

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Christina Mensger
aus Konstanz

Tag der mündlichen Prüfung:

Funktionelle Analyse von Livin: Interaktion mit dem "Amino-terminal Enhancer of Split" (AES)-Protein

Gutachter: Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf
Prof. Dr. Werner Buselmaier

Für Matthias

Die vorliegende Arbeit wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg im Forschungsschwerpunkt "Infektion und Krebs" in der Arbeitsgruppe "Molekulare Therapie virusassoziierter Tumore" unter Anleitung von Prof. Dr. Felix Hoppe-Seyler angefertigt.

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Felix Hoppe-Seyler für die Überlassung des Themas, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und die kritische Begleitung dieser Arbeit während der ganzen Zeit bedanken.

Für die Übernahme des Erstgutachtens, die Herstellung von Antikörpern, die Bereitstellung eines Fluoreszenz-Mikroskops, sowie für die allgemeine Unterstützung geht mein besonderer Dank an Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf.

Herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Werner Buselmaier für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Für die intensive Betreuung geht mein besonderer Dank an Frau Prof. Dr. Karin Butz, die mir während der ganzen Zeit mit ihren Ratschlägen, ihrer Diskussionsbereitschaft und ihrer Geduld immer zur Seite stand.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich ganz herzlich für die große und engagierte Unterstützung, die Hilfestellung bei experimentellen Problemen und besonders für die freundliche Atmosphäre bedanken. Für die mentale Unterstützung, die uneingeschränkte Hilfe innerhalb und außerhalb des Labors, sowie das Ertragen meiner Launen geht mein ganz spezieller Dank an Dani und Claire.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Martin Scheffner für die engagierte Diskussionsbereitschaft und Dr. Ulrike Kogel für die Durchführung von Ubiquitinierungsassays.

Schließlich danke ich meiner Familie, meiner WG und allen Freunden, im Speziellen Geli, Caro und Claudia. Ihre Unterstützung während der ganzen Zeit war für mich eine große Hilfe.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden vorab bei folgenden Gelegenheiten präsentiert:

Mensger C., Crnkovic-Mertens I., Cullmann C., Butz K. und Hoppe-Seyler F. (2006)
"Functional Analysis of the Anti-Apoptotic Livin Protein",
Cell Signaling World 2006, Luxemburg. *Posterpräsentation*

Mensger C., Butz K., Crnkovic-Mertens I., Scheffner M. und Hoppe-Seyler F. (2005)
"The Anti-Apoptotic Livin Protein Binds to the Amino-Terminal Enhancer of Split",
DKFZ PhD Students Poster Presentation 2005, Heidelberg. *Posterpräsentation*
(Posterpreis erhalten)

Mensger C., Butz K., Crnkovic-Mertens I. und Hoppe-Seyler F. (2004)
"Functional Analysis of the Livin Protein",
DKFZ PhD Retreat 2004, Weil der Stadt. *Posterpräsentation*

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	10
Summary	11
1. Einleitung	12
1.1 Krebs in Deutschland	12
1.2 Karzinogenese	13
1.3 Therapieformen	14
1.4 Apoptosemechanismen	14
1.4.1 Der extrinsische Apoptoseweg	15
1.4.2 Der intrinsische Apoptoseweg	15
1.5 Apoptoseresistenz von Tumoren	16
1.6 Mechanismen der Apoptoseresistenz	17
1.7 Die Familie der "Inhibitor of Apoptosis Proteins" (IAPs)	18
1.7.1 Anti-apoptotische Funktionsweise der IAP-Proteine.....	19
1.7.1.1 <i>Caspase-Inhibierung durch IAP-Proteine</i>	19
1.7.1.2 <i>Ubiquitinierung pro-apoptotischer Proteine</i>	20
1.7.1.3 <i>Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch IAP-Proteine</i> ...	20
1.7.2 Regulation der IAP-Proteine.....	21
1.7.3 IAPs als therapeutische Zielmoleküle.....	22
1.8 Livin	24
1.9 Ziel der Arbeit	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Geräte	27
2.1.2 Materialien	27
2.1.3 Reagenzien	28
2.1.4 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	29
2.1.5 Antikörper	29
2.1.6 Plasmide.....	30
2.1.6.1 <i>Hefe-Expressionsvektoren:</i>	30
2.1.6.2 <i>Eukaryotische Expressionsvektoren</i>	31

2.1.6.3	<i>Bakterielle Vektoren</i>	32
2.1.6.4	<i>Vektorbasierte siRNA</i>	32
2.1.7	<i>Zellkultur</i>	32
2.1.7.1	<i>Zellkulturmedien und Zusätze</i>	32
2.1.7.2	<i>Verwendete Zelllinien</i>	33
2.2	Methoden	33
2.2.1	<i>Methoden zum Y2H-System</i>	33
2.2.1.1	<i>Das Y2H-System</i>	33
2.2.1.2	<i>Herstellung selektiver Hefepplatten und Flüssigmedium</i>	35
2.2.1.3	<i>Transformation von Hefezellen</i>	36
2.2.1.4	<i>Transformation der cDNS-Expressionsbank in Hefezellen</i>	37
2.2.1.5	<i>Gesamtproteinextraktion aus Hefezellen</i>	38
2.2.1.6	<i>Isolierung von Plasmid-DNS aus Hefezellen (Plasmid-Rescue)</i> ...	38
2.2.1.7	<i>Replikaplattierung</i>	39
2.2.1.8	<i>Cross-Mating-Assay</i>	39
2.2.2	<i>Methoden der Zellkultur</i>	40
2.2.2.1	<i>Kultivierung adhärent wachsender Zellen</i>	40
2.2.2.2	<i>Transfektion von Säugerzellen mittels Calciumphosphat</i>	40
2.2.2.3	<i>Transfektion synthetischer siRNAs mittels Oligofectamin</i>	41
2.2.2.4	<i>CheckMate-Bindungsassay</i>	42
2.2.2.5	<i>Reporteragen-Analysen</i>	42
2.2.2.6	<i>Messung der Luciferase-Aktivität</i>	43
2.2.2.7	<i>Messung der β-Galaktosidase-Aktivität</i>	44
2.2.2.8	<i>Apoptose-Induktion in HeLa-Zellen</i>	45
2.2.2.9	<i>Herstellung mikroskopischer Präparate</i>	45
2.2.2.10	<i>TUNEL-Assay</i>	45
2.2.2.11	<i>Immunfluoreszenz</i>	46
2.2.3	<i>GST-Pulldown-Experimente</i>	46
2.2.3.1	<i>Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen</i>	46
2.2.3.2	<i>GST-Pulldown mit zellulären Extrakten</i>	47
2.2.3.3	<i>GST-Pulldown mit in vitro exprimierten Proteinen</i>	47
2.2.4	<i>Methoden zur Aufarbeitung und Klonierung von Plasmid-DNS</i>	48
2.2.4.1	<i>DNS-Ligation</i>	48
2.2.4.2	<i>Transformation kompetenter E.coli-Bakterien</i>	48

2.2.4.3	<i>Aufarbeitung kleiner Mengen an Plasmid-DNS (Minipräparation)</i>	49
2.2.4.4	<i>Aufarbeitung großer Mengen an Plasmid-DNS (Maxipräparation)</i>	49
2.2.4.5	<i>Agarosegelelektrophorese von DNS</i>	51
2.2.4.6	<i>Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	51
2.2.4.7	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	51
2.2.4.8	<i>Herstellung vektorbasierter siRNA gegen AES</i>	52
2.2.4.9	<i>Sequenzierungen</i>	53
2.2.5	<i>Methoden zur Analyse von Proteinen</i>	53
2.2.5.1	<i>Gesamtproteinextraktion</i>	53
2.2.5.2	<i>Extraktion cytosolischer Proteine</i>	54
2.2.5.3	<i>Bestimmung von Protein-Konzentrationen</i>	55
2.2.5.4	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	55
2.2.5.5	<i>Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Westernblot)</i>	56
2.2.5.6	<i>Antikörperbehandlung des Westernblots</i>	57
2.2.5.7	<i>Nachweis durch "Enhanced Chemiluminescence" (ECL)</i>	58
2.2.6	<i>Methoden zur Analyse von RNS</i>	58
2.2.6.1	<i>Gesamt-RNS-Extraktion</i>	58
2.2.6.2	<i>Bestimmung von RNS-Konzentrationen</i>	59
2.2.6.3	<i>Gelelektrophorese von RNS</i>	59
2.2.6.4	<i>Transfer von RNS auf eine Nylonmembran (Northernblot)</i>	60
2.2.6.5	<i>Radioaktive Markierung und Reinigung von DNS-Fragmenten</i>	61
2.2.6.6	<i>Hybridisierung von RNS-Filtern mit DNS-Sonden</i>	62
3.	Ergebnisse	63
3.1	Identifizierung neuer Interaktionspartner von Livin	63
3.1.1	<i>Vorexperimente für den Y2H-Screen</i>	63
3.1.1.1	<i>Expression des Köder-Proteins Livinβ</i>	63
3.1.1.2	<i>Test auf Autoaktivierung des Köder-Proteins Livinβ</i>	64
3.1.2	<i>Y2H-Screen</i>	65
3.1.2.1	<i>Replikaplattierung und Re-Screen</i>	65
3.1.2.2	<i>Identifizierung potenzieller Interaktionspartner</i>	66
3.2	Biochemische Analyse der Livinβ-AES-Interaktion	69
3.2.1	<i>Spezifität der Livinβ-AES-Interaktion</i>	69
3.2.1.1	<i>Spezifität in Hefezellen</i>	69
3.2.1.2	<i>Spezifität in Säugerzellen</i>	70

3.2.2	<i>In vitro</i> -Bindungsstudien zur Livin β -AES-Interaktion	72
3.2.2.1	<i>Bindung zwischen GST-AES und zellulärem Livinβ</i>	72
3.2.2.2	<i>Bindung zwischen GST-AES und in vitro translatiertem Livinβ</i>	73
3.3	Mutationsanalysen zur Eingrenzung der Livinβ-AES- Interaktion	73
3.3.1	Kritische Aminosäuren im AES-Protein	74
3.3.1.1	<i>Bindungsanalysen in Hefezellen</i>	74
3.3.1.2	<i>Bindungsanalysen in Säugerzellen</i>	76
3.3.2	Kritische Aminosäuren im Livin-Protein	78
3.4	Apoptose-Regulation durch das AES-Protein	80
3.4.1	AES und Bit1 bei der Apoptose-Regulation.....	80
3.4.1.1	<i>AES-Bit1-Bindungsanalyse</i>	81
3.4.1.2	<i>Analyse apoptotischer Effekte von Bit1</i>	81
3.4.2	Einfluss von AES auf die <i>bcl-2</i> -Promotor-Aktivität.....	82
3.4.3	Einfluss von AES auf die Apoptose-Rate von HeLa-Zellen	83
3.4.3.1	<i>Hemmung der AES-Expression durch vektorbasierte siRNA</i>	83
3.4.3.2	<i>Hemmung der AES-Expression durch synthetische siRNA</i>	84
3.4.3.3	<i>Hemmung der AES-Expression auf RNS-Ebene</i>	85
3.4.3.4	<i>Analyse der Apoptose-Rate nach AES-Hemmung</i>	86
3.4.3.4.1	<i>Analyse der Apoptose-Rate mittels TUNEL-Assay</i>	86
3.4.3.4.2	<i>Analyse der Apoptose-Rate mittels Westernblot</i>	87
3.5	Funktionelle Analyse der Livinβ-AES-Interaktion	88
3.5.1	Koexpression von AES und Livin.....	88
3.5.2	Regulation von endogenem AES nach Livin-Hemmung.....	89
3.5.2.1	<i>AES-Transkript-Spiegel nach Livin-Hemmung</i>	90
3.5.2.2	<i>AES-Protein-Spiegel nach Livin-Hemmung</i>	90
3.5.2.3	<i>AES- und Livin-Status in verschiedenen Zelllinien</i>	91
3.5.3	AES und Livin β bei der TCF-abhängigen Transkription.....	92
3.5.3.1	<i>AES-Mutante AESL35F</i>	93
3.5.3.2	<i>Reportergen-Analysen zur TCF-abhängigen Transkription</i>	94
3.5.4	Einfluss von AES auf die Livin β -Smac-Bindung	95
4.	Diskussion	97
5.	Literatur	107
6.	Abkürzungen	122

Zusammenfassung

Das anti-apoptotische Livin-Protein ist ein Mitglied der "Inhibitor of Apoptosis Protein" (IAP)-Proteinfamilie. Es wird vornehmlich in Tumoren exprimiert und trägt zu deren Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei. Über die molekularen Wirkmechanismen von Livin ist noch wenig bekannt.

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, neue Einblicke in die intrazellulären Aktivitäten des Livin-Proteins zu bekommen. Mit dem "Yeast-2-Hybrid"-Verfahren wurde nach neuen Interaktionspartnern von Livin gesucht. Zu den potenziellen Bindungspartnern, die dabei identifiziert wurden, gehörte das "Amino-terminal Enhancer of Split" (AES)-Protein, ein Mitglied der Gro/TLE-Familie. Da AES an der Apoptose-Regulation und an der Transkriptionskontrolle beteiligt ist, konzentrierten sich die weiteren Analysen auf die Livin-AES-Interaktion.

Bindungsanalysen in Hefe- und Säugerzellen ergaben, dass die Interaktion hochspezifisch ist. So bindet AES nicht an andere IAP-Proteine, während Livin nicht mit dem AES-verwandten TLE2-Protein interagiert. Die Livin-AES-Interaktion wurde durch *in vitro*-Experimente bestätigt. Die für die Interaktion kritischen Domänen wurden mittels Mutationsanalysen auf die BIR-Domäne von Livin und die Q-Domäne von AES eingeeengt. Mit gerichteten Mutationen wurde in der AES-Q-Domäne eine Aminosäure kartiert, deren Transfer in die homologe Q-Domäne des TLE2-Proteins ausreichte, die Bindungsfähigkeit an Livin auf TLE2 zu übertragen.

Funktionelle Analysen ergaben, dass AES pro-apoptotisch wirkt, insbesondere in Kombination mit genotoxischen Agenzien. Dies könnte mechanistisch darauf beruhen, dass AES in der Lage ist mit der Interaktion zwischen Livin und Smac zu interferieren. Freigesetztes Smac wäre dann in der Lage, die Hemmfunktion anderer IAPs auf Caspasen zu neutralisieren und letztendlich Apoptose zu induzieren.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Livin die transkriptionelle Aktivität von AES modulieren kann. So steigert die Koexpression von Livin und AES die Aktivität eines TCF-abhängigen Zielpromotors. TCF-Faktoren spielen eine wesentliche Rolle für die Stimulation der Zellproliferation im Rahmen der Wnt-Signalkaskade.

Diese Befunde verbinden, mit AES als Schalter, erstmals IAP-Proteine mit der Wnt-Signalkaskade. Zukünftig wird es interessant sein, diese Verknüpfung in Tumoren weiter aufzuklären, da sich Tumorzellen typischerweise durch konzentrierte Störungen von Apoptose- und Proliferationskontrolle auszeichnen.

Summary

The anti-apoptotic Livin protein is a member of the “Inhibitor of Apoptosis Protein” (IAP) family. Livin is preferentially expressed in tumors and contributes to their apoptotic resistance towards chemotherapy. Little is known about the molecular activities of Livin.

It was the overall aim of the study, to gain new insights into the intracellular activities of Livin. To search for novel interaction partners for Livin, the yeast two-hybrid system was employed. Several potential binding partners were identified, among them the “Amino-terminal Enhancer of Split” (AES) protein, a member of the Gro/TLE protein family. Since AES is believed to participate in apoptosis regulation and in transcriptional control, subsequent analyses focused on the Livin-AES interaction.

Binding analyses in yeast and mammalian cells indicated that the interaction is highly specific: AES did not bind to other IAP proteins, whereas Livin did not interact with TLE2, a TLE protein which is closely related to AES. The interaction between Livin and AES was also verified by *in vitro* binding studies. The critical domains for the Livin-AES interaction were mapped by mutational analyses to the BIR domain of Livin and to the Q domain of AES. Site directed mutagenesis identified a critical amino acid residue within the AES Q domain. The introduction of this amino acid into the Q domain of TLE2 conferred the ability to interact with Livin to the TLE2 protein.

Functional analyses revealed that AES exerts pro-apoptotic activities, in particular in combination with genotoxic agents. Mechanistically, this could be related to the observation in this study that AES is able to interfere with the Livin-Smac interaction. Upon release from Livin, Smac may be able to neutralize the inhibition of caspases by other IAPs, eventually resulting in apoptosis induction.

Furthermore, it was found that Livin has the potential to modulate AES-dependent transcriptional regulation. Co-expression of Livin and AES stimulated the activity of a promoter targeted by TCF factors. These transcription factors play a crucial role for the induction of cell proliferation in the context of the Wnt signaling cascade.

These findings indicate that AES may bridge IAP proteins with Wnt signaling. It will be interesting for future analyses, to further analyze this connection in tumor cells which are typically characterized by concerted deregulations of apoptosis and proliferation control.

1. Einleitung

1.1 Krebs in Deutschland

Krebs ist nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Becker und Wahrendorf, 1997). Durch vermehrt eingesetzte Früherkennungsverfahren, Präventionsmaßnahmen und Verbesserungen der Behandlungsmöglichkeiten sinkt seit einigen Jahren die altersbereinigte Sterblichkeit stetig. Diese Tatsache sollte aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass durch die allgemein gestiegene Lebenserwartung die absolute Zahl der Krebstodesfälle weiterhin ansteigen wird (Becker *et al.*, 2007).

Epidemiologische Studien gehen davon aus, dass 60% der Krebstodesfälle in Deutschland auf Umweltfaktoren zurückzuführen sind, von denen allerdings unter realistischen Umständen nur 18-33% vermeidbar sind (Becker, 2003). Somit kann der Großteil der Krebsfälle auch durch optimale Prävention nicht verhindert werden. Gesetzlich eingeführte "Screening"-Verfahren zur Früherkennung, wie der für Gebärmutterhalskrebs eingesetzte PAP-Abstrich, führten erfolgreich zu einer Reduktion der Sterberate bei dieser Tumorart (Schenck und von Karsa, 2000). Der Erfolg von Früherkennungsverfahren bei anderen Tumorarten bleibt allerdings begrenzt. So wird der Rückgang der Sterblichkeit bei Brustkrebs, wie er in Deutschland seit Mitte der Neunziger Jahre beobachtet wird, hauptsächlich den verbesserten therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten, als den durchgeführten Früherkennungsverfahren zugeschrieben (Becker, 2001). Erfolge bei der Bekämpfung von Krebs auf Grund verbesserter Therapien sind auch für Prostata- und Hodenkrebs, sowie für einige Lymphome und Leukämien dokumentiert (Oliver *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2007).

Das zeigt, dass der präventive Schutz vor Risikofaktoren und der Einsatz von Früherkennungsverfahren nur begrenzt erfolgreich sind und keinen vollständigen Schutz vor Krebs bieten können. Verbesserungen in den molekularen Therapieformen und verfeinerte Prognoseverfahren bleiben somit notwendig und

werden nach wie vor eine wesentliche Rolle bei einer erfolgreichen Krebsbekämpfung spielen.

1.2 Karzinogenese

Über 100 verschiedene Krebsformen existieren, die eine Vielzahl von Geweben des Körpers betreffen. Die meisten, oder womöglich alle dieser Krebsarten, zeigen gemeinsame Eigenschaften und Mechanismen in ihrer Entstehung. Diese Tumorgenese ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem sich über viele Jahre hinweg nach und nach eine Reihe von Genveränderungen innerhalb einer Zelle anhäufen (Vogelstein und Kinzler, 1993).

Diese Mutationen betreffen hauptsächlich zwei Klassen von krebsrelevanten Genen: die Proto-Onkogene, die in mutierter Form als Onkogene bezeichnet werden und die Tumorsuppressorgene. Die Genprodukte der Proto-Onkogene wirken häufig stimulierend auf den Zellzyklus. Mutationen von Onkogenen können zu einer Aktivitätssteigerung führen und somit zu einer Verstärkung des Zellwachstums. Tumorsuppressorgene besitzen oft wachstumshemmende Funktionen. Mutationen, die mit einem Aktivitätsverlust von Tumorsuppressorgenen assoziiert sind, können wie aktivierte Onkogene ebenfalls zu einer Deregulation des Zellwachstums führen (Hanahan und Weinberg, 2000).

Im Verlauf der Karzinogenese eignen sich die Tumorzellen durch weitere Mutationen bestimmte Eigenschaften an, um unkontrolliert wachsen zu können und sich somit im betroffenen Gewebe zu etablieren. Diese erworbenen Fähigkeiten sind: Unabhängigkeit gegenüber wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Signalen, die Fähigkeit sich unbegrenzt zu replizieren, Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli und die Fähigkeit sich an das bestehende Blutgefäßsystem anzuschließen (Hanahan und Weinberg, 2000; Hahn und Weinberg, 2002).

Die Eigenschaft, in benachbartes Gewebe einzuwandern und über das Blutkreislaufsystem in Fremdgewebe zu metastasieren, charakterisiert den Tumor schließlich als maligne (Vogelstein und Kinzler, 1993).

1.3 Therapieformen

Die klassischen Therapieformen der Krebsbehandlung sind, neben der operativen Entfernung des Tumors, die Bestrahlung und die medikamentöse Bekämpfung der Krebszellen durch Chemotherapeutika (Zytostatika). Häufig werden diese Therapieformen kombiniert eingesetzt und ergänzend zur Operation angewendet. Sowohl Chemotherapie als auch Bestrahlung wirken auf proliferierende Zellen, indem sie in die DNS-Replikation oder Zellteilung eingreifen (Ashkenazi, 2002). Dadurch sollen präferentiell Tumorzellen angegriffen werden, deren typisches Merkmal eine erhöhte Proliferationsrate ist.

1.4 Apoptosemechanismen

Die Apoptose ist ein intrazelluläres Zelltodprogramm, das für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Homöostase bei mehrzelligen Organismen eine bedeutende Rolle spielt. Durch Apoptose werden beispielsweise überzählige Zellen aus dem Gewebe eliminiert sowie Zellen, die intrazelluläre Defekte (z. B. nach DNS-Schädigung) aufweisen. Die Deregulierung des Apoptoseprogramms kann zu Funktionsstörungen wie Autoimmunerkrankungen, neurodegenerativen Krankheiten oder Krebs führen (Jin und El-Deiry, 2005).

Im Wesentlichen existieren zwei intrazelluläre Signalwege über die Apoptose ausgelöst und weitergeleitet werden kann - der extrinsische und der intrinsische Apoptoseweg. Welcher der beiden Wege induziert wird, hängt hauptsächlich vom apoptotischen Stimulus ab. Jedoch gibt es auch Verbindungen zwischen beiden Wegen und beide führen schließlich zur Aktivierung von Caspasen, den Effektor-Molekülen der Apoptose.

1.4.1 Der extrinsische Apoptoseweg

Der extrinsische oder Rezeptor-vermittelte Apoptoseweg wird beispielsweise von Zellen des Immunsystems verwendet, um infizierte Körperzellen oder Tumorzellen zu eliminieren (Igney und Krammer, 2002a). Er wird durch die Bindung von Liganden an spezifischen Todesrezeptoren (CD95, TNFR1, TRAIL-R1 und TRAIL-R2) an der Zelloberfläche ausgelöst. Die Ligand-Bindung führt an der cytosolischen Seite des aktivierten Rezeptors zur Rekrutierung von Adaptermolekülen. Diese binden an die Initiator-Caspase-8 und -10, so dass die Caspase-Moleküle in räumliche Nähe geraten. Dadurch können die Caspasen dimerisieren, was zur Autokatalyse und zur Aktivierung der Initiator-Caspasen führt. Dieser Signalkomplex wird als "death-inducing signalling complex" (DISC) bezeichnet. Die Initiator-Caspasen spalten und aktivieren anschließend die Effektor-Caspasen-3, -6, und -7 (Ashkenazi, 2002; Lavrik *et al.*, 2005).

1.4.2 Der intrinsische Apoptoseweg

Der intrinsische oder mitochondriale Apoptoseweg wird durch DNS-Schädigungen, Onkogen-Aktivierung oder andere apoptotische Signale, die aus dem Inneren der Zelle stammen, ausgelöst. Es kommt zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch Cytochrom C und andere pro-apoptotische Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum ins Cytosol freigesetzt werden. Die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran wird durch ein Zusammenspiel von anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie reguliert. Nach der Freisetzung der mitochondrialen Proteine formiert sich im Cytosol ein Multiproteinkomplex aus Apaf-1 und Cytochrom C Molekülen. In diesem sogenannten Apoptosom wird die Initiator-Caspase-9 gebunden und aktiviert. Caspase-9 wiederum spaltet und aktiviert die Effektor-Caspasen -3 und -7 (Riedl und Shi, 2004; Gogvadze und Orrenius, 2006).

Auch der intrinsische Apoptoseweg kann durch Todesrezeptoren aktiviert werden, indem Caspase-8 das zur Bcl-2-Familie gehörende BID-Protein spaltet. Das

gespaltene BID aktiviert daraufhin die pro-apoptotischen Proteine Bak und Bax, was zur Permeabilisierung der Mitochondrien führt (Korsmeyer *et al.*, 2000).

Die durch beide Wege aktivierbaren Effektor-Caspasen spalten eine Vielzahl von zelluläre Substraten, was zu den charakteristischen biochemischen und morphologischen Veränderung einer apoptotischen Zelle, wie Chromatin-kondensation, Fragmentierung der DNS, Zellschrumpfung und Zellfragmentierung führt (Fischer *et al.*, 2003).

1.5 Apoptoseresistenz von Tumoren

Viele Chemo- und Radiotherapeutika vermitteln ihre antitumoralen Effekte durch die Auslösung von Apoptose in den Tumorzellen (Kaufmann und Earnshaw, 2000; Debatin, 2004). Während Chemotherapeutika prinzipiell auch zu einer Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges führen können (Fulda und Debatin, 2006), wird angenommen, dass insbesondere DNS-schädigende Radio- und Chemotherapeutika hauptsächlich durch die Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges wirken (Galluzzi *et al.*, 2006).

Apoptoseresistenz ist ein häufiges und typisches Merkmal von Tumorzellen. Bei der Karzinogenese bietet sie den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil, z. B. eine erhöhte Überlebensrate bei Nahrungsmangel oder unter hypoxischen Bedingungen. Die erhöhte Resistenz gegenüber der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose begünstigt außerdem, dass die Tumorzellen vom Immunsystem nicht mehr effizient eliminiert werden können (Kaufmann und Gores, 2000).

Die Apoptoseresistenz spielt nicht nur bei der Karzinogenese eine entscheidende Rolle, sondern stellt auch ein ernsthaftes Problem für die Chemo- und Strahlentherapie in der Klinik dar. So sind Rezidivtumore von zuvor therapierten Patienten für gewöhnlich resistenter als die Primärtumore (Igney und Krammer, 2002b), da durch die eingesetzten Therapien auf apoptoseresistente Tumorzellen selektioniert wird.

Ein Ziel der aktuellen Forschung ist daher die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Apoptoseresistenz von Tumorzellen. Dieses Wissen soll helfen, gezielt Tumorzellen in der Therapie erfolgreich gegenüber Apoptose zu resensibilisieren und zu eliminieren.

1.6 Mechanismen der Apoptoseresistenz

Die Apoptoseresistenz von Tumorzellen resultiert aus Funktionsstörungen von Apoptose-regulierenden Proteinen, die zu unterschiedlichen Defekten im Apoptoseprogramm führen (Johnstone *et al.*, 2002; Kaufmann und Vaux, 2003). Die erworbene Apoptoseresistenz kann dabei prinzipiell auf der Inaktivierung pro-apoptotischer Proteine oder auf einer verstärkten Aktivität anti-apoptotischer Proteine beruhen.

Bei einer Vielzahl solider Tumore und hämatologischen Krebserkrankungen konnte eine erhöhte Expression der anti-apoptotischen IAP-Proteine (Inhibitor of Apoptosis Proteins) nachgewiesen werden (LaCasse *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2003). Das ist bei Leukämien (Tamm *et al.*, 2000), Lymphomen (Ambrosini *et al.*, 1997; Akyurek *et al.*, 2006), Melanoma (Vucic *et al.*, 2000), Kolonkarzinomen (Kawasaki *et al.*, 2001), Nierenzellkarzinomen (Byun *et al.*, 2007; Crnkovic-Mertens *et al.*, 2007), Prostatakarzinomen (Krajewska *et al.*, 2003), Lungenkarzinomen (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2006b) oder Mesotheliomen (Gordon *et al.*, 2007) der Fall. Oft werden in den Tumorzellen mehrere Mitglieder der IAP-Familie überexprimiert.

Die Überexpression von IAPs könnte zudem eine wichtige Rolle bei der Apoptoseresistenz von Tumorzellen in der Klinik spielen. So blockieren sie experimentell die Apoptose-Induktion durch Chemotherapeutika, wie Cisplatin (Li *et al.*, 2001), Doxorubicin (Tirro *et al.*, 2006), Taxol (Nomura *et al.*, 2003) oder auch nach UVB-Bestrahlung (Grossman *et al.*, 2001).

1.7 Die Familie der "Inhibitor of Apoptosis Proteins" (IAPs)

Die IAP-Proteine stellen eine Familie anti-apoptotischer Faktoren dar, von der stark konservierte Homologe in einer Vielzahl von Organismen, wie Würmern, Fliegen, Mäusen und Menschen existieren (Salvesen und Duckett, 2002; Liston *et al.*, 2003; de Graaf *et al.*, 2004). Ursprünglich wurden die IAP-Proteine in Baculoviren identifiziert. Diese Insektenviren exprimieren ein IAP-Protein, um nach der Infektion die in der Wirtszelle eingeleitete Apoptose zu hemmen (Crook *et al.*, 1993).

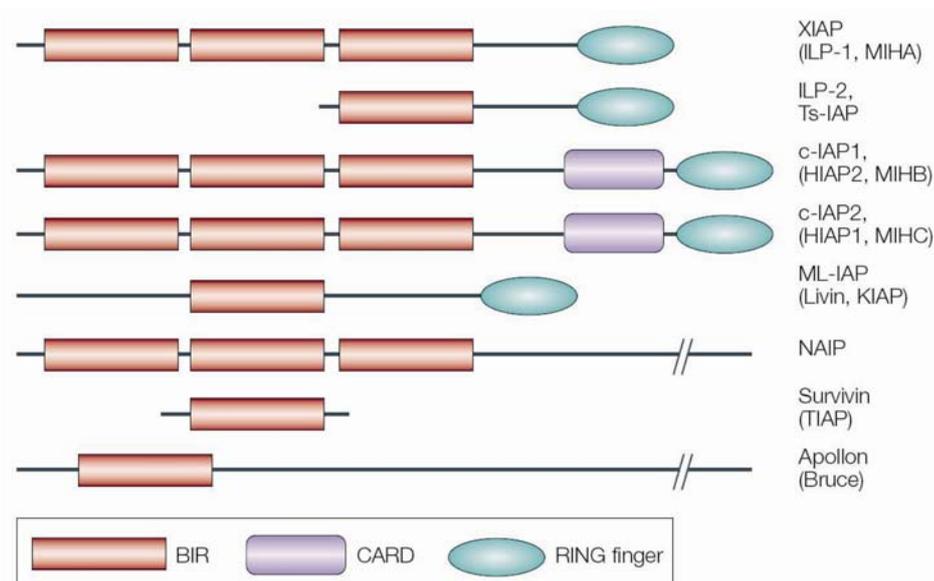


Abb.1.7.1: Schematische Übersicht der acht menschlichen IAP-Proteine (aus Salvesen und Duckett, 2002). IAP-Proteine sind durch das Vorhandensein mindestens einer BIR-Domäne charakterisiert. Alternative Namen sind in Klammern angegeben. BIR: Baculovirus IAP repeat. CARD: Caspase-recruitment domain. RING: Really interesting new gene. XIAP: X-linked IAP. ILP-2: IAP-like protein. c-IAP1: cellular IAP1. ML-IAP: Melanoma IAP. NAIP: Neuronal apoptosis inhibitory protein.

Bis heute wurden acht humane IAPs identifiziert: XIAP, ILP-2, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP (Livin), NAIP, Survivin und Apollon. Alle IAP-Proteine sind durch ein bis drei "Baculovirus IAP-repeat"-Domänen (BIR-Domänen) charakterisiert, die 70-80 Aminosäuren lang sind (Abb. 1.7.1).

Die IAPs interagieren durch ihre BIR-Domänen mit anderen Proteinen, wie Caspasen oder den mitochondrialen Proteinen Smac/DIABLO (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000) und Omi/HtrA2 (Hegde *et al.*, 2002). c-IAP1 und c-IAP2 binden über ihre BIR-Domänen an TRAF1 und TRAF2, die Komponenten des TNF α -

Signaltransduktionsweges sind (Rothe *et al.*, 1995). Die BIR-Domänen scheinen essentiell für die anti-apoptotischen Eigenschaften der IAP-Proteine zu sein (Takahashi *et al.*, 1998).

XIAP, c-IAP1, c-IAP2, NAIP und Livin besitzen zudem eine RING-Domäne. Diese Domänen besitzen E3 Ubiquitin-Ligase-Aktivität, die dazu führt, dass Zielproteine mit einem (Monoubiquitinierung) oder mehreren (Polyubiquitinierung) Ubiquitinresten kovalent verknüpft werden. Ubiquitin ist ein 76 Aminosäure großes globuläres Protein. Die RING-E3-Ubiquitin-Ligasen vermitteln die Substratspezifität, indem sie nicht nur die Ubiquitinierung vermitteln, sondern auch selbst das Zielprotein binden (Fang *et al.*, 2003). Die Monoubiquitinierung des Zielproteins führt zu einer funktionellen Veränderung des Proteins und die häufigste Form der Polyubiquitinierung zum proteolytischen Abbau des Zielproteins. Der Abbau polyubiquitinerter Proteine findet im Proteasom, einem Multiproteinkomplex, statt (Hicke, 2001; Vaux und Silke, 2005a).

Die CARD-Domäne, die zwischen der BIR- und RING-Domäne liegt, ist nur in c-IAP1 und c-IAP2 enthalten. Sie vermittelt Protein-Protein-Interaktionen mit anderen CARD-besitzenden Proteinen (Park *et al.*, 2007). Die Bedeutung der CARD-Domäne für die c-IAP1- und c-IAP2- Funktion ist noch nicht geklärt.

1.7.1 Anti-apoptische Funktionsweise der IAP-Proteine

1.7.1.1 Caspase-Inhibierung durch IAP-Proteine

Über ihre BIR-Domäne können IAP-Proteine an Caspasen binden und sie inaktivieren (Deveraux *et al.*, 1998). Obwohl die verschiedenen BIR-Domänen strukturell ähnlich sind, zeigen sie Unterschiede in ihrer Caspase-Spezifität. Bei IAP-Proteinen mit drei BIR-Domänen (XIAP, c-IAP1, c-IAP2) vermittelt die dritte BIR-Domäne (BIR3) die Bindung an die prozessierte Form von Caspase-9. Diese Interaktion verhindert die Homodimerisierung und Aktivierung der Caspase-9 (Roy *et al.*, 1997; Shiozaki *et al.*, 2003).

Mit der zweiten BIR-Domäne (BIR2) und einer N-terminal benachbarten Region wird die Bindung der IAPs an die aktiven Caspasen -3 und -7 vermittelt. Diese Bindung verhindert die Caspase-Interaktion mit zellulären Substraten (Roy *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 2005).

ILP-2 kann mit seiner einzelnen BIR-Domäne nur an Caspase-9 binden, wohingegen Survivin mit seiner einzelnen BIR-Domäne an Caspase-3 und -7 und Livin sogar an Caspase-3, -7 und -9 binden kann (Liston *et al.*, 2003).

Neben der Bindung an Caspasen werden aber auch andere Mechanismen diskutiert, mit denen IAPs die Apoptose blockieren können.

1.7.1.2 Ubiquitinierung pro-apoptotischer Proteine

IAP-Moleküle, die eine RING-Domäne mit Ubiquitin-Ligase-Aktivität enthalten, können die Ubiquitinierung pro-apoptotischer Proteine induzieren. Neben dem proteolytischen Abbau kann die Ubiquitinierung möglicherweise auch zu Veränderungen in der Funktion der Zielproteine führen (Vaux und Silke, 2005a).

Zielproteine der IAP-vermittelten Ubiquitinierung sind gebundene Caspasen (Huang *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; Morizane *et al.*, 2005) und der Apoptose-Regulator Smac/DIABLO (s. u.) (MacFarlane *et al.*, 2002; Hu und Yang, 2003; Ma *et al.*, 2006).

1.7.1.3 Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch IAP-Proteine

Die anti-apoptotische Aktivität mancher IAP-Proteine kann außerdem durch die Modulation von Signaltransduktions-Kaskaden vermittelt werden.

XIAP (Hofer-Warbinek *et al.*, 2000; Levkau *et al.*, 2001) und c-IAP2 (Chu *et al.*, 1997) aktivieren den NF κ B-Signalweg, indem sie den Abbau des NF κ B-Inhibitors I κ B stimulieren. Die Aktivierung dieses Signalweges führt zur Transkription verschiedener anti-apoptotischer Zielproteine, zu denen auch die IAP-Proteine selbst gehören.

XIAP interagiert im TGF β -Signalweg an der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors in einem Multi-Protein-Komplex mit dem Tab1-Protein und wirkt in diesem Zusammenhang als positiver Regulator des BMP-Signalweges (BMP für "Bone-Morphogenic-Protein") (Yamaguchi *et al.*, 1999).

Die IAP-Proteine XIAP, NAIP und Livin aktivieren die Kinase JNK1, was zur anti-apoptotischen Wirkung dieser IAP-Proteine bei der TNF α -induzierten Apoptose beiträgt (Sanna *et al.*, 2002).

Die Proteine c-IAP1 und c-IAP2 wurden ursprünglich als Komponenten des TNF α -Signalweges identifiziert. Die Bindung von c-IAP1 und c-IAP2 an die TRAF-Moleküle führt zur Aktivierung des NF κ B-Signalweges und ist notwendig, um TNF α -induzierte Apoptose zu inhibieren (Wang *et al.*, 1998).

1.7.2 Regulation der IAP-Proteine

Die anti-apoptotische Funktion der IAP-Proteine kann durch Antagonisten wie Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 neutralisiert werden (Vaux und Silke, 2003). Die Interaktion zwischen Smac/DIABLO und den IAP-Proteinen konnte bis jetzt für XIAP, c-IAP1, c-IAP2, Survivin und Livin gezeigt werden. Kürzlich wurden in einem Screen weitere IAP-Antagonisten in Säugerzellen identifiziert, die mit der BIR2 oder der BIR3 Domäne von XIAP interagieren (Verhagen *et al.*, 2007).

Omi/HtrA2 wird wie das Smac-Protein nach einem apoptotischen Stimulus aus dem mitochondrialen Intermembranraum ins Cytosol entlassen. Die prozessierten Proteine Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 besitzen ein amino-terminales IAP-Bindungsmotiv (IBM), das die Interaktion mit der BIR-Domäne der IAP-Proteine vermittelt (Srinivasula *et al.*, 2000; Ashhab *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Bindung können die IAPs nicht mehr mit Caspasen interagieren und diese hemmen, wodurch Apoptose wieder ablaufen kann (Ekert *et al.*, 2001; Srinivasula *et al.*, 2001).

IAP-Proteine können außerdem ihren eigenen Abbau fördern, indem sie sich nach einem apoptotischen Stimulus selbst ubiquitinieren. Die Behandlung mit

Glukokortikoiden oder Etoposid führt zur Ubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau von XIAP und c-IAP1 (Yang *et al.*, 2000). Proteasomeninhibitoren verhindern in Melanomzellen nicht nur den Abbau von Survivin und Livin, sondern auch den Ablauf der Apoptose, der durch ein Polyamin-Analog induziert wird (Chen *et al.*, 2003). Zudem konnte die Autoubiquitinierung von Livin *in vivo* nachgewiesen werden (Ma *et al.*, 2006).

Möglich wird die Autoubiquitinierung wahrscheinlich durch die Interaktion mit IAP-bindenden Proteinen, die als Dimere oder höhere Oligomere gebunden werden. Dadurch kommen die IAPs in räumliche Nähe zueinander und können sich gegenseitig ubiquitinieren. Oder die IAP-Proteine heterodimerisieren untereinander über ihre RING-Domäne, wodurch sie sich wechselseitig ubiquitinieren können und anschließend im Proteasom abgebaut werden (Silke *et al.*, 2005; Vaux und Silke, 2005a).

Ein weiterer Mechanismus in der Regulation der anti-apoptotischen Funktion von IAPs ist ihre proteolytische Spaltung durch Caspasen. Während der Fas-induzierten Apoptose wird endogenes XIAP durch Caspasen in zwei Fragmente gespalten. Diese proteolytischen Fragmente besitzen entweder die gleiche oder eine niedrigere Affinität zu Caspasen (Deveraux *et al.*, 1999). Bei der Spaltung von c-IAP1 (Clem *et al.*, 2001) und Livin (Nachmias *et al.*, 2003) entstehen Fragmente, die sogar pro-apoptotische Eigenschaften besitzen.

1.7.3 IAPs als therapeutische Zielmoleküle

Die IAP-Proteine sind aus mehreren Gründen attraktiv für therapeutische Ansätze. Sie sind in vielen Tumoren überexprimiert und tragen vermutlich zu deren Chemoresistenz bei. Aufgrund der Inhibierung sowohl von Initiator- als auch von Effektor-Caspasen und durch ihren Einfluss auf die Signaltransduktion, wirken sie auf mehreren Ebenen anti-apoptotisch. Therapeutika gegen IAPs würden somit an verschiedenen Stellen der defekten Signalwege eingreifen. Das würde die Wahrscheinlichkeit erhöhen, die Tumorzellen gegen Apoptose resensibilisieren zu können (Nachmias *et al.*, 2004).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Apoptoseresistenz von Tumorzellen durch eine funktionelle Hemmung von IAPs überwunden werden kann. Die Inhibierung der Expression unterschiedlicher *iap*-Gene durch siRNA (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2003) oder Antisense-RNA (Naumann *et al.*, 2007) sowie die Blockierung durch niedermolekulare Inhibitoren auf Proteinebene (Bockbrader *et al.*, 2005) führen zu einer Resensibilisierung der IAP-exprimierenden Tumorzellen gegenüber pro-apoptotischen Stimuli.

Ein vielversprechendes therapeutisches Zielmolekül stellt das Survivin dar. Antisense-Oligonukleotide gegen Survivin werden bereits in klinischen Studien getestet (Schimmer und Dalili, 2005). Die Expression von Survivin galt lange Zeit als streng tumorspezifisch. Inzwischen häufen sich Hinweise, dass Survivin auch in manchen gesunden Zellen exprimiert wird, z. B. in hematopoetischen Zellen, T-Lymphozyten, neutrophilen Zellen und vaskulären Endothelzellen. Ähnlich wie bei XIAP, zeigten sich aber in präklinischen Tiermodellen durch die Survivin-Inhibierung keine toxischen Effekte (Fukuda und Pelus, 2006).

Für Livin stellt sich eine ähnliche Situation wie für Survivin dar. Auch das Expressionsmuster von Livin galt weitestgehend als tumorspezifisch. In neueren Publikationen wurde die Expression von Livin jedoch auch in normalen adulten Zellen und Geweben nachgewiesen (s.u.). Allerdings ist die Expression, ähnlich wie bei Survivin, auf spezifische Zelltypen beschränkt und im Tumorgewebe für gewöhnlich stärker, als in den gesunden normalen Zellen.

Die präferentielle Expression von Livin in Tumoren sowie seine dokumentierten anti-apoptotischen Aktivitäten in Tumorzellen könnten Livin zu einem interessanten therapeutischen Zielmolekül machen (Chang und Schimmer, 2007; Liu *et al.*, 2007).

1.8 Livin

Livin, auch ML-IAP oder KIAP genannt, besitzt eine einzelne BIR-Domäne und eine carboxyterminale RING-Domäne (Lin *et al.*, 2000; Vucic *et al.*, 2000; Kasof und Gomes, 2001) (Abb. 1.8.1).

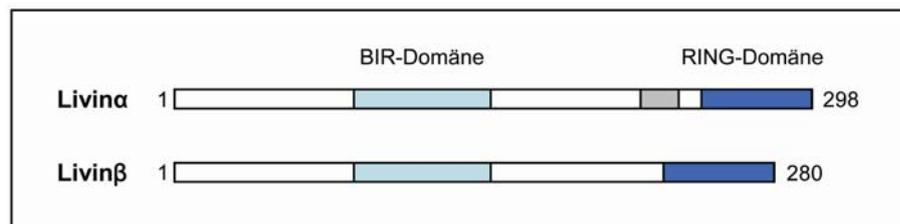


Abb. 1.8.1: Schematische Übersicht der Isoformen Livin α (AS 1-298) und Livin β (AS 1-280). hellblau: BIR-(Baculovirus IAP Repeat)-Domäne. Dunkelblau: RING-(Really Interesting New Gene)-Domäne. Grau: Lokalisierung der 18 Aminosäure langen Region, die nur in Livin α vorkommt.

Durch alternatives Splicing entstehen zwei Isoformen unterschiedlicher Größe, Isoform α mit 298 Aminosäuren und Isoform β mit 280 Aminosäuren (Ashhab *et al.*, 2001). Die beiden Proteine unterscheiden sich in einer 18 Aminosäure langen Region zwischen der BIR- und der RING-Domäne, die nur in der α -Isoform vorhanden ist (Abb. 1.8.1). Vucic *et al.* konnten keine funktionellen Unterschiede zwischen den Isoformen finden, wohingegen andere Arbeitsgruppen unterschiedliche apoptotische Eigenschaften beobachteten, die je nach Zelltyp und apoptotischen Stimulus variierten (Ashhab *et al.*, 2001; Crnkovic-Mertens *et al.*, 2006a).

Ursprünglich wurde Livin als Melanom-assoziiert beschrieben, woher auch die alternative Bezeichnung "Melanoma-linked-IAP" (ML-IAP) stammt (Vucic *et al.*, 2000). Dies beruhte auf der häufigen Überexpression von Livin in Melanomen und auf der Beobachtung, dass der Livin-Lokus auf einem Chromosomen-Abschnitt liegt, der in Melanomen häufig vervielfältigt vorliegt (Barks *et al.*, 1997). Dabei wurde in Melanomzellen eine direkte Korrelation zwischen der Resistenz gegenüber Apoptose und der Expressionsspiegel von Livin beobachtet (Nachmias *et al.*, 2003).

Inzwischen konnte die Expression von Livin in einer Vielzahl weiterer Tumorarten, wie Blasenkrebs (Gazzaniga *et al.*, 2003), manchen Formen von Lungenkrebs

(Tanabe *et al.*, 2004; Hariu *et al.*, 2005; Crnkovic-Mertens *et al.*, 2006b), Pankreastumoren (Lopes *et al.*, 2007), Leukämien (Qiuping *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2007), Nierenzellkarzinomen (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2007), Mesotheliomen (Gordon, 2007), Astrozytomen (Liu *et al.*, 2006), Neuroblastomen (Kim *et al.*, 2005) und Nasopharynxkarzinomen (Xiang *et al.*, 2006) nachgewiesen werden.

Neben Tumorzellen konnte die Expression von Livin in manchen fetalen Geweben und in einigen adulten Normalgeweben detektiert werden, wie Plazenta, Hoden, Thymus, Lymphknoten, Herz, Milz, Eierstöcken, Niere, Skelettmuskel, Gehirn, peripheren Blutlymphozyten und Lunge (Lin *et al.*, 2000; Vucic *et al.*, 2000; Ashhab *et al.*, 2001; Kasof und Gomes, 2001; Gordon *et al.*, 2007). Gewöhnlicherweise sind die Livin-Spiegel in Normalgeweben jedoch deutlich geringer als in den Tumoren und können z. T. auch ein Isoform-spezifisches Expressionsmuster aufzeigen (Ashhab *et al.*, 2001).

Livin kann Caspase-3, -7 und -9 binden und deren Aktivität reduzieren (Kasof und Gomes, 2001). Die Caspase-Inhibierung durch Livin ist jedoch deutlich geringer ausgeprägt, als durch XIAP (Duckett, 2005; Vucic *et al.*, 2005; Eckelman *et al.*, 2006). Dadurch stellt sich die Frage, ob die Apoptose-Hemmung durch Livin nicht primär über andere Mechanismen als eine direkte Inhibition von Caspasen erfolgt.

Ein Beispiel dafür, dass IAP-Proteine nicht nur durch direkte Caspase-Inhibierung sondern indirekt, z. B. durch die Neutralisierung von IAP-Antagonisten wirken können, bietet das Baculovirus Op-IAP. Dieser Faktor blockiert in Säugerzellen Apoptose, obwohl er nicht direkt an Caspasen binden kann. Allerdings bindet und neutralisiert er Smac, was für die anti-apoptotische Eigenschaft von Op-IAP notwendig ist (Wilkinson *et al.*, 2004).

Ein ähnliches Szenario ist auch für Livin denkbar. So bindet Livin relativ stark an Smac/DIABLO (Vucic *et al.*, 2002) und könnte die aus den Mitochondrien entlassenen Smac-Proteine abfangen. Dies wiederum führt dazu, daß andere IAPs (als stärkere Caspase-Inhibitoren) nicht mehr durch Smac neutralisiert werden und somit insgesamt die Caspase-Hemmung verstärkt wird (Vucic *et al.*, 2005). Dieser

indirekte Mechanismus wurde auch für die anti-apoptotische Wirkung des Survivin-Proteins vorgeschlagen (Song *et al.*, 2003, s.a. Diskussion).

1.9 Ziel der Arbeit

Die molekularen Mechanismen der Apoptose-Modulation durch Livin sind noch weitgehend ungeklärt. Auch ist wenig über mögliche zusätzliche Funktionen von Livin bekannt. Übergeordnetes Ziel der Arbeiten ist es daher, neue Einblicke in die intrazellulären Aktivitäten des Livin-Proteins zu gewinnen.

Um nachgeschaltete Effektoren für die Livin-Funktion zu identifizieren, sollten zelluläre Interaktionspartner des Livin-Proteins isoliert und charakterisiert werden. Hierfür sollte das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Yeast Two-Hybrid, Y2H) mit Livin als Köder aufgebaut und zur Identifizierung neuer zellulärer Bindungspartner aus einer cDNS-Expressionbank eingesetzt werden. Potentielle Interaktionspartner sollten hinsichtlich ihrer Bindungsspezifität charakterisiert werden. Zudem sollte untersucht werden, ob sie auch *in vitro* und in Säugerzellen an Livin binden können. Kritische Interaktionsdomänen sollten mittels Mutagenese kartiert werden, sowohl auf der Seite von Livin, als auch von Bindungspartnern. Zusätzlich sollten Funktionsstudien von Bindungspartnern von Livin vorgenommen werden, insbesondere hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die Apoptose-Regulation. Schließlich sollten auch der Einfluss von Livin auf die intrazelluläre Aktivität von Bindungspartnern untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Cerenkow-Counter	Dupont NEN, Bad Homburg
ELISA-Reader	Thermo Elektron, Karlsruhe
Luminometer (Lucy1)	Anthos, Krefeld
Hybridisierungs-ofen (Hybrid 2000)	Saur Laborbedarf, Reutlingen
Horizontale Gelkammer für Agarosegele	Peqlab, Erlangen
Vertikale Plattengelapparatur für Acrylamidgele	Gibco BRL, Eggenstein
pH-Meter (761 Calimatic)	Knick, Berlin
Spektralphotometer (GeneQuant)	GE Healthcare Biosciences, München
Transferkammer für Proteine	cti, Idstein
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
UV-Bestraher (Stratalinker 2400)	Stratagene, Heidelberg
Ultraschall-Sonikator (Sonifier 250)	Branson, Dietzenbach
Zellhomogenisator (FastPrep 120)	MP Biomedicals, Irvine (Kanada)
Zentrifugen:	
- Tischzentrifuge (5415R)	Eppendorf, Hamburg
- Multifuge 3 S-R	Heraeus, Osterode
- Kühlzentrifuge Sorvall RC5B	DuPont, Bad Nauheim
- Ultrazentrifuge Sorvall OTD75B	DuPont, Bad Nauheim
- Vakuumzentrifuge (Speed Vac)	Bachofer, Reutlingen

2.1.2 Materialien

Biogel P30	Bio-Rad Laboratories, München
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Faltenfilter	Schleicher und Schüll, Dassel
Glaswolle, silanisiert	Serva, Heidelberg
Injektionskanülen	Rose, Trier
Mikrotiter-(96-well)-Platten	BD Clontech, Heidelberg
Neubauer-Zählkammer	Migge, Heidelberg
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Steinbrenner, Wiesenbach
Polaroid-Filme	Diaprint, Heidelberg
Ultrazentrifugenröhrchen (Quickseal)	Beckmann, München
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Greiner Bio-One, Falcon, BD Clontech

Spritzen	BD Clontech, Heidelberg
Sterilfilter (0,2µm; 0,45µm)	Millipore, Schwalbach
Trockenblock	Schleicher und Schüll, Dassel
Whatman 3MM-Papier	Bender und Hobein, Bruchsal
Zellkulturflaschen	Renner, Dannstadt
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenbecher (250ml)	Herolab, Wiesloch

2.1.3 Reagenzien

Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aminosäuren	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3`AT (3-Amino-1,2,4-Triazol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ATP (Adenosin-5` Triphosphat)	Gibco BRL, Eggenstein
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto-Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Yeast Extract	Difco, Detroit (USA)
Basen (Adenin, Uracil)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BPB (Bromphenolblau)	Serva, Heidelberg
BES (N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethan- sulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
dNTPs	Epicentre, Madison (USA)
DTT (Dithiotreitol)	Serva, Heidelberg
D(-)-Luciferin	Boehringer Ingelheim, Mannheim
Digitonin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-Mannitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ficoll 400	GE Healthcare Biosciences, München
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	GERBU, Gaiberg
Guanidinium-Thiocyanat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES (Hydroxyethyl-Piperazin- Ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid)	GERBU, Gaiberg
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
MES (2[N-Morpholino)-Ethan-Sulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Norleucin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ONPG (O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid)	Boehringer Ingelheim, Mannheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pefablock	Biomol, Hamburg
PEG (Polyethylenglycol MG 4000)	Boehringer Ingelheim, Mannheim
Peptone	Difco, Detroit (USA)

Phenol	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Bio-Rad Laboratories, München
Sarkosyl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween-20	Roth, Karlsruhe
TEMED (Tetramethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris (Tri-(Hydroxymethyl)-Aminomethan)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton-X-100	Applichem, Darmstadt
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Yeast Nitrogen Base	Difco, Detroit (USA)
Yeast Extract	GERBU, Gaiberg

Alle weiteren Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Riedel de Haen (Seelze), Mallinckrot Baker (Deventer, Niederlande), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Acros Organics (Geel, Belgien).

2.1.4 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

CIA: 24 Teile Chloroform
1 Teil Isoamylalkohol

Phenol/CIA: 1 Teil Phenol
1 Teil CIA

10x PBS: 1,37M NaCl
27mM KCl
43mM Na₂HPO₄·7H₂O
14mM KH₂PO₄

1x TE: 10mM Tris
1mM EDTA pH 8.0

LB-Medium oder Platten: 1,0% Bacto-Trypton
0,5% Bacto-Yeast Extract
1,0% NaCl
1,5% Bacto-Agar (nur bei Bakterienplatten)
autoklavieren
für LB-Amp nach Abkühlen der Lösung auf 50°C Ampicillin
(Endkonzentration 100µg/ml) dazugeben

2.1.5 Antikörper

anti-AES (polyklonal)	Prof. Dr. Zentgraf (DKFZ, Heidelberg)
anti-Livin (polyklonal)	Prof. Dr. Zentgraf (DKFZ, Heidelberg)
anti-Livin	Imgenex, San Diego (USA)
anti-XIAP	BD Pharmingen, Heidelberg

anti-Tubulina	Calbiochem, San Diego (USA)
anti-AIF (D-20)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Cytochrom C (H-104)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-HA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-His	Prof. Dr. Zentgraf (DKFZ, Heidelberg)
anti-Flag	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-Myc	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Ziege	Promega, Mannheim
anti-Kanninchen	Promega, Mannheim
anti-Maus	Promega, Mannheim

2.1.6 Plasmide

2.1.6.1 Hefe-Expressionsvektoren

pPC97: Kodiert für die GAL4-BD und den *LEU2*-Selektionsmarker (Chevray und Nathans, 1992).

pPC97-Fusionskonstrukte: pPC97-MMP7, pPC97HA-Livin β , pPC97HA-Livin1-189, pPC97HA-Livin80-189, pPC97HA-Livin β 53-280, pPC97HA-Livin β 80-280, pPC97HA-Livin α 190-298, pPC97HA-Livin β D138A, pPC97HA-Livin β D52E, pPC97HA-Livin β D52E/D138A.

pPC97-Trp: Kodiert für die GAL4-BD und den *TRP1*-Selektionsmarker

pPC97-Trp-Fusionkonstrukte: pPC97-Trp-Livin β , pPC97-Trp-XIAP, pPC97-Trp-c-IAP1, pPC97-Trp-c-IAP2, pPC97-Trp-Survivin, pPC97-Trp-HPV16 E6, pPC97-Trp-Bit1.

pGAD10: Kodiert für die GAL4-AD und den *LEU2*-Selektionmarker (BD Clontech, Heidelberg).

pGAD10-Fusionskonstrukte: pGAD-AES, pGAD-AES5.2, pGAD-AES-Q, pGAD-AES-GP, pGAD-AES1-30, pGAD-AES1-75, pGAD-AES20-130, pGAD-TLE2-Q, pGAD-TLE25AES, pGAD-AES25TLE, pGAD-AES35TLE, pGAD-AES75TLE, pGAD-AES-Q-31/35, pGAD-TLE2-Q-30/34, pGAD-AES-Q-D31E, pGAD-TLE2-Q-E30D, pGAD-AES-Q-L35F, pGAD-TLE2-F34L.

pCL1: Kodiert für die komplette cDNS-Sequenz des GAL4-Transkriptionsfaktors (BD Clontech, Heidelberg).

2.1.6.2 Eukaryotische Expressionsvektoren

pBind: Vektor des "*CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid-Systems*" (Promega, Mannheim). Kodiert für die GAL4-BD.

pBind-Fusionskonstrukte: pBind-Livin β , pBind-Livin α , pBind-XIAP, pBind-c-IAP1, pBind-c-IAP2, pBind-Survivin.

pAct: Vektor des "*CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid-Systems*" (Promega, Mannheim). Kodiert für die VP16-AD.

pAct-Fusionskonstrukte: pAct-AES

pAct-X-Smac: Smac-cDNS wurde 5'-terminal der VP16-AD-Sequenz kloniert.

pAct-His-Fusionskonstrukte enthalten His-Tag zwischen Sequenz von AD und Fusionsprotein: pAct-His-AES-Q, pAct-His-TLE2-Q, pAct-His-AES-Q-31/35, pAct-His-TLE2-Q-30/34, pAct-His-AES-Q-D31E, pAct-His-TLE2-Q-E30D, pAct-His-AES-Q-L35F, pAct-His-TLE2-Q-F34L.

pcDNA3: Enthält CMV-Promotor (Invitrogen, Karlsruhe).

pcDNA3HA-Fusionskonstrukte enthalten 5'-terminalen HA-Tag: pcDNA3HA-Livin β , pcDNA3HA-Livin1-189, pcDNA3HA-XIAP.

pcDNA3-Flag-Fusionskonstrukte enthalten 5'-terminalen Flag-Tag:

pcDNA3-Flag-Bit1: Kodiert für die komplette Bit1-cDNS (# BX647177).

pcDNA3-Flag-AES: Kodiert für die komplette AES-cDNS (Isoform 2; # NM_001130).

pcDNA3-Flag-AESsm: Kodiert für eine mutierte AES-cDNS, die 8 stille Mutationen in der Zielsequenz der AES-siRNA enthält. Dabei wurde die Zielsequenz gctcgaatgtgacaagttg wie folgt verändert: gTtAgaGtgCgaTaaACTc (Pos. 132-150).

pcDNA3-Flag-AESL35F: Kodiert für AES, das an Position 35 Phenylalanin statt Leucin exprimiert.

pCMV-Gal: Kodiert für das β -Galaktosidasegen aus *E.coli* unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Butz und Hoppe-Seyler, 1993).

Die verwendeten Reporter-gen-Konstrukte sind im Abschnitt 2.2 *Methoden* in den Kapiteln 2.2.2.4 und 2.2.2.5 näher erläutert.

2.1.6.3 Bakterielle Vektoren

pGEX: Kodiert für GST (Glutathion-S-Transferase). Die pGEX-Vektoren besitzen einen vom Laktose-Operon abgeleiteten Promotor, so dass die GST-Fusionsproteine durch Glukose reprimiert und durch IPTG induziert werden können (GE Healthcare Biosciences, München).

pGEX-2TK-AES: Exprimiert AES in Fusion mit GST.

pGEX-2TK-Thioredoxin: Exprimiert Thioredoxin in Fusion mit GST (Butz *et al.*, 2000)

2.1.6.4 Vektorbasierte siRNA

pSuper-Luc: pSuper-Luc kodiert für eine siRNA, die komplementär zu einer Zielsequenz im Luciferase-Gen der amerikanischen Feuerfliege (*Photinus phyalis*) ist (Butz *et al.*, 2003).

pSuper-AES1.2: Zielsequenz: gctcgaatgtgacaagttg (Pos. 132-150); s. Kapitel 2.2.4.8

pSuper-Livin-2 (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2003)

2.1.7 Zellkultur

2.1.7.1 Zellkulturmedien und Zusätze

D-MEM (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium)
FKS (Fötales Kälberserum)

Trypsin-EDTA
Glutamin (200mM)
Penicillin(10000U/ μ l)/Streptomycin (10mg/ml)

Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PAA Laboratories, Pasching
(Österreich)

Gibco BRL, Eggenstein
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.7.2 Verwendete Zelllinien

<u>Zelllinie:</u>	<u>etabliert aus Tumor/Gewebe:</u>
HeLa	Zervixkarzinom
SW480	kolorektales Karzinom
HCT116	kolorektales Karzinom
SK-MEL-25	malignes Melanom
SK-MEL-28	malignes Melanom
MeWo	malignes Melanom
PC-3	Prostatakarzinom
Jurkat	Akute T-Zelleukämie
H1299	Lungenkarzinom
Mel-Juso	malignes Melanom
Colo 38	malignes Melanom
IGR	malignes Melanom
DU-145	Prostatakarzinom
293T	embryonale Niere
97TM1	Lungenkarzinom
H-125	Lungenkarzinom
HS-24	Lungenkarzinom

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zum Y2H-System

2.2.1.1 Das Y2H-System

Das Y2H-System ist eine genetische Methode zur Erfassung von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo*. Es wurde ursprünglich 1989 von Fields und Song entwickelt (Fields und Song, 1989) und seitdem weiter verbessert und modifiziert (Chien *et al.*, 1991; Uetz, 2002).

Das Verfahren basiert auf der Beobachtung, dass Transkriptionsfaktoren in ihre Aktivierungsdomäne und DNS-Bindungsdomäne zerlegt werden können, ohne dass diese Subdomänen ihre Funktionalität verlieren (Luban und Goff, 1995). Das heißt, sie können nicht nur als kovalent gebundene Domänen die Transkription aktivieren, sondern auch, wenn sie nur in räumliche Nähe zueinander gebracht werden.

Im klassischen Y2H-Versuch (Abb. 2.2.1) wird ein Protein X (Köder-Protein) an eine DNS-Bindungsdomäne fusioniert (BD) und ein Protein Y (Beute-Protein) an eine Aktivierungsdomäne (AD). Das hier verwendete System ist das GAL4-System, in dem die Bindungsdomäne und die Aktivierungsdomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4 eingesetzt werden. Beide Fusionsproteine (BD-X und AD-Y) werden in einen Stamm der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* koexprimiert, der ein oder mehrere Reportergene (Selektionsmarker, Marker) trägt. Nur wenn es zwischen Protein X und Y zu einer Interaktion kommt, resultiert daraus die Bildung eines Transkriptionsfaktors, der die Transkription der Reportergene aktiviert.

Häufig verwendete Reportergene kodieren für Bausteine in der Biosynthese bestimmter Aminosäuren und Basen (z.B. Histidin, Uracil, Adenin). Als Nachweis für die Reporteraktivität dient das Wachstum auf Selektionsmedium, dem die zum Reporter gen entsprechende Aminosäure oder Base fehlt.

Sowohl Köder- als auch Beute-Plasmid exprimieren die Hybrid-Proteine mitsamt einem Kernlokalisierungssignal, damit der Transport in den Kern gewährleistet ist, wo die Aktivierung der Reportergene stattfindet.

Als Testhefe wurde der *S.cerevisiae* Stamm KF1 verwendet (Butz *et al.*, 2000). Er enthält die Selektionsmarker *ADE2*, *HIS3* und *URA3*, die unter transkriptioneller Kontrolle unterschiedlicher GAL4-responsiver Promotoren stehen. Durch Unterschiede in den Promotoren werden die Selektionsmarker jeweils durch unterschiedlich starke Protein-Protein-Interaktionen aktiviert. Der *HIS3*-Marker wird am einfachsten aktiviert, gefolgt vom *ADE2*-Marker. Der Promotor des *URA3*-Markers besitzt ein negativ-regulatorisches Element und kann deshalb erst durch sehr starke Protein-Protein-Interaktionen aktiviert werden. Als Derivat des Hefestamms PJ69-4A (James *et al.*, 1996), zeichnet sich die KF1-Hefe durch eine ausgesprochen hohe genetische Stabilität aus, die zur Verminderung falsch-positiver Ergebnisse führt.

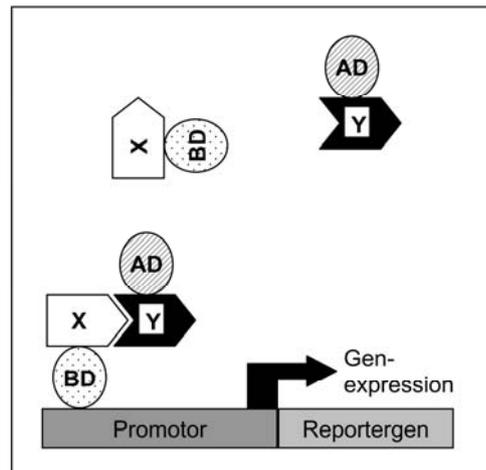


Abb. 2.2.1: Schema des Y2H-Systems (verändert aus Coates und Hall, 2003). Köder-Protein X ist an eine DNS-Bindungsdomäne (BD), Beute-Protein Y an eine Aktivierungsdomäne (AD) fusioniert. Nur im Falle einer Interaktion zwischen X und Y kommen Bindungsdomäne und Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe und können einen funktionellen Transkriptionsfaktor bilden. Dieser bindet an den Promotor eines Reportergens und aktiviert dessen Expression. Die Reportergenaktivität kann durch die Kultivierung auf Selektionsmedium nachgewiesen werden.

2.2.1.2 Herstellung selektiver Hefepplatten und Flüssigmedium

Es wurden Hefepplatten mit folgenden Selektionsmedien hergestellt: SC-Trp-Leu, SC-Trp-Leu-Ade, SC-Trp-Leu-Ura, SC-Trp-Leu-His + 3`AT.

Die Komponenten des SC-Mediums (für 1 Liter) wurden in 500ml H₂O und Agarpulver (20-25g) in 450ml H₂O gelöst und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde der noch heiße Agar zum SC-Medium gegeben und im Wasserbad auf 50°C abgekühlt. Danach wurde 50ml Glucose-Lösung (40%) und je nach Selektionsmedium die entsprechenden Aminosäuren/Basen und 3`AT dazu gegeben.

Für Flüssigmedium wurde SC-Medium (für 1 Liter) in 950ml eingewogen und autoklaviert. Erst bei Gebrauch wurde es mit Glucose-Lösung (40%) und den entsprechenden Aminosäuren und Basen komplettiert.

- Trp : Medium enthält alle Aminosäuren/Basen, außer Tryptophan
- Leu : Medium enthält alle Aminosäuren/Basen, außer Leucin
- Ade : Medium enthält alle Aminosäuren/Basen, außer Adenin
- Ura : Medium enthält alle Aminosäuren/Basen, außer Uracil
- His : Medium enthält alle Aminosäuren/Basen, außer Histidin
- 3`AT : Medium enthält 3`Amino-1,2,4-Triazol zur Reprimierung der Hintergrund Genexpression des *HIS3*-Markers

SC-Medium (1 Liter): 6,7g Yeast Nitrogen Base
4g Aminosäure-Mix
ad 500ml *aqua bidest.*, mit NaOH auf pH 5,9 einstellen

Aminosäure-Mix (je10g):

Alanin	Isoleucin
Arginin	Methionin
Aspartat	Phenylalanin
Asparagin	Serin
Cystein	Threonin
Glutamat	Tyrosin
Glutamin	Valin
Glycin	

Aminosäuren/Basen für SC-Flüssigmedium (1 Liter):

10ml 20mM Uracil
10ml 100mM L-Histidin
10ml 100mM L-Leucin
10ml 100mM L-Tryptophan
20ml 0,5% Adenin

2.2.1.3 Transformation von Hefezellen

Die zu transformierende Hefe wurde auf einer YPDA⁺⁺-Platte ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C kultiviert. Davon wurde anschließend eine Stecknadelkopf große Menge Hefe in 300µl Lösung I resuspendiert, 1x in Lösung I gewaschen und anschließend in 300µl Lösung I aufgenommen. Zu 1µg der zu transformierenden Plasmid-DNS und 50µg Carrier-DNS wurde 50µl Hefesuspension und 300µl Lösung II gegeben und durch vortexen gut gemischt. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten bei 30°C geschüttelt, bevor er für 15 Minuten bei 42°C (Hitzeschock) inkubiert wurde. Danach wurden die Hefen kurz abzentrifugiert, in 50µl-100µl H₂O aufgenommen, auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C für 3-5 Tage kultiviert.

YPDA⁺⁺-Agarplatten: 10g Yeast Extract
20g Peptone
25g Bacto-Agar
ad 950ml *aqua bidest.*, autoklavieren
40ml 0,5% Adenin und 50ml 40% Glucose nach Abkühlen der Lösung auf 50°C zugeben und Platten gießen

<u>Lösung I:</u>	1ml 10x LiOAc	<u>Lösung II:</u>	1ml 10x LiOAc
	1ml 10x TE		1ml 10x TE
	8ml <i>aqua bidest.</i>		8ml 50% PEG

10x TE: 100mM Tris-HCl pH 7,5
10mM EDTA

10x LiOAc: 1M LiAc pH 7,5

50% PEG: 50g Polyethylenglycol MG 4000 in 100ml *aqua bidest.*

Carrier-DNS: Lachssperma-DNS (10µg/µl): Wurde vor Gebrauch 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend kurz auf Eis abgekühlt.

alle Hefelösungen wurden steril filtriert

2.2.1.4 Transformation der cDNS-Expressionsbank in Hefezellen

Für die Transformation der cDNS-Expressionsbank wurde die Lithium-Acetat-Methode nach Gietz verwendet (Gietz und Woods, 2002).

Für eine Übernachtskultur (ÜNK) wurden 100ml SC-Trp-Medium mit Hefezellen, die schon das Köder-Plasmid (pPC97-Trp-Livinβ) enthielten, angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Mit dieser ÜNK wurde 800ml YPDA⁺⁺-Vollmedium angeimpft und die Hefen bis zu einer Dichte von etwa 4×10^6 Zellen/ml ($OD_{600} = 0,4$) bei 30°C geschüttelt.

Danach wurden die Hefen durch Zentrifugation (3500rpm, 4°C, 5min) pelletiert und erst in 50ml sterilem H₂O und anschließend in 40ml Lösung I gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (3500rpm, 4°C, 2min) wurden die Hefezellen pelletiert und in einem Endvolumen von 4ml Lösung I aufgenommen.

Anschließend wurde 2µg der cDNS-Expressionbank mit 180µg Carrier-DNS, 200µl Hefesuspension und 1,2ml Lösung II zusammengegeben und durch vortexen gut durchmischt. Auf diese Art wurden 20 parallele Einzelansätze vorbereitet, die daraufhin 30 Minuten bei 30°C geschüttelt und dann 15 Minuten bei 42°C (Hitzeschock) inkubiert wurden. Während des Hitzeschocks wurden die Ansätze alle 5 Minuten invertiert, damit die Hefezellen nicht am Boden sedimentierten. Danach wurden die Hefen der Einzelansätze durch Zentrifugation pelletiert, in sterilem H₂O aufgenommen und zu einer 13ml-Hefesuspension gepoolt. Davon wurden jeweils 500µl auf Selektionsplatten SC-Trp-Leu-Ade ausplattiert und bei 30°C kultiviert.

Zur Ermittlung der Transformationseffizienz des Y2H-Screens wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-4}) des Transformationsansatzes auf SC-Trp-Leu-Platten ausplattiert und nach 3 Tagen Wachstum bei 30°C ausgezählt.

cDNS-Expressionbank: "Human Foreskin Keratinocyte MATCHMAKER™ cDNA Library" (im pGAD10-Vektor) von Clontech, Palo Alto; USA

sonstige Hefelösungen siehe Kapitel 2.2.1.2 und 2.2.1.3.

2.2.1.5 Gesamtproteinextraktion aus Hefezellen

Zur Herstellung einer ÜNK wurden 20ml entsprechendes Selektionsmedium mit mehreren Hefekolonien angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Danach wurden die Hefen durch Zentrifugation (2000rpm, 4°C, 5min) pelletiert und mit 5ml H₂O gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (2000rpm, 4°C, 5min) wurde das Pellet schließlich in 200µl Lysepuffer aufgenommen. Diese Hefesuspension wurde in ein Schraubdeckelgefäß überführt, das zuvor zu 1/3 mit Glasperlen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gefüllt wurde. Zum Aufbrechen der Hefezellwände wurde dieser Ansatz in einem Zellhomogenisator für 20 Sekunden geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (12000rpm, 4°C, 5min) wurde der Überstand bei -70°C eingefroren oder direkt für eine Westernblot-Analyse weiterverarbeitet.

Lysepuffer: 100mM Tris pH8
 20% Glycerol
 1mM EDTA
 0,1% Triton-X-100
 5mM MgCl₂

1ml Lysepuffer: 10µl Inhibitor-Cocktail
 25µl Pefablock (Endkonzentration 2,5mM)
 erst kurz vor Gebrauch hinzugegeben

2.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNS aus Hefezellen (Plasmid-Rescue)

Für eine ÜNK wurden 15ml des entsprechenden Selektionsmediums mit Hefekolonien angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die Hefen wurden durch Zentrifugation pelletiert (2000rpm, RT, 2min) und in 500µl Puffer I gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet in 200µl Puffer II aufgenommen, in ein Schraubdeckelgefäß mit Glasperlen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) überführt und zum Aufschluss der Hefezellen in einem Zellhomogenisator für 20 Sekunden geschüttelt. Danach wurden die Ansätze zentrifugiert, der Überstand in ein neues

Reaktionsgefäß überführt und mit Phenol/CIA extrahiert. Zur Isolierung und Amplifizierung der Plasmid-DNS, wurden 2µl des Überstandes in *E.coli* Bakterien transformiert und anschließend eine DNS-Präparation (2.2.4.3) durchgeführt. Die Identifizierung der Beute-Plasmide erfolgte anschließend durch eine Restriktionsspaltung.

<u>Puffer I:</u>	100mM Tris pH 8	<u>Puffer II:</u>	2%	Triton-X-100
	100mM EDTA pH 8		1%	SDS
			100mM	NaCl
			10mM	Tris
			1mM	EDTA

2.2.1.7 Replikaplattierung

Die Hefen wurden in feinen Strichen auf eine entsprechende Selektionsplatte ausgestrichen und über Nacht bei 30°C kultiviert. Anschließend wurden diese Hefen auf Platten mit unterschiedlichen Selektionsmedien (SC-[-Trp-Leu]-Ura, -Ade, -His) mit Hilfe eines samtbezogenen Stempelblocks (Replicatech, Princeton USA) replikaplatziert. Danach wurden die Platten durch Abdrücken auf einem frischen Samttuch von überschüssigen Hefen gereinigt. Dieser Reinigungsschritt wurde nach einer Inkubation über Nacht bei 30°C wiederholt. Nach einer Kultivierung von mehreren Tagen konnten nur die Hefen wachsen, die je nach Selektionsmedium die entsprechenden Marker aktivierten.

2.2.1.8 Cross-Mating-Assay

Der Cross-Mating-Assay ist eine spezielle Form des Yeast-Mating-Verfahrens. Dabei werden Köder- und Beute-Plasmide jeweils in zwei haploide Hefestämme transformiert, die unterschiedlichen Paarungstypen angehören (a und α). Durch die Fusion der beiden haploiden Stämme entstehen diploide Zellen, in denen Köder- und Beute-Plasmid zusammenkommen (Kolonin *et al.*, 2000).

Die Köder-Konstrukte wurden in KF1 (a) und die Beute-Konstrukte in PJ69-4α (α) transformiert. Nach 3 Tagen wurden die KF1- und PJ69-4α-Hefen auf entsprechenden Selektionsplatten über die ganze Länge der Platte ausgestrichen und über Nacht bei 30°C kultiviert. Anschließend wurden die Hefen dieser beiden

Platten mittels eines samtbezogenen Stempelblocks in Form eines Gitters auf eine YPDA⁺⁺-Platte abgedrückt. Während der folgenden Inkubation über Nacht bei 30°C konnten an den Kreuzungspunkten die haploiden Hefen unterschiedlichen Paarungstyps miteinander fusionieren, so dass Köder- und Beute-Plasmid in eine Zelle gelangten. Um eine Aktivierung der Selektionsmarker zu testen, wurden die Hefen der YPDA⁺⁺-Platte anschließend auf entsprechenden Selektionsplatten replikaplatziert (2.2.1.7).

2.2.2 Methoden der Zellkultur

2.2.2.1 Kultivierung adhärent wachsender Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen in Kompletmedium bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Die langfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Dafür wurden die konfluent gewachsenen Zellen einer 175cm²-Zellkulturflasche trypsinisiert, durch Zentrifugation (800rpm, 10min) pelletiert, in Einfriermedium überführt und in Einfrieröhrchen aliquotiert. Zum schonenden Einfrieren wurden diese in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox (Nalgene Labware, Hereford; UK) bei -70°C gekühlt.

Kompletmedium: D-MEM mit 10% FKS
1% Glutamin
1% Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium: 90% Kompletmedium
10% DMSO

2.2.2.2 Transfektion von Säugerzellen mittels Calciumphosphat

Die Transfektion von Plasmid-DNS in Säugerzellen erfolgte mittels Calciumphosphat-Ko-Präzipitation nach der Methode von Chen und Okayama (Chen und Okayama, 1987).

Dafür wurden einen Tag vor Transfektion 1-2x 10⁵ Zellen (in 3ml) in 6cm-Schalen bzw. 3-4x 10⁵ Zellen (in 9ml) in 10cm-Schalen ausgesät. Die zu transfizierende DNS

(6µg bei 6cm-Schalen; 20µg bei 10cm-Schalen) wurde zuerst mit 150µl (6cm-Schalen) bzw. 500µl (10cm-Schalen) CaCl₂ (0,25M) und anschließend mit demselben Volumen an 2x BBS gemischt. Generell wurde zur Erhaltung gleicher Mengen an Expressionsplasmid zwischen den Ansätzen mit dem jeweiligen Leervektor aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten (RT) wurde dieser Reaktionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese anschließend für 16-18h bei 35°C und 3% CO₂ kultiviert. Danach wurden die Zellen 2x mit serumfreiem Medium gewaschen und in frischem Komplettmedium bei 37°C und 5% CO₂ weiterkultiviert.

CaCl₂-Stammlösung: 2,5M CaCl₂, bei -20°C gelagert

2x BBS (BES-buffered saline):

50mM BES [N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure]

280mM NaCl

1,5mM Na₂HPO₄

in *aqua ad iniectabilia*, pH bei Raumtemperatur mit 2M NaOH auf pH 6,95 einstellen, steril filtriert bei -20°C lagern.

2.2.2.3 Transfektion synthetischer siRNAs mittels Oligofectamin

Die Zellen wurden für die Transfektion 30-50% konfluent in 6cm-Schalen ausgesät. Die synthetischen siRNAs (Dharmacon Research, Lafayette USA) wurden in RNase-freiem H₂O aufgenommen und auf eine Konzentration von 40µM eingestellt.

Pro Ansatz wurden 8µl des Transfektionsreagenz Oligofectamin (Invitrogen, Karlsruhe) in 22µl serumfreien Medium (Opti-MEM I von Invitrogen, Karlsruhe) verdünnt und für 5 bis 10 Minuten bei RT inkubiert. 5µl (100nM) bzw. 10µl (200nM) siRNA wurden mit 365µl bzw. 360µl Opti-MEM I versetzt. Zu diesem Ansatz wurde 30µl Opti-MEM/Oligofectamin-Mix gegeben, gemischt und für 15 bis 20 Minuten bei RT inkubiert.

Von den zu transfizierenden Zellen wurde das Kulturmedium entfernt und durch 1,6ml Opti-MEM I ersetzt. Der Oligofectamin-siRNA-Mix wurde zu den Zellen gegeben und diese bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 4h wurde das Zellkulturmedium durch die Zugabe von 1ml Medium/30%FCS wieder komplettiert. Die Ernte der siRNA-behandelten Zellen erfolgte standardmäßig 2 Tage nach Transfektion.

- siAES1.2: Gleiche Zielsequenz wie pSuper-AES1.2 (s.a. Kapitel 2.1.6.4)
siLivin-2: 5`- GGAAGAGACTTTGTCCACA-3`, Nukleotide 648-666 im *livin* Gen
(Crnkovic-Mertens *et al.*, 2006b)
siControl: 5`- UAGCGACUAAACACAUCAA-3`, enthält mindestens vier unterschiedliche
Nukleotide zu allen bekannten menschlichen Genen (Dharmacon Research)

2.2.2.4 CheckMate-Bindungsassay

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen in Säugerzellen wurde das Zwei-Hybrid-System *CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid-System* (Promega, Mannheim) verwendet. Wie im Y2H-System werden die zu untersuchenden Proteine als Fusionsproteine mit einer DNS-Bindungsdomäne (GAL4-BD) bzw. Aktivierungsdomäne (VP16-AD) exprimiert. Im Fall einer Protein-Protein-Interaktion wird ein kotransfiziertes Luciferase-Reporterplasmid (pG5LUC) aktiviert werden. Das Reporterkonstrukt pG5LUC enthält das *luciferase*-Gen unter der Kontrolle von fünf GAL4-Bindungsstellen in seinem Promotor.

Für die Bindungsassays wurden die pAct-Konstrukte (enthalten VP16-AD) und die pBind-Konstrukte (enthalten GAL4-BD) zusammen mit dem pG5LUC-Vektor in Säugerzellen transfiziert. Zum Abgleich der Transfektionseffizienzen wurde als interner Standard das Plasmid pCMV-Gal kotransfiziert, das für das β -Galaktosidasegen kodiert. Alle Versuchsansätze wurden doppelt durchgeführt. Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und die Luciferase-Aktivität (2.2.2.6) und die β -Galaktosidase-Aktivität (2.2.2.7) quantitativ bestimmt.

2.2.2.5 Reporteragen-Analysen

Mit Hilfe von Reporteragen-Analysen kann die Aktivität bestimmter DNS-Sequenzabschnitte, wie Promotoren in Zellen untersucht werden. Durch die Kotransfektion von Expressionsplasmiden kann der Einfluss von Proteinen auf diese regulatorischen Elemente untersucht werden. Dafür wurden Reporteragen-Plasmide verwendet, die alle das Reporteragen Luciferase aus *Photinus pyralis* enthalten (de Wet *et al.*, 1987). Die in den Zellen gemessene Luciferase-Aktivität korreliert mit der Transkriptionsaktivität der regulatorischen DNS-Sequenzen.

Für die Reporteragen-Analysen zum Test der *bcl-2*-Promotor-Aktivität (s.a. Kapitel 3.4.2) wurden die Reporteragen-Konstrukte pBcl-2-(P1+P2)-Luc, pBcl-2-(P1)-Luc, pBcl-2-(P2)-Luc (Wilson *et al.*, 1996) verwendet und für die TCF-abhängige Transkription (s.a. Kapitel 3.5.3.2) der TOPFLASH- und FOPFLASH-Vektor (van de Wetering *et al.*, 1997).

Diese Reporterkonstrukte wurden zusammen mit Expressionsplasmiden mittels Calciumphosphat-Methode in die Zellen transfiziert. Zur Ermittlung der basalen Promotoraktivität wurden die unterschiedlichen Reporteragenkonstrukte jeweils mit Leervektor (pcDNA3) kotransfiziert. Um Schwankungen in der Transfektionseffizienz auszugleichen wurde als interner Standard das β -Galaktosidase-Referenzplasmid pCMV-Gal kotransfiziert. Alle Versuchsansätze wurden doppelt durchgeführt. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luciferase (2.2.2.6) und der β -Galaktosidase (2.2.2.7) bestimmt.

2.2.2.6 Messung der Luciferase-Aktivität

Die Herstellung eukaryotischer Zellextrakte zur Messung der Luciferase-Aktivität wurde nach dem Verfahren von Brasier durchgeführt (Brasier *et al.*, 1989).

Die Extraktaufarbeitung erfolgte auf Eis. Die Zellen wurden 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 200 μ l Triton-Lysepuffer (4°C) lysiert, mit einem Gummischaber abgeschabt und bei 13000rpm und 4°C für 3 Minuten zentrifugiert. Für die Messung wurde 30 μ l des Überstands in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben.

Die Ermittlung der Luciferase-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines Luminometers, mit dem die lichtemittierende und ATP-abhängige Oxidation des Substrates Luciferin durch die Luciferase gemessen wurde. Das Luminometer injiziert automatisch 150 μ l Luciferase-Reaktionspuffer und 50 μ l Luciferin-Lösung zu den Proben und registriert die emittierten Photonen für einen Zeitraum von 10 Sekunden. Die Messungen der Enzymaktivität wurden im linearen Bereich durchgeführt, so dass bei Substrat-Überschuss der Umsatz des Luciferins proportional zur Transkription des *luciferase*-Gens ist. Zur Ermittlung der relativen Luciferase-Aktivität wurde der Quotient aus dem gemessenen Luciferase-Wert und dem zugehörigen β -Galaktosidase-Wert gebildet (2.2.2.7).

Triton-Lysepuffer: 25mM Glycylglycin pH 7,8
 15mM MgSO₄
 1% (v/v) Triton X-100
 4mM EGTA
 in *aqua bidest.*, Lagerung bei 4°C

Luciferase-Reaktionspuffer: 25mM Glycylglycin pH 7,8
 15mM MgSO₄
 in *aqua bidest.*
 5mM ATP (unmittelbar vor Gebrauch zugeben)

Luciferin-Lösung: 0,25mM Luciferin in Luciferase-Reaktionspuffer ohne ATP

2.2.2.7 Messung der β -Galaktosidase-Aktivität

Alle Schritte der Extraktaufarbeitung erfolgten wie unter 2.2.2.6 beschrieben. Zur Messung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden 10-50 μ l des Zellextrakts in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und mit 200 μ l Reaktionspuffer, der das Substrat ONPG enthält, versetzt. Der Umsatz dieses Substrates durch die β -Galaktosidase führt zu einem Farbumschlag, bis zu dessen Eintreten die Proben bei RT oder bei 37°C inkubiert wurden. In einem ELISA-Reader wurde die optische Dichte der Proben gegen den Referenzwert des reinen Triton-Lysepuffers bei 405nm gemessen. Um eine unspezifische Absorption der Mikrotiterplatte zu korrigieren, wurde eine zusätzliche Messung bei 620nm vorgenommen und diese Werte von den Werten bei 405nm abgezogen.

β -Galaktosidase-Reaktionspuffer: 100mM Natriumphosphat pH 7,5
 10mM KCl
 1mM MgSO₄
 50mM 2-Mercaptoethanol
 in *aqua bidest.*
 1x ONPG (vor Gebrauch zugeben)

100mM Natriumphosphat pH 7,5: 41ml 200mM Na₂HPO₄
 9ml NaH₂PO₄
 in *aqua bidest.*

4x ONPG: 4mg/ml ONPG in
 100mM Natriumphosphat pH 7,5

2.2.2.8 Apoptose-Induktion in HeLa-Zellen

Zur Apoptose-Induktion mit ultraviolettem (UV) Licht wurden HeLa-Zellen 2 Tage nach Transfektion mit einer einmaligen Dosis von 50J/m^2 bestrahlt. Für die Bestrahlung wurde das Medium vollständig von den Zellen entfernt. Danach wurde auf diese Zellen und auf die Kontrollzellen neues Medium gegeben.

Bei der Apoptose-Induktion mit Etoposid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde das Etoposid in frischem Kulturmedium verdünnt (Endkonzentration $50\mu\text{g/ml}$) und auf die HeLa-Zellen gegeben. Bei den Kontrollzellen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Weiterkultivierung der Zellen erfolgte für mindestens 12h.

2.2.2.9 Herstellung mikroskopischer Präparate

Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag transfiziert. Mindestens 42h nach Transfektion wurden die Deckgläschen in PBS gewaschen und mittels Methanol/Aceton oder 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

Bei der Methanol/Aceton-Fixierung wurden die Deckgläschen bei -20°C erst 10 Minuten in Methanol, dann 5 Minuten in Aceton inkubiert und anschließend getrocknet. Bei der Fixierung mittels PFA wurden die Deckgläschen in PBS/4%PFA (pH 7-7,5) für 30 - 60 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Plättchen 2x mit PBS gewaschen. Die so fixierten Zellen wurden direkt für einen TUNEL-Assay (2.2.2.10) bzw. Immunfluoreszenz (2.2.2.11) eingesetzt.

2.2.2.10 TUNEL-Assay

Für den TUNEL-Assay wurde der "*In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein" (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Mit dieser Methode können Einzelstrangbrüche in der genomischen DNS sichtbar gemacht werden, die typischerweise während der Apoptose entstehen.

Für die TUNEL-Reaktion wurden die mit PFA auf Deckgläschen fixierten Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend in 0,1% Triton/0,1% Natriumcitrat bei 4°C für

5 Minuten permeabilisiert. Anschließend wurden die Plättchen erneut 2x in PBS gewaschen, mit 25µl TUNEL-Reaktionsmix (Lösung I und II im Verhältnis 1:10) bedeckt und für eine Stunde bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Deckgläschen wurden 3x mit PBS gewaschen, 1x in *aqua bidest.* und in 100% Ethanol getaucht und anschließend getrocknet und auf Objektträger eingebettet (Vectashield mit DAPI-Lösung von Vector Laboratories, Kanada).

2.2.2.11 Immunfluoreszenz

Die auf Deckgläschen fixierten Zellen wurden mit dem in PBS verdünnten Erstantikörper (40µl/Deckgläschen) für 1h inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen in PBS gewaschen und mit dem ebenfalls in PBS verdünnten Zweitantikörper für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Plättchen in PBS gewaschen, 1x in *aqua bidest.* und in 100% Ethanol getaucht, getrocknet und auf Objektträger eingebettet.

2.2.3 GST-Pulldown-Experimente

2.2.3.1 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

200ml LB-Medium wurden mit 10ml einer LB-Übernachtskultur von *E. coli* BL21, welche den Expressionsvektor des gewünschten GST-Fusionsproteins enthielten angeimpft und für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Zur Induktion der Proteinexpression wurden die Bakterien mit IPTG (Endkonzentration 0,25mM) versetzt und für weitere vier Stunden bei 30°C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4500rpm, 10min, 4°C) pelletiert und anschließend in kaltem PBS/1%Triton resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurden diese mittels eines Ultraschall-Sonikators mit 16 Pulsen beschallt und anschließend zur Abkühlung auf Eis gestellt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Danach wurde das Bakterienlysat zentrifugiert (4500rpm, 10min, 4°C) und der Überstand auf Eis gelagert.

Die Gluthation-Sepharose-Beads wurden 4x mit PBS/1%Triton gewaschen und jeweils durch leichte Zentrifugation (3000rpm, 1min) wieder sedimentiert. Zum

Binden der GST-Fusionsproteine an die Gluthation-Sepharose-Beads wurden das Bakterienlysat und die Beads (je 50µl) in einen Ansatz gegeben und für eine Stunde bei RT rotiert. Danach wurden die Sepharose-Beads mit den gebundenen GST-Proteinen abzentrifugiert (3000rpm, 5min, RT) und nicht gebundene Proteine durch mehrmaliges Waschen mit PBS/1%Triton entfernt. Zur Kontrolle, ob die GST-Fusionsproteine an die Sepharose-Beads gebunden hatten, wurden für eine Westernblot-Analyse 20µl als Input-Kontrolle entnommen.

2.2.3.2 GST-Pulldown mit zellulären Extrakten

Die in HeLa-Zellen exprimierten Proteine wurden aus den Zellen isoliert und vermessen. Zur Bindung des potenziellen Interaktionspartners wurden pro Ansatz 150µg dieses Proteinextrakts und 50µl Gluthation-Sepharose-Beads (mit gebundenen GST-Fusionsproteinen aus 2.2.3.1) zusammengegeben und über Nacht bei 4°C rotiert. Am nächsten Tag wurden die Gluthation-Sepharose-Beads und die an sie gebundenen Proteine durch Zentrifugation sedimentiert (3000rpm, 5min, RT) und 4x mit PBS/1%Triton gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in Proteinladepuffer aufgenommen, 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

2.2.3.3 GST-Pulldown mit *in vitro* exprimierten Proteinen

Für die *in vitro*-Transkription und -Translation wurde das "TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation" System (Promega, Mannheim) verwendet. Für die *in vitro*-Transkription und -Translation wurde 1µg Expressionsplasmid eingesetzt. Die Reaktion fand in 50µl eines Kaninchen-Retikoluzytenlysats statt und wurde für 90 Minuten bei 30°C inkubiert. Durch die Zugabe von [³⁵S]-Methionin (GE Healthcare Biosciences, München) wurde das Protein gleichzeitig radioaktiv markiert.

Für den *in vitro*-GST-Pulldown wurden die Sepharose-Beads in einen Puffer aus 4 Teilen T₂₅N₅₀ und 1 Teil Lysispuffer mit 1mM DTT überführt und in einem Endvolumen von 200µl aufgenommen. Zur Bindung der Proteine wurde zu den 200µl Gluthation-Sepahrose-Beads 12,5µl der *in vitro*-Reaktion gegeben und bei 4°C ü. N.

rotiert. Anschließend wurden die Ansätze 4x mit Lysepuffer gewaschen (bei 4°C) und durch Zentrifugation pelletiert. Die Pellets wurden in Proteinladepuffer aufgenommen, 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Danach wurde das Gel für 30 Minuten mit einer Lösung aus 50% Methanol/10% Essigsäure/40% H₂O fixiert und für 15 Minuten mit "Amplify"-Lösung (GE Healthcare Biosciences, München) inkubiert. Anschließend wurde das Gel getrocknet und das radioaktiv markierte Protein durch Autoradiographie detektiert.

T₂₅N₅₀: 25mM Tris, pH 8,0
50mM NaCl

Lysepuffer: 0,1M Tris, pH8,0
0,1M NaCl
1% NP40

2.2.4 Methoden zur Aufarbeitung und Klonierung von Plasmid-DNS

2.2.4.1 DNS-Ligation

Die Ligation von DNS-Fragmenten mit linearisierten dephosphorylierten Plasmiden erfolgte wahlweise in einem Volumen von 10-20µl bei 16°C über Nacht oder eine Stunde bei 22°C und Raumtemperatur. Es wurden 50-100ng Plasmid und das zu inserierende DNS-Fragment im dreifachen molaren Überschuss eingesetzt. Es wurde die T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) mit einer Endkonzentration von 0,5-1U/µl eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden nach Inkubation entweder bei -20°C eingefroren oder direkt in kompetente *E.coli* Bakterien transformiert.

2.2.4.2 Transformation kompetenter *E.coli*-Bakterien

Die Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNS erfolgte nach der von Hanahan etablierten Methode (Hanahan, 1983).

100µl der kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 5µl eines Ligationsansatzes (*E. coli* TG2) oder 20-100ng Plasmid-DNS (*E. coli* TG2 bzw. BL21) gemischt. Dieser Transformationsansatz wurde 30 Minuten auf Eis und anschließend für den Hitzeschock 1 Minute bei 42°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz kurz auf Eis abgekühlt, 900µl LB-Medium dazu gegeben und bei 37°C für eine Stunde

geschüttelt. Entweder wurde der komplette Ansatz (Ligation) oder ein Aliquot auf Agarplatten mit Ampicillin (Endkonzentration 100µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.4.3 Aufarbeitung kleiner Mengen an Plasmid-DNS (Minipräparation)

Für die Minipräparation von Plasmid-DNS aus Bakterien wurde der "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen, Hilden) verwendet. Er basiert auf der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly. Sie beruht darauf, dass nach der alkalischen Denaturierung die chromosomale DNS denaturiert bleibt, die superhelikale Plasmid-DNS aber wieder renaturiert (Birnboim und Doly, 1979).

Zur Herstellung einer (ÜNK) wurde 4ml LB-Amp-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien im alkalischen Milieu in Gegenwart von SDS lysiert (Puffer I und II) durch Zugabe von Natriumacetat neutralisiert (Puffer III). Denaturierte chromosomale DNS und Proteine wurden daraufhin durch Zentrifugation pelletiert und so von der nativen Plasmid-DNS in der wässrigen Phase getrennt. Die Isolierung der Plasmide im Überstand erfolgte durch Bindung der DNS an eine Silikasäule. Nach mehrmaligem Waschen wurde die DNS mit Elutionspuffer oder H₂O in einem Volumen von 50µl eluiert. Für eine anschließende Kontrollspaltung der isolierten Plasmid-DNS wurde 4µl der Präparation für 30 Minuten bei 37°C gespalten.

2.2.4.4 Aufarbeitung großer Mengen an Plasmid-DNS (Maxipräparation)

Die Maxipräparation von Hefe-Expressionsvektoren erfolgte mit dem "QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kit" (Qiagen, Hilden).

Die Maxipräparation von Expressionsvektoren für Säugerzellen erfolgte über eine alkalische Lyse mit zwei aufeinander folgenden CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradienten-Zentrifugationen. Dafür wurden die Bakterien einer 200ml-ÜNK durch Zentrifugation (4000rpm, 4°C, 10min, GSA-Rotor, Sorval-Zentrifuge) pelletiert und in 10ml Lösung I (4°C) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 20ml Lösung II und vorsichtigem Mischen. Danach wurde der Ansatz mit

15ml Lösung III versetzt und 5 Minuten inkubiert. Zellüberreste, Proteine und genomische DNS wurden durch Zentrifugation (6000rpm, 4°C, 15min) pelletiert. Der Überstand wurde mit Isopropanol (gleiches Volumen) für 30 Minuten gefällt und anschließend zentrifugiert (6000rpm, 4°C, 30min). Das Pellet wurde in 4ml 1x TE aufgenommen und zur Fällung der RNS mit 4ml 5M LiCl-Lösung versetzt, 30 Minuten inkubiert und anschließend zentrifugiert (4000rpm, 4°C, 5min). Der Überstand wurde mit 100% Ethanol (2x Volumen) für 1 Stunde bei -20°C gefällt, das DNS-Pellet anschließend abzentrifugiert (6000rpm, 4°C, 30min), getrocknet und in 1x TE aufgenommen.

Die weitere Aufreinigung der Plasmid-DNS von genomischer DNS und RNS-Resten erfolgte mittels einer CsCl-Ethidiumbromid-Dichtegradienten-Zentrifugation. Das in 1x TE gelöste Pellet wurde mit 1x TE auf ein Gewicht von 4,2g gebracht. Danach wurde 4,4g CsCl darin gelöst und 100µl Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) hinzu gegeben. Dieses Gemisch wurde in Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert und mit CsCl-Lösung aufgefüllt. Die erste Ultrazentrifugation (TV1665-Rotor) erfolgte für ca. 16h bei 20°C und 48.000rpm. Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren wurden diese als Banden im Zentrifugenröhrchen sichtbar. Die obere dünne Bande enthielt die restliche genomische DNS, die untere dicke Bande enthielt die superhelikale Plasmid-DNS. Diese wurde mit einer Spritze abgezogen, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit CsCl-Lösung aufgefüllt. Der zweite Zentrifugationsschritt erfolgte ebenfalls für 16h bei 20°C und 48.000rpm. Die entstandene Plasmid-Bande wurde abgezogen und so lange mit wassergesättigtem Butanol ausgeschüttelt, bis das Ethidiumbromid entfernt war. Der Ansatz wurde mit gleichem Volumen H₂O versetzt und anschließend mit Ethanol (2x Volumen) und 3M NaAc pH 5,2 (1/10 Volumen) gefällt. Nach der Zentrifugation (6000rpm, 4°C, 30min) wurde das Pellet in 500µl 1x TE aufgenommen und erneut gefällt.

Lösung I: 50mM Glucose
25mM Tris HCl pH 7,6
10mM EDTA

Lösung III: 125ml 5M Kaliumacetat
23ml Eisessig
57ml *aqua bidest*

Lösung II: 1% SDS
0,2M NaOH

CsCl-Lösung: 39,6g CsCl
37,8g 1x TE
900µl Ethidiumbromid (10mg/ml)
ad 50ml *aqua bidest*.

2.2.4.5 Agarosegelelektrophorese von DNS

Entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNS wurden 0,7%-2%ige Agarosegele verwendet. Dafür wurde Agarose in 1x Elektrophoresepuffer (EP) gelöst, mit Ethidiumbromid (1µg/ml Endkonzentration) versetzt und in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen. Die DNS-Proben wurden mit DNS-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen des erhärteten Agarosegels gegeben. Die Elektrophorese erfolgte in 1x EP-Laufpuffer bei Spannungen von 50V-120V. Ethidiumbromid interkaliert in DNS, die dadurch unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden kann. Die Größe der DNS-Moleküle wurde anhand eines DNS-Größenmarkers (Smart-Ladder von Eurogentec; Seraing, Belgien) ermittelt.

6x DNS-Ladepuffer: 0,25% (w/v) BPB
0,25% (w/v) Xylencyanol
30% (w/v) Glycerol
ad 100 ml mit *aqua bidest.*

1x EP: 40mM Tris
5mM Natriumacetat
1mM EDTA pH 7,8

2.2.4.6 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung im Agarosegel wurde das gewünschte DNS-Fragment unter UV-Bestrahlung mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend mit dem "QIAquick[®] Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden) aus dem Gel extrahiert.

2.2.4.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch eine PCR-Reaktion wurden cDNS-Abschnitte amplifiziert, die anschließend in Expressionsvektoren kloniert wurden. Für die Klonierung geeignete Restriktionschnittstellen wurden durch die Verwendung spezifischer Primer an die 3'- und 5'-Enden der Amplifikate angefügt.

Für die PCR-Reaktion wurde die Pfu-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) verwendet und folgender Ansatz hergestellt:

<u>PCR-Ansatz:</u>	10x Pfu-Puffer		: 10µl
	DNS-Template	[100ng/µl]	: 1µl
	dNTPs	[40mM]	: 2µl
	Vorwärts-Primer	[25pmol/µl]	: 1µl
	Rückwärts-Primer	[25pmol/µl]	: 1µl
	Pfu-Pol [2,5U/µl]		: 1µl
	H ₂ O		: 40µl

Standard PCR-Programm:

5min	95°C	} 20-35 Zyklen
40sek	56-64°C*	
2min	72°C	
40sek	94°C	
10min	72°C	

*Die verwendeten "Annealing"-Temperaturen lagen 2-3°C unter der jeweiligen Schmelztemperatur der verwendeten Primer

2.2.4.8 Herstellung vektorbasierter siRNA gegen AES

Zur Identifizierung einer funktionellen pSuper-basierten siRNA gegen AES wurden vier verschiedene pSuper-AES Konstrukte hergestellt, die unterschiedliche Zielsequenzen besaßen. Diese Zielsequenzen wurden nach den Kriterien zur Herstellung effizienter siRNAs (Tuschi-Regeln) ausgewählt und als Oligonukleotide in den pSuper-Vektor kloniert (Brummelkamp *et al.*, 2002; Elbashir *et al.*, 2002).

Die vier Zielsequenzen waren die Nukleotidbereiche 132-150, 162-180, 231-248, 251-269 in der kodierenden Sequenz des *aes* Gens. Ein "Sense"- und "Antisense"-Oligonukleotid wurden synthetisiert, die jeweils die 19 Nukleotide der Zielsequenz in beiden Orientierungen enthielten. Durch eine 9 Nukleotid lange Zwischenregion und die palindromische Anordnung der Zielsequenzen entsteht nach der Transkription eine shRNA ("short hairpin" RNA) mit einer typischen "stem-loop"-Struktur.

Die "Sense"- und "Antisense"-Oligos wurden zu doppelsträngigen Oligonukleotiden hybridisiert. Dafür wurden jeweils 5µg Oligonukleotid in 50µl 1x TNE bei 95°C für 4min erhitzt, gefolgt von einer Inkubation bei 70°C für 10 Minuten und langsamen Abkühlen auf RT. Für die Phosphorylierung wurden 2µl der Oligonukleotide mit 1µl

T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PNK von Invitrogen, Karlsruhe), 1µl 10x T4-PNK-Puffer und 1µl ATP (10mM) in 10µl für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion bei 70°C für 10 min hitzeinaktiviert. Die Oligonukleotide wurden in den zuvor geschnittenen (*Bgl*II und *Hind*III) und dephosphorylierten pSuper-Vektor ligiert. Die pSuper-Konstrukte wurden sequenzverifiziert.

10x TNE: 10x TE pH 8,0
 100mM EDTA pH 8,0
 1M NaCl
 2% (w/v) SDS in *aqua bidest.* lösen

2.2.4.9 Sequenzierungen

Die DNS-Sequenzierungen wurden von Andreas Hunziker (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte über das HUSAR-Programm (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources). Nach der Sequenzierung der Beute-Plasmide wurde zur Identifizierung der entsprechenden Proteine das Programm BLASTN verwendet.

2.2.5 Methoden zur Analyse von Proteinen

2.2.5.1 Gesamtproteinextraktion

Für eine Proteinextraktion wurden Zellen in 10cm-Kulturschalen (Calciumphosphat-Transfektion) oder in 6cm-Kulturschalen (Oligofectamin-Transfektion) ausgesät. Die Zellen wurden 48h (Überexpression von Proteinen) bzw. 72h (siRNA-behandelte Zellen) nach Transfektion geerntet.

Alle Schritte der Extrakterstellung erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden 2x mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Gummischaber vom Boden gelöst und anschließend in 500µl PBS (10cm-Schale) bzw. 200µl PBS (6cm-Schale) aufgenommen. Durch eine kurze Zentrifugation (15.000rpm, 4°C, 10sek) wurden die Zellen pelletiert und je nach Größe des Pellets in 50-150µl RIPA-Puffer (mit Pefablock und Inhibitor-Cocktail) resuspendiert, 30 Minuten inkubiert und anschließend zentrifugiert (15.000rpm, 4°C,

10min). Die Proteine im Überstand wurden vermessen (2.2.5.3) und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.2.5.4) oder bei -70°C gelagert.

RIPA-Puffer: 10mM Tris pH7,5
 150mM NaCl
 1mM EDTA
 1% NP-40
 0,5% Na-Desoxycholat
 0,1% SDS

1ml Lysepuffer: 10 μl Inhibitor-Cocktail
 25 μl Pefablock (Endkonzentration 2,5mM)
 erst kurz vor Gebrauch hinzugegeben

2.2.5.2 Extraktion cytosolischer Proteine

Für die Extraktion cytosolischer Proteine wurde nach dem Protokoll von Samali verfahren (Samali *et al.*, 1999).

Die Zellen wurden trypsinisiert, abzentrifugiert (1300rpm, 4°C , 3min) und 2x mit kaltem PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Das Zellpellet wurde in 30-50 μl Mitochondrien-Puffer (mit Pefablock und Inhibitor-Cocktail) resuspendiert und mit gleichem Volumen an Digitonin/MES-Puffer versetzt. Für die Zellyse wurden die Zellen 5 Minuten inkubiert und anschließend vorsichtig abzentrifugiert (900g, 4°C , 2min). Der Überstand nach einer weiteren Zentrifugation (13000rpm, 4°C , 5min) enthielt die cytosolischen Proteine.

Mitochondrien-Puffer: 70mM TrisBase
 0,25M Sucrose
 1mM EDTA
 einstellen auf pH 7,4; steril filtrieren

1ml Mitochondrien-Puffer: 10 μl Inhibitor-Cocktail
 25 μl Pefablock (Endkonzentration 2,5mM)
 erst kurz vor Gebrauch hinzugegeben

MES-Puffer (3x): 59,4mM EGTA
 59,4mM EDTA
 0,75M D-Mannitol
 59,4mM MES
 einstellen auf pH 7,4, steril filtrieren

Digitonin (10x): 20mg/ml H_2O , bei -20°C lagern

<u>Digitonin/MES-Puffer (1,5ml):</u>	500µl MES (3x)
	150µl Digitonin (10x)
	850µl <i>aqua bidest.</i>
	37,5µl Pefablock
	15µl Inhibitor-Cocktail

2.2.5.3 Bestimmung von Protein-Konzentrationen

Die Bestimmung der Protein-Konzentrationen wurde nach der Methode von Bradford ermittelt (Bradford, 1976). Sie basiert darauf, dass der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau mit Proteinen Komplexe bildet und dadurch sein Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm verschiebt.

Die Reaktion fand in 1ml 1:5-verdünnter Bradford-Lösung (Bio-Rad Laboratories, München) statt, in die 1-3µl Zellextrakt oder für den Leerwert 1-3µl Lysepuffer gegeben wurde. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurde bei 595nm die Extinktion photometrisch gemessen. Die entsprechende Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden ermittelt.

2.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Verwendet wurde das diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System nach Laemmli (Laemmli, 1970).

Nach dem Vorbereiten der Glasplatten wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine gleichmäßige Oberfläche zu gewährleisten. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol wieder entfernt, das Sammelgel bis zum Glasrand aufgefüllt und ein Kamm zur Aussparung der Taschen eingesetzt.

Die Proteine wurden mit 6x Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 Minuten zur Denaturierung aufgeköcht, kurz auf Eis abgekühlt und in die Taschen des auspolymerisierten Geles gegeben. Zusätzlich wurde 5µl eines Protein-Größenmarkers (peqGOLD Protein-Marker IV "prestained" von Peqlab, Erlangen) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Laufpuffer in einer vertikalen Elektrophoresekammer bei 60-100V für 3-5h.

	<u>10ml Trenngel (12,5%)</u>	<u>5ml Sammelgel (5%)</u>
H ₂ O	4,5ml	3,5ml
Trenngelpuffer	1,2ml	-
Sammelgelpuffer	-	620µl
Acrylamid	4,2ml	830µl
10% SDS	100µl	50µl
10% APS	100µl	50µl
TEMED	10µl	5µl

Acrylamid: 40% Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1); Gibco BRL, Eggenstein

Trenngelpuffer: 3M Tris pH 8,8
0,4% SDS

Sammelgelpuffer: 0,47M Tris pH 6,7

10x Elektrophoresepuffer (EP): 250mM Tris-Base pH 8,6
1,92M Glycin

1x Laufpuffer: 70ml 10x EP
7ml 10% SDS
ad 700ml *aqua bidest.*

6x Probenpuffer: 7,5ml Sammelgelpuffer
0,2g SDS
600µl Mercaptoethanol
36mg BPB
1,6ml Glycerin
ad 10ml *aqua bidest.*

2.2.5.5 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Westernblot)

Der Protein-Transfer erfolgte mit einer halbtrockenen („semi-dry“) Blot-Apparatur. Beim verwendeten 3-Puffer-System wurde das Trenngel des SDS-Polyacrylamidgels 10 Minuten in Puffer III inkubiert. Die PVDF-Membran (Immobilon-P von Millipore, Schwalbach) wurde einige Sekunden in Methanol geschwenkt, mit *aqua bidest.* gespült und anschließend in Puffer I inkubiert. Je 5 Whatman 3MM-Papiere wurden in Puffer I, II und III inkubiert. Die Transferanordnung wurde luftblasenfrei auf der Blot-Apparatur in folgender Anordnung von unten (Anode) nach oben (Kathode) aufgebaut:

- 5 Whatman in Puffer II getränkt
- 5 Whatman in Puffer I getränkt
- PVDF-Membran
- Trenngel
- 5 Whatman in Puffer III getränkt

Der Transfer erfolgte 1 Stunde bei 45-90mA und maximaler Spannung.

<u>Puffer I:</u>	25mM Tris pH 10,4	<u>Puffer III:</u>	25mM Tris pH 9,4 40mM Norleucin
<u>Puffer II:</u>	300mM Tris pH 10,4		

Alternativ wurde auch ein 1-Puffer-System für saure und neutrale Proteine verwendet. Bei diesem System wurden Whatman-Papiere, PVDF-Membran und SDS-Gel in demselben Puffer inkubiert. Der Blotaufbau erfolgte wie oben beschrieben.

Blot-Puffer (1-Puffer-System): 40mM Tris pH 9,2
 39mM Glycin
 1,3mM SDS
 20% Methanol

2.2.5.6 Antikörperbehandlung des Westernblots

Nach der Inkubation über Nacht (4°C) in Blockierlösung wurde die Westernblot-Membran durch Schwenken in PBS kurz gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Erstantikörper (in PBST) in der jeweils vom Hersteller empfohlenen Verdünnung für 2 Stunden bei RT unter Schwenken inkubiert. Danach folgten eine Inkubation von 10 Minuten in Blockierlösung und zwei Waschschrte mit PBST von jeweils 10 Minuten. Anschließend wurde die Membran mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper (in PBST) für 1 Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Blockierschritt von 10 Minuten und 2x 10 Minuten waschen in PBST wurden die Proteine über eine ECL-Reaktion detektiert.

Blockierlösung: PBS/0,2%Tween/5% Magermilch
 (alternativ zu Magermilch wurde auch BSA verwendet)

PBST: 1x PBS/0,2% Tween-20

2.2.5.7 Nachweis durch "Enhanced Chemiluminescence" (ECL)

Das ECL-Detektionssystem ist eine nicht-radioaktive Methode zur Detektion von Proteinen, die indirekt mit an Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörpern markiert wurden. Die Meerrettichperoxidase setzt das Substrat Luminol in einer Licht erzeugenden Reaktion um. Die Lichtemission wird mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert. Die Reaktion erreicht etwa 5 Minuten nach Substratzugabe das Maximum der Lichtemission und fällt dann langsam ab.

Nach der Antikörperbehandlung wurde der Westernblot mit einer 1:1-Mischung der ECL-Lösungen 1 und 2 (GE Healthcare Biosciences, München) für 1 Minute inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Frischhaltefolie bedeckt und auf einem Röntgenfilm (Kodak BioMax MR Film von Sigma-Aldrich, Taufkirchen) exponiert.

2.2.6 Methoden zur Analyse von RNS

2.2.6.1 Gesamt-RNS-Extraktion

Zur Isolierung cytoplasmatischer RNS wurde die von Chomczynski und Sacchi beschriebenen „Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform“ (AGPC)-Methode verwendet (Chomczynski und Sacchi, 1987). Das dabei als denaturierendes Agens eingesetzte Guanidinium-Thiocyanat in der Lösung D bewirkt die Lyse der Zellen und fungiert gleichzeitig als starker Inhibitor der dabei frei werdenden RNasen. Alle verwendeten Chemikalien und Geräte wurden RNase-frei gehalten.

Die Zellen einer 10cm-Kulturschale wurden nach Entfernen des Mediums 2x mit kaltem PBS gewaschen und in 3ml Lösung D aufgenommen. Das Lysat konnte entweder bei -20 °C aufbewahrt oder zur sofortigen Isolierung von Gesamt-RNS weiterverarbeitet werden. Dazu wurden 360µl 2M NaAc (pH 4,0), 3ml Phenol sowie 600µl CIA (49:1) hinzu gegeben und der Ansatz für etwa 10 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz zentrifugiert (3000rpm, 4°C, 30min) und der RNS-haltige Überstand mit 1 Volumen Isopropanol bei -20°C für 60 Minuten gefällt. Nach einer Zentrifugation (4000rpm,

4°C, 30min) wurde das RNS-Pellet erneut in 600µl Lösung D aufgenommen und wie zuvor mit Isopropanol gefällt und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem entsprechenden Volumen RNase-freiem H₂O (50-200µl) aufgenommen.

Lösung D: 4M Guanidinium-Thiocyanat
25mM Natriumcitrat pH 7,0
0,5% Sarkosyl
100mM 2-Mercaptoethanol (unmittelbar vor Gebrauch zugeben)
lichtgeschützt aufbewahren, Lösung etwa 4 Wochen haltbar

CIA 49:1: 49 Teile Chloroform
1 Teil Isoamylalkohol

2.2.6.2 Bestimmung von RNS-Konzentrationen

Die RNS-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\text{nm}$ bestimmt. Für die Messung wurde die RNS 1:250 in *aqua bidest.* verdünnt (3µl RNS + 750µl H₂O) und gegen den H₂O-Leerwert in Quarzküvetten (Hellma, Müllheim) vermessen. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 40µg einzelsträngiger RNS/ml.

2.2.6.3 Gelelektrophorese von RNS

Die elektrophoretische Auftrennung von RNS erfolgte in 1%igen Agarosegelen. Die Agarose wurde in 1x MOPS-Puffer gelöst, mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1µg/ml) und in eine Gelkammer mit Gelkamm gegossen. Pro Ansatz wurde 5µg RNS mit gleichem Volumen RNS-Ladepuffer versetzt und kurz vor dem Auftragen für 15 Minuten bei 68°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS-Puffer bei 45-70V für etwa 2-3 Stunden. Als Größenmarker dienten die ribosomalen RNS-Moleküle:

- 28S rRNS mit 4718 Nukleotiden
- 18S rRNS mit 1874 Nukleotiden
- 5S rRNS mit 120 Nukleotiden

10x MOPS-Puffer: 200mM MOPS
 50mM Natriumacetat
 10mM EDTA
 in *aqua bidest.*, auf pH 7,0 mit NaOH einstellen, lichtgeschützt bei Raumtemperatur lagern

RNS-Ladepuffer: 50% (v/v) Formamid
 2,2M Formaldehyd
 1x MOPS
 1% (v/v) Ficoll 400
 0,02% (w/v) BPB
 in *aqua ad iniectabilia* lösen, bei -20 °C lagern

2.2.6.4 Transfer von RNS auf eine Nylonmembran (Northernblot)

Die Übertragung von RNS auf eine Nylonmembran (Hybond-N+ von GE Healthcare Biosciences, München) wurde mittels Kapillartransfer durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNS wurden zunächst die Positionen der 28S-, 18S, und 5S- rRNS-Banden durch seitliches Einschneiden des Gels unter UV-Licht markiert. Danach wurde das Gel ebenso wie die Nylonmembran kurz in *aqua bidest.* gelegt und anschließend für 10-15 Minuten in 10x SSC äquilibriert. Die Transferanordnung wurde wie folgt luftblasenfrei aufgebaut:

- Stapel aus Papiertüchern
- 2 Lagen trockenes Whatman 3MM-Papier
- 2 Lagen feuchtes Whatman 3MM-Papier (in 10x SCC getränkt)
- Nylonmembran
- Agarosegel

Anschließend wurde sie mit einer Frischhaltefolie vor dem Austrocknen geschützt, mit einer Glasplatte abgedeckt und mit einem kleinen Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Beim Abbau der Anordnung wurden die Positionen der Markerbanden und der Probestaschen auf der Membran mit einem wasserfesten Stift eingezeichnet. Die Membran wurde kurz in 2x SSC gewaschen, auf Whatman-3MM Papier getrocknet und zur Fixierung der RNS mit UV-Licht bestrahlt. Schließlich wurde die Membran für 2 Stunden bei 80 °C gebacken.

10x SSC pH 7: 1,5M NaCl
 150mM Natriumcitrat

2.2.6.5 Radioaktive Markierung und Reinigung von DNS-Fragmenten

Für die radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten wurde der "Megaprime™ DNA Kit" (GE Healthcare Biosciences, München) verwendet. Dieser Kit basiert auf dem Prinzip der "Random-Prime"-Methode. Dabei hybridisieren Primer mit zufälliger Sequenz an denaturierte DNS-Fragmente. Durch den Einbau von dATP, dGTP, dTTP und [α - 32 P]-dCTP werden die DNS-Fragmente zu doppelsträngigen Molekülen und das Fragment gleichzeitig radioaktiv markiert.

Für die Reaktion wurden 50-100ng des gereinigten DNS-Fragments mit *aqua ad iniectabilia* auf 28 μ l aufgefüllt, mit 5 μ l „Random-Prime“-Mischung versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Der Ansatz wurde kurz zentrifugiert und abgekühlt, bevor er mit 10 μ l 5x "Labeling"-Puffer (enthält dATP, dGTP, dTTP), 5 μ l [α - 32 P]-dCTP (GE Healthcare Biosciences, München) und 2 μ l DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) versetzt wurde. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 75 μ l 1x TNE-Lösung und 20 μ l 2x TNE/BPB abgestoppt.

Die Reinigung der radioaktiv markierten Sonde erfolgte mittels einer Biogel P30-Säule. Dafür wurde zunächst 1ml in Biogel P30-Puffer vorgequollenes Gel in eine mit silanisierter Glaswolle abgedichtete 1ml-Injektionsspritze gefüllt. Zur Säulenbildung wurde die Spritze in einem 15ml-Schraubdeckelgefäß zentrifugiert (1600rpm; RT; 3min). Anschließend wurde die Säule mit 100 μ l 1x TNE äquilibriert und erneut zentrifugiert (1000rpm, RT, 5min). Nach Verwerfen der abzentrifugierten Flüssigkeit wurde die Säule in ein 1,5ml-Schraubdeckelgefäß und mit diesem zusammen wieder in das 15ml-Schraubdeckelgefäß gestellt. Der radioaktiv markierte Ansatz wurde dann auf die Säule geladen und für 10 Minuten bei 1300rpm zentrifugiert. Die nicht eingebauten Nukleotide verblieben auf der Säule und die gereinigte Sonde konnte in dem 1,5ml-Schraubdeckelgefäß aufgefangen werden.

Durch Messung der Cerenkow-Strahlung eines 2 μ l-Aliquots wurde die radioaktive Aktivität der Sonde bestimmt.

<u>1x TNE-Lösung:</u>	1x TE pH 8,0_	<u>2x TNE/BPB:</u>	2x TNE
	10mM EDTA pH 8,0		0,1% (w/v) BPB
	100mM NaCl		
	0,2% (w/v) SDS		
	in <i>aqua bidest.</i> lösen		

Biogel P30-Puffer: 1x TE pH 8,0
5mM NaCl
0,2% SDS in *aqua bidest.*, Lagerung bei Raumtemperatur

2.2.6.6 Hybridisierung von RNS-Filtern mit DNS-Sonden

Die auf einer Nylonmembran fixierten RNS-Moleküle wurden mit spezifischen radioaktiv markierten DNS-Sonden hybridisiert und detektiert. Zuerst wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen die Membranen kurz mit H₂O benetzt und in einer Hybridisierungsröhre im Ofen bei 68°C für 1 Stunde mit vorgewärmter Hybridisierungslösung inkubiert.

Die radioaktiv markierte DNS wurde durch Zugabe von 5M NaOH (Endkonzentration 0,2M) und einer Inkubation von 10 Minuten denaturiert und anschließend in die Röhre mit der vorhybridisierten Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte unter Rotieren über Nacht bei 68°C. Anschließend wurde die Membran für 3x 20 Minuten in 2x SSC/0,1% SDS bei 68°C unter ständigem Schwenken gewaschen, auf Whatman 3MM-Papier getrocknet und in Frischhaltefolie verpackt. Die Autoradiographie der Filter erfolgte auf Röntgenfilmen (Kodak BioMax MR Film von Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit Hilfe von Verstärkerfolien (Dr. Goos Suprema, Heidelberg) bei -70°C. Die Dauer der Exposition variierte je nach der spezifischen Aktivität der Sonde und der RNS-Menge.

Hybridisierungslösung: 50mM Natriumphosphat
1% SDS
1x Denhardts-Lösung
5x SSC
0,1mg/ml tRNA in *aqua bidest.*, Lagerung bei Raumtemperatur

50x Denhardts-Lösung: 1% BSA
1% Ficoll 400
1% Polyvinylpyrrolidon 25 in *aqua bidest.*, Lagerung bei -20°C

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung neuer Interaktionspartner von Livin

3.1.1 Vorexperimente für den Y2H-Screen

Voraussetzung für einen erfolgreichen Y2H-Screen ist die korrekte und ausreichende Expression des Köder-Proteins im verwendeten Hefestamm (3.1.1.1) und, dass das Köder-Protein *per se* keine Autoaktivierung zeigt (3.1.1.2). Letzteres würde, unabhängig von einer Interaktion mit dem Beute-Protein, zur Aktivierung der Selektionsmarker führen. In der Tat weist Livin α in der Hefe eine solche intrinsische Transaktivierungsfunktion auf (persönliche Mitteilung, Prof. K. Butz). Daher wurde für den Screen die Livin-Isoform β verwendet.

3.1.1.1 Expression des Köder-Proteins Livin β

Zunächst wurde das für das Köder-Protein (Livin β) kodierende Plasmid hergestellt. Dafür wurde die komplette cDNS von Livin β in den Hefe-Expressionsvektor pPC97-Trp kloniert. Dieser enthält die Sequenz für die GAL4-DNS-Bindungsdomäne (GAL4-BD) sowie das *TRP1*-Gen als Selektionsmarker.

Westernblot-Analysen zeigten eine deutlich nachweisbare Expression des Köder-Fusionsproteins BD-Livin β , das von pPC97-Trp-Livin β in KF1-Hefezellen exprimiert wurde (Abb. 3.1.1).



Abb. 3.1.1: Expression des Köder-Fusionsproteins BD-Livinβ von Plasmid pPC97-Trp-Livinβ. Kontroll-Konstrukt pPC97-Livinβ enthält einen anderen Selektionsmarker (*LEU2*) und Konstrukt pPC97-MMP7 (Negativkontrolle) exprimiert das MMP7-Protein. Proteindetektion mittels anti-Livin Antikörper. BD: DNS-Bindungsdomäne.

Für die folgenden Experimente wurde pPC97-Trp-Livinβ als Köder-Konstrukt verwendet.

3.1.1.2 Test auf Autoaktivierung des Köder-Proteins Livinβ

Um das intrinsische Transaktivierungspotenzial des Köder-Proteins zu untersuchen wurden die Hefe-Expressionsplasmide pPC97-Trp-Livinβ und pGAD10 (exprimiert nur die GAL4-Transaktivierungsdomäne) in KF1 kotransformiert. Als Positivkontrolle für den Assay diente Plasmid pCL1, das für den Wildtyp GAL4-Transkriptionsfaktor kodiert.

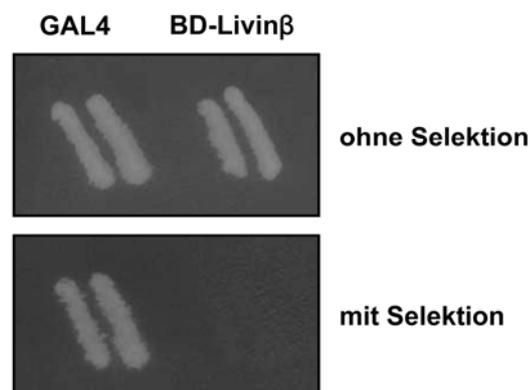


Abb. 3.1.2: Köder-Fusionsprotein BD-Livinβ führt nicht zur Autoaktivierung. KF1-Hefen wurden entweder mit den Vektoren pCL1 und pPC97-Trp (GAL4), oder mit pGAD10 und pPC97-Trp-Livinβ (BD-Livinβ) transformiert. Oben: Wachstum auf einem Nährboden ohne Selektion. Unten: Wachstum nach Selektion auf die Aktivierung des *ADE2* Reportergens. BD: DNS-Bindungsdomäne.

Dabei zeigte sich, dass unter Selektionsbedingungen nur die Positivkontrolle GAL4 zum Wachstum von KF1-Hefen führte (Abb. 3.1.2, unten). Das Köder-Fusionsprotein BD-Livin β führte hingegen *per se* nicht zur Aktivierung des *ADE2*-Reportergens, so dass es für die folgenden Versuche verwendet werden konnte.

3.1.2 Y2H-Screen

Für den Screen wurden KF1-Hefen, die das Köder-Konstrukt pPC97-Trp-Livin β enthielten, mit der Keratinocyten-Expressionsbank transformiert.

Im Screen wurden $7,75 \times 10^6$ Hefetransformanten getestet. Bei einer angegebenen Komplexität der Keratinocyten-Expressionsbank von 5×10^6 , ergab das eine 1,6-fache Abdeckung der Expressionsbank. Als Resultat des Screens wurden 503 Hefetransformanten erhalten, die den *ADE2*-Marker aktivierten.

3.1.2.1 Replikplattierung und Re-Screen

Durch Replikplattierung wurden die 503 positiven Hefetransformanten darauf getestet, ob sie weitere Selektionsmarker aktivieren konnten. Dies erfolgte zur Verminderung von falsch-positiven Hefetransformanten und um Rückschlüsse auf die Stärke der Protein-Protein-Interaktion ziehen zu können, da die verschiedenen Reportergene sich in ihren Stringenzen unterscheiden.

In der Replikplattierung konnten 399 Hefetransformanten den *HIS3*-Marker aktivieren, wenn die Konzentration an 3`AT (s.a. Kapitel 2.2.1.2) im Medium 80mM betrug und 336 Hefetransformanten, wenn sie 120mM betrug. 224 Hefetransformanten zeigten eine Aktivierung des *URA3*-Markers, der erst bei starken Protein-Protein-Interaktionen aktiviert wird.

Anschließend wurde in einem Re-Screen die Anzahl falsch-positiver Hefetransformanten weiter reduziert. Dafür wurden 35 *URA3*-positive Beute-Plasmide aus den Hefetransformanten isoliert (Plasmid-Rescue) und in frische

Hefezellen transformiert, um sie dort wieder auf die Aktivierung der Reportergene hin zu testen. Dabei zeigten 13 Hefetransformanten erneut eine Aktivierung von mindestens zwei Reportergenen.

3.1.2.2 Identifizierung potenzieller Interaktionspartner

Die Identifizierung dieser 13 Beute-Proteine erfolgte über eine Sequenzierung der cDNS-Abschnitte. Dabei wurden sieben als AES ("Amino-terminal Enhancer of Split"; #NM_001130), vier als Keratin5 (#NM_000424), eins als ein nicht näher beschriebenes G-Protein (#BC013090) und eins als hypothetisches FLJ12684 Protein ("hypothetical protein FLJ12684; #NM_024534) identifiziert. Eine zusammenfassende Darstellung des gesamten Y2H-Screens ist in Abb. 3.1.3 aufgeführt.

Da sowohl für das isolierte G-Protein als auch für das hypothetische FLJ12684 Protein noch keine weiteren Untersuchungen und Informationen vorlagen, wurden diese potentiellen Interaktionspartner hier nicht weiter untersucht.

Keratin5:

Keratin5 gehört zur Familie der Keratine, die aus mehr als 20 humanen Mitgliedern besteht. Durch Heterodimerisierung über coiled-coil Strukturen bilden die Keratine die Intermediärfilamente von Epithelzellen (Lersch und Fuchs, 1988). Keratin5 und sein Dimerisierungspartner Keratin14 sind die vorherrschenden Keratine in den Keratinocyten der Basalzellschicht mehrschichtiger Epithelien.

Proteine des Cytoskeletts werden jedoch als typische Proteine angesehen die bei Y2H-Screens falsch-positive Ergebnisse hervorrufen, da sie durch ihre coiled-coil-Strukturen und durch ihre nicht spezifische Ladung leicht Bindungen mit anderen Proteinen eingehen (Serebriiskii *et al.*, 2000). Auch ein Screen der gleichen Keratinozyten-Bank mit einem anderen Zielprotein führte ebenfalls zur Isolierung von Keratin5 (persönliche Mitteilung, S. Dymalla). Aufgrund dieser Tatsachen wurde diese Interaktion nicht weiter verfolgt.

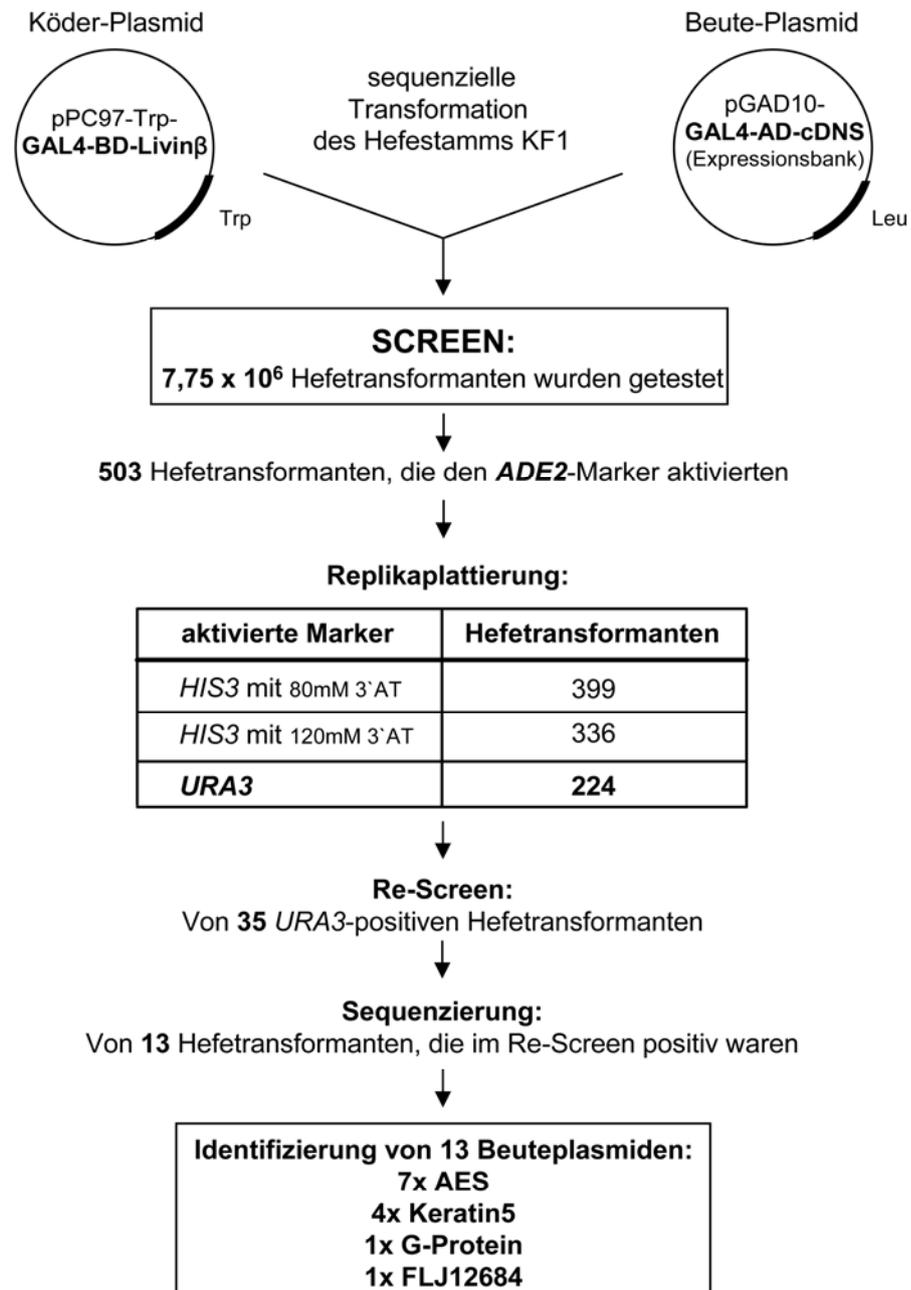


Abb. 3.1.3: Ablauf des Y2H-Screens. Köder-Plasmid pPC97-Trp-Livin β und die Beute-Plasmide pGAD10-cDNS wurden in KF1-Hefen sequenziell transformiert. Von den getesteten $7,75 \times 10^6$ Hefetransformanten aktivierten im Screen 503 den *ADE2*-Marker. Durch Replikaplattierung wurden diese auf die Aktivierung weiterer Reportergene (*HIS3* und *URA3*) hin getestet. Von 224 *URA3*-positiven Hefetransformanten wurden 35 im Re-Screen getestet, der bei 13 zur erneuten Aktivierung von Reportergenen führte. Die cDNS dieser 13 Beute-Plasmide wurde durch Sequenzierung identifiziert.

AES (Amino-terminal Enhancer of Split):

Das AES-Protein gehört zur evolutionär konservierten Groucho/TLE-Familie von Korepressoren. Diese Faktoren spielen in den meisten vielzelligen Organismen eine wichtige Rolle in unterschiedlichen Entwicklungsprozessen, wie der Neurogenese, Segmentierung oder Geschlechtsbestimmung (Paroush, 1994). Als Korepressoren binden diese Proteine nicht direkt an DNS, sondern werden durch andere DNS bindende Proteine an die regulatorischen Elemente verschiedener Gene rekrutiert (Fisher und Caudy, 1998; Chen und Courey, 2000). Als erstes Mitglied dieser Familie wurde das Drosophila Protein Groucho (Gro) beschrieben (Lindsley und Grell, 1968). Die später charakterisierten homologen humanen Proteine sind AES und TLE-1 bis 4 ("Transducin-like Enhancer of Split") (Stifani *et al.*, 1992).

Das AES-Protein ist mit seinen 197 Aminosäuren das kürzeste Mitglied der Gro/TLE-Familie. Während die Gro/TLE-Proteine als Repressoren von Transkriptionsfaktoren beschrieben wurden, ergibt sich für AES ein komplexeres Bild. Neben seiner reprimierenden Eigenschaft, zum Beispiel auf die NF- κ B- oder Androgen-Rezeptor-vermittelte Transkription (Tetsuka *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2001), kann AES auch als Aktivator wirken, was für die TCF/ β -Catenin-abhängige Transkription gezeigt werden konnte (Brantjes *et al.*, 2001).

Neben seiner Eigenschaft als Modulator der Transkription wurde AES auch als wichtiger Faktor bei der Anoikis-Regulation beschrieben. Als Anoikis wird die Apoptose bezeichnet, die durch Verlust der Zelladhäsion ausgelöst wird. Hier wurde postuliert, dass AES an das mitochondriale Protein Bit1 bindet und dieser Komplex eine ursächliche Rolle in der Apoptose-Induktion spielt, wobei der genaue Mechanismus dieses Prozesses noch unklar ist (Jan *et al.*, 2004).

Durch die Beschreibung als pro-apoptotischer Faktor erschien das AES-Protein ein interessanter Kandidat zu sein, um Einblicke in die anti-apoptotische Funktionsweise von Livin β zu bekommen. Aus diesem Grund konzentrierten sich die folgenden Experimente und funktionellen Analysen dieser Arbeit auf das AES-Protein und dessen Interaktion mit Livin β .

3.2 Biochemische Analyse der Livin β -AES-Interaktion

Zur genaueren Überprüfung der Livin β -AES-Interaktion wurden zunächst die Spezifität der Interaktion analysiert (3.2.1) und anschließend die Interaktion unter *in vitro*-Bedingungen untersucht (3.2.2).

3.2.1 Spezifität der Livin β -AES-Interaktion

3.2.1.1 Spezifität in Hefezellen

Für den Spezifitätstest in Hefe wurde eine spezielle Form des Y2H-Systems, das "Yeast-Mating"-Verfahren verwendet (Finley und Brent, 1994; Kolonin *et al.*, 2000). Diese Methode wird bevorzugt, wenn mehrere Köder- gegen mehrere Beute-Proteine getestet werden sollen. Die Anzahl der durchzuführenden Hefetransformationen ist geringer als beim herkömmlichen Y2H-Versuch, in dem jede Zweierkombination in einem separaten Ansatz transformiert werden muss.

Die Hefe-Expressionsplasmide der Köder-Proteine (Livin β , XIAP, c-IAP1, c-IAP2, Survivin, HPV16 E6) und der Beute-Proteine (AES5.2, AES) wurden in Hefezellen transformiert und im anschließenden Mating-Assay auf die Aktivierung mehrerer Reportergene hin getestet (Abb.3.2.1).

Das Beuteplasmid AES5.2 war im Y2H-Screen das erste, in dem die AES-Sequenz identifiziert wurde. Es enthält neben der AES-kodierenden Sequenz noch die 5'-nichttranslatierte Region (UTR). Das resultierende AD-AES5.2-Fusionsprotein besitzt dadurch noch eine Linkersequenz von 82 Aminosäuren zwischen Aktivierungsdomäne und dem eigentlichen AES-Protein.

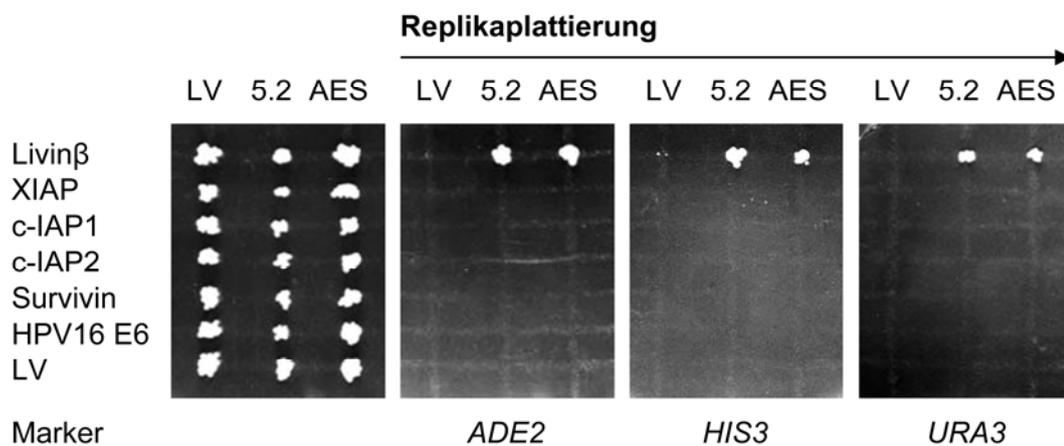


Abb. 3.2.1: Spezifität der Livin β -AES-Interaktion in Hefezellen. Linkes Bild: Die Beute-Proteine Livin β , XIAP, c-IAP1, c-IAP2, Survivin und das nicht mit Livin β verwandte HPV16 E6 wurden jeweils mit den Köder-Proteinen AES5.2 (5.2) und AES in Hefen koexprimiert. In einer Replikaplattierung wurden die Hefetransformanten auf die Aktivierung der Reportergene (Marker) *ADE2*, *HIS3* und *URA3* hin getestet. LV: Leervektor.

Der Mating-Assay zeigte, dass nur Hefen in denen Livin β mit AES5.2 oder AES koexprimiert wurde, die drei Reportergene (*ADE2*, *HIS3*, *URA3*) aktivierten. Das bedeutet, dass AES mit Livin β , nicht aber mit heterologen Proteinen, wie HPV16 E6, interagiert. Die Tatsache, dass AES auch nicht mit anderen, verwandten Mitgliedern der IAP-Proteinfamilie interagiert, weist außerdem auf eine hohe Bindungsspezifität hin.

3.2.1.2 Spezifität in Säugerzellen

Die Spezifität der Livin β -AES-Interaktion wurde außerdem in Säugerzellen analysiert. Hierfür wurde das *CheckMate Mammalian Two-Hybrid-System* eingesetzt, ein Zwei-Hybrid-System, das speziell für Studien in Säugerzellen konzipiert wurde.

Dafür wurden HeLa-Zellen mit pBind-Expressionsplasmiden für die IAP-Proteine Livin β , Livin α , XIAP, c-IAP1, c-IAP2 und Survivin (jeweils in Fusion mit der GAL4-DNS-Bindungsdomäne) und dem Plasmid pAct-AES (kodiert für AES in Fusion mit der VP16-Transaktivierungsdomäne) kotransfiziert. In Säugerzellen wirkt Livin α nicht *per se* als Transaktivator und konnte daher im CheckMate-Bindungsassay getestet werden. Die Expression der IAP-Proteine von den verwandten Plasmiden wurde durch Westernblot-Analysen und andere CheckMate-Bindungsassays bestätigt

(Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrolle diente die Bindung zwischen Livin β und Smac.

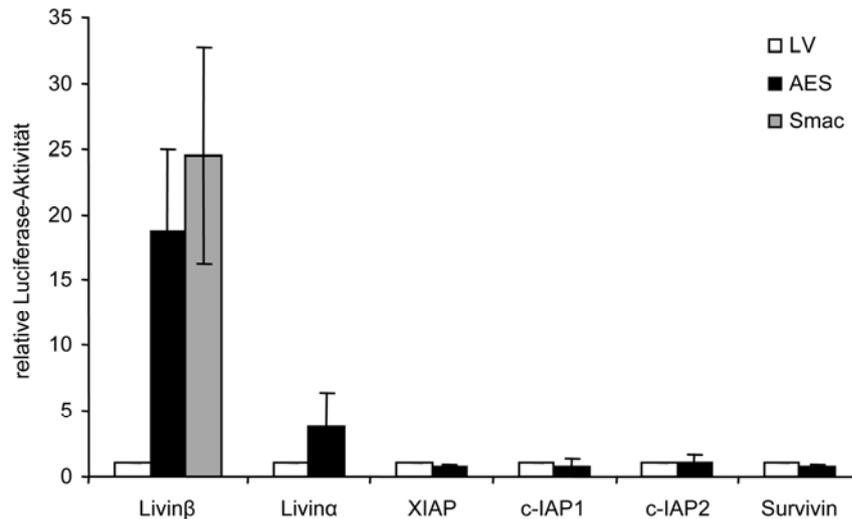


Abb. 3.2.2: Spezifität der Livin β -AES-Interaktion in Säugerzellen. HeLa-Zellen wurden mit den CheckMate-Expressionsplasmiden für AES und den an der x-Achse angegebenen IAP-Proteinen kotransfiziert. Abgebildet sind die relativen Luciferase-Aktivitäten nach β -Galaktosidase-Abgleich. Der Luciferase-Wert der sich jeweils aus der Kombination pBind-IAP mit dem Leervektor (LV) ergab, wurde gleich 1 gesetzt (weiß). Als Positivkontrolle diente die Bindung zwischen Livin β und Smac (hellgrau). Angegeben sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen CheckMate-Bindungsassays.

Die CheckMate-Versuche zeigten einen klaren Anstieg der Luciferase-Aktivitäten bei der Koexpression von AES mit Livin β und Livin α (Abb. 3.2.2), wobei die Livin β -AES-Interaktion einen stärkeren Anstieg aufwies. Die Koexpressionen der anderen IAP-Proteine mit AES führten nicht zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivitäten. Dies bedeutet, dass AES in Säugerzellen selektiv an Livin β und Livin α bindet, nicht aber an verwandte IAP-Proteine, was in Übereinstimmung mit den Experimenten in Hefezellen steht.

3.2.2 *In vitro*-Bindungsstudien zur Livin β -AES-Interaktion

3.2.2.1 Bindung zwischen GST-AES und zellulärem Livin β

Zuerst wurde die Interaktion eines rekombinant hergestellten GST-AES Fusionsproteins mit zellulär exprimiertem Livin β in einem GST-Pulldown-Experiment getestet.

Dafür wurde das Fusionsprotein GST-AES in Bakterienzellen exprimiert. Parallel wurden HeLa-Zellen mit den HA-markierten Expressionsplasmiden für Livin β und Livin1-189 transfiziert. Die Deletionsmutante Livin1-189 enthält die ersten 189 Aminosäuren des Volllängenproteins und besitzt somit als strukturelle Region die BIR-Domäne.

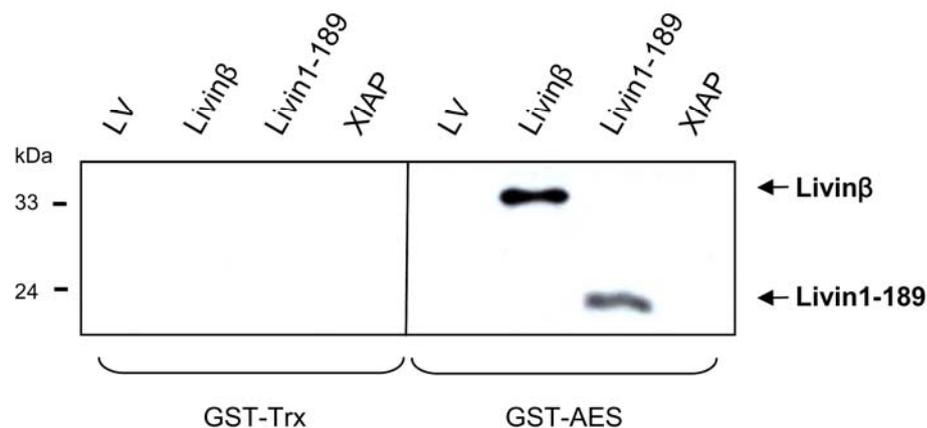


Abb. 3.2.3: *In vitro*-Bindung von AES an Livin β . Rechte Seite: GST-Pulldown mit rekombinantem GST-AES und einem Extrakt aus HeLa-Zellen, die zuvor mit dem Leervektor (LV) und den Expressionsvektoren für Livin β , Livin1-189 transfiziert wurden. Linke Seite: Westernblot des Kontroll-Pulldowns mit GST-Trx. Proteindetektion mittels anti-HA Antikörper. GST: Gluthation-S-Transferase; Trx: Thioredoxin.

Im GST-Pulldowns konnte gezeigt werden, dass GST-AES sowohl an das Volllängenprotein Livin β , als auch an die Deletionsmutante Livin1-189 bindet (Abb. 3.2.3, rechte Seite). Die ersten 189 Aminosäuren des Livin-Proteins reichen daher für die Interaktion mit AES aus.

Ein Kontroll-Pulldown mit rekombinantem GST-Thioredoxin (GST-Trx) zeigte, dass die zellulär exprimierten Proteine nicht unspezifisch an GST oder an das Kontrollprotein Thioredoxin binden konnten (Abb. 3.2.3, linke Seite).

3.2.2.2 Bindung zwischen GST-AES und *in vitro* translatiertem Livin β

Zur weiteren Überprüfung der Livin β -AES-Interaktion wurde der GST-Pulldown in einem zellfreien *in vitro*-Expressionssystem wiederholt.

Während der *in vitro*-Transkription und -Translation wurde Livin β radioaktiv markiert (Livin $\beta^{35}\text{S}$), um es später in einer Autoradiographie sichtbar machen zu können. Der Pulldown selbst wurde wie zuvor, mit den bakteriell hergestellten Proteinen GST-AES und GST (Negativkontrolle) durchgeführt (Abb. 3.2.4).

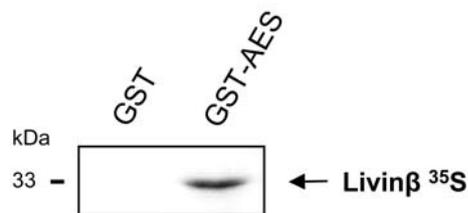


Abb.3.2.4: GST-Pulldown mit GST-AES und *in vitro* transkribiertem und translatiertem Livin $\beta^{35}\text{S}$.

Auch hier zeigte sich, dass *in vitro* transkribiertes und translatiertes Livin β mit GST-AES, nicht aber mit dem Kontrollprotein GST interagiert.

3.3 Mutationsanalysen zur Eingrenzung der Livin β -AES-Interaktion

Im Folgenden wurden die für die Livin β -AES-Interaktion verantwortlichen Regionen, sowohl im AES-, als auch im Livin β -Protein bestimmt. Für diese Analysen wurden erneut das Y2H- und das CheckMate-System verwendet, mit dem die Bindungen verschiedener Mutanten an den jeweiligen Bindungspartner getestet wurden.

3.3.1 Kritische Aminosäuren im AES-Protein

3.3.1.1 Bindungsanalysen in Hefezellen

Um bindungsrelevante Aminosäuren im AES-Protein zu identifizieren, wurden die in Abb. 3.3.1 dargestellten mutierten Proteine hergestellt. Die kodierenden Sequenzen dieser Mutanten wurden in den pGAD10-Vektor kloniert, so dass sie für den Y2H-Versuch in Fusion mit der Aktivierungsdomäne exprimiert wurden. Der pGAD10-Vektor ist ein sogenannter "low expression" Vektor, der die Rate falsch positiver Signale reduziert. Die von ihm kodierten Proteine werden in so geringen Mengen exprimiert, dass sie durch kommerziell verfügbare Antikörper gegen die GAL4-AD nicht detektierbar sind (Information Clontech). Aus diesem Grund konnte die Expression der Mutanten nicht wie gewöhnlich über eine Westernblot-Analyse getestet werden. Um die Expression trotzdem überprüfen zu können, wurde sich die Tatsache zu Nutze gemacht, dass die Gro/TLE-Proteine über ihre Q-Domäne untereinander interagieren (Pinto und Lobe, 1996; Chen *et al.*, 1998). Dadurch konnte über die Bindung der AES/TLE2-Mutanten an das AES5.2-Protein indirekt deren Expression und deren korrekte Proteinfaltung nachgewiesen werden.

Generell gilt die Q-("glutamine-rich")-Domäne der Gro/TLE-Proteine als Proteinbindende Region, wohingegen die GP-("glycin/proline-rich")-Domäne vorwiegend in der transkriptionellen Regulation involviert ist (Gasperowicz und Otto, 2005).

Für den Y2H-Versuch wurden die AES/TLE2-Mutanten mit Livin β oder AES5.2 in KF1-Hefen koexprimiert und auf die Aktivierung von Reporter genen hin getestet. Eine schematische Darstellung der AES/TLE2-Mutanten und deren Bindung an Livin β und AES5.2 sind in Abb. 3.3.1 aufgeführt.

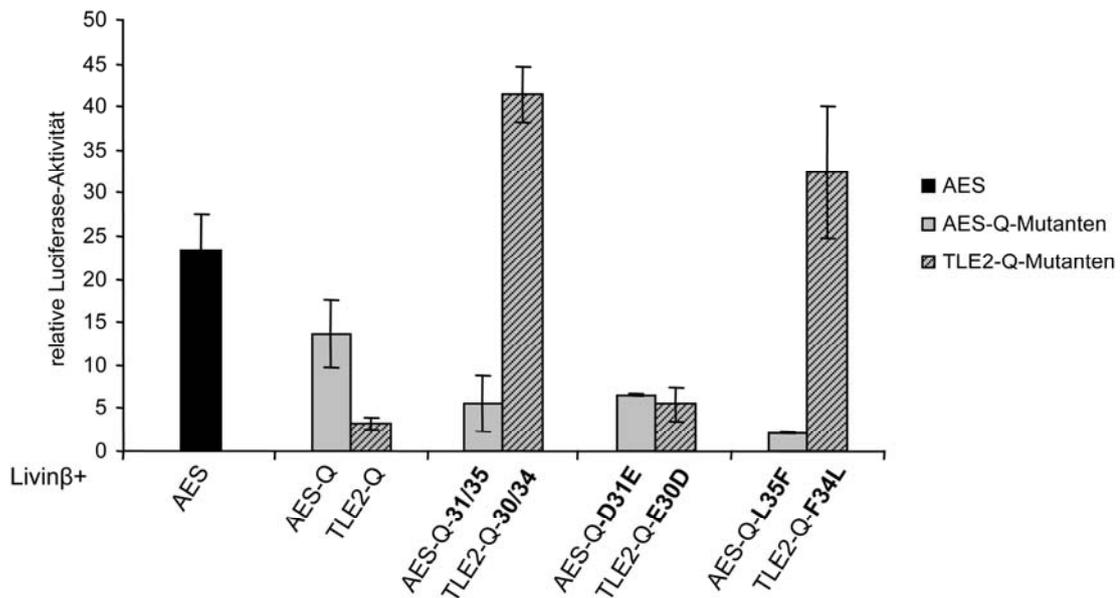


Abb. 3.3.3: Bindung von Livin β an verschiedene AES-Q/TLE2-Q-Mutanten. In HeLa-Zellen wurde Livin β jeweils mit AES (schwarz), AES-Q, TLE2-Q oder den angegebenen Mutanten koexprimiert. Der Luciferase-Wert, der sich aus der Kombination pBind-Livin β mit pAct ergab, wurde gleich 1 gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

Die Koexpression der Mutanten TLE2-Q-30/40 und TLE2-Q-F34L mit Livin β führte zu einem starken Anstieg der Luciferase-Aktivitäten. Wie zuvor in der Hefe, zeigte der Bindungsassay der zwei Mutanten AES-Q-31/35 und TLE2-Q-30/34, dass durch den Transfer von zwei Aminosäuren (D und L an Position 30 und 34) aus der AES-Q-Domäne an die entsprechende Stelle in der TLE2-Q-Domäne (Position 30 und 34) auch die Fähigkeit übertragen wird, Livin β zu binden. Ebenfalls wie in der Hefe, zeigen die Mutanten AES-Q-L35F und TLE2-Q-F34L, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure ausreicht, um die Livin β -Bindung vom AES- auf den TLE2-Anteil zu übertragen und zum Verlust der Bindung des AES-Anteils führt.

Im Gegensatz zum Y2H-Versuch konnte hier allerdings keine Interaktion zwischen der Mutante AES-Q-D31E und Livin β detektiert werden. Um zu überprüfen, ob möglicherweise eine fehlende Expression der Mutante die Ursache dafür war, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Dafür wurden die His-markierten AES-Q/TLE2-Q-Mutanten in HeLa-Zellen exprimiert und anschließend im Westernblot mit einem anti-His Antikörper detektiert (Abb. 3.3.4). Es zeigte sich eine vergleichbar starke Expression aller AES-Q/TLE2-Q-Mutanten.

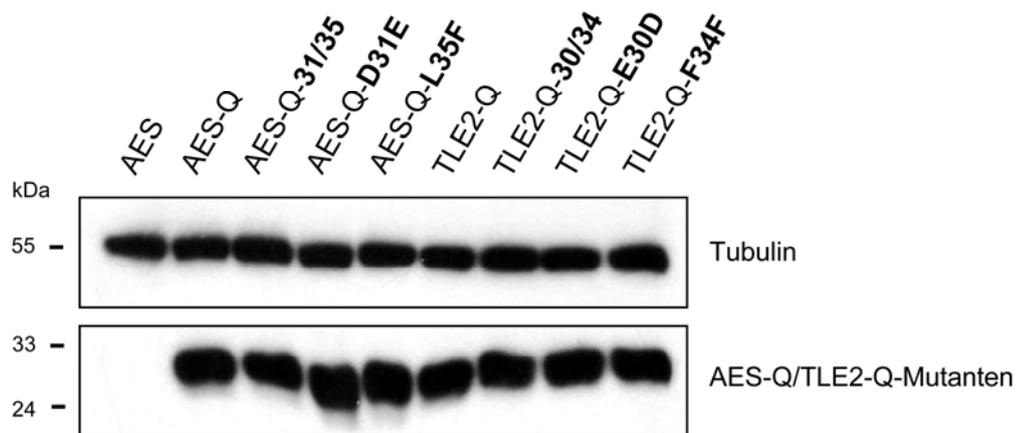


Abb. 3.3.4: Expressionskontrolle der AES-Q/TLE2-Q-Mutanten. Westernblot-Analysen von HeLa-Zellen, die mit den Expressionsplasmiden (pAct-His) der angezeigten Proteinmutanten transfiziert wurden. Negativkontrolle: AES-Expression ohne His-Tag. Proteindetektion mittels anti-His Antikörpern.

Die fehlende Interaktion der Mutante AES-Q-D31E mit Livin β musste somit einen anderen Grund haben. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich die Polypeptidkette der Mutante in Säugerzellen anders faltet als in Hefezellen, zumal sie im CheckMate-Vektor mit der VP16- und im Hefe-Vektor mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert vorliegt.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.1, dass sowohl in Hefe als auch in Säugerzellen die Aminosäure Leucin an der Position 35 im AES-Protein eine kritische Rolle bei der Livin β -Bindung spielt.

3.3.2 Kritische Aminosäuren im Livin-Protein

Zur Identifizierung bindungsrelevanter Aminosäuren im Livin-Protein wurden ebenfalls Bindungsstudien in Hefe durchgeführt, diesmal mit einer Reihe unterschiedlicher Livin-Mutanten (Abb. 3.3.5).

Als Deletionsmutante, die nur die RING-Domäne enthält, wurde Livin α 190-298 verwendet, da die korrespondierende β -Mutante (Livin β 190-280) nicht exprimiert wurde. Im Gegensatz zum Livin α -Volllängenprotein ist die Mutante Livin α 190-298 bei stringenten Selektionsbedingungen nicht *per se* aktivierend.

Die Punktmutante Livin β D138A besitzt innerhalb der BIR-Domäne an Position 138 einen Aminosäureaustausch, bei dem Aspartat (D) durch Alanin (A) ersetzt wurde. Dieser Austausch führt dazu, dass sie nicht mehr an Smac binden kann (Vucic *et al.*, 2002).

Livin besitzt innerhalb seines Amino-Terminus an Position 52 einen Aspartat-Rest, an den Caspase-3 und -7 *in vivo* binden und das Vollängenprotein in zwei Fragmente spalten können (Nachmias *et al.*, 2003). In der Mutante Livin β D52E wurde dieses Aspartat (D) durch Glutamat (E) ersetzt. Dadurch ist die Caspase-Bindungssequenz in dieser Mutante zerstört und Caspase-3 und -7 können Livin β D52E nicht mehr binden und spalten. Das durch eine Spaltung entstehende C-terminale Livin-Fragment wird durch die Deletionsmutante Livin β 53-280 repräsentiert.

Für den Y2H-Versuch wurden die Livin-Mutanten jeweils mit AES in KF1-Hefen koexprimiert. Eine schematische Darstellung der Livin-Mutanten und ihrer Bindungen an das AES-Protein im Y2H-Versuch sind in Abb. 3.3.5 aufgeführt.

AES konnte an alle Punktmutanten von Livin β (Livin β D138A, Livin β D52E, Livin β D52E/D138A) binden. Alle Mutanten, welche die vollständige BIR-Domäne enthielten, konnten im Y2H-Versuch mit dem AES-Protein interagieren. Durch die Bindung der kürzesten Mutante Livin β 80-189 an AES konnte die für die AES-Bindung relevante Region auf die Aminosäuren 80-189 eingegrenzt werden. Dieser Bereich enthält die BIR-Domäne und eine flankierende Sequenz von 35 Aminosäuren am C-Terminus.

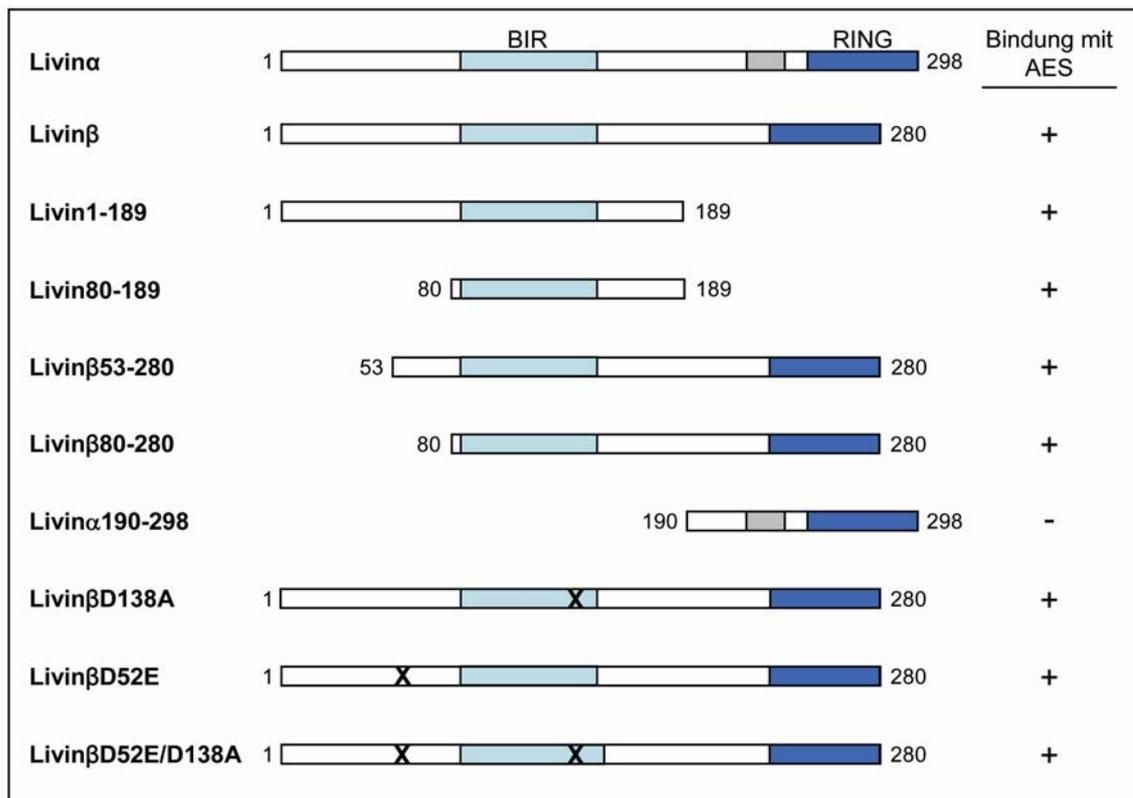


Abb. 3.3.5: Schematische Darstellung der Volllängenproteine Livin α (AS 1-298), Livin β (AS 1-280) und einer Reihe von Deletions- und Punktmutanten. Hellblau: BIR-Domäne (AS 87-154); dunkelblau: RING-Domäne (AS 249-280); grau: Livin α -spezifische Aminosäuren (AS 218-235); X: Aminosäureaustausch. Rechte Seite: Bindung der Livin-Mutanten an AES im Y2H-Versuch. +: Bindung; -: Keine Bindung. AS: Aminosäure.

3.4 Apoptose-Regulation durch das AES-Protein

Wie bereits in Kapitel 3.1.2.2 erwähnt, wurde das AES als pro-apoptotisches Protein beschrieben (Jan *et al.*, 2004). Nachdem die Livin β -AES-Bindung eingehend untersucht und verifiziert war, wurden diese pro-apoptotischen Eigenschaften von AES näher untersucht, in der Hoffnung dadurch neue Einblicke in die anti-apoptotische Wirkungsweise des Livin-Proteins zu bekommen.

3.4.1 AES und Bit1 bei der Apoptose-Regulation

Bit1 ist ein mitochondriales Protein, das nach einem apoptotischen Stimulus ins Cytoplasma entlassen wird, wo es mit AES interagieren kann. Nur in diesem

Komplex sollten beide Proteine zur Apoptose-Induktion führen (Jan *et al.*, 2004; Stupack und Cheresch, 2004).

3.4.1.1 AES-Bit1-Bindungsanalyse

Um die in der Hefe beschriebene Bindung zwischen AES und Bit1 zu bestätigen, wurde ein Y2H-Versuch durchgeführt. Dafür wurde Bit1 (in Fusion mit DNS-BD) und AES (in Fusion mit AD) in Hefen koexprimiert. Die Hefetransformanten wurden anschließend auf die Aktivierung aller drei Reportergene (*ADE2*, *URA3*, *HIS3*) hin getestet.

Keiner der Marker konnte durch die koexprimierten Proteine aktiviert werden. Somit konnte, zumindest in der Hefe, keine Interaktion zwischen AES und Bit1 nachgewiesen werden.

3.4.1.2 Analyse apoptotischer Effekte von Bit1

Zur Überprüfung der pro-apoptotischen Funktion von Bit1 wurden steigende Mengen an Bit1 in HeLa-Zellen exprimiert und anschließend mögliche Änderungen in der Apoptose-Rate der Zellen analysiert. HeLa-Zellen exprimieren endogenes AES, was für die pro-apoptotische Funktion von Bit1 notwendig sein soll (Jan *et al.*, 2004).

Es wurde ein Expressionsplasmid verwendet, von dem das Bit1-Protein in Fusion mit einem N-terminalen "Flag-Tag" exprimiert wurde. Durch diesen "Tag" wird das N-terminale mitochondriale Lokalisationssignal im Bit1-Protein abgeschirmt. Dadurch wird Flag-Bit1 nicht in die Mitochondrien transportiert, sondern verbleibt im Cytoplasma wo es nach Jan *et al.* pro-apoptotisch wirken soll.

Die Flag-Bit1 transfizierten Zellen zeigten jedoch weder morphologisch im Lichtmikroskop (Zellfragmentierung), noch in der DAPI-Kernfärbung (Chromatinkondensation und Kernfragmentierung) eine erhöhte Apoptose-Rate im

Vergleich zu den Kontrollzellen. Mittels Westernblot-Analyse konnte das Bit1-Protein nachgewiesen werden, so dass eine fehlende Expression als Ursache ausgeschlossen werden konnte.

3.4.2 Einfluss von AES auf die *bcl-2*-Promotor-Aktivität

Die beschriebene Apoptose-Induktion durch den AES-Bit1-Komplex wurde von Jan *et al.* nicht weiter untersucht. In transienten Reportergen-Assays zeigten die Autoren jedoch, dass die Expression von AES in CHO-Zellen zur Reprimierung der *bcl-2*-Promotor-Aktivität führt. Die Reduktion der Expression eines anti-apoptotischen Faktors wie Bcl-2 wäre eine mögliche Erklärung für die pro-apoptotische Funktion von AES (Jan *et al.*, 2004).

Um einen möglichen Effekt von AES auf die *bcl-2*-Promotor-Aktivität zu untersuchen, wurden Luciferase-Reportergen-Analysen in CHO-Zellen durchgeführt. Es wurden drei verschiedene Reportergen-Konstrukte verwendet, die entweder den 5`-Bereich (P1), den 3`-Bereich (P2) des Promotors oder den gesamten Promotor (P1+P2) des *bcl-2*-Gens enthielten. CHO-Zellen wurden mit den Reportergen-Plasmiden und steigenden Mengen eines AES-Expressionsplasmids kotransfiziert. Um Schwankungen in den Transfektionseffizienzen zu berücksichtigen, wurde als interner Standard ebenfalls ein pCMV- β -Galaktosidase-Plasmid transfiziert (s. a. 2.2.2.5 und 2.2.2.7).

Im Gegensatz zu den Arbeiten von Jan *et al.* konnte nach Abgleich auf die Transfektionseffizienz kein Effekt von AES auf den *bcl-2*-Promotor beobachtet werden. Dies traf auch für analoge Experimente in HeLa- und HCT116-Zellen zu.

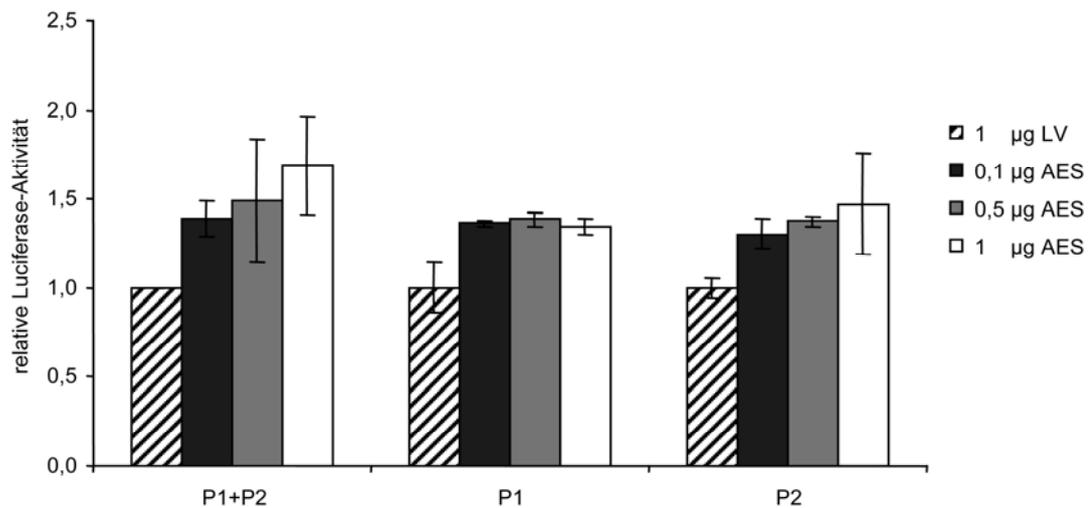


Abb. 3.4.1: *Bcl-2*-Promotor-Aktivität nach AES Überexpression. CHO-Zellen wurden mit den in der Abbildung angegebenen Mengen an AES-Expressionsplasmid oder Leervektor (LV) transfiziert. Getestet wurden die auf der x-Achse angegebenen *bcl-2*-Promotorabschnitte. Der Luciferase-Wert, der sich bei der Kotransfektion des jeweiligen Reporter-gen-Konstruktes mit dem LV ergab, wurde gleich 1 gesetzt. Standardabweichungen sind eingezeichnet. P1+P2: Gesamter *bcl-2*-Promotor; P1: 5'-Bereich des *bcl-2*-Promotors, P2: 3'-Bereich des *bcl-2*-Promotors.

3.4.3 Einfluss von AES auf die Apoptose-Rate von HeLa-Zellen

Im Folgenden wurde der Einfluss des AES-Proteins auf die Apoptose-Rate von HeLa-Zellen analysiert. Für diese Analysen wurde die RNAi-Technologie eingesetzt, die eine gezielte Inhibierung der Genexpression durch doppelsträngige, kurze RNS-Moleküle (siRNAs) ermöglicht (Fire *et al.*, 1998; Elbashir *et al.*, 2001). Dafür wurden sowohl das pSuper-Vektorsystem für die Generierung von siRNAs (Brummelkamp *et al.*, 2002), als auch synthetische siRNAs verwendet. Auf Grund der hohen Transfektionseffizienzen von über 85%, die in HeLa-Zellen reproduzierbar erreicht werden, wurden alle siRNA-Experimente in dieser Zelllinie durchgeführt.

3.4.3.1 Hemmung der AES-Expression durch vektorbasierte siRNA

Von den vier hergestellten pSuper-AES-Konstrukten (2.2.4.8) führte nur pSuper-AES1.2 zu einer effizienten Hemmung der AES-Genexpression. Dabei zeigte sich in Westernblot-Analysen (Abb. 3.4.2), dass nur der Proteinspiegel von

überexprimiertem Wildtyp-AES abnimmt, nicht aber der einer AES-Mutante (AESsm), in deren cDNS Nukleotidaustausche (stille Mutationen) im Bereich der siRNA-Zielsequenz eingeführt wurden.

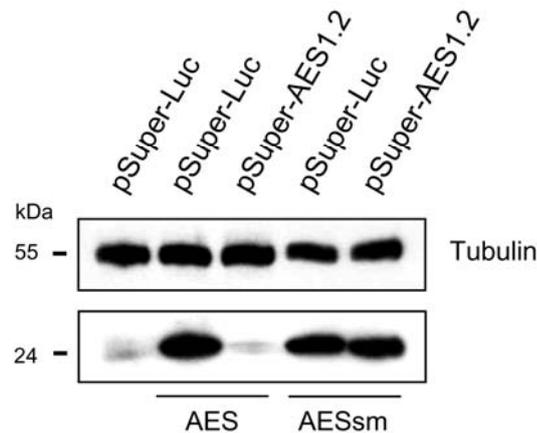


Abb. 3.4.2: Hemmung der AES-Expression durch pSuper-AES1.2. HeLa-Zellen wurden mit pSuper-AES1.2 und Expressionsplasmiden für AES oder AESsm kotransfiziert. Als Kontrolle diente die Transfektion von pSuper-Luc mit dem Leervektor (Spur1). Die Proteindetektion erfolgte über den Flag-Tag der AES-Proteine. Der Nachweis von Tubulin diente als Ladekontrolle. AES: Wildtyp-AES; AESsm: mutiertes AES (stille Mutationen).

3.4.3.2 Hemmung der AES-Expression durch synthetische siRNA

Im Gegensatz zu vektorbasierten siRNAs sind synthetische siRNAs direkt nach ihrer Transfektion in Säugerzellen funktionell, da sie nicht erst exprimiert und prozessiert werden müssen (Hannon, 2002; McManus und Sharp, 2002; Mittal, 2004).

Die synthetisch hergestellte siRNA siAES1.2 besitzt die identische Zielsequenz wie pSuper-AES1.2. Mittels Westernblot-Analyse wurde der Effekt der synthetischen siRNA auf ektopisch und endogen exprimiertes AES analysiert. Dafür wurden HeLa-Zellen mit siAES1.2 behandelt (Analyse des Effektes auf endogenes AES) oder gleichzeitig mit einem AES-Expressionsplasmid kotransfiziert (Analyse des Effekts auf ektopisch exprimiertes AES).

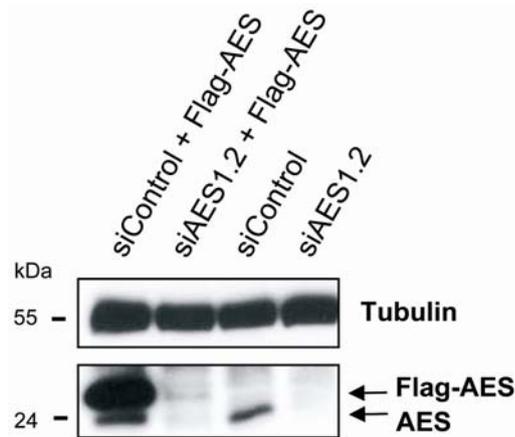


Abb. 3.4.3: Hemmung der AES-Expression durch synthetische siRNA. HeLa-Zellen wurden mit siAES1.2 und einem AES-Expressionsplasmid (Flag-AES), oder mit siAES1.2 alleine transfiziert. siControl diente als Kontroll-siRNA. Proteindetektion mittels anti-AES Antikörper.

Die Westernblot-Analyse (Abb. 3.4.3) zeigte, dass die synthetische siRNA siAES1.2 sowohl die Expression des endogenen als auch des ektopisch überexprimierten AES-Proteins hemmte.

3.4.3.3 Hemmung der AES-Expression auf RNS-Ebene

Die Hemmung der AES-Expression durch pSuper-AES1.2 und siAES1.2 wurde begleitend auf RNS-Ebene überprüft. HeLa-Zellen wurden mit pSuper-AES1.2 oder siAES1.2 transfiziert und anschließend die *aes*-Transkripte im Northernblot untersucht (Abb. 3.4.4).

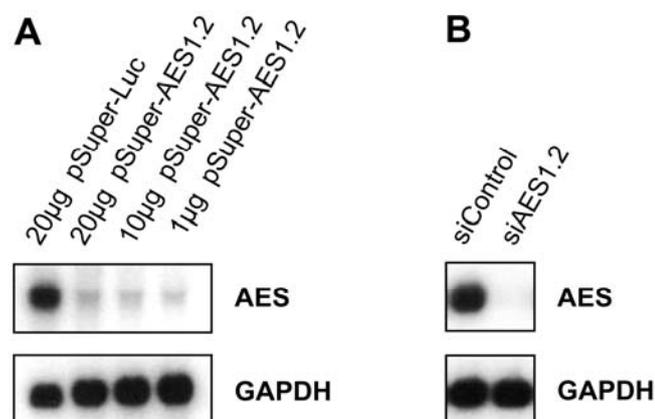


Abb. 3.4.4: Reduktion der *aes*-Transkripte durch pSuper-AES1.2 und siAES1.2. HeLa-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an pSuper-AES1.2 (A) oder siAES1.2 (B) transfiziert. Als Kontroll siRNAs wurden pSuper-Luc (A) oder siControl (B) verwendet. Die Detektion der GAPDH-mRNS diente als Ladekontrolle.

Die Northernblot-Analyse zeigte sowohl bei der Transfektion von pSuper-AES1.2 (Abb. 3.4.4, A), als auch von siAES1.2 (Abb. 3.4.4, B) eine deutliche Reduktion der *aes*-Transkripte.

Zusammenfassen konnte eine effiziente Hemmung der AES-Genexpression durch spezifische siRNAs auf Protein- und RNS-Ebene gezeigt werden.

3.4.3.4 Analyse der Apoptose-Rate nach AES-Hemmung

Um den Einfluss des AES-Proteins auf die Apoptose-Rate in HeLa-Zellen zu untersuchen, wurde die AES-Expression mit den oben beschriebenen siRNAs gehemmt und die Apoptose-Rate mit und ohne apoptotischen Stimuli in TUNEL- (3.4.3.2.1) und Westernblot-Analysen (3.4.3.2.2) untersucht.

3.4.3.4.1 Analyse der Apoptose-Rate mittels TUNEL-Assay

Zur Hemmung der endogenen AES-Expression wurden HeLa-Zellen mit pSuper-AES1.2 transfiziert. Zur Apoptose-Induktion wurden die Zellen mit dem pro-apoptischen Agens Etoposid behandelt und anschließend die Apoptose-Rate mittels TUNEL-Assay analysiert. Die Quantifizierung der apoptotischen Zellen ist in Abb. 3.4.5 dargestellt.

Der TUNEL-Assay zeigte, dass die durch Etoposid ausgelöste Apoptose bei einer gleichzeitigen Hemmung der AES-Genexpression etwa um die Hälfte reduziert wurde. Auch die spontane Apoptose-Rate der unbehandelten Kontrollzellen war bei den pSuper-AES1.2 transfizierten Zellen etwas niedriger als bei pSuper-Luc transfizierten Kontrollzellen.

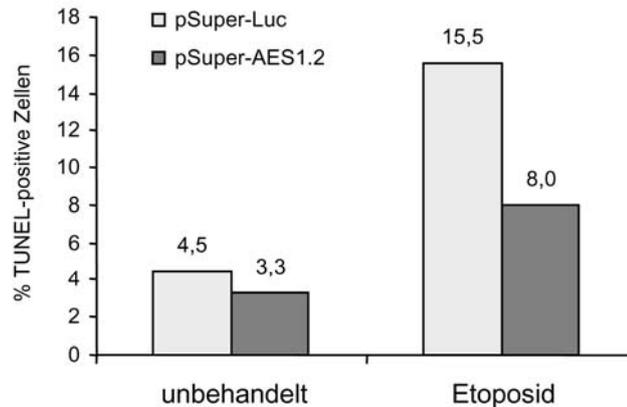


Abb. 3.4.5: Quantifizierung der apoptotischen Zellen. HeLa-Zellen wurden mit pSuper-AES1.2 transfiziert und mit Etoposid behandelt. Die Apoptose-Rate der Zellen wurde mittels TUNEL-Assay bestimmt und TUNEL-positive Zellen ausgezählt. Dargestellt sind die apoptotischen Zellen in %, als Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.4.3.4.2 Analyse der Apoptose-Rate mittels Westernblot

Während der Apoptose verändern sich die Proteinspiegel und/oder die Lokalisation von bestimmten Apoptose-assoziierten Proteinen. So gilt die Detektion von mitochondrialen pro-apoptotischen Proteinen, wie AIF ("Apoptosis-inducing factor") und Cytochrom C, in der cytosolischen Fraktion einer Proteinextraktion, als ein klares Anzeichen apoptotischer Prozesse in den Zellen (Garrido *et al.*, 2006; Modjtahedi *et al.*, 2006).

Um den Einfluss von AES auf die Regulation von AIF oder Cytochrom C nach Apoptose-Induktion zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit UV-Bestrahlung behandelt und gleichzeitig die AES-Expression durch siAES1.2 gehemmt. Dabei zeigte sich in Westernblot-Analysen (Abb. 3.4.6), dass der durch die UV-Bestrahlung induzierte Anstieg von AIF und Cytochrom C in der cytosolischen Fraktion reduziert wurde. Während die Menge an cytosolischem Cytochrom C in den Zellen ohne pro-apoptotischen Reiz unter der Nachweisgrenze lag, konnte für AIF bereits in der Abwesenheit zusätzlicher pro-apoptotischer Reize eine Reduktion beobachtet werden.

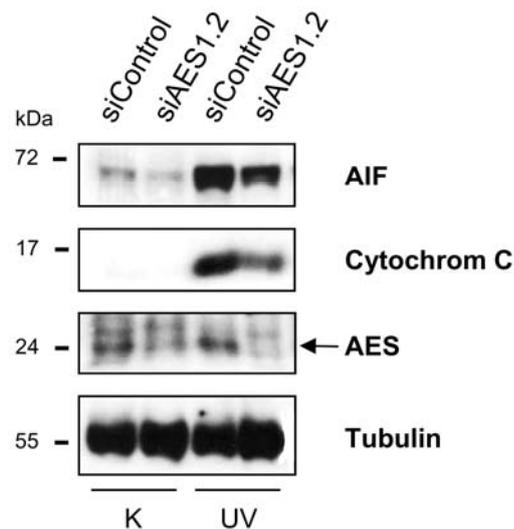


Abb. 3.4.6: Eine Hemmung der AES-Expression unter apoptotischem Stress reduziert die Konzentration von cytosolischem AIF und Cytochrom C. Westernblot-Analyse nach UV-Bestrahlung und Hemmung der AES-Expression in HeLa-Zellen. K: Kontrollzellen ohne UV-Bestrahlung. UV: UV-bestrahlte Zellen.

Zusammengefaßt wiesen diese Befunde darauf hin, dass eine Hemmung der AES-Expression anti-apoptotische Effekte aufweist und AES somit als pro-apoptotischer Faktor wirken kann.

3.5 Funktionelle Analyse der Livin β -AES-Interaktion

In den folgenden Experimenten wurde der funktionelle Zusammenhang zwischen den Interaktionspartnern Livin β und AES näher untersucht.

3.5.1 Koexpression von AES und Livin

Um einen möglichen Einfluss von Livin β auf die AES-Protein-Spiegel zu analysieren wurden zunächst beide Proteine in HeLa-Zellen koexprimiert. Mittels Westernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass steigenden Mengen eines Livin β -Expressionsplasmids zu einer Reduktion der AES-Protein-Spiegel führte (Abb. 3.5.1).

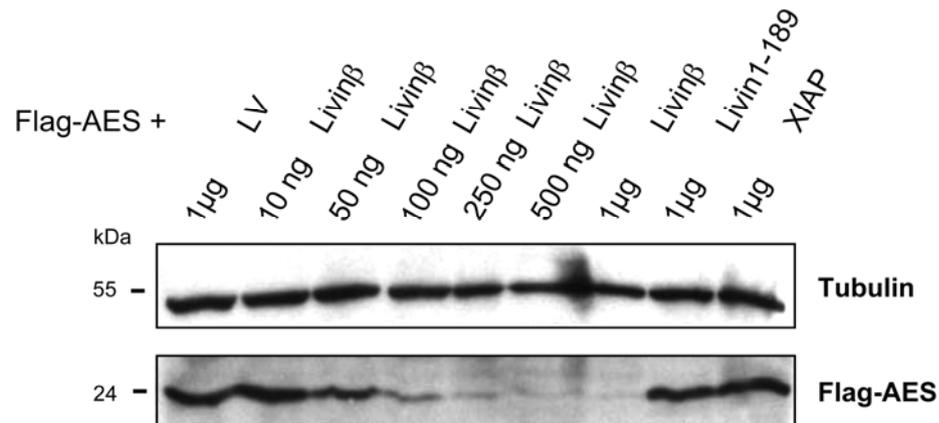


Abb. 3.5.1: Reduktion der AES-Konzentration durch Livin β . Steigende Mengen an Livin β wurden mit Flag-AES in HeLa-Zellen koexprimiert, das mit einem anti-Flag Antikörper detektiert wurde. Zusätzlich wurde Flag-AES mit der Mutante Livin1-189 und dem Kontrollprotein XIAP exprimiert. Tubulin: Ladekontrolle. LV: Leervektor.

Im Gegensatz dazu führte die Koexpression von Livin1-189 nicht zu einer Reduktion des AES-Protein-Levels. Diese Deletionsmutante enthält die BIR-Domäne, an die AES bindet, aber keine RING-Domäne und somit keine Ubiquitin-Ligase-Aktivität. Die Expressionen von Livin β , der Mutante Livin1-189 und XIAP wurden in einer weiteren Westernblot-Analyse kontrolliert und bestätigt.

Der gleiche Versuch wurde mit dem AES-verwandten TLE2-Protein durchgeführt. Dabei wurde TLE2 mit steigenden Mengen Livin β koexprimiert. Es konnte keine Reduktion des TLE2-Proteins bei gleichzeitiger Koexpression von Livin β festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten weisen darauf hin, dass hohe Mengen an Livin β zu einer Reduktion der AES-Mengen führen kann, und dass diese Aktivität vom Vorhandensein der RING-Domäne abhängt.

3.5.2 Regulation von endogenem AES nach Livin-Hemmung

Aufgrund der beobachteten Abnahme der AES-Proteinkonzentrationen bei Koexpression von Livin β stellte sich die Frage, ob es umgekehrt bei einer Inhibierung der Livin-Genexpression zu einem Anstieg der endogenen *aes*-Transkripte oder der AES-Proteine kommt.

3.5.2.1 AES-Transkript-Spiegel nach Livin-Hemmung

Um einen möglichen Effekt des Livin-Proteins auf die *aes*-Transkripte zu analysieren, wurde die Livin-Genexpression durch eine Livin-spezifische siRNA (siLivin-2) in HeLa-Zellen gehemmt. Diese siRNA inhibiert die Genexpression beider Isoformen von Livin. Die Menge der *aes*-Transkripte wurde anschließend mittels Northernblot analysiert (Abb. 3.5.2).

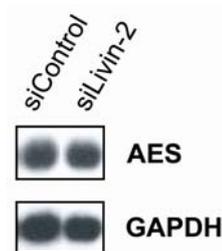


Abb. 3.5.2: Keine Änderung der AES-Transkriptmengen nach Livin-Hemmung. Northernblot-Analyse von HeLa-Zellen, die mit der synthetischen siRNA siLivin-2 oder Kontroll-siRNA siControl transfiziert wurden. GAPDH: Ladekontrolle.

In den Experimenten konnte kein Hinweis gewonnen werden, dass sich die AES-Transkript-Spiegel bei gleichzeitiger Inhibierung der endogenen Livin-Genexpression verändern.

3.5.2.2 AES-Protein-Spiegel nach Livin-Hemmung

Analoge Experimente wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich die endogenen AES-Protein-Spiegel bei gleichzeitiger Livin-Hemmung verändern. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit synthetischer siLivin-2 transfiziert und die AES-Proteinspiegel mittels Westernblot analysiert (Abb. 3.5.3).

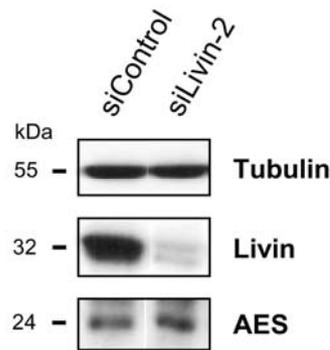


Abb. 3.5.3: Keine Änderung der AES-Protein-Spiegel nach Livin-Hemmung. HeLa-Zellen wurden mit siLivin-2 und siControl (Negativkontrolle) transfiziert und AES im Westernblot detektiert. Livin: Kontrolle der Livin-Hemmung durch die siRNA..

In der Westernblot-Analyse änderte sich der AES-Protein-Spiegel bei gleichzeitiger Hemmung der Livin-Genexpression nicht.

Die nach einer Hemmung der Livin-Genexpression zu beobachtende Sensibilisierung gegenüber Apoptose ist am deutlichsten in Gegenwart pro-apoptotischer Stimuli nachweisbar (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2003). Jedoch wurden auch - nach Applikation der siRNA gegen Livin - keine Änderungen der endogenen AES-Protein-Spiegel unter UV-Bestrahlung beobachtet (Daten nicht gezeigt).

3.5.2.3 AES- und Livin-Status in verschiedenen Zelllinien

Als nächstes wurde die Frage untersucht, ob es möglicherweise eine Korrelation zwischen den endogenen Livin- und AES-Mengen in Zelllinien gibt.

In Westernblot-Analysen (Abb. 3.5.4) konnte das AES-Protein in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden, wobei sich die absoluten Mengen zwischen einzelnen Zelllinien deutlich unterschieden. Eine schwache Proteinbande zeigten die Zelllinien H1299, SK-MEL-25 und PC-3. Sehr stark exprimiert wurde AES in den Zelllinien MeWo, Jurkat, SW480 und 293T.

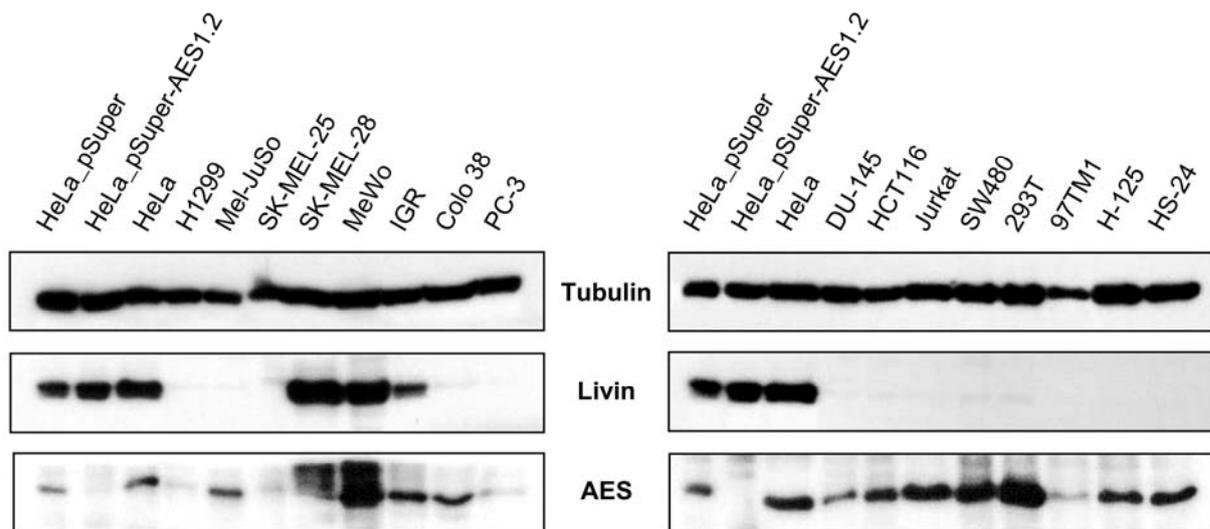


Abb. 3.5.4: AES- und Livin-Proteine in verschiedenen Zelllinien. Zur Identifizierung der AES-Bande wurden HeLa-Zellen mit Super-AES1.2 (HeLa_pSuper-AES1.2) und pSuper (HeLa_pSuper) transfiziert.

Eine Expression von Livin konnte auf Proteinebene nur in der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa und in den Melanom-Zelllinien SK-MEL-28, MeWo und IGR nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte somit keine offensichtliche Korrelation zwischen der endogenen AES- und Livin-Expression nachgewiesen werden.

3.5.3 AES und Livin β bei der TCF-abhängigen Transkription

Die Mehrzahl der Kolonkarzinom-Zelllinien weist sich typischerweise durch einen deregulierten und dadurch konstitutiv aktiven Wnt-Signalweg aus. Die Aktivierung dieses Signalweges führt zur Stabilisierung und Akkumulation von β -Catenin, welches daraufhin an TCF-Faktoren binden kann. Der TCF/ β -Catenin-Komplex aktiviert die Transkription TCF-abhängiger Zielgene (Korinek *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1997).

In Abwesenheit von β -Catenin binden die "langen" Gro/TLE-Proteine an die TCF-Faktoren und fungieren auf diese Weise als Repressoren der TCF-abhängigen Transkription. Im Gegensatz dazu, führt die Interaktion zwischen dem "kurzen" AES-

Protein und TCF zur Aktivierung der TCF-vermittelten Transkription (Roose *et al.*, 1998; Brantjes *et al.*, 2001).

Um einen möglichen Einfluss von Livin β auf die Funktion von AES im Rahmen der TCF-abhängigen Transkription zu untersuchen, wurden transiente Reporter-Gen-Analysen durchgeführt. Dabei wurde die Aktivierung eines TCF-abhängigen Reportergens unter dem Einfluss von AES oder der AES-Mutante AESL35F (3.5.3.1) untersucht, die jeweils ohne und mit Livin β exprimiert wurden (3.5.3.2).

3.5.3.1 AES-Mutante AESL35F

In der Mutante AESL35F ist die für die Livin-Bindung kritische Aminosäure Leucin an Position 35 durch Phenylalanin ersetzt worden (Abb. 3.5.5). In Kapitel 3.3.1 wurde bereits gezeigt, dass die AES-Q-Domäne mit diesem Aminosäureaustausch (AES-Q-L35F) nicht mehr an Livin β binden kann.

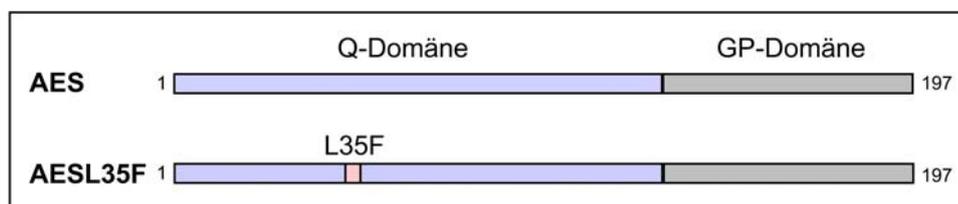


Abb. 3.5.5: Schematische Übersicht über das AES-Protein und die AES-Mutante AESL35F. Q-Domäne (hellblau): Aminosäure 1-130. GP-Domäne (grau): Aminosäure 131-197. L35F (rot): Leucin an Position 35 im AES-Protein wurde durch Phenylalanin ersetzt.

Zur Kontrolle der Expression von AES und AESL35F wurden Westernblot-Analysen durchgeführt (Abb. 3.5.6). Dabei zeigte sich, dass das Wildtyp-AES-Protein und die Mutante AESL35F in vergleichbaren Mengen exprimiert wird.

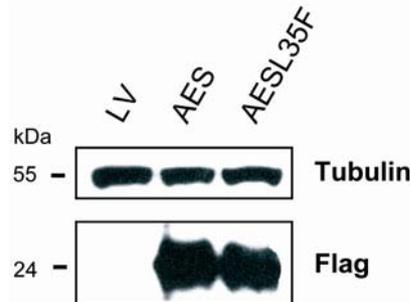


Abb. 3.5.6: Expression von AES und AESL35F. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für AES, AESL35F oder mit dem Leervektor (LV) transfiziert. Die Proteindetektion erfolgte über den Flag-Tag der AES-Proteine.

3.5.3.2 Reportergergen-Analysen zur TCF-abhängigen Transkription

Für transiente Reportergergen-Analysen wurde ein Reporterkonstrukt verwendet, das drei Kopien der TCF-DNS-Bindungsstelle in seinem Promotor besitzt und ein Luciferase-Reportergergen enthält. Die Reportergergen-Analysen wurden in der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 durchgeführt. Diese Zelllinie besitzt eine Mutation im β -*catenin*-Gen die zur Folge hat, dass β -Catenin im Cytoplasma nicht mehr abgebaut werden kann. Das führt zu einer konstitutiven Aktivierung der TCF-vermittelte Transkription (Morin *et al.*, 1997).

HCT116-Zellen wurden mit dem Reportergergenplasmid und Expressionsplasmiden für AES oder AESL35F transfiziert. Zudem wurde ein Expressionsplasmid für Livin β kotransfiziert (Abb. 3.5.7).

Dabei zeigte sich, dass überexprimiertes AES nur in Anwesenheit von koexprimiertem Livin β zu einer 2-fachen Steigerung der Reportergergen-Transkription führt. In der Analyse mit überexprimiertem AESL35F konnte diese Erhöhung nicht detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass Livin die transaktivierende Funktion von AES verstärken kann und dieser Effekt abhängig von einer direkten Interaktion zwischen AES und Livin ist.

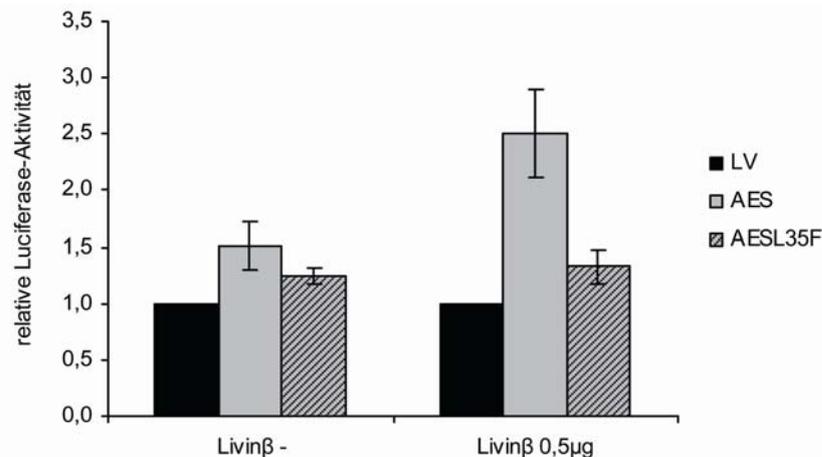


Abb. 3.5.7: Aktivierung der TCF-abhängigen Transkription durch Koexpression von Livin β und AES. HCT116-Zellen wurden mit einem TCF-Reporterkonstrukt und Expressionsplasmiden für AES oder AESL35F kotransfiziert. Rechte Seite: Zusätzlich wurde ein Expressionsplasmid für Livin β (Livin β 0,5 μ g) eingebracht. Dargestellt sind die relativen Luciferase-Werte nach β -Galaktosidase-Abgleich. Hierfür wurde die Aktivität des TCF-Reporterkonstrukts nach Ko-Transfektion mit dem LV als 1 gesetzt (schwarz). Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

In weiteren Kontrollexperimenten änderte sich die relative Luciferase-Aktivität nicht, wenn Livin β ohne AES oder AESL35F exprimiert wurde. Dadurch kann ein Einfluss auf die TCF-vermittelte Transkription durch Livin β *per se* ausgeschlossen werden. Auch eine Immunfluoreszenz-Analyse der überexprimierten Proteine AES und AESL35F zeigte, dass beide Proteine sowohl im Kern, als auch im Cytoplasma lokalisiert waren (Daten nicht gezeigt). Eine unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der Proteine konnte somit als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Effekte von AES und AESL35F ebenfalls ausgeschlossen werden.

3.5.4 Einfluss von AES auf die Livin β -Smac-Bindung

Da für die anti-apoptotische Funktion von Livin dessen Interaktion mit Smac eine wesentliche Rolle spielt, wurde im folgenden Abschnitt das Potenzial von AES getestet, mit der Bindung zwischen Livin β und Smac zu interferieren. Es wurden intrazelluläre Interaktionsstudien zwischen Livin β und Smac mittels CheckMate-Bindungsassays durchgeführt. Dabei wurde die Livin β -Smac-Bindung bei gleichzeitiger Koexpression von AES oder AESL35F getestet.

Die CheckMate-Vektoren pBind-Livin β und pAct-X-Smac wurden alleine oder zusammen mit den Expressionsplasmiden für AES oder AESL35F kotransfiziert. Der anschließende Luciferase-Assay zur Ermittlung der relativen Luciferase-Aktivitäten ist in Abbildung 3.5.8 dargestellt.

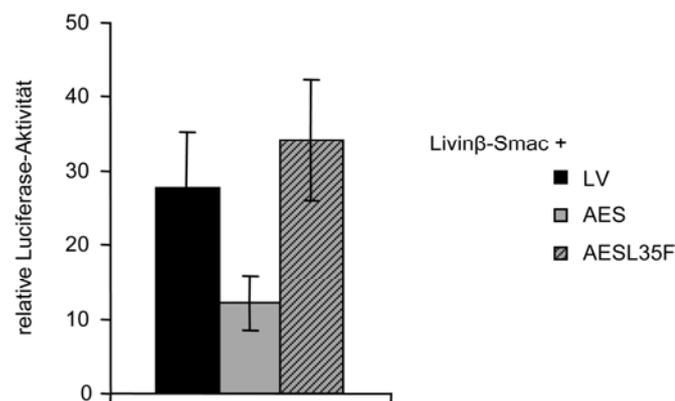


Abb. 3.5.8: AES hemmt die Livin β -Smac-Interaktion im CheckMate-Bindungsassay. HeLa-Zellen wurden mit pBind-Livin β und pAct-X-Smac kotransfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Expressionsvektoren für AES (hellgrau) oder AESL35F (gestrichelt) kotransfiziert. Dargestellt sind die relativen Luciferase-Werte nach β -Galaktosidase-Abgleich. Der Luciferase-Wert, der sich aus der Kombination pBind-Livin β und pAct ergab wurde dabei als 1 gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. LV: Leervektor

Im CheckMate-Bindungsassay führte koexprimiertes AES zu einer 57%-igen Hemmung der Livin β -Smac-Interaktion. Dagegen zeigte die Koexpression von AESL35F keine Reduktion der Livin β -Smac-Bindung. Weitere Kontrollversuche ergaben keinen Hinweis auf eine Interaktion zwischen AES und Smac (Daten nicht gezeigt).

Zusammengenommen ergeben diese Untersuchungen Anhalt dafür, dass AES mit der Interaktion zwischen Livin und Smac interferieren kann und dies von der Fähigkeit des AES-Proteins abhängt, an Livin zu binden.

4. Diskussion

Livin könnte zukünftig zu einem interessanten molekularen Target in der Tumorthherapie werden. Hierfür spricht, dass es in Tumorzellen anti-apoptotisch wirkt und zur Resistenz von Tumorzellen gegenüber Apoptose beiträgt. So wurden Livin-exprimierende Lungenkarzinom-, Nierenzellkarzinom- und Zervixkarzinomzellen gegenüber der pro-apoptotischen Wirkung von Chemotherapeutika resensibilisiert, wenn gleichzeitig die endogene Livin-Expression gezielt gehemmt wurde (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2003; Crnkovic-Mertens *et al.*, 2006b; Crnkovic-Mertens *et al.*, 2007). Bemerkenswerterweise handelt es sich dabei um Tumorformen, die häufig eine sehr hohe Resistenz gegenüber Chemotherapie aufweisen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Therapiestrategien entwickelt werden könnten, in denen eine Hemmung der Livin-Expression als adjuvante Therapie mit konventionellen Chemo- und Radiotherapeutika kombiniert wird (Chang und Schimmer, 2007; Liu *et al.*, 2007). Gegenwärtig wird daran gearbeitet, siRNAs oder auch niedermolekulare Inhibitoren des Livin-Proteins in eine solche Anwendungsperspektive weiterzuentwickeln (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2003; Franklin *et al.*, 2003).

Das besondere Expressionsmuster von Livin könnte außerdem für einen gezielten, oder zumindest präferentiellen Angriff auf Tumorzellen ermöglichen. So wird Livin in einer Vielzahl von Tumoren exprimiert, die neben malignen Melanomen auch Leukämien (Choi *et al.*, 2007), Nierenzellkarzinome (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2007), Bronchialkarzinome (Hariu *et al.*, 2005), Blasenkarzinome (Gazzaniga *et al.*, 2003), Neuroblastome (Kim *et al.*, 2005), Mesotheliome (Gordon *et al.*, 2007), Nasopharynxkarzinome (Xiang *et al.*, 2006) und Pankreaskarzinome (Lopes *et al.*, 2007) einschließen. Wurde bei den o.g. Untersuchungen das entsprechende

Normalgewebe untersucht, so ergab sich häufig das Bild, dass Livin zwar in den Tumoren, nicht aber im Normalgewebe exprimiert wurde. Dies deutet die Möglichkeit an, dass die gezielte Hemmung von Livin als eine präferentiell gegen Tumore gerichtete Therapiestrategie dienen könnte (Chang und Schimmer, 2007; Liu *et al.*, 2007).

Vor diesem Hintergrund war es wichtig, neue Einblicke in die molekularen Wirkmechanismen des Livin-Proteins in Tumorzellen zu erlangen. In den vorliegenden Untersuchungen wurde deshalb mittels des Y2H-Verfahrens nach neuen Interaktionspartnern von Livin β gesucht.

Zu den intrinsischen Problemen der Y2H-Technologie gehört das Auftreten falsch-positiver Signale (Serebriiskii *et al.*, 2000). Um sie möglichst gering zu halten, wurde ein modifiziertes Y2H-Verfahren eingesetzt, das gegenüber kommerziell erhältlichen Y2H-Systemen eine Reihe von Vorteilen aufweist. So wurde der Hefestamm KF1 verwendet (Butz *et al.*, 2000), der sich als Derivat des Hefestamms PJ69-4A (James *et al.*, 1996) durch eine ausgesprochen hohe genetische Stabilität auszeichnet. Ein weiterer Vorteil des KF1-Stammes ist, dass er drei unterschiedlich sensitive Reportergene besitzt (Hoppe-Seyler *et al.*, 2004). Dabei wird der *URA3*-Marker erst durch sehr starke Protein-Protein-Interaktionen aktiviert, so dass bereits frühzeitig erste Hinweise auf die Stärke der gefundenen Protein-Protein-Interaktionen unter intrazellulären Konditionen gewonnen werden können. Auch die Verwendung von "low-copy"-Vektoren, um die Menge der ektopisch exprimierten Proteine niedrig zu halten, trägt zur Verminderung von falsch-positiven Ergebnissen bei, da hohe Proteinkonzentrationen zu unspezifischen Interaktionen im Y2H-System führen können (Hoppe-Seyler *et al.*, 2004).

Unter den potentiellen Livin β -Interaktionspartnern, die im Y2H-Screen isoliert wurden, konzentrierten sich die Arbeiten im weiteren Verlauf auf das AES-Protein. Dies lag einerseits darin begründet, dass AES als pro-apoptotisches Protein (Jan *et al.*, 2004) beschrieben wurde und daher möglicherweise auch an der Apoptose-Regulation durch Livin beteiligt sein könnte. Andererseits ist AES ein Regulator der Wnt-Signalkaskade, die eine wesentliche Rolle für die Kontrolle der Zellproliferation spielt (Brantjes *et al.*, 2001). In diesem Kontext ist es wichtig zu erwähnen, dass eine

gezielte Hemmung von Livin - auch in der Abwesenheit pro-apoptotischer Stimuli - zu einer Hemmung der Zellproliferation in Kolonie-Bildungs-Assays führte (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2003).

Bindungsanalysen zur Livin-AES-Interaktion zeigten, dass die Bindung hochspezifisch ist. So bindet AES selektiv an Livin α und Livin β , nicht aber an heterologe Kontrollproteine oder sequenz- und strukturverwandte IAP-Proteine. Umgekehrt bindet Livin β nur an AES und nicht an das TLE2-Protein, das starke Homologien zu AES aufweist.

Wie auch andere AES-bindende Proteine (Ren *et al.*, 1999; Brantjes *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002), bindet Livin β an die Q-Domäne von AES. Dabei konnte die kritische Bindungsregion auf eine einzige Aminosäure (Leucin an Position 35 im AES-Protein) eingengt werden. Durch den Transfer dieser Aminosäure von der AES-Q-Domäne an die entsprechende Stelle in der TLE2-Q-Domäne, wird auch die Fähigkeit übertragen an Livin β zu binden. Obwohl hier nur das TLE2-Protein untersucht wurde, scheint eine Bindung von Livin β an die anderen drei bekannten TLE-Proteine unwahrscheinlich. So zeigte ein Vergleich der homologen TLE-Protein-Sequenzen, dass die für die Bindung zwischen AES und Livin β kritische Aminosäure nur im AES-Protein, nicht aber in den anderen TLE-Proteinen vorkommt. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Fähigkeit verschiedener Gro/TLE-Proteine mit Livin β zu interagieren von der Identität einer einzigen Aminosäure in der Q-Domäne abhängt. Ob diese Aminosäure direkt mit Livin β in Kontakt tritt, ist noch ungeklärt. Denkbar wäre zum Beispiel auch eine Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur von AES, die für die Bindung an Livin β notwendig ist.

Neben der Fähigkeit Fremdproteine zu binden spielt die Q-Domäne auch für die Dimerisierung und Tetramerisierung (Pinto und Lobe, 1996; Chen *et al.*, 1998) der Gro/TLE-Proteine untereinander eine Rolle. Diese Interaktionen werden durch Leucin-Zipper ähnliche Strukturen innerhalb der Q-Domäne vermittelt (Chen *et al.*, 1998). Die für die Livin β -Bindung kritische Aminosäure befindet sich innerhalb des ersten Leucin-Zipper-ähnlichen Motivs, das sich zwischen Aminosäure 25 und 69 erstreckt (Ren *et al.*, 1999). Ob es durch die Bindung von Livin β an die AES-Q-Domäne zur Störung der Oligomerisierung kommt, wäre eine interessante

Fragestellung für weiterführende Bindungsstudien. Zumal für das AES-verwandte *Drosophila* Gro-Protein gezeigt wurde, dass die Tetramerisierung als Voraussetzung für dessen transkriptionelle Repressor-Funktion ist (Chen *et al.*, 1998).

Interessanterweise besitzt AES kein so genanntes IAP-Bindungsmotiv (IBM), ein konserviertes Tetrapeptid in IAP-bindenden Proteinen, welches erst durch proteolytische Prozessierung zugänglich wird (Shi, 2002). Es ist in den bisher bekannten IAP-Bindungsproteinen wie Smac und den Caspasen-3, -7 und -9 enthalten (Riedl *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2005). AES stellt damit das erste Livin-bindende Protein ohne IBM-Motiv dar. Auf der Seite von Livin zeigen die in der Arbeit vorgenommenen Deletionsanalysen, dass der Aminosäurebereich 80-189 von Livin für die Bindung an AES notwendig ist. Diese Region enthält die BIR-Domäne und eine 35 Aminosäure lange flankierenden Sequenz, die C-terminal anschließt. Die BIR-Domäne vermittelt auch die Bindung der Caspasen-3, -7, -9 und von Smac an Livin (Kasof und Gomes, 2001; Vucic *et al.*, 2002), so dass es theoretisch denkbar ist, dass AES die Interaktion von Livin mit diesen anderen Proteinen blockieren kann. In der Tat konnte Anhalt dafür erhalten werden, dass koexprimiertes AES-Protein mit der Interaktion zwischen Livin β und Smac interferieren kann. Dadurch könnte AES einen Einfluss auf die Apoptose-Regulation ausüben.

In einer Studie, die AES als pro-apoptotisches Protein beschreibt (Jan *et al.*, 2004), wirkt AES pro-apoptotisch, indem es mit dem zellulären Bit1-Protein interagiert. Bit1 ist ein mitochondriales Protein, das nach apoptotischen Stimuli ins Cytoplasma entlassen wird. Zudem wurde in Reportergen-Analysen eine Reprimierung der *bcl-2*-Promotor-Aktivität durch überexprimiertes AES beschrieben (Jan *et al.*, 2004). Eine verminderte Expression des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins wäre eine mögliche Erklärung für die pro-apoptotische Aktivität von AES. In den vorliegenden Studien konnte die beschriebene Interaktion zwischen AES und Bit1 jedoch nicht verifiziert werden, obwohl sie unter ähnlichen Bedingungen im Y2H-Verfahren untersucht wurde. Anders als in der Arbeit von Jan *et al.* ließ sich auch durch ektopische Expression der cytosolischen Form von Bit1 (cyto-Bit1) keine Apoptose auslösen. Des Weiteren wurde der Einfluss von überexprimiertem AES-Protein auf den Promotor des *bcl-2*-Gens getestet. Hier konnte ebenfalls nicht bestätigt werden, dass AES den *bcl-2*-Promotor reprimieren kann. Insgesamt konnte kein Hinweis gefunden

werden, dass AES die Transkription Apoptose-assoziiierter Gene moduliert. So ergaben auch Microarray-Analysen keinen weiteren Hinweis darauf, dass das AES-Protein die Transkriptmengen einer Auswahl Apoptose-assoziiierter Gene signifikant verändert (persönliche Mitteilung, Dr. M. Vogt).

Dennoch zeigte auch die vorliegende Arbeit, dass AES pro-apoptotisch wirken kann. So resultierte die gezielte Hemmung der AES-Genexpression mittels siRNA in HeLa Zellen in einer anti-apoptotischen Wirkung. Dieser Effekt war am stärksten nach einer gleichzeitigen Behandlung der Zellen mit DNS-schädigenden Agenzien (z. B. Etoposid oder UV-Bestrahlung). Dies erinnert an die Effekte einer gezielten Hemmung der Livin-Expression, welche die Spontanapoptose nur gering steigerte, aber nach Behandlung mit pro-apoptotischen Agenzien Tumorzellen deutlich pro-apoptotisch sensibilisierte (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2003; Crnkovic-Mertens *et al.*, 2006b; Crnkovic-Mertens *et al.*, 2007).

Auf der biochemischen Ebene konnte beobachtet werden, dass eine Hemmung der AES-Expression - in Gegenwart pro-apoptotischer Stimuli - zu einer Reduktion der Konzentration der Apoptose-assoziierten Faktoren AIF und Cytochrom C im Cytoplasma führte. Dies steht im Einklang mit den Befunden, dass AES pro-apoptotisch wirkt. Ein möglicher Mechanismus, der dieser Aktivität von AES zugrunde liegt, könnte auf der in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtung beruhen, dass AES in der Lage ist, mit der Livin β -Smac-Interaktion zu interferieren.

Smac ist ein mitochondriales Protein (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000), das nach verschiedenen apoptotischen Stimuli, zusammen mit anderen Apoptose-assoziierten Proteinen, ins Cytoplasma entlassen wird (Zhou *et al.*, 2005). Es wirkt der anti-apoptotischen Funktion der IAPs entgegen, indem es mit den Caspasen um dieselbe IAP-Bindungsstelle konkurriert und diese verdrängen kann (Verhagen und Vaux, 2002). Die frei gewordenen Caspase-Moleküle können nun weitere pro-apoptotische Prozesse in Gang setzen, die schließlich zum Tod der Zelle führen (Fischer *et al.*, 2003).

Livin ist im Vergleich zu anderen IAPs ein sehr viel schwächerer Caspase-Inhibitor (Vucic *et al.*, 2005; Eckelman *et al.*, 2006). Jedoch kann Livin eine relativ starke

Bindung mit Smac eingehen (Vucic *et al.*, 2002) und dessen Abbau über den Proteasom-abhängigen Weg induzieren (Ma *et al.*, 2006). Damit ist folgendes Szenario für die pro-apoptotische Funktion von AES denkbar: (i) AES interferiert mit der Livin-Smac-Interaktion, (ii) das freigesetzte Smac kann nun ein Spektrum von anderen IAPs binden, die nun nicht mehr als starke Caspase-Inhibitoren zur Verfügung stehen, was (iii) zur Aktivierung von Caspasen und Induktion von Apoptose führt. Umgekehrt würde Livin anti-apoptotisch wirken, indem es das Smac-Protein abfängt und damit indirekt eine effiziente Hemmwirkung anderer IAPs auf Caspasen ermöglicht (Abb. 4.1.)

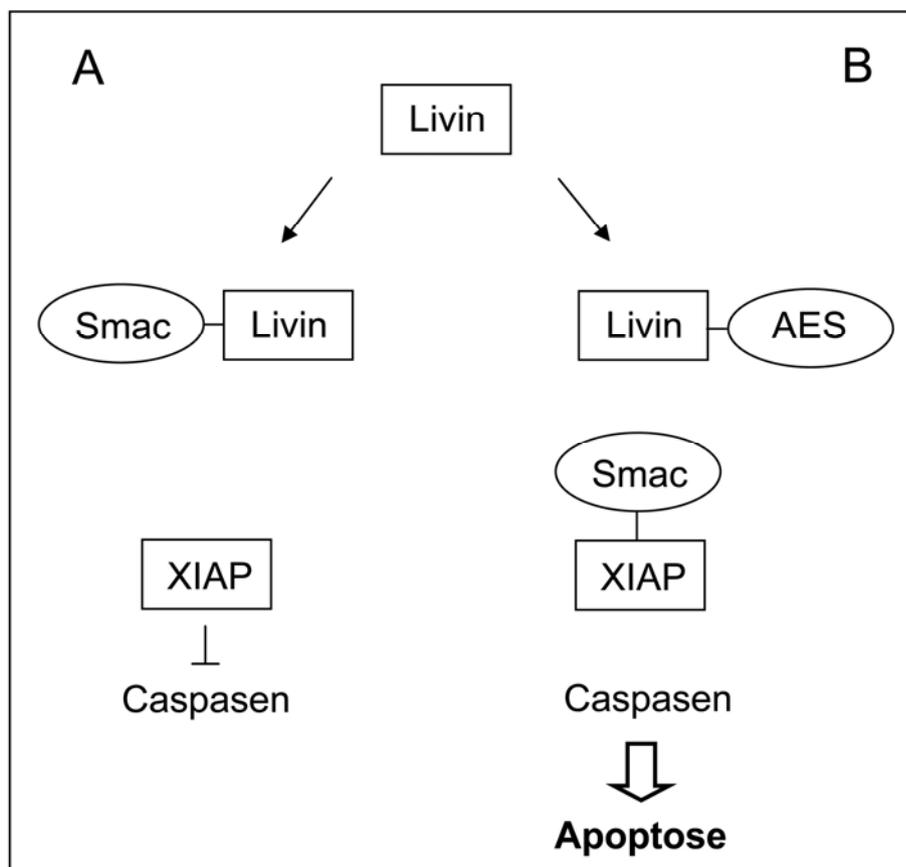


Abb. 4.1: Modell zur Apoptose-Regulation durch das Livin/Smac/AES-Netzwerk. **A:** Apoptose-Hemmung durch Livin. Livin bindet an Smac, das somit nicht an starke Caspase-Inhibitoren wie XIAP binden kann. Das freie XIAP blockiert Caspasen, wodurch Apoptose verhindert wird. **B:** Apoptose-Induktion durch AES. Die Bindung von AES and Livin setzt Smac frei, das nun starke Caspase-Hemmer, wie XIAP, blockieren kann. Caspasen werden der negativen Kontrolle durch IAPs entzogen und induzieren Apoptose.

Ein ähnlicher, Smac-assoziiertes indirekter Mechanismus, wurde bereits für die anti-apoptotische Wirkung des Baculovirus IAP-Protein Op-IAP (*Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus inhibitor of apoptosis) gezeigt. Obwohl Op-IAP als ein potenter Apoptose-Inhibitor gilt (Duckett *et al.*, 1996; Uren *et al.*, 1996; Hawkins *et*

al., 1998), ist es selbst nicht in der Lage die Aktivität von Caspasen zu inhibieren. Allerdings bindet und neutralisiert Op-IAP Smac, was für die anti-apoptotischen Eigenschaften von Op-IAP essentiell ist (Wilkinson *et al.*, 2004). Auch für die anti-apoptotische Aktivität des IAP-Proteins Survivin wurde ein indirekter, Smac-assoziiertes Mechanismus postuliert. Dabei gilt auch Survivin als schwacher Caspase-Inhibitor und das anti-apoptotische Potential von Survivin hängt von der Fähigkeit ab, Smac zu binden (Song *et al.*, 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studien ergeben somit erstmals einen Anhalt, dass AES in einem funktionellen Netzwerk mit Livin und Smac steht. Das Potential von AES mit der Livin β -Smac-Bindung zu interferieren hängt dabei direkt von der Fähigkeit des AES-Proteins ab, an Livin β zu binden. So kann eine Mutante (AESL35F), die nicht mehr an Livin β bindet, auch nicht mit der Livin β -Smac-Bindung interferieren. Weiterführende Studien sollten darauf abzielen, das Livin/AES/Smac-Netzwerk weiter im Detail zu analysieren. So wurde beobachtet, dass die Expression von prozessiertem cytoplasmatischem Smac alleine nicht ausreichte, um Apoptose auszulösen. Vielmehr wird vermutet, dass weitere Faktoren benötigt werden, damit das Smac-Protein seine pro-apoptotische Wirkung voll ausüben kann (Silke *et al.*, 2004). Auf Grund seiner pro-apoptotischen Eigenschaften und der Fähigkeit mit der Livin β -Smac-Bindung zu interferieren, wäre AES potenziell ein solcher Faktor.

Umgekehrt könnte auch die pro-apoptotische Funktion des AES-Proteins von Smac abhängen, denn in den vorliegenden Studien führten erst relativ hohe Mengen an ektopisch exprimierten AES zur Apoptose-Induktion in HeLa-Zellen. So wäre es interessant abzuklären, ob die Koexpression von AES mit Smac dazu führt, dass bereits niedrigere AES-Konzentrationen stärker apoptotisch wirken. Bei diesen Experimenten mit überexprimiertem Smac muss bedacht werden, dass unprozessierte Smac-Proteine nicht an IAPs binden können. Um die mitochondriale Prozessierung des Volllängenproteins umgehen zu können, kann ein von Hunter *et al.* entwickeltes Expressions-System verwendet werden, das auf einem Ubiquitin-fusionierten Smac basiert und gewährleistet, dass korrekt prozessiertes Smac direkt im Cytosol funktionsfähig ist (Hunter *et al.*, 2003). Eine weitere wichtige Frage wäre, ob AES den durch Livin vermittelten Abbau von Smac (Ma *et al.*, 2006) hemmen kann. Da endogenes Smac erst nach einem apoptotischen Stimulus für Livin

zugänglich wird, müssten diese Analysen unter apoptotischen Bedingungen durchgeführt werden.

Neben seiner Funktion als Apoptose-Regulator gibt es außerdem Hinweise, dass Livin auch als Proliferationsstimulus wirkt. Die gezielte Hemmung der Livin-Expression hemmt das Zellwachstum in Proliferationsassays und führt in Livin-exprimierenden Tumorzellen zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Crnkovic-Mertens *et al.*, 2003, persönliche Mitteilung C. Cullmann). Eine mögliche mechanistische Erklärung für diese Funktion von Livin könnte auf der Beobachtung beruhen, dass Livin zur Aktivierung der "Mitogen activated protein" (MAP)-Kinase JNK1 (Sanna *et al.*, 2002) führt, die wiederum die Zellproliferation steigern kann (Bode und Dong, 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit der Identifizierung von AES als Interaktionspartner von Livin eine neue Verbindung zu einem anderen Signaltransduktionsweg geschaffen werden, der an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt ist. So ist AES in der Lage, die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der TCF-Familie zu induzieren, die eine entscheidende Rolle für die Wnt-Signalkaskade spielen (Roose *et al.*, 1998; Brantjes *et al.*, 2001).

Die Aktivierung der Wnt-Signaltransduktionskaskade kann zu einem gesteigerten Zellwachstum führen. Der Regulationsweg spielt eine essentielle Rolle in der Entwicklung und während der Zellerneuerung in somatischen Stammzellen (Reya und Clevers, 2005). Er ist außerdem in vielen Tumorformen konstitutiv aktiv, z. B. in Kolonkarzinomen (häufig nach Mutation des *apc*-Tumorsuppressorgens), Melanomen, Leberkarzinomen, Ovarialkarzinomen und Prostatakarzinomen (Morin, 1999; Polakis, 2000). Letztendlich mündet die Aktivierung der Wnt-Signalkaskade in der Aktivierung von Proliferations-steigernden Genen, die beispielsweise die Zellzyklusprogression stimulieren (Morin, 1999; Brantjes *et al.*, 2002). Sie werden durch einen Komplex zwischen β -Catenin und Mitgliedern der TCF-Familie transkriptionell aktiviert.

Interessanterweise kann das AES-Protein als Aktivator der TCF-abhängigen Transkription wirken (Brantjes *et al.*, 2001). Dies geschieht vermutlich durch einen

indirekten Mechanismus, indem AES an andere „Groucho“-Proteine (TLEs) bindet, die normalerweise die TCF-abhängige Transkription hemmen. Sie sind dann nicht mehr in der Lage, die TCF-abhängige Transkription zu blockieren, was wiederum in der transkriptionellen Aktivierung von TCF-Zielgenen resultiert (Brantjes *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Koexpression von Livinß die Aktivierung der TCF-abhängigen Transkription durch AES verstärkt.

Auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinen die Beobachtungen, dass Livinß einerseits die Aktivität von AES in funktionellen Studien steigert, andererseits aber auch zur Abnahme des AES-Protein-Spiegels führen kann. Diese Reduzierung der AES-Protein-Konzentrationen durch das Livinß-Protein war jedoch nur bei sehr hohen Proteinkonzentrationen (nach ektopischer Expression) zu sehen. Unter endogenen Bedingungen ließ sich dieser Effekt nicht beobachten und die AES-Protein-Spiegel änderten sich bei einer gleichzeitigen Hemmung der Livin-Expression nicht. Die Aktivierung der AES-abhängigen Transkription durch Livinß wurde nicht mehr beobachtet, wenn die AES Mutante AESL35F eingesetzt wurde, die nicht mehr durch Livinß gebunden wird. Dies impliziert, dass eine direkte Interaktion zwischen AES und Livin für die Transkriptionssteigerung notwendig ist, jedoch kann gegenwärtig noch nicht ausgeschlossen werden, dass die AESL35F-Mutation möglicherweise auch die intrinsische Transaktivierungsfunktion von AES beeinflusst.

Im Gegensatz zu den Arbeiten von Brantjes *et al.*, wurde eine Aktivierung der TCF-abhängigen Transkription nicht nach Zugabe von AES alleine, sondern erst nach Koexpression von AES mit Livinß beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnten Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien sein, die unterschiedliche Mengen an TLE-Proteinen enthalten und damit mit unterschiedlicher Stringenz die TCF-abhängige Transkription reprimieren. So wird vermutet, dass ein sensibles Gleichgewicht zwischen reprimierenden TLE-Proteinen und aktivierenden AES-Proteinen die TCF-abhängige Transkription bestimmt (Brantjes *et al.*, 2001).

Nach den Befunden der vorliegenden Arbeit könnte Livin als Kofaktor für die Aktivierung der TCF-abhängigen Transkription wirken. Dabei bindet Livinß ausschließlich an das transaktivierende AES-Protein, nicht aber an die verwandten

TLE-Proteine, die bei der TCF-abhängigen Transkription nur als Korepressoren bekannt sind (Levanon *et al.*, 1998; Roose *et al.*, 1998; Daniels und Weis, 2005). In weiterführenden Analysen sollte auch abgeklärt werden, durch welchen Mechanismus Livin seinen Einfluss auf AES ausübt. Durch die RING-Domäne im Livin-Protein wäre beispielsweise eine Ubiquitinierung von AES durch Livin denkbar. Ubiquitinierungen führen nicht zwangsläufig zum Abbau des Zielproteins, sondern können auch dessen Funktion verändern (Hicke, 2001; Hochstrasser, 2006). So können sie auch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren modulieren (Kaiser *et al.*, 2000; Bres *et al.*, 2003; Adhikary *et al.*, 2005).

Außerdem wäre es zukünftig auch interessant zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen der Expression von Livin in Tumoren und einer Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion besteht. Dies sollte auch eine Analyse von TCF-regulierten Zielgenen beinhalten, die als Stimulatoren der Zellproliferation bekannt sind, wie beispielsweise Myc (He *et al.*, 1998) oder Cyclin D1 (Tetsu und McCormick, 1999).

Mit der Identifizierung von AES als Interaktionspartner für Livin verbinden die hier durchgeführten Arbeiten erstmals zwei zentrale Themenbereiche der molekularen Krebsforschung, nämlich die Gruppe der anti-apoptotischen IAP-Proteine mit Faktoren der Wnt-Signaltransduktion. Nach den vorliegenden Ergebnissen könnte AES ein wichtiger Kontrollschalter bei diesen Vorgängen sein. Proliferationskontrolle und Apoptose-Regulation sind in der Zelle eng verknüpft und erst die konzertierte Störung beider Prozesse ermöglicht das Auswachsen maligner Tumore. So zeichnen sich Malignome typischerweise dadurch aus, dass es während der Karzinogenese zu einer Aktivierung Wachstums-Stimulierender Onkogene kommt. Normale Zellen würden auf solche abnorme Wachstumsreize mit einer erhöhten Apoptose-Rate reagieren, was das Auswachsen deregulierter Zellen verhindert. Die gleichzeitige Aktivierung anti-apoptotischer Faktoren in den Tumorzellen kann jedoch die Apoptose-Induktion verhindern und damit das Überleben der Tumorzellen ermöglichen (Evan und Vousden, 2001). Es wird daher interessant sein, die hier identifizierte Verknüpfung zwischen Apoptose- und Wachstumsregulation auch unter diesen Gesichtspunkten weiter zu charakterisieren.

5. Literatur

- Adhikary, S., F. Marinoni, A. Hock, E. Hulleman, N. Popov, R. Beier, S. Bernard, M. Quarto, M. Capra, S. Goettig, U. Kogel, M. Scheffner, K. Helin and M. Eilers (2005). "The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation." Cell **123**(3): 409-21.
- Akyurek, N., Y. Ren, G. Z. Rassidakis, E. J. Schlette and L. J. Medeiros (2006). "Expression of inhibitor of apoptosis proteins in B-cell non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas." Cancer **107**(8): 1844-51.
- Ambrosini, G., C. Adida and D. C. Altieri (1997). "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma." Nat Med **3**(8): 917-21.
- Ashhab, Y., A. Alian, A. Polliack, A. Panet and D. Ben Yehuda (2001). "Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern." FEBS Lett **495**(1-2): 56-60.
- Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." Nat Rev Cancer **2**(6): 420-30.
- Barks, J. H., F. H. Thompson, R. Taetle, J. M. Yang, J. F. Stone, J. A. Wymer, R. Khavari, X. Y. Guan, J. M. Trent, D. Pinkel and M. A. Nelson (1997). "Increased chromosome 20 copy number detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) in malignant melanoma." Genes Chromosomes Cancer **19**(4): 278-85.
- Becker, N. (2001). "[Development of the incidence and mortality of breast cancer]." Radiologe **41**(4): 337-43.
- Becker, N. (2003). "Epidemiological aspects of cancer screening in Germany." J Cancer Res Clin Oncol **129**(12): 691-702.
- Becker, N., H. P. Altenburg, C. Stegmaier and H. Ziegler (2007). "Report on trends of incidence (1970-2002) of and mortality (1952-2002) from cancer in Germany." J Cancer Res Clin Oncol **133**(1): 23-35.
- Becker, N. and J. Wahrendorf (1997). "Atlas of cancer mortality in the Federal Republic of Germany (1981-1990)." 3rd end. Springer, Berlin Heidelberg: (Wird jährlich online aktualisiert).
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Bockbrader, K. M., M. Tan and Y. Sun (2005). "A small molecule Smac-mimic compound induces apoptosis and sensitizes TRAIL- and etoposide-induced apoptosis in breast cancer cells." Oncogene **24**(49): 7381-8.

- Bode, A. M. and Z. Dong (2007). "The functional contrariety of JNK." Mol Carcinog.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brantjes, H., N. Barker, J. van Es and H. Clevers (2002). "TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling." Biol Chem **383**(2): 255-61.
- Brantjes, H., J. Roose, M. van De Wetering and H. Clevers (2001). "All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors." Nucleic Acids Res **29**(7): 1410-9.
- Brasier, A. R., J. E. Tate and J. F. Habener (1989). "Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines." Biotechniques **7**(10): 1116-22.
- Bres, V., R. E. Kiernan, L. K. Linares, C. Chable-Bessia, O. Plechakova, C. Treand, S. Emiliani, J. M. Peloponese, K. T. Jeang, O. Coux, M. Scheffner and M. Benkirane (2003). "A non-proteolytic role for ubiquitin in Tat-mediated transactivation of the HIV-1 promoter." Nat Cell Biol **5**(8): 754-61.
- Brummelkamp, T. R., R. Bernards and R. Agami (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." Science **296**(5567): 550-3.
- Butz, K., C. Denk, A. Ullmann, M. Scheffner and F. Hoppe-Seyler (2000). "Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6693-7.
- Butz, K. and F. Hoppe-Seyler (1993). "Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region." J Virol **67**(11): 6476-86.
- Butz, K., T. Ristriani, A. Hengstermann, C. Denk, M. Scheffner and F. Hoppe-Seyler (2003). "siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells." Oncogene **22**(38): 5938-45.
- Byun, S. S., W. G. Yeo, S. E. Lee and E. Lee (2007). "Expression of survivin in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome." Urology **69**(1): 34-7.
- Chang, H. and A. D. Schimmer (2007). "Livin/melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy." Mol Cancer Ther **6**(1): 24-30.
- Chen, C. and H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." Mol Cell Biol **7**(8): 2745-52.
- Chen, G. and A. J. Courey (2000). "Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression." Gene **249**(1-2): 1-16.

- Chen, G., P. H. Nguyen and A. J. Courey (1998). "A role for Groucho tetramerization in transcriptional repression." Mol Cell Biol **18**(12): 7259-68.
- Chen, Y., D. L. Kramer, F. Li and C. W. Porter (2003). "Loss of inhibitor of apoptosis proteins as a determinant of polyamine analog-induced apoptosis in human melanoma cells." Oncogene **22**(32): 4964-72.
- Chevray, P. M. and D. Nathans (1992). "Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 5789-93.
- Chien, C. T., P. L. Bartel, R. Sternglanz and S. Fields (1991). "The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9578-82.
- Choi, J., Y. K. Hwang, K. W. Sung, S. H. Lee, K. H. Yoo, H. L. Jung, H. H. Koo, H. J. Kim, H. J. Kang, H. Y. Shin and H. S. Ahn (2007). "Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia." Blood **109**(2): 471-7.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Chu, Z. L., T. A. McKinsey, L. Liu, J. J. Gentry, M. H. Malim and D. W. Ballard (1997). "Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10057-62.
- Clem, R. J., T. T. Sheu, B. W. Richter, W. W. He, N. A. Thornberry, C. S. Duckett and J. M. Hardwick (2001). "c-IAP1 is cleaved by caspases to produce a proapoptotic C-terminal fragment." J Biol Chem **276**(10): 7602-8.
- Coates, P. J. and P. A. Hall (2003). "The yeast two-hybrid system for identifying protein-protein interactions." J Pathol **199**(1): 4-7.
- Crnkovic-Mertens, I., F. Hoppe-Seyler and K. Butz (2003). "Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene." Oncogene **22**(51): 8330-6.
- Crnkovic-Mertens, I., T. Muley, M. Meister, B. Hartenstein, J. Semzow, K. Butz and F. Hoppe-Seyler (2006b). "The anti-apoptotic livin gene is an important determinant for the apoptotic resistance of non-small cell lung cancer cells." Lung Cancer **54**(2): 135-42.
- Crnkovic-Mertens, I., J. Semzow, F. Hoppe-Seyler and K. Butz (2006a). "Isoform-specific silencing of the Livin gene by RNA interference defines Livin beta as key mediator of apoptosis inhibition in HeLa cells." J Mol Med **84**(3): 232-40.

- Crnkovic-Mertens, I., N. Wagener, J. Semzow, E. F. Grone, A. Haferkamp, M. Hohenfellner, K. Butz and F. Hoppe-Seyler (2007). "Targeted inhibition of Livin resensitizes renal cancer cells towards apoptosis." Cell Mol Life Sci.
- Crook, N. E., R. J. Clem and L. K. Miller (1993). "An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif." J Virol **67**(4): 2168-74.
- Daniels, D. L. and W. I. Weis (2005). "Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation." Nat Struct Mol Biol **12**(4): 364-71.
- de Graaf, A. O., T. de Witte and J. H. Jansen (2004). "Inhibitor of apoptosis proteins: new therapeutic targets in hematological cancer?" Leukemia **18**(11): 1751-9.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, M. DeLuca, D. R. Helinski and S. Subramani (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." Mol Cell Biol **7**(2): 725-37.
- Debatin, K. M. (2004). "Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy." Cancer Immunol Immunother **53**(3): 153-9.
- Deveraux, Q. L., E. Leo, H. R. Stennicke, K. Welsh, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1999). "Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases." Embo J **18**(19): 5242-51.
- Deveraux, Q. L., N. Roy, H. R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1998). "IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases." Embo J **17**(8): 2215-23.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
- Duckett, C. S. (2005). "IAP proteins: sticking it to Smac." Biochem J **385**(Pt 1): e1-2.
- Duckett, C. S., V. E. Nava, R. W. Gedrich, R. J. Clem, J. L. Van Dongen, M. C. Gilfillan, H. Shiels, J. M. Hardwick and C. B. Thompson (1996). "A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors." Embo J **15**(11): 2685-94.
- Eckelman, B. P., G. S. Salvesen and F. L. Scott (2006). "Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family." EMBO Rep **7**(10): 988-94.
- Ekert, P. G., J. Silke, C. J. Hawkins, A. M. Verhagen and D. L. Vaux (2001). "DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9." J Cell Biol **152**(3): 483-90.

- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-8.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, K. Weber and T. Tuschl (2002). "Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs." Methods **26**(2): 199-213.
- Evan, G. I. and K. H. Vousden (2001). "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer." Nature **411**(6835): 342-8.
- Fang, S., K. L. Lorick, J. P. Jensen and A. M. Weissman (2003). "RING finger ubiquitin protein ligases: implications for tumorigenesis, metastasis and for molecular targets in cancer." Semin Cancer Biol **13**(1): 5-14.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-6.
- Finley, R. L., Jr. and R. Brent (1994). "Interaction mating reveals binary and ternary connections between Drosophila cell cycle regulators." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12980-4.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.
- Fischer, U., R. U. Janicke and K. Schulze-Osthoff (2003). "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates." Cell Death Differ **10**(1): 76-100.
- Fisher, A. L. and M. Caudy (1998). "Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates." Genes Dev **12**(13): 1931-40.
- Franklin, M. C., S. Kadkhodayan, H. Ackerly, D. Alexandru, M. D. Distefano, L. O. Elliott, J. A. Flygare, G. Mausisa, D. C. Okawa, D. Ong, D. Vucic, K. Deshayes and W. J. Fairbrother (2003). "Structure and function analysis of peptide antagonists of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP)." Biochemistry **42**(27): 8223-31.
- Fukuda, S. and L. M. Pelus (2006). "Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues." Mol Cancer Ther **5**(5): 1087-98.
- Fulda, S. and K. M. Debatin (2006). "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy." Oncogene **25**(34): 4798-811.
- Galluzzi, L., N. Larochette, N. Zamzami and G. Kroemer (2006). "Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy." Oncogene **25**(34): 4812-30.

- Garrido, C., L. Galluzzi, M. Brunet, P. E. Puig, C. Didelot and G. Kroemer (2006). "Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria." Cell Death Differ **13**(9): 1423-33.
- Gasperowicz, M. and F. Otto (2005). "Mammalian Groucho homologs: redundancy or specificity?" J Cell Biochem **95**(4): 670-87.
- Gazzaniga, P., A. Gradilone, L. Giuliani, O. Gandini, I. Silvestri, I. Nofroni, G. Sacconi, L. Frati and A. M. Agliano (2003). "Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer." Ann Oncol **14**(1): 85-90.
- Gietz, R. D. and R. A. Woods (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." Methods Enzymol **350**: 87-96.
- Gogvadze, V. and S. Orrenius (2006). "Mitochondrial regulation of apoptotic cell death." Chem Biol Interact **163**(1-2): 4-14.
- Gordon, G., M. Mani, L. Mukhopadhyay, L. Dong, H. Edenfield, J. Glickman, B. Yeap, D. Sugarbaker and R. Bueno (2007). "Expression patterns of inhibitor of apoptosis proteins in malignant pleural mesothelioma." J Pathol **211**(4): 447-454.
- Grossman, D., P. J. Kim, O. P. Blanc-Brude, D. E. Brash, S. Tognin, P. C. Marchisio and D. C. Altieri (2001). "Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53." J Clin Invest **108**(7): 991-9.
- Hahn, W. C. and R. A. Weinberg (2002). "Rules for making human tumor cells." N Engl J Med **347**(20): 1593-603.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." Nature **418**(6894): 244-51.
- Hariu, H., Y. Hirohashi, T. Torigoe, H. Asanuma, M. Hariu, Y. Tamura, K. Aketa, C. Nabeta, K. Nakanishi, K. Kamiguchi, Y. Mano, H. Kitamura, J. Kobayashi, T. Tsukahara, N. Shijubo and N. Sato (2005). "Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer." Clin Cancer Res **11**(3): 1000-9.
- Hawkins, C. J., P. G. Ekert, A. G. Uren, S. P. Holmgren and D. L. Vaux (1998). "Anti-apoptotic potential of insect cellular and viral IAPs in mammalian cells." Cell Death Differ **5**(7): 569-76.

- He, T. C., A. B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L. T. da Costa, P. J. Morin, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." Science **281**(5382): 1509-12.
- Hegde, R., S. M. Srinivasula, Z. Zhang, R. Wassell, R. Mukattash, L. Cilenti, G. DuBois, Y. Lazebnik, A. S. Zervos, T. Fernandes-Alnemri and E. S. Alnemri (2002). "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction." J Biol Chem **277**(1): 432-8.
- Hicke, L. (2001). "Protein regulation by monoubiquitin." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 195-201.
- Hochstrasser, M. (2006). "Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly." Cell **124**(1): 27-34.
- Hofer-Warbinek, R., J. A. Schmid, C. Stehlik, B. R. Binder, J. Lipp and R. de Martin (2000). "Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1." J Biol Chem **275**(29): 22064-8.
- Hoppe-Seyler, F., I. Crnkovic-Mertens, E. Tomai and K. Butz (2004). "Peptide aptamers: specific inhibitors of protein function." Curr Mol Med **4**(5): 529-38.
- Hu, S. and X. Yang (2003). "Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO." J Biol Chem **278**(12): 10055-60.
- Huang, H., C. A. Joazeiro, E. Bonfoco, S. Kamada, J. D. Levenson and T. Hunter (2000). "The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7." J Biol Chem **275**(35): 26661-4.
- Hunter, A. M., D. Kottachchi, J. Lewis, C. S. Duckett, R. G. Korneluk and P. Liston (2003). "A novel ubiquitin fusion system bypasses the mitochondria and generates biologically active Smac/DIABLO." J Biol Chem **278**(9): 7494-9.
- Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002a). "Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack." J Leukoc Biol **71**(6): 907-20.
- Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002b). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." Nat Rev Cancer **2**(4): 277-88.
- James, P., J. Halladay and E. A. Craig (1996). "Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast." Genetics **144**(4): 1425-36.
- Jan, Y., M. Matter, J. T. Pai, Y. L. Chen, J. Pilch, M. Komatsu, E. Ong, M. Fukuda and E. Ruoslahti (2004). "A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors." Cell **116**(5): 751-62.

- Jin, Z. and W. S. El-Deiry (2005). "Overview of cell death signaling pathways." Cancer Biol Ther **4**(2): 139-63.
- Johnstone, R. W., A. A. Ruefli and S. W. Lowe (2002). "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy." Cell **108**(2): 153-64.
- Kaiser, P., K. Flick, C. Wittenberg and S. I. Reed (2000). "Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4." Cell **102**(3): 303-14.
- Kasof, G. M. and B. C. Gomes (2001). "Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member." J Biol Chem **276**(5): 3238-46.
- Kaufmann, S. H. and W. C. Earnshaw (2000). "Induction of apoptosis by cancer chemotherapy." Exp Cell Res **256**(1): 42-9.
- Kaufmann, S. H. and G. J. Gores (2000). "Apoptosis in cancer: cause and cure." Bioessays **22**(11): 1007-17.
- Kaufmann, S. H. and D. L. Vaux (2003). "Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance." Oncogene **22**(47): 7414-30.
- Kawasaki, H., M. Toyoda, H. Shinohara, J. Okuda, I. Watanabe, T. Yamamoto, K. Tanaka, T. Tenjo and N. Tanigawa (2001). "Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis." Cancer **91**(11): 2026-32.
- Kim, D. K., C. S. Alvarado, C. R. Abramowsky, L. Gu, M. Zhou, M. M. Soe, K. Sullivan, B. George, E. Schemankewitz and H. W. Findley (2005). "Expression of inhibitor-of-apoptosis protein (IAP) livin by neuroblastoma cells: correlation with prognostic factors and outcome." Pediatr Dev Pathol **8**(6): 621-9.
- Kolonin, M. G., J. Zhong and R. L. Finley (2000). "Interaction mating methods in two-hybrid systems." Methods Enzymol **328**: 26-46.
- Korinek, V., N. Barker, P. J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and H. Clevers (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma." Science **275**(5307): 1784-7.
- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, M. Saito, S. Weiler, K. J. Oh and P. H. Schlesinger (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." Cell Death Differ **7**(12): 1166-73.
- Krajewska, M., S. Krajewski, S. Banares, X. Huang, B. Turner, L. Bubendorf, O. P. Kallioniemi, A. Shabaik, A. Vitiello, D. Peehl, G. J. Gao and J. C. Reed (2003). "Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer." Clin Cancer Res **9**(13): 4914-25.

- LaCasse, E. C., S. Baird, R. G. Korneluk and A. E. MacKenzie (1998). "The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer." Oncogene **17**(25): 3247-59.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lavrik, I., A. Golks and P. H. Krammer (2005). "Death receptor signaling." J Cell Sci **118**(Pt 2): 265-7.
- Lersch, R. and E. Fuchs (1988). "Sequence and expression of a type II keratin, K5, in human epidermal cells." Mol Cell Biol **8**(1): 486-93.
- Levanon, D., R. E. Goldstein, Y. Bernstein, H. Tang, D. Goldenberg, S. Stifani, Z. Paroush and Y. Groner (1998). "Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11590-5.
- Levkau, B., K. J. Garton, N. Ferri, K. Kloke, J. R. Nofer, H. A. Baba, E. W. Raines and G. Breithardt (2001). "XIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappaB : new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells." Circ Res **88**(3): 282-90.
- Li, J., Q. Feng, J. M. Kim, D. Schneiderman, P. Liston, M. Li, B. Vanderhyden, W. Faught, M. F. Fung, M. Senterman, R. G. Korneluk and B. K. Tsang (2001). "Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins." Endocrinology **142**(1): 370-80.
- Lin, J. H., G. Deng, Q. Huang and J. Morser (2000). "KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family." Biochem Biophys Res Commun **279**(3): 820-31.
- Lindsley, E. B. and E. H. Grell (1968). "Genetic Variation of *Drosophila melanogaster*." Publ. No. 627. Carnegie Institute, Washington, DC.
- Liston, P., W. G. Fong and R. G. Korneluk (2003). "The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2." Oncogene **22**(53): 8568-80.
- Liu, B., M. Han, J. K. Wen and L. Wang (2007). "Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment." Cancer Lett.
- Liu, F., Y. Liu, D. Li, Y. Zhu, W. Ouyang, X. Xie and B. Jin (2002). "The transcription co-repressor TLE1 interacted with the intracellular region of gp130 through its Q domain." Mol Cell Biochem **232**(1-2): 163-7.
- Liu, X., N. Chen, X. Wang, Y. He, X. Chen, Y. Huang, W. Yin and Q. Zhou (2006). "Apoptosis and proliferation markers in diffusely infiltrating astrocytomas: profiling of 17 molecules." J Neuropathol Exp Neurol **65**(9): 905-13.

- Lopes, R. B., R. Gangeswaran, I. A. McNeish, Y. Wang and N. R. Lemoine (2007). "Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy." Int J Cancer.
- Luban, J. and S. P. Goff (1995). "The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions." Curr Opin Biotechnol **6**(1): 59-64.
- Ma, L., Y. Huang, Z. Song, S. Feng, X. Tian, W. Du, X. Qiu, K. Heese and M. Wu (2006). "Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway." Cell Death Differ **13**(12): 2079-88.
- MacFarlane, M., W. Merrison, S. B. Bratton and G. M. Cohen (2002). "Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro." J Biol Chem **277**(39): 36611-6.
- McManus, M. T. and P. A. Sharp (2002). "Gene silencing in mammals by small interfering RNAs." Nat Rev Genet **3**(10): 737-47.
- Mittal, V. (2004). "Improving the efficiency of RNA interference in mammals." Nat Rev Genet **5**(5): 355-65.
- Modjtahedi, N., F. Giordanetto, F. Madeo and G. Kroemer (2006). "Apoptosis-inducing factor: vital and lethal." Trends Cell Biol **16**(5): 264-72.
- Morin, P. J. (1999). "beta-catenin signaling and cancer." Bioessays **21**(12): 1021-30.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." Science **275**(5307): 1787-90.
- Morizane, Y., R. Honda, K. Fukami and H. Yasuda (2005). "X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO." J Biochem (Tokyo) **137**(2): 125-32.
- Nachmias, B., Y. Ashhab and D. Ben-Yehuda (2004). "The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer." Semin Cancer Biol **14**(4): 231-43.
- Nachmias, B., Y. Ashhab, V. Bucholtz, O. Drize, L. Kadouri, M. Lotem, T. Peretz, O. Mandelboim and D. Ben-Yehuda (2003). "Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: implications for drug-resistant melanoma." Cancer Res **63**(19): 6340-9.
- Naumann, U., O. Bahr, H. Wolburg, S. Altenberend, W. Wick, P. Liston, A. Ashkenazi and M. Weller (2007). "Adenoviral expression of XIAP antisense RNA induces apoptosis in glioma cells and suppresses the growth of xenografts in nude mice." Gene Ther **14**(2): 147-61.
- Nomura, T., H. Mimata, Y. Takeuchi, H. Yamamoto, E. Miyamoto and Y. Nomura (2003). "The X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibits taxol-induced apoptosis in LNCaP cells." Urol Res **31**(1): 37-44.

- Oliver, S. E., M. T. May and D. Gunnell (2001). "International trends in prostate-cancer mortality in the "PSA ERA"." Int J Cancer **92**(6): 893-8.
- Park, H. H., Y. C. Lo, S. C. Lin, L. Wang, J. K. Yang and H. Wu (2007). "The Death Domain Superfamily in Intracellular Signaling of Apoptosis and Inflammation." Annu Rev Immunol.
- Pinto, M. and C. G. Lobe (1996). "Products of the grg (Groucho-related gene) family can dimerize through the amino-terminal Q domain." J Biol Chem **271**(51): 33026-31.
- Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev **14**(15): 1837-51.
- Qiuping, Z., X. Jei, J. Youxin, J. Wei, L. Chun, W. Jin, W. Qun, L. Yan, H. Chunsong, Y. Mingzhen, G. Qingping, Z. Kejian, S. Zhimin, L. Qun, L. Junyan and T. Jinquan (2004). "CC chemokine ligand 25 enhances resistance to apoptosis in CD4+ T cells from patients with T-cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia by means of livin activation." Cancer Res **64**(20): 7579-87.
- Ren, B., K. J. Chee, T. H. Kim and T. Maniatis (1999). "PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins." Genes Dev **13**(1): 125-37.
- Reya, T. and H. Clevers (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." Nature **434**(7035): 843-50.
- Riedl, S. J., M. Renatus, R. Schwarzenbacher, Q. Zhou, C. Sun, S. W. Fesik, R. C. Liddington and G. S. Salvesen (2001). "Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP." Cell **104**(5): 791-800.
- Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 897-907.
- Roose, J., M. Molenaar, J. Peterson, J. Hurenkamp, H. Brantjes, P. Moerer, M. van de Wetering, O. Destree and H. Clevers (1998). "The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors." Nature **395**(6702): 608-12.
- Rothe, M., M. G. Pan, W. J. Henzel, T. M. Ayres and D. V. Goeddel (1995). "The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins." Cell **83**(7): 1243-52.
- Roy, N., Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1997). "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases." Embo J **16**(23): 6914-25.
- Salvesen, G. S. and C. S. Duckett (2002). "IAP proteins: blocking the road to death's door." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 401-10.

- Samali, A., J. Cai, B. Zhivotovsky, D. P. Jones and S. Orrenius (1999). "Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells." Embo J **18**(8): 2040-8.
- Sanna, M. G., J. da Silva Correia, O. Ducrey, J. Lee, K. Nomoto, N. Schrantz, Q. L. Deveraux and R. J. Ulevitch (2002). "IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition." Mol Cell Biol **22**(6): 1754-66.
- Schenck, U. and L. von Karsa (2000). "Cervical cancer screening in Germany." Eur J Cancer **36**(17): 2221-6.
- Schimmer, A. D. and S. Dalili (2005). "Targeting the IAP Family of Caspase Inhibitors as an Emerging Therapeutic Strategy." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 215-9.
- Scott, F. L., J. B. Denault, S. J. Riedl, H. Shin, M. Renatus and G. S. Salvesen (2005). "XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs." Embo J **24**(3): 645-55.
- Serebriiskii, I., J. Estojak, M. Berman and E. A. Golemis (2000). "Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems." Biotechniques **28**(2): 328-30, 332-6.
- Shi, Y. (2002). "A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding." Cell Death Differ **9**(2): 93-5.
- Shiozaki, E. N., J. Chai, D. J. Rigotti, S. J. Riedl, P. Li, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, R. Fairman and Y. Shi (2003). "Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9." Mol Cell **11**(2): 519-27.
- Silke, J., T. Kratina, D. Chu, P. G. Ekert, C. L. Day, M. Pakusch, D. C. Huang and D. L. Vaux (2005). "Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16182-7.
- Silke, J., T. Kratina, P. G. Ekert, M. Pakusch and D. L. Vaux (2004). "Unlike Diablo/smac, Grim promotes global ubiquitination and specific degradation of X chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and neither cause apoptosis." J Biol Chem **279**(6): 4313-21.
- Song, Z., X. Yao and M. Wu (2003). "Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis." J Biol Chem **278**(25): 23130-40.
- Srinivasula, S. M., P. Datta, X. J. Fan, T. Fernandes-Alnemri, Z. Huang and E. S. Alnemri (2000). "Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway." J Biol Chem **275**(46): 36152-7.

- Srinivasula, S. M., R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R. A. Lee, P. D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi and E. S. Alnemri (2001). "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis." Nature **410**(6824): 112-6.
- Stifani, S., C. M. Blaumueller, N. J. Redhead, R. E. Hill and S. Artavanis-Tsakonas (1992). "Human homologs of a Drosophila Enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins." Nat Genet **2**(2): 119-27.
- Stupack, D. G. and D. A. Cheresch (2004). "A Bit-role for integrins in apoptosis." Nat Cell Biol **6**(5): 388-9.
- Suzuki, Y., Y. Nakabayashi and R. Takahashi (2001). "Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8662-7.
- Takahashi, R., Q. Deveraux, I. Tamm, K. Welsh, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1998). "A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases." J Biol Chem **273**(14): 7787-90.
- Tamm, I., S. M. Kornblau, H. Segall, S. Krajewski, K. Welsh, S. Kitada, D. A. Scudiero, G. Tudor, Y. H. Qui, A. Monks, M. Andreeff and J. C. Reed (2000). "Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias." Clin Cancer Res **6**(5): 1796-803.
- Tanabe, H., A. Yagihashi, N. Tsuji, Y. Shijubo, S. Abe and N. Watanabe (2004). "Expression of survivin mRNA and livin mRNA in non-small-cell lung cancer." Lung Cancer **46**(3): 299-304.
- Tetsu, O. and F. McCormick (1999). "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells." Nature **398**(6726): 422-6.
- Tetsuka, T., H. Uranishi, H. Imai, T. Ono, S. Sonta, N. Takahashi, K. Asamitsu and T. Okamoto (2000). "Inhibition of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by association with the amino-terminal enhancer of split, a Groucho-related protein lacking WD40 repeats." J Biol Chem **275**(6): 4383-90.
- Tirro, E., M. L. Consoli, M. Massimino, L. Manzella, F. Frasca, L. Sciacca, L. Vicari, G. Stassi, L. Messina, A. Messina and P. Vigneri (2006). "Altered expression of c-IAP1, survivin, and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells." Cancer Res **66**(8): 4263-72.
- Uetz, P. (2002). "Two-hybrid arrays." Curr Opin Chem Biol **6**(1): 57-62.
- Uren, A. G., M. Pakusch, C. J. Hawkins, K. L. Puls and D. L. Vaux (1996). "Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(10): 4974-8.

- van de Wetering, M., R. Cavallo, D. Dooijes, M. van Beest, J. van Es, J. Loureiro, A. Ypma, D. Hursh, T. Jones, A. Bejsovec, M. Peifer, M. Mortin and H. Clevers (1997). "Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF." Cell **88**(6): 789-99.
- Vaux, D. L. and J. Silke (2003). "Mammalian mitochondrial IAP binding proteins." Biochem Biophys Res Commun **304**(3): 499-504.
- Vaux, D. L. and J. Silke (2005a). "IAPs, RINGs and ubiquitylation." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 287-97.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson and D. L. Vaux (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." Cell **102**(1): 43-53.
- Verhagen, A. M., T. K. Kratina, C. J. Hawkins, J. Silke, P. G. Ekert and D. L. Vaux (2007). "Identification of mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs." Cell Death Differ **14**(2): 348-57.
- Verhagen, A. M. and D. L. Vaux (2002). "Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac." Apoptosis **7**(2): 163-6.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1993). "The multistep nature of cancer." Trends Genet **9**(4): 138-41.
- Vucic, D., K. Deshayes, H. Ackerly, M. T. Pisabarro, S. Kadkhodayan, W. J. Fairbrother and V. M. Dixit (2002). "SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP)." J Biol Chem **277**(14): 12275-9.
- Vucic, D., M. C. Franklin, H. J. Wallweber, K. Das, B. P. Eckelman, H. Shin, L. O. Elliott, S. Kadkhodayan, K. Deshayes, G. S. Salvesen and W. J. Fairbrother (2005). "Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP." Biochem J **385**(Pt 1): 11-20.
- Vucic, D., H. R. Stennicke, M. T. Pisabarro, G. S. Salvesen and V. M. Dixit (2000). "ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas." Curr Biol **10**(21): 1359-66.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel and A. S. Baldwin, Jr. (1998). "NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation." Science **281**(5383): 1680-3.
- Wilkinson, J. C., A. S. Wilkinson, F. L. Scott, R. A. Csomos, G. S. Salvesen and C. S. Duckett (2004). "Neutralization of Smac/Diablo by inhibitors of apoptosis (IAPs). A caspase-independent mechanism for apoptotic inhibition." J Biol Chem **279**(49): 51082-90.

- Wilson, B. E., E. Mochon and L. M. Boxer (1996). "Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis." Mol Cell Biol **16**(10): 5546-56.
- Xiang, Y., H. Yao, S. Wang, M. Hong, J. He, S. Cao, H. Min, E. Song and X. Guo (2006). "Prognostic value of Survivin and Livin in nasopharyngeal carcinoma." Laryngoscope **116**(1): 126-30.
- Yamaguchi, K., S. Nagai, J. Ninomiya-Tsuji, M. Nishita, K. Tamai, K. Irie, N. Ueno, E. Nishida, H. Shibuya and K. Matsumoto (1999). "XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway." Embo J **18**(1): 179-87.
- Yang, L., Z. Cao, H. Yan and W. C. Wood (2003). "Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy." Cancer Res **63**(20): 6815-24.
- Yang, Y., S. Fang, J. P. Jensen, A. M. Weissman and J. D. Ashwell (2000). "Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli." Science **288**(5467): 874-7.
- Yu, X., P. Li, R. G. Roeder and Z. Wang (2001). "Inhibition of androgen receptor-mediated transcription by amino-terminal enhancer of split." Mol Cell Biol **21**(14): 4614-25.
- Zhou, L. L., L. Y. Zhou, K. Q. Luo and D. C. Chang (2005). "Smac/DIABLO and cytochrome c are released from mitochondria through a similar mechanism during UV-induced apoptosis." Apoptosis **10**(2): 289-99.

6. Abkürzungen

Abb.	: Abbildung
AD	: Aktivierungsdomäne
AES	: "Amino-terminal Enhancer of Split"
AIF	: "Apoptosis-inducing factor"
Amp	: Ampicillin
<i>aqua bidest.</i>	: Bidestilliertes Wasser
Bcl-2	: "B cell lymphoma/leukaemia-2"
BD	: DNS-Bindungsdomäne
BIR	: "Baculovirus IAP Repeat"
CARD	: "Caspase Recruitment Domain"
cDNS	: Komplementäre DNS (oder DNS-Kopie der RNS)
CIAP	: „calf intestinal alkaline phosphatase“, alkalische Phosphatase aus Kälbern
c-IAP1/2	: "Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein"-1/2
CMV	: Cytomegalovirus
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DIABLO	: "Direct IAP Binding Protein with low pI"
DNS	: Desoxyribonukleinsäure
g	: Gramm
GAPDH	: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GST	: Glutathion-S-Transferase
h	: Stunde
HPV16	: Humanes Papillomvirus (Typ 16)
IAP	: "Inhibitor of Apoptosis Protein"
kDa	: Kilodalton
KIAP	: "Kidney Inhibitor of Apoptosis Protein"
LB	: Luria Bertani
m	: Milli
min	: Minute
ML-IAP	: "Melanoma-IAP"
NAIP	: "Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein"

NF- κ B	: "Nuclear factor κ B"
OD	: Optische Dichte
RING	: "Really Interesting New Gene"
RNS	: Ribonukleinsäure
rpm	: "rotations per minute", Umdrehungen pro Minute
RT	: Raumtemperatur
SC-Medium	: "Synthetic Complete Medium", Komplettmedium
sek	: Sekunde
Smac	: "Second Mitochondria-derived activator of Caspases"
siRNA	: "small interfering RNA"
TCF	: "T cell factor"
TLE	: Transducin-like Enhancer of Split
TUNEL	: "TdT-mediated dUTP nick end labelling"
U	: "Unit", Enzymeinheit
ÜNK	: Übernachtkultur
UV	: Ultraviolett
XIAP	: "X-chromosome-linked IAP"