sollten die Phosphatreste am 5'-Ende linearisierter DNA vor der Ligation entfernt



werden. Dazu wurde die antarktische Phosphatase verwendet. Die Reaktion erfolgte unter Zugabe von 1 U Enzym/ $\mu\text{g}$  DNA für 15 Min bei 37 °C für 5'-Überhänge oder glatte Enden oder für 1 h bei 3'-Überhängen. Anschließend wurde das Enzym für 5 Min bei 65 °C inaktiviert.

### 3.1.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Veresterung einer endständigen 5'-Phosphorylgruppe mit einer endständigen 3'-Hydroxylgruppe, so dass DNA-Fragmente kovalent miteinander verknüpft werden. Diese Technik erlaubt die Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$ , in dem das zu inserierende DNA-Fragment und das Plasmid in einem molaren Verhältnis von 3:1 und in einer Gesamtmenge von maximal 100 ng DNA zusammen mit 0,5 U T4-DNA-Ligase (Promega) entweder  $\mu\text{N}$  bei 16 °C oder 1 h bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz für die Transformation in Bakterien verwendet.

### 3.1.3 Transformation von Bakterien

#### 3.1.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien nach Hanahan (1983)

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurden 50 ml vorgewärmtes YB-Medium mit 50-100  $\mu\text{l}$  einer  $\mu\text{N}$ -Vorkultur angeimpft und im Schüttler bei 37 °C bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5-0,6 kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde 10 Min auf Eis abgekühlt und anschließend 10 Min bei 2800 x g und 4 °C abzentrifugiert. Nach der Dekantierung des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 10 ml eiskaltem TFB I resuspendiert und für 10 Min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde anschließend wie oben abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 2 ml eiskalter TFB II-Lösung resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden zu je 100  $\mu\text{l}$  in Reaktionsgefäße aliquotiert, im Ethanol-Trockeneisbad oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

| TFB-Puffer I |                      | TFB-Puffer II |                   |
|--------------|----------------------|---------------|-------------------|
| 30 mM        | NaAc oder KAc pH 6,0 | 10 mM         | MOPS pH 7,0       |
| 50 mM        | MnCl <sub>2</sub>    | 75 mM         | CaCl <sub>2</sub> |
| 100 mM       | NaCl                 | 10 mM         | NaCl              |
| 10 mM        | CaCl <sub>2</sub>    | 15 % (v/v)    | Glyzerin          |
| 15 % (v/v)   | Glyzerin             |               |                   |

### 3.1.3.2 Transformation von Bakterien nach Hanahan (1983)

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit der zu transformierenden DNA (1 ng Plasmid-DNA oder 10 µl mit 100 ng Ligationsansatz) vermischt. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Bakterien einem Hitzeschock für 75 s bei 42 °C unterzogen und sofort wieder 2 Min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 900 µl LB-Medium versetzt und für 30-60 Min bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Inkubationszeit ermöglicht den transformierten Bakterien die Expression des Antibiotika-Resistenzgens. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert, der Überstand bis auf ca. 100 µl dekantiert und das Zellpellet im verbleibenden Medium resuspendiert. Der Ansatz wurde nun auf Antibiotika-haltige LB-Agarplatten ausgestrichen und üN bei 37 °C inkubiert. Zur langfristigen Aufbewahrung wurde die Bakterienkultur mit Glycerin (Endkonzentration 15 % (v/v)) versetzt und bei -80 °C gelagert.

### 3.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

#### 3.1.4.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA in Agarosegelen

Da sowohl DNA als auch RNA eine negative Ladung aufweisen, können sie in einem elektrischen Feld anhand ihrer Fragmentlänge aufgetrennt werden. Je nach Fragmentlänge der DNA und RNA wurden Agarosegele von 0,8-4 % (w/v) in TAE-Puffer verwendet. Zur Visualisierung der DNA- und RNA-Fragmente wurde dem Agarosegel der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,4 µg/ml zugegeben. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert zwischen zwei benachbarten Basenpaaren der DNA und wird mit Hilfe eines UV-Transilluminators (*Image Master VDS*, Pharmacia) angeregt. Die Elektrophorese erfolgte bei 10-15 V/cm Lauffront in TAE-Puffer. Als Größenstandard bei der DNA- oder RNA-Auftrennung wurden die 100 bp DNA-Leiter und die 1 kb DNA-Leiter von Peqlab, die 50 bp DNA-Leiter von Fermentas oder der *PUC19*-Standard der Firma Fermentas verwendet. Um die Intensität von DNA-Banden im Agarosegel zu quantifizieren, wurden die entsprechenden Agarosegele mit Hilfe eines Computerprogramms digitalisiert. Anschließend wurde die Intensität jeder einzelnen DNA-Bande mit dem Programm *ImageMaster TotalLab v2.01* ermittelt.

#### 3.1.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von siRNA-Molekülen

Die gelelektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung der ca. 21-23 bp langen siRNA-Moleküle (siehe 3.6) erfolgte in 12%-igen Polyacrylamidgelen (PAA-Gel). Für die

Herstellung des PAA-Gels wurden 8 ml 30% Acrylamid-Bisacrylamid (Verhältnis von 37,5:1), 2 ml 10x TBE-Puffer, 10 ml H<sub>2</sub>O, 125 µl APS (10 % (w/v)) und 6 µl TEMED eingesetzt. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proben mit 6x Ladepuffer versetzt. Die Gelelektrophorese wurde in TBE-Puffer bei 125 V für ca. 1 h durchgeführt. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde die RNA mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TBE-Puffer für 20 Min angefärbt. Die Detektion der siRNA-Moleküle erfolgte unter UV-Licht (UV-Handlampe, 312 nm). Als Größenstandard wurde die 50 bp DNA-Leiter der Firma Fermentas verwendet.

### **3.1.5 Reinigung, Konzentrierung und Mengenbestimmung von Nukleinsäuren**

#### **3.1.5.1 Phenol/Chloroform-Aufreinigung von DNA**

Für die Reinigung der DNA von Proteinen wurde die DNA-Lösung mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt, mit 500 µl Phenol/Chloroform (1 Volumenanteil Phenol, 1 Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol pH 7,5) versetzt und der Ansatz 20 s kräftig durchmischt. Durch eine Zentrifugation für 5 Min bei 16000 x g und 4 °C wurde die wässrige, DNA-haltige Phase abgetrennt (obere Phase) und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Phase wurde mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24 Volumenanteile Chloroform, 1 Volumenanteil Isoamylalkohol, pH 7,5) versetzt und 20 s kräftig durchmischt. Die DNA-haltige wässrige Phase wurde durch Zentrifugation wie oben abgetrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde dem Ansatz das 2 ½ fache Volumen Ethanol abs. sowie 2 M Ammoniumacetat zugefügt. Die DNA wurde bei 16000 x g und 4 °C für 20 Min pelletiert und anschließend mit eiskaltem 70 %-igen Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde bei 55 °C getrocknet und in 1x Tris-Puffer aufgenommen.

#### **3.1.5.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung und Isolierung der entsprechenden DNA-Fragmente aus präparativen Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *MinElute Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers. Die DNA wurde in 10-30 µl 1x Tris-Puffer aufgenommen.

#### **3.1.5.3 Natriumacetat-Fällung von Nukleinsäuren**

Zur Fällung von Nukleinsäuren wurde die Methode nach Sambrook *et al.* (1989) angewandt. Die DNA- oder RNA-Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3M NaAc (pH 5,5) und 2 ½ fachem Volumen Ethanol abs. für 30 Min oder üN bei -20 °C gefällt. Anschließend wurden die gefällten Nukleinsäuren durch Zentrifugation (16000 x g, 10 Min, 4 °C) pelletiert, der Überstand verworfen, das DNA/RNA-Pellet in eiskaltem 70 %-igen Ethanol gewaschen und

die luftgetrocknete DNA/RNA bei RT in einem geeigneten Volumen  $H_2O_{\text{bidest}}$  oder in entsprechendem 1x TE-Puffer aufgenommen.

#### 3.1.5.4 Konzentrations- und Reinheitsgradbestimmung von Nukleinsäuren

Anhand einer photometrischen Messung können sowohl die Konzentration wie auch der Reinheitsgrad einer DNA- sowie einer RNA-Lösung bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum dsDNA sowie von RNA liegt bei 260 nm, das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Eine  $OD_{260}$  Einheit ist definitionsgemäß die DNA- oder RNA-Menge, die in 1 ml Wasser gelöst, im Spektralphotometer (1 cm Schichtdicke der Küvette) bei 260 nm einen Absorptionswert von 1,0 erzeugt. Dabei entspricht eine  $OD_{260}$  näherungsweise 50  $\mu\text{g}$  dsDNA bzw. 40  $\mu\text{g}$  RNA (Sambrook *et al.*, 1989). Anhand des Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  wird der Reinheitsgrad einer DNA-Lösung bestimmt: Bei einer reinen DNA-Lösung liegt der Wert des Quotienten zwischen 1,8 bis 2. Je kleiner der Wert wird, desto stärker ist die Proteinverunreinigung. Bei einem Quotienten von 1,5 liegen DNA und Protein in einem Verhältnis von ca. 1:1 vor. Liegt der Wert über 2, so ist die DNA-Probe stark mit RNA kontaminiert.

#### 3.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das *in vitro* Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde für die exponentielle Amplifikation definierter DNA-Abschnitte aus einer geringen DNA-Ausgangsmenge verwendet. Durch wiederholte Folgen von Denaturierung, Hybridisierung mit synthetischen Oligonukleotiden und Strang-Synthese mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase führt die PCR zu einer Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts. Für die PCR-Reaktion wurden synthetische Oligonukleotide verwendet, die über einen Bereich von ca. 10-30 Basen zu den 5'- bzw. 3'-Enden der zu amplifizierenden DNA homolog sind. Bevorzugt wurde ein DNA-Bereich gewählt, der einen GC-Gehalt von 40-60 % aufweist. Die Schmelztemperatur  $T_M$  der Oligonukleotide lässt sich nach folgender vereinfachter Formel berechnen:

$$T_M = 59,9 + (0,41 \times \text{GC-Gehalt [\%]}) - (600/\text{Primer-Länge [bp]}).$$

Der Bereich der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids sollte zwischen 50 °C und 60 °C liegen, außerdem sollte sich die Schmelztemperatur eines Oligonukleotid-Paares so wenig wie möglich unterscheiden. Einige der hier verwendeten Oligonukleotide enthielten an ihrem 5'-Überhang zusätzlich eine Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen, wodurch die nachfolgende Klonierung der amplifizierten PCR-Produkte in ein Plasmid ermöglicht wurde.

Die PCR wurde in einem *TGradient*-Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Je nach Anwendung wurden die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Promega), (die *Hot Star Taq* (Qiagen) oder das *GC-rich PCR System* (Roche) verwendet. Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich im Allgemeinen wie folgt zusammen und wurde nach den angegebenen Bedingungen durchgeführt:

| PCR-Ansatz    |                                    | PCR-Bedingungen |           |                           |
|---------------|------------------------------------|-----------------|-----------|---------------------------|
| 1-10 ng       | Matrizen-DNA                       | 95 °C           | 5-15 Min  | Anfangs-Denaturierung     |
| je 20-50 pmol | Oligonukleotide                    | 95 °C           | 45 s      | Denaturierung             |
| 200 µM        | je dNTP (PeqLab)                   | x °C            | 0,5-1 Min | Oligonukleotid-Anlagerung |
| 1,5-2,5 mM    | MgCl <sub>2</sub>                  | 72 °C           | y Min     | Elongation                |
| 1x            | PCR-Puffer                         | 72 °C           | 7-10 Min  | Abschlusselongation       |
| 1,5-2,5 U     | DNA-Polymerase                     |                 |           |                           |
| ad 50 µl      | H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> |                 |           |                           |

} x 25-45

\* x = T<sub>M</sub>; \* y = 1 Min/kb PCR-Produkt

### 3.1.7 Umschreiben von RNA in cDNA und RT-PCR

Zur Expressionsanalyse von Genen im Zellkulturmodell wurde die RT-PCR angewendet. Die präparierte Gesamt-RNA (siehe 3.1.1.3) wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase *Superscript<sup>TM</sup> II* (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Diese Methode basiert darauf, dass die meisten Gen-Transkripte an ihrem 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz besitzen. Bei der RT-Reaktion wird deshalb ein Oligo-dT-Oligonukleotid eingesetzt, das an die Poly-A-Schwänze der mRNAs bindet. Von diesem Oligonukleotid ausgehend synthetisiert die Reverse Transkriptase dann die entsprechende cDNA. Die mRNA aus 2,5 µg Gesamt-RNA wurde mit 200 U der Reversen Transkriptase umgeschrieben. Um zu überprüfen, ob die cDNA frei von genomischen Verunreinigungen war, wurde eine Kontroll-PCR mit den Oligonukleotiden *β-Aktin-USP* und *β-Aktin-DSP* durchgeführt. Diese Oligonukleotide flankieren eine Intron-Sequenz des *β-Aktin*-Gens. Ist das Intron durch Spleißen entfernt, so entsteht ein PCR-Produkt mit einer Größe von 243 bp. Weist die umgeschriebene cDNA noch genomische Verunreinigungen auf, so entsteht durch die Anwesenheit des Introns ein zusätzliches PCR-Produkt von 330 bp Länge. War die cDNA frei von genomischen Verunreinigungen, wurde sie für RT-PCR- Analysen eingesetzt. Das Gen, dessen Expression untersucht werden sollte, wurde mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert, wobei die cDNA als Matrize diente. Um verschiedene Ansätze (zum Beispiel aus verschiedenen Zelllinien) vergleichen zu können, wurde ein Abgleich mit Oligonukleotiden für das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder für *β2-*

Mikroglobulin mitgeführt. Die RT-PCR-Analyse und der Abgleich erfolgten in zwei getrennten PCR-Ansätzen.

### 3.1.8 Real-Time RT-PCR Analyse

Um den Expressionsstatus von TFPT in Gliomgewebe von verschiedenen Patienten zu bestimmen, wurde die Real-Time RT-PCR-Analyse angewendet. Diese Untersuchung wurde freundlicherweise von Dr. Jörg Felsberg (Institut für Neuropathologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) durchgeführt. Bei der Amplifikation eines DNA-Fragments aus der cDNA von TFPT wurden die Oligonukleotide 5' CGGAGATGGAATTGGAGCAG 3' und 5'GATGTGGCCACCAAATAGGG 3' verwendet, für die Amplifikation eines Par-4-Fragments wurden die Oligonukleotide 5'-CGGATCCCAGCCCTACG-3' und 5'-GGATGC CAGGAGACGACC-3' verwendet. Während des Amplifikationsprozesses wurde die eingebaute Menge des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR green* (Applied Biosystems) in den dsDNA-Strang quantitativ mit dem *ABI PRISM 5700* (Applied Biosystems) bestimmt. Als Mengenabgleich wurde die Expressionsmenge von *ARF1 (ADP-ribosylation factor 1)* bestimmt. Als Kontrolle für die Proben aus Gliomgewebe diente Gesamt-RNA, die aus folgenden Gehirngeweben isoliert wurde: Gesamt-Gehirn, zerebraler Kortex, Frontallappen des Cerebellum, Corpus Callosum, Temporallappen, Okzipitallappen (BioChain Institute Inc., Hayward, CA, USA), embryonales Gehirn (Clontech), MVP Gesamt-Gehirn (Stratagene) und Gesamt-Gehirn (BD Biosciences).

### 3.1.9 Oligonukleotid-Hybridisierung

Um die siRNA-Oligonukleotide 5' siKawSuper und 3' siKawSuper gegen Par-4 in den pSUPER.neo+gfp Vektor klonieren zu können, musste zunächst eine Hybridisierung der Oligonukleotide vorgenommen werden. Dazu wurden die Oligonukleotide zuerst in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgenommen (100 µM Endkonzentration), je 1 µl der Sinn- und Gegensinn-Oligonukleotide zusammen mit 48 µl Annealing-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,4) vermischt und 4 Min bei 90 °C erhitzt, um unspezifische Anlagerungen zu lösen. Danach wurde der Ansatz zunächst für 10 Min bei 70 °C, dann für 15-20 Min bei 37 °C inkubiert und anschließend langsam auf RT abgekühlt.

## 3.2 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

### 3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden, da ihre natürliche

Konformation sowie ihre Eigenladung aufgrund der Anlagerung von negativ geladenen SDS-Molekülen vernachlässigt werden kann (Laemmli, 1970). Die Proteine wurden bei der hier angewandten so genannten diskontinuierlichen Elektrophorese zunächst in einem Sammelgel mit 4,5 % Polyacrylamid und einem pH-Wert von 6,8 bei 17 mA auf eine Lauffront konzentriert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte dann in Abhängigkeit von ihrer Molekularmasse in einem Trenngel mit Polyacrylamid-Konzentrationen von 7,5-12,5 % und einem pH-Wert von 8,8 bei einer Stromstärke von 34 mA.

| <b>Sammelgelpuffer (pH 6,8)</b> |      | <b>Trenngelpuffer (pH 8,8)</b> |      |
|---------------------------------|------|--------------------------------|------|
| 0,5 M                           | Tris | 1,5 M                          | Tris |
| 0,4 % (w/v)                     | SDS  | 0,4 % (w/v)                    | SDS  |

| <b>Sammelgel</b> |                                    | <b>Trenngel (10 %)</b> |                                    |
|------------------|------------------------------------|------------------------|------------------------------------|
| 820 µl           | Sammelgelpuffer                    | 3,4 ml                 | Trenngelpuffer                     |
| 2 ml             | H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> | 5,7 ml                 | H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> |
| 500 µl           | Acrylamidlösung*                   | 4,5 ml                 | Acrylamidlösung*                   |
| 10 µl            | APS 10 % (w/v)                     | 68 µl                  | APS 10 % (w/v)                     |
| 3,5 µl           | TEMED                              | 3,4 µl                 | TEMED                              |

\*Acrylamidlösung. 30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid

Zur Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE wurden diese mit Protein-Probenpuffer versetzt und für 3 Min bei 100 °C inkubiert. Das DTT im Probenpuffer reduziert die Disulfidbrücken in den Proteinen zu Sulfhydrylgruppen. Um eine Reoxidation der Disulfidbrücken zu verhindern, wurde den Proben nach dem Kochen 1/3 Volumen NEM zugesetzt, das zu einer Alkylierung der freien Sulfhydryl-Gruppen führt. Die Inkubation mit NEM erfolgte für 15 Min (RT). Als Größenstandard bei der Auftrennung der Proteinproben in einer SDS-PAGE wurde der *Prestained Precision Plus Protein Standard* von der Firma Bio Rad oder die *Page Ruler Prestained Protein Ladder* von der Firma Fermentas verwendet.

### 3.2.2 Western Blot und Immunfärbung

Um Proteine immunologisch nachzuweisen, wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und dann auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wo sie mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden können (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981). Die Übertragung der Proteine aus einem SDS-PAA-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm Porengröße) erfolgte durch Elektrotransfer bei 0,35 A für 1 h in einer Blotting-Kammer der Firma Bio-Rad. Im Anschluss wurde die Membran mit 20 % (v/v) Ponceau-Lösung (0,1 %

(w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure; AppliChem) in H<sub>2</sub>O gefärbt, um den Erfolg der Übertragung auf die Nitrozellulosemembran zu überprüfen. Dann wurden die verbliebenen freien Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in 3 % (w/v) Magermilchpulver (*Mega Slim*, FOOD TECH) in TBS-Tween für mindestens 1 h abgesättigt und anschließend 3x mit TBS-Tween (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Die Inkubation der Blot-Membran mit dem Erstantikörper erfolgte rotierend in TBS-Tween für 1 h (RT) oder 4 h (4 °C). Danach wurde 3x mit TBS-Tween gewaschen und die Membran mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 30 Min rotierend inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit TBS-Tween wurde der Protein-Antikörper-Komplexe mit Hilfe des Chemilumineszenz-Substrats (*Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate*, Pierce) nachgewiesen und die Signale mit einem Röntgenfilm (Cronex 5, Agfa) detektiert. Sofern die Blot-Membran mit einem weiteren Erstantikörper inkubiert werden sollte, wurden die Antikörper der vorherigen Immunfärbung von der Membran mit Strip-Puffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 2,5 mM DTT) entfernt. Die Inkubation der Membran mit dem Strip-Puffer erfolgte für 30 Min bei 50 °C. Nach einem anschließenden Waschschrtritt mit TBS-Tween stand die Membran für weitere Analysen zur Verfügung. Um die Intensität von Proteinbanden auf einer Western Blot-Membran zu quantifizieren, wurden die entsprechenden Autoradiographien mit Hilfe eines Computerprogramms digitalisiert. Anschließend wurde die Intensität jeder einzelnen Proteinbande mit dem Programm *ImageMaster TotalLab v2.01* ermittelt.

### 3.2.3 Präparation von Gesamtprotein-Zellextrakten

Die Lyse von kultivierten Säugerzellen erfolgte mit Hilfe von 2,5x Phosphatlysispuffer (PLP; PLP pH 8,0; 1 Tablette Protease-Inhibitor-Mix (Roche)/25 ml). Das im PLP enthaltene nicht-ionische Detergenz NP-40 zerstört sowohl die Plasma- wie auch die Kernmembran. Weiterhin enthält der Lysis-Puffer Protease-Inhibitoren sowie eine hohe Konzentration an Phosphat-Ionen. Die Phosphat-Ionen hemmen die Phosphatasen und sorgen dafür, dass der ursprüngliche Phosphorylierungszustand der Proteine erhalten bleibt (Scheidtmann *et al.*, 1982). Das DTT reduziert sowohl inter- wie auch intramolekulare Disulfidbrücken der Proteine. Für die Herstellung von Gesamtprotein-Zellextrakten wurden adhärenente Zellen, die auf Zellkulturschalen (LPs) kultiviert wurden, 3x mit PBS<sup>+</sup> gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS<sup>+</sup> mit einem Gummischaber von der Kulturschale abgeschabt und bei 150 x g für 3 Min bei RT abzentrifugiert. Suspensionszellen bzw. Zellen, die sich bereits von der Zellkulturschale abgelöst hatten, wurden mit dem Medium in ein 15 ml



Zentrifugationsröhrchen überführt, durch Zentrifugation (150 x g, 3 Min, RT) sedimentiert und 3x mit PBS<sup>+</sup> gewaschen. Für die Lyse wurden die Zellpellets in 50 µl 2,5x PLP resuspendiert und 30 Min auf Eis inkubiert, wobei die löslichen Proteine aus Zytoplasma und Kern freigesetzt wurden. Mit dem folgenden Zentrifugationsschritt für 15 Min bei 16000 x g und 4 °C wurden die unlöslichen Proteine des Zytoskeletts und des Chromatins abzentrifugiert und der lösliche zytoplasmatische Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die hergestellten Zellextrakte wurden entweder für eine SDS-PAGE verwendet (siehe 3.2.1) oder standen für eine Immunpräzipitation (3.2.4) zur Verfügung.

### 3.2.4 Immunpräzipitation

Die Methode der Immunpräzipitation wurde in dieser Arbeit verwendet, um GFP-Fusionsproteine oder FLAG-Fusionsproteine aus dem Gesamtprotein-Zellextrakt (siehe 3.2.3) transfizierter Säugerzellen zu isolieren. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass ein hergestelltes Gesamtprotein-Zellextrakt mit einem Antikörper gegen das betreffende Epitop inkubiert wird und der sich bildende Antigen-Antikörper-Komplex an eine unlösliche Matrix adsorbiert und so sedimentiert werden kann. Die Matrix besteht für Kaninchen-Antikörper aus an Sepharose gekoppeltem Protein A, ein aus *Staphylococcus aureus* stammendes Protein, das sehr effizient an den konstanten Teil des Kaninchen-Antikörpers bindet. Für Antikörper, die in der Maus hergestellt wurden, verwendet man die Matrix Protein-G-Agarose. Für die Immunpräzipitation wurde der Gesamtprotein-Zellextrakt (ca. 1 mg Gesamtprotein) mit PLP (versetzt mit 50 µM Leupeptin und 1 mM PMSF) zunächst auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und anschließend 1 h bei 4 °C rotierend mit 30 µl reiner Sepharose 4B vorinkubiert, um unspezifisch an die Matrix bindende Proteine zu entfernen. Durch Zentrifugation bei 500 x g für 1 Min bei 4 °C wurde die Sepharose 4B mitsamt den unspezifisch gebundenen Proteinen sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem entsprechenden Antikörper üN bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 µl Protein A-Sepharose bzw. 15 µl Protein-G-Agarose, um den Proteinkomplex zu binden. Dies geschah durch Inkubation für 1 h bei 4 °C auf dem Rollinkubator. Die spezifisch gebundenen Proteine wurden zusammen mit der Matrix durch Zentrifugation sedimentiert, 3x mit 200 µl PLP gewaschen und für die weiteren Untersuchungen (siehe 3.2.5) auf Eis gelagert.

### 3.2.5 Entfernung der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide von Proteinen

Die N-Glykosylierung von Proteinen stellt eine posttranslationale Modifikation dar, bei der mannosereiche Zuckerketten im Lumen des ER kotranslational auf NH<sub>2</sub>-Gruppen von geeigneten Asparagin-Resten übertragen werden. Die Abspaltung der mannosereichen Zuckerketten von Proteinen erfolgte durch das rekombinante Enzym Endoglycosidase H (New England Biolabs), das die Bindung zwischen den beiden N-Acetylglukosaminen spaltet (Robbins *et al.*, 1984). Durch die Behandlung von Proteinen mit der Glykosidase können N-glykosylierte Proteine identifiziert werden, da sie nach der Abspaltung ihrer mannosereichen Zuckerketten ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE aufweisen. Um Proteine einer Behandlung mit der Endoglycosidase H zu unterziehen, wurden die zu untersuchenden Proteine aus einem Gesamtprotein-Zellextrakt immunpräzipitiert (siehe 3.2.4). Durch die Zugabe von 20 µl 1x Denaturierungspuffer (New England Biolabs) und 10 minütiger Inkubation bei 100 °C wurden die Proteine denaturiert und dabei gleichzeitig von der Matrix abgelöst. Die Matrix wurde abzentrifugiert (16000 x g, RT, 1 Min) und der Überstand, der die aufgereinigten Proteine enthält, mit 1/10 Volumen Reaktionspuffer sowie mit 50 U Enzym versetzt. Die Proben wurden anschließend 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Analyse der Proteine in einer SDS-PAGE (siehe 3.2.1).

### 3.2.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung von Gesamtprotein-Zellextrakten wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Für die Proteinbestimmung wurde ein Gemisch aus 800 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 200 µl *Protein Assay Dye Reagent* (Bio-Rad) mit 1 µl des Zellextraktes (siehe 3.2.3) versetzt und 5 Min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die OD<sub>595nm</sub> gemessen. Die Proteinkonzentration der Gesamtprotein-Zellextrakte wurde anhand einer mitgeführten Eichreihe ermittelt.

## 3.3 ZELLKULTURMETHODEN

### 3.3.1 Kultur von Säugerzellen

Die Kultur von Säugerzellen erfolgte bei 37 °C und je nach Zelllinie in einer 5 %-igen oder 10 %-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (siehe auch 2.4.2). Zum Passagieren wurden die Zellen 2x mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und dann mit Trypsin für 3-5 Min bei 37 °C von der Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden bei 150 x g für 5 Min sedimentiert und je nach Zelllinie in entsprechendem frischen Medium (siehe auch 2.4.2) in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:20 verdünnt und auf

neue Zellkulturschalen ausplattiert. Zur langfristigen Lagerung wurden exponentiell wachsende Zellen nach Trypsinierung in vorgekühltem Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen und schrittweise abgekühlt (2 h -20 °C, üN -70 °C), bevor sie in flüssigem Stickstoff (-180 °C) dauergelagert wurden.

### 3.3.2 Transiente Transfektion von Säugerzellen mit DNA oder RNA

Zur Transfektion von Säugerzellen wurde entweder das kationische Polymer *jetPEI* (Qbiogene) für die Einschleusung von DNA oder das Liposomen-bildende Reagenz *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) für die Einschleusung von RNA verwendet. Für die Transfektion wurden  $1,8-3,5 \times 10^4$  Zellen am Vortag in 24-Loch-Platten auf Deckgläschen ausplattiert.

Zur Transfektion von DNA mit dem Reagenz *jetPEI* wurden 250 ng der zu transfizierenden DNA zunächst in 12,5 µl 150 mM NaCl-Lösung verdünnt. Des Weiteren wurde eine Verdünnung von 0,5 µl Transfektionsreagenz in 12,5 µl 150 mM NaCl-Lösung angesetzt. Beide Lösungen wurden gut vermischt, für 15-30 Min bei RT inkubiert und anschließend zu 225 µl Medium je Vertiefung in die 24-Loch-Platte pipettiert. Der Transfektionsansatz verblieb bis zur Analyse auf den Zellen (maximal 48 h). Für eine kleine Zellkulturschale (MP) wurde der 4-fache, für eine mittlere Zellkulturschale (SP) wurde der 8-fache, für eine große Zellkulturschale (LP) der 15-fache Ansatz verwendet.

Die Transfektion von RNA sowie von RNA/DNA-Gemischen erfolgte mit Hilfe des *Lipofectamine 2000*-Reagenzes. 500 ng der zu transfizierenden RNA oder des DNA/RNA-Gemischs wurde in 50 µl *Optimem* (serumfreies Medium von der Firma Gibco) verdünnt. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden 50 µl *Optimem* mit 1,25 µl *Lipofectamine 2000*-Lösung verdünnt und für 5 Min bei RT vorinkubiert. Beide Ansätze wurden anschließend vermischt und für 20-30 Min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde von den zu transfizierenden Zellen das Medium entfernt, die Zellen 1x mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend 400 µl *Optimem* auf die Zellen in jeder Vertiefung der 24-Loch-Platte gegeben. Der Reaktionsansatz wurde nach der Inkubationszeit vorsichtig auf die Zellen gegeben und nach 2-3 h durch einen Waschschrift mit PBS<sup>-</sup> und einem anschließenden Mediumwechsel entfernt. Für eine kleine Zellkulturschale (MP) wurde der 2-fache, für eine mittlere Zellkulturschale (SP) wurde der 5-fache, für eine große Zellkulturschale (LP) der 10-fache Ansatz verwendet.

### 3.3.3 Herstellung stabil transfizierter Zelllinien

Zur Herstellung stabil transfizierter HeLa-Zellen, in denen die Par-4-Expression herunterreguliert ist, wurden die Zellen wie unter 3.3.2 beschrieben in 24-Loch Kulturschalen ausplattiert und mit dem Plasmid pSUPER-KawPar-4 oder als Kontrolle mit dem leeren Plasmid pSUPER.gfp+neo transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen trypsinisiert und auf eine LP ausplattiert. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte mit 700 ng/ $\mu$ l des Antibiotikums Geneticindisulfat (G418). Abgestorbene Zellen wurden am nächsten Tag durch einen Mediumwechsel entfernt und die überlebenden Zellen weiterhin mit dem Selektionsantibiotikum gehalten. Nachdem einzelne Zellklone mit einem Durchmesser von 1-3 mm auf der Zellkulturplatte herangewachsen waren, wurden diese mit Hilfe von Klonierungszyklindern isoliert und nach Trypsinierung in neue Kulturgefäße überführt. Die Herunterregulation der Par-4-Expression wurde anschließend durch Immunfluoreszenz- (3.4.3) und Western Blot-Analysen (3.2.1) in den einzelnen Zellklonen untersucht.

## 3.4 FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE ANALYSEN

### 3.4.1 Ausplattieren und Fixieren von Säugerzellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Säugerzellen auf runden Deckgläschen in passenden Zellkulturgefäßen mit passenden Vertiefungen (1,5 cm  $\varnothing$ ) ausplattiert. Es wurden je nach Zelllinie 1,8 -  $3,5 \times 10^4$  Zellen je Vertiefung ausplattiert. Die Zellen wurden vor der Fixierung 2x mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und anschließend 20 Min bei RT in Paraformaldehyd (3 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS<sup>+</sup>, pH 7,2) inkubiert. Das Paraformaldehyd wurde anschließend durch Waschen mit PBS<sup>+</sup> von den Zellen entfernt.

### 3.4.2 Kernfärbung mit DAPI

Mit dem Farbstoff 4',6'-Diamino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI) lässt sich spezifisch chromosomale DNA und so die Zellkerne anfärben. Zu diesem Zweck wurden die fixierten Zellen für 15 Min bei RT mit 0,25  $\mu$ g DAPI/ml in PBS<sup>+</sup> inkubiert und der überschüssige Farbstoff anschließend durch Waschen mit PBS<sup>+</sup> entfernt.

### 3.4.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die subzelluläre Lokalisation von Proteinen in Säugerzellen kann sowohl durch einen direkten Nachweis von GFP/RFP (*green-fluorescent-protein/red-fluorescent-protein*)-Fusionsproteinen (Pines, 1995) wie auch durch einen indirekten, Antikörper vermittelten

Nachweis untersucht werden. Alle Inkubationen wurden bei RT auf einer Wippe durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert (siehe 3.4.1), 2x mit PBS<sup>+</sup> gewaschen und anschließend für 1 h in PBS<sup>+</sup> mit 0,1 % Triton X-100, 1 % Ziegen Serum und 5 % Magermilchpulver permeabilisiert und abgesättigt. Nach einem Waschschriff mit PBS<sup>+</sup> wurden die Zellen für 1 h mit dem entsprechenden Erstantikörper in PBS<sup>+</sup> mit 0,1 % Triton X-100 und 1 % Ziegen Serum inkubiert. Es folgten 3 weitere Waschschriffe mit PBS<sup>+</sup>, bevor der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper in PBS<sup>+</sup> mit 0,1 % Triton X-100 und 1 % Ziegen Serum für 30 Min auf die Zellen gegeben wurde. Nach der Zweitantikörper-Inkubation erfolgten 3 weitere Waschschriffe mit PBS<sup>+</sup>.

### **3.4.4 Einbetten von fixierten Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie**

Bevor die Deckgläschen mit den fixierten Zellen auf Objektträger montiert wurden, wurden die Zellen einmal mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen, um die Bildung von Salzkristallen zu verhindern. Anschließend wurde das Einbettmedium (*PERMAFLUOR Aqueous Mounting Medium*, Beckmann Coulter GmbH) auf die Objektträger getropft und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten luftblasenfrei auf das Einbettmedium gelegt. Die Objektträger wurden vor der fluoreszenzmikroskopischen Analyse über Nacht lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

### **3.4.5 Fluoreszenzmikroskopische Analyse**

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

## **3.5 METHODEN ZUM NACHWEIS DER APOPTOSE**

### **3.5.1 Bestimmung der Apoptoserate anhand morphologischer Merkmale**

Die Zellen wurden entsprechend dem Versuchsansatz nach den unter 3.4 beschriebenen Methoden für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert und einer Kernfärbung unterzogen (siehe 3.4.2). Apoptotische Zellen wurden anhand ihrer morphologischen Eigenschaften (fragmentierte Zellkerne, Chromatinkondensation, Blasenbildung der Zytoplasmamembran) identifiziert. Pro Versuchsreihe wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt, dabei wurde in jedem Experiment je Ansatz mindestens eine Gesamtzellzahl von 100 transfizierten Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen anhand der charakteristischen morphologischen Merkmale bestimmt.

### 3.5.2 Nachweis der Caspase-3 Spaltung

Die Caspase-3 ist eine Protease, die spezifisch während der Apoptose durch die proteolytische Spaltung nach der AS Asparagin<sub>175</sub> aktiviert wird. Durch die Spaltung entstehen Proteinprodukte von 12 und 17 kDa, die sich zu einem aktiven Protease-Komplex zusammenlagern können. Die Spaltung der Caspase-3 lässt sich durch Caspase-spezifische Antikörper mit Hilfe der Western Blot-Technik immunologisch nachweisen. Der hier verwendete Antikörper anti-cleaved-Caspase-3 (siehe 2.9) erkennt nur das Proteinfsegment mit einem Molekulargewicht von 17 kDa. Die zu analysierenden Zellen wurden je nach experimentellem Ansatz kultiviert und behandelt. Anschließend wurden Gesamtprotein-Zellextrakte (3.2.3) hergestellt, diese einer SDS-PAGE (siehe 3.2.1) unterzogen und anschließend durch das Western Blot-Verfahren (siehe 3.2.2) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das 17 kDa große Spaltprodukt der Caspase-3 wurde immunologisch durch den entsprechenden Antikörper nachgewiesen.

## 3.6 IN VITRO-HERSTELLUNG VON siRNA

### 3.6.1 *In vitro*-Transkription, Hybridisierung und Aufreinigung von RNA

Für die *in vitro*-Transkription wurde die komplette cDNA-Sequenz des zu untersuchenden Gens in den pGEM-T Easy Vektor kloniert, der im 5'-Bereich der multiplen Klonierungsstelle einen T7-Promoter und im 3'-Bereich der multiplen Klonierungsstelle einen SP6-Promoter besitzt. Der Vektor wurde in getrennten Ansätzen mit Hilfe geeigneter Restriktionsendonukleasen sowohl vor wie auch hinter der einklonierten cDNA-Sequenz gespalten. Die Aufreinigung der linearisierten Vektoren erfolgte mit Phenol/Chloroform (siehe 3.1.5.1). Anschließend wurden je 2,5 µg der linearisierten Vektoren zusammen mit 2,5 mM rNTP-Mix (Fermentas), 1x Transkriptionspuffer (Boehringer), 200 U RNasin (Promega) sowie 2,5 µl T7-RNA-Polymerase (Promega) und Sp6-RNA-Polymerase (Boehringer) in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 2-3 h bei 37 °C inkubiert. Direkt nach der *in vitro*-Transkription wurde der Ansatz für 3 Min auf 95 °C erhitzt, um die Sekundärstrukturen in der RNA zu lösen. Es folgte eine Inkubation bei 75 °C für 30 Min, anschließend wurde die Probe zur Hybridisierung üN bei RT stehen gelassen. Die nun doppelsträngige RNA (dsRNA) wurde mit Hilfe einer LiCl-Fällung aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurde dem Hybridisierungsansatz 2,5 M LiCl und 16,7 mM EDTA zugefügt, die RNA für 30 Min bei -20 °C ausgefällt, anschließend für 15 Min bei 16000 x g und 4 °C pelletiert und mit eiskaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde nach kurzer Trocknung bei RT in RNase-freiem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst.

### 3.6.2 *DICER*-Verdau und Aufreinigung der siRNA-Moleküle

Der Verdau der dsRNA wurde mit Hilfe des *DICER*-Enzyms (Stratagene) durchgeführt. Dieses Enzym, das zur Familie der Ribonukleasen III gehört, spaltet die dsRNA in ca. 21-23 bp lange Fragmente, die 2 Basen lange 3'-Überhänge haben und als siRNA bezeichnet werden (Kawasaki *et al.*, 2003). 1 µg dsRNA wurde mit 2 U rekombinantem *DICER*-Enzym im mitgelieferten Puffersystem in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 18-20 h bei 37 °C inkubiert. Um die generierten ca. 21-23 bp langen siRNA-Moleküle aufzureinigen, wurde der gesamte Ansatz (3.6.1) auf ein 12%-iges Polyacrylamid-TBE-Gel aufgetragen (siehe 3.1.4.2) und die entsprechenden Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der siRNA-Moleküle aus dem PAA-Gel erfolgte unter Zugabe von 1M Ammoniumacetat bei 37 °C üN. Am nächsten Tag wurde die siRNA wie unter 3.1.5.3 beschrieben mit NaAc und Ethanol gefällt. Die siRNA wurde anschließend in 1x TE-Puffer (für RNA) aufgenommen und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt (3.1.5.4). Danach stand die siRNA zur Verfügung für die entsprechenden Experimente.

## 3.7 UNTERSUCHUNG VON <sup>5</sup>M C-DNA-METHYLIERUNG

Die Experimente zur Detektion von 5-Methylcytosin (<sup>5</sup>mC) in genomischer DNA wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Waha (Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt.

### 3.7.1 Bisulfit-Modifizierung genomischer DNA nach Frommer (1992)

1 µg genomische DNA (siehe 2.5 und 3.1.1.4) wurde mit 200 mM NaOH für 10 Min bei 37 °C denaturiert. Anschließend wurde dem Ansatz 0,5 mM Hydrochinon und 2,6 M Natriumdisulfit (pH 5) zugegeben und die Probe bei 50 °C für 16 h unter Mineralöl inkubiert. Die am 5'-C-Atom unmethylierten Cytosinbasen reagieren unter diesen Reaktionsbedingungen reversibel mit dem Hydrogensulfit-Reagenz unter Bildung eines 5,6-Dihydro-6-sulfonats, das spontan desaminiert. Methylierte <sup>5</sup>mCytosinbasen reagieren hingegen nicht und bleiben unverändert. Mit Hilfe des *Wizard Cleanup Kit* (Promega) wurden die DNA-Proben anschließend aufgereinigt. Da die im nächsten Reaktionsschritt stattfindende Desulfonierung unter alkalischen Bedingungen stattfindet, wurde der DNA-Lösung 300 mM NaOH zugegeben und der Ansatz für 5 Min bei RT inkubiert. Durch die Abspaltung des Hydrogensulfits entsteht Uracil. Anschließend wurde die Bisulfit-modifizierte DNA (BS-DNA) mit 2,3 M Ammoniumacetat und dem 3-fachen Volumen Ethanol abs. ausgefällt und mit 16000 x g für 5 Min bei 4 °C pelletiert. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem 70 %-

igen Ethanol wurde das DNA-Pellet in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgenommen und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Es ist zu beachten, dass das Reagenz Hydrogensulfit ( $\text{HSO}_3^-$ ), welches für die Umwandlung von unmethyliertem Cytosin zu Thymin verwendet wird, nicht stabil ist und deshalb erst kurz vor Gebrauch durch Lösen von Natrium-Bisulfit (bzw. Natrium-Disulfit) in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  hergestellt wird.

Alternativ wurde die genomische DNA mit Hilfe des *EpiTect Bisulfite Kit* der Firma QIAGEN nach den Vorgaben des Herstellers präpariert.

### 3.7.2 Polymerase-Kettenreaktion mit Bisulfit-modifizierter DNA (BS-PCR)

Die DNA-Fragmente von 100–300 bp Länge aus einem CpG-reichen potentiellen Promoterbereich des zu untersuchenden Gens wurden durch den Einsatz von entsprechenden Oligonukleotid-Paaren in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Der Amplifikationsprozess, in dem die BS-modifizierte genomische DNA (3.7.1) als Matrizen-DNA eingesetzt wird, führt zu einer Transformation von Uracil (vorher Cytosin) zu Thymin und von  $^5\text{m}$ Cytosin zu Cytosin. Auf diese Weise ist es möglich, durch weitere Analysen anhand der Präsenz von CpG- oder TpG-Dinukleotiden im untersuchten DNA-Bereich Rückschlüsse auf den Methylierungszustand der potentiellen CpG-Inseln zu ziehen (Frommer *et al.*, 1992). Die in der BS-PCR verwendeten Oligonukleotide werden so gewählt, dass sie sowohl an vormals methylierte als auch an unmethylierte BS-DNA hybridisieren können. Bei der Auswahl der Oligonukleotide ist zu beachten, dass die Länge der Oligonukleotide 16-30 bp beträgt, ihre Sequenz selbst keine CpG-Bereiche überspannt und dass die Sequenz möglichst viele Thyminbasen, besonders am 3' Ende, beinhaltet, die vor der BS-Konvertierung als unmethylierte Cytosinbasen vorlagen. Bei Beachtung dieser Kriterien wird die unspezifische Bindung der Oligonukleotide mit Sequenzbereichen unmodifizierter DNA, die bei unvollständiger Bisulfit-Behandlung vorliegen können, minimiert. Die PCR-Reaktion wurde analog wie unter 3.1.6 beschrieben durchgeführt, wobei pro 30  $\mu\text{l}$  Gesamtansatz 2  $\mu\text{l}$  BS-DNA als Matrizen-DNA eingesetzt wurde. Für die Amplifikation der entsprechenden DNA-Fragmente wurde die *PlatinumTaq*-Polymerase der Firma Invitrogen eingesetzt, die Schmelztemperatur für die eingesetzten Oligonukleotide lag zwischen 50-56  $^\circ\text{C}$ .

### 3.7.3 Herstellung und Aufreinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierungs-Reaktion

Die PCR-Produkte, die durch eine BS-PCR generiert wurden, mussten für die spätere Sequenzierung in einen Vektor kloniert werden. Zu diesem Zweck wurde der pCR2.1-TOPO-



Vektor der Firma Invitrogen verwendet, da hierbei die Ligationsreaktion über 3'-A-Überhänge erfolgen konnte, die durch die Taq-Polymerase an das PCR-Produkt angefügt wurden. Für die Klonierungsreaktion wurden 1-4 µl BS-PCR-Ansatz mit 0,5 µl Vektor/Ligase-Mix vermischt und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf ein Gesamtvolumen von 5 µl eingestellt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 30 Min. Der Ligationsansatz wurde anschließend in kompetente Bakterien (siehe 3.1.3) transformiert und auf Ampicillin- und X-Gal-haltige LB-Platten ausgestrichen. Nach der Transformation wurden mindestens 12 weiße Bakterien-Einzelkolonien von der LB-Platte in je 50 µl LB-Ampicillin-Medium angeimpft und 2 h bei 37 °C angezogen. Für die anschließende Klon-PCR wurde je 1 µl Bakterienkultur als Matrizen-DNA, die Vektor-spezifischen Oligonukleotide 921 M13r und 920 M13s, sowie die *GoTaq*-Polymerase der Firma Promega verwendet (siehe 3.1.6). Die Aufreinigung der PCR-Produkte aus der Klon-PCR erfolgte mit Hilfe des *ExoSAP-IT* Reagenzes (USB Corporation). Dieses Reagenz enthält zwei hydrolytische Enzyme, die Exonuklease I und die Alkalische Phosphatase. Die Exonuklease entfernt einzelsträngige Oligonukleotide und einzelsträngige PCR-Produkte, wobei die alkalische Phosphatase die Phosphatgruppe von den dabei entstehenden dNTPs sowie von den überschüssigen dNTPs aus der PCR-Reaktion abspaltet und dabei Nucleoside und anorganische Phosphatgruppen hinterlässt. Die Reaktionsprodukte beeinflussen die folgende Sequenzierungs-Reaktion nicht. Für die Aufreinigung der PCR-Produkte aus der Klon-PCR wurden 2,5 µl PCR-Ansatz mit 1 µl *ExoSAP-IT* Reagenz versetzt und für 15 Min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme für 15 Min bei 80 °C hitzeinaktiviert.

### 3.7.4 Sequenzierung der PCR-Produkte

Das Prinzip der hier verwendeten Sequenzierungs-Reaktion beruht auf der von Sanger entwickelten Kettenabbruch-Sequenzierung (Sanger & Coulson; 1975, Sanger *et al.*, 1977). Dabei werden zur Matrizen-DNA komplementäre Einzelstränge hergestellt, die durch den Einsatz von so genannten Kettenabbruchmolekülen verschiedene Stranglängen aufweisen. Bei den Kettenabbruchmolekülen handelt es sich um Didesoxynukleotide, wobei jede der vier Basen mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Wird eine fluoreszierende Base während der PCR-ähnlichen Reaktion in den DNA-Strang eingebaut, so kann dieser nicht mehr verlängert werden und die Synthese des Strangs bricht ab. Auf diese Weise entstehen durch das Zufallsprinzip verschiedene Stranglängen, im Idealfall weisen die Stränge Minimal- bis Maximallänge auf. Die fluoreszierenden DNA-Stränge können mit einem geeigneten Gerät detektiert und ausgewertet werden. Die Sequenzier-Reaktion wurde mit Hilfe des

*BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) durchgeführt. Dazu wurde 1 µl aufgereinigtes PCR-Produkt (siehe 3.7.3) mit 0,5 µl *BigDye Terminator v1.1 Sequencing-Mix*, 1,5 µl 5x *BigDye Terminator v1.1 Sequenzierungs-Puffer* sowie 1,6 pmol Sinn-Oligonukleotid (921 M13r) versetzt und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die PCR-ähnliche Sequenzierungs-Reaktion wurde in einem *TGradient-Thermocycler* (Biometra) wie folgt durchgeführt:

|       |       |  |      |
|-------|-------|--|------|
| 96 °C | 1 Min |  | x 40 |
| 96 °C | 10 s  |  |      |
| 50 °C | 5 s   |  |      |
| 60 °C | 4 Min |  |      |

Anschließend wurden die amplifizierte DNA-Stränge mit 2 µl 3 M NaAc pH 4,6 und 50 µl Ethanol abs. gefällt, mit eiskaltem 70 %-igen Ethanol gewaschen und danach in 10 µl *HiDye-N,N-Dimethylformamid-Lösung* (Applied Biosystems) aufgenommen.

Die Sequenzierung der fluoreszierenden PCR-Produkte wurde am *3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems/HITACHI) vorgenommen. Bei diesem Gerät handelt es sich um ein voll automatisches Kapillarsequenziergerät. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt in einem Polymer, das mit Druck in die Kapillaren gepresst wird und nach jedem Lauf erneuert wird. Am Ende der Polymer-Matrix werden die fluoreszenzmarkierten Moleküle mit einem Laser angeregt, die emittierte Strahlung mit einem Detektor aufgefangen und die Information im nachgeschalteten Computer gespeichert. Die Basenabfolge wird mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms analysiert. Die Auswertung der BS-DNA-Sequenzen aus mindestens 5 unabhängigen Klonen erfolgte mit Hilfe des *BiQ-Analyzer*-Programms (Bock *et al.*, 2005). Das Computerprogramm vergleicht die Sequenzierungsergebnisse der BS-PCR-Produkte in einem internen *ClustalW*-Vergleich mit den Sequenzen der entsprechenden genomischen DNA. So kann der Methylierungsstatus der enthaltenen CpG-Dinukleotide im PCR-Produkt bestimmt werden. Das Ergebnis dieser Auswertung wird anschließend graphisch dargestellt.

### 3.7.5 Kombinierte Bisulfit-Restriktionsanalyse (COBRA)

Als Alternative zur Sequenzierung von BS-PCR-Produkten (siehe 3.7.3 und 3.7.4) kann der Methylierungsstatus der genomischen DNA anhand eines speziellen Restriktionsendonuklease-Verdaus analysiert werden (nach Xiong & Laird, 1997). Diese Methode erleichtert die Untersuchung von sehr vielen DNA-Proben. Das Prinzip der so genannten COBRA-Analyse beruht darauf, dass Restriktionsendonukleasen ausgewählt werden, deren

---

Erkennungssequenz CG-Basenfolgen beinhaltet. Diese speziellen Restriktionsendonukleasen schneiden die PCR-Produkte aus der BS-PCR nur, wenn die Cytosinbase in einem entsprechenden CpG-Motiv vor der BS-Behandlung der Matrizen-DNA methyliert war und dadurch als Cytosin erhalten geblieben ist. Für die Untersuchung wurde die Restriktionsendonuklease *Bst*UI (New England Biolabs) verwendet, die die Erkennungssequenz CGCG aufweist. Für einen experimentellen Ansatz wurden 10 µl PCR-Produkt aus einer BS-PCR (siehe 3.7.2) mit 2 U *Bst*UI in 1x Reaktionspuffer 2 (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 16 h bei 60 °C inkubiert. Als Kontrollansatz wurde 5 µl des gleichen PCR-Produkts mit 1x Reaktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 16 h bei 60 °C inkubiert, jedoch ohne den Zusatz der Restriktionsendonuklease. Anschließend erfolgte die Analyse der DNA-Proben auf einem 4%-igen Agarosegel.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 ETABLIERUNG EINES SYSTEMS ZUR INHIBITION VON ENDOGENEM PAR-4 IN SÄUGERZELLEN

Aus zahlreichen vorangegangenen Studien wurde deutlich, dass Par-4 an einer Vielzahl von apoptotischen Prozessen und ihrer Regulation beteiligt ist, doch die genauen Mechanismen in der Par-4-vermittelten Apoptose sind bis jetzt ungeklärt. Um nähere Aufschlüsse über die pro-apoptotische Funktion von Par-4 zu gewinnen, sollte im ersten Teil dieser Arbeit ein experimenteller Ansatz etabliert werden, um das endogene Par-4-Protein mittels siRNA herunterzuregulieren oder um die Funktion des endogenen Par-4-Proteins durch den Einsatz dominant-negativer Par-4-Mutanten zu unterdrücken.

#### 4.1.1 Herunterregulation von endogenem Par-4 durch RNA-Interferenz

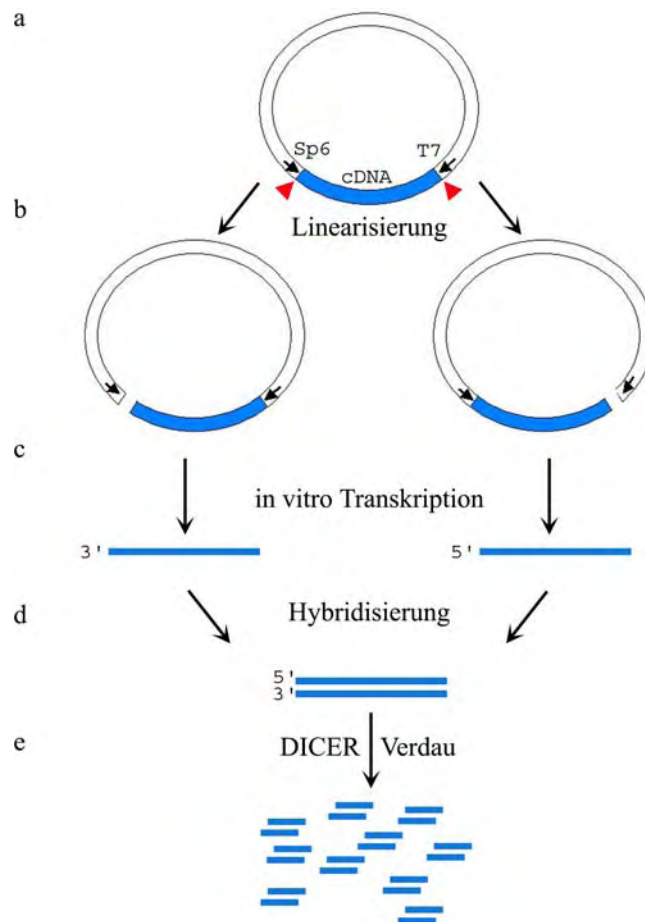
Die Bezeichnung RNA-Interferenz (RNAi) wird in der aktuellen Literatur als Sammelbegriff für verschiedene Phänomene der posttranskriptionellen Genstilllegung (*posttranscriptional gene silencing*, PTGS) verwendet (Übersicht bei Hannon, 2002). Zu diesem Phänomen gehören die Ko-Suppression (Napoli *et al.*, 1990), das so genannte *quelling* (Romano & Macino, 1992) sowie die Transgen induzierte Stilllegung (Übersicht bei Metzloff, 2002). Sie alle beruhen auf der Stilllegung eines Gens durch den von doppelsträngiger RNA (dsRNA) vermittelten Abbau seiner mRNA. Bei sämtlichen RNAi-Phänomenen handelt es sich nach heutiger Auffassung um sehr alte Selbstschutzmechanismen gegenüber RNA-Viren (Ruiz *et al.*, 1998; Voinnet, 2001; Mak, 2005) und Transposons (Ketting *et al.*, 1999; Tabara *et al.*, 1999). Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von RNAi trugen Hamilton & Baulcombe (1999) entschieden bei, als sie durch die Einschleusung von langen dsRNA-Molekülen RNAi in Pflanzenzellen induzierten und daraufhin ca. 25 nt lange RNA-Moleküle aus den Zellen isolieren konnten. Diese kleinen dsRNA-Moleküle werden heute als *short interfering RNA* (siRNA) bezeichnet, da sie nach Einschleusung in eukaryontische Zellen in der Lage sind, ihre komplementäre mRNA zu degradieren. Die siRNA-Moleküle entstehen in der Zelle durch Prozessierung durch das *DICER*-Enzym, einer Nuklease der Ribonuklease III-Familie, die die ca. 500 bp langen dsRNA-Fragmente in 21-23 nt lange siRNA-Moleküle zerschneidet (Übersicht bei Carmell & Hannon, 2004). Nach der Entwindung des doppelsträngigen siRNA-Intermediats wird ein Strang von dem so genannten *RISC*-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) für den Abbau der Ziel-mRNA verwendet, so dass die Expression des entsprechenden Gens inhibiert wird (Übersicht bei McManus & Sharp, 2002). In fast allen

Säugerzellen führt das Einschleusen von dsRNA, die größer ist als 30 bp, nicht nur zu einer spezifischen RNAi-Antwort, sondern auch zur Aktivierung eines unspezifischen Weges, durch den alle mRNA-Moleküle in der Zelle abgebaut werden und die gesamte Proteinbiosynthese herunterreguliert wird (Übersicht in Bass, 2001). Um dieses Problem zu umgehen, wurden zwei Ansätze entwickelt, um gezielt Gene durch RNAi in Säugerzellen auszuschalten. Bei dem ersten Ansatz werden Vektoren in die Zelle eingebracht, die so genannte *short hairpin* RNAs (shRNA) exprimieren, aus denen dann *in vivo* durch das *DICER*-Enzym siRNA-Moleküle hergestellt werden (Brummelkamp *et al.*, 2002; siehe auch 4.1.1.4, Abb. 9). Alternativ können synthetisch hergestellte siRNA-Moleküle in Säugerzellen transfiziert werden, die dort ebenfalls zu einem spezifischen Abbau von mRNA führen (Elbashir *et al.*, 2001).

#### 4.1.1.1 *In vitro*-Herstellung von siRNA gegen Par-4 und Dlk sowie von Kontroll-siRNA

Für die *in vitro*-Herstellung von siRNA wird zuerst die vollständige cDNA-Sequenz des auszuschaltenden Gens in ein Plasmid einkloniert, das sowohl im 5'-Bereich als auch im 3'-Bereich der multiplen Klonierungsstelle einen gleich starken Promotor besitzt. Diese Anforderungen erfüllt das Plasmid pGEM-T Easy, da hier ein T7- und ein Sp6-Promotor enthalten sind. Die cDNA von Par-4 wurde für die Klonierung mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* aus dem Plasmid pCMV-Tag2B-Par-4 ausgeschnitten und über Kassettenaustausch in das Plasmid pGEM-T Easy-Cx kloniert. Für die *in vitro*-Transkription von Par-4 wurde das hergestellte Plasmid (bezeichnet als pGEM-T Easy-Par-4) mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *PstI* linearisiert. Die Restriktionsendonuklease *NcoI* schneidet das Plasmid pGEM-T Easy-Par-4 zwischen dem T7-Promotor und der einklonierten Par-4-cDNA-Sequenz, die Restriktionsendonuklease *PstI* schneidet zwischen dem Sp6-Promotor des Vektors und der Par-4-cDNA-Sequenz. Die Linearisierung des Plasmids ist erforderlich, damit nur die RNA der Par-4-Sequenz und nicht Bereiche des Klonierungsvektors exprimiert werden. Die so vorbereiteten linearisierten Vektoren wurden für eine *in vitro*-Transkription eingesetzt, bei der die Sp6-RNA-Polymerase und die T7-RNA-Polymerase verwendet wurden. Dies führte zur Erzeugung von einzelsträngigen RNA-Strängen (ssRNA) der Par-4-Sequenz, die anschließend miteinander hybridisiert wurden. Die doppelsträngigen RNA-Stränge (dsRNA) wurden dann mit dem *DICER*-Enzym in 21-23 bp große Fragmente zerschnitten, die jeweils 2 Basen lange 3'-Überhänge besitzen. Im Folgenden werden die Produkte dieser enzymatischen Spaltung als siRNA-Par-4 bezeichnet. Nach dem gleichen Prinzip wurde siRNA gegen Connexin 47 hergestellt, die in den

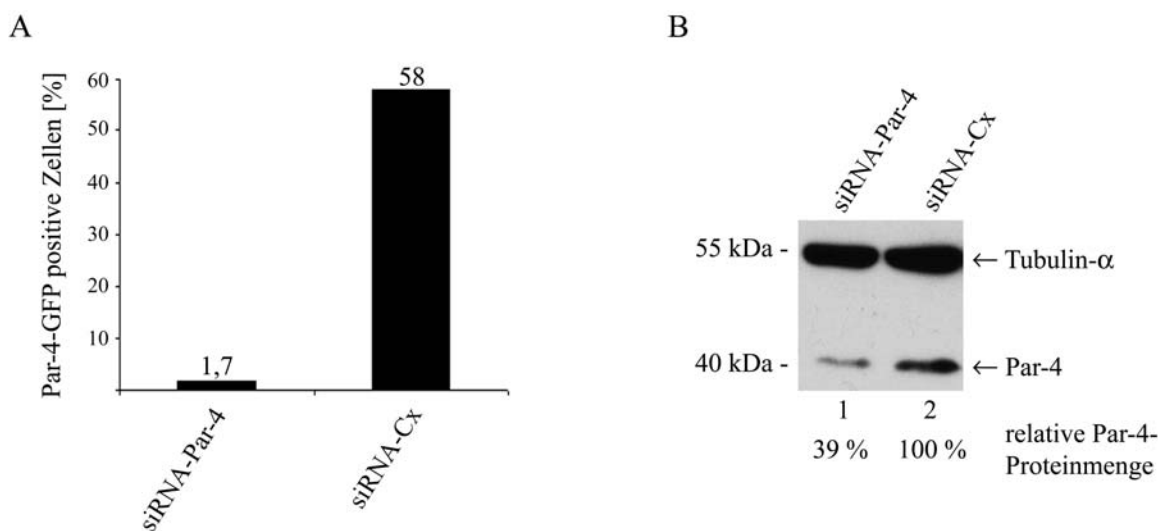
nachfolgenden Experimenten als Kontroll-siRNA diente und als siRNA-Cx bezeichnet wird. Der hierfür verwendete Vektor pGEM-T Easy-Cx, der die murine cDNA-Sequenz von Connexin 47 enthält, wurde freundlicherweise von Dr. Benjamin Odermatt aus der Arbeitsgruppe Willecke (Institut für Genetik, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Für die Linearisierung des Plasmids pGEM-T Easy-Cx wurden die Restriktionsendonukleasen *PstI* und *SacI* verwendet. Die gegen die Proteinkinase Dlk eingesetzte siRNA (bezeichnet als siRNA-Dlk) wurde ebenfalls nach dieser Methode hergestellt; der verwendete Vektor pGEM-T Easy-Dlk, der die vollständige cDNA-Sequenz der Dlk aus der Ratte enthält, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Scheidtmann (Institut für Genetik, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt und mit den Restriktionsendonukleasen *ApaI* und *SacI* linearisiert. Das Verfahren der *in vitro*-Herstellung von siRNA ist in Abb. 6 noch einmal schematisch dargestellt.



**Abb. 6: *In vitro*-Herstellung von siRNA.** Schematische Darstellung des Verfahrens der *in vitro*-Herstellung von siRNA: (a) Zuerst wird die vollständige cDNA-Sequenz des zu untersuchenden Gens in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pGEM-T Easy kloniert, die im 5'-Bereich von dem T7-Promotor und im 3'-Bereich von dem Sp6-Promotor flankiert wird. (b) Dann wird der Vektor vor dem Sp6- oder dem T7-Promotor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aufgeschnitten (rote Pfeile) und aufgereinigt. (c) Jetzt können ssRNA-Stränge der inklonierten Sequenz mit den entsprechenden RNA-Polymerasen hergestellt werden, die dann im nächsten Schritt (d) hybridisiert werden. (e) Die dsRNA-Stränge werden mit dem *DICER*-Enzym verdaut, so dass siRNA-Moleküle der Größe 21-23 bp entstehen.

#### 4.1.1.2 Funktionelle Überprüfung der *in vitro* hergestellten siRNA gegen Par-4

Die Funktionalität der hergestellten siRNA gegen Par-4 wurde sowohl durch Fluoreszenzmikroskopie anhand der Inhibition der Expression von kotransfiziertem Par-4-GFP-Fusionsprotein als auch durch Western Blot-Analysen anhand der Herunterregulation der endogenen Par-4-Expression in humanen HeLa-Zellen nachgewiesen. Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurden REF52.2-Zellen mit 200 ng siRNA-Par-4 und mit 50 ng des Expressionsplasmids, das für das Fusionsprotein Par-4-GFP kodiert, kotransfiziert, nach 48 h fixiert und die Zellen einer DAPI-Färbung unterzogen. Zusätzlich wurden REF52.2-Zellen als Kontrolle mit 200 ng siRNA-Cx zusammen mit 50 ng des Expressionsplasmids für Par-4-GFP kotransfiziert und analysiert. Um die Effektivität der Ausschaltung der Par-4-GFP-Expression mittels siRNA zu quantifizieren, wurden je Ansatz 100 DAPI-positive Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgezählt und die Expression des Par-4-GFP-Fusionsproteins untersucht. Wie in Abb. 7 A zu sehen ist, betrug der Anteil Par-4-GFP positiver Zellen 1,7 % nach Transfektion mit siRNA-Par-4 (Abb. 7 A, Säule 1) gegenüber 58 % Par-4-GFP positiver Zellen im Kontrollansatz (Abb. 7 A, Säule 2). Im Vergleich zum Kontrollansatz betrug die Herunterregulation des kotransfizierten Par-4-GFP demnach über 95 %.



**Abb. 7: Die *in vitro*-hergestellte siRNA gegen Par-4 kann sowohl kotransfiziertes Par-4-GFP-Protein wie auch das endogene Par-4-Protein herunterregulieren.** (A) REF52.2-Zellen wurden mit 200 ng siRNA-Par-4 und 50 ng des Par-4-GFP-Expressionsplasmids oder als Kontrolle mit 200 ng siRNA-Cx und 50 ng des Par-4-GFP-Expressionsplasmids kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Die Auswertung erfolgte durch direkte Fluoreszenzmikroskopie. Jeweils 100 DAPI-positive Zellen wurden auf Expression von Par-4-GFP hin untersucht und ausgezählt. Der prozentuale Anteil Par-4-GFP positiver Zellen von 100 DAPI-positiven Zellen ist im Säulendiagramm graphisch dargestellt. (B) HeLa-Zellen wurden mit 2,5 µg siRNA-Par-4 oder als Kontrolle mit 2,5 µg siRNA-Cx transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und jeweils 10 µg Gesamtprotein-Zellextrakt in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Western Blot-Membran übertragen. Der Nachweis des endogenen Par-4-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper und der Nachweis des endogenen  $\alpha$ -Tubulin-Proteins als interner Standard mit einem monoklonalen anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper. Die Intensität der Proteinbanden wurde densitometrisch bestimmt, um die relative Par-4-Proteinmenge in den Gesamtprotein-Zellextrakten zu berechnen.

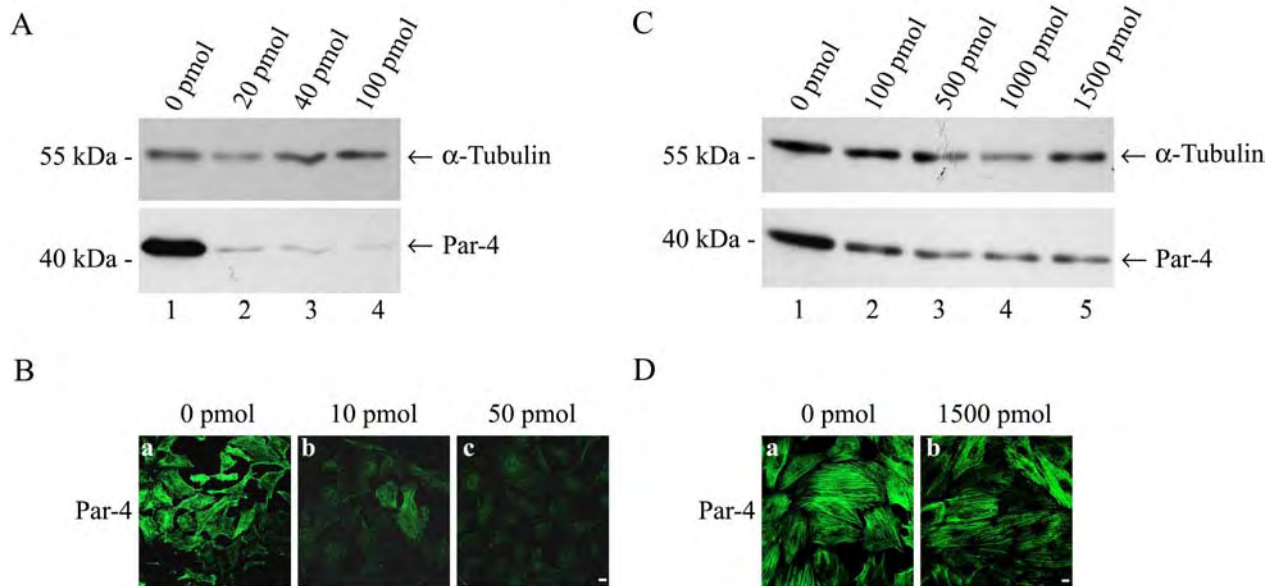
Um die Funktionalität der hergestellten siRNA-Par-4 gegenüber endogenem Par-4 zu überprüfen, wurden humane HeLa-Zellen mit 2,5µg siRNA-Par-4 und als Kontrolle mit 2,5 µg siRNA-Cx transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und jeweils 10 µg der Gesamtprotein-Zellextrakte in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Hilfe der Western Blot-Technik analysiert. Der immunologische Nachweis des endogenen Par-4-Proteins erfolgte mit Hilfe eines polyklonalen anti-Par-4-Antikörpers. Als Mengengleich der geladenen Proteinmenge wurde zusätzlich endogenes  $\alpha$ -Tubulin mit Hilfe eines monoklonalen anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörpers nachgewiesen. Das Ergebnis in Abb. 7 B zeigt, dass nach Transfektion der HeLa-Zellen mit siRNA-Par-4 (Abb. 7 B unten, Spur 1) die Expression des endogenen Par-4-Proteins gegenüber dem Kontrollansatz (Abb. 7 B unten, Spur 2) stark abnimmt. Um die Effektivität der eingesetzten siRNA-Par-4 quantitativ bestimmen zu können, wurde die Intensität der einzelnen Proteinbanden auf der Western Blot-Membran densitometrisch gemessen. Dann wurde das relative Verhältnis der Par-4-Proteinmenge zur entsprechenden  $\alpha$ -Tubulin-Proteinmenge berechnet, dabei wurde das relative Verhältnis Par-4/ $\alpha$ -Tubulin des Kontrollansatzes als 100 % festgesetzt. Anschließend wurde im Vergleich zur Kontrolle das relative Verhältnis Par-4/ $\alpha$ -Tubulin im siRNA-Par-4-Ansatz berechnet. Die quantitative Auswertung zeigte, dass die relative Par-4-Proteinmenge in dem siRNA-Par-4-Ansatz nur 39 % betrug im Gegensatz zu 100 % im Kontrollansatz (siehe Abb. 7 B). Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass durch die Transfektion der *in vitro* hergestellten siRNA gegen Par-4 sowohl die ektopische als auch die endogene Expression von Par-4 effektiv herunterreguliert werden konnte.

#### **4.1.1.3 Überprüfung der Funktionalität von Cy3-gekoppelter siRNA gegen humanes Par-4 sowie Par-4 aus der Ratte**

Die *in vitro*-Herstellung von siRNA (siehe 4.1.1.1) hat den Vorteil, dass die hergestellte siRNA ein Gemisch aus verschiedenen Teilsequenzen der Par-4-cDNA darstellt, somit sehr aktiv und vor allem gegen RNA jeder Spezies gerichtet ist. Der Nachteil der Methode ist allerdings, dass die Ausbeute an siRNA sehr gering und das Verfahren sehr aufwendig und langwierig ist. Aus diesem Grund sollten siRNA-Moleküle gegen humanes Par-4 sowie Par-4 aus der Ratte von der Firma Dharmacon synthetisiert werden. Um die Aufnahme der siRNA nach der Transfektion in die Zellen anhand immunfluoreszenzmikroskopischer Analysen überprüfen zu können, wurde die siRNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelt. Für die Synthese der siRNA gegen humanes Par-4 wurde eine bereits bekannte Sequenz gegen die Par-4-mRNA verwendet (Kawai *et al.*, 2003). Da diese siRNA aufgrund hoher



Sequenzunterschiede nicht gegen Par-4 aus der Ratte verwendet werden konnte, wurde eine zusätzliche siRNA-Par-4-Sequenz des Ratten-Orthologs ausgewählt (siehe 2.8).



**Abb. 8: Überprüfung der Funktionalität von Cy3-gekoppelter siRNA gegen humanes Par-4 sowie Par-4 aus der Ratte.** (A) HeLa-Zellen wurden mit 0, 20, 40 oder 100 pmol siRNA-Cy3 gegen humanes Par-4 transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Zellernte und -lyse. 10 µg der Gesamtprotein-Zellextrakte wurden in einer 10%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und die endogene Par-4-Proteinmenge in einem Western Blot mittels polyklonalem anti-Par-4-Antikörper detektiert. Als Mengenabgleich der geladenen Proteinmengen wurde die endogene  $\alpha$ -Tubulin-Proteinmenge mit einem monoklonalem anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper detektiert. (B) HeLa-Zellen wurden mit 0, 10 oder 50 pmol siRNA-Cy3 gegen humanes Par-4 transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert und anschließend immunzytochemisch mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper und einem Alexa 488-fluoreszenzmarkierten anti-Kaninchen-Antikörper gefärbt sowie einer DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Balken 10 µm. (C) REF52.2-Zellen wurden mit 0, 100, 500, 1000 oder 1500 pmol siRNA-Cy3 gegen Par-4 aus der Ratte transfiziert. Die weitere Auswertung erfolgte wie unter (A) beschrieben. (D) REF52.2-Zellen wurden mit 0 oder 1500 pmol siRNA-Cy3 gegen Par-4 aus der Ratte transfiziert. Die weitere Auswertung erfolgte wie unter (B) beschrieben. Balken 10 µm.

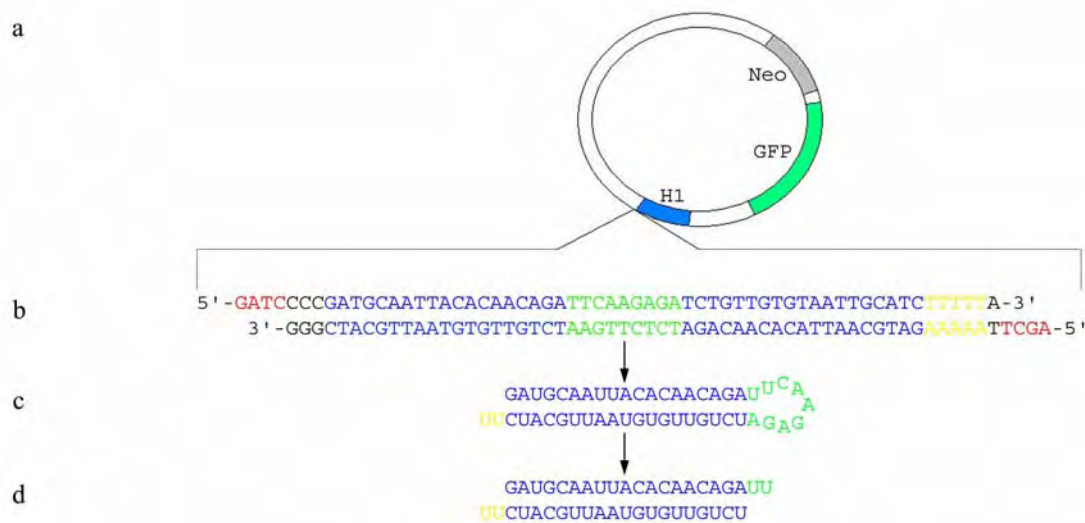
Für den Funktionalitätstest der Cy3-gekoppelten siRNA wurden humane HeLa-Zellen mit 0-100 pmol oder die Ratten-Fibroblasten-Zelllinie REF52.2 mit 0-1500 pmol siRNA gegen humanes Par-4 bzw. Par-4 aus der Ratte transfiziert. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion lysiert und 10 µg des Gesamtprotein-Zellextrakts in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteinbanden auf eine Nitrozellulose-Membran wurde das endogene Par-4-Protein immunologisch mit einem polyklonalem anti-Par-4-Antikörper detektiert. Die Färbung derselben Blot-Membran mit einem monoklonalen anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper diente dem Abgleich der aufgetragenen Proteinmengen. Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurden die transfizierten Zellen nach 48 h fixiert und das endogene Par-4-Protein mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper und einem Alexa 488-fluoreszenzmarkierten anti-Kaninchen-Antikörper angefärbt. Die Western Blot-Analyse in Abb. 8 A verdeutlicht, dass die HeLa-Zellen eine

starke Expression von endogenem Par-4 aufweisen (Abb. 8 A unten, Spur 1). Jedoch konnte nach der Transfektion von 20 pmol und 40 pmol siRNA (Abb. 8 A unten, Spur 2 und 3) nur eine schwache Par-4-Proteinbande detektiert werden, und nach Transfektion von 100 pmol siRNA war kaum noch endogenes Par-4-Protein nachzuweisen (Abb. 8 A unten, Spur 4). Dieses Ergebnis konnte anhand von Immunfluoreszenzanalysen bestätigt werden (Abb. 8 B). In den Kontrollzellen, die nicht mit siRNA transfiziert waren, konnte eine starke Par-4-Färbung am Aktin-Zytoskelett nachgewiesen werden (Abb. 8 B, a). Bereits nach Transfektion der HeLa-Zellen mit 10 pmol siRNA gegen Par-4 war die Färbung der HeLa-Zellen mit dem anti-Par-4-Antikörper sehr schwach (Abb. 8 B, b), und nach Transfektion von 50 pmol siRNA-Par-4 konnte kaum noch endogenes Par-4-Protein detektiert werden (Abb. 8 B, c). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Cy3-gekoppelte siRNA gegen humanes Par-4 funktionell ist und das endogene Par-4-Protein in den HeLa-Zellen sehr effektiv herunterreguliert werden kann. Im Gegensatz zu der siRNA gegen humanes Par-4 war die Cy3-gekoppelte siRNA gegen Par-4 aus der Ratte nicht so wirksam. Die Western Blot-Analyse in Abb. 8 C zeigte, dass die endogene Par-4-Protein-Menge in den REF52.2-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 8 C unten, Spur 1) selbst nach Transfektion mit 1500 pmol siRNA (Abb. 8 C unten, Spur 5) nur geringfügig herunterreguliert werden konnte. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Analyse der Expression des endogenen Par-4-Proteins in den REF52.2-Zellen verdeutlicht, dass das endogene Par-4-Protein am Aktin-Zytoskelett lokalisiert ist (Abb. 8 D, a). Auch nach der Transfektion von 1500 pmol siRNA-Par-4 war eine starke Par-4-Expression in den Zellen nachweisbar (Abb. 8 D, b), wodurch deutlich wurde, dass in den Ratten-Fibroblasten keine zufriedenstellende Herunterregulation der endogenen Par-4-Expression durch den Einsatz der Cy3-gekoppelten siRNA gegen Par-4 der Ratte erreicht werden konnte. Aus diesem Grund wurden für die nachfolgenden Untersuchungen nur die humanen HeLa-Zellen herangezogen.

#### **4.1.1.4 Herstellung eines Expressionsplasmids für die *in vivo*-Herstellung von siRNA-Par-4**

Für die *in vivo*-Herstellung von siRNA-Par-4 wurde das siRNA-Expressionsplasmid pSUPER-KawPar4 konstruiert (Abb. 9). Hierfür wurden Oligonukleotide verwendet, die die funktionelle siRNA-Sequenz beinhalten, die bereits für die Cy3-gekoppelte siRNA gegen humanes Par-4 verwendet wurde (siehe 4.1.1.3). Die Oligonukleotide 5' *siKawSuper* und 3' *siKawSuper*, die Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bgl*III und *Hind*III aufweisen, wurden hybridisiert und anschließend in den Vektor pSUPER.neo+gfp

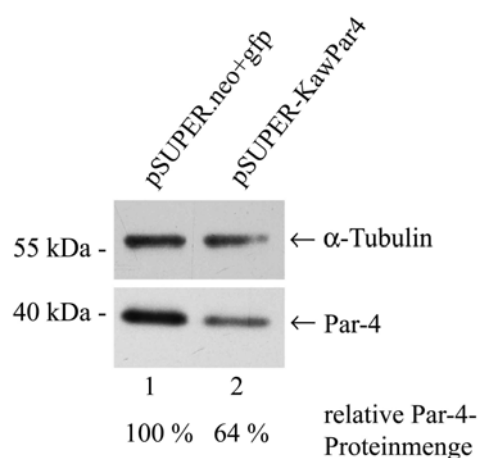
direkt hinter den RNA-Polymerase III Promotor H1 inkloniert. Das hergestellte Plasmid-konstrukt, bezeichnet als pSUPER-KawPar4, wurde anschließend durch Sequenzierung überprüft. Wird der Vektor pSUPER-KawPar4 in eukaryontische Zellen transfiziert, synthetisiert die endogene RNA-Polymerase III die hinter dem H1-Promotor liegende Sequenz bis zum Stopp-Signal. Der so gebildete RNA-Strang faltet sich zu einer *short hairpin* RNA (*shRNA*) zusammen und wird anschließend durch zelleigene Enzyme zu siRNA-Molekülen von 21-23 bp Länge prozessiert. In Abb. 9 ist dieser Prozess schematisch verdeutlicht.



**Abb. 9: Schematische Darstellung der *in vivo*-Herstellung von siRNA gegen humanes Par-4.** (a) Das siRNA-Expressionsplasmid pSUPER.neo+gfp besitzt hinter dem RNA-Polymerase III Promotor H1 (blaues Feld) eine multiple Klonierungsstelle, über die hybridisierte Oligonukleotide (5' *siKawSuper* und 3' *siKawSuper*) inkloniert werden können. Zusätzlich enthält das Plasmid eine GFP-Expressionskassette (grünes Feld) sowie eine Neomycin-Expressionskassette (graues Feld), die eine Antibiotika-Selektion der transfizierten Zellen ermöglicht. (b) Die Oligonukleotide werden so ausgewählt, dass sich nach der Hybridisierung zwei Restriktionsüberhänge an dem dsDNA-Strang befinden (rot), über den die Klonierung in den Vektor erfolgen kann. Der 19 nt langen siRNA-Sequenz gegen humanes Par-4 (blau) folgt ein Platzhalter von 9 nt Länge (grün), nach dem die 19 nt lange siRNA-Par-4-Sequenz revers wiederholt wird (blau). Als Stopp-Signal für die RNA-Polymerase III dienen fünf Thymidinbasen (gelb). (c) Die RNA-Polymerase III synthetisiert nach der Transfektion des Vektors in der Zelle einen RNA-Strang, der sich zu einer so genannten shRNA zusammenlagert, wobei die Schleife aus dem 9 nt langen Platzhalter gebildet wird. (d) Zelleigene Enzyme prozessieren die shRNA zu siRNA-Molekülen von 21-23 bp Länge, die in der Lage sind, die Degradation der Par-4 mRNA einzuleiten.

HeLa-Zellen wurden transient mit dem siRNA-Expressionsplasmid pSUPER-KawPar4 oder als Kontrolle mit dem leeren Plasmid pSUPER.neo+gfp transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Zellyse und jeweils 10 µg des Gesamtprotein-Zellextraktes wurden in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Western Blot-Analysen mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper wurde das endogene Par-4-Protein detektiert. Die Färbung derselben Western Blot-Membran mit einem monoklonalen anti-α-Tubulin-Antikörper diente wiederum dem Abgleich der aufgetragenen Proteinmengen. Das Ergebnis in Abb. 10 verdeutlicht, dass das

endogene Par-4-Protein nach der Transfektion der HeLa-Zellen mit dem pSUPER-KawPar4-Plasmid (Abb. 10 unten, Spur 2) gegenüber der Kontrolle (Abb. 10 unten, Spur 1) herunterreguliert wird. Um die Effektivität der *in vivo* synthetisierten siRNA gegen Par-4 zu quantifizieren, wurde die Intensität der Proteinbanden auf der Western Blot-Membran densitometrisch gemessen und die relativen Par-4-Proteinmengen in den Gesamtprotein-Zellextrakten, wie unter 4.1.1.2 bereits beschrieben, berechnet. Die quantitative Auswertung zeigte, dass die relative Par-4-Proteinmenge in den mit dem Plasmid pSUPER-KawPar4 transfizierten HeLa-Zellen nur 64 % im Vergleich zur relativen Par-4-Proteinmenge im Kontrollansatz (100 %) betrug.

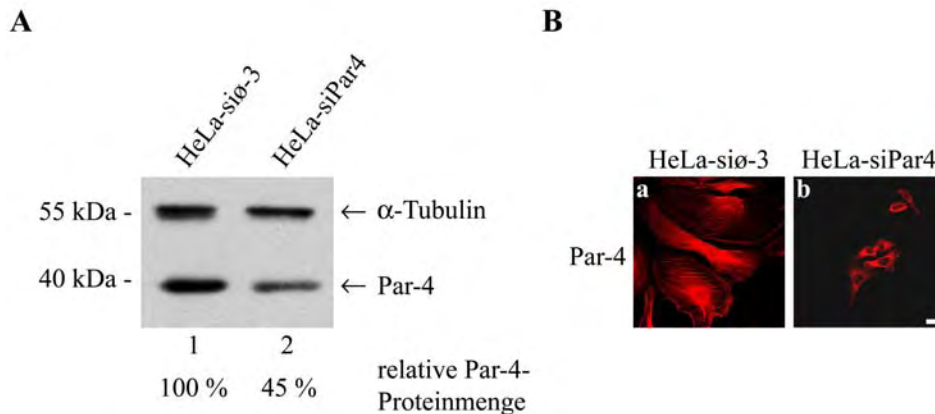


**Abb. 10: Überprüfung der Funktionalität des siRNA-Expressionsplasmids pSUPER-KawPar4 gegen humanes Par-4.** HeLa-Zellen wurden transient mit dem Vektor pSUPER-KawPar4 oder als Kontrolle mit dem leeren Vektor pSUPER.neo+gfp transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Zellernte und -lyse. 10 µg der Gesamtprotein-Zellextrakte wurden in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Nachweis des endogenen Par-4-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper. Als interner Mengenabgleich erfolgte der Nachweis von endogenem α-Tubulin mit einem monoklonalen anti-α-Tubulin-Antikörper. Die Intensität der Proteinbanden wurde densitometrisch bestimmt und die relative Par-4-Proteinmenge in den Gesamtprotein-Zellextrakten berechnet.

#### 4.1.1.5 Herstellung einer stabil siRNA-Par-4 exprimierenden Zelllinie

Nachdem die Wirksamkeit des siRNA-Par-4-Expressionsplasmids pSUPER-KawPar4 überprüft wurde (siehe 4.1.1.4), sollten HeLa-Zelllinien hergestellt werden, die stabil siRNA gegen Par-4 exprimieren. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen entweder mit dem Vektor pSUPER-KawPar4 oder mit dem leeren Kontrollvektor pSUPER.neo+gfp transfiziert und nach 72 h mit 700 ng/µl Geneticindisulfat (G418) selektioniert. Es konnte nur 1 HeLa-Zellklon (bezeichnet als HeLa-siPar4) etabliert werden, der stabil siRNA-Par-4 exprimiert, obwohl mehrere Transfektionsexperimente durchgeführt wurden und die Selektionsbedingungen variiert wurden. Im Gegensatz dazu konnten mehrere HeLa-Zellklone etabliert werden, die den Kontrollvektor pSUPER.neo+gfp stabil exprimierten. Drei Zellklone, bezeichnet als HeLa-si ∅ -1, -2 und -3, wurden für die weiteren Analysen isoliert und in Kultur genommen. Als nächstes wurde die Expressionsstärke des endogenen Par-4-Proteins in der Zelllinie HeLa-siPar4 sowie in der Kontroll-Zelllinie HeLa-si ∅ -3 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blot-Technik untersucht. Für die Western Blot-Analysen wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein-Zellextrakt der Zelllinie HeLa-siPar4 sowie

der Kontroll-Zelllinie HeLa-si Ø -3 durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Western Blot-Membran transferiert. Der immunologische Nachweis der endogenen Par-4-Proteinmenge wurde mit Hilfe eines polyklonalen anti-Par-4-Antikörpers bestimmt, als Mengenabgleich wurde auf der selben Blot-Membran das endogene  $\alpha$ -Tubulin-Protein mit einem anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper nachgewiesen.



**Abb. 11: Überprüfung der stabil siRNA gegen Par-4 exprimierenden Zelllinie HeLa-siPar4 sowie der Kontroll-Zelllinie HeLa-si Ø -3.** (A) Die Gesamtprotein-Zellextrakte von den stabil transfizierten HeLa-Zelllinien HeLa-siPar4 und HeLa-si Ø -3 wurden in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Western Blot-Membran transferiert. Der Nachweis des endogenen Par-4-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper, das endogene  $\alpha$ -Tubulin-Protein wurde mit einem monoklonalen anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper detektiert. Die Intensität der Proteinbanden wurde densitometrisch bestimmt und die relative Par-4-Proteinmenge in den Gesamtprotein-Zellextrakten berechnet. (B) Die stabil transfizierten HeLa-Zelllinien HeLa-siPar4 und HeLa-si Ø -3 wurden für die fluoreszenzmikroskopische Analyse mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper und einem Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Kaninchen-Antikörper gefärbt sowie einer DAPI-Färbung unterzogen. Die Analyse der Zellen erfolgte am konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Balken 20  $\mu$ m.

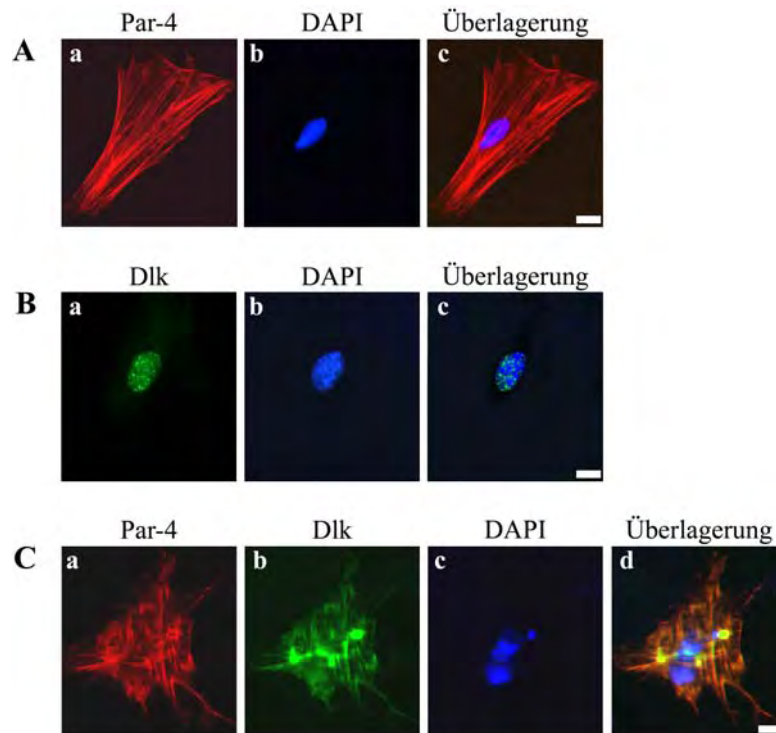
Das Ergebnis in Abb. 11 A zeigt, dass die Expression des endogenen Par-4-Proteins in der stabil transfizierten Zelllinie HeLa-siPar4 (Abb. 11 A unten, Spur 2) im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie HeLa-si Ø -3 (Abb. 11 A unten, Spur 1) herunterreguliert ist. Die Quantifizierung der endogenen relativen Par-4-Proteinmenge zeigte weiterhin, dass die Par-4-Proteinmenge der Zelllinie HeLa-siPar4 nur 45 % im Vergleich zur relativen Par-4-Proteinmenge in der Zelllinie HeLa-si Ø -3 betrug. Für die Immunfluoreszenzanalysen wurde das endogene Par-4-Protein in der Zelllinie HeLa-siPar4 und in der Kontroll-Zelllinie HeLa-si Ø -3 mit Hilfe eines polyklonalen anti-Par-4-Antikörpers und eines Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Kaninchen-Antikörpers detektiert. Das Ergebnis in Abb. 11 B verdeutlicht, dass die Kontroll-Zelllinie eine starke endogene Par-4-Expression aufweist und das Par-4-Protein mit den Spannungsfasern des Aktin-Zytoskeletts assoziiert ist (Abb. 11 B, a). In der Zelllinie HeLa-siPar4, die stabil siRNA gegen Par-4 exprimiert, wurde ebenfalls endogenes Par-4-Protein detektiert, die Zellen wiesen allerdings eine durchweg kleinere Zellmorphologie im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie auf (Abb. 11 B, b). Abschließend kann man festhalten, dass

die Zelllinie HeLa-siPar4 stabil siRNA-Par-4 exprimiert. Die exprimierte siRNA gegen Par-4 reichte jedoch nicht aus, um die endogene Par-4-Expression vollständig zu inhibieren. Aus diesem Grund wurde auf weitere Studien mit der Zelllinie HeLa-siPar4 verzichtet.

#### **4.1.2 Inhibition der Par-4-Funktion durch den Einsatz dominant-negativer Par-4-Mutanten**

Zusätzlich zur Inhibition der endogenen Par-4-Expression durch die siRNA-Technik sollten Mutanten von Par-4 identifiziert werden, die einen dominant-negativen Effekt gegenüber dem Par-4 wt-Protein ausüben und somit möglicherweise in der Lage sind, die Funktion des Par-4-Proteins zu unterdrücken. Das pro-apoptotische Protein Par-4 ist nach alleiniger Expression nicht in der Lage, in Ratten-Fibroblasten die Apoptose zu induzieren. Eine Koexpression von Par-4 zusammen mit seinem Interaktionspartner, der Serin/Threonin-Kinase Dlk, führt in diesen Zellen allerdings zu einer Translokation der Dlk aus dem Zellkern in das Zytoplasma, wo sie mit Par-4 am Aktin-Zytoskelett kolokalisiert. Die Kolokalisation von Par-4 und der Dlk an den Aktinfilamenten induziert eine starke Veränderung des Aktin-Zytoskeletts und die Apoptose (Page *et al.*, 1999). Die Identifizierung potentiell dominant-negativer Par-4-Mutanten sollte nun anhand ihrer Fähigkeit zur Blockierung der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose in der Ratten-Fibroblasten-Zelllinie REF52.2 erfolgen. Zu diesem Zweck wurden REF52.2-Zellen mit Par-4 und Dlk sowie mit den zu untersuchenden Par-4-Mutanten kotransfiziert. Die Identifizierung apoptotischer Zellen erfolgte immunfluoreszenzmikroskopisch anhand morphologischer Merkmale wie der Blasenbildung der Plasmamembran (*membrane blebbing*), der Fragmentierung des Zellkerns sowie der Chromatinkondensation. Die Abb. 12 zeigt exemplarisch die morphologischen Merkmale einer nicht apoptotischen REF52.2-Zelle nach Transfektion mit FLAG-Par-4 wt (Abb. 12 A) oder GFP-Dlk (Abb. 12 B) sowie die morphologischen Merkmale einer apoptotischen REF52.2-Zelle nach Kotransfektion von FLAG-Par-4 wt und GFP-Dlk (Abb. 12 C). Das FLAG-Par-4 wt-Fusionsprotein wurde in diesen Versuchen mit einem anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-markierten anti-Maus-Antikörper angefärbt, die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI-Färbung. In einer nicht-apoptotischen Zelle, die mit FLAG-Par-4 wt transfiziert wurde, lokalisiert das Fusionsprotein FLAG-Par-4 wt an den Spannungsfasern des Aktin-Zytoskeletts (Abb. 12 A, a), die DAPI-Färbung des Zellkerns zeigt, dass dieser keine morphologischen Merkmale der Apoptose aufweist (Abb. 12 A, b). Das GFP-Dlk-Fusionsprotein ist nach ektopischer Expression im Zellkern sowohl diffus verteilt wie auch in so genannten „speckles“ zu finden (Abb. 12 B, a und c). Die Visualisierung des Zellkerns

verdeutlicht, dass dieser völlig intakt ist (Abb. 12 B, b). In einer apoptotischen Zelle, gezeigt in Abb. 12 C, kolokalisiert das pro-apoptotische Protein FLAG-Par-4 wt mit dem koexprimierten GFP-Dlk-Fusionsprotein am stark kontrahierten Aktin-Zytoskelett (Abb. 12 C, d) und der Zellkern ist bereits stark fragmentiert (Abb. 12 C, c).



**Abb. 12: Einzelexpression von Par-4 und Dlk oder Koexpression von Par-4 und Dlk in REF52.2-Zellen.** (A) REF52.2-Zellen wurden mit FLAG-Par-4 transfiziert und 24 h nach der Transfektion fixiert. Die Detektion des FLAG-Par-4-Fusionsproteins erfolgte mittels anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörper. Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff DAPI angefärbt. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Axiophot Fluoreszenz-Mikroskop. Balken 10  $\mu$ m. (B) 24 h nach der Transfektion von REF52.2-Zellen mit GFP-DLK wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit DAPI visualisiert. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Axiophot Fluoreszenz-Mikroskop. Balken 10  $\mu$ m. (C) REF52.2-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit den Expressionsplasmiden für FLAG-Par-4 und GFP-Dlk kotransfiziert, 24 h nach der Transfektion fixiert und anschließend immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörper gefärbt sowie einer DAPI-Färbung unterzogen. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Axiophot Fluoreszenz-Mikroskop. Balken 10  $\mu$ m.

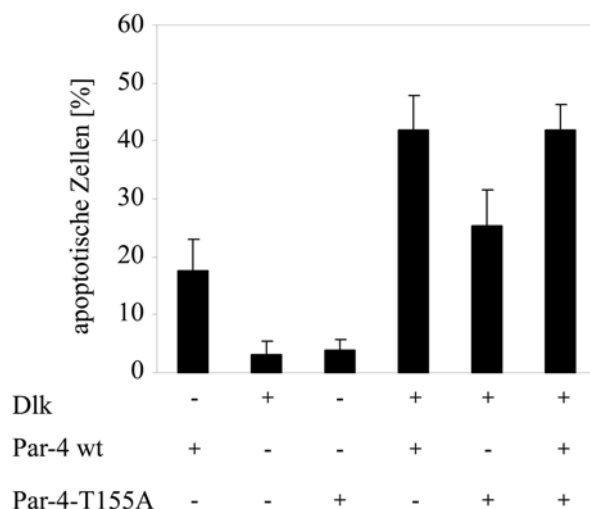
#### 4.1.2.1 Untersuchung der Par-4-Mutante Par-4-T155A als potentiell dominant-negative Mutante in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose

Als erstes sollte die Par-4-Phosphorylierungsmutante Par-4-T155A untersucht werden, die von Meike Boosen im Rahmen ihrer Doktorarbeit (2007) generiert wurde. In der Mutante Par-4-T155A ist die AS Threonin<sub>155</sub> im Ratten-Par-4-Protein durch die AS Alanin ausgetauscht worden, weshalb die Mutante nicht mehr durch die Dlk an der AS Threonin<sub>155</sub> phosphoryliert werden kann und in ihrer Fähigkeit zur Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose beeinträchtigt ist. Nach der Koexpression von Par-4-T155A zusammen mit der Dlk kommt es



nicht zu einer Translokation der Kinase aus dem Zellkern an das Aktin-Zytoskelett und die Apoptose wird in den Zellen nicht induziert (Dissertation Boosen, 2007).

REF52.2-Zellen wurden als Kontrolle einzeln mit FLAG-Par-4 wt bzw. FLAG-Par-4-T155A und GFP-Dlk transfiziert oder mit FLAG-Par-4 wt bzw. FLAG-Par-4-T155A und GFP-Dlk im Verhältnis 1:1 kotransfiziert. Um den Effekt der Mutante Par-4-T155A auf die Par-4/Dlk-induzierte Apoptose zu untersuchen, wurden REF52.2-Zellen mit FLAG-Par-4 wt, GFP-Dlk und FLAG-Par-4-T155A im Verhältnis 1:1:1 kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die FLAG-Fusionsproteine mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper sowie einem Cy3-gekoppelten anti-Maus-Antikörper immunologisch detektiert. Die Zellkerne wurden mit dem DAPI-Farbstoff visualisiert. Um die potentielle dominant-negative Wirkung der Mutante Par-4-T155A in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose quantitativ zu ermitteln, wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 100 transfizierte Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert und die Apoptoserate anhand morphologischer Merkmale der Apoptose (siehe auch Abb. 12 C) prozentual bestimmt.



**Abb. 13: Apoptose-Induktion in REF52.2-Zellen durch ektopische Expression von Par-4 wt, Par-4-T155A und Dlk.** REF52.2-Zellen wurden transfiziert mit FLAG-Par-4 wt, FLAG-Par-4-T155A, GFP-Dlk oder kotransfiziert mit FLAG-Par-4 wt und GFP-Dlk, FLAG-Par-4-T155A und GFP-Dlk oder FLAG-Par-4 wt, FLAG-Par-4-T155A und GFP-Dlk. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion fixiert und anschließend immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörper gefärbt sowie einer DAPI-Färbung unterzogen. Dann wurde der Anteil apoptotischer Zellen durch fluoreszenzmikroskopische Analyse unter den transfizierten Zellen ermittelt. Im Diagramm sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt, in denen jeweils 100 Zellen ausgezählt wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die quantitative Auswertung dieses Experiments ist in Abb. 13 in einem Säulendiagramm graphisch dargestellt. Die Apoptoserate betrug nach der Einzelexpression von Dlk 3 % (Abb. 13, Säule 2) und nach der Einzelexpression von Par-4-T155A 4 % (Abb. 13, Säule 3). Das Par-4 wt-Protein induzierte hingegen in 18 % der Zellen die Apoptose (Abb. 13, Säule 1). Die



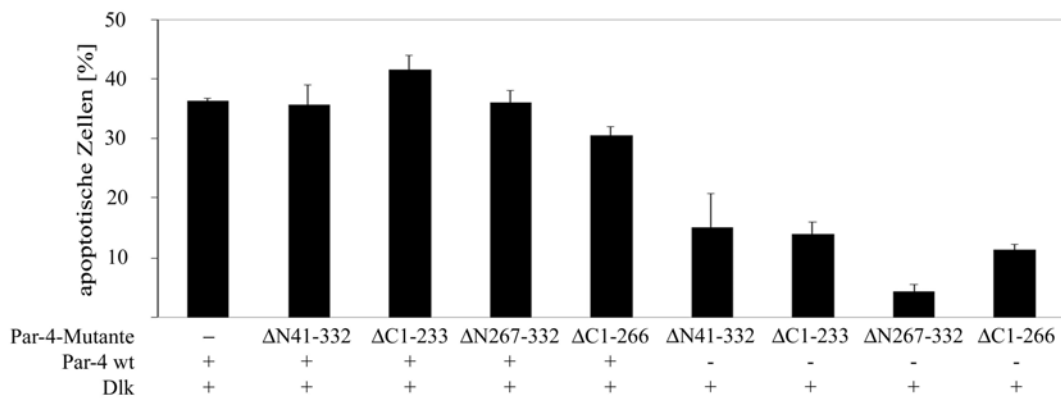
Apoptoserate betrug etwa 42 % nach der Koexpression von Par-4 und Dlk (Abb. 13, Säule 4), im Gegensatz dazu wurde die Apoptose nach Koexpression von Par-4-T155A und Dlk nur zu ca. 26 % induziert (Abb. 13, Säule 5). Die Koexpression von Par-4-T155A zusätzlich zu Par-4 wt und Dlk induzierte die Apoptose in 42 % der transfizierten Zellen (Abb. 13, Säule 6). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieses Experiments, dass die Mutante Par-4-T155A nicht in der Lage ist, die Par-4/Dlk vermittelte Apoptose in REF52.2-Zellen zu blockieren.

#### 4.1.2.2 Untersuchung von Par-4-Deletionsmutanten als potentiell dominant-negative Mutanten in der Par-4/Dlk-induzierten Apoptose

In einem weiteren Experiment sollten die von Dr. Susanne Vetterkind im Rahmen ihrer Doktorarbeit (2003) hergestellten Par-4-Deletionsmutanten  $\Delta N_{41-332}$ ,  $\Delta C_{1-233}$ ,  $\Delta C_{1-266}$  und  $\Delta N_{266-332}$  auf eine potentielle dominant-negative Funktion in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose in REF52.2-Zellen untersucht werden. Die Par-4-Deletionsmutanten  $\Delta N_{41-332}$  (AS 41-332) und  $\Delta N_{266-332}$  (AS 266-332) sind N-terminal deletiert, wobei der Mutante  $\Delta N_{41-332}$  nur die ersten 40 AS und damit die erste Kernlokalisationssequenz fehlt. Die Mutante  $\Delta N_{266-332}$  (AS 266-332) besteht ausschließlich aus der C-terminalen Todesdomäne und dem Leucin-Zipper von Par-4. Der C-terminal deletierten Par-4-Mutante  $\Delta C_{1-233}$  (AS 1-233) fehlt die komplette Todesdomäne mit dem Leucin-Zipper, der C-terminal deletierten Par-4-Mutante  $\Delta C_{1-266}$  (AS 1-266) fehlt nur der Leucin-Zipper. Alle vier Par-4-Deletionsmutanten  $\Delta N_{41-332}$ ,  $\Delta C_{1-233}$ ,  $\Delta C_{1-266}$  und  $\Delta N_{266-332}$  weisen nach der Expression in REF52.2-Zellen eine schwächere Anbindung an das Aktin-Zytoskelett im Vergleich zu Par-4 wt auf. Des Weiteren korreliert die Beeinträchtigung der Aktin-Zytoskelett-Bindung der Par-4-Deletionsmutanten mit einer verringerten Fähigkeit zur Induktion der Apoptose (Vetterkind *et al.*, 2005b). Um die Par-4-Deletionsmutanten in der direkten Fluoreszenzmikroskopie untersuchen zu können, wurden die entsprechenden cDNA-Sequenzen in den pEGFP-N1-Vektor kloniert. Zu diesem Zweck wurden die Par-4-cDNA-Deletionskonstrukte  $\Delta N_{41-332}$ ,  $\Delta C_{1-233}$  und  $\Delta C_{1-266}$  zuerst mit Hilfe einer PCR durch den Einsatz entsprechender Oligonukleotide amplifiziert und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *AgeI* in das Plasmid pEGFP-N1 kloniert. Als Matrizen-DNA in der PCR diente die vollständige cDNA-Sequenz von Par-4 aus der Ratte. Für die Amplifikation des Par-4- $\Delta N_{41-332}$ -Fragments wurden die Oligonukleotide 5' *Par4-193-EcoRI* und *Par4 AgeI reverse* verwendet, für die Amplifikation des Par-4- $\Delta C_{1-233}$ -Fragments wurden die Oligonukleotide 5' *PAR4 DASH EcoRI* und 3' *Par4-771-AgeI* und für die Amplifikation des Par-4- $\Delta C_{1-266}$ -Fragments wurden die Oligonukleotide 5' *PAR4 DASH EcoRI* und 3' *Par4-870-AgeI* eingesetzt. Die hergestellten Plasmidkonstrukte wurden als

pEGFP-N1-Par4 $\Delta$ N<sub>41-332</sub>, pEGFP-N1-Par4 $\Delta$ C<sub>1-233</sub> und pEGFP-N1-Par4 $\Delta$ C<sub>1-266</sub> bezeichnet. Das Expressionsplasmid pEGFP-N1-Par4 $\Delta$ N<sub>266-332</sub> wurde bereits von Dr. Susanne Vetterkind hergestellt und konnte direkt in den Experimenten eingesetzt werden.

Für die Untersuchung der Par-4-Deletionsmutanten  $\Delta$ N<sub>41-332</sub>-GFP,  $\Delta$ C<sub>1-233</sub>-GFP,  $\Delta$ N<sub>266-332</sub>-GFP und  $\Delta$ C<sub>1-266</sub>-GFP wurden die entsprechenden Expressionsplasmide in REF52.2-Zellen zusammen mit Par-4-GFP wt und FLAG-Dlk kotransfiziert. Als Kontrolle wurden die REF52.2-Zellen nur mit FLAG-Dlk und Par-4-GFP wt bzw. mit FLAG-Dlk und den verschiedenen Par-4-Mutanten  $\Delta$ N<sub>41-332</sub>-GFP,  $\Delta$ C<sub>1-233</sub>-GFP,  $\Delta$ N<sub>266-332</sub>-GFP und  $\Delta$ C<sub>1-266</sub>-GFP kotransfiziert. Für die Transfektion wurden die Expressionsplasmide für Par-4-GFP wt und für FLAG-Dlk in einem Verhältnis von 2:1 eingesetzt, das Verhältnis der Expressionsplasmide für Par-4-GFP wt und für die verschiedenen Par-4-GFP-Deletionskonstrukte betrug 1:1. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion fixiert, immunzytochemisch mit einem anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörper gefärbt und die Zellkerne durch eine DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Um die Apoptoseraten quantitativ zu ermitteln, wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 100 transfizierte Zellen analysiert und der Anteil apoptotischer Zellen anhand morphologischer Merkmale (siehe auch Abb. 12 C) bestimmt.



**Abb. 14: Apoptose-Induktion in REF52.2-Zellen durch ektopische Expression von Par-4 wt, Par-4-Deletionsmutanten und Dlk.** REF52.2-Zellen wurden (wie angegeben) entweder mit FLAG-Dlk und Par-4-GFP wt bzw. mit FLAG-Dlk und den Par-4-GFP-Deletionsmutanten  $\Delta$ N<sub>41-332</sub>,  $\Delta$ C<sub>1-233</sub>,  $\Delta$ C<sub>1-266</sub> und  $\Delta$ N<sub>266-332</sub> oder mit FLAG-Dlk, Par-4-GFP wt und den Par-4-GFP-Deletionsmutanten  $\Delta$ N<sub>41-332</sub>,  $\Delta$ C<sub>1-233</sub>,  $\Delta$ C<sub>1-266</sub> und  $\Delta$ N<sub>266-332</sub> kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörper gefärbt sowie einer DAPI-Färbung unterzogen. Dann wurde der Anteil apoptotischer Zellen durch fluoreszenzmikroskopische Analyse unter den transfizierten Zellen ermittelt. Im Diagramm sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt, in denen jeweils 100 Zellen ausgezählt wurden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

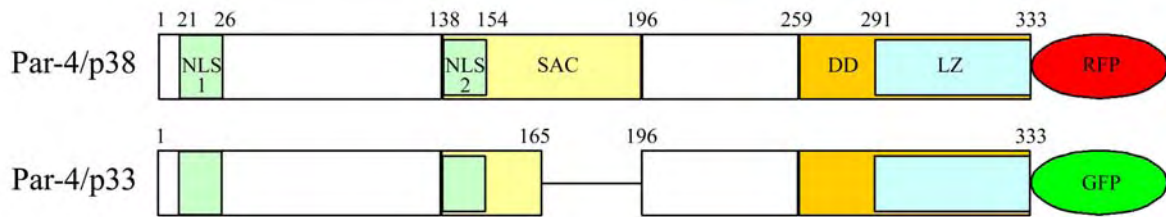
Die Ergebnisse dieser Studie sind in einem Säulendiagramm in Abb. 14 dargestellt. Par-4 wt induzierte zusammen mit Dlk in 36 % der REF52.2-Zellen die Apoptose (Abb. 14 A, Säule

1). Die Apoptoserate nach Koexpression der Par-4-Deletionsmutanten und Dlk betrug für  $\Delta N_{41-332}$  15% (Abb. 14 A, Säule 6), für  $\Delta C_{1-233}$  14 % (Abb. 14 A, Säule 7), für  $\Delta N_{266-332}$  4 % (Abb. 14 A, Säule 8) und für  $\Delta C_{1-266}$  12 % (Abb. 14 A, Säule 9). Die zusätzliche Expression von  $\Delta N_{41-332}$  zu Par-4 wt und Dlk induzierte die Apoptose in 36 % der Zellen (Abb. 14 A, Säule 2). Die Koexpression der Par-4-Mutante  $\Delta C_{1-233}$  zusammen mit Par-4 wt und der Dlk führte zu einer Apoptoserate von 42 % (Abb. 14 A, Säule 3). Nach der zusätzlichen Expression von  $\Delta N_{266-332}$  betrug die Apoptoserate 36 % (Abb. 14 A, Säule 4) und nach zusätzlicher Expression von  $\Delta C_{1-266}$  betrug die Apoptoserate 31 % (Abb. 14 A, Säule 5). Durch den Einsatz der Par-4-Deletionsmutanten im Verhältnis 1:1 zu Par-4 wt konnte demnach keine signifikante Blockierung der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose in REF52.2-Zellen beobachtet werden. Da die Möglichkeit bestand, dass die eingesetzten Mengen der Par-4-Deletionsmutanten nicht ausreichten, um die endogene Funktion von Par-4 wt zu blockieren, wurde das Verhältnis der transfizierten Par-4-Deletionsmutanten zu Par-4 wt auf 3:1 erhöht. Es wurde aber auch in diesem experimentellen Ansatz kein dominant-negativer Einfluss der Par-4-Deletionsmutanten auf die Par-4/Dlk-induzierte Apoptose beobachtet (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend verdeutlichen diese Experimente, dass keine der untersuchten Par-4-Deletionsmutanten die Par-4/Dlk-induzierte Apoptose blockieren kann.

#### **4.1.2.3 Untersuchung der neuen Par-4-Isoform Par-4/p33 als potentiell dominant-negative Mutante in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose**

Eine kürzlich veröffentlichte Studie hat gezeigt, dass in embryonalen Stammzellen der Maus zwei Par-4-Isoformen exprimiert werden. Neben dem Par-4 wt-Protein, das eine molekulare Masse von 38 kDa aufweist (bezeichnet als Par-4/p38), konnte eine zweite Par-4-Isoform mit einer molekularen Masse von 33 kDa (bezeichnet als Par-4/p33) detektiert werden. Sequenzanalysen der neuen Isoform Par-4/p33 haben gezeigt, dass das Exon 3 in der Par-4/p33-cDNA komplett herausgespleißt wird. Dem Par-4/p33-Protein fehlen somit die AS 166-195, die im Par-4 wt-Protein zur SAC-Domäne gehören (siehe Abb. 15). Es konnte gezeigt werden, dass die ektopisch exprimierte Isoform Par-4/p33 in den murinen embryonalen Stammzellen hauptsächlich im Zytosol lokalisiert ist und dort an F-Aktin bindet. Das ektopisch exprimierte wt-Protein Par-4/p38 findet man nach der Überexpression hingegen in den untersuchten Zellen hauptsächlich im Zellkern. Des Weiteren wurde in Koexpressionsstudien gezeigt, dass die neue Isoform Par-4/p33 in der Lage ist, das Par-4/p38-Protein zu binden und es im Zytosol zurückzuhalten. Als Folge dessen wird die Par-4/p38-induzierte Apoptose blockiert. Aufgrund dieser Ergebnisse haben die Autoren postuliert, dass die Isoform Par-4/p33 eine dominant-negative Isoform von Par-4/p38 darstellen könnte und

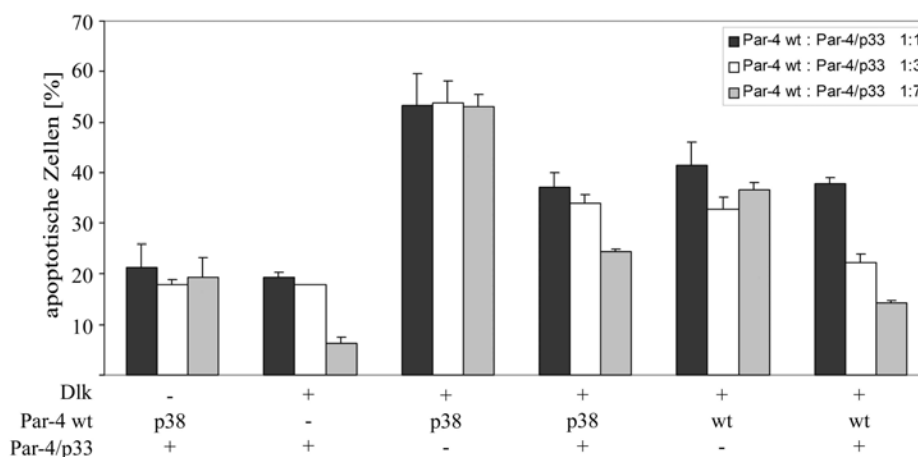
die Par-4/p38-abhängige Apoptose in den murinen Stammzellen regulieren kann (Wang *et al.*, 2006).



**Abb. 15: Schematische Darstellung der murinen Fusionsproteine Par-4/p38-RFP und Par-4/p33-GFP.** Das obere Bild zeigt das murine wt-Protein Par-4/p38. In der neuen Isoform Par-4/p33 ist das Exon 3 herausgespleißt und somit fehlen die AS 166-195 im Par-4/p33-Protein. GFP, grün fluoreszierendes Epitop; RFP, rot fluoreszierendes Epitop; NLS, Kernlokalisationssequenz; SAC, *S*elective for *A*poptosis induction in *C*ancer cells; DD, Todesdomäne; LZ, Leucin-Zipper-Motiv.

Es sollte nun experimentell untersucht werden, ob die neue Par-4-Isoform Par-4/p33 aus der Maus einen dominant-negativen Effekt auf die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose in Ratten-Fibroblasten ausüben kann. Zu diesem Zweck wurden uns die Expressionsplasmide für die Fusionsproteine Par-4/p33-GFP und für Par-4/p38-RFP (Maus-Sequenzen von Par-4, schematische Übersicht in Abb. 15) freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Bieberich (Medical College of Georgia, USA) zur Verfügung gestellt. Für die Untersuchung wurden REF52.2-Zellen mit Par-4-GFP wt aus der Ratte und mit FLAG-Dlk bzw. mit Par-4/p38-RFP aus der Maus und mit YFP-Dlk, mit Par-4/p38-RFP und Par-4/p33-GFP, mit FLAG-Dlk und Par-4/p33-GFP sowie mit Par-4-GFP wt, FLAG-Dlk und Par-4/p33-GFP bzw. mit Par-4/p38-RFP, YFP-Dlk und Par-4/p33-GFP kotransfiziert. Für die Transfektion wurden die Expressionsplasmide für Dlk und Par-4 wt (Ratte oder Maus) im Verhältnis 1:2 eingesetzt, das Verhältnis der Expressionsplasmide für Par-4 wt (Ratte oder Maus) und Par-4/p33 betrug je nach Transfektionsansatz 1:1, 1:3 oder 1:7. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion fixiert und immunzytochemisch mit einem anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus-Antikörper sowie mit DAPI gefärbt. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte, dass die murine Par-4/p38 wt-Form in REF52.2-Zellen, genau wie das Par-4 wt-Protein aus der Ratte, unabhängig von einer Koexpression von Par-4/p33 an den Aktin-filamenten lokalisiert war (Daten nicht gezeigt). Für die Bestimmung der Apoptoserate wurden je 100 transfizierte Zellen pro Ansatz in drei unabhängigen Experimenten anhand morphologischer Merkmale der Apoptose (siehe auch Abb. 12 C) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 16 graphisch dargestellt. Im ersten experimentellen Ansatz betrug das Verhältnis von Par-4 wt bzw. Par-4/p38 zu Par-4/p33 1:1 (Abb. 16, schwarze Säulen). Eine Koexpression von Par-4/p38 und Par-4/p33 löste in 21 % der Zellen Apoptose aus (Abb. 16, schwarze Säule 1). Nach der Expression von Par-4/p33 zusammen mit Dlk betrug die Apoptoserate 19 % (Abb. 16, schwarze Säule 2), nach der Koexpression von Par-4/p38 und Dlk betrug die Apoptoserate 53 % (Abb. 16, schwarze Säule

3). Dagegen sank die Apoptoserate nach der Koexpression von Par-4/p33 zusammen mit Par-4/p38 und Dlk auf 37 % ab (Abb. 16, schwarze Säule 4) im Vergleich zu 53 % apoptotischer Zellen nach Koexpression von Par-4/p38 und Dlk (Abb. 16, schwarze Säule 3). Das Par-4 wt-Protein induzierte zusammen mit der Dlk in 41 % der Zellen die Apoptose (Abb. 16, schwarze Säule 5), die Koexpression von Par-4/p33 zusätzlich zu Par-4 wt und Dlk ließ die Apoptoserate auf 38 % leicht absinken (Abb. 16, schwarze Säule 6).



**Abb. 16: Apoptose-Induktion in REF52.2-Zellen durch ektopische Expression von Par-4 wt aus der Ratte, Par-4/p38 und Par-4/p33 aus der Maus und Dlk.** REF52.2-Zellen wurden mit Par-4-GFP wt bzw. Par-4/p38-RFP, FLAG-Dlk bzw. YFP-Dlk und Par-4/p33-GFP in verschiedenen Kombinationen wie angegeben kotransfiziert. Das für die Transfektion eingesetzte Verhältnis von Par-4 wt (Ratte oder Maus) zu Dlk betrug 2:1. Das Verhältnis von Par-4 wt (Ratte oder Maus) zu der neuen Isoform Par-4/p33 betrug 1:1 (schwarze Säulen), 1:3 (weiße Säulen) oder 1:7 (graue Säulen). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und anschließend immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörper gefärbt sowie einer DAPI-Färbung unterzogen. Dann wurde der Anteil apoptotischer Zellen durch fluoreszenzmikroskopische Analyse unter den transfizierten Zellen ermittelt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils 100 Zellen pro Ansatz ausgezählt wurden.

Um zu überprüfen, ob sich der beobachtete inhibierende Effekt der Par-4-Isoform Par-4/p33 auf die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose noch steigern lässt, wurde die eingesetzte Menge von Par-4/p33 in den folgenden Experimenten erhöht. Im zweiten Versuchsansatz wurden Par-4 wt bzw. Par-4/p38 und Par-4/p33 im Verhältnis 1:3 kotransfiziert (Abb. 16, weiße Säulen). Es zeigte sich, dass durch die Koexpression der Isoform Par-4/p33 die durch Par-4/p38 und Dlk ausgelöste Apoptose von 54 % (Abb. 16, weiße Säule 3) auf 34 % (Abb. 16, weiße Säule 4) abgesenkt werden konnte. Auch die Par-4 wt/Dlk-vermittelte Apoptose wurde durch die Koexpression von Par-4/p33 um 11 % von 33 % (Abb. 16, weiße Säule 5) auf 22 % vermindert (Abb. 16, weiße Säule 6). Im dritten Versuchsansatz wurden Par-4 wt bzw. Par-4/p38 zu Par-4/p33 in einem Verhältnis von 1:7 eingesetzt (Abb. 16, graue Säulen). Auch hier übte die Par-4/p33-Isoform einen dominant-negativen Effekt aus, indem sie die Apoptoserate von Par-4/p38/Dlk (53 %, Abb. 16, graue Säule 3) um 18 % auf 25 % (Abb. 16, graue Säule 4) und die Apoptoserate von Par-4 wt/Dlk (37 %, Abb. 16, graue Säule 5) um

22% auf 14 % (Abb. 16, graue Säule 6) verminderte. Zusammenfassend haben die Ergebnisse der Versuche gezeigt, dass das Par-4/p33-Protein, das eine natürliche Par-4-Isoform in murinen embryonalen Stammzellen darstellt, sowohl die Par-4/p38/Dlk- als auch die Par-4 wt/Dlk-vermittelte Apoptose in REF52.2-Zellen inhibieren kann. Obwohl die Isoform Par-4/p33 die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose nach Koexpression um bis zu 22 % inhibieren konnte, ist es fraglich, ob der gezeigte dominant-negative Effekt von Par-4/p33 ausreicht, um die endogene Par-4-Aktivität in der Zellkultur ausreichend zu blockieren. Aus diesem Grund wurde die Par-4-Isoform Par-4/p33 in den folgenden Untersuchungen nicht zur Inhibition der endogenen Par-4-Funktion eingesetzt.

## 4.2 INDUKTION DER ENDOGENEN PAR-4-EXPRESSION DURCH VERSCHIEDENE STIMULI

Bisher wurde das Par-4-Protein in dieser Arbeit ektopisch in Säugerzellen exprimiert, um die Par-4-vermittelte Apoptose zu untersuchen. Ein großer Nachteil dieser Methode ist, dass die Überexpression von Proteinen nicht dem physiologischen Zustand der Zellen entspricht. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit Reagenzien identifiziert werden, mit denen die Expression von endogenem Par-4 induziert werden kann. Aus früheren Studien war bereits bekannt, dass die Par-4-Expression durch die Reagenzien Ionomycin und Thapsigargin hochreguliert werden kann (Sells *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 2002). Das Antibiotikum Ionomycin ist ein Ionophor aus dem Organismus *Streptomyces conglobatus*, das Calcium-Ionen 1:1 im Komplex binden kann (Liu & Hermann, 1978). Ionomycin kann eine Vielzahl physiologischer Effekte auslösen, wie zum Beispiel die Hemmung der ATP-abhängigen Akkumulation von Calcium im sarkoplasmatischen Retikulum (Beeler *et al.*, 1979) sowie die Hemmung der Prozessierung sekretorischer Glykoproteine (Kuznetsov *et al.*, 1992), wodurch es letztendlich zur Induktion der Apoptose kommt (Aagaard-Tillery & Jelinek, 1995). Thapsigargin ist ein Sesquiterpen-Lakton aus der Pflanze *Thapsia garganica*. Die Substanz kann spezifisch die Ca<sup>2+</sup>-ATPase des ERs (Thastrup *et al.*, 1990) und des Sarkoplasmatischen Retikulums (Sagara & Inesi, 1991) hemmen und bewirkt in hohen Konzentrationen (> 10 µM) auch eine Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus den Mitochondrien (Vercesi *et al.*, 1993). Durch die Hemmung der Ca<sup>2+</sup>-ATPase nimmt die Konzentration der Ca<sup>2+</sup>-Ionen im ER-Lumen ab, so dass die Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Enzyme des ER ihre Funktion nicht mehr korrekt ausüben können. Als Konsequenz wird die Apoptose induziert (Lamkanfi *et al.*, 2004). Zusätzlich zu den ER-Stress auslösenden Reagenzien Ionomycin und Thapsigargin wurden in den folgenden experimentellen Ansätzen weitere Substanzen in Bezug auf ihre Fähigkeit

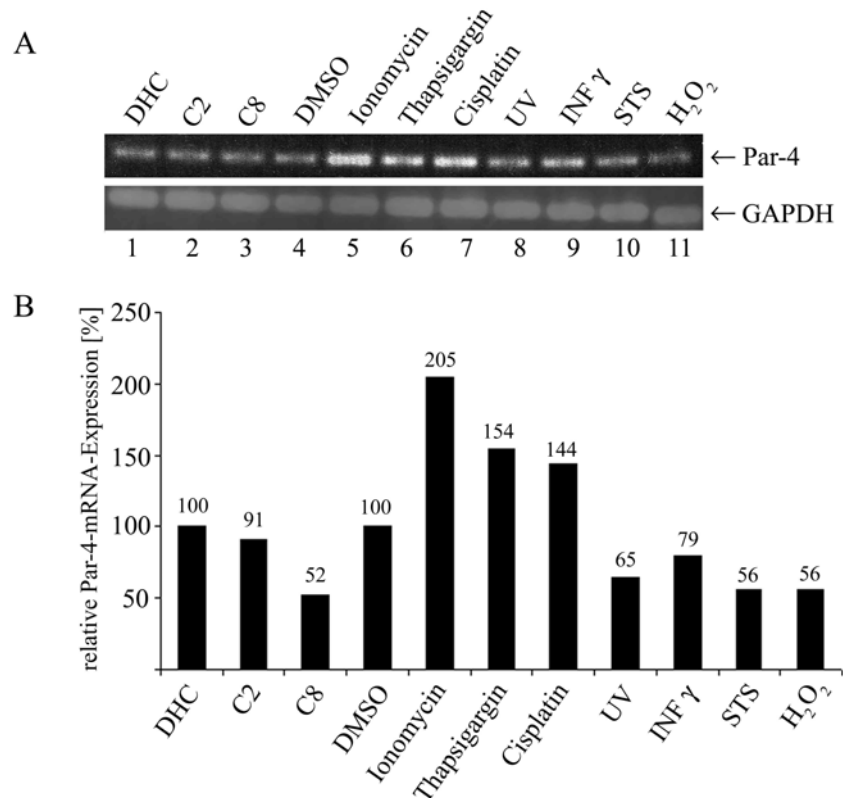
überprüft, die endogene Par-4-Expression in Säugerzellen zu induzieren. Dazu gehörten unter anderem die Zellstress auslösenden Reagenzien Cisplatin und Staurosporin (STS). Cisplatin ist ein Zytostatikum, dessen Wirkung hauptsächlich auf der Bildung von kovalenten Addukten mit den Basen in der DNA beruht, wodurch sich DNA-Inter- und -Intrastrang-Quervernetzungen ausbilden. Durch die Ausbildung der Addukte wird die Konformation der DNA verändert, wodurch die Replikation und die Transkription beeinträchtigt und im Folgenden die Apoptose ausgelöst wird (Übersicht bei Trimmer & Essigmann, 1999). STS ist ein Alkaloid aus *Streptomyces staurosporeus*. Es interagiert mit der ATP (Adenosintriphosphat)-Bindungsstelle von Proteinkinasen mit einer höheren Affinität als ATP selbst und kann die Proteinkinase C (Couldwell *et al.*, 1994), die Calmodulin-Kinase, die *myosin light chain*-Kinase (MLCK), die Proteinkinase A, und die Proteinkinase G (Ruegg & Burgess, 1989) hemmen. STS kann in vielen Tumorzellen die Apoptose auslösen, wohingegen in normalen Zellen ein Zellzyklus-Arrest am G<sub>1</sub>-Kontrollpunkt erfolgt (Crissman *et al.*, 1991). Für die Induktion von oxidativem Zellstress wurde das Reagenz Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) eingesetzt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird als Nebenprodukt bei der Gewinnung von ATP in den Mitochondrien erzeugt (Übersicht bei Cadenas & Davies, 2000). In der Zelle gibt es eine Vielzahl von Proteinen, darunter auch viele Apoptose-Inhibitoren, die für die Neutralisation des Oxidanten zuständig sind (Übersicht bei Slater *et al.*, 1995). In Thymuszellen der Ratte ist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Konzentrationen von 10–30 µM ein sehr effektiver Apoptoseinduktor (Riou *et al.*, 1998 und Sakamoto *et al.*, 1996), ebenso in humanen HL-60-Zellen (Sakagami *et al.*, 1996), wohingegen in humanen Lungenadenokarzinom-Zellen sogar 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für die Induktion der Apoptose benötigt wird (Kazzaz *et al.*, 1996). Des Weiteren sollte die Substanz Interferon  $\gamma$  (INF  $\gamma$ ) zum Einsatz kommen, um die endogene Par-4-Expression zu induzieren. INF  $\gamma$  wird der Klasse der Zytokine zugeordnet und wird von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen produziert (Hibino *et al.*, 1991). Die Substanz besitzt antivirale Aktivität (Vilcek *et al.*, 1985), kann das Tumorwachstum inhibieren (Gresser *et al.*, 1970; Knight, 1976) und die Apoptose induzieren (Trubiani *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1996). Um die endogene Par-4-Expression in Säugerzellen zu induzieren, sollten außerdem die zwei synthetischen, zell-permeablen Ceramidanaloga C2-Ceramid (N-Acetyl-D-erythro-Sphingosin; Obeid *et al.*, 1993) und C8-Ceramid (N-Octanoyl-D-erythro-Sphingosin, Jarvis *et al.*, 1994) eingesetzt werden, die die Apoptose auslösen können. Die Ceramidanaloga wirken wie die *in vivo* produzierten Ceramide, die nach der Aktivierung der Sphingomyelinase produziert werden. Die Sphingomyelinase wird in der Zelle zum Beispiel durch die Anbindung eines Liganden an den Fas-Rezeptor aktiviert (Cifone *et al.*, 1994). Das

DHC (C2-Dihydroceramid) ist ein Strukturanalogon des C2-Ceramids, stellt allerdings die inaktive Form des C2-Ceramids dar (Obeid *et al.*, 1993) und wurde deshalb in den Versuchen als Kontrolle eingesetzt.

#### 4.2.1 Induktion der Par-4-Expression auf mRNA-Ebene

Um die verschiedenen Substanzen auszutesten, wurde die Gliom-Zelllinie U87-MG ausgewählt, da diese Zelllinie ein schwaches Par-4 Expressionsniveau aufweist (Vetterkind *et al.*, 2005a). Für die Untersuchung wurden die U87-MG-Zellen für 8 h mit 50  $\mu$ M der Ceramide C2 und C8 behandelt, als Kontrolle diente die Behandlung mit dem inaktiven C2-Strukturanalog DHC (8 h, 50  $\mu$ M). Als Kontrolle für alle anderen Stimuli wurden die Zellen für 24 h mit DMSO (0,72 %) behandelt. Die Behandlung der Zellen mit den ER-Stress-auslösenden Reagenzien Ionomycin (10  $\mu$ M) und Thapsigargin (2  $\mu$ M) erfolgte für 24 h bzw. 16 h. Die Behandlung mit INF  $\gamma$  (1500 U/ml), dem Breitband-Kinase-Inhibitor STS (10 nM) und dem Oxidanten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) erfolgte für 16 h. Für die Induktion von genotoxischem Stress wurden die Zellen entweder mit UV-Strahlung (150 Joule) oder mit 50  $\mu$ M Cisplatin für 16 h behandelt. Nach der Behandlung der Zellen wurde die Gesamt-RNA mit TRIzol aus den Zellen isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die Par-4-mRNA-Expression wurde in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden 5'*Par4-mut-T164* und *Par-4-795-775reverse* analysiert, in der ein 273 bp langes DNA-Fragment amplifiziert wurde. Als Mengenabgleich diente die Amplifikation eines 309 bp langen DNA-Fragments des Haushaltsgens GAPDH, das mit den Oligonukleotiden *ratGAPDH-for* und *ratGAPDH-rev* generiert wurde. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden anschließend in einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Das Ergebnis in Abb. 17 A zeigt, dass die Par-4-mRNA-Expression nach Behandlung der Zellen mit den Ceramiden C2 (Abb. 17 A oben, Spur 2) und C8 (Abb. 17 A oben, Spur 3) im Vergleich zur DHC-Kontrolle (Abb. 17 A oben, Spur 1) nicht heraufreguliert wurde. Nach UV-Bestrahlung (Abb. 17 A oben, Spur 8) oder Behandlung der Zellen mit INF  $\gamma$  (Abb. 17 A oben, Spur 9) sowie mit STS (Abb. 17 A oben, Spur 10) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 17 A oben, Spur 11) konnte ebenfalls keine Erhöhung der Par-4-mRNA-Expression im Vergleich zum Kontrollansatz (Abb. 17 A oben, Spur 4) detektiert werden. Die Stimulation der U87-MG-Zellen mit Ionomycin (Abb. 17 A oben, Spur 5), Thapsigargin (Abb. 17 A oben, Spur 6) und Cisplatin (Abb. 17 A oben, Spur 7) induzierte hingegen eine deutliche Steigerung der Par-4-mRNA-Expression im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 17 A oben, Spur 4).





**Abb. 17: Induktion von endogenem Par-4 auf mRNA-Ebene in U87-MG-Zellen durch verschiedene Stimuli.** (A) U87-MG-Zellen wurden mit verschiedenen Stimuli behandelt: 50  $\mu$ M DHC 8 h, 50  $\mu$ M Ceramid C2 8 h, 50  $\mu$ M Ceramid C8 8 h, 0,72 % DMSO 24 h, 10  $\mu$ M Ionomycin 24 h, 2  $\mu$ M Thapsigargin 16 h, 50  $\mu$ M Cisplatin 16 h, 150 Joule UV 16 h, 1500 U/ml INF  $\gamma$  16 h, 10 nM STS 16 h, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 16 h. Danach erfolgte die Zellyse und Präparation der Gesamt-RNA mit TRIzol. 2,5  $\mu$ g Gesamt-RNA wurden mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse mit Par-4-spezifischen sowie GAPDH-spezifischen Oligonukleotiden unterzogen. Die Analyse der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. (B) Die Intensität der PCR-Fragmente im Agarosegel (A) wurde densitometrisch gemessen und die relative Par-4-Transkriptmenge in den einzelnen Proben in Bezug auf die entsprechende GAPDH-Kontrolle berechnet. Die Ergebnisse wurden in einem Säulendiagramm graphisch dargestellt.

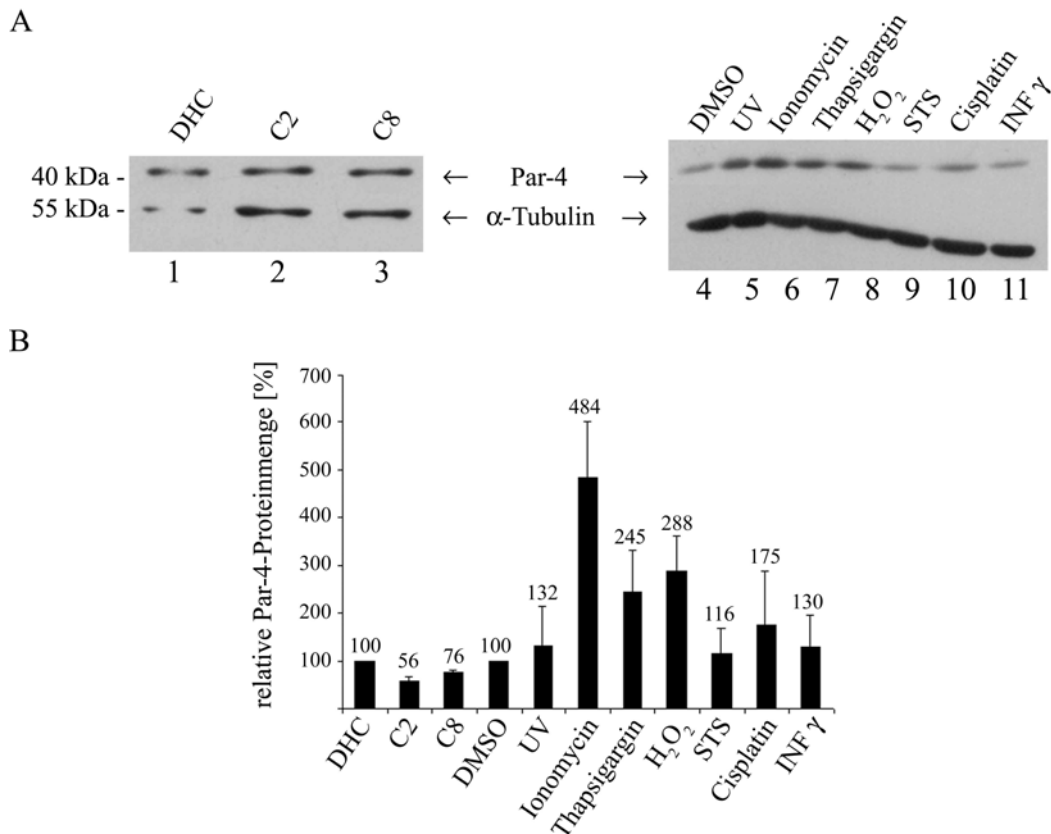
Um die Induktion der Par-4-Expression zu quantifizieren, wurde die Intensität der einzelnen DNA-Fragmente im Agarosegel densitometrisch bestimmt. Das relative Verhältnis der Par-4-Transkriptmenge zur jeweiligen GAPDH-Transkriptmenge wurde berechnet, wobei das relative Par-4/GAPDH-Verhältnis der Kontrollansätze (DHC und DMSO) als 100 % festgesetzt wurde. Anschließend wurde das relative Verhältnis Par-4/GAPDH der verschiedenen Ansätze im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollansätzen bestimmt und so die relative Par-4-Transkriptmenge berechnet. Die quantitative Auswertung des Experiments in Abb. 17 B zeigte, dass die Par-4-mRNA-Expression nach der Stimulation mit den Ceramiden C2 (Abb. 17 B, Säule 2) und C8 (Abb. 17 B, Säule 3) auf 91 % bzw. auf 52 % im Vergleich zum Kontrollansatz (100 %, Abb. 17 B, Säule 1) absank. Nach Behandlung der U87-MG-Zellen mit UV-Strahlung (Abb. 17 B, Säule 8, 65 %), INF  $\gamma$  (Abb. 17 B, Säule 9, 79 %), STS (Abb. 17 B, Säule 10, 56 %) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 17 B, Säule 11, 56 %) wurde im

Vergleich zum Kontrollansatz (100 %, Abb. 17 B, Säule 4) keine Steigerung der Par-4-mRNA-Expression, sondern ebenfalls eine Verringerung der Par-4-Transkriptmenge detektiert. Eine geringe Erhöhung der Par-4-mRNA-Expression wurde nach Inkubation der Zellen mit den Reagenzien Cisplatin (144 %, Abb. 17 B, Säule 7) und Thapsigargin (154 %, Abb. 17 B, Säule 6) beobachtet. Den stärksten Effekt auf die Par-4-Expression hatte die Behandlung der U87-MG-Zellen mit dem Ionophor Ionomycin (205 %, Abb. 17 B, Säule 5), wodurch die relative Par-4-Transkriptmenge im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (100 %, Abb. 17 B, Säule 4) in den U87-MG-Zellen verdoppelt werden konnte.

#### 4.2.2 Induktion der Par-4-Expression auf Proteinebene

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Induktion der Par-4-Expression auf mRNA-Ebene nach der Behandlung von Säugerzellen mit verschiedenen Stimuli auch mit einer Induktion der Par-4-Proteinexpression korreliert. Für diese Untersuchungen wurde nicht die Zelllinie U87-MG eingesetzt, da in diesen Zellen keine Expression des Par-4-Proteins mit Hilfe der Western Blot-Technik detektiert werden kann (Vetterkind et al., 2005a). Deshalb wurde die murine Neuroblastom-Zelllinie N2A, die eine geringe Par-4-Proteinexpression aufweist, mit den bereits unter 4.2.1 beschriebenen Reagenzien behandelt und die Par-4-Proteinmenge mittels Western Blot analysiert. Die Zellen wurden mit DHC (8 h, 50  $\mu$ M) oder DMSO (24 h, 0,72 %) als Kontrolle sowie mit den Ceramiden C2 (8 h, 50  $\mu$ M) und C8 (8 h, 50  $\mu$ M), mit den ER-Stress auslösenden Reagenzien Ionomycin (24 h, 10  $\mu$ M) und Thapsigargin (16 h, 2  $\mu$ M), mit dem Zytostatikum Cisplatin (16 h, 50  $\mu$ M), mit UV-Strahlung (150 Joule), mit INF  $\gamma$  (16 h, 1500 U/ml), mit dem Breitband-Kinase-Inhibitor STS (16 h, 10 nM) und dem Oxidanten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (16 h, 1 mM) behandelt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und 10  $\mu$ g des Gesamtprotein-Zellextrakts in einer 10%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Western Blot-Membran transferiert. Der immunologische Nachweis des endogenen Par-4-Proteins erfolgte mit Hilfe eines polyklonalen anti-Par-4-Antikörpers. Um die aufgetragenen Proteinmengen abzugleichen, wurde dieselbe Western Blot-Membran mit einem anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper gefärbt. Die Behandlung der N2A-Zellen mit den Ceramiden C2 (Abb. 18 A oben, Spur 2) und C8 (Abb. 18 A oben, Spur 3) konnte keine sichtbare Erhöhung der Par-4-Proteinmenge im Vergleich zum DHC-Kontrollansatz (Abb. 18 A oben, Spur 1) induzieren. Die Stimulation der Zellen mit STS (Abb. 18 A oben, Spur 9), Cisplatin (Abb. 18 A oben, Spur 10) und INF  $\gamma$  (Abb. 18 A oben, Spur 11) hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Par-4-Proteinmenge im Vergleich zum DMSO-Kontrollansatz (Abb. 18 A oben, Spur 4). Nach der Behandlung der N2A-Zellen

mit UV-Strahlung (Abb. 18 A oben, Spur 5), Ionomycin (Abb. 18 A oben, Spur 6), Thapsigargin (Abb. 18 A oben, Spur 7) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 18 A oben, Spur 8) konnte allerdings eine Erhöhung der Par-4-Proteinmenge im Vergleich zum DMSO-Kontrollansatz (Abb. 18 A oben, Spur 4) detektiert werden.



**Abb. 18: Induktion der endogenen Par-4-Proteinmenge in N2A-Zellen durch verschiedene Stimuli.** (A) N2A-Zellen wurden mit verschiedenen Stimuli behandelt: 50 μM DHC 8 h, 50 μM Ceramid C<sub>2</sub> 8 h, 50 μM Ceramid C<sub>8</sub> 8 h, 0,72 % DMSO 24 h, 150 Joule UV 16 h, 10 μM Ionomycin 24 h, 2 μM Thapsigargin 16 h, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 16 h, 10 nM STS 16 h, 50 μM Cisplatin 16 h, 1500 U/ml INF γ 16 h. Nach der Zellyse wurden 10 μg Gesamtprotein-Zellextrakt in einer 10%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Western Blot-Membran transferiert. Dann erfolgte der immunologische Nachweis von endogenem Par-4 mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper. Der Abgleich der Proteinmengen erfolgte durch den Nachweis des endogenen α-Tubulin-Proteins mit einem monoklonalen anti-α-Tubulin-Antikörper. (B) Die Intensität der Proteinbanden des unter (A) gezeigten Western Blots sowie von 4 weiteren Western Blots (nicht gezeigt) wurde densitometrisch bestimmt. Anschließend wurde die relative Par-4-Proteinmenge im Vergleich zur α-Tubulinmenge in jeder Probe berechnet und die Ergebnisse in einem Säulendiagramm graphisch dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

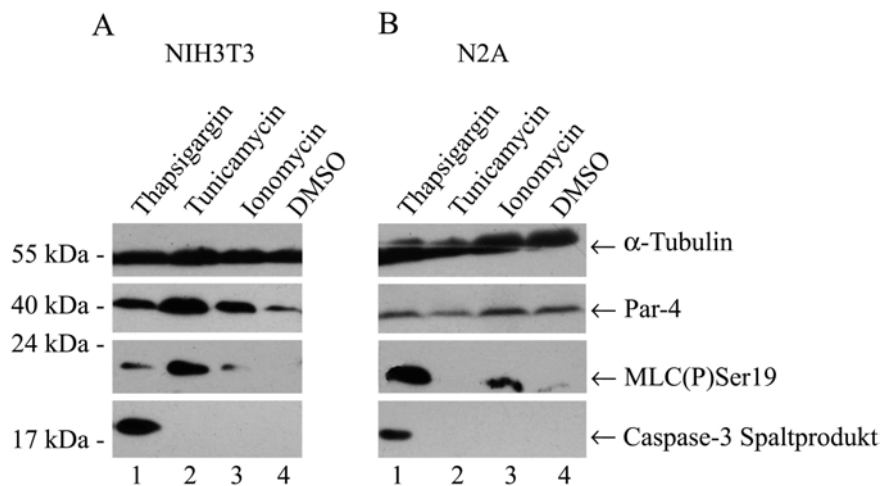
Um die Induktion der Par-4-Proteinmenge quantitativ bestimmen zu können, wurde die Intensität der einzelnen Proteinbanden densitometrisch gemessen. Danach wurde das relative Verhältnis der Par-4-Proteinmenge zur jeweiligen α-Tubulin-Proteinmenge berechnet. Das Par-4/α-Tubulin-Verhältnis der Kontrollansätze (DHC oder DMSO) wurde als 100 % festgesetzt. Zur Berechnung der relativen, prozentualen Par-4-Proteinmenge wurden nun die Werte der Par-4/α-Tubulin-Verhältnisse der einzelnen Ansätze durch die Werte der Par-4/α-

Tubulin-Verhältnisse der entsprechenden Kontrollansätze dividiert und das Ergebnis mit 100 multipliziert. Die N2A-Zellen wurden mit den verschiedenen Reagenzien in vier weiteren unabhängigen Experimenten behandelt, die Par-4-Proteinmengen durch die Western Blot-Technik analysiert und die relativen Par-4-Proteinmengen anschließend nach gleichem Vorgehen berechnet. Die in der Abb. 18 B graphisch dargestellten relativen Par-4-Proteinmengen stellen die Mittelwerte der insgesamt fünf unabhängigen Experimente dar. Die Inkubation der N2A-Zellen mit den Ceramiden C2 (Abb. 18 B, Säule 2) und C8 (Abb. 18 B, Säule 3) bewirkte eine Abnahme der relativen Par-4-Proteinmenge auf 56 % bzw. 76 % im Vergleich zum Kontrollansatz (100 %, Abb. 18 B, Säule 1). Die Stimulation der Zellen mit UV-Strahlung (132 %, Abb. 18 B, Säule 5), STS (116 %, Abb. 18 B, Säule 9), Cisplatin (175 %, Abb. 18 B, Säule 10) oder INF  $\gamma$  (130 %, Abb. 18 B, Säule 11) konnte nur eine geringe Erhöhung der endogenen Par-4-Proteinmenge im Vergleich zum DMSO-Kontrollansatz (100 %, Abb. 18 B, Säule 4) induzieren. Die Behandlung der N2A-Zellen mit Ionomycin (Abb. 18 B, Säule 6) bewirkte eine starke Erhöhung der relativen Par-4-Proteinmenge auf ungefähr 484 % im Vergleich zum DMSO-Kontrollansatz (100 %, Abb. 18 B, Säule 4). Mit den Reagenzien Thapsigargin (Abb. 18 B, Säule 7) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 18 B, Säule 8) wurde eine Steigerung der relativen Par-4-Proteinmenge auf durchschnittlich 245 % bzw. 288 % erreicht. Anhand der Ergebnisse der Experimente (4.2.1 und 4.2.2) konnten Ionomycin und Thapsigargin als die potentesten Reagenzien zur Induktion der endogenen Par-4-Expression identifiziert werden. Daher wurden beide Reagenzien in den nachfolgenden Experimenten eingesetzt.

### **4.3 UNTERSUCHUNG DER MLC-PHOSPHORYLIERUNG NACH DER INDUKTION VON ENDOGENEM PAR-4**

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die MLC-Phosphorylierung vermutlich ein wichtiges Ereignis in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose in REF52.2-Zellen darstellt. Nach der Koexpression von Par-4 und der Proteinkinase Dlk wird die Kinase an das Aktin-Zytoskelett rekrutiert und kann dort die regulatorische leichte Kette von Myosin II (MLC) an der AS Serin<sub>19</sub> phosphorylieren (Vetterkind *et al.*, 2005b). Es sollte nun untersucht werden, ob die Induktion der endogenen Par-4-Expression ebenfalls zu einer gesteigerten Phosphorylierung der MLC an der AS Serin<sub>19</sub> sowie zu einer gesteigerten Apoptoserate führt. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden die murine Neuroblastom-Zelllinie N2A und die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 mit Ionomycin und Thapsigargin behandelt. Zusätzlich sollte die Substanz Tunicamycin bei diesen Experimenten zum Einsatz kommen. Das

Nukleosid-Antibiotikum Tunicamycin aus dem Organismus *Streptomyces lysosuperficus* kann die Glykosylierung von Proteinen im ER blockieren, indem es die GlcNAc-1-P-Transferase inhibiert. Die GlcNAc-1-P-Transferase katalysiert den Transfer von GlcNAc-1-P auf den „Lipidcarrier“ Dolicholphosphat. Bei dem Prozess der N-Glykosylierung von Proteinen, die in das Lumen des ER synthetisiert werden, werden die an Dolicholphosphat angeknüpften Vorläufer-Zuckerketten auf Asparaginreste der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr übertragen (Übersicht bei Elbein, 1984). Die Inhibition der N-Glykosylierung durch Tunicamycin führt dazu, dass die neu synthetisierten Proteine nicht korrekt gefaltet werden und deshalb im ER-Lumen akkumulieren. Die Akkumulation ungefalteter Proteine im ER löst den UPR (*unfolded protein response*)-Signalweg aus, der bei anhaltendem ER-Stress die Apoptose induzieren kann (Lamkanfi *et al.*, 2004).



**Abb. 19: Untersuchung der MLC-Phosphorylierung und der Caspase-3-Spaltung nach der Par-4-Induktion durch verschiedene Reagenzien.** (A) NIH-3T3-Zellen wurden mit verschiedenen Reagenzien behandelt: 0,72 % DMSO 24 h, 10  $\mu$ M Ionomycin 24 h, 3  $\mu$ M Tunicamycin 24 h, 2  $\mu$ M Thapsigargin 16 h. Jeweils 20  $\mu$ g bzw. 40  $\mu$ g der hergestellten Gesamtprotein-Zellextrakte wurden in einer 12,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Western Blot-Membran transferiert. Auf der mit 20  $\mu$ g Gesamtprotein-Extrakt je Spur beladenen Nitrozellulose-Membran wurde endogenes Par-4-Protein mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper und endogenes  $\alpha$ -Tubulin-Protein mit einem anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper immunologisch detektiert. Auf der mit 40  $\mu$ g Gesamtprotein-Zellextrakt je Spur beladenen Nitrozellulose-Membran wurde endogenes MLC(P)Ser19 mit einem anti-phospho-MLC 2-Antikörper und das endogene Caspase-3 Spaltprodukt mit dem anti-cleaved-Caspase-3-Antikörper nachgewiesen. (B) N2A-Zellen wurden analog wie unter (A) beschrieben behandelt und analysiert.

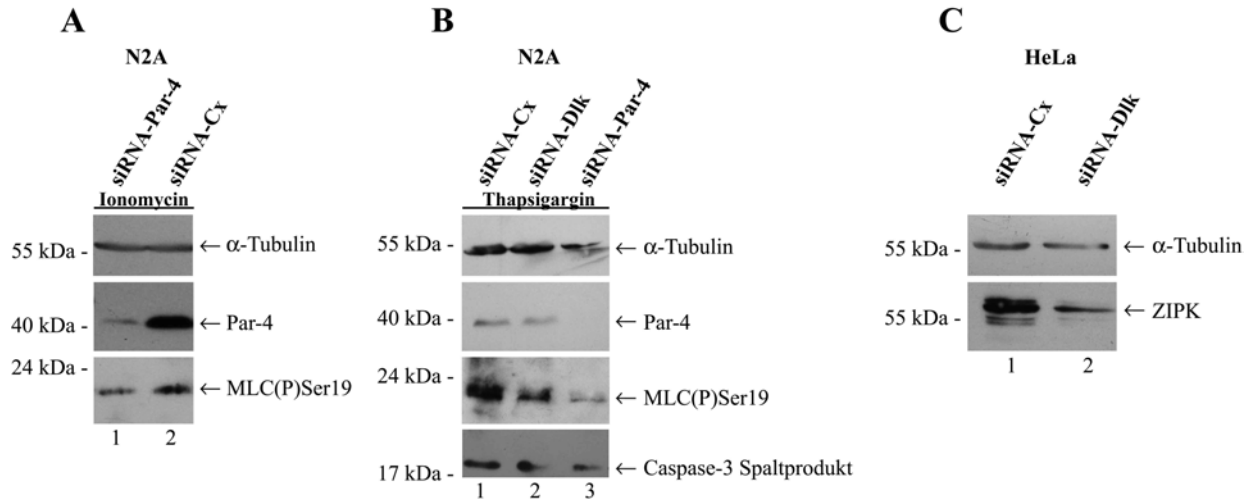
NIH-3T3-Zellen sowie N2A-Zellen wurden 16 h mit 2  $\mu$ M Thapsigargin, 24 h mit 10  $\mu$ M Ionomycin und 24 h mit 3  $\mu$ M Tunicamycin sowie 24 h mit 0,72 % DMSO als Kontrolle behandelt. Nach der Lyse der Zellen wurden pro Ansatz jeweils 20  $\mu$ g bzw. 40  $\mu$ g des Gesamtprotein-Zellextrakts mit Hilfe der Western-Blot-Technik analysiert. Die mit je 40  $\mu$ g Gesamtprotein-Extrakt pro Spur beladene Western Blot-Membran wurde immunologisch mit einem anti-phospho-MLC 2-Antikörper sowie mit dem anti-cleaved-Caspase-3-Antikörper gefärbt. Der anti-phospho-MLC 2-Antikörper detektiert das an der AS Serin<sub>19</sub> phosphorylierte

MLC-Protein (MLC(P)Ser19). Da nach der Induktion der Apoptose eine aktivierende Spaltung der Procaspase-3 in 12 kDa und 17 kDa große Proteinfragmente erfolgt, konnte durch die Detektion des 17 kDa großen Spaltprodukts mit dem anti-cleaved-Caspase-3-Antikörper die Aktivierung der Caspase-3 und somit die Induktion der Apoptose nachgewiesen werden. Der Nachweis des endogenen Par-4-Proteins erfolgte mit einem anti-Par-4-Antikörper auf der mit je 20 µg Gesamtprotein-Extrakt pro Spur beladenen Western Blot-Membran. Die Färbung derselben Western Blot-Membran mit einem anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper diente dem Abgleich der aufgetragenen Proteinmengen. Wie die Abb. 19 A zeigt, konnte die endogene Par-4-Expression in NIH-3T3-Zellen sowohl mit Ionomycin (Abb. 19 A, Spur 3) wie auch mit Tunicamycin (Abb. 19 A, Spur 2) und Thapsigargin (Abb. 19 A, Spur 1) im Vergleich zum DMSO-Kontrollansatz (Abb. 19 A, Spur 1) induziert werden. Nach der Stimulation der Zellen mit Ionomycin (Abb. 19 A, Spur 3), Thapsigargin (Abb. 19 A, Spur 1) und Tunicamycin (Abb. 19 A, Spur 2) ließ sich eine deutliche Phosphorylierung der MLC an der AS Serin<sub>19</sub> (MLC(P)Ser19) mit dem anti-phospho-MLC 2-Antikörper nachweisen. Interessanterweise wurde nach der Stimulation der Zellen mit Tunicamycin sowohl die stärkste Hochregulation des Par-4-Proteins (Abb. 19 A, Spur 2) wie auch die stärkste MLC-Phosphorylierung an der AS Serin<sub>19</sub> (Abb. 19 A, Spur 2) beobachtet, wohingegen eine Phosphorylierung der MLC an der AS Serin<sub>19</sub> im Kontrollansatz nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 19 A, Spur 4). Das 17 kDa große Spaltprodukt der Caspase-3 konnte nur nach einer Behandlung der NIH-3T3-Zellen mit Thapsigargin (Abb. 19 A, Spur 1) nachgewiesen werden. In der Abb. 19 B wird deutlich, dass sich die endogene Par-4-Proteinmenge in den N2A-Zellen durch die Behandlung mit Ionomycin (Abb. 19 B, Spur 3) und Thapsigargin (Abb. 19 B, Spur 1) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 19 B, Spur 4) induzieren ließ, nicht aber nach der Behandlung der N2A-Zellen mit Tunicamycin (Abb. 19 B, Spur 2). Die Induktion der Par-4-Expression korrelierte mit einer verstärkten Phosphorylierung der MLC an der AS Serin<sub>19</sub> nach Ionomycin- (Abb. 19 B, Spur 3) und Thapsigargin- (Abb. 19 B, Spur 1) Behandlung. Sowohl im DMSO-Kontrollansatz (Abb. 19 B, Spur 4) wie auch nach der Behandlung der Zellen mit Tunicamycin (Abb. 19 B, Spur 2) wurde nur eine sehr schwache bzw. keine MLC-Phosphorylierung an der AS Serin<sub>19</sub> nachgewiesen. Das 17 kDa große Spaltprodukt der Caspase-3 konnte nur nach einer Behandlung der N2A-Zellen mit Thapsigargin (Abb. 19 B, Spur 1) detektiert werden. Abschließend zeigen die Ergebnisse, dass die Induktion der Par-4-Expression in NIH-3T3-Zellen mit einer gesteigerten MLC-Phosphorylierung an der AS Serin<sub>19</sub> nach der Induktion von ER-Stress durch die Reagenzien Thapsigargin, Ionomycin und Tunicamycin korrelierte. In den N2A-Zellen konnte die

endogene Par-4-Expression sowie die gesteigerte Phosphorylierung der MLC an der AS Serin<sub>19</sub> durch die Stimulation mit Ionomycin und Thapsigargin induziert werden. Nach Behandlung der N2A-Zellen mit Tunicamycin konnte weder eine Par-4-Induktion noch eine MLC-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die Induktion der Apoptose, nachgewiesen durch die immunologische Detektion des Caspase-3 Spaltprodukts, wurde ausschließlich nach einer Behandlung der NIH-3T3- und N2A-Zellen mit Thapsigargin nachgewiesen. Ob die Spaltung der Caspase-3 mit der durch Thapsigargin induzierten Hochregulation der Par-4-Expression zusammenhängt, kann nicht ausgeschlossen werden.

#### **4.4 UNTERSUCHUNG DER MLC-PHOSPHORYLIERUNG UND DER APOPTOSE-INDUKTION NACH INHIBITION VON PAR-4**

Durch die vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Induktion der endogenen Par-4-Expression in Säugerzellen zu einer gesteigerten MLC-Phosphorylierung führt. Es stellte sich nun die Frage, ob durch die Inhibition von endogenem Par-4 die durch die Reagenzien Ionomycin und Thapsigargin induzierte MLC-Phosphorylierung blockiert werden kann. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden N2A-Zellen entweder mit 2,5 µg siRNA-Par-4 oder als Kontrolle mit 2,5 µg siRNA-Cx transfiziert und anschließend für 24 h mit 10 µM Ionomycin behandelt. Die Zellen wurden anschließend lysiert, pro Ansatz 20 µg bzw. 50 µg Gesamtprotein-Zellextrakte in einer 12,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der immunologische Nachweis des endogenen Par-4-Proteins auf der mit je 20 µg Gesamtprotein-Extrakt pro Spur beladenen Nitrozellulose-Membran erfolgte mit Hilfe des polyklonalen anti-Par-4-Antikörpers. Auf derselben Western Blot-Membran wurde als Mengenabgleich das endogene  $\alpha$ -Tubulin-Protein mit einem anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper detektiert. Der Nachweis der phosphorylierten MLC an der AS Serin<sub>19</sub> (MLC(P)Ser19) sowie der Nachweis des Spaltprodukts der Caspase-3 auf der mit je 50 µg Gesamtprotein-Extrakt pro Spur beladenen Western Blot-Membran wurde mit den Antikörpern anti-phospho-MLC 2 und anti-cleaved-Caspase-3 durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Experiments in Abb. 20 A zeigten, dass die Transfektion von siRNA-Par-4 die durch Ionomycin induzierte Heraufregulation des endogenen Par-4-Proteins (Abb. 20 A Mitte, Spur 1) im Vergleich zum Kontrollansatz (Abb. 20 A Mitte, Spur 2) inhibieren konnte. Des Weiteren wurde die durch Ionomycin induzierte gesteigerte Phosphorylierung der MLC an der AS Serin<sub>19</sub> durch die Transfektion der N2A-Zellen mit siRNA-Par-4 (Abb. 20 A unten, Spur 1) im Vergleich zum Kontrollansatz (Abb. 20 A unten, Spur 2) vermindert.



**Abb. 20: Die Inhibition der Par-4-Expression hemmt die durch ER-Stress induzierte MLC-Phosphorylierung und die Apoptose-Induktion.** (A) N2A-Zellen wurden mit 2,5 µg siRNA-Par-4 oder als Kontrolle mit 2,5 µg siRNA-Cx transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Behandlung mit 10 µM Ionomycin. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen lysiert. Pro Ansatz wurden 20 µg bzw. 50 µg Gesamtprotein-Zellextrakt je Spur in einer 12,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dann erfolgte der immunologische Nachweis von endogenem Par-4 mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper sowie der Nachweis von endogenem α-Tubulin mit einem monoklonalen anti-α-Tubulin-Antikörper auf der mit je 20 µg Gesamtprotein-Extrakt pro Spur beladenen Western Blot-Membran sowie der Nachweis von endogenem MLC(P)Ser19 mit einem anti-phospho-MLC 2-Antikörper auf der mit je 50 µg Gesamtprotein-Extrakt pro Spur beladenen Blot-Membran. (B) N2A-Zellen wurden mit 2,5 µg siRNA-Par-4, 2,5 µg siRNA-Dlk oder als Kontrolle mit 2,5 µg siRNA-Cx transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 2 µM Thapsigargin behandelt. Nach weiteren 24 h erfolgte die Zellyse. Je Ansatz wurden 20 µg bzw. 50 µg der hergestellten Proteinextrakte mit Hilfe der Western Blot-Technik analysiert. Das endogene Par-4-Protein wurde mit dem anti-Par-4-Antikörper (Blot-Membran mit je 20 µg Gesamtprotein-Extrakt pro Spur), die an der AS Serin<sub>19</sub> phosphorylierte MLC mit dem anti-phospho-MLC 2-Antikörper (Blot-Membran mit je 50 µg Gesamtprotein-Extrakt pro Spur) und das Spaltprodukt der Caspase-3 mit dem anti-cleaved-Caspase-3-Antikörper (Blot-Membran mit je 50 µg Gesamtprotein-Extrakt pro Spur) detektiert. Zum Abgleich der Proteinmengen wurde die mit je 20 µg Gesamtprotein-Extrakt pro Spur beladene Nitrozellulose-Membran mit einem anti-α-Tubulin-Antikörper gefärbt. (C) HeLa-Zellen wurden mit 2,5 µg siRNA-Dlk oder als Kontrolle mit 2,5 µg siRNA-Cx transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Zellernte und -lyse. 20 µg Gesamtprotein-Zellextrakt wurden in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran gebロットet. Dann erfolgte der Nachweis des endogenen ZIPK-Proteins mit einem anti-ZIPK-Antikörper sowie der Nachweis von endogenem α-Tubulin mit einem anti-α-Tubulin-Antikörper als Mengenabgleich.

Vorangegangene Studien weisen der Proteinkinase Dlk eine wichtige Funktion bei der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose und vor allem der damit verbundenen MLC-Phosphorylierung zu (Page *et al.*, 1999; Vetterkind *et al.*, 2005b). Deshalb sollten N2A-Zellen vor der Behandlung mit Thapsigargin mit siRNA-Dlk transfiziert werden, um den Effekt der Inhibition der Dlk in Bezug auf die MLC-Phosphorylierung und die Caspase-3-Aktivierung analysieren zu können. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Inhibition der endogenen Par-4-Expression nicht nur die Induktion der MLC-Phosphorylierung, sondern auch die Induktion der Apoptose blockieren kann. Um diese Fragestellungen zu bearbeiten, wurden N2A-Zellen mit 2,5 µg siRNA-Par-4, 2,5 µg siRNA-Dlk oder als Kontrolle mit 2,5 µg siRNA-Cx transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Behandlung der Zellen mit



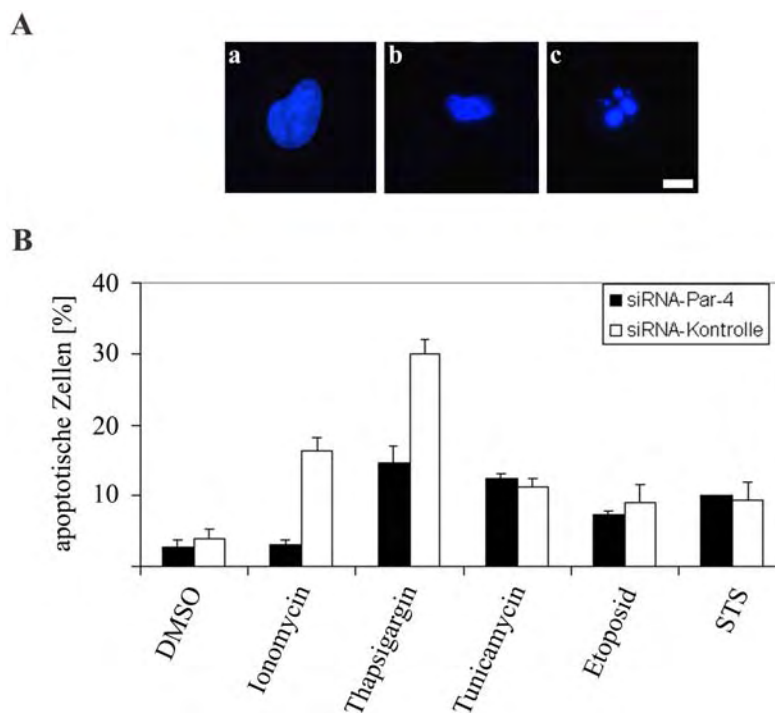
2  $\mu$ M Thapsigargin für 24 h. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die hergestellten Gesamtprotein-Zellextrakte mit Hilfe der Western Blot-Technik analysiert. Die Detektion des endogenen Par-4-Proteins erfolgte mit dem anti-Par-4-Antikörper, die Detektion der phosphorylierten MLC an der AS Serin<sub>19</sub> erfolgte mit dem anti-phospho-MLC-Antikörper und der Nachweis des 17 kDa großen Caspase-3 Spaltprodukts erfolgte mittels anti-cleaved-Caspase-3-Antikörper. Für den Abgleich der aufgetragenen Proteinmengen wurde außerdem das endogene  $\alpha$ -Tubulin-Protein mittels anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper detektiert. Auch in diesem Experiment zeigte sich, dass die Herunterregulation des endogenen Par-4-Proteins (Abb. 20 B, Spur 3) mit einer verminderten Phosphorylierung der MLC an der AS Serin<sub>19</sub> (Abb. 20 B, Spur 3) im Vergleich zum Kontrollansatz mit siRNA-Cx (Abb. 20 B, Spur 1) korrelierte. Nach der Transfektion der Zellen mit siRNA-Dlk wurde ebenfalls eine schwächere MLC-Phosphorylierung an der AS Serin<sub>19</sub> (Abb. 20 B, Spur 2) im Vergleich zum Kontrollansatz mit siRNA-Cx (Abb. 20 B, Spur 2) detektiert. Zusätzlich konnte eine verminderte Aktivierung der Caspase-3 nach der Transfektion der N2A-Zellen mit siRNA-Par-4 (Abb. 20 B, Spur 3) oder mit siRNA-Dlk (Abb. 20 B, Spur 2) gegenüber der siRNA-Cx-Kontrolle (Abb. 20 B unten, Spur 1) beobachtet werden. Da der einzige derzeit zur Verfügung stehende anti-ZIPK-Antikörper nur das humane Dlk-Ortholog, die ZIPK, detektiert, wurde die Wirksamkeit der siRNA-Dlk (Transfektion von 2,5  $\mu$ g siRNA-Dlk) in humanen HeLa-Zellen mit Hilfe der Western Blot-Technik überprüft. Dabei zeigte sich, dass die gegen die Dlk gerichtete siRNA (Abb. 20 C unten, Spur 2) im Vergleich zur Kontroll-siRNA-Cx (Abb. 20 C unten, Spur 1) in der Lage ist, die endogene Proteinexpression der ZIPK in den HeLa-Zellen zu inhibieren. Allerdings scheint die siRNA-Dlk in den HeLa-Zellen nicht so effektiv zu sein. Zusammenfassend haben die Ergebnisse gezeigt, dass die Inhibition von endogenem Par-4 die durch die Stimulation der Zellen mit Ionomycin induzierte verstärkte MLC-Phosphorylierung hemmen kann. Dies gilt ebenfalls für die induzierte MLC-Phosphorylierung nach Stimulation der Zellen mit Thapsigargin. Des Weiteren kann die Inhibition der endogenen Dlk die Phosphorylierung der MLC an der AS Serin<sub>19</sub> nach Tunicamycin-Behandlung blockieren. Nach Behandlung der Zellen mit Thapsigargin kann eine schwache Inhibition der Caspase-3-Aktivierung durch die Herunterregulation von Par-4 und Dlk erreicht werden.

#### **4.4.1 Die Inhibition von Par-4 hemmt die durch Ionomycin und Thapsigargin induzierte Apoptose**

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation des endogenen Par-4-Proteins durch siRNA-Par-4 zu einer schwächeren Caspase-3-

Aktivierung nach der Behandlung der Zellen mit Thapsigargin führt. Daher sollte nun überprüft werden, ob die Inhibition von endogenem Par-4 auch die durch andere Reagenzien ausgelöste Apoptose in einer humanen Tumorzelllinie blockieren kann. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit 50 pmol Cy3-gekoppelter siRNA gegen humanes Par-4 oder mit 50 pmol Cy3-gekoppelter siRNA gegen Par-4 der Ratte transfiziert. Die Ansätze mit der siRNA gegen Par-4 der Ratte dienten in diesem Experiment als Kontrolle, da diese siRNA nicht in der Lage ist, endogenes humanes Par-4 herunterzuregulieren (Daten nicht gezeigt). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit den ER-Stress auslösenden Reagenzien Ionomycin (24 h, 10  $\mu$ M), Thapsigargin (24 h, 2  $\mu$ M) und Tunicamycin (24 h, 3  $\mu$ M), mit dem Breitband-Kinase-Inhibitor STS (5 h, 200 nM) sowie mit Etoposid (24 h, 17  $\mu$ M) behandelt, um die Apoptose auszulösen. Etoposid ist ein halbsynthetisches Derivat des Podophyllotoxins aus *Podophyllum peltatum* (Maiapfel), das gewöhnlich in Kombination mit anderen Zytostatika bei der Tumorbekämpfung eingesetzt wird (Williams *et al.*, 1987; Zanetta *et al.*, 1996). Das Toxin hemmt die Topoisomerase II, die Doppelstrangbrüche in die DNA einführt, um die DNA zu entwinden. Etoposid bindet und stabilisiert einen Proteinkomplex, der bei der Entwindung der DNA-Stränge durch die Topoisomerase II beteiligt ist. Daher treten in der Zelle dauerhafte DNA-Doppelstrangbrüche auf, wodurch der Zellzyklus in der späten S- und frühen G2-Phase arretiert wird. Bei größeren DNA-Schäden kommt es zur Induktion von Apoptose (Forbes *et al.*, 1992). Die Zellen wurden nach der Behandlung mit den verschiedenen Reagenzien mit Paraformaldehyd fixiert und das endogene Par-4-Protein mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper und einem Alexa 488-fluoreszenzmarkierten anti-Kaninchen-Antikörper detektiert. Für die Visualisierung der Zellkerne wurde die DNA mit dem Farbstoff DAPI angefärbt. Anschließend wurde die Anzahl apoptotischer Zellen anhand morphologischer Merkmale der Apoptose (wie in Abb. 21 A dargestellt) fluoreszenzmikroskopisch ermittelt, wobei jeweils 100 Zellen in drei unabhängigen Experimenten ausgezählt wurden. In den Ansätzen, in denen die Zellen mit siRNA gegen humanes Par-4 transfiziert wurden, wurden für die Bestimmung der Apoptoserate nur die Zellen berücksichtigt, bei denen keine oder nur eine geringe endogene Par-4-Expression detektiert werden konnte. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abb. 21 B in einem Säulendiagramm graphisch dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit Ionomycin in 17 % der mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen die Apoptose induzierte (Abb. 21 B, weiße Säule 2). Die Apoptoserate sank auf 3 % ab, wenn die Zellen vor der Behandlung mit Ionomycin mit siRNA gegen humanes Par-4 transfiziert wurden (Abb. 21 B, schwarze Säule 2). Die Apoptoserate nach Thapsigargin-Behandlung konnte durch die

Herunterregulation des Par-4-Proteins auf 15 % (Abb. 21 B, schwarze Säule 3) abgesenkt werden im Vergleich zur Apoptoserate von 30 % in den Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden (Abb. 21 B, weiße Säule 3). In den Ansätzen, in denen die Apoptose durch Tunicamycin, Etoposid und STS ausgelöst wurde, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Apoptose-Induktion durch die Herunterregulation von endogenem Par-4 (Abb. 21 B, schwarze Säulen 4-6) im Vergleich zu den Kontrollansätzen (Abb. 21 B, weiße Säule 4-6). Die ausgelösten Apoptoseraten betragen, unabhängig von einer Transfektion der Zellen mit Kontroll-siRNA gegen Par-4 der Ratte oder mit siRNA gegen humanes Par-4, für Tunicamycin ca. 12 % (Abb. 21 B, schwarze und weiße Säule 4), für Etoposid 7-9 % (Abb. 21 B, schwarze und weiße Säule 5) und für STS ca. 10 % (Abb. 21 B, schwarze und weiße Säule 6). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieses Experiments, dass die Inhibition der Par-4-Expression durch die siRNA-Technik die Ionomycin- und Thapsigargin-induzierte Apoptose in HeLa-Zellen blockieren kann.



**Abb. 21: Die Inhibition von Par-4 hemmt die durch Ionomycin und Thapsigargin ausgelöste Apoptose in HeLa-Zellen.** (A) Dargestellt sind exemplarisch die mit DAPI angefärbten Zellkerne einer nicht apoptotischen (a) sowie zweier apoptotischer HeLa-Zellen (b, c); (b) frühes Stadium der Apoptose und (c) spätes Stadium der Apoptose. Balken 10 µM. (B) HeLa-Zellen wurden mit 50 pmol Cy3-gekoppelter siRNA gegen humanes Par-4 (schwarze Säulen) oder als Kontrolle mit 50 pmol Cy3-gekoppelter siRNA gegen Par-4 der Ratte (weiße Säulen) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit verschiedenen Reagenzien behandelt: 0,72 % DMSO 24 h, 10 µM Ionomycin 24 h, 2 µM Thapsigargin 24 h, 3 µM Tunicamycin 24 h, 17 µM Etoposid 24 h, 200 nM STS 5 h. Anschließend wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper und einem Alexa 488-fluoreszenzmarkierten anti-Kaninchen-Antikörper markiert sowie einer DAPI-Färbung unterzogen. Dann wurde der Anteil apoptotischer Zellen anhand morphologischer Merkmale der Apoptose wie Kernfragmentation und Chromatinkondensation durch fluoreszenzmikroskopische Analyse unter den transfizierten Zellen ermittelt, wobei in den Ansätzen mit siRNA gegen humanes Par-4 nur die Zellen analysiert wurden, die keine oder nur eine schwache Par-4-Expression aufwiesen. Im Diagramm sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt, in denen jeweils 100 Zellen ausgezählt wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

#### 4.5 EXPRESSIONSSTUDIEN UND PROMOTOR-METHYLIERUNGS-ANALYSEN VON PAR-4 UND SEINEN INTERAKTIONSPARTNERN DLK/ZIPK, AMIDA/TFPT UND EFP1

Im Laufe der Evolution haben sich epigenetische Mechanismen entwickelt, durch die eine Regulation der Genexpression erzielt werden kann, die nicht auf Variationen in der DNA-Sequenz beruhen. Zu diesen epigenetischen Effekten gehören vor allem die Histonmodifikation, die Regulation der Stabilität von mRNA sowie die Methylierung von DNA-Basen im Promotorbereich von Genen. All diese Mechanismen zur Regulation der Transkription spielen vor allem bei der embryonalen Gewebeentwicklung und bei der genetischen Prägung, aber auch bei der Stilllegung von Transposons und Retroelementen im Genom von Pflanzen und Tieren eine wichtige Rolle (Übersicht bei Wolffe & Matzke, 1999). Die am häufigsten im eukaryontischen Genom vorliegenden modifizierten Basen sind 5-Methylcytosin ( $^5\text{mC}$ ) und N6-Methyladenin ( $^{\text{N}6\text{m}}\text{A}$ ) (Übersicht bei Adams, 1990). Im Gegensatz zu Prokaryonten, bei denen die Modifikation beider Basen in gleichem Maße vorkommt (Übersicht bei Wilson & Murray, 1991 und bei Adams, 1990), spielt in Eukaryonten  $^5\text{mC}$  die dominierende Rolle. Bei der DNA-Methylierung von  $^5\text{mC}$  in eukaryontischen Organismen wird eine Methylgruppe kovalent an das 5'-C-Atom des Cytosinringes gebunden, so dass  $^5\text{mC}$  entsteht. Der Anteil der  $^5\text{mC}$  modifizierten Basen beträgt in Säugern ca. 4 % der genomischen DNA und ist hauptsächlich in Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Dinukleotiden (CpG) zu finden, die wiederum gehäuft in so genannten CpG-Inseln auftreten (Übersicht bei Bird, 2002). Nach der allgemein akzeptierten Definition werden 200-1000 bp lange DNA-Bereiche als CpG-Inseln bezeichnet, die einen G+C-Gehalt von mehr als 50 % und ein Verhältnis von über 0,6 an beobachteten CpGs zu erwarteten CpGs aufweisen (Gardiner-Garden & Frommer, 1987; Takai & Jones, 2002). Im Gegensatz zu den meisten CpG-Dinukleotiden des genfreien heterochromatischen Genoms sind die Cytosinbasen der CpG-Inseln, die sich in euchromatischen Promotorregionen befinden, nur selten methyliert. Das liegt darin begründet, dass die DNA-Methylierung eine Stilllegung der Genexpression induziert (Übersicht bei Bird, 2002) und außerdem ein Risiko zum Auftreten einer Punktmutation aufgrund der leichten Umwandlung von  $^5\text{mC}$  zu Thymin darstellt (Übersicht bei Laird & Jaenisch, 1996). Die kovalente Verknüpfung von Cytosinbasen mit einer Methylgruppe wird durch die Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert, die in drei Klassen unterteilt werden. Die Enzyme der DNMT1-Klasse (*Maintenance Methyltransferases*) sind für die Erhaltung von Methylierungsmustern verantwortlich und binden bevorzugt hemimethylierte DNA-Stränge, wie sie nach der Replikation vorliegen. Die

Methyltransferasen der Klasse DNMT3 wurden hingegen als *de novo* Methyltransferasen charakterisiert, wobei in Säugern sowohl die Variante DNMT3a wie auch die Variante DNMT3b vorzufinden ist (Übersicht bei Bestor, 2000). Die Mitglieder der DNMT2-Klasse weisen lediglich eine schwache Methyltransferase-Aktivität auf und ihre Funktion ist bisher weitgehend unbekannt (Übersicht bei Jeltsch *et al.*, 2006). Zahlreiche neuere Studien liefern immer mehr Hinweise darauf, dass eine unkontrollierte DNA-Methylierung in der Entwicklung von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielt. Im Verlauf der Tumorgenese werden entweder wachstumsfördernde Gene durch Promotor-Hypomethylierung verstärkt aktiviert oder aber Tumorsuppressorgene durch Promotor-Hypermethylierung stillgelegt. Dadurch erlangt die Zelle einen entscheidenden Wachstumsvorteil und wird zum Beispiel resistent gegenüber der Induktion von Apoptose (Übersicht bei Baylin & Ohm, 2006). Darüber hinaus führt eine in Tumorzellen oft beobachtete genomweite Hypomethylierung zur genomischen Instabilität (Übersicht bei Ehrlich, 2002).

Da in dieser Arbeit ausschließlich die DNA-Methylierung von Cytosinbasen untersucht wurde, ist immer die Modifikation von Cytosin ( $^5\text{mC}$ ) gemeint, wenn von DNA-Methylierung gesprochen wird. Alle nachfolgenden Studien wurden mit humanen Zelllinien oder humanem Tumorgewebe durchgeführt, deshalb werden in diesem Abschnitt der Doktorarbeit ausschließlich die Bezeichnungen der humanen Orthologe für Amida/TFPT und Dlk/ZIPK verwendet.

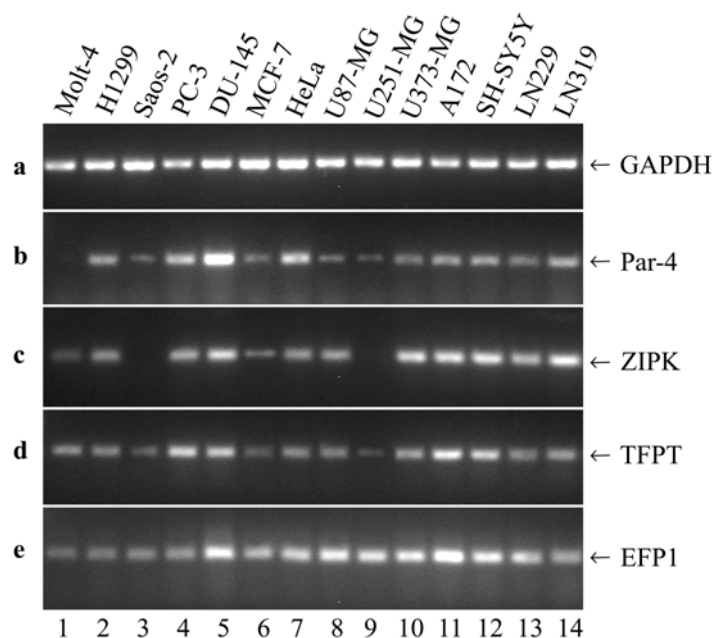
#### **4.5.1 Untersuchung des Expressionsstatus von Par-4 und seinen Interaktionspartnern ZIPK, TFPT und EFP1 in humanen Tumorzelllinien**

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine ektopische Expression von Par-4 in Tumorzelllinien des Zentralen Nervensystems verstärkt Apoptose auslösen kann, wenn diese Zellen keine oder eine schwache Expression des endogenen Par-4-Proteins aufweisen (Vetterkind *et al.*, 2005a). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Expression des pro-apoptotischen Par-4-Proteins in Tumorzellen herunterreguliert sein kann und die Tumorzellen dadurch resistenter gegenüber Apoptose werden, wodurch sie einen Wachstumsvorteil erhalten und so die Tumorentstehung begünstigt wird. Diese Hypothese wird durch Par-4-Expressionsstudien gestützt, die eine verminderte Par-4-Expression in Nierenzellkarzinomen (Cook *et al.*, 1999), Melanomen (Lucas *et al.*, 2001), Prostatakarzinomen (Chakraborty *et al.*, 2001) und in verschiedenen Leukämien (Boehrer *et al.*, 2001) belegen. Deshalb sollte zunächst die Expression des pro-apoptotischen Par-4 und seiner Interaktionspartner ZIPK, TFPT und EFP1 in verschiedenen Tumorzelllinien untersucht

werden. Die Expression von Par-4 wurde sowohl auf mRNA- wie auch auf Proteinebene untersucht, die Untersuchung der ZIPK-, TFPT- und EFP1-Expression erfolgte ausschließlich auf mRNA-Ebene.

#### 4.5.1.1 Expression von Par-4, ZIPK, TFPT und EFP1 auf mRNA-Ebene

Für diese Untersuchungen wurden die leukämische T-Zelllinie Molt-4, die Osteosarkom-Zelllinien H1299 und Saos-2, die Prostatakarzinom-Zelllinien PC-3 und DU-145, die Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie MCF-7 und die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa ausgewählt. Als Tumorzelllinien des zentralen Nervensystems wurden die Gliom-Zelllinien U87-MG, U251-MG, U373-MG, A172, LN229 und LN319 sowie die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y ausgewählt.



**Abb. 22: mRNA-Expression von Par-4, ZIPK, TFPT und EFP1 in humanen Tumorzelllinien.** Aus verschiedenen humanen Tumorzelllinien (oben angegeben) wurde die Gesamt-RNA mit TRIzol präpariert. 2,5 µg der Gesamt-RNA wurden mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse mit Par-4-, ZIPK-, TFPT-, EFP1- sowie GAPDH- spezifischen Oligonukleotiden unterzogen. Die Amplifikation eines DNA-Fragments des Haushaltgens GAPDH diente als Mengenabgleich. Die amplifizierten DNA-Fragmente von Par-4 (273 bp), ZIPK (193 bp), TFPT (235 bp), EFP1 (218 bp) und GAPDH (309 bp) wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

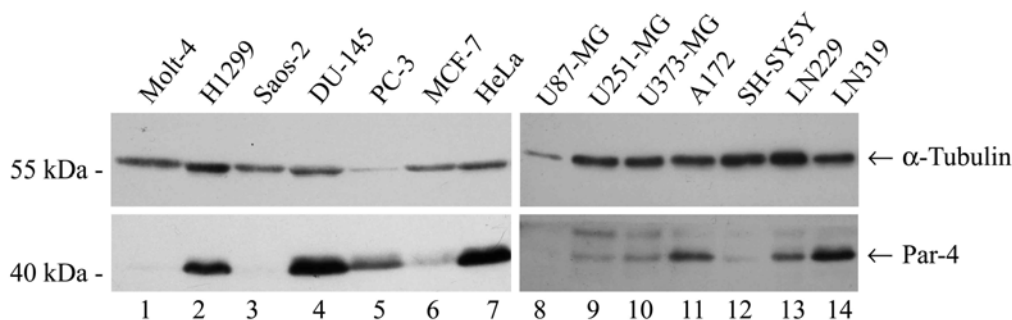
Die Gesamt-RNA der Tumorzellen wurde mit TRIzol präpariert und unter Verwendung der Reversen Transkriptase in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden DNA-Fragmente von den zu untersuchenden Genen in einer PCR-Reaktion mit 28 Zyklen für Par-4, ZIPK, TFPT und EFP1 bzw. 25 Zyklen für GAPDH amplifiziert. Dabei wurde das 273 bp lange Par-4-DNA-Fragment mit den Oligonukleotiden 5'Par4-mut-T164 und Par-4-795-775reverse, das 193 bp lange ZIPK-DNA-Fragment mit den Oligonukleotiden ZIPK-cDNA-f

und *ZIPK-cDNA-r*, das 235 bp lange TFPT-DNA-Fragment mit den Oligonukleotiden *TCF3-cDNA-f* und *TCF3-cDNA-r* und das 218 bp lange EFP1-DNA-Fragment mit den Oligonukleotiden *5'Klon53Q2* und *3'Klon53Q2* amplifiziert. Als Mengenabgleich diente die Amplifikation eines 309 bp langen DNA-Fragments des Haushaltsgens GAPDH mit den Oligonukleotiden *ratGAPDH-for* und *ratGAPDH-rev*. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend in einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Ergebnisse in der Abb. 22 b zeigen, dass in der leukämischen T-Zelllinie Molt-4 keine Par-4-mRNA-Expression detektierbar war (Abb. 22 b, Spur 1). In der Gliom-Zelllinie U251-MG wurde nur eine äußerst schwache Par-4-mRNA-Expression nachgewiesen (Abb. 22 b, Spur 9). In der Osteosarkom-Zelllinie Saos-2 (Abb. 22 b, Spur 3), in der Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie MCF-7 (Abb. 22 b, Spur 6) sowie in der Gliom-Zelllinie U87-MG (Abb. 22 b, Spur 8) konnte nur eine schwache Expression des Par-4-Transkripts festgestellt werden. In allen anderen Zelllinien (H1299, PC-3, DU-145, HeLa, U373-MG, A172, SH-SY5Y, LN229 und LN319; Abb. 22 b, Spuren 2, 4, 5, 7, 10-14) konnte eine deutliche Par-4-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Die Analyse der ZIPK-Expression zeigte, dass in den Zelllinien Saos-2 (Abb. 22 c, Spur 3) und U251-MG (Abb. 22 c, Spur 9) kein ZIPK-Transkript nachweisbar war. Die MCF-7-Zellen (Abb. 22 c, Spur 6) und die Molt-4-Zellen (Abb. 22 c, Spur 1) zeigten eine schwache Expression des ZIPK-Transkripts. Die anderen untersuchten Tumorzelllinien (H1299, PC-3, DU-145, HeLa, U87-MG, U373-MG, A172, SH-SY5Y, LN229 und LN319; Abb. 22 c, Spuren 2, 4, 5, 7, 8, 10-14) wiesen eine starke ZIPK-mRNA-Expression auf. Die Analyse der TFPT-Expression ergab, dass die Tumorzelllinien Saos-2 (Abb. 22 d, Spur 3) und MCF-7 (Abb. 22 d, Spur 6) nur eine schwache TFPT-Transkription aufwiesen, in der Zelllinie U251-MG (Abb. 22 d, Spur 9) war das TFPT-Transkript kaum detektierbar. In allen anderen Zelllinien (Molt-4, H1299, PC-3, DU-145, HeLa, U87-MG, U373-MG, A172, SH-SY5Y, LN229 und LN319; Abb. 22 d, Spuren 1, 2, 4-5, 7-8, 10-14) wurde eine starke TFPT-mRNA-Expression nachgewiesen. Das Ergebnis in Abb. 22 e demonstriert, dass EFP1 im Gegensatz zu Par-4, ZIPK und TFPT in allen untersuchten Tumorzelllinien auf mRNA-Ebene stark exprimiert wurde (Abb. 22 e, Spuren 1-14), am stärksten war die EFP1-mRNA-Expression in der Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145 (Abb. 22 e, Spur 5) und der Gliom-Zelllinie A172 (Abb. 22 e, Spur 11). Der Abgleich mit GAPDH zeigte, dass in allen Ansätzen vergleichbare mRNA-Konzentrationen vorlagen (Abb. 22 a, Spuren 1-14). Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse, dass die Mehrzahl der Tumorzelllinien die untersuchten Gene *par-4*, *zipk*, *tfpt* und *efp1* exprimieren. Auffällig ist jedoch, dass die Transkripte von Par-4, ZIPK und TFPT

meist in denselben Zelllinien (Molt-4, Saos-2, MCF-7 und U251-MG) nicht bzw. nur sehr schwach detektierbar sind.

#### 4.5.1.2 Par-4-Expression auf Proteinebene

Um zu überprüfen, ob die Par-4-Expression auf mRNA-Ebene mit der Par-4-Expression auf Proteinebene korrelierte, wurde die endogene Par-4-Proteinmenge in den bereits unter 4.5.1.1 beschriebenen Tumorzelllinien Molt-4, H1299, Saos-2, DU-145, PC-3, MCF-7, HeLa, U87-MG, U251-MG, U373-MG, A172, SH-SY5Y, LN229 und LN319 mit Hilfe der Western Blot-Technik analysiert. Für die Untersuchung wurden 15 µg der Gesamtprotein-Zellextrakte der humanen Tumorzelllinien in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der immunologische Nachweis des endogenen Par-4-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper. Der Nachweis des endogenen  $\alpha$ -Tubulin-Proteins mit einem monoklonalen anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper auf derselben Western Blot-Membran diente dem Abgleich der aufgetragenen Proteinmengen.



**Abb. 23: Par-4-Proteinexpression in humanen Tumorzelllinien.** Die Gesamtprotein-Zellextrakte von verschiedenen Tumorzelllinien (oben angegeben) wurden in einer 10%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Nachweis des endogenen Par-4-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen anti-Par-4-Antikörper. Als Mengenabgleich wurde das endogene  $\alpha$ -Tubulin-Protein mit einem monoklonalen anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper auf derselben Nitrozellulose-Membran nachgewiesen.

Das Ergebnis in Abb. 23 zeigt, dass in der leukämische T-Zelllinie Molt-4 (Abb. 23 unten, Spur 1), in der Osteosarkom-Zelllinie Saos-2 (Abb. 23 unten, Spur 3) und in der Gliom-Zelllinie U87-MG (Abb. 23 unten, Spur 8) kein endogenes Par-4-Protein detektiert werden konnte. In den Gliom-Zelllinien U251-MG (Abb. 23 unten, Spur 9) und U373-MG (Abb. 23 unten, Spur 10) sowie in der Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y (Abb. 23 unten, Spur 12) und in der Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie MCF-7 (Abb. 23 unten, Spur 6) wurde nur eine schwache endogene Par-4-Proteinexpression nachgewiesen. In allen anderen untersuchten Tumorzelllinien (H1299, DU-145, PC-3, HeLa, A172, LN229, LN319) konnte eine deutliche Expression des Par-4-Proteins detektiert werden (Abb. 23 unten, Spuren 2, 4, 5, 7, 11, 13, 14). Das Protein-Expressionsmuster von Par-4 korrelierte demnach im Wesentlichen mit dem



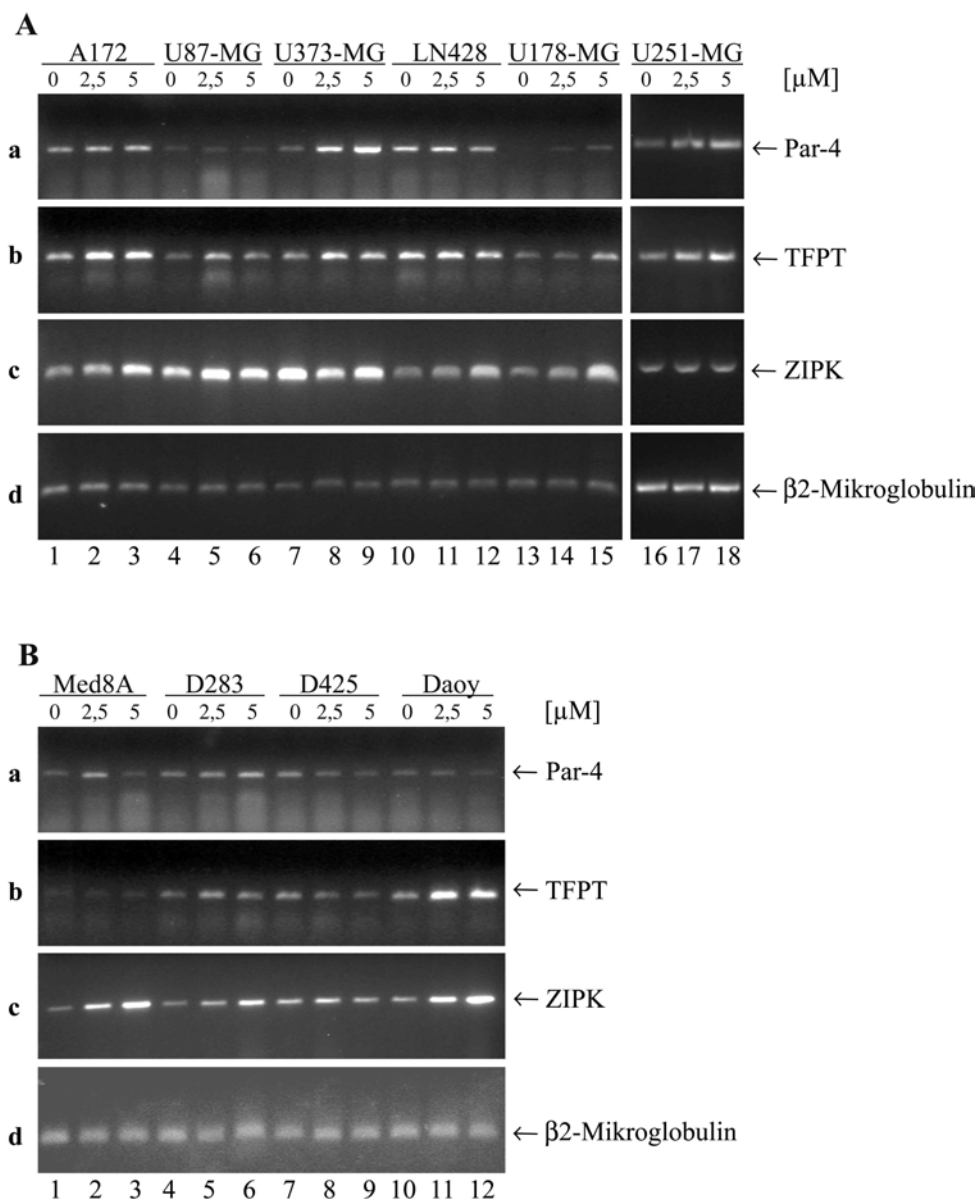
Par-4-mRNA-Expressionsmuster (siehe 4.5.1.1, Abb. 22 b) in den untersuchten Tumorzelllinien. In der leukämischen T-Zelllinie Molt-4 konnte weder ein Par-4-Transkript noch das Par-4-Protein detektiert werden. In den Tumorzelllinien Saos-2 und U87-MG wurde zwar ein schwaches Par-4-Transkript, jedoch keine Par-4-Proteinexpression nachgewiesen. Die Zelllinien U251-MG und MCF-7 wiesen sowohl eine schwache Par-4-mRNA- wie auch eine schwache Par-4-Proteinexpression auf. In den Zelllinien H1299, PC-3, DU-145, HeLa, A172, LN229 und LN319 wurde in der RT-PCR-Analyse ein deutliches Par-4-Transkript sowie in der Western Blot-Analyse eine deutliche Par-4-Proteinexpression nachgewiesen. Eine Diskrepanz zwischen der Expression von Par-4 auf mRNA- und Proteinebene gab es lediglich in den Zelllinien SH-SY5Y und U373-MG, in denen eine starke Par-4-mRNA-Expression, jedoch nur eine schwache Par-4-Proteinexpression detektiert werden konnte. Anhand der in 4.5.1.1 und 4.5.1.2 beschriebenen Expressionsanalysen von Par-4, der ZIPK, TFPT und EFP1 konnten mehrere Tumorzelllinien identifiziert werden, in denen keine oder nur eine schwache Expression des Par-4-, ZIPK- oder TFPT-mRNA-Transkripts bzw. des Par-4-Proteins detektiert werden konnte. Diese Tumorzelllinien stellen daher gute Kandidaten für die Analyse der entsprechenden Promotoren in Bezug auf DNA-Hypermethylierung dar. Aufgrund der starken Expression des EFP1-Transkripts in allen untersuchten Tumorzelllinien wurden die folgenden mRNA-Expressionsstudien nach Behandlung von Tumorzelllinien mit dem DNA-Demethylierungsreagenz 5-Aza-2'-deoxycytidin sowie die Studien zur Analyse der Promotor-Methylierung nur für das *par-4*-, *tfpt*- und *zipk*-Gen durchgeführt.

#### **4.5.2 Expression von Par-4, ZIPK und TFPT auf mRNA-Ebene nach 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung**

Um zu analysieren, ob die für Par-4, ZIPK oder TFPT kodierenden Gene durch Promotor-Hypermethylierung reguliert werden könnten, wurden die Gliom-Zelllinien A172, U87-MG, U373-MG, LN428, U178-MG und U251-MG sowie die Medulloblastom-Zelllinien Med8A, D283, D425 und Daoy mit dem Reagenz 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelt. Das Demethylierungsreagenz 5-Aza-2'-deoxycytidin wurde ursprünglich als Chemotherapeutikum synthetisiert (Cihak, 1974). In proliferierenden Zellen wird das Reagenz in die DNA eingebaut und wirkt dort als Inhibitor der DNA-Cytosin-C5-Methyltransferase, indem es mit der Methyltransferase einen Komplex und somit einen stabilen Intermediärzustand ausbildet (Sheikhnejad *et al.*, 1999). Durch die Hemmung der DNA-Cytosin-C5-Methyltransferase wird die Methylierung der neu gebildeten DNA-Stränge bei der Replikation blockiert, so dass eine Demethylierung der genomischen DNA erreicht wird. Die Tumorzellen wurden für 72 h

mit 2,5  $\mu$ M oder 5  $\mu$ M 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelt, als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Dann wurde die Gesamt-RNA mit TRIzol präpariert und in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde ein 273 bp langes DNA-Fragmente von Par-4 mit den Oligonukleotiden *5'Par4-mut-T164* und *Par-4-795-775reverse*, ein 235 bp langes DNA-Fragment von TFPT mit den Oligonukleotiden *TCF3-cDNA-f* und *TCF3-cDNA-r* oder ein 193 bp langes DNA-Fragment der ZIPK mit den Oligonukleotiden *ZIPK-cDNA-f* und *ZIPK-cDNA-r* in einer PCR-Reaktion mit 28 Zyklen amplifiziert und die PCR-Produkte in einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Als Mengenabgleich wurde ein 148 bp langes DNA-Fragment von  $\beta$ 2-Mikroglobulin mit den Oligonukleotiden  *$\beta$ 2-MG-for* und  *$\beta$ 2-MG-rev* in einer PCR-Reaktion mit 35 Zyklen amplifiziert. Wie in Abb. 24 zu sehen ist, wurde die Par-4-mRNA-Expression in den Gliom-Zelllinien A172 (Abb. 24 A a, Spur 1-3), U373-MG (Abb. 24 A a, Spur 7-9), U178-MG (Abb. 24 A a, Spur 13-15) und U251-MG (Abb. 24 A a, Spur 16-18) sowie in der Medulloblastom-Zelllinie D283 (Abb. 24 B a, Spur 4-6) im Vergleich zum jeweiligen Kontrollansatz durch die Behandlung der Tumorzellen mit dem Reagenz 5-Aza-2'-deoxycytidin hochreguliert. In den anderen untersuchten Tumorzelllinien des zentralen Nervensystems konnte kein Unterschied in der Par-4-mRNA-Expression nach Induktion der DNA-Methylierung durch 5-Aza-2'-deoxycytidin festgestellt werden (U87-MG und LN428, Abb. 24 A a, Spur 4-6 und 10-12 sowie Med8A, D425 und Daoy, Abb. 24 B a, Spur 1-3, 7-9, 10-12). Eine Erhöhung des TFPT-Transkripts konnte auch in den Gliom-Zelllinien A172 (Abb. 24 A b, Spur 1-3), U373-MG (Abb. 24 A b, Spur 7-9), U178-MG (Abb. 24 A b, Spur 13-15) und U251-MG (Abb. 24 A b, Spur 16-18) sowie in der Medulloblastom-Zelllinie Daoy (Abb. 24 B b, Spur 10-12) nach Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin beobachtet werden. Alle anderen Tumorzelllinien exprimierten, unabhängig von der Induktion der DNA-Methylierung durch 5-Aza-2'-deoxycytidin, gleiche Mengen TFPT-mRNA im Vergleich zur jeweiligen Kontrollzelle (U87-MG und U373-MG, Abb. 24 A b, Spur 4-6 und 7-9 sowie Med8A, D283 und D425, Abb. 24 B b, Spur 1-9). Die mRNA-Expression der ZIPK wurde in den Gliom-Zelllinien A172 (Abb. 24 A c, Spur 1-3), LN428 (Abb. 24 A c, Spur 10-12) und U178-MG (Abb. 24 A c, Spur 13-15) sowie in den Medulloblastom-Zelllinien Med8A (Abb. 24 B c, Spur 1-3), D425 (Abb. 24 B c, Spur 7-9) und Daoy (Abb. 24 B c, Spur 10-12) nach 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollzellen induziert. In den anderen untersuchten Tumorzelllinien wurde kein Unterschied in der ZIPK-mRNA-Expression nach Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin detektiert (U87-MG und U373-MG, Abb. 24 A c, Spur 4-9 sowie D283, Abb. 24 B c, Spur 4-6). Die

Expressionsanalyse von  $\beta$ 2-Mikroglobulin zeigte, dass in allen Ansätzen vergleichbare mRNA-Konzentrationen vorlagen (Abb. 24 A und B, d).



**Abb. 24: mRNA-Expression von Par-4, ZIPK und TFPT nach Behandlung von humanen Tumorzelllinien mit 5-Aza-2'-deoxycytidin.** (A) Verschiedene Gliom-Zelllinien (oben angegeben) wurden 72 h mit 2,5  $\mu$ M oder 5  $\mu$ M 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelt, unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (0  $\mu$ M). Anschließend wurde die endogene Par-4-, ZIPK- oder TFPT-mRNA-Expression in einer RT-PCR-Analyse untersucht, in der für Par-4 ein 273 bp langes, für TFPT ein 235 bp langes und für ZIPK ein 193 bp langes DNA-Fragment amplifiziert wurde. Als Mengenabgleich wurde die Amplifikation eines 148 bp langen DNA-Fragments des  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Gens herangezogen. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. (B) Die endogene mRNA-Expression von Par-4, ZIPK und TFPT sowie  $\beta$ 2-Mikroglobulin als Mengenabgleich wurde durch RT-PCR in verschiedenen Medulloblastom-Zelllinien (oben angegeben) untersucht, die 72 h mit 2,5  $\mu$ M oder 5  $\mu$ M 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelt wurden bzw. als Kontrolle nicht mit 5-Aza-2'-deoxycytidin (0  $\mu$ M) behandelt wurden. Die amplifizierten DNA-Fragmente von Par-4 (273 bp), ZIPK (193 bp), TFPT (235 bp) und  $\beta$ 2-Mikroglobulin (148 bp) wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse dieser Analyse darauf hin, dass die mRNA-Expression der untersuchten Gene *par-4*, *tfpt* und *zipk* in verschiedenen Gliom- und

Medulloblastom-Zelllinien durch DNA-Methylierung herunterreguliert sein könnte, da die Genexpression durch die Behandlung der Zellen mit dem DNA-Demethylierungsreagenz 5-Aza-2'-deoxycytidin dosisabhängig induziert werden konnte.

#### 4.5.3 Methylierungsanalysen des Par-4-, ZIPK- und TFPT-Promotors

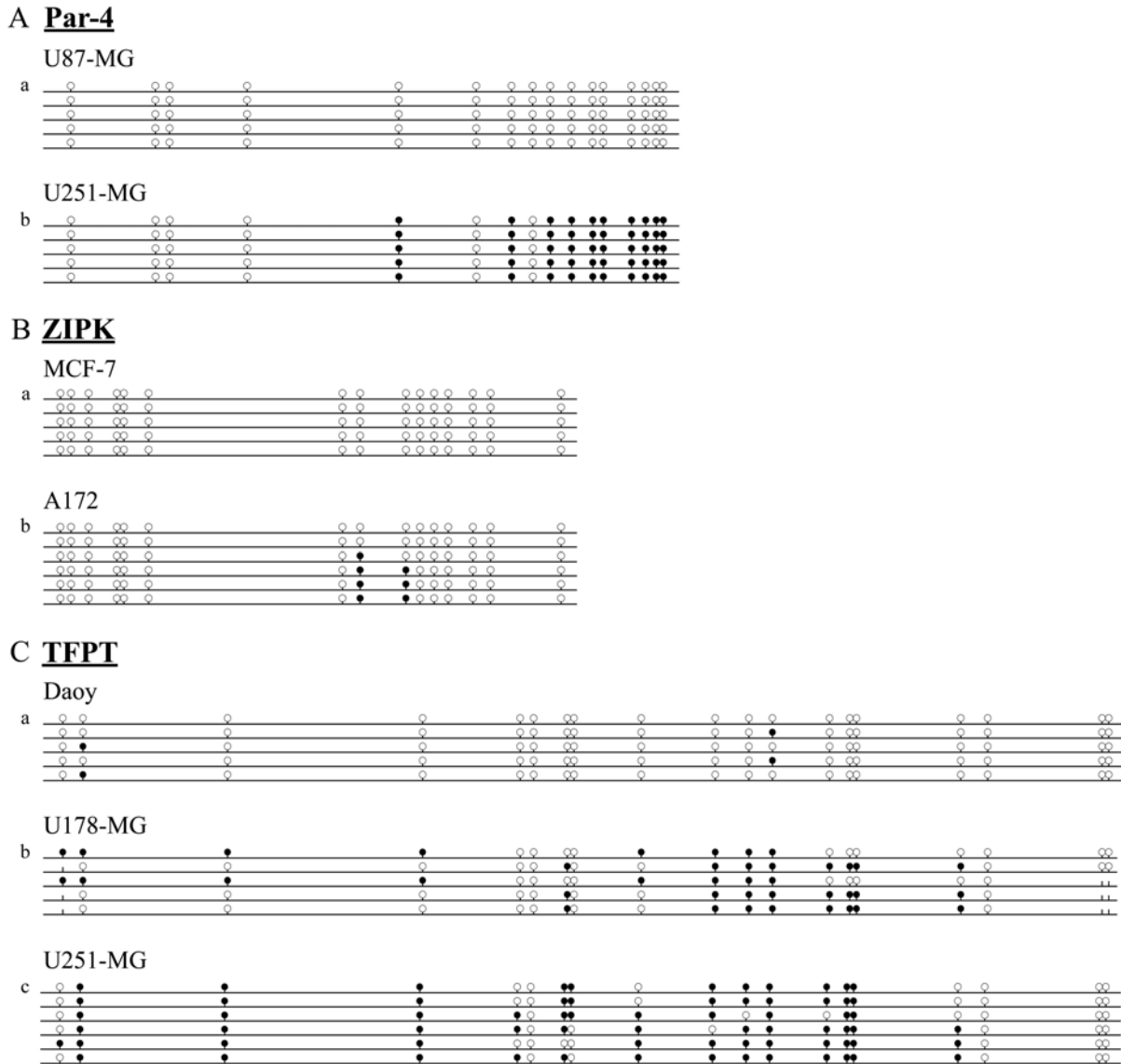
Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Gene *par-4*, *zipk* und *tfpt* in einigen Tumorzelllinien nur schwach exprimiert werden (4.5.1) und dass die Genexpression in Tumorzellen des zentralen Nervensystems durch die Behandlung mit dem DNA-Demethylierungsreagenz 5-Aza-2'-deoxycytidin hochreguliert werden kann (4.5.2). Diese Befunde deuten auf die Inaktivierung des *par-4*-, *tfpt*- und *zipk*-Gens durch DNA-Hypermethylierung hin. Des Weiteren wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt, dass die Par-4-Expression in Ras-transformierten HEK Zellen (humane, embryonale Nierenzellen) durch Promotor-Methylierung des *par-4*-Gens herunterreguliert wird (Pruitt *et al.*, 2005). Deshalb sollte nun untersucht werden, ob die Promotoren der *par-4*-, *tfpt*- und *zipk*-Gene hypermethyliert sind. Zu diesem Zweck wurden ca. 5000 bp im 5'-Bereich des Transkriptionsstartpunkts der entsprechenden Gene mit Hilfe des *EMBOSS CpGPlot* Programms (Rice *et al.*, 2000) analysiert. Mit Hilfe dieses Computerprogramms können CpG-Inseln lokalisiert werden, indem die DNA-Abschnitte im Hinblick auf ihren GC-Gehalt untersucht werden. Die Einstellungen des Computerprogramms wurden so gewählt, dass mindestens ein GC-Gehalt von 50 % in einem DNA-Fragment von mindestens 200 bp Länge vorliegen muss, um als potentielle CpG-Insel identifiziert zu werden. Darüber hinaus musste das Verhältnis von beobachteten CpGs zu erwarteten CpGs größer als 0,6 sein. Anschließend wurden Oligonukleotid-Paare ausgewählt, mit denen DNA-Fragmente aus den identifizierten CpG-Inseln amplifiziert werden können (siehe auch Anhang A). Für die Methylierungsanalysen genomischer DNA standen zwei experimentelle Ansätze zur Verfügung. Der erste Schritt in beiden experimentellen Methoden besteht in der Behandlung der genomischen DNA mit dem Reagenz Bisulfit (BS). Durch diese Behandlung werden die unmethylierten Cytosinbasen der DNA in Uracil umgewandelt, wohingegen methylierte Cytosinbasen (<sup>5m</sup>C) unter den gewählten Reaktionsbedingungen inert sind und nicht umgewandelt werden. Anschließend wird eine PCR-Reaktion durchgeführt, in der die behandelte BS-DNA als Matrize eingesetzt wird. In dieser so genannten BS-PCR werden die Uracil-Basen als Thymin und die <sup>5m</sup>C-Basen als Cytosin in den amplifizierten DNA-Strang eingebaut, so dass nach dem Amplifikationsprozess entweder CpG-Dinukleotide (bei methylierter DNA) oder TpG-Dinukleotide (bei unmethylierter DNA) im amplifizierten

DNA-Fragment vorliegen. Die amplifizierten DNA-Produkte aus der BS-PCR können nun durch zwei verschiedene experimentelle Ansätze weiter untersucht werden. Bei der ersten Methode, durch die eine genaue Kartierung methylierter Cytosinbasen möglich ist, wird das BS-PCR-Produkt in den Vektor pCR 2.1-TOPO kloniert und anschließend durch Vektor-spezifische Oligonukleotide nochmals in einer PCR-Reaktion („Klon-PCR“) amplifiziert. Das PCR-Produkt aus der Klon-PCR kann dann sequenziert werden („BS-Sequenzierung“). Die Auswertung der BS-DNA-Sequenzen erfolgt mit Hilfe des Computerprogramms *BiQ-Analyzer*, das die Sequenzierungsergebnisse der BS-PCR-Produkte in einem internen *ClustalW*-Vergleich mit den entsprechenden Sequenzen der genomischen DNA vergleicht. Auf diese Weise kann der Methylierungsstatus jedes einzelnen CpG-Dinukleotids im BS-PCR-Produkt bestimmt werden. Als Alternative zur Sequenzierung von BS-PCR-Produkten kann der Methylierungsstatus der BS-PCR-Produkte bei der zweiten experimentellen Methode mit Hilfe eines speziellen Restriktionsendonuklease-Verdaus analysiert werden. Das Prinzip dieser so genannten kombinierten BS-Restriktionsanalyse (COBRA) beruht auf dem Einsatz von Restriktionsendonukleasen, die Erkennungsmotive mit CpG-Dinukleotiden besitzen und deshalb zum Beispiel nur vormals methylierte DNA schneiden können. Die im Rahmen dieser Arbeit für die COBRA-Analyse verwendete Restriktionsendonuklease *BstUI* weist das Erkennungsmotiv CGCG auf und kann die amplifizierten BS-PCR-Fragmente nur schneiden, wenn beide Cytosinbasen im Erkennungsmotiv in der genomischen DNA als <sup>5m</sup>C vorliegen und deshalb in der BS-PCR als Cytosin und nicht als Thymin in das amplifizierte DNA-Fragment eingebaut wurden. Der Grad der DNA-Fragmentierung spiegelt deshalb den Grad der DNA-Methylierung an dem Erkennungsmotiv der Restriktionsendonuklease *BstUI* wider. Während die BS-Sequenzierung geeignet ist, quantitativ die Position von Methylierungsereignissen zu bestimmen, liegt der Vorteil der COBRA-Analyse darin, sehr effizient große DNA-Kollektive auf die Methylierung bestimmter CpG-Positionen hin studieren zu können.

#### **4.5.3.1 Methylierungsstatus des Par-4-, ZIPK- und TFPT-Promotors in humanen Tumorzelllinien**

Zunächst sollten die Promotoren der Gene *par-4*, *zipk* und *tfpt* in den Tumorzelllinien untersucht werden, die einen geringen mRNA-Expressionsstatus der entsprechenden Gene aufweisen (siehe 4.5.1.1) oder in denen sich die Expression der Gene nach 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung hochregulieren lässt (siehe 4.5.2). Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurde zunächst genomische DNA aus den entsprechenden Tumorzelllinien isoliert,

die DNA einer Bisulfit-Behandlung unterzogen und nach der Behandlung als Matrize in einer BS-PCR mit den Oligonukleotiden *PAR4-bs-fl* und *PAR4-bs-rl* für den Par-4-Promotor, *huZIP-bs-f* und *huZIP-bs-r* für den ZIPK-Promotor sowie *TFPT-bs-3f* und *TFPT-bs-2r* für den TFPT-Promotor eingesetzt. Das amplifizierte DNA-Fragment des Par-4-Promotors (222 bp), des ZIPK-Promotors (191 bp) oder des TFPT-Promotors (378 bp) wurde in den Vektor pCR 2.1-TOPO kloniert und anschließend in Bakterien transformiert. Dann wurde eine Klon-PCR mit mindestens fünf unabhängigen Bakterienklonen durchgeführt und die amplifizierten PCR-Produkte sequenziert. Die BS-DNA-Sequenzen wurden dann mit dem *BiQ-Analyzer*-Computerprogramm ausgewertet. Das Computerprogramm vergleicht die Sequenzierungsergebnisse mit der entsprechenden Sequenz der genomischen DNA und stellt die Analyseergebnisse graphisch dar. Das amplifizierte Promotorfragment wird dabei als Linie und die CpG-Dinukleotide durch Kreise dargestellt. Gefüllte schwarze Kreise symbolisieren methylierte, ungefüllte Kreise stellen unmethylierte Cytosinbasen in den CpG-Dinukleotiden dar. Striche ohne Kreise symbolisieren nicht-CpG-Positionen im BS-PCR-Produkt, obwohl in der genomischen Sequenz an dieser Stelle ein CpG-Dinukleotid vorliegt. Zur besseren Übersicht wurden die durch die BS-Sequenzierung ermittelten Methylierungsgrade der Promotorfragmente von Par-4, ZIPK und TFPT in drei verschiedene Kategorien eingeteilt: Der Wert „0“ repräsentiert keine DNA-Methylierung innerhalb des untersuchten Promotorbereichs, der Wert „1“ steht für eine schwache DNA-Methylierung und der Wert „2“ bezeichnet eine starke DNA-Methylierung im untersuchten Promotorbereich. In der Abb. 25 sind exemplarisch die Sequenzierungsergebnisse der analysierten BS-PCR-Produkte des Par-4-Promotors (Abb. 25 A), des ZIPK-Promotors (Abb. 25 B) und des TFPT-Promotors (Abb. 25 C) dargestellt, die die verschiedenen detektierten DNA-Methylierungsgrade in den untersuchten humanen Tumorzelllinien repräsentieren. Dabei ist in Abb. 25 A (a) ein unmethyliertes Par-4-Promotorfragment mit dem Wert 0 und in Abb. 25 A (b) ein stark methyliertes Par-4-Promotorfragment mit dem Wert 2 dargestellt. Ein nicht methyliertes DNA-Fragment des ZIPK-Promotors (Wert 0) ist in Abb. 25 B (a) dargestellt, die Abb. 25 B (b) zeigt ein schwach methyliertes ZIPK-Promotorfragment mit dem Wert 1. In Abb. 25 C (a) ist ein nicht methyliertes DNA-Fragment des TFPT-Promotors mit dem Wert 0, in Abb. 25 C (b) ein schwach methyliertes TFPT-Promotorfragment mit dem Wert 1 und in Abb. 25 C (c) ein stark methyliertes TFPT-Promotorfragment mit dem Wert 2 gezeigt.



**Abb. 25: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse der BS-Sequenzierung des Par-4-, ZIPK- und des TFPT-Promotors in humanen Tumorzelllinien.** (A-C) Genomische, BS-modifizierte DNA aus verschiedenen Tumorzelllinien wurde in einer BS-PCR als Matrizen-DNA eingesetzt und ein DNA-Fragment des Par-4-, ZIPK- oder TFPT-Promotors mit den entsprechenden Oligonukleotiden amplifiziert. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend kloniert und in Bakterien transformiert. Dann wurde eine Klon-PCR mit mindestens 5 unabhängigen Bakterienklonen durchgeführt und die amplifizierten PCR-Produkte sequenziert. Die BS-DNA-Sequenzen wurden anschließend mit Hilfe des *BiQ-Analyzer* Programms ausgewertet und die Ergebnisse in einem Diagramm graphisch dargestellt. Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise symbolisieren unmethylierte Cytosinbasen in den CpG-Dinukleotiden des Promotorfragments. Striche ohne Kreise symbolisieren nicht-CpG-Positionen im sequenzierten BS-PCR-Produkt, obwohl dort in der genomischen Sequenz ein CpG-Dinukleotid vorliegt. (A) Exemplarisch für mehrere untersuchte Proben sind die Sequenzanalysen der amplifizierten Par-4-Fragmente aus den Tumorzelllinien U87-MG (a) und U251-MG (b) dargestellt. Die U87-MG-Probe repräsentiert ein nicht methyliertes Promotorfragment mit dem Wert 0 und die U251-MG-Probe repräsentiert ein stark methyliertes Promotorfragment mit dem Wert 2. (B) Promotor-Analysen der ZIPK. Exemplarisch für mehrere untersuchte Proben sind die Sequenzanalysen der Zelllinie MCF-7 (a) und der Zelllinie A172 (b) dargestellt. Dabei repräsentiert die MCF-7-Probe nicht methylierte DNA mit dem Wert 0, die A172-Probe repräsentiert schwach methylierte DNA mit dem Wert 1. (C) TFPT-Promotor-Analysen. Exemplarisch für mehrere untersuchte Proben sind die Sequenzanalysen der Tumorzelllinie Daoy (a), der Tumorzelllinie U178-MG (b) und der Tumorzelllinie U251-MG (c) dargestellt. Die Daoy-Probe repräsentiert eine nicht methylierte DNA-Sequenz mit dem Wert 0, die U178-MG-Probe repräsentiert eine schwach methylierte DNA-Sequenz mit dem Wert 1 und die U251-MG-Probe repräsentiert stark methylierte DNA mit dem Wert 2.

In den Gliom-Zelllinien U251-MG (Abb. 25 A, b) und U373-MG, in denen nach der Induktion der DNA-Demethylierung ein erhöhter Par-4-mRNA-Expressionsstatus nachgewiesen wurde, konnte nach der Auswertung der BS-Sequenzierungsreaktion mit dem Programm *BiQ-Analyzer* eine starke DNA-Methylierung im untersuchten Par-4-Promotorfragment detektiert werden (Tabelle 1, Spalte 4). In der Tumorzelllinie Molt-4, in der kein Par-4-Transkript detektiert wurde, konnte keine DNA-Methylierung im untersuchten Par-4-Promotorfragment nachgewiesen werden (Tabelle 1, Spalte 4). Auch in den Tumorzelllinien U87-MG (Abb. 25 A, a) und SH-SY5Y wurde keine Methylierung im Par-4-Promotor detektiert (Tabelle 1, Spalte 4). Das Par-4-Promotorfragment in den Tumorzelllinien U178-MG, A172 und D283, in denen nach 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung eine verstärkte Par-4-mRNA-Expression beobachtet wurde, war ebenfalls nicht methyliert (Tabelle 1, Spalte 4). Die sequenzierten ZIPK-Promotorfragmente aus den Zelllinien Molt-4 und MCF-7 (Abb. 25 B, a) wiesen trotz geringer ZIPK-mRNA-Expression keine DNA-Methylierung auf (Tabelle 1, Spalte 7). Unter den Zelllinien, in denen die ZIPK-mRNA-Expression nach 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung induziert werden konnte (A172, LN428, U178-MG, Daoy, D283, Med8A), war nur in der Zelllinie A172 (Abb. 25 B, b) eine äußerst schwache DNA-Methylierung zu detektieren (Tabelle 1, Spalte 7). Für die Untersuchung des in der BS-PCR amplifizierten DNA-Fragments des TFPT-Promotors aus verschiedenen Tumorzelllinien wurde nicht nur die Methode der BS-Sequenzierung verwendet, sondern auch die COBRA-Technik herangezogen. In der COBRA-Analyse wurde die Restriktionsendonuklease *BstUI* verwendet, die die BS-PCR-Produkte an dem Erkennungsmotiv CGCG spaltet. Die durch den Restriktionsverdau entstehenden DNA-Spaltprodukte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Der Grad der DNA-Fragmentierung spiegelt dabei den Grad der DNA-Methylierung des BS-PCR-Produkts an dem Erkennungsmotiv CGCG wider. Zur besseren Übersicht wurden die detektierten Grade der DNA-Fragmentierung in drei verschiedene Schnittklassifikationen eingeteilt. Der Wert „0“ repräsentiert unverdaute und damit nicht methylierte DNA, der Wert „1“ repräsentiert eine partielle Spaltung des BS-PCR-Produkts und damit eine schwache DNA-Methylierung. Der Wert „2“ repräsentiert (nahezu) vollständig verdaute DNA und somit eine starke DNA-Methylierung. In der Abb. 26 B (Abschnitt 4.5.3.2) sind exemplarisch die Ergebnisse einer COBRA-Analyse mit der Restriktionsendonuklease *BstUI* von amplifizierten TFPT-Promotorfragmenten aus einer BS-PCR sowie ihre Einteilung in die Schnittklassen 0, 1 und 2 dargestellt. Zusätzlich zur COBRA-Analyse wurden alle amplifizierten TFPT-Promotorfragmente bis auf das TFPT-DNA-Fragment, das aus der Tumorzelllinie MCF-7



amplifiziert wurde, durch BS-Sequenzierung analysiert. Die ermittelten Methylierungsgrade des TFPT-Promotorfragments aus der COBRA-Analyse und aus der Sequenzierungsanalyse der BS-PCR-Produkte stimmten dabei völlig überein. Eine starke DNA-Methylierung des untersuchten TFPT-Promotorfragments (COBRA und BS-Sequenzierung) wurde in den Glioblastom-Zelllinien A172, U373-MG und U251-MG (Abb. 25 C, c) nachgewiesen (Tabelle 1, Spalte 10), in denen die TFPT-mRNA-Expression nach 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung induziert werden konnte. In der Zelllinie U178-MG, in der die TFPT-mRNA-Expression nach 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung induziert wurde, konnte sowohl in der COBRA-Analyse wie auch nach Auswertung der Sequenzierungs-Reaktion (Abb. 25 C, b) des amplifizierten DNA-Fragments eine schwache DNA-Methylierung detektiert werden (Tabelle 1, Spalte 10). Die Medulloblastom-Zelllinie Daoy (Abb. 25 C, a) wies keinerlei DNA-Methylierung im untersuchten TFPT-Promotorfragment auf (COBRA und BS-Sequenzierung), obwohl auch hier die TFPT-mRNA-Expression nach 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung hochreguliert werden konnte. Die Zelllinie MCF-7, in der ein schwaches TFPT-Transkript nachgewiesen wurde, wies in der COBRA-Analyse eine schwache DNA-Methylierung der Schnittklassifikation 1 auf (Tabelle 1, Spalte 10).

| Zelllinie | Par-4 |       |                       | ZIPK |       |                       | TFPT |       |                       |
|-----------|-------|-------|-----------------------|------|-------|-----------------------|------|-------|-----------------------|
|           | mRNA  | 5-Aza | Promotor-Methylierung | mRNA | 5-Aza | Promotor-Methylierung | mRNA | 5-Aza | Promotor-Methylierung |
| Molt-4    | -     |       | 0                     | +    |       | 0                     | ++   |       |                       |
| MCF-7     | +     |       |                       | +    |       | 0                     | +    |       | 1                     |
| Saos-2    | +     |       |                       | -    |       |                       | +    |       |                       |
| U87-MG    | +     | -     | 0                     | ++   | -     |                       | ++   | -     |                       |
| U178-MG   |       | +     | 0                     |      | +     | 0                     |      | +     | 1                     |
| U251-MG   | +     | +     | 2                     | -    | -     |                       | +    | +     | 2                     |
| U373-MG   | ++    | +     | 2                     | ++   | -     | 0                     | ++   | +     | 2                     |
| LN428     |       | -     |                       |      | +     | 0                     |      | -     |                       |
| A172      | ++    | +     | 0                     | ++   | +     | 1                     | ++   | +     | 2                     |
| SH-SY5Y   | ++    |       | 0                     | ++   |       |                       | ++   |       |                       |
| D283      |       | +     | 0                     |      | +     | 0                     |      | -     |                       |
| Med8A     |       | -     |                       |      | +     | 0                     |      | -     |                       |
| D425      |       | -     |                       |      | -     |                       |      | -     |                       |
| Daoy      |       | -     |                       |      | +     | 0                     |      | +     | 0                     |

**Tabelle 1: Zusammenfassung der mRNA-Expressionsanalysen, der Ergebnisse aus der Untersuchung zur mRNA-Induktion nach 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung sowie der Ergebnisse der Promotor-Methylierungsstudien von Par-4, ZIPK und TFPT in humanen Tumorzelllinien.** In der linken Spalte sind die Tumorzelllinien aufgelistet. In der Tabelle ist der mRNA-Expressionsstatus von Par-4 (Spalte 2), von ZIPK (Spalte 5) und von TFPT (Spalte 8) in den untersuchten humanen Tumorzelllinien dargestellt (siehe 4.5.1.1). +/++ repräsentiert die Intensität der mRNA-Expression, – repräsentiert kein detektierbares Transkript. Die Ergebnisse aus den mRNA-Expressionsstudien nach Induktion der DNA-Demethylierung in humanen Tumorzelllinien mit dem Reagenz 5-Aza-2'-deoxycytidin (siehe 4.5.2) sind für Par-4 in der Spalte 3, für ZIPK in

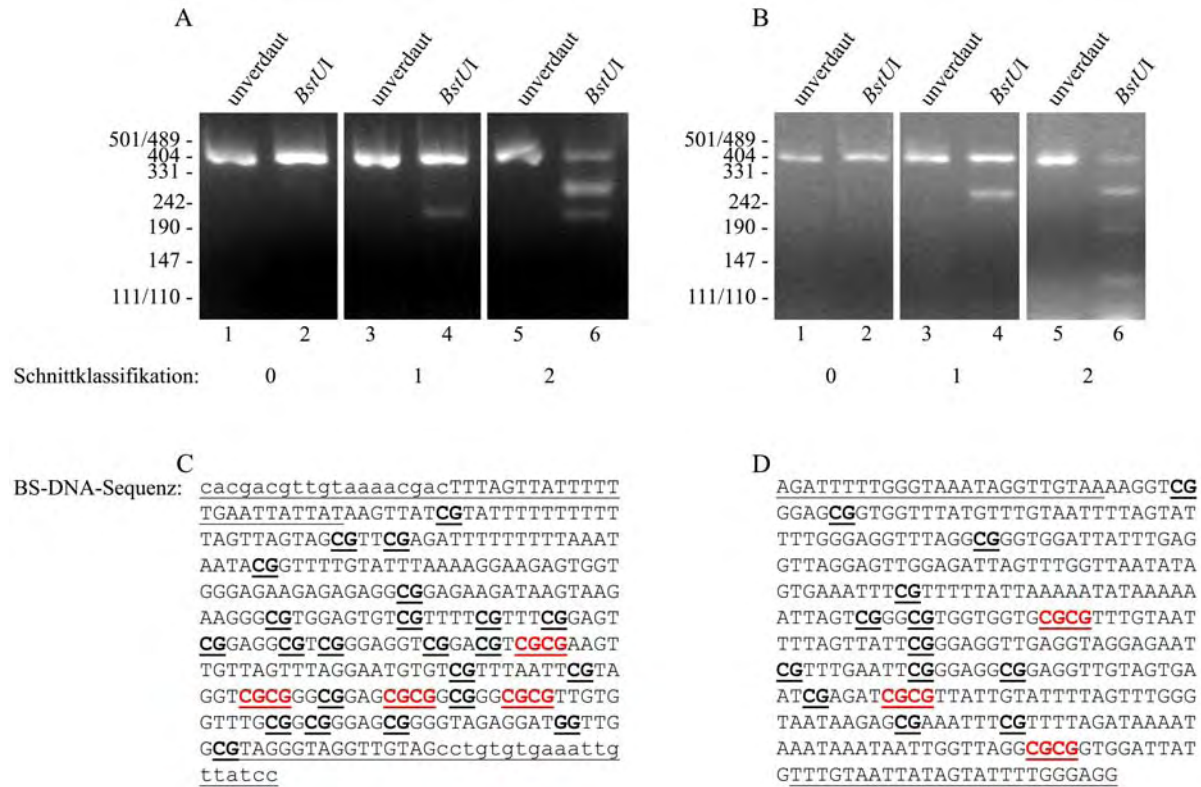
der Spalte 6 und für TFPT in der Spalte 9 dargestellt. – zeigt keine Induktion der mRNA-Expression nach Behandlung der Tumorzellen mit 5-Aza-2'-deoxycytidin an, + zeigt die Detektion einer Induktion der Transkription nach der Behandlung der Zellen mit 5-Aza-2'-deoxycytidin an. Die ermittelten Methylierungsgrade (siehe 4.5.3.1) des Par-4-Promotors sind in der Spalte 4 angegeben. Die relativen Methylierungsgrade für das ZIPK-Promotorfragment sind in Spalte 7, die relativen Methylierungsgrade für das TFPT-Promotorfragment sind in Spalte 10 dargestellt (siehe 4.5.3.1). Der Wert 0 repräsentiert nicht methylierte DNA, der Wert 1 repräsentiert schwach methylierte DNA und der Wert 2 repräsentiert stark methylierte DNA. Schwarz gefüllte Zeilen bedeuten, dass die Analyse für die entsprechende Zelllinie nicht stattgefunden hat.

Zusammenfassend bestätigen die durchgeführten Experimente, dass die Transkription des *par-4*-Gens in den Gliom-Zelllinien U251-MG und U373-MG durch Promotor-Methylierung reguliert wird. Das untersuchte Promotorfragment des *zipk*-Gens war in keiner der untersuchten Tumorzelllinien deutlich methyliert. Die Analysen des amplifizierten TFPT-Promotorfragments zeigten, dass eine positive Korrelation zwischen einer schwachen TFPT-mRNA-Expression in den Tumorzelllinien MCF-7 und U251-MG und einer starken DNA-Hypermethylierung im TFPT-Promotor vorliegt. Mit Ausnahme der Medulloblastom-Zelllinie Daoy konnte in allen Tumorzelllinien (U178-MG, U251-MG, U373-MG, A172) eine Korrelation zwischen der Induktion der TFPT-Transkription durch DNA-Demethylierung und einer verstärkten TFPT-Promotormethylierung nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind als Übersicht in der Tabelle 1 zusammengefasst.

#### **4.5.3.2 Methylierungsstatus des Par-4- und des TFPT-Promotors sowie mRNA-Expression von Par-4 und TFPT in humanem Gliomgewebe**

Die vorangegangenen Studien haben gezeigt, dass die Par-4- sowie die TFPT-mRNA-Expression in vielen Gliom-Zelllinien durch die Behandlung der Zellen mit dem Reagenz 5-Aza-2'-deoxycytidin induziert werden konnte (4.5.2) und dass die Induktion der Par-4- bzw. TFPT-Transkription durch DNA-Demethylierung mit einer DNA-Methylierung der untersuchten Par-4- bzw. TFPT-Promotorfragmente korrelierte (4.5.3.1). Die ZIPK-mRNA-Expression wurde zwar ebenfalls in einigen Gliom-Zelllinien durch Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung induziert, es konnte jedoch keine deutliche DNA-Methylierung in dem untersuchten ZIPK-Promotorfragment aus den entsprechenden Zelllinien detektiert werden. Daher wurde in den folgenden Untersuchungen nur der Par-4-Promotor und der TFPT-Promotor in primärem Gliomgewebe verschiedener Patienten auf DNA-Hypermethylierung analysiert. Für die Studien wurde uns freundlicherweise ein DNA-Kollektiv aus primären Gliomproben verschiedener Patienten von der Arbeitsgruppe Reifenberger (Institut für Neuropathologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) und von der Arbeitsgruppe von Deimling (Institut für Neuropathologie, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die genomische DNA aus den primären Gliomen wurde mit Hilfe des

*EpiTect Bisulfite Kit* von der Firma QIAGEN in BS-DNA umgewandelt und als Matrize in einer BS-PCR eingesetzt. In den nachfolgenden Analysen wurde genomische DNA als Kontrolle eingesetzt, die aus der weißen und grauen Gehirnschicht von Epilepsiepatienten präpariert wurde (NB, *normal brain*; Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Bonn). Auch die Kontroll-DNA wurde wie oben beschrieben in BS-DNA umgewandelt.

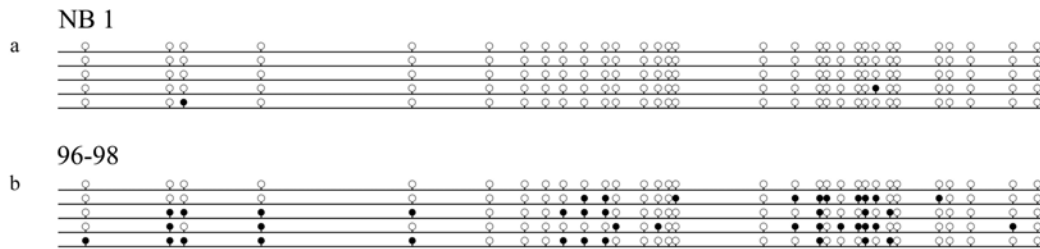


**Abb. 26: COBRA-Analyse der durch BS-PCR amplifizierten DNA-Fragmente des Par-4- und des TFPT-Promotors in primärem Gliomgewebe. (A-B)** In einer BS-PCR, in der BS-modifizierte DNA aus primärem Gliomgewebe als Matrize eingesetzt wurde, wurden Promotorfragmente mit Par-4-spezifischen bzw. TFPT-spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Jeweils drei verschiedene BS-PCR-Produkte des Par-4- und des TFPT-Promotors wurden mit der Restriktionsendonuklease *Bst*UI verdaut. Die Auftrennung der DNA-Spaltprodukte erfolgte in einem 4 %-igen Agarosegel. Als Kontrolle diente das jeweilige unverdaute PCR-Produkt. Die DNA-Fragmentlängen des Längenstandards sind in [bp] neben dem Gel angegeben. Je nach Grad der DNA-Fragmentierung wurden die Proben in die Schnittklassifikation 0 (unverdautes BS-PCR-Produkt), 1 (schwach verdautes BS-PCR-Produkt) und 2 (stark verdautes BS-PCR-Produkt) eingeteilt. **(A)** *Bst*UI-Restriktionsverdau von drei verschiedenen BS-PCR-Produkten des Par-4-Promotors mit der Schnittklassifikation 0 (Spur 1-2), 1 (Spur 3-4) und 2 (Spur 5-6), die exemplarisch für die Analyse des gesamten Gliomkollektivs gezeigt werden. **(B)** *Bst*UI-Restriktionsverdau von drei Proben des amplifizierten TFPT-Promotorfragments aus dem Gliomkollektiv, die die Schnittklassifikation 0 (Spur 1-2), 1 (Spur 3-4) und 2 (Spur 5-6) aufweisen. **(C)** DNA-Sequenz des amplifizierten Par-4-Promotorfragments nach BS-Behandlung. Die potentiell methylierten CpG-Dinukleotide sind durch fett markierte, unterstrichene Buchstaben hervorgehoben. Dabei stellen die in roten Buchstaben dargestellten CGCG-Folgen die *Bst*UI-Restriktionsschnittstellen dar. Die unterstrichenen Basen entsprechen den verwendeten Oligonukleotiden, dabei sind die bei der Amplifikation angefügten M13-Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide durch kleine Buchstaben markiert. Bei der Methylierung aller vorhandenen Cytosinbasen in den CpG-Dinukleotiden würden nach einem *Bst*UI-Restriktionsverdau DNA-Fragmente von 218, 77, 43, 11, und 9 bp entstehen. **(D)** DNA-Sequenz des amplifizierten TFPT-Promotorfragments nach BS-Behandlung. Die unterstrichenen Basenfolgen am Anfang und am Ende der Sequenz entsprechen der Sequenz der in der BS-PCR eingesetzten Oligonukleotide. Die fett markierten und unterstrichenen Buchstaben stellen die potentiellen CpG-Dinukleotide dar. Die roten, fett markierten und unterstrichenen CGCG-Folgen markieren die potentiellen *Bst*UI-Restriktionsschnittstellen. Wären alle Cytosinbasen in den CpG-Dinukleotiden des TFPT-Promotorfragments methyliert, würden nach einem *Bst*UI-Restriktionsverdau DNA-Fragmente von 182, 84, 75 und 37 bp entstehen.

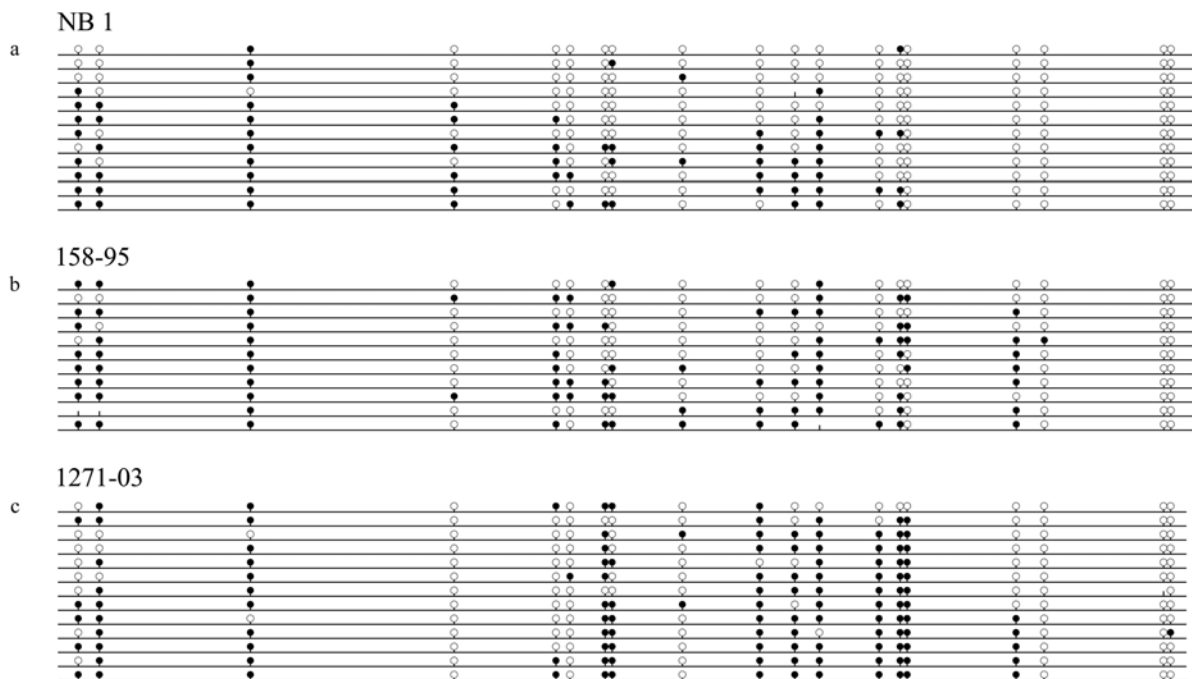
Für die Amplifikation des Par-4-Promotorfragments wurden die Oligonukleotide *Par4-bs-f1-M13* und *Par4-bs-r4-M13* verwendet. Mit diesen Oligonukleotiden wird ein 358 bp langes DNA-Fragment des Par-4-Promotors in der BS-PCR amplifiziert, das insgesamt vier potentielle *BstUI*-Restriktionsschnittstellen enthält. Sowohl am Sinn- wie auch am Gegensinn-Oligonukleotid befindet sich eine 20 bp lange M13-Sequenz, die nicht mit dem amplifizierten Par-4-Promotorfragment hybridisiert. Die in der BS-PCR-Reaktion amplifizierten PCR-Produkte des Par-4-Promotors werden deshalb im 5'-Bereich und im 3'-Bereich um 20 bp verlängert, so dass die DNA-Spaltprodukte des BS-PCR-Produkts nach der COBRA-Analyse im Agarosegel besser aufgetrennt werden können (siehe Abb. 26 C). Für die Amplifikation des TFPT-Promotorfragments von 378 bp Länge wurden die Oligonukleotide *TFPT-bs-3f* und *TFPT-bs-2r* verwendet. Das BS-PCR-Produkt enthält 3 potentielle *BstUI*-Restriktionsschnittstellen (siehe Abb. 26 D). Alle amplifizierten BS-PCR-Produkte wurden einer COBRA-Analyse mit der Restriktionsendonuklease *BstUI* unterzogen und die DNA-Spaltprodukte in einem 4 %-igen Agarosegel analysiert. Als Kontrolle wurde zusätzlich das PCR-Produkt auf das Agarosegel aufgetragen, das nicht mit der Restriktionsendonuklease *BstUI* verdaut wurde. Zur Übersicht wurden die im Rahmen dieser Analyse detektierten Grade der DNA-Fragmentierung in die drei verschiedenen Schnittklassifikationen „0“, „1“ und „2“ eingeteilt. Die Abb. 26 zeigt exemplarisch für alle Proben aus dem DNA-Kollektiv von Gliomen verschiedener Patienten jeweils drei gespaltene BS-PCR-Produkte des Par-4-Promotors (Abb. 26 A) oder des TFPT-Promotors (Abb. 26 B). Wie bereits unter 4.5.3.1 beschrieben, repräsentiert der Wert 0 unverdaute und damit unmethylierte DNA (Abb. 26 A und B, Spur 2), der Wert 1 repräsentiert schwach verdaute und damit schwach methylierte DNA (Abb. 26 A und B, Spur 4) und der Wert 2 repräsentiert (nahezu) vollständig verdaute und damit stark methylierte DNA (Abb. 26 A und B, Spur 6). Anhand dieser Schnittklassifikation wurden alle 87 mit Hilfe der COBRA-Analyse untersuchten DNA-Proben des Gliomkollektivs eingeteilt und die Ergebnisse in der Tabelle 2 zusammengefasst. Zusätzlich wurden alle in der COBRA-Analyse als methyliert eingestufte und einige als unmethyliert eingestufte BS-PCR-Fragmente des Par-4-Promotors kloniert. Dann wurde mit jeweils fünf unabhängigen Bakterienklonen eine Klon-PCR durchgeführt, die amplifizierten PCR-Produkte sequenziert und mit dem *BiQ-Analyzer* Programm analysiert. So konnte überprüft werden, ob die Ergebnisse der COBRA-Analyse mit dem durch die BS-Sequenzierung ermittelten Methylierungsmuster des untersuchten Promotorfragments übereinstimmten. In Abb. 27 A sind exemplarisch zwei BS-Sequenzanalysen dargestellt, wobei die Probe NB 1 (Abb. 27 A a, Kontrollgewebe, weiße/graue Hirnsubstanz) eine

unmethylierte DNA-Sequenz mit dem Wert 0 und die Probe 96-98 (Abb. 27 A b, sekundäres Glioblastom) eine schwach methylierte DNA-Sequenz mit dem Wert 1 repräsentiert.

**A Par-4**



**B TFPT**



**Abb. 27: Exemplarische Darstellung der BS-Sequenzierungsergebnisse des Par-4- sowie des TFPT-Promotors in primären Gliomproben und in Kontrollgewebe. (A und B) BS-behandelte genomische DNA aus primärem Gliomgewebe bzw. aus Kontrollgewebe wurde in einer BS-PCR als Matrize eingesetzt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend kloniert und in Bakterien transformiert. Dann wurde eine Klon-PCR mit mindestens 5 unabhängigen Bakterienklonen (für Par-4) bzw. mit mindestens 10 unabhängigen Bakterienklonen (für TFPT) durchgeführt und die amplifizierten PCR-Produkte sequenziert. Die BS-DNA-Sequenzen wurden anschließend mit Hilfe des *BiQ-Analyzer* Programms ausgewertet und die Ergebnisse in einem Diagramm graphisch dargestellt. Das amplifizierte Promotorfragment wird als Linie dargestellt. Gefüllte schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, ungefüllte Kreise symbolisieren unmethylierte Cytosinbasen in den CpG-Dinukleotiden des Promotorfragments. Striche ohne Kreise symbolisieren nicht-CpG-Positionen im sequenzierten BS-PCR-Produkt, obwohl dort in der genomischen Sequenz ein CpG-Dinukleotid vorliegt. (A) Untersuchung des Par-4-Promotors. Exemplarisch für alle untersuchten DNA-Proben des Gliomkollektivs sind die Sequenzanalysen der DNA eines Kontrollgewebes (a, NB 1, weiße/graue Hirnschubstanz) und eines sekundären Glioblastoms (b, Referenznummer 96-98) dargestellt. Dabei repräsentiert die DNA-Probe (a) eine unmethylierte DNA-Sequenz mit dem Wert 0 und die DNA-Probe (b) eine schwach methylierte DNA-Sequenz mit dem Wert 1. (B) Untersuchung des TFPT-Promotors. Die Sequenzanalysen der DNA des Kontrollgewebes (a, NB 1, weiße/graue Hirnschubstanz) sowie von zwei DNA-Proben primärer Glioblastome (b, Referenznummer 158-95 und c, Referenznummer 1271-03) sind abgebildet. Das amplifizierte TFPT-Promotorfragment des Kontrollgewebes NB1 ist im Bereich der *Bst*UI-Restriktionsschnittstellen nicht bzw. nur äußerst schwach methyliert, die untersuchte DNA-Sequenz der Probe 158-95 ist schwach und die DNA-Sequenz der Probe 1271-03 ist stark methyliert.**

Für die in der BS-PCR amplifizierte TFPT-Promotorfragmente wurde exemplarisch jeweils eine durch die COBRA-Technik als unmethyliert (Abb. 27 B a, Kontrollgewebe, weiße/graue Hirnsubstanz), schwach methyliert (Abb. 27 B b, primäres Glioblastom) und stark methyliert (Abb. 27 B c, primäres Glioblastom) klassifizierte DNA-Probe durch BS-Sequenzierung von mindestens zehn unabhängigen Klonen untersucht und die Sequenzen anschließend mit dem Computerprogramm *BiQ-Analyzer* ausgewertet. Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Detektion einer schwachen DNA-Methylierung (Grad 1) in einer DNA-Probe nicht zwingend bedeutet, dass das untersuchte Promotorfragment ein schwaches Methylierungsmuster aufweist. Tumorgewebe, das aus Patienten isoliert wurde, enthält nicht ausschließlich Tumorzellen, sondern beinhaltet ebenso normale Zellen, in denen das Promotorfragment des zu untersuchenden Gens nicht methyliert sein kann. Darüber hinaus können die Allele der untersuchten Gene ein unterschiedliches Methylierungsmuster aufweisen, so dass die Tumorzellen heterogen in Bezug auf die DNA-Methylierung sein können. Wie die Zusammenfassung in der Tabelle 2 zeigt, stimmen die ermittelten Methylierungsgrade der COBRA-Analyse und der BS-Sequenzierung völlig überein (vergleiche Spalten 3 und 4 sowie 6 und 7). Die Ergebnisse der Analysen verdeutlichen, dass die untersuchte Par-4-Promotorregion nur in sehr wenigen Gliomproben methyliert ist (Tabelle 2, Spalten 3 und 4). Einen geringen Methylierungsgrad mit dem Wert 1 wiesen 2 von 41 DNA-Proben (5 %) aus primären Glioblastomen (Proben 380-99 und 1248-03) und 4 von 13 DNA-Proben (31 %) aus sekundären Glioblastomen (537-94, 96-98, 198-01 und 365-02) auf. In allen anderen Proben des Gliomkollektivs konnte keine DNA-Methylierung nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Analyse des Par-4-Promotorfragments zeigten die Untersuchungen der amplifizierten TFPT-Promotorfragmente (Tabelle 2, Spalten 6 und 7) sehr viele methylierte DNA-Proben der Schnittklassifikation 1 und 2. Es ist jedoch zu beachten, dass eine der beiden Kontrollproben (NB 3) ebenfalls den Methylierungsgrad 1 aufweist. Innerhalb der ersten Probengruppe (Primäre Glioblastome) wiesen nur 6 von 41 DNA-Proben (15 %) keine Methylierung auf, 16 von 41 DNA-Proben (39 %) waren schwach und 19 von 41 DNA-Proben (46 %) waren stark methyliert. Bei den primären Glioblastomen, die aus „Langzeitüberlebenden“ (Patienten, die nach der operativen Entfernung des Glioblastoms mindestens 3 Jahre überlebt haben) isoliert wurden, gab es nur 1 DNA-Probe von insgesamt 4 DNA-Proben (25 %) mit dem Methylierungsgrad 2, der Rest der Proben war unmethyliert. Bei den primären Glioblastomen mit sarkomatöser Komponente ließen sich 2 von 5 (40 %) gering methylierte Proben detektieren, bei den primären Glioblastomen mit oligodendroglialer Komponente war 1 von 2 DNA-Proben (50 %) schwach methyliert. Es gab keine

unmethylierte DNA-Probe innerhalb der Riesenzellglioblastome, dafür wiesen 4 von 5 DNA-Proben (80 %) einen Methylierungsgrad der Schnittklassifikation 1 und 1 von 5 DNA-Proben (20 %) einen Methylierungsgrad der Schnittklassifikation 2 auf. Zusammenfassend konnte in 37 % aller primären Glioblastomproben eine starke DNA-Methylierung des TFPT-Promotors mit dem Grad 2 nachgewiesen werden. Auch bei den sekundären Glioblastomen wurden stark methylierte DNA-Proben der Schnittklassifikation 2 in 6 von 12 DNA-Proben (50 %) gefunden sowie 3 von 12 (25 %) schwach methylierte DNA-Proben der Schnittklassifikation 1. Von den insgesamt 9 DNA-Proben der anaplastischen Astrozytome wurden 6 DNA-Proben (67 %) als stark methyliert sowie 1 DNA-Probe (11 %) als schwach methyliert eingestuft. Bei den Astrozytomen mit einem WHO-Grad II war der größte Teil der DNA-Proben unmethyliert (62 %), nur 3 von 8 DNA-Proben (38 %) konnte der Methylierungsgrad 2 zugewiesen werden.

| Referenznummer | Histologische Herkunft | Par-4 |                  |                 | TFPT  |                  |                 |
|----------------|------------------------|-------|------------------|-----------------|-------|------------------|-----------------|
|                |                        | COBRA | BS-Sequenzierung | mRNA-Expression | COBRA | BS-Sequenzierung | mRNA-Expression |
| 158-95         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 1     | 1                | -               |
| 302-95         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 2     | -                | -               |
| 363-95         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 2     | -                | -               |
| 836-95         | Primäres Glioblastom   | 0     | 0                | -               | 1     | -                | -               |
| 871-95         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | 3,12            | 2     | -                | 0,89            |
| 881-95         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | 2,87            | 0     | -                | 1,41            |
| 1096-95        | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 1     | -                | -               |
| 1107-95        | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | 1,3             | 2     | -                | 0,75            |
| 45-96          | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 1     | -                | -               |
| 281-97         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 1     | -                | -               |
| 819-99         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 2     | -                | -               |
| 655-01         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | 3               | 1     | -                | 1,06            |
| 771-02         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 1     | -                | -               |
| 490-03         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 1     | -                | -               |
| 558-03         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | 2,86            | 0     | -                | 0,94            |
| 1037-03        | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 1     | -                | -               |
| 189-98         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 2     | -                | -               |
| 379-99         | Primäres Glioblastom   | 0     | 0                | -               | 2     | -                | -               |
| 380-99         | Primäres Glioblastom   | 1     | 1                | -               | 2     | -                | -               |
| 409-99         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | 1,03            | 2     | -                | 2,57            |
| 126-01         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | 3,61            | 1     | -                | 1,58            |
| 568-01         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | 1,59            | 2     | -                | 0,81            |
| 832-01         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 1     | -                | -               |
| 1265-02        | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | 16,93           | 0     | -                | 1,51            |
| 785-02         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 2     | -                | -               |
| 416-03         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 1     | -                | -               |
| 497-03         | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 2     | -                | -               |
| 1139-03        | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 1     | -                | -               |
| 1248-03        | Primäres Glioblastom   | 2     | 1                | -               | 2     | -                | -               |
| 1271-03        | Primäres Glioblastom   | 0     | -                | -               | 2     | 2                | -               |

|         |  |   |   |       |   |   |      |
|---------|--|---|---|-------|---|---|------|
| 1290-03 | Primäres Glioblastom   | 0 | - | -     | 1 | - | -    |
| 0002-04 | Primäres Glioblastom   | 0 | - | -     | 0 | - | -    |
| 0154-04 | Primäres Glioblastom   | 0 | - | -     | 2 | - | -    |
| 0264-04 | Primäres Glioblastom   | 0 | - | -     | 1 | - | -    |
| 0374-04 | Primäres Glioblastom   | 0 | - | -     | 2 | - | -    |
| 0458-04 | Primäres Glioblastom   | 0 | - | -     | 2 | - | -    |
| 0547-04 | Primäres Glioblastom   | 0 | - | -     | 0 | - | -    |
| 611-04  | Primäres Glioblastom   | 0 | - | -     | 2 | - | -    |
| 740-04  | Primäres Glioblastom   | 0 | - | -     | 1 | - | -    |
| 896-04  | Primäres Glioblastom   | 0 | - | -     | 2 | - | -    |
| 1235-01 | Primäres Glioblastom   | 0 | - | 9,55  | 0 | - | 2,35 |
| 934-96  | Glioblastom,<br>Langzeitüberleber                            | 0 | - | -     | 2 | - | -    |
| 201-98  | Glioblastom,<br>Langzeitüberleber                            | 0 | - | -     | 0 | - | -    |
| 54-91   | Glioblastom,<br>Langzeitüberleber                            | 0 | - | -     | 0 | - | -    |
| 375-01  | Glioblastom,<br>Langzeitüberleber                            | 0 | - | -     | 0 | - | -    |
| 445-96  | Primäres Glioblastom<br>mit sarkomatöser<br>Komponente       | 0 | - | -     | 0 | - | -    |
| 1340-98 | Primäres Glioblastom<br>mit sarkomatöser<br>Komponente       | 0 | - | -     | 0 | - | -    |
| 644-00  | Primäres Glioblastom<br>mit sarkomatöser<br>Komponente       | 0 | - | -     | 1 | - | -    |
| 689-01  | Primäres Glioblastom<br>mit sarkomatöser<br>Komponente       | 0 | - | -     | 1 | - | -    |
| 1246-02 | Primäres Glioblastom<br>mit sarkomatöser<br>Komponente       | 0 | - | -     | 0 | - | -    |
| 706-02  | Primäres Glioblastom<br>mit oligodendroglialer<br>Komponente | 0 | - | -     | 1 | - | -    |
| 1071-03 | Primäres Glioblastom<br>mit oligodendroglialer<br>Komponente | 0 | 0 | -     | 0 | - | -    |
| 303-89  | Sekundäres Glioblastom                                       | 0 | - | 0,84  | 2 | - | 0,47 |
| 523-92  | Sekundäres Glioblastom                                       | 0 | - | 74,54 | 2 | - | 0,27 |
| H492-94 | Sekundäres Glioblastom                                       | 0 | - | -     | 2 | - | -    |
| 537-94  | Sekundäres Glioblastom                                       | 1 | 1 | 1,48  | 0 | - | 0,9  |
| 18-96   | Sekundäres Glioblastom                                       | 0 | - | 1,31  | - | - | -    |
| 1150-96 | Sekundäres Glioblastom                                       | 0 | 0 | 9,55  | 2 | - | 0,97 |
| 96-98   | Sekundäres Glioblastom                                       | 1 | 1 | 15,05 | 1 | - | 1,85 |
| H542-98 | Sekundäres Glioblastom                                       | 0 | 0 | -     | 0 | - | -    |
| 198-01  | Sekundäres Glioblastom                                       | 1 | 1 | 18,46 | 0 | - | 3,05 |
| 365-02  | Sekundäres Glioblastom                                       | 1 | 1 | -     | 2 | - | -    |
| 143(K)  | Sekundäres Glioblastom                                       | 0 | - | -     | 1 | - | -    |
| 630(K)  | Sekundäres Glioblastom                                       | 0 | - | 0,76  | 2 | - | 0,66 |
| 752(K)  | Sekundäres Glioblastom                                       | 0 | - | -     | 1 | - | -    |
| 505-89  | Riesenzellglioblastom  | 0 | - | -     | 1 | - | -    |
| 862-89  | Riesenzellglioblastom  | 0 | - | -     | 2 | - | -    |
| 76-92   | Riesenzellglioblastom  | 0 | - | -     | 1 | - | -    |



|         |                           |   |   |        |   |   |      |
|---------|---------------------------|---|---|--------|---|---|------|
| 1113-93 | Riesenzellglioblastom     | 0 | 0 | -      | 1 | - | -    |
| 503-96  | Riesenzellglioblastom     | 0 | - | -      | 1 | - | -    |
| 15-88   | Anaplastisches Astrozytom | 0 | - | 1,27   | 0 | - | 0,3  |
| H71-95  | Anaplastisches Astrozytom | 0 | - | 94,67  | 2 | - | 2,94 |
| 1107-97 | Anaplastisches Astrozytom | 0 | - | 0,86   | 2 | - | 1,92 |
| 818-98  | Anaplastisches Astrozytom | 0 | - | 52,34  | 2 | - | 1,88 |
| 1205-99 | Anaplastisches Astrozytom | 0 | - | 187,39 | 2 | - | 2,17 |
| 202-00  | Anaplastisches Astrozytom | 0 | - | -      | 1 | - | -    |
| 811-01  | Anaplastisches Astrozytom | 0 | - | 225,17 | 2 | - | 2,82 |
| 895-96  | Anaplastisches Astrozytom | 0 | - | 5,02   | 2 | - | 0,76 |
| 570-98  | Anaplastisches Astrozytom | 0 | - | 1,17   | 0 | - | 1,5  |
| 1278-94 | Astrozytom                | 0 | - | 10,31  | 0 | - | 1,5  |
| 282-95  | Astrozytom                | 0 | - | 1,76   | 2 | - | 1,83 |
| 1220-95 | Astrozytom                | 0 | - | 1,67   | 2 | - | 1,22 |
| 87-96   | Astrozytom                | 0 | - | 1,52   | 2 | - | 1,5  |
| 1238-96 | Astrozytom                | 0 | - | 1,38   | 0 | - | 2,74 |
| 981-00  | Astrozytom                | 0 | - | 1,28   | 0 | - | 0,96 |
| 1041-01 | Astrozytom                | 0 | - | 3,98   | 0 | - | 1,81 |
| 403-04  | Astrozytom                | 0 | - | 2,75   | 0 | - | 3,07 |
| NB 1    | normal brain              | 0 | 0 | -      | 0 | 0 | -    |
| NB 3    | normal brain              | 0 | 0 | -      | 1 | 1 | -    |

**Tabelle 2: Methylierungsgrad der untersuchten Par-4- und TFPT-Promotorfragmente sowie Par-4- und TFPT-mRNA-Expressionsstatus in primären Gliomen aus dem Gliomkollektiv.** Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Methylierungsanalysen des Par-4- und TFPT-Promotors sowie den mRNA-Expressionsstatus von Par-4 und TFPT in den Proben des Gliomkollektivs. In der linken Spalte sind die Referenznummern der verwendeten Proben aufgelistet, in der Spalte daneben ist die histologische Herkunft der Tumorproben aufgeführt. In der Spalte 3 (Par-4) und Spalte 6 (TFPT) sind die Methylierungsgrade der untersuchten Promotorfragmente zusammengefasst, die durch BS-Sequenzierung ermittelt wurden. Die Spalten 4 (Par-4) und 7 (TFPT) beinhalten die Methylierungsgrade der untersuchten Promotorregion, die durch die COBRA-Analyse bestimmt wurden. Die Zuordnung der Methylierungsgrade ist für beide experimentelle Methoden (BS-Sequenzierung und COBRA) identisch: 0 bedeutet nicht methylierte DNA, 1 repräsentiert schwach methylierte DNA und 2 bedeutet stark methylierte DNA. Die mRNA-Expressionsdaten für Par-4 sind in der Spalte 5, die mRNA-Expressionsdaten für TFPT sind in der Spalte 8 dargestellt. Dabei beziehen sich die angegebenen relativen mRNA-Expressionswerte auf die ermittelte mRNA-Expression von Par-4 bzw. TFPT im Kontrollgewebe, die als 1 festgelegt wurde.

Um zu überprüfen, ob eine DNA-Methylierung des Par-4- oder TFPT-Promotors mit einer schwachen Expression des *par-4*- bzw. *tfpt*-Gens korreliert, wurde die mRNA-Expression von Par-4 und von TFPT mit Hilfe der Real-Time-RT-PCR-Analyse in den Proben des Gliomkollektivs sowie im Kontrollgewebe (Gemisch aus Gesamt-Gehirn, zerebralem Kortex, Frontallappen des Cerebellum, Corpus Callosum, Temporallappen, Okzipitallappen und embryonalem Gehirn, siehe auch 3.1.8) stichprobenartig bestimmt. Die im Kontrollgewebe ermittelte relative mRNA-Expression wurde als 1 festgesetzt und die relative mRNA-

Expression von Par-4 bzw. TFPT aus den Tumorproben des Gliomkollektivs in Bezug zum Kontrollwert berechnet. Diese Analysen wurden freundlicherweise von Dr. Jörg Felsberg (Institut für Neuropathologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) durchgeführt. Der ermittelte relative mRNA-Expressionsstatus von Par-4 und TFPT ist in Tabelle 2 (Spalten 5 und 8) dargestellt. In den primären und sekundären Glioblastomen lagen die ermittelten TFPT-mRNA-Expressionswerte für unmethylierte DNA vorwiegend über dem Wert 1 (881-95, 1265-02, 1235-01, 198-01). Nur die Probe 558-03 und 537-94 lagen mit Werten um 0,9 unter dem Expressionsstatus des Kontrollgewebes. Insgesamt wurden für drei primäre und sekundäre Glioblastomproben (655-01, 126-01, 96-98) mit schwach methyliertem TFPT-Promotor TFPT-mRNA-Expressionsanalysen durchgeführt. Die ermittelten Werte für diese Proben lagen zwischen 1,06 und 1,85. Die relativ zum Kontrollgewebe bestimmte TFPT-mRNA-Expressionswerte in primären oder sekundären Glioblastomproben lagen bei starkem Methylierungsgrad größtenteils unter dem Wert 1 (871-95, 1107-95, 568-01, 303-89, 523-92, 630(K)). Nur in den Proben 409-99 und 1150-96 konnten Werte über 1,8 ermittelt werden. Betrachtet man die mRNA-Expression von TFPT in den anaplastischen Astrozytomen (15-88, H71-95, 1107-97, 818-98, 1205-99, 811-01, 895-96, 570-98) und diffusen Astrozytomen (1278-94, 282-95, 1220-95, 87-96, 1238-96, 981-00, 1041-01, 403-04), so lässt sich keine Korrelation zwischen dem Methylierungsgrad des untersuchten TFPT-Promotorfragments und dem TFPT-mRNA-Expressionsstatus feststellen. Die ermittelten Werte der Par-4-mRNA-Expression zeigten keine Korrelation zum Methylierungsgrad der entsprechenden Gliomproben. Die relativen Par-4-mRNA-Expressionswerte betragen in unmethylierten sekundären Glioblastomproben zwischen 0,76 und 74,54 (303-89, 523-92, 18-96, 1150-96, 630(K)) und in schwach methylierten sekundären Glioblastomproben zwischen 1,48 und 18,46 (198-01, 96-98, 537-94). Die relative Par-4-mRNA-Expression betrug in unmethylierten primären Glioblastomen 1,03–16,93 (871-95, 881-95, 1107-95, 558-03, 409-99, 126-01, 1265-02, 1235-01), in unmethylierten anaplastischen Astrozytomen 0,86–225,17 (15-88, H71-95, 1107-97, 818-98, 1205-99, 811-01, 895-96, 570-98) und in unmethylierten Astrozytomen 1,28–10,31 (1278-94, 282-95, 1220-95, 87-96, 1238-96, 981-00, 1041-01, 403-04). Abschließend zeigen die Ergebnisse dieser Experimente, dass die untersuchte Region des TFPT-Promotors in 50 % der sekundären Glioblastome sowie in 37 % aller primären Glioblastome eine starke Methylierung aufweist. Dabei stimmten die Methylierungsgrade größtenteils sehr gut mit dem ermittelten TFPT-mRNA-Expressionsstatus in der jeweiligen Tumorprobe überein. Auch in den Astrozytomen (38 %) und anaplastischen Astrozytomen (67 %) wurde eine starke DNA-Methylierung des TFPT-Promotors nachgewiesen, die

ermittelte TFPT-mRNA-Expression korrelierte hier jedoch nicht mit den entsprechenden Methylierungsgraden. Im Gegensatz dazu war der untersuchte Bereich des Par-4-Promotors nur in wenigen primären (5 %), jedoch in 31 % der sekundären Glioblastome schwach methyliert. Eine Korrelation zwischen dem Methylierungsgrad und dem Par-4-mRNA-Expressionsstatus war jedoch nicht nachweisbar. Eine Methylierung des Par-4-Promotors in den Astrozytom- und Anaplastischen Astrozytom-Proben konnte nicht detektiert werden.

#### **4.5.3.3 Methylierungsstatus des Par-4-Promotors in humanem Prostatakarzinomgewebe**

Par-4 ist ein Tumorsuppressor-Protein, das eine wichtige Rolle bei der Proliferationskontrolle der hormonabhängigen Gewebe Endometrium und Prostata spielt. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die homozygote Deletion des *par-4*-Gens zu einer geringeren Lebensspanne der Tiere im Gegensatz zu Kontrolltieren aufgrund erhöhter Tumorbildung führt (Garcia-Cao *et al.*, 2005). Des Weiteren zeigen Untersuchungen, dass die Par-4-Expression sehr häufig in primärem Prostatakarzinomgewebe herunterreguliert ist (Chakraborty *et al.*, 2001). Daher sollte als nächstes untersucht werden, ob der Par-4-Promotor in humanem Prostatagewebe methyliert ist und dadurch die Par-4-Expression herunterreguliert wird. Für die Analysen wurden uns freundlicherweise Proben genomischer DNA aus primärem Prostatakarzinom-Gewebe (PCA) verschiedener Patienten von Prof. Büttner (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle für diese Untersuchung wurde genomische DNA aus Blutzellen (REF) verwendet, da in diesen DNA-Proben äußerst selten veränderte Methylierungsmuster zu finden sind. Als interne Kontrolle wurden genomische DNA-Proben aus benignen Hyperplasien der Prostata (BPH) analysiert. Für die Untersuchung der Proben wurde die genomische DNA einer BS-Behandlung unterzogen und anschließend als Matrize in einer BS-PCR mit den Oligonukleotiden *PAR4-bs-fl* und *PAR4-bs-rl* eingesetzt, in der ein 222 bp langes DNA-Fragment des Par-4-Promotors amplifiziert wurde. Das DNA-Fragment wurde für die weitere Analyse in den Vektor pCR 2.1-TOPO kloniert und anschließend in Bakterien transformiert. In einer Klon-PCR wurden mindestens fünf unabhängige Bakterienklone je Gewebeprobe eingesetzt und die amplifizierten PCR-Produkte sequenziert. Die BS-DNA-Sequenzen wurden mit dem Computerprogramm *BiQ-Analyzer* ausgewertet. Die Zuordnung der Methylierungsgrade der BS-Sequenzanalysen wurde wie bereits in Abschnitt 4.5.3.1 beschrieben vorgenommen. Die Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Analyse ist in der Tabelle 3 dargestellt. Die Ergebnisse des Versuchs zeigen, dass weder in den PCA-Proben,

noch in den BPH-Proben oder in den REF-Proben eine DNA-Methylierung im Bereich des amplifizierten Par-4-Promotorfragments detektiert werden konnte.

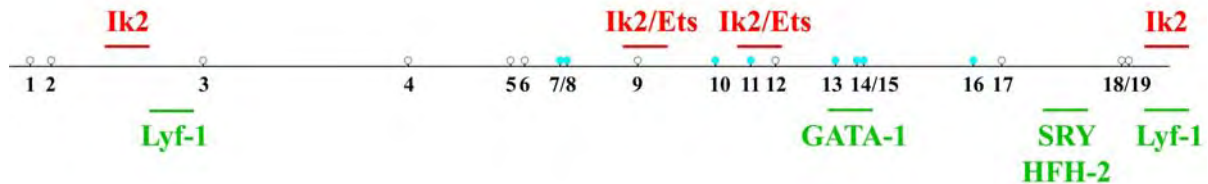
| Gewebeprobe | Histologische Herkunft | BS-Sequenzierung |
|-------------|------------------------|------------------|
| REF 2       | Blut                   | 0                |
| REF 8       | Blut                   | 0                |
| REF 12      | Blut                   | 0                |
| BPH 7       | benigne Hyperplasie    | 0                |
| BPH 10      | benigne Hyperplasie    | 0                |
| BPH 14      | benigne Hyperplasie    | 0                |
| BPH 15      | benigne Hyperplasie    | 0                |
| PCA 3       | Prostatakarzinom       | 0                |
| PCA 8       | Prostatakarzinom       | 0                |
| PCA 11      | Prostatakarzinom       | 0                |
| PCA 12      | Prostatakarzinom       | 0                |
| PCA 45      | Prostatakarzinom       | 0                |

**Tabelle 3: Zusammenfassung der BS-Sequenzierungsergebnisse der Par-4 Promotoranalysen aus primärem Prostatakarzinomgewebe.** Die Tabelle zeigt die durch BS-Sequenzierung ermittelten Methylierungsgrade des in einer BS-PCR amplifizierten Par-4-Promotorfragments aus primärem Prostatakarzinomgewebe (PCA) sowie aus Kontrollgewebe (benigne Prostatahyperplasien, BPH) und aus Blutzellen (REF). Ganz links sind die Proben aufgelistet, in der nächsten Spalte ist ihre histologische Herkunft angegeben. In der rechten Spalte sind die ermittelten Methylierungsgrade des Par-4-Promotorfragments zusammengefasst. Der Wert 0 repräsentiert nicht methylierte DNA.

#### 4.5.4 Computergestützte Promotoranalyse des *tfpt*-Gens

Die vorangegangenen Ergebnisse des TFPT-Promotors zeigten, dass das untersuchte DNA-Fragment in Tumorzelllinien (4.5.3.1) sowie in Gliomgewebe von Patienten (4.5.3.2) eine starke DNA-Methylierung aufweist. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von Tumorzelllinien des zentralen Nervensystems mit dem Demethylierungsreagenz 5-Aza-2'-deoxycytidin die Expression des TFPT-Transkripts in den meisten Fällen deutlich erhöhen kann (4.5.2). Des Weiteren konnte in den meisten primären und sekundären Glioblastomgeweben eine Korrelation zwischen starker DNA-Methylierung des TFPT-Promotors sowie einem geringen TFPT-mRNA-Expressionsstatus nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression des *tfpt*-Gens in den untersuchten Proben durch Hypermethylierung des Promotors inhibiert wird. Vergleicht man das Sequenzierungsergebnis eines schwach und eines stark methylierten primären Glioblastoms (siehe Abb. 27 B, b und c) mit nicht methyliertem Kontrollgewebe (siehe Abb. 27 B, a), so können spezifische CpG-Dinukleotidpositionen innerhalb des untersuchten TFPT-Promotorbereichs identifiziert werden, die besonders häufig methyliert sind (schematisch dargestellt in Abb. 28, blaue Kreise, CpG-Dinukleotide 7/8, 10, 11, 13, 14/15, 16). Daher sollte analysiert werden, ob sich in diesem Promotorbereich potentielle Bindungsmotive von Transkriptionsfaktoren befinden, deren Aktivität durch die Methylierung beeinflusst werden

kann. Zu diesem Zweck wurde eine computergestützte Analyse des untersuchten TFPT-Promotorfragments mit Hilfe des *TFSEARCH ver 1.3*-Programms durchgeführt sowie die bereits von der Arbeitsgruppe Privitera veröffentlichten Ergebnisse der Promotoranalyse des *tfpt*-Gens (Brambillasca *et al.*, 2001) mit einbezogen. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 28 schematisch dargestellt.



**Abb. 28: Potentielle Bindungsmotive von Transkriptionsfaktoren im untersuchten TFPT-Promotorbereich.** Das in den Methylierungsanalysen untersuchte Promotorfragment von TFPT ist als Linie dargestellt. CpG-Dinukleotide sind als Kreise dargestellt. Blau gefüllte Kreise stellen CpG-Dinukleotide dar, die nach den Sequenzanalysen (siehe Abb. 27 B a-c) in primären Glioblastomen im Vergleich zum Kontrollgewebe besonders häufig methyliert sind. Über dem schematisch dargestellten TFPT-Promotorbereich sind in rot die potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive aus der Analyse von Brambillasca *et al.* (2001) eingezeichnet, darunter in grün die potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive aus der Sequenzanalyse mit Hilfe des *TFSEARCH ver 1.3* Computerprogramms. Die CpG-Dinukleotide sind zur Übersicht nummeriert.

In der Promotoranalyse, die von Brambillasca *et al.* (2001) durchgeführt wurden, werden für den untersuchten Promotorbereich von TFPT Bindungsmotive für die Transkriptionsfaktoren Ik2 (*Ikaros 2*) und Ets (*epithelium specific transcription factor*) beschrieben (Abb. 28., rot). Die Analyse des TFPT-Promotorbereichs mit dem Programm *TFSEARCH ver 1.3* hat darüber hinaus potentielle Bindungsmotive für die Transkriptionsfaktoren Lyf-1 (*lymphoid transcription factor 1*), GATA-1, SRY (*sex-determining region Y protein*) und HFH-2 (Abb. 28, grün) identifiziert. Die schematische Darstellung in Abb. 28 zeigt, dass zwei der drei potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive für Ik2/Ets und GATA-1 mit den häufig methylierten CpG-Dinukleotiden 11, 13 und 14/15 (Abb. 28, blaue Kreise) im TFPT-Promotorfragment übereinstimmen. Die anderen Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive liegen in Regionen des TFPT-Promotors, die nicht mit den häufig von DNA-Methylierung betroffenen CpG-Dinukleotiden (Abb. 28, blaue Kreise) korrelieren.

#### 4.6 DAS THIOREDOXIN-ÄHNLICHE PROTEIN EFP1, EIN NEUER INTERAKTIONSPARTNER VON PAR-4

Das EFP1-Protein wurde in unserer Arbeitsgruppe bei der Suche nach neuen Interaktionspartnern des Par-4-Proteins in einem Hefe-Zwei-Hybrid System identifiziert (Dissertation Boosen, 2007). Nachdem die vollständige cDNA-Sequenz von EFP1 aus der Ratte kloniert worden war (Diplomarbeit Maertens, 2003; Diplomarbeit Koplín, 2004), wurden von Ansgar Koplín erste Funktionsanalysen durchgeführt. Anhand von fluoreszenz-

mikroskopischen Analysen wurde eine Lokalisation des EFP1-Proteins im ER detektiert. Weiterhin konnte mit Hilfe eines Insulin-Disulfid-Reduktionstests eine schwache enzymatische Reduktase-Aktivität für das EFP1-Protein nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte das EFP1-Protein näher charakterisiert und ein möglicher Einfluss des EFP1-Proteins auf die Par-4-vermittelte Apoptose analysiert werden.

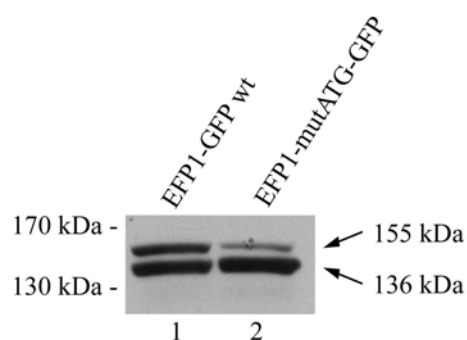
#### **4.6.1 Charakterisierung der zwei EFP1-Proteinvarianten mit unterschiedlichem Molekulargewicht**

Nach der Expression des EFP1-GFP-Fusionsproteins in eukaryontischen Zellen und anschließender Western Blot-Analyse mit dem monoklonalen anti-GFP-Antikörper konnten zwei EFP1-GFP-Fusionsproteine mit unterschiedlichen apparenten Molekulargewichten von 136 kDa und 155 kDa detektiert werden. Auch nach der ektopischen Expression von FLAG-EFP1 in Säugerzellen und anschließender Färbung der FLAG-Fusionsproteine mit einem anti-FLAG-Antikörper im Western Blot konnten zwei EFP1-Varianten mit unterschiedlichen apparenten Molekulargewichten von 115 kDa und 128 kDa nachgewiesen werden. Anhand von verschiedenen experimentellen Ansätzen sollten nun die zwei EFP1-Proteinvarianten analysiert werden. Aufgrund computergestützter Sequenzanalysen war bekannt, dass die EFP1-cDNA zwei potentielle Translations-Initiationsstellen beinhaltet, die von den im 5'-Bereich gelegenen potentiellen Startcodons ATG<sub>1-3</sub> sowie ATG<sub>160-162</sub> gebildet werden (Diplomarbeit Koplín, 2004). Deshalb sollte zunächst untersucht werden, ob bei der Translation des EFP1-Proteins beide Startcodons benutzt und deshalb zwei EFP1-Proteinvarianten mit unterschiedlichen Molekulargewichten in den Zellen exprimiert werden. Des Weiteren wurde anhand von Proteinsequenz-Analysen vorhergesagt, dass insgesamt acht der im EFP1-Protein vorliegenden Asparagin-Reste im ER potentiell N-glykosyliert werden könnten (Diplomarbeit Koplín, 2004). Daher sollte auch experimentell überprüft werden, ob das EFP1-Protein, das nach ektopischer Expression im ER lokalisiert ist, durch N-Glykosylierung kotranslational modifiziert wird.

##### **4.6.1.1 Untersuchung der potentiellen alternativen Startcodons von EFP1**

Als erstes sollte untersucht werden, ob bei der Translation des ektopisch exprimierten EFP1-GFP-Fusionsproteins alternative Startcodons (ATG<sub>1-3</sub> bzw. ATG<sub>160-162</sub>) genutzt und deshalb zwei EFP1-Proteinvarianten unterschiedlichen Molekulargewichts in den Zellen exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Expressionsplasmid generiert, in dem das putative zweite Startcodon ATG<sub>160-162</sub> in der EFP1-cDNA-Sequenz mittels PCR-Mutagenese

zu AGT<sub>160-162</sub> mutiert wurde und somit ein AS-Austausch im EFP1-Protein von Methionin<sub>54</sub> zu Serin<sub>54</sub> erfolgt. Im ersten Schritt der PCR-Mutagenese wurde mit den Oligonukleotiden 5' *K53NT/Hind* und 3' *K53mutATG* sowie 5' *K53mutATG* und 3' *Klon53hScaI* zwei EFP1-Fragmente amplifiziert, in denen das ATG<sub>160-162</sub> zu AGT<sub>160-162</sub> mutiert wurde. Im zweiten Schritt wurden die zwei mutierten, amplifizierten PCR-Fragmente in einer so genannten „Assembly-PCR“ unter Verwendung der flankierenden Oligonukleotide 5' *K53NT/Hind* und *Klon53hScaI* zusammengefügt, wodurch ein 684 bp langes EFP1-mutATG-Fragment amplifiziert wurde. Das EFP1-mutATG-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *ScaI* geschnitten und über einen Kassettenaustausch in den pEGFP-N1-EFP1-Vektor eingefügt. Das hergestellte Plasmidkonstrukt wurde als pEGFP-N1-EFP1-mutATG bezeichnet und die Mutation des ATG<sub>160-162</sub> zu AGT<sub>160-162</sub> durch Sequenzierung verifiziert.



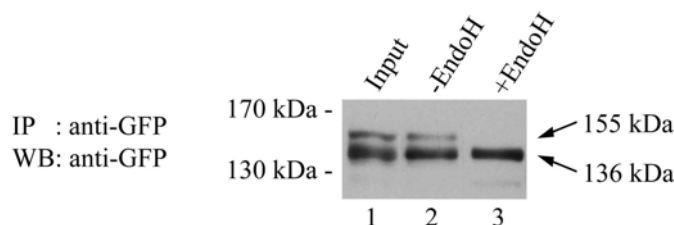
**Abb. 29: Expression von EFP1-GFP wt und EFP1-mutATG-GFP in CHO-Zellen.** CHO-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für EFP1-GFP wt oder für EFP1-mutATG-GFP transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und 50 µg der Gesamtprotein-Zellextrakte durch die Western Blot-Technik analysiert. Der immunologische Nachweis der Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe des monoklonalen anti-GFP-Antikörpers.

CHO-Zellen wurden mit EFP1-GFP wt und EFP1-mutATG-GFP transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden Gesamtprotein-Zellextrakte hergestellt und in einer 7,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Western Blot-Membran. Die Fusionsproteine EFP1-GFP wt bzw. EFP1-mutATG-GFP wurden immunologisch mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper detektiert. Wie in Abb. 29 zu erkennen ist, konnten nach der Expression von EFP1-GFP wt sowohl die 136 kDa große (Abb. 29, Spur 1 unten) wie auch die 155 kDa große (Abb. 29, Spur 1 oben) EFP1-GFP-Proteinvariante in den Zellen nachgewiesen werden. Die Zellen, die mit EFP1-mutATG-GFP transfiziert wurden, exprimierten ebenfalls die 136 kDa große EFP1-GFP-Proteinvariante (Abb. 29, Spur 2 unten) sowie die 155 kDa große EFP1-GFP-Proteinvariante (Abb. 29, Spur 2 oben). Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass die zwei EFP1-Proteinvarianten nicht durch die Nutzung alternativer Startcodons in der EFP1-cDNA generiert werden.

#### 4.6.1.2 Untersuchung des N-Glykosylierungsstatus des EFP1-Proteins

Da anhand der vorangegangenen Studie die Nutzung alternativer Startcodons bei der Translation des EFP1-Proteins ausgeschlossen werden konnte, sollte nun überprüft werden,

ob das ER-ständige EFP1-Protein nach ektopischer Expression in Säugerzellen durch N-Glykosylierung modifiziert wird. Zu diesem Zweck sollten die EFP1-GFP-Proteinvarianten mit der Endoglykosidase H (EndoH) behandelt werden. Die EndoH kann mannosereiche N-Glykane von Proteinen abspalten, die kotranslational im Lumen des ER an die NH<sub>2</sub>-Gruppen von Asparagin-AS-Resten der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr angehängt werden (Übersicht bei Kornfeld & Kornfeld, 1985). Um der Fragestellung der N-Glykosylierung nachzugehen, wurde das EFP1-GFP-Fusionsprotein in HeLa-Zellen exprimiert und 24 h nach der Transfektion Gesamtprotein-Zellextrakte hergestellt. Das EFP1-GFP-Fusionsprotein wurde aus den Gesamtprotein-Zellextrakten mit einem polyklonalen anti-GFP-Antikörper immunpräzipitiert und anschließend mit der EndoH behandelt. Als Kontrolle wurde eine Fraktion des präzipitierten EFP1-GFP-Fusionsproteins nur mit Puffer versetzt und ohne EndoH unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen inkubiert. Als Größenstandard wurden 50 µg des Gesamtprotein-Zellextrakts (Input) eingesetzt. Die mit EndoH bzw. nicht mit EndoH behandelten, präzipitierten Proteine sowie der Input wurden in einer 7,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die immunologische Detektion der Proteine erfolgte im Western Blot mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper.



**Abb. 30: Das EFP1-Protein wird in der Zelle durch N-Glykosylierung modifiziert.** HeLa-Zellen wurden mit EFP1-GFP transfiziert und 24 h nach der Transfektion lysiert. 50 µg des Gesamtprotein-Zellextrakts wurden für den Input aufgehoben, der Rest wurde für eine Immunpräzipitation mit einem polyklonalen anti-GFP-Antikörper eingesetzt. Das präzipitierte EFP1-GFP-Fusionsprotein wurde entweder mit der Endoglykosidase H (+EndoH) oder als Kontrolle nur mit Puffer (-EndoH) inkubiert. Dann wurden die Proteine in einer 7,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Western Blot-Membran transferiert. Die immunologische Detektion des EFP1-GFP-Fusionsproteins erfolgte mit einem monoklonalen anti-GFP-Antikörper.

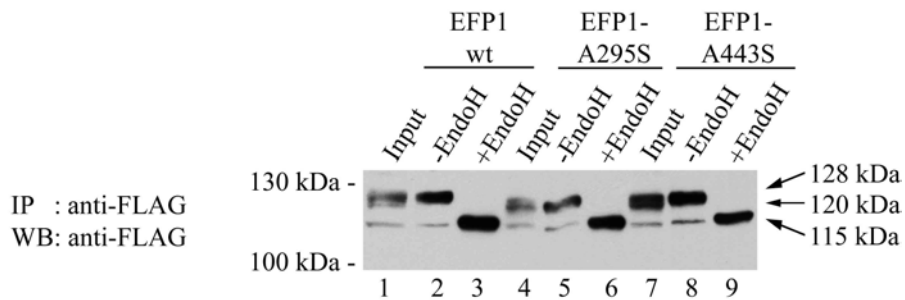
Wie in Abb. 30 zu sehen ist, waren beide EFP1-GFP-Proteinvarianten mit einem apparenten Molekulargewicht von 136 kDa (Abb. 30 unten) und von 155 kDa (Abb. 30 oben) sowohl im Input (Abb. 30 Spur 1) wie auch in der Kontrollprobe ohne EndoH-Behandlung (Abb. 30 Spur 2) nachweisbar. Nach der Behandlung des präzipitierten EFP1-GFP-Fusionsproteins mit der EndoH konnte nur noch die 136 kDa große EFP1-Proteinvariante detektiert werden (Abb. 30 Spur 3). Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass das ER-ständige EFP1-GFP-Protein nach ektopischer Expression in HeLa-Zellen durch N-Glykosylierung modifiziert wird. Die EFP1-



GFP-Proteinvariante mit einem apparenten Molekulargewicht von 136 kDa repräsentiert das unglykosylierte EFP1-GFP-Protein, wobei es sich bei der 155 kDa großen EFP1-GFP-Proteinvariante um das N-glykosylierte EFP1-GFP-Protein handelt.

Um die N-Glykosylierungsstellen im EFP1-Protein identifizieren zu können, wurde zunächst eine Analyse der Proteinsequenz von EFP1 mit dem Programm *NetNGlyc* durchgeführt. Dabei wurden für die AS Asparagin<sub>13</sub>, Asparagin<sub>295</sub> und Asparagin<sub>443</sub> die höchsten Wahrscheinlichkeiten einer N-Glykosylierungsstelle mit dem Konsensusmotiv Asn-X-Ser/Thr vorhergesagt. Da nur die AS Asparagin<sub>295</sub> und Asparagin<sub>443</sub>, nicht aber die AS Asparagin<sub>13</sub>, in den Spezies Ratte, Maus und Mensch konserviert sind (Vergleich der Proteinsequenzen siehe Anhang B), wurden im Folgenden nur die AS Asparagin<sub>295</sub> und Asparagin<sub>443</sub> als potentielle N-Glykosylierungsstellen in Betracht gezogen. Um zu überprüfen, ob diese AS im EFP1-Protein N-glykosyliert werden, wurden FLAG-EFP1-Mutanten durch PCR-Mutagenese hergestellt, in denen die AS Asparagin<sub>295</sub> oder Asparagin<sub>443</sub> zu Serin mutiert waren (Yusa *et al.*, 2006). Für die Amplifikation der ersten zwei DNA-Fragmente zur Herstellung der EFP1-Mutante EFP1-A295S, in der die Basenfolge AAC<sub>883-885</sub> zu TCC<sub>883-885</sub> und so die AS Asparagin<sub>295</sub> zu Serin<sub>295</sub> mutiert wurde, wurden die Oligonukleotide 5' *EFP1 ScaI* und 3' *EFP1 Asn295Ser* sowie 5' *EFP1 Asn295Ser* und 3' *EFP1 XbaI* verwendet. Die zwei generierten PCR-Fragmente wurden im zweiten Schritt mit Hilfe einer „Assembly-PCR“ mit den flankierenden Oligonukleotiden 5' *EFP1 ScaI* und 3' *EFP1 XbaI* zusammengefügt und das amplifizierte EFP1-Fragment nach Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *ScaI* und *XbaI* über einen Kassettenaustausch in den Vektor pCMV-Tag2B-EFP1 kloniert. Das hergestellte Plasmidkonstrukt wurde als pCMV-Tag2B-EFP1-A295S bezeichnet. Entsprechend wurde die AS Asparagin<sub>443</sub> im EFP1-Protein zu der AS Serin<sub>443</sub> mutiert. Die Mutagenese-PCR, in der die Basenfolge AAC<sub>1327-1329</sub> zu TCC<sub>1327-1329</sub> mutiert wurde, wurde mit den Oligonukleotiden 5' *EFP1 ScaI* und 3' *EFP1 Asn443Ser* sowie 5' *EFP1 Asn443Ser* und 3' *EFP1 XbaI* durchgeführt. Das in der nachfolgenden „Assembly-PCR“ (mit den Oligonukleotiden 5' *EFP1 ScaI* und 3' *EFP1 XbaI*) zusammengefügte PCR-Produkt wurde nun ebenfalls über einen Kassettenaustausch mit den Restriktionsendonukleasen *ScaI* und *XbaI* in den Vektor pCMV-Tag2B-EFP1 kloniert. Das generierte Plasmid wurde als pCMV-Tag2B-EFP1-A443S bezeichnet. Beide hergestellten Plasmidkonstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. Die Expressionsplasmide für die Fusionsproteine FLAG-EFP1 wt, FLAG-EFP1-A295S und FLAG-EFP1-A443S wurden nun in HeLa-Zellen transfiziert und die Zellen 24 h nach der Transfektion lysiert. Der Gesamtprotein-Zellextrakt wurde einer Immunpräzipitation mit dem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper unterzogen. Die

präzipitierten FLAG-Fusionsproteine wurden entweder mit der EndoH oder als Kontrolle ohne EndoH, aber unter sonst gleichen Bedingungen inkubiert. Der Input, der 50 µg des Gesamtzellextrakts betrug, wurde als Größenstandard zusammen mit den präzipitierten EndoH-behandelten bzw. nicht EndoH-behandelten FLAG-Fusionsproteinen in einer 7,5 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe der Western Blot-Technik untersucht. Die immunologische Detektion der Fusionsproteine erfolgte mittels monoklonalem anti-FLAG-Antikörper.



**Abb. 31: EndoH-Behandlung der Proteine FLAG-EFP1 wt, FLAG-EFP1-A295S und FLAG-EFP1-A443S.** HeLa-Zellen wurden mit FLAG-EFP1 wt, FLAG-EFP1-A295S oder FLAG-EFP1-A443S transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden Gesamtprotein-Zellextrakte hergestellt und in einer Immunpräzipitation mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper eingesetzt. Die präzipitierten Fusionsproteine wurden entweder mit der Endoglykosidase H (+EndoH) oder als Kontrolle nur mit Puffer (-EndoH) inkubiert. In einer 7,5 %-igen SDS-PAGE wurden die präzipitierten Proteine und der Input (50 µg Gesamtzellextrakt) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die immunologische Detektion der FLAG-EFP1-Fusionsproteine erfolgte mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper.

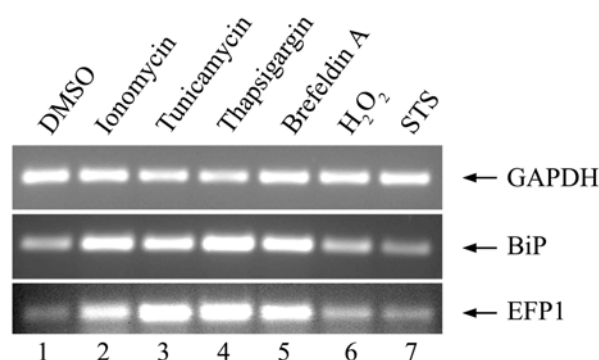
In der Abb. 31 sieht man, dass die FLAG-EFP1-Proteinvariante mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 115 kDa sowohl nach der Expression von FLAG-EFP1 wt (Abb. 31 unten, Spur 1, 2, 3) wie auch nach der Expression der zwei EFP1-Mutanten FLAG-EFP1-A295S (Abb. 31 unten, Spur 4, 5, 6) und FLAG-EFP1-A443S (Abb. 31 unten, Spur 7, 8, 9) detektiert werden konnte. In den Zellen, die als Kontrolle mit FLAG-EFP1 wt transfiziert wurden, konnte zusätzlich zu der ca. 115 kDa großen Proteinbande noch eine EFP1-Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 128 kDa nachgewiesen werden (Abb. 31 oben, Spur 1 und 2). In den Zellen, die mit den EFP1-Mutanten FLAG-EFP1-A295S (Abb. 31 oben, Spur 4 und 5) und FLAG-EFP1-A443S (Abb. 31 oben, Spur 7 und 8) transfiziert wurden, konnte zusätzlich zu der ca. 115 kDa großen Proteinbande noch eine EFP1-Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 120 kDa nachgewiesen werden. Nach der Behandlung des präzipitierten FLAG-EFP1 wt-Fusionsproteins mit der EndoH konnte die Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 128 kDa nicht mehr detektiert werden (Abb. 31, Spur 3). Nach der EndoH-Behandlung der präzipitierten Fusionsproteine FLAG-EFP1-A295S (Abb. 31, Spur 6) und FLAG-EFP1-A443S (Abb. 31, Spur 9) konnte nur noch eine Proteinbande mit einem apparenten

Molekulargewicht von ca. 115 kDa nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl das FLAG-EFP1 wt-Protein wie auch die Proteine FLAG-EFP1-A295S und FLAG-EFP1-A443S durch N-Glykosylierung in der Zelle modifiziert werden, da ausschließlich die nicht N-glykosylierte FLAG-EFP1-Proteinbande von ca. 115 kDa sowohl bei FLAG-EFP1 wt als auch bei den Mutanten FLAG-EFP1-A295S und FLAG-EFP1-A443S nach der EndoH-Behandlung zu finden ist. Dass das N-glykosylierte FLAG-EFP1-A295S- bzw. das FLAG-EFP1-A443S-Protein nur ein apparentes Molekulargewicht von 120 kDa im Vergleich zum N-glykosylierten 128 kDa großen FLAG-EFP1 wt-Protein aufweist, deutet darauf hin, dass beide untersuchten Asparaginreste (Asparagin<sub>295</sub> und Asparagin<sub>443</sub>) des EFP1-Proteins in der Zelle durch N-Glykosylierung modifiziert werden. Weitere N-Glykosylierungsstellen im EFP1-Protein können durch dieses Experiment jedoch nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.6.2 Untersuchung der EFP1-mRNA-Expression nach der Induktion von ER-Stress

Anhand von Sequenzanalysen mit dem Computerprogramm *PredictProtein* konnte gezeigt werden, dass das EFP1-Protein eine hohe Sequenzidentität zu Mitgliedern der PDI (*protein disulfide isomerase*)-Familie aufweist (siehe 5.3.1 und Sequenzanalyse im Anhang B). PDI-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Beseitigung missgefalteter Proteine im ER und werden wie viele andere Chaperone des ERs nach der Induktion von ER-Stress hochreguliert (Übersicht bei Kaufman, 1999). Die Homologie von EFP1 zu PDI-Proteinen sowie die Lokalisation des EFP1-Proteins im ER (Diplomarbeit Koplín, 2004; Wang *et al.*, 2006) lassen vermuten, dass auch EFP1 eine wichtige Funktion bei der Protektion der Zelle nach ER-Stress ausüben kann. Um diese Vermutung zu stützen, sollte überprüft werden, ob die EFP1-Expression durch ER-Stress induziert werden kann. Zu diesem Zweck wurden NIH-3T3 Zellen mit den ER-Stress auslösenden Reagenzien Ionomycin (24 h, 10 µM), Tunicamycin (24 h, 3 µM), Thapsigargin (24 h, 4 µM) und Brefeldin A (24 h, 37,5 µM) behandelt. Das Antibiotikum Brefeldin A ist ein Metabolit aus dem Pilz *Eupenicillium brefeldianum* und wird strukturell den makrozyklischen Laktonen zugeordnet. Das Antibiotikum hemmt den Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat und verursacht eine Auflösung der Golgi-Strukturen (Fujiwara *et al.*, 1988) durch die Inhibition von GEPs (*guanin nucleotide exchange proteins*), die wiederum ARF1 (*ADP-ribosylation-factor*) durch einen Austausch von GDP zu GTP aktivieren. ARF-Proteine regulieren unter anderem den Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat und sind deswegen für die Produktion sekretorischer Proteine essentiell (Yamaji *et al.*, 2000). Da die sekretorischen Proteine nach einer Behandlung der Zellen mit

Brefeldin A nicht mehr in den Golgi-Apparat weiter transportiert werden können, akkumulieren diese Proteine im ER-Lumen und es kommt dadurch zur Induktion von ER-Stress (Lamkanfi *et al.*, 2004). Die Reagenzien H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (16 h, 1 mM) und STS (16 h, 10 nM) wurden verwendet, um eine ER-Stress unabhängige Apoptose in den Zellen auszulösen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit DMSO (24 h, 0,72 %) behandelt. Nach der Behandlung der NIH-3T3-Zellen wurde die Gesamt-RNA mit TRIzol isoliert und mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Untersuchung der endogenen EFP1-mRNA-Expression erfolgte durch semiquantitative RT-PCR-Analyse, in der ein 218 bp langen EFP1-DNA-Fragments mit den Oligonukleotiden 5'Klon53Q2 und 3'Klon53Q2 amplifiziert wurde. Als Mengenabgleich wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden *ratGAPDH-for* und *ratGAPDH-rev* durchgeführt, wobei ein DNA-Fragment von 309 bp des Haushaltsgens GAPDH amplifiziert wurde. Die Analyse der BiP-mRNA-Expression diente in diesem Experiment als Positivkontrolle, da bereits gezeigt werden konnte, dass die BiP-Expression durch ER-Stress in der Zelle induziert werden kann (Rao *et al.*, 2002). Die Amplifikation eines 231 bp langen DNA-Fragments wurde mit den BiP-spezifischen Oligonukleotiden *BiP-FORMO/HU* und *BiP-REVRAT/MO* durchgeführt.



**Abb. 32: mRNA-Expression von EFP1 nach Induktion von ER-Stress.** NIH-3T3 Zellen wurden mit folgenden Reagenzien behandelt: 0,72 % DMSO 24 h, 10 µM Ionomycin 24 h, 3 µM Tunicamycin 24 h, 4 µM Thapsigargin 24 h, 37,5 µM Brefeldin A 24 h, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 16 h, 10 nM STS 16 h. Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Präparation der Gesamt-RNA mit TRIzol. 2,5 µg Gesamt-RNA wurden mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und einer semiquantitativen RT-PCR-Analyse mit EFP1-spezifischen, BiP-spezifischen sowie GAPDH-spezifischen Oligonukleotiden unterzogen. Für die Amplifikation von EFP1 wurde eine PCR mit 25 Zyklen, für die Amplifikation von BiP und GAPDH eine PCR mit 22 Zyklen durchgeführt. Die Produktgrößen der amplifizierten DNA-Fragmente betragen: EFP1 218 bp, BiP 231 bp, GAPDH 309 bp.

Die Abb. 32 zeigt, dass sich die EFP1-mRNA-Expression durch alle vier ER-Stress auslösenden Reagenzien Ionomycin (Abb. 32 unten, Spur 2), Tunicamycin (Abb. 32 unten, Spur 3), Thapsigargin (Abb. 32 unten, Spur 4) und Brefeldin A (Abb. 32 unten, Spur 5) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 32 unten, Spur 1) induzieren ließ. Weder nach oxidativem Stress durch Behandlung der Zellen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 32 unten, Spur 6) noch nach

Apoptose-Induktion durch den Breitband-Kinaseinhibitor STS (Abb. 32 unten, Spur 7) konnte die EFP1-Transkription induziert werden. Die verstärkte Expression des BiP-Transkripts nach der Behandlung mit Ionomycin (Abb. 32 Mitte, Spur 2), Tunicamycin (Abb. 32 Mitte, Spur 3), Thapsigargin (Abb. 32 Mitte, Spur 4) und Brefeldin A (Abb. 32 Mitte, Spur 5) zeigt, dass der gewählte experimentelle Ansatz funktionell war, da ER-Stress in den NIH-3T3-Zellen durch die Reagenzien Ionomycin, Thapsigargin, Tunicamycin und Brefeldin A ausgelöst wurde. Der Mengenabgleich mit GAPDH verdeutlicht, dass in den verwendeten Proben vergleichbare mRNA-Konzentrationen vorlagen (Abb. 32, oben). Mit diesem experimentellen Ansatz konnte gezeigt werden, dass die Expression des EFP1-Transkripts nach Auslösung von ER-Stress in der Zelle induziert werden kann.

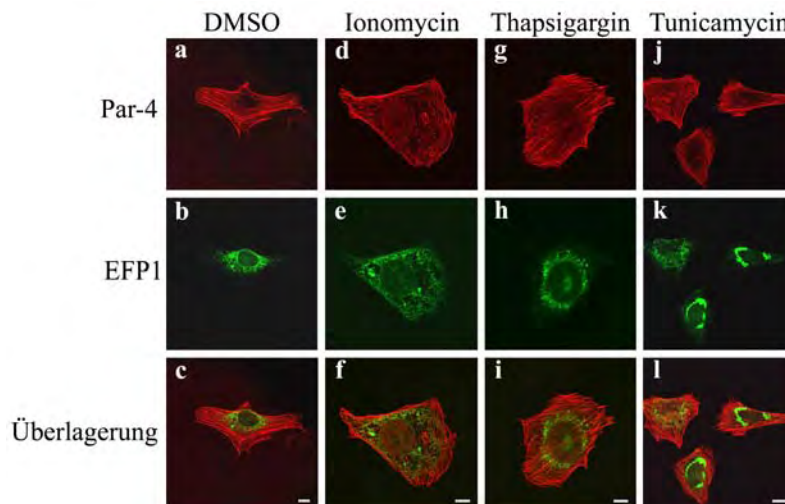
### **4.6.3 Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Par-4 und EFP1**

In den bisherigen Untersuchungen, die im Rahmen der Diplomarbeit von Ansgar Koplín (2004) durchgeführt wurde, konnte anhand immunfluoreszenzmikroskopischer Analysen keine Kolokalisation der ektopisch exprimierten Proteine Par-4 und EFP1 in Säugerzellen nachgewiesen werden. Das pro-apoptotische Protein Par-4 kolokalisiert nach der Koexpression mit EFP1 an den Spannungsfasern des Aktin-Zytoskeletts, während das EFP1-Protein in den transfizierten Zellen nur im ER detektiert werden kann. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die EFP1-Expression durch die Induktion von ER-Stress induziert werden kann (4.6.2). Daher sollten Säugerzellen in den folgenden Experimenten mit verschiedenen ER-Stress auslösenden Reagenzien behandelt und anhand immunfluoreszenzmikroskopischer Analysen eine möglicherweise induzierte Kolokalisation von Par-4 und EFP1 untersucht werden. Weiterhin sollte die subzelluläre Lokalisation des Par-4- und des EFP1-Proteins in apoptotischen Zellen analysiert werden.

#### **4.6.3.1 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von Par-4 und EFP1 nach der Induktion von ER-Stress**

Um die subzelluläre Lokalisation von Par-4 und EFP1 nach ER-Stress zu untersuchen, wurden CHO-Zellen mit den Expressionsplasmiden für FLAG-Par-4 und EFP1-GFP kotransfiziert und die Zellen 24 h nach der Transfektion mit den ER-Stress auslösenden Reagenzien Ionomycin (10  $\mu$ M), Thapsigargin (2  $\mu$ M) oder Tunicamycin (3  $\mu$ M) behandelt. Als Kontrolle wurden die transfizierten Zellen mit DMSO (0,25 %) behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen fixiert und das FLAG-Par-4-Fusionsprotein immunzytochemisch mit einem anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-gekoppelten anti-Maus-Antikörper detektiert.

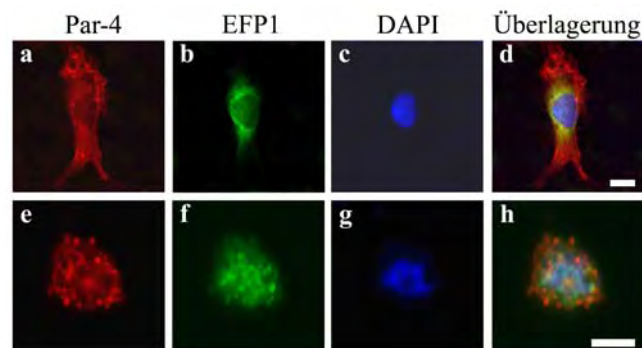
Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 33 zeigen, dass das FLAG-Par-4-Fusionsprotein sowohl in den CHO-Zellen, die als Kontrolle mit DMSO behandelt wurden (Abb. 33, a) wie auch in den mit Ionomycin (Abb. 33, d), Thapsigargin (Abb. 33, g) und Tunicamycin behandelten CHO-Zellen (Abb. 33, j) mit den Stressfasern des Aktin-Zytoskeletts assoziiert war. Im Gegensatz dazu wurde das EFP1-GFP-Fusionsprotein in den mit DMSO behandelten CHO-Zellen (Abb. 33, b) genauso wie in den mit Ionomycin (Abb. 33, e), Thapsigargin (Abb. 33, h) und Tunicamycin (Abb. 33, k) behandelten CHO-Zellen ausschließlich im ER detektiert. Interessanterweise konnte in den mit Tunicamycin behandelten CHO-Zellen beobachtet werden, dass die EFP1-GFP-Fusionsproteine keine diffuse Verteilung, sondern eine starke Konzentration im ER nahe des Zellkerns aufwiesen (Abb. 33, k und l). Vermutlich handelt es sich dabei um Aggregate von missgefalteten EFP1-GFP-Fusionsproteinen, da die neu synthetisierten ER-Proteine durch die Behandlung der CHO-Zellen mit Tunicamycin nicht N-glykosyliert und deshalb nicht richtig gefaltet werden können. Die Überlagerung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 33, c, f, i, l zeigt, dass nach der Induktion von ER-Stress keine Kolokalisation von FLAG-Par-4 und EFP1-GFP beobachtet werden konnte (Abb. 33, c, f, i, l). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass kein Stimulus identifiziert werden konnte, der die Kolokalisation der ektopisch exprimierten Fusionsproteine FLAG-Par-4 und EFP1-GFP induzieren kann.



**Abb. 33: Subzelluläre Lokalisation von Par-4 und EFP1 nach Induktion von ER-Stress.** CHO-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit den Expressionsplasmiden für EFP1-GFP und FLAG-Par-4 kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit 0,25 % DMSO, 10  $\mu$ M Ionomycin, 2  $\mu$ M Thapsigargin oder mit 3  $\mu$ M Tunicamycin behandelt und nach weiteren 24 h fixiert. Dann erfolgte der immunzytochemische Nachweis von FLAG-Par-4 mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörper. Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop. Balken 10  $\mu$ m.

#### 4.6.3.2 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Par-4 und EFP1 in apoptotischen Zellen

Als nächstes sollte untersucht werden, ob es nach der Auslösung von Apoptose zu einer Kolokalisation der Fusionsproteine FLAG-Par-4 und EFP1-GFP kommt. Zu diesem Zweck wurden CHO-Zellen verwendet, da ektopisch exprimiertes Par-4 allein in CHO-Zellen 24 h nach der Transfektion eine Apoptoserate von 20–30 % induzieren kann (Dissertation Vetterkind, 2003). Die CHO-Zellen wurden mit FLAG-Par-4 und EFP1-GFP kotransfiziert, 24 h nach der Transfektion fixiert und das exprimierte FLAG-Par-4-Fusionsprotein immunzytochemisch mit einem anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff DAPI visualisiert.



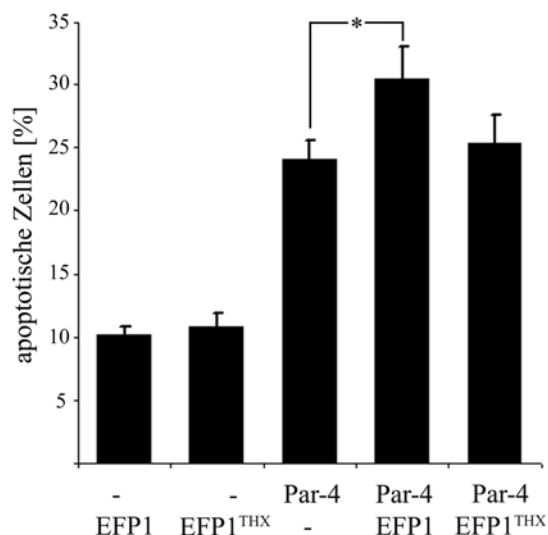
**Abb. 34: Subzelluläre Lokalisation von FLAG-Par-4 und EFP1-GFP in nicht apoptotischen und apoptotischen CHO-Zellen.** CHO-Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit den Expressionsplasmiden für EFP1-GFP und FLAG-Par-4 kotransfiziert und 24 h nach der Transfektion fixiert. Der immunzytochemische Nachweis von FLAG-Par-4 erfolgte mit einem monoklonalen anti-FLAG- Antikörper und einem Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörper. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Axiophot Fluoreszenz-Mikroskop. Die Bilder a-d zeigen eine nicht apoptotische, die Bilder e-h zeigen eine apoptotische CHO-Zelle. Balken 10 µm.

In der Abb. 34 a-d ist eine FLAG-Par-4/EFP1-GFP koexprimierende nicht apoptotische CHO-Zelle dargestellt, wohingegen die Abb. 34 e-h eine apoptotische CHO-Zelle zeigt, in der FLAG-Par-4 und EFP1-GFP koexprimiert werden. Das FLAG-Par-4-Fusionsprotein kolokalisierte in der nicht apoptotischen CHO-Zelle mit dem Aktin-Zytoskelett (Abb. 34, a), das EFP1-GFP-Fusionsprotein wurde dagegen im ER detektiert (Abb. 34, b). Die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 34, d zeigt deutlich, dass die untersuchten Proteine FLAG-Par-4 und EFP1-GFP in der nicht apoptotischen CHO-Zelle nicht kolokalisierten. In der apoptotischen CHO-Zelle (Abb. 34, e-h) waren morphologische Merkmale der Apoptose wie Kondensation des Chromatins, Kernfragmentation (Abb. 34, g) und Membranbläschen (Abb. 34, e) zu detektieren. Es konnte jedoch auch in den apoptotischen CHO-Zellen keine Kolokalisation des FLAG-Par-4-Fusionsproteins und des EFP1-GFP-Fusionsproteins nachgewiesen werden (Abb. 34, h).

#### 4.6.4 Einfluss von EFP1 auf die Par-4-vermittelte Apoptose

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welchen Einfluss die ektopische Expression von EFP1 auf die Par-4-induzierte Apoptose ausübt und ob die katalytische Aktivität des EFP1-Proteins in diesem Zusammenhang von Bedeutung ist. Die Mutante EFP1<sup>THX</sup> wurde von Ansgar Koplin im Rahmen seiner Diplomarbeit (2004) hergestellt und beinhaltet in ihrer C-terminalen Thioredoxindomäne (THX<sub>2</sub>) anstelle der charakteristischen AS-Folge <sub>687</sub>CXXC<sub>690</sub> eines katalytischen Zentrums die AS-Folge <sub>687</sub>SXXS<sub>690</sub>. In einem Insulin-Disulfid-Reduktionstest wurde für die EFP1<sup>THX</sup>-Mutante im Vergleich zum EFP1 wt-Protein eine schwächere Reduktase-Aktivität nachgewiesen, was auf eine verminderte katalytische Aktivität der EFP1-Mutante hinweist (Diplomarbeit Koplin, 2004). Für die Untersuchungen wurden die Fusionsproteine FLAG-Par-4 und EFP1-GFP wt bzw. FLAG-Par-4 und EFP1<sup>THX</sup>-GFP in CHO-Zellen koexprimiert oder die Proteine FLAG-Par-4, EFP1-GFP wt oder EFP1<sup>THX</sup>-GFP als Kontrolle einzeln exprimiert, die Zellen 24 h nach der Transfektion fixiert, die FLAG-Par-4-Fusionsproteine immunzytochemisch mit einem anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper angefärbt und die Zellkerne mit DAPI visualisiert. Um den Einfluss von EFP1 auf die Par-4-induzierte Apoptose zu quantifizieren, wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 100 transfizierte Zellen analysiert und die Apoptoserate anhand morphologischer Merkmale der Apoptose wie Chromatinkondensation und Blasenbildung der Membran (siehe auch Abb. 34, e-h) prozentual bestimmt. Die quantitative Auswertung in Abb. 35 A zeigt, dass die Apoptoserate nach der Einzelexpression von EFP1-GFP wt (Abb. 35, Säule 1) oder der Thioredoxinmutante EFP1<sup>THX</sup>-GFP (Abb. 35, Säule 2) ungefähr 10 % betrug. Die Einzelexpression von FLAG-Par-4 löste in ca. 25 % der Zellen die Apoptose aus (Abb. 35, Säule 3). Die Koexpression von EFP1-GFP wt und FLAG-Par-4 führte zu einer Steigerung der Apoptoserate auf 31 % (Abb. 35, Säule 4). Nach der Koexpression von FLAG-Par-4 und EFP1<sup>THX</sup>-GFP betrug die Apoptoserate der transfizierten Zellen nur 26 % (Abb. 35, Säule 6). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass das koexprimierte EFP1 wt-Protein die Par-4-induzierte Apoptose in CHO-Zellen um ca. 6 % erhöhen kann. Die Signifikanz dieser Steigerung der Apoptoserate konnte in einem einseitigen gepaarten T-Test (p=0,037) bestätigt werden (Abb. 35, Stern). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die katalytische Aktivität des EFP1-Proteins für die Erhöhung der Par-4-induzierten Apoptoserate erforderlich ist.

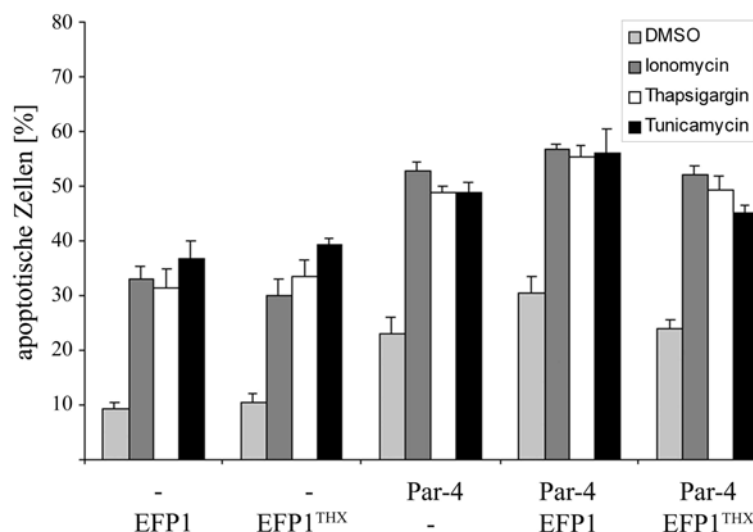




**Abb. 35: Apoptose-Induktion in CHO-Zellen nach ectopischer Expression von Par-4, EFP1 wt und EFP1<sup>THX</sup>.** CHO-Zellen wurden mit EFP1-GFP wt und FLAG-Par-4 bzw. EFP1<sup>THX</sup>-GFP und FLAG-Par-4 kotransfiziert oder einzeln mit EFP1-GFP wt, EFP1<sup>THX</sup>-GFP bzw. FLAG-Par-4 transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Fixierung der Zellen sowie der immunzytochemische Nachweis von FLAG-Par-4 mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörper. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde durch fluoreszenzmikroskopische Analysen unter den transfizierten Zellen ermittelt. Im Diagramm sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten dargestellt, in denen jeweils 100 Zellen ausgezählt wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen, die signifikante Steigerung der Apoptoserate (Säule 3 und 4), markiert durch einen Stern, wurde in einem einseitigen gepaarten T-Test bestätigt (p=0,037).

Die vorangegangenen Experimente (4.6.2) haben gezeigt, dass die Expression des EFP1-Transkripts durch die Induktion von ER-Stress induziert werden kann. Daher sollte analysiert werden, ob sich die Induktion von ER-Stress auch auf die Apoptoserate nach der Koexpression von EFP1 und Par-4 auswirkt. Zu diesem Zweck wurden CHO-Zellen mit den Expressionsplasmiden für FLAG-Par-4 und EFP1-GFP wt bzw. FLAG-Par-4 und EFP1<sup>THX</sup>-GFP kotransfiziert oder als Kontrolle einzeln mit den Expressionsplasmiden für FLAG-Par-4, EFP1-GFP wt oder EFP1<sup>THX</sup>-GFP transfiziert. Die Zellen wurden anschließend für 24 h mit 10 µM Ionomycin, 2 µM Thapsigargin oder 3 µM Tunicamycin behandelt. Als Kontrolle diente die Behandlung der Zellen mit 0,25 % DMSO. Die Detektion der FLAG-Par-4-Fusionsproteine erfolgte durch immunzytochemische Färbung mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörper. Die Apoptoserate wurde anhand morphologischer Merkmale der Apoptose der transfizierten Zellen (siehe auch Abb. 34, e-h) am Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Abb. 36 zeigt die quantitative Auswertung dieses Experiments. Die Einzelexpression von EFP1-GFP wt (Abb. 36, hellgraue Säule 1) oder der Mutante EFP1<sup>THX</sup>-GFP (Abb. 36, hellgraue Säule 2) induzierte in den mit DMSO behandelten CHO-Zellen eine Apoptoserate von ungefähr 10 %, wohingegen die Apoptoserate nach alleiniger Expression von FLAG-Par-4 23 % betrug (Abb. 36, hellgraue Säule 3). Die Koexpression von EFP1-GFP wt und FLAG-Par-4 steigerte die Apoptoserate der mit DMSO behandelten Kontrollzellen auf ca. 30 % (Abb. 36, hellgraue

Säule 4), wohingegen die Apoptoserate nach der Koexpression von EFP1<sup>THX</sup>-GFP und FLAG-Par-4 nur 26 % betrug (Abb. 36, hellgraue Säule 5).



**Abb. 36: Apoptose-Induktion in CHO-Zellen nach ektopischer Expression von Par-4, EFP1 wt und EFP1<sup>THX</sup> nach ER-Stress.** CHO-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für EFP1-GFP, EFP1<sup>THX</sup>-GFP und FLAG-Par-4 einzeln transfiziert oder wie angegeben kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte eine Behandlung der Zellen mit 0,25 % DMSO (hellgraue Säule), 10  $\mu$ M Ionomycin (dunkelgraue Säule), 2  $\mu$ M Thapsigargin (weiße Säule) oder 3  $\mu$ M Tunicamycin (schwarze Säule) für weitere 24 h. Anschließend wurden die Zellen fixiert und das FLAG-Par-4-Fusionsprotein immunzytochemisch mit einem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper und einem Cy3-fluoreszenzmarkierten anti-Maus-Antikörper detektiert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde durch fluoreszenzmikroskopische Analysen unter den transfizierten Zellen ermittelt. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils 100 Zellen pro Ansatz ausgezählt wurden.

Nach einer Behandlung der CHO-Zellen mit Ionomycin betrug die durch FLAG-Par-4 allein ausgelöste Apoptoserate 53 % (Abb. 36, dunkelgraue Säule 3), die durch FLAG-Par-4 und EFP1-GFP wt induzierte Apoptoserate 57 % (Abb. 36, dunkelgraue Säule 4) und die durch FLAG-Par-4 und EFP1<sup>THX</sup>-GFP ausgelöste Apoptoserate 52 % (Abb. 36, dunkelgraue Säule 5). Die Anzahl apoptotischer CHO-Zellen nach Thapsigargin-Behandlung betrug nach der alleinigen Expression von FLAG-Par-4 ca. 49 % (Abb. 36, weiße Säule 3), nach Koexpression von FLAG-Par-4 und EFP1-GFP wt ca. 55 % (Abb. 36, weiße Säule 4) und nach Koexpression von FLAG-Par-4 und EFP1<sup>THX</sup>-GFP ca. 50 % (Abb. 36, weiße Säule 5). Die Einzelexpression von FLAG-Par-4 induzierte in 48 % der mit Tunicamycin behandelten CHO-Zellen die Apoptose (Abb. 36, schwarze Säule 3). Die Koexpression von EFP1-GFP wt und FLAG-Par-4 steigerte die Apoptoserate der mit Tunicamycin behandelten CHO-Zellen auf 53 % (Abb. 36, schwarze Säule 4), wohingegen die Apoptoserate in den mit Tunicamycin behandelten CHO-Zellen nach der Koexpression von EFP1<sup>THX</sup>-GFP und FLAG-Par-4 nur 45 % betrug (Abb. 36, schwarze Säule 5). Zusammenfassend haben die Experimente gezeigt, dass die Induktion von ER-Stress, ausgelöst durch eine Behandlung der CHO-Zellen mit den Reagenzien Ionomycin, Thapsigargin oder Tunicamycin, keine Auswirkung auf die Steigerung der Par-4-induzierten Apoptose durch die Koexpression von EFP1 hat.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 UNTERSUCHUNG ZUR PAR-4-VERMITTELTEN APOPTOSE DURCH DIE INHIBITION DER PAR-4-FUNKTION

Die Vermutung, dass Par-4 an der Regulation von apoptotischen Prozessen beteiligt ist, konnte durch zahlreiche Studien belegt werden. Jedoch sind die genauen Mechanismen der Par-4-vermittelten Apoptose bisher nicht vollständig aufgeklärt. Die aktuelle Datenlage verdeutlicht, dass sich generell zwei Wege unterscheiden lassen, wie Par-4 die Apoptose auslösen kann. Je nach Zelltyp oder apoptotischem Stimulus sensitiviert Par-4 die Zellen nur für die Apoptose oder induziert den programmierten Zelltod auf direktem Weg (Übersicht bei Ranganathan & Rangnekar, 2005). Die meisten der bisher identifizierten Interaktionspartner von Par-4 sind an seiner proliferations-inhibierenden Wirkung beteiligt, die Zellen lediglich für apoptotische Stimuli empfänglicher macht. So wird zum Beispiel die Proteinkinase C $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) durch die Bindung an Par-4 inhibiert (Diaz-Meco *et al.*, 1996), wodurch der NF- $\kappa$ B-Signalweg blockiert wird und wichtige Überlebenssignale ausbleiben (Barkett & Gilmore, 1999). Weiterhin bewirkt die Interaktion zwischen Par-4 und dem Transkriptionsfaktor WT1 am Promotor des *bcl-2*-Gens eine Herunterregulation der Expression des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins, so dass das Gleichgewicht zwischen den pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie zu Gunsten der pro-apoptotischen Faktoren verschoben wird und die Zelle dadurch sensibler gegenüber pro-apoptotischen Signalen wird (Qiu *et al.*, 1999). In vielen Tumorzellen, wie zum Beispiel in Androgen-unabhängigen Prostatakarzinomzellen (Chakraborty *et al.*, 2001) oder in Tumorzellen des zentralen Nervensystems (Vetterkind *et al.*, 2005a), löst die ektopische Expression des pro-apoptotischen Par-4-Proteins hingegen direkt die Apoptose aus (Übersicht bei Gurusurthy & Rangnekar, 2004). Die Koexpression von Par-4 und seinem Interaktionspartner Dlk (*DAP-like kinase*) ist in Ratten-Fibroblasten ebenfalls an einer direkten Apoptose-Induktion beteiligt (Page *et al.*, 1999), bei der ein intaktes Aktin-Zytoskelett von großer Bedeutung ist. Die Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette von Myosin II (MLC) an der AS Serin<sub>19</sub> scheint dabei für die Induktion der Apoptose essentiell zu sein (Vetterkind *et al.*, 2005b). Ein Ziel dieser Arbeit war es, durch die siRNA-Technik oder durch den Einsatz dominant-negativer Par-4-Mutanten die endogene Par-4-Funktion zu inhibieren und so neue Einblicke in die Par-4-vermittelte Apoptose zu erlangen.

### 5.1.1 Identifizierung dominant-negativer Par-4-Mutanten

Für die Funktionalität von dominant-negativen Mutanten, wie sie in dieser Arbeit für das Par-4-Protein in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose identifiziert werden sollten, müssen bestimmte grundlegende Voraussetzungen erfüllt sein. Dabei spielt zum Beispiel die Fähigkeit von Proteinen, Di- oder Multimere ausbilden zu können, eine wichtige Rolle. Funktionell inaktivierte Proteinvarianten können einen dominant-negativen Effekt auf das wt-Protein ausüben, indem sie Homodi- oder Homomultimere mit der wt-Form des Proteins ausbilden und dadurch seine Funktion blockieren. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist die Ausschaltung des p53-Tumorsuppressor-Proteins durch sporadisch auftretende Mutationen in einem p53-Allel. Das p53-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der als Tetramer an die Promotoren seiner Zielgene bindet. Dominant-negative p53-Mutanten beinhalten häufig eine Mutation in der DNA-Bindedomäne des p53-Proteins, weshalb sie nach Bindung an die p53 wt-Proteine die Interaktion des p53-Heterotetramers mit der DNA verhindern (Willis *et al.*, 2004). Des Weiteren können funktionell inaktivierte Proteinvarianten in der Zelle Heterodi- oder Heteromultimere mit wichtigen Interaktionspartnern des wt-Proteins ausbilden, die Interaktionspartner dadurch blockieren und so die natürliche Wirkungsweise des wt-Proteins verhindern (Decoy-Effekt), wie es zum Beispiel für den TRAIL-Decoy-Rezeptor TRUNDD gezeigt worden ist (Meng *et al.*, 2000). Für Par-4 sind grundsätzlich beide Möglichkeiten der Inhibition des wt-Proteins denkbar, da die Fähigkeit zur Homomultimer-Bildung von Par-4 in unterschiedlichen Studien belegt wurde (Gao *et al.*, 2006; Sells *et al.*, 1997; Berra *et al.*, 1997). Darüber hinaus könnten inaktive Par-4-Proteinmutanten an die verschiedenen Interaktionspartner des wt-Proteins (Übersicht bei Ranganathan & Rangnekar, 2005) binden und so die Par-4-vermittelte Apoptose inhibieren.

Um dominant-negative Par-4-Mutanten zu identifizieren, wurden die zu untersuchenden Par-4-Mutanten im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Blockierung der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose in REF52.2-Zellen untersucht. Zunächst wurde die Par-4-Phosphorylierungsmutante Par-4-T155A analysiert, in der die AS Threonin<sub>155</sub> gegen Alanin ausgetauscht wurde. Die Phosphorylierung der AS Threonin<sub>155</sub> im Par-4-Protein durch die Proteinkinase A (PKA) ist essentiell für die pro-apoptotische Funktion von Par-4 in Tumorzellen (Gurumurthy *et al.*, 2005). Ebenso spielt die Phosphorylierung des Par-4-Proteins an der AS Threonin<sub>155</sub> in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose eine wichtige Rolle. Nach der Koexpression der Par-4-Mutante Par-4-T155A und Dlk in Ratten-Fibroblasten transloziert die Proteinkinase Dlk nicht aus dem Kern an das Aktin-Zytoskelett und die Apoptose kann nicht induziert werden (Dissertation Boosen, 2007). In den in dieser Doktorarbeit durchgeführten

Koexpressionsstudien zeigte sich jedoch, dass die Par-4-T155A Phosphorylierungsmutante die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose nicht blockieren konnte. Man könnte vermuten, dass die Mutante Par-4-T155A nicht fähig ist, an die Proteinkinase Dlk zu binden, um mit Par-4 wt um die Bindung an die Dlk zu konkurrieren. Dass Par-4-T155A in der Lage ist, mit der Dlk zu interagieren, konnte jedoch in einem Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionstest gezeigt werden (Doktorarbeit Boosen, 2007). Andererseits könnte die Par-4-Mutante in der Heterodimerisierung mit Par-4 wt beeinträchtigt sein, so dass sie die Par-4 wt-Funktion nicht blockieren kann. Um diese Vermutung zu bestätigen, müsste ein Interaktionstest mit Par-4 wt und Par-4-T155A durchgeführt werden. Denkbar ist auch, dass eine Heterodimerisierung zwischen Par-4 wt und Par-4-T155A stattfindet, die Komplexbildung aber keinen negativen Einfluss auf die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose ausübt.

Um dominant-negative Par-4-Mutanten für die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose zu identifizieren, wurden weiterhin verschiedene Par-4-Deletionsmutanten untersucht. Die verwendeten Par-4-Deletionsmutanten zeigen im Vergleich zum Par-4 wt-Protein eine schwächere Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett und sind deshalb in ihrer Fähigkeit beeinträchtigt, die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose zu induzieren (Vetterkind *et al.*, 2005b). Die N-terminal deletierten Par-4-Mutanten  $\Delta N_{41-332}$  und  $\Delta N_{266-332}$  könnten mit ihrem LZ sowohl an Par-4 wt wie auch an Dlk binden und so die Heterodimerisierung zwischen den Proteinen Par-4 wt und Dlk verhindern. Die C-terminal deletierten Par-4-Mutanten  $\Delta C_{1-233}$  und  $\Delta C_{1-266}$  können aufgrund des deletierten LZ weder mit Par-4 wt noch mit Dlk interagieren, jedoch durch die Anbindung an Aktinfilamente den Par-4/Dlk-Proteinkomplex kompetitiv vom Aktin-Zytoskelett verdrängen. Die Par-4-Deletionsmutante  $\Delta N_{266-332}$  entspricht einer Mutante von Par-4, die ausschließlich aus dem LZ von Par-4 (Par-4-LZ) besteht und für die bereits ein dominant-negativer Effekt auf das Par-4 wt-Protein beschrieben wurde. In diesen Studien wurde gezeigt, dass der koexprimierte Par-4-LZ an den LZ des Par-4 wt-Proteins bindet, so eine Bindung zwischen Par-4 wt und seinen Interaktionspartnern verhindert und dadurch die Par-4 wt-induzierte Apoptose in Prostatakarzinom-Zellen blockiert (Sells *et al.*, 1997). Nachdem die verschiedenen Par-4-Mutanten zusammen mit Par-4 wt und Dlk in Ratten-Fibroblasten transfiziert wurden, konnte jedoch keine der Par-4-Deletionsmutanten die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose inhibieren und deshalb keinen dominant-negativen Effekt ausüben. Dies lässt vermuten, dass weder die Par-4-Mutante  $\Delta N_{266-332}$  noch die Par-4-Mutante  $\Delta N_{41-332}$ , die aufgrund des deletierten N-Terminus in ihrer Aktinbindungsfähigkeit beeinträchtigt sind, über ihren LZ an das Par-4 wt-Protein oder an das Dlk-Protein binden und so die Interaktion zwischen Par-4 wt und der Dlk inhibieren.

Womöglich hat die Interaktion zwischen Par-4 wt und den Par-4-Deletionsmutanten  $\Delta N_{266-332}$  und  $\Delta N_{41-332}$  keinen negativen Einfluss auf die Par-4 wt-Funktion in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose. Die C-terminal deletierten Par-4-Mutanten  $\Delta C_{1-233}$  und  $\Delta C_{1-266}$  können zwar mit dem N-Terminus an das Aktin-Zytoskelett assoziieren, jedoch aufgrund des deletierten LZ-Motivs keine Interaktion mit dem Par-4 wt-Protein oder dem Dlk-Protein eingehen und so die Par-4/Dlk-induzierte Apoptose inhibieren. Die Ergebnisse dieser Versuche deuten allerdings darauf hin, dass die C-terminal deletierten Par-4-Mutanten nicht an die Aktinfilamente binden, um das Par-4 wt-Protein von diesen Strukturen kompetitiv zu verdrängen. Vermutlich ist die Aktin-Anbindung der Mutanten  $\Delta C_{1-233}$  und  $\Delta C_{1-266}$  zu gering, um die starke Bindung zwischen Par-4 wt und dem Aktin-Zytoskelett zu verhindern.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht, ob die neue Isoform Par-4/p33, die aus embryonalen Stammzellen der Maus isolierte wurde, eine dominant-negative Par-4-Mutante in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose darstellen könnte. Die Isoform Par-4/p33 wird in den embryonalen Stammzellen durch die Verwendung einer alternativen Spleißstelle zwischen Exon 2 und Exon 4 generiert, so dass das Exon 3 komplett herausgespleißt wird. Im Par-4/p33-Protein sind daher die AS 166-195 deletiert, die im Par-4 wt-Protein zur SAC-Domäne gehören. Die funktionelle NLS 2 (AS 138-154; El-Guendy *et al.*, 2003) sowie die für die Apoptose-Induktion essentielle Phosphorylierungsstelle AS Threonin<sub>156</sub> in der Maus-Sequenz, die der AS Threonin<sub>155</sub> in der Ratten-Sequenz entspricht (Gurumurthy *et al.*, 2005; Dissertation Boosen, 2007), sind von der Deletion im Par-4/p33-Protein jedoch nicht betroffen. In embryonalen Stammzellen der Maus ist die Par-4/p33-Isoform am Aktin-Zytoskelett lokalisiert im Gegensatz zum Par-4 wt-Protein, das in diesen Zellen im Kern zu finden ist. In Koexpressionsstudien wurde gezeigt, dass die Isoform Par-4/p33 das Par-4 wt Protein im Zytosol zurückhält und so die Par-4 wt-vermittelte Apoptose blockieren kann (Wang *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die neue Isoform Par-4/p33 auch die Par-4/Dlk-vermittelte Apoptose in Ratten-Fibroblasten blockieren kann. Ob der dominant-negative Effekt der Par-4/p33-Isoform in diesem Zusammenhang ebenfalls mit einer Zurückhaltung des Par-4 wt-Proteins (Maus oder Ratte) aus dem Zellkern zusammenhängt, ist unbekannt. Im Laufe der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose transloziert die Proteinkinase Dlk aus dem Kern an das Aktin-Zytoskelett der Zelle und kolokalisiert mit dem Par-4-Protein an den Aktinfilamenten. Jedoch konnte bisher nicht aufgeklärt werden, ob die Dlk selbst aktiv aus dem Nukleus exportiert wird oder ob das Par-4-Protein in den Kern importiert wird, dort mit der Dlk interagiert und die Kinase anschließend aktiv in das Zytoplasma rekrutiert. Womöglich verhindert das

Par-4/p33-Protein die Translokation des Par-4 wt-Proteins in den Kern und behindert so den Kernexport der Dlk, was zur Blockierung der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose führt. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssen jedoch weitere experimentelle Studien durchgeführt werden. Nach der Expression von Dlk zusammen mit Par-4 wt aus der Ratte bzw. mit Par-4 wt aus der Maus wurde beobachtet, dass die murine wt-Form von Par-4 eine höhere Apoptoserate im Vergleich zu Par-4 wt aus der Ratte induziert. Vergleicht man die Proteinsequenzen von Par-4 wt aus der Ratte und der Maus, so kann man feststellen, dass die bisher identifizierten funktionellen Domänen in beiden Spezies stark konserviert sind (Übersicht bei El-Guendy & Rangnekar, 2003). Auffällig ist aber, dass nur das Par-4 wt-Protein aus der Ratte die AS Serin<sub>249</sub> beinhaltet, die weder in der humanen noch in der murinen Form konserviert ist. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass das Par-4-Protein durch die Akt-Kinase an der AS Serin<sub>249</sub> phosphoryliert und dadurch inaktiviert werden kann (Goswami *et al.*, 2005). Die Aktivität des murinen Par-4-Proteins kann also, im Gegensatz zum Par-4-Protein aus der Ratte, nicht durch die inhibitorische Phosphorylierung der Akt-Kinase an der AS Serin<sub>249</sub> beeinträchtigt werden und könnte deshalb in Ratten-Fibroblasten ein stärkeres apoptotisches Potential in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose aufweisen. Bestätigt werden könnte diese Hypothese durch die Generierung einer Ratten-Par-4-Mutante, in der die AS Serin<sub>249</sub> durch die AS Alanin ausgetauscht wird. Auf der anderen Seite könnte eine Maus-Par-4-Mutante, in der sich anstelle der AS Asparagin<sub>249</sub> die AS Serin befindet, ebenfalls zur Klärung dieser Fragestellung beitragen.

### **5.1.2 Die Inhibition von Par-4 durch die siRNA-Technik führt zur Verringerung der MLC-Phosphorylierung trotz Induktion von ER-Stress**

Die Etablierung eines Zellkultursystems, in dem die Par-4-Expression durch verschiedene Stimuli hochreguliert werden kann, war eine wichtige Voraussetzung für die Untersuchung der Funktion des endogenen Par-4-Proteins. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von Par-4 durch die ER-Stress auslösenden Reagenzien Ionomycin und Thapsigargin induziert werden kann (Sells *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit bestätigt werden. Daher konnte nun untersucht werden, welchen Einfluss die Hochregulation von endogenem Par-4 auf die Phosphorylierung der MLC an der AS Serin<sub>19</sub> hat. Nach der Induktion der endogenen Par-4-Expression durch Behandlung der murinen Säugerzellen N2A und NIH-3T3 konnte eine Steigerung der MLC-Phosphorylierung beobachtet werden. Dass ein direkter Zusammenhang zwischen der erhöhten MLC-Phosphorylierung und der Induktion der Par-4-Expression

besteht, konnte durch den Einsatz der siRNA-Technik gezeigt werden. Trotz einer Behandlung der Zellen mit Ionomycin oder Thapsigargin wurde keine verstärkte MLC-Phosphorylierung an der AS Serin<sub>19</sub> nachgewiesen, sobald Par-4 durch den Einsatz von siRNA-Par-4 herunterreguliert wurde. Auch nach der Ausschaltung der endogenen Dlk-Expression durch die siRNA-Technik konnte die erhöhte MLC-Phosphorylierung nach Thapsigargin-Behandlung inhibiert werden, jedoch fiel der beobachtete Effekt schwächer aus als nach der Inhibition der Par-4-Expression. Dies lag wahrscheinlich daran, dass die siRNA gegen die Dlk nicht so effizient war wie die siRNA gegen Par-4 und deshalb eine relativ hohe Dlk-Expression und damit eine hohe Restaktivität der Kinase in den untersuchten Zellen verblieben ist. Eine vollständige Inhibition der MLC-Phosphorylierung wurde weder nach der Inhibition von Par-4 noch nach der Inhibition der Dlk beobachtet. Das liegt wohl zum einen daran, dass durch die siRNA-Technik immer nur ein *knock-down* und keine vollständige Ausschaltung der Expression erreicht werden kann. Des Weiteren wird die Phosphorylierung der MLC durch zahlreiche andere Signalwege reguliert, die zum Beispiel bei der Zellteilung (Gerashchenko *et al.*, 2002) oder der Zellmortalität (Gutjahr *et al.*, 2005) eine Rolle spielen. Für das humane Ortholog der Dlk, der ZIPK, konnte gezeigt werden, dass sie die MLC an der AS Threonin<sub>18</sub> und Serin<sub>19</sub> phosphoryliert und so die Motalität von Fibroblasten regulieren kann (Komatsu & Ikebe, 2004). Weitere Studien haben gezeigt, dass die Kinasen ROCK (*Rho-associated coiled-coil forming protein kinase*) und MLCK (*myosin light chain kinase*) durch Caspasen aktiviert werden können und die Phosphorylierung ihres Substrats, die MLC, eine wichtige Rolle in der Apoptose-Induktion spielt (Coleman *et al.*, 2001; Sebbagh *et al.*, 2001; Petrache *et al.*, 2003). Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Studien die vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, in denen die Proteinkinase Dlk die AS Serin<sub>19</sub> der MLC phosphoryliert und diese MLC-Phosphorylierung eine wichtige Rolle in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose spielt (Vetterkind *et al.*, 2005b). Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass eine erhöhte MLC-Phosphorylierung nicht nur durch die Überexpression von Par-4 und Dlk in Ratten-Fibroblasten induziert werden kann, sondern auch durch die Induktion der endogenen Par-4-Expression durch die Auslösung von ER-Stress in murinen N2A- und NIH-3T3-Zellen. Die erhöhte Par-4-Expression könnte ausreichen, um zusammen mit der endogenen Dlk die verstärkte MLC-Phosphorylierung zu induzieren. Es wäre jedoch auch denkbar, dass die Dlk-Expression ebenso wie die Par-4-Expression nach der Auslösung von ER-Stress induziert wird und die Hochregulation beider Proteine zu einer verstärkten MLC-Phosphorylierung führt. Daher wäre es sicher interessant, den Dlk-mRNA-Status sowie die Dlk-Proteinexpression nach der Induktion von ER-Stress zu analysieren.



### 5.1.3 Die Inhibition von Par-4 beeinträchtigt die Apoptose-Induktion nach der Auslösung von ER-Stress

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die proteolytische Spaltung der Effektorcaspase-3 essentiell für die Apoptose ist, so dass ihre Aktivierung oft als Apoptosenachweis herangezogen wird (Übersicht bei Kohler *et al.*, 2002). Des Weiteren ist bekannt, dass die Caspase-3 durch die Par-4-vermittelte Apoptose in neoplastischen Lymphozyten aktiviert werden kann (Boehrer *et al.*, 2002). Um den Einfluss des endogenen Par-4-Proteins auf die Apoptose-Induktion zu analysieren, wurde in den durchgeführten Studien die Caspase-3-Aktivierung untersucht. Nach der Induktion von ER-Stress mit Thapsigargin wurde sowohl die endogene Par-4-Expression in N2A-Zellen hochreguliert und außerdem eine Aktivierung der Caspase-3 beobachtet. Nach der Herunterregulation der Par-4-Expression durch die siRNA-Technik konnte eine Abnahme der Caspase-3-Aktivierung nach Thapsigargin-Behandlung nachgewiesen werden. Die siRNA-vermittelte Herunterregulation der endogenen Dlk-Expression führte ebenfalls zu einer Abnahme der Aktivierung der Caspase-3 nach Thapsigargin-Behandlung, jedoch fiel dieser Effekt schwächer aus als nach der Inhibition von Par-4. Die schwache Inhibition der Caspase-3-Aktivierung nach der Herunterregulation der Dlk liegt vermutlich an der hohen Restaktivität des Dlk-Proteins, bedingt durch die geringere Effizienz der eingesetzten siRNA-Dlk. Da die Aktivierung der Caspase-3 nach der Induktion von ER-Stress durch Thapsigargin sowohl durch die Inhibition der Par-4- wie auch der Dlk-Expression inhibiert werden konnte, kann man vermuten, dass sowohl das Par-4-Protein wie auch das Dlk-Protein in der ER-Stress-vermittelten Apoptose eine Rolle spielen könnten. In guter Korrelation zu diesen Ergebnissen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibition der endogenen Par-4-Expression mit Hilfe der siRNA-Technik zu einer erhöhten Apoptoseresistenz gegenüber den ER-Stress auslösenden Reagenzien Ionomycin und Thapsigargin in HeLa-Zellen führte. Die Herunterregulation von endogenem Par-4 konnte die Apoptose-Induktion nach Behandlung der HeLa-Zellen mit dem ER-Stress auslösenden Reagenz Tunicamycin jedoch nicht inhibieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von Par-4 durch die siRNA-Technik die durch die Zellstress-Agenzien Etoposid und Staurosporin ausgelöste Apoptose in HeLa-Zellen nicht blockieren kann. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde jedoch gezeigt, dass eine Herunterregulation der Par-4-Expression durch die siRNA-Technik zur Desensibilisierung von HeLa-Zellen gegenüber Zytostatika wie Etoposid und Staurosporin führen kann (Affar *et al.*, 2006). Aufgrund der aus unseren Studien gewonnenen Ergebnisse kann man vermuten, dass die siRNA gegen Par-4 die durch verschiedene Reagenzien ausgelöste Apoptose nur dann

blockieren kann, wenn die entsprechenden Reagenzien auch zur Induktion der endogenen Par-4-Expression und so zur Par-4-vermittelten Apoptose führen. Darüber hinaus könnte die siRNA-vermittelte Inhibition von Par-4 die durch die verschiedenen Reagenzien ausgelöste Apoptose blockieren, wenn das endogene Par-4-Protein in den durch die Reagenzien induzierten Apoptosemechanismus involviert ist. Dass die Par-4-Expression durch die ER-Stress auslösenden Reagenzien Ionomycin und Thapsigargin in N2A- und in NIH-3T3-Zellen induziert werden kann, nicht jedoch in N2A-Zellen durch die Behandlung von Staurosporin, wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt und würde die erste Vermutung stützen. Das ER-Stress induzierende Reagenz Tunicamycin konnte hingegen nur in den NIH-3T3-Zellen, nicht aber in den N2A-Zellen die Par-4-Expression heraufregulieren. Womöglich wird auch in den HeLa-Zellen keine Induktion der Par-4-Expression durch das Reagenz Tunicamycin erreicht, so dass die siRNA-vermittelte Inhibition von Par-4 keinen Einfluss auf die durch Tunicamycin ausgelöste Apoptose ausüben kann. Diese Vermutung könnte durch weitere Experimente untersucht werden, in denen der Par-4 Expressionsstatus nach der Induktion von ER-Stress durch Ionomycin, Thapsigargin und Tunicamycin in HeLa-Zellen analysiert werden sollte.

#### **5.1.4 Par-4 übt möglicherweise eine stabilisierende Funktion auf das Aktin-Zytoskelett aus**

Die Herstellung der stabil siRNA-Par-4 exprimierenden Zelllinie HeLa-siPar4 lieferte neue interessante Hinweise auf eine weitere Funktion des Par-4-Proteins. Im Gegensatz zur Etablierung von HeLa-Kontrollzelllinien, die den leeren Vektor pSUPER.neo+gfp stabil in ihr Genom integriert haben, war die Etablierung einer stabil siRNA-Par-4 exprimierenden HeLa-Zelllinie äußerst schwierig. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das pro-apoptotische Par-4-Protein, zumindest in HeLa-Zellen, auch eine lebensnotwendige Funktion ausüben könnte. In immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen der Zelllinie HeLa-siPar4 wurde gezeigt, dass diese Zellen im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie HeLa-siØ-3 eine kleinere Zellmorphologie aufwiesen. Da Par-4 sowohl direkt mit F-Aktin (filamentöses Aktin) interagieren kann und außerdem in der Lage ist, vorpolymerisiertes F-Aktin in höhere Strukturen zu organisieren (Vetterkind *et al.*, 2005b), kann man vermuten, dass die Herunterregulation der endogenen Par-4-Expression möglicherweise eine Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts verursacht. Um diese Vermutung zu überprüfen, sollte in weiteren experimentellen Studien untersucht werden, ob das Aktin-Zytoskelett in den Zellen der Zelllinie HeLa-siPar4 im Vergleich zu den Kontrollzellen schwächer ausgeprägt oder ob die

veränderte Zellmorphologie auf andere physiologische Variationen zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck könnten die Aktinfilamente in der stabil siRNA-Par-4 exprimierenden Zelllinie mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Phalloidin angefärbt und die Präparate anschließend mikroskopisch ausgewertet werden. Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass ein intaktes und funktionelles Zytoskelett für eine Zelle lebensnotwendig ist. So wurde bereits gezeigt, dass das Zytoskelett Ziel von vielen Signalwegen (Übersicht bei Sepulveda *et al.*, 2005), aber auch Sensor für den allgemeinen Zustand der Zelle ist (Yamazaki *et al.*, 2000). Daher könnte die Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts, bedingt durch die Herunterregulation der Par-4-Expression, die Lebensfähigkeit der HeLa-siPar4-Zellen durchaus negativ beeinflussen. Durch die weitere Charakterisierung dieser Zelllinie könnten sicherlich interessante neue Erkenntnisse über die Funktion des Par-4-Proteins gewonnen werden.

## **5.2 METHYLIERUNGSSPEZIFISCHE DNA-ANALYSEN DES PAR-4-, DLK/ZIPK- UND AMIDA/TFPT-PROMOTORS**

Ursprünglich ging man davon aus, dass genetische Abnormalitäten in Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen sowie chromosomale Abnormalitäten zur Entstehung von Krebserkrankungen führen (Hahn *et al.*, 1999; Übersicht bei Hanahan & Weinberg, 2000; Kinzler & Vogelstein, 1997). In den letzten Jahren mehren sich jedoch die Hinweise, dass mindestens in gleichem Umfang epigenetische Veränderungen eine wichtige Rolle in dem Prozess der Tumorgenese spielen. Zu den epigenetischen Modifikationen gehören die transkriptionelle Repression von Tumorsuppressoren durch eine Hypermethylierung in der entsprechenden Promotorregion (Übersicht bei Herman & Baylin, 2003), eine genomweite Hypomethylierung, die zur genomischen Instabilität führt (Übersicht bei Ehrlich, 2002) sowie die Stilllegung von Genen durch veränderte Histon-Modifikationen (Fraga *et al.*, 2005). Durch die Inaktivierung von wachstumsregulierenden Genen erlangen die Tumorzellen einen entscheidenden Wachstumsvorteil, der entweder die Entwicklung einer entarteten Zelle erst ermöglicht oder den Prozess der Transformation weiter begünstigt (Übersicht bei Baylin & Ohm, 2006). Daher sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit der DNA-Methylierungsstatus von Cytosinbasen in den potentiellen Promotorregionen der *par-4*-, *dlk/zipk*- und *amida/tfpt*-Gene in humanen Tumorzelllinien und in humanem Tumorgewebe untersucht werden. Diese Analysen könnten einen ersten Hinweis darauf geben, ob epigenetische Mechanismen die Expression der Gene *par-4*, *dlk/zipk* und *amida/tfpt* inaktivieren könnten. Eine epigenetische Stilllegung der Genexpression von Par-4, Dlk/ZIPK und Amida/TFPT könnte apoptotische

Vorgänge im Rahmen der neoplastischen Transformation beeinflussen und daher einen wichtigen Schritt bei der Tumorentstehung darstellen.

### **5.2.1 Das pro-apoptotische Protein Amida/TFPT wird in verschiedenen Tumorzelllinien und Gliomen durch DNA-Hypermethylierung stillgelegt**

Amida/TFPT wird ubiquitär exprimiert, jedoch konnte eine verstärkte Expression im Gehirngewebe und im Testis nachgewiesen werden. Das Ratten-Ortholog Amida wurde ursprünglich als Interaktionspartner des gehirnspezifischen Proteins Arc bei einer Hefe-Zwei-Hybrid Suche isoliert und kann in COS-7-Zellen nach Überexpression zur Induktion der Apoptose führen. Da eine Koexpression von Arc die Amida-vermittelte Apoptose blockieren kann, wurde postuliert, dass die beiden Proteine Amida und Arc den Zelltod in neuronalen Zellen regulieren können (Irie *et al.*, 2000). Darüber hinaus wird dem Amida-Protein eine Kontrollfunktion im Zellzyklus zugesprochen. Die DNA-bindende Domäne von Amida, die zwischen den beiden Kernlokalisationssequenzen des Proteins lokalisiert ist, scheint dabei von großer Bedeutung zu sein. Es wurde postuliert, dass Amida durch die Bindung an DNA die Chromatinkondensation beeinträchtigt und so den Übergang von der S- zur M-Phase blockiert. Die Funktion des Amida-Proteins kann in diesem Zusammenhang durch die Zellzyklus-Kinase Cdc2 reguliert werden, die das Amida-Protein an der AS Serin<sub>180</sub> phosphorylieren kann und so die DNA-Bindekapazität von Amida beeinflusst (Gan *et al.*, 2003). Das Amida-Protein ist auch ein Interaktionspartner von Par-4 und der Dlk (Dissertation Boosen, 2007). Nach der Koexpression von Par-4 und Amida in Ratten-Fibroblasten rekrutiert Par-4 das Amida-Protein an die Spannungsfasern des Zytoskeletts und es kommt zur Induktion der Apoptose (Boosen *et al.*, 2005). Das humane Ortholog von Amida, TFPT bzw. FB1, wurde als Fusionspartner des Transkriptionsfaktors E2A/TCF3 in Patienten mit pre-B ALL (prä-B-Zell akute lymphatische Leukämie) entdeckt. Das *tfpt*-Gen ist auf Chromosom 19q13.4 lokalisiert, eine Region, die bereits mehrfach mit LOH (*loss of heterozygosity*)-Ereignissen in verschiedenen Tumoren in Verbindung gebracht wurde (Brambillasca *et al.*, 1999). Ob die funktionelle Inaktivierung von E2A, einem Protein das an der B-Zell-Differenzierung beteiligt ist, oder ob die funktionelle Inaktivierung von TFPT ursächlich mit der Krankheit in Verbindung steht, konnte bisher nicht geklärt werden. Aufgrund einer kürzlich veröffentlichten Studie, die dem Amida-Protein eine Rolle als Tumorsuppressor zuweist, lässt sich vermuten, dass die Inaktivierung von TFPT für die Entstehung der pre-B ALL verantwortlich ist. Im Rahmen dieser Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass ektopisch exprimiertes TFPT nur in mitotischen Tumorzellen eine p53-

unabhängige Apoptose auslösen kann. In Zellen, die nicht den G2-Kontrollpunkt überschreiten und nicht in die Mitose eintreten, führt überexprimiertes TFPT nicht zur Induktion des programmierten Zelltods (Franchini *et al.*, 2006).

Im Rahmen der durchgeführten Studien konnte in allen untersuchten Tumorzelllinien eine TFPT-mRNA-Expression nachgewiesen werden, jedoch war nur ein schwaches TFPT-Transkript in den Tumorzelllinien U251-MG, Saos-2 und MCF-7 detektierbar. Durch eine Behandlung von Tumorzelllinien des zentralen Nervensystems mit 5-Aza-2'-deoxycytidin konnte die TFPT-mRNA-Expression in den vier Gliom-Zelllinien U178-MG, U251-MG, U373-MG und A172 sowie in der Medulloblastom-Zelllinie Daoy induziert werden. Die Promotoranalyse in den Zellen, in denen die TFPT-mRNA-Expression durch die genomweite Demethylierung heraufreguliert werden konnte, zeigte für alle untersuchten Gliom-Zelllinien, nicht jedoch für die Medulloblastom-Zelllinie Daoy, eine Hypermethylierung des untersuchten TFPT-Promotorbereichs. In der Tumorzelllinie MCF-7, die nur ein schwaches TFPT-Transkript aufweist, konnte ebenfalls eine schwache Promotor-Hypermethylierung nachgewiesen werden. Dieser erste Hinweis auf eine Stilllegung des *tfpt*-Gens durch Promotor-Hypermethylierung in Tumorzelllinien konnte auch in der methylierungsspezifischen Analyse der DNA-Proben eines Gliomkollektivs bestätigt werden. Gliome sind unterschiedlich differenzierte Gehirntumore, die von der Glia abstammen. Sie gehören zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren des Gehirns und werden in die Untergruppen Astrozytom, Oligodendrogliom, Oligo-Astrozytom, Ependymom und Glioblastoma multiforme eingeteilt. Die histologische Einteilung nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO)-Klassifikation beinhaltet die Graduierung von Grad I (benigne) bis Grad IV (hochgradig maligne) und stützt sich auf lichtmikroskopische Kriterien (Kleihues *et al.*, 2002). Eine starke Methylierung des untersuchten TFPT-Promotorfragments wurde in 37 % der primären Glioblastome, in 50 % der sekundären Glioblastome, in 67 % der anaplastischen Astrozytome und in 38 % der diffusen Astrozytome detektiert. Die Untersuchung der relativen TFPT-mRNA-Expression verdeutlichte, dass es besonders in den primären und sekundären Glioblastomproben (WHO IV) eine Korrelation zwischen dem Methylierungsgrad des TFPT-Promotors und dem TFPT-mRNA-Expressionsstatus gab. Bei den Astrozytomen (WHO II) und anaplastischen Astrozytomen (WHO III) konnte kein direkter Bezug zwischen der detektierten DNA-Hypermethylierung und einer verminderten TFPT-mRNA-Expression nachgewiesen werden (Appel *et al.*, in Vorbereitung).

Es ist interessant, dass das untersuchte TFPT-Promotorfragment nur in einem der insgesamt vier primären Glioblastome aus so genannten „Langzeitüberlebenden“ stark hypermethyliert

war. Bei den Tumorproben aus Langzeitüberlebenden handelt es sich um Glioblastomgewebe, das aus Patienten isoliert wurde, die nach der ersten Operation mindestens 3 Jahre überlebt haben. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die Glioblastome aus Langzeitüberlebenden einen geringeren Malignitätsgrad aufweisen. Zwar ist die Anzahl der untersuchten Glioblastome aus Langzeitüberlebenden zu gering, um statistisch sichere Aussagen treffen zu können, jedoch tritt eine Korrelation zwischen geringer bzw. fehlender DNA-Methylierung des *tfpt*-Promotors und niedrigerem Malignitätsgrad auch in anderen Gliomproben auf. In den von der WHO als niedrig gradig maligne eingestuften diffusen Astrozytomen (Kleihues *et al.*, 2002) sind nur drei von acht DNA-Proben im Bereich des untersuchten TFPT-Promotors stark hypermethyliert, alle restlichen Proben sind unmethyliert. Bei den höher gradig malignen anaplastischen Astrozytomen wurden dagegen sechs von neun Proben als stark methyliert identifiziert. In weiteren experimentellen Studien könnte die Fragestellung untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der epigenetischen Herunterregulation des *tfpt*-Gens und dem Malignitätsgrad von Gliomen gibt.

Die Unterteilung von Glioblastomen in primäre und sekundäre Glioblastome geht auf Scherer (1940) zurück. Primäre Glioblastome entwickeln sich in kürzester Zeit ohne einen Tumorstadium, wobei sekundäre Glioblastome über einen längeren Zeitraum aus Astrozytomen entstehen. Während sich primäre und sekundäre Glioblastome histologisch nur schwer voneinander unterscheiden lassen, zeigen sie deutliche genetische Differenzen (Übersicht bei Kleihues & Ohgaki, 1999). So weisen nur 10 % der primären Glioblastome Mutationen im p53-Gen auf, in sekundären Glioblastomen sind es dagegen über 65 % (Watanabe *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass eine starke Hypermethylierung des TFPT-Promotors in 37 % der primären Glioblastome auftrat, im Gegensatz zu 50 % in sekundären Glioblastomen. Auch hier ist die Anzahl der untersuchten sekundären Glioblastome zu gering, um statistisch sichere Aussagen treffen zu können. Es ist dennoch interessant, dass das *tfpt*-Gen, dessen Genprodukt nach neuestem Erkenntnisstand eine p53-unabhängige Apoptose induzieren kann (Franchini *et al.*, 2006), vermehrt in sekundären Glioblastomen epigenetisch stillgelegt wird, die zu über 65 % eine p53-Mutation aufweisen. Man kann nun vermuten, dass die Entstehung von sekundären Glioblastomen sowohl durch die Ausschaltung des p53-abhängigen wie auch durch Ausschaltung eines p53-unabhängigen Apoptoseweges begünstigt oder ermöglicht wird. Um diese Hypothese zu stützen, müsste eine größere Probenanzahl sekundärer Glioblastome im Hinblick auf den Methylierungsstatus des TFPT-Promotors untersucht werden. Anschließend sollte analysiert werden, ob eine epigenetische Stilllegung der *tfpt*-

Genexpression mit Mutationen in einem p53-Allel korreliert. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob allein eine ektoische Expression von TFPT in der Lage ist, in Glioblastomzellen die Apoptose oder einen Zellzyklus-Arrest zu induzieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten DNA-Methylierungsanalysen zeigten, dass besonders die in der zentral gelegenen Region (Position -1083 bis -965) des untersuchten TFPT-Promotorfragments lokalisierten CpG-Dinukleotide (CpG-Dinukleotide 7/8, 10, 11, 13, 14/15, 16) häufig in Glioblastomen methyliert sind. Eine Analyse der untersuchten Promotorregion des *tfpt*-Gens mit dem Computerprogramm *TFSEARCH ver 1.3* sowie die Einbeziehung bereits vorhandener Promotorstudien (Brambillasca *et al.*, 2001) wiesen darauf hin, dass die Transkriptionsfaktoren Ikaros2 (Übersicht bei Cortes *et al.*, 1999), Ets (*epithelium specific transcription factor*; Übersicht bei Sharrocks *et al.*, 1997) und GATA-1 (Übersicht bei Migliaccio *et al.*, 2005) an die häufig methylierten CpG-Dinukleotide 11, 13 und 14/15 im untersuchten TFPT-Promotorfragment binden können. Bei all diesen Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Proteine, die in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Für Transkriptionsfaktoren aus der Ets-Familie wurde jedoch bereits gezeigt, dass die entsprechenden Gene auch in anderen Geweben exprimiert werden (Übersicht bei Maroulakou & Bowe, 2000). Über den Transkriptionsfaktor GATA-1 ist bekannt, dass er die Genexpression seiner Zielgene durch die Acetylierung des Histonproteins H3 im Promotorbereich aktivieren kann (Kiekhaefer *et al.*, 2002). Die Inhibition des GATA-1-Bindungsmotivs durch DNA-Hypermethylierung würde demnach dazu führen, dass die Chromatinstruktur im TFPT-Promotor nicht für andere Transkriptionsfaktoren zugänglich wird und die Transkription aus diesem Grund nicht stattfinden kann. Welche Transkriptionsfaktoren in neuronalen Zellen die Expression des *tfpt*-Gens regulieren und an welche Regionen des TFPT-Promotors diese Transkriptionsfaktoren binden, ist bisher nicht bekannt. Es kann deshalb keine Aussage darüber getroffen werden, ob auch die DNA-Bindung von gehirnspezifischen Transkriptionsfaktoren durch die Methylierung der häufig methylierten CpG-Dinukleotide 7/8, 10, 11, 13, 14/15, 16 im TFPT-Promotor blockiert werden könnte. Um die Genexpression stillzulegen, müssen nach aktuellem Forschungsstand die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren nicht direkt von einer DNA-Methylierung betroffen sein. Eine transkriptionelle Stilllegung von Genen wird vielmehr durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener epigenetischer Modifikationen bewerkstelligt (Übersicht bei Klose & Bird, 2006). An diesem Prozess sind vor allem die initiale Methylierung von Cytosinbasen durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs), die Blockierung der DNA durch Methylcytosin-Bindeproteine (MBPs) sowie eine Verdichtung der

Chromatinstruktur durch Histon-Deacetylierung und Histon-Methylierung beteiligt. In Folge dessen wird der betroffene DNA-Bereich eines Gens für die Faktoren der Transkriptionsmaschinerie unzugänglich, so dass eine Genexpression nicht mehr stattfinden kann (Übersicht bei Geiman & Robertson, 2002).

### **5.2.2 Die Herunterregulation der Par-4-Expression wird nur in zwei Gliom-Zelllinien durch Promotor-Hypermethylierung induziert**

Viele Studien haben gezeigt, dass die Expression des pro-apoptotischen Par-4-Proteins in verschiedenen Tumoren herunterreguliert ist, so zum Beispiel in Nierenzellkarzinomen (Cook *et al.*, 1999), in Melanomen (Lucas *et al.*, 2001), in verschiedenen Leukämien (Boehrer *et al.*, 2001) und in Prostatakarzinomen (Chakraborty *et al.*, 2001). Des Weiteren ist bekannt, dass eine ektopische Expression von Par-4 in den meisten Tumorzellen ausreichend ist, um die Apoptose einzuleiten (Nalca *et al.*, 1999; Chakraborty *et al.*, 2001; El-Guendy *et al.*, 2003; Vetterkind *et al.*, 2005a; Lucas *et al.*, 2001). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass die Herunterregulation der Par-4-Expression für die Ras-induzierte Transformation in der murinen Fibroblasten-Zelllinie NIH-3T3 essentiell ist (Qiu *et al.*, 1999). Im Jahr 2005 wurde Par-4 erstmals als ein Protein mit Tumorsupressor-Aktivität beschrieben, da der homozygote Verlust der Par-4-Allele in *knock-out* Mäusen zu einer vermehrten Tumorentwicklung führt (Garcia-Cao *et al.*, 2005). Vor Beginn dieser Doktorarbeit wurde veröffentlicht, dass der Par-4-Promotor in Ras-transformierten Fibroblasten- und Epithelzelllinien hypermethyliert ist und daher die Par-4-Expression in diesen Zellen herunterreguliert sein könnte (Pruitt *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte Anfang diesen Jahres von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Par-4-Expression sowohl in Tumorzelllinien, die aus Endometriumkarzinomen etabliert wurden, wie auch in primärem Endometriumkarzinomgewebe durch Promotor-Methylierung epigenetisch stillgelegt ist (Moreno-Bueno *et al.*, 2007). All diese Hinweise lassen vermuten, dass das *par-4*-Gen in verschiedenen Tumorarten durch Promotor-Hypermethylierung inaktiviert sein könnte. Daher sollte der Methylierungsstatus eines Par-4-Promotorfragments in verschiedenen Tumorzelllinien sowie in verschiedenen Tumorgewebe-proben analysiert werden.

Die Befunde, dass in den humanen Tumorzelllinien Molt-4, Saos-2, MCF-7, U87-MG und U251-MG nur ein schwaches bzw. kein Par-4-Transkript detektiert wurde und dass die Par-4-mRNA-Expression nach Behandlung der Gliom-Zelllinien U178-MG, U251-MG, U373-MG und A172 und der Medulloblastom-Zelllinie D283 mit dem DNA-Demethylierungsreagenz 5-Aza-2'-deoxycytidin induziert werden konnte, deuteten darauf hin, dass der Par-4-Promotor



durch Hypermethylierung stillgelegt sein könnte. Die Analyse des Methylierungsstatus des Par-4-Promotors bestätigte diese Annahme in den untersuchten Gliom-Zelllinien U251-MG und U373-MG, in denen eine starke DNA-Methylierung im untersuchten Promotorbereich detektiert wurde. In den Tumorzelllinien Molt-4, U87-MG, U178-MG, A172, SH-SY5Y und D283 konnte hingegen keine Hypermethylierung des untersuchten Par-4-Promotorfragments nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung des Par-4-Promotorfragments in genomischer DNA aus Mammakarzinomen (Daten nicht gezeigt) und Prostatakarzinomen verschiedener Patienten konnte ebenfalls keine DNA-Hypermethylierung detektiert werden. Für die Analyse des Par-4-Promotors in DNA-Proben, die aus primärem Gliomgewebe verschiedener Patienten isoliert wurden, wurde der untersuchte Promotorbereich erweitert, um mehr CpG-Dinukleotide in die Untersuchung mit einbeziehen zu können. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten nur für 5 % der untersuchten primären Glioblastome, jedoch für 31 % der sekundären Glioblastome eine schwache DNA-Methylierung des Par-4-Promotors. Weder in den diffusen Astrozytomen, noch in den anaplastischen Astrozytomen konnte eine DNA-Methylierung in CpG-Dinukleotiden detektiert werden. Nach der Bestimmung der relativen Par-4-mRNA-Expression zeigte sich, dass in allen untersuchten Gliomproben, selbst in den Gliomproben, in denen der Par-4-Promotor schwach methyliert war, die Par-4-Expression gegenüber dem Kontrollgewebe stark erhöht war. Es konnte demnach keine Korrelation zwischen der schwachen Hypermethylierung des Par-4-Promotors im Glioblastomgewebe und dem Par-4-mRNA-Expressionsstatus nachgewiesen werden. Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser Studien der Schluss ziehen, dass die *par-4*-Genexpression in den meisten untersuchten Tumorzelllinien und primären Tumorgeweben nicht durch Promotor-Hypermethylierung im untersuchten Bereich inhibiert wird. Nach Behandlung der Tumorzelllinien U178-MG, U251-MG, U373-MG, A172 und D283 mit dem DNA-Demethylierungsreagenz 5-Aza-2'-deoxycytidin konnte allerdings beobachtet werden, dass die Par-4-mRNA-Expression durch diese Behandlung induziert werden konnte. Dieser Befund lässt vermuten, dass die DNA-Hypermethylierung bei der Deregulation des Par-4-Transkripts dennoch eine Rolle spielen könnte. Möglicherweise ist der Par-4-Promotor in einem anderen Bereich methyliert, der in unseren Studien nicht berücksichtigt wurde. Des Weiteren kann man vermuten, dass die *par-4*-Genexpression von Transkriptionsfaktoren reguliert wird, deren Promotoren selbst aufgrund von DNA-Hypermethylierung stillgelegt sind. Diese Vermutung wird gestützt durch die Ergebnisse, dass die Ras-vermittelte Herunterregulation der Par-4-Expression mit der Hochregulation von *de novo* DNMTs einhergeht (Pruitt *et al.*, 2005). Die induzierte Expression der *de novo* DNMTs könnte zur

vermehrten Methylierung von Cytosinbasen in den CpG-Inseln der Promotoren führen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, die die *par-4*-Genexpression regulieren. Andere Studien haben gezeigt, dass die Genexpression nach Behandlung von Zellen mit 5-Aza-2'-deoxycytidin nicht nur durch DNA-Demethylierung, sondern auch durch Hyperacetylierung (Takebayashi *et al.*, 2001) oder Demethylierung (Nguyen *et al.*, 2002) von Histonproteinen im entsprechenden Promotorbereich induziert werden kann. Beispielsweise kann die Expression der Gene *dsc3* und *maspin* in Mammakarzinom-Zelllinien durch 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung reaktiviert werden, indem die Behandlung der Zellen mit dem Reagenz zur Demethylierung der Histonproteine H3 an der AS Lysin<sub>9</sub> in den entsprechenden Promotorregionen führt (Wozniak *et al.*, 2007). Diese epigenetischen Chromatinmodifikationen wurden in unserem experimentellen Ansatz nicht untersucht und können deshalb als Ursache für die verminderte *par-4*-Genexpression bzw. die Induktion der *par-4*-Genexpression nach 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung nicht ausgeschlossen werden.

### 5.2.3 Der Dlk/ZIPK-Promotor ist nicht hypermethyliert

Die ZIPK, das humane Ortholog der Dlk, bildet zusammen mit vier weiteren Vertretern die Familie der DAP-Kinasen, die eine hohe Sequenzhomologie in ihrer Kinase-Domäne aufweisen und die alle in apoptotische Prozesse involviert sind (Übersicht bei Kögel *et al.*, 2001). Promotorstudien der DAP-Kinase (*death associated protein kinase*) haben bereits gezeigt, dass das *dapk*-Gen in zahlreichen malignen Erkrankungen durch DNA-Hypermethylierung stillgelegt ist (Fischer *et al.*, 2006; Mittag *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2005; Schildhaus *et al.*, 2005). Methylierungsspezifische Analysen für den Promotor des *zipk*-Gens wurden bisher nicht durchgeführt. Als ein in den apoptotischen Prozess involviertes Protein stellt jedoch auch die ZIPK ein potentielles Zielgen von DNA-Hypermethylierung während der Tumorgenese dar, so dass in Rahmen dieser Arbeit auch der Methylierungsstatus des ZIPK-Promotors untersucht werden sollte.

Anhand von mRNA-Expressionsstudien konnte in dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass alle untersuchten humanen Tumorzelllinien mit Ausnahme der Gliom-Zelllinie U251-MG und der Osteosarkom-Zelllinie Saos-2 eine ZIPK-mRNA-Expression aufwiesen, jedoch wurde nur ein schwaches ZIPK-Transkript in der leukämische T-Zelllinie Molt-4 und in der Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie MCF-7 nachgewiesen. Nach der Behandlung von Tumorzelllinien des zentralen Nervensystems konnte beobachtet werden, dass die *zipk*-Genexpression in den Gliom-Zelllinien LN428 und A172 sowie in den Medulloblastom-Zelllinien Med8A, D283 und Daoy induziert werden konnte. Die Sequenzanalyse des amplifizierten Promotorfragments des

*zipk*-Gens verdeutlichte jedoch, dass die untersuchte ZIPK-Promotorregion in den Tumorzelllinien, die nach Induktion der DNA-Demethylierung einen erhöhten ZIPK-mRNA-Expressionsstatus aufwiesen, keine DNA-Hypermethylierung zeigte. Nur in der Gliom-Zelllinie A172 wurde an zwei CpG-Dinukleotiden des ZIPK-Promotors eine schwache DNA-Methylierung detektiert. In der Sequenzanalyse eines weiter stromaufwärts gelegenen ZIPK-Promotorbereichs (siehe Anhang B, Amplifikation mit den Oligonukleotiden *ZIPK-bs-f3* und *ZIPK-bs-r3b*) aus der Zelllinie A172 konnte wiederum keine DNA-Methylierung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine methylierungsspezifische Analyse des ZIPK-Promotors in den Zelllinien Molt-4 und MCF-7, die nur ein geringes ZIPK-Transkript aufweisen, zeigte ebenso keine DNA-Methylierung. Die Untersuchung drei primärer Glioblastomgewebe bestätigten die vorangegangenen Befunde, dass das für die Studien amplifizierte DNA-Fragment des ZIPK-Promotors nicht durch DNA-Hypermethylierung modifiziert wird (Daten nicht gezeigt). So kann für das *zipk*-Gen eine direkte Stilllegung durch DNA-Methylierung in allen untersuchten Tumorzelllinien und Gliomproben nahezu ausgeschlossen werden. Wie für Par-4 bereits diskutiert ist jedoch eine indirekte Regulation der ZIPK-mRNA-Expression durch DNA-Hypermethylierung bzw. eine epigenetische Stilllegung der Genexpression durch Histonmodifikationen möglich, da die ZIPK-mRNA-Expression nach Behandlung einiger Tumorzellen des zentralen Nervensystems mit 5-Aza-2'-deoxycytidin-Behandlung induziert werden konnte.

### **5.3 EFP1, DER NEUE PAR-4-INTERAKTIONSPARTNER, IST EIN ER-STRESS INDUZIERTES GLYKOPROTEIN**

Im zweiten Teil dieser Doktorarbeit sollte das Thioredoxin-ähnliche Protein EFP1 (*EF-hand binding protein*) aus der Ratte, das in unserer Arbeitsgruppe als neuer Interaktionspartner von Par-4 in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System isoliert wurde (Dissertation Boosen, 2007), näher charakterisiert werden. Mit Hilfe von Sequenz- und Funktionsanalysen konnte für das EFP1-Protein bereits eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie eine schwache Reduktase-Aktivität in einem Insulin-Disulfid-Reduktionstest nachgewiesen werden (Diplomarbeit Koplin, 2004). Das humane EFP1-Protein wurde ursprünglich als Interaktionspartner von Duox-Proteinen identifiziert, die selbst eine wichtige Rolle bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in der Schilddrüse spielen und so an der Thyroid-Hormonsynthese beteiligt sind. EFP1 ist ein hoch konserviertes Protein mit Orthologen in verschiedenen Spezies (Wang *et al.*, 2005), wobei Proteinsequenzanalysen der EFP1-Orthologe eine starke Sequenzidentität mit der höchsten Homologie zwischen den AS 51-304 und den AS 564-767 zeigen konnten

(siehe Anhang B). Des Weiteren haben Expressionsstudien gezeigt, dass sowohl das Ratten-Ortholog wie auch das humane Ortholog von EFP1 ubiquitär exprimiert wird (Diplomarbeit Maertens, 2003; Wang *et al.*, 2005).

### 5.3.1 EFP1 weist Sequenzhomologien zu PDI-Proteinen auf

Das EFP1-Protein beinhaltet eine potentiell funktionelle Thioredoxindomäne mit einem charakteristischen CXXC-Motiv eines katalytischen Zentrums (THX<sub>2</sub>), eine potentielle Thioredoxindomäne mit einem inaktiven katalytischen Zentrum (THX<sub>1</sub>) sowie eine Thioredoxin-ähnliche Domäne (Holmgren *et al.*, 1975). Darüber hinaus konnte anhand computergestützter Sequenzanalysen mit dem *PredictProtein*-Programm gezeigt werden, dass das EFP1-Protein eine für PDI (*protein disulfide isomerase*)-Proteine charakteristische  $\alpha$ -Helix/ $\beta$ -Faltblatt Sekundärstruktur ausweist (Analysen durchgeführt von Dr. Susanne Vetterkind). PDI-Proteine gehören zur Superfamilie der Thioredoxin-Proteine und können die Oxidation, Reduktion und Isomerisierung von inter- oder intramolekularen Disulfidbrücken katalysieren (Übersicht bei Ferrari & Soling, 1999). Die meisten Proteinmitglieder der PDI-Familie besitzen die Domänenstruktur a-b-b'-a'-c, dabei symbolisiert a und a' katalytisch aktive Thioredoxindomänen, b und b' Thioredoxin-ähnliche Domänen ohne katalytisch aktives Zentrum und c stellt eine Ca<sup>2+</sup>-Bindedomäne dar (Übersicht bei Ellgaard & Ruddock, 2005; Übersicht bei Ferrari & Soling, 1999). Im Vergleich dazu weist das EFP1-Protein die Domänenstruktur a-b-x-a'-LZ auf. Die Thioredoxindomäne a (THX<sub>1</sub>) ist im EFP1-Protein allerdings inaktiv, x stellt einen uncharakterisierten Proteinabschnitt dar und LZ symbolisiert das Leucin-Zipper-Motiv. Eine Übersicht der Strukturanalyse des EFP1-Proteins befindet sich in Anhang B. Obwohl die Domänenstruktur des EFP1-Proteins nicht vollständig mit der Domänenstruktur von PDI-Protein übereinstimmt, könnte EFP1 ein neuartiges Mitglied der PDI-Familie darstellen. Diese Hypothese wird gestützt durch den Befund, dass die EFP1-Expression, genau wie die Expression vieler PDI-Mitglieder, durch die Induktion von ER-Stress hochreguliert werden kann (Übersicht bei Boyce & Juan, 2006). Zusammenfassend deuten sowohl die strukturelle Homologie des EFP1-Proteins zu PDI-Proteinen wie auch die Induktion der EFP1-Expression durch ER-Stress darauf hin, dass EFP1 in der Zelle an der Beseitigung missgefalteter Protein im ER beteiligt ist und an der Protektion der Zelle nach ER-Stress eine wichtige Rolle spielen könnte.

### 5.3.2 EFP1 ist ein ER-ständiges Glykoprotein

Aufgrund der durchgeführten Experimente mit der Endoglykosidase H (EndoH) konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass das EFP1-Protein *in vivo* durch N-Glykosylierung

modifiziert wird. Im Prozess der N-Glykosylierung werden mannosereiche Zuckerketten an Asparaginreste in der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr übertragen und durch die Glukosidasen I und II schrittweise prozessiert. Werden die glykosylierten Proteine anschließend aus dem ER in den Golgi-Apparat transportiert, erfolgt eine Modifikation der mannosereichen Zuckerketten durch spezifische Glukosidasen und Transferasen, so dass im Golgi-Kompartiment hauptsächlich komplex glykosylierte Proteinen vorliegen. Der Vesikeltransport vom ER zum Golgi verläuft unidirektional, daher kann aufgrund des Glykosylierungsmusters eines Proteins auf dessen subzelluläre Lokalisation geschlossen werden (Übersicht bei Kornfeld & Kornfeld, 1985). Da die glykosylierte EFP1-Proteinvariante sensitiv gegenüber einer enzymatischen Behandlung mit der EndoH war und da die EndoH nur mannosereiche Oligosaccharide, nicht aber komplexe N-Glykane von Proteinen abspalten kann (Robbins *et al.*, 1984), ist eine ausschließliche Lokalisation des EFP1-Proteins im ER wahrscheinlich. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das ektopisch exprimierte EFP1-Protein nicht vollständig glykosyliert ist, weil die Glykosylierungsmaschinerie der Zelle mit den hohen Mengen von überexprimiertem EFP1 überlastet ist. Tatsächlich konnte bereits für das Duox-Protein, einem Interaktionspartner des humanen EFP1-Proteins, gezeigt werden, dass das überexprimierte Duox-Protein nicht vollständig glykosyliert wird und aufgrund der unvollständigen posttranslationalen Modifikation nicht funktionell ist (Ameziane-El-Hassani *et al.*, 2005). Wie in Proteinsequenzanalysen gezeigt werden konnte, besitzt das EFP1-Protein mehrere potentielle N-Glykosylierungsstellen (Diplomarbeit Koplin, 2004). Um die N-Glykosylierungsstellen von EFP1 zu identifizieren, wurden die hoch konservierten Asparaginreste Asn<sub>295</sub> und Asn<sub>443</sub> im EFP1-Protein durch ortsspezifische Mutagenese in die AS Serin ausgetauscht, und so die Mutanten EFP1-A295S und EFP1-A443S generiert. Durch die Behandlung der EFP1-Mutanten EFP1-A295S und EFP1-A443S mit der EndoH konnte gezeigt werden, dass beide AS im EFP1-Protein, Asn<sub>295</sub> und Asn<sub>443</sub>, durch N-Glykosylierung *in vivo* modifiziert werden. Weitere N-Glykosylierungsstellen im EFP1-Protein konnten anhand des Experiments jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Sequenzanalysen haben gezeigt, dass das EFP1-Protein kein für ER-Proteine typisches KDEL-Retentionssignal (Pelham, 1988) beinhaltet (Diplomarbeit Koplin, 2004). Möglicherweise besitzt das EFP1-Protein jedoch ein alternatives ER-Retentionssignal, das bisher nicht identifiziert werden konnte. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde eine Proteinstrukturanalyse mit dem Programm PSORT II (Nakai & Horton, 1999) durchgeführt. Mit Hilfe dieses Programms konnte eine potentielle Transmembrandomäne für das EFP1-Protein identifiziert werden, die die AS 60-76 umfasst und die sich innerhalb der ER-

Signalsequenz befindet (siehe Anhang B). Zahlreiche Studien belegen, dass ER-ständige Transmembranproteine kein KDEL-Motiv, sondern variable ER-Retentionsmotive wie zum Beispiel das C-terminal gelegene KKXX-Motiv (Jackson *et al.*, 1990), das N-terminale XXRR-Motiv (Schutze *et al.*, 1994) oder die AS-Folge CVLF (Zarei *et al.*, 2004) beinhalten. Im EFP1-Protein konnte jedoch keines dieser ER-Retentionsmotive identifiziert werden. Darüber hinaus ist beschrieben worden, dass das Vorhandensein einer N-terminal gelegenen Transmembrandomäne Proteine im ER zurückhalten und eine Translokation in den Golgi-Apparat verhindern kann (Murakami *et al.*, 1994). Um zu überprüfen, ob die potentielle Transmembrandomäne von EFP1 für die Retention des EFP1-Proteins im ER zuständig ist, könnte die potentielle Transmembrandomäne von EFP1 mit einem sonst sekretorischen Protein fusioniert und anschließend die subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins untersucht werden.

### 5.3.3 Charakterisierung der Interaktion von Par-4 und EFP1

In den bisher durchgeführten Studien konnte die Interaktion zwischen Par-4 und EFP1 *in vivo* durch Ko-Immünpräzipitationsanalysen bestätigt werden (Diplomarbeit Koplín, 2004). Allerdings konnte keine Kolokalisation von EFP1 und Par-4 in Säugerzellen, selbst nach der Induktion von ER-Stress oder nach der Induktion der Apoptose, beobachtet werden. Vorstellbar ist, dass nur eine Subfraktion von EFP1 und Par-4 in der Zelle interagieren oder dass die Interaktion zwischen den beiden Proteinen nur transient stattfindet und dass die Kolokalisation der Proteine in fluoreszenzmikroskopischen Analysen daher nur schwer nachweisbar ist. Ob es einen physiologischen Stimulus gibt, der zur detektierbaren Kolokalisation von Par-4 und EFP1 führt, bleibt zu klären, da bisher ein solcher Stimulus nicht identifiziert werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dennoch gezeigt werden, dass die Koexpression von Par-4 und EFP1 zu einer signifikanten Erhöhung der Par-4-vermittelten Apoptose in Hamster-Fibroblasten führt. Des Weiteren konnte verdeutlicht werden, dass ein funktionelles katalytisches Zentrum in der zweiten Thioredoxindomäne (THX<sub>2</sub>) des EFP1-Proteins für den Effekt, den koexprimiertes EFP1 auf die Par-4-induzierte Apoptose ausübt, essentiell ist. Wie bereits diskutiert, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das ektopisch exprimierte EFP1-Protein aufgrund unzureichender posttranslationaler Modifikation nicht voll funktionsfähig ist. Daher wäre es möglich, dass das endogene EFP1-Protein eine stärkere Induktion der Par-4-vermittelten Apoptose bewirken kann. Die Steigerung der Apoptoserate durch die Koexpression von Par-4 und EFP1 wt im Vergleich zur alleinigen Expression von Par-4 bzw. im Vergleich zur Koexpression von Par-4 und der EFP1<sup>THX</sup>-

Mutante lassen vermuten, dass das EFP1-Protein als Regulator von Par-4 fungieren könnte und dass die regulatorische Funktion von einem funktionellen katalytischen Zentrum in der zweiten Thioredoxindomäne (THX<sub>2</sub>) und so von der enzymatischen Reduktase-Aktivität von EFP1 vermittelt werden könnte. Das Par-4-Protein beinhaltet drei Cysteinreste an der Position 82, 103 und 165, die an der korrekten Faltung des Proteins durch die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt sein könnten. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von EFP1 zu Mitgliedern der PDI-Familie ist es denkbar, dass EFP1 als Chaperon bzw. Disulfid-Isomerase die Faltung des Par-4-Proteins beeinflussen und so die Aktivität des pro-apoptischen Proteins kontrollieren könnte (Vetterkind *et al.*, eingereicht). Wie die Proteine Par-4 und EFP1 trotz unterschiedlicher Lokalisation in der Zelle interagieren könnten, bleibt zu untersuchen. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass viele Mitglieder der PDI-Familie nicht ausschließlich im ER, sondern auch im Zellkern, im Zytosol, auf der Zelloberfläche oder im Extrazellularraum detektiert werden können (Übersicht bei Turano *et al.*, 2002). Auch das ER-Protein BiP/GRP78 kann im Verlauf des *unfolded protein response* (UPR)-Signalweges vom ER zu den Mitochondrien translozieren (Sun *et al.*, 2006). Deshalb ist es nicht ausgeschlossen, dass das EFP1-Protein, obwohl es bisher nur im ER detektiert werden konnte, auch im Zytosol der Zelle lokalisiert sein und dort mit dem Par-4-Protein interagieren könnte. Ob nun möglicherweise eine kleine Fraktion des EFP1-Proteins ständig außerhalb des ERs lokalisiert ist oder ob eine potentielle Relokalisation von EFP1 aus dem ER nach einem bestimmten Stimulus stattfindet, bleibt durch weitere experimentelle Studien zu klären.

#### **5.3.4 Hypothetische Funktion von EFP1 und Par-4 bei ER-Stress**

Die Induktion von ER-Stress und die dadurch induzierte Apoptose spielen in vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit (Übersicht bei Katayama *et al.*, 2004) und der Parkinson-Krankheit (Übersicht bei Takahashi *et al.*, 2003) eine bedeutende Rolle. Interessant ist, dass das pro-apoptische Protein Par-4 eine wichtige Funktion bei der ER-Stress induzierten Apoptose in der Alzheimer-Krankheit ausübt (Übersicht bei Mattson *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine deregulierte Par-4-Expression mit neurodegenerativen Krankheiten, so zum Beispiel mit der Amyotrophischen Lateralsklerose (ALS, Xie *et al.*, 2005; Pedersen *et al.*, 2000), mit dem Ischämischen Tod von Nervenzellen (Culmsee *et al.*, 2001), aber auch mit der Parkinson-Krankheit (Duan *et al.*, 1999) und mit der Alzheimer-Krankheit (Guo *et al.*, 1998; Xie & Guo, 2005) in Verbindung gebracht wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass

sowohl die Par-4-Expression wie auch die EFP1-Expression nach der Induktion von ER-Stress hochreguliert werden können und dass die Koexpression von EFP1 und Par-4 zu einer verstärkten Par-4-induzierten Apoptose führt. Aus der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lässt sich ein hypothetisches Modell für die Funktion von EFP1 und Par-4 in der ER-Stress induzierten Apoptose herleiten: Nach der Auslösung von ER-Stress, zum Beispiel durch die Akkumulation missgefalteter Proteine im ER-Lumen, kann die EFP1-Expression induziert werden. Das EFP1-Protein kann nun zusammen mit anderen ER-Chaperonen zur Beseitigung der missgefalteten Proteine beitragen. Dauert der durch die akkumulierten Proteine ausgelöste ER-Stress weiter an und kann die Integrität des ERs nicht wieder hergestellt werden, führt dies zur Störung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in der Zelle, wodurch die Par-4-Expression induziert wird. In der Gegenwart von erhöhten Par-4-Proteinmengen könnte EFP1 als Aktivator des Par-4-Proteins fungieren, indem es die Faltung des neu gebildeten Par-4-Proteins unterstützt, wodurch das aktivierte Par-4 die Apoptose einleiten kann. Der genaue Mechanismus des Par-4/EFP1-vermittelten Signalwegs bleibt jedoch noch zu untersuchen.

## 5.4 AUSBLICK

Das Par-4-Protein kann nach Überexpression normale Zellen für apoptotische Stimuli sensitivieren oder in den meisten Tumorzellen direkt zur Induktion der Apoptose führen. In Ratten-Fibroblasten ist Par-4 zusammen mit der Dlk in der Lage, direkt die Apoptose zu induzieren. Dabei spielt die Aktin-Assoziation von Par-4, die Rekrutierung der Dlk aus dem Zellkern an die Aktinfilamente und die für die Kontraktion des Aktomyosin-Systems verantwortliche Phosphorylierung der leichten Kette von Myosin II (MLC) an der AS Serin<sub>19</sub> eine entscheidende Rolle. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung der Par-4/Dlk-induzierten MLC-Phosphorylierung in der ER-Stress-vermittelten Apoptose hin. Da bekannt ist, dass viele neurodegenerative Erkrankungen mit ER-Stress-vermittelter Apoptose in direktem Zusammenhang stehen und dass die Par-4-induzierte Apoptose in neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt, sollten weitere Studien klären, inwieweit das Zytoskelett bei der Par-4-vermittelten, ER-Stress induzierten neuronalen Apoptose eine Rolle spielt. In diesen Kontext scheint auch der neue Par-4-Interaktionspartner EFP1 involviert zu sein. Als ER-ständiges Glykoprotein mit Strukturhomologien zu PDI-Proteinen könnte EFP1 an der Beseitigung von ER-Stress beteiligt sein, wobei diese Theorie durch die Hochregulation der EFP1-Expression nach ER-Stress gestützt wird. In Koexpressionsstudien ist EFP1 in der Lage, die Par-4-induzierte Apoptose in



Hamster-Fibroblasten signifikant zu steigern. Da auch die endogene Par-4-Expression nach Induktion von ER-Stress induziert werden kann, kann eine essentielle Funktion für EFP1 und Par-4 in der ER-Stress-vermittelten Apoptose vermutet werden. Das EFP1-Protein könnte eine Verbindung zwischen ER-Stress und Par-4-vermittelter Apoptose darstellen, indem EFP1 als Chaperon zunächst bei der Wiederherstellung der ER-Integrität mitwirkt und nach anhaltendem ER-Stress das Par-4-Protein aktiviert. Weitere Studien auf diesem Gebiet könnten zur Entwicklung neuer Therapieansätze bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen beitragen, in denen die Par-4-vermittelte Apoptose eine Rolle spielt.

Mit Hilfe von methylierungsspezifischen Analysen konnte deutlich gezeigt werden, dass die Stilllegung des *amida/tfpt*-Gens in primärem Glioblastomgewebe auf Promotor-Hypermethylierung beruht. Da Amida/TFPT im Gehirn einen hohen Expressionsstatus aufweist, lässt sich eine essentielle Funktion für das Amida/TFPT-Protein bei der Aufrechterhaltung der Integrität dieses Gewebes vermuten. Ob der Verlust des proapoptischen Amida/TFPT-Proteins eine Begleiterscheinung der Transformation von Gliomzellen ist, oder ob die Verringerung der Amida/TFPT-Expression selbst eine Strategie darstellen könnte, die den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil verschafft, müssen weitere Untersuchungen klären. Ausgeweitete Studien zur Involvierung einer epigenetisch bedingten Stilllegung des *amida/tfpt*-Gens in anderen Tumorentitäten stellen sicherlich interessante zukünftige Forschungsgebiete dar. Es sollten dabei besonders Leukämie-Erkrankungen im Mittelpunkt stehen, da ein Funktionsverlust von Amida/TFPT durch die Fusion mit dem Transkriptionspartner E2A hier bereits nachgewiesen werden konnte und man deshalb annehmen kann, dass ein Verlust der Amida/TFPT-Expression, ausgelöst durch Promotor-Hypermethylierung, ebenfalls zur Tumorgenese dieser Zellen führen kann. Für die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Krebsbekämpfung sollte darüber hinaus der Mechanismus der Amida/TFPT-induzierten Apoptose weiter aufgeklärt und die Involvierung von Par-4 und Dlk/ZIPK in diesem Kontext untersucht werden. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Dlk/ZIPK-Expression in den untersuchten Tumorzelllinien und Gliomgeweben hingegen nicht durch Promotor-Hypermethylierung epigenetisch stillgelegt ist. Auch für die Par-4-Expression konnte in fast allen Tumorzelllinien sowie in den untersuchten Gliom- und Prostatakarzinom- und Mammakarzinomgeweben eine Inhibition durch Promotor-Hypermethylierung ausgeschlossen werden. Aufgrund der durchgeführten 5-Aza-2'-deoxycytidin-Versuche mit den Tumorzelllinien des zentralen Nervensystems lässt sich jedoch eine indirekte Regulation der Par-4- und Dlk/ZIPK-Expression durch DNA-Methylierung oder andere epigenetische

---

Modifikationen vermuten. Weitere experimentelle Studien sollten deshalb die Frage klären, ob die Regulation der *par-4*- bzw. *dlk/zipk*-Genexpression durch die methylierungsspezifische Stilllegung von Genen ausgelöst wird, deren Genprodukte für die Expression von Par-4 und Dlk/ZIPK benötigt werden oder ob zum Beispiel eine veränderte Histonmodifikation im Promotorbereich der *par-4*- und *zipk*-Gene eine Rolle bei der Stilllegung der Genexpression spielen könnte. Da keine Deregulation des Par-4-Proteins in den untersuchten Gliomgeweben detektiert werden konnte, sollte die Expression der dominant-negativen Par-4-Isoform Par-4/p33 in diesen Gliomproben sowie in Kontrollgewebe untersucht werden. Möglicherweise hat die Inhibition der Par-4-Expression in neuronalem Gewebe keine so wichtige Funktion bei der Tumorgenese, dafür aber die Inhibition des Par-4 wt-Proteins durch die Überexpression der Par-4/p33-Isoform.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Methoden etabliert, mit denen die endogene Par-4-Expression entweder herauf- oder herunterreguliert werden kann. Es wurde gezeigt, dass die Induktion der endogenen Par-4-Expression durch die ER-Stress auslösenden Reagenzien Ionomycin, Thapsigargin und Tunicamycin in N2A- und NIH-3T3-Zellen ebenso wie die ektopische Koexpression von Par-4 und Dlk in REF52.2-Zellen zu einer verstärkten MLC-Phosphorylierung an der AS Serin<sub>19</sub> führt. Eine siRNA-vermittelte Inhibition der Par-4-Expression kann die durch Ionomycin und Thapsigargin ausgelöste MLC-Phosphorylierung blockieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Induktion der Par-4-Expression durch Thapsigargin zu einer Aktivierung der Caspase-3 in N2A-Zellen führt und dass die Inhibition von Par-4 die Apoptose-Induktion nach der Auslösung von ER-Stress in N2A- und in HeLa-Zellen blockieren kann. Die neue Par-4-Isoform Par-4/p33 aus embryonalen Stammzellen der Maus wurde als dominant-negative Par-4-Mutante in der Par-4/Dlk-vermittelten Apoptose identifiziert, wobei der Wirkmechanismus nicht aufgeklärt wurde.

Anhand methylierungsspezifischer Promotoranalysen von Par-4 und seinen Interaktionspartnern Dlk/ZIPK und Amida/TFPT wurde gezeigt, dass der TFPT-Promotor sowohl in mehreren Tumorzelllinien wie auch in primärem Gliomgewebe einen hohen Methylierungsgrad aufweist. Die DNA-Hypermethylierung korrelierte in primärem Glioblastomgewebe mit einer verringerten TFPT-Transkription, was eine epigenetische Stilllegung des *tfpt*-Gens in diesen Tumoren vermuten lässt. Die Promotoranalysen des *par-4*-Gens zeigten, dass der Par-4-Promotor nur in den Gliom-Zelllinien U251-MG und U373-MG hypermethyliert ist. In allen anderen untersuchten Tumorzelllinien sowie in primärem Gliom-, Prostatakarzinom- und Mammakarzinomgewebe wurde keine bzw. nur eine schwache Par-4-Promotor-Hypermethylierung nachgewiesen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die *zipk*-Genexpression in allen untersuchten Tumorzelllinien und in primärem Gliomgewebe nicht durch Promotor-Hypermethylierung stillgelegt wird. Studien mit dem DNA-Demethylierungsreagenz 5-Aza-2'-deoxycytidin deuten jedoch darauf hin, dass sowohl das *par-4*- wie auch das *zipk*-Gen in den untersuchten Tumorzelllinien indirekt durch DNA-Methylierung oder andere epigenetische Modifikationen reguliert werden könnte.

Das in unserer Arbeitsgruppe als Interaktionspartner von Par-4 isolierte, Thioredoxin-ähnliche EFP1-Protein wurde als ER-ständiges Glykoprotein identifiziert. Die Hochregulation auf mRNA-Ebene nach Induktion von ER-Stress sowie die strukturellen Homologien zu Mitgliedern der PDI-Familie weisen dem EFP1-Protein eine Funktion bei der Protektion der Zelle vor ER-Stress zu. Obwohl keine Kolokalisation der Proteine EFP1 und Par-4 in CHO-Zellen beobachtet werden kann, führt die Koexpression von EFP1 und Par-4 in diesen Zellen, unabhängig von einer zusätzlichen Induktion von ER-Stress, zu einer signifikanten Steigerung der Par-4-vermittelten Apoptose. Möglicherweise agiert das EFP1-Protein als Vermittler zwischen ER-Stress und Par-4-induzierter Apoptose.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

Aagaard-Tillery KM, Jelinek DF (1995). Differential activation of a calcium-dependent endonuclease in human B lymphocytes. Role in ionomycin-induced apoptosis. *J Immunol* 155: 3297-3307.

Adams RL (1990). DNA methylation. The effect of minor bases on DNA-protein interactions. *Biochem J* 265: 309- 20.

Affar el B, Luke MP, Gay F, Calvo D, Sui G, Weiss RS, Li E, Shi Y (2006). Targeted ablation of Par-4 reveals a cell type-specific susceptibility to apoptosis-inducing agents. *Cancer Res* 66: 3456-3462.

Ameziane-El-Hassani R, Morand S, Boucher JL, Frapart YM, Apostolou D, Agnandji D, Gnidehou S, Ohayon R, Noel-Hudson MS, Francon J, Lalaoui K, Virion A, Dupuy C (2005). Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca<sup>2+</sup>-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity. *J Biol Chem* 280: 30046-30054.

Antonsson B (2004). Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol Cell Biochem* 256-257: 141-155.

Appel S, Waha A, Mikeska T, Felsberg J, Waha A, Pietsch T, Preuss U. Epigenetic silencing of the pro-apoptotic protein TFPT (FB1) in gliomas. (in Vorbereitung).

Baker SJ, Reddy EP (1995). B cell differentiation: role of E2A and Pax5/BSAP transcription factors. *Oncogene* 11: 413-426

Barkett M; Gilmore TD (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6910-6924.

Bass BL (2001). RNA interference. The short answer. *Nature* 411: 428-429.

Bassik MC, Scorrano L, Oakes SA, Pozzan T, Korsmeyer SJ (2004). Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptosis. *EMBO J* 23: 1207-1216.

Baylin SB, Ohm JE (2006). Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6: 107-116.

Beeler TJ, Jona I, Martonosi A (1979). The effect of ionomycin on calcium fluxes in sarcoplasmic reticulum vesicles and liposomes. *J Biol Chem* 254: 6229-6231.

Bergmann M, Kukoc-Zivojnov N, Chow KU, Trepohl B, Hoelzer D, Weidmann E, Mitrou PS, Boehrer S (2004). Prostate apoptosis response gene-4 sensitizes neoplastic lymphocytes to CD95-induced apoptosis. *Ann Hematol* 83: 646-653.

Berra E, Municio MM, Sanz L, Frutos S, Diaz-Meco MT, Moscat J (1997). Positioning atypical protein kinase C isoforms in the UV-induced apoptotic signaling cascade. *Mol Cell Biol* 17: 4346-4354.

Berridge MJ (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32: 235-249.

- Bestor TH (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9: 2395-2402.
- Bird A (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6-21.
- Birnboim HC, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
- Bock C, Reither S, Mikeska T, Paulsen M, Walter J, Lengauer T (2005). BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulphite sequencing. *Bioinformatics* 21: 4067-4068.
- Boehrer S, Chow KU, Puccetti E, Ruthardt M, Godziszard S, Krapohl A, Schneider B, Hoelzer D, Mitrou PS, Rangnekar VM, 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. *Hematol J* 2: 103-107.
- Boehrer S, Chow KU, Beske F, Kukoc-Zivojnov N, Puccetti E, Ruthardt M, Baum C, Rangnekar VM, Hoelzer D, Mitrou PS, 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.
- Boehrer S, Nowak D, Puccetti E, Ruthardt M, Sattler N, Trepohl B, Schneider B, Hoelzer D, Mitrou PS, Chow KU (2006). Prostate-apoptosis-response-gene-4 increases sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. *Leuk Res* 30: 597-605.
- Boghaert ER, Sells SF, Walid AJ, Malone P, Williams NM, Weinstein MH, Strange R, Rangnekar VM (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-Par4- Fusionskonstrukten und von Par4 Phosphorylierungsmutanten. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Boosen M (2007). Molekulargenetische und Zellbiologische Untersuchungen zur Par-4-induzierten Apoptose. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Boosen M, Vetterkind S, Koplín A, Illenberger S, 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.
- Boyce M, Yuan J (2006). Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 13: 363-373.
- Bradford MM (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.
- Brambillasca F, Mosna G, Ballabio E, Biondi A, Boulukos KE, Privitera E (2001). Promoter analysis of TFPT (FB1), a molecular partner of TCF3 (E2A) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 1250-1257.

- Brambillasca F, Mosna G, Colombo M, Rivolta A, Caslini C, Minuzzo M, Giudici G, Mizzi L, Biondi A, Privitera E (1999). Identification of a novel molecular partner of the E2A gene in childhood leukemia. *Leukemi*. 13: 369-375.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553.
- Burnette WN (1981). "Western Blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112: 195-203.
- Cadenas E, Davies KJ (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29: 222-230.
- Camandola S, Mattson MP (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.
- Carmell MA, Hannon GJ (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 11: 214-218.
- Chakraborty M, Qiu SG, Vasudevan KM, Rangnekar VM (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 JH, 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 BN, Wang JY (2003). Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat Rev Cancer* 3: 130-138.
- Chen M, He H, Zhan S, Krajewski S, Reed JC, Gottlieb RA (2001). Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/ reperfusion. *J. Biol. Chem* 276: 30724-30728.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31: 3497-3500.
- Cifone MG, De Maria R, Roncaiolo P, Rippon MR, Azuma M, Lanier LL, Santoni A, Testi R (1994). Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med* 180: 1547-1552.
- Cihak A (1974). Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology* 30: 405-422.
- Cohen O, Feinstein E, Kimchi A (1997). DAP-kinase is a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J* 16: 998-1008.
- Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF (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 SF, Shi Y, Walther MM, Linehan WM, Sukhatme VP, Weinstein MH, Rangnekar VM (1999). Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. *Oncogene* 18: 1205-1208.
- Cortes M, Wong E, Koipally J, Georgopoulos K (1999). Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr Opin Immunol* 11: 167-171.
- Couldwell WT, Hinton DR, He S, Chen TC, Sebat I, Weiss MH, Law RE (1994). Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines. *FEBS Lett* 345: 43-46.
- Crissman HA, Gadbois DM, Tobey RA, Bradbury EM (1991). Transformed mammalian cells are deficient in kinase-mediated control of progression through the G1 phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7580-7584.
- Cryns V, Yuan J (1998). Proteases to die for. *Genes Dev* 12: 1551-1570.
- Culmsee C, Zhu Y, Kriegstein J, Mattson MP (2001). Evidence for the involvement of Par-4 in ischemic neuron cell death. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 334-343.
- Danial NN, Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219.
- Diaz-Meco MT, Municio MM, Frutos S, Sanchez P, Lozano J, Sanz L, 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.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102: 33-42.
- Duan W, Zhang Z, Gash DM, Mattson MP (1999). Participation of prostate apoptosis response-4 in degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 46: 587-597.
- Dunne J, Drescher B, Riehle H, Hadwiger P, Young BD, Krauter J, Heidenreich O (2003). The apparent uptake of fluorescently labeled siRNAs by electroporated cells depends on the fluorochrome. *Oligonucleotides* 13: 375-380.
- Ehrlich M (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21: 5400-5413.
- Ekert PG, Vaux DL (1997). Apoptosis and the immune system. *Br Med Bull* 53: 591-603.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.
- Elbein AD (1984). Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides. *CRC Crit Rev Biochem* 16: 21-49.

- El-Guendy N, Rangnekar VM (2003). Apoptosis by Par-4 in cancer and neurodegenerative diseases. *Exp Cell Res* 283: 51-66.
- El-Guendy N, Zhao Y, Gurumurthy S, Burikhanov R, Rangnekar VM (2003). Identification of a unique core domain of par-4 sufficient for selective apoptosis induction in cancer cells. *Mol Cell Biol* 23: 5516-5525.
- Ellgaard L, Ruddock LW (2005). The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep* 6: 28-32.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagat S (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50.
- Engidawork E, Gulesserian T, Yoo BC, Cairns N, 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, Varfolomeev E (1995). The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. *Trends Biochem.Sci.* 20: 342-344.
- Ferrari DM, Soling HD (1999). The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J* 339: 1-10.
- Fischer JR, Ohnmacht U, Rieger N, Zemaitis M, Stoffregen C, Kostrzewa M, Buchholz E, Manegold C, Lahm H (2006). Promoter methylation of RASSF1A, RARbeta and DAPK predict poor prognosis of patients with malignant mesothelioma. *Lung Cancer* 54: 109-116.
- Forbes IJ, Zalewski PD, Giannakis C, Cowled PA (1992). Induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells and its prevention by phorbol ester. *Exp Cell Res* 198: 367-372.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37: 391-400.
- Franchini C, Fontana F, Minuzzo M, Babbio F, Privitera E (2006). Apoptosis promoted by up-regulation of TFPT (TCF3 fusion partner) appears p53 independent, cell type restricted and cell density influenced. *Apoptosis* 11: 2217-2224.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1827-1831.
- Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 263: 18545-18552.
- Gan Y, Taira E, Irie Y, Fujimoto T, Miki N (2003). Arrest of cell cycle by amida which is phosphorylated by Cdc2 kinase. *Mol Cell Biochem* 246: 179-85.



- Gao S, Wang H, Lee P, Melamed J, Li CX, Zhang F, Wu H, Zhou L, 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.
- Garcia-Cao I, Duran A, Collada M, Carrascosa MJ, Martin-Caballero J, Flores JM, Diaz-Meco MT, Moscat J, Serrano M (2005). Tumor-suppression activity of the proapoptotic regulator Par4. *EMBO Rep* 6: 577-583.
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196: 261-282.
- Geiman TM, Robertson KD (2002). Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? *J Cell Biochem* 87: 117-125.
- Geraschenko BI, Ueda K, Hino M, Hosoya H (2002). Phosphorylation at threonine-18 in addition to phosphorylation at serine-19 on myosin-II regulatory light chain is a mitosis-specific event. *Cytometry* 47: 150-157.
- Golstein P, Kroemer G (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32: 37-43.
- Gorlach A, Klappa P, Kietzmann T (2006). The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal* 8: 1391-1418.
- Goswami A, Burikhanov R, de Thonel A, Fujita N, Goswami M, Zhao Y, Eriksson JE, Tsuruo T, Rangnekar VM (2005). Binding and phosphorylation of par-4 by akt is essential for cancer cell survival. *Mol Cell* 20: 33-44.
- Gougeon ML (1997). Programmed cell death in HIV infection: dysregulation of BCL-2 and Fas pathways and contribution to AIDS pathogenesis. *Psychoneuroendocrinology* 22:S33-S39.
- Green DR, Kroemer G (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-629.
- Gresser I, Brouty-Boye D, Thomas MT, Macieira-Coelho A (1970). Interferon and cell division. I. Inhibition of the multiplication of mouse leukemia L 1210 cells in vitro by interferon preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66:1052-1058.
- Guo Q, Fu W, Xie J, Luo H, Sells SF, Geddes JW, Bondada V, Rangnekar VM, Mattson MP (1998). Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nat Med* 4: 957-962.
- Guo Q, 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 KM, Rangnekar VM (2005). Phosphorylation of Par-4 by protein kinase A is critical for apoptosis. *Mol Cell Biol* 25: 1146-1161.
- Gurumurthy S, Rangnekar VM (2004). Par-4 inducible apoptosis in prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 91: 504-512.

- Gutjahr MC, Rossy J, Niggli V (2005). Role of Rho, Rac, and Rho-kinase in phosphorylation of myosin light chain, development of polarity, and spontaneous migration of Walker 256 carcinosarcoma cells. *Exp Cell Res* 308: 422-438.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400: 464-468.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hannon GJ (2002). RNA interference. *Nature* 418: 244-251.
- Herman JG, Baylin SB (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349: 2042-2054.
- Hibino Y, Mariano TM, Kumar CS, Kozak CA, Pestka S (1991). Expression and reconstitution of a biologically active mouse interferon gamma receptor in hamster cells. Chromosomal location of an accessory factor. *J Biol Chem* 266:6948-6951.
- Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M (2004). Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 165: 347-356.
- Holmgren A, Soderberg BO, Eklund H, Branden CI (1975). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 2305-2309.
- Hsu SC, Kirschenbaum F, Miller J, Cordell B, McCarthy JV (2002). Structural and functional characterization of the upstream regulatory region of the human gene encoding prostate apoptosis response factor-4. *Gene* 295: 109-116.
- Irie Y, Yamagata K, Gan Y, Miyamoto K, Do E, Kuo C, Taira E, 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.
- Jackson MR, Nillson T, Peterson PA (1990). Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 265: 317-333.
- Jarvis WD, Kolesnick RN, Fornari FA, Traylor RS, Gewirtz DA, Grant S (1994). Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:73-77.
- Jellinger KA, Stadelmann CH (2000). The enigma of cell death in neurodegenerative disorders. *J Neural Transm Suppl* 60: 21-36.

- Jeltsch A, Nellen W, Lyko F (2006). Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. *Trends Biochem Sci* 31: 306-308.
- Jin Z, El-Deiry WS (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4: 139-163.
- Johnstone RW, See RH, Sells SF, Wang J, Muthukkumar S, Englert C, Haber DA, Licht JD, Sugrue SP, Roberts T, Rangnekar VM, 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.
- Katayama T, Imaizumi K, Manabe T, Hitomi J, Kudo T, Tohyama M (2004). Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat* 28: 67-78.
- Kaufman RJ (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13: 1211-1233.
- Kaufmann SH, Hengartner MO (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 11: 526-534.
- Kawai T, Akira S, Reed JC (2003). ZIP kinase triggers apoptosis from nuclear PML oncogenic domains. *Mol Cell Biol* 23: 6174-6186.
- Kawasaki H, Suyama E, Iyo M, Taira K (2003). siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res* 31: 981-987.
- Kazzaz J, Xu J, Palaia T, Mantell L, Fein A, Horowitz S (1996) Cellular oxygen toxicity; oxidant injury without apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 271: 15182–15186.
- Keller CLA (2003). Ausschaltung der Dlk mittels der siRNA Technik und Analyse des daraus resultierenden Phänotyps. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
- Ketting RF, Haverkamp TH, van Luenen HG, Plasterk RH (1999). Mut-7 of *C elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 99: 133-141.
- Kiekhäfer CM, Grass JA, Johnson KD, Boyer ME, Bresnick EH (2002). Hematopoietic-specific activators establish an overlapping pattern of histone acetylation and methylation within a mammalian chromatin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14309-14314.
- Kinzler KW, Vogelstein B (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386: 761-763.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 215-225.

- Kleihues P, Ohgaki H (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncol* 1: 44-51.
- Klimiuk PA, Bernacka K, Kuryliszyn-Moskal A (1995). Apoptosis in autoimmune diseases. *Rocz Akad Med Bialymst* 40: 227-232.
- Klose RJ, Bird AP (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31: 89-97.
- Knight E Jr (1976). Antiviral and cell growth inhibitory activities reside in the same glycoprotein of human fibroblast interferon. *Nature* 262:302-303.
- Kogel D, Plottner O, Landsberg G, Christian S, Scheidtmann KH (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.
- Kogel D, Bierbaum H, Preuss U, Scheidtmann KH (1999). C-terminal truncation of Dlk/ZIP kinase leads to abrogation of nuclear transport and high apoptotic activity. *Oncogene* 18: 7212-7218.
- Kogel D, Prehn JH, Scheidtmann KH (2001). The DAP kinase family of pro-apoptotic proteins: novel players in the apoptotic game. *Bioessays* 23: 352-358.
- Kohler C, Orrenius S, Zhivotovsky B (2002). Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* 265: 97-110.
- Komatsu S, 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.
- Kong WJ, Zhang S, Guo C, Zhang S, Wang Y, Zhang D (2005). Methylation-associated silencing of death-associated protein kinase gene in laryngeal squamous cell cancer. *Laryngoscope* 115: 1395-1401.
- Koplin A (2004). Molekulare und biochemische Untersuchungen zur Funktion eines neuen Thioredoxin-ähnlichen Proteins. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Kornfeld R, Kornfeld S (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54: 631-664.
- Korsmeyer SJ (1999). BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 59: 1693s-1700s.
- Kuznetsov G, Brostrom MA, Brsotrom CO (1992). Demonstration of a calcium requirement for secretory protein processing and export. Differential effects of calcium and dithiothreitol. *J Biol Chem* 267: 3932-3939.
- Laemmli KE (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- Laird PW, Jaenisch R (1996). The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet* 30: 441-464.
- Lamkanfi M, Kalai M, Vandenabeele P (2004). Caspase-12: an overview. *Cell Death and Differentiation* 11: 365-368.
- LeBlanc AC (2003). Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 215-229.
- Lei K, Davis RJ (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2432-2437.
- Liu C, Hermann TE (1978). Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* 253: 5892-5894.
- Lucas T, Pratscher B, Krishnan S, Fink D, Gunsberg P, Wolschek M, Wacheck V, Muster T, Romirer I, Wolff K, Pehamberger H, Eichler HG, Rangnekar VM, Jansen B (2001). Differential expression levels of Par-4 in melanoma. *Melanoma Res* 11: 379-383.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF (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.
- Maertens B (2003). Isolierung und Charakterisierung eines neuen Interaktionspartners des Par-4-Proteins. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Mak J (2005). RNA interference: more than a research tool in the vertebrates' adaptive immunity. *Retrovirology* 2: 35.
- Maroulakou IG, Bowe DB (2000). Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* 19: 6432-6442.
- Mattson MP, Gary DS, Chan SL, Duan W (2001). Perturbed endoplasmic reticulum function, synaptic apoptosis and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Symp* 67:151-162.
- McCarthy, N., Mercer, J., and Bennett, M. (2001). Apoptotic proteins. p53 and c-myc related pathways. *Cardiol Clin* 19: 75-89.
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21: 1249-1259.
- McManus MT, Sharp PA (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3: 737-747.
- Meier P, Finch A, Evan G (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407: 796-801.
- Meng RD, McDonald ER 3rd, Sheikh MS, Fornace AJ Jr, El-Deiry WS (2000). The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression

and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis. *Mol Ther* 1:130-144.

Metzlaff M (2002). RNA-mediated RNA degradation in transgene- and virus-induced gene silencing. *Biol Chem* 383: 1483-1489.

Migliaccio AR, Rana RA, Vannucchi AM, Manzoli FA (2005). Role of GATA-1 in normal and neoplastic hemopoiesis. *Ann N Y Acad Sci* 1044: 142-158.

Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* 140: 627-636.

Mittag F, Kuester D, Vieth M, Peters B, Stolte B, Roessner A, Schneider-Stock R (2006). DAPK promotor methylation is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Lett* 240: 69-75.

Moreno-Bueno G, Fernandez-Marcos PJ, Collado M, Tendero MJ, Rodriguez-Pinilla SM, Garcia-Cao I, Hardisson D, Diaz-Meco MT, Moscat J, Serrano M, Palacios J (2007). Inactivation of the candidate tumor suppressor par-4 in endometrial cancer. *Cancer Res* 67: 1927-1934.

Murakami K, Mirhara K, Omura T (1994). The transmembrane region of microsomal cytochrome P450 identified as the endoplasmic reticulum retention signal. *J Biochem (Tokyo)* 116: 164-175.

Nakai K, Horton P (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24: 34-36.

Nalca A, Qiu SG, el Guendy N, Krishnan S, Rangnekar VM (1999). Oncogenic Ras sensitizes cells to apoptosis by Par-4. *J.Biol.Chem* 274: 29976-29983.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289.

Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, Gonzales FA, Lin JC, Liang G, Jones PA (2002). Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* 62: 6456-6461.

Nutt LK, Pataer A, Pahler J, Fang B, Roth J, McConkey DJ, Swisher SG (2002). Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> stores. *J Biol Chem* 277: 9219-9225.

Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259: 1769-1771.

Odermatt B (2004). Untersuchungen zur Expression und Funktion von Connexin47 in der Maus. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

- Page G, Kogel D, Rangnekar V, Scheidtmann KH (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.
- Pedersen WA, Luo H, Kruman , Kasarskis E, Mattson MP (2000). The prostate apoptosis response-4 protein participates in motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J* 14: 913-924.
- Pelham HR (1988). Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J* 7: 913-918.
- Peter ME, Krammer PH (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 10: 545-551.
- Petrache I, Birukov K, Zaiman AL, Crow MT, Deng H, Wadgaonkar R, Romer LH, Garcia JG (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.
- Pruitt K, Ulku AS, Frantz K, Rojas RJ, Muniz-Medina VM, Rangnekar VM, Der CJ, Shields JM (2005). Ras mediated loss of the pro-apoptotic response protein Par-4 is mediated by DNA hypermethylation through Raf-independent and Raf-dependent signaling cascades in epithelial cells. *J Biol Chem* 280: 23363-23370.
- Qiu G, Ahmed M, Sells SF, Mohiuddin M, Weinstein MH, Rangnekar VM (1999). 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.
- Ranganathan P, Rangnekar VM (2005). Regulation of cancer cell survival by Par-4. *Ann N Y Acad Sci* 1059: 76-85.
- Rangnekar VM (1998). Apoptosis mediated by a novel leucine zipper protein Par-4. *Apoptosis* 3: 61-66.
- Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio G, Hermel E, Yokota T, Goldsmith PC, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett* 514: 122-128.
- Rice P, Longden I, Bleasby A (2000). EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16: 276-277.
- Riou C, Remy C, Rabilloud R, Rousset B, Fonlupt P (1998). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces apoptosis of pig thyrocytes in culture. *J Endocrinol* 156: 315-322.
- Robbins PW, Trimble RB, Wirth DF, Hering C, Maley F, Maley GF, Das R, Gibson BW, Royal N, Biemann K (1984). Primary structure of the *Streptomyces* enzyme endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J Biol Chem* 259: 7577-7583.

- Romano N, Macino G (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 6: 3343-3353.
- Roussigne M, Cayrol C, Clouaire T, Amalric F, Girard JP (2003). THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies. *Oncogene* 22: 2432-2442.
- Ruegg UT, Burgess GM (1989). Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* 10: 218-220.
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10: 937-946.
- Sagara Y, Inesi G (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J Biol Chem* 266: 13503-13506.
- Sakagami H, Kuribayashi N, Iida M, Hagiwara T, Takahashi H, Yoshida H, Shiota F, Ohata H, Momose K, Takeda M (1996). The requirement for and mobilization of calcium during induction by sodium ascorbate and by hydrogen peroxide of cell death. *Life Science* 58: 1131-1138.
- Sakamoto T, Repasky W, Uchida K, Hirata A, Hirata F (1996). Modulation of cell death pathways to apoptosis and necrosis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated rat thyrocytes by lipocortin 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 220: 643-647.
- Salomoni P, Pandolfi PP (2002). The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108: 165-170.
- Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour, New York.
- Sanger F, Coulson AR (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94: 441-448.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Scheidtmann KH, Echle B, Walter G (1982). Simian virus 40 large T antigen is phosphorylated at multiple sites clustered in two separate regions. *J Virol* 44: 116-133.
- Scherer HJ (1940). Cerebral astrocytomas and their derivatives. *Am J Cancer* 40: 159-198.
- Schildhaus HU, Krockel I, Lippert H, Malfertheiner P, Roessner A, Schneider-Stock R (2005). Promoter hypermethylation of p16INK4a, E-cadherin, O6-MGMT, DAPK and FHIT in adenocarcinomas of the esophagus, esophagogastric junction and proximal stomach. *Int J Oncol* 26: 1493-1500.
- Schlegel RA, Williamson P (2001). Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ* 8, 551-563.



- Schutze MP, Peterson PA, Jackson MR (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 13: 1696-1705.
- Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 3: 346-352.
- Sells SF, Han SS, Muthukkumar S, Maddiwar N, Johnstone R, Boghaert E, Gillis D, Liu G, Nair P, Monnig S, Collini P, Mattson MP, Sukhatme VP, Zimmer SG, Wood DP, McRoberts JW, Shi Y, Rangnekar VM (1997). Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. *Mol Cell Biol* 17: 3823-3832.
- Sells SF, Wood DP Jr, Joshi-Barve SS, Muthukumar S, Jacob RJ, Crist SA, Humphreys S, Rangnekar VM (1994). Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Cell Growth Differ* 5: 457-466.
- Sepulveda JL, Gkretsi V, Wu C (2005). Assembly and signaling of adhesion complexes. *Curr Top Dev Biol* 68: 183-225.
- Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y, Yates PR (1997). The ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1371-1387.
- Sheikhnejad G, Brank A, Christman JK, Goddard A, Alvarez E, Ford H Jr, Marquez VE, Marasco CJ, Sufrin JR, O'gara M, Cheng X (1999). Mechanism of inhibition of DNA (cytosine C5)-methyltransferases by oligodeoxyribonucleotides containing 5,6-dihydro-5-azacytosine. *J Mol Biol* 285: 2021-2034.
- Slater AFG, Nobel SCI, Orrenius S (1995). The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1271: 59-62.
- Stroh C, Schulze-Osthoff K (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ* 5: 997-1000.
- Sun FC, Wei S, Li CW, Chang YS, Chao CC, Lai YK (2006). Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. *Biochem J* 396: 31-39.
- Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 186-194.
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7: 880-885.
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C elegans*. *Cell* 99: 123-132.
- Tan Y, Dourdin N, Wu C, De Veyra T, Elce JS, Greer PA (2006). Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 281: 16016-16024.

Takahashi R, Imai Y, Hattori N, Mizuno Y (2003). Parkin and endoplasmic reticulum stress. *Ann N Y Acad Sci* 991: 101-106.

Takai D, Jones PA (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3740-3745.

Takebayashi S, Nakao M, Fujita N, Sado T, Tanaka M, Taguchi H, Okumura K (2001). 5-Aza-2'-deoxycytidine induces histone hyperacetylation of mouse centromeric heterochromatin by a mechanism independent of DNA demethylation. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 921-926.

Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $Ca^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2466-2470.

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1316.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4350-4354.

Trimmer EE, Essigmann JM (1999). Cisplatin. *Essays Biochem* 34: 191-211.

Trubiani O, Bosco D, Di Primio R (1994). Interferon-g (IFN-g) induces programmed cell death in differentiated human leukemic B cell lines. *Exp. Cell Res* 215: 23-27.

Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A (2002). Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol* 193: 154-163.

Vercesi AE, Moreno SN, Bernardes CF, Meinicke AR, Fernandes EC, Docampo R (1993). Thapsigargin causes  $Ca^{2+}$  release and collapse of the membrane potential of *Trypanosoma brucei* mitochondria in situ and of isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 268: 8564-8568.

Vetterkind S (2003). Untersuchungen zur Beteiligung Aktin-assoziiierter Proteine an intrazellulären Signalwegen. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Vetterkind S, Appel S, Koplín A, Maertens B, Boosen M, Preuss U. EFP1 is an ER stress-induced glycoprotein which interacts with the pro-apoptotic protein Par-4. (eingereicht).

Vetterkind S, Boosen M, Scheidtmann KH, Preuss U (2005a). Ectopic expression of Par-4 leads to induction of apoptosis in CNS tumor cell lines. *Int.J.Oncol* 26: 159-167.

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

Vilcek J, Henriksen-Destefano D, Siegel D, Klion A, Robb RJ, Le J (1985). Regulation of IFN-gamma induction in human peripheral blood cells by exogenous and endogenously produced interleukin 2. *J Immunol* 135: 1851-1856.

- Voinnet O (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* 17: 449-459.
- Wang D, De Deken X, Milenkovic M, Song Y, Pirson I, Dumont JE, Miot F (2005). Identification of a novel partner of duox: EFP1, a thioredoxin-related protein. *J Biol Chem* 280: 3096-3103
- Wang G, Silva J, Krishnamurthy K, Bieberich E (2006). A novel isoform of prostatic apoptosis response 4 (PAR-4) that co-distributes with F-actin and prevents apoptosis in neural stem cells. *Apoptosis* 11: 315-325.
- Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1997). Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 3: 523-530.
- Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996). Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6: 217-223.
- Williams SD, Birch R, Einhorn LH, Irwin L, Greco FA, Loehrer PJ (1987). Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *N Engl J Med* 316: 1435-1440.
- Willis A, Jung EJ, Wakefield T, Chen X (2004). Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* 23: 2330-2338.
- Wilson GG, Murray NE (1991). Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet* 25: 585-627.
- Wolffe AP, Matzke MA (1999). Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286: 481-486.
- Wood DE, Thomas A, Devi LA, Berman Y, Beavis RC, Reed JC, Newcomb EW (1998). Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* 17: 1069-1078.
- Wozniak RJ, Klimecki WT, Lau SS, Feinstein Y, Futscher BW (2007). 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 dimethylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation. *Oncogene* 26: 77-90.
- Wu AJ, Chen ZJ, Tsokos M, O'Connell BC, Ambudkar IS and Baum BJ (1996). Interferon-gamma induced cell death in a cultured human salivary gland cell line. *J. Cell. Physiol* 167: 297-304.
- Xie J, Awad KS, Guo Q (2005). RNAi knockdown of Par-4 inhibits neurosynaptic degeneration in ALS-linked mice. *J Neurochem* 92: 59-71.
- Xie J, Guo Q (2005). PAR-4 is involved in regulation of beta-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 280: 13824-13832.

---

Xiong Z, Laird PW (1997). COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucl Acids Res* 25: 2532-2534.

Yamaji R, Adamik R, Takeda K, Togawa A, Pacheco-Rodriguez G, Ferrans VJ, Moss J, Vaughan M (2000). Identification and localization of two brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors in a macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2567-2572.

Yamazaki Y, Tsuruga M, Zhou D, Fujita Y, Shang X, Dang Y, Kawasaki K, 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.

Yusa A, Kitajima K, Habuchi O (2006). N-linked oligosaccharides on chondroitin 6-sulfotransferase-1 are required for production of the active enzyme, Golgi localization and the sulfotransferase activity toward keratan sulfate. *J Biol Chem* 281: 20393-20403.

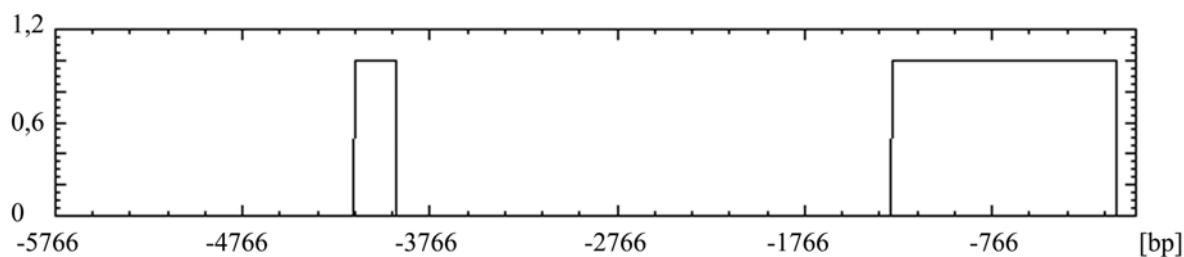
Zanetta G, Monico SL, Gabriele A, Miceli D, Mangioni C (1996). Chemotherapy with doxorubicin, etoposide and cyclophosphamide (DEC) in ovarian cancer persistent after platinum-based treatment. *Eur J Cancer* 32A: 178-179.

Zarei MM, Eghbali M, Alioua A, Song M, Knaus HG, Stefani E, Toro L (2004). An endoplasmic reticulum trafficking signal prevents surface expression of a voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>channel splice variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10072-10077.

Zornig M, Hueber A, Baum W, Evan G (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1551: F1-F37.

## PROMOTOR-STRUKTUR VON PAR-4

Dargestellt ist die humane Promotor-Sequenz von Par-4 (Zugangsnummer NM\_002583) mit Exon 1 und 2 (Großbuchstaben) bis zum ATG. Die CpG-Dinukleotide sind zur besseren Übersicht unterstrichen und fett markiert. Die für die Methylierungsanalysen verwendeten Oligonukleotide sind in der Sequenz eingezeichnet.



**Abb. 37: CpG-Inseln des humanen Par-4-Promotors.** Die unten abgebildete DNA-Sequenz wurde mit Hilfe des *EMBOSS CpGPlot* Programms (Rice *et al.*, 2000) auf mögliche CpG-Inseln untersucht. Im Diagramm sind die Sequenzbereiche als CpG-Inseln dargestellt, die über eine Länge von mindestens 200 bp einen GC-Gehalt von mindestens 50 % sowie ein Verhältnis von beobachteten CpGs zu erwarteten CpGs von  $\geq 0,6$  aufweisen. Bereich 1 erstreckt sich von -1597 bis -1822 bp, Bereich 2 von -4465 bis -5662 bp.

```

-5766 cattccaacacactacttaacaggaattccagaaggcaggaacagagaaagttagaaggaaagtcttataaaagaaa
-5691 gagaatagccaggcacggtggctcacgcctctaattcccagcattttgggaggctgaggcaggtggatcatgagg
-5616 tcaggagttcaagaccaacctgaccaacatggtgaagccccgtctctactaaaaatacaaaaaattaaccaggcgt
-5541 gtgtgcctgtaatcccagctactcaggaggctgaggcaggagaatcgcttgaacccgaaaggtgaaggttgctgt
-5466 gagcctagatcaggccactgcactctgacctgggcgacagagcgagactccatgtcaaagaaaaagaaaggat
-5391 aagaaaatttcctaactggaaggcagatagctgattaaaaggggtccactgactgcataacataataatgataaaa
-5316 gaccaaactcagagcatatcttcaagatatttcagaggatctaagtaagaagatccaaaaattttgagacagaaaa
-5241 tacaatgcaatcagaatgccactggtcttctaacagcaactctggaaactagatgataataaagcaatgccttc
-5166 aaaattatgaaggaaaatgcttttaacctagagttctatgctccaccaaactattaatcaagtatgaagataaa
-5091 tttaaacattttccaatatgcaaggtctctaagaatgagttatactatcttcagaatatactgaggatatactc
-5016 tgctaaaatgaaggggagaaacaaaagagaaaagtatgcaattcaggaaacaagaagtctacagagaaaatgat

```

-4941 tctcaaggtgtagaggagcataatcccaggatgaccacaagcaacgagccttaaataatcagtcagattaggcca

-4866 ggtgcggtggctcacacctgtaatcccagcactttgggaggccaaagcaggctgggtgcctgagctcagaagttc

-4791 gagaccagtctgggcaacatggtgaaacccccgtctctactaaaatacaaaaaattagctgggcgtgggtggcatg

-4716 tgcctgtattcccagctactctggaggctgatgcaggagaattgcttgaaccaggaggcggaggttgcagtgag

-4641 ccaagactgcgccactgcactacagcctcaccaacagagcgagactccgtctccaaacaaacaaacaaatcaat

-4566 ccatattaaagcaggggatggagggtccagaacagatgtttccaaaagagaatagaactgatagcttacccaa

-4491 tgtgattaacgtcatgagaggaggaaaatttgagtataacttgtgactgggtatataaaaaataagccgatga

-4416 ttaaagaaaaaaaaagaggcaagttttaactgcagaaaaatggtaaagacaaaagggtatagttgtgcaacaagga

-4341 aaaacagttgtaaaaaaaaaagaaatgcaatcatatacaccacatgactcagctatgaacagtatgttatagtc

-4266 taactacgggcgtgtaggagtatgaaaagtatatgtgtggccgggcatgggtggctcatgcctgtaatcccaga

-4191 actttgggaggccgaggcggggtggatcacgaggtcaggagatcgagatcatcctggctaacacagtgaaaccccg

-4116 tctctactaaaatgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaattagccgggcgtgggtggcagccacctgtagtc

-4041 ccagctactcaggaggctgaggcaggagaatggcgtgaacccgggaggcggagcttgcagtgagccgagatcgcg

-3966 ccactgcactccagcctgggagacagagcgagactccatctcaaaaaaaaaagaaaaaaaaagaaaaagaaaaaga

-3891 aaagtatatgtgttattagtgatttagagctaaatcctcttctatatctaaaaatggaaaaatcaagatgtacaa

-3816 tagcagatatgcacataaaaaataaatatgaagatctctattaatggaaacagttaaaaagttcaaagttttggg

-3741 tagggttttcagaatggataaggtagagaggggattgctgtttttgttataatccttgtagaactaaagtatgt

-3666 aattttttatcctatgcacataataattttgatgtagaggatgaattgcatatgttccagaaatacctgcat

-3591 tgaaggcaaaatggctacttccaatacactagctatccatacatataataatacacttccctcaaaatcattaag

-3516 actaacatctaggtttcactctgacataatataatgaatctgtttttgtcagcattatcatcatatttcatttta

-3441 ttattaagggaagtgagtcgctaaaaattgggtattttaggctaactcagaggtgctcaaccggggaagaattt

-3366 tatcccaggaccatgtggcaatgtcacaatacaggtgggggtttcttattggtatcctaaggtagaagccaac

-3291 gatgctgctaacaacctacaatgggcaggacagcaaagaattatccagccccaaatgtaacagtgctgaggttg

-3216 agaaaccaagctccaagtctttgaggattatctcatcagaacgctatacataaagattgatgatatgcaaacatc

-3141 ttgcaatttaggactgactcagctaaatacctcggtgcaatggtggaagcagctctggctgtgaaatatacttcg

-3066 ggaatattgagaatggtaaagacaaaaggtataataaatgataataataacaaaacacagagctttgtacctcaa

-2991 taatctctttcatccatggttcctagggcactttatagactaataatacctactctggtactcacataccacctt

-2916 ttatctaaggactgcaggcactttcacaaactctcacgatgcaggaagtattattatccccattttatatgtaa

-2841 gtaaacagaggcacaaaagttaagcaacttgcccaaagccacacaagtcagtagcagccaaaattcctgactcag

-2766 aacctattaacactaagagaactggctcaagccatgcagtgataaatttatgtgggggtgttatcctagttcattc

-2691 aaagtctatcgtttttaggctgatattgtatattcaatacccatctgttataatttcctcttctcccatacact

-2616 tcttagagaccaaggactttaagcccctagaagggactatgtttactgagtgcccttctcgaatcaagcacattt

-2541 tatgtgcagtgctcagttcttaagacagcttaaataataatgtaattgggaggctgagagcaggagaattgcttgaa

-2466 ctcaggaggcggaggttgcaagtgcagctgagatcccgccactgcactccagcctggcgacagagcgagactcgcc

-2391 tcaaaaaaaaaaaaaatgtaatttttgcgtgattttatagtacagaaagctgagtaccagataatgtaaacatgcc

-2316 caagatctctcagctagctgactataccctctttccactatatcctgcagcccttcaggagaaaagtcctctga

-2241 taagttacaaagcatatgaatgtgaatacgtttaatgtccagcctcccttactctccttaaaactcagaaaaca

-2166 aactaatgaatatgtaattgagaaacttcaggtggcacactgggggttggtactagcttaggtaaacagccgctca

-2091 gccttttagacctattccaacaaaagcttttaattttctaaggatttttccagagctctcgccatacgtttccc

-2016 acaacagccagaccaaaagacaaaactgtctttccctgagaaatatagagcatgtgaatcactttcttctgttcc

-1941 cagttctgtggcaggcaaacactgattgctcactcatcatgtgctacctgggcaaacaggaatattaagtagga

-1866 agaaaggtttatgtaggtaagagcgtgacttagggctctcctacttttttcaaaaatggagacctggcatttgt

-1791 agcctcccaaatgatgtgcctgacattacttgatatagaaaggtcagtcttaggtgcgt cagtgacagccca  
 -1716 ccccgctctgatccagaaatttcagatgacttgcacagaggataagcctctggcatgttaataatgaaaaata  
 -1641 gagacaatcactgccccagctcatctcaaattagcatcagtgcagcgttagtactttggtagggagctttgctgc  
 -1566 taaattcattctctgtaaagaggagagggagagacagggtaaggggaaaactccaagactggaatcgccaatac  
 -1491 aataaactgtcgaactgagttttttctcccgcaaccctaagataactagtaagtccttctcttagccaaccttt  
 -1416 tcaccagggcaccgcagttttcttagaaggagggtgctggggttctcaggtctttctattctcctgcccgctg  
 -1341 ccctagtacatctgaaaaggagcagcgactaggaaaagagacacgtgggtattttcccatcctgtctagtcatt  
 -1266 Par4-bs-f1 →  
 ccctgaatcatcacaagttatcgcacttttccccttagccagcagcgttcgagactttctctcaataatacggt  
Par4-bs-f1-M13 →  
 -1191 cttgtacttaaagggaagagtgggggagaagagagaggcggagaagacaagcaagaagggcgtggagtgccgtt  
 -1116 cccgccccggagtcggaggcgcgggaggccggacgcggaagctgctagcccaggaatgtgccgtctaactcg  
 ← Par4-bs-r1  
 -1041 caggccgggcggagcggcgggcgctgtgggtctgcggcgggagcggggagaggacggctggcggagggc  
 ← Par4-bs-r1-M13  
 -966 aggctgcagcggcgggccggacggcgaccggcgccctgagcggcggggcggggcgt cagcggccacgaccctt  
 -891 cccaccggcggcggcccctcggcggcggcccctcggcccctttctcgctcgtgcttcggcggcggctcggctccctt  
 -816 cccgcccctggctccctccctccctccctccctctcttctcctccctcCTGTCTGGGATTGCCTGGAGCTCC  
 -741 GCACCGCGAGTTTGCCGCGCACTTTCCCGCGCGCGGAAGAGCGCGCGCCAGCTTCGGCACACCTGGGAGCCGGA  
 -666 TCCCAGCCCTACGCTTCTCCCCTACAAGCTCCTCCAAGgtaaggcgctcgctcacacccggtcctttccacgct  
 -591 cggcgggacagctgggtccccgcctctctgcgaaccggctaggagctccggcgcctcgccttgggagtggggttg  
 -516 tagctgacggggacctcggaccggcgggtggctagagcggcggagcaggcgatacgacgagccgacaggtggcgggt  
 -441 ctagccctagtatctcgaccggcggcggacacttggggggatggggcgggcgggccgacttgggggtggg  
 -366 gtcagtccctctccctccctcttaggggcggcgatcgtcggggtccgtactgtagggtgcggggagaaactttgc  
 -291 aggggtggggacccggcggctgctggccggtagtgactgggggcggctcgaggactccaaggggcgcagcccgg



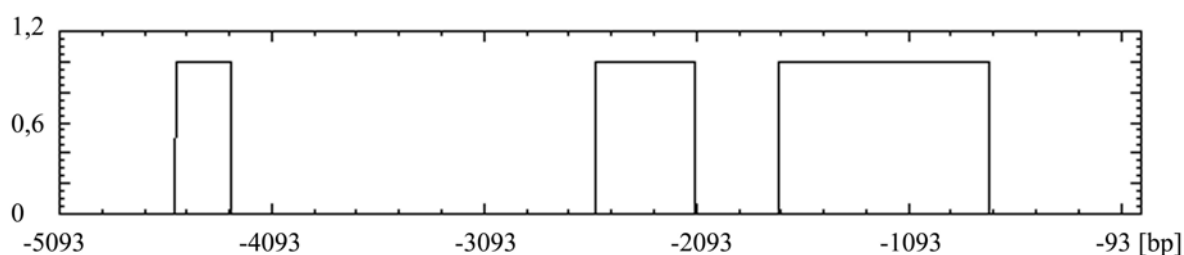
-216 gggcagacccttggggtcggggcggggatcttacgcttccttacccgcccccttttgtctttcacctcagCCCCGC

-141 CGGCTGCTGTGGGAGCGCGCGCGTCCCTCTCCTGGAGGTCGTCTCCTGGCATCCTCGGGGCCGCAGGAAGGAAG

-66 AGGAGGCAGCGCGGAGCCCTGGTGGGCGGCCTGAGGTGAGAGCCCGACCGCCCCCTTTGGGAATATG

## PROMOTOR-STRUKTUR DER ZIPK

Dargestellt ist die humane Promotor-Sequenz der ZIPK (Zugangsnummer AB022341) mit Exon 1 (Großbuchstaben) bis zum ATG. CpG-Dinukleotide sind zur besseren Übersicht unterstrichen und fett markiert. Die für die Methylierungsanalysen verwendeten Oligonukleotide sind in der Sequenz eingezeichnet.



**Abb. 38: CpG-Inseln des humanen ZIPK-Promotors.** Die unten abgebildete DNA-Sequenz wurde mit Hilfe des *EMBOSS CpGPlot* Programms (Rice *et al.*, 2000) auf mögliche CpG-Inseln untersucht. Im Diagramm sind die Sequenzbereiche als CpG-Inseln dargestellt, die über eine Länge von mindestens 200 bp einen GC-Gehalt von mindestens 50 % sowie ein Verhältnis von beobachteten CpGs zu erwarteten CpGs von  $\geq 0,6$  aufweisen. Bereich 1 erstreckt sich von -4545 bis -4283 bp, Bereich 2 von -2564 bis -2099 bp, Bereich 3 von -1702 bis -710 bp.

-5093 gaagtagggctgtggggttctcggcaaaggcgggggcagctctggccctgcattgtcaaggccaagcctcagctg

-5018 aggttttgcccatgtaggtatgcctgaggtttggtttggtgtcgcatttgaattggggctgtaactgacgct

-4943 gttccagcagtcagggtaacggattactgtgtttcgagaatctcactctatcgcccaggatggagtgcagtgtt

-4868 gtgatcttggctcactatagcctctgcctccggattcaagtgctcaagcaattcttgtgcttcagcctcccgagt

-4793 agctggaattacaggcgcctatcaccaggtctgtgtaatttttgtatatttaggtgagatggggtttcaccatgt

-4718 tggccaggctggtctcaagctcgaccgtaagagatcagcccgcctcagcctcccaaagtgctggggtttacagggtg

-4643 tgagccaccataccgggctctattcttttttagtagtgcaaaacgttaagatgggtatgtggaagctgaattttttt

-4568 ttttttttgagacagtctttgctctgtcaccaggctggagtgcagtggtcaatcttggctcactgcaagctccg

-4493 gcctcccgggttcacgccattctcctgcctcagcctcccgagtagccgggactacaggcgcccgccaccatgccc

-4418 ggctaattttttgtatttatttagtagagacagggtttcaccgtgtagccaggatagtctcgatctcctgacctc

-4343 gtgatccacccgcctcggcctcccaaagtgctgggaattataggcgtgagccactgtgctgacctaatTTTTTact

-4268 tttttttagtaatggggtctcactatggtgctcaggctgggtctccttcccgggctcaagcgatccttctgcctc

-4193 agcctcccaaagtgctgggatttcagggtgtgagcgccaatagcttagaaaactatttgTTTTTctaaatagtgcc

-4118 taagatgtgaggaggcctaactctgtcagtgctgataaggtaacatgatcattttccgccttttactctgtcct

-4043 caggaaggcaggtggggactgtgaagtagggctgtggggttctcggcaaaggcgggggcagctctggccctgcat

-3968 tgtcaaggccaagcctcagctgaggttttggccacatgtaggtatgctgaggtttggttggctgtcgcatttg

-3893 aattggggctgtaactgacgctgtttccagcagtcagggtaacggattactgtgtttcgagaatctcactctatc

-3818 gcccaggatggagtgcagtggttgatcttggctcactatagcctctgcctccggattcaagtgctcaagcaatt

-3743 ctgtgcttcagcctcccgagtagctggaattacaggcgcctatcaccaggtctgtgtaatttttgtatatttag

-3668 gtgagatggggtttcacatggtggccaggctgggtctcaagctcgaccgtaagagatcagcccgcctcagcctcc

-3593 caaagtgctggggttacagggtgtgagccaccataccgggctctattctTTTTTtagtagtgcaaacgttaagatgg

-3518 tatgtggaagctgaattTTTTTTTTTTTTTgagacagtctttgctctgtcaccaggctggagtgcagtggtca

-3443 atcttggctcactgcaagctccgcctcccgggttcacgccattctcctgcctcagcctcccgagtagccgggact

-3368 acaggcacccgccaccatgcccggctaattttttgtatttatttagtagagacagggtttcaccgtgtagccagg

-3293 atggtcttgatgtcctgacttcgtgatctgcccaccgtgccctccaaaatgctggaattacaggcgttagccac

-3218 catgccctgccactTTTTTTTTTttgagatggagtctccctccgtcaccaggctgtagtatagtggcatgatct

-3143 cggctcgtgcaacctccacctcctgggttcaagcaattctcctgcgctagcctcccgagtagctgggattacag

-3068 gcatgtgccaccaggcctggctaacttttgtatttttagtagagacagggtttcacatggtgagcaggctggctc

-2993 ttgaactcctacttcaagtgacctgcccgccttggctgccaagctggtgggattacgggcgtgagccaccacac

-2918 ctggccaaccattgtacgttgaaatgtaaataaaaaatataaaggccggcttgtggctcacgtctgtaatcgc

-2843 agcactttgagaggccgaggccgggatcacagatattgagaccatcctggccaacatggtgaaaccctgcgtc

-2768 tactaaaaatacaaaaatcagctgggagtggtggcgtgcacctgtagtcccagctactcgggaggctgaggcagg

-2693 agaatcgcctgaaccaggaggcagagattgcagtgagcccagatctcaccactgcgttccagcctggacgatag

-2618 aaggagactgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaggctgggcaagggtggctcatgctgtaattcctgca

-2543 ctttgggaggccgaggcgggcggatcaggaggtcaggagatcgagaccatcctggctaacacggtgaaaccctgt

-2468 ctctactaataaatacaaaaaattagctgggcgtggtgacgggcgcctgtagtcccagctattcgggaggctgag

-2393 gcaggagaatggcgtgaacctgggaggtggagcttgcaagtgagccgagattgtgccagtgtactccagcctgggt

-2318 gacagagcgagactccgtctcaaaataataataaaaaatgaatttaggccgggcgcaatggctcacgcctgtaat

-2243 ctcagcactttgaaagctgaggtgccggatcacctgagcttaggagttcgagaccagcctgggcaacatggtga

-2168 aacccgtctctactaaaaatacaaaaattagccgggcgtggtgatgggcacctgtaatcccagctacttgggag

-2093 gctgaggcacggaaatcgtttgaacccgggaggtggaggttgcaagtgagctggataccgccgctgcactcctgcc

-2018 tgggtgacagagtgagaccctgtctcaaaaaataaaattaaaaaaaaaacaacctgatacctcccagtggtgtc

-1943 agttggcacatactatgtctcaataaaatgcttgctgttaccctctatTTTgagacgaagagggaccctgtgtat

-1868 gacaaccagattgacctcatttgcattttaagtatttagaatgtgggtaacagttttcagtgaggaaactgc

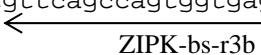
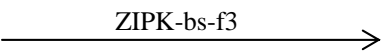
-1793 cacatagggactaaagcagctccagggtccactccaggagctgccaggcgctcggccacaggtgagccatcca

-1718 ttcgccaaccggtgctccaggaaggcaggaagcgggatgcagggcttcagcctcacttctcgcagcttcagcac

-1643 ctgggtcagaggagaggcgggcgggcgatgaagggaccggaagtcggcctTTTTTcgtcgcttgaccagcgt

-1568 cgactgcagccaatgaaatcagggatggcgagtgttcagccagtggtgaggctgcatccggggtgtgggtgccgaa

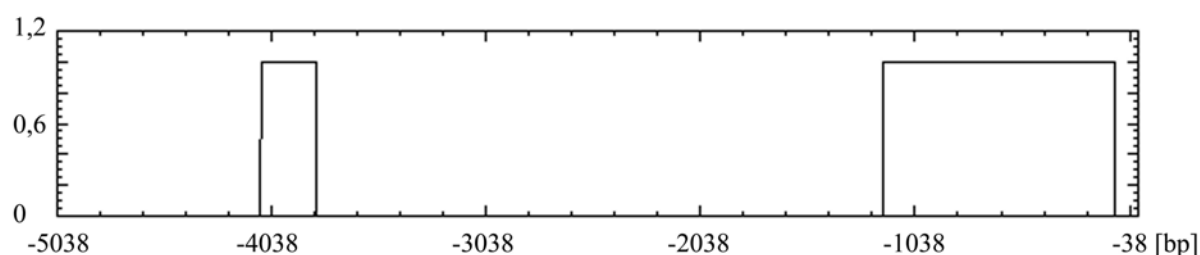
-1493 aaggcagctgggggcgggacgtcgaggtgcggcacgagcgggcgggcgcaccggccaataggcggcggggttcgtt





## PROMOTOR-STRUKTUR VON TFPT

Dargestellt ist die humane Promotor-Sequenz von TFPT (Zugangsnummer NM\_013342) mit Exon 1 (Großbuchstaben) bis zum ATG. Die CpG-Dinukleotide sind zur besseren Übersicht unterstrichen und fett markiert. Die für die Methylierungsanalysen verwendeten Oligonukleotide sind in der Sequenz eingezeichnet.



**Abb. 39: CpG-Inseln des humanen TFPT-Promotors.** Die unten abgebildete DNA-Sequenz wurde mit Hilfe des *EMBOSS CpGPlot* Programms (Rice *et al.*, 2000) auf mögliche CpG-Inseln untersucht. Im Diagramm sind die Sequenzbereiche als CpG-Inseln dargestellt, die über eine Länge von mindestens 200 bp einen GC-Gehalt von mindestens 50 % sowie ein Verhältnis von beobachteten CpGs zu erwarteten CpGs von  $\geq 0,6$  aufweisen. Bereich 1 erstreckt sich von -4088 bis -3827 bp, Bereich 2 von -1187 bis -105 bp.

```

-5038  ggggtctgactccatccctgagcctggcctgacatcaggaaatgtcactttctgtgtcccataaccctctggagg
-4963  gagaaattccttggcctggcatctggaactctgcaggattctctctccggatatctgaggccccgggcctgccgc
-4888  tgtctttccctgggcccccttctccctttctttgctggcacatgcattcatgctctacagtccaattcagctat
-4813  cgattcttctgacacctggggcagggctcagccagtcctcctgtggctccggtgtccccagcttggtaccacca
-4738  ctgatagctgtctggaacctggcctgcctcttccactagaccttgagtactttgagagcaaagacctgggcgatt
-4663  caactgggtgcccaggtaaacgttaaagaaagcaagcagtgagctctcccgaaactctgccctctcactacacttc
-4588  tttccccagaaacctcctatggcttctgtcatcaaaaattccattcaagaagaatgggaaggctgggcgtagt
-4513  ggctcatgcctgtaatcccagcactttgggagggccgaggtgggcggattacttgaggtcaggagttcgagactag
-4438  cctgggtcaacatggtgaaacccatctctactaaaaatacaaaaatagccaggcatggtggttgataacctgtaat
-4363  cccagctatacataaggctgagggaggagaatcgcttgaacccgggaggtggaggttgcaatgagccaagaacac
-4288  atcactgcactccagcctgggcgacagagggagactctatctcaaggaaaaaaaaaaaaagaataggaatggtaac

```

-4213 aggactgccctcttaagagtgagtctgagcactcatgagataagctagtgttctctcaatttgggcatgagaaaa  
-4138 ggttttaggttatTTTTTTTTTTTTTTTgagacggagtcttgctctgtcgcccaggctggagtgagtgagtgcacgatc  
-4063 tcggctcactgcaagctccgcctcccaggttcacgccattctcccgcctcagcctcctgagtagctgggactaca  
-3988 ggcacccgccaccacgcctggctaattTTTTTgtatttttagtagagacggggtgtcaccgtgttagccaggatgg  
-3913 tctcgatctcctgaactcatgatccacctgcctccgcctcccaaagtgtgggattacaggcgtgagccacggcg  
-3838 cccggccttaggtggttcctaataattatataatctatTTTTTatacagtgactttgtctttgccaaatgatacca  
-3763 gttttccattcatggtagcaatttgcttccttctcagataaatttaagaaaaaaagtccctagactcaaagaatat  
-3688 gttaagcaataataggataagcggcttatagatgtggcaaaaaccctgtaaccggtcatgtgaatcagtgaaat  
-3613 ctgggaaacctcaagctgagtcctatcatgatcagtaagctcagcacacaggaaggacttaagaagcatgagctt  
-3538 tacaatgcaatataatTTTtagtggaaggaacggggtgggggtgaaacaaaaaaaaaagaaggctctggaaaag  
-3463 gctgagaaggagatataaccagccacaagcagccagggagccagggggcctggcaggagagacaggagatgggga  
-3388 ggggcacagagtgggaggaagcaccttctgaagctttggcttgcttgctgatatactcctcaatcttcatcataa  
-3313 tctcagcaactgtaggaaaggagaagacagtcagaatccagcactcttcaaaaagaagcctgtatcacccctt  
-3238 ctgggagattctgtctagagccccctgctaggaacacctcttgctcctcttaccatcttactatcccatagcttgg  
-3163 cgatggcttgactgaatccccggaaagatccagctgtgtctcctcctgcacatcctcgatcgctggctcctctt  
-3088 cttcctccccatagcttctcctcctcctcttctgctgcctcttcgagatcagctaagagctcatctgccagag  
-3013 acatcccgaggcctggggagggacagcagcgttccctaaaaacttgccccgacaaagtccctccttattactgag  
-2938 cgatgattctccccagaagacctggctccttctttatcaaccctactagcatgcaggctccacgacaacaggtg  
-2863 ctttagtttgTTTTgttactggcgagctctccagctccgacctgtgcaagacgcagcacacccctatgaccgcca  
-2788 ccttgctaagacttactggaaccaagtgggtgtagattccaaatgcatttgcaaactttcttattcctttcttggc  
-2713 tttagccttgaaaacatactttgaaattctttgtttccctcctttcccactagatactgtcttgactgctggct

-2638 tatctatgtgcttacttagaagttccaggggctaactctttatctttatcttttttaagatggagctctggctctg

-2563 acaccaggttggagtgagtgaggcgagctctggctcacttgcaacctccacctcctgggttcaagcgattctcc

-2488 tgcctcagcctcctgagtagctgggactacaggcacctgccaccatgccagctaatttttttttttttttttg

-2413 tagagtcaaggtttcactatgtaagccaggctggctctggaactcttgacctcaagtgagcgacccaccttggcct

-2338 cccaaactgttgggattacaggcgtaagccaccgcgctcgcgaggggctaactcttgaaacaaactaggtatg

-2263 gaaaccagctgcaaaactccagagatcacctcaaggcgatcaatctacaa<sup>cg</sup>tggccattggtgacttgacacc

-2188 agcccatgctccaggtggcc<sup>cg</sup>tgactcaagacagcctt<sup>cg</sup>gagcaagacacacataccttgtagccagcaccac

-2113 tctgtatgctccccattcaagttccccctttttaagccccctctccccagcctaaagcttgaaatggctctctaa

-2038 agacattagcttggccatttctcatctg<sup>cg</sup>agcatttgatcagtaaagctgctttactttcaccacccccactt

-1963 cctctgcctctgagtagcagaaacttgagttgggtacattat<sup>cg</sup>gtctcttcc<sup>cg</sup>cctccaggtcttgtacagg

-1888 agtcccttgaactaaagtggccctttcttctactttgtttttcttttcttttcttttcttttttggagaccatgtct

-1813 tgctctgtcacctaggctgcagtgagtgaggcgccatcatagctca<sup>cg</sup>gcagcct<sup>cg</sup>atcacctgggctcaag<sup>cg</sup>a

-1738 ttctcc<sup>cg</sup>cctcagcctcc<sup>cg</sup>atagctgagatgacaggca<sup>cg</sup>caccagca<sup>cg</sup>cc<sup>cg</sup>gctaatttttaaatcttc

-1663 thtagagacagggctcactgtgttgctcaggctggctcaaacctcctgggctcaag<sup>cg</sup>atccttt<sup>cg</sup>cctgggc

-1588 caccxaaagtgtgggattacaggagtgagccatgg<sup>cg</sup>tctggctctcctcacttcttagtagccagcatctcc

-1513 tcagcctcagctctca<sup>cg</sup>ttccacctccctgaccaca<sup>cg</sup>ccccactctagactacaggaggttgctttgtgat

-1438 aa<sup>cg</sup>gtctcc<sup>cg</sup>ca<sup>cg</sup>ctctg<sup>cg</sup>gtgtctacagtaaggcacttcacacatttgtgattaatgaagtaattatttgat

-1363 aaagcctgtctgccaggcatcaaccxaaagctctaagagggtag<sup>cg</sup>aacaatttttgctccttccacatcccagg

-1288 gccacccatggtagg<sup>cg</sup>catattaagacttttggttaaacaggctgtaaaaggc<sup>cg</sup>ggag<sup>cg</sup>gtggctcatgcc

-1213 tgtaatcccagcactttgggaggcccagg<sup>cg</sup>ggtggatcatctgaggtcaggagttggagaccagcctggccaac

-1138 atagtgaacccc<sup>cg</sup>tcttactaaaaatacaaaaaactagc<sup>cg</sup>gg<sup>cg</sup>tggtgggt<sup>cg</sup>cgctgtaatcccagcta

TFPT-bs-3f



-1063 ctcgggaggctgaggcaggagaatcgcttgaatccgggaggcggaggttgcagtgaaaccgagatcgcgccactgc

-988 actccagcctgggcaacaagagcgaaactccgtctcagacaaaacaaaacaaactggccaggcgcggtggatc

-913 atgcctgtaatcacagcactttgggaggccgaggcgggcggatcacgagatcaggagttcgagaccagcctgacc  
←  
TFPT-bs-2r

-838 aacatggggaaacccgtctctactaaaaatacaaaaattagtcaggggtggtggcgggcgcctgtaatcccagc

-763 tactctggaggctgaggcagaagaatcgtttgaacccgggagacggaggttgcaatgagccgagatcgcgccact

-688 gctctccaacctgggcaacagaacgagactccgtctcaaaacaaacaaacaaaaacaaaaaccaagctgt

-613 aaagacccgcctttttcctcacacacttcttctcccagaccaggagcccagcctcccgtccccgtggtctcca

-538 tcacactcacctctcctctccgcgcaccactgtttctagcgttagtcgctcaccgatgacgtctcactctcgcgc

-463 cgttatagaggcaaagctactctctgattggtccccgtcgcgatggtcctggccgcatttgaaacaacaacttt

-388 attagcacctggcactaggcggagagaggcggtaagccgcgaggaggaaagggactcacgtcccgctgtggaccg

-313 atcctgctaagcagagaatcgctgtggccggacgcggggcgtcgagacaagaagaaagacgttggcaactcaga

-238 ggactggttgcggcgttagacaagaaagcaaggcctttaagcagggattcggggtggacgtgggggtgggccgaa

-163 gcgaagccggaaacaggaaactacaactcccacaaggcctagggccacgtcccgcgtctcctcggctgctgagcct

-88 gatgggacaagtagttttgcgaacggcttaacctacagattgaagaggtcgGAAGCTCTGAGGCCCGGGCTTCC

-13 GGAGGTCGCGGAGATG



PROTEINSEQUENZ-VERGLEICH DER EFP1-ORTHOLOGE

Dargestellt ist die Proteinsequenz von EFP1 aus verschiedenen Spezies, außer bei dem in unserer Arbeitsgruppe isolierten und sequenzierten Klon „Rat-EFP1“ (Position 1) sind die Datenbank-Zugangsnummern in Klammern angegeben. Der Vergleich der vier Sequenzen wurde mit dem ClustalW Programm (Chenna et al., 2003) durchgeführt. Dabei zeigen Sterne unter den Sequenzen identische AS, Doppelpunkte zeigen einen konservierten AS-Austausch und einfache Punkte einen semi-konservativen AS-Austausch an. Alle folgenden AS-Positionsangaben beziehen sich auf die Proteinsequenz „Rat-EFP1“: Die N-terminale ER-Signalsequenz (AS 54-83) ist rot umrahmt, die potentielle Transmembrandomäne (PSORT II; Nakai & Horton, 1999) ist durch blaue Buchstaben markiert (AS 60-76). Die zwei Thioredoxindomänen (Domäne a = AS 104-207; Domäne a' = AS 659-764) sind schwarz umrahmt und grau hinterlegt, die dritte Thioredoxin-ähnliche Domäne (Domäne b = AS 218-318) ist nur grau hinterlegt. Die vorhergesagte Sekundärstruktur (PredictProtein Computerprogramm) der Thioredoxindomänen ist über der Proteinsequenz angegeben, dabei steht a für eine α-Helix- und b für eine β-Faltblatt-Struktur. Das inaktive kalatyische Zentrum (CGQS, AS 133-136) und das potentiell aktive katalytische Zentrum (CGFC, AS 687-690) der Thioredoxindomänen a bzw. a' ist schwarz hinterlegt. Die Leucin-Reste im Abstand von 7 AS, die den Leucin-Zipper ausbilden, sind ebenfalls schwarz hinterlegt (AS 834-855). Die mit höchster Wahrscheinlichkeit N-glykosylierten, konservierten Asparagin-Reste (N295, N443) sind durch rote Buchstaben markiert.

Rat-EFP1 MSECGRGGGGGNNSEDAEDEGGG---PKGSGSLS--PAGAAASSEGRIRRLRGASTIMARQRPEL 61
Rat-EFP1 (xm\_220122.2) MSECGRGGGGGNNSEDAEDEGGG---PKGSGSLS--PAGAAASSEGRIRRLRGASTIMARQRPEL 61
Mouse-EFP1 (nm\_029582.1) MSECGRGGGGGNNSEDAEDEGGG---PKGSGSLS--PAGAAASLEGRIRRLRGASTIMARQRPEL 61
Human-EFP1 (NP\_056998) MSECGRGGGS-SSSEDAEDEGGGGPAGSDCLSSSPTLATASSAGRLRRGLRGAFIMARQRPEL 61
\*\*\*\*\*. . .\*\*\*\*\* \* \* . \*\* \* : \* : \*\* \* : \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

Rat-EFP1 LCGAVALGCALLFALKFTCS-----RAKDVIIP----- 89
Rat-EFP1 (xm\_220122.2) LCGAVALGCALLFALKFTCRNCSSHAGCSFLLTVNYRAEAAVPPDQWLLS VRLQGGDAGI WVVS 127
Mouse-EFP1 (nm\_029582.1) LCGAVALGCALLFALKFTCS-----RAKDVIIP----- 89
Human-EFP1 (NP\_056998) LCGAVALGCALLLALKFTCS-----RAKDVIIP----- 93
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\* : . : \*

Rat-EFP1 bbbbbb aaaaaa bbbbbb aaaaaaaaaa
-----AKPPVSFFSSRSPLVLDLFDGQGLDYADHVRQDSEVVVLFYAPWCGQSIAARAETEQ 146
Rat-EFP1 (xm\_220122.2) ETMGRVILYCFPNLHLQGRYPASVCPGQGLDYADHVRQDSEVVVLFYAPWCGQSIAARAETEQ 193
Mouse-EFP1 (nm\_029582.1) -----AKPPVSFFSSRSPLVLDLFDGQGLDYADHVRQDSEVVVLFYAPWCGQSIAARAETEQ 146
Human-EFP1 (NP\_056998) -----AKPPVSFFSLRSPVLDLFDGQGLDYAEYVRRDSEVVVLFYAPWCGQSIAARAETEQ 150
. \* : : . . : \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Rat-EFP1 aaaa bbbbbb aaaaaa aaaaaa bbbbb aaaaaaaaaa
ASRLSDQVLFVAVN CWNNQKCRKQKHFYFPVIHLYHRSFGPIEYKGPMSAVYIEK FVRRV MKPL 212
Rat-EFP1 (xm\_220122.2) ASRLSDQVLFVAVN CWNNQKCRKQKHFYFPVIHLYHRSFGPIEYKGPMSAVYIEK FVRRV MKPL 259
Mouse-EFP1 (nm\_029582.1) ASRLSDQVLFVAVN CWNNQKCRKQKHFYFPVIHLYHRSFGPIEYKGPMSAVYIEK FVRRV MKPL 212
Human-EFP1 (NP\_056998) ASRLSDQVLFVAVN CWNNQKCRKQKHFYFPVIHLYHRSFGPIEYKGPMSAVYIEK FVRRV MKPL 216
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Rat-EFP1 aaaaaaaaaa bbbbbb aaaaaaaaaa bbbbb aaaaa
LYIPQSSELLDFLSNYEPGLGYFEGSFPQPPGYLTFFTSALHSLKKDYLGTVRFVITNKH LAK 278
Rat-EFP1 (xm\_220122.2) LYIPQSSELLDFLSNYEPGLGYFEGSFPQPPGYLTFFTSALHSLKKDYLGTVRFVITNKH LAK 325
Mouse-EFP1 (nm\_029582.1) LYIPQSALLDFLSSYEPGLGYFEGSFPQPPGYLTFFTSALHSLKKDYLGTVRFVITDKHLAR 278
Human-EFP1 (NP\_056998) LYIPQSSELLDFLSNYEPGLGYFEGSFPQPPGYLTFFTSALHSLKKDYLGTVRFVITNKH LAK 282
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

|                          |   |                      |                       |                   |                     |                         |
|--------------------------|---|----------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|
|                          | a   | bbbb                 | bbb                   | aaaaaaaa          |                     |                         |
| Rat-EFP1                 | LVSLVHSGSVYLHRRHF   | NTSLVFPREVMNFTAENIYK | WASENQETLFRWLQPHGGKSL | LLNDELKKG         | 344                 |                         |
| Rat-EFP1 (xm_220122.2)   | LVSLVHSGSVYLHRRHF   | NTSLVFPREVMNFTAENIYK | WASENQETLFRWLQPHGGKSL | LLNDELKKG         | 391                 |                         |
| Mouse-EFP1 (nm_029582.1) | LVSLVHSGSVYLHRRHF   | NTSLVFPREVMNFTAENIYK | WASENQETLFRWLQPHGGKSL | LLNDELKKG         | 344                 |                         |
| Human-EFP1 (NP_056998)   | LVSLVHSGSVYLHRRHF   | NTSLVFPREVLNYTAENICK | WALENQETLFRWLRPHGGKSL | LLNDELKKG         | 348                 |                         |
|                          | *****:*.*** ** *****:*****                                      |                      |                       |                   |                     |                         |
| Rat-EFP1                 | PALFLFIPFDPLAERHPL  | LDTEITVALEYSNCRGDQ   | VVERLLQHLRRAEAPVFQ    | SLAPLQAPLPD       | 410                 |                         |
| Rat-EFP1 (xm_220122.2)   | PALFLFIPFDPLAERHPL  | LDTEITVALEYSNCRGDQ   | VVERLLQHLRRAEAPVFQ    | SLAPLQAPLPD       | 457                 |                         |
| Mouse-EFP1 (nm_029582.1) | PALFLFIPFDPLAERHPL  | LDTEITVALEYNNCHGDQ   | VVERLLQHLRREAPVQL     | SLAPLQAPLPD       | 410                 |                         |
| Human-EFP1 (NP_056998)   | PALFLFIPFNPLAESHP   | LIDEITVALEYNNCHGDQ   | VVERLLQHLRRVDAPV      | LESALAEVPAQLPD    | 414                 |                         |
|                          | *****:*** ** :*****.*:*****:***:*** * : * **                    |                      |                       |                   |                     |                         |
| Rat-EFP1                 | AQLMAASPCCNTVVLP  | QGPALSRTHNVCEL       | CVNQSVG-TRPSSVSV      | PQCSFFEMAAALDSFY  | LKEQ 475            |                         |
| Rat-EFP1 (xm_220122.2)   | AQLMAASPCCNTVVLP  | QGPALSRTHNVCEL       | CVNQSVG-TRPSSVSV      | PQCSFFEMAAALDSFY  | LKEQ 522            |                         |
| Mouse-EFP1 (nm_029582.1) | TQLMAASPCCNTVVLP  | QGPALSRTHNVCEL       | CVNQSVG-TRPSSVSV      | PQCSFFEMAAALDSFY  | LKEQ 476            |                         |
| Human-EFP1 (NP_056998)   | PPTITASPCCNTVVLP  | QGWHSFRTHNVCEL       | CVNQTSGGMKPSVSV       | PQCSFFEMAAALDSFY  | LKEQ 480            |                         |
|                          | * . :***** :*****: * :*****                                     |                      |                       |                   |                     |                         |
| Rat-EFP1                 | TFYRVVSGSIECSNFLT   | SYSPFSFYTACCRTISR    | GTASFSGSAQDVFTAP      | AIIEFSALEKSCEATAP | 541                 |                         |
| Rat-EFP1 (xm_220122.2)   | TFYRVVSGSIECSNFLT   | SYSPFSFYTACCRTISR    | GTASFSGSAQDVFTAP      | AIIEFSALEKSCEATAP | 588                 |                         |
| Mouse-EFP1 (nm_029582.1) | TFYHVVSGSIECSNFLT   | SYSPFSYTTACCRTISR    | GMASFTGSEQNVLTA       | PAIEFSSLEKSCEATAP | 542                 |                         |
| Human-EFP1 (NP_056998)   | TFYHVASDSIECSNFLT   | SYSPFSYTTACCRTISR    | GVSGFIDSEQGVFEAP      | TVAFSSLEKKCEVDAP  | 546                 |                         |
|                          | ***.*.*****:***** :.* *.*: ***: **:***.* **                     |                      |                       |                   |                     |                         |
| Rat-EFP1                 | SSIPHEENRYRFP   | EVGLSSTAFTGLS        | CRNTKLNLYLLDSN        | FLWLYAERL         | GAPSSAPVKEFATIV 607 |                         |
| Rat-EFP1 (xm_220122.2)   | SSIPHEENRYRFP   | EVGLSSTAFTGLS        | CRNTKLNLYLLDSN        | FLWLYAERL         | GAPSSAPVKEFATIV 654 |                         |
| Mouse-EFP1 (nm_029582.1) | SSIPHEENRYRFP   | QVGLTSTAFTGLS        | CRNTKLNLYLLDSN        | FLWLYAERL         | GAPSSAPVKEFATIV 608 |                         |
| Human-EFP1 (NP_056998)   | SSVPHIEENRYLFP  | EVDMTSTNFTGLS        | CRNTKLNLYLLDSN        | FLWLYAERL         | GAPSSQVKEFAAIV 612  |                         |
|                          | **:* **:* :* *****:*****: *****:                                |                      |                       |                   |                     |                         |
| Rat-EFP1                 | DVKEESHYIILDPKQ   | ALVKLTLESFIQNF       | SVLYSPLKRHLTG         | SDSAQFPTQHLLITE   | VTDTDFWEVTL 673     |                         |
| Rat-EFP1 (xm_220122.2)   | DVKEESHYIILDPKQ   | ALVKLTGTQPRADS       | QGLAAAKGLMFPDF        | AEIPDMQHKKLN      | SKASLVQRHW 720      |                         |
| Mouse-EFP1 (nm_029582.1) | DVKEESHYIILDPKQ   | ALMKTLESFIQNF        | SVLYSPLKRHLTG         | SDSAQFPTQHLLITE   | VTDTDFWEVTL 674     |                         |
| Human-EFP1 (NP_056998)   | DVKEESHYIILDPKQ   | ALMKTLESFIQNF        | SVLYSPLKRHLIG         | SGSAQFPPSQHLLITE  | VTDTDFWEVTL 678     |                         |
|                          | *****:*** : : * :. * : .. **:* : . : : : :                      |                      |                       |                   |                     |                         |
| Rat-EFP1                 | RKQ-----  | DVLLLYYTQW           | CGFCPSLNHIFIQ         | LARLLPEDTFTVAR    | IDVSNQNDLPWEF 725   |                         |
| Rat-EFP1 (xm_220122.2)   | RSRKSPLPSGGGRSA   | VDVLLLYYTQW          | CGFCPSLNHIFIQ         | LARLLPEDTFTVAR    | IDVSNQNDLPWEF 786   |                         |
| Mouse-EFP1 (nm_029582.1) | RKQ-----  | DVLLLYYTQW           | CGFCPSLNHIFIQ         | LARLLPEDTFTVAR    | IDVSNQNDLPWEF 726   |                         |
| Human-EFP1 (NP_056998)   | QKQ-----  | DVLLLYYAPW           | CGFCPSLNHIFIQ         | LARNLPMDTFTVAR    | IDVSNQNDLPWEF 730   |                         |
|                          | :.* *****:***** ** *****  |                      |                       |                   |                     |                         |
| Rat-EFP1                 | MVDRLPTVLFPCNRK   | DLVSKYPGDL           | PITLPNLLR             | FILHHS            | SDPASAPQGLTSPPTQ    | CAQSAAVL 791            |
| Rat-EFP1 (xm_220122.2)   | MVDRLPTVLFPCNRK   | DLVSKYPGDL           | PITLPNLLR             | FILHHS            | SDPASAPQGLTSPPTQ    | CAQSAAVL 852            |
| Mouse-EFP1 (nm_029582.1) | MVDRLPTVLFPCNRK   | DLVSKYPGDL           | PITLPNLLR             | FILHHS            | SDAASAPQDPGISPT     | QDCVQSAV 792            |
| Human-EFP1 (NP_056998)   | MVDRLPTVLFPCNRK   | DLVSKYPEDVP          | PITLPNLLR             | FILHHS            | SDPASSPQNVA         | NSP-TRECLQSEAVL 796     |
|                          | *****.*:*****.*.*. ** *.:** ** *                                |                      |                       |                   |                     |                         |
| Rat-EFP1                 | QREHISHVENAMQ   | ELRSEM               | SLRRTQE               | QVEGRLFSARRD      | GHRLLRRQRTLE        | QQHRLRRHSQKIQ 857       |
| Rat-EFP1 (xm_220122.2)   | QREHISHVENAMQ   | ELRSEM               | SLRRTQE               | QVEGRLFSARRD      | GHRLLRRQRTLE        | QQHRLRRHSQKIQ 918       |
| Mouse-EFP1 (nm_029582.1) | QREHISHVENAMQ   | ELRSEM               | SLRRTQE               | QVEGRLFSARRD      | GHRLLRRQRTLE        | QQHRLRRHSQKIQ 858       |
| Human-EFP1 (NP_056998)   | QRGHISHLEREI  | QKLRAEISS            | LQRAQVQVES            | QLSSARRDEHRL      | RQQQRALTE           | EQHSLEHAHSEQLQA 862     |
|                          | ** *****: . :*:***:***:* * **.* :* ***** ** :*:***.* ** :*:***: |                      |                       |                   |                     |                         |
| Rat-EFP1                 | LYLKKARELQELAS  | -----                | ASETPLPEHT            | WLKVLVATMERELER   | QGD                 | AKEFTPLGKAHPNHSKP 916   |
| Rat-EFP1 (xm_220122.2)   | LYLKKARELQELAS  | -----                | ASETPLPEHT            | WLKVLVATMERELER   | QGD                 | AKEFTPLGKAHPNHSKP 947   |
| Mouse-EFP1 (nm_029582.1) | LYLKKARELQELAR  | -----                | ASGTPLPEHT            | WLKILVATMERELER   | GQ                  | GGAKEFPALGKAHPNHSKS 917 |
| Human-EFP1 (NP_056998)   | LYEQKTRELQELAR  | KLQELADASE           | NLLTENTW              | LKILVATMERKLE     | GRDGAESL            | AAQREVHPKQPEP 927       |
|                          | ** .*:***** ** .*.***:*****.* * :.*. :. :*:***:                 |                      |                       |                   |                     |                         |
| Rat-EFP1                 | MGATQLPGDTPPP   | SSASSTLASER          | KHENRTD               |                   | 947                 |                         |
| Rat-EFP1 (xm_220122.2)   | MGATQLPGDTPPP   | SSASSTLASER          | KHENRTD               |                   | 1008                |                         |
| Mouse-EFP1 (nm_029582.1) | MGTTQLPGDTPPP   | STTSSTLASE           | TKHENRTD              |                   | 948                 |                         |
| Human-EFP1 (NP_056998)   | SATPQLPGSSPPP   | ANVATLVSER           | NKENRTD               |                   | 958                 |                         |
|                          | :.* *****:***:***.* ** :* *****                                 |                      |                       |                   |                     |                         |

## DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich allen danken, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Frau PD Dr. Ute Preuß danke ich für die Überlassung der Themen, für die fachliche Unterstützung, für viele wertvolle Anregungen und für die Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Andreas Waha danke ich für die gute Betreuung, für die Hilfestellung und die vielen Tipps bei der Durchführung der DNA-Methylierungsanalysen im letzten Jahr meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Scheidtmann danke ich für die Übernahme des Koreferates und für die hilfreichen Anregungen.

Frau PD Dr. Gerhild van Echten-Deckert und Herrn Prof. Dr. Norbert Koch danke ich für ihre Teilnahme an der Promotionskommission als fachnahe Gutachterin und fachangrenzender Gutachter.

Reinhild, Meike B., Susanne und Meike W. danke ich für die gute Zusammenarbeit, die bereichernden Diskussionen, die vielen Anregungen und für die freundschaftliche Laboratmosphäre.

Ein großer Dank geht auch an alle übrigen Institutsmitglieder und insbesondere an die Mitglieder der AG Scheidtmann für die immerwährende Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank geht an Gerd für die vielen guten Tipps, die zur Lösung zahlreicher Laborprobleme beigetragen haben.

Allen Mitgliedern der AG Waha am Institut für Neuropathologie der Uniklinik Bonn danke ich für die Hilfsbereitschaft, die Unterstützung und die freundliche Aufnahme in ihre Laborgemeinschaft. Ein Dank geht auch an Herrn Kladt, der mir durch die Digitalisierung vieler Autoradiographien einen Dienst erwiesen hat. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Dr. Jörg Felsberg für die Durchführung der Real-Time RT-PCR Analysen bedanken.

Vielen Dank an alle fleißigen Korrekturleser und an diejenigen, die mich bei der Gestaltung dieser Arbeit unterstützt haben: Susanne, Thomas, Anne, meine Schwester Kristina, meinen Bruder Jan, meine Mutter und meinen Vater.

Ein besonders lieber Dank gilt der guten Seele des genetischen Instituts, die immer ein offenes Ohr für ihr Ärgernis hatte und ihm ausnahmslos jeden Spülküchenwunsch erfüllt hat.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein Studium und diese Arbeit gar nicht erst möglich gewesen wären.

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

---

Sarah Appel

Bonn, im Mai 2007

## **Eigene Publikationen**

Vetterkind S, Illenberger S, Kubicek J, Boosen M, **Appel S**, Naim H, Scheidtmann KH, 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, **Appel S**, Koplín A, Maertens B, Boosen M, Preuss U. EFP1 is an ER stress-induced glycoprotein which interacts with the pro-apoptotic protein Par-4. (eingereicht).

**Appel S**, Waha A, Mikeska T, Felsberg J, Waha A, Pietsch T, Preuss U. Epigenetic silencing of the pro-apoptotic protein TFPT (FB1) in gliomas. (in Vorbereitung).