

Membranfusionsprozesse und Apoptose in
Saccharomyces cerevisiae

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

Astrid Proksch

Tag der mündlichen Prüfung:

04.02.2005

Dekan:

Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. D. Mecke

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. F. Madeo

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert

Wissing S*, Ludovico P*, Engelhardt S., Büttner S., Herker E., Decker T., Link A., Proksch A., Rodrigues F., Corte-Real M., Fröhlich KU., Manns J., Candé C., Kroemer G., Sigrist S.J., Madeo F. An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol.* 2004 Sep 27;166(7):969-74.

Wadskog I., Maldener C., Proksch A., Madeo F., Adler L. Yeast lacking the SOP1/SRO7 encoded tumor suppressor homologue shows increased susceptibility to apoptosis-like cell death on exposure to NaCl stress. *Mol. Biol. Cell.* 2004 Mar; 15 (3):1436-44.

Madeo F., Engelhardt S., Herker E., Lehmann N., Maldener C., Proksch A., Wissing S., Fröhlich KU. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr Genet.* 2002, (4):208-16.

Proksch A*, Fröhlich KU*, Jungwirth H., Hojas N., Deponte M., Jüschke C., Madeo F. A new cdc48-mutant showing all markers of apoptosis; *in preparation*

* Beide Personen trugen gleichwertig zu dieser Arbeit bei.

Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Frank Madeo und Prof. Dr. Dieter Mecke am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt. Bei ihnen beiden bedanke ich mich für das Interesse an meiner Doktorarbeit und speziell bei Frank Madeo für die vielen Freiheiten, die er mir während meiner Doktorarbeit ließ.

Für die angenehme, entspannte Atmosphäre im Labor bedanke ich mich in erster Linie bei den vier weiteren Doktorandinnen: Silvia Engelhardt, Eva Herker, Corinna Maldener und Silke Wissing. Sie haben viel zu gelungenen drei Jahren Doktorarbeit beigetragen. Abgesehen davon bedanke ich mich auch bei den Diplomanden und speziell bei den zahlreichen Hiwis, die mir viel Routinearbeit abgenommen haben. Auch Helmut Jungwirth möchte ich an dieser Stelle erwähnen, er sowie alle anderen haben mit ihrer unkomplizierten, hilfsbereiten und freundschaftlichen Art zur guten Stimmung beigetragen.

Bei Eva und Silke möchte ich mich für die vielen molekularbiologischen Tipps und Tricks bedanken, die mir vieles erleichtert haben.

Corinna danke ich für die unzählbaren, schönen Teestunden, in denen sie mir mit Rat und Tat bei Problemen, die viel weitergingen als Laborprobleme, zur Seite stand. Darauf hoffe ich auch weiterhin.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes danke ich für mein Stipendium.

Für ihr Verständnis ihre Unterstützung möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, besonders bei meinem Vater, der mir das Biochemiestudium ermöglicht hat.

Meinem lieben Jan, für so vieles.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Der Zelltod	1
1.2.	Die beiden Formen des Zelltodes: Nekrose und Apoptose.....	3
1.2.1.	Marker der Apoptose	4
1.2.2.	Caspasen – Schlüsselenzyme der Apoptose	5
1.3.	Apoptose und Membranfusionsprozesse.....	8
1.4.	Hefe als Modellorganismus.....	9
1.4.1.	Hefe als Modellorganismus im Allgemeinen	9
1.4.2.	Hefe als Modellorganismus für Apoptose	11
1.5.	Zielsetzung	15
2.	Material und Methoden	16
2.1.	Geräte.....	16
2.2.	Chemikalien	18
2.3.	Antikörper	19
2.4.	Organismen	19
2.4.1.	Hefestämme	19
2.4.2.	<i>E. coli</i> -Stämme	21
2.5.	Puffer und Lösungen für molokularbiologische Methoden.....	21
2.5.1.	PCR	22
2.5.2.	Agarosegelelektrophorese.....	22
2.5.3.	pYES2.1 TOPO TA Expressionskit der Firma Invitrogen.....	22
2.6.	Primer	23
2.6.1.	Primer für das chromosomale Taggen.....	23
2.6.2.	Primer für die Kolonien PCR.....	24
2.6.3.	Überexpressionsprimer.....	24
2.7.	Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden	25
2.7.1.	Lösungen zur Bestimmung der Zelldichte einer Hefekultur	25
2.7.2.	Gewinnung transformationskompetenter Zellen von <i>S. cerevisiae</i> und Transformation mit rekombinanter DNA	25
2.7.3.	TUNEL-Test (<i>In Situ Cell Death Detection</i> , POD).....	25

2.7.4.	Dihydrorhodamin 123-Färbung	26
2.7.5.	Diaminophenylindol-Färbung	26
2.7.6.	Bestimmung der Caspaseaktivität durch FACS-Messung	26
2.8.	Puffer und Lösungen für immunologische Methoden.....	27
2.8.1.	Rohextraktherstellung	27
2.8.2.	Proteinbestimmung nach Bradford	27
2.8.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	27
2.8.4.	Ponceau-S-Färbung	28
2.8.5.	Immunoblot.....	28
2.9.	Kulturmedien.....	29
2.9.1.	Hefe-Vollmedium YEPD/YEPG.....	29
2.9.2.	Hefe-Vollmedium YEPD mit NaCl.....	29
2.9.3.	Hefe-Minimalmedium SMD/SMG.....	30
2.9.4.	LB (Luria + Bertani)-Medium für coli Bakterien	30
2.10.	Stammhaltung und Kultivierung	30
2.10.1.	Flüssigkulturen.....	30
2.10.2.	Plattenkulturen.....	30
2.10.3.	Dauerkulturen	31
2.11.	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	31
2.11.1.	Agarosegelelektrophorese.....	31
2.11.2.	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	32
2.11.3.	Aufreinigungsmöglichkeiten der DNA	32
2.11.4.	Extraktion von DNA nach präparativen Agarosegelen.....	33
2.12.	Molekularbiologische Methoden in <i>Escherichia coli</i>	33
2.12.1.	Eingesetzte Vektoren.....	33
2.12.2.	Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i>	33
2.12.3.	Restriktionsverdau	34
2.12.4.	Herstellung von elektrokompetenter <i>E. coli</i>	34
2.12.5.	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	34
2.12.6.	Klonierung	35
2.12.7.	Kolonien-PCR.....	35
2.12.8.	Klonieren mit Hilfe des pYES2.1/V5-His-TOPO- Expressionskit der Firma Invitrogen.....	36
2.13.	Molekularbiologische Methoden in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36

2.13.1.	Plasmidisolierung aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
2.13.2.	Herstellung transformationskompetenter <i>S. cerevisiae</i> - Zellen	37
2.13.3.	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit rekombinanter DNA	37
2.13.4.	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	38
2.14.	Zellbiologische Methoden in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
2.14.1.	Induktion der Genexpression	38
2.14.2.	Induktion von Apoptose durch Wasserstoffperoxid	39
2.14.3.	Bestimmung der Zelldichte einer Hefekultur mit dem Zellzähler „Casy“	39
2.14.4.	Überlebensplattierung	40
2.14.5.	Beschichtung von Objektträgern mit Polylysin	41
2.14.6.	Fixierung von Zellen für den TUNEL-Test	41
2.14.7.	TUNEL-Test (<i>Terminal Desoxynukleotidyltransferase-</i> <i>mediated-dUTP-Nick-End-Labeling</i>)	42
2.14.8.	Diaminophenylindol (DAPI)-Färbung	43
2.14.9.	Dihydrorhodamin (DHR) 123-Färbung	44
2.14.10.	Messung der Caspaseaktivität mit FITC-VAD-fmk im FACS	44
2.15.	Proteinbiochemische Methoden	45
2.15.1.	Gewinnung von Rohextrakten aus <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	45
2.15.2.	Proteinbestimmung nach Bradford	46
2.15.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	46
2.15.4.	Immunoblot mittels Semi-dry Transfer	47
2.15.5.	Ponceau-S-Färbung	48
2.15.6.	Immunologische Entwicklung	48
2.15.7.	Entwicklung mit dem ECL System	48
2.15.8.	Stripping	49
3.	Ergebnisse und Diskussion	50
3.1.	Apoptose und Membranfusionsprozesse	50
3.1.1.	Überblick über die untersuchten Gene	51

3.1.2.	Funktionen von SRO7 und SRO77 während der Apoptose in Zusammenhang mit Salzstress.....	54
3.1.3.	Verhalten der Deletionsstämme <i>KRE11</i> , <i>SRO77</i> , <i>VAM7</i> und <i>YAK1</i>	55
3.1.4.	Verhalten der Deletionsstämme <i>KRE11</i> , <i>SRO77</i> , <i>VAM7</i> und <i>YAK1</i> mit überexprimierter Hefecaspase Yca1p.....	57
3.1.5.	Mögliche Prozessierung von Kre11p, Sro77p, Vam7p und Yak1p durch Yca1p.	62
3.1.6.	Überexpression der Gene <i>KRE11</i> , <i>SRO77</i> , <i>VAM7</i> und <i>YAK1</i>	64
3.1.7.	Einfluss von Brefeldin A auf Hefezellen	67
3.1.8.	Diskussion	70
3.2.	Das Zellzyklusprotein Cdc48p und Apoptose	79
3.2.1.	Überblick zu Cdc48p.....	79
3.2.2.	Überlebensplattierungen.....	81
3.2.3.	TUNEL- und DAPI-Färbungen zum Nachweis apoptotischer Marker	83
3.2.4.	<i>in-vivo</i> Caspaseaktivitätsmessung.....	84
3.2.5.	Dihydrorhodamin 123-Färbung zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies	86
3.2.6.	Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Calcium auf die Überlebensfähigkeit	87
3.2.7.	Diskussion	89
3.3.	Charakterisierung neuer Apoptose-Induktoren des menschlichen Genoms	93
3.3.1.	Überblick.....	94
3.3.2.	Überlebensplattierungen.....	102
3.3.3.	TUNEL- und DAPI-Färbung.....	103
3.3.4.	<i>in-vivo</i> Caspaseaktivitätsmessung.....	104
3.3.5.	Diskussion	104
4.	Zusammenfassung.....	106
5.	Literaturverzeichnis	108

Verzeichnis der Abkürzungen

AIF	Apoptosis-inducing factor
Amp	Ampicillin
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
Bax	Bcl-2 associated X-factor
Bcl	B-cell lymphoma
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Ced	<i>C. elegans</i> death
CFU	Colony Forming Units
DAPI	Diaminophenylindol
DD	Death Domain
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DED	Death Effector Domain
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiaminoacetat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FMY	Hefestammsammlung Frank Madeo
GFP	Green fluorescent protein
IAP	Inhibitory apoptosis protein
ICE	Interleukin-1 β -converting enzyme
kDa	kilo Dalton
KFY	Hefestammsammlung Kai-Uwe Fröhlich
LB	(Luria + Bertani)-Medium
LiAc	Lithiumacetat
MAC-1	Mitglied der AAA-Familie, das CED-4 bindet

OD ₆₀₀	Extinktion bei 600 nm (optische Dichte)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFM	Plasmidstammsammlung Frank Madeo
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PTP	Permeability transition pore
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rotations per Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TUNEL	Terminale Desoxynucleotidyltransferase Mediated dUTP Nick End Labeling
VCP	Valosin containing protein
WT	Wildtyp
zVAD-fmk	z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketon

1. Einleitung

1.1. Der Zelltod

Das reibungslose Funktionieren unseres Körpers ist wesentlich davon abhängig, dass alle Zellen in kontrollierter Weise zusammen wirken. Dazu ist nicht nur eine koordinierte Zellteilung und somit das Wachstum des Organismus notwendig, sondern auch der kontrollierte Zelltod.

Das Auftreten eines programmierten Zelltodes unter physiologischen Bedingungen wurde bereits vor 150 Jahren beschrieben (Vogt 1842). Eine genaue Definition und damit eine Differenzierung zwischen verschiedenen Arten des Zelltodes wurde allerdings erst 1972 von Kerr, Wyllie und Currie geleistet (Kerr *et al.*, 1972). Sie beschrieben 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).

Als Nekrose wird diejenige Form des Zelltodes bezeichnet, die durch eine 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 umliegenden Gewebe führt. Apoptose hingegen wird als ein programmierter Zelltod beschrieben, der gerichtet abläuft und angrenzendes Gewebe nicht beschädigt, da die Zellintegrität erhalten bleibt.

Bereits während der Embryonalentwicklung spielt der gezielte apoptotische Tod bestimmter Zellen eine wichtige Rolle, beispielsweise für die korrekte Ausbildung von Händen und Füßen. So werden die Häute zwischen den Fingern, die bei Säugetieren nur vorübergehend in der Embryogenese auftreten, entfernt (Jacobson *et al.*, 1997).

Auch bei der Immunsystemreifeung sorgt Apoptose dafür, dass sich die Immunabwehr nicht gegen körpereigene Antigene richtet, indem als autoreaktiv erkannte Lymphozyten im Thymus schon im Stadium der Differenzierung in den Zelltod getrieben.

So ist die Apoptose vermutlich der wichtigste Mechanismus, der den Organismus vor potentiell gefährlichen Zellen wie genotoxisch geschädigten oder viral infizierten Zellen schützt (Shub, 1994). Schließlich sorgt beim erwachsenen Menschen ein Gleichgewicht von Zellteilung auf der einen und Zelltod auf der anderen Seite dafür, dass Organe wie Leber und Nieren, ständig erneuert werden und dabei in ihrer Zellzahl trotzdem relativ konstant bleiben (Strasser *et al.*, 2000).

Trotz dieser wichtigen Funktionen der Apoptose wurde ihre große Relevanz in vielen Gebieten des Lebens erst in den letzten 10 Jahren erkannt. Die Bedeutung des Zelltodes für den Organismus als Gesamtheit wird besonders klar, wenn dieser Prozess fehlreguliert wird. Dabei lassen sich Krankheiten, bei denen zu viel Apoptose auftritt, von solchen unterscheiden, die auf einem Mangel an Apoptose beruhen. Zu ersteren gehören vor allem neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Thompson *et al.*, 1995) oder Morbus Parkinson (Offen *et al.*, 2000, Übersichtsartikel; Jenner *et al.*, 1996, Übersichtsartikel). Reperfusionsschäden nach Ischämiezuständen, insbesondere beim Herzinfarkt oder Schlaganfall, fallen auch in diese Kategorie. Die wieder einsetzende Sauerstoffversorgung führt dabei zu einer Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies, die Apoptose auslösen können (Steller *et al.*, 1995).

Auch das Immunsystem kann durch ein Zuviel an Apoptose krankhaft gestört sein. So sterben bei AIDS-Patienten (*acquired immune deficiency syndrome*) beispielsweise die T-Lymphozyten in überhöhtem Maße ab, da das HI-Virus (*human immunodeficiency*) in ihnen Apoptose auslöst. Dadurch ändert sich das Verhältnis von T-Lymphozyten zu T-Suppressorzellen und das Immunsystem ist nicht mehr imstande, eine Infektion erfolgreich zu bekämpfen (Jaworowski *et al.*, 1999).

Auf der anderen Seite stehen die Krankheiten, deren Ursache in einem Mangel an Apoptose liegt. Hier sind neben Tumorerkrankungen, bei denen es zu einer verstärkten Zellvermehrung aufgrund ausbleibender Apoptose kommt und Virusinfektionen, vor allem die Autoimmunerkrankungen zu nennen (Rosen *et al.*, 1999). Selbstreaktive Lymphozyten können nämlich nur dann

auftreten, wenn ihr apoptotischer Tod während der Reifung des Immunsystems ausblieb (siehe oben).

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es für das Verständnis vieler Krankheiten und für die Entwicklung neuer Therapeutika essenziell, zwischen Nekrose und Apoptose differenzieren zu können. Die unterschiedlichen morphologischen und biochemischen Charakteristika können hierbei Ansatzpunkte für spezifische Detektionssysteme bieten.

1.2. Die beiden Formen des Zelltodes: Nekrose und Apoptose

Bei der Nekrose handelt es sich um einen Tod der Zelle, der häufig durch das Komplementsystem, einer Infektion mit lytischen Viren oder durch extreme Abweichungen von den nötigen physiologischen Bedingungen ausgelöst wird. Desweiteren sind auch manche toxischen Substanzen wie Alkohol in der Lage, den nekrotischen Tod von Zellen zu verursachen. Nekrose ist meist ein pathologischer Prozess. In letzter Konsequenz kommt es bei der Nekrose zu einem Platzen der Plasmamembran, wodurch der Zellinhalt mitsamt der lysosomalen Enzyme aus der Zelle in das umgebende Gewebe freigesetzt wird und es zu Entzündungsreaktionen kommt.

Im Gegensatz zu diesem unkontrollierten Platzen der Zellmembran, zeigt die Apoptose eine strukturierte, aktive Auflösung der Zelle.

Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen (apo = ab, weg; ptosis = Senkung) und beschreibt den Laubfall im Herbst. Bei Apoptose handelt es sich um eine genetisch programmierte Form des Zelltodes, die durch interne oder äußere Reize ausgelöst werden kann. So können neben physiologischen Signalstoffen wie dem Tumornekrosefaktor unter anderem Gamma- oder UV-Strahlen, Chemotherapeutika, Wasserstoffperoxid und die daraus entstehenden freien Radikale, Hitzeschock sowie Schädigungen der DNA die Apoptose induzieren.

1.2.1. Marker der Apoptose

Seit der erstmaligen Erwähnung der Apoptose (Kerr *et al.*, 1972) haben die Erkenntnisse über ihre Entstehung und ihren Verlauf beträchtlich zugenommen. Zu diesem Verständnis hat vor allem die Forschung an *Caenorhabditis elegans* (Yuan *et al.*, 1992; Zou *et al.*, 1997) beigetragen.

So gehören die Initiatoren der Apoptose (Entzug von Wachstumsfaktoren, Stimulierung bestimmter Rezeptoren, Sauerstoffstress), die Signaltransduktion über Caspasekaskaden und die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien zu den wichtigsten Erkenntnissen. Allerdings gibt es eine fast unendlich große Zahl von Abfolgen und Kausalitäten, die die oben erwähnten Apoptoseauslöser und Mechanismen ergänzen, so dass man die Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose auch heute noch anhand morphologischer Merkmale trifft, die erst am Ende des Prozesses stehen. So galt z.B. die Caspaseaktivierung lange als das wichtigste Kennzeichen für Apoptose. Auf die genauere Funktion der Caspasen im apoptotischen Geschehen gehe ich später noch detailliert ein. Inzwischen kennt man aber auch caspaseunabhängige Vorgänge, die ebenfalls zu Apoptose führen (Monney *et al.*, 1998). Zu diesen möglicherweise Caspase-unabhängigen Szenarien gehört auch der durch den *Apoptosis-inducing-Factor* (AIF) vermittelte Zelltod (Candé *et al.*, 2004, Übersichtsartikel). Allerdings ist es sowohl bei dem menschlichen AIF als auch dem AIF aus Hefe umstritten, ob der Prozess tatsächlich caspaseunabhängig verläuft (Wissing *et al.*, 2004).

Morphologisch kann man zu Beginn der Apoptose eine Verringerung des Zellvolumens beobachten. Im Gegensatz zur Nekrose bleiben die Organellen intakt und der Stoffwechsel der apoptotischen Zelle läuft über einen langen Zeitraum hinweg normal weiter. Desweiteren schrumpft der Zellkern und das Chromatin verdichtet sich (Kerr *et al.*, 1972). Im Elektronenmikroskop kann man dies an den charakteristischen Halbmondformen der Kerne erkennen.

Relativ früh auf dem Weg zum apoptotischen Zelltod wird das Phospholipid Phosphatidylserin, das normalerweise nur im inneren Blatt der Cytoplasmamembran lokalisiert ist, in das äußere Blatt externalisiert (Martin *et al.*, 1995). Später kann dann noch intensives „membrane blebbing“ - die

Bildung von Ausstülpungen und Bläschen - an der Cytoplasmamembran beobachtet werden. Die Externalisierung des Phospholipids Phosphatidylserin auf die äußeren Seite der Zellmembran führt dazu, dass die später gebildeten apoptotische Vesikel oder „apoptotic bodies“ - von phagozytosefähigen Zellen wie Makrophagen erkannt und beseitigt werden (Fadok *et al.*, 1992).

Lauber *et al.*, konnten kürzlich zeigen, dass ein weiteres Phospholipid, Lysophosphatidylcholin, an der Markierung von apoptotischen Zellen beteiligt ist. Caspase-3 vermittelt hierbei die Sekretion von Lysophosphatidylcholin aus einer apoptotisch sterbenden Zelle, wodurch Makrophagen chemotaktisch angelockt werden (Lauber *et al.*, 2003). So wird sichergestellt, dass apoptotische Zellen effizient entfernt werden und – im Gegensatz zur Nekrose – Entzündungsreaktionen unterbleiben.

Zusätzlich zur Phospholipidexternalisierung wird die chromosomale DNA durch spezielle apoptotische Endonukleasen in kleine definierte Bruchstücke fragmentiert und es entsteht in der Gelelektrophorese die sogenannte DNA-Leiter (Brown *et al.*, 1993).

1.2.2. Caspasen – Schlüsselenzyme der Apoptose

Wichtige Knoten- und Angelpunkte stellen bei den meisten apoptotischen Vorgängen die Caspasen dar. Es handelt sich bei ihnen um eine Familie von Cystein-Proteasen, die in ihrem katalytischen Zentrum eine katalytische Diade aus Cystein und Histidin aufweisen. Da sie spezifisch nach Aspartatresten schneiden werden sie Caspasen (Cystein-Aspartat-Proteasen) genannt. Die Caspase-Familie in Säugern umfasst zur Zeit 14 Mitglieder, die aber nicht alle an der Transduktion der Apoptose beteiligt sind (Creagh *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2000, Übersichtsartikel).

Kommt es zur Aktivierung einer Caspase, werden durch Autokatalyse oder durch eine Caspase-Kaskade weitere Caspasen und Faktoren zur DNA-Fragmentierung z.B. DFF (DNA-fragmentation factor) aktiviert. Zusätzlich kommt es zur Inaktivierung von Proteinen, die an der DNA-Reparatur beispielsweise PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymerase) (Lazebnik *et al.*, 1994), am mRNA-Splicing oder an der Aufrechterhaltung der Kernarchitektur beteiligt sind (Fischer *et al.*, 2003). In der Summe führen all diese

Veränderungen zum Arrest des Zellzyklus, zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte, zur Desintegration der Zelle und zur Markierung der apoptotischen Zellen für die Phagozytose.

1.2.2.1. Aufbau und funktionelle Einteilung der Caspasen

Caspasen werden immer als inaktive Procaspasen synthetisiert und erst durch partielle proteolytische Spaltung aktiviert. Die Procaspasen, die ein Molekulargewicht von ca. 45 kDa besitzen, sind aus drei Domänen aufgebaut: einer N-terminalen Prodomäne, einer großen p20-Domäne und einer kleinen p10-Domäne (Rotonda *et al.*, 1996). Bei einer Aktivierung wird die Prodomäne der konstitutiv exprimierten Zymogene abgespalten. In manchen Caspasen gibt es zwischen der p20 und der p10-Domäne ein kurzes Linker-Peptid, das ebenfalls herausgeschnitten wird.

Mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen der Caspase-1 (*Interleukin-1β-converting enzyme*, ICE) (Wilson *et al.*, 1994) konnte aufgeklärt werden, dass die aktive Caspase als Heterotetramer aus zwei p10-p20-Komplexen vorliegt (Rotonda *et al.*, 1996).

Eine Möglichkeit, die Caspasen innerhalb ihrer Familien zu unterteilen, ist die Größe und der Aufbau der oben erwähnten Prodomänen. Allerdings scheint die Gliederung nach funktionellen Aspekten sinnvoller. Hierbei unterscheidet man Initiator- und Effektorcaspasen.

Initiatorcaspasen sind für die Auslösung der Caspase-Kaskade (zu dieser Kategorie zählen die Caspasen-2, -8, -9 und -10) verantwortlich. Ihre Aktivierung erfolgt durch Aggregation und anschließende autokatalytische Spaltung. Effektorcaspasen (zu dieser Kategorie zählen die Caspasen-3, -6 und -7) bewirken dann die eigentlichen morphologischen Zellveränderungen. Sie werden hauptsächlich durch Initiatorcaspasen aktiviert.

1.2.2.2. Wege der Caspaseaktivierung

Prinzipiell gilt es zwei Wege der Caspaseaktivierung zu unterscheiden: den extrinsischen Weg über die sogenannten Todesrezeptoren und den intrinsischen, mitochondrialen Weg:

Einen klassischen extrinsischen Apoptoseweg stellt der Mechanismus über die membranständigen Rezeptoren Fas/CD95 sowie den Tumornekrosefaktor-Rezeptor TNFR dar (Salvesen *et al.*, 1997, Übersichtsartikel; Nicholson *et al.*, 1997 Übersichtsartikel). Die Rezeptoren des extrinsischen Weges haben konservierte cysteinreiche Abschnitte in ihrer extrazellulären Domäne. Im cytoplasmatischen Bereich haben sie eine homologe Region, die sogenannte *Death Domain* (DD). Diese Region wird für die apoptotische Signalübertragung benötigt.

Neben dem extrinsischen, todesrezeptorabhängigen Signalweg gibt es den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg der Apoptose, der durch die Ausschüttung von Cytochrom c initiiert wird. Im Cytosol induziert Cytochrom c die Oligomerisierung des Adapterproteins Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) (Zou *et al.*, 1999). Der so gebildete Apaf-1-Komplex rekrutiert über die Wechselwirkung seiner CARD-Adapter-Domäne (*caspase recruitment domain*) die Procaspase-9. Es entsteht das sogenannte Apoptosom, ein hochmolekularer Komplex von ca. 700 kDa (Cain *et al.*, 2002) ist. Als zweite zentrale Initiator-Caspase ist dann Caspase-9 in der Lage, die Caspase-Kaskade auszulösen und die Apoptose einzuleiten.

Der Mechanismus, der zur Cytochrom c-Freisetzung aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Cytosol führt, ist noch sehr umstritten. Diskutiert wird unter anderem die Möglichkeit, dass proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie eine Pore in der Art eines Ionenkanals in der äußeren Mitochondrienmembran bilden, wodurch es zum Anschwellen der Matrix kommt und die äußere Membran permeabel wird. Eine zweite Möglichkeit stellt die Öffnung der mitochondrialen *Permeability Transition Pore* (PTP) dar (Green *et al.*, 1998; von Ahsen *et al.*, 2000, Übersichtsartikel).

Bei beiden Wegen entsteht durch teilweise autokatalytische Aktivierung und Rückkopplungen ein vielfältiges und komplexes Netzwerk (Übersichtsartikel: Cohen *et al.*, 1997). Allerdings liegen bis jetzt hauptsächlich *in-vitro* Daten vor, so dass der gezeigte Verlauf *in-vivo* auch anders vonstatten gehen kann.

Neben den bereits erwähnten möglichen Apoptosewegen gibt es noch weitere Signalwege der Apoptose, bei denen z.B. das endoplasmatische Retikulum

involviert ist. So wurde erst kürzlich ein Caspase-12-abhängiger Mechanismus beschrieben, der nach Stress im endoplasmatischen Retikulum zur Apoptoseinduktion führt (Rao *et al.*, 2002; Maag *et al.*, 2003, Übersichtsartikel). Zudem gibt es Hinweise, dass auch ein lysosomaler Apoptosesignalweg existiert (Leist *et al.*, 2001). Diese alternativen Signalwege sind allerdings noch nicht im Detail charakterisiert und ihre Bedeutung muss in künftigen Untersuchungen geklärt werden.

Aufgrund der Schlüsselstellung der Caspasen im apoptotischen Geschehen verwundert es nicht, dass auf der Ebene der Caspasen auch ein Regulationsmechanismus der Apoptose zu finden ist. Hierfür verantwortlich ist die Familie der IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*), die stark konserviert ist (Deveraux *et al.*, 1998). Diese Proteine inhibieren verschiedene Caspasen, indem sie die autokatalytische Abspaltung der Prodomäne verhindern und damit den programmierten Zelltod blockieren. Die Zielproteine der IAP-Familie sind die Initiator-Caspase-9 und die Effektor-Caspasen-3 und -7 (Shiozaki *et al.*, 2004).

1.3. Apoptose und Membranfusionsprozesse

Die Ausbildung von "apoptotic bodies" ist ein wichtiges Merkmal der Apoptose bei Säugern. Dabei kommt es unter anderem durch Fusions- und Phospholipidumverteilungsprozesse zur Umorganisation der Zellmembran. An dieser Umgestaltung der Membran haben Säugercaspasen eine entscheidende Funktion (Salvesen *et al.*, 1997; Nicholson *et al.*, 1997).

Für manche Organismen liegen bereits Erkenntnisse vor, die das Zusammenspiel von Apoptose und Membranfusion beschreiben. So konnte im zellfreien *Xenopus leavis*-Oocytenexaktekt gezeigt werden, dass die Endosomenfusion einen Angriffspunkt der Caspasen darstellt: Rapaptin-5, ein endogener Faktor, der an der Endosomenfusion in Säugerzellen beteiligt ist, wird selektiv durch Caspasen gespalten (Cosulich *et al.*, 1997). Auf diese Weise kommt es zur Blockierung der Endosomenfusion. Dieses Ergebnis legt nahe, dass während der exekutiven Phase der Apoptose die Endocytose nicht mehr funktionsfähig ist. Interessanterweise konnte die Spaltung von

Rapaptin-5 und somit die Blockierung der Endocytose durch den spezifischen humanen Caspaseinhibitor zVAD-fmk verhindert werden. Durch die Expression von Bcl-2 und Bcl-XL – zwei negativen Apoptoseregulatoren – war es möglich, die Spaltung von Rapaptin-5 zu verhindern.

Auch in *S. cerevisiae* konnte eine protektive Wirkung von Bcl-2 bei gleichzeitiger Überexpression des Caspaseinduktors Bax nachgewiesen werden (Ligr *et al.*, 1998). Ferner konnte die Hefecaspase Yca1p mit Hilfe des humane Caspaseinhibitor zVAD-fmk ebenfalls inhibiert werden (Madeo *et al.*, 2002).

Abgesehen davon ist es möglich, trotz der Überexpression des Caspaseinduktors Bax in *S. cerevisiae* die Apoptose zu unterdrücken, indem AtVAMP (*vesicle-associated membrane protein*), ein v-SNARE aus Arabidopsis, überexprimiert wird (Levine *et al.*, 2001). Die durch Wasserstoffperoxid induzierte Apoptose kann ebenfalls durch eine Überexpression von AtVAMP unterbunden werden.

Darüber hinaus liegt die Bedeutung der Membranfusionsprozesse darin begründet, dass sie auch bei Krebserkrankungen eine Rolle spielen. Kürzlich wurde EWS-WT, ein neu entdeckter Transkriptionsfaktor, beschrieben (Palmer *et al.*, 2002). Dieser Transkriptionsfaktor bindet an die Promotorregion des Gens BAIAP3, das für ein Protein kodiert, welches an der regulierten Exocytose beteiligt ist. Abgesehen davon findet bei jeder Zellteilung die Cytokinese statt, die durch Fusionsprozesse gekennzeichnet ist. Krebszellen wiederum manifestieren sich durch eine unkontrollierte Zellteilung.

1.4. Hefe als Modellorganismus

1.4.1. Hefe als Modellorganismus im Allgemeinen

Louis Pasteur konnte erst Mitte des 19. Jahrhunderts nachweisen, dass Hefe als ein kleiner, einzelliger Organismus, für die Gärung verantwortlich ist, und die Gärung kein anorganischer Vorgang ist wie von Justus von Liebig postuliert. Er rückte so die Hefe in den Fokus des biologischen Interesses. Seitdem ist *Saccharomyces cerevisiae* ein gern genutzter Modellorganismus

zur Untersuchung unterschiedlicher biochemischer Prozesse, der sich unter anderem bei der Erforschung der Mechanismen der Vesikelfusion, der Sekretion und des Zellzyklus als exzellenter Modellorganismus erwiesen hat. Der bahnbrechenden Zellzyklusforschung an Hefe wurde durch die Verleihung des Nobelpreises 2001 für Medizin an Lee Hartwell und Paul Nurse Anerkennung gezollt.

Gründe für die Beliebtheit von Hefe als Modellorganismus sind sicherlich auf der einen Seite die einfache Kultivierbarkeit des Mikroorganismus und auf der anderen Seite die Tatsache, dass die eukaryontische Hefe zelluläre Mechanismen höherer Organismen besitzt.

Ein weiterer, enormer Vorteil der Hefe ist, dass ihr Genom seit mehreren Jahren vollständig sequenziert (Cherry *et al.*, 1997) und der Allgemeinheit zugänglich ist. *Saccharomyces cerevisiae* besitzt 6000 Gene, die sich auf 16 Chromosomen verteilen. Zusätzlich wurden zu vielen wichtigen menschlichen Genen Homologe in Hefe gefunden: 30 % aller Gene, die an menschlichen Krankheiten beteiligt sind, haben Homologe im vergleichsweise überschaubaren Genom der Hefe, 50 % aller Hefegene haben Homologe im menschlichen Genom (Botstein *et al.*, 1997).

Abgesehen davon bietet die Hefe für molekularbiologische Arbeiten einige Vorteile dadurch, dass sie sowohl haploid als auch diploid auftritt. Mutationen können so sehr leicht in die haploide Form eingeführt werden, da nur eine Kopie des Gens mutiert werden muss, um eine Veränderung des Phänotyps zu erzeugen. Des Weiteren tritt in *S. cerevisiae* die sogenannte homologe Rekombination auf (Rothstein, 1991). Diese macht es möglich, ganze Genomabschnitte spezifisch gegen Fremd-DNA auszutauschen, solange die Ränder der auszutauschenden Bereiche übereinstimmen. Auf diese Weise kann man einerseits definierte Gene disruptieren (Disruptanten, „Knock-out-Hefen“), andererseits aber auch beliebige, fremde Gene gezielt ins Genom integrieren. Schließlich sind für Hefen viele genetische Methoden etabliert und es existieren geeignete kommerzielle Expressionsvektoren, die es ermöglichen, beispielsweise Säugergene gezielt in der Bäckerhefe zu exprimieren. In den letzten Jahren wurde die Attraktivität der Hefe als Modellorganismus noch durch neue Methoden wie die *Yeast-Two-Hybrid*

Technik gesteigert. Mit dieser Technik ist es möglich, *in-vivo* Proteininteraktionen zu ermitteln.

1.4.2. Hefe als Modellorganismus für Apoptose

Hefe als Modellorganismus zu Erforschung apoptotischer Mechanismen einzusetzen ist noch ein recht junger Forschungsansatz, da erstmals 1997 an *Saccharomyces cerevisiae* apoptotische Marker entdeckt wurden (Madeo *et al.*, 1997). Eine Mutante des Zellzyklusgens *CDC48* (*Cdc48p*^{S565G}) zeigte Chromatinkondensation, Phosphatidylserinexternalisierung und DNA-Fragmentierung - also die wichtigsten apoptotischen Marker, wie sie aus Säugerzellen bekannt sind.

Die *Cdc48*-vermittelte Apoptose in Hefe wurde zunächst als exotisches Randphänomen angesehen, da erstens *Cdc48p* und seine zahlreichen Homologen noch nie als Apoptoseregulatoren in Erscheinung getreten waren, und zweitens die Suche nach Homologen metazoischer apoptoserelevanter Gene in *Saccharomyces cerevisiae* zunächst erfolglos blieb. Es konnten beispielsweise keine Gene mit Verwandtschaft zu den Caspasen gefunden werden. Auch nach Vertretern der Bax/Bcl-2-Familie, die in Säugern apoptotische Prozesse regulieren, suchte man vergeblich.

Shirogane *et al.* konnten jedoch 1999 zeigen, dass VCP (Valosine Containing Protein) eine antiapoptotische Wirkung aufweist (Shirogane *et al.* 1999). Bei VCP handelt es sich um das menschliche Orthologe von *Cdc48p*, mit einer Sequenzidentität von 70%. VCP wirkt stark antiapoptotisch, ein Mutantenallel von VCP löste dagegen dominant Apoptose aus.

Nicht nur bei Säugern, sondern auch bei *Caenorhabditis elegans* wurde ein apoptoserelevantes *Cdc48p* Orthologes entdeckt (Wu, *et al.*, 1999). Es handelt sich hierbei um MAC-1 (member of the AAA-family binding CED-4). MAC-1 bindet in Gegenwart von CED-4 an die Apoptoseauslöser CED-3 und CED-9 und bildet einen Multiproteinkomplex aus, wodurch Apoptose unterbleibt. Damit ist *Cdc48p* der erste Apoptoseregulator, der zuerst im Hefesystem entdeckt und dann in Metazoen bestätigt wurde. Inzwischen ist sogar bekannt, dass VCP/CDC48 eine entscheidende Rolle bei der Neurodegeneration spielt (Higashiyama *et al.*, 2002).

Abgesehen davon ließ sich der apoptotische Phänotyp auch in Wildtypstämmen induzieren, wenn man dem Medium Wasserstoffperoxid zusetzte.

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass in allen bis dahin bekannten Fällen der Hefeapoptose der apoptotische Zelltod mit einem vermehrten Auftreten von endogenen Sauerstoffradikalen einherging. So konnten sowohl die Radikalfänger PBN oder TMPO als auch hypoxische Bedingungen den apoptotischen Phänotyp der Cdc48p^{S565G}-Mutante verhindern (Madeo *et al.*, 1999).

Diese Ergebnisse sind so entscheidend, da Sauerstoffradikale bei apoptotischen Prozessen in Säugerzellen eine wichtige Schlüsselrolle spielen (Hockenbery *et al.*, 1993; Schulz *et al.*, 1997). Einerseits gelten sie als ein Merkmal der Apoptose (Hockenbery *et al.*, 1993), andererseits können reaktive Sauerstoffspezies an mehreren Stellen in die apoptotische Regulation eingreifen: zu Beginn der Signalkette (Hockenberry *et al.*, 1993; Kane *et al.*, 1993; Greenlund *et al.*, 1995; Slater *et al.*, 1995) oder aber auch nachgelagert in der Signalkaskade unterhalb von Bax und den Caspasen (Schulz *et al.*, 1997). Des weiteren können reaktive Sauerstoffspezies die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien bewirken, welches zusammen mit Apaf-1 zur Caspase-Aktivierung führt (Skulachev *et al.*, 1998, Petrosillo *et al.*, 2003).

Neben Sauerstoffstress konnten weitere Stimuli der Hefeapoptose beschrieben werden. Ein neuer Apoptosestimulus wurde mit Essigsäure beschreiben (Ludovico *et al.*, 2001). Im Folgejahr wurden Kochsalz (Huh *et al.*, 2002) und das Pheromon α -Faktor als Apoptoseauslöser veröffentlicht (Severin *et al.*, 2002).

Weiterhin konnte als ein endogen getriggert Apoptoseweg die Überexpression von Säuger-Bax in der Hefe beschrieben werden, bei dem es zur Cytochrom c Freisetzung kommt (Manon *et al.*, 1997, Ligr *et al.*, 1998). Bei der Überexpression von Bax in Hefe kann man apoptotisches Sterben feststellen, das durch die gleichzeitige Expression von Bcl-XL, einem antiapoptotischen Mitglied der Bcl-2 Familie, verhindert werden kann. Auch in Säugern besitzen diese beiden Apoptoseregulatoren dieselbe antagonistische

Wirkung: Bax ist ein apoptoseauslösender Faktor und Bcl-XL wirkt antiapoptotisch.

Trotzdem konnten aber in der Vergangenheit in der Hefe keine Homologen zu den typischen Apoptoseregulatoren der Säuger wie beispielsweise der Bcl-2/Bax-Familie, p53, CAD/ICAD (Enari *et al.*, 1998) und den Apoptoserezeptoren der Zytoplasmamembran (TNF-R1, CD95) gefunden werden. Speziell das Fehlen einer Caspase – dem Schlüsselenzym apoptotischer Vorgänge - war stets ein starkes Argument gegen eine mechanistische Konservierung der Zelltodmechanismen in Hefe und Metazoen. Uren *et al.* fanden im Jahr 2000 durch iterative PSI-Blast-Suche eine neue Caspasefamilie, die sie Metacaspasen nannten. Diese Metacaspasen haben ausschließlich Mitglieder in Protisten, Pflanzen und Pilzen. Die Homologie zu menschlichen Caspasen beschränkt sich nicht nur auf die Primärstruktur, sondern ist auch in der Sekundärstruktur zu finden (Uren *et al.*, 2000). Madeo *et al.*, konnten 2002 zeigen, dass Hefe ein Mitglied der Metacaspasefamilie besitzt: *YCA1* (yeast caspase 1) (Madeo *et al.*, 2002). Des weiteren konnten Madeo *et al.* die Hefecaspase Yca1p charakterisieren und zeigen, dass sie große funktionelle Gemeinsamkeiten mit Säugercaspasen aufweist (Madeo *et al.*, 2002). Wie bei Säugern hat auch diese Caspase eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der Apoptose inne: Yca1p ist in Hefe durch Überexpression und gleichzeitigen Sauerstoffstress in der Lage, apoptotische Veränderungen in der Zelle hervorzurufen (Madeo *et al.*, 2002). Des weiteren führt eine Disruption von *YCA1* zu Hefezellen, die deutlich resistenter gegen den apoptoseinduzierenden Wasserstoffperoxidstress sind. Da zahlreiche Apoptoseszenarien in Hefe mit Sauerstoffradikalen verknüpft sind, spielt Yca1p vermutlich in vielen verschiedenen Szenarien der Hefeapoptose eine Rolle.

Die oben beschriebenen Ergebnisse zu dem apoptotischen Zelltod in *Saccharomyces cerevisiae* legen nahe, dass man wie so oft Hefe als Modellsystem zur Erforschung der grundlegenden Mechanismen verwenden kann.

Allerdings muss für eine erfolgreiche Übertragbarkeit des Modellorganismus Hefe für die Säugerapoptose sichergestellt sein, dass die apoptotische Vorgänge in der Hefe ähnlich wie in Säugerzellen gesteuert werden.

Durch zahlreiche neuere Arbeiten wird immer deutlicher, dass sich die Signalwege und Regulatoren der Hefeapoptose nicht grundlegend von denen der Säugerapoptose unterscheiden: So löst beispielsweise die Expression von E4orf4 aus Adenoviren Apoptose in menschlichen und in Hefezellen aus (Afifi *et al.*, 2001).

Die deutliche Verknüpfung zwischen DNA-Doppelstrangbrüchen und ihre Reparatur mit der Apoptoseregulation in Säugerzellen findet ebenfalls ein Pendant in Hefe: die Hemmung der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen führt zu Apoptose, die durch die Hefecaspase Yca1p eingeleitet wird (Qin *et al.*, 2003, Übersichtsartikel).

1.4.2.1. Hefeapoptose unter physiologischen Bedingungen

Nicht nur bei Hefe-Mutanten oder bei Überexpressionsstämmen konnte Apoptose gezeigt werden, sondern auch bei Wildtyphefestämmen unter bestimmten physiologischen Bedingungen.

So konnte eine physiologische Rolle der Apoptose in Hefe bei Alterungsprozessen und dem Absterben alter Hefezellen nachgewiesen werden (Laun *et al.*, 2001). Hefezellen haben nicht nur die Fähigkeit als Gesamtpopulation zu altern (chronologisches Altern; (Fabrizio *et al.*, Longo *et al.*, 2003)), sondern sie können durch asymmetrische Teilung auch individuell altern (replikatives Altern) (Bitterman *et al.*, 2003). Laun und Kollegen konnten zeigen, dass in replikativ gealterten Hefezellen Sauerstoffradikale akkumulieren und die Hefezellen apoptotisch sterben (Laun *et al.*, 2001). Dadurch kann verhindert werden, dass sich Zellen vermehren, die bereits DNA-Schädigungen aufweisen.

Weiterhin konnten Herker *et al.* zeigen, dass chronologisch gealterte Hefezellen apoptotisch sterben (Herker *et al.*, 2004). Hier konnten sowohl die Ansammlung von reaktiven Sauerstoffspezies, Caspaseaktivierung und weitere apoptotische Marker in chronologisch gealterten Hefekulturen nachgewiesen werden.

Apoptose in Hefe ist daher nicht ein einzeln auftretendes Phänomen bei speziellen Mutanten, sondern gehört ganz selbstverständlich zu dem Lebenszyklus einer Hefezelle.

All diese Ergebnisse haben dazu beigetragen, dass Apoptose in Hefe etabliert ist und Hefe als Modellorganismus zur Erforschung der Apoptose geeignet und akzeptiert ist.

1.5. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen Membranfusionsprozessen und Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae* untersucht werden. Hierzu habe ich drei Gene (*KRE11*, *SRO77* und *VAM7*) untersucht, die alle in Membranfusionsprozessen involviert sind und teilweise Interaktoren der Hefecaspase darstellen. In diesem Zusammenhang ist auch die Proteinkinase *YAK1* von mir untersucht worden, da auch sie ein Interaktor der Hefecaspase ist.

Weiterhin wurde der Einfluss einer Punktmutation im *CDC48*-Gen untersucht. Es handelt sich hierbei um ein Zellzyklusprotein, das unter anderem auch an Membranfusionsprozessen des Endoplasmatischen Retikulums beteiligt ist.

Im letzten Kapitel werden die Ergebnisse der Charakterisierung neuer Apoptose-Induktoren des menschlichen Genoms dargestellt. Hierbei wurden 67 menschliche Gene untersucht, die in Säugerzellen Apoptose induzieren können. Exemplarisch stelle ich zwei menschliche Gene vor, die auch in Hefe in der Lage sind, Apoptose auszulösen. Diese Arbeiten wurden in einer Industriekooperation mit der Firma Xantos Biomedizin durchgeführt.

2. Material 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
Geldokumentationssystem CS1	Cybertech, Berlin
Gelelektrophoresekammern:	
Agarosegele:	
Elektrophoresekammer 50*75*8 mm (Minigel)	für Werkstatt des Physiologisch- Chemischen Instituts der Universität Tübingen
Midi-Gele	Biorad, München
Polyacrylamidgele:	
Mini-Protean 3 System	Biorad
Hoefler SE 400 Serie	Amersham Pharmacia, Freiburg
Lab Shaker	Braun, Melsungen
Mikroskope und Zubehör:	
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
Waagen:	
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
Zentrifugen:	
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	Heraeus Christ, Osterode
(Sorvall)	
3K12 mit Rotor Nr. 11133	Sigma, München
Zellzähler Casy1 DT	Schärfe System, Reutlingen

2.2. Chemikalien

Alle Feinchemikalien und Enzyme wurden – soweit nicht anders angegeben – von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Boehringer (Mannheim bzw. Ingelheim), Merck (Darmstadt), Roche (Grenzach-Wyhlen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen.

Agar	Otto Nordwald KG, Hamburg
β -Glucuronidase/Arylsulfatase	Roche, Mannheim
DAB Substrate/Metall enhanced	Roche, Mannheim
DAPI	Sigma, Bestell Nr. D 8417
E.Z.N.A. Cycle Pure Kit	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
E.Z.N.A. Gelextraktions Kit	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit1	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
FITC-VAD-fmk	Promega
Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm)	B. Braun, Melsungen
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche, Mannheim
Lyticase	Sigma, München
Objektträger	bioMérieux, Frankreich
Primer für die PCR	Auftragssynthesen bei MWG-Biotech
Proteaseinhibitoren:	
Aprotinin	Sigma. Cat. No. 10818
DTT	Sigma. Cat. No. 457779
Leupeptin	Sigma. Cat. No. 62070
Pepstatin	Sigma. Cat. No. 77170
PMSF	Sigma. Cat. No. 06566
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
Rundbodenröhrchen	Meylan Codex, Frankreich
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
Taq-Polymerase	MBI Fermentas
Wasser für Molekularbiologie	Ultra Pure Water sterile molecular Biology grade; Qbiogene

2.3. Antikörper

anti-FLAG Epitop polyklonaler Antikörper aus Hase	Geschenk von S. Baksh
anti-HA Epitop monoklonaler Antikörper aus Maus	Sigma, Bestell Nr. H-9658
anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRP; aus Ziege	BIO RAD, Cat. Nr. 170-6515
anti-Maus IgG (H+L)-HRP Konjugat aus Ziege	BIO RAD, Cat. Nr. 170-6516
anti-poly-Histidin, monoklonaler Antikörper aus Maus	Sigma, Bestell Nr. H-1029

2.4. Organismen

2.4.1. Hefestämme

KFY = Kai Fröhlich Yeast

FMY = Frank Madeo Yeast

X = Xantos

Stamm	Alias	Genotyp
KFY 417	alias ECCC:	<i>Mat a; cdc48::URA3; his 4-619; leu 2-3, 112; ura 3-52; YEp52/CDC48</i>
KFY 715	WT BY 4741, Euroscarf	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>
KFY 597	CDC48.ECCC-Gal	<i>(MATalpha cdc48::URA3 his4-619leu3-3,112ura3-52 YEp52/cdc48^{R609P})</i>
FMY 17	pESC-His/YCA1	<i>KFY 715, pFM 21</i>
FMY 29	pESC-His	<i>KFY 715, pFM 16</i>
FMY 34	ΔSRO77, YCA1ex	<i>KFY 715, SRO77::KanMX4, pFM 21</i>
FMY 35	ΔKRE11, YCA1ex	<i>KFY 715, KRE11::KanMX4, pFM 21</i>
FMY 36	ΔYAK1, YCA1ex	<i>KFY 715, YAK1::KanMX4, pFM 21</i>

FMY 37	Δ VAM7, YCA1ex	KFY 715, VAM7::KanMX4, pFM 21
FMY 38	Δ SRO77, Leer	KFY 715, SRO77::KanMX4, pFM 16
FMY 39	Δ KRE11, Leer	KFY 715, KRE11::KanMX4, pFM 16
FMY 40	Δ YAK1, Leer	KFY 715, YAK1::KanMX4, pFM 16
FMY 41	Δ VAM7, Leer	KFY 715, VAM7::KanMX4, pFM 16
FMY 394	Δ SOR7 Δ YCA1,	KFY 715, SRO7::LEU2, YCA1::KanR
FMY 395	Δ SOR77 Δ YCA1,	KFY 715, SRO77::HIS3, YCA1::KanR
FMY 396	Δ SOR7 Δ SOR77,	KFY 715, SRO7::LEU2, SRO77::HIS3
FMY 397	Δ SOR7 Δ SOR77 Δ YCA1,	KFY 715, SRO7::LEU2, SRO77::HIS3, YCA1::KanR
FMY 476	Δ SOR7, BY 5451, Euroscarf	KFY 715, SRO7::KanMX4
FMY 477	Δ SRO77, BY 3134, Euroscarf	KFY 715, SRO77::KanMX4
FMY 478	Δ KRE11, BY 4796, Euroscarf	KFY 715, KRE11::KanMX4
FMY 479	Δ YAK1, BY 7006, Euroscarf	KFY 715, YAK1::KanMX4
FMY 480	Δ VAM7, BY 4578, Euroscarf	KFY 715, VAM7::KanMX4
FMY 555	YAK c-term. HA in BY 4747; pESC-His/YCA1	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; HA-Tag; pFM17
FMY 556	VAM7 c-term. HA in BY 4747; pESC-His/YCA1	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; HA-Tag; pFM17
FMY 557	KRE11 c-term. HA in BY 4747; pESC-His/YCA1	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; HA-Tag; pFM17
FMY 558	YAK c-term. HA in BY 4747; pESC-His	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; HA-Tag; pFM29
FMY 559	VAM7 c-term. HA in BY 4747; pESC-His	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; HA-Tag; pFM29
FMY 560	KRE11 c-term. HA in BY 4747; pESC-His	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; HA-Tag; pFM29
FMY 561	pYES2.1/V5-His-Topo/ in BY 4747	VAM7 MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; HA-Tag;
FMY 562	pYES2.1/V5-His-Topo/ Leer in	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0;

	BY 4747		<i>ura3Δ0; HA-Tag;</i>
FMY 563	pYES2.1/V5-His-Topo/ in in DYCA1	VAM7	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; HA-Tag; YCA1::KanR</i>
FMY 564	pYES2.1/V5-His-Topo/ DYCA1	Leer in	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; HA-Tag; YCA1::KanR</i>
FMY 560	pYES2/X1		<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>
X39	pYES2/X39		<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>

2.4.2. *E. coli*-Stämme

pFM = Plasmid Frank Madeo

Stamm	Alias	Genotyp
Von Gabi Dodt	DH5α	
pFM 16	pESC-His	<i>pESC-His ampR, pUC origin, 2μ origin, f1 origin, URA3, pGAL10- FLAGtag, pGAL1-c-myctag von Sratagene</i>
pFM 21	pESC-His/YCA1	<i>pFM16/ YCA1</i>
pFM 22	pESC-His/YCA1 ^{C297A}	<i>pFM16/ YCA1^{C297A}</i>

2.5. Puffer und Lösungen für molokularbiologische Methoden

Für die Herstellung aller Puffer und Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet. Nur für die PCR wurde dd-Wasser benutzt, welches nach dem Deionisieren zweimal destilliert war.

2.5.1. PCR

Taq-Polymerase	Fermentas Produkt Nr. GM0670
MgCl ₂	Fermentas
dNTPs	Fermentas
10x Puffer	Fermentas

2.5.2. Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer	40 mM Tris/ Acetat; 1 mM EDTA; pH 8
Probenauftragspuffer	eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau in 50 ml 87 % (w/ v) Glycerin
DNA - Längenstandard	0,1 µg/µl λ-DNA EcoRI/Hind III verdaut (21226 bp, 4937 bp, 4277 bp, 3520 bp, 2027 bp, 1904 bp, 1584 bp, 1331 bp, 983 bp, 831 bp, 564 bp, 125 bp)
Agarosegel	0,7 % bis 2 % Agarose in TAE 0,001 % Ethidiumbromid

2.5.3. pYES2.1 TOPO TA Expressionskit der Firma Invitrogen

pYES2.1/V5-His-TOPO	10 ng/µl Plasmid-DNA in: 50 % Glycerol; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 0,1 % Triton X-100; 100 µg/ml BSA; 30 µM Phenolrot
Salzlösung	1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl ₂

2.6. Primer

Sämtliche Primer wurden bei der Firma MWG–Biotech AG in Auftrag gegeben.

2.6.1. Primer für das chromosomale Taggen

2.6.1.1. Primer für chromosomales Taggen von *KRE11*

KRE11 sense:

5`- CTTATAGAAGTTGGAAATGGCGCATCTGTGTTAATCCAG – 3`

KRE11 antisense:

5`- CAACTGCTCTTTTGGGTGACTCGCAACGCCTAAGTAAAG – 3`

2.6.1.2. Primer für chromosomales Taggen von *SRO77*

SRO77 sense:

5`- GGAAGAAACGGGAAGGGATATGATGAAGAGCGCTGTAGGTTTT – 3`

SRO77 antisense:

5`- GAGCCTGATAAAATTCTTATGCGAGCAAGGGCAACCTGATCG – 3`

2.6.1.3. Primer für chromosomales Taggen von *VAM7*

VAM7 sense:

5`- CAGATAGCCAACAAGAAGGCTAGACATTTTAACAACAGTGCT – 3`

VAM7 antisense

5`- GTACAAATATACTCTCAGGATTTGTAACCCGGATAGTAACTC – 3`

2.6.1.4. Primer für chromosomales Taggen von *YAK1*

YAK1 sense:

5`- GAAGGGCCAACAAGCGCGTTCAATAAACTTCACATTGTGCGAA
GAA – 3`

YAK1 antisense:

5`- CATTATGGCACCAAGCCGTAATAAAATGAAATGGGTAGTTAAG– 3`

2.6.2. Primer für die Kolonien PCR

Flag anti2:

5` - CAGTGCGGCCGCCATAATAAATTGCAGATTTACGTC- 3`

2.6.3. Überexpressionsprimer

2.6.3.1. Primer für die Überexpression von *KRE11*

KRE11 sense

5` - ATGGAATGTTTTGTACCGCTGC – 3`

KRE11 antisense

5` - CTGGATTAACACAGATGCGCC – 3`

2.6.3.2. Primer für die Überexpression von *SRO77*

SRO77 sense

5` - ATGTTTAAGAAAAGCAGGCATTTG – 3`

SRO77 Antisense

5` - AAAACCTACAGCGCTCTTCATC – 3`

2.6.3.3. Primer für die Überexpression von *VAM7*

VAM 7 sense

5` - ATGGCAGCTAATTCTGTAGGGA – 3`

VAM 7 antisense

5` - AGCACTGTTGTTAAAATGTCTAGC – 3`

2.6.3.4. Primer für die Überexpression von *YAK1*

YAK1 sense

5` - ATGAACTCATCCAATAATAACGAC – 3`

YAK1 antisense

5` - TTCTTCGACAATGTGAAGTTTATTG – 3`

2.7. Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

Für die Herstellung aller Puffer und Lösungen wurde deionisiertes Wasser eingesetzt.

2.7.1. Lösungen zur Bestimmung der Zelldichte einer Hefekultur

Casyton	0,9 % NaCl; 0,1 mM EDTA
Casy-clean	Zusammensetzung unbekannt; zur wöchentlichen Reinigung des CASY Zellzählers

2.7.2. Gewinnung transformationskompetenter Zellen von *S. cerevisiae* und Transformation mit rekombinanter DNA

10x TE	100 mM Tris pH 7,5; 10 mM EDTA
10x LiAc	1 M LiAc
50 % PEG	50 % Polyethylenglykol 3350
Lyticase-Lösung	1000 U/ml in TE
Carrier-DNA	Lachssperma-DNA (10 mg/ml)

2.7.3. TUNEL-Test (*In Situ Cell Death Detection*, POD)

Puffer B	35 mM Kaliumphosphat; 5 mM MgCl ₂ ; pH 6,8
Puffer B + Sorbitol	1 x Puffer B; 1,2 M Sorbitol
Lyticase-Lösung	1000 U/ ml in TE
β-Glucuronidase/ Arylsulfatase	aus <i>Helix pomatia</i> ; 4,5 U/ml bzw. 14 U/ml (Roche)
Poly-L-Lysin	M _r 6000-9000 (Serva); 0,1 %
PBS	25 mM Kaliumphosphat; 0,9 % NaCl; pH 7

Permeabilisierungslösung	0,1 % Triton X-100 ; 0,1 % Natriumcitrat
TUNEL-Reaktionsmix	Enzyme Solution 1/10 mit Label Solution verdünnt
Enzyme Solution	Terminale Transferase
Label Solution	Nukleotid-Mix
Converter POD	Anti-Fluoreszein-Antikörper, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; gebrauchsfertig
DAB-Substrat	DAB Substrate/Metall 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* (Roche) und dem *DAB Substrat Metal Enhanced Kit* (Roche). Die genaue Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht angegeben.

2.7.4. Dihydrorhodamin 123-Färbung

DHR 123-Lösung 2,5 mg/ ml in Ethanol

2.7.5. Diaminophenylindol-Färbung

DAPI-Lösung 1 µg/ ml Diaminophenylindol in PBS

2.7.6. Bestimmung der Caspaseaktivität durch FACS-Messung

FITC-VAD-fmk 1:1000 verdünnt in PBS

2.8. Puffer und Lösungen für immunologische Methoden

Für die Herstellung aller Puffer und Lösungen wurde deionisiertes Wasser eingesetzt.

2.8.1. Rohextraktherstellung

Lysepuffer	20 mM HEPES pH 7,4; 84 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM EGTA; 0,5 % NP40
Proteaseinhibitoren	1 mM PMSF; 1 mM DTT; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 5 µg/ml Aprotinin; (Zugabe unmittelbar vor Gebrauch):
Lysepuffer CL (chemische Lyse)	1,84 M NaOH; 7,5 % β- Mercaptoethanol

2.8.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford-Stammlösung	100 ml 95 % Ethanol; 200 ml 88 % Phosphorsäure; 350 mg Serva Blau G-250
Bradford-Puffer	425 ml destilliertes Wasser; 15 ml 95 % Ethanol; 30 ml 88 % H ₃ PO ₄ ; 30 ml Bradford-Stammlösung. Die Lösung wurde durch Whatman No. 1 Papier filtriert und in einer dunklen Flasche bei RT gelagert.
BSA	Stammlösung 1 mg/ml

2.8.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl; 0,4 % SDS; pH 8,8
Sammelpuffer	1 M Tris/HCl; 0,8 % SDS; pH 6,8

Acrylamidlösung	30 % Acrylamid 0,8 % N, N'-Methylenbisacrylamid
SDS-Lösung	10 % SDS
Persulfatlösung	10% Ammoniumperoxodisulfat
10x Laufpuffer	250 mM Tris/HCl; 1,92 M Glycin; 2 % SDS; pH 8,3
Sammelgelpuffer	30 ml 86 % Glycerol; 12 g SDS; 60 mg Bromphenolblau
Stammlösung 6x Probenpuffer	37,5 ml Sammelgelpuffer; 30 ml 86 % Glycerol; 12 g SDS; 60 mg Bromphenolblau; Mit deionisiertem Wasser auf 94 ml auffüllen
Protein Molecular Weight Marker 10-180 kDa	MBI Fermentas, Deutschland [170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 33 kDa, 24 kDa, 17 kDa, 11 kDa]
6x Lämmli-Auftragspuffer	50 mM Tris/HCl; 2 % SDS; 10 % Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau; 100 mM β -Mercaptoethanol; pH 6,8
Harnstoffladepuffer	200 mM Tris/HCl; 8 M Harnstoff; 5 % SDS; 1mM EDTA; 0,1 % Bromphenolblau; 15 mM DTT; pH 6,8

2.8.4. Ponceau-S-Färbung

Ponceau-S Lösung 0,1 % Ponceau; 5 % Essigsäure

2.8.5. Immunoblot

Nitrocellulose-Membran Hybond ECL Amersham Pharmacia Biotech,
Freiburg

10x Blotpuffer 200 mM Tris; 1,5 M Glycin; 0,5 %
SDS

10x Blockpuffer	100 mM Tris/HCl; 1,5 M NaCl; 0,5 % (w/v) Tween; pH 7,6
10x Waschpuffer	100 mM Tris/HCl; 1,5 M NaCl; 0,2 % (w/v) Triton-X-100; pH 7,6
ECL-Detection reagent 1	100 mM Tris/HCl; 2,5 mM Luminol; 0,4 mM Cumarsäure; pH 8,5
ECL-Detection reagent 2	100 mM Tris/HCl; 5,4 mM H ₂ O ₂
Film BioMax MR von Kodak	Kodak Produkt Nr. 8701302; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Strippingpuffer	62,5 mM Tris/HCl; 0,4 % SDS; pH 8

2.9. Kulturmedien

Die Bestandteile für Kulturmedien wie Yeast Extract, Bactopepton, Bactotrypton und Yeast Nitrogene Base wurden von Difco, USA bezogen. Alle Kulturmedien wurden für 20 Minuten bei 121°C im Autoklaven sterilisiert. Zur Herstellung von Kulturplatten wurden 1,5 % Agar zugesetzt. Eventuell benötigte Antibiotika wurden in deionisiertem Wasser gelöst, sterilgefiltert und nach dem Autoklavieren den auf 50°C abgekühlten Medien zugesetzt. Zur Herstellung aller Kulturmedien wurde deionisiertes Wasser verwendet.

2.9.1. Hefe-Vollmedium YEPD/YEPG

1 % Yeast Extract
 2 % Bacto-Pepton
 4 % Glucose/Galaktose

2.9.2. Hefe-Vollmedium YEPD mit NaCl

12 % NaCl
 1 % Yeast Extract
 2 % Bacto-Pepton
 2 % Glucose

2.9.3. Hefe-Minimalmedium SMD/SMG

0,17 % Yeast Nitrogene Base w/v

0,5 % Ammoniumsulfat

2 % Glucose/Galaktose

Die Aminosäuren sowie Adenin und Uracil wurden je nach Bedürfnis des jeweiligen Stammes in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

80 mg/l Histidin

320 mg/l Uracil

10 mg/l Adenin

20 mg/l alle anderen Aminosäuren

2.9.4. LB (Luria + Bertani)-Medium für coli Bakterien

0,5 % Natriumchlorid

0,5 % Yeast Extract

1 % Bacto-Trypton

(100 mg/l Ampicillin)

2.10. Stammhaltung und Kultivierung

2.10.1. Flüssigkulturen

Flüssigkulturen dienen der Anzucht von Zellen bis zur gewünschten Zelldichte. *E. coli*-Kulturen wurden bei 37°C in LB-Medium geschüttelt. Falls Plasmid-enthaltende Stämme verwendet wurden, wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Kulturen von *Saccharomyces cerevisiae* wurden bei 28°C in YEPD oder in einem geeigneten Minimalmedium unter Schütteln angezogen.

2.10.2. Plattenkulturen

Plattenkulturen wurden für die Anzucht von Klonen (z.B. Selektion nach Transformation mit rekombinanter DNA) und für die Überlebensplattierung

eingesetzt. Abgesehen davon dienen sie der mittelfristigen Stammhaltung. Platten mit *E. coli* sind bei 4°C gut 4 Wochen haltbar, Platten mit *S. cerevisiae* sogar über zwei Monate. Platten mit *E. coli* (LB, LB + Antibiotikum) wurden bei 37°C einen Tag und Platten mit *S. cerevisiae* (YEED, Minimalmedium) bei 28°C zwei Tage inkubiert.

2.10.3. Dauerkulturen

Dauerkulturen dienen der langfristigen Stammhaltung und sind bei -80°C über Jahre hinweg haltbar. Zum Anlegen einer Dauerkultur wurden 500 µl einer Übernacht-Kultur zu 500 µl 87 % (w/v) Glycerin (*E. coli*) bzw. 500 µl 50 % (w/v) Glycerin (*S. cerevisiae*) in ein Kryoröhrchen gegeben. Nach Mischen wurde die Dauerkultur bei -80°C eingefroren und gelagert.

Zur erneuten Anzucht eines Hefestammes aus der Dauerkultur wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas gefrorenes Material aus dem Kryoröhrchen entnommen und auf einer den Anforderungen des Stammes entsprechender Agarplatte ausgestrichen. Bei *E. coli* ist es möglich, direkt in ein entsprechendes Flüssigmedium anzupflanzen.

2.11. Allgemeine molekularbiologische Methoden

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

2.11.1. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde je nach Länge der zu trennenden DNA mit Gelen von 0,7 bis 2 %igen Agarosegelen durchgeführt. Die Agarose in TAE wurde vor dem Gelgießen im Mikrowellenherd aufgeköcht und nach leichtem Abkühlen der Lösung wurde sie mit 1 %igem (w/v) Ethidiumbromid auf eine Endkonzentration von 0,001 % eingestellt. Bei 80 V (Mini-Gel) bzw. 100 V (Midi-Gel) wurde dann die Elektrophorese durchgeführt. Abgesehen davon wurde bei jedem Lauf neben den Proben 5 µl DNA-Längenstandard (λ -, oder 100 bp-Marker) aufgetragen. Sobald die Lauffront aus Bromphenolblau

das Gelende erreicht hatte, war die Elektrophorese beendet (bei Mini-Gelen nach ca. 30 Minuten bei Midi-Gelen nach etwa 2 h). Anschließend wurde mit Hilfe des UV-Transilluminators das Gel ausgewertet und dokumentiert. Das Abschätzen der DNA-Menge erfolgte durch Vergleich der Ethidiumbromid-Fluoreszenzintensität der zu bestimmenden Bande mit Ethidiumbromid-Fluoreszenzintensität des DNA-Längenstandards. Dies ist möglich, weil der λ -DNA-Marker mit 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eine definierte Konzentration besitzt.

2.11.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode, zur Amplifizierung von Desoxyribonukleinsäuren. Sie besteht aus den folgenden Schritten, die etwa 30x wiederholt werden: Denaturierung, Annealing, Elongation.

2.11.3. Aufreinigungsmöglichkeiten der DNA

Im Anschluss an die PCR muss die so amplifizierte DNA noch aufgearbeitet werden, um anschließend für eine Transformation oder einen Restriktionsverdau verwenden werden zu können.

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das E.Z.N.A Cycle Pure Kit verwendet. Die DNA wurde mit 30 μl deionisiertem Wasser eluiert. Alternativ kann die DNA auch durch eine Ethanol-fällung aufgereinigt werden.

2.11.3.1. Ethanol-fällung

Um DNA aus verdünnten Lösungen zu konzentrieren oder umzupuffern und zusätzlich einen gewissen Reinigungseffekt zu erzielen, wurde sie mit Ethanol ausgefällt. Zunächst wurde mit 2 M Natriumchloridlösung die Salzkonzentration auf 0,2 M Natriumchlorid eingestellt. Weißt die Lösungen schon einen relativ hohen Salzgehalt auf, kann auf diesen Schritt verzichtet werden. Anschließend wurde das 2,5 fache Volumen des Ansatzes an Ethanol zugegeben und die DNA für mindestens 30 Minuten bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation (15 Minuten bei 10000 g) wurde das Pellet zweimal mit

70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen konnte die DNA in einem geeigneten Volumen TE, TE/LiAc oder dd-Wasser aufgenommen und direkt eingesetzt werden.

2.11.4. Extraktion von DNA nach präparativen Agarosegelen

Oft kommt es durch die PCR zu DNA-Nebenprodukten unterschiedlicher Größe oder es entstehen durch einen Restriktionsverdau überflüssige DNA-Stücke. Um nur DNA einer definierten Größe zu erhalten, wurde die DNA in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt (zur Kontaminationsvermeidung durch Fremd-DNA wurde hierfür ausschließlich frischer TAE-Puffer eingesetzt). Die Banden wurden mit Hilfe des UV-Transilluminator sichtbar gemacht und die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA aus den Gelstücken erfolgte mit Hilfe des E.Z.N.A. Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde mit 30-80µl dd-Wasser eluiert.

2.12. Molekularbiologische Methoden in *Escherichia coli*

2.12.1. Eingesetzte Vektoren

Zur Überexpression von Genen in *Saccharomyces cerevisiae* wurden die Vektoren YEp52 (Broach *et al.*, 1983), pYES2 (Invitrogen Corporation) und pESC (Stratagene) verwendet. Ausschließlich zur Überexpression der Gene *KRE11*; *SRO77*, *VAM7* und *YAK1* wurde der pYES2.1/V5-His-TOPO-Expressionskit der Firma Invitrogen verwendet.

2.12.2. Plasmidisolierung aus *E.coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit nach den Angaben des Herstellers. Hierbei wurde die Anleitung für High copy Plasmide verwendet. Zur Elution wurden 75 µl ddH₂O eingesetzt. Mittels Agarosegelelektrophorese wurde die Konzentration des Plasmids ermittelt.

2.12.3. Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau wurden zur Restriktionsanalyse von Plasmiden sowie zur Generierung von *sticky ends* für eine folgende Ligationen durchgeführt. Ca. 0,5 bis 3 µg der zu verdauenden DNA, 2 µl des geeigneten Zehnfachpuffers und 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym wurden eingesetzt und mit Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 2 bis 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde in einem Agarosegel der Erfolg des Verdau überprüft.

2.12.4. Herstellung von elektrokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurden 1 l des Stamms DH5α in LB-Medium auf eine Zelldichte von OD₆₀₀ 0,5 herangezogen. Die Kultur wurde bei 4°C abzentrifugiert (10 min, 4000 g), mit eiskaltem Wasser zweimal sowie einmal mit eiskaltem 10 %igem Glycerin gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in etwa 9 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert. 50 µl Aliquots wurden bei –80°C eingefroren.

2.12.5. Elektrotransformation von *E. coli*

Mit Hilfe eines Elektroporators wurden Elektrotransformationen von *E. coli* durchgeführt. 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 1,6 kV in einer gekühlten Elektroporationsküvette transformiert. Durch den Impulses kam es zu einer kurzzeitigen Perforierung der Membran und das Eintreten der DNA in die *coli*-Bakterien wurde so ermöglicht. Im Anschluss wurden die Zellen sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation in der Tischzentrifuge (1 min, 10000 g) wurden die Zellen in 20-100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit einem zur Selektion entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

Nach einem Tag wurden die gewachsenen Klone gepickt und zum Animpfen einer Übernachtkultur verwendet.

2.12.6. Klonierung

Mit Hilfe einer Klonierung soll ein bestimmtes Gen in einen Expressionsvektor eingefügt werden. Das Gen wird hierfür durch PCR amplifiziert, genomische DNA oder ein Vektor können als Template dienen. Genomische Hefe-DNA wurde nach (Struhl *et al.*, 1979) isoliert und diente als Template zur Amplifikation des Genes. Die Primer wurden so entworfen, dass sie Restriktionsschnittstellen für die Ligation in einem geschnittenen und dephosphorylierten Vektor enthielten und das PCR-Programm wurde der Länge der Primer und des zu amplifizierenden Gens angepasst. Die nachfolgenden Klonierungsschritte, wie Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation, wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Transformation der Plasmide erfolgte mittels Elektroporation.

Zur Kontrolle der Klonierung wurde die Plasmid-DNA der potentiellen Transformanten mit Hilfe des E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit isoliert und zur Sequenzierung an die Firma SRD GmbH (Oberursel) geschickt.

2.12.7. Kolonien-PCR

Um entstehende Kosten bei der Sequenzierung zu vermeiden, wurden die erhaltenen Klone zuerst mittels Kolonien-PCR überprüft. Als Primer dienen jeweils der zur Klonierung verwendete sense Primer und der „Flag anti2 Primer“. Als Template wurde sehr wenig Zellmaterial direkt in den PCR-Ansatz gegeben. Durch 15minütiges Erhitzen auf 94°C im Thermocycler vor Beginn der PCR wurden die Bakterienzellen aufgeschlossen. Der 20 µl PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 0,2 µl Taq-Polymerase, 2 µl PCR-Puffer (ohne MgCl₂), 2 µl MgCl₂-Lösung, 2 µl dNTP-Lösung, 0,2 µl sense bzw. antisense Primer. Der Ansatz wurde dann mit 13,4 µl dd-Wasser aufgefüllt.

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Um falsch positive Klone der Kolonien-PCR zu eliminieren, wurde zusätzlich ein Immunoblot durchgeführt.

2.12.8. Klonieren mit Hilfe des pYES2.1/V5-His-TOPO-Expressionskit der Firma Invitrogen

Hier wurde strikt nach den Angaben des Herstellers vorgegangen, allerdings wurde die Reaktionszeit des TOPO-Ansatzes um 30 min verlängert, um der Länge der Inserts Rechnung zu tragen. Anschließend wurden 2 µl des TOPO-Reaktionsmixes in die entsprechenden *E. coli*s transformiert.

2.13. Molekularbiologische Methoden in *Saccharomyces cerevisiae*

2.13.1. Plasmidisolierung aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Plasmidisolierung wurde in einem 2 ml Eppendorfcup durchgeführt. Hierzu wurden von einer Übernachtskultur 2 ml für 1 min bei 10000 g abzentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden etwa 300 mg Glasperlen zugegeben und die Suspension mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte dann durch 2 minütiges Vortexen bei höchster Stufe. Zur Phasentrennung wurde dann zentrifugiert (10 min, 10000 g). Die DNA-haltige obere, wässrige Phase wurde abgenommen und durch den Zusatz von 160 µl Isopropanol wurde die DNA gefällt und zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70 % Ethanol zur Entfernung von Isopropanolrückständen gewaschen und im Exikkator für 7 Minuten getrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in 15 bis 30 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

2.13.2. Herstellung transformationskompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Da transformationskompetente Hefezellen nicht lagerbar sind, müssen sie vor jeder Transformation frisch hergestellt werden. Die Herstellung transformationskompetenter Hefezellen und die daran anschließende Transformation beruht auf der Lithiumacetat/PEG-Methode von Gietz *et al.* (Gietz *et al.*, 2001).

Mit einer Übernachtkultur wurde eine 50 ml-Kultur auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,3 angeimpft. Nach 2 Generationszeiten – das entspricht etwa 4 Stunden – befanden sich die Hefezellen in der logarithmischen Phase. Die Hefezellen wurden dann durch Zentrifugation (5 min, 5000 rpm) steril geerntet. Das Zellpellet wurde mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen, die Zellen wurden in 2 ml 1xLiAc/0,5xTE resuspendiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die so gewonnenen kompetenten Zellen konnten direkt für die Transformation eingesetzt werden.

2.13.3. Transformation von *S. cerevisiae* mit rekombinanter DNA

Die Transformation von *S. cerevisiae* mit rekombinanter DNA basiert auf der Methode von Ito (Ito *et al.*, 1983).

Für die Transformation wurden pro Ansatz 100 µl der soeben beschriebenen Zellsuspension in ein Eppendorfcup überführt. Es wurde 10 µl Carrier-DNA (ssDNA), bis zu 15 µl (ca. 1 µg) der zu transformierenden DNA sowie 700 µl 1xLiAc/1xTE/40%PEG hinzu pipettiert. Die Carrier-DNA wurde unmittelbar vor Gebrauch für 20 Minuten im Wasserbad gekocht und dann umgehend auf Eis gekühlt, um DNA-Einzelstränge zu erhalten. Anschließend wurde der Transformationssmix solange durch Vortexen gemischt, bis sich das gesamte Zellpellet aufgelöst hatte. Danach wurde der Transformationsansatz für 30 Minuten unter Schütteln bei 30°C inkubiert, 85 µl DMSO zugegeben und ein 5 minütiger Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad durchgeführt. Dann wurden die Zellen durch 15 sekundige Zentrifugation geerntet. Anschließend wurden die Zellen in TE gewaschen und in 500 µl TE aufgenommen. Zwischen 200 und 500 µl der Zellsuspension wurden auf Platten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert. Nach ca. 2–3 Tagen waren auf den Platten

Kolonien mit transformierten Hefezellen sichtbar, die gepickt und erneut auf Selektions-Medienplatten ausgestrichen wurden.

2.13.4. Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae* wurden 5 ml einer Übernachtskultur durch Zentrifugation (5 min bei 5000 rpm) geerntet und mit 1 ml H₂O gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl Lysepuffer (100 mM Tris pH 8,0; 50mM EDTA; 1 % SDS) aufgenommen und nach Zugabe von ca. 500 µl Glasperlen 2 min gevortext. Nach kurzer 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 10000 g zentrifugiert, die wässrige Phase in ein neues Eppendorfcup überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml Isopropanol 5 min bei RT gefällt. Zum Schluss wurde die DNA 5 min bei 10000 g abzentrifugiert, das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und die DNA getrocknet. Schließlich wurde die DNA in 50 µl H₂O resuspendiert.

2.14. Zellbiologische Methoden in *Saccharomyces cerevisiae*

2.14.1. Induktion der Genexpression

Für die Expression der Gene, die sich in den Expressionsvektoren unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren Promotors Gal1 befinden, wurden die Stämme zunächst auf geeignetem Minimalmedium mit 2 % Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen. Befanden sich die Zellen in der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ 0,3–0,6), wurde der Shift auf Galaktose durchgeführt und somit die Kulturen auf Minimalmedium mit 2 % Galaktose als Kohlenstoffquelle überführt. Hierfür wurden die Zellen durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 5000 rpm geerntet und in einem Kulturvolumen galactosehaltigem Medium aufgenommen und darin weiter kultiviert. Auf das Waschen der Zellen wurde

verzichtet, damit die so noch vorhandenen Glucosereste die Umstellung auf die neue Kohlenstoffquelle Galaktose erleichterten.

2.14.2. Induktion von Apoptose durch Wasserstoffperoxid

Sollte in Kulturen mit überexprimierten, proapoptotischen Genen Apoptose ausgelöst werden, wurden aus Übernachtskulturen Kulturen auf eine OD_{600} von ca. 0,1 beimpft und nochmals für zwei bis drei Generationszeiten (4 bis 5 Stunden) geschüttelt. Befanden sich die Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} 0,3–0,6) wurde die Expression des zu untersuchenden Gens durch einen Medienshift ausgelöst. Direkt nach dem Medienshift wurden die Kulturen in zwei gleiche Aliquots aufgeteilt und in Erlenmeyerkolben (mindestens das fünffache ihres Volumens) mit Schikane überführt. Eine der beiden Kulturen wurde mit Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus versetzt. Je nach Versuchsaufbau wurden diese Kulturen mehrere Stunden (meist zwischen 18 und 26) auf dem Schüttler kultiviert und anschließend auf apoptotische Marker untersucht.

Alternativ hierzu wurden Kulturen auch oft bei einer niedrigeren Zellzahl mit Wasserstoffperoxid belastet. Hierzu wurden zur Induktion der Apoptose durch Wasserstoffperoxid mit Hilfe von Übernachtskulturen Kulturen auf eine Zellzahl von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml angeimpft und 4 h bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Anwachsen der Kulturen mit dem Zellzähler kontrolliert. Dann wurden sie in zwei Aliquots aufgeteilt, von denen eines mit Wasserstoffperoxid versetzt wurde um eine bestimmte Endkonzentration einzustellen. Vier Stunden nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid wurden die Kulturen auf ihre Sensitivität gegenüber Sauerstoffstress untersucht.

2.14.3. Bestimmung der Zelldichte einer Hefekultur mit dem Zellzähler „Casy“

Die Zellzahlbestimmung von Hefe-Flüssigkulturen erfolgte mit Hilfe des Zellzählers „Casy“ in Zellen pro ml. Ein Aliquot der zu messenden Kultur wurde in 10 ml Casyton, einer Lösung mit schwachen Elektrolyten,

suspendiert. Zur Messung wurde eine 60 μm Kapillare verwendet und zweimal ein Volumen von 200 μl gemessen. Die Messung fand üblicherweise im Bereich eines Zelldurchmesser von 1,5 μm bis 15 μm statt. Aufgrund der Tatsache, dass an der Kapillarstrecke eine Spannung angelegt worden war, konnte durch das Verdrängen der Elektrolytlösung durch jede nicht leitende Hefezelle eine Erhöhung des elektrischen Widerstandes gemessen werden. Aus der Häufigkeit und dem Grad der Widerstandsänderung konnte der Zellzähler die Anzahl der Hefezellen bestimmen. Bei sehr dünnen Kulturen wurden 100 μl unverdünnter Kultur in 10 ml Casyton gemessen, bei stationären Kulturen wurden 100 μl einer 1:100 Verdünnung eingesetzt.

2.14.4. Überlebensplattierung

Die Überlebensrate von Hefezellen kann in einer Überlebensplattierung ermittelt werden. Hierfür wurde die Zellzahl mittels Zellzähler bestimmt und 500 oder 1000 Zellen auf YEPD-Platten ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation der Platten im Brutraum bei 28°C wurde die Anzahl der gewachsenen Kolonien bestimmt. Die CFU (=colony forming unit) gab die Anzahl der lebensfähigen Zellen pro ausplattierter Zellen wieder.

Abhängig von der Zelldichte der jeweiligen Hefekultur mussten für das Ausplattieren entsprechende Verdünnungen erstellt werden, so dass das ausplattierte Volumen in einem Bereich zwischen 50 und 200 μl lag.

2.14.4.1. Aging-Test

Bei einem Aging-Test handelt es sich um eine Spezialform der Überlebensplattierung, bei der die Überlebensrate der Kultur in Abhängigkeit des Kulturalters bestimmt wird. Aufgrund der Verarmung des Mediums an Stickstoffquellen geht mit fortschreitendem Kulturalter ein immer größerer Anteil der Hefepopulation in Apoptose über (Herker *et al.*, 2004). Zur Bestimmung der Überlebensrate einer chronologisch alternden Hefekultur wurden in ein bis zwei Tagesabständen steril Aliquots entnommen und eine Überlebensplattierung durchgeführt.

2.14.5. Beschichtung von Objektträgern mit Polylysin

Zur besseren Haftung der Zellen auf den Objektträgern und zur Vermeidung, dass die Zellen im Verlauf der entsprechenden Färbung heruntergespült werden, werden die Objektträger mit Polylysin beschichtet. Die Objektträger wurden hierzu zunächst in einer wässrigen Detergenzlösung, dann in deionisiertem Wasser und schließlich in Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden in jedes Fenster 30 µl einer 0,1 % (w/v) Polylysinlösung pipettiert. Nach 30 minütigem Antrocknen wurde die überschüssige Polylysinlösung abgesaugt und die Objektträger wurden an der Luft vollständig getrocknet. Schließlich wurde jedes Fenster dreimal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Die so vorbehandelten Objektträger wurden bei 4°C gelagert und konnten direkt für das Aufbringen fixierter Zellen eingesetzt werden.

2.14.6. Fixierung von Zellen für den TUNEL-Test

Je nach Zelldichte wurde der zu testenden Kultur ein Aliquot von 200 µl bis 5 ml entnommen. In der Tischzentrifuge wurden die Zellen bei maximaler Geschwindigkeit für ca. 3 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Puffer B gewaschen und in 1 ml Puffer B resuspendiert. Nach Zugabe von 120 µl 37 %iger Formaldehydlösung wurde gut gevortext und zur Quervernetzung der Proteine wurden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zur vollständigen Entfernung des Formaldehyds wurden anschließend die Zellen drei mal in je 500 µl Puffer B + 1,2 M Sorbitol gewaschen und schließlich in 330 µl Puffer B + 1,2 M Sorbitol resuspendiert. Nun wurde zum Zellwandabtau 5 µl Lyticase (1000 U/ml) und 20 µl β-Glucuronidase/Arylsulfatase zupipettiert. Der Ansatz wurde für zwei Stunden bei 28°C inkubiert. Durch den Zellwandabtau entstanden sehr empfindliche Sphäroplasten, die durch Sorbitol osmotisch stabilisiert wurden und nicht mehr gevortext, sondern nur noch vorsichtig mit der Pipette resuspendiert werden durften. Nach erneutem Waschschrift in 500 µl Puffer B + 1,2 M Sorbitol und 10 sekundiger Zentrifugation wurde das Zellpellet in 60 µl Puffer B + 1,2 M Sorbitol resuspendiert und auf die polylysinbeschichteten

Objektträger aufgetragen. Auf den Objektträgern konnten sich die Zellen für ca. 15 Minuten absetzen, bevor überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt wurde. Nach dem Trocknen der Objektträger wurden die Objektträger mit den fixierten Zellen im Kühlschrank 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 Färbungsqualität durchgeführt werden.

2.14.7. TUNEL-Test (*Terminal Desoxynukleotidyltransferase-mediated-dUTP-Nick-End-Labeling*)

Im Verlauf der Apoptose kommt es zu DNA-Fragmentierung durch die freie 3'-OH-Gruppen entstehen. Diese können über eine enzymatische Reaktion nachgewiesen werden. Die T4 terminale Desoxynukleotidyltransferase kann in einer enzymatischen Reaktion an diese freien 3'-OH-Gruppen modifizierte Nukleotide anhängen. Beim TUNEL-Test werden fluoresceinmarkierte dUTPs angeknüpft. Diese können dann mit einem Peroxidase gekoppelten Antikörper durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden. Zellkerne von apoptotischen Zellen, die mit dem TUNEL-Test gefärbt wurden, erscheinen braun.

Die TUNEL-Färbung wurde mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit* und dem *DAB Substrate/Metall enhanced Kit* durchgeführt. Es wurden fixierte Zellen eingesetzt. Um restliches Sorbitol zu entfernen wurde vor der Färbung jedes Fenster 2 mal mit PBS gewaschen und man ließ die Objektträger vollständig trocknen. Zur Zerstörung endogener Peroxidaseaktivität wurden die Objektträger anschließend für 30 Minuten mit 0,3 % Wasserstoffperoxid in Methanol geflutet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung abgesaugt, die Objektträger getrocknet und sie erneut zweimal mit PBS gewaschen. Um das spätere Eindringen des TUNEL-Reaktionsmix und der Converter-POD zu ermöglichen, wurden die Zellen für exakt zwei Minuten auf Eis mit Permeabilisierungslösung inkubiert. Danach wurde die Permeabilisierungslösung abgesaugt und durch Waschen mit PBS vollständig entfernt. Nach dem Trocknen wurden in jedes Fenster des Objektträgers je 10 µl TUNEL-Reaktionsmix aufgetragen, welcher unmittelbar davor durch 1:10 Verdünnung der Enzyme Solution mit der Label Solution hergestellt worden

war. Die Objektträger wurden für eine Stunde bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert, so dass die Fenster des Objektträgers nicht austrocknen konnten. Nach Ende der Inkubationszeit wurde dreimal mit PBS gewaschen und je Fenster 10 µl Converter-POD aufgetragen. Nach weiteren 30 Minuten bei 37°C in der Feuchtkammer wurde wieder dreimal mit PBS gewaschen und schließlich 30 µl DAB-Substrat-Lösung aufgetragen, welche ebenfalls durch 1:10 Verdünnung von DAB Substrate/Metal enhanced mit Peroxidpuffer frisch hergestellt worden war. Die Farbreaktion wurde nach 10 bis 15 Minuten durch Absaugen des Substrates und dreimaligem Waschen mit PBS gestoppt. Nach dem Trocknen der Objektträger wurde auf jedes Fenster Kaiser-Gelatine aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt. Die gefärbten Zellen konnten nach Aushärten der Gelatine bei 4°C bis zu einer Woche gelagert werden. Eine Auswertung unter dem Lichtmikroskop konnte frühestens einen Tag nach der Färbung vorgenommen werden.

2.14.8. Diaminophenylindol (DAPI)-Färbung

Diaminophenylindol (DAPI) ist ein blau fluoreszierender, selektiver DNA-Farbstoff. Er kann daher genutzt werden, um Chromatinkondensation, die bei Apoptose auftritt, nachzuweisen. Die Chromatinkondensation war am halbmondförmigen oder langgestreckten Chromatin, häufig am Rand des Kerns und bisweilen auch an fragmentierten Kernen zu erkennen. Die Zellen wurden wie für die TUNEL-Färbung beschrieben fixiert. Nach zweimaligem waschen mit PBS wurde auf die getrockneten Fenster 30 µl DAPI-Färbelösung gegeben, 10 bis 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und sechsmal mit PBS gewaschen, um den Hintergrund möglichst gering zu halten. Schließlich wurde Kaiser Gelatine aufgebracht und ein Deckglas aufgelegt. Nach Aushärten der Gelatine bei 4°C konnten die Präparate innerhalb von 24 Stunden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Die Färbung von fixierten Zellen ist im allgemeinen intensiver als die von lebenden Zellen, so dass die DAPI-Färbung nur an fixierten Zellen durchgeführt wurde.

2.14.9. Dihydrorhodamin (DHR) 123-Färbung

Die Färbung mit Dihydrorhodamin (DHR) 123 dient der Detektion von Sauerstoffradikalen in der Zelle. Dabei wird DHR 123 zu dem eigentlichen Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 oxidiert, wodurch die Zelle im Fluoreszenzmikroskop im Rhodamin-Kanal rot leuchtet. 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 im Rhodamin-Kanal untersucht.

2.14.10. 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.

Um die Caspaseaktivität von Hefekulturen zu ermitteln, wurde eine FACS-Messung durchgeführt. Die Durchflußzytometrie (FACS = *Fluorescence Activated Cell Sorting*) ermöglicht Zählen und Analyse von Partikeln, wie beispielsweise Zellen, in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren. Hier sollte mit Hilfe der FACS-Messung die Caspaseaktivität von Hefezellen ermittelt werden. Zur Messung der Caspaseaktivität wurde ein an den Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelter Caspaseinhibitor verwendet (Madeo *et al.*, 2002).

Aus einer Hefeflüssigkultur wurden 1 Million Zellen durch Zentrifugation geerntet und in 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl FITC-VAD-fmk-Färbelösung (1:1000 verdünnt in PBS) für 20 min bei 28°C auf dem Schüttler gefärbt, in 500 µl PBS gewaschen, in 250 µl PBS aufgenommen und in 5 ml Rundbodenröhrchen zur FACS-Messung überführt. Bis zur Färbung wurden die FACS-Röhrchen lichtgeschützt. 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.

2.15. Proteinbiochemische Methoden

2.15.1. Gewinnung von Rohextrakten aus *Saccharomyces cerevisiae*

2.15.1.1. Glasperlenaufschluss

Für Immunoblots werden Rohextrakte der zu untersuchenden Hefekulturen benötigt. Für ihre Herstellung wurden je nach Dichte der Kulturen zwischen 20 ml und 250 ml Flüssigkultur durch Zentrifugation geerntet (5 min bei 4000 g). Im Anschluss wurde das Zellpellet in 400 µl Lysepuffer R (Rohextrakt) resuspendiert und in dickwandige Reagenzgläser überführt. Die Zellen wurden durch dreiminütige Zentrifugation bei 5000 rpm geerntet und es wurden ihnen das drei- bis vierfachen ihres Volumens an Glasperlen zugesetzt. Die Zellen wurden so für exakt 4 Minuten auf höchster Stufe gevortext. Das dadurch entstandene Lysat wurde sofort auf Eis gestellt und in 750 µl eisgekühltem Lysepuffer R aufgenommen und nochmals kurz gevortext. Der so erhaltene Rohextrakt wurde abgenommen und in ein frisches Eppendorfcup überführt. Anschließend wurde das Lysat kurz zentrifugiert und der Überstand bei -80°C bis zu weiteren Untersuchungen gelagert. Mit einem 10 µl Aliquot des Rohextraktes wurde der Proteingehalt nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976).

2.15.1.2. Chemische Lyse

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

Für die chemische Lyse wurden 3 OD_{600} einer Kultur entnommen, abzentrifugiert und mit 1 ml H_2O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 150 µl Lysepuffer CL aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und 150 µl 55

% TCA zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 10 min wurden die gefällten Proteine 10 min bei 10000 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 5 min bei 10000 g zentrifugiert. Für die Gelelektrophorese wurden 30 µl des Überstandes eingesetzt.

2.15.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff Serva Blau G-250 bindet unspezifisch an die hydrophoben Bereiche von Proteinen, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Die Extinktion bei 595 nm lässt sich daher zur Bestimmung der Proteinkonzentration heranziehen (Bradford, 1976). Gerätebedingt wurde in unserem Labor die Absorption im Flankenbereich bei 620 nm gemessen. Zur Durchführung der Proteinbestimmung wurden 10 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. Als Leerwert diente reiner Bradford Arbeitspuffer. Mit Hilfe einer Eichreihe aus Proben mit bekannter BSA-Konzentration konnte aus der Extinktion die Proteinkonzentration berechnet werden.

2.15.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS PAGE, (Lämmli, 1970)) wurde für die Verwendung zum Immunoblot angewendet. Es wurden Gele mit einer Acrylamidkonzentrationen von 12 % eingesetzt oder ein Gradientengel von 8 % bis 15 % verwendet. 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. Danach wurde das Trenngel rasch bis zu einer Höhe von ca. 12 cm in die vorbereitete Gelkammer (150x140x1,5 mm) gegossen. Das Trenngel wurde für die Polymerisation mit Wasser

überschichtet, um Blasenbildung zu verhindern. Nach vollständiger Polymerisation wurde das überständige Wasser dekantiert, Wasserreste mit einem Whatman Paper entfernt und das Sammelgel gegossen. Das Sammelgel hatte eine Acrylamidkonzentration von 5 %, wurde mit 3,4 ml Acrylamidstammlösung und 2,7 ml Sammelgelpuffer angesetzt und mit Wasser auf 20 ml aufgefüllt. Für die Polymerisation wurden 20 µl TEMED und 200 µl APS zugegeben. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gestellt. Um Gelreste und Luftblasen zu entfernen, wurden die Geltaschen anschließend mit Laufpuffer gespült. Kollabierte Taschen wurden gegebenenfalls mit einem dünnen Spatel in Form gebracht. Anschließend wurde das Gel beladen: hierzu wurden die zu testenden Proben auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Je nach Expressionsintensität des gesuchten Proteins wurden 100-400 µg Protein eingesetzt; von chromosomal getaggten Proteinen entsprechend mehr als von überexprimierten Proteinen. Die Proben wurden 5:1 mit 6fach Probenauftragspuffer versetzt und 10 min auf 100°C erhitzt.

Nachdem die Proben die Geltaschen verlassen hatten, wurde die Spannung von 80 V auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese erfolgte bei RT. Hatte die Lauffront den unteren Gelrand erreicht, wurde die Elektrophorese gestoppt. Alternativ konnte die Elektrophorese auch bei 30 V über Nacht durchgeführt werden

2.15.4. Immunoblot mittels Semi-dry Transfer

Zur immunologischen Detektion wurden die Proteine nach der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Je eine Nitrocellulose-Membran und sechs Blätter Whatman-3MM-Papier wurden auf die passende Größe zugeschnitten und in Blot-Puffer getränkt. Die Elektroblopparatur wurde ebenfalls mit Blot-Puffer befeuchtet und zwischen Anode und Kathode wurden in folgender Reihenfolge drei Blätter Whatman-Papier, Nitrocellulose-Membran, Polyacrylamidgel und nochmals drei Blätter Whatman-Papier luftblasenfrei übereinandergelegt. Der Proteintransfer fand bei konstanter Stromstärke von (0,4 mA/cm²) innerhalb von 45 min statt.

2.15.5. Ponceau-S-Färbung

Zur Kontrolle des Transfers wurden die Proteine mit Ponceau-S-Lösung vorübergehend angefärbt. Hierfür wurde die Membran ca. 1 min in einer 0,1 %igen Ponceau-S-Lösung inkubiert. Anschließend wurde so lange mit Wasser gewaschen, bis der Membranhintergrund entfärbt war und nur noch die Proteinbanden eine rosa Färbung aufwiesen.

2.15.6. 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 (TBS; 0,02 % Triton) gewaschen und mit dem Primärantikörper 1 h bei RT inkubiert. Die antikörperhaltige Lösung wurde abpipettiert und bei 4°C zur Wiederverwendung aufbewahrt.

Danach wurde die Membran dreimal kurz und viermal für 5 min mit Waschpuffer bei RT gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (ein Peroxidase-gekoppelter monoklonaler Antikörper; 1:4000 in TBS-Tween (TBS; 0,05 % Tween mit 5 % Milchpulver)) erfolgte 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran dreimal kurz und 6-8 mal für 5 min mit Waschpuffer bei RT gewaschen.

2.15.7. 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 exakt 1 min bei RT inkubiert und anschließend luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweißt. Überschüssige Flüssigkeit und Luftblasen wurden entfernt und in der Dunkelkammer wurde ein Film belichtet. Die Dauer der Belichtung war von der Stärke des zu erwartenden Signals abhängig. Bei sehr schwachem Signal – wie beispielsweise durch chromosomal getaggte

Proteine – war gegebenenfalls auch eine Belichtung über Nacht notwendig. Bei einem starken Signal war die Exposition von wenigen Minuten ausreichend. Mittels einer Entwicklermaschine erfolgte dann die Visualisierung.

2.15.8. Stripping

Um mit einer Membran einen erneuten Immunoblot durchführen zu können, muss sie zuerst von den vorher eingesetzten Antikörpern befreit werden. Hierzu wurde die Membran zweimal mit Wasser gewaschen, währenddessen wurden 40 ml Strippingpuffer mit 280 μ l β -Mercaptoethanol versetzt und auf 50°C vorgewärmt. Die Membran wurde dann für 45 min im erhitzten Wasserbad mit dem Strippingpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit Waschpuffer gewaschen, bevor mit einem erneuten Block der Membran mit Milchpulver im Protokoll des Immunoblots fortgefahren werden konnte.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Apoptose und Membranfusionsprozesse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse in bezug auf die Untersuchungen dargestellt, die einen Zusammenhang zwischen Membranfusionsprozessen und Apoptose in Hefe näher charakterisieren.

Während der kompletten Umorganisation der Zelle heben neueste Erkenntnisse auch die Bedeutung des sekretorischen Pathways in Zusammenhang mit der stressinduzierten Apoptose hervor (Ferri *et al.*, 2001; Maag *et al.*, 2003). Unter dem sekretorischen Pathway versteht man den Transfer von Proteinen über das ER und den Golgi-Apparat in die Lysosomen, zur Zellmembran oder - daher der Name – durch exocytotische Prozesse in den extrazellulären Raum. Membranfusionsprozesse ermöglichen hierbei den vesikulären Transport zwischen den Zellkompartimenten. Für Fusionsprozesse nötig sind unter anderem die membranständigen SNAREs, die Vesikel- und Zielmembran zueinander führen und so die Fusion ermöglichen.

Kommt es zum Auftreten von Stress am Endoplasmatischen Reticulum (ER) oder am Golgi-Apparat durch Spaltung von ER- oder Golgi-Proteinen, wird zuerst ein Reparaturmechanismus (*unfolded protein response*) aktiviert. Sollte dieser erfolglos sein, wird die Apoptose eingeleitet. Spaltungen von ER- oder Golgi-Proteinen können sowohl den Reparaturmechanismus als auch die Apoptose einleiten, bei der es dann unter anderem zur Disassemblierung dieser Organellen kommt.

Soll die Apoptose durch den sekretorischen Pathway ausgelöst oder zumindest über ihn weitergeleitet werden, ist es nötig, dass einige Komponenten der apoptotischen Maschinerie im sekretorischen Pathway angesiedelt sind. Dies trifft z.B. für die Säugercaspase-12 zu, die an der cytoplasmatischen Seite des ERs angesiedelt ist (Nakagawa *et al.*, 2000). Abgesehen davon wird die Sekretion eingestellt sobald es zur Apoptose kommt und die Zelle wird direkt in „apoptotic bodies“ verpackt, das ER schwillt an und wird vesikuliert (Sesso *et al.*, 1999). Allerdings sind die spezifischen

Ereignisse und Proteine, die die Disassemblierung des ERs und des Golgi-Apparates steuern, unbekannt.

All dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen Apoptose und Membranfusionsprozessen in Säugerzellen hin. Ob auch in *Saccharomyces cerevisiae* eine Verbindung besteht, soll durch Untersuchungen der folgenden Gene beleuchtet werden.

3.1.1. Überblick über die untersuchten Gene

Durch Datenbankrecherche auf der Suche nach Interaktoren der Hefecaspase Yca1p konnten fünf Interaktoren (Tfb1p, Yak1p, Srb4p, Kre11p und Sro77p) identifiziert werden, von denen zwei (Kre11p und Sro77p) an Fusionsprozessen im sekretorischen Pathway beteiligt sind. Daher lag es nahe, diese näher zu untersuchen. Die Interaktoren sind mit Hilfe eines *high-throughput Yeast-Two-Hybrid* identifiziert worden (Ito *et al.*, 2001). Bei Tfb1p handelt es sich um einen Bestandteil des RNA-Polymerase-Transkription-Initiator Faktors TFIIH, der oft zusätzlich an DNA-Reparaturprozessen beteiligt ist. Srb4p ist ein Bestandteil des RNA-Polymerase II Holoenzym und vermittelt die Interaktion der Transkriptionsaktivatoren mit der RNA-Polymerase II.

Des Weiteren haben wir unser Augenmerk noch auf die Proteinkinase Yak1p als Interaktor von Yca1p gerichtet. Da sie im Zellzyklus eine Rolle spielt, sollte auch sie untersucht werden. Dies war deshalb von großem Interesse, da Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae* zuerst an einer Zellzyklusmutante entdeckt wurde (Madeo *et al.*, 1999). Abgesehen davon fand man bei einer vergleichenden Chipanalyse der apoptotischen Zellzyklusmutante Cdc48p^{S565G} (Madeo *et al.*, 1999) mit einem Wildtyp, dass die Expression des VAM7-Gens erhöht ist (Breitenbach und Kollegen (Universität Salzburg), persönliche Mitteilung). Das VAM7-Gen wirkt bei Fusionsprozessen des sekretorischen Pathways mit.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Membranfusionsprozessen und Apoptose in Hefe näher zu beleuchten, haben Corinna Maldener und ich in einem Gemeinschaftsprojekt mit diesen Genen gearbeitet.

3.1.1.1.KRE11

Das *KRE11*-Gen von *S. cerevisiae* ist auf Chromosom VII lokalisiert und codiert ein neues, nicht-essentielles Protein, welches für die β -1,6 Glucansynthese benötigt wird (Brown *et al.*, 1993). Das Protein ist 560 Aminosäuren lang und hat ein Molekulargewicht von 63 kDa. Seine zelluläre Lokalisation ist vermutlich das Cytoplasma (Brown und Bussey, unveröffentlicht).

KRE11 Mutanten haben im Vergleich zu Wildtypzellen einen auf schätzungsweise 50 % reduzierten Gehalt an β -1,6 Glucan in der Zellwand (Brown *et al.*, 1993), zeigen aber ein normales Wachstumsverhalten. Weiterhin sind *KRE11*-Mutanten resistent gegen das K1-Killer-Toxin, worauf sich auch der Name (*killer toxin resistant*) gründet. Das K1-Killer-Toxin ist ein sekretiertes, viral codiertes Protein das letal für sensitive Hefen ist. „Killer“-Hefen sind immun gegen ihr produziertes Toxin. Seine Wirkung beruht auf der lektin-ähnlichen Interaktion mit den Glucanrezeptoren in der Zellwand, wodurch es zur Kanalbildung in der Plasmamembran von Hefezellen kommt (Bussey *et al.*, 1990 Übersichtsartikel). Toxinresistente Hefezellen weisen veränderte Glucane in der Zellwand auf (Bussey, 1991 Übersichtsartikel).

Die biologische Funktion des Kre11p ist die Beteiligung am Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat. Hierbei stellt es eine Untereinheit des TRAPP-Komplexes (*transport protein particle*) dar (Sacher *et al.*; 2000). Der TRAPP Komplex mit seinen 10 Untereinheiten spielt eine Schlüsselrolle im späten Status des Transport vom ER zum Golgi-Apparat in *S. cerevisiae*. TRAPP ist ein großer Komplex an dem cis-Golgi, der vor der Bildung des SNARE-Komplexes das Andocken der Vesikel und ihre Fusion vermittelt.

3.1.1.2.SRO77

Das *SRO77*-Gen von *S. cerevisiae* befindet sich auf Chromosom II und codiert für ein Protein mit 1033 Aminosäuren und dem Molekulargewicht von 111,7 kDa. Seine zelluläre Lokalisation ist unbekannt, vermutet wird das Cytoplasma. Die Nullmutante ist lebensfähig und zeigt keinen Phänotyp (Giaever *et al.*, 2002).

Die Proteine der SRO-Familie z.B. Sro7p und sein Homologes Sro77p sind in einen späten Schritt der Exocytose involviert. Sie interagieren physikalisch mit Sec9p, einem t-SNARE, das an der Fusion von post-Golgi-Vesikeln mit der Plasmamembran beteiligt ist (Lehman *et al.*, 1999). Des Weiteren ist Sro77p auch für die Organisation des Aktincytoskeletts verantwortlich und beeinflusst so die normale Zellteilung (Kagami *et al.*, 1998). Doppelmutanten von *sro7* und *sro77* zeigen eine teilweise gestörte Organisation des polarisierten Aktincytoskeletts, schwere Defekte in der Exocytose sowie einen kälte-sensitiven Wachstumstyp. Allerdings ist zur Zeit umstritten, ob es tatsächlich zu einem Defekt in der Aktinpolarität kommt, oder ob doch die primäre Funktion von Sro7/77p und dann wahrscheinlich aller Mitglieder der SRO-Familie eher die Exocytose ist, als die Regulation des Aktincytoskeletts (Lehman *et al.*, 1999). Genetische Interaktionsstudien zeigen, dass *SRO77* mit *MYO1* und *MYO2* (Kagami *et al.*, 1998) eng verknüpft ist. *MYO1* codiert für Myo1p, welches ein Klasse-II Myosin darstellt (Brown 1997) und *MYO2* ist ein Gen, das eine der schweren Ketten der Klasse-V Myosine codiert (Brown 1997, Mermall *et al.*, 1998). Das Aktincytoskelett und die assoziierten Myosin-Proteine sind essentiell für den Transport und die steady-state Lokalisation der Vesikel und Organellen. Gleichzeitig sind beide für die dynamischen Remodellingprozesse der Plasmamembran sowie für das Beibehalten unterschiedlicher zellulärer Oberflächenstrukturen verantwortlich.

Abgesehen davon besitzen Sro77p und sein Homologes Sro7p Domänen, die homolog zu dem Tumorsuppressor I(2)gl (*gene lethal (2) giant larvae*) aus *Drosophila* sind (Kagami *et al.*, 1998). Auch in Maus und Mensch sind Homologe zu I(2)gl bekannt (Strand *et al.*, 1994; Tomotsune *et al.*, 1993). Des Weiteren zeigt Sro77p eine signifikante Ähnlichkeit zu dem neuronalen Syntaxin-bindendem Protein Tomosyn.

3.1.1.3.VAM7

Das *VAM7*-Gen von *S. cerevisiae* auf dem Chromosom VII codiert für ein 36,71 kDa großes, hydrophiles Protein, das als v-Snare an dem Transport von Golgi zur Vakuole beteiligt ist und auch bei der Morphogenese der Vakuolen eine Rolle spielt. Das Protein ist in der vakuolären Membran lokalisiert.

Es handelt sich bei Vam7 um ein SNAP-25 Homologes, das für das Andocken und den Fusionsprozess benötigt wird und für die Sporulation essentiell ist (Deutschbauer *et al.*, 2002; Ungermann *et al.*, 1998). Zusammen mit Vam3p spielt es im vakuolären Proteinsorting Pathway eine Rolle (Sato *et al.*, 1998). Die Nullmutante ist lebensfähig, zeigt aber auffällig große Vakuolen.

3.1.1.4. YAK1

Das *YAK1*-Gen aus *S. cerevisiae* ist auf Chromosom X lokalisiert und codiert für ein Protein mit 807 Aminosäuren mit dem Molekulargewicht von 91 kDa. Seine zelluläre Lokalisation ist unbekannt. In unterschiedlichen Assays ergaben sich sowohl das Cytoplasma als auch der Kern als mögliche Lokalisation.

Das *YAK1*-Gen aus *S. cerevisiae* codiert für eine Serin-Threonin Proteinkinase, die induziert wird durch einen Arrest in der frühen Zellzyklusphase. Sie stellt einen negativen Zellzyklusregulator dar und ist der Gegenspieler der cAMP abhängigen Proteinkinase A (Garrett *et al.*, 1991). Der Nullmutant ist lebensfähig und zeigt keinen Phänotyp (Giaever *et al.*, 2002).

3.1.2. Funktionen von *SRO7* und *SRO77* während der Apoptose in Zusammenhang mit Salzstress

Untersuchungen in Wildtyphefezellen, *sro7*-Disruptanten, *sro77*-Disruptanten sowie in der Doppeldisruptante $\Delta SRO7\Delta SRO77$ Salzstress induzierte Apoptose betreffend ergaben folgende Ergebnisse.

Milder NaCl Stress führt zum Tod der *sro7*- und *sro7sro77*-Disruptanten. Schon eine zehnminütige Inkubation mit 0,7 M NaCl tötete 30 % beider Stämme und nach sechs stündiger Inkubation überlebten weniger als 5 % der Hefezellen in einer Überlebensplattierung. Dieselbe Salzkonzentration hatte auf das Überleben des Wildtyps kaum Einfluss.

Da Yca1p bei der Apoptose, die durch Wasserstoffperoxid (Madeo *et al.*, 1999) oder Essigsäure (Madeo *et al.*, 2002) ausgelöst wird, eine essentielle Rolle spielt, wurde auch die durch salzstressinduzierte Apoptose auf ihre

Caspase-Abhängigkeit untersucht. Hierzu wurden Wildtyphefen sowie der $\Delta YCA1$ -Stamm mit 1,2 M NaCl für vier Stunden gestresst. Die Wildtyphefen starben hierbei stark, wohingegen der $\Delta YCA1$ -Stamm unter den gleichen Bedingungen kaum eine Verringerung seiner Überlebensfähigkeit zeigte.

Ob auch die durch Salzstress ausgelöste Apoptose im *sro7*-Disruptionsstamm caspaseabhängig ist, sollte mit Hilfe von Überlebensplattierungen untersucht werden. Die zusätzliche Disruption der Hefecaspase rettete den $\Delta SRO7$ Stamm: der $\Delta SRO7\Delta YCA1$ -Stamm besaß nach 2 Stunden Salzstress noch etwa 75 % überlebensfähige Zellen. Auch zeigte $\Delta SRO7\Delta YCA1$ -Stamm weniger DNA-Fragmentierung als der *SRO7*-Disruptionsstamm.

Im Gegensatz dazu ist die salzinduzierte Apoptose im $\Delta SRO77$ -Stamm nicht caspaseabhängig. Dies ergaben Überlebensplattierungen des *SRO77*-Disruptionsstammes, des $\Delta SRO77\Delta YCA1$ -Stammes und der entsprechenden Wildtypkontrollen in der exponentiellen Wachstumsphase nach einer vierstündigen Inkubation mit 1,2 M NaCl für 4 h. Dieser starke Salzstress führte sogar zu einem deutlichen Absinken der CFU des Wildtypes auf ca. 50 %. Allerdings wirkte hier die Disruption der Hefecaspase protektiv auf die Überlebensfähigkeit des Stammes: 90 % der Zellen überlebten. $\Delta SRO77$ starb ähnlich stark wie der Wildtyp (45 %). Hier konnte aber eine zusätzliche Disruption des *YCA1*-Genes den Stamm nicht vollständig retten: es starben noch etwa 40 %. Auch bei den Untersuchungen bezüglich der Caspaseaktivität bestätigte sich, dass die salzinduzierte Apoptose im $\Delta SRO77$ -Stamm nicht caspaseabhängig ist. Jedoch konnte der apoptotische Marker DNA-Fragmentierung sowohl beim $\Delta SRO77$ -Stamm als auch bei der Doppeldisruptante $\Delta SRO77\Delta YCA1$ nachgewiesen werden.

Bei $\Delta SRO77$ führt Salzstress folglich zum Tod mit DNA-Strangbruch, nicht aber zu einer Aktivierung der Hefecaspase Yca1p.

3.1.3. Verhalten der Deletionsstämme *KRE11*, *SRO77*, *VAM7* und *YAK1*

Um erste Erkenntnisse über diese vier Gene zu erhalten, wurden Apoptosetests durchgeführt. Aus stationären Vorkulturen der

Deletionsstämme und dem Wildtyp als Kontrolle wurden Kulturen auf eine Zellzahl von $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml beimpft. Diese Kulturen wurden für 4 Stunden bei 28°C kultiviert und nachdem mit Hilfe des Zellzählers sichergestellt war, dass alle Kulturen angewachsen waren, wurden sie halbiert. 0,6 mM Wasserstoffperoxid wurde als Apoptosestimulus zugesetzt, nicht aber den entsprechenden Kontrollen. Nach 4 h wurde die Überlebensfähigkeit getestet, hierfür wurden pro Stamm 500 Zellen ausplattiert.

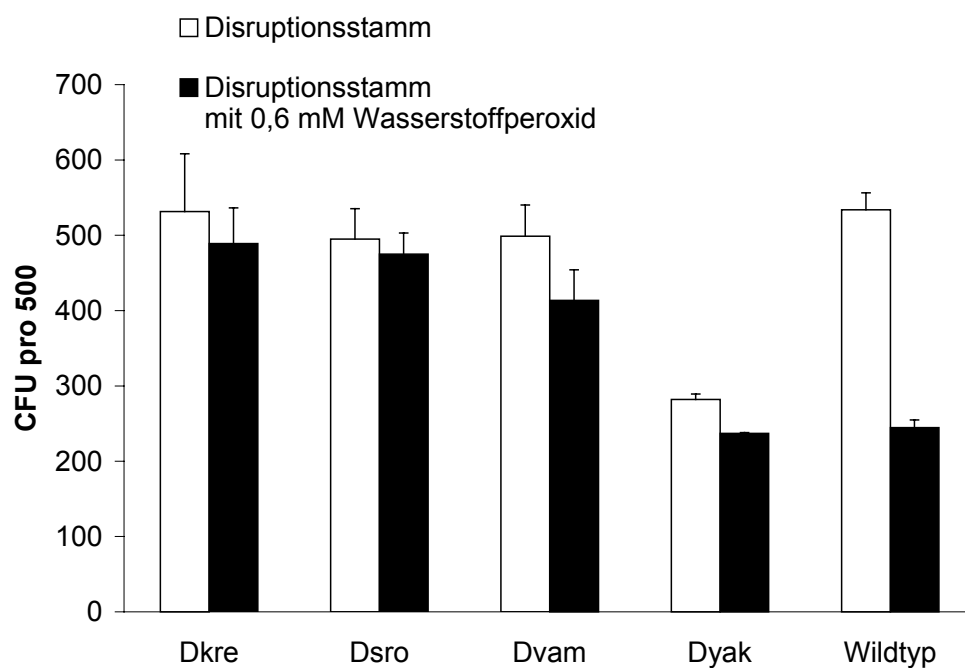


Abb. 1: Überlebensplattierung der Disruptionstämmen mit 0,6 mM Wasserstoffperoxid

Die Knockout-Stämme der Gene *KRE11*, *SRO77*, *VAM7* und *YAK1* zeigten mit und ohne Wasserstoffperoxid dieselbe Überlebensfähigkeit, allerdings führt die Disruption von *VAM7* zu einem allgemein schlechterem Überleben. Der Wildtyp hingegen zeigte nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid eine deutliche Abnahme der Fähigkeit Kolonien zu bilden. Dies deutet darauf hin, dass die Membranfusionsgene *SRO77* und *KRE11* sowie die Proteinkinase *YAK1* essentiell für die Aktivität der Caspase Yca1p sind.

3.1.4. Verhalten der Deletionsstämme *KRE11*, *SRO77*, *VAM7* und *YAK1* mit überexprimierter Hefecaspase Yca1p

Um die Abhängigkeit der Funktion von Yca1p zu untersuchen, wurde in die Disruptions-Stämmen der drei Membranfusionsgene (FMY 477, FMY 478, FMY 480) bzw. der Proteinkinase (FMY 479) die sich in einem Überexpressionsplasmid (pESC-Plasmid) befindliche Hefecaspase YCA1 hineintransformiert (FMY 34-37). Zur Kontrolle dienten die Disruptionsstämme mit dem Plasmid ohne Insert (im folgenden Leerplasmid genannt) (FMY 38-41), der Wildtyphintergrund mit Yca1-Überexpression (FMY 17) und dem entsprechenden Leerplasmid (FMY 29). Zuerst sollte sowohl ein geeignetes Zeitfenster als auch eine geeignete Wasserstoffperoxidkonzentration ermittelt werden.

Hierzu wurden mit stationären Übernachtskulturen Kulturen auf eine OD_{600} von 0,1 beimpft und kultiviert, bis sie eine OD_{600} von 0,3-0,6 besaßen. Dann wurde durch einen Medienshift die Expression der Hefecaspase induziert und Wasserstoffperoxid in den Konzentrationen 0; 0,4 mM; 0,8 mM und 1,2 mM als Apoptosestimulus zugesetzt. Die Kulturen wurden dann für 20 h, 22 h, 28 h und 45 h inkubiert. Im Anschluss wurden Überlebensplattierungen durchgeführt.

Bei der Wasserstoffperoxidkonzentration ab 0,8 mM war auch ein Sterben des zur Kontrolle verwendeten Leerplasmids festzustellen, die Konzentration war also zu hoch gewählt. Nach 45 h Inkubation war überhaupt kein Effekt mehr festzustellen. Es ist anzunehmen, dass sich die Kulturen von dem Stress regeneriert hatten. Da der 20 h Wert sich bei vielen anderen Versuchen schon bewährt hat und auch hier erste Werte vielversprechend waren, wurden alle weiteren Versuche mit einer Inkubation von 20 h und 0,4 mM Wasserstoffperoxid durchgeführt. Die Versuche wurden in derselben Form wie die Vorversuche durchgeführt. Nach 20 h Kultivierung wurde die Vitalität der Stämme anhand von Überlebensplattierungen ermittelt und sie wurden des weiteren auf apoptotische Marker getestet.

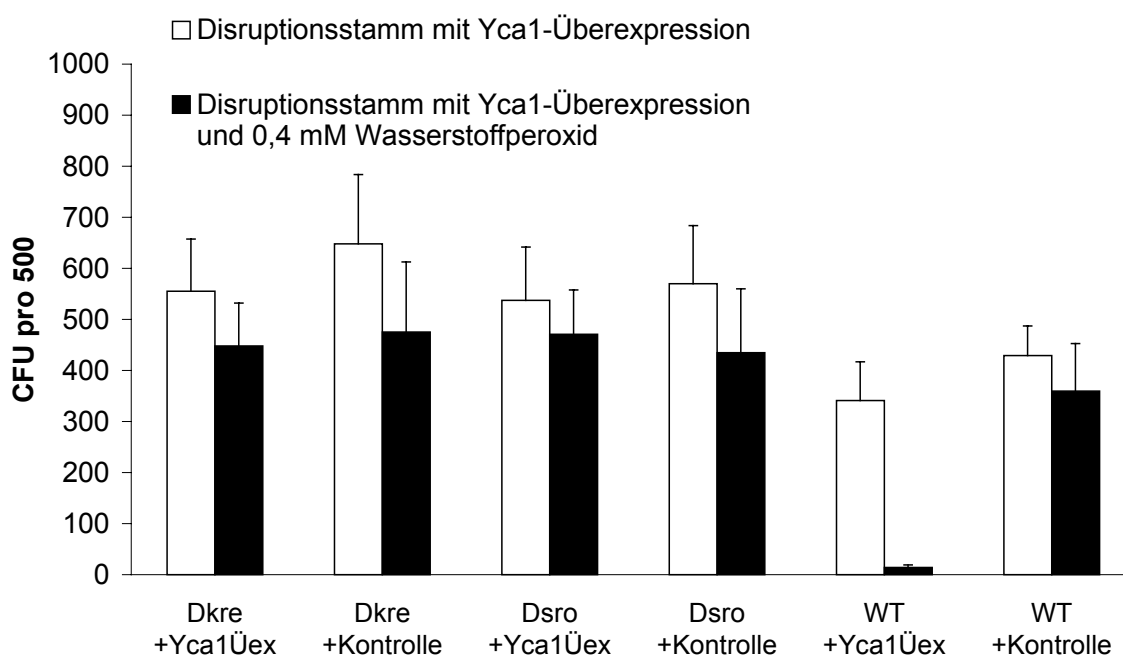


Abb. 2: Überlebensplattierung der Disruptionsstämme mit überexprimierter Caspase und 0,4 mM Wasserstoffperoxid

Die Überexpression der Hefecaspase im Wildtyphintergrund bewirkte, dass auch ohne Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus von 500 ausplattierten Zellen nur noch etwa 350 in der Lage waren, Kolonien zu bilden. Die Zugabe von 0,4 mM Wasserstoffperoxid senkte die CFU drastisch auf 50. Bei der Leerplasmidkontrolle im Wildtyphintergrund betrug die CFU ca. 450. Es überlebten fast alle ausplattierten Zellen. Dies änderte sich auch durch die Belastung mit Wasserstoffperoxid nur geringfügig.

Die Deletion der Gene *KRE11*, *SRO77* und *YAK1* führte dazu, dass bei überexprimierter Caspase selbst durch Zugabe von Wasserstoffperoxid die CFU nur geringfügig sank. Die CFU der drei Kontrollen (Disruptions-Stämme mit Leerplasmid) zeigte unter den selben Bedingungen ähnliche Werte.

Auch im *VAM7*-Deletionsstamm war kein Unterschied zwischen der Leerplasmidkontrolle und der Caspaseüberexpression festzustellen. Von 500 ausplattierten Zellen überlebten nach der Belastung mit 0,4 mM H₂O₂ nur noch etwa 300 Zellen. Die Sensitivität gegenüber Wasserstoffperoxid scheint bei diesem Stamm prinzipiell erhöht.

Neben den Überlebensplattierungen der vier Hefestämme wurden die Kulturen mit Hilfe des TUNEL-Tests auf DNA-Fragmentierung untersucht.

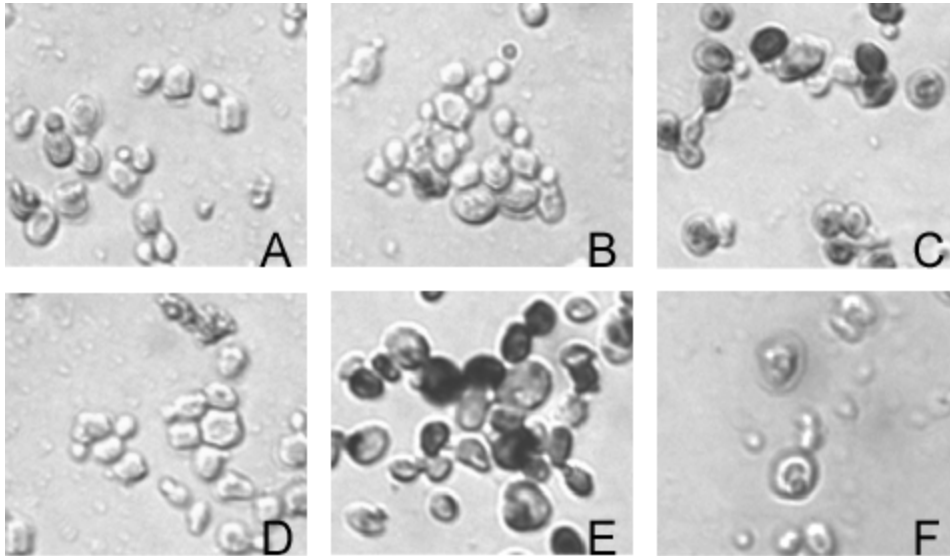


Abb. 3: TUNEL-Färbung der Disruptionsstämme mit überexprimierter Caspase und Wasserstoffperoxid

A: $\Delta KRE11$ mit Yca1-Üex und 0,4 mM H_2O_2 ; B: $\Delta SRO77$ mit Yca1-Üex und 0,4 mM H_2O_2 ; C: $\Delta VAM7$ mit Yca1-Üex und 0,4 mM H_2O_2 ; D: $\Delta YAK1$ mit Yca1Üex und 0,4 mM H_2O_2 ; E: WT mit Yca1Üex und 0,4 mM H_2O_2 ; F: WT mit Leerplasmid und 0,4 mM H_2O_2

Die TUNEL-Färbung bestätigte die Ergebnisse der Überlebensplattierungen. Der Wildtyp mit überexprimierter Caspase wies nach der Gabe von 0,4 mM Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus in der TUNEL-Färbung positive, schwarz gefärbte Kerne auf, die eine DNA-Fragmentierung anzeigen. Der $\Delta VAM7$ -Stamm mit überexprimierter Caspase wies weniger schwarz gefärbte Kerne auf als der Wildtyp mit überexprimierter Caspase. Die Kontrolle in Form des Wildtyps mit Leerplasmid zeigte auch in Gegenwart von Wasserstoffperoxid keine DNA-Fragmentierung. In keinem der anderen Disruptions-Stämme führte die Überexpression von Yca1p in Gegenwart des Apoptosestimulus Wasserstoffperoxid zu einer DNA-Fragmentierung.

in-vivo Caspaseaktivitätsmessung

Abgesehen davon wurde auch *in-vivo* die Caspaseaktivität bestimmt. Hierfür wurden Hefezellen mit einem Derivat eines Caspase-Inhibitors (FITC-VAD-fmk) inkubiert. Bei aktiven Caspasen bindet FITC-VAD-fmk kovalent im aktiven Zentrum. Man kann dann mittels Durchflusszytometrie das Maß der aktiven Caspasen bestimmen.

Kultur ohne H ₂ O ₂	Caspase-aktivität [%]	Kultur mit H ₂ O ₂	Caspase-aktivität [%]
$\Delta KRE11$ +Yca1-Üex	7	$\Delta KRE11$ +Yca1-Üex	11
$\Delta SRO77$ +Yca1-Üex	7	$\Delta SRO77$ +Yca1-Üex	12
$\Delta VAM7$ +Yca1-Üex	8	$\Delta VAM7$ +Yca1-Üex	32
$\Delta YAK1$ +Yca1-Üex	5	$\Delta YAK1$ +Yca1-Üex	10
WT+Yca1-Üex	19	WT+Yca1-Üex	65

Kultur ohne H ₂ O ₂	Caspase-aktivität [%]	Kultur mit H ₂ O ₂	Caspase-aktivität [%]
$\Delta KRE11$ +Leerplasmid-kontrolle	3	$\Delta KRE11$ +Yca1-Üex	5
$\Delta SRO77$ +Leerplasmid-kontrolle	3	$\Delta SRO77$ +Yca1-Üex	4
$\Delta VAM7$ +Leerplasmid-kontrolle	5	$\Delta VAM7$ +Yca1-Üex	32
$\Delta YAK1$ +Leerplasmid-kontrolle	3	$\Delta YAK1$ +Yca1-Üex	12
WT+Leerplasmid-kontrolle	19	WT+Yca1-Üex	65

Die vier Stämme verhielten sich in der *in-vivo* Messung der Caspaseaktivität mit FITC-VAD-fmk analog zu den schon durchgeführten Tests.

Im Wildtyphintergrund mit überexprimiertem Yca1p konnte etwa 20 % Caspaseaktivität gemessen werden, die durch die Zugabe von 0,4 mM Wasserstoffperoxid auf über 65 % gesteigert werden konnte. Das heißt, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen die Hefecaspase im Wildtyphintergrund mit Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus stark aktiviert werden konnte. Die Leerplasmidkontrolle im Wildtyphintergrund zeigte ohne Wasserstoffperoxid etwa 2 % Caspaseaktivität auf und in Gegenwart von Wasserstoffperoxid konnte nur ein geringer Anstieg an caspasepositiven Zellen beobachtet werden. Die Caspaseaktivität stieg auf nur 4 %. Bei den $\Delta SRO77$ -, $\Delta YAK1$ - und $\Delta KRE11$ -Stämmen mit

überexprimierter Caspase war nur eine basale Caspaseaktivität vorhanden, die auch mit Hilfe von Wasserstoffperoxid nur leicht erhöht werden konnte.

Im Gegensatz dazu verhielt sich der *VAM7*-Disruptionsstamm mit überexprimierter Caspase: Zwar war hier ohne Wasserstoffperoxid auch nur eine basale Caspaseaktivität vorhanden, in Gegenwart von Wasserstoffperoxid konnte diese auf 32 % gesteigert werden. Damit lag sie aber immer noch unter der im Wildtyphintergrund gemessenen Caspaseaktivität (65 %). Die Leerplasmidkontrollen im Δ *SRO77*-, Δ *KRE11*- und Δ *YAK1*-Stammhintergrund zeigten in Gegenwart von Wasserstoffperoxid kaum erhöhte Caspaseaktivität; nur im Δ *VAM*-Stammhintergrund war die Caspaseaktivität leicht auf 12 % erhöht.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich die Δ *SRO77*-, Δ *YAK1*- und Δ *KRE11*-Stämme mit überexprimierter Caspase bei allen durchgeführten Apoptosetests unauffällig verhielten. Einzig der Δ *VAM7*-Stamm zeigte sowohl Caspaseaktivierung als auch DNA-Fragmentierung, und fiel in den Überlebensplattierungen allgemein durch eine verschlechterte Vitalität unabhängig von der Caspaseüberexpression in Gegenwart von Wasserstoffperoxid auf.

Um sicherzugehen, dass die Hefecaspase auch in allen Stämmen gleich stark exprimiert wurde, habe ich ein FLAG-getaggetes-*YCA1*-Konstrukt eingesetzt, so dass es mir mit Hilfe eines Immunoblots möglich war, die Caspaseexpression nachzuweisen. Nach dem etablierten Anzucht-schema (Medienshift und Wasserstoffperoxidgabe) wurden die Kulturen geerntet und Rohextrakte hergestellt. Nach Messen der Proteinkonzentration und Angleichen derselben (200 μ g) wurde mit Hilfe eines α -Flag-Antikörpers bei der SDS-Page mittels Westernblots die Menge an Yca1p in den einzelnen Stämmen unter diesen Bedingungen ermittelt: bei allen vier Stämmen konnte eine einheitlich starke Bande von etwa 55 kDa identifiziert werden. Die Expression von Yca1p war folglich in allen getesteten Kulturen gleich stark. Obwohl die Hefecaspase in allen getesteten Disruptionsstämmen gleich stark exprimiert wurde, war sie nicht in der Lage einen apoptotischen Phänotyp zu erzeugen.

3.1.5. Mögliche Prozessierung von Kre11p, Sro77p, Vam7p und Yak1p durch Yca1p.

Möglicherweise führt die Interaktion der Hefecaspase zur Prozessierung der getesteten Proteinen. Um dies zu untersuchen, wurde versucht die Gene *KRE11*, *SRO77*, *VAM7* und *YAK1* chromosomal c-terminal an HA zu taggen.

Bei den Genen *KRE11*, *VAM7* und *YAK1* hat das Taggen problemlos funktioniert und die getaggen Proteine konnten mittels Westernblot nachgewiesen werden. Es wurde wie oben beschrieben nach 20 h Inkubation ein Rohextrakt hergestellt, die Proteinkonzentration gemessen und angeglichen (200 µg). Mit Hilfe eines α-HA-Antikörpers wurden bei der SDS-Page mit Westernblot die getaggen Proteine identifiziert.

Das chromosomale Tagging von *SRO77* blieb sowohl bei HA, als auch bei c-myc erfolglos. Hierfür erscheinen mehrere Gründe plausibel: erstens die Größe von Sro77p mit 111,7 kDa. Zweitens wäre es möglich, dass Sro77p zwar chromosomal getaggt werden kann, eine Detektion das Taggings im Westernblot aber nicht möglich ist. Tatsächlich war es so, dass mittels Kolonien-PCR erfolgreiches Tagging nachgewiesen werden konnte, sobald aber der endgültige Nachweis mittels Immunoblot erbracht werden sollte, war das Taggen nicht mehr zu identifizieren. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wäre, dass die endogene Hefecaspase Yca1p das getaggte Sro77p schneidet, bevor es in einem Immunoblot nachgewiesen werden kann. Um dies auszuschließen wurde anhand zweier verschiedener Strategien erneut versucht chromosomal zu taggen: In der ersten Strategie wurde das chromosomale-Taggen von Sro77p im $\Delta YCA1$ -Hintergrund versucht. Hierbei wurde sowohl ein HA- als auch ein c-myc-Tag getestet. Weiterhin wurde durch Zugabe des Caspaseinhibitor zVAD-fmk während der Rohextraktherstellung in einer Konzentration von 20 µM in Anlehnung an die beobachtete Caspaseinhibition durch Madeo *et al.* (Madeo *et al.*, 2002) versucht, das eventuelle Schneiden von Sro77p zu verhindern. Das unter diesen Bedingungen getaggte Sro77p sollte dann im Immunoblot nachgewiesen werden. Leider haben beide Strategien nicht funktioniert.

Um nun eine mögliche Prozessierung nachzuweisen, wurde in die chromosomal getaggem *KRE11*-, *VAM7*- und *YAK1*-Stämme die FLAG-

getaggte Hefecaspase hineintransformiert, die sich in einem Überexpressionskonstrukt unter Galaktosekontrolle befand. Als Kontrolle wurde das entsprechende Leerplasmid verwendet. Die Kulturen wurden wie in den vorhergegangenen Versuchen angezchtet, geshiftet und mit 0,4 mM Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus versetzt. Nach 20 h Induktion der Hefecaspase nach Medienwechsel wurden die Zellen geerntet und Rohextrakte hergestellt. Nach Messen der Proteinkonzentration und Angleichen derselben wurden jeweils 200 µg Protein durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines α -HA-Antikörpers bei der SDS-Page mit Westernblot die Expression und eventuelle Prozessierung der HA-getaggtten Proteine nachgewiesen. Die Exposition des Films erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran von Antikörpern befreit und ein zweiter Immunoblot gegen FLAG als primärer Antikörper zur Detektion der Yca1p-Expression durchgeführt. Aufgrund der starken Expression wurde diesmal der Film nur wenige Minuten aufgelegt.

In allen Spuren des Immunoblots außer den Leerplasmidkontrollspuren war bei etwa 55 kDa eine gleichstarke Bande zu erkennen. Das heißt, die Hefecaspase wurde in allen chromosomal getaggtten Konstrukten gleich stark exprimiert. Die Proteine Kre11p, Vam7p und Yak1p zeigten nur ein schwaches Signal bei den erwarteten Banden (65, 35 und 90 kDa) und ihre Größe entsprach in etwa den vorhergesagten Proteingrößen. Ein kleineres Fragment, das durch Abspaltung des c-terminalen Endes von Kre11p, Vam7p und Yak1p bei der Prozessierung gebildet worden wäre, war nicht zu identifizieren.

Um sicherzustellen, dass auch wirklich alle Proteingrößen in dem SDS-Gel dargestellt werden können, wurde ein 8 bis 15 %iges Gradientengel durchgeführt. Des Weiteren wurde die eingesetzte Proteinkonzentration auf 400 µg Protein erhöht, um intensivere Banden zu erlangen. Jedoch konnte auch unter diesen Bedingungen kein kleines Fragment nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Tatsachen scheint Yca1p die Genprodukte der Fusionsgene und das der Proteinkinase nicht zu prozessieren.

3.1.6. Überexpression der Gene *KRE11*, *SRO77*, *VAM7* und *YAK1*

Um den Einfluss der untersuchten Gene auf den Hefewildtyp zu untersuchen, habe ich versucht Überexpressionskonstrukte der Gene *KRE11*, *SRO77*, *VAM7* und *YAK1* herzustellen. Nach erfolglosen Klonierungsversuchen in den pESC-His-Vektor wurde mit Hilfe des TOPO-TA-Klonierungskit von Invitrogen wenigstens das *VAM7*-Gen in einen Überexpressionsvektor hineinkloniert und durch Sequenzierung seine Richtigkeit bestätigt.

Um die Auswirkung einer Überexpression des *VAM7*-Gens zu untersuchen wurde sowohl in den Bya 4717 Wildtypstamm als auch in den $\Delta YCA1$ -Stamm das *VAM7*-Überexpressionsplasmid hineintransformiert (FMY 561 und FMY 563). Als Kontrolle diente das entsprechende Leerplasmid.

Als erstes wurde ein geeignetes Zeitfenster ermittelt. Hierzu wurden aus stationären Übernachtskulturen Kulturen auf eine OD_{600} von 0,1 beimpft und kultiviert, bis sie eine OD_{600} von 0,3-0,6 besaßen. Dann wurde durch einen Medienshift die Expression des *VAM7*-Gens induziert und 0,4 mM Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus zugesetzt. Die Kulturen wurden dann für 18 h, 20 h, 24 h, und 50 h inkubiert. Im Anschluss wurden Überlebensplattierungen durchgeführt.

Nach 50 h Inkubation war kein Effekt mehr festzustellen. Anscheinend hatten sich die Kulturen vollständig regeneriert. Sowohl der 20 h Wert, der sich bei vielen anderen Versuchen schon bewährt hat, als auch der 18 h Wert zeigten vielversprechende Ergebnisse, wobei der früherer Zeitwert bei den Kontrollwerten besser funktionierte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle weiteren Versuche mit einer Inkubation von 18 h und 0,4 mM Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus durchgeführt.

Bei den Überlebensplattierungen nach 18stündiger Inkubation ergab sich folgendes Bild:

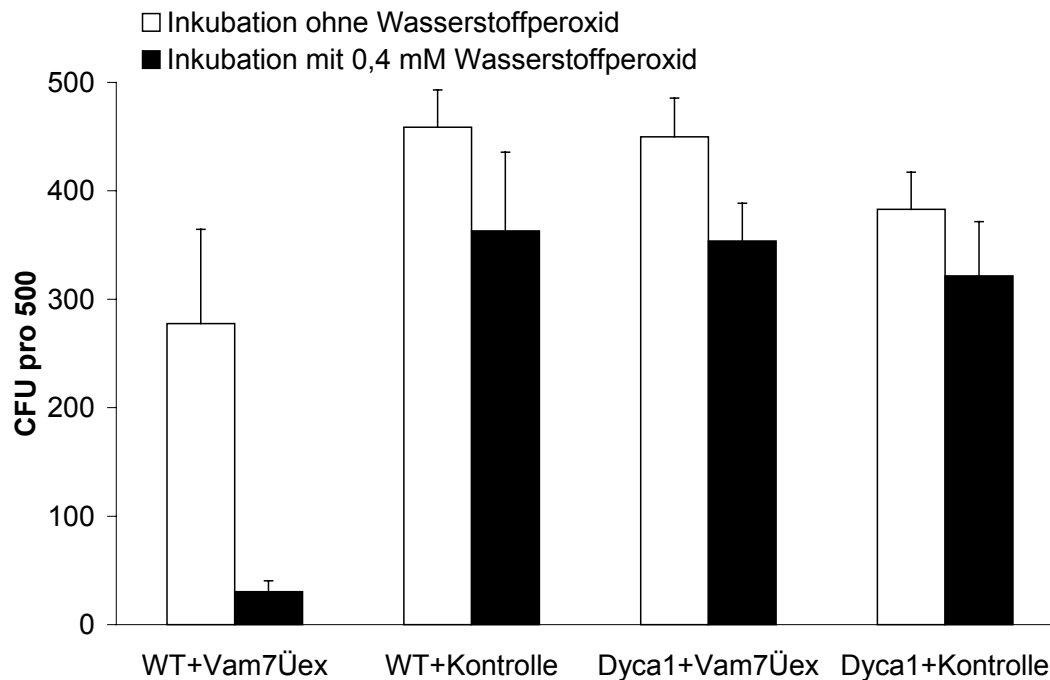


Abb.4: Überlebensplattierung des Wildtyps und des $\Delta YCA1$ -Stammes mit überexprimiertem Vam7 und 0,4 mM Wasserstoffperoxid

Die Kontrollen sowohl des Wildtypstammes als auch des $\Delta YCA1$ -Stammes verhielten sich ähnlich und die Inkubation mit Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus beeinträchtigte die Überlebensrate kaum. Jedoch zeigten der Wildtypstamm mit dem *VAM7*-Überexpressionsplasmid im Vergleich zu dem $\Delta YCA1$ -Stamm mit dem *VAM7*-Überexpressionsplasmid stark unterschiedliches Überleben.

Allein durch die Überexpression des *VAM7*-Gens sank die Überlebensfähigkeit im Wildtyphintergrund auf nahezu die Hälfte (CFU 278), wobei sie im $\Delta YCA1$ -Stamm kaum beeinträchtigt wurde (CFU 450). Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid sank die Überlebensfähigkeit des Wildtypstammes sogar auf 31 CFU ab. Die Überexpression des *VAM7*-Gens tötet Hefezellen folglich ähnlich effizient wie die Überexpression von *Yca1p*.

Die Zugabe von Wasserstoffperoxid hatte keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit des $\Delta YCA1$ -Stammes.

Um herauszufinden, ob es sich bei dem Sterben um einen apoptotischen Phänotyp handelt, wurden mit diesen Stämmen sowohl TUNEL- und DAPI-Färbungen als auch *in-vivo* Caspase-messungen durchgeführt.

TUNEL- und DAPI-Färbung

Die Stämme wurden hierzu nach dem selben Protokoll wie zur Überlebensplattierung behandelt.

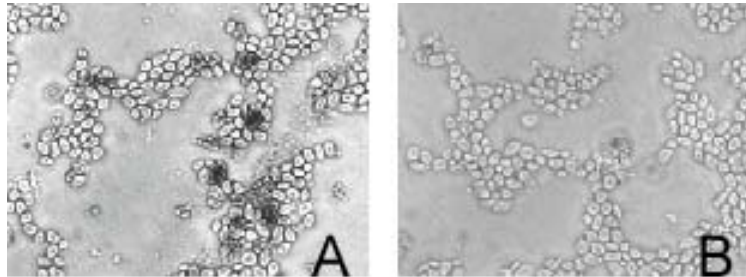


Abb. 5: TUNEL-Färbung des Wildtyps und des $\Delta YCA1$ -Stammes mit überexprimiertem Vam7 und Wasserstoffperoxid

A: WT mit Vam7-Üex und 0,4 mM H_2O_2 ; B: $\Delta YCA1$ mit Vam7-Üex und 0,4 mM H_2O_2

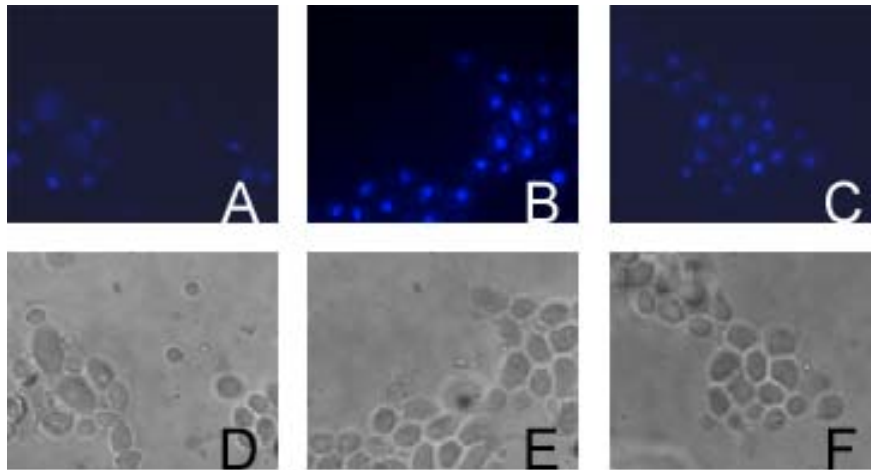


Abb. 6: DAPI-Färbung des Wildtyps und des $\Delta YCA1$ -Stammes mit überexprimiertem Vam7 und Wasserstoffperoxid

A, D: WT mit Vam7-Üex und 0,4 mM H_2O_2 ; B, E: $\Delta YCA1$ mit Vam7-Üex und 0,4 mM H_2O_2 ; C, F WT mit Leerplasmid und 0,4 mM H_2O_2

Die TUNEL- und DAPI-Färbungen ergaben das gleiche Bild wie die Überlebensplattierungen. Die Überexpression des *VAM7*-Gens führte im $\Delta YCA1$ -Stammhintergrund selbst bei Gabe von Wasserstoffperoxid zu unauffälligen Kernen, die sich wie die entsprechende Leerplasmidkontrolle verhielten. Wurde aber das *VAM7*-Gen im Wildtyphintergrund überexprimiert, kam es schon ohne Wasserstoffperoxid zur Färbung des Kerns im TUNEL-Test und zur Chromatin-kondensation visualisiert in der DAPI-Färbung (halbmondförmige Kerne). Wurde diesem Stamm noch zusätzlich mit

Wasserstoffperoxid versetzt, kam es zur deutlichen Ausbildung eines apoptotischen Phänotyps.

in-vivo Caspasemessungen

Auch hierzu wurden die Stämme nach dem oben beschriebenen Protokoll angezogen.

Es ergab sich folgendes Bild:

Kultur	Caspaseaktivität ohne H ₂ O ₂ [%]	Caspaseaktivität mit H ₂ O ₂ [%]
WT+Vam7-Üex	2	28
ΔYCA1+Vam7-Üex	2	2
WT+Leerplasmid	2	2
ΔYCA1+Leerplasmid	4,5	5

Die Ergebnisse entsprechen den Überlebensplattierungen. Die Leerplasmidkontrollen sind unempfindlicher gegenüber der Inkubation mit Wasserstoffperoxid. Durch Wasserstoffperoxid konnte die Caspaseaktivität im VAM7-Überexpressionsstamm im Wildtyphintergrund um das 14fache gesteigert werden. Hingegen trat im ΔYCA1-Hintergrund durch Zugabe von Wasserstoffperoxid keine Veränderung auf.

3.1.7. Einfluss von Brefeldin A auf Hefezellen

Brefeldin A ist ein Metabolit aus dem Pilz *Eupenicillium brefeldianum*, der in verschiedenen Zelltypen und Organismen spezifisch und reversibel den Proteintransport vom endoplasmatischen Reticulum zum Golgi-Apparat hemmt (Magner *et al.*, 1988; Misumi *et al.*, 1986). Dies hat eine veränderte Morphologie der Zelle zur Folge, wie beispielsweise den Kollaps der Golgi-Stapel, wodurch sekretorische Proteine im endoplasmatischen Retikulum akkumuliert werden. In Rattenhepatocyten konnten Fujiwara *et al.* zeigen, dass Albumin eine Stunde nach Brefeldin A-Gabe im ER akkumuliert, dieser Prozess aber reversibel ist und vier Stunden nach der Brefeldin A-Gabe eine normale Lokalisation des sekretorischen Proteins wieder hergestellt ist

(Fujiwara *et al.*, 1988). Neben dem Block der Sekretion beeinflusst Brefeldin A auch die Fusion: es verringert die Trans- und Endocytose (Hunziker *et al.*, 1992).

Welche Auswirkungen ein gestörter sekretorischer Pathway in Hefezellen hat, sollte durch die Gabe von Brefeldin A untersucht werden.

Hierfür habe ich verschiedene Strategien ausprobiert. Als erstes sollte untersucht werden, ob der Einfluss von Brefeldin A sowohl an stationären als auch an logarithmisch wachsenden Kulturen zu beobachten ist und welches Zeitfenster sich hierfür eignet. In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss der Hefecaspase Yca1p untersucht.

Es zeigte sich, dass Brefeldin A keinen Einfluss auf stationäre Hefezellen besitzt. Die Versuche an logarithmisch wachsenden Kulturen wurden wie folgt durchgeführt.

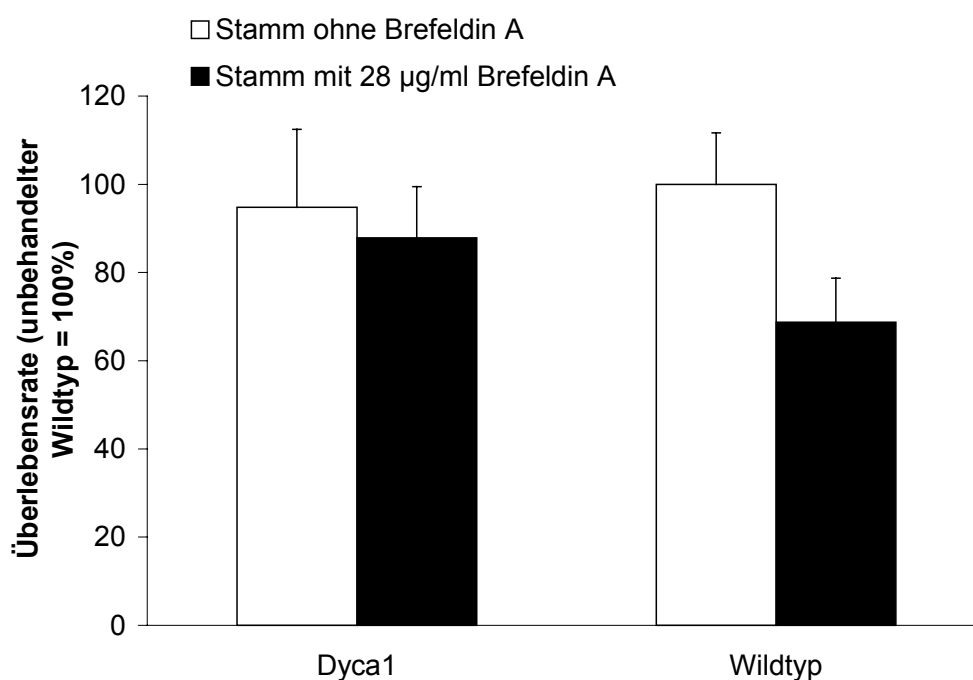


Abb. 7: Überlebensplattierung des Wildtyps und des $\Delta YCA1$ -Stammes mit Brefeldin A (28µg/ml)

Aus Übernachtskulturen des Wildtypstammes und des $\Delta YCA1$ -Stamme wurden Kulturen auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft. Sobald diese Kulturen eine OD_{600} von 0,2 aufwiesen, wurden sie mit Brefeldin A versetzt um eine Konzentration von 28 µg/ml pro Kultur zu erlangen. Als Kontrolle wurde Ethanol (hierin war

das Brefeldin A gelöst) zugegeben. Nach 4,5 h wurde die Vitalität mit Hilfe von Überlebensplattierungen überprüft.

Auf den Wildtypstamm hatte die Zugabe von Brefeldin A einen negativen Effekt, die Überlebensrate sank um 30 %. Im $\Delta YCA1$ -Stamm hatte die Zugabe von Brefeldin A keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit. Wie zu erwarten war, ist für ein normales Überleben eine funktionierende Fusionsmaschinerie vonnöten. Falls diese gestört ist, scheint die endogene Caspase für den Tötungsprozess mitverantwortlich. Allerdings konnte keine Caspaseaktivität in FACS-Messungen nachgewiesen werden.

Als zweites sollte der Einfluss von Brefeldin A bei der Gabe von Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus untersucht werden.

Hierzu wurden Wildtypkulturen auf eine Zellzahl von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml beimpft. Diese Kulturen wurden für 4 Stunden bei 28°C kultiviert und nachdem mit Hilfe des Zellzählers sichergestellt war, dass alle angewachsen waren, wurde einem Teil der Kulturen Brefeldin A zugegeben, so dass seine Konzentration 1 µg/ml betrug. Den Kontrollen wurde das entsprechende Volumen Ethanol beigefügt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde den Kulturen 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1,2 mM Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus zugesetzt, nicht aber den entsprechenden Kontrollen. 4 h später wurde eine Überlebensplattierung durchgeführt, pro Stamm wurden jeweils 500 Zellen ausplattiert. Die Kulturen, die einer Wasserstoffperoxidkonzentration über 0,6 mM ausgesetzt waren, starben fast vollständig. Daher wurden in den folgenden Versuchen nur die Konzentrationen von 0,4 mM und 0,6 mM Wasserstoffperoxid verwendet.

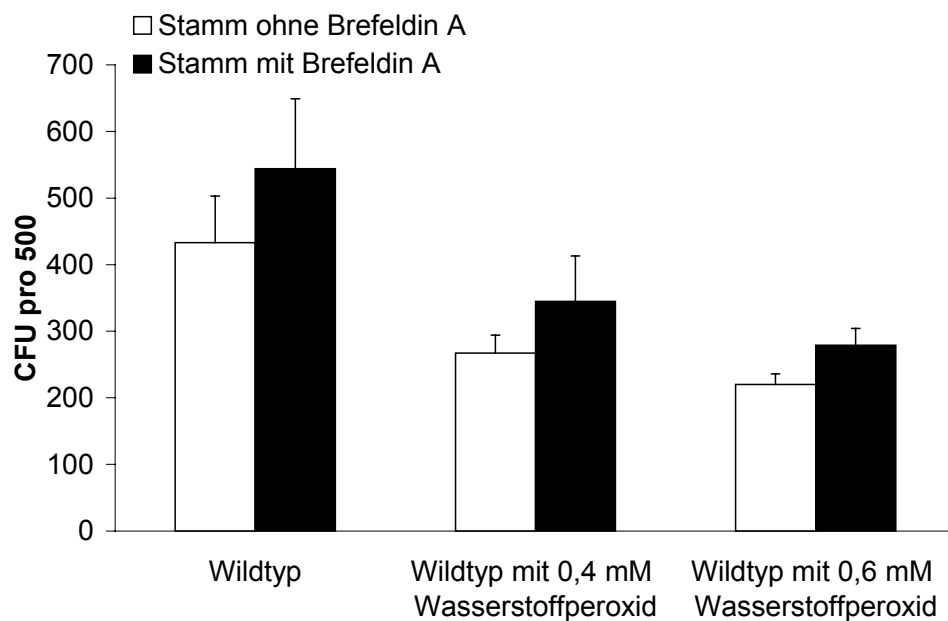


Abb. 8: Überlebensplattierung des Wildtyps mit Brefeldin A (1µg/ml) und Wasserstoffperoxid.

Die Stämme, die mit 1 µg/ml Brefeldin A inkubiert worden waren, zeigten unabhängig von der Wasserstoffperoxidgabe ein verbessertes Überleben.

3.1.8. Diskussion

3.1.8.1. Einfluss von Salzstress auf *Saccharomyces cerevisiae*

Seit kurzem gilt Kochsalz als Apoptosestimulus für Pflanzen und Hefen (Katsuhara, 1997; Huh *et al.*, 2002). In *S. cerevisiae* Wildtyphefen konnte gezeigt werden, dass 1,2 M NaCl zu einem apoptotischen Phänotyp führt (Katsuhara, 1997; Huh *et al.*, 2002). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass erstens die Disruption von *SRO7* in Hefen zu einer stark erhöhten Sensitivität gegen den durch NaCl ausgelösten Salzstress, nicht aber zu einer generell erhöhten Sensitivität gegenüber osmotischem Stress führt (Larrson *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu weist $\Delta SRO7$ nur eine geringfügig erhöhte Sensitivität gegen NaCl auf. Zweitens zeigte die Doppeldisruptante $\Delta SRO7\Delta SRO7$ eine starke Sensitivität gegenüber Na⁺, K⁺ und Li⁺ - Ionen. Es scheinen also sowohl Sro7p, als auch Sro77p an der Kationenhomöostase beteiligt zu sein.

Aufgrund des Fehlens einer Na⁺/K⁺-ATPase bei *Saccharomyces cerevisiae* kann das Na⁺/K⁺-Verhältnis nur über spezifische Transporter aufrecht erhalten werden. Hefen besitzen hierfür zwei Transporter, die die Kationenhomöostase ermöglichen (Haro *et al.*, 1991; Wieland *et al.*, 1995). Der Trk1/2-Transporter befördert K⁺-Ionen ins Zellinnere, und der ENA1-Transporter ist für das Ausschleusen von Na⁺ aus der Zelle verantwortlich, um das Na⁺/K⁺-Verhältnis im Zellinneren kleiner als 1 zu halten.

Die Expression von ENA1 wird sehr komplex reguliert. Es wäre möglich, dass über diese Regulationsmechanismen auch unter apoptoseinduzierendem Salzstress die Ionenhomöostase aufrecht erhalten werden kann, um apoptotische Vorgänge zu verhindern, wie das im Wildtyp bei milden Salzkonzentration der Fall ist.

Im $\Delta SRO7$ -Stamm ist nun das Targeting des Natriumtransporters ENA1 gestört und es kommt daher direkt nach seiner Synthese zum Abbau desselben in der Vakuole. Ein erhöhter Salzstress bei $\Delta SRO7$ führt dann unweigerlich zu einem intrazellulären Anstieg des Na⁺/K⁺-Verhältnisses (Larsson *et al.*, 1998).

Wir konnten nun zeigen, dass milder NaCl Stress nicht nur zum schlechteren Wachsen der beiden Stämme führt, wie von Larsson *et al.* (Larsson *et al.*, 1998) beschrieben, sondern dass sie sterben und dabei einen apoptotischen Phänotyp aufweisen.

Die Hefecaspase Yca1p vermittelt die durch Salzstress induzierte Apoptose im *SRO7*-Disruptionsstamm, nicht aber im *SRO77*-Disruptionsstamm.

Die in unserem Labor entdeckte Metacaspase Yca1p in *Saccharomyces cerevisiae* kann sowohl durch Wasserstoffperoxid (Madeo *et al.*, 1999), durch Altern (Madeo *et al.*, 2002) als auch durch Essigsäure (Ludovico *et al.*, 2001) aktiviert werden. Alle bis dato bekannten apoptotischen Vorgänge in *Saccharomyces cerevisiae* werden durch Yca1p vermittelt, was Yca1p zu einem herausragendem Effektor bei apoptotischen Vorgängen macht. Um ihre Relevanz auch bei der durch salzstressinduzierten Apoptose zu ermitteln, haben wir Wildtyphefen und die Disruptionsstämme $\Delta SRO7$ und

$\Delta SRO7\Delta SRO77$ mit den korrespondierenden Stämmen, bei denen $\Delta YCA1$ deletiert war, untersucht.

Hierbei ergab sich ein sehr interessantes Bild: Auf der einen Seite führte die Disruption von $YCA1$ im Wildtyp zu einem verbesserten Überleben und einer deutlichen Verringerung der Caspaseaktivität bei starkem Salzstress. Diese Beobachtungen scheinen also für eine generelle Funktion von Yca1p bei der salzinduzierten Apoptose zu sprechen. Darüber hinaus wurde Yca1p nach NaCl-Gabe im salzsensitiven Stamm $\Delta SRO7$ stärker als im Wildtyp aktiviert. Auch konnte eine zusätzliche Disruption von $YCA1$ im $\Delta SRO7$ -Stamm bei Salzstress die Überlebensfähigkeit deutlich erhöhen und das Auftreten von DNA-Strangbrüchen vermindern. Das fehlende ENA1-Targeting scheint also zur verstärkten Apoptose zu führen.

Auf der anderen Seite kam es jedoch durch die Disruption von $YCA1$ im $\Delta SRO7\Delta SRO77$ -Hintergrund oder im $\Delta SRO77$ -Disruptionsstamm nicht zu einem verbesserten Überleben bei Salzstress und beide Stämme zeigten starke DNA-Fragmentierung, obwohl $SRO77$ mit mehr als 50 % Übereinstimmung ein Isogen von $SRO7$ ist.

Die Disruption von $YCA1$ im $SRO77$ - bzw. $SRO7SRO77$ -Hintergrund vermochte die Stämme nicht vor salzinduzierter Apoptose zu retten. Hingegen rettete die Disruption von $YCA1$ im $\Delta SRO7$ -Hintergrund vor Apoptose nach Salzstress. Dazu passt auch, dass der $SRO77$ -Disruptionsstamm nach Salzstress keine Caspaseaktivierung in der FACS-Messung aufweist. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Yca1p ein intaktes Sro77p benötigt, um als wichtiger Effektor in der Apoptose bei *Saccharomyces cerevisiae* tätig zu sein.

All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Funktion von Sro77p bei der Hefeapoptose trotz der hohen Sequenzhomologie zu Sro7p eine andere darstellt, da die Disruption von $YCA1$ im $\Delta SRO77$ - bzw. $\Delta SRO7\Delta SRO77$ -Hintergrund die Stämme nicht vor salzinduzierter Apoptose retten konnte. Offenbar gibt es in *S. cerevisiae* einen oder sogar mehrere Yca1p unabhängige Apoptosemechanismen. Diese alternativen Wege könnten dann unter negativer Kontrolle von Sro77p oder einem mit Sro77p interagierenden Protein stehen.

3.1.8.2. Verhalten der Membranfusionsdeletionsstämme *KRE11*, *SRO77*, und *VAM7*

Um erste Erkenntnisse über einen möglichen Zusammenhang zwischen Apoptose und Membranfusionsprozessen in *Saccharomyces cerevisiae* zu erhalten, wurde das Verhalten der Deletionsstämme *KRE11*, *SRO77* und *VAM7* untersucht. Hierbei wurde Wasserstoffperoxid als apoptotischer Stimulus eingesetzt.

Die Tatsache, dass alle Deletionsstämme mit und ohne Wasserstoffperoxid im Gegensatz zum Wildtyp dieselbe Überlebensfähigkeit aufweisen, deutet darauf hin, dass die endogene Caspase durch die Disruption der oben erwähnten Gene nicht mehr in der Lage ist zu töten, auch nicht mit einer Zugabe von Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus. Festzuhalten bleibt aber auch, dass eine Deletion des *VAM7*-Gens die Vitalität des Stammes insgesamt stark beeinträchtigt.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Caspaseaktivität der Hefecaspase Yca1p in den Deletionsstämmen mit einer Yca1p-Überexpression bestätigen, dass die Proteine Kre11p, Sro77p und Vam7p essentiell für die Caspaseaktivität sind. Dies zeigt sich an der Beobachtung, dass ein Überexpressionskonstrukt der Hefecaspase Yca1p nicht mehr in der Lage war, in den Kulturen einen apoptotischen Phänotyp auszulösen: weder TUNEL- noch DAPI-Färbungen waren positiv. Auch kam es zu keiner reduzierten Überlebensfähigkeit in den Überlebensplattierungen. Selbst die Gabe von 0,4 mM Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus führte zu keiner Apoptoseinduktion in diesen Stämmen.

Da bei allen hier getesteten Konstrukten die Hefecaspase Yca1p einheitlich stark exprimiert war, führt dies zu dem Schluss, dass Kre11p, Sro77p und Vam7p, essentiell für die Apoptose in Hefe sind. Im Anschluss an diese Beobachtung sollte der Vermutung nachgegangen werden, ob die Proteine Kre11p, Sro77p und Vam7p eventuell durch die Hefecaspase Yca1p prozessiert werden und diese Prozessierung eine funktionierende Caspaseschinerie ermöglicht. Die Proteine Kre11p und Vam7p werden nicht durch die Hefecaspase Yca1p prozessiert. Zu Sro77p ist leider keine

Aussage möglich, da es trotz verschiedener Klonierungsstrategien nicht gelang das *SRO77*-Gen chromosomal zu taggen.

Ob hingegen die Proteine Kre11p, Sro77p und Vam7p an der Prozessierung der Hefecaspase beteiligt sind, steht noch offen, da es mir erst am Ende meiner Doktorarbeit gelungen war, wenigstens das *VAM7*-Gen in einen Überexpressionsvektor hineinzuklonieren. Der Klonierungserfolg für die anderen Gene steht leider immer noch aus.

Falls es zum erfolgreichen Abschluss dieser Klonierungsarbeiten kommt, könnte jeweils ein Plasmid mit überexprimierter Hefecaspase und ein Konstrukt mit dem überexprimierten Fusionsgen in Wildtyphefen transformiert werden. Ein anschließender Immunoblot würde dann Aufschluss geben, ob Kre11p, Sro77p oder Vam7p die Hefecaspase prozessieren.

3.1.8.3. Überexpression des *VAM7*-Gens

Durch die erfolgreiche Klonierung des *VAM7*-Gens in einen Überexpressionsvektor, konnte ich den Einfluss einer *VAM7*-Überexpression auf Wildtyphefen und auf Hefen mit einer *YCA1*-Deletion untersuchen.

Die Überexpression des *VAM7*-Gens führte zu einem ausgesprochen starken apoptotischen Phänotyp, der in seiner Stärke an den apoptotischen Phänotyp, der durch *Yca1p*-Überexpression hervorgerufen wird, erinnert. So sank durch die alleinige Überexpression des *VAM7*-Gens die Überlebensfähigkeit im Wildtyphintergrund auf nahezu die Hälfte und konnte durch die Gabe von Wasserstoffperoxid sogar auf unter 50 Kolonien gesenkt werden. Im Gegensatz dazu wurde die Überlebensfähigkeit des Δ *YCA1*-Stammes weder durch die Überexpression des *VAM7*-Gens noch durch die zusätzliche Gabe von Wasserstoffperoxid beeinträchtigt. Diese Ergebnisse und die Ergebnisse der TUNEL- und DAPI-Färbungen sowie die der FACS-Messungen zeigen, dass Vam7p nur in Abhängigkeit der Caspase in der Lage ist zu töten und einen apoptotischen Phänotyp zu erzeugen, der apoptotische Phänotyp also nicht allein durch die Überexpression von Vam7p zustande kommt.

Dies könnte daraufhin deuten, dass die endogen exprimierte Caspase unter verstärktem Golgi-Vakuole Transport sehr viel besser in der Lage ist Apoptose zu induzieren.

Werden diese Ergebnisse in einem Kontext mit „Stress im sekretorischen Pathway“ betrachtet, kann man interessante Schlüsse ziehen. Für die Erzeugung von Stress im sekretorischen Pathway gibt es einige physiologisch relevante Auslöser. Speziell Auslöser für ER-Stress sind gut charakterisiert: Akkumulation von ungefalteten oder missgefalteten Proteinen, Verarmung des Calciumvorrates und β -Amyloid Produktion (Kudo *et al.*, 2002). Obwohl es keine gut charakterisierten Golgi-Apparat spezifischen Stressauslöser gibt, kann die Struktur der Golgi-Membranen sensitiv auf Veränderungen der Lipidkomposition reagieren. Zum Beispiel führt die Erhöhung von Ceramid im Golgi-Komplex zur Störung der Membranfusionsprozesse (Maceyka *et al.*, 1997).

Um einen apoptotischen Phänotyp auszulösen, ist die Disassemblierung des ERs und des Golgi-Apparates essentiell (Sesso *et al.*, 1999). Einige Proteine wie Golgin-160 (Mancini *et al.*, 2000), GRASP65 (Golgi Reassembly and Stacking Protein 65) (Lane *et al.*, 2002) und das t-SNARE Syntaxin-5 (Maag *et al.* 2003 Übersichtsartikel), die alle eine Rolle in der Erhaltung der Golgi-Struktur und dem „Membrane trafficking“ spielen, sind kürzlich als Caspasesubstrate identifiziert worden. Lane *et al.* fanden z.B. heraus, dass GRASP65, das wie bereits erwähnt in den Golgi-Stapelungsprozess und Vesikeltransportprozesse involviert ist, während der Apoptose durch die Caspase-3 gespalten wird. Expression eines unspaltbaren Derivates von GRASP65 führte zu einer Verzögerung der durch den sekretorischen Pathway induzierten Apoptose, was darauf hindeutet, dass GRASP65 und somit auch dem Golgi-Apparat eine wichtige Rolle in der Weiterleitung des apoptotischen Signals zukommt.

Die Tatsache, dass Syntaxin-5 als Caspasesubstrat identifiziert wurde, könnte erklären, warum Sro77p, zu dem das menschliche Protein Tomosyn, ein Syntaxin-1 bindendes Protein, homolog ist, essentiell für die Caspaseaktivität ist. Durch die Disruption von *SRO77* fehlt offenbar ein wichtiges Caspasesubstrat und es kann so eventuell nicht zur nötigen

Disassemblierung der Organellen, des gezielten Vesikelfusionsstops und zur Präsentation von Lipiden als Erkennungssignal auf der Zelloberfläche kommen.

Die Wichtigkeit eines funktionierenden sekretorischen Pathways zeigt allein die Tatsache, dass die Präsentation des Todesrezeptors Fas an der Plasmamembran durch ein im Golgi produziertes Gangliosid (GD3) stimuliert wird (De Maria *et al.*, 1997, 41. Malisan *et al.*, 2002).

Des weiteren scheint die im Golgi lokalisierte Caspase-2 nötig, um in Mäuse-Fibroblasten Apoptose aufgrund der Ligation der Todesrezeptoren Tnrf-1 und Fas auszulösen (Maag *et al.*, 2003 Übersichtsartikel).

Alle diese Erkenntnisse und auch die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen von Kre11p und Vam7p (Beide sind in Golgi-Prozesse involviert: Vam7p spielt beim Transport vom Golgi-Apparat zur Vakuole eine Rolle und Kre11p ist am Transport vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt.) deuten darauf hin, dass zumindest in manchen Zelltypen - unter anderem wahrscheinlich in Hefezellen - die apoptotische Antwort auch über den Golgi-Apparat vermittelt wird und es nicht nur im Laufe des apoptotischen Geschehen zu einer Disassemblierung des Golgi-Apparates kommt, sondern er aktiv eine Rolle bei der Weitergabe apoptotischer Signale spielt.

3.1.8.4. Einfluss von Brefeldin A auf Hefezellen

Auch die Ergebnisse aus den Versuchen, in denen Brefeldin A in hohen Konzentrationen zu logarithmisch wachsenden Kulturen des Wildtyps und eines $\Delta YCA1$ -Stamme gegeben wurde, zeigen, dass es bei massiver Störung des sekretorischen Pathways zu einer leichten Verschlechterung der Überlebensfähigkeit des Wildtyps kommt. Offenbar ist für das Absinken der Vitalität die Caspase mitverantwortlich. In der TUNEL-Färbung wurde eine leichte DNA-Fragmentierung durch vereinzelt schwarz gefärbte Kerne angezeigt. Auf den $\Delta YCA1$ -Stamm hingegen hatte Brefeldin A keinen Einfluss. Es scheint, als ob Brefeldin A in hohen Konzentrationen in logarithmisch wachsenden Hefezellen caspaseabhängig Apoptose auslösen

könnte. Allerdings konnte in den FACS-Messungen keine Caspaseaktivität gemessen werden.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, die das Zusammenspiel von Brefeldin A (in geringeren Konzentrationen) und Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus untersuchen, dass ein funktionierender sekretorischer Pathway wichtig für den Apoptosestimulus Wasserstoffperoxid ist. Brefeldin A scheint hier aufgrund seines Blocks des sekretorischen Pathways die Exekution der Apoptose zu verhindern. Allerdings können hier keine weiterführenden Aussagen getroffen werden, da es trotz der Gabe von Brefeldin A zu einem verringerten Überleben bei Wasserstoffperoxidgabe kommt. Auch führt die Zugabe von Brefeldin A wenn überhaupt nur zu sehr schwachen Effekten. Dennoch könnte dieser Ansatz sehr vielversprechend zur weiteren Aufklärung des Zusammenhanges zwischen Apoptose und sekretorischem Pathway inklusive der damit verbundenen Fusionsmaschinerie sein.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die Ergebnisse stark auf einen Zusammenhang zwischen Apoptose und Membranfusion in *Saccharomyces cerevisiae* hindeuten. Allerdings wären Untersuchungen den Einflusses von Brefeldin A sowie die Überexpression der untersuchten Gene betreffend sicherlich sehr sinnvoll, um den Zusammenhang zwischen Apoptose und sekretorischem Pathway inklusive der damit verbundenen Fusionsmaschinerie noch weiter zu charakterisieren.

3.1.8.5. Einfluss der Proteinkinase Yak1p auf die Hefeapoptose

Das *YAK1*-Gen aus *S. cerevisiae* codiert für eine Serin-Threonin Proteinkinase, die durch einen Arrest in der frühen Zellzyklusphase induziert wird. Da Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae* zuerst an einer Zellzyklusmutante entdeckt wurde (Madeo *et al.*, 1999) und Kinasen bei vielen zellulären Prozessen eine Rolle spielen, war es von großem Interesse, den Einfluss der Proteinkinase Yak1p auf die Hefeapoptose näher zu untersuchen.

Verhalten des Deletionsstammes *YAK1*

Um erste Erkenntnisse über die Interaktion von Yca1p und Yak1p zu erhalten, wurde das Verhalten des *YAK1*-Deletionsstammes untersucht. Hierbei wurde Wasserstoffperoxid als apoptotischer Stimulus eingesetzt.

Die Tatsache, dass der Deletionsstamm mit und ohne Wasserstoffperoxid im Gegensatz zum Wildtyp dieselbe Überlebensfähigkeit aufweist, deutet darauf hin, dass die endogene Caspase durch die *YAK1*-Disruption nicht mehr in der Lage ist, trotz der Zugabe von Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus, zu töten.

Auch die Ergebnisse aus den Caspaseaktivitätsuntersuchungen in dem Deletionsstamm mit überexprimierter Caspase zeigen, dass das Proteine Yak1p essentiell für die Caspaseaktivität ist. Selbst die Gabe von 0,4 mM Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus führte zu keiner Apoptoseinduktion in diesem Stamm.

Durch das chromosomale Taggen des *YAK1*-Gens konnte des weiteren festgestellt werden, dass Yak1p nicht durch die Hefecaspase Yca1p prozessiert wird.

Da die Klonierung des *YAK1*-Gen in einen Überexpressionsvektor nicht funktioniert hat, war es einerseits nicht möglich, eine eventuelle Prozessierung der Hefecaspase Yca1p durch Yak1p zu untersuchen. Andererseits konnte auch die Auswirkung einer Überexpression von Yak1p auf Wildtyphefzellen und $\Delta YCA1$ -Hefen nicht untersucht werden.

Zusammenfassend deuten alle Ergebnisse darauf hin, dass Yak1p in der durch Yca1p kontrollierten Apoptosemaschinerie eine wichtige Rolle spielt, wie man es bei einem Interaktor der Caspase aus dem Bereich der Kinasen auch erwarten kann.

3.2. Das Zellzyklusprotein Cdc48p und Apoptose

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse in bezug auf die Punktmutation im Cdc48p dargestellt.

3.2.1. Überblick zu Cdc48p

Das Gen *CDC48* ist auf Chromosom IV lokalisiert und codiert ein essentielles Zellzyklusprotein mit 835 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 92 kDa. Eine Disruption von *CDC48* wirkt sich letal aus (Fröhlich *et al.*, 1991; Fröhlich 1993). Das *CDC48*-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde erstmals durch eine kältesensitive Mutante (restriktive Bedingung ist eine Temperaturerniedrigung auf 14°C) von Donald Moir definiert (Moir *et al.*, 1982). Unter restriktiven Bedingungen arretieren die Zellen mit großer Knospe und besitzen einen langgestreckten Hals zwischen Mutter- und Tochterzelle. Mit Hilfe von immunhistochemischen Untersuchungen mit Anti-Tubulin-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass diese Zellen einen desorganisierten Spindelapparat haben, dessen Mikrotubuli von einem ungeteilten Spindelpolkörper ausgehen (monopolare Spindel) und frei im Cytosol enden (Fröhlich *et al.*, 1991).

Cdc48p liegt als ringförmiges Hexamer vor und weist zwei hochkonservierte Kopien der AAA-Box auf, wobei eine Sequenzidentität von 50 % zwischen beiden Kopien besteht. Die AAA-Superfamilie (*ATPase associated with diverse cellular activities*) ist eine Proteinfamilie, die sich durch den gemeinsamen Besitz von einer oder zwei 230-250 Aminosäuren umfassenden Konsensussequenzen (AAA-Box) auszeichnet, welche eine ATP-Bindungsstelle enthält (Confalonieri *et al.*, 1995, Übersichtsartikel; Beyer, 1997, Übersichtsartikel). Seine ATPase-Aktivität ist durch N- Ethylmaleimid hemmbar (Fröhlich *et al.*, 1995).

Studien zur subzellulären Lokalisation zeigten, dass Cdc48p sowohl mit der Kernhülle als auch mit der ER-Membran assoziiert ist. Die Regulation des Kernimports erfolgt über die zellzyklusabhängige Phosphorylierung eines carboxyterminalen Tyrosinrestes, wodurch die N-terminale Kernlokalisationssequenz demaskiert wird (Madeo *et al.*, 1998).

3.2.1.1. Die Beteiligung von Cdc48p an Membranfusionsprozessen

Aufgrund von Sequenzhomologien (u.a. zu den Hefeproteinen Sec18p und Pas1p) wurde eine Mitwirkung von Cdc48p an Peroxisomenbildung, Sekretion und Genexpression postuliert (Fröhlich *et al.*, 1991). Bis jetzt konnte die Beteiligung von Cdc48p an Membranfusionsprozessen des ER (Latterich *et al.*, 1995) am ER-assoziierten proteasomalen Proteinabbau (Braun *et al.*, 2002) am Zellzyklus (Moir *et al.*, 1982) und an der Apoptose (Madeo *et al.*, 1997) nachgewiesen werden. Latterich *et al.* konnten mit Hilfe eines in-vitro Systems zeigen, dass Cdc48p eine essentielle Rolle bei der homotypischen ER-Membranfusion spielt, die unabhängig von Sec18p (NSF) und Sec17p (α -Snap) erfolgt (Latterich *et al.*, 1995). Die Fusion von ER-Membranen ist unter anderem ein essentieller Vorgang für das normale Fortschreiten des Zellzyklus: während der Mitose bleiben zwar zunächst Kern- und ER-Membran intakt, doch für die Zell- und Kernteilung zur Bildung der Tochterzellen und –kerne sind Membranfusionsprozesse nötig. Abgesehen davon spricht für die Beteiligung von Cdc48p an Membranfusionsprozessen die elektronenmikroskopische Aufnahmen der Cdc48p^{S565G}-Mutante: sie weist ein stark verlängertes ER auf (Madeo *et al.*, 1997).

3.2.1.2. Die potentielle C2-Domäne des Cdc48p:

Die C2-Domäne ist ein weit verbreitetes Ca²⁺-abhängiges Bindungsmotiv, das häufig eine Bindung zwischen Protein und Phospholipid vermittelt. Calcium als ubiquitärer Second Messenger spielt auch hierbei eine wichtige Rolle. Die meisten Proteine, die eine C2-Domäne enthalten, sind an der Signaltransduktion oder der Membranfusion beteiligt. Zur ersten Kategorie zählen Proteinkinasen (z.B. die Familie der PKC), Proteine, die an der Bildung von Phospholipid-Second-Messenger (z.B. PLC), an der Aktivierung von GTPasen (wie z.B. Ras) und an der Ubiquitinligation (z.B. Nedd4) beteiligt sind. Zur zweiten Kategorie zählen Proteine wie die Synaptotagmine, Rabphilin-3 und Munc (Rizo *et al.*, 1998 Übersichtsartikel).

In den Diplomarbeiten von Christoph Jüschke (Jüschke, 2000) und mir (Proksch, 2001) wurde die These verstärkt, dass Cdc48p eine C2-Domäne

besitzt und Ca^{2+} - vermittelt an Membranen bindet. Besonders die von Kai-Uwe Fröhlich und mir weiterentwickelte Konsensussequenz für C2-Domänen mit Hilfe eines multiplen Alignments zeigt, dass Cdc48p ein Kandidat für eine Ca^{2+} -bindende C2-Domäne ist. Durch Vergleiche der beiden AAA-Boxen des Cdc48p zeigte sich, dass die potentielle C2-Domäne in der zweiten AAA-Box liegt (Proksch, 2001).

Während meiner Diplomarbeit habe ich versucht anhand gezielter Mutationen einzelner Aminosäuren, die funktionellen Eigenschaften der potentiellen C2-Domäne und somit des Cdc48ps zu verändern. Durch das Sequenzalignment zeigte sich, dass alle C2-Domäne-enthaltenden Proteine außer Cdc48p an der entsprechenden Stelle einen Prolinrest besitzen. Diese Aminosäure stellt mit Sicherheit keinen Calciumkoordinierenden Rest dar, sondern ist für die Struktur zu Beginn des dritten β -Faltblattes (Sutton *et al.*, 1995) wichtig. Da auch die von Christoph Jüschke aufgestellte (Jüschke, 2000) und von mir modifizierte Konsensussequenz an dieser Stelle ein Prolin verlangt, wurde diese Mutation durchgeführt.

3.2.2. Überlebensplattierungen

Um einen ersten Einblick in das eventuell veränderte Verhalten der Cdc48^{R609P}-Mutante zu erlangen, wurden Überlebensplattierungen von Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase durchgeführt. Hierzu wurden mit stationären Übernachtskulturen Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 beimpft und bis eine OD₆₀₀ von 0,3 kultiviert. Dann wurde Wasserstoffperoxid in der Konzentrationen von 0,4 mM als Apoptosestimulus zugesetzt. Die Kulturen wurden dann für weitere 2 h inkubiert. Im Anschluss wurden Überlebensplattierungen durchgeführt. Bei allen Versuchen zur Charakterisierung der Cdc48^{R609P}-Mutante wurden jeweils 1000 Zellen ausplattiert. Zur Kontrolle diente KFY 417, eine Wildtypstamm, dessen endogenes *CDC48*-Gen ebenfalls disrumpt ist und der auf einem YEp52-Plasmid das native *CDC48*-Gen enthält.

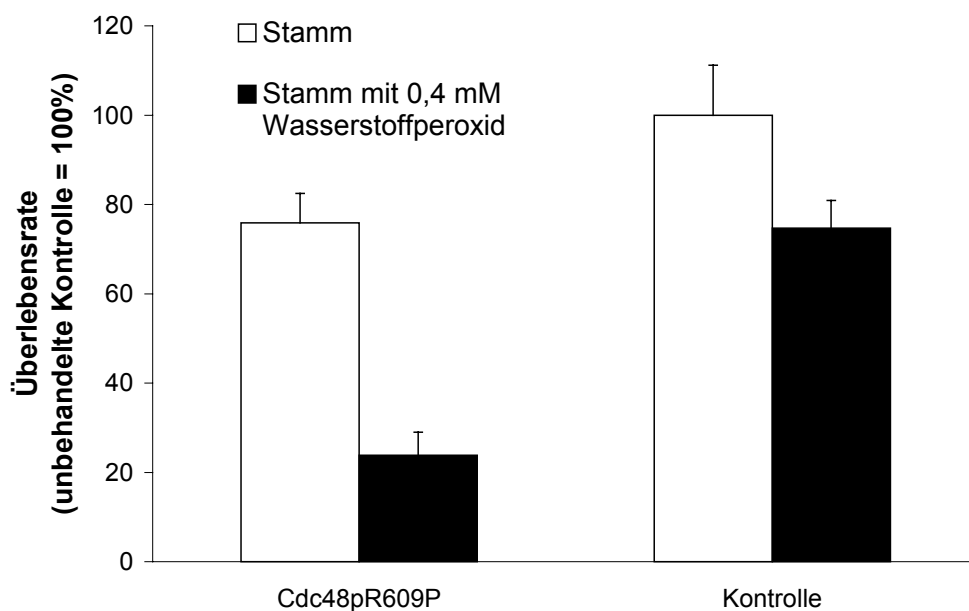


Abb. 9: Überlebensplattierung der logarithmisch wachsenden Kontrolle und der Cdc48p^{R609P}-Mutante mit 0,4 mM Wasserstoffperoxid für 2 h

Die Mutation in dem *CDC48*-Gen bewirkte, dass selbst ohne Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus nur etwa 75 % der Zellen in der Lage waren Kolonien zu bilden. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid konnte die Überlebensrate sogar auf unter 25 % gesenkt werden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Allerdings konnte auch bei der Kontrolle durch Gabe von Wasserstoffperoxid eine verminderte Überlebensfähigkeit festgestellt werden: es überlebten nur noch ungefähr 75 %, was der Überlebensrate der unbehandelten Mutante entspricht. Die Mutation des *CDC48*-Gens führt also zu einer verschlechterten Vitalität und zusätzlich zu einer verstärkten Sensibilität gegenüber Wasserstoffperoxid.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei den Überlebensplattierungen stationärer Kulturen gemacht werden. Hierzu wurden mit stationären Übernachtskulturen Kulturen auf eine OD_{600} von 0,1 beimpft und sie nach 24 h Wachstum mit 1 mM Wasserstoffperoxid für 3 h inkubiert. Im Anschluss wurden Überlebensplattierungen durchgeführt.

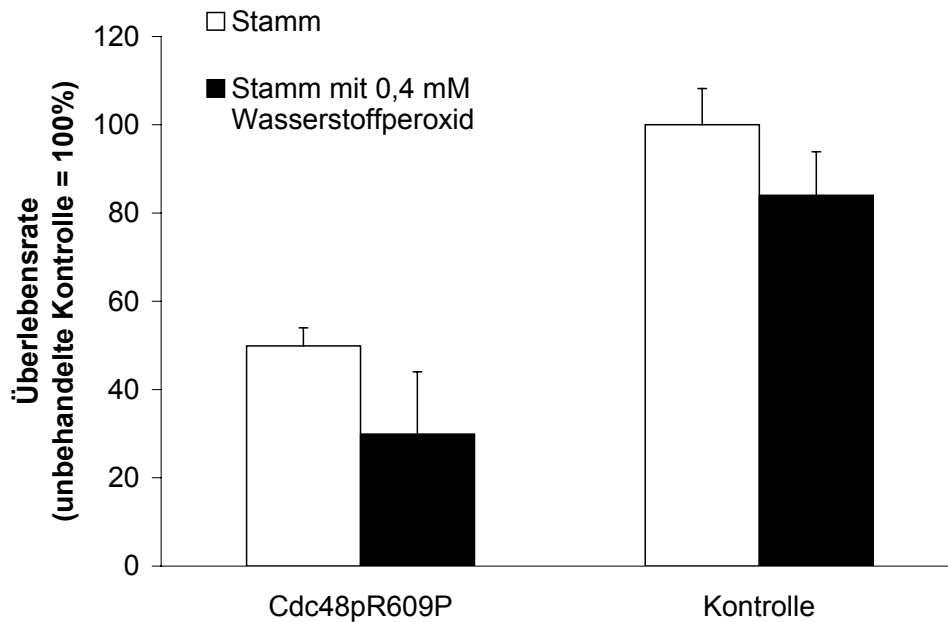


Abb. 10: Überlebensplattierung der stationären Kontrolle und der Cdc48p^{R609P}-Mutante mit 1 mM Wasserstoffperoxid für 3 h

Stationäre Cdc48^{R609P}-Mutanten zeigten eine noch schlechtere Überlebensfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp als logarithmisch wachsende Kulturen: nur etwa 50 % der ausplattierten Zellen überlebten. Durch Gabe von Wasserstoffperoxid konnte die Überlebensrate sogar auf etwa 30 % reduziert werden. Auf die Vitalität der Kontrolle hatte hingegen die Gabe von Wasserstoffperoxid nur einen geringen Einfluss, die Überlebensrate sank auf ungefähr 85 %.

3.2.3. TUNEL- und DAPI-Färbungen zum Nachweis apoptotischer Marker

Um herauszufinden, ob der durch die Mutation hervorgerufene Zelltod apoptotischer Natur ist, wurden TUNEL-Färbungen zum Nachweis der DNA-Fragmentierung und DAPI-Färbungen zum Nachweis der Chromatinkondensation durchgeführt. Hierzu wurden stationären Kulturen analog zur Überlebensplattierung behandelt.

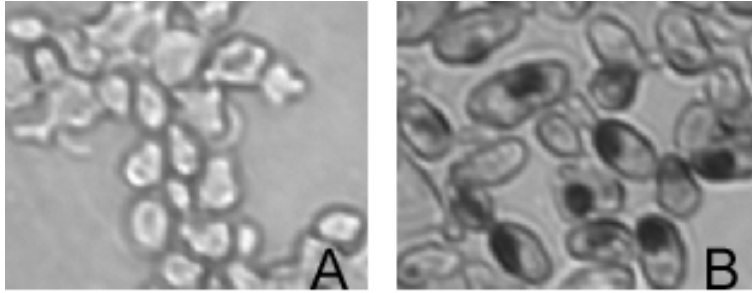


Abb.11: TUNEL-Färbung der stationären Kontrolle (A) und der Cdc48p^{R609P}-Mutante (B) mit 1 mM Wasserstoffperoxid für 3 h

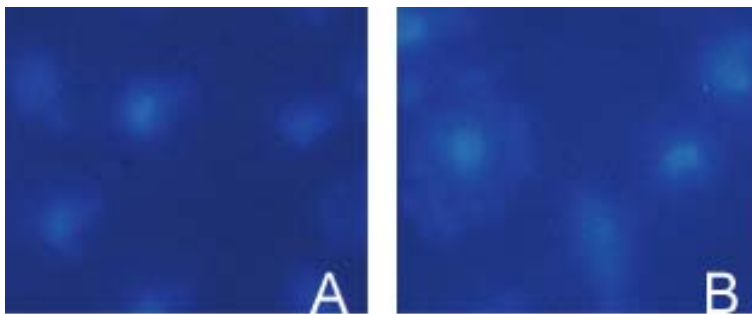


Abb.12: DAPI-Färbung der stationären Kontrolle (A) und der Cdc48p^{R609P}-Mutante (B) mit 1 mM Wasserstoffperoxid für 3 h

Cdc48^{R609P}-Mutanten zeigten in der TUNEL-Färbung massiv positive, schwarz gefärbte Kerne nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid. Des Weiteren konnte Chromatinkondensation in der DAPI-Färbung nachgewiesen werden. Die Kontrolle verhielt sich bei den Tests unauffällig. Dies deutet darauf hin, dass der durch die Mutation hervorgerufene Zelltod apoptotischer Natur ist.

3.2.4. *in-vivo* Caspaseaktivitätsmessung

Abgesehen davon wurde auch *in-vivo* die Caspaseaktivität der Cdc48^{R609P}-Mutante bestimmt. Es wurden sowohl Messungen von Zellen in der logarithmischen als auch in der stationären Wachstumsphase durchgeführt.

3.2.4.1. *in-vivo* Messung der Caspaseaktivität von logarithmisch wachsenden Zellen

Hierzu wurden die Kulturen analog zu den Überlebensplattierungen logarithmisch wachsender Zellen behandelt. Die Kulturen wurden für 2 h mit Wasserstoffperoxid inkubiert.

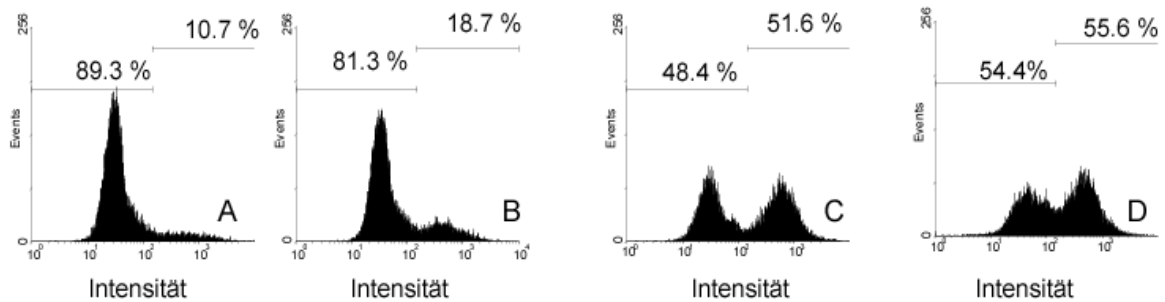


Abb. 13: Caspaseaktivität der logarithmischen Kontrolle (A bzw. B wenn mit 0,4 mM Wasserstoffperoxid für 2 h und der Cdc48^{R609P}-Mutante (C bzw.D wenn mit 0,4 mM Wasserstoffperoxid für 2 h)

Schon die unbehandelte Cdc48^{R609P}-Mutante zeigte eine um das fünffache gesteigerte Caspaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle. Interessanterweise konnte durch Gabe von Wasserstoffperoxid die Caspaseaktivität nur noch leicht auf etwa 55 % gesteigert werden, während es in der Kontrolle fast zu einer Verdoppelung der Caspaseaktivität durch Gabe von Wasserstoffperoxid kam.

3.2.4.2. *in-vivo* Messung der Caspaseaktivität von stationär wachsenden Zellen

Derselbe Effekt konnte bei *in-vivo* Caspaseaktivitätsmessungen von Zellen in der stationären Wachstumsphase beobachtet werden.

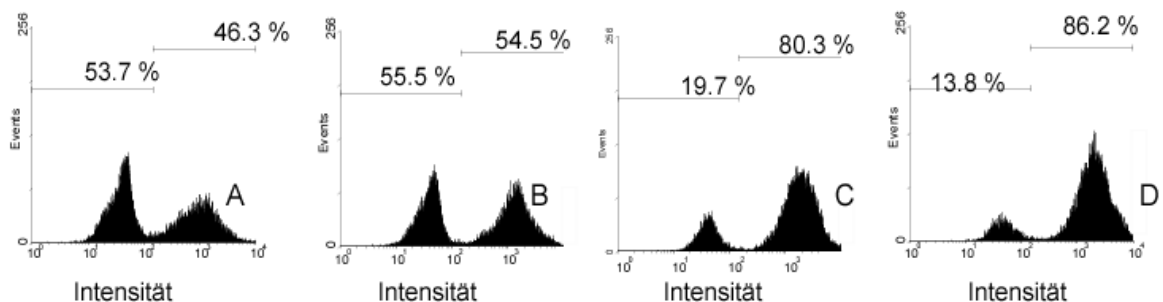


Abb. 14: Caspaseaktivität der stationären Kontrolle (A bzw. B wenn mit 1 mM Wasserstoffperoxid für 3 h und der Cdc48^{R609P}-Mutante (C bzw.D wenn mit 1 mM Wasserstoffperoxid für 3 h)

Die sich in der stationären Wachstumsphase befindende Cdc48^{R609P}-Mutante zeigte eine fast doppelt so starke Caspaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle

(Kontrolle ca. 46 %; Cdc48^{R609P}-Mutante etwa 80 %). Hier allerdings kam es durch die Gabe von Wasserstoffperoxid sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Cdc48^{R609P}-Mutante nur noch zu einer leichten Erhöhung der Caspaseaktivität. In der Kontrolle konnte die Caspaseaktivität auf etwas 55 % gesteigert werden, in der Cdc48^{R609P}-Mutante auf etwa 85 %.

3.2.5. Dihydrorhodamin 123-Färbung zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

Die Ergebnisse aus den Überlebensplattierungen und den FACS-Messungen deuten daraufhin, dass die Cdc48^{R609P}-Mutante keine äußeren Stimuli benötigt, um apoptotisch zu sterben. Aus diesem Grund wurden die Zellen auf reaktive Sauerstoffspezies untersucht. Reaktive Sauerstoffspezies stellen in *Saccharomyces cerevisiae* sowohl einen Schlüsselreiz für die Apoptose als auch einen Marker dar (Madeo *et al.*, 1999). Mit stationären Übernachtskulturen wurden hierzu Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 beimpft und sie nach 24 h Wachstum mit Dihydrorhodamin 123 für 2 h inkubiert.

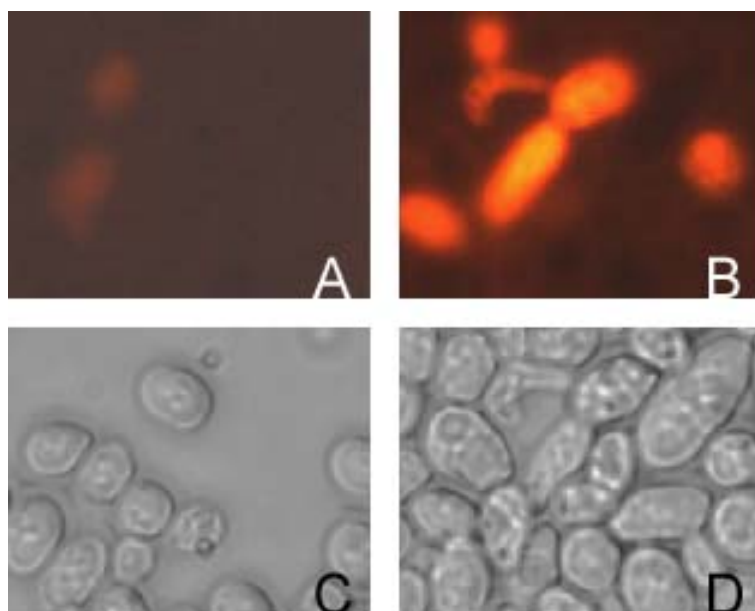


Abb.15: DHR 123-Färbung der stationären Kontrolle (A bzw. C beim Lichtbild) und der Cdc48p^{R609P}-Mutante (B bzw. D beim Lichtbild)

Die Cdc48^{R609P}-Mutante zeigte bei der Dihydrorhodamin 123-Färbung starke Rhodamin-123 Färbung, was daraufhin deutet, dass es hier zu einer

Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies kommt. Die Kontrollzellen wiesen nur eine sehr geringfügige Rhodamin-123 Färbung auf.

3.2.6. Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Calcium auf die Überlebensfähigkeit

Die Mutation der C2-Domäne sollte zu veränderten Bindungseigenschaften gegenüber Calcium führen.

Um dies zu prüfen, wurde ein möglicher Einfluss von Calcium auf die Überlebensfähigkeit der Cdc48^{R609P}-Mutante sowohl in der logarithmischen Wachstumsphase als auch in chronologisch gealterten Kulturen getestet. Des Weiteren sollte eine eventuelle gegenseitige Beeinflussung von Calcium und Wasserstoffperoxid untersucht werden.

3.2.6.1. Überlebensplattierungen in der logarithmischen Wachstumsphase

Hierzu wurden mit stationären Übernachtskulturen Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 beimpft und kultiviert, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,3 besaßen. Die Kulturen wurden dann mit und ohne 1 mM CaCl₂ inkubiert. Um unspezifische Effekte aufgrund zweiwertiger Kationen auszuschließen, wurde den Kontrollkulturen 1 mM MgCl₂ zugesetzt. Nach einstündiger Inkubation wurde Wasserstoffperoxid in der Konzentration von 0,4 mM zugesetzt. Die Kulturen wurden dann für weitere 2 h inkubiert. Im Anschluss wurden Überlebensplattierungen durchgeführt. Hierbei konnte weder ein Einfluss von CaCl₂ oder MgCl₂ auf die Kulturen festgestellt werden, noch eine gegenseitige Beeinflussung von Calcium und Wasserstoffperoxid. Nach diesem erfolglosen Versuch sollte der Einfluss von Calcium auf die Überlebensfähigkeit der Cdc48^{R609P}-Mutante während des chronologischen Alterns getestet werden.

3.2.6.2. Chronologisches Altern

Herker *et al.* konnten zeigen, dass chronologisch gealterte Hefezellen apoptotisch sterben (Herker *et al.*, 2004). Dabei sammeln sich reaktive Sauerstoffspezies an, es kommt zur Caspaseaktivierung und weitere

apoptotische Marker in chronologisch gealterten Hefekulturen können nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, wie sich die $Cdc48^{R609P}$ -Mutante im chronologischen Altern verhält und ob hier ein Einfluss von Calcium-Ionen zu beobachten ist, wurden mit stationären Übernachtkulturen Kulturen auf eine OD_{600} von 0,1 beimpft. Um den Einfluss von Ca^{2+} -Ionen zu untersuchen, wurden die neu beimpften Kulturen mit und ohne 1 mM $CaCl_2$ inkubiert. Auch hier wurde der Kontrolle 1 mM $MgCl_2$ zugesetzt, um unspezifische Effekte aufgrund zweiwertiger Kationen auszuschließen, Die Kulturen wurden dann bis zu Tag 5 inkubiert. Nach 24 h (1. Tag), 72 h (3. Tag) und 120 h (5. Tag) wurde in einer Überlebensplattierungen getestet, wie gut die Hefen in der Lage sind, Kolonien zu bilden.

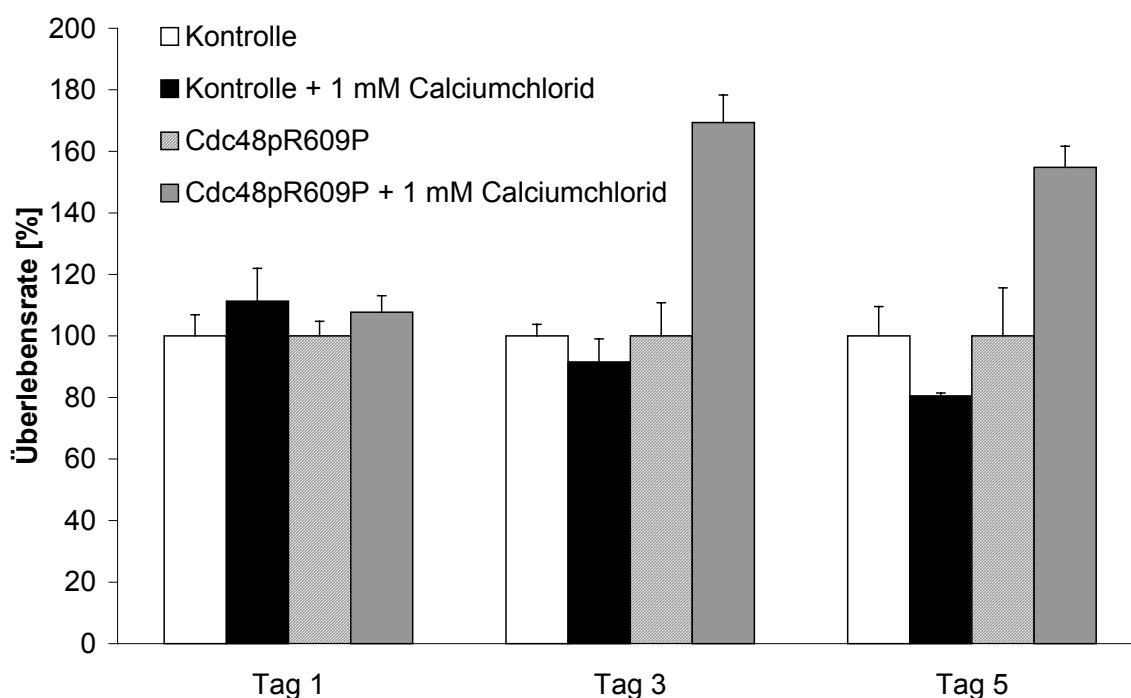


Abb. 16: Überlebensplattierung der chronologisch gealterten Kontrolle und der $Cdc48p^{R609P}$ -Mutante mit 1 mM Calciumchlorid

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Calcium einen negativen Einfluss auf die Kontrolle, die einem Wildtyp entsprach, hat. Im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp überlebten nur 75 % der mit Calcium behandelten Wildtypzellen. Diesen negativen Einfluss von Calcium-Ionen auf die Überlebensfähigkeit von Wildtypzellen konnte auch Eisenberg

nachweisen (Eisenberg, 2004). Er zeigte, dass sich die Überlebensfähigkeit von logarithmisch wachsenden Wildtyphefezellen durch die Zugabe von 10 mM CaCl_2 auf etwa 65 % verringert. Auch ihm diente die Inkubation mit MgCl_2 als Kontrolle. MgCl_2 -Gabe hatte keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit. Ganz anders verhält sich die $\text{Cdc48}^{\text{R609P}}$ -Mutante. Ihre Überlebensrate verbesserte sich durch die Calcium-Gabe im Vergleich zur unbehandelten $\text{Cdc48}^{\text{R609P}}$ -Mutante. Die Gabe von 1 mM Calcium verbesserte die Überlebensrate nach 5 Tagen auf 143 %. Die Gabe von MgCl_2 als Kationen-Kontrolle hatte keinen Einfluss auf das Verhalten der Stämme.

3.2.7. Diskussion

3.2.7.1. Apoptotisches Verhalten der $\text{Cdc48}^{\text{R609P}}$ -Mutante

Die erstmalige Beobachtung apoptotischer Marker in *Saccharomyces cerevisiae* wurden an einer Mutante des Cdc48p (KFY437 $\text{Cdc48p}^{\text{S565G}}$) durchgeführt (Madeo *et al.*, 1997). Cdc48p besitzt also in Hefe eine antiapoptotische Wirkung, die durch Mutationen des *CDC48*-Gens aufgehoben werden kann (Madeo *et al.*, 1997).

In meiner Doktorarbeit konnte ich zeigen, dass eine R609P-Mutation in der zweiten der beiden AAA-Boxen des Cdc48p einen vollständigen apoptotischen Phänotyp induziert, sogar ohne zusätzliche äußere Stimuli.

Die $\text{Cdc48}^{\text{R609P}}$ -Mutante zeigt massive DNA-Fragmentierung in der TUNEL-Färbung und Chromatinkondensation in der DAPI-Färbung. Beides sind wichtige Marker der Hefeapoptose (Madeo *et al.*, 1997). Zusätzlich konnte Deponte mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen das apoptotische Sterben der $\text{Cdc48}^{\text{R609P}}$ -Mutante festigen, da die Mutante starke morphologische Veränderungen der Zelle wie z.B. Zellschrumpfung und eine Art des „Membrane Blebbings“ (Deponte, 2002) zeigt. Diese morphologischen Veränderungen sind typische Charakteristika eines apoptotischen Phänotyps (Kerr *et al.*, 1972)

Aufgrund der Tatsache, dass reaktive Sauerstoffspezies essentiell und ausreichend zur Induktion der Apoptose sind (Madeo *et al.*, 1999), wurden Zellen der $\text{Cdc48}^{\text{R609P}}$ -Mutante auf die Produktion von reaktiven

Sauerstoffspezies mittels Dihydrorhodamin 123-Färbung getestet. Die meisten der stationären Zellen waren Rhodamin positiv, was die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies anzeigte. In der Kontrolle konnte dagegen keine Fluoreszenz beobachtet werden.

Die wichtige Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies in der Regulation apoptotischer Vorgänge bietet einen Erklärungsansatz für die Entstehung und Funktion der Apoptose: reaktive Sauerstoffspezies entstehen in der Atmungskette, durch UV-Strahlen oder durch zahlreiche chemische und enzymatische Reaktionen in der Zelle. Die durch reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufenen Zellschädigungen (Modifizierung von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren) sind daher ein häufiges Ereignis.

3.2.7.2. Caspaseaktivität

Kürzlich konnten Madeo *et al.* nachweisen, dass durch Sauerstoffstress induzierte Apoptose in Hefezellen über die Aktivierung der Hefecaspase Yca1p verläuft (Madeo *et al.*, 2002).

Ich konnte zeigen, dass die exponentiell wachsende, unbehandelte Cdc48^{R609P}-Mutante eine fünffach höhere Caspaseaktivität als die unbehandelte Kontrolle aufweist. Interessanterweise konnte die Caspaseaktivität durch Zugabe von Wasserstoffperoxid als Sauerstoffstress nur noch leicht erhöht werden. Auch die sich in der stationären Wachstumsphase befindliche Cdc48^{R609P}-Mutante wies eine fast doppelt so starke Caspaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle auf.

Diese Ergebnisse deuten stark daraufhin, dass der apoptotische Zelltod der Cdc48^{R609P}-Mutante ebenfalls über eine Aktivierung der Hefecaspase Yca1p verläuft.

Zusammenfassend ist zu beobachten, dass durch die neue Mutation im CDC48-Gen typische apoptotische Marker wie DNA-Fragmentierung und Caspaseaktivität auftreten. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass das Absterben der Cdc48^{R609P}-Mutante apoptotischer Natur ist.

Interessanter Weise zeigte die Cdc48^{R609P}-Mutante sogar ohne Wasserstoffperoxidexposition alle typischen Kennzeichen der Apoptose.

Cdc48p und seine antiapoptotischen Eigenschaften scheinen also zur Aufrechterhaltung einer vitalen Hefezelle nötig zu sein.

3.2.7.3. Einfluss von Calcium auf die Cdc48^{R609P}-Mutante

Hojas konnte in ihrer Diplomarbeit zeigen, dass das mutierte Protein vom ER zu den Mitochondrien transloziert (Hojas, 2003). Normalerweise ist Cdc48p an der Integrität der ER- und Kernmembranen beteiligt. Durch die Delokalisation des Cdc48-Proteins könnte die Integrität der ER-Membran verloren gehen und es so zu einem Ausstrom von Calcium aus dem ER kommen.

Der Second Messenger Ca^{2+} reguliert die Struktur und Funktion vieler Proteine und ist beispielsweise an Fusion, Sekretion, Signaltransduktion und Membranpermeabilität beteiligt (Berridge *et al.*, 1995, Übersichtsartikel). Häufig gehen Apoptoseszenarien mit einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration einher (Scorrano *et al.*, 2003; Orrenius *et al.*, 2003). Jedoch ist nicht allein der Anstieg der Calcium-Konzentration für die Vermittlung apoptotischer Signale verantwortlich, sondern vielmehr die Umverteilung der Calciums zwischen Cytosol, ER und Mitochondrien (Orrenius *et al.*, 2003; Carafoli, 2002, Übersichtsartikel).

Allerdings könnte man auch einfach annehmen, dass Cdc48p aufgrund der Delokalisation nicht mehr in der Lage ist, Fusionsprozesse am ER mitzugestalten. Dies würde dann zu einem defekten ER führen, dass wiederum zu einem gestörten sekretorischen Pathway und damit zum apoptotischen Phänotyp führen würde.

Abgesehen davon ist auch das Verhalten der Wildtyphefzellen und der Cdc48^{R609P}-Mutante während des chronologischen Alterns sehr interessant. Herker *et al.* konnten zeigen, dass chronologisches Altern und Apoptose in Hefe miteinander verknüpft sind: chronologische gealterte Hefezellen sterben apoptotisch (Herker *et al.*, 2004). Es ist auch bekannt, dass die Calciumfreisetzung während des zellulären Alterns in gealterten Fibroblasten vermindert ist (Huang *et al.*, 1998).

Ich konnte nun zeigen, dass die Gabe von $CaCl_2$ zu einem verbesserten Überleben der Cdc48^{R609P}-Mutante führt. Die Gründe hierfür sind unbekannt. Eine Möglichkeit wäre, dass eventuell die Mutation zu einer

verbesserten Calciumbindung führt, wodurch Cdc48p^{R609P} an der ER-Membran lokalisiert bleibt und so der durch Altern induzierter Zelltod verhindert werden kann. Die Calciumgabe beeinflusst allerdings die Überlebensfähigkeit der Cdc48^{R609P}-Mutante während der logarithmischen Phase nicht.

3.3. Charakterisierung neuer Apoptose-Induktoren des menschlichen Genoms

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse aus der Forschungskooperation mit der Firma Xantos Biomedicine dargestellt.

Ein Teil meiner Promotion bestand aus einem Forschungsprojekt, das gemeinsam mit der Firma Xantos Biomedicine durchgeführt wurde. In diesem Projekt sollen Gene identifiziert werden, die in Krebszellen Apoptose auslösen können. Die Ergebnisse sollen in Strategien zur Produktentwicklung neuer Krebsmedikamente einfließen.

Die Firma Xantos Biomedicine hat ein Verfahren entwickelt, um im Bereich der Onkologie therapeutisch und diagnostisch relevante Gene, speziell bei der Induktion von Zelltod in Tumorzellen, zu identifizieren. Durch eine funktionelle Charakterisierung humaner cDNAs in zellulären Hochdurchsatzsystemen können Gene identifiziert werden, welche einer vorher definierten biologischen Funktion und damit auch einer diagnostischen/therapeutischen Anwendung zugeordnet werden können. Die funktionell charakterisierten Gene werden bei Xantos Biomedicine zunächst in nachgeschalteten Systemen beispielsweise ausgewählte Zellsysteme oder mittels bioinformatischer Methoden auf ihre Eignung für eine Produktentwicklung untersucht. Anschließend werden ihre Funktionen und ihre Signaltransduktionswege bei der Induktion des Zelltodes erforscht. Dies geschieht zum einen durch die Firma Xantos Biomedicine zum anderen aber auch durch unser Labor in dem Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*. Dies ist möglich, da *Saccharomyces cerevisiae* einen basalen Apoptoseapparat besitzt, der auch von menschlichen Apoptosegenen aktiviert werden kann (Manon *et al.*, 1997).

In einem gemeinsamen Laborprojekt mit Silvia Engelhardt, Eva Herker, Corinna Maldener, Silke Wissing und mir wurden 67 menschliche Gene untersucht, die von Xantos Biomedicine als interessant eingestuft worden waren, da sie in Säugerzellen in der Lage waren Apoptose zu induzieren. Die Firma Xantos Biomedicine machte dies an typischen apoptotischen Markern wie z.B. DNA-Leiterbildung, Phosphatidylexternalisation usw. fest.

Um sie in unserem Labor weiter zu charakterisieren wurden sie in den Hefeüberexpressionsvektor pYES2 kloniert. Für diese Arbeiten waren Silvia Engelhardt und Eva Herker zuständig. Danach wurden die in unserem Labor üblichen Apoptosetests von mir durchgeführt. Erwiesen sich die Gene als apoptoseauslösend, wurden mit geeigneten Kandidaten Yeast-Two-Hybrid-Assays durchgeführt.

3.3.1. Überblick

Als erstes wurden für die Hefestämme, die die menschlichen Gene in dem Hefeüberexpressionsvektor pYES2 enthielten, ideale Bedingungen (Zeitfenster, Apoptosestimuluskonzentration, usw.) für die in unserem Labor etablierten Apoptosetests ermittelt.

Hierzu wurden mit stationären Übernachtskulturen Kulturen auf eine OD_{600} von 0,1 beimpft und kultiviert, bis sie eine OD_{600} von 0,3-0,6 besaßen. Dann wurde durch einen Medienshift die Expression der menschlichen Gene induziert und Wasserstoffperoxid in den Konzentrationen 0 mM; 0,4 mM; 0,8 mM als Apoptosestimulus zugesetzt. Die Kulturen wurden dann für 18 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h inkubiert. Im Anschluss wurden Überlebensplattierungen durchgeführt.

Bei der Wasserstoffperoxidkonzentration ab 0,8 mM war auch ein Sterben des zur Kontrolle verwendeten Leerplasmids festzustellen, die Konzentration war also zu hoch gewählt. Nach 48 h Inkubation war überhaupt kein Effekt mehr festzustellen. Es ist anzunehmen, dass sich die Kulturen von dem Stress regeneriert hatten. 24 h nach dem Medienshift zeigten sich die vielversprechendsten Werte. Daher wurden alle weiteren Versuche mit einer Inkubation von 24 h und 0,4 mM Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus durchgeführt.

3.3.1.1. Überlebensplattierungen

Um einen ersten Hinweis auf die apoptoseinduzierenden Eigenschaften der 67 Gene zu erhalten, wurden mit den Überexpressionskonstrukten Überlebensplattierungen durchgeführt.

Hierzu wurden mit stationären Übernachtskulturen Kulturen auf eine OD_{600} von 0,1 beimpft und bis eine OD_{600} von 0,3 kultiviert. Dann wurde ein Medienshift durchgeführt und Wasserstoffperoxid in der Konzentrationen von 0,4 mM als Apoptosestimulus zugesetzt. Die Kulturen wurden dann für weitere 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden Überlebensplattierungen durchgeführt. Aus patentrechtlichen Gründen, werden die Gene X1 bis X72 genannt und nur zwei Gene näher charakterisiert.

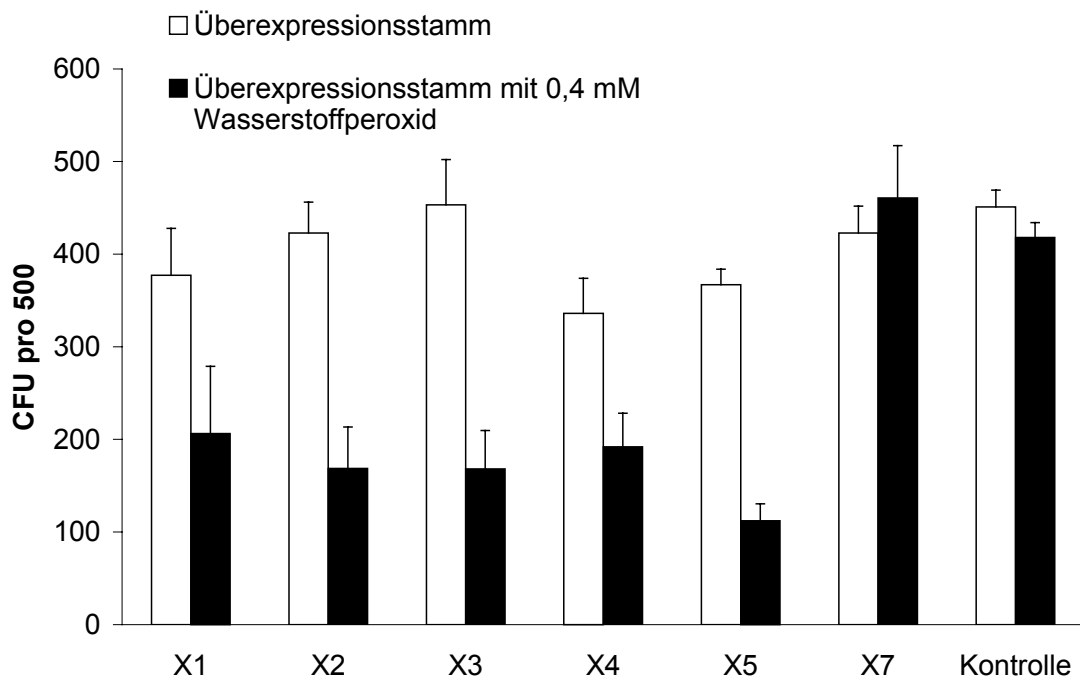


Abb. 17: Überlebensplattierung der Stämme X1 bis X5, X7 und Kontrolle

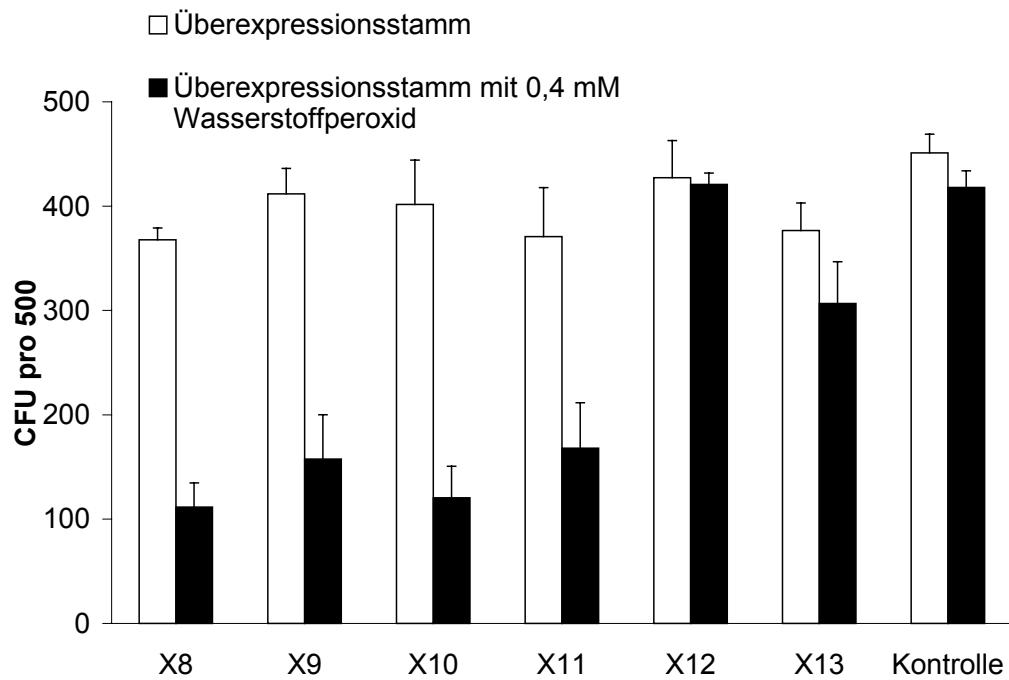


Abb. 18: Überlebensplattierung der Stämme X8 bis X13 und Kontrolle

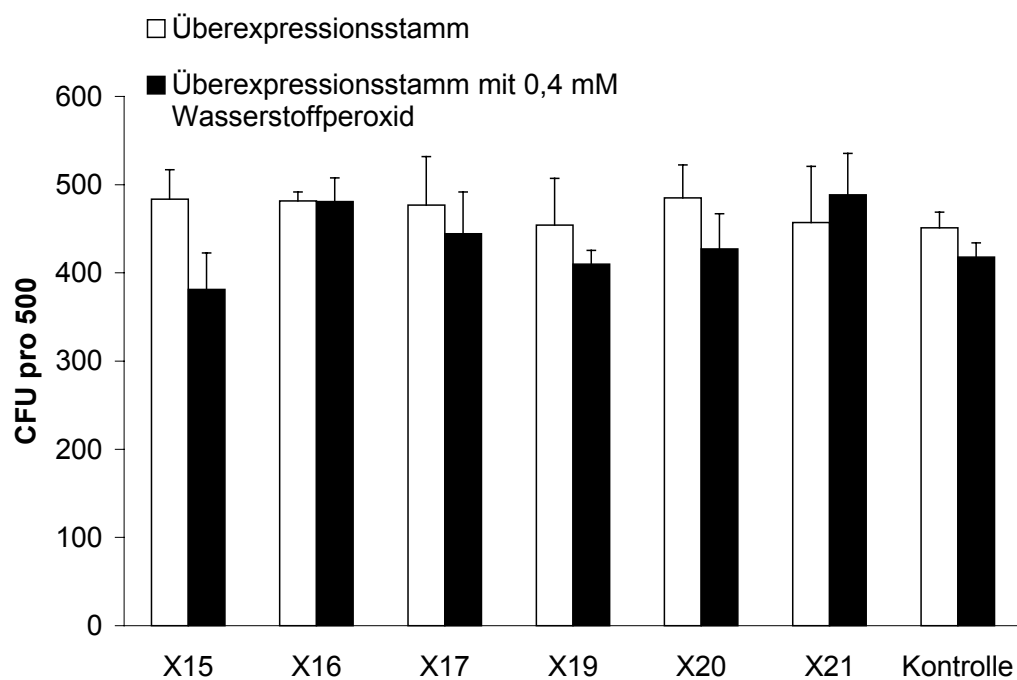


Abb. 19: Überlebensplattierung der Stämme X15 bis X21 und Kontrolle

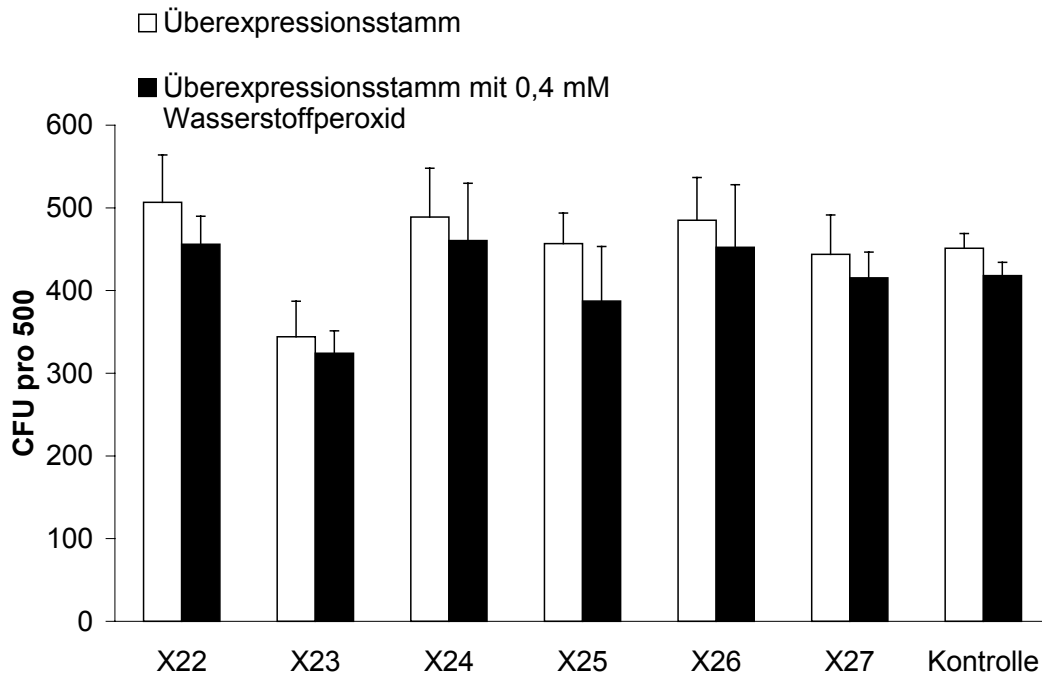


Abb. 20: Überlebensplattierung der Stämme X22bis X27 und Kontrolle

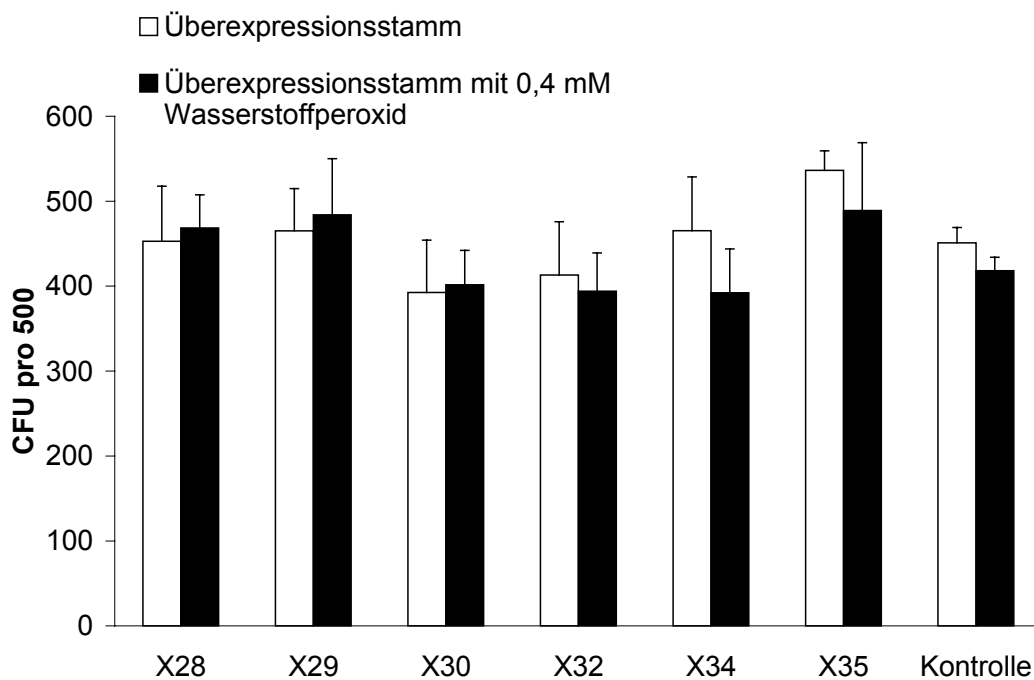


Abb. 21: Überlebensplattierung der Stämme X28, X29, X30, X32, X34, X35 und Kontrolle

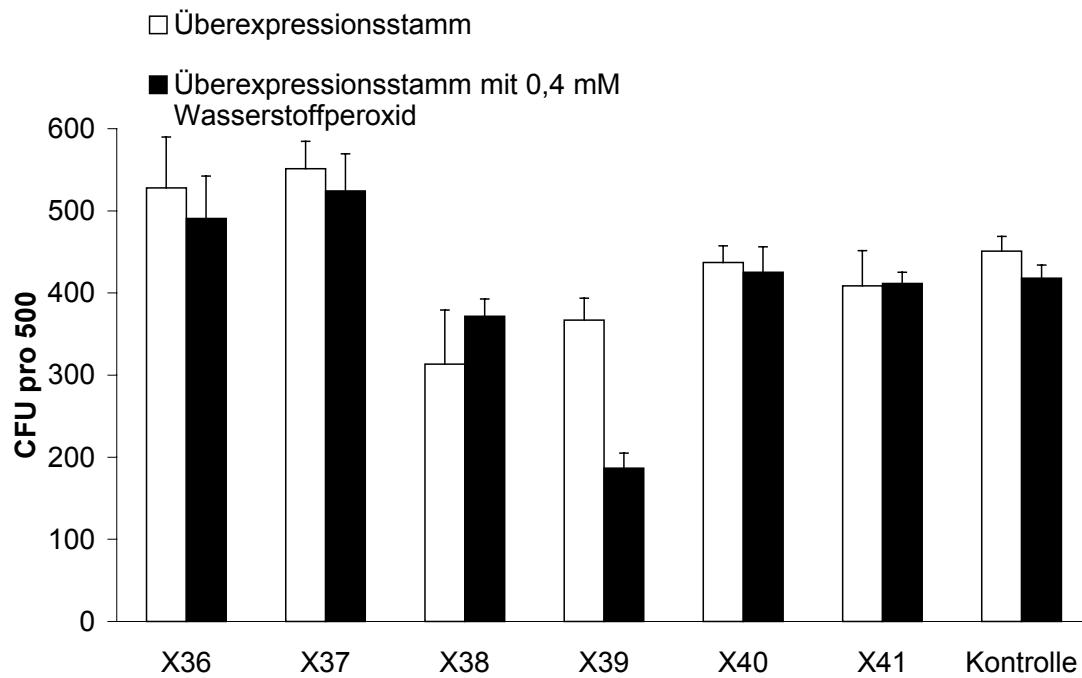


Abb. 22: Überlebensplattierung der Stämme X36 bis 41 und Kontrolle

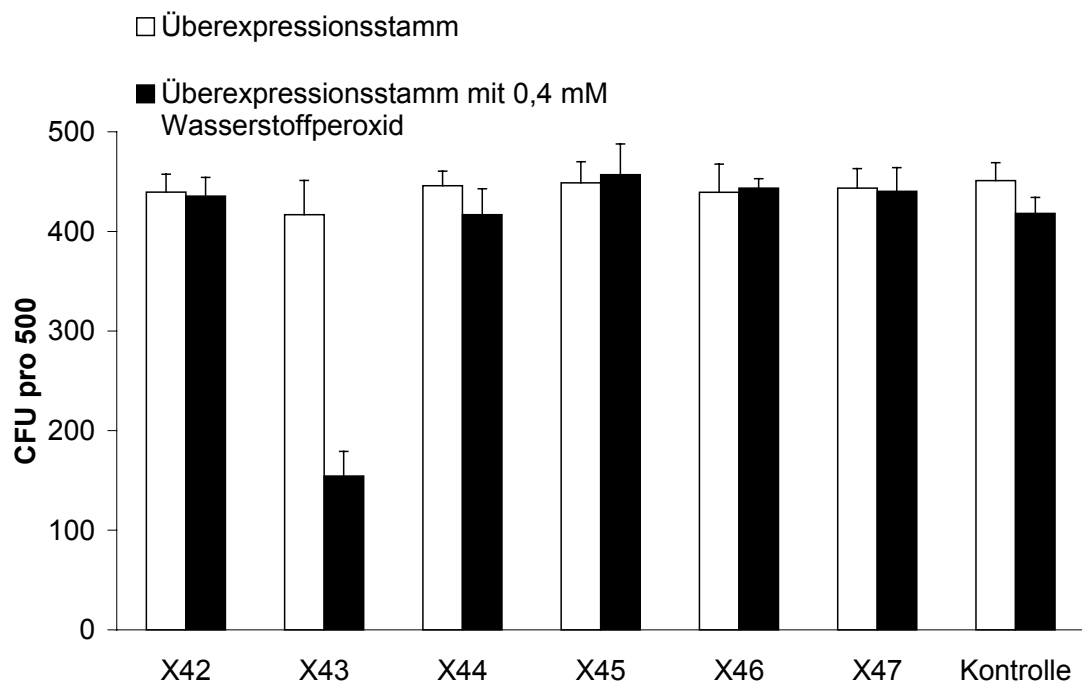


Abb. 23: Überlebensplattierung der Stämme X42 bis 47 und Kontrolle

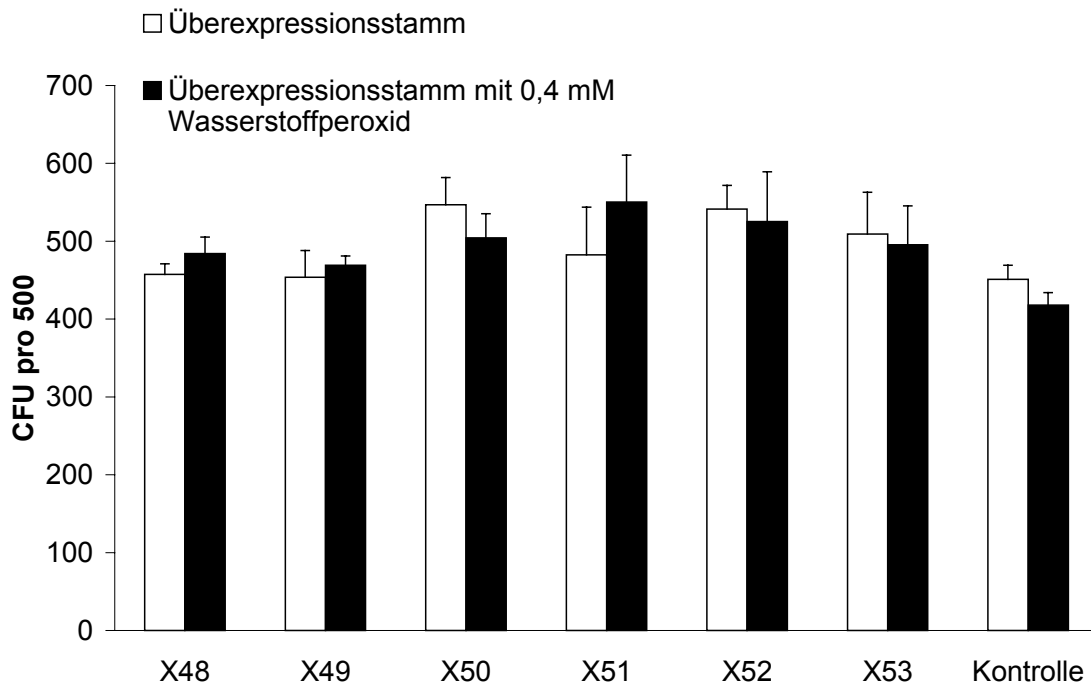


Abb. 24: Überlebensplattierung der Stämme X48 bis 53 und Kontrolle

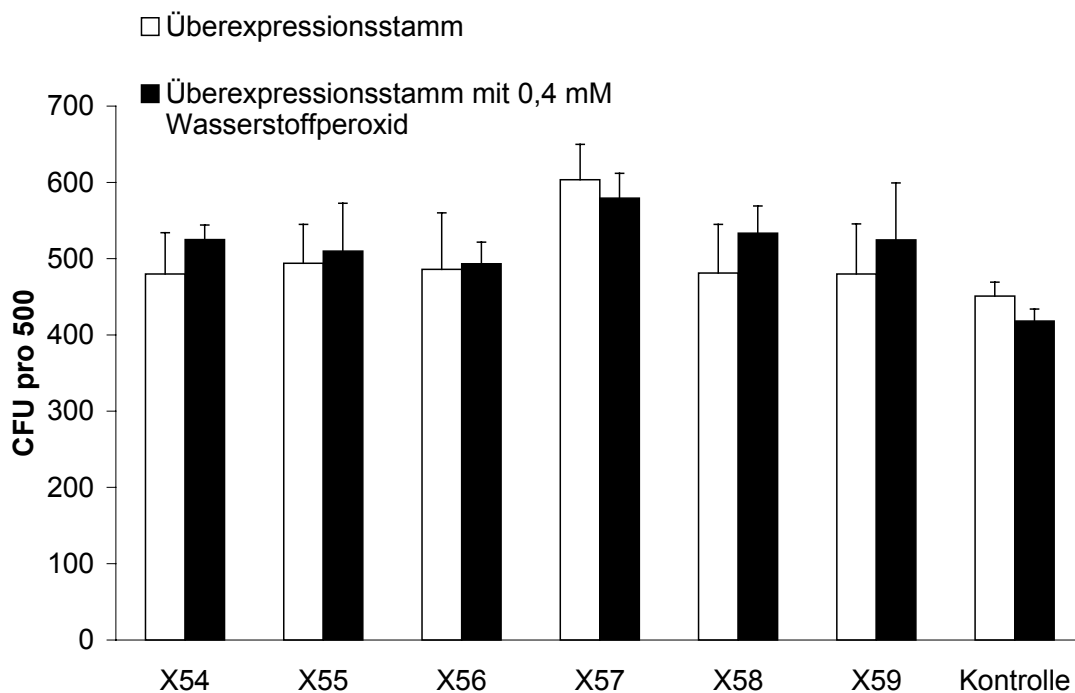


Abb. 25: Überlebensplattierung der Stämme X54 bis 59 und Kontrolle

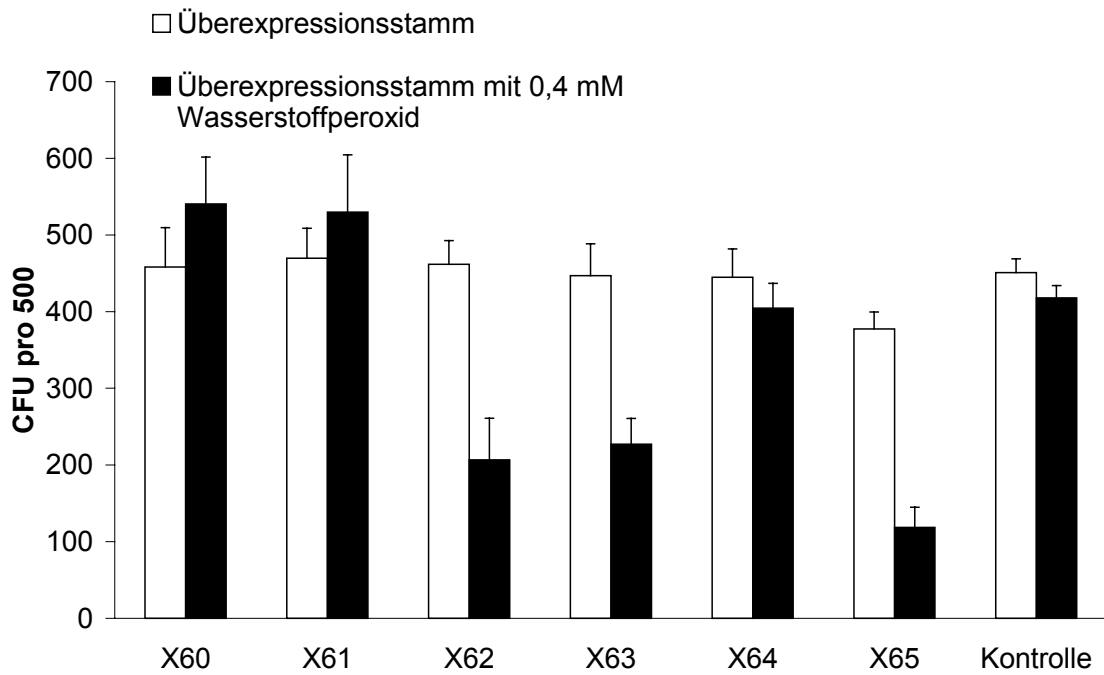


Abb. 26: Überlebensplattierung der Stämme X60 bis 65 und Kontrolle

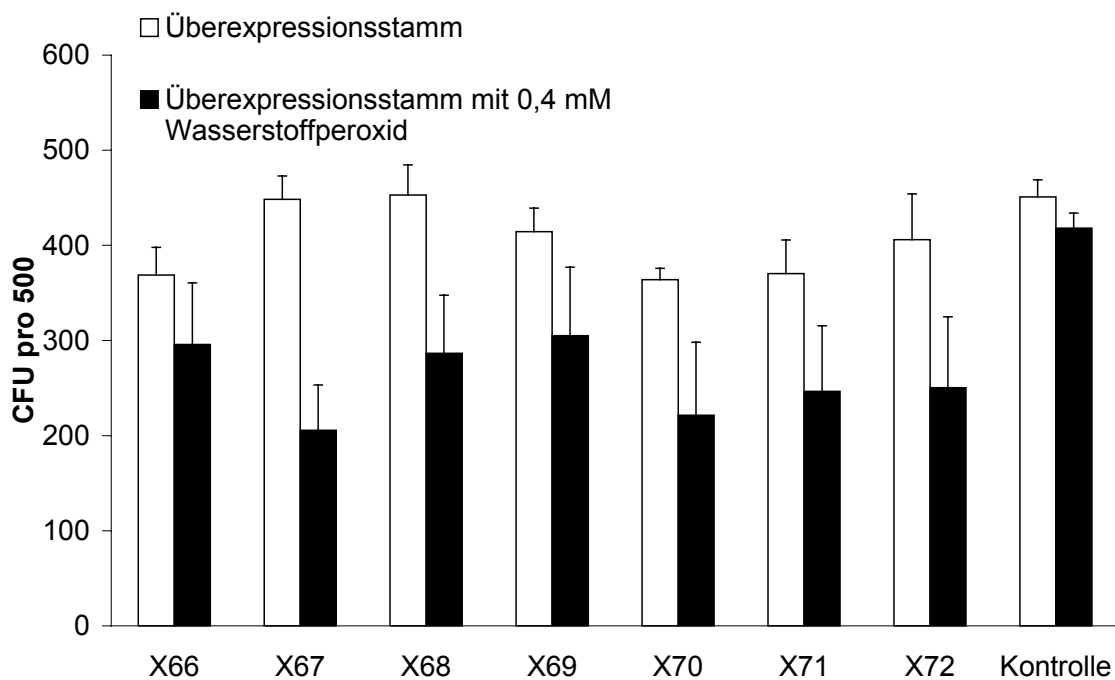


Abb. 27: Überlebensplattierung der Stämme X66 bis 72 und Kontrolle

In den Apoptosetests der 68 Konstrukte fielen 19 menschliche Gene auf, die die Überlebensfähigkeit der Hefezellen stark reduzierten und apoptotische Marker zeigten (X1, X2, X3, X4, X5, X8, X9, X10, X11, X23, X39, X43, X62, X63, X65, X67, X68, X70, X72)

Bei dem Stamm X23 fällt auf, dass unabhängig von Wasserstoffperoxid die Überlebensrate reduziert ist.

In naher Zukunft sollen diese Gene noch näher charakterisiert werden: Bei menschlichen Genen mit kompletten oder partiellen Homologen in Hefe sollen weiterführende Experimente durchgeführt werden: Disruptanten werden auf Ausfallphänotyp und auf Komplementation mit dem Homologen untersucht.

3.3.1.2. Das ribosomale Protein L8

Ribosomen sind aus einer kleinen (40 S) und einer großen (60 S) Untereinheit aufgebaut. Diese Untereinheiten werden durch 4 RNA-Spezies und etwa 80 Proteinen aufgebaut. Das ribosomale Protein L8 ist eine Komponente der 60 S-Untereinheit und gehört zur L2P-Familie der ribosomalen Proteine. Es ist im Cytoplasma lokalisiert und für die strukturelle Integrität der Ribosomen mitverantwortlich (Hanes *et al.*, 1993). In der Ratte ist dieses Gen an die 5,8 S rRNA assoziiert und wahrscheinlich an der Bindung der aminoacyl-tRNA (Chan *et al.*, 1992), also an der Proteinbiosynthese beteiligt. Bis jetzt gibt es noch keine Hinweise darauf, dass es in apoptotischen Vorgängen eine Rolle spielt.

3.3.1.3. Basigin (auch Tumor cell-derived collagenase stimulatory factor)

Das Gen codiert für Basigin, welches zu der Immunoglobulin Superfamilie gehört. Es ist ein stark glycosiliertes Transmembranprotein und spielt in vielen zellulären Prozessen wie beispielsweise Spermatogenese, neuronaler Netzbildung und Tumorprogression eine zentrale Rolle.

Des Weiteren ist es an dem Zelloberflächentargeting der Monocarboxylat-Transporter an die Plasmamembran beteiligt. Auch ist Basigin in inflammatorische Prozesse involviert und als Rezeptor für Cyclophilin A vorgeschlagen (Muramatsu *et al.*, 2003, Übersichtsartikel). Das ist sehr

interessant, da Cyclophilin A nicht nur bei der Apoptose von Säugern sondern, wie wir zeigen konnten, auch bei der Apoptose von Hefen beteiligt ist, indem es mit Aifp (*apoptosis-inducing factor*) interagiert (Cande *et al.*, 2004, Wissing *et al.*, 2004). Weiterhin spielt Basigin höchstwahrscheinlich auch eine Rolle in der HIV-Infektion und triggert in Tumorzellen die Produktion oder auch die Freisetzung der in der Matrix lokalisierten Metalloproteinase in die umgebenden mesenchymalen Zellen und Tumorzellen. Damit wirkt Basigin auch an der Tumorinvasion mit (Muramatsu *et al.*, 2003).

3.3.2. Überlebensplattierungen

Die Überlebensplattierungen wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

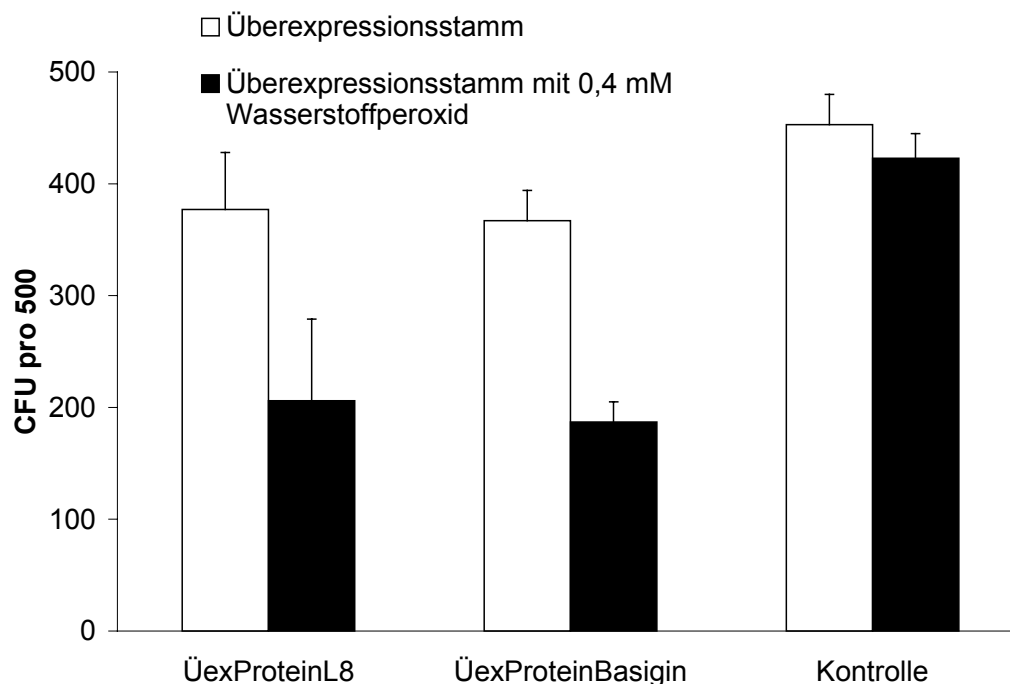


Abb. 28: Überlebensplattierung des Stammes mit dem überexprimierten ribosomalen Protein L8 und des Stammes mit dem überexprimierten Protein Basigin

In den Überlebensplattierungen des Stammes mit dem überexprimierten ribosomalen Protein L8 sank die CFU von etwa 380 durch Belastung mit 0,4 mM Wasserstoffperoxid auf ca. 210. In den Überlebensplattierungen des Stammes mit dem überexprimierten Protein Basigin sank die Überlebensrate von 370 Hefezellen nach Gabe von 0,4 mM Wasserstoffperoxid auf 110. Selbst ohne Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus überlebten beide

Stämme schlechter als die Kontrolle. Die Kontrolle zeigte eine Überlebensrate von 450 Zellen ohne Wasserstoffperoxidbelastung, nach der Belastung mit Wasserstoffperoxid waren noch 420 Zellen in der Lage Kolonien zu bilden.

3.3.3. TUNEL- und DAPI-Färbung

Neben den Überlebensplattierungen der einzelnen Hefestämmen wurden die Kulturen mit Hilfe des TUNEL-Tests auf DNA-Fragmentierung und mittels DAPI-Färbung auf Chromatinkondensation untersucht.

Die Stämme wurden hierzu nach dem selben Protokoll wie zur Überlebensplattierung behandelt.

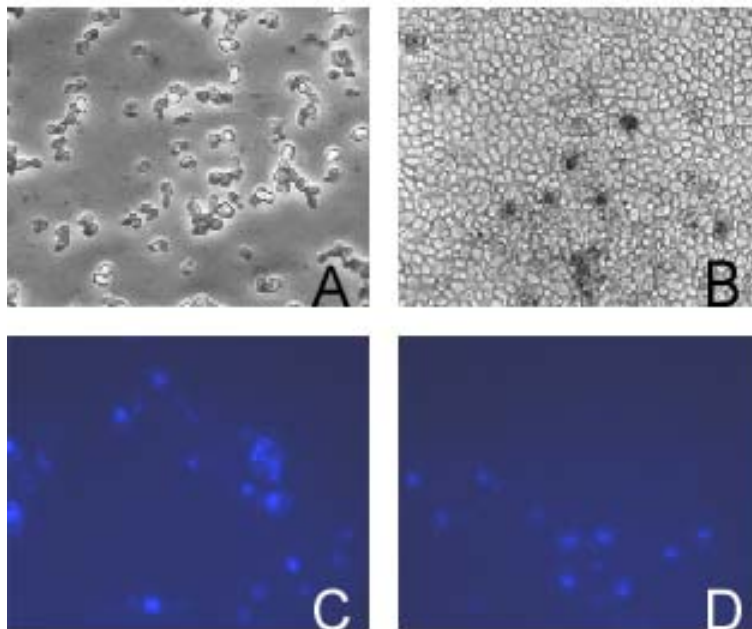


Abb. 29: TUNEL- und DAPI-Färbung des Stammes mit dem überexprimierten Protein Basigin (A und C) und des Stammes mit dem überexprimierten ribosomalen Protein L8 (B und D)

Dabei ergab sich ein Bild, das gut zu den Ergebnissen der Überlebensplattierungen passte.

Sowohl der Stamm mit dem überexprimierten ribosomalen Protein L8 als auch der Stamm mit dem überexprimierten Protein Basigin zeigten nach der Gabe von Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus in der TUNEL-Färbung positive, schwarz gefärbte Kerne, die DNA-Fragmentierung anzeigen. In der DAPI-Färbung zeigte sich Chromatinkondensation. Die Kontrolle verhielt sich bei beiden Färbungen auf apoptotische Marker unauffällig.

3.3.4. *in-vivo* Caspaseaktivitätsmessung

Zusätzlich wurde die Caspaseaktivität *in-vivo* bestimmt. Hierfür wurden Hefezellen mit einem Derivat eines Caspase-Inhibitors (FITC-VAD-fmk) inkubiert.

Es ergaben sich folgende Werte:

Kultur ohne H ₂ O ₂	Caspase-aktivität [%]	Kultur mit H ₂ O ₂	Caspase-aktivität [%]
BYA+ÜexProteinL8	7	BYA+ÜexProteinL8	10
BYA+ÜexProteinBasigin	6	BYA+ÜexProtein Basigin	23
Kontrolle	6	Kontrolle	6

Der Stamm mit dem überexprimierten Protein Basigin verhielt sich in der *in-vivo* Messung der Caspaseaktivität mit FITC-VAD-fmk analog zu den schon durchgeführten Tests: er wies mit Wasserstoffperoxid induzierbare Caspaseaktivität auf: Die Caspaseaktivität erhöhte sich durch die Gabe von Wasserstoffperoxid von 6 % auf 23 %. Allerdings war beim Stamm mit dem überexprimierten ribosomalen Protein L8 nur eine Erhöhung von 7 % auf 10 % zu beobachten. Die Kontrolle verhielt sich unauffällig.

3.3.5. Diskussion

Die apoptotische Wirkung des überexprimierten ribosomalen Proteins L8 könnte vielleicht auf fehlende oder falsche ribosomale Integrität zurückzuführen zu sein. Durch die Überexpression könnte es beispielsweise zu fehlerhaft zusammengesetzten Ribosomen kommen. Dadurch könnten Störungen in der Translation der mRNA entstehen, die zu defekten Proteinen

des Cytosols aber auch des Endoplasmatischen Retikulums führen könnten. So könnte Apoptose induziert werden.

Die apoptotische Wirkung des überexprimierten Proteins Basigin könnte durch seine Rolle, die das Protein bei HIV-Infektionen oder der Tumordinvasion spielt, begründet sein. Vielleicht führt es auch in Hefezellen zu Freisetzung der Metalloproteinasen, die dann ihrer proteinabbauenden Wirkung nachkommen.

Trotz dieser Spekulationen sind die Ursachen der apoptotischen Wirkung der beiden Gene in *Saccharomyces cerevisiae* unbekannt. Vielleicht können sie mit Hilfe von zukünftigen Experimenten geklärt werden.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass Hefe als Modellsystem für die Säugerapoptose sehr gut geeignet ist, da ein beträchtlicher Anteil menschlicher Apoptoseinduktoren auch in der Lage ist Apoptose in Hefezellen auszulösen. Somit sind sehr einfache Möglichkeiten zur Charakterisierung menschlicher Apoptoseinduktoren als auch zur Suche nach Wirkstoffen gegeben.

4. Zusammenfassung

Bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* handelt es sich um einen einzelligen eukaryontischen Organismus, der befähigt zur Apoptose ist, obwohl bei ihm lange Zeit keine Homologen der Exekutoren der Säugerapoptose gefunden werden konnten.

Durch Internetrecherchen konnte gezeigt werden, dass die Caspase Yca1p zwei Interaktionspartner im Bereich der Membranfusionsprozesse besitzt: Kre11p und Sro77p. Des Weiteren führten Breitenbach und Kollegen eine Chipanalyse der apoptotischen Mutante Cdc48p^{S565G} durch. Hierbei fiel das hochregulierte Gen *VAM7* auf, das auch an Membranfusionsprozessen beteiligt ist. Es wurde daher untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen Fusionsprozessen und Apoptose auch in *Saccharomyces cerevisiae* gibt.

Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus kann in den Disruptions-Stämmen dieser Gene keine Apoptose auslösen. Auch benötigt die Hefecaspase Kre11p und Sro77p um einen apoptotischen Phänotyp zu induzieren. Das Disruptieren des *VAM7*-Gens führt allgemein zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Wasserstoffperoxid unabhängig von der Caspase. Durch die Gabe des Fusionshemmers Brefeldin A kann das Auslösen der Apoptose durch den Apoptosestimulus Wasserstoffperoxid etwas unterdrückt werden. Die gewonnenen Ergebnisse sprechen dafür, dass es auch in Hefe einen Zusammenhang zwischen Apoptose und Membranfusionsprozessen gibt.

Ferner wurde die Relevanz des Gens *SRO77* bezüglich der Salzstress induzierten Apoptose untersucht. Sind die Gene der SRO-Familie disruptiert, werden diese Hefen sensitiver gegen Salzstress induzierte Apoptose. Hier gibt es in Bezug auf die Caspaseabhängigkeit Unterschiede in der SRO-Familie: Im Falle des *SRO7*-Disruptionsstammes ist die Apoptose caspaseabhängig, bei Δ *SRO77* hingegen nicht.

Neben den Interaktionspartnern aus dem Bereich der Membranfusionsprozesse wurde noch der Interaktor Yak1p (eine Serin-Threonin Proteinkinase) untersucht. Die hierbei erzielten Ergebnisse deuten

darauf hin, dass Yak1p für die Hefecaspase Yca1p in der durch Wasserstoffperoxid induzierbaren Apoptose essentiell ist.

Neben diesen Genen wurde die Cdc48p^{R609P}-Mutante näher charakterisiert. Diese Mutante aufweist bereits ohne externe Stimuli alle Marker der Apoptose auf. Abgesehen davon führt die durch die Mutation veränderte Calciumbindungsdomäne zu unterschiedlichem Verhalten während des chronologischen Alterns bei gleichzeitiger Calciumgabe: Die Gabe von Calciumchlorid steigert die Überlebensfähigkeit der Cdc48p^{R609P}-Mutante im Vergleich zum Wildtyp.

Weiterhin konnte ich in einer Industriekooperation zeigen, dass 19 von 67 im Bereich der Onkologie relevanten menschlichen Gene, die in Säugerzellen Apoptose induzieren können, in Hefezellen in der Lage sind Apoptose auszulösen. Dies zeigt einmal mehr, dass Hefe als Modellsystem für die Säugerapoptose gut geeignet ist. Allerdings können nicht alle Apoptose induzierenden menschlichen Gene auch in *Saccharomyces cerevisiae* Apoptose auslösen.

5. Literaturverzeichnis

- Afifi, R., Sharf, R., Strichman, R., Kleinberger, T. (2001). Selection of apoptosis-deficient adenovirus E4orf4 mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol.* 75(9):4444-7.
- Berridge, M.J. (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays* 17(6):491-500.
- Beyer, A. (1997). Sequence analysis of the AAA protein family. *Protein Sci.* 6(10):2043-58.
- Bitterman, K.J., Medvedik, O., Sinclair, D.A. (2003). Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 376-99.
- Botstein, D., Chervitz, S.A., Cherry, J.M. (1997). Yeast as a model organism. *Science* 277(5330):1259-60.
- Braun, S., Matuschewski, K., Rape, M., Thoms, S., Jentsch, S. (2002). Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *EMBO J.* 21(4):615-21.
- Broach JR. (1983). Construction of high copy yeast vectors using 2-microns circle sequences. *Methods Enzymol.* 1983;101:307-25.
- Brown, D.G., Sun, X.M., Cohen, G.M. (1993). Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J Biol Chem.* 268(5): 3037-9.
- Brown, J.L., et al. (1993). A mutational analysis of killer toxin resistance in *S.cerevisiae* identifies new genes involved in cell wall (1->6)-beta-glucan synthesis. *Genetics* 133:837-849.
- Brown, S.S. (1997). Myosins in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 9(1):44-8.
- Bussey, H. (1991). K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol Microbiol.* 5(10):2339-43.
- Bussey, H., Boone, C., Zhu, H., Vernet, T., Whiteway, M., Thomas, D.Y. (1990). Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast killer toxin. *Experientia* 46(2):193-200.
- Cain, K., et al. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84: 203–214.

- Candé, C., Vahsen, N., Garrido, C., Kroemer, G. (2004). Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ.* 11, 591-595.
- Candé, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R.T., Giordanetto, F., Garrido, C., Penninger, J.M., Kroemer, G. (2004). AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* 23(8):1514-21.
- Carafoli, E. (2002). Calcium signalling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(3):1115-22.
- Chan, Y.L., Wool, I.G. (1992). The primary structure of rat ribosomal protein L8. *Biochem Biophys Res Commun.* 185(2):539-47.
- Chang, H.Y., Yang, X. (2000). Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 821-846.
- Cherry, J. M., Ball, C., Weng, S., Juvik, G., Schmidt, R., Adler, C., Dunn, B., Dwinght, S., Riles, L., Mortimer, R. K., Botstein, D. (1997). Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 387: 67-73.
- Clarke, P.G.H, Clarke, S. (1995). Historic apoptosis. *Nature* 378: 230.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326:1- 16.
- Confalonieri, F., Duguet, M. (1995). A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *Bioessays* 17(7):639-50.
- Cosulich, S., Horiuchi, H., Zerial, M., Clarke, P., Woodman, P. (1997). Cleavage of Rabaptin-5 blocks endosome fusion during apoptosis. *EMBO* 9(20): 6182-6191.
- Creagh, E.M., Martin, S.J. (2001). Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans.* 29: 696-702.
- De Maria, R., Lenti, L., Malisan, F., d'Agostino, F., Tomassini, B., Rippon, M.R., Testi, R. (1997). Requirement for GD3 ganglioside CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 277:1652-1655.
- Deponte M. (2002). Funktionen und Mechanismus der Membranassoziation von Cdc48p in *S. cerevisiae*. *Diplomarbeit*; Eberhard-Karls-Universität Tübingen

- Deutschbauer, A.M., Williams, R.M., Chu, A.M., Davis, R.W. (2002). Parallel phenotypic analysis of sporulation and postgermination growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24):15530-5.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsedale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrom c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17, 2215-2223.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsedale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrom c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17, 2215-2223.
- Drees, B. L., Sundin, B., Brazeau, E., Caviston, J. P., Chen, G. C., Guo, W., Kozminski, K. G., Lau, M. W., Moskow, J. J., Tong, A., Schenkman, L. R., McKenzie, A. R., Brennwald, P., Longtine, M., Bi, E., Chan, C., Novick, P., Boone, C., Pringle, J. R., Davis, T. N., Drubin, D. G. (2001). A protein interaction map for cell polarity development. *J Cell Biol* 154: 549-571.
- Eisenberg T. (2004). Calcineurin als konservierter Regulator der Apoptose in *S. cerevisiae*. *Diplomarbeit*; Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998). A caspase activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50
- Fabrizio, P., Longo, V.D. (2003). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2: 73-81.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148: 2207–2216.
- Ferri, K.F., Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3:E255-E263.
- Fischer, U., et al. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10: 76–100.

- Fröhlich, K.- U., Fries, H.- W., Peters, J. M., Mecke D. (1995) The ATPase activity of purified CDC48p from *Saccharomyces cerevisiae* shows complex dependence on ATP-, ADP- and NADH-concentration and is completely inhibited by NEM. *Biochem. Biophys. Acta* 1253, 25-32.
- Fröhlich, K.U. (1993). Struktur und Funktion des Zellcyclusproteins CDC48p und verwandter Proteine aus Hefe und Säugern. *Habilitationsschrift* Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Fröhlich, K.U., Fries, H.W., Rudiger, M., Erdmann, R., Botstein, D., Mecke, D. (1991). Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. *J Cell Biol.* 114(3):443-53.
- Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.*; 263(34):18545-52.
- Garrett, S., *et al.* (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* YAK1 gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle. *Mol Cell Biol* 11(8):4045-52.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K.D.A., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D.J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J.H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D.F., Kelly, D.E., Kelly, S.L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D.C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S.L., Revuelta, J.L., Roberts, C.J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D.D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Strathern, J.N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C.Y., Ward, T.R., Wilhelmy, J., Winzeler, E.A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J.D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R.W., Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418(6896):387-91.

- Gietz RD, Woods RA (2001). Genetic transformation of yeast. *BioTechniques* 30, 816-831.
- Green, D.R., Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
- Greenlund, L. J. S., Deckweth, T. L., Johnson, Jr, E. M. (1995). Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14: 303-315.
- Hanes, J., Klaudiny, J., von der Kammer, H., Scheit, K.H. (1993). Characterization by cDNA cloning of the mRNA of human ribosomal protein L8. *Biochem Biophys Res Commun.* 197(3):1223-8.
- Haro, R., Garciadeblas, B., Rodríguez-Navarro, A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett* 291: 189-191.
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Fröhlich, K.-U., Wissing, S., Büttner, S., Fehr, M., Sigrist, S., Madeo, F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 164(4): 501-507.
- Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y.H., Fujikake, N., Matsukage, A., Kakizuka, A. (2002). Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 9(3):264-73.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Millman, C.L., Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251.
- Hojas, N. (2003). Charakterisierung der potentiellen C2-Domäne von Ccd48p mit Hilfe von Fusionsproteinen. *Diplomarbeit*, Universität Graz.
- Huang, M.S., Adebajo, O., Moonga, B.S., Goldstein, S., Lai, F.A., Lipschitz, D.A., Zaidi, M. (1998). Upregulation of functional ryanodine receptors during in vitro aging of human diploid fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 245(1):50-2.
- Huh, G. H., Damsz, B., Matsumoto, T. K., Reddy, M. P., Rus, A. M., Ibeas, J. I., Narasimhan, M. L., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. (2002). Salt

- causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J* 29: 649-659.
- Hunziker, W., Whitney, J. A., Mellman, I. (1992). Brefeldin A and the endocytic pathway. Possible implications for membrane traffic and sorting. *FEBS Lett* 307(1): 93-96.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4569-4574.
- Jacobson, M. D., Weil, M., Raff, M. C. (1997). Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell* 88: 347-354.
- Jaworowski, A., Crowe, S. M. (1999). Does HIV cause depletion of CD4+ T cells in vivo by the induction of apoptosis? *Immunol Cell Biol* 77(1): 90-98.
- Jüschke, C. (2000) Regulation der ER-Assoziation von Cdc48p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*, Universität Tübingen.
- Kagami, M., Toh-e, A., Matsui, Y. (1998). Sro7p, a *Saccharomyces cerevisiae* counterpart of the tumor suppressor I(2)gl protein, is related to myosins in function. *Genetics* 149(4):1717-27.
- Kane, D. J., Sarafinian, T. A., Anton R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Örd, T., Bredesen, D. E. (1993). Bcl-2 inhibition of neuronal death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262: 1274-1277.
- Katsuhara, M. (1997). Apoptosis like cell death in barley roots under salt stress. *Plant Cell Physiol* 38: 1091-1093.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257
- Kudo, T., Katayama, T., Imaizumi, K., Yasuda, Y., Yatera, M., Okochi, M., Tohyama, M., Takeda, M. (2002). The unfolded protein response is involved in the pathology of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 977:349-355.
- Lane, J.D., Lucocq, J., Pryde, J., Barr, F.A., Woodman, P.G., Allan, V.J., Lowe, M. (2002). Caspase-mediated cleavage of the stacking protein

- GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *J Cell Biol* 156:495-509.
- Larsson, K., Böhl, F., Sjöström, I., Akhtar, N., Strand, D., Mechler, B., Grabowski, R., Adler, L. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* SOP1 SOP2 genes, which act in cation homeostasis, can be functionally substituted by the *Drosophila Lethal(2)giant larvae* tumor suppressor gene. *J Biol Chem* 273: 33610-33618.
- Latterich, M., Frohlich, K.U., Schekman, R. (1995). Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell* 82(6):885-93.
- Lauber, K., Bohn, E., Krober, S. M., Xiao, Y. J., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., Xu, Y., Autenrieth, I. B., Schulze-Osthoff, K., Belka, C., Stuhler, G., Wesselborg, S. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113(6): 717-730.
- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Fröhlich, K.U., Breitenbach, M. (2001). Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.* 39, 1166-1173.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., Earnshaw, W.C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371(6495): 346-7.
- Lehman, K., Rossi, G., Adamo, J.E., Brennwald, P. (1999). Yeast homologues of tomosyn and lethal giant larvae function in exocytosis and are associated with the plasma membrane SNARE, Sec9. *J Cell Biol.* 146(1):125-40.
- Leist, M., Jaattela, M. (2001). Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ* 8: 324–326.
- Levine, A., Belenghi, B., Damari-Weisler, H., Grannot, D. (2001). Vesicle-associated membrane protein of *Arabidopsis* suppresses Bax-induced apoptosis in yeast downstream of oxidative burst. *JBC* 276(49): 46284-46289.

- Ligr, M., Madeo, F., Fröhlich, E., Hilt, W., Fröhlich, K.-U., Wolf, D. H. (1998). Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett* 438 (1-2): 61-65
- Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M. T., Barrientos, A., Corte-Real, M. (2002). Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13(8): 2598-25606.
- Ludovico, P., Sousa, M. J., Silva, M. T., Leao, C., Corte-Real, M. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* 47(9): 2409-2415.
- Maag, R.S., Hicks, S.W., Machamer, C.E. (2003). Death from within: apoptosis and the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 456-461.
- Maceyka, M., Machamer, C.E. (1997). Ceramide accumulation uncovers a cycling pathway for the cis-Golgi network marker, infectious bronchitis virus M protein. *J Cell Biol* 1997, 139:1411-1418.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigris, S.J., Wolf, D.H., Fröhlich, K.-U. (1999) Oxygen stress: A regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 139, 729- 734.
- Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S., Fröhlich, K.-U. (2002). Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr Genet* 41(4): 208-216.
- Madeo, F., Fröhlich E., Ligr, M., Grey, M., Sigris, S. J., Wolf, D. H., Fröhlich, K.-U. (1999). Oxygen stress: A regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 145: 757-767.
- 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., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigris, S., Wesselborg, S., Fröhlich, K.-U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9: 911-917

- Madeo, F., Schlauer, J., Zischka, H., Mecke, D., Fröhlich, K.- U. (1998) Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p. *Mol. Biol. Cell* 9, 131- 141.
- Magner JA, Papagiannes E. (1988). Blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in mouse pituitary cells: effects on the biosynthesis of thyrotropin and free alpha-subunits. *Endocrinolog.* 122(3):912-20.
- Malisan, F., Testi, R. (2002). GD3 ganglioside and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585:179-187.
- Mancini, M., Machamer, C.E., Roy, S., Nicholson, D.W., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L.A., Rosen, A. (2000). Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol* 149:603-612.
- 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.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P. M., McGahon, J. A., Rader, van Schie, R. C. A., LaFace, D. M, Green, D. R. (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(5):1545-56.
- Mermall, V., *et al.* (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* 279(5350):527-33.
- Moir, D., Stewart, S. E., Osmond, B. C., Botstein, D. (1982). Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties and pseudoreversion studies. *Genetics* 100(4): 547- 563.
- Misumi Y, Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y (1986) Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem*;261(24):11398-403.
- Monney, L., Otter, I., Olivier, R., Ozer, H.L., Haas, A.L., Omura, S., Borner, C. (1998). Defects in the ubiquitin pathway induce caspase-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *J. Biol Chem* 273, 6121-6131.

- Muramatsu, T., Miyauchi, T. (2003). Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol* 18(3):981-7.
- Nakagawa, T., Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150:887-894.
- Nicholson, D.W., Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 22(8):299-306.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7):552-65.
- Palmer, R. E., Lee, S. B., Wong, J. C., Reynolds, P. A., Zhang, H., Truong, V., Oliner, J. D., Gerald, W. L., Haber, D. A. (2002). Induction of BAI3 by EWS-WT1 chimeric fusion implicates regulated exocytosis in tumorigenesis. *Cancer Cell* 2(6): 427-428.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Paradies, G. (2003). Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrom c from mitochondria. *FASEB J.* 17, 2202-2208.
- Proksch, A.B.C. (2001). Charakterisierung der C2-Domäne von Cdc48p aus *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit* Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Qin, J., Li, L. (2003). Molecular anatomy of the DNA damage and replication checkpoints. *Radiat Res* 159(2):139-48.
- Rao, R.V., et al. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 277: 21836–21842.
- Rizo, J., Südhof, T. C. (1998) C2-domains, Structure and Function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* 273, 15879- 15882.
- Rosen, A., Casciola-Rosen, L. (1999). Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death Differ* 6: 6–12.
- Rothstein, R. (1991). Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol* 194:281-301.

- Rotonda, J., Nicholson, D.W., Fazil, K.M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Ruel, R., Vaillancourt, J.P., Thornberry, N.A., Becker, J.W. (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3, 619-625.
- Sacher, M., Barrowman, J., Schieltz, D., Yates, J.R., Ferro-Novick, S. (2000). Identification and characterization of five new subunits of TRAPP. *Eur J Cell Biol* 79(2):71-80.
- Salvesen, G.S., Dixit, V.M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91(4):443-6.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Edition, Vol.1-3, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Sato, T.K., Darsow, T., Emr, S.D. (1998). Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. *Mol Cell Biol* 18(9):5308-19.
- Schulz, J.B., Bremen, D., Reed, J.C., Lommatzsch, J., Takayama, S., Wullner, U., Loschmann, P.A., 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.
- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* 300(5616):135-9.
- Sesso, A., Fujiwara, D.T., Jaeger, M., Jaeger, R., Li, T.C., Monteiro, M.M., Correa, H., Ferreira, M.A., Schumacher, R.I., Belisario, J. (1999). Structural elements common to mitosis and apoptosis. *Tissue Cell* 31:357-371.
- Severin, F.F., Hyman, A. A. (2002). Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 12, R233-R235.
- Shiozaki, E.N., Shi, Y. (2004). Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci* 29(9): 486-496.

- Shirogane, T., Fukada, T., Muller, J. M. M., Shima, D. T., Massahiko, H., Hirano, T. (1999). Synergistic Roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-Mediated Cell Cycle Progression and Antiapoptosis. *Immunity* 11: 709-719.
- Shub, D. A. (1994). Bacterial viruses. Bacterial altruism? *Curr Biol* 4(6): 555-556
- Skulachev, V. P. (1998). Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* 423: 275-280.
- Slater, A. F. G., Stefan, C., Nobel, I., van den Dobbelsteen, D. J., Orrenius, S. (1995). Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett* 82/83: 149-153.
- Steller, M. A., Delgado, C. H., Zou, Z. (1995). Insulin-like growth factor II mediates epidermal growth factor-induced mitogenesis in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(26): 11970-11974.
- Strand, D., Raska, I., Mechler, B. M. (1994). The Drosophila Lethal(2) giant larvae tumor suppressor protein is a component of the cytoskeleton. *J Cell Biol* 127: 1345-1360.
- Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69: 217-245.
- Struhl K, Stinchcomb DT, Scherer S, Davis RW. (1979). High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(3):1035-9.
- Sutton, R. B., Davletov, B. A., Berghuis, A. M., Südhof, T. C., Sprang, S. R. (1995) Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell* 80, 929-938.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- Tomotsune, D., Shoji, H., Wakamatsu, Y., Kondoh, H., Takahashi, N. (1993). A mouse homologue of the Drosophila tumour-suppressor gene *l(2)gl* controlled by Hox-C8 in vivo. *Nature* 365(6441): 69-72.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G.,

- Yang, M., Johnston, M., Fields, S., Rothberg, J. M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403: 623-627.
- Ungermann, C., Wickner, W. (1998). Vam7p, a vacuolar SNAP-25 homolog, is required for SNARE complex integrity and vacuole docking and fusion. *EMBO J.* 17(12):3269-76.
- Uren, A. G., O'Rourke, K., Aravind, L. A., Pisabarro, M. T., Seshagiri, S., Koonin, E. V., Dixit, V. M. (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 6(4): 961-967.
- Vogt, C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). *Jens und Gassmann, Solothurn*.
- 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.
- Von Ahsen, O., Waterhouse, N.J., Kuwana, T., Newmeyer, D.D., Green, D.R. (2000a). The 'harmless' release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 7, 1192-1199.
- Wadskog, I., Maldener, C., Proksch, A., Madeo, F., Adler, L. (2004). Yeast lacking the SRO7/SOP1-encoded tumor suppressor homologue show increased susceptibility to apoptosis-like cell death on exposure to NaCl stress. *Mol Biol Cell* 15(3): 1436-1444.
- Wieland, J., Nietsche, A. M., Strayle, J., Steiner, H., Rudolph, H. K. (1995). The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J* 14: 3870-3882.
- Wilson, K. P., Black, J. A. F., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., Livingston, D. J. (1994). Structure and Mechanism of ICE. *Nature* 370: 270-274.
- Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., Engelhardt, S.M., Decker, T., Link, A., Proksch, A., Rodrigues, F., Corte-Real, M., Frohlich, K.U.,

- Manns, J., Cande, C., Sigrist, S.J., Kroemer, G., Madeo, F. (2004). An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *Cell Biol.* 166(7):969-74.
- Wu, D., Chen, S., Hu, Y., Nunez, G., Ellis, R. E. (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.
- Yuan, J., Horvitz, H.R. (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, W.J., 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.

Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Privatdozenten:

Allgemeine Biologie	S. Klautke, E. Komor
Anatomie	K. Reutter
Anorganische Biochemie	U. Weser
Anorganische Chemie	H. Alt
Humanphysiologie	J. Ruppertsberg
Mikrobiologie	K. Poralla, W. Wohlleben
Molekularbiologie	J. Voigt
Organische Chemie	G. Spittler
Physik	D. Haarer
Physikalische Biochemie	K. Albert, H. Bauer, W. Voelter, S. Stoeva
Physikalische Chemie	D. Christen, G. Gauglitz, W. Göpel, K. Hoffmann, C. Ziegler
Physiologische Chemie	H. Bisswanger, P. Bohley, K. Eisele, K.-U. Fröhlich, B. Hamprecht, F. Madeo, D. Mecke, H. Probst, F. Schmid, U. Weber, U. Weser
Strahlenschutz	H.-J. Reinecke
Toxikologie	K. Bock, U. Breyer-Pfaff, M. Schwarz, E. Pfaff