

**Identifizierung und Charakterisierung mitochondrialer
Signalwege als zentrale Regulatoren der Apoptose in
*Saccharomyces cerevisiae***

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2004

vorgelegt von

Silvia Mechthild Engelhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.2004

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Mecke

2. Berichterstatter: PD Dr. F. Madeo

Meinem Verlobten

Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt. Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. D. Mecke danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit und insbesondere dafür, dass er mir zudem auch ein musikalisches Engagement ermöglicht hat.

Bei PD Dr. Frank Madeo bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung der Arbeit in seinem Labor.

Bei Eva Herker, Corinna Maldener, Astrid Proksch, Silke Wissing, Sabrina Büttner, Thorsten Decker, Marcel Deponte, Tobias Eisenberg, Dr. Helmut Jungwirth, Nina Lehmann, Alexander Link, Stefan Picker und Nadja Valtcheva bedanke ich mich für das angenehme Arbeitsklima im Labor, ihre Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreude, was meine Frustrationstoleranz deutlich erhöht hat.

Meinen Eltern danke ich, dass sie mir mein Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Alexander Kiefner, der mich während meiner Doktorarbeit stets unterstützt und das Korrekturlesen der Arbeit übernommen hat.

DANKE

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	VI
ZUSAMMENFASSUNG	IX
SUMMARY.....	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Apoptose – eine Form des Zelltods.....	1
1.1.1 Zelltod.....	1
1.1.2 Verschiedene Arten programmierten Zelltods	2
1.1.3 Apoptose.....	2
1.2 Caspasen in der Apoptose.....	3
1.2.1 Funktionelle Einteilung von Caspasen	4
1.3 Mitochondrien und Cytochrom c als Mediatoren der Apoptose	5
1.3.1 Cytochrom c Ausschüttung in der Apoptose	5
1.3.2 Ausschüttung anderer proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien.....	7
1.3.3 Atmungskette und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	7
1.4 Hefe als Modellorganismus	8
1.5 Apoptose in Hefe.....	9
1.5.1 Beteiligung der Mitochondrien an der Hefeapoptose.....	10
1.5.2 Weitere zwischen Säugern und <i>S. cerevisiae</i> konservierten Apoptosemechanismen	11
1.5.3 Physiologische Apoptose in Hefe	12
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	12
2 MATERIALIEN UND METHODEN.....	13
2.1 Geräte	13
2.2 Chemikalien und Kits	15
2.2.1 Antikörper	16
2.3 Organismen.....	16

2.3.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.3.2	<i>Escherichia coli</i>	19
2.4	Kulturmedien	20
2.5	Puffer und Lösungen	21
2.5.1	Agarosegelelektrophorese.....	21
2.5.2	PCR mit <i>Taq</i> Polymerase (MBI Fermentas).....	21
2.5.3	Gewinnung transformationskompetenter Zellen von <i>S. cerevisiae</i> und Transformation mit rekombinanter DNA oder genspezifischen KanMX-Disruptionskassetten	22
2.5.4	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	22
2.5.5	Bestimmung der Zelldichte mit Casy (Schärfe System):.....	22
2.5.6	Zellfixierung	22
2.5.7	TUNEL-Färbung.....	23
2.5.8	DHR-Färbung.....	23
2.5.9	Annexin-Färbung.....	23
2.5.10	Bestimmung der Caspaseaktivität durch FACS-Messung	24
2.5.11	Messung der Änderung von delta psi mit DiOC6.....	24
2.5.12	Synchronisierung von <i>S. cerevisiae</i>	24
2.5.13	Herstellung von Rohextrakten	24
2.5.14	Proteinbestimmung nach Bradford.....	24
2.5.15	Fluorimetrische Messung der Caspaseaktivität <i>in vitro</i>	25
2.5.16	Chemische Lyse.....	25
2.5.17	Mitochondrienisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	25
2.5.18	Pulldown mit α -Flag Agarose.....	25
2.5.19	SDS-Gelelektrophorese.....	26
2.5.20	Coomassie Gelfärbung.....	26
2.5.21	Westernblot.....	27
2.6	Primer für PCR	28
2.7	Stammhaltung und Kultivierung	30
2.7.1	Flüssigkulturen.....	30
2.7.2	Plattenkulturen	30
2.7.3	Dauerkulturen	30
2.8	Allgemeine molekularbiologische Methoden	31
2.8.1	Agarosegelelektrophorese und Abschätzung von DNA Mengen	31
2.8.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	31
2.8.3	Aufarbeitung der PCR-Produkte für Transformation oder Restriktionsverdau	32
2.8.4	Extraktion von DNA nach präparativen Agarosegelen.....	32
2.9	Molekularbiologische Methoden in <i>E. coli</i>	33

2.9.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
2.9.2	Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i>	33
2.10	Molekularbiologische Methoden in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.10.1	Herstellung transformationskompetenter Zellen von <i>S. cerevisiae</i> und Transformation mit rekombinanter DNA oder genspezifischen KanMX-Disruptionskassetten	33
2.10.2	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	35
2.11	Zellbiologische Methoden bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	35
2.11.1	Bestimmung der Zelldichte mit dem Zellzähler.....	35
2.11.2	Überlebensplattierung	36
2.11.3	Bestimmung der Zellgrößenverteilung in Kulturen.....	36
2.11.4	Induktion der Expression von Genen in Expressionsvektoren durch Galactose	36
2.11.5	Induktion von Apoptose durch Wasserstoffperoxid.....	37
2.11.6	Induktion von Apoptose durch Temperaturstress.....	37
2.11.7	Beschichtung von Objektträgern mit Polylysin.....	37
2.11.8	Fixierung von Zellen für den TUNEL-Test.....	37
2.11.9	TUNEL-Test (In Situ Cell Death Detection Kit, POD).....	38
2.11.10	Dihydrorhodamin 123 Färbung.....	39
2.11.11	Annexin-Färbung.....	39
2.11.12	Messung der Caspaseaktivität mit FITC-VAD-fmk im FACS.....	40
2.11.13	Messung der Änderung von delta psi mit DiOC ₆ im FACS	40
2.11.14	Tüpfeltest.....	40
2.11.15	Synchronisierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
2.12	Proteinbiochemische Methoden.....	41
2.12.1	Gewinnung von Rohextrakten aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
2.12.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	42
2.12.3	Messung der Caspaseaktivität in vitro	42
2.12.4	Chemische Lyse.....	42
2.12.5	Mitochondrienisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	43
2.12.6	Pulldown mit α -Flag-Antikörper gekoppelter Agarose.....	43
2.12.7	SDS Polyacrylamidelektrophorese.....	44
2.12.8	Commassie Gelfärbung.....	45
2.12.9	Immunoblot.....	45
3	ERGEBNISSE	47
3.1	Cytochrom c als möglicher Mediator von Apoptose in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	47
3.1.1	Zugabe von Cytochrom c als Apoptoseauslöser bzw. Aktivator von Caspasen.....	47
3.1.2	Überexpression der beiden Isoformen von Cytochrom c im Wildtyp bzw. <i>yca1</i> Δ Hintergrund	49

3.1.3	Fazit: Überexpression von Cyc1p, nicht aber von Cyc7p, führt in Zusammenhang mit Sauerstoffstress zu Apoptose.....	52
3.2	Die Rolle von Cytochrom c bei der durch die Hefecaspase YCA1 ausgelösten Apoptose in <i>S. cerevisiae</i>	53
3.2.1	Überexpression der Hefecaspase Yca1p in Disruptanten der beiden Isoformen von Cytochrom c.....	53
3.2.2	Untersuchung von Kooperation und Interaktion von Yca1p und Cytochrom c in Hefe.....	59
3.2.3	Mitochondriale Beteiligung bei der Hefeapoptose	61
3.2.4	Fazit: Abhängigkeit der Hefeapoptose durch Yca1p-Überexpression von Cytochrom c...	65
3.3	Mitochondriale Beteiligung bei einer konstitutiv apoptotischen CDC48-Mutante.....	66
3.4	Einfluss verschiedener Atmungskettenkomplexe auf die Überlebensfähigkeit von <i>S. cerevisiae</i>	67
3.4.1	Langzeitüberlebensplattierung von Nullmutanten verschiedener Atmungskettenkomponenten und von Cytochrom c	67
3.4.2	Messung der Caspaseaktivität bei Nullmutanten verschiedener Atmungskettenkomplexe und Cytochrom c.....	69
3.4.3	Überexpression von Yca1p in Nullmutanten der Atmungskette	70
3.4.4	Überexpression von Yca1p in einem rho0 Stamm.....	71
3.4.5	Fazit: Mutanten der Atmungskette sind unempfindlicher gegenüber der Yca1p-Überexpression.....	72
3.5	Einfluss der Kanamycin-Disruptionskassette auf die Überlebensfähigkeit von <i>S. cerevisiae</i>	72
3.5.1	Herstellen verschiedener Hefedeletionsmutanten.....	72
3.5.2	Belastung von unterschiedlichen Nullmutanten mit und ohne KanMX-Kassette mit Wasserstoffperoxid.....	73
3.5.3	Fazit: Die KanMX4-Kassette hat keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von <i>S. cerevisiae</i>	75
3.6	Respiratorische Funktion von Aif1p.....	75
3.6.1	Wachstum einer <i>aif1Δ</i> Nullmutante auf nicht-fermentierbaren Medien.....	75
3.6.2	Fazit: Geringere Wachstumsfähigkeit von <i>S. cerevisiae</i> auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen bei <i>aif1Δ</i> Mutation.....	76
3.7	Hefeapoptose und Zellzyklus.....	77
3.7.1	Synchronisierung von <i>S. cerevisiae</i> und Apoptoseinduktion durch Sauerstoffstress.....	77
3.7.2	Fazit: Übergang von der G1- in die S-Phase als neuralgischer Punkt der Hefe	78
3.8	Apoptose bei einer Mutante des retrograden Transports	79
3.8.1	Überlebensplattierungen von <i>tip20</i> Mutanten bei Temperaturstress	79

3.8.2	Caspasemessung von <i>tip20</i> Mutanten bei Temperaturstress	80
3.8.3	DHR-Färbung von <i>tip20</i> Mutanten.....	81
3.8.4	Annexin V-Färbung von <i>tip20</i> Mutanten.....	81
3.8.5	Fazit: Spezifische Mutanten von TIP20 führen bei Temperaturstress zu Apoptose in Hefe	82
4	DISKUSSION	83
4.1	Cytochrom c in <i>S. cerevisiae</i>.....	83
4.1.1	Absterben von <i>S. cerevisiae</i> unter dem Einfluß von Cytochrom c.....	83
4.1.2	Cytochrom c und Sauerstoffstress.....	85
4.1.3	Töten der Hefecaspase Yca1p in Abhängigkeit von Cytochrom c.....	85
4.1.4	Interaktion von Cytochrom c mit der Hefecaspase Yca1p	86
4.1.5	Cytochrom c Ausschüttung und Mitochondrienpotential bei Yca1p Überexpression	88
4.2	Cytochrom c in der Yca1p-abhängigen Hefeapoptose – Fazit	90
4.3	Die Atmungskette in <i>S. cerevisiae</i>.....	90
4.3.1	Apoptose in Hefe in Abhängigkeit der Funktion der Atmungskette	91
4.3.2	Die Atmungskette in der Hefeapoptose – Fazit	92
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	93

Verzeichnis der Abkürzungen

AIF	Apoptosis-inducing factor
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bad	Bcl-2 agonist of cell death
Bax	Bcl-2 associated X-factor
Bcl	B-cell lymphoma
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CDC	Cell division cycle
Ced	<i>C. elegans</i> death
CFU	Colony Forming Units
CML	Hefestammsammlung Cristina Mazzoni
COX	Cytochrome c oxidase
CYC	Cytochrome c
DBY	Hefestammsammlung David Botstein
DD	Death Domain
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DED	Death Effector Domain
DHR	Dihydrorhodamin 123
DIG	Digoxygenin
DiOC ₆	3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPH	Diphthamide
DsRed	Discosoma sp. red fluorescent protein
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiaminoacetat
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanat

FMY	Hefestammsammlung Frank Madeo
FOA	5-Fluoro-Orotsäure
GFP	Green fluorescent protein
IAP	Inhibitory apoptosis protein
ICE	Interleukin-1 β -converting enzyme
kDa	Kilodalton
KFY	Hefestammsammlung Kai-Uwe Fröhlich
LB	(Luria + Bertani)-Medium
LiAc	Lithiumacetat
MES	2-(4-Morpholinyl)-ethansulfonsäure
MBG	Molecular biology grade
OD ₆₀₀	Extinktion bei 600 nm (optische Dichte)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PFM	Plasmidstammsammlung Frank Madeo
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PKF	Plasmidstammsammlung Kai-Uwe Fröhlich
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PTP	Permeability transition pore
QCR	Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rotations per Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SEY	Hefestammsammlung Scott Emr
SMAC	Second mitochondrial activator of caspases
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminale Desoxynucleotidyltransferase Mediated dUTP Nick End Labeling
VCP	Valosin containing protein
VDAC	Voltage-dependent anion channel

v/v	Volumen pro Volumeneinheit
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit
YCA	Yeast caspase
YME	Yeast mitochondrial escape
zVAD-fmk	z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketon

Zusammenfassung

Apoptose ist eine evolutionär konservierte Form des programmierten Zelltodes, die zunächst in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und in Zellkulturen untersucht wurde. Die Entdeckung morphologischer Merkmale der Apoptose in Hefe sowie die Identifizierung einer Hefecaspase ließen diesen einzelligen Eukaryonten zu einem möglichen Modellorganismus für die Erforschung der Apoptose werden.

Mitochondrien sind nicht nur die Energieerzeuger, sondern auch die „Waffenkammer“ der Zelle. Mitochondriale Cytochrom c-Ausschüttung in das Cytosol ist ein wichtiger Bestandteil des apoptotischen Signalweges in Säugerzellen.

In dieser Arbeit wird nachgewiesen, dass die Mitochondrien auch bei der Hefeapoptose beteiligt sind. Bei der Induktion von Apoptose durch Überexpression der Hefecaspase Yca1p (**Y**east **C**aspase **1**) konnte eine Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Cytosol beobachtet werden. Überdies ist die Caspase in Nullmutanten der beiden Isoformen von Cytochrom c in *Saccharomyces cerevisiae* nicht mehr in der Lage, ihre todbringende Wirkung zu entfalten. Umgekehrt wird durch eine Überexpression von Cyc1p, der unter aeroben Bedingungen exprimierten Isoform von Cytochrom c, eine verringerte Überlebensfähigkeit von *S. cerevisiae* hervorgerufen, was wiederum durch die Deletion des Hefegens YCA1 verhindert werden kann. Schließlich konnte gezeigt werden, dass für die Yca1p-vermittelte Apoptose eine intakte Atmungskette benötigt wird.

Summary

Apoptosis is an evolutionary conserved form of cell death on which research was primarily performed in the nematode *Caenorhabditis elegans* and in cell culture. Discovery of a mutant with morphological markers of apoptosis as well as identification of a yeast caspase made yeast a potential research tool for apoptosis.

Mitochondria are not only the energy sources of cells but also “the armoury”. Cytochrome c release from mitochondria is a key player in the mammalian apoptotic pathway.

In this thesis it is shown, that mitochondria also partake in yeast apoptosis. Induction of apoptosis through overexpression of yeast caspase Yca1p (**Yeast Caspase 1**) led to release of cytochrome c from mitochondria into the cytosol. Moreover, null mutants of either isoform 1 or 2 of cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae* are insensitive towards apoptosis induction through the yeast caspase. On the other hand, overexpression of Cyc1p, the cytochrome c isoform being expressed under aerobic conditions, decreases survival of *S. cerevisiae*, which can be prevented by deletion of the yeast gene YCA1. Finally, it could be shown, that Yca1p mediated apoptosis depends on a functionally intact respiratory chain.

1 Einleitung

1.1 Apoptose – eine Form des Zelltods

1.1.1 Zelltod

Das Auftreten von Zelltod unter physiologischen Bedingungen wurde bereits vor 150 Jahren u. a. durch Carl Vogt und August Weissmann beschrieben (Clarke und Clarke, 1995, Übersichtsartikel). 1972 wurde die weite Verbreitung sowie die biologische Bedeutung von programmiertem Zelltod von Kerr, Wyllie und Currie erkannt. Sie beschreiben den Zelltod während der Embryonalentwicklung und den im adulten Organismus als gleichartig und unterteilten den Zelltod in zwei Kategorien: Nekrose und Apoptose (Kerr *et al.*, 1972). Nekrose wurde als diejenige Form des Zelltods beschrieben, die durch starke Schädigung von außen ausgelöst wird und zu einer raschen Beendigung wichtiger Zellfunktionen führt. Dabei schwellen die Zellen an und platzen, was zu einer Entzündungsreaktion im Gewebe führt. Apoptose dagegen soll eine Art Zelltod beschreiben, die eine ergänzende, aber gegensätzliche Rolle zu Mitose in der Regulation der Zellzahl ausführt. Kerr *et al.* vermuteten, dass der Dysregulation von Apoptose für manche Krankheiten eine relevante Bedeutung zukommt. Diese Veröffentlichung blieb zunächst weitgehend unbeachtet und erst die Forschung an *Caenorhabditis elegans*, einem Fadenwurm, dessen Entwicklung – u. a. die dabei auftretende Eliminierung einzelner Zellen – sehr gut unter dem Mikroskop beobachtet werden kann, gab der Erforschung von Zelltod neuen Auftrieb. Heute schreibt man der Apoptose zwei wichtige Rollen zu: Zunächst bei der Eliminierung von Zellen, die vom Organismus nicht mehr benötigt werden wie z. B. bei der Reifung des Immunsystems und allgemein in der Embryonalentwicklung (Meier *et al.*, 2000, Übersichtsartikel), zum anderen als eine Art der Abwehr gegen Krankheiten wie z. B. die Entfernung von neoplastischen Zellen. Etliche Krankheiten sind mit einer Fehlregulation von Apoptose assoziiert, zu denen Morbus Alzheimer und AIDS gehören, bei denen eine verstärkte Apoptose stattfindet. Zu nennen sind ferner Autoimmunerkrankungen und Krebs, bei denen programmierter Zelltod (PCD) gerade nicht ausgelöst wird (Thompson 1995, Übersichtsartikel).

Seit einigen Jahren gewinnt Hefe als Modellorganismus für die Erforschung apoptotischer Prozesse zunehmend an Bedeutung. Mittlerweile ist auch die

physiologische Bedeutung der Hefeapoptose als Mittel zur Aufrechterhaltung der Gesundheit und Teilungsfähigkeit innerhalb eines Klons weitgehend akzeptiert.

1.1.2 Verschiedene Arten programmierten Zelltods

In den letzten Jahren zeigte sich, dass Apoptose vermutlich nicht die einzige Form programmierten Zelltods darstellt. Die ursprüngliche Definition von Apoptose erfolgte aufgrund von morphologischen Veränderungen der sterbenden Zelle: Kondensation des Cytoplasmas, Ablösen von benachbarten Zellen in Geweben, Kondensation des Chromatins und Anlagerung an die innere Kernmembran sowie Zellfragmentierung in „apoptotic bodies“. Durch Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass in den kondensierten Zellen sowie in den Zellfragmenten alle Organellen noch intakt sind. Wenig später wurde entdeckt, dass programmierter Zelltod nicht immer mit den gleichen morphologischen Merkmalen einhergeht und eine Klassifizierung in drei Gruppen vorgenommen werden kann (Schweichel und Merker, 1973; Clarke, 1990, Übersichtsartikel). Typ I entspricht dem apoptotischen Zelltod. Typ II wird gekennzeichnet durch die Bildung von sehr vielen autophagischen Vakuolen und wird daher autophagischer Zelltod genannt. *In vivo* werden die Zellreste - wie bei der Apoptose auch - von angrenzenden Zellen oder Makrophagen phagozytiert. Typ III beschreibt einen Zelltod durch Aufspaltung der Zellen in Fragmente ohne Beteiligung des lysosomalen Systems und ohne wesentliche Kondensation des Cytoplasmas. Guimaraes und Linden beschreiben in ihrem Review von 2004 die Typ III Form des programmierten Zelltods als programmierte Nekrose. Sie zeigen überdies auf, dass unterschiedliche Enzyme und Mechanismen nicht auf eine Art des PCD beschränkt sind.

1.1.3 Apoptose

Seit der erstmaligen Beschreibung der Apoptose als einem morphologischen Phänomen verstehen wir heute sehr viel genauer, was auf molekularer Ebene bei ihrer Auslösung abläuft. Zu diesem Verständnis hat vor allem die Forschung an *Caenorhabditis elegans* (z. B. Yuan und Horvitz, 1992; Zou *et al.*, 1997) beigetragen. Zu den wichtigen Mechanismen, die auf molekularer Ebene bekannt sind, gehören die Auslösung der Apoptose (zum Beispiel durch den Entzug von Wachstumsfaktoren, die Stimulierung bestimmter Rezeptoren, Sauerstoffstreß oder interne Signale bei der Entwicklung), die Signaltransduktion über Caspasekaskaden und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. In einigen speziellen

Situationen kann die Abfolge und Kausalität von Mechanismen, die über Leben oder Sterben bestimmen, verfolgt werden. In der Mehrzahl der Fälle scheint jedoch die Wirkung eines Stoffes vom genetischen Hintergrund und der Vorgeschichte der Zelle abzuhängen. Außerdem wurden sehr viele Varianten zu dem oben skizzierten Schema gefunden: lange galt die Caspaseaktivierung als Kennzeichen für Apoptose, inzwischen kennt man caspaseunabhängige Vorgänge, die ebenfalls zu Apoptose führen (Monney *et al.*, 1998). Zu diesen möglicherweise Caspase-unabhängigen Szenarien gehört der durch *Apoptosis-inducing Factor* (AIF) vermittelte Zelltod (Candé *et al.*, 2004, Übersichtsartikel). Aufgrund der Vielfalt und der Komplexität der unterschiedlichen Möglichkeiten einer apoptotischen Signaltransduktion wird die Apoptose nach wie vor an den morphologischen Merkmalen, die am Ende des Prozesses stehen, eingeordnet. Dazu gehören neben den oben beschriebenen morphologischen Kennzeichen auch DNA-Fragmentierung und die Externalisierung von Phosphatidylserin vom inneren zum äußeren Blatt der Zellmembran (Martin *et al.* 1995). Die Mechanismen, die für diese Phänomene verantwortlich sind, sind nur wenig bekannt.

1.2 Caspasen in der Apoptose

Die meisten Apoptoseszenarien werden mit der koordinierten Aktivierung einer Familie von Cystein-Proteasen assoziiert, die spezifisch bei Aspartatresten schneiden und daher Caspasen (**Cystein-Aspartat-Proteasen**) genannt werden. Im katalytischen Zentrum befinden sich zwei katalytische aktive Aminosäurereste: Cystein und Histidin. Die Caspase-Familie in Säugerzellen umfasst heute 14 Mitglieder, die aber nicht alle an der Transduktion von Apoptose beteiligt sind (Creagh & Martin, 2001; Chang & Yang, 2000, Übersichtsartikel). Die proteolytische Spaltung von Caspasen hat so unterschiedliche Ziele wie die Aktivierung von Caspasen selbst (durch Autokatalyse oder durch eine Caspase-Kaskade), die Aktivierung von Faktoren zur DNA-Fragmentierung sowie die Inaktivierung von Proteinen, die an der DNA-Reparatur oder am mRNA-Splicing oder an der Aufrechterhaltung der Kernarchitektur beteiligt sind.

Caspasen werden als inaktive Procaspasen exprimiert und durch proteolytische Spaltung der großen (ca. 20 kDa) von der kleinen Domäne (ca. 10 kDa.) sowie die anschließende Abspaltung der sogenannten Prodomäne aktiviert. Das prozessierte aktive Enzym ist ein Heterotetramer aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten (Rotonda *et al.*, 1996). Eine Möglichkeit, die Caspasen innerhalb ihrer

Familien zu unterteilen ist, die Größe und der Aufbau dieser Prodomänen. Als weiteres Systematisierungskriterium bietet sich ihre Funktion an, was zu einer Unterteilung führt, die sich nur teilweise mit der erstgenannten Unterteilung deckt.

1.2.1 Funktionelle Einteilung von Caspasen

Caspasen, die an der Apoptose beteiligt sind, werden in zwei Untergruppen eingeteilt: die Initiatorcaspasen, die für die Auslösung der Caspase-Kaskade verantwortlich sind und die Effektorcaspasen, von denen angenommen wird, sie seien für die eigentlich Zerstörung der Zelle verantwortlich.

Zu den Initiatorcaspasen gehören die Caspasen -2, -8, -9 und -10. Ihre Aktivierung erfolgt durch Aggregation und anschließende autokatalytische Spaltung. Die Aggregation kann durch Caspase-Adaptormoleküle mit sogenannten *Death Domains* erfolgen (z. B. bei Caspase-8) oder durch Cytochrom c-Ausschüttung und anschließende Bildung des Apoptosom-Komplexes (z. B. Caspase-9). Initiatorcaspasen verfügen über relativ große Prodomänen, die die Aggregation erleichtern.

Zu den Effektorcaspasen zählen die Caspasen -3, -6 und -7. Sie werden hauptsächlich durch die Spaltung durch Initiatorcaspasen aktiviert. Es wird angenommen, dass zunächst eine Teilaktivierung durch Spaltung der kleinen von der großen Untereinheit erfolgt und anschließend die Prodomäne autokatalytisch von der großen Domäne gespalten wird. Dieser Schritt der autokatalytischen Spaltung ist auch ein Angriffspunkt für negative Regulatoren der Apoptose: die *Inhibitors of Apoptosis* (IAPs). Bei einer Untersuchung der Säugerapoptosecascade durch Expression in Hefe konnte gezeigt werden, dass die Initiatorcaspasen -8 und -10 autokatalytisch aktiviert werden und diese wiederum in Kooperation Caspase-3 aktivieren können. Die Überexpression der Initiatorcaspase-8 führte zu Cytotoxizität (Kang *et al.*, 1999).

Cytokin-aktivierende Caspasen sind nicht an der Apoptose beteiligt, zu ihnen zählen die Caspasen -1, -4, -5 und -11. Caspase-1, die erste überhaupt identifizierte Protease dieser Familie wurde zunächst nach ihrer Funktion *Interleukin-1 β converting enzyme* (ICE) benannt. Diese Caspasegruppe ist durch Spaltung von Cytokinen an der entzündlichen Immunantwort beteiligt.

Die verbleibenden Mitglieder dieser Proteasefamilie sind bisher nicht genau charakterisiert. Caspase-12 wird jedoch mit der ER-vermittelten Apoptose in Verbindung gebracht (Maag *et al.*, 2003, Übersichtsartikel).

1.3 Mitochondrien und Cytochrom c als Mediatoren der Apoptose

Während der Apoptose werden einige zelluläre Strukturen und Organellen beschädigt oder zerstört. Mitochondrien, die energiespendenden Organellen in gesunden Zellen, sind jedoch nicht nur passiv betroffen, sondern auch aktiv an der Apoptose beteiligt. 1994 konnten Newmayer *et al.* nachweisen, dass für die Apoptoseinduktion in einem zellfreien System eine mit Mitochondrien angereicherte Fraktion benötigt wird. Wenig später konnte gezeigt werden, dass der gleiche Effekt auch durch Zugabe von dATP und Cytochrom c erreicht werden kann (Liu *et al.*, 1996). Auch die Tatsache, dass proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie die Ausschüttung von Cytochrom c ins Cytosol vermitteln (Luo *et al.*, 1998) und dies durch das antiapoptotische Bcl-2 verhindert werden kann (Kluck *et al.*, 1997a), hat dazu beigetragen, Mitochondrien als zentrale Regulatoren der Apoptose anzuerkennen.

1.3.1 Cytochrom c Ausschüttung in der Apoptose

Die Rolle von Cytochrom c bei der Induktion von Apoptose scheint zunächst erstaunlich, denn es handelt sich um ein Enzym, das essentiell für die mitochondriale Energieproduktion ist und das im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist. Die Entdeckung des Apoptosoms konnte eine Erklärung für die Funktion von Cytochrom c im Cytosol liefern: Cytochrom c rekrutiert den sogenannten *Apoptotic protease-activating Factor* (Apaf-1) und dATP sowie Procaspase-9 und kann so die Aktivierung der Caspase-9 bewirken (Zou *et al.*, 1999; Jiang & Wang 2000).

Eine entscheidende Bedeutung bei der Ausschüttung von Cytochrom c ins Cytosol kommt – wie schon oben erwähnt – den Proteinen der Bcl-2-Familie zu. Während die Tatsache, dass Cytochrom c ins Cytosol ausgeschüttet wird und dort stromabwärts zu Apoptose führen kann generell akzeptiert ist, gibt es doch weitreichende Diskussionen zum Mechanismus der Ausschüttung von Cytochrom c.

Da Cytochrom c in gesunden Zellen im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist, bedarf es für die Ausschüttung theoretisch lediglich einer Öffnung der äußeren Mitochondrienmembran. Es gibt unterschiedliche Modelle für mögliche Öffnungen der äußeren Mitochondrienmembran, u. a., dass Bax oder andere proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie eine Pore in der äußeren Mitochondrienmembran bilden, dass Bax eine Lipidpore in der äußeren Mitochondrienmembran öffnet, dass Bax die Öffnung des VDAC-Kanals bewirkt,

dass ein Schließen des VDAC-Kanals zur Hyperpolarisation, anschließender Matrixschwellung und Disruption der äußeren Mitochondrienmembran führt oder dass die sogenannte mitochondriale *Permeability Transition Pore* (PTP) geöffnet wird, was die gleichen Auswirkungen hat wie das Schließen des VDAC-Kanals (Green & Reed, 1998; von Ahsen *et al.*, 2000a, Übersichtsartikel). Von der PTP wird angenommen, dass sie ein Komplex aus einigen Proteinen ist (u. a. VDAC, ANT, Cyclophilin D und Hexokinase) der sowohl die innere als auch die äußere Zellmembran durchzieht. Ein Öffnen der Pore ermöglicht den Austausch von Proteinen bis zur Größe von 1,5 kDa.

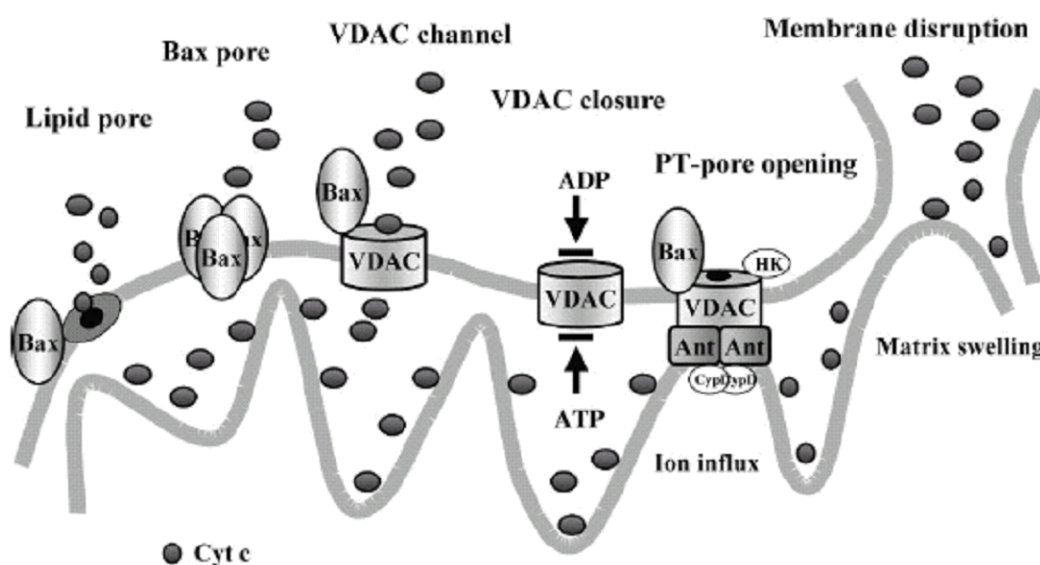


Abbildung 1.1: Verschiedene Möglichkeiten der Cytochrom c Ausschüttung. Die Bildung von Poren, die Bildung von Kanälen durch proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie und die Veränderung der Porengröße von VDAC durch Bax führen zur Cytochrom c-Ausschüttung bei intakter äußerer Mitochondrienmembran. Das Schließen von VDAC und anschließende Hyperpolarisation sowie das Öffnen der PTP mit anschließender Depolarisierung des Mitochondriums führen zum Anschwellen der Matrix und mechanischer Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran. Aus von Ahsen *et al.*, 2000.

Neben der Ausschüttung von Cytochrom c wurde auch die Entkopplung des mitochondrialen Membranpotentials in vielen Apoptoseszenarien festgestellt. Diese Entkopplung wird in engen Zusammenhang mit der Öffnung der PTP gebracht. Es könnte sein, dass sowohl die Art der Apoptoseauslösung, als auch die Zellart und die Art der Nährstoffe Einfluss auf die zeitliche Abfolge der Öffnung der PTP haben (Ly *et al.*, 2003, Übersichtsartikel).

Im Zusammenhang mit der Ausschüttung von Cytochrom c ist noch zu erwähnen, dass unter bestimmten Umständen Zellen auch nach der Ausschüttung von Cytochrom c nicht apoptotisch werden, sondern gerettet werden. Hierfür verantwortlich sind sogenannte Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteine (Deveraux *et al.*, 1998); diese Proteine inhibieren Caspasen. Aufgrund der Fähigkeit der Zellen, sich trotz Cytochrom c Ausschüttung wieder zu erholen, ist davon auszugehen, dass es einen Mechanismus geben muss, Cytochrom c auszuschütten, ohne das mitochondriale Membranpotential völlig zu zerstören.

In letzter Zeit wurde der Debatte um die Art der Ausschüttung von Cytochrom c ein weiterer Aspekt hinzugefügt: die Bindung von Cytochrom c an Cardiolipin, einem Phospholipid in der inneren Mitochondrienmembran. Es wird angenommen, dass Cytochrom c in intakten Mitochondrien nicht frei im Intermembranraum vorliegt, sondern in den Einstülpungen der Cristae an Cardiolipin gebunden ist. Für die Ausschüttung von Cytochrom c ist also zunächst die Loslösung von Cardiolipin erforderlich (Iverson & Orrenius, 2004a; Degli Esposti, 2004, Übersichtsartikel).

1.3.2 Ausschüttung anderer proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien

Die Ausschüttung weiterer proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien wird mit der Öffnung der PTP assoziiert. Darunter sind Proteine, die die Inhibition der Caspasen durch IAPs aufheben: Smac/DIABLO (Srinivasula *et al.*, 2001) und Omi/HtrA2 (Suzuki *et al.*, 2001), wobei das letztere eine Serinprotease ist, die IAPs spaltet, um sie zu inaktivieren, und deshalb vermutlich effizienter ist als Smac/DIABLO. Daneben werden auch Proteine ausgeschüttet, von denen angenommen wird, dass sie Caspase-unabhängig töten: apoptosis-inducing factor (AIF) und Endonuclease G (Li *et al.*, 2001). AIF ist ein Protein, das zum Zellkern wandert und zu Chromatinkondensation führt (Susin *et al.*, 1999).

1.3.3 Atmungskette und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Mitochondrien, genauer gesagt die Atmungskette, sind die Hauptproduzenten intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Sie sind gleichzeitig auch die ersten Organellen, die durch ROS geschädigt werden. Stress durch ROS wurde mit verschiedensten Zellschädigungen in Verbindung gebracht, die alle zu Zelltod führen können, u. a. Lipidperoxidation, Proteinoxidation und DNA-Schädigung. ROS werden

mit Alterungsprozessen und mit Krankheiten wie amyotropher lateraler Sklerose assoziiert.

ROS werden während der oxidativen Phosphorylierung gebildet, vermutlich entkommen etwa 1-5 % der Elektronen der Atmungskette und bilden dadurch Superoxid. In gesunden Zellen werden die Superoxidanionen durch die Superoxiddismutase zu H_2O_2 entgiftet. Zu diesem Zweck gibt es sowohl eine cytosolische, als auch eine mitochondriale Superoxiddismutase.

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus vier verschiedenen Komplexen. Zwei dieser Komplexe werden hauptsächlich für die Produktion von ROS verantwortlich gemacht: NADH-Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) und Ubichinon-Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex III). In beiden Fällen wird davon ausgegangen, dass Superoxid entsteht, wenn Semichinon sein Elektron nicht bestimmungsgemäß abgeben kann (Turrens, 2003, Übersichtsartikel).

In der Apoptose haben ROS in zweierlei Hinsicht Bedeutung erlangt: Einerseits gelten sie als ein Merkmal der Apoptose (Hockenbery *et al.*, 1993), andererseits lösen sie selbst wohl bestimmte apoptotische Prozesse aus. Petrosillo *et al.* konnten 2003 zeigen, dass ROS an der Ausschüttung von Cytochrom c beteiligt sind. Sie sind verantwortlich für die Loslösung von Cytochrom c von Cardiolipin und dessen anschließende Ausschüttung.

Neben der Produktion von Sauerstoffspezies übernimmt die Atmungskette noch weitere Funktionen in der Apoptose. So konnte eine Untereinheit des Komplex I als Caspasesubstrat identifiziert werden, dessen Spaltung zur Entkopplung des mitochondrialen Membranpotentials, einer verringerten ATP-Menge und der Bildung von ROS führt (Ricci *et al.*, 2004). Albayrak *et al.* (2003) haben eine Untereinheit des Komplex II als proapoptotisches Protein identifiziert, dessen Expression mit Bildung von ROS einhergeht.

1.4 Hefe als Modellorganismus

In den Anfängen der Mikrobiologie und Biochemie war die Alkoholfermentation von Hefe einer der ersten biochemisch untersuchten Prozesse. Zu diesem Zeitpunkt war Hefe noch nicht generell als Organismus anerkannt. Heute wird Hefe für viele metazoische Prozesse als Modell verwendet. Gründe dafür sind u. a. die leichte Kultivierbarkeit des Mikroorganismus, der aber dennoch ein Eukaryont ist, und deshalb eine gewisse Ähnlichkeit zu Säugerzellen aufweist. Ein weiterer Grund ist, dass das Hefegenom schon geraume Zeit sequenziert ist und zu vielen wichtigen

menschlichen Genen Homologe in Hefe gefunden wurden. Es wurden auf den 16 Chromosomen von *Saccharomyces cerevisiae* etwa 6000 Gene entdeckt, die in einem gemeinsamen Projekt mehrerer Labore – soweit nicht lethal – sukzessive deletiert wurden (EUROFAN-Projekte). Da Hefe sowohl haploid als auch diploid existieren kann und homologe Rekombination relativ problemlos stattfindet, ist diese Art der genetischen Manipulation besonders einfach.

Bei der Erforschung des Zellzyklus hat sich Hefe bereits als exzellenter Modellorganismus erwiesen. Auch die Sekretion wurde sehr weitreichend in Hefe erforscht.

Neben der Möglichkeit der Erforschung einzelner zellulärer Prozesse auf der Basis von Homologen zu Metazoen bietet sich in Hefe auch die Möglichkeit, „fremde“ Gene zu exprimieren und sie – wie z. B. bei der Hefe-2-Hybrid-Analyse – in einer Art *Cleanroom* zu untersuchen.

1.5 Apoptose in Hefe

Für die Erforschung von programmiertem Zelltod, dem in vielzelligen Organismen eine besondere Bedeutung zukommt, wird Hefe erst in jüngster Zeit herangezogen. Zunächst fand man keine Hefehomologe zu den wichtigsten bekannten Apoptoseregulatoren wie den Mitgliedern der Bax/Bcl-2-Familie und vermutete, dass programmierter Zelltod in diesem Organismus nicht auftritt, zumal die Bedeutung eines solchen Prozesses, der in der Entwicklung von Vielzellern und bei der Verhinderung von Krankheiten eine Rolle spielt, für den Einzeller Hefe nicht unmittelbar einleuchtend war. 1997 jedoch wurden erstmals apoptotische Marker bei einer Zellzyklusmutante im Gen CDC48 entdeckt (Madeo *et al.*, 1997; Fröhlich und Madeo, 2000, Übersichtsartikel). Nachträglich konnte eine antiapoptotische Wirkung von VCP des humanen Orthologs zu CDC48 gezeigt werden (Shirogane *et al.* 1999). Manon *et al.* konnten 1997 bei der Überexpression von Bax in Hefe apoptotisches Sterben feststellen, das durch die gleichzeitige Expression von Bcl-x_L, einem antiapoptotischen Mitglied der Bcl-2 Familie, verhindert wurde. Neben diesen endogen getriggerten Apoptosewegen konnte gezeigt werden, dass in Hefe auch durch exogene Signale wie Sauerstoffstress Apoptose ausgelöst werden kann (Madeo *et al.*, 1999). Da reaktive Sauerstoffspezies bereits als Signal für Apoptose in anderen Spezies bekannt waren (Hockenbery *et al.*, 1993; Schulz *et al.*, 1997), galt dies als weitere Bestätigung für das Auftreten von Apoptose in Hefe.

Kürzlich konnte eine physiologische Rolle von Apoptose in Hefe bei Alterung und Absterben von alten Hefezellen nachgewiesen werden (Laun *et al.*, 2001). Schließlich konnten Madeo *et al.* (2002a) über die Identifizierung einer Caspase in Hefe berichten, die große funktionelle Gemeinsamkeiten mit Säugercaspasen aufweist.

Diese Ergebnisse bestätigen das Auftreten von Apoptose als einer Art des programmierten Zelltods in Hefe und damit ihre Eignung als Modellorganismus zur Erforschung der molekularen Vorgänge, die letztlich zum Absterben der Zellen führen (Madeo *et al.*, 2002b).

1.5.1 Beteiligung der Mitochondrien an der Hefeapoptose

Noch bevor die Möglichkeit der Apoptose in Hefe ernsthaft in Betracht gezogen wurde, zeigte sich bei dem Versuch, eine 2-Hybrid-Analyse von Bax durchzuführen, dass die Expression dieses Proteins für *S. cerevisiae* lethal ist (Greenhalf *et al.*, 1996). Diese Lethalität geht einher mit apoptotischen Merkmalen und kann durch die gleichzeitige Expression von Bcl-x_L antagonisiert werden (Manon *et al.*, 1997; Ligr *et al.*, 1998). Außerdem kann auch Bax-Inhibitor-1 (BI-1) die durch Bax ausgelöste Apoptose in Hefe unterbinden (Chae *et al.*, 2003). Bemerkenswert ist vor allem die Cytochrom c Ausschüttung bei Überexpression von Bax in *S. cerevisiae*, die schon 1997 gezeigt wurde und immer noch Bestandteil aktueller Forschung ist. Priault *et al.* (1999a) konnten zeigen, dass bei der Ausschüttung von Cytochrom c bei Expression von Bax in *S. cerevisiae* nur eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran stattfindet und dieser Prozess ATP-abhängig ist. In den letzten Jahre konnte ferner gezeigt werden, dass die Expression von Bax in *S. cerevisiae* zu Lipidoxidation führt, was möglicherweise für den apoptotischen Effekt mitverantwortlich ist (Manon, 2004, Übersichtsartikel). Eine genaue molekulare Charakterisierung eines Kanals bzw. einer Pore, die für die Ausschüttung von Cytochrom c in Hefe verantwortlich ist, gelang bisher nicht. Allerdings ergaben elektrophysiologische Untersuchungen, dass für die Öffnung der äußeren Mitochondrienmembran ein Kanal verantwortlich ist, der bisher noch nicht beschrieben wurde und der *mitochondrial apoptosis-induced channel* bezeichnet wird (Pavlov *et al.*, 2001). In Säugerzellen wird die Ausschüttung von Cytochrom c sehr oft durch GFP-getaggetes Cytochrom c untersucht. Der Versuch, dies in Hefe zu tun, ergab, dass die Pore der äußeren Mitochondrienmembran in Hefe offensichtlich nicht groß genug ist, um dieses Konstrukt auszuschütten, die Hefe aber dennoch weniger

gut überlebt. Bei diesem Versuch konnte auch gezeigt werden, dass das GFP-Cytochrom c Konstrukt in der Atmungskette funktional ist (Roucou *et al.*, 2000). Zu dem Ergebnis, dass Cytochrom c für den Zelltod in Hefe nicht benötigt wird kamen auch Priault *et al.*, (1999b). Lim *et al.* (2002) haben die Größe der Pore durch unterschiedlich getaggte Cytochrom c-Konstrukte auf ca. 15-20 kDa bestimmt. Überdies konnten Matsuyama *et al.* (1998) zeigen, dass die Funktion von Bax in Hefe von einer funktionellen F₀-F₁-ATPase abhängig ist.

Unabhängig von der Expression von Säugergenen konnten Ludovico *et al.* (2002) nachweisen, dass die durch Essigsäure ausgelöste Hefeapoptose mit einer Ausschüttung von Cytochrom c einhergeht. Nullmutanten von Cytochrom c waren Essigsäure gegenüber unempfindlich, genauso wie eine Nullmutante bei der die mitochondriale F₀-F₁-ATPase gestört war.

1.5.2 Weitere zwischen Säugern und *S. cerevisiae* konservierten Apoptosemechanismen

Neben der oben schon erwähnten Konservierung zwischen CDC48 und VCP zwischen Hefe und Säugern und der Ausschüttung von Cytochrom c bei Bax-Expression konnten innerhalb der letzten Jahre noch etliche andere konservierte Proteine gefunden werden.

Das wichtigste konservierte Enzym ist die Hefecaspase Yca1p. Sie gehört zu der Unterfamilie der Metacaspasen. Madeo *et al.* konnten 2002(a) zeigen, dass diese Caspase in Hefe durch Überexpression und gleichzeitigen Sauerstoffstress in der Lage ist apoptotische Veränderungen in der Zelle hervorzurufen. Ihre Aktivität ist abhängig von Ygl129c einem Hefehomologen von DAP-3. DAP-3 ist Teil der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose und ist an der Fragmentierung von Mitochondrien beteiligt (Mukamel & Kimchi, 2004).

Zu HtrA2/Omi, ein mitochondriales Protein in Säugern, das über die PTP ausgeschüttet wird und IAPs spaltet, konnte in Hefe ein Homolog namens Nma1 gefunden werden. Nma1 ist allerdings im Kern lokalisiert, aggregiert dort unter Stressbedingungen wie erhöhte Temperatur und verursacht apoptotische Veränderungen (Fahrenkrog *et al.*, 2004).

Apoptose in Hefe kann auch durch die Deletion von ASF1/CIA1, die Histon-Chaperone kodieren, ausgelöst werden. hCIA1 ist ein Interaktor von einer Untereinheit von TFIID, einem Transkriptionskomplex, der mit Apoptose in Verbindung gebracht wird (Yamaki *et al.*, 2001).

1.5.3 Physiologische Apoptose in Hefe

Physiologische Bedingungen, unter denen eine Auslösung der Apoptose sinnvoll erscheint, sind Nährstoffmangel oder Altern. In einer Hefekultur können diese Bedingungen zeitgleich auftreten.

Beim individuellen Altern von Hefezellen konnten Laun *et al.* (2001) zeigen, dass in älteren Zellen ROS angereichert sind. Diese Zellen weisen überdies apoptotische Marker auf. Das apoptotische Absterben dieser Zellen könnte verhindern, dass sich Zellen vermehren, die bereits DNA-Schädigungen aufweisen.

Herker *et al.* (2004) konnten erst kürzlich zeigen, dass Apoptose auch beim chronologischen Altern von Hefekulturen eine Rolle spielt. Es konnten sowohl die Ansammlung von ROS als auch Caspaseaktivierung und weitere apoptotische Marker in älteren Hefekulturen nachgewiesen werden.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Mitochondrien spielen in der Säugerzellapoptose eine zentrale Rolle. Einige Säugerproteine, die die Cytochrom c-Ausschüttung in Säugerzellen beeinflussen, zeigen diese Wirkung auch in Hefezellen (vgl. oben).

Ziel dieser Arbeit war es, die Beteiligung der Mitochondrien und insbesondere von Cytochrom c bei der Hefeapoptose im Allgemeinen und bei der durch die Hefecaspase ausgelösten Apoptose im Besonderen näher zu untersuchen. Hierfür wurden einerseits Versuche mit unterschiedlichen Nullmutanten und andererseits mit Überexpressionsplasmiden durchgeführt. Außerdem wurde die Ausschüttung von Cytochrom c mittels Mitochondrien- und Cytosolaufreinigung untersucht. Zudem wurden Untersuchungen zu einer möglichen Interaktion zwischen Cytochrom c und Yca1p durchgeführt. Überdies bot diese Arbeit die Möglichkeit, die Hefe als Modellorganismus für Apoptose weiter zu etablieren.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte

Autoklav Ventilab S 3000	MMM, München
Dounce Homogenisator	Braun, Melsungen
Elektroblotapparatur Multiphor II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
ELISA-Reader MR 5000	Dynatech Instruments Inc., Torrance, USA
Entwicklungsmaschine SRX-101	Konica
Geldokumentationssystem CS1	Cybertech, Berlin
<i>Gelelektrophoresekammern:</i>	
<i>Agarosegele:</i>	
Elektrophoresekammer für 50*75*8 mm (Minigel)	Werkstatt des Physiologisch- Chemischen Instituts der Universität Tübingen
Midi-Gele	Biorad, München
<i>Polyacrylamidgele:</i>	
Mini-Protean 3 System	Biorad
Hoefer SE 400 Serie	Amersham Pharmacia, Freiburg
Lab Shaker	Braun, Melsungen
<i>Mikroskope und Zubehör:</i>	
Mikroskop Ortholux 2	Leitz, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20	Zeiss, Jena
Photokamera XR-X 3000	Ricoh, Japan
Axiovert 200	Zeiss, Jena
AxioCam HRm	Zeiss, Jena
Software AXIOVISION 4	Zeiss, Jena
pH-mV-Meter	Knick, Berlin
Rührer IKA-COMBIMAG RCH	Janke & Krake KG, Staufen im Breisgau
Pipetten und Cups	Eppendorf AG, Hamburg
Schwingschüttler	Wacker, Deutschland
Spannungsgeber EA-3049 und EA-3050	Heinzinger Regel- und Messtechnik, Rosenheim
Sterilbank Modell ET 130 V	Ehret Reinraumtechnik, Emmendingen

Sterilfilter 0,22 µm Syringe Filter	Fisherbrand Scientific GmbH, Nidderau
Tiefkühlschrank (-80°C) UF85-110T	Colora Messtechnik GmbH, Lorch
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Thermocycler	MWG Biotech
Transilluminator	Vilber Lourmat, Frankreich
UV/VIS-Spectrophotometer UV-120-01	Shimadzu
UV/VIS-Spektralphotometer Lambda 15	Perkin-Elmer, Überlingen
UV-Transilluminator	Vilber Lourmat, Frankreich
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich
<i>Waagen:</i>	
Delta Range PE 360	Mettler Waagen GmbH, Gießen
MC 1 Laboratory LC 22000	Sartorius AG, Göttingen
Sartorius Basic	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänsingen
<i>Zentrifugen:</i>	
Airfuge	Beckmann Instruments, München
Tischzentrifuge Modell 29025	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Christ, Osterode
Tischzentrifuge 3200	Eppendorf AG, Hamburg
Megafuge 1,0 mit Rotor 3360	Heraeus Christ, Osterode
Suprafuge 22 mit Rotor HFA 12.500	Heraeus Christ, Osterode
Ultrazentrifuge L5-65 mit Rotor Ti60	Beckman Instruments, München
RC-5 Superspeed mit Rotor SS 34 (Sorvall)	Heraeus Christ, Osterode
3K12 mit Rotor Nr. 11133	Sigma, München
Zellzähler Casy1 DT	Schärfe System, Reutlingen

2.2 Chemikalien und Kits

Alle Feinchemikalien und Enzyme wurden – soweit nicht anders angegeben – von den Firmen Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), ICN (Eschwege) und Sigma (München) bezogen.

Agar	Otto Nordwald KG, Hamburg
Alkalische Phosphatase (shrimp AP)	USB, Cleveland
Apo-Alert Annexin V Apoptosis Kit	Clontech, USA
CCCP	Sigma, München
DAB Substrate/Metall enhanced	Roche, Mannheim
DiOC ₆	Sigma, München
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit1	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
E.Z.N.A. Gelextraktions Kit	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
E.Z.N.A. Cycle Pure Kit	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
FACS Calibur	Becton Dickinson, USA
α-Faktor	Sigma, München
β-Glucuronidase/Arylsulfatase	Roche, Mannheim
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche, Mannheim
Lyticase	Sigma, München
Ponceau S	Sigma, München
Primer für die PCR	Auftragssynthesen bei MWG-Biotech
Objektträger	bioMérieux, Frankreich
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
Taq-Polymerase	MBI Fermentas
Wasser für Molekularbiologie	Ultra Pure Water sterile molecular Biology grade; Qbiogene

2.2.1 Antikörper

Anti-FLAG Epitop polyklonaler Antikörper aus Hase	Geschenk von S. Baksh
Anti-HA Epitop monoklonaler Antikörper aus Maus	Cell Signaling Technology, Inc.
Anti-Hefe Alkalische Phosphatase monoklonaler Antikörper aus Maus	Molecular Probes
Anti-S.c. Cytochrom c Antikörper aus Hase	Geschenk von F. Sherman
Anti-S.c. Cox2p Antikörper aus Hase	Geschenk von A. Barrientos
MAb414 monoklonaler Antikörper aus Maus	BAbCO
Anti-Hase IgG, HRP gekoppelter Sekundärantikörper	Amersham
Anti-Maus IgG, HRP gekoppelter Sekundärantikörper	Amersham
Die Bestandteile für Kulturmedien wie Yeast Extract, Bactopepton, Bactotrypton und Yeast Nitrogene Base wurden von Difco, USA bezogen.	

2.3 Organismen

2.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Nummer	Beschreibung
KFY 159	alias Dby2068: MAT a; his 4-619; leu 2-3; 112; ura 3-52
KFY 496	KFY159 Δ YCA1 (yca1::KanMX)
KFY 437	alias S2G: Mat a; cdc48::URA3; his 4-619; leu 2-3, 112; ura 3-52; YEp52/cdc48 ^{S565G}
KFY 417	alias ECCC: Mat a; cdc48::URA3; his 4-619; leu 2-3, 112; ura 3-52; YEp52/CDC48
KFY 715	alias BY4741: Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0
KFY 571	KFY 715 (BY4741) mit pKF 788 (Yep52/YCA1)
KFY 572	KFY 715 (BY4741) mit pKF 426 (YEp52)
FMY 17	KFY 715 (BY4741) mit pFM 21 (pESC-His/YCA1)
FMY 20	KFY 715 (BY4741) mit YCA1 c-terminal chromosomal getaggt an 3 HA (KanMX6-Marker)
FMY 29	KFY 715 (BY4741) mit pFM16 (pESC-His)
FMY 42	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; cyc1::KanMX4 (Euroscarf)

FMY 43	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; cyc7::KanMX4 (Euroscarf)
FMY 44	FMY 42 (BYa cyc1 Δ) mit pFM 21 (pESC-His/YCA1)
FMY 45	FMY 42 (BYa cyc1 Δ) mit pFM 16 (pESC-His)
FMY 46	FMY 43 (BYa cyc7 Δ) mit pFM 21 (pESC-His/YCA1)
FMY 47	FMY 43 (BYa cyc7 Δ) mit pFM 16 (pESC-His)
FMY 48	KFY 159 (DB.....) yca1::loxP (nach Entfernen der kan-Kassette)
FMY 60	KFY 715 (BY4741) yca1::KanMX
FMY 61	KFY 715 (BY4741) cyc7::KanMX
FMY 97	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; pet111::KanMX4 (Euroscarf)
FMY 98	FMY 97 (BYa pet111 Δ) mit pFM 21 (pESC-His/YCA1)
FMY 99	FMY 97 (BYa pet111 Δ) mit pFM 16 (pESC-His)
FMY 100	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; cyc3::KanMX4 (Euroscarf)
FMY101	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; atp10::KanMX4 (Euroscarf)
FMY 186	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; cox7::KanMX4 (Euroscarf)
FMY 187	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; cox8::KanMX4 (Euroscarf)
FMY 188	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; qcr7::KanMX4 (Euroscarf)
FMY 189	Mat a; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; qcr9::KanMX4 (Euroscarf)
FMY 102	(BYa qcr7 Δ) mit pFM 16 (pESC-His)
FMY 103	(BYa qcr7 Δ) mit pFM 21 (pESC-His/YCA1)
FMY 104	(BYa qcr9 Δ) mit pFM 16 (pESC-His)
FMY 105	(BYa qcr9 Δ) mit pFM 21 (pESC-His/YCA1)
FMY 106	(BYa cox7 Δ) mit pFM 16 (pESC-His)
FMY 107	(BYa cox7 Δ) mit pFM 21 (pESC-His/YCA1)
FMY 108	(BYa cox8 Δ) mit pFM 16 (pESC-His)
FMY 109	(BYa cox8 Δ) mit pFM 21 (pESC-His/YCA1)
FMY 254	KFY 715 (BY4741) mit pFM 58 (pYES2-URA/CYC1)
FMY 256	KFY 729 (BYa yca1 Δ) mit pFM 58 (pYES2-URA/CYC1)
FMY 258	KFY 729 (BYa yca1 Δ) mit pYES2-URA
FMY 286	RSY BO5 alias SEY 6210 Mat α ; suc 2-9; ura 3-52; leu 2,3-113; his 3-200; trp1-901; Lys2-801; von F. Kamena
FMY 287	SEY 6210 tip 20-5; von F. Kamena
FMY 288	SEY 6210 tip 20-8; von F. Kamena
FMY 327	KFY 715 (BY4741) yca1::loxP

FMY 328	KFY 715 (BY4741) <i>cyc7::loxP</i>
FMY 349	KFY 715 (BY4741) mit pYES2-URA
FMY 350	KFY 715 (BY4741) mit pFM 76 (pYES2-URA/CYC7)
FMY 351	KFY 729 (BYa <i>yca1Δ</i>) mit pFM 76 (pYES2-URA/CYC7)
FMY 366	KFY 715 (BY4741) <i>yme1::KanMX</i>
FMY 367	KFY 715 (BY4741) <i>cyc1::KanMX</i>
FMY 368	KFY 715 (BY4741) <i>dph2::KanMX</i>
FMY 369	KFY 715 (BY4741) <i>dph5::KanMX</i>
FMY 374	KFY 715 (BY4741) <i>yme1::loxP</i>
FMY 375	KFY 715 (BY4741) <i>cyc1::loxP</i>
FMY 376	KFY 715 (BY4741) <i>dph2::loxP</i>
FMY 377	KFY 715 (BY4741) <i>dph5::loxP</i>
FMY 468	FMY 101 (BY <i>atp10Δ</i>) mit pFM 16 (pESC-His)
FMY 469	FMY 101 (BY <i>atp10Δ</i>) mit pFM 21 (pESC-His/YCA1)
FMY 471	FMY 20 (BYa YCA1 c-term. HA) mit pYES2-URA
FMY 472	FMY 20 (BYa YCA1 c-term. HA) mit pFM 58 (pYES2-URA/CYC1)
FMY 473	FMY 20 (BYa YCA1 c-term. HA) mit pFM 76 (pYES2-URA/CYC7)
FMY 292	CML39.11A Mat a; <i>leu2</i> ; <i>his3</i> , <i>trp</i> ; <i>ura3</i> ; von C. Mazzoni
FMY 293	CML39.9A Mat a; <i>leu2</i> ; <i>his3</i> , <i>trp</i> ; <i>ura3</i> ; <i>yca1::KanMX4</i> ; von C. Mazzoni
FMY 474	CML 39.11A <i>rho0</i> ; von C. Mazzoni
FMY 475	CML 39.9A <i>rho0</i> ; von C. Mazzoni
FMY 481	FMY 292 mit pFM 16 (pESC-His)
FMY 482	FMY 292 mit pFM 21 (pESC-His/YCA1)
FMY 483	FMY 474 mit pFM 16 (pESC-His)
FMY 484	FMY 474 mit pFM 21 (pESC-His/YCA1)
FMY 485	FMY 293 mit pFM 16 (pESC-His)
FMY 486	FMY 293 mit pFM 21 (pESC-His/YCA1)
FMY 487	FMY 475 mit pFM 16 (pESC-His)
FMY 488	FMY 475 mit pFM 21 (pESC-His/YCA1)
FMY 451	BYa Δ DPH2 (Euroscarf)
FMY 452	BYa Δ DPH5 (Euroscarf)
FMY 453	KFY 715 (BY4741) mit pFM 16 (pESC-His) mit pYES2-URA
FMY 454	KFY 715 (BY4741) mit pFM 16 (pESC-His) mit pYES2-URA/CYC1

FMY 455	KFY 715 (BY4741) mit pFM 16 (pESC-His) mit pYES2-URA/CYC7
FMY 456	KFY 715 (BY4741) mit pFM 21 (pESC-His/YCA1) mit pYES2-URA
FMY 457	KFY 715 (BY4741) mit pFM 21 (pESC-His/YCA1) mit pYES2-URA/CYC1
FMY 458	KFY 715 (BY4741) mit pFM 21 (pESC-His/YCA1) mit pYES2-URA/CYC7
FMY 385	KFY 715 (BY4741) mit pFM 82 (pRS 416-EGFP)
FMY 386	KFY 715 (BY4741) mit pFM 82 (pRS 416-YCA1(1-155)-EGFP)
FMY 519	FMY 17 mit pFM 129 (mitochondrienlokalisiert DsRed)
FMY 520	FMY 29 mit pFM 129 (mitochondrienlokalisiert DsRed)
FMY 521	FMY 385 mit pFM 129 (mitochondrienlokalisiert DsRed)
FMY 522	FMY 386 mit pFM 129 (mitochondrienlokalisiert DsRed)

2.3.2 Escherichia coli

Nummer	Alias	Beschreibung
pKF 426	YEp52	ampR; 2 μ ; LEU2; GAL10 ^P ; kein Insert
pKF 788		YEp52; YCA1(GAL10 ^P)
pKF 784	pUG6	ampR; Disruptionskassette loxP-KanMX4-loxP (Geneticinresistenz); von U. Güldener
pFM 16	pESC-His	ampR; pUC origin; 2 μ origin; f1 origin; HIS3; GAL10 ^P -FLAG-Tag; GAL1 ^P -c-myc-Tag; kein Insert; von Stratagene
pFM 21	pESC-His/YCA1	pESC-His; YCA1-Flag(GAL10 ^P)
	pYES 2	ampR; 2 μ ; URA3; GAL1 ^P ; CYC1 ^T ; kein Insert; von Invitrogen
pFM 58	pYES2/CYC1	pYES 2; CYC1(GAL1 ^P)
pFM 76	pYES2/CYC7	pYES 2; CYC7(GAL1 ^P)
pFM 99	pRS 416	ampR; CEN origin; URA3; YCA1(1-155)-EGFP(MET ^P) von A. Szillis
pFM 121	pSH47	Ura3; Cre-Rekombinase(Gal ^P) von Güldener
pFM 129		basiert auf pYX142; ampR; CEN; LEU2; Su9(1-69) DsRed(TPI ^P)

2.4 Kulturmedien

Alle Kulturmedien wurden 20 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Dem Medium für Kulturplatten wurden 1,5% Agar Agar respektive 2,5% für Minimalmedien zugesetzt. Eventuell benötigte Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren zugegeben. Alle Kulturmedien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

Hefe-Vollmedium YPD/YPG:

1% Yeast Extract

2% Bactopepton

4% Glucose/Galactose

(200 mg/l Geneticin)

Hefe-Minimalmedium SD/SG:

0,17% Yeast Nitrogene Base w/o Amino Acids

0,5% Ammoniumsulfat

2% Glucose/Galactose

Aminosäuren sowie Adenin und Uracil je nach Bedürfnis der jeweiligen Stämme in folgenden Konzentrationen:

80 mg/l Histidin

320 mg/l Uracil

200mg/l Leucin

30 mg/l alle anderen Aminosäuren und Adenin

Hefe-Minimalmedium mit nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen:

Diese Medien wurden entsprechend den Minimalmedien mit Glucose bzw. Galactose hergestellt. Als Kohlenstoffquellen wurden 3% (v/v) Glycerin, 2% (v/v) Lactat bzw. 2% (v/v) Ethanol zugesetzt.

LB (Luria + Bertani)-Medium (*E. coli*):

0,5% Natriumchlorid

0,5% Yeast Extract

1% Bacto-Trypton

(100 mg/l Ampicillin)

2.5 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung aller Puffer und Lösungen wurde deionisiertes Wasser eingesetzt. Lediglich bei der PCR wurde MBG H₂O benutzt.

2.5.1 Agarosegelelektrophorese

TAE	40 mM Tris/Acetat pH 8 ; 1 mM EDTA
Probenauftragspuffer	eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau in 50 ml 87% (w/v) Glycerin
Agarosegele	1 % bis 2 % Agarose in TAE; 0,001% - 0,01% Ethidiumbromid
DNA	
Längenstandards	
EcoRI/HindIII	0,1 µg/µl λ-DNA EcoRI/HindIII verdaut (21226 bp, 4937 bp, 4277 bp, 3520 bp, 2027 bp, 1904 bp, 1584 bp, 1331 bp, 983 bp, 831 bp, 564 bp und 125 bp)
100 bp (Fermentas)	DNA-Längenstandard mittlere Länge (3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1200 bp, 1031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp)

2.5.2 PCR mit *Taq* Polymerase (MBI Fermentas)

<i>Taq</i> DNA Polymerase (rekombinant)	5 U/µl in 20 mM Tris/HCl pH 8,8; 1 mM DTT; 0,1 mM EDTA; 100 mM KCl; 0,5% Nonidet P40; 0,5% Tween 20; 50% Glycerol
10X PCR Puffer	100 mM Tris/HCl pH 8,8; 500 mM KCl; 0,8 % Nonidet P40
Magnesiumchlorid	25 mM MgCl ₂
dNTP Mix	2 mM dNTPs

2.5.3 Gewinnung transformationskompetenter Zellen von *S. cerevisiae* und Transformation mit rekombinanter DNA oder genspezifischen KanMX-Disruptionskassetten

LiAc (10X Stammlösung)	1 M in dH ₂ O
50 % (w/v) PEG	50 % Polyethylenglykol 4000 in ddH ₂ O
TE (10X Stammlösung)	100 mM Tris pH 8; 10mM EDTA
Carrier-DNA	Lachshoden-DNA (10 mg/ml)

2.5.4 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Lysepuffer GP	100 mM Tris pH 8,0; 50 mM EDTA; 1% SDS
Lösung für Proteinfällung	7 M Ammoniumacetat pH 7

2.5.5 Bestimmung der Zelldichte mit Casy (Schärfe System):

Casyton Meßlösung	0,9 % NaCl; 0,1 mM EDTA
Casyclean Reinigungslösung	keine näheren Angaben des Herstellers

2.5.6 Zellfixierung

Puffer B	35 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,8; 0,5 mM MgCl ₂
Puffer B + Sorbitol	1,2 M Sorbitol in Puffer B
Formaldehyd	37%
Lyticase-Lösung	1000 U/ml Lyticase in TE
β-Glucuronidase / Arylsulfatase	aus <i>Helix pomatia</i> ; 4,5 U/ml bzw. 14 U/ml
Poly-L-Lysin	0,1% (w/v), M _r 6000 – 9000

2.5.7 TUNEL-Färbung

PBS	25 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7; 0,9% (w/v) NaCl
Permeabilisierungslösung	0,1% Triton X-100; 0,1% (w/v) Natriumcitrat
TUNEL-Reaktionsmix	Enzyme Solution 1/10 mit Label Solution verdünnt
Enzyme Solution	T4 Terminale Desoxynucleotidyl Transferase
Label Solution	Nukleotid-Mix
Converter POD	Anti-Fluorescein-Antikörper gekoppelt mit Meerrettichperoxidase
DAB-Substrat	DAB Substrate/Metal Enhanced 1/10 mit Peroxidpuffer verdünnt

Die Lösungen TUNEL-Reaktionsmix, Enzyme Solution, Label Solution, Converter POD und DAB-Substrat entstammen dem In Situ Cell Death Detection Kit, POD und dem DAB Substrate/Metal Enhanced Kit. Die genaue Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht angegeben.

2.5.8 DHR-Färbung

DHR 123-Lösung 2,5 mg/ml Dihydrorhodamin 123 in Ethanol

2.5.9 Annexin-Färbung

FITC (Fluoresceinisothiocyanat) – Annexin V	Apo Alert Annexin V Apoptosis Kit
Puffer C (Annexin-Bindepuffer)	10 mM HEPES/NaOH pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl ₂
Puffer B und Puffer B + Sorbitol: siehe TUNEL-Test	
Lyticase-Lösung	1000 U/ml Lyticase in TE
Glucuronidase/Arylsulfatase aus <i>Helix pomatia</i> :	4,5 U/ml bzw. 14 U/ml (Roche)
Propidiumiodid	50 µg/ml in Puffer C

2.5.15 Fluorimetrische Messung der Caspaseaktivität *in vitro*

Reaktionspuffer (2X)	100 mM HEPES pH 7,4; 200 mM NaCl; 20% Sucrose; 0,2% CHAPS; 4 mM CaCl ₂ ;
DTT-Lösung	2 M DTT
Ac-VEID-AMC	50 mM Ac-VEID-AMC in DMSO
Substrat	
Ac-IETD-AMC	50 mM AC-IETD-AMC in DMSO
Substrat	

2.5.16 Chemische Lyse

Lysepuffer CL	1,84 M NaOH; 7,5% β -Mercaptoethanol
TCA	55% TCA (w/v)
Harnstoff-Ladepuffer	200 mM Tris/HCl; 8 M Harnstoff; 5% SDS; 1 mM EDTA; 0,1% Bromphenolblau als pH-Indikator; 15 mM DTT pH 6,8

2.5.17 Mitochondrienisolierung aus *S. cerevisiae*

Waschlösung	1,2 M Sorbitol
Permeabilisierungslösung	50 ml Ansatz: 30 ml 2 M Sorbitol; 3 ml 1 M Phosphatpuffer pH 7,5; 0,1 ml 0,5 M EDTA; 0,5 ml Mercaptoethanol; 16 ml dH ₂ O; 5000 U Lyticase. Diese Lösung wurde erst kurz vor Gebrauch hergestellt.
Aufschlußlösung	0,5 M Sorbitol; 20 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA
Mitochondrienwaschlösung	0,5 M Sorbitol

2.5.18 Pulldown mit α -Flag Agarose

Lysepuffer PD	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1 mM PMSF; 1 μ g/ml Leupeptin; 1 μ g/ml Pepstatin; 5 μ g/ml Aprotinin
TBS	50 mM Tris HCl pH 7,4; 150 mM NaCl
Elutionspuffer PD	100 mM Glycin pH 2,6
Neutralisationslösung	1 M Tris pH 9
Neutralisationslösung SP	2 M Tris untitriert

2.5.19 SDS-Gelelektrophorese

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4% SDS
Sammelgelpuffer:	1 M Tris-HCl pH 6,8; 0,8% SDS
TEMED:	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Acrylamidlösung:	30% Acrylamid; 0,8% N, N'-Methylenbisacrylamid
Persulfatlösung:	10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)
10X Laufpuffer:	25 mM Tris/HCl pH 8,3; 192 mM Glycin; 0,2% SDS
Probenauftragspuffer 6X (Lämmli)	375 mM Tris/HCl pH 6,8; 12,3% SDS; 25,8% Glycerin; 600 µg/ml Bromphenolblau; 6% Mercaptoethanol
Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas
Prestained Molecular Weight Marker	MBI Fermentas

2.5.20 Coomassie Gelfärbung

Coomassie- Färbelösung	2,5 g Coomassie brilliant Blue R-250; 200 ml Methanol; 250 ml dH ₂ O
Entfärbelösung	10% Essigsäure; 40% Methanol; 50% dH ₂ O

2.5.21 Westernblot

Nitrocellulose-Membran	Amersham Pharmacia, Freiburg
Hybond ECL	
Blot-Puffer Stammlösung:	200 mM Tris; 1,5 M Glycin; 0,5% SDS. Vor Gebrauch wurden Wasser, Methanol und Stammlösung im Verhältnis 7:2:1 gemischt.
Ponceau S Lösung	0,1% Ponceau S; 5% Essigsäure
Blockpuffer:	50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 5% Milchpulver
TBS	50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl
TBS-T	10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,02% (w/v) Triton X-100
TBS-Tween	10 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20
ECL-1	2,5 mM Luminol; 0,4 mM Coumarsäure; 100 mM Tris/HCl pH 8,5
ECL-2	5,4 mM H ₂ O ₂ ; 100 mM Tris/HCl pH 8,5
Stripping Buffer	62,5 mM Tris/HCl pH 6,9; 10% SDS; 0,007% Mercaptoethanol

2.6 Primer für PCR

Alle Primer wurden als Auftragssynthesen von der Firma MWG-Biotech (???) bezogen. Sie wurden lyophilisiert geliefert und in sterilem deionisiertem Wasser in einer Konzentration von 100 pmol/µl gelöst.

Die fett dargestellten Bereiche an den 3'-Enden der Disruptionsprimer sind komplementär zur jeweiligen Matrize (KanMX-Kassette). Die 5'-überhängenden Enden der Disruptionsprimer entsprechen Sequenzen an den Rändern der zu deletierenden Gene. Bei allen Primerpaaren stimmt der jeweils erstgenannte mit dem Sense-Strang, der zweitgenannte mit dem Antisense-Strang des Gens überein:

dDPH2fwd	5'-GATTTCTAAGTGGCAGCGTTGAAAGATCGTGCAAAGGTTGCA GCTGAAGCTTCGTACGC -3'
dDPH2bwd	5'-GATGATACCCGGCCTTCCACGCGGTCACTTCGCACGGAATGC ATAGGCCACTAGTGGATCTG -3'
dDPH5fwd	5'-GCAAAGTAAAAACGAACAGGATATAGAGTGAATAAAGGACAGT GCAGCTGAAGCTTCGTACGC -3'
dDPH5bwd	5'-CGATTCGTTTTGGGATCGAATTGTTACCCGACTGAAAGGATCTA TTC GCATAGGCCACTAGTGGATCTG -3'
dYME1fwd	5'-TATATCGGAGTTGGTGAAGTGAGTTAAATCTCTACCTTGCCAG CTGAAGCTTCGTACGC -3'
dYME1bwd	5'-GCATTCTCGGTCTTGAGGTAGGTTCTTCATACGTTTAACGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG -3'
CYC1fwd	5'-GGTGGATCAAGCCCACGCGTAGGCAATCCTCGAGCAGATCCA GCTGAAGCTTCGTACGC -3'
CYC1bwd	5'-CCTAGACTTCAGGTTGTCTAACTCCTTCCTTTTCGGTTAGGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG -3'
Kontroll- Primer:	
kagegen	5'-GGACGAGGCAAGCTAAACAG-3'
deltDPH2	5'-CATCTACAGGATCAGTCTGATAG-3'
deltDPH5	5'-GGTTCAAGGAGTAATGCACTAC-3'
deltYME1	5'-GGTAAATCCAGTGACGAGGC-3'
deltCYC1	5'-GTGTGAGACGACATCGTCGA-3'

Primer zur Klonierung von Cytochrom c in den Vektor pYES2:

Die Gene wurden von genomischer DNA mittels PCR mit den nachfolgenden Primerpaaren amplifiziert und mit Hilfe der Schnittstellen HindIII und XhoI in den Vektor pYES2 kloniert.

Cyc1sense	5'-AGCG AAGCTT ATGACTGAATTCAA-3'
CYC1antisense2	5'-TTAT CTCGAG TTACTCACAGGCTT-3'
Cyc7sense	5'-AGCG AAGCTT ATGGCTAAAGAAAGTACG-3'
CYC7antisense2	5'-TTAT CTCGAG CTATTTGGCAGCCTTTG-3'
Kontroll-Primer:	
cyc1ctrl	5'-CATCTGTGTACGAATACC-3'
cyc7ctrl	5'-TTACCTGACCTGAATGTC-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

2.7 Stammhaltung und Kultivierung

2.7.1 Flüssigkulturen

Flüssigkulturen dienen der Anzucht von Zellen bis zur gewünschten Zelldichte.

Kulturen von *Escherichia coli* wurden bei 37 °C in LB-Medium geschüttelt. Gegebenenfalls wurde bei Plasmid enthaltenden Stämmen das entsprechende Antibiotikum zugegeben.

Kulturen von *Saccharomyces cerevisiae* wurden bei 28 °C in YPD oder einem geeigneten Minimalmedium unter Schütteln angezogen.

2.7.2 Plattenkulturen

Plattenkulturen wurden für die Anzucht von Klonen (z. B. Selektion nach Transformation mit rekombinanter DNA, Verdünnungsausstrich) und für die Überlebensplattierung eingesetzt. Außerdem dienen Plattenkulturen der mittelfristigen Stammhaltung. Platten mit *E. coli* sind bei 4 °C etwa vier Wochen haltbar, Platten mit *S. cerevisiae* über zwei Monate.

Dabei wurden Platten mit *E. coli* (LB, LB + Antibiotikum) bei 37 °C einen Tag und Platten mit *S. cerevisiae* (YPD, YPD + Geneticin, Minimalmedium) bei 28 °C oder bei Raumtemperatur zwei Tage inkubiert und danach bei 4 °C gelagert.

2.7.3 Dauerkulturen

Dauerkulturen dienen der langfristigen Stammhaltung und sind bei -80 °C über Jahre hinweg haltbar.

Zum Anlegen einer Hefe-Dauerkultur wurden 500 µl einer Übernachtskultur und 500 µl 50% (w/v) Glycerin in ein Kryoröhrchen gegeben. Nach Mischen wurde die Dauerkultur bei -80 °C gelagert.

Zum Anlegen von *E. coli* Dauerkulturen wurden 500 µl einer Übernachtskultur und 500 µl einer 87% (w/v) Glycerin in einem Kryoröhrchen gemischt und sofort bei -80 °C gelagert.

Zur erneuten Anzucht eines Hefe- oder *E.coli*-Stammes aus der Dauerkultur wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas gefrorenes Material aus dem Kryoröhrchen gekratzt und auf einer entsprechenden Agarplatte (LB evtl. mit Antibiotikum, YPD oder SD) ausgestrichen.

2.8 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Zur genetischen Manipulation von DNA und *E. coli* und wurden Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1998)) verwendet.

2.8.1 Agarosegelelektrophorese und Abschätzung von DNA Mengen

Die Agarosegelelektrophorese wurde je nach Länge der zu trennenden DNA mit Gelen von 1 bis 2% Agarose in TAE durchgeführt. Nach leichtem Abkühlen wurde die Lösung mit 1% (w/v) Ethidiumbromid auf eine Endkonzentration von ungefähr 0,001%, in Ausnahmefällen bis zu 0,01%, versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 80 V (Mini-Gel) bzw. 100 V (Midi-Gel) durchgeführt. Bei jedem Lauf wurden neben den Proben 5 µl DNA-Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront aus Bromphenolblau sich dem zweiten Drittel oder dem Ende des Gels näherte. Nach dem Lauf wurde das Gel aus der Kammer genommen und mit Hilfe des UV-Transilluminators ausgewertet und dokumentiert. Die Abschätzung der DNA-Menge erfolgte durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der zu bestimmenden Bande mit dem DNA-Längenstandard.

2.8.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.8.2.1 Herstellung der Disruptionskassetten

Die Deletion von Hefegenen in *S. cerevisiae* wurde nach der Methode von Güldener *et al.* (1996) durchgeführt. Hierzu wurde das Plasmid pUG6 als Template verwendet und somit eine Disruptionskassette erstellt, die aus einem loxP-KanMX4-loxP Teil besteht flankiert von Sequenzen aus der 5' bzw. 3' untranslatierten Region der zu disruptierenden Gene. 10 µl Buffer w/o (10X); 10 µl dNTPs; 2 µl Plasmid-Miniprep pUG6; 6 µl MgCl₂; 1 µl Primer fwd; 1 µl Primer bwd; 3 µl *Taq*-Polymerase; 65 µl MBG H₂O. Folgendes Programm wurde für die PCR verwendet: 3 min bei 94°C, 15 Zyklen (45 s bei 94°C, 45 s bei 45°C, 1,5 min bei 72°C) und weitere 25 Zyklen (45 s bei 94°C, 45 s bei 50°C, 1,5 min bei 72°C), 5 min bei 72 °C; Endtemperatur 4°C. Die Disruptionskassette konnte nach Fällung direkt zur Transformation eingesetzt werden.

2.8.2.2 Kontrolle der Disruptionen

Zur Kontrolle der durchgeführten Disruptionen wurden Primer erstellt, die zu einer Region stromaufwärts des zu disruptierenden Gens komplementär sind. Als Gegenprimer dient ein Oligonukleotid, das zu einem Abschnitt innerhalb der KanMX-Kassette komplementär ist.

Alle Primer besitzen eine Schmelztemperatur von ungefähr 60 °C, und das verwendete PCR-Protokoll orientiert sich an der „touch-down-Methode“ (Scheinert *et al.*, 2001). Folgender Ansatz wurde verwendet:

2,5 µl Puffer w/o (10X); 2,5 µl dNTP-Mix; 5 µl genomische DNA (aus Isolierung); 1,5 µl MgCl₂; 0,5 µl Primer 1; 0,5 µl Primer 2; 12 µl MBG H₂O; 0,5 µl Taq-Polymerase (1U/µl).

Folgendes Programm wurde verwendet: 3 min bei 94 °C, 25 Zyklen (30 s bei 94 °C ; 30 s bei 70 °C, die Temperatur wurde dabei bei jedem Zyklus um 0,6 °C abgesenkt; 1 min bei 72 °C) und weitere 14 Zyklen (30 s bei 94 °C ; 30 s bei 54 °C ; 1 min bei 72°C) ; 10 min bei 72°C ; Endtemperatur: 4 °C.

Im Anschluss an die PCR wurden direkt 3 µl der Produkte entnommen und auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

2.8.3 Aufarbeitung der PCR-Produkte für Transformation oder Restriktionsverdau

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das E.Z.N.A Cycle Pure Kit verwendet (mit 30 µl MBG H₂O eluiert) oder die DNA mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol bei -20 °C 10 min. gefällt. Nach Zentrifugation (10 min bei 10.000 g) wurde das Pellet einmal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in MBG H₂O aufgenommen.

2.8.4 Extraktion von DNA nach präparativen Agarosegelen

Um nach dem Restriktionsverdau die überflüssigen DNA Stücke zu entfernen, wurde dieser auf ein Agarosegel aufgetragen und die gewünschten Banden ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA aus den Gelstücken erfolgte mit Hilfe des E.Z.N.A. Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers. Es wurde mit 40 µl MBG H₂O eluiert.

2.9 Molekularbiologische Methoden in *E. coli*

2.9.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit. Es wurde nach Anleitung für High copy Plasmide gearbeitet.

Für die Elution wurden 75 µl ddH₂O eingesetzt.

Die Konzentration des Plasmids wurde mittels Agarosegelelektrophorese ermittelt.

2.9.2 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurden 1 l des Stamms XL-1 blue bzw. DH5α in LB-Medium auf eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 herangezogen. Die Kultur wurde 10 min bei 4.000 g, 4 °C abzentrifugiert, dreimal mit eiskaltem Wasser sowie einmal mit eiskaltem 10% Glycerin gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 8-9 ml 10% Glycerin resuspendiert und in 50 µl Aliquots bei – 80 °C eingefroren.

Für die Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit ca. 5 ng Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligationsansatzes gemischt und bei 1,8 kV in einer gekühlten Elektroporationsküvette transformiert. Die Zellen wurden sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und zur Ausbildung der Ampicillinresistenz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation in der Tischzentrifuge wurden die Zellen in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit einem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion ausplattiert.

2.10 Molekularbiologische Methoden in *Saccharomyces cerevisiae*

2.10.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen von *S. cerevisiae* und Transformation mit rekombinanter DNA oder genspezifischen KanMX-Disruptionskassetten

Die Herstellung transformationskompetenter Hefezellen und daran anschließende Transformation beruht auf der Lithiumacetat/PEG-Methode von Gietz *et al.* (2001).

2.10.1.1 Gewinnung transformationskompetenter Zellen von *S. cerevisiae*

Da sich kompetente Hefezellen nicht lagern lassen, müssen sie vor jeder Transformation frisch hergestellt werden. Dazu wurde am Tag vor der Transformation eine 10 ml Vorkultur des zu transformierenden Hefestammes angeimpft. Am nächsten Morgen wurde damit eine 50 ml Kultur auf eine Dichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml angeimpft. Diese Kultur wurde dann 2 bis 3 Generationszeiten – das entspricht etwa

4 bis 5 Stunden – weiter bei 28 °C geschüttelt, bis die Zelldichte bei $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml lag. Die nun in der logarithmischen Phase befindliche Kultur wurde durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 5000 rpm steril geerntet und mit 25 ml sterilen Wassers gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml einer TE/LiAc-Lösung (10 mM Tris/HCl, pH 8; 1 mM EDTA; 100 mM LiAc) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur konnten die so gewonnenen kompetenten Zellen direkt für die Transformation eingesetzt werden.

2.10.1.2 Transformation von *S. cerevisiae* mit rekombinanter DNA

Für die Transformation wurden pro Ansatz 100 µl der soeben beschriebenen Zellsuspension in ein Eppendorfcup überführt. Es wurden 10 µl Carrier-DNA (10 mg/ml), 5-15 µl zu transformierende DNA sowie 700 µl einer PEG/TE/LiAc-Lösung (40% PEG-4000; 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; 100 mM LiAc; pH 8,0) zugegeben. Die Carrier-DNA wurde unmittelbar vor Gebrauch für 20 min im Wasserbad gekocht und dann auf Eis abgeschreckt, um Einzelstränge zu erhalten. Der Transformationsansatz wurde kurz gevortext. Daraufhin wurden die Zellen bei 28 °C eine halbe Stunde inkubiert, 85 µl DMSO zugegeben und hitzeunempfindliche Zellen 7 min bei 42 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch 15-sekündige Zentrifugation geerntet. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen in TE (1X) gewaschen und in 500 µl TE aufgenommen. Zwischen 200 und 500 µl der Zellsuspension wurden auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert.

2.10.1.3 Transformationsmethode für genspezifische KanMX-Disruptionskassetten und Entfernen der KanMX-Kassette

Für die Transformation von Hefen mit Disruptionskassetten wurde - mit leichten Abänderungen - obiges Protokoll verwendet. Die eingesetzte DNA-Menge wurde so hoch eingesetzt, wie es die vorhandene Menge an DNA erlaubte. Vor dem Ausplattieren auf Platten mit Selektionsmedium wurde das Pellet in 2 ml YPD aufgenommen und 3 Stunden bei 28 °C geschüttelt, um die Geneticinresistenz, auf die später selektioniert wurde, auszubilden. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert, in 200 µl TE aufgenommen und der gesamte Transformationsansatz auf YPD-Platten mit 200 mg/ml Geneticin ausplattiert. Die Inkubation der Platten fand meist bei RT statt. Auf diesen Selektionsplatten wuchs nach etwa fünf Tagen ein Zellrasen mit wenigen größeren Kolonien, die nochmals auf YPD mit Geneticin ausgestrichen wurden und mit PCR analysiert wurden.

Zur Entfernung der KanMX-Disruptionskassette und damit der Resistenz gegen Geneticin wurden die disrumptierten Hefen mit dem Plasmid pSH47 transformiert. Dieses Plasmid enthält die *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle eines Gal4 Promoters und als Selektionsmarker das URA3-Gen. Von den transformierten Hefen wurde eine Kolonie gepickt, in 2 ml YPG 3h inkubiert und anschließend auf YPD-Platten ausplattiert. Der Verlust der KanMX-Kassette wurde durch Froggern auf YPD-Platten mit und ohne Geneticin kontrolliert. Um das Plasmid pSH47 wieder zu entfernen wurden aus logarithmisch wachsenden Hefekultur 300 Zellen auf YPD-FOA-Platten ausplattiert.

2.10.2 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae* wurden 5 ml einer Übernachtskultur durch 5-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm geerntet und mit 1 ml H₂O gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl Lysepuffer GP (100 mM Tris pH 8,0; 50 mM EDTA; 1% SDS) aufgenommen und nach Zugabe von ca. 500 µl Glasperlen 2 min. gevortext. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Anschließend wurden 275 µl 7 M Ammoniumacetat (pH 7) zugegeben, gemischt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden die Proteine durch Zugabe von 500 µl Chloroform extrahiert: Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 10.000 g zentrifugiert, die wässrige Phase in ein neues Eppendorfcup überführt, und die DNA durch Zugabe von 1 ml Isopropanol 5 min bei RT gefällt. Die DNA wurde 5 min bei 10.000 g abzentrifugiert, das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Schließlich wurde die DNA in 50 µl H₂O resuspendiert.

2.11 Zellbiologische Methoden bei *Saccharomyces cerevisiae*

2.11.1 Bestimmung der Zelldichte mit dem Zellzähler

Für die Bestimmung der Zelldichte mit dem Zellzähler wurde ein Aliquot von 200 µl steril aus der Kultur entnommen und je nach Dichte der Kultur eine erste Verdünnung von 1:10 bzw. 1:100 in Wasser hergestellt. Nach starkem Vortexen wurde in ein mit 10 ml CASYton gefülltes Messgefäß 10 µl einer sehr dünnen Kultur oder 100 µl einer Verdünnung zugegeben. Zum Durchmischen wurden die Gefäße verschlossen und dreimal auf den Kopf gestellt, um eine Durchmischung bei weitgehender Vermeidung von Gasblasen zu gewährleisten. Für die Messung wurde eine 60 µm Kapillare

verwendet und zweimal mit einem Volumen von 200 μl gemessen. Die Messung fand üblicherweise im Bereich von 1,4 μm bis 15 μm Zelldurchmesser statt. Bei entsprechender Einstellung des Geräts konnte die Zelldichte unmittelbar abgelesen werden.

2.11.2 Überlebensplattierung

Die Überlebensrate von Zellen in einer Hefekultur wurde durch Überlebensplattierung ermittelt. Dazu wurde ein Aliquot der Kultur entnommen und in einer Verdünnungsreihe von zwei Schritten auf insgesamt 1:1000 bzw. 1:10000 verdünnt. In der ersten Verdünnungsstufe oder aus dem verbleibenden Rest des Aliquots wurde die Zelldichte bestimmt. Daraus konnte berechnet werden, welches Volumen der zweiten Verdünnungsstufe 500 bzw. 1000 Zellen enthält. Dieses Volumen wurde auf YPD-Platten ausplattiert. Die Platten wurden zwei Tage bei 28 °C inkubiert und anschließend die Zahl der herangewachsenen Kolonien bestimmt. Diese Zahl gibt die Anzahl der lebenden Zellen pro plattierte Zellen an.

2.11.3 Bestimmung der Zellgrößenverteilung in Kulturen

Zur Bestimmung der Zellgrößenverteilung in Kulturen wurde wie oben beschrieben eine Zelldichtebestimmung mit dem Zellzähler vorgenommen. Durch unterschiedliche Einstellung des Messbereichs konnte die Zelldichte in kleineren Fenstern bestimmt werden und so ein Spektrum aufgenommen werden.

2.11.4 Induktion der Expression von Genen in Expressionsvektoren durch Galactose

Für die Expression der Gene, die sich in den Expressionsvektoren pYES2 bzw. pESC unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren Promotors Gal1 befinden, wurden die Stämme zunächst auf geeignetem Minimalmedium mit 2 % Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen. Für den Shift auf Galactose, durch den die Expression der Gene induziert wird, wurden die Zellen 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert und das glucosehaltige Medium verworfen. Die Zellen wurden anschließend in einem Kulturvolumen galactosehaltigen Mediums aufgenommen und darin weiter gezogen. Gegebenenfalls wurde an dieser Stelle zur Induktion von Apoptose 0,4 mM Wasserstoffperoxid zugesetzt. Es wurde auf Waschen der Zellen verzichtet, damit die so noch vorhandenen Glucosereste die Umstellung auf eine neue

Kohlenstoffquelle und ein Weiterwachsen in einem nicht-konditionierten Medium erleichtern.

2.11.5 Induktion von Apoptose durch Wasserstoffperoxid

Für die Induktion von Apoptose durch Wasserstoffperoxid wurden die Hefekulturen auf den entsprechenden Medien am Vorabend so angeimpft, dass sie am nächsten Morgen in der exponentiellen Wachstumsphase waren. Die Zellen wurden auf eine Dichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt und 3 h bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Dann wurde Wasserstoffperoxid mit einer Endkonzentration von 0,6 mM zugegeben und weitere 3 h inkubiert und schließlich die Zellen geerntet.

2.11.6 Induktion von Apoptose durch Temperaturstress

In Hefe gibt es einige temperatursensitive Mutanten, bei denen ein apoptotischer Phänotyp durch Kultivieren bei 37 °C hervorgerufen werden kann. Von einer Übernachtskultur wurde eine 20 ml Kultur auf eine OD_{600} von 0,2 angeimpft und bis zu einer OD von 0,4 weitergezogen. Von dieser Kultur wurde die eine Hälfte bei 28 °C weitergezogen, während die andere bei 37 °C kultiviert wurde. Nach einer, drei oder fünf Stunden wurde geerntet. Im Falle der temperatursensitiven Mutante KFY 437 wurde diese zunächst von Galactose auf Glucose geschiftet, 12 h oder 16 h bei 28 °C weiterkultiviert und danach noch eine oder vier Stunden bei 37 °C, um den apoptotischen Phänotyp noch zu verstärken.

2.11.7 Beschichtung von Objektträgern mit Polylysin

Die Beschichtung dient der besseren Haftung der Zellen auf den Objektträgern. Dazu wurden diese in einer wässrigen Detergenzlösung (mit N-Lauryl-Sarcosyl), dann in dH_2O und schließlich in Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden pro Fenster je 25 μ l einer 0,1% (w/v) Polylysinlösung pipettiert. Nach ungefähr 30 min Wartezeit wurde die verbleibende Polylysinlösung abgesaugt und die Objektträger erneut im Liegen getrocknet. Schließlich wurde dreimal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Die so vorbehandelten Objektträger wurden bei 4 °C gelagert und konnten direkt für das Aufbringen fixierter Zellen eingesetzt werden.

2.11.8 Fixierung von Zellen für den TUNEL-Test

Je nach Zelldichte der zu testenden Kultur wurde eine Probe von 1 bis 3 ml entnommen. Die Zellen wurden in der Tischzentrifuge bei 10.000 g Geschwindigkeit

ca. 30 s abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal in 500 µl Puffer B gewaschen und anschließend in 1 ml Puffer B aufgenommen. Nach Zugabe von 120 µl 37% Formaldehydlösung wurde gut gevortext und die Zellen zur Fixierung eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit je 500 µl Puffer B + 1,2 M Sorbitol gewaschen, um das Formaldehyd vollständig zu entfernen, und schließlich in 330 µl Puffer B + 1,2 M Sorbitol resuspendiert. Nun wurden 5 µl Lyticase (1000 U/ml) und 20 µl β-Glucuronidase/ Arylsulfatase zupipettiert. Für den Zellwandverdau wurde 2 Stunden bei 30 °C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation folgte ein Waschschriff mit 500 µl Puffer B + 1,2 M Sorbitol, wobei die Sphaeroblasten sehr vorsichtig durch Anschneiden des Eppendorfcups in Lösung gebracht wurden. Danach wurde erneut kurz zentrifugiert und das Zellpellet in 60 µl Puffer B + 1,2 M Sorbitol wie oben beschrieben resuspendiert. Je 30 µl der Suspension wurden auf ein Fenster des polylysinbeschichteten Objektträgers aufgetragen. Nach ungefähr 20 min wurde die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt. Die Objektträger wurden zum vollständigen Trocknen weitere 30 bis 60 min bei Raumtemperatur belassen und danach im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Bei dieser Temperatur sind die fixierten Zellen zwei bis drei Wochen haltbar. In diesem Zeitraum konnte eine TUNEL- bzw. DAPI-Färbung ohne Beeinträchtigung der Qualität der Färbung durchgeführt werden.

2.11.9 TUNEL-Test (In Situ Cell Death Detection Kit, POD)

Die TUNEL-Färbung wurde mit dem In Situ Cell Death Detection Kit und dem DAB Substrate/Metall enhanced der Firma Roche durchgeführt. Die T4 Terminale Desoxynukleotidyltransferase kann in fixierten, permeabilisierten Zellen mit Fluorescein markiertes dUTP an freie 3'-OH-Gruppen anhängen. Dies kann mit einem Peroxidase gekoppelten Antikörper durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden.

Vor der Färbung wurde jedes Fenster zweimal mit PBS gewaschen, um restliches Sorbitol zu entfernen. Im Anschluß wurden die Objektträger im Liegen getrocknet. Zur Zerstörung endogener Peroxidaseaktivität wurden die Objektträger dann während 30 min mit 0,3% Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde abgesaugt und die Objektträger getrocknet. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen. Nach Trocknen der Objektträger wurde für genau zwei min auf Eis mit Permeabilisierungslösung inkubiert. Danach wurde die Permeabilisierungslösung sofort abgesaugt und durch zweimaliges Waschen mit

PBS vollständig entfernt. In jedes Fenster auf dem Objektträger wurden nach dem Trocknen je 10 µl TUNEL-Reaktionsmix aufgetragen. Dieser wurde unmittelbar davor durch 1:10 Verdünnung der Enzyme Solution in der Label Solution hergestellt. Die Objektträger wurden für eine Stunde bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde dreimal mit PBS gewaschen und in jedes Fenster je 10 µl Converter-POD aufgetragen. Nach weiteren 30 min bei 37 °C in der feuchten Kammer wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen und schließlich 30 µl DAB-Substratlösung aufgetragen (1:10 Verdünnung von DAB Substrate/Metal enhanced in Peroxidpuffer). Die Farbreaktion wurde nach 10 min durch Absaugen des Substrates und dreimaliges Waschen in PBS gestoppt. Nach dem Trocknen der Objektträger wurde auf jedes Fenster ein kleiner Tropfen Kaiser-Gelatine gegeben und ein Deckglas aufgelegt. Die gefärbten Zellen konnten nach Aushärten der Gelatine bei 4 °C bis zu einer Woche gelagert werden. Die Auswertung des Tests erfolgte durch Betrachtung unter dem Lichtmikroskop.

2.11.10 Dihydrorhodamin 123 Färbung

Die Färbung mit Dihydrorhodamin 123 (DHR) dient der Detektion von Sauerstoffradikalen in der Zelle. Dabei wird DHR zu dem eigentlichen Fluorescensfarbstoff Rhodamin 123 oxidiert, weshalb die Zelle rot leuchtend erscheint. Pro Ansatz wurden 100 µl (sehr dichte Kultur) bis 400 µl (frühlogarithmische Kultur) einer Hefekultur mit PBS auf 1 ml aufgefüllt. Für die Färbung wurden 2 µl DHR 123 Lösung zugegeben und 2 h bei 28 °C im Dunkeln auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen kurz abzentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 30 µl abgenommen. Die verbleibende Zellsuspension wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.11.11 Annexin-Färbung

Durch den Annexin V-Test kann die Externalisierung von Phosphatidylserin, einem Apoptosemarker, nachgewiesen werden. Dazu wurden 100 µl bis 500 µl einer Hefeflüssigkultur entnommen, in Puffer B + 1,2 M Sorbitol gewaschen, in 330 µl Puffer B + 1,2 M Sorbitol resuspendiert und anschließend für den Zellwandverdau 2 Stunden bei 30°C mit 5 µl Lyticase (1000 Units/ml) und 20 µl Glucuronidase/Arylsulfatase inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Puffer C + 1,2 M Sorbitol gewaschen, in 20-50 µl Puffer C + 1,2 M Sorbitol resuspendiert, davon 10 µl entnommen und mit 2 µl GFP-Annexin V und 1 µl Propidiumiodid (1:30 verdünnt) 20

min im Dunkeln bei RT inkubiert. Auf einem Objektträger konnten die Zellen dann unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

2.11.12 Messung der Caspaseaktivität mit FITC-VAD-fmk im FACS

Die Messung der Caspaseaktivität wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Wesselborg, Medizinische Fakultät der Universität Tübingen, durchgeführt.

Zur Messung der Caspaseaktivität wurde ein an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelter Caspaseinhibitor verwendet (Protokoll nach Madeo *et al.*, 2002a). Aus einer Hefeflüssigkultur wurden ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen entnommen und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml PBS-Puffer gewaschen und mit 200 μ l FITC-VAD-fmk Färbelösung 20 min bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit 500 μ l PBS-Puffer gewaschen und in 200 μ l PBS-Puffer aufgenommen. Die Messung der relativen Fluoreszenzintensität erfolgte durchflußcytometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Emission wurde zwischen 525 nm und 550 nm (Filter FL1) gemessen.

2.11.13 Messung der Änderung von delta psi mit DiOC₆ im FACS

Bei dem Farbstoff DiOC₆ handelt es sich um ein lipophiles Carbocyanin, das in der Lage ist membranumschlossene Zellkompartiment anzufärben. Mitochondrien können den Farbstoff nur aufnehmen, solange das Mitochondrienpotential aufrecht erhalten wird. Durch das Waschen in Puffer mit hohem Chloridgehalt wird die Anfärbung der gesamten Zelle verhindert. Als Kontrolle für die Anfärbung von Mitochondrien wird CCCP verwendet, das das Mitochondrienpotential enkopplelt.

Für die FACS-Messung wurden OD 0,4 jeder Kultur genommen, die Zellen abzentrifugiert, einmal in Waschpuffer gewaschen und in 1 ml Waschpuffer resuspendiert. Zur Entkopplung wurden 20 μ l der CCCP Lösung beziehungsweise 20 μ l DMSO als Kontrolle zugegeben und 20 min im Brutraum inkubiert. Anschließend wurden 400 μ l der Zellsuspension entnommen und 100 μ l einer 1:100 Verdünnung der DiOC₆-Stammlösung zugegeben. Nach weiteren 10 min Inkubation konnten die Proben im FACS-Gerät gemessen werden.

2.11.14 Tüpfeltest

Für den Tüpfeltest, einem schnellen Test für Überleben auf verschiedenen Kulturmedien, wird Hefe von einer drei Tage alten Platte genommen und in dH₂O auf OD₆₀₀ = 1 einstellen. In einer Froggerplatte wird nacheinander die unverdünnte

Suspension, eine 1:10-, 1:100-, 1:1000-, 1:10000- und eine 1:100000-fache Verdünnung der Suspension mit je gleichen Volumina hergestellt. Anschließend werden die Verdünnungsreihen mit dem Froggerstempel auf Kulturplatten aufgebracht.

2.11.15 Synchronisierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Synchronisierung von *S. cerevisiae* wurde von Übernachtskultur auf $1 \cdot 10^6$ angeimpft. Nach 3 h Wachstum wurden die Zellen kurz mit Ultraschall behandelt (10 s, Stufe 2) und danach die Zelldichte bestimmt. Bei einer Zelldichte von $7 \cdot 10^7$ Zellen/ml wurde 5 µg/ml α-Faktor (1 µg/µl in EtOH) zu der Kultur gegeben. Das Fortschreiten der Synchronisierung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und nach ca. 90 min, als die meisten Zellen groß und ohne Knospe waren, durch Abzentrifugieren gestoppt. Die Hefen wurden einmal in temperiertem Medium gewaschen und danach in gleichem Kulturvolumen an temperiertem Medium aufgenommen. Aus der Hefekultur wurde alle 7,5 min je 1 ml in Reagenzgläser überführt und mit 0,2 bzw. 0,4 mM Peroxid belastet. Während drei Stunden wurden die Zellen belastet und möglichst exakt nach 3 h entnommen und ausplattiert. Alle 15 min wurden Zellen mit Formaldehyd schnellfixiert, indem 100 µl Zellsuspension 8,8% 37% Formaldehyd-Lösung zugegeben wurde. Die Suspension wurde bis zur Weiterverwendung auf Eis gelagert. Die Budding-Indizes wurden unter dem Mikroskop ausgezählt: Es wurden ca. 200 Zellen gezählt, von denen die Anzahl sowie die Größe der Knospen bestimmt wurde.

2.12 Proteinbiochemische Methoden

2.12.1 Gewinnung von Rohextrakten aus *Saccharomyces cerevisiae*

Je nach Dichte der Kulturen wurden zwischen 20 ml und 50 ml 5 min bei ca. 4000g abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Dann wurden die Zellen in 1 ml eiskalten Lysepuffers aufgenommen und in ein dickwandiges Reagenzglas überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 3000 rpm wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Zu den Zellpellets wurde etwa das doppelte Volumen an Glasperlen gegeben und 4 min auf höchster Stufe gevortext. Das entstandene Lysat wurde sofort auf Eis gestellt und je nach eingesetzter Zellmenge in 200 bis 400 µl eisgekühlten Lysepuffers aufgenommen. Hierauf wurde nochmals kurz gevortext. Mit einer 1000 µl Eppendorf-Pipette wurde der so erhaltene Rohextrakt von den

Glasperlen abgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfcup überführt und 15 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Die Lipidphase und das Pellet wurden verworfen. Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurde ein Aliquot von 10 µl entnommen und 1:100 mit Wasser verdünnt; das restliche Rohextrakt wurde bei – 80 °C gelagert.

2.12.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff Serva Blau G-250 bindet unspezifisch an Proteine, wobei sich sein Absorptionsmaximum verschiebt. Die Extinktion bei 595 nm lässt sich daher zur Bestimmung der Proteinkonzentration heranziehen (Bradford, 1976). Zur Durchführung der Proteinbestimmung wurden zwischen 5 µl und 20 µl Rohextrakt mit 700 µl Bradfordreagenz versetzt und in eine ELISA-Platte je 300 µl pro Vertiefung pipettiert (Doppelbestimmung). Im ELISA-Reader wurde die Extinktion der Proben bestimmt. Mit Hilfe einer Eichreihe aus Proben mit bekannter BSA Konzentration konnte aus der Extinktion die Proteinkonzentration berechnet werden.

2.12.3 Messung der Caspaseaktivität in vitro

Die Bestimmung der Caspase-Aktivität erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Wesselborg, Medizinische Fakultät der Universität Tübingen, nach einem Protokoll von Lauber *et al.* (2001). Rohextrakte wurden mit Lysepuffer anhand der berechneten Proteinkonzentration auf die gleiche Proteinmenge eingestellt (300 µg Protein pro 50 µl, insgesamt 100 µl pro zu messender Substanz). Für die Bestimmung wurde ein Reaktionsmix hergestellt aus 2,6 ml Reaktionspuffer, 2,6 ml H₂O, 69 µl DTT-Lösung und 7,2 µl Substrat (VEID oder IETD). 50 µl der verdünnten Lysate wurden in 96-Well Mikrotiterplatten zu je 150 µl Reaktionsmix gegeben. Der Verlauf der Reaktion wurde in einem ELISA-Reader für Fluoreszenzmessungen fluorimetrisch bestimmt. Aus der Fluoreszenzänderung über die Zeit lässt sich die Caspase-Aktivität im entsprechenden Rohextrakt ermitteln.

2.12.4 Chemische Lyse

Die chemische Lyse ist eine schnelle Methode, um Hefeextrakte für die Expressionskontrolle von Proteinen zu erhalten. Allerdings ist hierbei keine Proteinbestimmung möglich.

Für die chemische Lyse wurden 3 OD₆₀₀ einer Kultur entnommen, abzentrifugiert und mit 1 ml H₂O gewaschen. Die Zellen wurden in 150 µl Lysepuffer CL aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 150 µl 55% TCA zugegeben und weitere

10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine 10 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert und die Überstände verworfen. Das Proteinpellet wurde in 300 µl Harnstoffpuffer aufgenommen, 10 min bei 65 °C erhitzt und anschließend noch mal 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Bei Bedarf wurde der pH-Wert noch mit untitriertem 2 M Tris eingestellt. Für die Gelelektrophorese wurden 30 µl des Überstands eingesetzt.

2.12.5 Mitochondrienisolierung aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Mitochondrien fand nach einem modifizierten Protokoll von Daum *et al.* (1982) statt. Hierzu wurden 1-2 l einer Hefeflüssigkultur durch fünfminütige Zentrifugation bei 4000 rpm geerntet und in 50 ml 1,2 M Sorbitol gewaschen. Danach wurde das Gewicht des nassen Zellpellets bestimmt und pro 10 g Zellen 30 ml Permeabilisierungslösung zugegeben und resuspendiert. Die Suspension wurde so lange bei 37 °C inkubiert, bis die meisten Zellen sphäroblastiert waren. Zum Abstoppen der Reaktion wurde bis zum Volumen von 50 ml 1,2 M Sorbitol hinzugefügt und 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschgängen mit 1,2 M Sorbitol wurden die Sphäroblasten in Aufschlußlösung resuspendiert (30 ml pro 10 g anfängliches Zellpellet) und im Douncer auf Eis mit 40 Hüben aufgeschlossen. Zur Entfernung von Zelldebris wurde zunächst 10 min bei 2500 rpm und 4 °C zentrifugiert, das Pellet verworfen und mit dem Überstand die Zentrifugation wiederholt. Der so erhaltene Überstand wurde 15 min bei 12.000 rpm und 4 °C im SS34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation entspricht dem Cytosol und wurde bei -80 °C eingefroren. Das Mitochondrienpellet wurde noch zweimal mit Mitochondrienwaschlösung durch 15minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4 °C gewaschen und ebenfalls bei -80 °C eingefroren. Für die Proteinbestimmung wurde vor dem Einfrieren von jeder Fraktion ein 10 µl Aliquot abgenommen und getrennt eingefroren.

2.12.6 Pulldown mit α -Flag-Antikörper gekoppelter Agarose

Für den Pulldown mit α -Flag-Antikörper gekoppelter Agarose wurde am gleichen Tag Heferohextrakte hergestellt. Hierfür wurde der Lysepuffer PD für Rohextrakte ohne DTT verwendet. Die Proteinkonzentration der Rohextrakte wurde nach Bradford bestimmt und auf eine Konzentration von 2000 µg in 970 µl eingestellt.

Die Beads wurden aufgeschüttelt und ca. 40 µl pro Probenansatz wurden entnommen und mit der fünffachen Menge TBS gewaschen, indem bei 10.000 rpm und 4 °C 5 sec die Beads abzentrifugiert wurden und der Überstand vorsichtig abgenommen wurde. Anschließend wurden die Beads in etwas weniger als einem Volumen TBS aufgenommen und pro Ansatz 30 µl zu den Proben gegeben. Die Proben wurden mit den Beads 2 Stunden bei 4 °C rotiert und anschließend bei 10.000 rpm und 4 °C 5 sec abzentrifugiert und dreimal mit TBS gewaschen. Die Waschschriffe wurden gekühlt aufbewahrt. Zuletzt wurde mit 100 µl Elutionspuffer PD 5 min bei 4 °C rotiert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfcup überführt und 10 µl Tris pH 9 zur Neutralisation zugegeben. Für die anschließende SDS-Page mit Westernblot wurden je 100 µl Überstand bzw. 100 µl Waschschriff mit 20 µl Lämmli (6X) versetzt und 30 min bei 100 °C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte auf einem 12% Proteingel.

2.12.7 SDS Polyacrylamidelektrophorese

Für die Gelelektrophorese von Proteinen wurde die Methode der diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE nach Lämmli (1970)) angewandt.

Minigele wurden für die Coomassie Färbung von Proteinen verwendet, Midigele für die anschließende Immunoblotanalyse. Es wurden Gele mit Proteinkonzentrationen von 12% oder 15% eingesetzt oder ein Gradientengel von 8% bis 15% in Laufrichtung ansteigend. Für das Gießen des Trenngels wurde 10,4 ml Trenngelpuffer und zwischen 10,7 ml (8%) und 20 ml (15%) einer Acrylamidstammlösung gemischt und mit dH₂O auf 40 ml aufgefüllt. Zum Start der Polymerisation wurden 16 µl TEMED und 400 µl APS zugegeben. Das Trenngel wurde für die Polymerisation mit Wasser überschichtet. Das Sammelgel hatte eine Acrylamidkonzentration von 5% und wurde mit 3,4 ml Acrylamidstammlösung und 2,7 ml Sammelgelpuffer angesetzt und mit Wasser auf 20 ml aufgefüllt. Für die Polymerisation wurde 20 µl TEMED und 200 µl APS zugegeben. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gestellt und geladen. Hierfür wurden die Proben 5:1 mit 6X Probenauftragungspuffer versetzt und 10 min auf 100°C erhitzt. Die Auftrennung auf dem Gel erfolgte bei 50 V übernacht (Midigele) bzw. 100 V für 1,5 h (Minigele), jeweils bis die Bromphenolblaufront den unteren Gelrand erreicht hatte.

2.12.8 Coomassie Gelfärbung

Die Coomassiefärbung wurde als Ladungskontrolle für Gele durchgeführt, da der Bradford Proteintest durch unterschiedliche Anteile an Lipiden in den Proben oft nicht hinreichend genau ist. Für die Färbung wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung 1,5 min in der Mikrowelle erhitzt, danach kurz mit dH₂O gespült und mit Entfärbelösung erneut 1,5 min in der Mikrowelle erhitzt. Die Entfärbung wurde so oft durchgeführt, bis deutliche Banden auf dem Gel zu erkennen waren.

2.12.9 Immunoblot

2.12.9.1 Semi-dry Transfer

Zur immunologischen Detektion wurden die Proteine nach der SDS-PAGE auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Zu jedem Gel wurden je eine Nitrocellulosemembran und sechs Blätter Whatman 3MM-Papier auf passende Größe zugeschnitten und mit Blot-Puffer getränkt. Die Elektroblopparatur wurde ebenfalls mit Blot-Puffer befeuchtet, und zwischen Anode und Kathode wurden in folgender Reihenfolge drei Blätter Whatman Papier, Nitrocellulosemembran, Polyacrylamidgel und nochmals drei Blätter Whatman Papier luftblasenfrei übereinandergelegt. Der Proteintransport fand bei konstanter Stromstärke von 400 mA während 45 min statt. Anschließend wurden zur Kontrolle des Transfers die Proteine mit Ponceau S Lösung vorübergehend angefärbt.

2.12.9.2 Immunologische Entwicklung

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 1 h bei RT mit 5% Milchpulver in TBS inkubiert. Danach wurde die Membran kurz dreimal mit TBS-T gewaschen und mit dem ersten Antikörper 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran vier bis fünfmal mit TBS-T gewaschen und 1 h mit dem zweiten Peroxidase-gekoppelten monoklonalen Antikörper inkubiert (1:4000 in TBS-Tween mit 5% Milchpulver). Nach weiteren sechs bis acht Waschschritten mit TBS-T wurde die Membran mit ECL entwickelt.

2.12.9.3 Entwicklung mit dem ECL System

Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe auf der Membran wurde das Enhanced Chemiluminescence (ECL) System eingesetzt. Gleiche Volumina der Reagenzien ECL-1 und ECL-2, wurden im Verhältnis 1:1 mit dH₂O verdünnt und unmittelbar vor Gebrauch zusammengegeben. Die Membran wurde damit 1 min bei RT inkubiert und anschließend luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweißt. In der Dunkelkammer wurde ein Film mit der Membran zwischen einer und fünf min belichtet und mittels Entwicklungsmaschine entwickelt.

3 Ergebnisse

3.1 Cytochrom c als möglicher Mediator von Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae*

Cytochrom c ist das zentrale Molekül eines der wichtigsten Apoptosewege in Säugerzellen. Auch in Zellen von *S. cerevisiae* wurden unter verschiedenen apoptotischen Bedingungen die Ausschüttung von Cytochrom c nachgewiesen. Mit den nachfolgenden Experimenten soll ermittelt werden, ob Cytochrom c in der durch Wasserstoffperoxid ausgelösten Apoptosekaskade eine ebenso zentrale Rolle einnimmt. Im Gegensatz zu Säugerzellen besitzt *S. cerevisiae* zwei Isoformen von Cytochrom c, die zu 80% identisch sind und deren unterschiedliche Expression von der Sauerstoffkonzentration abhängig ist (Burke *et al.*, 1997). CYC1 wird bei hohen Sauerstoffkonzentrationen – also aerob – exprimiert, wohingegen CYC7 unter hypoxischen Bedingungen exprimiert wird. Überdies unterscheiden sich die beiden Isoformen in ihrer Proteinstabilität: Cyc7p wird weniger schnell abgebaut als Cyc1p (Dumont *et al.*, 1990), was vor allem auch für die Apo-Proteine gilt.

3.1.1 Zugabe von Cytochrom c als Apoptoseauslöser bzw. Aktivator von Caspasen

Ein Versuch, ohne vorhergehende molekularbiologische Arbeiten Ergebnisse zu erzielen, ist die Inkubation von ganzen Zellen bzw. Zellextrakten mit Cytochrom c. Bei *S. cerevisiae* sind einige Transporter in der äußeren Zellmembran bekannt (als Beispiel: Holst *et al.*, 2000, Casal *et al.*, 1999), und einige Substanzen wie Ethanol sind auch in der Lage, die Zellmembran via Diffusion direkt zu überwinden. Allerdings ist für Cytochrom c kein Transportmechanismus bekannt, was unter Umständen ein Hindernis bei diesem Versuchsansatz sein könnte; außerdem kann so nicht zwischen den beiden Isoformen von Cytochrom c unterschieden werden.

3.1.1.1 Verringerte Überlebensfähigkeit bei Inkubation eines YCA1-Überexprimierers mit Cytochrom c

Zunächst wurde versucht, durch direkte Zugabe von Cytochrom c die Apoptose in *S. cerevisiae* auszulösen. Hierfür wurde ein aus Hefe aufgereinigtes Cytochrom c verwendet, das 70% der reduzierten Form enthält. Überdies wurden für diesen Versuch Hefestämme verwendet, die die Hefecaspase Yca1p überexprimieren und

bei denen durch Belastung mit Wasserstoffperoxid Apoptose ausgelöst werden kann (Madeo *et al.*, 2002a). Die Hefestämme KFY571 (KFY715 Yep52/YCA1) und KFY572 (KFY715 Yep52) wurden übernacht auf SD-Leu angezogen und dann auf $OD_{600} = 0,05$ verdünnt. Bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,4 - 0,5$ wurden die Stämme zur Induktion der Expression auf Galactosehaltiges SG -Leu-Medium geschiftet und auf Reagenzgläser verteilt (je 2 ml). Es wurden direkt 2 μ l einer 100 mM Cytochrom c Lösung zugegeben (0,1 mM), nach 22 h wurden 0,8 mM H_2O_2 zugegeben und nach insgesamt 26 h wurde die Zelldichte bestimmt und ausplattiert. Bei diesem Versuch zeigte sich keinerlei Unterschied zwischen Kulturen mit oder ohne Cytochrom c bzw. mit oder ohne H_2O_2 ; in nachfolgenden Versuchen wurden daher die Konzentrationen erhöht.

Der gleiche Versuchsansatz wurde mit den Cytochrom c Konzentrationen von 1 mM beim Shift (0 h) und 2 mM bzw. 4 mM nach 22 h durchgeführt; überdies wurde auch beim Shift (0 h) H_2O_2 zu einer Konzentration von 0,4 mM und nach 22 h zu einer Konzentration von 1,6 mM zugegeben. Insgesamt 26 h nach dem Shift wurde ausplattiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1 angezeigt.

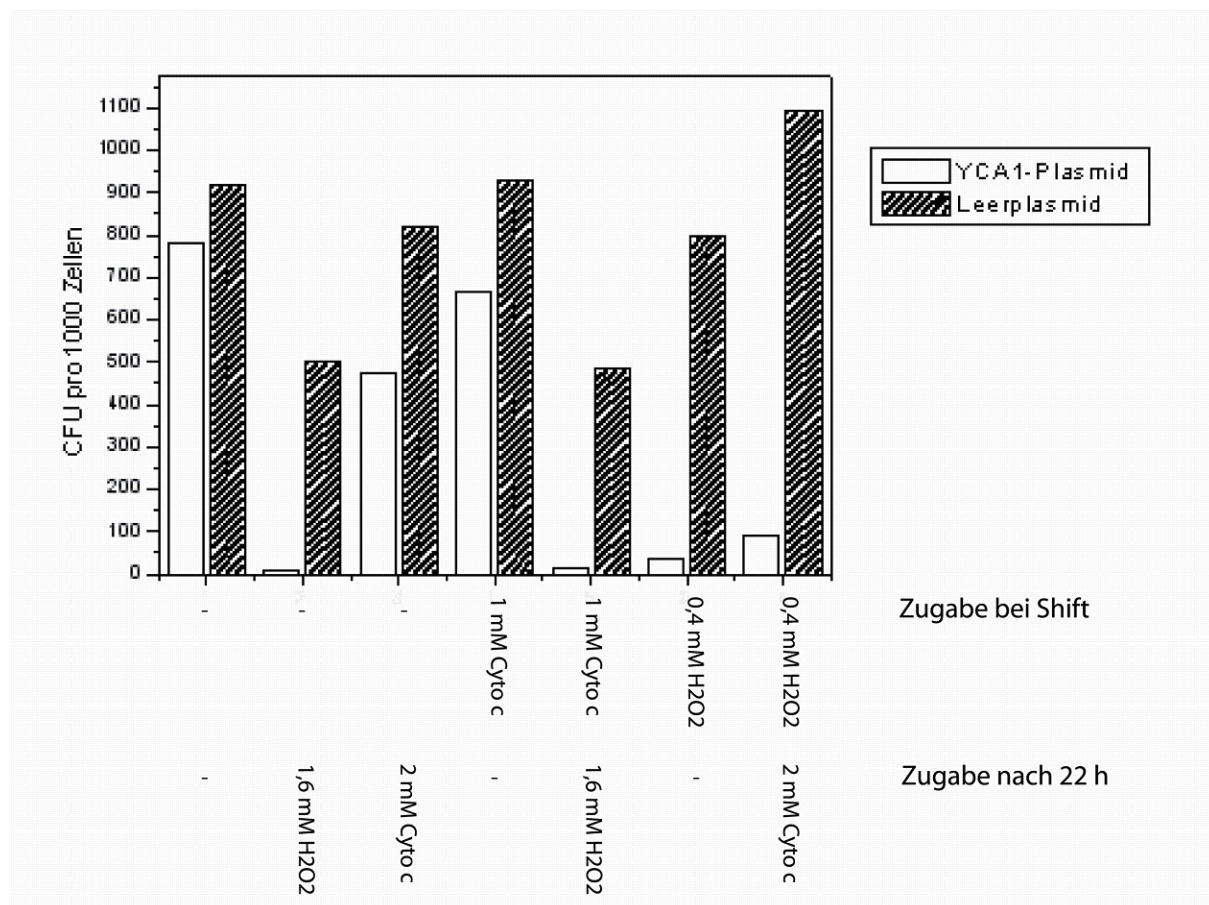


Abbildung 3.1: Überlebensplattierung von FMY 571 (BY 4741 Yep52/YCA1) und FMY 572 (BY 4741 Yep52) mit und ohne Cytochrom c bzw. mit und ohne H_2O_2 .

Insgesamt überlebt der Hefestamm KFY 571, der die Hefecaspase YCA1 überexprimiert, unter allen Bedingungen schlechter als der Kontrollhefestamm KFY 572 mit Leerplasmid. Die Gabe von Cytochrom c alleine hat keinen so starken Effekt auf das Überleben der Hefestämme wie die Belastung mit Wasserstoffperoxid. Dieser Versuch wurde nur einmal durchgeführt. Um die Wirkung von Cytochrom c auf die Überlebensfähigkeit von Hefe näher zu untersuchen, wurden die beiden Isoformen von Cytochrom c in Hefe in einen Überexpressionsvektor kloniert.

3.1.1.2 *In vitro* Caspase-messung mit Zugabe von Cytochrom c

Die Aktivierung von Caspasen kann durch die Inkubation von Rohextrakten mit fluorogenen Caspasesubstraten wie IETD und VEID gemessen werden. Aktive Caspasen binden diese Substrate und verändern so die Fluoreszenzintensität – welche photometrisch ermittelt werden kann.

Cytochrom c selbst ist durch die Häm-Gruppe ein intensiver Farbstoff (wie auch an der roten Farbe der Lösung zu erkennen ist) und stört die Messung empfindlich; es waren daher keine brauchbaren Ergebnisse aus diesem Versuch zu gewinnen (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Überexpression der beiden Isoformen von Cytochrom c im Wildtyp bzw. *yca1Δ* Hintergrund

Bei der Zugabe von Cytochrom c zu *Yca1p*-überexprimierenden Hefestämmen konnte gezeigt werden, dass zumindest ein gewisser Effekt auf die Überlebensfähigkeit von Hefe erzielt werden kann. Um diesen Effekt genetisch zu untersuchen, wurden die beiden unterschiedlichen Isoformen von Cytochrom c in den Hefeüberexpressionsvektor pYES2 kloniert. Die so entstandenen Plasmide wurden sowohl in den Wildtyphefestamm BY 4741 als auch in die entsprechende Nullmutante der Hefecaspase *yca1Δ* transformiert.

3.1.2.1 Zelltod infolge von Überexpression von *Cyc1p*

In dem Vektor pYES2 befinden sich die beiden Isoformen von Cytochrom c unter der Kontrolle eines GAL1-Promotors, weshalb die Expression von Cytochrom c durch Shift auf galactosehaltiges Medium induziert wurde. Die Hefestämme wurden übernacht auf SD -URA-Medium angezogen und dann auf eine OD_{600} von 0,1 verdünnt. Bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,4$ wurden die Kulturen auf SG -URA-Medium geshiftet und mit 0,4 mM H_2O_2 belastet. Nach 20 h wurden die Kulturen

geerntet und 500 Zellen auf YPD-Platten ausplattiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Cyc1p, nicht aber die Überexpression von Cyc7p zu verminderter Überlebensfähigkeit und geringerer Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid führt.

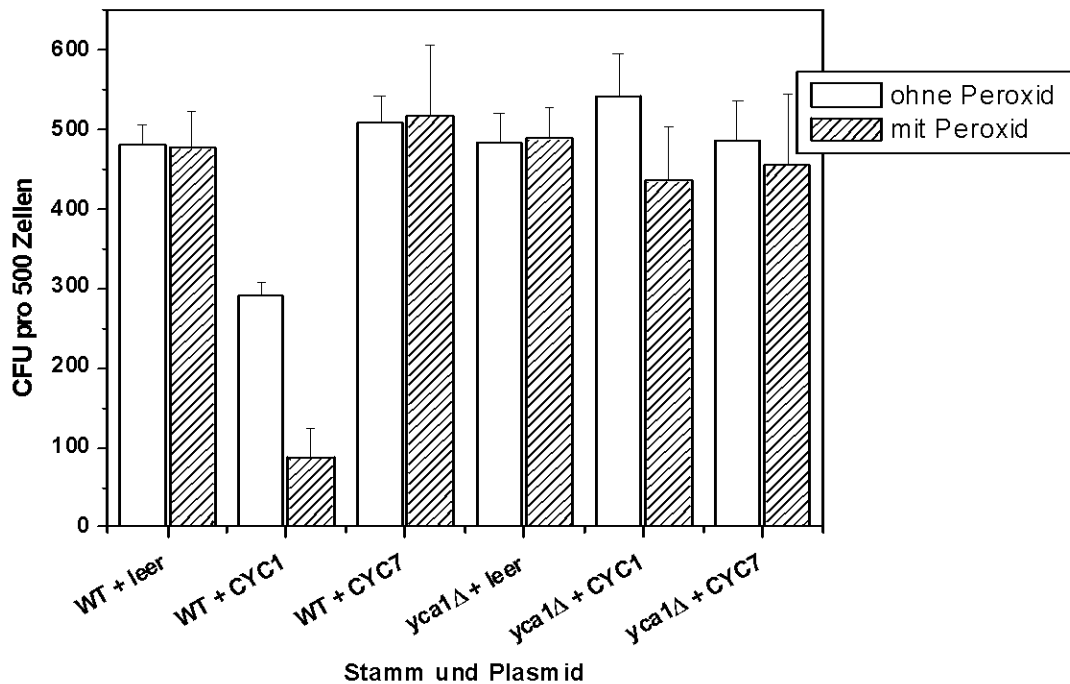


Abbildung 3.2: Überexpression von Cyc1p bzw. Cyc7p in WT und *yca1Δ* Stämmen ohne bzw. mit 0,4 mM Wasserstoffperoxid. Es sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen gezeigt.

3.1.2.2 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei Überexpression von Cytochrom c

Da, wie oben schon erwähnt, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ein Merkmal der Hefeapoptose ist (Madeo *et al.*, 1999) und überdies bei alternden Hefezellen die Mitochondrien als Quelle derselben identifiziert wurden (Laun *et al.*, 2001), sollte bei Cytochrom c Überexpression die Bildung von Sauerstoffradikalen untersucht werden. Die Hefestämme wurden wie oben beschrieben angezogen und 20 h nach Shift mit einer DHR-Färbung auf die Akkumulation von ROS untersucht. Die DHR-Färbung ergab mehr Sauerstoffradikale in der *yca1Δ* Nullmutante im Vergleich zum WT sowohl bei Cyc1p als auch bei Cyc7p Überexpression, allerdings nicht bei den Leerplasmidkontrollen.

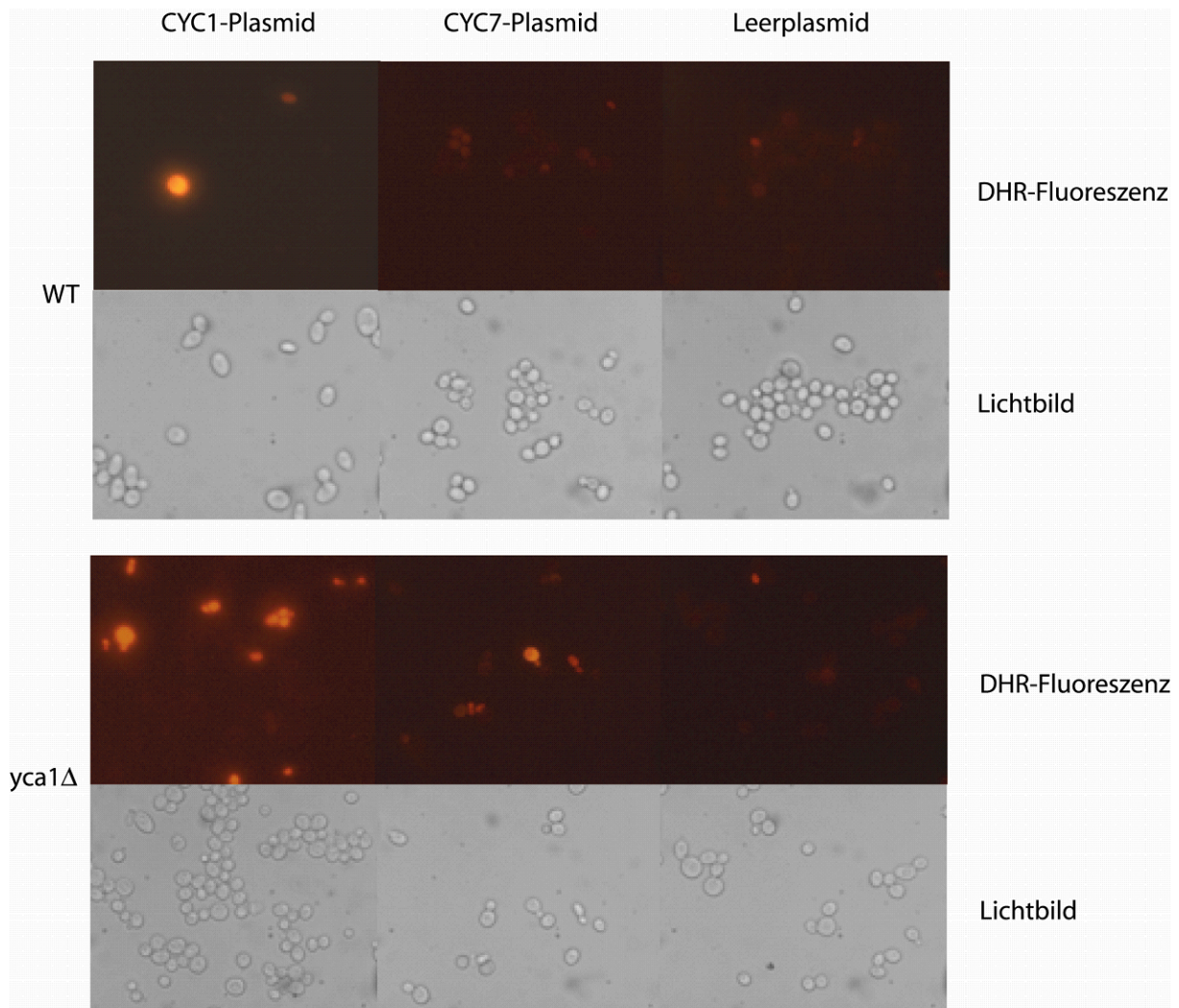


Abbildung 3.3: DHR-Färbung von WT und *yca1Δ* Nullmutante bei Cyc1p bzw. Cyc7p Überexpression

Insgesamt sind bei WT mit Cyc1p Überexpression sehr wenige DHR-positive Zellen zu sehen, die dafür aber sehr stark gefärbt sind; bei der entsprechenden Leerplasmid-Kontrolle sind etwas mehr gefärbte, dafür aber deutlich weniger stark gefärbte Zellen zu sehen.

3.1.2.3 DNA-Strangbrüche und Chromatinkondensation bei Überexpression von Cytochrom c

DNA Strangbrüche sind charakteristische morphologische Merkmale der Apoptose, die durch den sogenannten TUNEL-Test nachgewiesen werden können. Wie oben beschrieben wurden die Zellen angezogen und nach 20 h geerntet. Die TUNEL-Färbung der Cyc1p exprimierenden Hefen bei Wasserstoffperoxidbelastung ist deutlich zu sehen. Überdies ist zu erkennen, dass bei Cyc1p Überexpression und gleichzeitiger Belastung mit Wasserstoffperoxid die Zellen stark vergrößert sind. Alle

anderen Stämme zeigen auch bei Belastung mit Wasserstoffperoxid keine TUNEL-positiven Zellen.

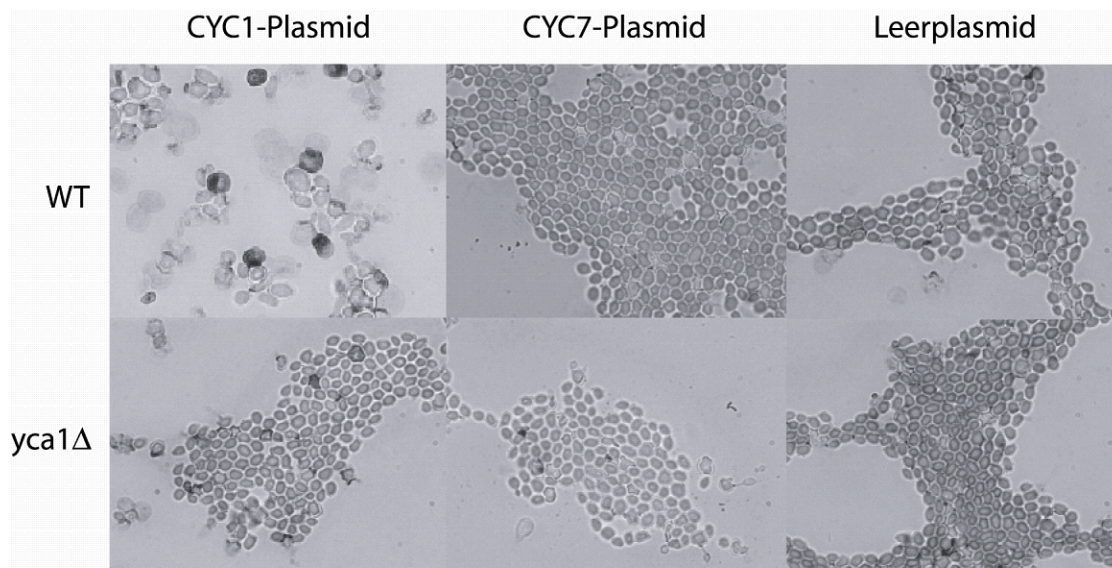


Abbildung 3.4: TUNEL-Färbung von WT und *yca1Δ* Nullmutante bei Cyc1p bzw. Cyc7p Überexpression

3.1.3 Fazit: Überexpression von Cyc1p, nicht aber von Cyc7p, führt in Zusammenhang mit Sauerstoffstress zu Apoptose

Durch die Überexpression der unter aeroben Bedingungen exprimierten Isoform von Cytochrom c Cyc1p sowie der unter hypoxischen Bedingungen exprimierten Isoform Cyc7p konnte gezeigt werden, dass Cyc1p in Zusammenhang mit Sauerstoffstress, ausgelöst durch Gabe von Wasserstoffperoxid, in der Lage ist, Zelltod auszulösen, was auch durch die TUNEL-Anfärbung bestätigt wird. Die Expression beider Isoformen von Cytochrom c kann in *S. cerevisiae* die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies auslösen. Dies deutet darauf hin, dass die Apoptose in Hefe, ebenso wie in Säugerzellen stark reguliert ist und die Zellen auch bei Aufweisen morphologischer Merkmale der Apoptose noch überleben können.

3.2 Die Rolle von Cytochrom c bei der durch die Hefecaspase YCA1 ausgelösten Apoptose in *S. cerevisiae*

Madeo *et al.* konnten 2002(a) zeigen, dass die zur Gruppe der Metacaspasen gehörende Hefecaspase Yca1p eine wichtige Rolle in der Hefeapoptose spielt. Ihre Überexpression führt zu Apoptose, und ihre Deletion kann vor apoptoseinduzierenden Einflüssen schützen. In den nachfolgenden Kapiteln soll genauer untersucht werden, ob Cytochrom c tatsächlich an der durch Yca1p ausgelösten Apoptosekaskade beteiligt ist.

3.2.1 Überexpression der Hefecaspase Yca1p in Disruptanten der beiden Isoformen von Cytochrom c

Die Deletion von einer der beiden Isoformen von Cytochrom c führt, wie oben beschrieben, nicht zu einer Erhöhung der Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid. Da Sauerstoffstress nicht nur als Induktor, sondern auch als Merkmal der Hefeapoptose fungiert (Madeo *et al.*, 1999), besteht die Möglichkeit, dass Cytochrom c zu einem früheren Zeitpunkt an der Apoptosekaskade beteiligt ist. Daher wurde ein YCA1-Überexpressionsplasmid in Nullmutanten der beiden Isoformen von Cytochrom c transformiert.

3.2.1.1 Überlebensplattierung von WT, *cyc1Δ* und *cyc7Δ* mit YCA1-Überexpressionsplasmid und Leerplasmid

Zur Überexpression von der Hefecaspase Yca1p in dem Hefestamm BY 4741 und den entsprechenden Deletionsmutanten wurde der Vektor pESC-His/YCA1, in dem die Caspase unter der Kontrolle eines Gal10-Promotors steht und c-terminal FLAG-getaggt ist, und der entsprechende Leervektor pESC-His als Kontrolle verwendet. Zunächst wurden die Hefestämme übernacht in SD -His-Medium angezogen. Es wurde auf $OD_{600} = 0,1$ verdünnt und bei OD_{600} zwischen 0,4 und 0,5 auf SG -His-Medium geschiftet. Nach 20 h wurde geerntet, die Zelldichte bestimmt und je 500 Zellen auf YPD-Platten ausplattiert. Dieser Versuch wurde achtmal unabhängig durchgeführt.

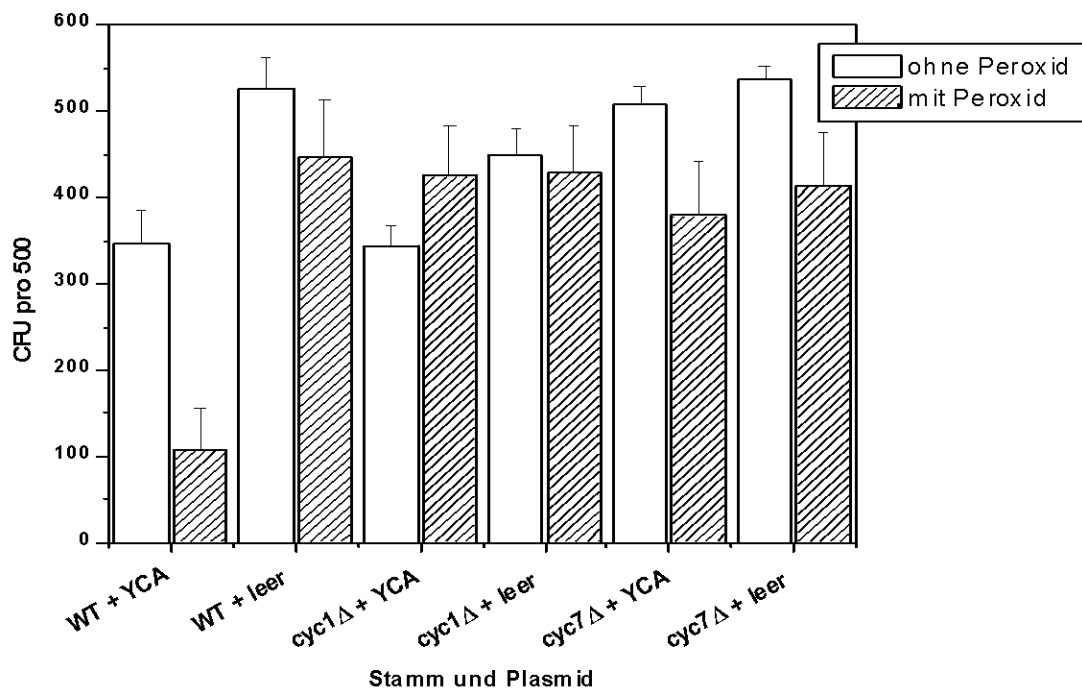


Abbildung 3.5: Überlebensrate von *cyc1Δ* und *cyc7Δ* Nullmutanten bei Yca1p Überexpression mit und ohne 0,4 mM H₂O₂. Es sind die Mittelwerte aus acht unabhängigen Versuchen gezeigt.

Deutlich erkennbar ist eine insgesamt verminderte Lebensfähigkeit der *cyc1Δ* Mutante. Allerdings wird diese durch die Expression von Yca1p nur sehr wenig und durch die Gabe von Wasserstoffperoxid gar nicht beeinträchtigt. Die *cyc7Δ* Mutante zeigt eine leicht verminderte Überlebensfähigkeit bei Expression von Yca1p und gleichzeitiger Gabe von H₂O₂, was allerdings nicht vergleichbar mit dem Absterben des WT mit Yca1p bzw. WT mit Yca1p und H₂O₂ ist.

3.2.1.2 Keine erhöhte Caspaseaktivität bei Yca1p Überexpression in Nullmutanten der beiden Isoformen von Cytochrom c

Da wir bisher davon ausgehen, dass die Hefecaspase Yca1p sowohl als Initiator- als auch als Effektorcaspase wirkt, sollte durch die Messung der Caspaseaktivität in Nullmutanten von Cytochrom c gezeigt werden, ob auch ohne Cytochrom c noch Caspaseaktivierung stattfinden kann.

Die Hefen wurden wie im vorigen Kapitel beschrieben angezogen und nach 20 h geerntet. Ungefähr $5 \cdot 10^6$ Zellen wurden pro Stamm für die Messung der Caspaseaktivierung mit Hilfe von FITC-VAD im FACS-Gerät eingesetzt. Die Messung wurde zweimal unabhängig durchgeführt.

A:

Hefestamm	%	Hefestamm	%	Hefestamm	%
WT Yca1p:	13,22	<i>Cyc1Δ</i> Yca1p:	6,20	<i>cyc7Δ</i> Yca1p:	5,95
WT Yca1p + H ₂ O ₂ :	29,29	<i>Cyc1Δ</i> Yca1p + H ₂ O ₂ :	7,87	<i>cyc7Δ</i> Yca1p + H ₂ O ₂ :	7,08
WT leer:	1,51	<i>Cyc1Δ</i> leer:	3,52	<i>cyc7Δ</i> leer:	2,61
WT leer + H ₂ O ₂ :	9,54	<i>Cyc1Δ</i> leer + H ₂ O ₂ :	2,03	<i>cyc7Δ</i> leer + H ₂ O ₂ :	1,88

B:

Hefestamm	%	Hefestamm	%	Hefestamm	%
WT Yca1p:	10,23	<i>Cyc1Δ</i> Yca1p:	9,61	<i>cyc7Δ</i> Yca1p:	5,22
WT Yca1p + H ₂ O ₂ :	27,11	<i>Cyc1Δ</i> Yca1p + H ₂ O ₂ :	7,38	<i>cyc7Δ</i> Yca1p + H ₂ O ₂ :	8,40
WT leer:	4,49	<i>Cyc1Δ</i> leer:	3,10	<i>cyc7Δ</i> leer:	1,17
WT leer + H ₂ O ₂ :	3,69	<i>Cyc1Δ</i> leer + H ₂ O ₂ :	5,61	<i>cyc7Δ</i> leer + H ₂ O ₂ :	3,75

Tabelle 3.1: Messungen der Caspaseaktivität bei Cytochrom c Nullmutanten mit Yca1p Überexpression; Angaben in Prozent der FACS-positiven Zellen an den insgesamt gemessenen Zellen. A und B repräsentieren zwei unabhängige Messungen; leer: pESC-His Kontrollplasmid; Yca1p: pESC-His/YCA1-Plasmid

Entsprechend den Überlebensplattierungen zeigt sich auch bei der Messung der Caspaseaktivität, dass die Deletion von einer der beiden Isoformen von Cytochrom c zu besserem Überleben und damit einhergehend verminderter Caspasaktivierung führt.

3.2.1.3 Kontrolle der Expression von Yca1p in den Deletionsmutanten

Teilweise führt die Disruption oder Deletion bestimmter Gene zu einer verminderten Expression einzelner Proteine. Um dies festzustellen, wurden von den Hefestämmen FMY 17 (WT+pESC-His/YCA1), FMY 44 (*cyc1*Δ+ pESC-His/YCA1) und FMY 46 (*cyc7*Δ+ pESC-His/YCA1) 20 h nach dem Shift auf Galactose mit und ohne Wasserstoffperoxid Rohextrakte hergestellt. Nach Messen der Proteinkonzentration und Angleichen derselben wurde mit Hilfe eines α-Flag-Antikörpers bei der SDS-Page mit Westernblot die Menge an Yca1p in den einzelnen Stämmen unter diesen Bedingungen ermittelt:

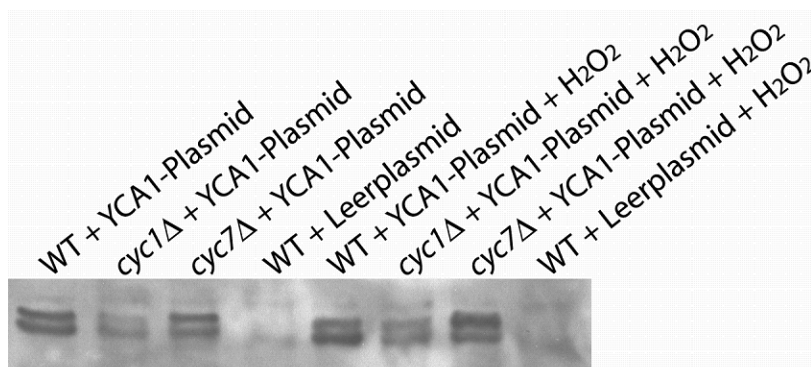


Abbildung 3.6: Kontrolle der Expression von Yca1p in Cytochrom c Deletionsmutanten: Westernblot gegen das Flag-Epitop nach zwanzigstündiger Induktion auf Galactosehaltigem Selektionsmedium. Es wurden gleiche Mengen (50 µg pro Spur) an zellulärem Protein geladen.

Deutlich zu sehen ist die verringerte Menge an Yca1p in der *cyc1*Δ Nullmutante. Demzufolge ist anzunehmen, dass der rettende Effekt der *cyc1*Δ Nullmutante zumindest teilweise auf der verringerten Caspase menge in diesem Stamm beruht. Daher wurde genauer untersucht, ob die verringerte Proteinmenge durch eine verringerte mRNA-Menge oder durch eine herabgesetzte Proteinstabilität verursacht wird.

3.2.1.4 Bestimmung der YCA1 mRNA Mengen in WT, *cyc1Δ* und *cyc7Δ* mit Überexpressionsplasmid

Diese Untersuchung wurde von Dr. Helmut Jungwirth durchgeführt.

Um festzustellen, ob die unterschiedlichen Proteinmengen von Yca1p in WT und *cyc1Δ* Stämmen mit pESC-His/YCA1-Plasmid auf unterschiedliche Proteinstabilität zurückzuführen ist, wurde aus diesen Stämmen unter den Bedingungen der Überlebensplattierungen RNA isoliert und ein Northernblot durchgeführt. Es wurde eine YCA1-Sonde und eine ACT1-Sonde als Kontrolle eingesetzt.

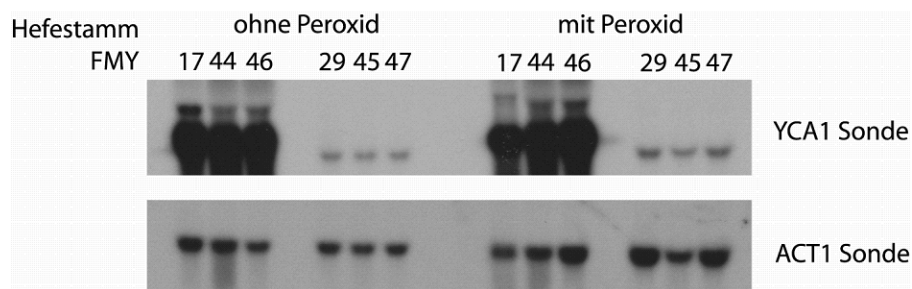


Abbildung 3.7: Northernblot mit YCA1- und ACT1-Sonden zur Bestimmung der mRNA Mengen von YCA1 in WT, *cyc1Δ* und *cyc7Δ* Stämmen. FMY17: WT mit YCA1-Plasmid; FMY 44: *cyc1Δ* mit YCA1-Plasmid; FMY46: *cyc7Δ* mit YCA1-Plasmid; FMY 29: WT mit Leerplasmid; FMY45: *cyc1Δ* mit Leerplasmid; FMY47: *cyc7Δ* mit Leerplasmid

In allen Stämmen findet sich im Vergleich zwischen YCA1- und ACT1-Sonde gleich viel mRNA. Dies weist darauf hin, dass im *cyc1Δ* Stamm die Hefecaspase Yca1p vermehrt abgebaut wird.

3.2.1.5 Angleichen der Expression von Yca1p in WT und *cyc1Δ*

Die Expression von Proteinen unter einem Galactosepromotor wird durch Glucose reprimiert. Daher wurde versucht, durch unterschiedliche Anteile von Glucose und Galactose im Medium die Expression von Yca1p im WT und in der *cyc1Δ* Mutante anzugleichen. Hierzu wurden die beiden Stämme wie zuvor beschrieben übernacht in Flüssigkultur angezogen und dann auf $OD_{600} = 0,1$ verdünnt und bei einer Kulturdichte von $OD_{600} = 0,4 - 0,5$ geshiftet. Der Stamm FMY 44 (*cyc1Δ* + pESC-His/YCA1) wurde auf SG -His-Medium geshiftet (enthält 2% Galactose). Der Stamm FMY 17 (WT + pESC-His/YCA1) wurde auf Medien mit unterschiedlichen Glucose- und Galactoseanteilen geshiftet: 0% Galactose und 2% Glucose; 0,4% Galactose und 1,6% Glucose; 1% Galactose und 1% Glucose bzw. 1,6% Galactose und 0,4%

Glucose. Wie bei obigem Versuch wurden nach 20 h von allen Proben Rohextrakte hergestellt und mittels SDS-Page und Westernblot ausgewertet.

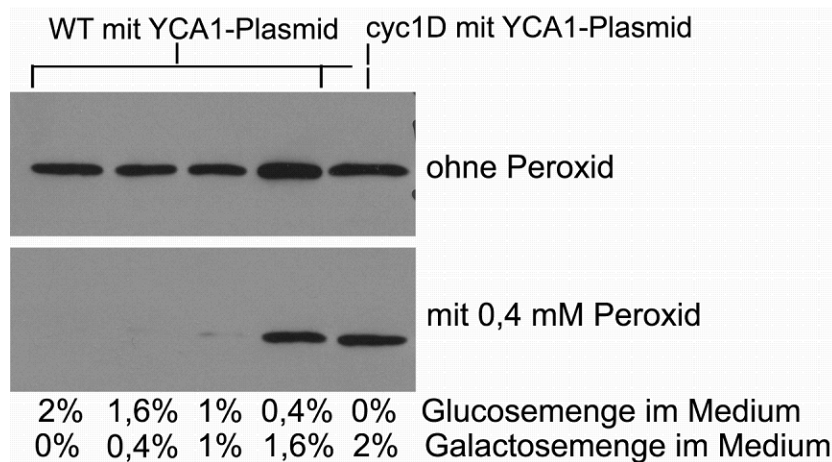


Abbildung 3.8: Westernblot mit α -Flag-Antikörper zur Kontrolle der Expression von Yca1p im WT bei unterschiedlichen Mengen von Galactose im Medium mit und ohne H_2O_2 . Es wurden pro Spur 50 μ g Protein geladen.

Es zeigt sich, dass die Caspase im WT bei geringen Galactosemengen weniger exprimiert wird und bei Zugabe von H_2O_2 letztlich ganz abgebaut wird. Bei 1% Glucose und 1% Galactose entspricht die Expression der Caspase im WT der bei 2% Galactose im *cyc1Δ* Stamm. Unter Stressbedingungen mit 0,4 mM H_2O_2 Belastung entspricht die Konzentration der Caspase im WT bei 1,6% Galactose und 0,4% Glucose der im *cyc1Δ* Stamm. Demnach gibt es keine Konzentration an Galactose, bei der die Caspase im WT und im *cyc1Δ* Hintergrund sowohl ohne als auch mit Peroxid gleich gut exprimiert wird.

3.2.1.6 Fazit: Deletion von Cytochrom c Genen führt zu verminderter Apoptose in Yca1p überexprimierenden Hefestämmen

Die Deletion einer der beiden Isoformen von Cytochrom c führt in Yca1p überexprimierenden Stämmen zu verminderter Caspaseaktivität und weniger Absterben bei Belastung mit Wasserstoffperoxid. In *cyc1Δ* Nullmutanten wird überdies die Hefecaspase Yca1p vermehrt abgebaut. Dies zeigt, dass für die durch die Hefecaspase Yca1p ausgelöste und vermittelte Apoptose Cytochrom c von Bedeutung ist, vergleichbar mit der Apoptose in Säugerzellen. Nachfolgend soll erörtert werden, ob zwischen Cytochrom c und Yca1p eine direkte Interaktion besteht, analog des Apoptosoms in der Säugerzellapoptose.

3.2.2 Untersuchung von Kooperation und Interaktion von Yca1p und Cytochrom c in Hefe

Um den Zusammenhang von Cytochrom c und der Hefecaspase Yca1p näher zu untersuchen, soll einerseits eine Interaktion untersucht werden und andererseits durch Koüberexpression ein Zusammenwirken festgestellt werden.

3.2.2.1 Keine direkte Interaktion zwischen Cytochrom c und Yca1p

Um die Interaktion von Cytochrom c und Yca1p zu untersuchen, wurden von verschiedenen Hefestämmen, die Yca1p c-terminal Flag-getaggt überexprimieren, Rohextrakte hergestellt und die Hefecaspase mittels α -Flag-Antikörper gekoppelter Agarose gebunden. Nach drei aufeinanderfolgenden Waschschrritten wurde die Caspase wieder eluiert und das Eluat sowie die Waschschrritte mittels SDS-Page und Westernblot auf ihren Gehalt an Yca1p bzw. Cytochrom c analysiert. Bei allen Caspase-überexprimierenden Stämmen konnten die charakteristischen Doppelbanden im Eluat detektiert werden. Cytochrom c fand sich bei allen Proben im ersten Waschschrritt (ohne Abbildung). Eine starke Interaktion zwischen Cytochrom c und der Caspase Yca1p in Hefe scheint somit ausgeschlossen.

3.2.2.2 Coüberexpression der Hefecaspase Yca1p und der einzelnen Isoformen von Cytochrom c

Die Überexpression von Yca1p zusammen mit Cyc1p bzw. Cyc7p jeweils unter der Kontrolle eines induzierbaren Gal-Promotors sollte ein Zusammenwirken der Proteine bei der Hefeapoptose zeigen. Zunächst wurden die beiden Cytochrom c-Überexpressionsplasmide in einen Hefestamm transformiert, der bereits das YCA1-Überexpressionsplasmid enthielt bzw. den entsprechenden Leervektor. Die Stämme wurden übernacht (20h) in SD -Ura -His-Medium angezogen und ein Tüpfeltest auf YPD-Platten sowie auf SD -Ura -His-Platten und SG -Ura -His-Platten durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Yca1p-überexprimierenden Stämme so stark abstarben, dass kein Unterschied zu den Cytochrom c-coüberexprimierenden Stämmen bzw. dem entsprechenden Leerplasmid als Kontrolle zu erkennen war (ohne Abbildung). Da der Hefestamm FMY 17 (WT mit pESC-His/YCA-Flag), in den die Cytochrom c Überexpressionsplasmide transformiert wurden, durch häufiges Ausstreichen einige Auftau- und Einfrierphasen mitgemacht hatte und dadurch zusätzlich sensibler sein könnte, wurden umgekehrt die Plasmide pFM 16 (pESC-His) und pFM 21 (pESC-His/YCA1-Flag) in Cytochrom c überexprimierende Hefen transformiert. Diese

Hefestämme wurden wieder auf SD -Ura -His-Medium (20h) und auf SG -Ura -His-Medium (26h) angezogen. Anschließend wurde ein Tüpfeltest durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Hefen, die Yca1p und Cyc1p überexprimieren, etwas weniger gut anwachsen im Vergleich zu den entsprechenden Stämmen mit Leerplasmid. Insgesamt scheint der Einfluss der Hefecaspase auf die Überlebensfähigkeit bei diesen Versuchen jedoch größer als der der beiden Isoformen von Cytochrom c.

3.2.2.3 Keine verstärkte Expression von Yca1p bei Überexpression von Cytochrom c

In Kapitel 3.2.1.4 wurde beschrieben, dass die Proteinstabilität von Yca1p durch die Deletion von CYC1 verringert wird. Daher sollte festgestellt werden, ob umgekehrt, eine Überexpression von Cytochrom c die Proteinstabilität erhöht. Hierfür wurde ein Hefestamm, in dem die Hefecaspase YCA1 chromosomal HA-getaggt ist (FMY20), mit den Überexpressionsplasmiden der beiden Isoformen von Cytochrom c transformiert. Die Stämme wurden auf SD-Medium angezogen, auf SG-Medium geshiftet und 20 h später geerntet. Bei der anschließenden SDS-Page mit Westernblot zeigte sich, dass die Expression von Yca1p unabhängig von der Proteinmenge von Cyc1p bzw. Cyc7p ist.

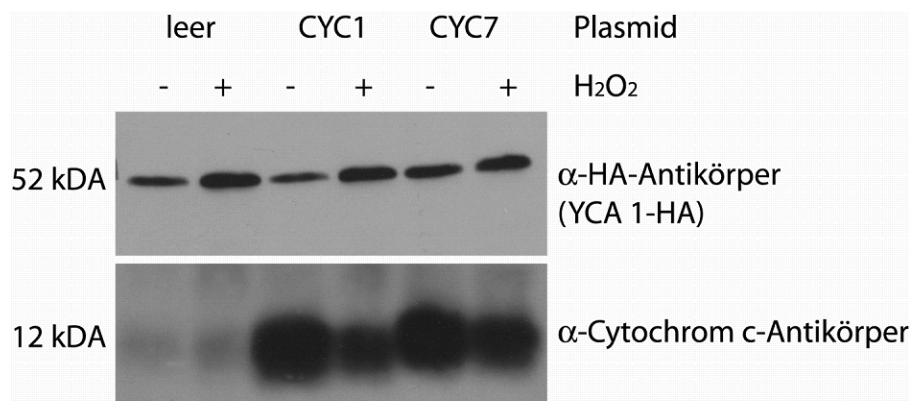


Abbildung 3.9: Westernblot zur endogenen Expression der Caspase bei Überexpression von Cytochrom c.

Zwischen den einzelnen Stämmen mit unterschiedlichen Plasmiden besteht bei der Expression der Caspase kein Unterschied. Auffällig ist allerdings, dass die Menge an endogener Caspase bei Sauerstoffstress zunimmt, wohingegen die Menge an Cytochrom c, das plasmidisch exprimiert wird, abnimmt. Es wäre interessant, dieses Phänomen weiter zu untersuchen.

3.2.3 Mitochondriale Beteiligung bei der Hefeapoptose

Ein wesentliches Merkmal der mitochondrienvermittelten Apoptose in Säugerzellen ist die Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Da die Überexpression von Cytochrom c, wie oben gezeigt zu Apoptose in Hefe führt und die Hefecaspase nicht in der Lage ist, ohne die beiden Isoformen von Cytochrom c zu töten, war zu untersuchen, ob bei der durch die Überexpression von Yca1p ausgelösten Apoptose die Ausschüttung von Cytochrom c nachgewiesen werden kann.

3.2.3.1 Cytochrom c Ausschüttung bei Yca1p-Überexpression

Eine gute Möglichkeit, die Ausschüttung von Cytochrom c qualitativ zu untersuchen ist die Zellfraktionierung. Dabei werden Mitochondrien und Cytosol getrennt und mittels SDS-Page und Westernblot auf den Gehalt an Cytochrom c untersucht.

Da sich bei der Überexpression von Yca1p mit gleichzeitiger Belastung mit Wasserstoffperoxid nach 26 h Inkubation die morphologischen Merkmale der Apoptose zeigen und die Ausschüttung von Cytochrom c vor der Aktivierung einer Caspasekaskade steht, wurde die Zellfraktionierung nach 20 h Inkubation durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass bei Überexpression von Yca1p Cytochrom c aus den Mitochondrien verschwindet. Allerdings ließ sich im Cytosol kein Cytochrom c nachweisen. Die Isolierung von Mitochondrien bei Yca1p-Überexpression und gleichzeitiger Belastung mit Wasserstoffperoxid ergab keine nachweisbaren Proteinmengen.

Um festzustellen, ob Cytochrom c schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt ausgeschüttet und eventuell später im Cytosol degradiert wird, wurde die Zellfraktionierung 6 h nach der Induktion der Expression der Hefecaspase durchgeführt. Es zeigte sich, dass zu diesem frühen Zeitpunkt sowohl in den Mitochondrien von Yca1p-überexprimierenden Hefen weniger Cytochrom c, als auch im Cytosol mehr Cytochrom c war als im Kontrollstamm mit Leerplasmid.

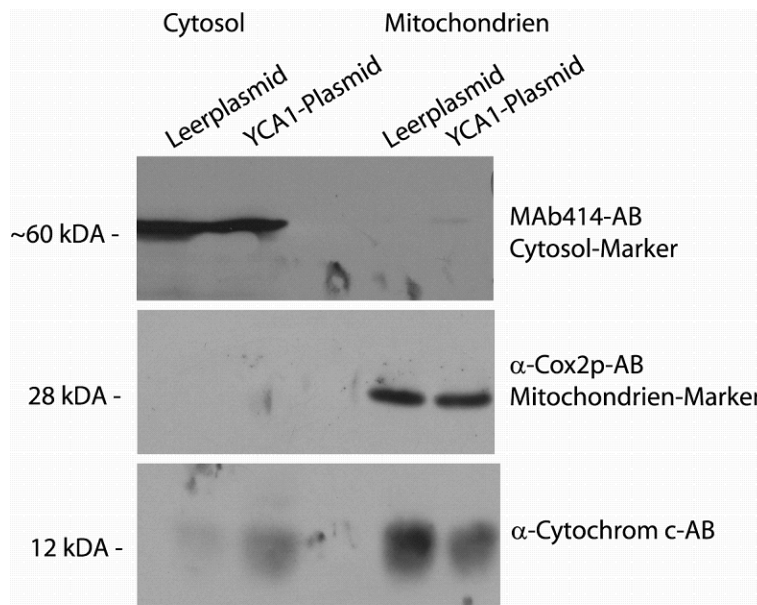


Abbildung 3.10: Westernblot von Mitochondrien- und Cytosolfractionen von Yca1p-überexprimierenden Hefen und einem Kontrollstamm. Proteinmenge: Mitochondrien:ca. 20 µg; Cytosol: ca. 60 µg.

Als Kontrolle für die Qualität der Fraktionierung wurden als Mitochondrienmarker ein Anti-Cox2p-Antikörper und als Cytosolmarker MAb414 eingesetzt.

3.2.3.2 Morphologie der Hefezellen und der Mitochondrien bei Yca1p-Überexpression

Um die Morphologie der Mitochondrien bei der Yca1p-Überexpression zu untersuchen, wurde ein zweites Plasmid in die Hefestämme FMY 17 und FMY 29 transformiert. Dabei handelt es sich um ein Plasmid, in dem sich DsRed (ein roter Fluoreszenzfarbstoff) mit einer Mitochondrienlokalisationssequenz befindet und dieses Konstrukt unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht (pFM129). Die Hefen wurden wie beschrieben bei einer OD_{600} von 0,4 auf SG-Medium geschiftet, um die Expression der Caspase zu induzieren, und gleichzeitig mit 0,4 mM H_2O_2 belastet. Nach 20 h wurden die Zellen geerntet und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

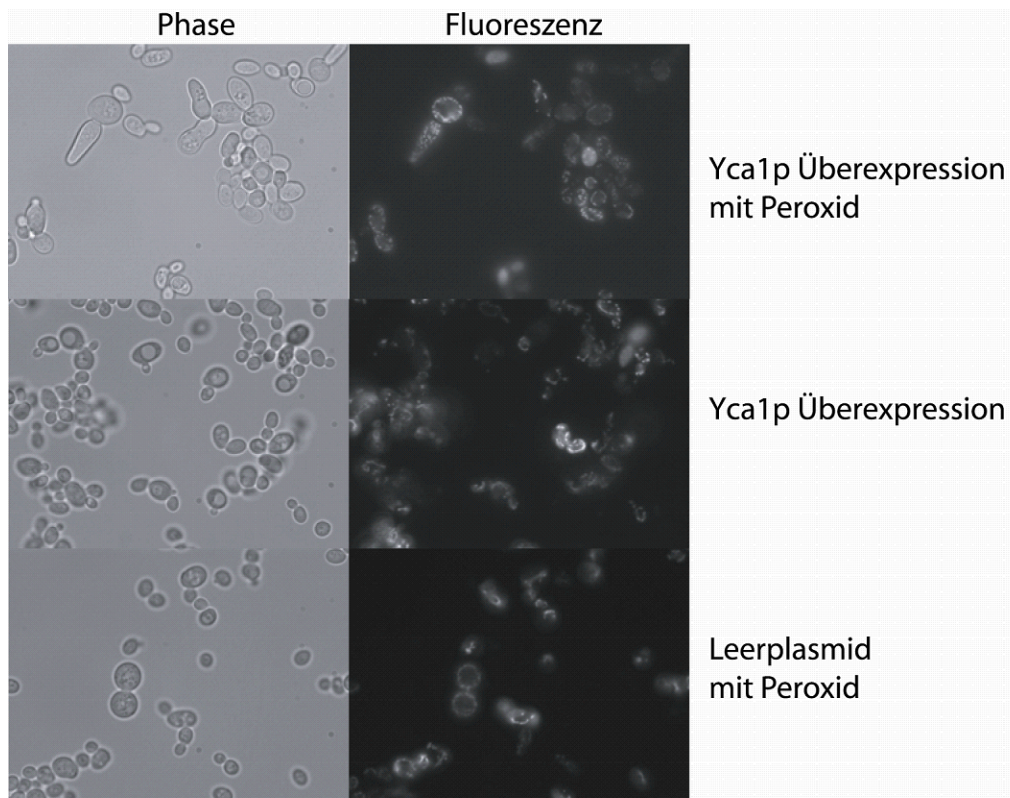


Abbildung 3.11: Fluoreszenzmikroskopie der Mitochondrien von Yca1p-überexprimierenden Hefen mit und ohne Peroxid, sowie Leerplasmid als Kontrolle.

Auffällig sind einerseits die Größe der Zellen mit YCA1-Plasmid und andererseits die außergewöhnlichen Formen der Knospen. Die Mitochondrien scheinen im Gegensatz zu den anderen Hefen über die gesamte Zelle verteilt und etwas zahlreicher zu sein. Die Proben mit Leerplasmid ohne Peroxid sind denen mit Peroxid ähnlich.

3.2.3.3 Keine mitochondriale Lokalisation von Yca1p

Um eine mögliche Interaktion der Hefecaspase Yca1p mit Mitochondrien zu eruieren, sollte mit dem Hefestamm FMY 486, der ein Plasmid mit dem N-terminalen Bereich von Yca1p an GFP getaggt enthält, die Lokalisation der Caspase ermittelt werden. Hierzu wurde zusätzlich das in Kapitel 3.2.3.2 beschriebene Plasmid pFM 129 zur Markierung der Mitochondrien in die Hefe transformiert. Wie oben beschrieben wurden die Hefen geschiftet und mit Peroxid belastet und nach weiteren 20 h geerntet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte sich, dass nur wenige Zellen beide Plasmide exprimieren und dass keine Kollokalisierung der beiden Fluoreszenzen zu sehen ist:

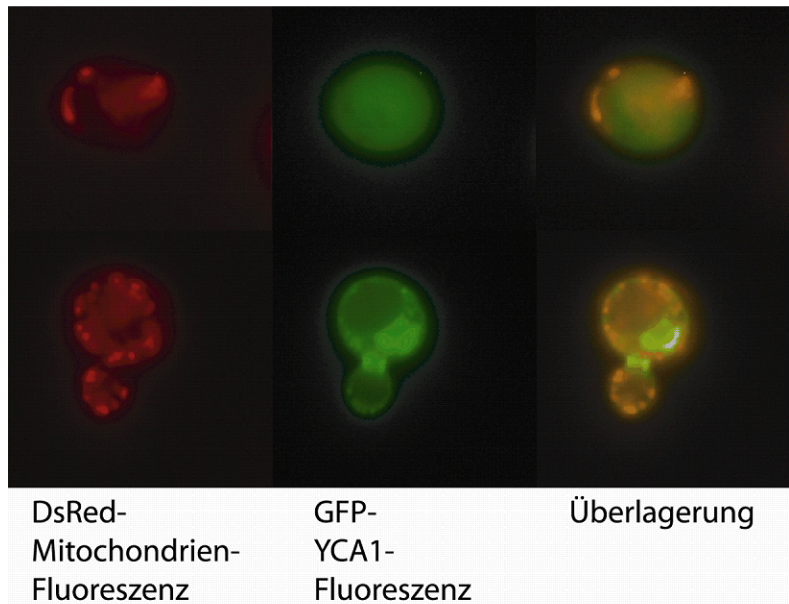


Abbildung 3.12: WT-Hefen mit YCA1(1-155)-EGFP-Plamid (grün) und Plamid pFM129 (DsRed mit Mitochondrienlokalisationssequenz) (rot) nach Belastung mit 0,5 mM Peroxid.

Die Caspase befindet sich anscheinend hauptsächlich im Bereich des Zellkerns und am Knospenhals. Auffällig ist die normale Form der Hefen im Vergleich zu den Überexpressionsstämmen, die die gesamte Caspase überexprimieren (siehe 3.2.3.2, Abbildung 3.11).

3.2.3.4 Messung des Mitochondrienpotentials bei Yca1p-Überexpression

Bei der Säugerzellapoptose erfolgen neben der Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien noch weitere Veränderungen der Mitochondrien, unter anderem die Öffnung eines Kanals in der inneren Mitochondrienmembran, die sogenannte Permeability Transition Pore (PTP). Diese Öffnung geht einher mit der Zerstörung der mitochondrialen Membranpotentials. Die Messung dieses Potentials kann über Farbstoffe erfolgen, die nur bei intaktem Membranpotential im Mitochondrium verbleiben; anschließend kann die Anzahl der Zellen mit intaktem Membranpotential versus der Zellen mit entkoppeltem Membranpotential im FACS-Gerät ermittelt werden. Als Kontrolle wurden die Stämme mit CCCP inkubiert, was zu einer künstlichen Entkopplung der Mitochondrien führt.

Probe	Zeit nach Shift	gefärbt	ungefärbt (entkoppelt)
WT leer	3,5 h	76,96	23,25
WT Yca1p	3,5 h	33,09	67,13
WT leer	6 h	94,03	6,02
WT Yca1p	6 h	81,23	18,87
WT leer	20 h	94,29	5,8
WT Yca1p	20 h	74,23	25,89

Tabelle 3.2: Bestimmung des Mitochondrienpotentials bei Yca1p-überexprimierenden Hefen. Angaben in Prozent der im FACS gemessenen Zellen; leer: pESC-His Leerplasmid; Yca1p: pESC-His/YCA1-Plasmid

Die hohe Anzahl der entkoppelten Zellen schon 3,5 h nach dem Shift lässt darauf schließen, dass der Shift an sich schon einen großen Stress für die Zellen darstellt und sie sich nach dieser Zeit noch nicht an das neue Medium und die neue Kohlenstoffquelle adaptiert haben. Eine zum gleichen Zeitpunkt durchgeführte Überlebensplattierung ergab, dass die Überlebensrate sowohl bei dem Überexpressionsstamm als auch bei dem Kontrollstamm sehr gering war (Daten nicht gezeigt). Mitochondrienpotentialmessungen mit Stämmen, die mit Wasserstoffperoxid belastet waren, zeigten, dass unter diesen Bedingungen keine Entkopplung mehr möglich ist und daher davon auszugehen ist, dass in diesem Fall nicht die Mitochondrien angefärbt wurden.

3.2.4 Fazit: Abhängigkeit der Hefeapoptose durch Yca1p-Überexpression von Cytochrom c

Yca1p-Überexpression mit gleichzeitigem Sauerstoffstress führt in den Nullmutanten von CYC1 bzw. CYC7 nicht mehr zu Apoptose. Dies zeigt sich auch in den in vivo Messungen der Caspaseaktivität, die in beiden Deletionsstammhintergründen sehr gering ist. Außerdem lässt sich bei Yca1p-Überexpression eine Cytochrom c Ausschüttung aus den Mitochondrien sowie eine Entkopplung des Mitochondrienpotentials nachweisen. Jedoch zeigte sich, dass bei keiner der beiden Isoformen von Cytochrom c eine direkte Interaktion mit der Caspase existiert. Die Überexpression von Yca1p bei gleichzeitigem Sauerstoffstress führt zu starken Veränderungen der Zellmorphologie und der Verteilung der Mitochondrien. Allerdings ist die Hefecaspase nicht unmittelbar an den Mitochondrien lokalisiert. Insgesamt

zeigt sich hier, dass die über die Hefecaspase Yca1p ausgelöste Apoptose durch Cytochrom c vermittelt wird.

3.3 Mitochondriale Beteiligung bei einer konstitutiv apoptotischen CDC48-Mutante

Cdc48p ist ein Zellzyklusprotein, dem eine große Bedeutung bei der homotypischen Fusion des endoplasmatischen Retikulums zukommt (Latterich *et al.*, 1995). Im Jahr 1997 beschrieben Madeo *et al.* eine Mutante dieses Zellzyklusgens, die apoptotische Merkmale aufweist. Der apoptotische Phänotyp lässt sich durch Shift von Galactose- auf Glucosemedium und Temperaturstress noch verstärken. Unter diesen Bedingungen wurde eine Proteomanalyse der apoptotischen Mutante (S2G) versus die entsprechende Hefe mit unmutiertem CDC48 (ECCC) durchgeführt. Dabei zeigten sich besonders viele Veränderungen bei mitochondrialen Proteinen (Ralf Braun persönliche Mitteilung). Daher sollte bei diesem Stamm die Ausschüttung von Cytochrom c untersucht werden.

Die Anzucht der Hefen sowie die Zellfraktionierung wurden von R. Braun durchgeführt. Für die Westernblot-Analyse wurden zunächst alle Proben auf SDS-Gele aufgetragen und mit Coomassie angefärbt, um die Proteinmengen der einzelnen Proben anzugleichen. Bei einer Inkubationszeit von 13 h nach dem Medienshift, davon 1 h bei 37 °C, konnte Cytochrom c im Cytosol nachgewiesen werden:

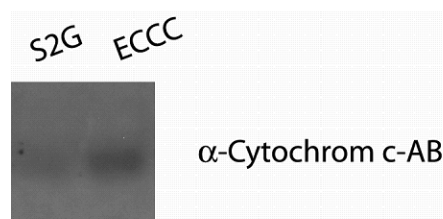


Abbildung 3.13: Westernblot der Cytosolfraction von den Stämmen S2G und ECCC. Die Proteinmenge pro Spur entspricht etwa 5 µg.

Wie sich durch die Akkumulation von Cytochrom c und die Veränderungen in der Proteinzusammensetzung zeigen lässt, ist die durch die Mutation von CDC48 ausgelöste Apoptose durch Mitochondrien vermittelt. Außerdem bestätigt sich durch die trotz der Ausschüttung große Menge an Cytochrom c im Mitochondrium (nicht gezeigt) der beobachtete leichte Anstieg der Menge an CYC1 mRNA bei einer mRNA-Array-Analyse von S2G im Vergleich zu ECCC, durchgeführt von Breitenbach und Kollegen, Universität Salzburg (persönliche Mitteilung).

3.4 Einfluss verschiedener Atmungskettenkomplexe auf die Überlebensfähigkeit von *S. cerevisiae*

Kirchman *et al.* beobachteten 1999 zum ersten Mal eine Verlängerung der Lebenszeit von einigen Hefestämmen bei Atmungskettendefizienz, die durch den Verlust der mitochondrialen DNA bzw. nukleäre Mutationen verursacht wurde. Bei der durch Essigsäure ausgelösten Apoptose in Hefe konnten Ludovico *et al.* (2002) zeigen, dass die Deletion von ATP10, verantwortlich für die Zusammensetzung der mitochondrialen ATPase, und die Deletion von CYC3, der Cytochrom c Hämlyase, vor Zelltod durch Essigsäure schützen und die Ausschüttung von Cytochrom c verhindern. Außerdem haben Albayrak *et al.* (2003) cybL, einen Bestandteil des Atmungskettenkomplexes II, als proapoptotisches Protein indentifiziert. Vor diesem Hintergrund sollten die Bedeutung der unterschiedlichen Atmungskettenkomplexe bei der Hefeapoptose, ausgelöst durch Überexpression von Yca1p, untersucht werden.

3.4.1 Langzeitüberlebensplattierung von Nullmutanten verschiedener Atmungskettenkomponenten und von Cytochrom c

Mit Nullmutanten der Gene CYC1, CYC7, CYC3, PET111, ATP10, COX7, COX8, QCR7 und QCR9 wurden Langzeitüberlebensplattierungen durchgeführt. Die Gene CYC1 und CYC7 kodieren für die verschiedenen Isoformen von Cytochrom c in Hefe, CYC3 kodiert für Cytochrom c Hämlyase. PET 111 ist benannt nach der Morphologie seiner Nullmutante (petit, frz. für klein); das zugehörige Protein ist an der Translation von COX2, einer zentralen Untereinheit des Cytochrom c Oxidase Komplexes, beteiligt. (Green-Willms *et al.*, 2001). ATP10 kodiert für ein Protein, das an der Zusammensetzung der mitochondrialen ATPase beteiligt ist; COX7, COX8, sowie QCR7 und QCR9 kodieren respektive für Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase bzw. der Coenzym Q Cytochrom c Reduktase. Die Kulturen wurden übernacht angezogen und auf eine Zelldicht von $1 \cdot 10^6$ verdünnt; am nächsten Tag (Tag 1) fand die erste Zelldichtenmessung und Plattierung statt.

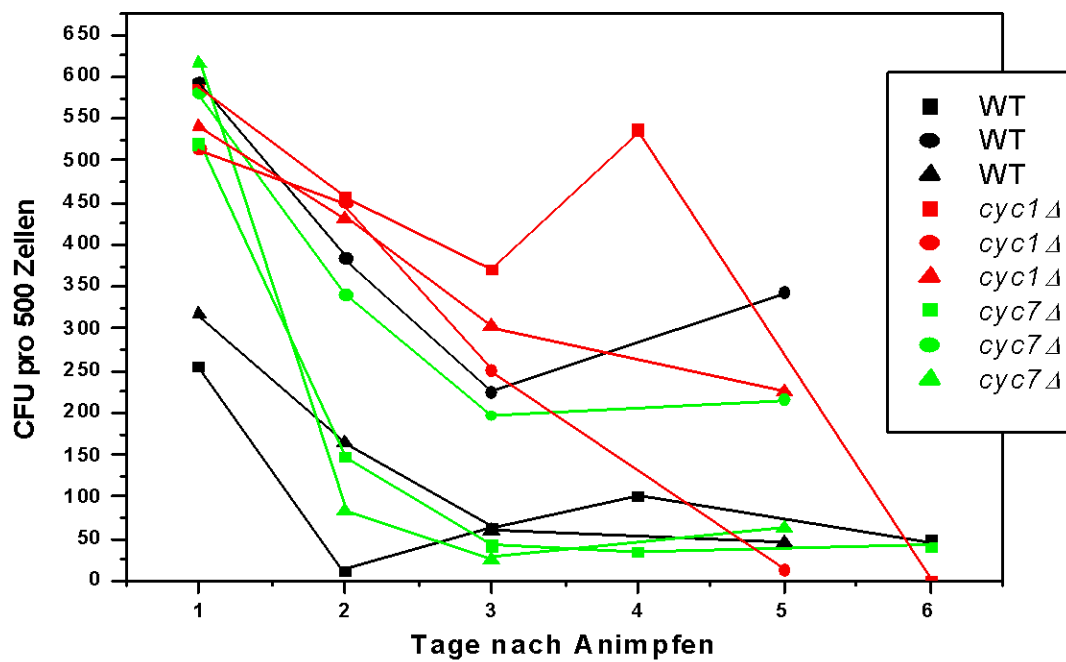


Abbildung 3.14: Langzeitüberlebensplattierung mit den Stämmen WT (BY4741), *cyc1Δ*, *cyc7Δ*. Dargestellt sind drei unabhängige Versuche.

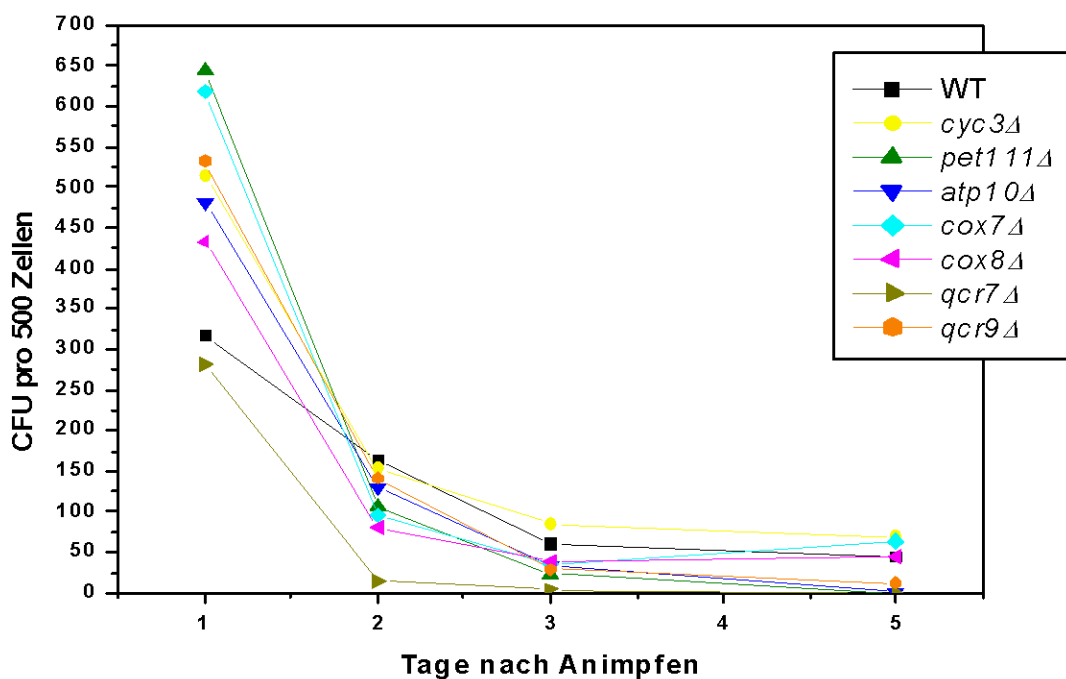


Abbildung 3.15: Langzeitüberlebensplattierung der Stämme WT, *cyc3Δ*, *pet111Δ*, *cox7Δ*, *cox8Δ*, *qcr7Δ*, *qcr9Δ*.

Da die *cyc1Δ* Mutante zunächst sehr gut überlebt, aber ungefähr am fünften Tag – vermutlich aufgrund von Glucosemangel und der fehlenden Fähigkeit zur Zellatmung – abstirbt, werden hier nur die ersten fünf Tage der verschiedenen Überlebensplattierungen gezeigt: Auffällig ist die geringe Überlebensfähigkeit der *pet111Δ*, *atp10Δ*, der *qcr7Δ* und der *qcr9Δ* Mutanten, die am schon am fünften Tag nach Animpfen keine Kolonien mehr bilden können. Da die Atmungskettenkomplexe I und III die Hauptquellen physiologischer Sauerstoffradikale sind, könnte die verringerte Lebensfähigkeit der *qcrΔ* Nullmutanten darauf zurückzuführen sein, dass die Deletion einzelner Untereinheiten die Atmungskettenfunktion unterbindet und gleichzeitig zu einem Anstieg an Sauerstoffradikalen führt.

3.4.2 Messung der Caspaseaktivität bei Nullmutanten verschiedener Atmungskettenkomplexe und Cytochrom c

Um einen Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Überlebensfähigkeiten der einzelnen Nullmutanten und der Induktion von Apoptose zu ergründen, wurden am nullten und am zweiten Tag des Alterns Proben entnommen und die Caspaseaktivität mittels FACS-Messung ermittelt.

Stamm	Tag 0	Tag 2
WT	6,1	20,5
<i>yca1Δ</i>	4,2	14,5
<i>cyc1Δ</i>	3,6	16,8
<i>cyc7Δ</i>	2,4	23,8
<i>cyc3Δ</i>	3,4	13,5
<i>pet111Δ</i>	3,1	24,3
<i>atp10Δ</i>	6,3	15,4
<i>cox7Δ</i>	2,9	10,4
<i>cox8Δ</i>	9,5	25,7
<i>qcr7Δ</i>	3,6	54,9
<i>qcr9Δ</i>	5,7	38,8

Tabelle 3.3: In vivo Messung der Caspaseaktivität an frühlogarithmischen und 2 Tage gealterten Nullmutanten unterschiedlicher Atmungskettenkomplexe. Angaben in Prozent positive Zellen an den gesamt gemessenen Zellen.

Analog zu den Überlebensplattierungen zeigt sich eine erhöhte Caspaseaktivität bei den Mutanten des Atmungskettenkomplex III, insbesondere bei *qcr7Δ*. Die Mutanten

von CYC1 und CYC3, bei denen in beiden Fällen kein Cytochrom c Isoform 1 Holoenzym vorhanden ist, zeigen verringerte Caspaseaktivität, vergleichbar mit der *yca1Δ* Nullmutante, wohingegen die Caspaseaktivität der *cyc7Δ* Mutante vergleichbar mit der des WT ist.

3.4.3 Überexpression von Yca1p in Nullmutanten der Atmungskette

Um eine spezifische Abhängigkeit der durch Yca1p induzierten Hefeapoptose von den einzelnen Atmungskettenkomplexen zu ermitteln, wurde das Überexpressionsplasmid pFM 21 in die in Kapitel 3.4.2 aufgeführten Stämme transformiert. Die Expression der Caspase wurde mittels Westernblot ermittelt. Die Überexpression von Yca1p in *cyc1Δ* und *cyc7Δ* wurde in Kapitel 3.1.2 ff. bereits ausführlich behandelt. Die Expression der Caspase wurde mittels Westernblot ermittelt (ohne Abbildung). Dabei zeigte sich, dass *qcr7Δ*, *cyc3Δ* und *pet1111Δ* die Caspase nicht exprimieren. Diese Stämme wurden nicht für weitere Experimente verwendet. In allen weiteren Stämmen wurde die Hefecaspase gleich gut wie im WT exprimiert. Für die Überlebensplattierung wurden die Stämme übernacht auf SD-Medium angezogen, auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und bei einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,5 auf Minimalmedium mit Galactose geschiftet; es wurden 0,4 mM Wasserstoffperoxid zugegeben. Nach 20 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und ausplattiert.

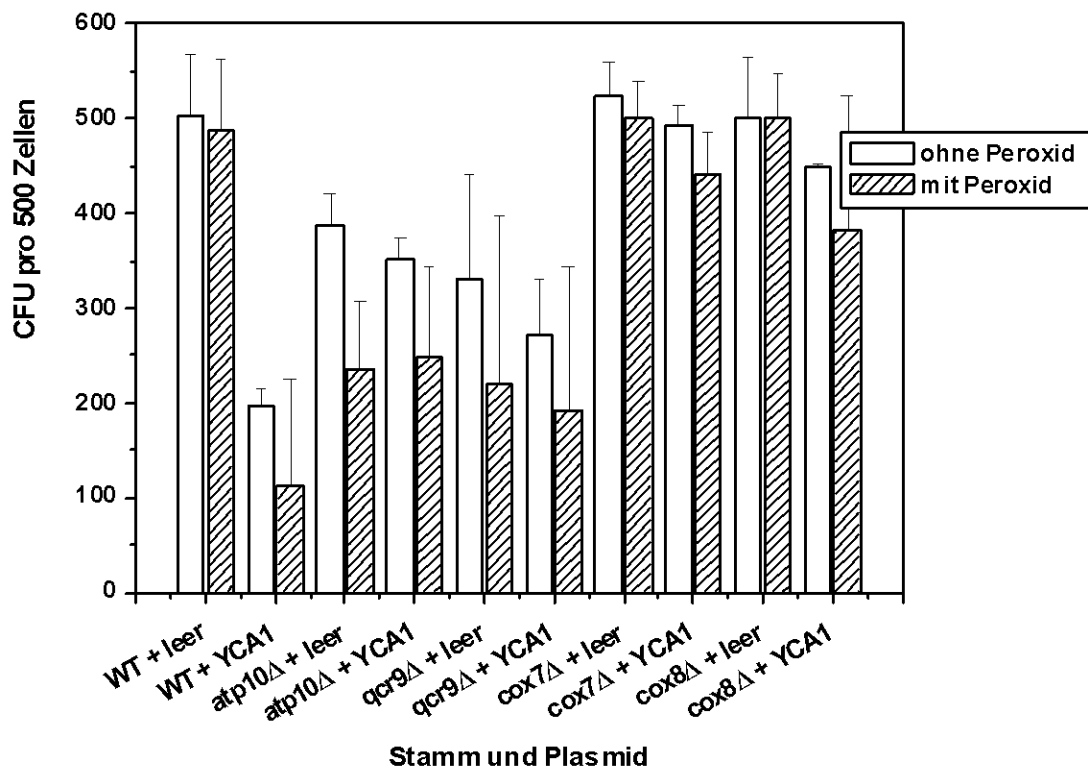


Abbildung 3.16: Überexpression von Yca1p und Belastung mit 0,4 mM H₂O₂ in Nullmutanten der Atmungskette: yca: YCA-Plasmid; leer: Kontrollplasmid. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Insbesondere die Deletionen von Bestandteilen des Atmungskettenkomplex IV, COX7 und COX8, scheinen für eine verbesserte Überlebensfähigkeit zu sorgen. Insgesamt ist zu bemerken, dass sich die Überlebensraten der Knockoutstämmen mit YCA-Plasmid nicht wesentlich von denen mit dem leeren Kontrollplasmid unterscheiden.

Diese Plattierung wurde dreimal durchgeführt. Ein besseres Überleben fast aller Stämme mit Peroxid bei der zweiten Plattierung führt zu den großen Standardabweichungen.

3.4.4 Überexpression von Yca1p in einem rho0 Stamm

Die Mutation von mitochondrialer DNA in der Apoptose ist Bestandteil kontroverser Diskussion. Einerseits konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose gezeigt werden (Lee *et al.*, 2004), andererseits wurde für Knockoutmäuse eines mitochondrialen Transkriptionsfaktor vermehrte Apoptose nachgewiesen (Wang *et al.*, 2001). Um die Notwendigkeit von mitochondrialer DNA, die in Hefe unter

anderem für 3 Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase und drei Untereinheiten der ATPase kodiert, für die Hefeapoptose herauszufinden, wurde ein Hefestamm gewählt bei dem eine entsprechende isogene rho0 Mutante existiert. Das YCA1-Überexpressionsplasmid pFM 21 wurde in diese Stämme transformiert und eine Überlebensplattierung nach 20 h Inkubation durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei Kontrolle der Expression der Caspase im Westernblot in der rho0 Mutante Protein zu finden war, nicht aber im WT-Hintergrund (ohne Abbildung). Entsprechend dieses Befundes konnte kein Absterben beim WT mit YCA1-Plasmid festgestellt werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Expression der Caspase im rho0 Hintergrund im Vergleich zum Leerplasmid zu einer verringerten Überlebensfähigkeit führt (Daten nicht gezeigt).

3.4.5 Fazit: Mutanten des Atmungskette sind unempfindlicher gegenüber der Yca1p-Überexpression

Zusammenfassend lässt sich zu den Experimenten der Apoptoseauslösung in Nullmutanten der Atmungskette festhalten, dass die Hefecaspase in diesen Stammhintergründen nicht in der Lage ist, ihre Wirkung zu entfalten. Allerdings scheinen sich die Deletionen einzelner Gene an sich bereits negativ auf die Überlebensfähigkeit der Hefe auszuwirken, einhergehend mit einer erhöhten Caspaseaktivität beim Altern.

3.5 Einfluss der Kanamycin-Disruptionskassette auf die Überlebensfähigkeit von *S. cerevisiae*

Um festzustellen, ob für eine verbessertes Überleben unter apoptoseauslösenden Bedingungen bei Deletionsstämmen teilweise die bei Euroscarf verwendete Kanamycinkassette verantwortlich ist, wurden einige der Nullmutanten nochmals mit einer etwas veränderten Kassette hergestellt, um nach erfolgreicher Deletion die Kassette wieder entfernen zu können.

3.5.1 Herstellen verschiedener Hefedeletionsmutanten

Die Deletion der einzelnen Gene wurde nach der Methode von Güldner *et al.* durchgeführt. Hierbei wurde der Vektor pUG6 als PCR-Template verwendet und somit eine KanMX4-Kassette erzeugt, die von loxP-Sequenzen flankiert ist. Diese Sequenzen ermöglichen ein späteres Entfernen des KanMX4-Moduls und somit der Resistenz gegen Geneticin. Es wurden Deletionsmutanten der Gene CYC1, YME1,

DPH2 und DPH5 hergestellt. Die Deletionen wurden mittels PCR verifiziert. Anschließend wurde das KanMX4-Gen mit Hilfe der Cre-Rekombinase entfernt, so dass anstelle der deletierten Gene eine loxP-Stelle verblieb. Eine Deletion der Gene DPH2 oder DPH5 verhindert eine ADP-Ribosylierung des Elongations-Faktor 2 bei Einwirkung von Diphtherietoxin. Yme1 ist, wie CDC48 ein AAA-Protein in Hefe, es baut in Cytochrom c Nullmutanten und bei Bax-Expression in Hefe Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase ab (Manon *et al.*, 2001).

Da sich mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit die Deletionskassette auch an einer falschen Stelle im Genom integriert, wurden von den Deletionsmutanten Wachstumskurven erstellt. Es zeigte sich, dass sich die *cyc1Δ* Mutante, die *dph2Δ* Mutante und die *dph5Δ* Mutante wie ihre Pendanten aus der Euroscarf Stammsammlung verhalten. Die *yme1Δ* Mutante wuchs geringfügig schneller als ihr Pendant.

3.5.2 Belastung von unterschiedlichen Nullmutanten mit und ohne KanMX-Kassette mit Wasserstoffperoxid

Die Nullmutanten mit gleichem Wachstum wurden übernacht auf SD-Medium mit allen Aminosäuren übernacht angezogen, auf $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt und nach 3 h Wachstum mit 0,6 mM H₂O₂ belastet und nach weiteren 3 h Wachstum ausplattiert.

Der Vergleich zwischen Euroscarf Nullmutanten und eigenen Nullmutanten ohne KanMX4-Kassette und der Vergleich zwischen eigenen Nullmutanten mit und ohne KanMX4-Kassette wurde je zweimal durchgeführt. Der erste Versuch fand jeweils mit Stämmen statt, die erst zwei Tage zuvor aus der Stammsammlung frisch ausgestrichen wurden. Der zweite Versuch fand statt, nachdem die Platten 4 oder 5 Tage bei 4 °C gelagert worden waren. Die Ergebnisse des jeweils ersten Versuchs zeigten, dass frisch ausgestrichene Hefestämme empfindlicher sind gegenüber Sauerstoffstress als die gleichen Stämme, die ein paar Tage bei 4 °C gelagert wurden und so Gelegenheit hatten in die G₀-Phase einzutreten (ohne Abbildung).

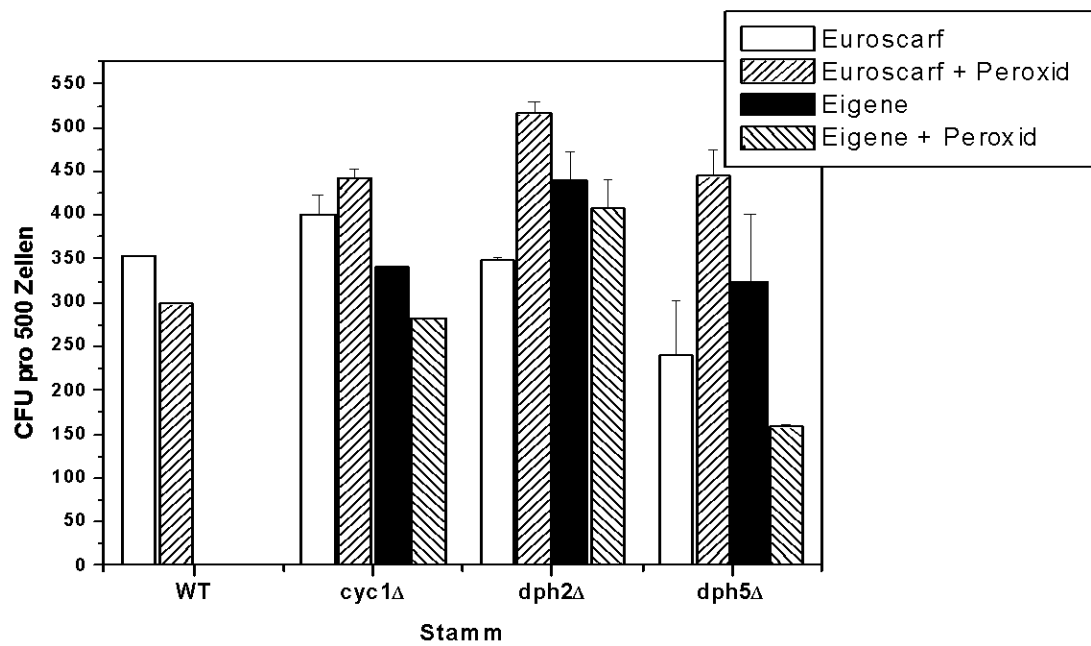


Abbildung 3.17: Überlebensplattierung von Euroscarf Stämmen und eigenen Nullmutanten (ohne KanMX-Kassette) ohne und mit 0,6 mM Wasserstoffperoxid. Es sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

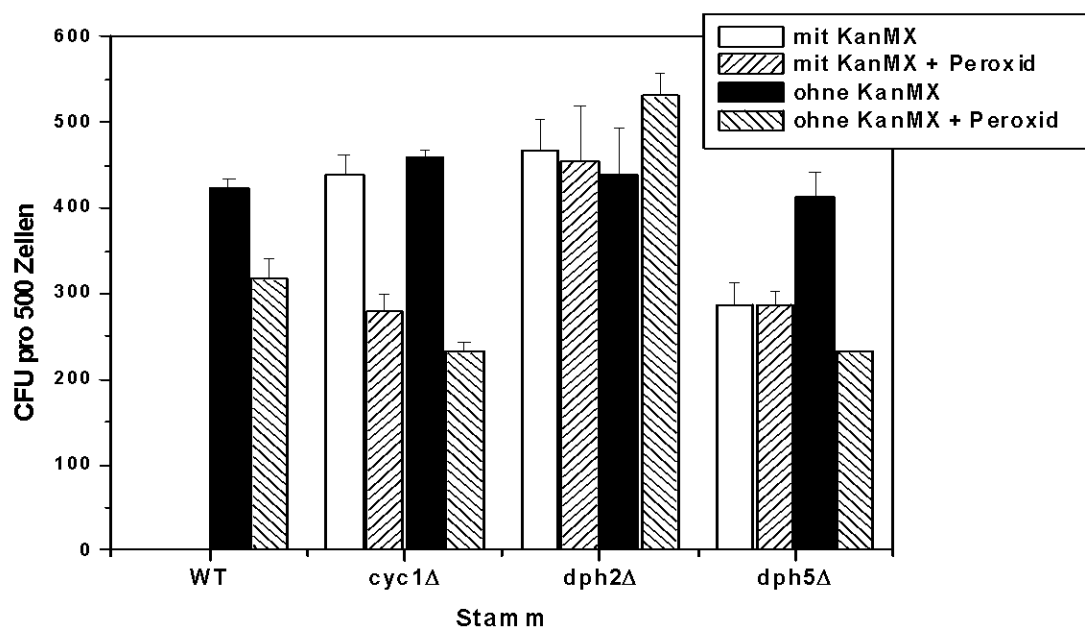


Abbildung 3.18: Überlebensplattierung von Nullmutanten mit und ohne KanMX Kasette und ohne und mit 0,6 mM Wasserstoffperoxid. Es sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Die Versuche mit den gelagerten Hefestämmen zeigen, dass kein großer Unterschied besteht zwischen Stämmen mit oder ohne KanMX-Kassette.

3.5.3 Fazit: Die KanMX4-Kassette hat keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit von *S. cerevisiae*

Die Deletion von Hefegenen mit Hilfe einer KanMX-Kassette beeinflusst die Überlebensfähigkeit der Hefestämme nur geringfügig, und daher sind die mit Deletionsstämmen gewonnenen Daten relevant.

3.6 Respiratorische Funktion von Aif1p

Zwischen dem Hefeprotein Ynr074c und dem humanen Apoptose-auslösenden Faktor (AIF) konnten mittels Sequenzvergleich signifikante Ähnlichkeit festgestellt werden (Wissing *et al.*, 2004). Als Funktion des humanen AIF konnte eine Caspase-unabhängige Auslösung der Apoptose gezeigt werden (als Beispiel: Cregan *et al.*, 2002). Allerdings wird eine Funktion des Proteins in der Caspase-abhängigen Apoptose diskutiert (Zusammenfassung siehe: Candé *et al.*, 2004). Wissing *et al.* (2004) konnten zeigen, dass Aif1p die gleiche Lokalisation und ähnliche Aufgaben in der Apoptosevermittlung hat wie humanes AIF.

3.6.1 Wachstum einer *aif1Δ* Nullmutante auf nicht-fermentierbaren Medien

Klein *et al.* (2002) konnten zeigen, dass Harlequin Mäuse mit reduzierter AIF-Expression verminderte oxidative Phosphorylierung in Retina und Gehirn zeigen und dass dies einhergeht mit einem geringeren Expressionslevel einzelner Untereinheiten des Atmungskettenkomplex I. Daher wurde die Möglichkeit eines Zusammenhangs zwischen humanem AIF und der Atmungskette erwogen (persönliche Mitteilung Guido Krömer). Um dies für das Hefehomologe Aif1p zu untersuchen, wurden eine *aif1Δ* Nullmutante und ein isogener WT auf verschiedenen nicht-fermentierbaren Medien angezogen und die Wachstumsgeschwindigkeit bestimmt. Hierfür wurden die Stämme ausgestrichen und nach Anwachsen mindestens drei Tage bei 4 °C gelagert, um einen Übertritt fast aller Hefen in die G0 Phase zu ermöglichen. Anschließend wurden die Hefen direkt von Platte auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft.

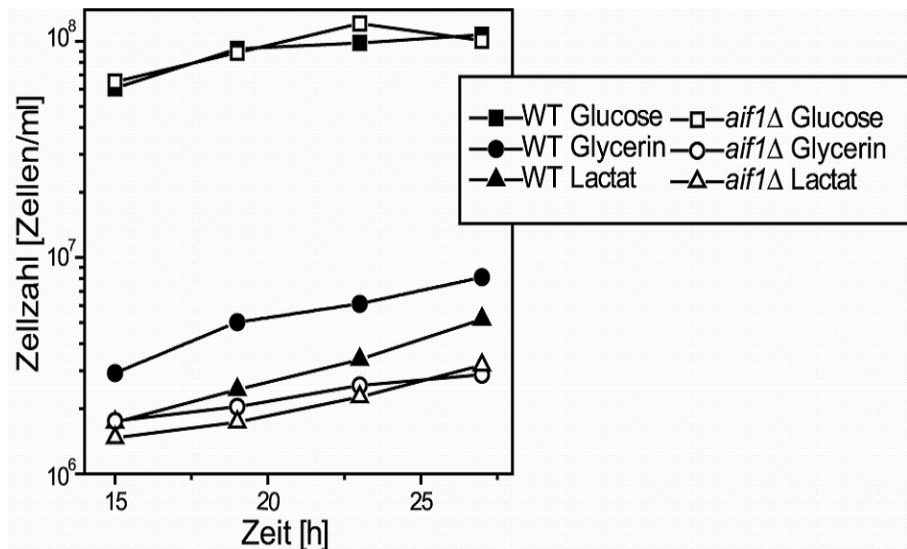


Abbildung 3.19: Wachstumskurven von WT und *aif1*Δ Nullmutante auf SD-Medium sowie auf Minimalmedium mit Glycerin bzw. Lactat als Kohlenstoffquelle.

Beide Stämme wachsen auf Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle gleich schnell. Bei der Verwendung von Lactat oder Glycerin wächst die *aif1*Δ Nullmutante signifikant schlechter.

3.6.2 Fazit: Geringere Wachstumsfähigkeit von *S. cerevisiae* auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen bei *aif1*Δ Mutation

Die Nullmutante des Apoptose-induzierenden Faktors in Hefe wächst auf Glucose als Kohlenstoffquelle genau so schnell wie ein entsprechender isogener WT. Bei Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zeigt diese Nullmutante allerdings eine leichte, aber signifikante Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit, was auf eine Rolle von Aif1p im Zusammenhang mit der Atmungskette hinweisen könnte. Allerdings sollte erwähnt werden, dass Atmungsketten-defiziente Hefen nicht auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen anwachsen können, weshalb Aif1p in der Atmungskette keine notwendige Bedeutung zukommen kann.

3.7 Hefeapoptose und Zellzyklus

Der bekannte Regulator der Apoptose p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der bei Stress z. B. durch DNA Schädigung stabilisiert wird und über die Induktion von p21 zu Zellzyklusarrest führen kann. Neben p53 gibt es noch weitere an der Apoptose beteiligte Proteine, die auch im Zellzyklus eine Rolle spielen.

Bei der ersten in Hefe gefundenen apoptotischen Mutante handelt es sich um eine Mutante des Zellzyklusgens CDC48 (Madeo *et al.*, 1997). Eine kältesensitive Mutante dieses Gens arretiert als große Zelle mit Knospe, wobei sich der Kern im Hals zwischen Mutter- und Tochterzelle befindet. Nachträglich wurde für das humane Orthologe von CDC48, VCP, ebenfalls eine Funktion als Apoptoseregulator nachgewiesen (Shirogane *et al.*, 1999). Zusätzlich konnte auch ein Ortholog in *C. elegans* identifiziert werden, das eine apoptoserelevante Funktion einnimmt (Wu *et al.*, 1999). Somit handelt es sich also bei Hefeapoptose einer Zellzyklusmutante um ein ubiquitäres Phänomen. Von Breitenbach und Kollegen (Universität Salzburg) wurde eine mRNA-Array Analyse von dieser Mutante im Vergleich zum isogenen Stamm mit unmutiertem CDC48 unter apoptoseauslösenden Bedingungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass einige S-Phase assoziierte Gene hochreguliert und einige weniger M-Phase assoziierte Gene herunterreguliert sind (persönliche Mitteilung). Dies gab Anlass, die Abhängigkeit der Apoptoseinduktion in Hefe unter dem Gesichtspunkt des Zellzyklus zu untersuchen.

3.7.1 Synchronisierung von *S. cerevisiae* und Apoptoseinduktion durch Sauerstoffstress

Um die Empfindlichkeit der Hefe gegenüber Apoptose-induzierenden Faktoren in verschiedenen Stadien des Zellzyklus zu untersuchen, wurde ein Hefewildtypstamm (BY4741) synchronisiert. Hierfür wurde das Polypeptid α -Faktor verwendet, ein Pheromon in Hefe, mit dem haploide Zellen des Typs Mat a synchronisiert werden können. Der Zellzyklusarrest tritt in der G1-Phase ein. Aus der synchronisierten Hefekultur wurde im Abstand von 7,5 min je 1 ml in Reagenzgläser überführt und mit 0,2 bzw. 0,4 mM Peroxid belastet bzw. als Kontrolle unbelastet weitergezogen. Im Abstand von 15 min wurde eine Schnellfixierung der Zellen in Formaldehyd durchgeführt um später den Budding-Index auszuzählen.

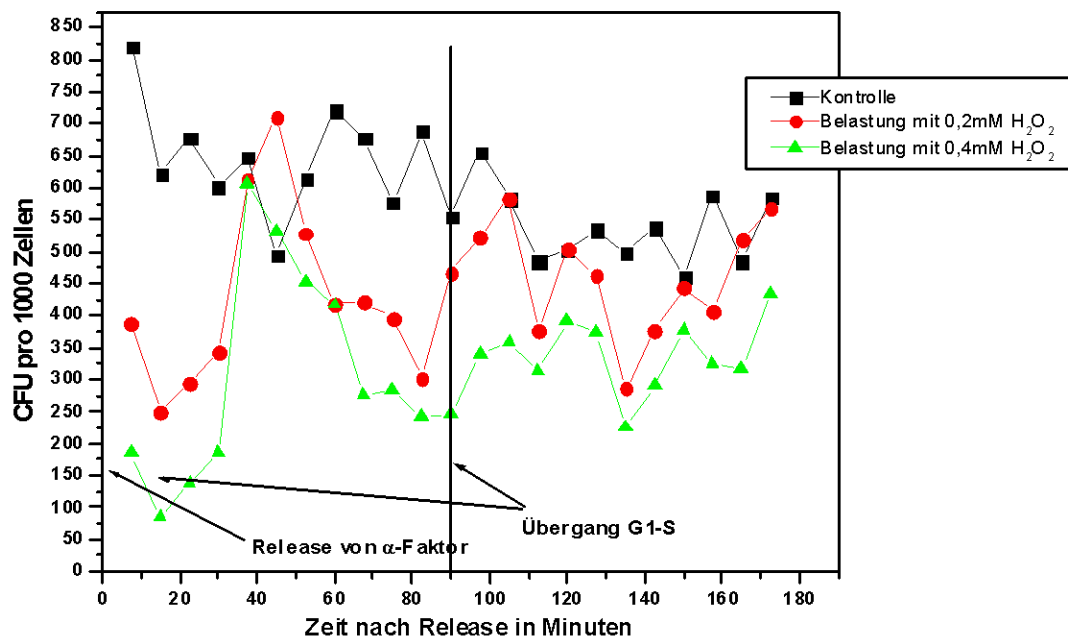


Abbildung 3.20: Überlebensplattierung eines WT-Stamms nach Synchronisierung mit α -Faktor

Es zeigte sich, dass die Zellen beim Übergang von der G1 in die S Phase ca. 90 min nach Abstoppen der Synchronisation besonders empfindlich gegenüber der Belastung mit Sauerstoffstress sind. Auch direkt nach dem Entfernen des α -Faktors überleben nur sehr wenige Zellen die Belastung mit Wasserstoffperoxid. Dies ist eine Bestätigung des Ergebnisses, da die Arretierung von α -Faktor in G1 stattfindet. Nach 180 min zeigte sich, dass die Synchronisation immer weniger ausgeprägt war; an dieser Stelle wurde beendet.

3.7.2 Fazit: Übergang von der G1- in die S-Phase als neuralgischer Punkt der Hefe

Der Übergang von der G1- zur S-Phase ist morphologisch in Hefe besonders leicht an der Bildung kleiner Knospen erkenntlich. Durch die Belastung mit Wasserstoffperoxid in unterschiedlichen Zellzyklusphasen konnte dieser Übergang als die Phase mit der größten Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid identifiziert werden. Dies bestätigt die Ergebnisse des mRNA Array, bei dem während der Auslösung der Apoptose einige mit der S-Phase assoziierten Gene hochreguliert sind. Interessant scheint in diesem Zusammenhang auch die Lokalisation der GFP-getaggten trunkierten Caspase, die in Kapitel 3.2.3.3 erörtert wurde. In Abbildung 3.12 ist deutlich eine vermehrte Lokalisation der Caspase am

Knospenhals zu sehen. Die Funktion der Caspase an dieser Stelle sollte weiter untersucht werden.

3.8 Apoptose bei einer Mutante des retrograden Transports

Proteine, die für die Sekretion bestimmt sind beziehungsweise an die Zelloberfläche gelangen sollen, werden in einer Reihe von Transportschritten, vermittelt durch kleine Transportvesikel, an ihren Zielort gebracht. Hierbei sind eine Reihe von Proteinen beteiligt, die dafür sorgen, dass diese Transportvesikel mit der richtigen Zielmembran fusionieren. Ein Teil der Spezifität wird durch SNARE-Protein-Interaktionen vermittelt. Allerdings sind bei retrogradem und anterogradem Transport die gleichen SNAREs beteiligt.

Da während der Apoptose durch Bildung der sogenannten apoptotischen Körperchen größere Umbauprozesse in der Zelle stattfinden, liegt die Vermutung nahe, dass zwischen Vesikelfusion und Apoptose ein Zusammenhang bestehen könnte. Tatsächlich konnte für einige Proteine, denen eine Rolle beim Golgi Membrantransport zugeschrieben wird, gezeigt werden, dass sie Caspasesubstrate sind. Die Expression nicht-spaltbarer Mutanten dieser Proteine führte zu einer Verzögerung der Aufspaltung des Golgi-Apparats während der Apoptose (Maag *et al.*, 2003, Übersichtsartikel).

Tip20p ist ein Transportprotein, das am retrograden Transport zwischen ER und Golgi beteiligt ist. Kamena und Spang (2004) konnten eine temperatursensitive Mutante dieses Proteins isolieren, die die Rückfusion der Vesikel mit dem ER erlaubt. Dabei fiel die außergewöhnliche Anfärbung der Zellen mit DAPI auf (persönliche Mitteilung, Faustin Kamena). Daher wurden diese Mutante und eine weitere Mutante des Proteins auf die Induktion von Apoptose bei Temperaturstress untersucht.

3.8.1 Überlebensplattierungen von *tip20* Mutanten bei Temperaturstress

Die beiden Mutanten *tip20-5* und *tip20-8* sind sehr empfindlich gegenüber hohen Temperaturen; sie wurden daher grundsätzlich bei 24 °C angezogen. Für die Überlebensplattierung wurden sie auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und nach 3 h Wachstum aufgeteilt. Ein Teil der Kulturen wurde bei 24 °C weitergezogen, der andere Teil wurde für 1 h, 3 h, 5 h bzw. 7 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und Überlebensplattierungen durchgeführt.

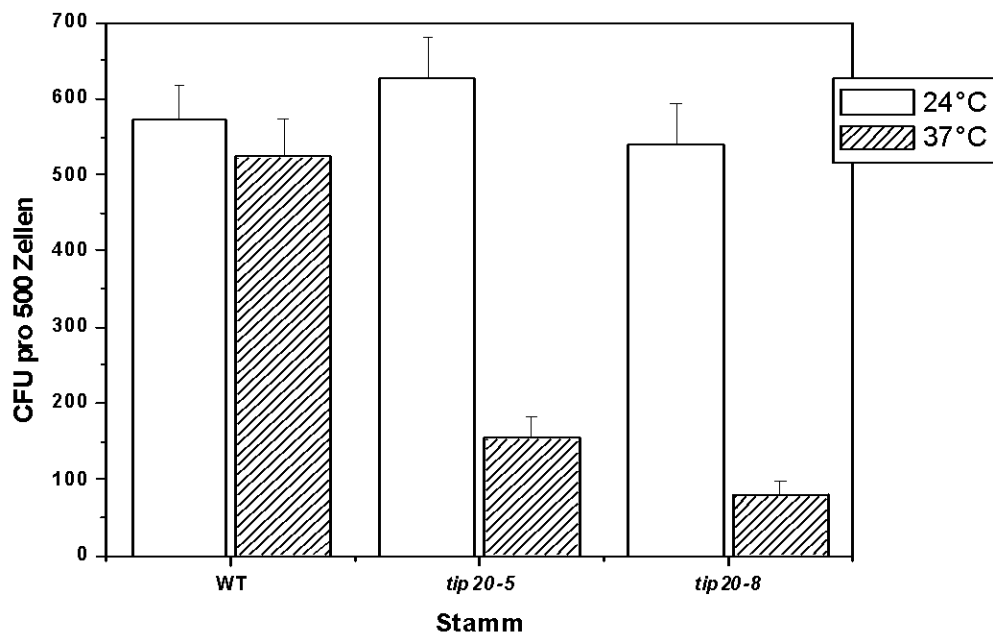


Abbildung 3.21: Überlebensplattierung von *tip20* Mutanten nach 5 h Inkubation. Es sind die Mittelwerte aus acht unabhängigen Versuchen dargestellt.

Deutlich zu erkennen ist, dass insbesondere die *tip20-8* Mutante verringertes Überleben zeigt.

3.8.2 Caspasemessung von *tip20* Mutanten bei Temperaturstress

Unter den gleichen Bedingungen wie bei den Überlebensplattierungen wurden auch in vivo Caspasemessungen an den Mutanten durchgeführt:

Stamm	Temperatur	positive [%]
WT	24°C	0,80
<i>tip20-5</i>	24°C	4,30
<i>tip20-8</i>	24°C	0,79
WT	37°C	0,68
<i>tip20-5</i>	37°C	50,30
<i>tip20-8</i>	37°C	44,54

Tabelle 3.4: In vivo Caspasemessung an *tip20* Mutanten nach 5 h Temperaturstress. Angabe in Prozent positiver Zellen an den gesamt gemessenen Zellen

Entsprechend den Überlebensplattierungen zeigen beide Mutanten sehr hohe Caspaseaktivitäten bei Temperaturstress, wohingegen der isogene Wildtyp davon nicht betroffen ist.

3.8.3 DHR-Färbung von *tip20* Mutanten

Die DHR-Färbung dient der Anfärbung von Sauerstoffradikalen. Sie wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Überlebensplattierung durchgeführt. Deutlich sichtbar ist die Anfärbung der Mutanten im Vergleich zum isogenen Wildtypstamm.

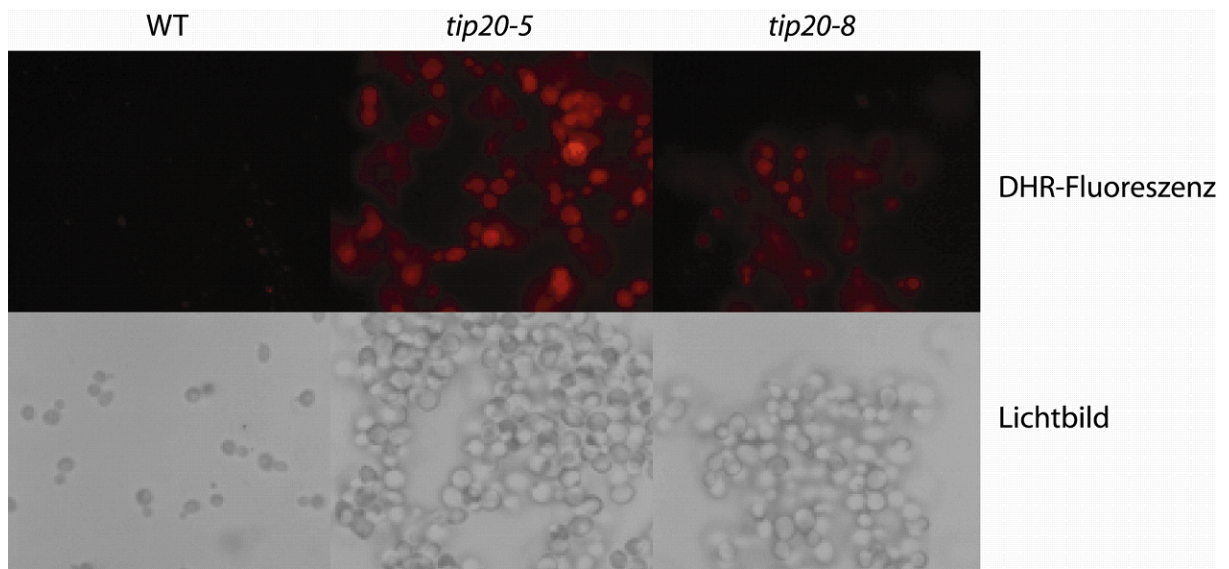


Abbildung 3.22: DHR-Färbung von *tip20* Mutanten nach 5 h Temperaturstress.

3.8.4 Annexin V-Färbung von *tip20* Mutanten

Die Annexin-Färbung zeigt spezifisch die Externalisierung von Phosphatidylserin an die Außenseiter der Zellmembran. Gleichzeitig wird mit Propidiumiodid gegengefärbt um zu vermeiden, dass tote Zellen mit permeabilisierter Zellmembran als positiv erkannt werden.

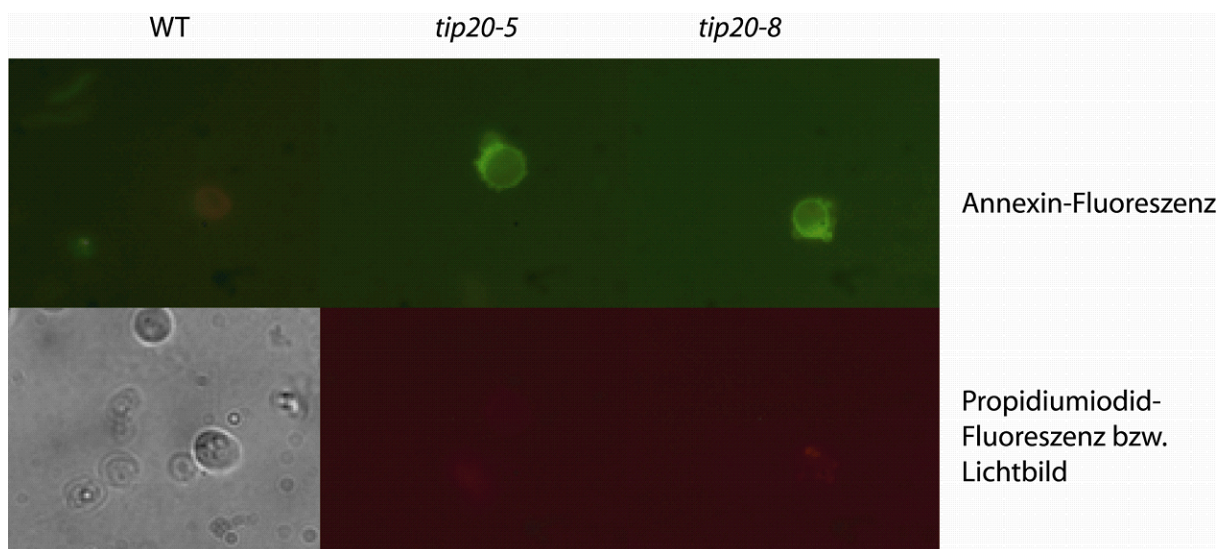


Abbildung 3.23: Annexin V-Färbung von *tip20* Mutanten nach 5 h Temperaturstress.

Sehr gut zu erkennen ist insbesondere bei der *tip20-8* Mutante, dass neben der Externalisierung auch die Membran an mehreren Stellen leicht nach außen gestülpt wird; dabei könnte es sich um das sogenannte Membrane Blebbing handeln.

3.8.5 Fazit: Spezifische Mutanten von TIP20 führen bei Temperaturstress zu Apoptose in Hefe

Bei Belastung mit hohen Temperaturen führen sowohl die *tip20-5* Mutante als auch die *tip20-8* Mutante, für die eine Rückfusion mit dem ER beschrieben ist, zu Apoptose in Hefe. Dabei findet eine sehr starke Caspaseaktivierung statt, die vergleichbar mit der Überexpression der Hefecaspase Yca1p ist (vgl. Madeo *et al.*, 2002a). Außerdem ist die Annexin-Färbung für beide Mutanten positiv, und es werden Sauerstoffradikale gebildet. Überdies zeigt sich bei der Annexin-Färbung vermutlich *Membrane Blebbing*, was in dieser Form noch nicht für Hefe beschrieben ist. Dieses Ergebnis zeigt klar die Beteiligung der Vesikelfusion an der Apoptosekaskade in Hefe.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Cytochrom c und der Atmungskette bei der Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae* näher zu beleuchten. Hierzu wurde vor allem die Tatsache genutzt, dass *S. cerevisiae* als fakultativer Aerobier bei Wachstum auf fermentierbaren Medien nicht zwingend auf die Atmungskette zur Energiegewinnung angewiesen ist.

4.1 Cytochrom c in *S. cerevisiae*

Im Gegensatz zu Säugerzellen verfügt *S. cerevisiae* über zwei Isoformen von Cytochrom c: Cyc1p und Cyc7p. Unter normalen Labor-Wachstumsbedingungen beträgt der Anteil der beiden Isoformen zu 95% Cyc1p und nur zu 5% Cyc7p (Dumont *et al.*, 1991). Die Expression von Cyc1p wird unter hypoxischen Bedingungen reprimiert, während unter diesen Bedingungen die Expression von Cyc7p induziert wird (Burke *et al.* 1997). Cyc1p ist zu 64% identisch mit dem humanen Cytochrom c, Cyc7p zu 60%. Interessanterweise wurde für beide Isoformen von Cytochrom c nachgewiesen, dass sie nicht in der Lage sind, in Säugerzellen Apoptose auszulösen (Abdulaev *et al.*, 2002; Kluck *et al.* 2000, Kluck *et al.* 1997b)

4.1.1 Absterben von *S. cerevisiae* unter dem Einfluß von Cytochrom c

Ein wesentliches Merkmal der Apoptose ist, dass fast jedes der beteiligten proapoptotischen Gene durch Überexpression in der Lage ist, Apoptose auszulösen. Ursache hierfür könnte eine gesteigerte Protein-Protein-Interaktion sein. Daher wurden einige Studien durchgeführt, bei denen Cytochrom c aus verschiedenen Organismen zu Mitochondrien und Cytosol aus *Xenopus* Oocyten gegeben wurde, um die proapoptotische Wirkung zu untersuchen (z. B. Kluck *et al.*, 1997b und Kluck *et al.*, 2000). Es konnte nachgewiesen werden, dass z. B. Pferde-Cytochrom c, nicht aber Hefe-Cytochrom c in der Lage ist, in diesem System die Aktivierung einer Caspase-ähnliche Protease (CPP32) auszulösen.

Analog wurde versucht, durch die Gabe von Hefe-Cytochrom c zu exponentiell wachsenden Zellen, die die Hefecaspase Yca1p überexprimieren, eine Wirkung auf die Überlebensfähigkeit zu erzielen. Tatsächlich führt dies zu leichtem Absterben, die Wirkung ist allerdings deutlich geringer als die von niedrigen Dosen an Wasserstoffperoxid unter den gleichen Bedingungen. Da über einen Transportweg

von Cytochrom c über die Plasmamembran nichts bekannt ist, könnte der geringe Effekt auch auf eine verminderte Aufnahme des Proteins zurückzuführen sein.

Um dieses Hindernis zu umgehen, wurden die beiden Isoformen von Hefe-Cytochrom c in einen Überexpressionsvektor kloniert und die Expression über einen Galactosepromotor ($Gal1^P$) durch Medienwechsel induziert. Die Überexpression der unterschiedlichen Isoformen von Hefe-Cytochrom c ergab, dass nur Cyc1p zu verminderter Überlebensfähigkeit führt, was durch zusätzlichen Sauerstoffstress noch verstärkt wird. Insbesondere lässt sich dieses Ergebnis durch die TUNEL-Färbung bestätigen, die nur bei Überexpression mit Cyc1p deutlich gefärbte Zellen zeigt. Dies ist hingegen nicht der Fall, wenn Cyc1p in einer *yca1Δ* Nullmutante ohne die Hefecaspase exprimiert wird. Die Überexpression von Cyc1p in diesem Stammhintergrund führt zu vermehrter Akkumulation von ROS, was darauf hinweist, dass Yca1p eine Funktion stromabwärts von Sauerstoffradikalen und Cytochrom c wahrnimmt. Das entspricht der Funktion der meisten Caspasen in Säugerzellen, die erst nach der Ausschüttung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium durch die Initiatorcaspase 9 aktiviert werden. Allerdings konnten Chen *et al.* 2003 zeigen, dass die Bildung von ROS in Zellen, die mit γ -Strahlen behandelt wurden, in zwei distinkten Phasen erfolgt. Die erste Phase ist sehr früh und ergibt nur wenige Sauerstoffradikale; die zweite Phase bedarf der Aktivierung von Caspasen, wird mit der Öffnung der mitochondrialen Permeability Transition Pore (PTP) assoziiert und führt zu exzessiver Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Interessanterweise kann nur die zweite Phase durch Expression von Bcl-2, einem Antagonisten von Bax bei der Ausschüttung von Cytochrom c, verhindert werden.

Bei der Überexpression von Cyc1p in WT-Hefen verändert sich neben allen anderen Effekten auch die Morphologie von *S. cerevisiae*. Die Zellen erscheinen zwei- bis dreimal so groß im Vergleich zu einem isogenen WT mit CYC7-Plasmid bzw. Leerplasmid. Dieses Phänomen könnte auf eine vermehrte Anzahl an Mitochondrien und auf dadurch erhöhte Energieresourcen zurückzuführen sein, allerdings erklärt dies nicht, warum eine *yca1Δ* Nullmutante mit CYC1-Plasmid nicht auch über ein größeres Zellvolumen verfügt. Interessant wäre es, in diesem Zusammenhang die Morphologie der Mitochondrien – z. B. durch Anfärben mit Mitotracker – zu untersuchen, da gezeigt wurde, dass die reine Funktionalität der Atmungskette in Hefe nicht die Morphologie von Mitochondrien beeinflusst (Church & Poyton, 1998), allerdings in Säugerzellen morphologische Veränderungen der Mitochondrien

durchaus mit Apoptose assoziiert werden (für einen Review siehe Karbowski & Youle, 2003).

4.1.2 Cytochrom c und Sauerstoffstress

Überraschenderweise führte die Deletion der beiden Isoformen von Cytochrom c in keinem Fall zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid. Dies würde an sich nahelegen, dass die Ausschüttung von Cytochrom c der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies vorangeht. Dieses Ergebnis wird aber durch Studien widerlegt, die zeigen, dass Cardiolipin, ein Phospholipid in der inneren Mitochondrienmembran, für die Bindung von Cytochrom c verantwortlich ist und dass der Ausschüttung von Cytochrom c eine Oxidation von Cardiolipin durch ROS und damit verknüpfte „Freigabe“ von Cytochrom c vorangeht (Petrosillo *et al.*, 2003). Allerdings sind nicht alle apoptotischen Stimuli von der Bindung und Loslösung von Cytochrom c an Cardiolipin abhängig, wie Iverson *et al.* (2004b) nachweisen konnten, denn die durch Bax induzierte Ausschüttung von Cytochrom c in Hefe ist unabhängig von Cardiolipin (Iverson *et al.*, 2004a, Übersichtsartikel). Dem steht jedoch wiederum die Bildung von ROS in zwei Phasen entgegen, wie durch Chen *et al.* (2003) gezeigt wurde. Vermutlich spielen also ROS bei der Apoptose sowohl vor als auch nach der Ausschüttung von Cytochrom c durch Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran eine Rolle.

4.1.3 Töten der Hefecaspase Yca1p in Abhängigkeit von Cytochrom c

Madeo *et al.* konnten 2002 zeigen, dass eine Metacaspase in Hefe (Yca1p) tatsächlich die Funktion einer Caspase einnimmt. Sie führt bei Überexpression und gleichzeitigem Sauerstoffstress zu geringerer Überlebensfähigkeit von Hefe, wobei sowohl Caspaseaktivierung, Chromatinkondensation als auch DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden konnten. Umgekehrt führt die Deletion der Caspase zu erhöhter Toleranz gegenüber Sauerstoffstress und verzögert ein altersbedingtes Absterben. In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob das Töten der Caspase abhängig von Cytochrom c und dessen Ausschüttung erfolgt.

Die Überexpression der Hefecaspase in Nullmutanten der verschiedenen Isoformen von Cytochrom c führt in keinem Fall zu einem gesteigerten Zelltod im Vergleich zum Leerplasmid, auch nicht bei gleichzeitiger Belastung durch Sauerstoffstress. Allerdings ist zu bemerken, dass die Nullmutante von CYC1 in diesem Versuch generell sehr schlecht überlebte. Vermutlich ist diese verringerte Überlebensfähigkeit

auf Effekte zurückzuführen, die mit einem vermehrten Abbau einzelner Proteine der Atmungskette, z. B. Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase, zusammenhängen. Jedoch wurde das Phänomen des vermehrten Abbaus nur für eine Nullmutante beider Isoformen von Cytochrom c beschrieben (Pearce *et al.*, 1995). Neben einer verbesserten Überlebensfähigkeit der Cytochrom c Nullmutanten konnte auch gezeigt werden, dass dies mit einer deutlich verringerten Caspaseaktivität bei Überexpression von Yca1p und gleichzeitigem Sauerstoffstress einhergeht.

Allerdings ergab die Westernblot-Analyse dieser Stämmen, dass in der *cyc1Δ* Nullmutante die Caspase deutlich weniger exprimiert wird als im WT Stammhintergrund bzw. in der *cyc7Δ* Nullmutante, die beide eine in etwa gleich starke Expression aufweisen. Auffällig ist allerdings, dass bei Belastung mit Wasserstoffperoxid in der *cyc1Δ* Nullmutante die Menge an Yca1p in etwa konstant bleibt, wohingegen sie beim WT etwas abnimmt. Dies hatte zur Folge, dass ein Angleichen der Expression des Proteins in beiden Stämmen durch unterschiedlichen Galactosegehalt im Medium sowohl mit als auch ohne Sauerstoffstress nicht möglich war. Es bleibt festzuhalten, dass die rettenden Effekte der *cyc1Δ* Nullmutante bei Caspaseüberexpression und Sauerstoffstress sowie die verringerte Caspaseaktivität zumindest teilweise durch eine verringerte Proteinmenge von Yca1p zustande kommen könnten.

Eine Northernblot-Analyse ergab, dass die mRNA Mengen der Caspase in diesem Stammhintergrund etwa gleich sind im Vergleich zum WT und zu der *cyc7Δ* Nullmutante. Die verringerte Proteinmenge von Yca1p ist also auf verringerte Proteinstabilität zurückzuführen. Eventuell könnte eine Doppeldisruption von CYC1 und YME1 diese Proteinmenge wieder auf ein annähernd normales Niveau bringen, da gezeigt wurde, dass Yme1p für den Abbau von COX-Untereinheiten bei Cytochrom Nullmutanten verantwortlich ist (Pearce *et al.*, 1995).

Durch Westernblot-Analyse von Cytochrom c überexprimierenden Stämmen, in denen die Hefecaspase Yca1p endogen unter dem eigenen Promotor HA-getaggt war, zeigte, dass die Stabilität von Yca1p nicht durch die Überexpression von Cytochrom c heraufgesetzt wird.

4.1.4 Interaktion von Cytochrom c mit der Hefecaspase Yca1p

In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass das aus Mitochondrien ausgeschüttete Cytochrom c mit Apaf-1 und Procaspase-9 unter Hydrolyse von ATP einen Komplex eingeht, das sogenannte Apoptosom. Dabei wird Procaspase-9 zur aktiven Caspase

9 autokatalytische prozessiert und kann nachfolgend die Effektorcaspasen 3 und 7 spalten und aktivieren (Zou *et al.*, 1999; Jiang & Wang, 2000). Der bei *C. elegans* gefundene Signaltransduktionsweg benötigt, nach heutigem Kenntnisstand, die Ausschüttung von Cytochrom c nicht für diesen Schritt. Vielmehr geht man davon aus, dass Ced-9, das Bcl-2-Homolog in *C. elegans*, direkt Ced-4 inhibiert und nicht wie in Säugerzellen durch Inhibition von Bax die Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien verhindert. Ced-4, das Apaf-1 Homolog in *C. elegans*, ist dafür verantwortlich, die Caspase Ced-3 zu aktivieren (Liu & Hengartner, 1999; Horvitz, 1999). Daher war es interessant zu überprüfen, ob die einzige bis dato bekannte Caspase in Hefe in der Lage ist, Cytochrom c zu binden, obwohl für Apaf-1 bzw. Ced-4 kein Homolog in Hefe gefunden werden konnte.

Durch Aufreinigen der Flag-getaggten Hefecaspase Yca1p mit Hilfe von α -Flag-Antikörper gekoppelter Agarose und anschließender Westernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass zumindest keine starke Interaktion zwischen der Caspase und Cytochrom c bestehen kann, denn Cytochrom c wurde bereits im ersten Waschschrift, vermutlich mit der Mehrzahl der Proteine, eluiert.

Der Versuch, eine mitochondriale Lokalisierung der Caspase bei Sauerstoffstress durch Fluoreszenzmikroskopie einer Hefe mit GFP-gebundenem N-terminalen Teil von Yca1p und DsRed markierten Mitochondrien nachzuweisen, ergab, dass sich die Caspase hauptsächlich in einer großen runden Struktur am Rande der Zelle befindet, was auf eine Kernlokalisierung hinweisen könnte. Andererseits wurden auch größere Mengen der Caspase am Knospenhals gefunden, was auch auf eine Lokalisation an Filamente hindeuten könnte. In jedem Fall scheint eine mitochondriale Lokalisation des N-terminalen Teils der Caspase ausgeschlossen.

Die Überexpression der gesamten Caspase zusammen mit DsRed markierten Mitochondrien führte allerdings bei gleichzeitiger Belastung mit Wasserstoffperoxid zu einer völlig veränderten Morphologie der Hefezellen: vor allem bei Knospen konnten längliche oder an Birnen erinnernde Formen gefunden werden. Diese veränderten Hefeknospen scheinen teilweise über die gesamte Zelle verteilte Mitochondrien zu haben, die punktförmig sind. Im Vergleich dazu befinden sich die Mitochondrien in dem gleichen Hefestamm ohne Peroxid bzw. mit Leerplasmid anstelle des YCA1-Plasmids eher am Rande der Zellen und sind teilweise miteinander verbunden. Dieses Ergebnis scheint Beobachtungen zu ähneln, die eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks bei Apoptose beschreiben.

Allerdings konnten diese Effekte nicht durch den Einsatz von Caspase-Inhibitoren verhindert werden (Frank *et al.*, 2001; Karbowski & Joule, 2003, Übersichtsartikel). In der Zukunft sollte die Lokalisierung der Caspase näher untersucht werden, insbesondere im Hinblick auf Filamente, die an der mitochondrialen Fusion bzw. Fission oder an der Abschnürung der Knospe beteiligt sind.

4.1.5 Cytochrom c Ausschüttung und Mitochondrienpotential bei Yca1p Überexpression

Auch wenn die meisten Caspasen im Signalweg der Säugerzellapoptose stromabwärts von der Ausschüttung von Cytochrom c zu finden sind, so gibt es doch Hinweise darauf, dass bei der durch Todesrezeptoren aktivierten Apoptose, bei der Caspase-8 als Initiatorcaspase fungiert, erst nach der Aktivierung dieser Caspase eine Ausschüttung von Cytochrom c erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass die Übersendung des apoptotischen Signals von Caspase-8 zu den Mitochondrien über ein Protein namens Bid, einem Mitglied der Bcl-2-Familie, erfolgt. Dabei wird Bid durch Caspase 8 gespalten, und der verbleibende C-Terminus induziert an den Mitochondrien die Freisetzung von Cytochrom c (Luo *et al.*, 1998). Überdies konnten bereits Madeo *et al.* (2002) zeigen, dass in der Hefeapoptosekaskade Yca1p stromaufwärts von Ygl129cp einzuordnen ist. Bemerkenswerterweise ist Ygl129cp das Hefehomolog zu DAP-3, einem Bestandteil der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose in Säugern (Miyazaki & Reed, 2001).

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Überexpression von Yca1p zur Ausschüttung von Cytochrom c führt. Es zeigte sich, dass nach 6 h Überexpression bereits eine Ausschüttung von Cytochrom c stattgefunden hatte. Bei dem Versuch, die Ausschüttung nach 20 h nachzuweisen, konnte lediglich eine verringerte Cytochrom c Menge in den Mitochondrien, nicht jedoch Cytochrom c im Cytosol nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich auf Proteindegradation zurückzuführen. Interessanterweise überlebten nach 6 h Induktion der Hefecaspase Yca1p in etwa gleich viele Zellen wie bei dem Kontrollstamm mit Leerplasmid. Dies wirft die Frage auf, wie die Cytochrom c Ausschüttung abläuft. Von Ahsen *et al.* diskutieren diese Frage in ihrem Review „The 'harmless' release of cytochrom c“; sie postulieren, dass die Ausschüttung von Cytochrom c über eine so geringfügige Veränderung der Mitochondrien erfolgen muss, dass die Folgen jederzeit reversibel sind. Dies würde die beobachtete Ausschüttung von Cytochrom c ohne gleichzeitiges Absterben der Hefezellen erklären. Von Ahsen *et al.* (2000b) gehen von einer nachträglichen

Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials aus, die abhängig von Caspaseaktivität ist. Dagegen konnten Gottlieb *et al.* (2003) zeigen, dass die Enkopplung des mitochondrialen Membranpotentials zu Kondensation der mitochondrialen Matrix und anschließender Cytochrom c-Ausschüttung führt, wenn die Mitochondrien mit der BH3-Domäne (*Bcl-2 homology region-3*) von Bid inkubiert werden.

Die Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials lässt sich unter anderem durch Farbstoffe nachweisen, die einzelne Zellkompartimente abhängig von ihrem Potential anfärben. Eine solche Färbung wurde bei Yca1p-überexprimierender Hefe im Vergleich zu einem Kontrollstamm mit Leerplasmid durchgeführt. Die Messungen fanden 3,5 h, 6 h, und 20 h nach dem Medienshift, der die Expression induzierte, statt. Sowohl bei 3,5 h als auch bei 6 h betrug der Anteil der entkoppelten Zellen bei dem Yca1p-überexprimierenden Stamm etwa das dreifache im Vergleich zum Kontrollstamm. Nach 20 h waren bei dem Yca1p-überexprimierenden Stamms etwa viermal so viele Zellen entkoppelt als bei dem Kontrollstamm. Auffällig ist in diesem Zusammenhang die insgesamt erhöhte Anzahl der entkoppelten Zellen bei der Messung nach 3,5 h. Allerdings zeigte sich bei der entsprechenden Überlebensplattierung auch, dass sowohl bei der Kontrolle als auch bei dem Überexprimierer sehr viele Zellen gestorben waren. Es ist festzuhalten, dass das Mitochondrienpotential bei der durch Yca1p-ausgelösten Hefeapoptose entkoppelt wird und auch Cytochrom c ausgeschüttet wird. Über einen Zusammenhang oder eine zeitliche Reihenfolge ist noch keine Aussage möglich.

Die Diskussion um den Mechanismus der Cytochrom c Ausschüttung ist eine sehr aktuelle Frage, und es gibt bereits Versuche, diese mit Hilfe des Hefesystems zu bearbeiten. So haben Roucou *et al.* bereits im Jahr 2000 gezeigt, dass ein GFP-getaggtetes Hefe-Cytochrom c bei Bax Expression nicht ins Cytosol ausgeschüttet wird. Lim *et al.* geben in ihrem Review von 2002 an, die Größe der Poren der äußeren Mitochondrienmembran durch unterschiedlich getaggte Cytochrom c-Konstrukte in Hefe mit etwa 15 bis 20 kDa bestimmt zu haben.

Hefe ist also ein Modellorganismus, in dem mechanistische Fragen zur Ausschüttung von Cytochrom c in der Apoptose allgemein – durch Expression von Säugergenen – und speziell in der Hefeapoptose adressiert werden können.

4.2 Cytochrom c in der Yca1p-abhängigen Hefeapoptose – Fazit

Durch die Überexpression der Isoform 1 von Cytochrom c (Cyc1p) kann ein Zelltod verursacht werden, der mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies einhergeht. Umgekehrt verhindert die Deletion von CYC1 ein vermehrtes Absterben von Hefe durch Überexpression der Caspase Yca1p. Dies ist unter anderem bedingt durch eine verringerte Proteinmenge der Caspase. Die Deletion der Isoform 2 von Cytochrom c (Cyc7p) dagegen kann zwar auch vor Apoptose durch Caspaseüberexpression retten, Cyc7p ist selbst jedoch nicht in der Lage, bei Überexpression Zelltod zu verursachen. Demzufolge ist Cyc7p zwar notwendig, nicht aber hinreichend für die Auslösung von Apoptose.

Überexpression der Hefecaspase Yca1p bei gleichzeitigem Sauerstoffstress führt zu einer stark veränderten Morphologie der Hefezellen, von der teilweise auch die Mitochondrien betroffen sind. Jedoch war ein Nachweis mitochondrialer Lokalisation der Caspase nicht möglich. Eine Interaktion zwischen Yca1p und Cytochrom c konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Überexpression der Caspase führt einerseits zur Ausschüttung von Cytochrom c ins Cytosol und andererseits auch teilweise zur Entkopplung des mitochondrialen Membranpotentials. Es lässt sich also festhalten, dass die durch die Überexpression der Hefecaspase Yca1p ausgelöste Apoptose abhängig von der Ausschüttung von Cytochrom c verläuft.

4.3 Die Atmungskette in *S. cerevisiae*

Hefe wird für die Erforschung bestimmter zellulärer Prozesse schon lange als Modellorganismus benutzt. So wurden große Teile des Zellzyklus zunächst in Hefe erforscht und anschließend auf Säugerzellen übertragen. Für die Erforschung von Apoptose erschien Hefe zunächst ungeeignet, da einerseits keine Homologe zu den wichtigsten an der Apoptose beteiligten Proteinen wie Caspasen und p53 gefunden wurden und andererseits die Notwendigkeit eines physiologischen Zelltods für einen Einzeller nicht gesehen wurde.

Die Enzyme der Atmungskette wurden hauptsächlich an Mitochondrien aus Rinderherzen erforscht und nachträglich auch in Hefe. Es zeigte sich, dass im Vergleich zum Zellzyklus die Zusammensetzung der einzelnen Komplexe der Atmungskette weniger konserviert ist, als man zunächst annehmen könnte. In der Tat sind die Komplexe sogar innerhalb der Hefegruppe durchaus unterschiedlich. Eine

mögliche Erklärung ist, dass Hefe im Gegensatz zu Säugerzellen auf ganz unterschiedlichen Substraten wachsen kann und deshalb im Stande ist, die Zusammensetzung ihrer Stoffwechsellenzyme zu verändern (de Vries & Marres, 1987, Übersichtsartikel).

Der Atmungskettenkomplex I, die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, ist in der Hefe *S. cerevisiae* nicht vorhanden. Dafür ist *S. cerevisiae* in der Lage, durch eine externe NADH-Dehydrogenase im Intermembranraum NADH zu oxidieren. Diese Oxidation lässt sich nicht durch Rotenon, einem Inhibitor des Komplex I, unterbinden. In der Hefe *S. cerevisiae* findet sich im mitochondrialen Genom keine der Untereinheiten der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, die bei Säugern mitochondrial kodiert sind. Allerdings gibt es in *S. cerevisiae* eine intramitochondriale NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase Ndi1p, die in der stationären Phase exprimiert wird, aber ebenfalls insensitive gegenüber Rotenon ist. Dagegen sind die Atmungskettenkomplexe II, III und IV alle in Hefe vorhanden und führen auch die gleichen Funktionen aus. Für Komplex IV (Cytochrom Oxidase) sind sogar die gleichen zentralen Untereinheiten COX1, COX2 und COX3 wie bei Säugern mitochondrial kodiert. Da unter anderem drei Untereinheiten des Komplex IV mitochondrial kodiert sind sowie drei weitere Untereinheiten der ATP Synthase, führt die Entfernung der mitochondrialen DNA (mtDNA) zu einer Atmungskettendefizienz, die bedingt, dass die Hefen nicht mehr auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen können. Zellen ohne mtDNA werden mit rho0 bezeichnet. Es gibt unterschiedliche Ergebnisse bei Versuchen herauszufinden, ob rho0 Zellen resistenter oder empfindlicher gegenüber Apoptose sind (z. B. Lee *et al.*, 2004 und Wang *et al.*, 2002).

4.3.1 Apoptose in Hefe in Abhängigkeit der Funktion der Atmungskette

Der Versuch, die Resistenz von rho0 Hefezellen gegenüber der Yca1p-induzierten Apoptose zu untersuchen, gelang leider nicht. Daher wurden Yca1p-Überexpressionsexperimente mit Nullmutanten verschiedener Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen III und IV durchgeführt. Komplex III (Ubichinon-Cytochrom c-Reduktase) ist für die Bildung mitochondrialer Sauerstoffspezies verantwortlich. Von Komplex IV (Cytochrom c-Oxidase) werden die drei größten Untereinheiten durch das mitochondriale Genom kodiert. Ausgewählt wurden Untereinheiten der Komplexe, die bei der *Saccharomyces Genome Database* (SGD) als notwendig für die Funktion der Atmungskette definiert und kernkodiert sind: QRC7, QRC9, COX7, COX9. In der Nullmutante von QRC7 sind außerdem noch weitere Untereinheiten der

Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase herunterreguliert. Außerdem wurden noch folgende Stämme in die Versuche miteinbezogen: eine Nullmutante von CYC3, der Cytochrom c Haemlyase, die für die Verknüpfung von Apocytochrom c mit dem Haem verantwortlich ist; eine Nullmutante von PET111, das an der Translation von COX2 beteiligt ist; eine Nullmutante von ATP10, das am Zusammenbau der mitochondrialen ATPase beteiligt ist. Von ATP10 und CYC3 ist außerdem bekannt, dass die Deletion vor Essigsäure-induzierter Apoptose in Hefe schützt. Dasselbe gilt im Übrigen auch für rho0-Hefen. Es zeigte sich, dass nur ein Teil der Nullmutanten auch die Caspase exprimieren, nämlich diejenigen der Gene COX7, COX8, ATP10 und QRC9. Bei diesen Stämmen konnte nachgewiesen werden, dass die Nullmutanten der Cytochrom c-Oxidase insgesamt besser überleben, wohingegen alle anderen Nullmutanten generell schlechter als der WT überleben. Allerdings konnte bei keiner der Nullmutanten durch die Expression der Caspase Yca1p die Überlebensrate weiter verringert werden. Dies führt zu dem Schluss, dass für die Yca1p-induzierte Apoptose eine intakte Atmungskette benötigt wird.

Beim Altern aller oben aufgezählten Nullmutanten überlebt insbesondere die Nullmutante von QRC7 sehr schlecht. Nach zwei Tagen Altern wurde bei einer Messung der *in vivo* Caspaseaktivität gezeigt, dass die Mutanten der Ubichinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase (*qrc7Δ* und *qrc9Δ*) eine erhöhte Caspaseaktivität haben, wohingegen die Mutanten von ATP10 und COX7 eine eher geringe Caspaseaktivität aufweisen. Vermutlich ist die verminderte Überlebensfähigkeit der *qrc* Mutanten auf eine vermehrte Produktion von ROS zurückzuführen, was noch nachzuweisen wäre.

4.3.2 Die Atmungskette in der Hefeapoptose – Fazit

Die Hefecaspase Yca1p kann ohne eine funktionierende Atmungskette in *S. cerevisiae* nicht töten. Die Deletion einzelner Untereinheiten des Ubichinon-cytochrom c-Oxidoreduktase-Komplexes führt zu verminderter Überlebensfähigkeit der Hefe. Die Deletion von Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase vermehrt die Resistenz gegenüber der Apoptoseinduktion durch die Hefecaspase Yca1p.

5 Literaturverzeichnis

Abdullaev ZK, Bodrova ME, Chernyak BV, Dolgikh DA, Kluck RM, Pereverzev MO, Arseniev AS, Efremov RG, Kirpichnikov MP, Mokhova EN, Newmeyer DD, Roder H, Skulachev VP (2002). A cytochrome c mutant with high electron transfer and antioxidant activities but devoid of apoptogenic effect. *Biochem. J.* 362, 749-754.

Albayrak T, Scherhammer V, Schoenfeld N, Braziulis E, Mund T, Bauer MK, Scheffler IE, Grimm S (2003). The tumor suppressor cybL, a component of the respiratory chain, mediates apoptosis induction. *Mol. Biol. Cell* 14, 3082-3096.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Burke PV, Raitt DC, Allen LA, Kellogg EA, Poyton RO (1997). Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast. *J. Biol. Chem.* 272, 14705-14712.

Candé C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G (2004). Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ.* 11, 591-595.

Casal M, Paiva S, Andrade RP, Gancedo C, Leão C (1999). The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1. *J. Bacteriol.* 181, 2620-2623.

Chae HJ, Ke N, Kim HR, Chen S, Godzik A, Dickman M, Reed JC (2003). Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene* 323, 101-113.

Chang HY, Yang X (2000). Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 821-846.

Chen Q, Chai YC, Mazumder S, Jiang C, Macklis RM, Chisolm GM, Almasan A (2003). The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ.* 10, 323-334.

Church C, Poyton, RO (1998). Neither respiration nor cytochrom c oxidase affects mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Exp. Biol.* 201, 1729-1737.

Clarke PG (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol. (Berl.)* 181, 195-213.

Clarke PG, Clarke S (1995). Historic apoptosis. *Nature* 378, 230.

Creagh EM, Martin SJ (2001). Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans.* 29, 696-702.

Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS (2002). Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J. Cell Biol.* 158, 507-517.

Daum G, Bohni PC, Schatz G (1982). Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b2 by isolated yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257, 13028–13033.

Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrom c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17, 2215-2223.

De Vries S, Marres CA (1987). The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 895, 205-239.

Degli Esposti MD (2004). Mitochondria in apoptosis: past, present and future. *Biochem. Soc. Transact.* 32, 493-495.

Dumont MD, Mathews AJ, Nall BT, Baim SB, Eustice DC, Sherman F (1990). Differential stability of two apo-isocytochromes c in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 265, 2733-2739.

Dumont ME, Cardillo TS, Hayes MK, Sherman F (1991). Role of cytochrome c heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 11, 5487-5496.

Fahrenkrog B, Sauder U, Aebi U (2004) The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. *J. Cell Sci.* 117, 115-126.

Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ (2001). The role of dynamin-related protein1, a mediator of mitochondrial fission in apoptosis. *Dev. Cell* 1, 515-525.

Fröhlich K-U, Madeo F (2000). Apoptosis in yeast – a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett.* 473, 6-9.

Futcher B (1999). Cell cycle synchronization. *Methods Cell Sci.* 21, 79-86.

Gietz RD, Woods RA (2001). Genetic transformation of yeast. *BioTechniques* 30, 816-831.

Gottlieb E, Armour SM, Harris MH, Thompson CB (2003) Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ.* 10, 709-717.

Güldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J, Hegemann JH (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research* 24, 2519-2524.

Guimaraes AC, Linden R (2004). Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J Biochem.* 271, 1638-1650.

Green DR, Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.

Greenhalf W, Stephan C, Chaudhuri B (1996). Role of mitochondria and C-terminalmembrane anchor of Bcl-2 in Bax induced growth arrest and mortality in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 380, 169-175

Green-Willms NS, Butler CA, Dunstan HM, Fox TD (2001). Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene COX2. *J. Biol. Chem.* 276, 6392-6397.

Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Fröhlich KU, Wissing S, Büttner S, Fehr M, Sigrist S, Madeo F (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 164, 501-507.

Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251.

Holst B, Lunde C, Lages F, Oliveira R, Lucas C, Kielland-Brandt MC (2000). GUP1 and its close homologue GUP2, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 37, 108-124.

Horvitz HR (1999) Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.* 59, 1701-1706.

Iverson SL, Orrenius S (2004a). The cardiolipin-cytochrom c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 423, 37-46.

Iverson SL, Enoksson M, Gogvadze V, Ott M, Orrenius S (2004b). Cardiolipin is not required for Bax-mediated cytochrome c release from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 1100-1107.

Jiang X, Wang X (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem.* 275, 31199-31203.

Kamena F, Spang A (2004). Tip20p prohibits back-fusion of COPII vesicles with the endoplasmic reticulum. *Science* 304, 286-289.

Kang JJ, Schaber MD, Srinivasula SM, Alnemri ES, Litwack G, Hall DF, Bjornsti M-A (1999). Cascades of Mammalian Caspase Activation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 3189-3198.

Karbowski M, Youle RJ (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ.* 10, 870-880.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.

Kirchman PA, Kim S, Lai CY, Jazwinski SM (1999). Interorganelle signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152, 179-190.

Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis inducing factor. *Nature* 419, 367-374.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997a). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.

Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR, Newmeyer DD (1997b). Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J.* 16, 4639-4649.

Kluck RM, Ellerby LM, Ellerby HM, Naiem S, Yaffe MP, Margoliashi E, Bredesen A, Mauk G, Sherman F, Newmeyer DD (2000). Determinants of Cytochrome c Pro-

apoptotic Activity. The role of Lysine 72 Timethylation. *J. Biol. Chem.* 275, 16127-16133.

Lämmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lauber K, Appel HA, Schlosser SF, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S (2001). The adapter protein apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) is proteolytically processed during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 29772-29781.

Latterich M, Fröhlich K-U, Schekman R (1995). Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell* 82, 885-893.

Laun P, Pichova A, Madeo F, Fuchs J, Ellinger A, Kohlwein S, Dawes I, Fröhlich KU, Breitenbach M (2001). Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.* 39, 1166-1173.

Lee MS, Kim JY, Park SY (2004). Resistance of rho(0) cells against apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1011, 146-153.

Li LY, Luo X, Wang X (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.

Ligr M, Madeo F, Fröhlich E, Hilt W, Fröhlich K-U, Wolf DH (1998). Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett.* 438, 61-65.

Lim ML, Lum MG, Hansen TM, Roucou X, Nagley P (2002). On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *J. Biomed. Sci.* 9, 488-506.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.

Liu QA, Hengartner MO (1999). The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 887, 92-104.

Ludovico P, Rodrigues F, Almeida A, Silva MT, Barrientos A, Côrte-Real M (2002). Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 13, 2598-2606.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

Ly JD, Grubb DR, Lawen A (2003). The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 8, 115-128.

Maag RS, Hicks SW, Machamer CE (2003). Death from within: apoptosis and the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 456-461.

Madeo F, Fröhlich E, Fröhlich K-U (1997) A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol.* 139, 729-734.

Madeo F, Fröhlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH, Fröhlich K-U (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol.* 145, 757-767.

Madeo F, Herker E, Maldener C, Wissing S, Lächelt S, Herlan M, Fehr M, Lauber K, Sigrist SJ, Wesselborg S, Fröhlich K-U (2002a). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell* 9, 911-917.

Madeo F, Engelhardt S, Herker E, Lehmann N, Maldener C, Proksch A, Wissing S, Fröhlich K-U (2002b). Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr. Genet.* 41, 208-216.

Manon S, Chaudhuri B, Guerin M (1997). Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL. *FEBS Lett.* 415, 29-32.

Manon S, Priault M, Camougrand N (2001). Mitochondrial AAAtype protease Yme1p is involved in Bax effects on cytochrome c oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 1314-1319.

Manon S (2004). Utilization of yeast to investigate the role of lipid oxidation in cell death. *Antioxid. Redox Signal* 6, 259-267.

Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RCAA, LaFace DM, Green DR (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition of overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182, 1545-1556.

Matsuyama S, Xu Q, Velours J, Reed JC (1998). The Mitochondrial F₀F₁-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol. Cell* 1, 327-336.

Meier P, Finch A, Evan G (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796-801.

Miyazaki T, Reed JC (2001). A GTP-binding adapter protein couples TRAIL receptors to apoptosis-inducing proteins. *Nat. Immunol.* 2, 493-500.

Monney L, Otter I, Olivier R, Ozer HL, Haas AL, Omura S, Borner C (1998). Defects in the ubiquitin pathway induce caspase-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 273, 6121-6131.

Mukamel Z, Kimchi A (2004). DAP3 localizes to the mitochondria and is involved in the process of mitochondrial fragmentation during cell death. *J. Biol. Chem.* 2004 Jun 2 [Epub ahead of print].

Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC (1994). Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 79, 353-364.

Pavlov EV, Priault M, Pietkiewicz D, Cheng EH, Antonsson B, Manon S, Korsmeyer SJ, Mannella CA, Kinnally KW (2001). A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J. Cell Biol.* 155, 725-731.

Pearce DA, Sherman F (1995). Degradation of cytochrome oxidase subunits in mutants of yeast lacking cytochrome c and suppression of the degradation by mutation of yme1. *J. Biol. Chem.* 270, 20879-20882.

Petrosillo G, Ruggiero FM, Paradies G (2003). Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrom c from mitochondria. *FASEB J.* 17, 2202-2208.

Priault M, Chaudhuri B, Clow A, Camougrand N, Manon S (1999a). Investigation of bax-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria: Permeability of mitochondrial membranes, role of VDAC and ATP requirement. *Eur. J. Biochem.* 260, 684-691.

Priault M, Camougrand N, Chaudhuri B, Schaeffer J, Manon S (1999b) Comparison of the effects of bax-expression in yeast under fermentative and respiratory conditions: Investigation of the role of adenine nucleotides carrier and cytochrome c. *FEBS Lett.* 456, 232-238.

Ricci J-E, Muñoz-Pinedo C, Fitzgerald G, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, Scheffler IE, Ellisman MH, Green DR (2004). Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 117, 773-786.

Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* 3, 619-625.

Roucou X, Prescott M, Devenish RJ, Nagley P (2000). A cytochrome c-GFP fusion is not released from mitochondria into the cytoplasm upon expression of Bax in yeast cells. *FEBS Lett.* 471, 235-239.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Scheinert P, Behrens B, Kahle D (2001). Optimizing DNA amplification protocols using the Eppendorf Mastercycler.

http://www.brinkmann.com/PCR_appl_protocolsMC.asp

Schulz JB, Bremen D, Reed JC, Lommatzsch J, Takayama S, Wullner U, Loschmann PA, Klockgether T, Weller M (1997). Cooperative interception of neuronal apoptosis by BCL-2 and BAG-1 expression: prevention of caspase activation and reduced production of reactive oxygen species. *J. Neurochem.* 69, 2075-2086.

Schweichel JU, Merker HJ (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253-266.

Shirogane T, Fukada T, Muller JM, Shima DT, Hibi M, Hirano T (1999). Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* 11, 709-719.

Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee RA, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112-116.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* 8, 613-621.

Thompson CB (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335-344.

Uchiyama Y (2001). Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch. Histol. Cytol.* 64: 233-246.

Von Ahsen O, Waterhouse NJ, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR (2000a). The 'harmless' release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 7, 1192-1199.

Von Ahsen O, Renken C, Perkins G, Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD (2000b). Preservation of mitochondrial structure and function after Bid- or Bax-mediated cytochrome c release *J. Cell Biol.* 150, 1027-1036.

Wang J, Silva JP, Gustafsson CM, Rustin P, Larsson NG (2001). Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4038-4043.

Wissing S, Ludovico P, Herker E, Büttner S, Engelhardt SM, Decker T, Link A, Proksch A, Rodrigues F, Côte-Real M, Fröhlich K-U, Manns J, Candé C, Sigrist SJ, Kroemer G, Madeo F (2004). An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* [in print].

Wu D, Chen PJ, Chen S, Hu Y, Nunez G, Ellis RE (1999). *C. elegans* MAC-1, an essential member of the AAA family of ATPases, can bind CED-4 and prevent cell death. *Development* 126, 2021-2031.

Yamaki M, Umehara T, Chimura T, Horikoshi M (2001). Cell death with predominant apoptotic features in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by deletion of the histone chaperone ASF1/CIA1. *Genes Cells* 6, 1043-1054.

Yuan J, Horvitz HR (1992). The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 116, 309-320.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999). An APAF-1-cytochrom c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 274, 11549-11556.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Anatomie	K. Reutter
Anorganische Chemie	E. Lindner, J. Strähle
Botanik	W.-E. Mayer
Organische Chemie	E. Bayer, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, H. Kalbacher, A. Kapourniotu, E. Maier, W. Voelter
Humanphysiologie	G. Kissling, J. Ruppertsberg
Mathematik	H. Pommer
Mikrobiologie	K. Poralla
Pflanzenphysiologie	K. Wegmann
Physik	W. Nakel
Physikalische Biochemie	K. Albert, H. Bauer, W. Hiller, W. Stock, S. Stoeva, W. Voelter
Physikalische Chemie	G. Gauglitz, V. Hoffmann
Physiologische Chemie	H. Bisswanger, P. Bohley, K. Eisele, K.-U. Fröhlich, B. Hamprecht, F. Madeo, D. Mecke, H. Probst, U. Weber, U. Weser
Spezielle Pathologie (Histologie)	E. Kaiserling
Strahlenschutz	H.-J. Reinecke
Toxikologie	K. Bock, U. Breyer-Pfaff, P. Münzel, M. Schwarz, E. Pfaff, J. Werringloer
Zoologie	H. Günzl, W. Pfeiffer