

Caspaseabhängige Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae*

## **DISSERTATION**

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2004

vorgelegt von

**Corinna Maldener**

Tag der mündlichen Prüfung:

28.06.2004

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. D. Mecke

2. Berichterstatter:

PD Dr. F. Madeo

Für Bernd  
und meine Eltern



## Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert:

- Wadskog, I., Maldener, C., Madeo, F., Adler, L. (2004). 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.
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K., 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.* 2004 Feb; 164(4):501-7.
- 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. Gen.* 2002 Jul; 41(4):208-16.
- Madeo, F., Herker E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., Fröhlich, K.-U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cel.* 2002 Apr; 9(4):911-7.



## Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. D. Mecke und PD Dr. Frank Madeo am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt. Bei ihnen bedanke ich mich für das Interesse an meiner Doktorarbeit.

Für die angenehme, entspannte Atmosphäre im Labor bedanke ich mich bei PD Dr. Frank Madeo, sowie den anderen Mitgliedern des Arbeitskreises: Sabrina Büttner, Thorsten Decker, Tobias Eisenberg, Silvia Engelhardt, Eva Herker, Nina Lehmann, Alexander Link, Nadja Valtcheva, Silke Wissing, Stefan Picker, Astrid Proksch, Dr. Helmut Jungwirth, darüber hinaus den zahlreichen Hiwis, die mir viel lästige Routinearbeit abgenommen haben.

Sie alle trugen mit ihrer freundschaftlichen Art viel dazu bei, dass mir mein Laboralltag Spaß gemacht hat und standen mir immer hilfsbereit zur Seite.

Bei Eva Herker möchte ich mich für die vielen kleinen EDV-Kniffe bedanken, die mir während meiner Doktorarbeit eine große Hilfe waren.

Mit Astrid Proksch verband mich nicht nur eine besonders enge Zusammenarbeit im Labor; in ihr habe ich sicherlich einen Freundin fürs Leben gefunden...

Für das Knüpfen von wissenschaftlichen Kooperationen bedanke ich mich bei PD Dr. Frank Madeo. Er hat mir dadurch einen Auslandsaufenthalt im Labor von Prof. Dr. Lenart Adler an der Universität Göteborg, Schweden ermöglicht.

Bei der deutschen Forschungsgemeinschaft bedanke ich mich für mein Promotionsstipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs 686/1.

Bei Bernd Schöberl und meiner Familie bedanke ich mich für ihr vorhandenes Verständnis und ihre Unterstützung.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Zelltod.....	1
1.2 Apoptose und ihre physiologische Funktion in Metazoen.....	1
1.3 Morphologische Marker der Apoptose.....	3
1.4 Caspasen als wichtige Regulatoren der Apoptose in Metazoen.....	5
1.5 Apoptose in Hefe und zugehörige apoptotische Marker .....	7
1.6 Selbstmordmechanismen in anderen Einzellern .....	9
1.7 Hefe als Modellorganismus .....	9
1.8 Hefe als Modellorganismus für Apoptose .....	10
1.9 Hefe als Modellorganismus für die Krebsgrundlagenforschung .....	12
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1 Geräte .....	13
2.2 Chemikalien und Kits.....	14
2.3 Verwendete Organismen.....	16
2.3.1 Hefestämme.....	16
2.3.2 <i>E. coli</i> -Stämme.....	17
2.4 Kulturmedien .....	17
2.4.1 Hefe-Vollmedium YEPD/YEPG .....	17
2.4.2 Hefe-Vollmedium YEPD mit NaCl .....	17
2.4.3 Hefe-Minimalmedium SMD/SMG .....	18
2.4.4 LB (Luria + Bertani)-Medium für <i>coli</i> Bakterien .....	18
2.4.5 DME (Dulbecco's Modified Eagle)- Medium für WISH-Zellen.....	18
2.5 Puffer und Lösungen für molokularbiologische Methoden.....	19
2.5.1 Agarosegelelektrophorese .....	19
2.5.2 PCR.....	19
2.5.3 Mutagenese von YCA1 .....	19
2.6 Puffer und Lösungen für Zellbiologische Methoden .....	20
2.6.1 Lösungen zur Bestimmung der Zelldichte einer Hefekultur .....	20
2.6.2 Gewinnung transformationskompetenter Zellen von <i>S. cerevisiae</i> und Transformation mit rekombinanter DNA .....	20
2.6.3 Chromosomales Taggen.....	20
2.6.4 Inhibitor zur Hemmung der Hefecaspase.....	20
2.6.5 TUNEL-Test (In Situ Cell Death Detection Kit, POD) .....	20
2.6.6 Dihydrorhodamin 123-Färbung .....	21

2.6.7 Diaminophenylindol (DAPI)-Färbung .....	21
2.6.8 Dihydrofluorescein Färbung .....	21
2.6.9 Annexin V-Test (Apo Alert Annexin V Apoptosis Kit).....	21
2.6.10 Bestimmung der Caspaseaktivität durch FACS-Messung.....	21
2.7 Puffer und Lösungen für immunologische Methoden .....	22
2.7.1 Rohextraktherstellung .....	22
2.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford .....	22
2.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	23
2.7.4 Ponceau-S-Färbung.....	23
2.7.5 Immunoblot .....	23
2.8 Primer.....	24
2.8.1 Primer für die Mutagenese von YCA1 .....	24
2.8.2 Primer für die Sequenzierung von YCA1.....	24
2.8.3 Primer für chromosomales Taggen von VAM7.....	25
2.8.4 Primer für chromosomales Taggen von SRO77.....	25
2.8.5 Primer für chromosomales Taggen von YAK1 .....	25
2.8.6 Primer für chromosomales Taggen von KRE11 .....	25
2.9 Stammhaltung und Kultivierung.....	26
2.9.1 Flüssigkulturen .....	26
2.9.2 Plattenkulturen .....	26
2.9.3 Dauerkulturen.....	26
2.10 Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	27
2.10.1 Agarosegelelektrophorese .....	27
2.10.2 Abschätzung der DNA-Menge in Agarosegelen.....	27
2.10.3 Ethanol-fällung .....	27
2.10.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	28
2.10.5 Aufreinigung des PCR-Produkts mit dem Cycle Pure Kit von E.Z.N.A. ..	28
2.10.6 Präparatives Gel zum Aufreinigen von DNA .....	28
2.10.7 DNA-Extraktion .....	29
2.11 Molekularbiologische Methoden in <i>Escherichia coli</i> .....	29
2.11.1 Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i> .....	29
2.11.2 Restriktionsverdau .....	29
2.11.3 Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> für eine Elektrotransformation .....	29
2.11.4 Elektrotransformation von <i>E. coli</i> .....	29
2.11.5 Klonierung .....	30
2.11.6 Mutagenese von YCA1 .....	31
2.12 Molekularbiologische Methoden in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
2.12.1 Plasmidisolierung aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
2.12.2 Herstellung transformationskompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen .....	33
2.12.3 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit rekombinanter DNA.....	34
2.12.4 Kolonien-PCR bei <i>S. cerevisiae</i> .....	34
2.13 Zellbiologische Methoden bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	35
2.13.1 Induktion der Expression von Genen, die sich unter einem Galaktosepromotor befinden .....	35
2.13.2 Bestimmung der Zelldichte einer Hefekultur mit dem Zellzähler Casy ..	35

2.13.3 Überlebensplattierung .....	36
2.13.4 Aging-Tests .....	36
2.13.5 Beschichtung von Objektträgern mit Polylysin .....	36
2.13.6 Fixierung von Zellen für den TUNEL-Test .....	37
2.13.7 TUNEL-Test (In Situ Cell Death Detection Kit, POD) .....	37
2.13.8 Annexin V-Test (Apo Alert Annexin V Apoptosis Kit).....	39
2.13.9 Diaminophenylindol (DAPI)-Färbung.....	39
2.13.10 Dihydrorhodamin (DHR) 123-Färbung .....	40
2.13.11 Dihydrofluoresceinfärbung .....	41
2.13.12 Induktion von Apoptose durch Wasserstoffperoxid .....	41
2.13.13 Inhibition der Hefecaspase .....	41
2.13.14 FACS-Messung .....	42
2.14 Zellbiologische Methoden bei WISH-Zellen .....	43
2.14.1 Anzucht von WISH-Zellen .....	43
2.14.2 Fixierung von WISH-Zellen .....	43
2.14.3 TUNEL-Test bei WISH-Zellen .....	43
2.15 Immunologische Methoden .....	44
2.15.1 Gewinnung von Rohextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> .....	44
2.15.2 Proteinbestimmung nach Bradford.....	44
2.15.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	45
2.15.4 Semi-dry Blot.....	46
2.15.5 Ponceau-S-Färbung.....	46
2.15.6 Immunologische Entwicklung .....	47
2.15.7 Detektion durch Chemolumineszenz (ECL) .....	47
2.15.8 Stripping .....	48

### **3 Ergebnisse .....49**

3.1 YCA1 – eine caspaseartige Sequenz im Genom von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	49
3.1.1 YCA1 besitzt caspaseartige Aktivität.....	49
3.1.2 Die Überexpression von YCA1 führt zu Apoptose.....	51
3.1.3 Die Disruption von YCA1 schützt vor Apoptose .....	54
3.1.3.1 YCA1 – eine <i>bona fida</i> Caspase: Diskussion.....	56
3.2 Salzstress kann Apoptose in Hefe auslösen .....	58
3.2.1 Milder NaCl Stress führt zum Tod der SRO7- und SRO7SRO77-Disruptanten .....	58
3.2.2 Nach Salzstress sterben $\Delta$ SRO7 und $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77 apoptotisch .....	59
3.2.3 Die $\Delta$ SRO7 und die $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77 Mutante zeigen Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung nach Salzstress.....	61
3.2.4 Salzstress aktiviert die Hefecaspase YCA1 in einem Überexpressions-Konstrukt .....	63
3.2.5 Die Hefecaspase YCA1 ist in Wildtyphefen notwendig für den Salzstress induzierten Zelltod .....	65

3.2.6	Durch Salzstress ausgelöste Apoptose ist im SRO7-Disruptionsstamm caspaseabhängig.....	67
3.2.7	Salzstress induzierte Apoptose ist in $\Delta$ SRO77 unabhängig von YCA1 ...	70
3.2.8	WISH-Zellen sterben durch Salzstress mit einem apoptotischem Phänotyp .....	74
3.2.9	Salzstress, ein Apoptoseauslöser: Diskussion .....	75
3.2.9.1	Salzstress führt in Säugerzellen zu Apoptose.....	75
3.2.9.2	Salzstress führt bei der $\Delta$ SRO7 Mutanten zu Apoptose .....	75
3.2.9.3	Die Hefecaspase YCA1 vermittelt Salzstress induzierte Apoptose .....	76
3.2.9.4	Funktionen von SRO7 und SRO77 während der Apoptose .....	77
3.2.9.5	Relevanz für die Onkologie.....	78
3.3	Apoptose und Fusion.....	79
3.3.1	YCA1 benötigt die Membranfusionsgene SRO77 und KRE11 sowie die Proteinkinase YAK1, um aktiv sein zu können.....	81
3.3.2	Weder Kre11p, Yak1p noch Vam7p werden durch die Hefecaspase prozessiert .....	85
3.3.3	Für den Verlauf von Apoptose ist eine funktionierende Membranfusionsmaschinerie nötig: Diskussion .....	87
3.4	Apoptose und DNA-Reparatur.....	88
3.4.1	Die Disruption von NHP6A und B führt im chronologischen Altern zu vermehrter Apoptose .....	88
3.4.2	Funktion von NHP6Ap in der exponentiellen Wachstumsphase .....	92
3.4.3	Zusammenhang DNA-Reparatur und Apoptose: Diskussion .....	94

## **4 Zusammenfassung.....95**

## **5 Literatur .....96**

## Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
BFA	Brefeldin A
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CFU	Colony Forming Units (entspricht der Anzahl der lebensfähigen Zellen)
Da	Dalton
DAPI	Diaminophenylindol
DBY	Hefestammsammlung David Botstein
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DIG	Digoxygenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminoacetat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FMY	Hefestammsammlung Frank Madeo
ICE	Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme (=Caspase 1)
KFY	Hefestammsammlung Kai-Uwe Fröhlich
LB	(Luria + Bertani)-Medium
LiAc	Lithiumacetat
MAC-1	Mitglied der AAA-Familie, das CED-4 bindet
OD <sub>600</sub>	Extinktion bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBN	N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitron
PBS	Phosphat gepufferte Saline (Phosphate Buffered Saline)

PFM	Plasmidstammsammlung Frank Madeo
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polyethylenglykol
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rotations per Minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUNEL	Terminale Desoxynucleotidyltransferase Mediated dUTP Nick End Labeling (ein Test auf DNA-Fragmentierung)
VCP	Valosin Containing Protein
WT	Wildtyp
Y	Hefestammsammlung Steve Jackson
YIW	Hefestammsammlung Ingrid Wadskog
zVAD-fmk	z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketon

# 1 Einleitung

## 1.1 Zelltod

Zellen können entweder durch Apoptose oder durch Nekrose sterben.

Bei Nekrose handelt es sich um einen Tod der Zelle, der durch äußere Einflüsse wie beispielsweise mechanische Verletzung, UV-Strahlung oder zu geringe O<sub>2</sub>-Versorgung der Zelle hervorgerufen werden kann. Im Verlauf der Nekrose schwellen die Zellorganellen an und führen dadurch zu einem Platzen der Plasmamembran: der Zellinhalt mitsamt der freigesetzten lysosomalen Enzyme strömt dadurch aus der Zelle und führt im umgebenden Gewebe zu einer Entzündungsreaktion.

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 Signale ausgelöst werden kann. Apoptose ist ein bei Metazoen schon länger bekanntes Phänomen. Dabei wird infolge eines Signals ein aktiver Prozess gestartet, der letztlich zum kontrollierten Selbstmord der Zelle führt. Hierdurch lässt sich die Apoptose deutlich von der Nekrose, dem pathologischen Zustand infolge von Zellschädigungen abgrenzen.

Apoptose wurde erstmals 1972 von Kerr, Wyllie und Currie beschrieben (Kerr *et al.*, 1972). Ihr wurde zunächst allerdings keine allzu große Aufmerksamkeit zuteil. Erst in den letzten 10 Jahren wurde die große Bedeutung der Apoptose in vielen Gebieten des Lebens erkannt.

## 1.2 Apoptose und ihre physiologische Funktion in Metazoen

Durch Apoptose haben mehrzellige Organismen die Möglichkeit sich selbst zu organisieren und zu erhalten, wodurch Apoptose bei vielen Prozessen des Lebens eine Schlüsselrolle inne hat. Im Verlauf des Lebens werden durch Apoptose nicht mehr benötigte oder kranke Zellen des Organismus entfernt. So werden mit Hilfe von Apoptose während der Embryonalentwicklung innere Hohlräume geschaffen. Diese entstehen, indem Zellen aus dem Inneren apoptotisch absterben. Auch werden Schwimmhäute, die bei Säugetieren nur vorübergehend in der Embryogenese auftreten, entfernt (Jacobson *et al.*, 1997). Während der Embryonalentwicklung werden Nervenzellen im Überschuss produziert. Können sie jedoch keinen Kontakt zu benachbarten Neuronen herstellen, gehen sie durch Apoptose zugrunde. Eine

wichtige Rolle spielt Apoptose auch bei der Reifung des Immunsystems, in deren Verlauf autoreaktive Immunzellen apoptotisch eliminiert werden. Des Weiteren besitzt Apoptose auch während der Entwicklung der Keimzellen eine wichtige Funktion: sie entfernt genetisch krankhaft veränderte Keimzellen und verhindert dadurch eine Weitergabe von verändertem Erbmateriale an die Nachkommen. Schließlich ist die Apoptose wohl der wichtigste Mechanismus, der den Organismus vor potentiell gefährlichen, viral infizierten Zellen schützt (Shub, 1994). Allerdings hat das Epstein-Barr-Virus eine Strategie entwickelt, um virusinfizierte Zellen vor Apoptose zu schützen. Das Virus fördert die Synthese des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 und kann dadurch Apoptose verhindern oder zumindest verlangsamen (Pender, 2003).

Angesichts der zentralen Bedeutung der Apoptose ist es nicht verwunderlich, dass ihre Fehlregulation mit einigen Krankheiten assoziiert ist. 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 (Thomson *et al.*, 1995) oder Morbus Parkinson aber auch die erworbene Immunschwäche AIDS (acquired immune deficiency syndrome). Der HI-Virus (human immunodeficiency) befällt T-Lymphozyten des Immunsystems und löst in ihnen Apoptose aus, gleichzeitig sinkt die Anzahl der T-Killerzellen - das Immunsystem bricht zusammen (Jaworowski *et al.*, 1999).

Aber auch Reperfusionsschäden nach Ischämiezuständen (Steller *et al.*, 1995), insbesondere beim Herzinfarkt oder Schlaganfall, fallen in die Kategorie der Krankheiten mit erhöhter Apoptoserate. Die wieder einsetzende Sauerstoffversorgung führt dabei zu einer Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies, die Apoptose auslösen können. Bei den Krankheiten, deren Ursache in einem Mangel an Apoptose liegt, sind neben der schon genannten Virusinfektion vor allem die Autoimmun- und Tumorerkrankungen zu nennen. Selbstreaktive Lymphozyten können nur dann auftreten, wenn ihr apoptotischer Tod während der Reifung des Immunsystems ausblieb.

Obwohl sich zahlreiche wissenschaftliche Publikationen mit dem Thema Apoptose befassen, gibt es noch viele offene Fragen bezüglich der Apoptose und ihrer Regulation. Insbesondere der basale Exekutionsapparat ist nur wenig erforscht.

### 1.3 Morphologische Marker der Apoptose

Apoptose ist ein aktiver und regulierter Prozess, für den Energie und sogar Proteinbiosynthese erforderlich ist. Sie lässt sich vor allem anhand von morphologischen Veränderungen der Zelle, apoptotische Marker genannt, von Nekrose abgrenzen.

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 wird die chromosomale DNA durch spezielle apoptotische Endonukleasen in kleine definierte Bruchstücke fragmentiert. DNA von höheren Eukaryonten ist um Histone gewickelt. Diesen Bereich bezeichnet man als Nukleosom. Zwischen zwei Nukleosomen befindet sich eine Linker-Region, an der aus sterischen Gründen Nukleasen bevorzugt angreifen. Dadurch entsteht bei Agarosegelen von genomischer DNA während der Apoptose eine typische DNA-Leiter mit einem Sprossenabstand von ca. 150 bp.

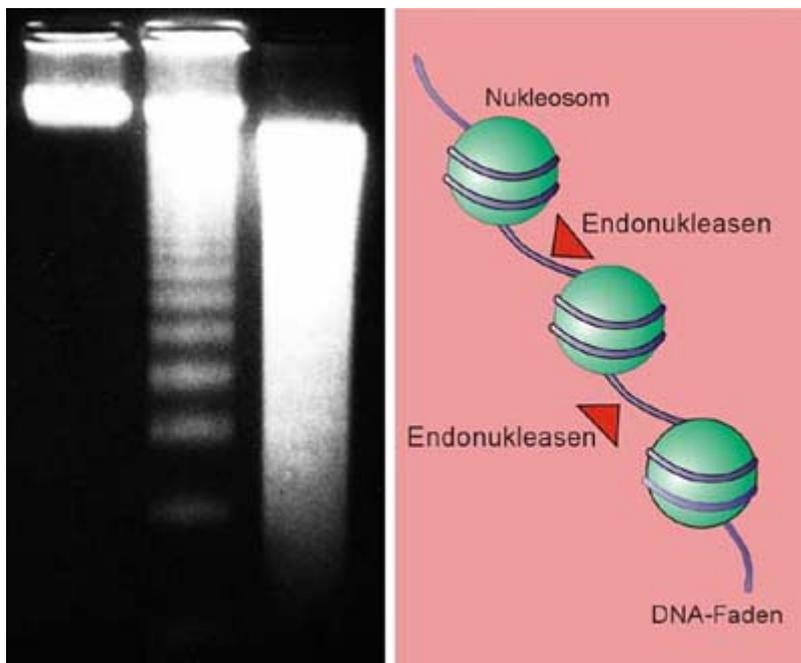


Abb. 1: Die linke Seite zeigt ein Agarosegel mit der, während Apoptose typischen DNA-Leiterbildung. Auf der rechten Seite wird schematisch die räumliche Organisation der DNA dargestellt ([www.ukammann.de](http://www.ukammann.de)).

Weitere apoptotische Marker sind die Chromatinkondensation (Kerr *et al.*, 1972), die Verringerung des Zellvolumens und schließlich die Verpackung des ganzen Zellinhalts in apoptotische Vesikel („apoptotic bodies“), die dann von Makrophagen phagozytiert werden. Dies hat zur Folge, dass der Zellinhalt von apoptotisch sterbenden Zellen, im Gegensatz zu nekrotischen Zellen, nie in das umgebende Gewebe entlassen wird. Entzündungsreaktionen bleiben so aus. Anders als Apoptose ist Nekrose kein regulierter Prozess.

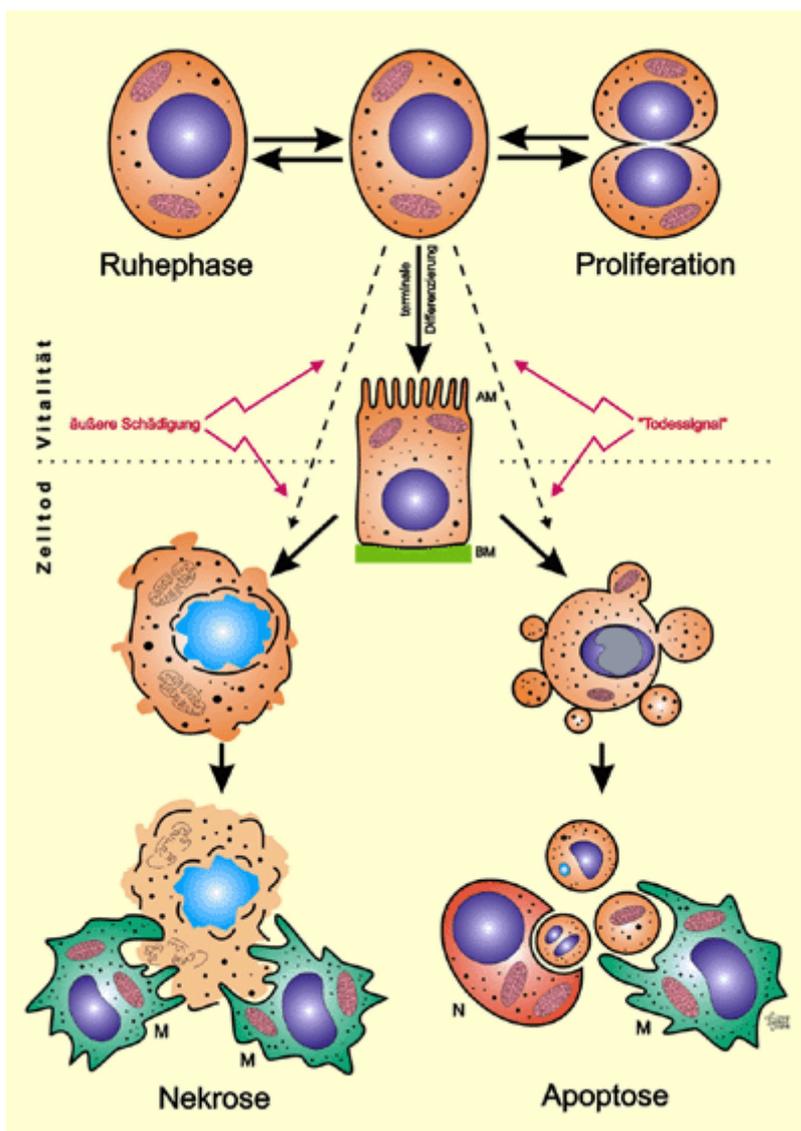


Abb. 2: Auf der linken Seite wird die Morphologie einer nekrotischen Zelle beschrieben, rechts wird dargestellt, wie eine Zelle während der Apoptose schrumpft und apoptotische Vesikel ausbildet, die anschließend von Makrophagen (M) phagozytiert werden ([www.ukammann.de](http://www.ukammann.de)).

Die Externalisierung des Phospholipids Phosphatidylserin auf die äußeren Seite der Zellmembran führt dazu, dass apoptotische Vesikel von phagozytosefähigen Zellen

wie Makrophagen erkannt und beseitigt werden. Auch konnten Lauber *et al.*, kürzlich zeigen, dass ein weiteres Phospholipid Lysophosphatidylcholin an der Markierung von apoptotischen Zellen beteiligt ist (Lauber *et al.*, 2003). Caspase-3 vermittelt die Sekretion von Lysophosphatidylcholin aus einer apoptotisch sterbenden Zelle, wodurch Makrophagen chemotaktisch angezogen werden. Dadurch wird sichergestellt, dass apoptotische Zellen effizient entfernt werden und Entzündungsreaktionen unterbleiben.

#### **1.4 Caspasen als wichtige Regulatoren der Apoptose in Metazoen**

Die Caspasen sind eine Familie von inzwischen vierzehn Mitgliedern. Sie sind an der Signaltransduktion, die zum apoptotischen Zelltod führt, beteiligt. Der Name der Caspasen steht für Cysteinaspasen. Es handelt sich folglich um Cysteinproteasen, die ihre Substrate mit hoher Schnittspezifität nach einem Aspartat-Rest schneiden. Der katalytische Mechanismus der Caspasen entspricht dem einer katalytischen Diade mit einem intermediären Acyl-Enzym-Zwischenprodukt, wobei sich im aktiven Zentrum ein Cystein und ein Histidin befinden.

Typischerweise bestehen die Caspasen (mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa) aus drei Domänen, einer N-terminalen Prodomäne, einer großen p20-Domäne und einer kleinen p10-Domäne. Die Prodomäne wird bei der Aktivierung 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. Aus der Röntgenstruktur von Caspase 1 (Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme, ICE) (Wilson *et al.*, 1994) ist bekannt, dass die aktive Caspase als Homodimer aus zwei p10-p20-Komplexen vorliegt.

Zur Caspaseaktivierung führen zwei verschiedene Wege: ein Ligand bindet an einem Todesrezeptor, oder aber rezeptorunabhängig über die Ausschleusung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium. Der externe Weg der Caspaseaktivierung beginnt mit der Bindung des entsprechenden Liganden an den Fas- bzw. den TNF-Rezeptor. Nach Ligandenbindung oligomerisieren die Rezeptoren und führen über ihre cytosolischen Domänen unter Beteiligung weiterer Adaptorproteine zur Aktivierung der Caspasen 8 und 10 beim Fas-Weg bzw. Caspasen 8 und 2 im Fall des TNF-Signalwegs. Dabei werden die Caspasen an die Zellmembran rekrutiert. Die Bindung zwischen den verschiedenen Adapterproteinen erfolgt über homotypische Interaktionen zwischen sogenannten Death Domains (DD) und Death Effector

Domains (DED). Letztere sind auch in der Caspase 8 und der Caspase 10 vorhanden. Nachdem die Initiatorcaspase aktiviert wurde, folgt eine proteolytische Kaskade, in der nacheinander weitere Caspasen aktiviert werden. Zum Teil läuft die Aktivierung auch autokatalytisch ab. Dabei gibt es Verzweigungen und Rückkoppelungen bei der Aktivierungskaskade, so dass ein komplexes Netzwerk entsteht (Cohen *et al.*, 1997).

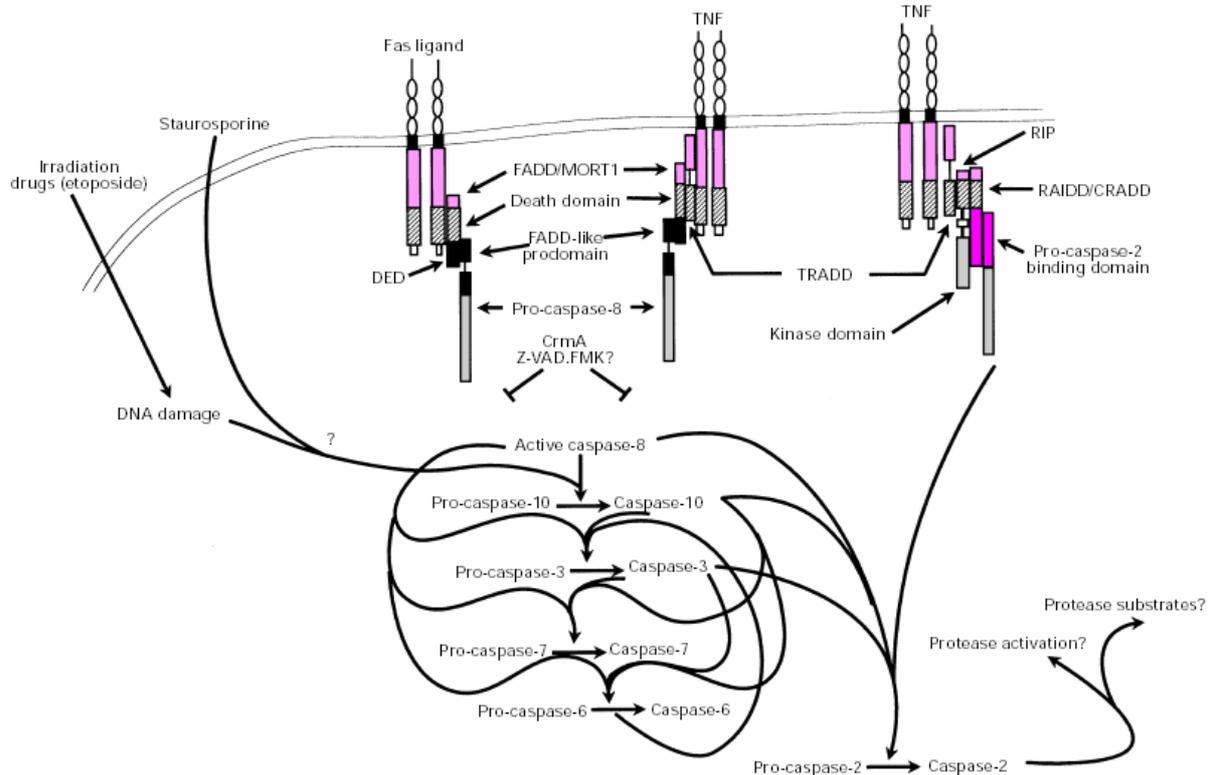


Abb. 3: Die Abbildung von Cohen (1997) gibt einen Überblick über die Aktivierungskaskade der Caspasen.

Bei der rezeptorunabhängigen Caspaseaktivierung wird Cytochrom c aus den Mitochondrien ausgeschleust, worauf Procaspase 9 in Zusammenarbeit mit Apaf 1 gespalten und so das Caspase-Netzwerk aktiviert wird.

Am Ende beider Wege führen die Caspasen zur Spaltung definierter Caspase-Substrate: die Exekution der Apoptose wird eingeleitet. Es werden beispielsweise Proteine des Cytoskeletts und Adhäsionsmoleküle angegriffen, damit die Zelle schnellstmöglich abgebaut werden kann.

## 1.5 Apoptose in Hefe und zugehörige apoptotische Marker

Während der Sinn der Apoptose für vielzellige Organismen offensichtlich ist, ist es bei einem Einzeller nicht ohne weiteres zu erkennen, welchen evolutionären Vorteil er von einem Programm haben sollte, an dessen Ende sein eigener Tod steht. Um so erstaunlicher war es, als 1997 an der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* erstmals apoptotische Marker bei einem Einzeller entdeckt wurden (Madeo *et al.*, 1997; Fröhlich und Madeo, 2000).

So wurde eine Zellzyklusmutante (KFY437 *cdc48*<sup>S565G</sup>) beschrieben, die DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation und Phosphatidylserinexternalisation, also die wichtigsten apoptotischen Marker von Mehrzellern, zeigte. DNA-Leiterbildung, die bei der Gelelektrophorese von apoptotischer Säuger-DNA auftritt, konnte nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt dies an der Beschaffenheit der Linker-DNA von Hefe (Lowary *et al.*, 1989), die zu kurz sein könnte, um der bevorzugte Ort der DNA-Fragmentierung zu sein. Nukleasen greifen die Hefe-DNA folglich nicht nur zwischen den Nukleosomen an, wodurch dann zufällig lange DNA-Fragmente entstehen.

Die Suche nach apoptoserelevanten Genen in *Saccharomyces cerevisiae* aufgrund von Homologien zu bekannten apoptoserelevanten Genen in Metazoen verlief allerdings zunächst ohne Erfolg. 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.

Wenig später wurde jedoch der erste Regulator der Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (Madeo *et al.*, 1999). So zeigten alle Mutanten mit konstitutiv apoptotischem Phänotyp verstärkt Sauerstoffstress. Dazu gehörten die oben genannte Zellzyklusmutante und eine Mutante im Glutathionstoffwechsel (YPH98gsh1). Weiterhin ließ sich durch Zugabe von Wasserstoffperoxid zum Medium der apoptotische Phänotyp auch in Wildtypstämmen induzieren. 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. Durch die Radikalfänger PBN oder TMPO konnte die apoptotische *cdc48*<sup>S565G</sup>-Mutante hingegen vor dem programmierten Zelltod gerettet werden. Auch wenn diese Mutante unter Hypoxie gesetzt wurde, überlebte sie deutlich besser (Madeo *et al.*, 1999). Sauerstoffradikale

spielen also auch bei der Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae* eine wichtige Rolle. In Säugern können reaktive Sauerstoffspezies an mehreren Stellen in die apoptotische Regulation eingreifen. Sie können am Anfang der Signalkette das apoptotische Programm auslösen (Hockenberry *et al.*, 1993; Kane *et al.*, 1993; Greenlund *et al.*, 1995; Slater *et al.*, 1995), oder aber auch downstream in der Signalkaskade unterhalb von Bax und den Caspasen wirken (Schulz *et al.*, 1997). Schließlich können reaktive Sauerstoffspezies die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien bewirken, was zusammen mit Apaf-1 zur Caspase-Aktivierung führt (Skulachev, 1998). Neben Sauerstoffstress konnten in der Zwischenzeit weitere Stimuli der Hefeapoptose beschrieben werden. 1998 konnten Ligre und Kollegen zeigen, dass die Überexpression von Säuger-Bax in der Bäckerhefe zu einem apoptotischen Zelltod führt (Ligre *et al.*, 1998). Drei Jahre später wurde mit Essigsäure ein weiterer Apoptosestimulus beschrieben (Ludevico *et al.*, 2001) und im Folgejahr wurden Kochsalz (Huh *et al.*, 2002) und das Pheromon  $\alpha$ -Faktor als Apoptoseauslöser veröffentlicht (Severin und Hyman, 2002).

Abgesehen davon konnte auch beim Hungern von Hefen unter Stickstoffmangel-Bedingungen ein apoptotischer Phänotyp beobachtet werden (Madeo *et al.*, 2002). Werden diese hungernden Hefezellen allerdings geerntet und in destilliertes Wasser überführt, hat dies einen protektiven Effekt auf die Hefezellen und sie überleben. Bei Nährstoffknappheit, wie sie in der Natur für Hefen beispielsweise im Spätherbst auftritt, töten sich die älteren Zellen des genetisch gleichen Hefeklons durch Apoptose, um die begrenzten Nährstoffressourcen den jüngeren Vertretern zu überlassen, bei denen die Überlebenschancen dadurch steigen. Wenn die hungernden Hefen andererseits durch Regen weggespült werden (das entspricht dem Umsetzen auf destilliertes Wasser), macht ein altruistischer Selbstmord für eine alte Hefezelle keinen Sinn mehr und sie überlebt auch hier.

Wir konnten zeigen, dass replikativ gealterte Hefezellen apoptotisch sterben (Herker *et al.*, 2004). Damit ist Hefeapoptose folglich ein physiologisches Phänomen, das nicht nur bei exotischen Mutanten vorkommt, sondern durch Hungerbedingungen ausgelöst werden kann und am Lebensende jeder einzelnen Hefezelle seinen unwiderruflichen Platz einnimmt.

## 1.6 Selbstmordmechanismen in anderen Einzellern

*Saccharomyces cerevisiae* ist nicht der einzige einzellige Organismus, bei dem ein programmierter Zelltod nachgewiesen werden konnte. Bei Enterobakterien wie *E. coli*, die durch Phagen befallen waren, konnte ein altruistischer Selbstmord der virusinfizierten Bakterienzellen beobachtet werden (Shub *et al.*, 1994), um ein Ausbreiten der Infektion auf benachbarte Zellen des selben Klons zu verhindern. Und auch bei *Trypanosoma cruzi* und *T. rhodesiense* konnten als Reaktion auf äußere Einflüsse Vakuolisierung, DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation ausgelöst werden (O'Brien *et al.*, 1997).

## 1.7 Hefe als Modellorganismus

Hefe ist ein einzelliger Eukaryont, der sich durch Zellteilung vermehrt. Hefe eignet sich besonders gut als Modellorganismus, weil er die einfache Handhabung eines leicht zu kultivierenden Mikroorganismus besitzt, andererseits aber viele zelluläre Mechanismen von höheren Organismen zeigt. Die Bäckerhefe lässt sich sehr leicht und schnell kultivieren. Ihre Generationszeit beträgt nur ca. 90 min im Vollmedium mit Glucose. Sie ist ungiftig und Kontaminationen sind, aufgrund des Alkoholgehaltes, des sauren pH-Wertes des Mediums und des schnellen Wachstums, selten. Auch lassen sich Hefen bei -80°C problemlos über Jahre lagern. Ein weiterer enormer Vorteil der Hefe ist, dass ihr Genom seit mehreren Jahren vollständig sequenziert (Cherry *et al.*, 1997) und der Allgemeinheit zugänglich ist, wodurch die Suche in Datenbanken sehr schnell Informationen liefert; das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* war das erste vollständig sequenzierte Genom eines Eukaryonten. *Saccharomyces cerevisiae* besitzt 6000 Gene, die sich auf 16 Chromosomen verteilen. Bäckerhefe kann sowohl diploid, als auch haploid auftreten. Mutationen können in der haploide Form sehr leicht eingeführt werden, weil bei ihr nur eine Kopie des Gens mutiert werden muss, um eine Veränderung des Phänotyps zu erzeugen.

Auch tritt in *S. cerevisiae* die sogenannte homologe Rekombination auf (Rothstein, 1991) die es möglich macht, Genomabschnitte der Bäckerhefe spezifisch gegen Fremd-DNA auszutauschen. Auf diese Weise ist es einerseits möglich, definierte Gene zu disruptieren und dadurch auszuschalten, andererseits aber auch beliebige Gene gezielt ins Genom zu integrieren. Schließlich sind für Hefen viele genetische Methoden etabliert und es existieren geeignete Expressionsvektoren, die in

unterschiedlichen Kopienzahlen extrachromosomal vermehrt werden können. Dadurch wird es möglich, Säugergene gezielt in der Bäckerhefe zu exprimieren.

## 1.8 Hefe als Modellorganismus für Apoptose

Aufgrund der Erkenntnis, dass *Saccharomyces cerevisiae* genauso wie metazoische Organismen einen apoptotischen Zelltod sterben kann und dass dieser Zelltod auch unter physiologischen Bedingungen auftritt, ist es naheliegend, die Bäckerhefe – wie auf vielen anderen Gebieten erfolgreich erprobt – auch bei der Apoptose als Modellsystem für Säuger heranzuziehen.

Um Hefe als Modellorganismus für die Säugerapoptose einsetzen zu können, muss sichergestellt sein, dass die Apoptose in beiden Systemen tatsächlich ähnlich funktioniert. Bei Hefe konnten aber in der Vergangenheit 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. Erst 2002 konnten wir die Hefecaspase YCA1 etablieren (Madeo *et al.*, 2002). Aber schon in den Jahren davor gab es Anzeichen, die dafür sprachen, dass Hefe- und Säugerapoptose ähnlich ablaufen. So führte die Expression von Säuger-Bax, einem apoptoseauslösendem Faktor, in *Saccharomyces cerevisiae* zu einem apoptotischen Phänotyp, der durch die gleichzeitige Überexpression des Gegenspielers Bcl-X<sub>L</sub> unterdrückt werden konnte (Ligr *et al.*, 1998). Auch in Säugern besitzen diese beiden Apoptoseregulatoren dieselbe antagonistische Wirkung: Bax ist eine apoptoseauslösender Faktor und Bcl-X<sub>L</sub> wirkt antiapoptotisch. 2001 konnten Pavlov und Kollegen einen Kanal in der Mitochondrienmembran von Hefen beschreiben, der sich Bax abhängig öffnet (Pavlov *et al.*, 2001). Durch diesen Kanal könnte die Externalisierung von Cytochrom c, ähnlich der Apoptose von Säugern, vonstatten gehen (Manon *et al.*, 1997).

Die Hemmung der mitochondrialen F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase durch Oligomycin führte sowohl bei Hefe als auch bei Säugern zu einer Verhinderung der Apoptose (Matsuyama *et al.*, 1998), folglich scheint auch für die Exekution der Hefeapoptose ATP erforderlich zu sein. So war es selbst durch die Expression von Bax in einer Hefezelle mit einer defekten mitochondrialen F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase nicht mehr möglich, Apoptose zu induzieren (Xu *et al.*, 1998).

Darüber hinaus tritt auch in der Spaltheefe *Saccharomyces pombe* Apoptose auf. So führte die Expression des Säugergens p53 zum Tod (Bischoff *et al.*, 1992; Nigro *et al.*, 1992). Weiterhin war die Expression von Ced-4 und Bak in *Saccharomyces pombe* ebenfalls letal und mit einem apoptotischen Phänotyp assoziiert (Ink *et al.*, 1997; James *et al.*, 1997). Auch konnte mit dem Protein SpRad9 in Spaltheefe erstmals ein potentieller Hefekandidat der Bcl-2 Familie beschrieben werden (Komatsu *et al.*, 2000).

Wie gut das Hefe-Modellsystem tatsächlich für die Untersuchung von Apoptose geeignet ist, zeigt die Beschreibung von VCP (Valosisin Containing Protein), des Säugerhomologen von CDC48, als antiapoptotischem Faktor (Shirogane *et al.*, 1999). VCP ist damit das erste Säugerprotein, das in das apoptotische Geschehen involviert ist und dessen Funktion als antiapoptotischer Faktor zuerst am Hefe-Homologen CDC48 erkannt wurde. Doch nicht nur bei Säugern, sondern auch bei *Caenorhabditis elegans* wurde ein apoptoserelevantes CDC48-Orthologes entdeckt (Wu *et al.*, 1999). Es handelt sich hierbei um MAC-1 (Mitglied der AAA-Familie, das CED-4 bindet). MAC-1 bindet in Gegenwart von CED-4 an die Apoptoseauslöser CED-3 und CED-9 und bildet einen Multiproteinkomplex aus – Apoptose unterbleibt dadurch. Die Expression von MAC-1 unterdrückt aber nicht nur bei Nematoden, sondern auch in Säugerzellen, Apoptose.

Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass es sich bei Hefeapoptose um einen basalen, konservierten apoptotischen Apparat handelt, der schon vor dem Übergang zum vielzelligen Leben angelegt wurde. Im Laufe der Evolution wurde er dann stark erweitert und neuen Funktionen angepasst.

## 1.9 Hefe als Modellorganismus für die Krebsgrundlagenforschung

Nicht nur eine einzelne Mutation, sondern ein mehrstufiger Prozess ist nach Vogelstein und Kollegen dafür verantwortlich, dass aus normalen, gesunden Zellen ein Tumor entsteht. Nach Applikation eines Tumorinitiators und anschließendem mehrmaligem Einwirken von Tumorpromotoren entstehen transformierte Zellen, die zu malignen Tumoren werden können (Vogelstein *et al.*, 1993). Bei malignen Zellen ist das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Zelltod gestört, Apoptose kann nur vermindert oder auch gar nicht mehr ablaufen. Durch eine verstärkte Expression des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 wird beispielsweise Apoptose in manchen Tumoren unterbunden (Kirkin *et al.*, 2004). Diese Beobachtung macht Apoptose für die Krebsgrundlagenforschung interessant, könnte doch durch die Beseitigung der Apoptoseresistenz ein wirksames Mittel gegen Krebs gefunden werden. Das alleine rechtfertigt jedoch noch nicht den Einsatz von Hefe als Modellorganismus für die Krebsgrundlagenforschung. Mit den isogenen SRO7 und SRO77 besitzt die Bäckerhefe allerdings zwei Homologe eines Tumorsuppressors in *Drosophila*.

Darüber hinaus kann die Bäckerhefe auf Wirkstoffe für Apoptosemodulation untersucht werden. Hierfür werden in Hefezellen Mutationen ausgelöst und die potentiell entstandenen Mutanten werden auf Medienplatten mit den, auf Resistenzausbildung zu testenden Wirkstoffe, ausgestrichen. Resistente Mutanten überleben und können näher untersucht werden. Schließlich kann in Hefe auch eine genomische Genbank auf Drogenresistenz getestet werden. Hierbei lassen sich definiert die Gene ermitteln, die für die Drogenresistenz verantwortlich sind (Bjornsti, *et al.*, 2002).

Abgesehen davon können auch die in Hefe gewonnen Erkenntnisse über den basalen Apoptosemechanismus, Ansätze zum Verständnis der Krebsentstehung und somit auch zur Verbesserung der Therapiemöglichkeiten, liefern.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Autoklav Ventilab S 3000	MMM, München
Elektroblotapparatur Multiphor II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophorese-Kammern:	Werkstatt des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Tübingen
Elektroporator 2510	Eppendorf AG, Hamburg
ELISA-Reader MR 5000	Dynatech Instruments Inc., Torrance, USA
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop BH-2RFCA	Olympus, Japan
Gele:	
<ul style="list-style-type: none"><li>• DNA-Agarose-Gele,</li></ul>	Werkstatt des Physiologisch-Chemischen Instituts der Universität Tübingen
<ul style="list-style-type: none"><li>• Protein-Polyacrylamid-Gele</li></ul>	Hofer SE 400, USA
<ul style="list-style-type: none"><li>• Geldokumentationssystem</li></ul>	Cybertech, Berlin
Lab Shaker	B. Braun, Melsungen
pH-Meter	Knick, Berlin
Photo-Dokumentationssystem CS1	Cybertech, Berlin
Photokamera Modell c35AD-4	Olympus, Japan
Photokamera XR-X 3000	Ricoh, Japan
Pipetten, Pipettenspitzen und Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Rührer IKA-COMBIMAG RCH	Janke & Krake KG, Staufen im Breisgau
Schlauchpumpe MP-3	Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan
Schwingschüttler	Wacker, Deutschland
Spannungsgeber EA-3049 EA-3050	Heinzinger, Rosenheim
Sterilbank 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
UV/VIS-Spectrophotometer UV-120-01	Shimadzu
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

Zellzähler CASY 1

Schärfe System, Reutlingen

Zentrifugen:

- 3K12 mit Rotor Nr. 11133 Sigma, München
- Tischzentrifuge 3200 Eppendorf AG, Hamburg
- Biofuge pico Heraeus Christ, Osterode
- Megafuge 1.0 mit Rotor 3360 Heraeus Christ, Osterode
- Tischzentrifuge 29025 Hettich, Tuttlingen
- Ultrazentrifuge L5-65 Beckman Instruments, München  
mit Rotor Ti60

## 2.2 Chemikalien und Kits

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

Apo-Alert Annexin V Apoptosis Kit

Clontech, USA

Brefeldin A

Serva, Cat. Nr. 15100

Glasperlen Ø 0,5 mm

B. Braun, Melsungen

β-Glucuronidase/Arylsulfatase

Roche

DAB-Substrat/Metall enhanced

Roche

DAPI

Sigma, Bestell Nr. D 8417

DIG High Prime Labeling and

Roche, Cat. No. 1 745 832

Detection Starter Kit I

Dihydrofluorescein	Sigma
Dihydrorhodamin	Sigma
E.Z.N.A Cycle-Pure Kit	PEQLAB, Bestell Nr. 12-6493-02
E.Z.N.A Gel Extraction Kit	PEQLAB, Bestell Nr. 12-2501-02
E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB, Bestell Nr. 12-6942-02
FITC-VAD-fmk	Promega
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche, Cat. No. 1 684 817
Lyticase	Sigma
Objektträger	bioMérieux, Frankreich
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
Rundbodenröhrchen	Meylan Codex, Frankreich
zVAD-fmk	Bachem

Die Bestandteile für Kulturmedien wie Yeast Extract, Bacto-Pepton, Bactotrypton und Yeast Nitrogene Base wurden von Difco, USA bezogen und gebrauchsfertiges DME-Medium für WISH-Zellen von der Firma Sigma.

## 2.3 Verwendete Organismen

### 2.3.1 Hefestämme

KFY = Kai Fröhlich Yeast

FMY = Frank Madeo Yeast

DBY = David Botstein Yeast

YIW = Yeast Ingrid Wadskog

Y = Steve Jackson Yeast

Stamm	Alias	Genotyp
KFY 715	WT BY 4741, Euroscarf	<i>MAT<math>\alpha</math></i> ; <i>his3<math>\Delta</math>1</i> ; <i>leu2<math>\Delta</math>0</i> ; <i>met15<math>\Delta</math>0</i> ; <i>ura3<math>\Delta</math>0</i>
KFY 729	$\Delta$ YCA1, Euroscarf	KFY 715, YCA1::KanMX4
FMY 17	pESC-His/YCA1	KFY 715, pFM 21
FMY 18	pESC-His/YCA1 <sup>C297A</sup>	KFY 715, pFM 22
FMY 29	pESC-His	KFY 715, pFM 16
FMY 34	$\Delta$ SRO77, YCA1ex	KFY 715, SRO77::KanMX4, pFM 21
FMY 35	$\Delta$ KRE11, YCA1ex	KFY 715, KRE11::KanMX4, pFM 21
FMY 36	$\Delta$ YAK1, YCA1ex	KFY 715, YAK1::KanMX4, pFM 21
FMY 37	$\Delta$ VAM7, YCA1ex	KFY 715, VAM7::KanMX4, pFM 21
FMY 38	$\Delta$ SRO77, Leer	KFY 715, SRO77::KanMX4, pFM 16
FMY 39	$\Delta$ KRE11, Leer	KFY 715, KRE11::KanMX4, pFM 16
FMY 40	$\Delta$ YAK1, Leer	KFY 715, YAK1::KanMX4, pFM 16
FMY 41	$\Delta$ VAM7, Leer	KFY 715, VAM7::KanMX4, pFM 16
FMY 394	$\Delta$ SOR7 $\Delta$ YCA1, YIW 24	KFY 715, SRO7::LEU2, YCA1::KanR
FMY 395	$\Delta$ SOR77 $\Delta$ YCA1, YIW 25	KFY 715, SRO77::HIS3, YCA1::KanR
FMY 396	$\Delta$ SOR7 $\Delta$ SOR77, YIW 1	KFY 715, SRO7::LEU2, SRO77::HIS3
FMY 397	$\Delta$ SOR7 $\Delta$ SOR77 $\Delta$ YCA1, YIW 26	KFY 715, SRO7::LEU2, SRO77::HIS3, YCA1::KanR
	$\Delta$ CKB1, Euroscarf	BY 4741, CKB1::KanMX4
	$\Delta$ GPD1, Euroscarf	BY 4741, GPD1:: KanMX4
FMY 459	WT Y 865	<i>MAT <math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp 1-289</i> , <i>his3-<math>\Delta</math>1</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112gal2</i> , <i>gal10</i>
FMY 461	$\Delta$ NHP6A/B, Y 869	<i>MAT <math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp 1-289</i> , <i>his3-<math>\Delta</math>1</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112gal2</i> , <i>gal10</i> , <i>NHP6A::URA3</i> , <i>NHP6B::HIS3</i>
FMY 462	Yep352-Leu	FMY 459, Yep352-Leu
FMY 463	Yep352-Leu/NHP6A	FMY 459, Yep352-Leu/NHP6A
FMY 476	$\Delta$ SOR7, BY 5451, Euroscarf	KFY 715, SRO7::KanMX4
FMY 477	$\Delta$ SRO77, BY 3134, Euroscarf	KFY 715, SRO77::KanMX4
FMY 478	$\Delta$ KRE11, BY 4796, Euroscarf	KFY 715, KRE11::KanMX4

FMY 479	$\Delta$ YAK1, BY 7006, Euroscarf	KFY 715, YAK1::KanMX4
FMY 480	$\Delta$ VAM7, BY 4578, Euroscarf	KFY 715, VAM7::KanMX4

### 2.3.2 *E. coli*-Stämme

pFM = Plasmid Frank Madeo

Stamm	Alias	Genotyp
Von Gabi Dodt	DH5 $\alpha$	
pFM 16	pESC-His	pESC-His ampR, pUC origin, 2 $\mu$ origin, f1 origin, URA3, pGAL10-FLAGtag, pGAL1-c-myctag von Sratagene
pFM 21	pESC-His/YCA1	pFM16/ YCA1
pFM 22	pESC-His/YCA1 <sup>C297A</sup>	pFM16/ YCA1 <sup>C297A</sup>

## 2.4 Kulturmedien

Alle Kulturmedien wurden für 20 Minuten bei 121°C im Autoklaven sterilisiert. Für 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.

### 2.4.1 Hefe-Vollmedium YEPD/YEPG

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

### 2.4.2 Hefe-Vollmedium YEPD mit NaCl

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

### 2.4.3 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 jeweilige Stammes in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

80 mg/l Histidin

320 mg/l Uracil

10 mg/l Adenin

20 mg/l alle anderen Aminosäuren

### 2.4.4 LB (Luria + Bertani)-Medium für *coli* Bakterien

0,5 % Natriumchlorid

0,5 % Yeast Extract

1 % Bactotrypton (40 mg/l Ampicillin)

### 2.4.5 DME (Dulbecco's Modified Eagle)- Medium für WISH-Zellen

Wurde als gebrauchsfertiges Medium von der Firma Sigma bezogen.

Inhalt	Menge [mg/L]	Inhalt	Menge [mg/L]
<b>Salze:</b>		<b>Aminosäuren:</b>	
CaCl <sub>2</sub> (Anhydrid)	200.0	L-Arginin-HCl	84.0
Fe(NO <sub>3</sub> )*9H <sub>2</sub> O	0.1	L-Cystin-2HCl	63.0
KCl	400.0	L-Glutamin	584.0
MgSO <sub>4</sub> (Anhydrid)	97.7	Glycin	30.0
NaCl	6400.0	L-Histidin-HCl*H <sub>2</sub> O	42.0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	125.0	L-Isoleucin	105.0
<b>Vitamine:</b>		L-Leucin	105.0
D-Ca-Pantothenat	4.0	L-Lysin-HCl	146.0
Cholinchlorid	4.0	L-Methionin	30.0
Folsäure	4.0	L-Phenylalanin	66.0
i-Inositol	7.2	L-Serin	42.0
Niacinamid	4.0	L-Threonin	95.0
Riboflavin	0.4	L-Tryptophan	16.0
Thiamin-HCl	4.0	L-Tyrosin-2Na*2H <sub>2</sub> O	104.3
<b>weitere Bestandteile:</b>		L-Valin	94.0
D-Glucose	4500.0		
Phenol Rot	15.0		
Na-Pyruvate	110.0		

## 2.5 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden

Für die Herstellung aller Puffer und Lösungen wurde deionisiertes Wasser eingesetzt. Lediglich bei der Mutagenese von YCA1 wurde QS-Wasser benutzt, welches nach dem Deionisieren zweimal destilliert war.

### 2.5.1 Agarosegelelektrophorese

TAE	40 mM Tris/Acetat; 1 mM EDTA; pH 8
Probenauftragspuffer	eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau in 50 ml 87 % (w/v) Glycerin
Agarosegel	0,7 % bis 1 % Agarose in TAE; 0,001 % Ethidiumbromid
DNA-Längenstandard	0,1 µg/µl λ-DNA EcoRI/Hind III verdaut [21226 bp, 4978 bp, 4268 bp, 3530 bp, 2027 bp, 1904 bp, 1584 bp, 1375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp, 125 bp]
100 bp Marker	[3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1200 bp, 1031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp]

### 2.5.2 PCR

Taq-Polymerase	Fermentas Produkt Nr. GM0670
MgCl <sub>2</sub>	Fermentas
dNTPs	Fermentas
10x Puffer	Fermentas

### 2.5.3 Mutagenese von YCA1

10x Reaktionspuffer	100 mM KCl; 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 200 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM MgSO <sub>4</sub> ; 1% Triton-X-100; 1 mg/ml nukleasefreies Rinderserumalbumin
LB-Medium;	1 M MgCl <sub>2</sub> ; 1 M MgSO <sub>4</sub>
<i>PfuTurbo</i> DNA-Polymerase	2,5 U/µl (Stratagene, Kanada)
<i>Dpn I</i> Restriktionsenzym	10 U/µl (Stratagene, Kanada)
QuickSolution	Die Zusammensetzung der QuickSolution wird vom Hersteller Stratagene nicht angegeben.

## 2.6 Puffer und Lösungen für Zellbiologische Methoden

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

### 2.6.1 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

### 2.6.2 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)

### 2.6.3 Chromosomales Taggen

#### 2.6.4 Inhibitor zur Hemmung der Hefecaspase

z-Val-Ala-DL-Asp-fluoromethylketon (=zVAD-fmk) 20 µM in DMSO/EtOH

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

10x Puffer B	350 mM Kaliumphosphat-Puffer; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 6,8
Puffer B + Sorbitol	1,2 M Sorbitol in Puffer B
Lyticase-Lösung	1000 U/ml Lyticase in TE
β-Glucuronidase/Arylsulfatase aus <i>Helix pomatia</i>	4,5 U/ml bzw. 14 U/ml, Roche
Poly-L-Lysin M <sub>r</sub> 6000-9000	0,1 % (w/v), Serva
PBS	25 mM Kaliumphosphat-Puffer; 0,9 % (w/v) NaCl; pH 7
Permeabilisierungs-Lsg.	0,1 % Triton-X-100; 0,1 % (w/v) Natriumcitrat
TUNEL-Reaktionsmix	Enzyme Solution 1:10 mit Label Solution verdünnt

Enzyme Solution	T4 Terminale Desoxynucleotidyl Transferase
Label Solution	Nukleotid-Mix
Converter POD	Anti-Fluorescein Antikörper; gekoppelt mit Meerrettichperoxidase; gebrauchsfertig
DAB-Substrat	DAB Substrat Metal Enhanced 1:10 mit Peroxidpuffer verdünnt

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

### 2.6.6 Dihydrorhodamin 123-Färbung

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

### 2.6.7 Diaminophenylindol (DAPI)-Färbung

DAPI-Lösung	1 µg/ml Diaminophenylindol in PBS
-------------	-----------------------------------

### 2.6.8 Dihydrofluorescein Färbung

Dihydrofluorescein	2,5 mg/ml Dihydrofluorescein in Ethanol
--------------------	---

### 2.6.9 Annexin V-Test (Apo Alert Annexin V Apoptosis Kit)

Annexin V	Apo Alert Annexin V Apoptosis Kit
Puffer C	(Annexin-Bindepuffer) 10 mM HEPES/NaOH; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> ; pH 7,4
Puffer B	35 mM Kaliumphosphat-Puffer; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 6,8
Puffer B + Sorbitol	1,2 M Sorbitol in Puffer B
Lyticase-Lösung	1000 U/ml Lyticase in TE
β-Glucuronidase/Arylsulfatase aus <i>Helix pomatia</i>	4,5 U/ml bzw. 14 U/ml, Roche
Propidiumiodid	50 µg/ml in Puffer C

### 2.6.10 Bestimmung der Caspaseaktivität durch FACS-Messung

FITC-VAD-fmk	1:1000 verdünnt in PBS
--------------	------------------------

## 2.7 Puffer und Lösungen für immunologische Methoden

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

### 2.7.1 Rohextraktherstellung

Lysepuffer                      20 mM HEPES pH 7,4; 84 mM KCl;  
   10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM EGTA;  
   0,5 % NP40

Proteaseinhibitoren (Zugabe unmittelbar vor Gebrauch):

1 mM PMSF; 1 mM DTT; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 5 µg/ml Aprotinin

### 2.7.2 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<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
   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

### 2.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Sammelpuffer	1 M Tris/HCl; 0,8 % SDS; pH 6,8
Trennpuffer	1,5 M Tris/HCl; 0,4 % SDS; pH 8,8
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Acrylamidlösung	30 % Acrylamid 0,8 % N, N'-Methylenbisacrylamid
Persulfatlösung	10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS)
10x Laufpuffer	250 mM Tris/HCl; 1,92 M Glycin; 2 % SDS; pH 8,3
Sammelpuffer	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]

### 2.7.4 Ponceau-S-Färbung

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

### 2.7.5 Immunoblot

PVDF-Membran Immobilon P	Millipore, Bedford, USA
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

Antikörper:

polyklonaler anti-FLAG Antikörper aus Kaninchen	Geschenk von S. Baksh
monoklonaler anti-HA Antikörper aus Maus	Sigma, Bestell Nr. H-9658
anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRP Konjugat aus Ziege	BIO RAD, Cat. Nr. 170-6515
anti-Maus IgG (H+L)-HRP Konjugat aus Ziege	BIO RAD, Cat. Nr. 170-6516
ECL-Detection reagent 1	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
ECL-Detection reagent 2	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Film BioMax MR von Kodak	Kodak Produkt Nr. 8701302
Entfernungspuffer	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim 62,5 mM Tris/HCl; 0,4 % SDS; pH 8

## 2.8 Primer

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

### 2.8.1 Primer für die Mutagenese von YCA1

Ausschnitt aus der Originalsequenz von YCA1:

5'- CTTTCATTATTCTGGAC**AT**GGTGGCCAAACTGAAGATTT – 3'

5'- **AGCATTGTTTGACTCTTGT****CATT****CGGGTACAGT****GTTGGAA** – 3'

In den fettgedruckten Bereichen der YCA1–Originalsequenz wurde ein Basenaustausch durchgeführt. Durch diese Mutation wurde Cystein nach Alanin ausgetauscht.

C nach A sense:

5'- GCATTGTTTGACTCTGCTCATT**CGGGTACAGT**GTTGGATC – 3'

C nach A antisense:

5'- GATCCAACACTGTACCCGAATGAGCAGAGTCAAACAATGC – 3'

### 2.8.2 Primer für die Sequenzierung von YCA1

5'- TGCAATGGTTGGTCAAGGATGCGC – 3'

### **2.8.3 Primer für chromosomales Taggen von VAM7**

VAM7 sense:

5` - C AGA TAG CCA ACA AGA A GGC TAG ACA TTT TAA CAA CAG TGC T – 3`

VAM7 antisense

5` - GTA CAA ATA TAC TCT CAG GAT TTG TAA CCC GGA TAG TAA CTC – 3`

### **2.8.4 Primer für chromosomales Taggen von SRO77**

SRO77 sense:

5` - GGA AGA AAC GGG AA GGG ATA TGA TGA AGA GCG CTG TAG GTT TT – 3`

SRO77 antisense:

5` - GA GCC TGA TAA AAT TCT TAT GCG AGC AAG GGC AAC CTG ATC G – 3`

### **2.8.5 Primer für chromosomales Taggen von YAK1**

YAK1 sense:

5` - GAA GGG CCA ACA AGC GCG TTC AAT AAA CTT CAC ATT GTC GAA

GAA – 3`

YAK1 antisense:

5` - CAT TAT GGC ACC AAG CCG TAA TAA AAT GAA ATG GGT AGT TAA G– 3`

### **2.8.6 Primer für chromosomales Taggen von KRE11**

KRE11 sense:

5` - CTT ATA GAA GTT GGA AAT GGC GCA TCT GTG TTA ATC CAG – 3`

KRE11 antisense:

5` - CAA CTG CTC TTT TGG GTG ACT CGC AAC GCC TAA GTA AAG – 3`

## 2.9 Stammhaltung und Kultivierung

### 2.9.1 Flüssigkulturen

Flüssigkulturen dienen der Anzucht von Zellen bis zur gewünschten Zelldichte.

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

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

WISH-Zellen wurden in DMEM Medium bei 37°C angezogen.

### 2.9.2 Plattenkulturen

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

Dabei wurden Platten für *E. coli* (LB, LB+Antibiotikum) bei 37°C und Platten für *S. cerevisiae* (YEPD, Minimalmedium) bei 28°C inkubiert.

### 2.9.3 Dauerkulturen

Dauerkulturen dienen der langfristigen Stammhaltung und sind bei -80°C über Jahre hinweg haltbar. Zum Anlegen einer Dauerkultur wurden 500 µl einer Übernachtskultur 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 gelagert.

Zur erneuten Anzucht eines Hefestammes aus der Dauerkultur wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas gefrorenes Material aus dem Kryoröhrchen gekratzt und auf einer Platte ausgestrichen. Bei *E. coli* ist es möglich, direkt ein entsprechendes Flüssigmedium anzuimpfen.

## **2.10 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

### **2.10.1 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese wurde je nach Länge der zu trennenden DNA in 0,7 bis 1 %igen Agarosegelen durchgeführt. Vor dem Gießen der Gele wurde die Agarose in TAE im Mikrowellenherd aufgeköcht. Nach Abkühlen der Lösung wurde sie mit 1 %igem (w/v) Ethidiumbromid auf eine Endkonzentration von 0,001 % eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in die vorbereitete Gelkammer gegossen und der Kamm für die Probenfächer eingesetzt. Nach ca. einer halben Stunde war das Gel erstarrt, so dass die Gelkammer mit TAE als Laufpuffer gefüllt und zuletzt der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen werden konnte. Die Proben wurden in die Fächer pipettiert und die Elektrophorese bei 80 V (Mini-Gel) bzw. 120 V (großes Gel) durchgeführt. Bei jedem Lauf wurden neben den Proben 5 µl λ-, oder 100 bp-Marker als DNA-Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande sich dem Ende des Gels näherte. Dies war bei Mini-Gelen nach ca. 30 Minuten der Fall und bei großen Gelen nach etwa 2 Stunden. Nach dem Lauf wurde das Gel aus der Kammer genommen; mit Hilfe des UV-Transilluminators wurden die ethidiumbromidhaltigen DNA-Banden sichtbar gemacht, anschließend dokumentiert und ausgewertet.

### **2.10.2 Abschätzung der DNA-Menge in Agarosegelen**

Die Abschätzung der DNA-Menge in Agarosegelen erfolgte durch Vergleich der Ethidiumbromid-Fluoreszenzintensität der zu bestimmenden Bande mit einer Bande des DNA-Längenstandards. Dies ist möglich, weil der λ-DNA-Marker mit 0,1 µg/µl eine definierte Konzentration besitzt. Wenn in einem Gel immer 5 µl DNA-Längenstandard aufgetragen wurden, dann entsprach die Gesamtmenge der Marker-DNA 0,5 µg. Die einzelnen Banden des λ-DNA-Markers enthalten immer in etwa die gleiche DNA-Konzentration. Auf die oberste Bande (21 kb) entfallen knapp 0,25 µg, da das gesamte λ-Phagengenom eine Länge von 48 kb hat. Die 2. und 3. Bande entsprechen einer DNA-Menge von je ca. 50 ng.

### **2.10.3 Ethanolfällung**

Um DNA aus verdünnten Lösungen zu konzentrieren oder umzupuffern und außerdem einen gewissen Reinigungseffekt zu erzielen, wurde sie mit Ethanol

ausgefällt. Dazu wurde zunächst mit 2 M Natriumchloridlösung die Salzkonzentration auf 0,2 M Natriumchlorid eingestellt. Bei Lösungen mit einem relativ hohen Salzgehalt kann auf diesen Schritt auch verzichtet werden. Anschließend wurde das 2,5 fache Volumen des Ansatzes an Ethanol zugegeben und die DNA für mindestens 30 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gefällt. Die DNA wurde für 15 Minuten bei 10000 g abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknen der DNA an der Luft konnte die DNA in einem geeigneten Volumen TE, TE/LiAc oder QS-Wasser aufgenommen und dann direkt eingesetzt werden.

#### **2.10.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode, um Desoxyribonukleinsäuren zu amplifizieren. Sie besteht aus den folgenden Schritten, die etwa 30x wiederholt werden:

- Denaturierung: hier wird die doppelsträngige DNA in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt.
- Annealing: während des Annealings lagern sich die Primer an der einzelsträngigen DNA an.
- Elongation: im Elongation-Schritt erzeugt die DNA-Polymerase den fehlenden zweiten Strang, indem sie den vorhandenen Strang als Template nutzt.

#### **2.10.5 Aufreinigung des PCR-Produkts mit dem Cycle Pure Kit von E.Z.N.A.**

Bis zu vier 50  $\mu\text{l}$  PCR-Ansätze wurden vereinigt und mit dem 4 bis 5 fachen Volumen CP-Puffer gemischt und durch eine HiBind-Zentrifugensäule nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Die DNA wurde mit 30  $\mu\text{l}$  deionisiertem Wasser eluiert.

#### **2.10.6 Präperatives Gel zum Aufreinigen von DNA**

DNA unterschiedlicher Größe – wie beispielsweise PCR-Produkt mit Nebenprodukten - wurde in einem präperativen Agarosegel aufgetrennt. Um Kontamination durch Fremd-DNA auszuschließen wurde hierfür frischer TAE-Puffer eingesetzt. Nach dem Lauf des Gels wurde die ethidiumbromidhaltige DNA auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und die DNA-Bande mit der gewünschten Größe wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. Aus dem Agaroseblock wurde sie anschließend herausgelöst.

### **2.10.7 DNA-Extraktion**

Nach einem präperativen Gel wurde DNA mit dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit nach Vorschrift des Herstellers aus dem Agaroseblock herausgelöst.

## **2.11 Molekularbiologische Methoden in *Escherichia coli***

### **2.11.1 Plasmidisolierung aus *E.coli***

Die Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe des E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit nach den Angaben des Herstellers.

### **2.11.2 Restriktionsverdau**

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

### **2.11.3 Herstellung von kompetenten *E. coli* für eine Elektrotransformation**

Zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli* wurde 1 l des Stamms DH5α in LB-Medium auf eine Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,5 herangezogen. Die Kultur wurde für 10 min bei 4000 g bei 4°C abzentrifugiert, zweimal mit eiskaltem Wasser und anschließend zweimal mit eiskaltem 10 %igem Glycerin gewaschen. Dann wurde das Zellpellet in 8-9 ml Wasser resuspendiert. 50 µl Aliquots wurden bei -80°C eingefroren.

### **2.11.4 Elektrotransformation von *E. coli***

Die Elektrotransformation wurde mit dem Elektroporator 2510 durchgeführt. Hierzu wurden 50 µl einer Suspension mit kompetenten *E. coli* auf Eis aufgetaut. Parallel wurden Elektroporationsküvetten auf Eis vorgekühlt. 5-10 µl DNA, die in die *E. coli*-Zellen hineintransformiert werden sollen, wurden in die aufgetauten kompetenten Zellen getropft und anschließend durch mehrmaligem Aufziehen mit der Pipette gemischt. Der Ansatz wurde in die vorgekühlten Spezialküvette überführt. Die Transformation fand durch einen Impuls von 1600 Volt statt; aufgrund des Impulses kam es zu einer kurzzeitigen Perforierung der Membran, die das Eintreten der DNA

in die *coli*-Bakterien ermöglichte. Der Küvetteninhalt wurde mit 1 ml LB-Medium gemischt und 1 h bei 37°C in einem Eppendorf Cub auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (1 min, 10000 g), der Überstand auf ein Volumen von etwa 20-100 µl abgesaugt, und das Zellpellet wurde in diesem Restvolumen resuspendiert. Die Suspension wurde auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, bis sich Klone bildeten. Einzig *coli*-Bakterien, bei denen die Transformation erfolgreich verlaufen war, waren in der Lage auf den ampicillinhaltigen Platten zu wachsen - nur sie besaßen eine Ampicillinresistenz. Gewachsene Klone wurden gepickt und zum Animpfen einer Übernachtkultur verwendet.

### **2.11.5 Klonierung**

In einer Klonierung soll ein bestimmtes Gen in einen *E.coli*-Expressionsvektor eingefügt werden. Das Gen wird hierfür durch PCR amplifiziert, genomische DNA oder ein Vektor können als Template dienen. Das PCR-Produkt wurde durch einen Pure Cycle Kit aufgereinigt. Vektor und Insert wurden anschließend in einem dreistündigen Verdau bei 37°C mit Restriktionsendonukleasen so geschnitten, dass ihre Überhänge kompatibel waren. Durch Ligation wurden dann Insert- und Vektor-DNA aneinander gefügt und der Ligationsansatz wurde in den gewünschten *E.coli*-Stamm transformiert und auf Platten mit Selektionsmedium ausplattiert. Die Medienplatten wurden bei 37°C für einen Tag inkubiert, bis sich Klone bildeten, die dann auf Minimalmedienplatten umgestrichen wurden. Zur Kontrolle der Klonierung wurde die Plasmid-DNA der potentiellen Transformanten mit einem Plasmidisolierungs Kit isoliert und zum Sequenzieren eingeschickt.

### 2.11.6 Mutagenese von YCA1

Durch die Mutagenese soll in YCA1 eine Mutation eingeführt werden, in der Cystein 297 durch Alanin ersetzt werden soll. Die hierfür nötigen Primer („sense“ und „antisense“) wurden so verdünnt, dass sich in 1,25 µl Primerlösung jeweils 1,25 ng Oligonukleotid befanden. Die DNA Konzentration des YCA1 haltigen Plasmids wurde durch ein Minigel ermittelt. Für die Mutagenese mussten 10 ng DNA eingesetzt werden; das entsprach 1 µl des isolierten Plasmids. Es wurden zwei Ansätze im PCR-Thermocycler gefahren.

Mutageneseansatz:

5 µl 10x Puffer  
1 µl (=10 ng) Plasmid-DNA  
1,25 µl (=1,25 ng Oligonukleotid) Primer „sense“  
1,25 µl (=1,25 ng Oligonukleotid) Primer „antisense“  
1 µl dNTP-Mix  
3 µl QuickSolution  
37,5 µl dd H<sub>2</sub>O

Der Mutageneseansatz wurde in ein kleines PCR-Eppendorf-Cup überführt und es wurden jeweils 1 µl *PfuTurbo* DNA-Polymerase dazupipettiert. Anschließend wurde der Inhalt der Cups gut gemischt.

Programm des Thermocyclers:

Segment 1: 1 Cyclus mit 95°C für 1 Minute  
Segment 2: 18 Cyclen mit 95°C für 50 Sekunden  
60°C für 50 Sekunden  
68°C für 2 Minuten/kb Plasmidlänge  
→ 30 Minuten  
Segment 3: 1 Cyclus mit 68°C für 7 Minuten

Nach dem Lauf des PCR-Thermocyclers wurde der PCR-Ansatz in ein frisches Eppendorf-Cup überführt und mit 1 µl *Dpn I* Restriktionsendonuklease versetzt und anschließend für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad zum Abbau der mütterlichen DNA inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die mitgelieferten XL10-Gold

ultrakompetenten *E. coli* auf Eis aufgetaut und ein 45 µl–Aliquot wurde auf 4 sterile Eppendorf–Reaktionsgefäße verteilt. 2 ml β–Mercaptoethanol wurden dazu pipettiert und vorsichtig gemischt. Bis zum vollständigen Ablauf des einstündigen Restriktionsverdau wurden die kompetenten Zellen dann noch für 10 Minuten auf Eis inkubiert und alle 2 Minuten sachte geschüttelt. Anschließend wurden 2 µl der *Dpn* I behandelten DNA zu den kompetenten Zellen pipettiert, gut gemischt und dann 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein 30 sekündiger Hitzeschock der *E. coli* im 42°C warmen Wasserbad mit anschließender Kühlung der Ansätze auf Eis. Nach 2 Minuten wurden 500 µl vorgewärmtes LB–Medium zugesetzt und die Cups wurden eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubation wurden die Eppendorf–Cups kurz zentrifugiert, ein Teil des Überstandes wurde abgegossen. Das Zellpellet wurde in dem verbleibenden Überstand aufgenommen und die Zellsuspension wurde auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Nach ca. 2 Tagen wuchsen auf ihnen mehrere hundert Kolonien. Es wurden 2 Klone gepickt und in flüssigem LB/Amp–Medium angezogen. Mit diesen Kulturen wurde dann eine Plasmidisolierung durchgeführt. Das isolierte und gereinigte Plasmid wurde in 20 µl 10 mM Tris (pH=7,5) aufgenommen. Seine Konzentration wurde in einem Minigel bestimmt. 400 ng des Plasmids wurden dann der Firma Scientific Research & Development GmbH (Oberursel) zum Sequenzieren eingeschickt. Das restliche Plasmid wurde bei 4°C gelagert und, nachdem das Einführen der erwünschten Mutation durch die Sequenzierung bestätigt worden war, in den Wildtypstamm KFY 715 transformiert. Mit der YCA1–Punktmutante (FMY 28) wurden anschließend ein Immunoblot, Überlebensplattierungen und Apoptosetests durchgeführt.

## **2.12 Molekularbiologische Methoden in *Saccharomyces cerevisiae***

### **2.12.1 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 zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und Zellpellet wurde in 200 µl Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden etwa 300 mg Glasperlen zugegeben und die Suspension wurde mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Dann wurden die Zellen für 2 min bei höchster Vortexstufe zum Zellaufschluss gevortext. Anschließend wurde für 10 min bei 10000 g zur Phasentrennung zentrifugiert. Die DNA-haltige obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein frisches Ebbendorf Cub überführt. Durch den Zusatz von 160 µl Isopropanol wurde die DNA gefällt und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wurde mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, um Isopropanolrückstände zu entfernen. Das Pellet wurde mit dem Exikkator für 7 Minuten getrocknet und anschließend in 15 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

### **2.12.2 Herstellung transformationskompetenter *S. cerevisiae*-Zellen**

Da sich kompetente Hefezellen nicht lagern lassen, müssen sie vor jeder Transformation frisch hergestellt werden. Am Tag vor der Transformation wurde hierfür eine 10 ml YEPD-Vorkultur des zu transformierenden Hefestammes angeimpft und im 28°C Brutraum auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde mit dieser Übernachtskultur eine 50 ml-Kultur so angeimpft, dass sie eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,3 besaß. Diese Kultur wurde dann für 2-4 Stunden bei 28°C auf dem Schüttler inkubiert. Die nun in der logarithmischen Phase befindlichen Hefezellen wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 5000 rpm steril geerntet. Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet wurde mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 2 ml 1xLiAc/0,5xTE resuspendiert und in ein Eppendorf Cup überführt. Es erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die so gewonnenen kompetenten Zellen konnten direkt für die Transformation eingesetzt werden.

### **2.12.3 Transformation von *S. cerevisiae* mit rekombinanter DNA**

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

Neben den kompetenten Hefezellen und der rekombinanten DNA benötigt man zur Transformation noch einzelsträngige Carrier-DNA. Um einzelsträngige Carrier-DNA zu erhalten, wurde doppelsträngige Lachssperma-DNA unmittelbar vor Gebrauch für 10 Minuten im Wasserbad gekocht und dann direkt zur Verhinderung von Reassoziaton auf Eis gekühlt bis zum weiteren Gebrauch gelagert. 100 µl der frisch hergestellten Suspension kompetenter Zellen wurden in ein neues Eppendorf Cup überführt. 10 µg ssDNA und bis zu 15 µl (ca. 1 µg) der zu transformierenden DNA wurden dazu pipettiert. Anschließend wurde der Transformationssmix mit 700 µl 1xLiAc/1xTE/40%PEG versetzt und es wurde solange durch Vortexen gemischt, bis sich das gesamte Zellpellet aufgelöst hatte. Dann wurde der Transformationsansatz für 30 Minuten unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Es wurden 85 µl DMSO hinzugefügt, bevor ein 5 minütiger Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad erfolgte. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml sterilem 1xTE gewaschen, hierbei wurden die Zellen äußerst sachte behandelt und nur für etwa 5 Sekunden zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in 500 µl 1xTE aufgenommen. Ein Aliquot (50 µl, 100 µl und 200 µl) dieser Suspension wurde auf einer Platte mit Selektionsmedium ausplattiert. Nach ca. 2–3 Tagen waren auf den Platten Kolonien mit transformierten Hefezellen sichtbar, die gepickt und auf Selektions-Medienplatten umgestrichen wurden.

### **2.12.4 Kolonien-PCR bei *S. cerevisiae***

Um erfolgreiches chromosomales Tagging in das Hefegenom nachzuweisen, wurde eine Kolonien-PCR durchgeführt. Hierzu wurde eine einzelne Hefekolonie an der Wandung eines 0,2 ml PCR-Gefäßes verschmiert, für 2 min in der Mikrowelle erhitzt und kurz auf Eis gekühlt, bevor 25 µl PCR-Mix (10 mM Tris/HCl pH 8,8; 500 mM KCl; 0,8 % NP-40; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM dNTPs; je 1 pM Primer; 0,02 U/µl Taq-Polymerase) zugegeben wurden. Die Amplifikation erfolgte für 15 Zyklen im Thermocycler. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Um falsch positive Klone der Kolonien-PCR zu eliminieren, wurde zusätzlich ein Immunoblot durchgeführt.

## **2.13 Zellbiologische Methoden bei *Saccharomyces cerevisiae***

### **2.13.1 Induktion der Expression von Genen, die sich unter einem Galaktosepromotor befinden**

In einem pESC-Expressionsvektor befindet sich beispielsweise das für die Hefecaspase codierende Gen YCA1 unter Kontrolle eines galaktoseinduzierbaren Promotors. Um die Expression der Caspase zu induzieren, wurde ein Medienshift durchgeführt. Hierfür wurden die entsprechenden Hefestämme zunächst auf Minimalmedium mit 2 % Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen. Wenn sich die Zellen in der exponentiellen Phase befanden ( $OD_{600}$  ca. 0,3–0,6), wurden die Kulturen auf Minimalmedium mit 2 % Galaktose als Kohlenstoffquelle überführt. Die Zellen wurden hierfür durch Zentrifugation für 3 Minuten bei 5000 rpm geerntet und das glucosehaltige Medium wurde verworfen. Die Zellen wurden in einem Kulturvolumen galactosehaltigem Medium aufgenommen und darin dann weiter kultiviert.

### **2.13.2 Bestimmung der Zelldichte einer Hefekultur mit dem Zellzähler Casy**

Die Zellzahlbestimmung von Hefe-Flüssigkulturen erfolgte mit Hilfe des Casy 1 Zellzählers in Zellen pro ml. Ein Aliquot der zu messenden Kultur wurde in 10 ml Casyton, einer Lösung mit schwachen Elektrolyten, suspendiert. 200  $\mu$ l der Hefesuspension wurden vom Zellzähler durch eine Kapillare gesaugt, an deren Kapillarstrecke eine Spannung angelegt worden war. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängte jede Zelle ein, ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Weil Hefezellen den Strom nicht leiten, hatte dies eine Erhöhung des Widerstandes zur Folge. Aus der Häufigkeit und dem Grad der Widerstandsänderung konnte der Zellzähler die Anzahl und die Größe der Hefezellen bestimmen.

Direkt vor der Messung wurde die Kultur gründlich gevortext, da Hefezellen schnell sedimentieren. Dann wurde je nach Dichte der Kultur ein Aliquot in ein Messgefäß mit 10 ml Casyton überführt. Das Messgefäß wurde verschlossen und dreimal invertiert, bevor die Zellzahlbestimmung erfolgte. Der Zellzähler wurde wie folgt programmiert:

Kapillare:	60 µm
Verdünnung:	abhängig vom eingesetzten Volumen Hefekultur
Messvolumen der Kapillare:	200 µl
Anzahl der Messzyklen:	2

Bei sehr dünnen Kulturen wurden 100 µl unverdünnter Kultur in 10 ml Casyton gemessen, entsprechend wurde die Verdünnung des Zellzählers mit 100 eingestellt. Bei stationären Kulturen wurden 100 µl einer 1:100 Verdünnung eingesetzt und der Zellzähler wurde auf eine Verdünnung von 10000 programmiert.

### **2.13.3 Überlebensplattierung**

Die Überlebensrate von Zellen in einer Hefekultur kann in einer Überlebensplattierung ermittelt werden. Hierfür wurden pro Kulturplatte eine definierte Anzahl Hefezellen ausgestrichen und die Platten werden 2 Tage im Brutraum bei 28°C inkubiert. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien wurde dann bestimmt. Die CFU (=colony forming unit) gab die Anzahl der lebensfähigen Zellen pro 500 ausplattierten Zellen an.

Abhängig von der Zelldichte der jeweiligen Hefekultur musste für das Ausplattieren eine Verdünnung erstellt werden.

### **2.13.4 Aging-Tests**

Bei einem Aging-Test handelt es sich um eine Spezialform der Überlebensplattierung, bei der die Überlebensrate der Kultur in Abhängigkeit vom Alter der Kultur bestimmt wird. Aufgrund der Verarmung des Mediums an Stickstoffquellen geht mit fortschreitendem Kulturalter ein immer größerer Anteil der Hefepopulation in Apoptose über. Zur Bestimmung der Überlebensrate einer chronologisch alternden Hefekultur wurden täglich Aliquots entnommen und ihre Fähigkeit Kolonien zu bilden, wurde getestet.

### **2.13.5 Beschichtung von Objektträgern mit Polylysin**

Um ein gutes Haften von fixierten Zellen auf dem Objektträger zu gewährleisten und zu verhindern, dass sie im Verlauf der entsprechenden Färbung heruntergespült werden, wurden die Objektträger vor der Zellfixierung mit Polylysin beschichtet. Dazu wurden die Objektträger zunächst in einer wässrigen Detergenzlösung, dann in deionisiertem Wasser und schließlich in Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden in jedes Fenster 30 µl 0,1 % (w/v) Polylysinlösung pipettiert und man ließ die

Lösung für 30 Minuten antrocknen. Das überschüssige Polylysin wurde mit einer Wasserstrahlpumpe 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.

### **2.13.6 Fixierung von Zellen für den TUNEL-Test**

Je nach Zelldichte wurde der zu testenden Kultur ein Aliquot von 200 µl bis 1 ml entnommen. Die Zellen wurden in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit für ca. 3 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal 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 die Zellen wurden zur Quervernetzung der Proteine für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zur vollständigen Entfernung des Formaldehyds 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. Zum Zellwandabtau wurden 5 µl Lyticase (1000 U/ml) und 20 µl β-Glucuronidase/Arylsulfatase zupipettiert, und der Ansatz wurde für zwei Stunden bei 28°C inkubiert. Bei gealterten Zellen ist die Zellwand dicker, für den Abtau ihrer Zellwand wurden deshalb 40 µl Lyticase (1000 U/ml) und 30 µl β-Glucuronidase/Arylsulfatase eingesetzt. Auch wurde die Dauer der Inkubation auf drei Stunden erhöht. Durch den Zellwandabtau entstehen sehr empfindliche Sphäroplasten, die durch Sorbitol osmotisch stabilisiert wurden und nicht mehr gevortext, sondern nur noch vorsichtig mit der Pipette resuspendiert werden durften. Es folgte erneut ein Waschschrift in 500 µl Puffer B + 1,2 M Sorbitol, nach 20 sekundiger Zentrifugation wurde das Zellpellet in 30 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 bei Raumtemperatur wurden die Objektträger mit den fixierten Zellen im Kühlschrank gelagert. Innerhalb von mehreren Wochen konnten sie dann für eine TUNEL- oder DAPI-Färbung eingesetzt werden.

### **2.13.7 TUNEL-Test (In Situ Cell Death Detection Kit, POD)**

Im Verlauf von Apoptose kommt es zu DNA-Fragmentierung, durch die freie 3'-OH-Gruppen entstehen. 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. Anti-Fluorescein-Antikörper, an die Peroxidase gekoppelt ist, werden zugegeben und binden in einer Antigen–Antikörper–Reaktion an das Fluorescein. Durch eine enzymatische Farbreaktion der Peroxidase kann nun die DNA-Fragmentierung im Lichtmikroskop sichtbar gemacht 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 der Firma Roche durchgeführt. Es wurden fixierte Zellen eingesetzt. Um restliches Sorbitol zu entfernen, wurde vor der Färbung jedes Fenster 2 mal mit PBS gewaschen, dann ließ man die Objektträger vollständig trocknen. Zur Zerstörung endogener Peroxidaseaktivität wurden die Objektträger anschließend für 30 Minuten mit 0,3 % Wasserstoffperoxid in Methanol geflutet, wobei darauf geachtet wurde, dass sie nicht austrockneten, da das Methanol sehr schnell verdunstet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung abgesaugt und die Objektträger getrocknet, bevor erneut zweimal mit PBS gewaschen wurde. Dann wurden die Zellen für genau zwei Minuten auf Eis mit Permeabilisierungslösung inkubiert, um das spätere Eindringen des TUNEL-Reaktionsmix und der Converter-POD zu ermöglichen. Danach wurde die Permeabilisierungslösung abgesaugt und durch zweimaligem Waschen mit PBS vollständig entfernt. Auf jedes Fenster des Objektträgers wurden nach dem Trocknen 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. Es wurde für 30 Minuten bei 37°C in der Feuchtkammer inkubiert, erneut 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 ein kleiner Tropfen Kaiser-Gelatine gegeben und ein Deckglas aufgelegt. Die gefärbten Zellen konnten nach Aushärten der Gelatine bei 4°C bis zu einer Woche gelagert werden.

Eine Auswertung unter dem Lichtmikroskop konnte frühestens einen Tag nach der Färbung vorgenommen werden.

#### **2.13.8 Annexin V-Test (Apo Alert Annexin V Apoptosis Kit)**

Durch eine Annexin V-Färbung kann die Externalisierung des Phospholipids Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Seite der Plasmamembran nachgewiesen werden.

Je nach Dichte der zu untersuchenden Kultur wurden 100 bis 500  $\mu\text{l}$  Zellen entnommen, in der Tischzentrifuge geerntet und einmal mit 500  $\mu\text{l}$  Puffer B + 1,2 M Sorbitol gewaschen. Das Pellet wurde in 330  $\mu\text{l}$  Puffer B + 1,2 M Sorbitol aufgenommen und zum Verdau der Zellwand mit 20  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase und 5  $\mu\text{l}$  Lyticase (1000 U/ml) versetzt. Der Verdau erfolgte für mindestens 2 Stunden bei 28°C. Anschließend wurden die Sphäroblasten kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, einmal mit Annexin Binding Puffer (Puffer C + 1,2 M Sorbitol) gewaschen und je nach Größe des Pellets in 20 bis 50  $\mu\text{l}$  Annexin Binding Puffer resuspendiert. Die Resuspension erfolgte durch vorsichtiges Anschnipsen des Cups, um die sehr labilen Sphäroblasten nicht durch Scherkräfte zu zerstören. Auch durfte nur kurz abzentrifugiert werden. 10  $\mu\text{l}$  der erhaltenen Suspension wurden in ein neues Cup überführt und es wurden dann 2  $\mu\text{l}$  FITC-Annexin V (Apo Alert Annexin V Apoptosis Kit) und 1  $\mu\text{l}$  der 1:30 vorverdünnten Propidiumiodid-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. 7  $\mu\text{l}$  des Ansatzes wurden dann auf einen Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Zur Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit Propidiumiodid gefärbt, um sicher zu stellen, dass die Plasmamembran noch intakt war. Phosphatidylserinexternalisierung ist nur in den Zellen eindeutig nachgewiesen, die im FITC-Kanal einen grünen Ring aufweisen und im Propidiumiodidkanal keine Färbung zeigen. Sphäroblasten, die in beiden Kanälen gefärbt sind, haben keine intakte Cytoplasmamembran mehr (Propidiumiodid kann in die Zelle eindringen), so dass FITC-Annexin V von innen an die Membran binden kann und die Zellen im FITC-Kanal intensiv grün gefärbt erscheinen.

#### **2.13.9 Diaminophenylindol (DAPI)-Färbung**

Diaminophenylindol (DAPI) ist ein blau fluoreszierender Farbstoff, der selektiv an die DNA bindet. Er kann daher genutzt werden, um Chromatinkondensation, die bei Apoptose auftritt, nachzuweisen. Für die Färbung wurden je nach Zelldichte 100 bis

500 µl Kultur entnommen, abzentrifugiert und einmal mit 500 µl PBS gewaschen. Das Pellet wurde je nach Größe in 30–60 µl DAPI-Lösung (1 µg/ml) resuspendiert und 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. 7 µl des Färbeansatzes wurden auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Schließlich wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop im DAPI-Kanal betrachtet. Chromatinkondensation war am halbmondförmigen oder langgestreckten Chromatin, häufig am Rand des Kerns und bisweilen auch an fragmentierten Kernen zu erkennen.

Alternativ dazu wurde die DAPI Färbung auch an Zellen durchgeführt, die nach dem Protokoll des TUNEL-Test fixiert worden waren. Zu Beginn wurden die auf den Objektträgern haftenden Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem Trocknen der Objektträger wurden 30 µl DAPI-Lösung auf jedes Fenster pipettiert und 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Fenster 6 mal 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 war im allgemeinen intensiver als die von lebenden Zellen, so dass die Chromatinkondensation besser erkannt werden konnte.

#### **2.13.10 Dihydrorhodamin (DHR) 123-Färbung**

Dihydrorhodamin 123 ist eine Verbindung, die zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies dient. Durch diese wird es zu Rhodamin 123, dem eigentlichen Fluoreszenzfarbstoff, oxidiert, welcher im Fluoreszenzmikroskop anhand seiner roten Farbe zu erkennen ist. Da gezeigt werden konnte, dass reaktive Sauerstoffspezies in *S. cerevisiae* Apoptose auslösen können, kann auch diese Färbung als apoptotischer Marker herangezogen werden.

Für die Färbung wurde 1 ml der zu untersuchenden Kultur steril entnommen und mit 2 µl DHR 123-Lösung versetzt. Sofort nach der Zugabe wurde gut gemischt und anschließend für 2 Stunden bei 28°C geschüttelt. Die Zellen wurden mit der Tischzentrifuge geerntet, zweimal mit je 500 µl PBS gewaschen und schließlich in 1 ml PBS aufgenommen. Es wurden 7 µl auf einen Objektträger pipettiert, ein Deckglas aufgelegt und die Fluoreszenz im Rhodamin-Kanal betrachtet.

### **2.13.11 Dihydrofluoresceinfärbung**

Mit einer Dihydrofluoresceinfärbung ist es auch möglich die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies sichtbar zu machen.

Je nach Zelldichte der Kultur wurden 100–1000 µl Kultur steril entnommen und durch Zentrifugation geerntet. Das Pellet wurde in 500 µl PBS gewaschen und mit 8 µl Dihydrofluorescein (2,5 mg/ml in EtOH) versetzt. Anschließend wurde die Kultur zur Färbung 2 h bei 28°C auf dem Schüttler lichtgeschützt inkubiert. Nach dem Färben wurden die Zellen in 500 µl PBS gewaschen und dann in 20 µl PBS aufgenommen. 7 µl wurden auf ein Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Fluoreszenz wurde anschließend im Rhodamin-Kanal betrachtet.

### **2.13.12 Induktion von Apoptose durch Wasserstoffperoxid**

Eine Übernachtskultur wurden mit den entsprechenden Hefestämmen beimpft. Am Folgetag wurden mit einem Aliquot aus diesen stationären Vorkulturen 20 ml Kulturen auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 beimpft und nochmals für zwei bis drei Generationsdauern (4 bis 5 Stunden) geschüttelt. Wenn sich die Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,3–0,6 befanden, wurde die Expression von YCA1 durch Medienshift ausgelöst. Direkt nach dem Medienshift wurden die Kulturen in zwei 10 ml Aliquots geteilt, in 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikane überführt und einer der beiden Kolben wurde mit 0,4 mM Wasserstoffperoxid versetzt. Apoptotische Marker wurden untersucht, nachdem die Kulturen 20-26 Stunden bei 28°C auf dem Schüttler kultiviert worden waren.

Alternativ wurden Kulturen bei einer niedriger Zellzahl mit Wasserstoffperoxid belastet. Mit einer Übernachtskultur wurden hierfür 20 ml Medium auf  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml beimpft und für 4 Stunden bei 28°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde mit dem Zellzähler kontrolliert, ob die Kulturen angewachsen waren; falls dies der Fall war, wurden sie in zwei 10 ml Aliquots aufgeteilt, von denen eines mit 0,6 mM Wasserstoffperoxid versetzt wurde. Vier Stunden nach der Zugabe von Wasserstoffperoxid wurden die Kulturen auf ihre Sensitivität gegen Sauerstoffstress untersucht.

### **2.13.13 Inhibition der Hefecaspase**

Direkt nach der Aktivierung der Hefecaspase durch Medienshift wurden 20 µM Caspaseinhibitor, der in DMSO/EtOH gelöst war, zugesetzt. Zu den dazugehörigen

Kontrollen wurde das entsprechende Volumen DMSO/EtOH pipettiert. 20-24 Stunden nach dem Medienshift wurden die Kulturen auf Apoptosemarker untersucht.

#### **2.13.14 FACS-Messung**

Um die Caspaseaktivität von Hefekulturen zu ermitteln, wurde eine FACS-Messung durchgeführt. Die Durchflußzytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das Zählen und die 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. In meiner Doktorarbeit wurde mit Hilfe der FACS-Messung Caspaseaktivität von Hefezellen ermittelt.

Es wurden 1 Million Zellen durch Zentrifugation geerntet und einmal in 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl FITC-VAD (1:1000 verdünnt in PBS) für 20 min bei 28°C auf dem Schüttler gefärbt. Die Zellen wurden 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.

## **2.14 Zellbiologische Methoden bei WISH-Zellen**

### **2.14.1 Anzucht von WISH-Zellen**

In die Wells von Zellkulturplatten wurden vor dem Aussähen der Zellen Deckgläschen gelegt, an die adherent wachsende WISH-Zellen anschließend hafteten.

### **2.14.2 Fixierung von WISH-Zellen**

Das DMEM Medium wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und es wurden zu den WISH-Zellen 500 µl steriles PBS pipettiert. Die Zellkulturplatte wurde anschließend zum Waschen der Zellen sanft geschwenkt, bevor der Überstand wieder abgesaugt wurde. Die Zellen wurden dann ein zweites Mal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden sie anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 500 µl 4 % Formaldehyd in PBS inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen und bis zur anschließenden TUNEL-Färbung im Kühlschrank gelagert.

### **2.14.3 TUNEL-Test bei WISH-Zellen**

Durch den TUNEL-Test können 3'-OH-Gruppen, die durch DNA-Fragmentierung während der Apoptose entstehen, visualisiert werden. Der TUNEL-Test wurde nach der Originalvorschrift von Roche für die Färbung von Säugerzellen durchgeführt. Die fixierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend 10 Minuten zum Blocken der endogenen Peroxidase mit 3 % Wasserstoffperoxid in Methanol geflutet. Dann wurden die WISH-Zellen erneut mit PBS gewaschen, bevor sie für 2 Minuten auf Eis mit Permeabilisierungslösung inkubiert wurden. Sofort nach Ablauf dieser zweiminütigen Inkubation wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen mit den fixierten WISH-Zellen wurden getrocknet und um die haftenden Zellen wurde der zu färbende Bereich mit Nagellack abgegrenzt. 50 µl frisch erstellter TUNEL-Reaktionsmix wurde dem abgegrenzten Zellareal zugesetzt und der Reaktionsansatz wurde in einer Feuchtkammer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, 50 µl Converter-POD wurden zugesetzt und es folgte eine dreißigminütige Inkubation in der Feuchtkammer bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Zur Färbung wurden die WISH-Zellen mit

100 µl DAB-Substrat für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die gefärbten Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Nachdem die Zellen getrocknet waren, wurden sie in Kaisers Gelatine eingebettet. Ein Deckglas wurde aufgelegt und die gefärbten Zellen konnten, nachdem das Mounting Medium ausgehärtet war, unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden. WISH-Zellen mit DNA-Strangbruch zeigten braun gefärbte Kerne, teilweise waren auch größere Bereiche der Zelle braun angefärbt.

## **2.15 Immunologische Methoden**

### **2.15.1 Gewinnung von Rohextrakten aus *S. cerevisiae***

Für Immunoblots werden Rohextrakte von den zu untersuchenden Hefekulturen benötigt. Für ihre Herstellung wurden 50 ml Kulturen durch Zentrifugation geerntet und der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Zellpellet wurden in 400 µl Lysepuffer resuspendiert und anschließend in dickwandige Reagenzgläser überführt. Die Zellen wurden durch dreiminütige Zentrifugation bei 5000 rpm geerntet und der Überstand wurde quantitativ entfernt. Die Zellen wurden mit dem drei- bis vierfachen Volumen an Glasperlen (No. 854 179/1 Braun Melsungen) versetzt und für genau 4 Minuten auf höchster Stufe gevortext. Das dadurch entstandene Lysat wurde sofort auf Eis gestellt und in 750 µl eisgekühltem Lysepuffer aufgenommen. Mit einer Pipette wurde der so erhaltene Rohextrakt von den Glasperlen abgenommen und in ein frisches Eppendorf Cup überführt. Anschließend wurde das Lysat kurz zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zu weiteren Untersuchungen gelagert. Mit einem 10 µl Aliquot des Rohextraktes wurde der Proteingehalt nach Bradford bestimmt.

### **2.15.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Der Farbstoff Serva Blau G-250 bindet unspezifisch an die hydrophoben Bereiche innerhalb eines Proteins wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Aus der Absorption bei 595 nm kann somit die Proteinkonzentration gemessen werden. Gerätebedingt wurde in unserem Labor die Absorption im Flankenbereich bei 620 nm gemessen.

Zur Erstellung einer BSA-Eichkurve wurden 1-10 µl BSA (1 µg/µl) in aufsteigendem Volumen in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Ein 10 µl Aliquot der zu untersuchenden Rohextrakte wurden 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Von dieser Verdünnung

wurden 10 µl entnommen und mit 700 µl Bradford Arbeitspuffer gemischt. Zwei 300 µl Aliquots dieser Verdünnung wurden zur Doppelbestimmung in die Mikrotiterplatte pipettiert. Als Leerwert diente reiner Bradford Arbeitspuffer. Dann wurde bei 620 nm mit dem ELISA-Reader die Absorption der Proben gemessen. Durch lineare Regression wurde per Computer eine Geradengleichung für die BSA-Eichreihe ermittelt. Dadurch wurde es möglich, die Proteinkonzentration der Rohextrakte aus den gemessenen Absorptionen zu berechnen.

### 2.15.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Durch eine diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen wurden Proteine unterschiedlicher Größe aufgetrennt. Bei der Arbeit mit den neurotoxischen Acrylamidlösungen wurden stets Handschuhe getragen. Trenn- und Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung:

	Trenngel (10 %)	Sammelgel
Acrylamidlösung	13,3 ml	3,4 ml
Trenngelpuffer	10,4 ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,7 ml
deionisiertes Wasser	15,8 ml	13,6 ml
Persulfatlösung	400 µl	200 µl
TEMED	16 µl	20 µl

Nachdem die Polymerisation mit TEMED gestartet worden war, wurde die Lösung gut gemischt und das Trenngel rasch bis zu einer Höhe von ca. 12 cm in die vorbereitete Gelkammer (150x140x1mm) gegossen. Anschließend wurde, um Blasenbildung zu verhindern, etwa 1 ml destilliertes Wasser auf das Trenngel pipettiert. Nachdem das Gel nach etwa einer Stunde polymerisiert war, wurde das überständige Wasser dekantiert. Wasserreste wurden danach mit einem Whatman Paper entfernt. Anschließend wurde der Kamm mit den Probenfächerchen eingesetzt und mit frisch hergestelltem Sammelgel wurde die Gelkammer vollends aufgefüllt. Nach einer Stunde war auch das Sammelgel polymerisiert. Das Gel wurde in der Elektrophorese Apparatur befestigt und ihr Boden wurde ca. 2 cm hoch mit Laufpuffer aufgefüllt. Anschließend wurde der Kamm, ohne Beschädigung der Fächerchen, vorsichtig herausgenommen. Um Gelreste und Luftblasen zu entfernen,

wurden die Geltaschen anschließend mit Laufpuffer gespült. Kollabierte Taschen wurden gegebenenfalls mit einem dünnen Spatel in Form gebracht.

Alle zu testenden Rohextrakte wurden auf eine einheitliche Proteinkonzentration mit destilliertem Wasser verdünnt. Je nach Expressionintensität des gesuchten Proteins wurden 100-200 µg Protein eingesetzt; von chromosomal getaggen Proteinen entsprechend mehr als von überexprimierten Proteinen. 80 µl verdünnter Rohextrakt wurden 20 µl 6x Probenpuffer versetzt. Die Lösung wurde gut gemischt und 10 min im Heizblock gekocht. Anschließend wurden die Proben vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Auch ein Proteinmarker wurde aufgetragen. Bis die Proben ihre Taschen verlassen hatten, wurde die Elektrophorese mit 80 V durchgeführt, später wurde die Spannung dann auf 120 V erhöht und die Elektrophorese wurde gestoppt, als die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte. Alternativ konnte die Elektrophorese auch bei 30 V über Nacht durchgeführt werden.

#### **2.15.4 Semi-dry Blot**

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde mit dem Gel ein semi-dry Blot durchgeführt. Hierzu wurden 6 Blatt Whatman 3MM-Papier und eine Nitrocellulosemembran exakt auf die Größe des Trenngels zugeschnitten, wobei Whatman Papier und Membran nur mit Handschuhen berührt wurden. Die Whatman-Papiere und die Nitrocellulosemembran wurden gründlich in Blotpuffer getränkt. Anode und Kathode der Blotapparatur wurden ebenfalls mit Blotpuffer benetzt. Auf die Anode wurden dann 3 Lagen Whatman-Papier, die Membran und anschließend das abgetrennte Trenngel exakt übereinander geschichtet. Die linke obere Ecke des Gels und der Membran wurden zur Markierung abgeschnitten. Zur Kathodenseite hin wurden dann nochmal 3 Lagen Whatman-Papier auf das Gel geschichtet. Eventuell eingeschlossene Luftblasen wurden dann durch Abrollen einer Glaspipette hinausgedrückt. Anschließend wurde die Blot-Apparatur durch auflegen der Kathode geschlossen. Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran fand bei konstantem Strom ( $0,4 \text{ mA/ cm}^2$ ) innerhalb von 45 min statt.

#### **2.15.5 Ponceau-S-Färbung**

In einer Ponceau-S-Färbung können Proteine, die nach einem Blot an einer Membran haften, rosa angefärbt werden. 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**

Die Membran wurde 1 h bei RT oder über Nacht im Kühlraum in 50 ml Blockpuffer + 5 % Milchpulver auf dem Schüttler inkubiert. Der Blockpuffer wurde verworfen und die Membran wurde dann dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der Primärantikörper zugegeben und für 1 h bei RT auf dem Schüttler 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 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 Detektion durch Chemolumineszenz (ECL)**

Zur Membran wurden je 5 ml ECL-Lösung 1 und 2 geschüttet; in die Lösung 2 waren direkt davor 3,06 µl 30 %iges Wasserstoffperoxid pipettiert worden. Die Membran wurde exakt eine Minute in dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran sofort in eine dünne Klarsichthülle gelegt oder alternativ in Plastikfolie eingeschweißt. Überschüssige Flüssigkeit und Luftblasen wurden durch Glattstreichen der Folie mit einem fusselfreien Tuch entfernt. Die Glassichtfolie mit der Membran wurde in eine lichtundurchsichtige Kassette gelegt und im Dunekelraum wurde ein Film auf die Membran gelegt. Die Dauer der Exposition 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.

### **2.15.8 Stripping**

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

## 3 Ergebnisse

### 3.1 YCA1 – eine caspaseartige Sequenz im Genom von *Saccharomyces cerevisiae*

In einer PSI-BLAST Suche fanden Uren *et al.* (Uren *et al.*, 2000) eine Gruppe von caspaseähnlichen Proteinen, die sie Para- und Metacaspasen nannten. Diese Gruppe zeigt in der Primärstruktur starke Homologie zu den Säugercaspasen: auch die Para- und Metacaspasen besitzen ein hoch konserviertes Histidin und Cystein, die der katalytischen Diade der Caspasen entsprechen könnten. Des Weiteren weisen die Para- und Metacaspasen eine den Caspasen ähnliche Sekundärstruktur auf. Metacaspasen besitzen mit YOR197w einen Vertreter in *S. cerevisiae*. Im folgenden möchte ich darlegen, dass sich das Genprodukt von Yor197w in der Hefeapoptose wie eine *bona fide* Caspase verhält und deshalb von uns mit Yca1p für Yeast Caspase-1 benannt wurde.

#### 3.1.1 YCA1 besitzt caspaseartige Aktivität

Um endogene Caspaseaktivität nach Apoptoseinduktion messen zu können, haben wir einen Caspaseaktivitätstest entwickelt (Madeo *et al.*, 2002). FITC-VAD-fmk wird hierbei mit den zu untersuchenden Hefekulturen inkubiert. FITC-VAD-fmk bindet am katalytischen Zentrum von aktiven Caspasen und führt dadurch zu einer Änderung der Fluoreszenz, die von einem FACS-Gerät gemessen werden kann. Es handelt sich hierbei um eine *in vivo* Messung der Caspaseaktivität.

Mit einer stationären Vorkultur wurden der Wildtyp (KFY 715) und die YCA1-Disruptante (KFY 729) auf eine Zellzahl von  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml beimpft und die Kulturen wurden für 4 Stunden bei 28°C kultiviert. Nachdem mit dem Zellzähler sichergestellt worden war, dass die Stämme angewachsen waren, wurden die Kulturen halbiert. 0,4 mM Wasserstoffperoxid wurde den Kulturen als Apoptosestimulus zugesetzt, nicht aber den entsprechenden Kontrollen.

Kultur	Caspaseaktivität [%]
WT	5
WT + 0,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	54
dYCA1	4
dYCA1 + 0,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8

Abb. 4: Caspaseaktivität von WT und  $\Delta$ YCA1 mit und ohne 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Der unbehandelte Wildtyp zeigte praktisch keine Caspaseaktivität, wurde er hingegen mit 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt, besaß er mehr als 50 % caspasepositive Zellen. Beim YCA1-Disruptionsstamm konnte hingegen auch die Zugabe von Wasserstoffperoxid zu keiner deutlichen Caspaseaktivität führen. Behandelte Zellen besaßen mit 8 % nur unwesentlich höhere Aktivität als die unbehandelte Kontrolle. Zusätzlich zum Wildtyp und der YCA1-Disruptanten wurde auch ein Stamm mit YCA1 Überexpression, der Stamm mit Cystein 297 Punktmutation der Caspase und die entsprechende Kontrolle mit Leerplasmid auf Caspaseaktivität untersucht. Der induzierbare Promotor wurde durch einen Medienshift der Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase aktiviert. Nach dem Shift wurde die eine Hälfte der Kulturen mit 0,4 mM Wasserstoffperoxid versetzt; der anderen Hälfte wurde kein Apoptosestimulus zugesetzt. Anschließend wurden die Kulturen für 26 Stunden weiterkultiviert und ihre Caspaseaktivität wurde dann gemessen.

Kultur	Caspaseaktivität [%]
Leervektor	11
Leervektor + 0,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	11
YCA1ex.	52
YCA1ex. + 0,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	84
Cys. Mutante + 0,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25

Abb. 5: Caspaseaktivität von der Vektorkontrolle und dem Stamm mit YCA1-Überexpression mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; sowie von der Cysteinmutante mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Der Stamm mit YCA1-Überexpression zeigte ohne die Gegenwart von Wasserstoffperoxid mit 52 % eine starke Caspaseaktivität, die durch die Zugabe von 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sogar noch auf 84 % caspasepositive Zellen erhöht werden konnte. Erwartungsgemäß besaß die Vektorkontrolle nur eine sehr geringe Caspaseaktivität; hier vermochte auch die Gabe von Wasserstoffperoxid nicht, die Caspaseaktivität zu

erhöhen. Die Einführung einer Punktmutation in die Hefecaspase YCA1 von Cystein 297 nach Alanin verringerte die Caspaseaktivität deutlich. Trotz der Gegenwart von 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> war die Caspaseaktivität mit 25 % deutlich unter der Aktivität der unmutierten Vergleichsprobe mit 84 % Caspasepositiven Zellen.

### **3.1.2 Die Überexpression von YCA1 führt zu Apoptose**

Zellen, die sich durch Apoptose töten, unterscheiden sich morphologisch von gesunden oder nekrotisch sterbenden Zellen. Die stärksten Veränderungen vollziehen sich im Zellkern. Chromatin kondensiert und aggregiert in halbmondförmiger Gestalt entlang der Kernhülle und DNA wird durch Nukleasen erst in große Fragmente und später in Oligomere mit 180-200 bp Länge gespalten. Zeitgleich verändert sich die Struktur des gesamten Zellkerns: er wird fragmentiert.

Um herauszufinden, ob YCA1 an der Exekution der Hefeapoptose beteiligt ist, haben wir den YCA1-Überexpressionsstamm, eine Leerplasmidkontrolle und den Stamm mit mutiertem YCA1 auf apoptotische Marker untersucht. Auch die Auswirkung von 0,4 mM Wasserstoffperoxid, das direkt nach dem Mediumshift zugesetzt worden war, wurde getestet. 26 Stunden nach dem Wechsel des Mediums wurde eine Überlebenspattierung durchgeführt.

Auf die Überlebensfähigkeit der Kontrolle mit Leerplasmid hatte die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keinen Einfluss, die behandelten Zellen überlebten fast ebenso gut wie die unbehandelten. Dieses Ergebnis korreliert mit der FACS-Messung zur Ermittlung der Caspaseaktivität. Dort besaßen weder die unbehandelte Vektorkontrolle, noch die Kontrolle in Gegenwart von Wasserstoffperoxid merkliche Caspaseaktivität.

Der Stamm mit überexprimierter Hefecaspase zeigte 26 Stunden nach dem Medienshift kaum vermindertes Überleben. Erst die Zugabe von Wasserstoffperoxid senkte die Überlebensfähigkeit der Zellen auf etwa 20 % drastisch. Auch das starke Sterben des mit Wasserstoffperoxid behandelten YCA1-Überexprimierers passt in das Bild der FACS-Messung; dort traten unter den selben Bedingungen 84 % FITC-VAD-fmk positive Zellen auf. Etwas erstaunlich war es fest zu stellen, dass der Stamm mit YCA1 Überexpression ohne die Gegenwart von Wasserstoffperoxid kaum starb. Erst nach einer 44 bzw. 96 stündigen Inkubation verringerte sich auch sein Überleben drastisch. Das chronologische Altern der Kultur scheint hier als Apoptosestimulus fungiert zu haben. Unsere Arbeitsgruppe konnte zu einem späteren Zeitpunkt zeigen, dass alte Hefen apoptotisch sterben (Herker *et al.*, 2004).

Die YCA1-Punktmutante zeigte 26 Stunden nach dem Medienshift in Gegenwart von Wasserstoffperoxid eine nur geringfügig verminderte Überlebensfähigkeit, die gut zur geringen Caspaseaktivität in der FACS-Messung passte (nicht gezeigt).

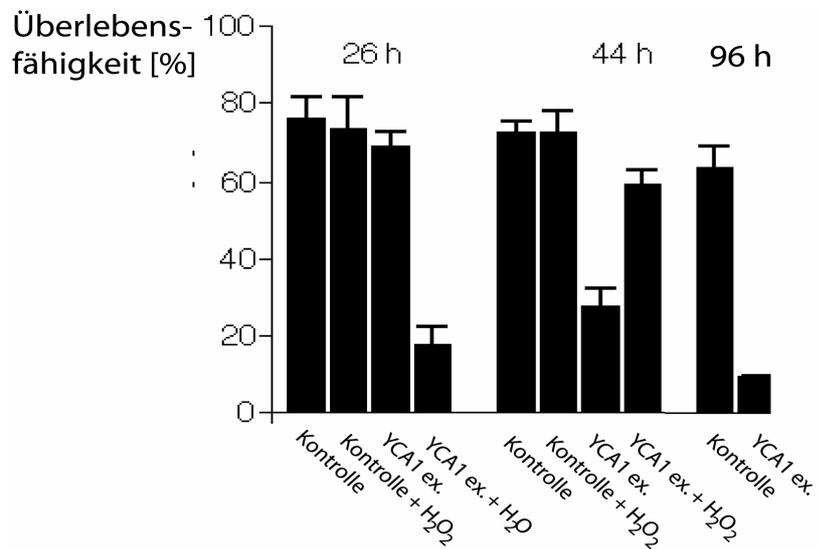


Abb. 6: Überlebensplattierung von der Kontrolle, dem Stamm mit YCA1-Überexpression mit und ohne Wasserstoffperoxid; 26, 44 und 96 h nach dem Medienshift.

Neben der Überlebensfähigkeit wurden die Kulturen auf DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation als typische Apoptosemarker untersucht.

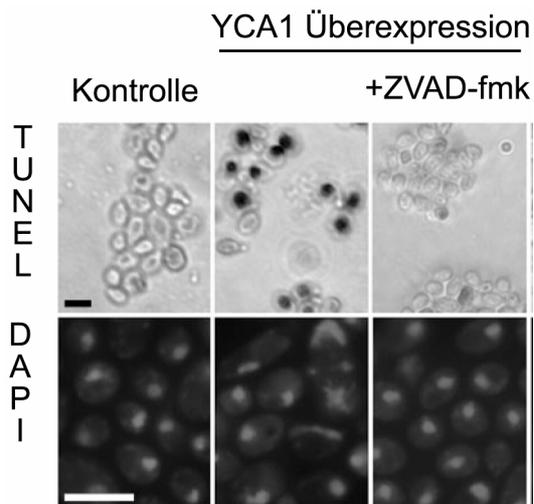


Abb. 7: TUNEL- und DAPI-Färbung von der WT-Kontrolle und dem Stamm mit YCA1-Überexpression; sowie in Gegenwart von zVAD-fmk beim YCA1-Überexprimierer.

Zellen mit YCA1-Überexpression zeigten nach 26 stündiger Inkubation mit 0,4 mM Wasserstoffperoxid eine starke TUNEL-Färbung, die durch die Zugabe des Caspaseinhibitors zVAD-fmk verhindert werden konnte. Die entsprechende Kontrolle mit Leerplasmid zeigte hingegen keinerlei DNA-Fragmentierung und auch die Cysteinmutante besaß unter dem Lichtmikroskop keine dunkel gefärbten TUNEL positiven Kerne.

Analog verhielten sich die Kulturen auch bei der DAPI-Färbung, die Chromatinkondensation sichtbar macht. Das Chromatin des Kontrollstammes war normal geformt, der Stamm mit YCA1-Überexpression besaß hingegen stark verändertes Chromatin; auch dieser apoptotische Marker konnte durch die Zugabe von zVAD-fmk eliminiert werden. Des Weiteren führte der Austausch des Cystein 297, das sich vermutlich im aktiven Zentrum der Hefecaspase YCA1 befindet, zu normal geformten Chromatin in der DAPI-Färbung.

### 3.1.3 Die Disruption von YCA1 schützt vor Apoptose

Um herauszufinden, ob YCA1 für die Exekution der Apoptose in Bäckerhefe essentiell ist, haben wir auch den  $\Delta$ YCA1-Stamm und den entsprechenden Wildtyp mit Wasserstoffperoxid belastet und anschließend auf apoptotische Marker untersucht. Wie bei der Messung der Caspaseaktivität wurde auch hier bei einer niederen Zellzahl gearbeitet. Mit einer stationären Vorkultur wurden die beiden Stämme auf eine Zellzahl von  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml beimpft, für 4 Stunden bei  $28^\circ\text{C}$  kultiviert und dann aliquotiert. 0,4, 0,8 und 1,2 mM Wasserstoffperoxid wurde den Kulturen als Apoptosestimulus zugesetzt, nicht aber den entsprechenden Kontrollen. Nach weiteren 4 Stunden Inkubation wurde eine Überlebensplattierung durchgeführt.

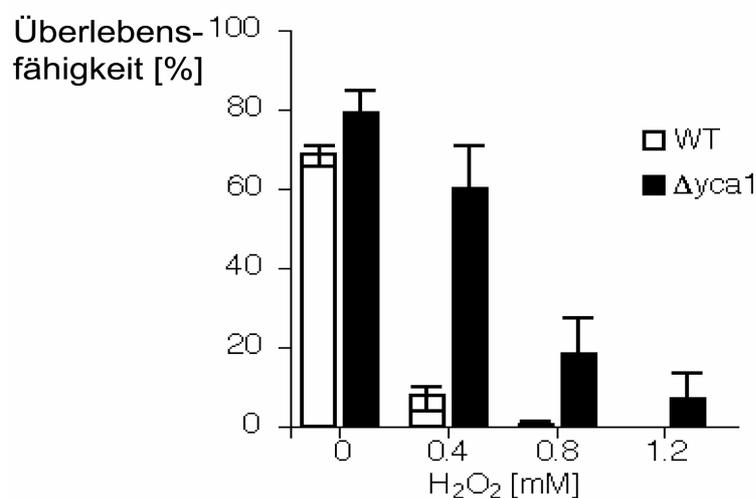


Abb. 8: Überlebensplattierung vom Wildtyp und  $\Delta$ YCA1 nach Belastung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid.

Ohne den Zusatz von Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus überlebten etwa 70 % der Wildtyphefen, beim YCA1-Disruptionsstamm war die Überlebensfähigkeit mit etwa 80 % noch größer. Die Inkubation mit Wasserstoffperoxid führte konzentrationsabhängig bei beiden Stämmen zu einem schlechteren Überleben, wobei der  $\Delta$ YCA1-Stamm bei allen  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentrationen deutlich besser überlebte als der Wildtyp. Nach Zugabe von 0,4 mM Wasserstoffperoxid überlebten etwa 60 % der  $\Delta$ YCA1-Zellen. Beim Wildtyp waren unter den selben Bedingungen hingegen nur noch etwa 10 % der Zellen in der Lage Kolonien zu bilden.

Auch die TUNEL- und DAPI-Färbung bestätigten YCA1 als wichtigen Exekutor der Hefeapoptose.

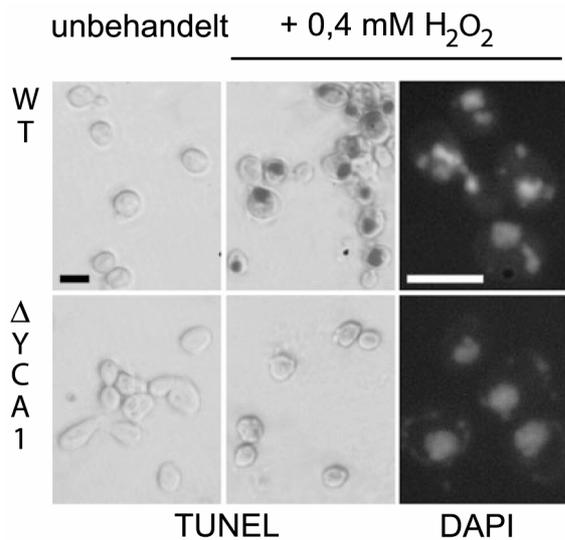


Abb. 9: TUNEL- und DAPI-Färbung von Wildtyp und  $\Delta$ YCA1 nach Sauerstoffstress.

Sowohl der unbehandelte Wildtyp, als auch der unbehandelte YCA1-Disruptionsstamm zeigten weder DNA-Fragmentierung noch ein verändertes Chromatin in der DAPI-Färbung. Nach vierstündiger Inkubation mit 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> besaß der Wildtyp einen apoptotischen Phänotyp und war stark TUNEL und DAPI positiv. Der Stamm mit disruptierter Hefecaspase zeigte hingegen unter den selben Bedingungen weder DNA-Fragmentierung, noch wies sein Chromatin eine abnormale Gestalt auf, YCA1 scheint also für die Ausprägung eines apoptotischen Phänotyps essentiell zu sein.

### 3.1.3.1 YCA1 – eine *bona fida* Caspase: Diskussion

Silke Wissing konnte durch einen Immunoblot zeigen, dass im YCA1-Überexpressionskonstrukt die Hefecaspase als inaktives Zymogen mit 52 kDa syntetisiert wird. Ferner wird auch bei ihr – wie bei Säugercaspasen - während der Prozessierung ein kleines C-terminales Fragment mit etwa 12 kDa abgespalten. Eine Verkürzung der Inkubationszeit nach der Induktion der Expression von YCA1 führte zu einer verringerten Yca1p Konzentration im Immunoblot und auch das kleine C-terminale Fragment blieb aus. Wegen der zu geringen Konzentration wurde die Caspase folglich nicht prozessiert. Auch in Säugern ist eine bestimmte Menge der Caspase nötig, um eine autokatalytische Aktivierung der Caspase bewirken zu können. Ferner fehlte auch bei der Cystein-Mutante das kleine Fragment. Für ihre Prozessierung benötigt die Hefecaspase folglich den Cystein Rest 297 (Madeo *et al.*, 2002).

Im Wildtyp konnten ich durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid eine Aktivierung der endogenen Caspaseaktivität nachweisen. Auch die plasmidische Caspase im Überexpressionsprodukt konnte durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid stark aktiviert werden. Die Leerplasmid-Kontrolle zeigte hingegen bei der selben Konzentration an Wasserstoffperoxid, die dem Wildtyp zugesetzt wurde, keinerlei Caspaseaktivität, obwohl auch dieser Stamm eine endogene Caspase besitzt. Der Grund hierfür ist in der unterschiedlichen Zelldichte, bei der die beiden Versuche durchgeführt wurden, zu suchen. Wildtyp und  $\Delta$ YCA1 wurden bei einer sehr geringen Zellzahl von etwa  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml mit Wasserstoffperoxid belastet, wohingegen beim YCA1-Überexpressionskonstrukt und der Leerplasmid Kontrolle die Zugabe des Sauerstoffstresses erst bei einer viel höheren Zellzahl von etwa  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml erfolgte. Nach Steels *et al.* besitzen Hefekulturen mit einer hohen Zellzahl auch eine höhere Toleranz gegen Sauerstoffstress, weil bei ihnen verstärkt Redox-Schutz-Enzyme vorhanden sind (Steels *et al.*, 1994).

Säugercaspasen können auf drei unterschiedlichen Wegen aktiviert werden. Ein spezifischer Ligand bindet an den Fas Rezeptor, wodurch die Caspasen 8 und 10 aktiviert werden. Beim zweiten Weg bindet ein Ligand an den TNF Rezeptor und aktiviert dadurch die Caspasen 2 und 8. Auch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien kann bei Säugern zur Aktivierung der Caspasekaskade führen – es wird hierbei zunächst die Caspase 9 aktiviert. Durch welchen Mechanismus die Hefecaspase aktiviert wird, ist noch unklar. Um dies zu untersuchen, wurden von Eva

Herker ein Zellextrakt des YCA1-Überexpressionsstammes auf seine Fähigkeit fluorogene Caspasesubstrate von Säugern zu spalten, getestet (Madeo *et al.*, 2002). Eine hohe Aktivität konnte in Gegenwart von IETD, einem typischen Säugersubstrat der Initiatorcaspase 8, erzielt werden. Die Hefecaspase YCA1 scheint hiernach also der Säugercaspase 8 am ähnlichsten zu sein. Auch konnten Kang *et al.* zeigen, dass Caspase 8 Zymogene, die in der Bäckerhefe überexprimiert wurden, in der Lage sind, sich autokatalytisch zu aktivieren (Kang *et al.*, 1999). Des Weiteren ist die heterologe Expression von Säugercaspasen in Hefe einzig bei Caspase 8 cytotoxisch.

Vieles spricht folglich dafür, dass die Hefecaspase YCA1 bezüglich ihrer Funktion der Initiatorcaspase 8 in Säugern am ähnlichsten ist. *C. elegans* besitzt nur eine einzige Caspase, die sich selbst aktivieren kann - dies wäre sicherlich auch bei der einzelligen Hefe denkbar. Diese Caspase müsste dann Eigenschaften einer Initiatorcaspase aufweisen.

Nachdem wir nun zeigen konnten, dass Yca1p caspaseartig prozessiert wird, Caspaseaktivität aufweist, durch den Säugercaspaseinhibitor zVAD-fmk (Diplomarbeit, Corinna Maldener) inhibiert werden kann und ihre Überexpression in Hefe zu einem Tod mit apoptotischem Phänotyp führt, haben wir YCA1 als Caspase von *S. cerevisiae* bestätigt. Dadurch konnten wir dem Kritikpunkt, in Hefe gäbe es keine Homologen zu den klassischen Apoptoseauslösern, endgültig entgegenreten. YCA1 nimmt in der Hefeapoptose eine zentrale Rolle ein und im folgenden möchte ich zeigen, dass sie auch an der, durch Salzstress ausgelösten Apoptose, beteiligt ist.

## 3.2 Salzstress kann Apoptose in Hefe auslösen

In Säugerzellen führt eine Veränderung der Ionenhomöostase zu Apoptose (Yu *et al.*, 2001). Eine Erhöhung von  $\text{Ca}^{2+}$  ist, abhängig von Konzentration, Zeitpunkt und der subzellulärer Verteilung, entweder apoptoseauslösend oder wirkt inhibierend. Eine Verringerung an intrazellulärem  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  löst wahrscheinlich Apoptose aus. Auch in der Bäckerhefe ist eine gestörte Ionenhomöostase apoptoseauslösend.

Das Hefegen SRO7 codiert für ein Protein mit 1033 Aminosäuren. Es besitzt keine vorhergesagten Transmembrandomänen. Datenbankrecherchen in der *Saccharomyces* Genome Database zeigten 53 % Aminosäuren-Sequenz-übereinstimmung mit SRO77. Des weiteren konnte eine Homologie mit dem *Drosophila lethal (2) giant larvae* Tumorsupressor Gen [*l(2) gl*] nachgewiesen werden. Auch in Maus und Mensch sind Homologe zu *l(2) gl* bekannt (Strand *et al.*, 1994, Tomotsune, *et al.*, 1993).

Die Disruption von SRO7 führt in Hefen zu einer stark erhöhten Sensitivität gegen, durch NaCl ausgelösten Salzstress, nicht aber zu einer generell erhöhten Sensitivität gegenüber osmotischem Stress (Larsson *et al.*, 1998), wohingegen  $\Delta\text{SRO77}$  nur eine geringfügig erhöhte Sensitivität gegen NaCl aufweist. Die Doppeldisruptante  $\Delta\text{SRO7}\Delta\text{SRO77}$  zeigt eine starke Sensitivität gegenüber  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Li}^+$  - es scheinen also sowohl  $\Delta\text{SRO7}$ , als auch  $\Delta\text{SRO77}$  an der Kationenhomöostase beteiligt zu sein.

### 3.2.1 Milder NaCl Stress führt zum Tod der SRO7- und SRO7SRO77-Disruptanten

Überlebensplattierungen zeigten die Sensitivität von  $\Delta\text{SRO7}$  (FMY 476) und von  $\Delta\text{SRO7}\Delta\text{SRO77}$  (FMY 396) gegenüber Salzstress (nicht gezeigt). Bereits eine zehnminütige Inkubation mit 0,7 M NaCl tötete 30 % beider Stämme und nach 6 Stunden waren weniger als 5 % der Hefezellen in einer Überlebensplattierung in der Lage Kolonien zu bilden. Die beiden Stämme wachsen durch milden Salzstress also nicht nur, wie von Larssen *et al.* (Larssen *et al.*, 1998) beschrieben, schlechter, sondern sterben. Dieselbe Salzkonzentration hatte auf das Überleben des Wildtyps kaum Einfluss.

### 3.2.2 Nach Salzstress sterben $\Delta$ SRO7 und $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77 apoptotisch

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) haben bei der Hefeapoptose zwei Funktionen: sie sind ein Stimulus für das Auslösen von Apoptose und ihre Akkumulation ist ein Apoptosemarker (Madeo *et al.*, 1999). Mit einer Dihydrorhodamin 123-Färbung ist es möglich die Akkumulation von ROS nachzuweisen. Wir haben die SRO7-Disruptante, die  $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77-Doppeldisruptante und den Wildtyp auf eine Anreicherung von ROS untersucht. Auch die salzsensitiven  $\Delta$ GPD1- und  $\Delta$ CKB1-Mutanten wurden Salzstress ausgesetzt. Hierzu wurden zu exponentiell wachsenden Kulturen mit einer OD<sub>600</sub> von 0,3-0,6 unterschiedliche Volumina Minimalmedium mit 12 % NaCl zugesetzt, um eine Endkonzentration von 0,4 M, 0,6 M, 0,8 M und 1 M NaCl zu erreichen. Die Kontrollen wurden mit dem entsprechenden Volumen Minimalmedium versetzt. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Kulturen auf eine Akkumulation von ROS durch eine DHR-Färbung untersucht.

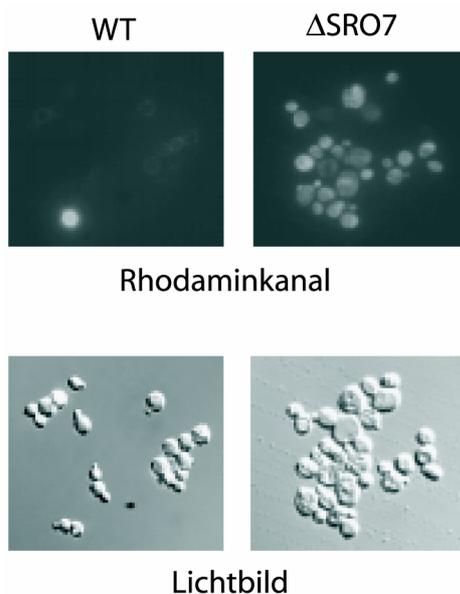


Abb. 10: DHR-Färbung von WT und  $\Delta$ SRO7 nach Salzstress.

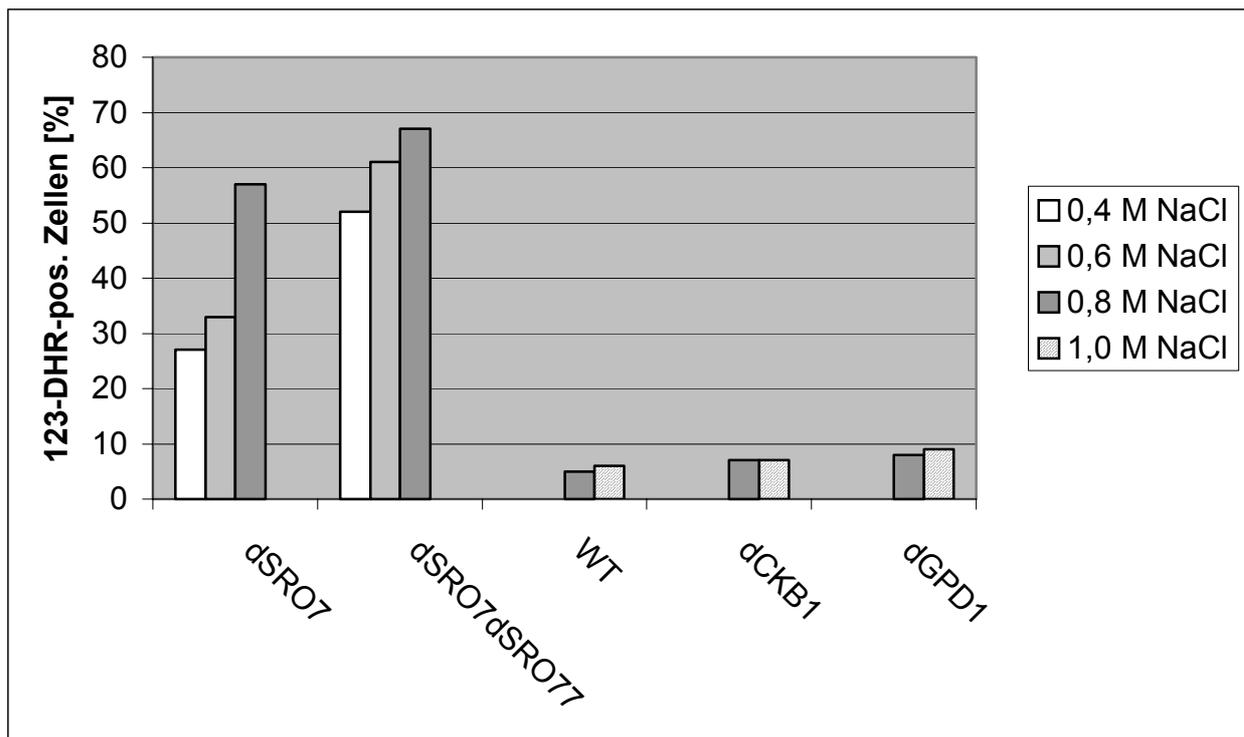


Abb. 11: Prozentualer Anteil an DHR-positiven Zellen nach Salzstress.

Niedere Konzentrationen von NaCl zeigten sowohl im  $\Delta$ SRO7-Stamm als auch bei der Doppeldisruptanten  $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77 eine Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies. Bei 0,4 M NaCl zeigte  $\Delta$ SRO7 ca. 25 % DHR-gefärbte Zellen; bei der Doppeldisruptante waren bei dieser Konzentration bereits doppelt so viele Zellen DHR positiv. Auch bei 0,6 und 0,8 M NaCl war die Akkumulation von ROS bei  $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77 stärker als im SRO7-Disruptionsstamm. Sowohl der Wildtyp als auch die salzsensitiven  $\Delta$ GPD1 und  $\Delta$ CKB1 Mutanten zeigten bei niederen NaCl-Konzentrationen kaum Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies. Selbst die Gegenwart von 1 M NaCl führte bei diesen Stämmen nur zu 5-10 % DHR positiven Zellen.

### 3.2.3 Die $\Delta$ SRO7 und die $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77 Mutante zeigen Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung nach Salzstress

Wildtyp (KFY 715),  $\Delta$ SRO7,  $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77,  $\Delta$ GPD1 und  $\Delta$ CKB1 wurden auf DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation untersucht. Die Kulturen wurden hierfür in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer  $OD_{600}$  von 0,3-0,6 mit 0,7 M NaCl für eine Stunde gestresst.

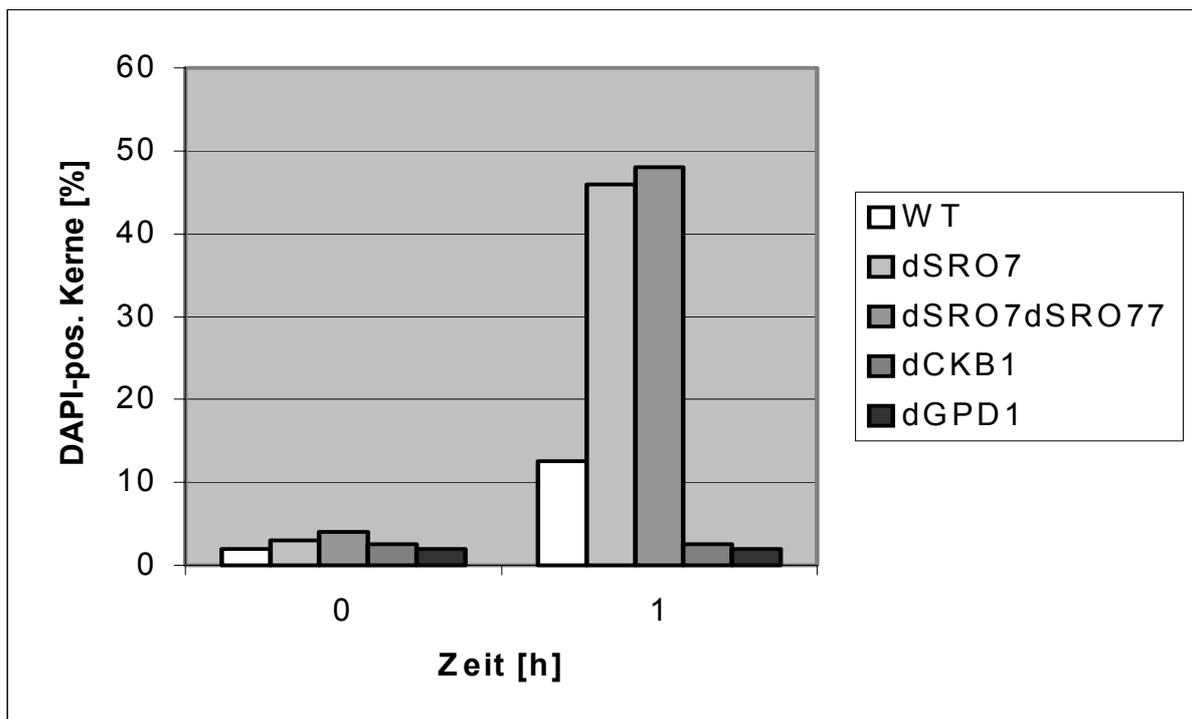


Abb. 12: Prozentualer Anteil der Zellen mit Chromatinkondensation.

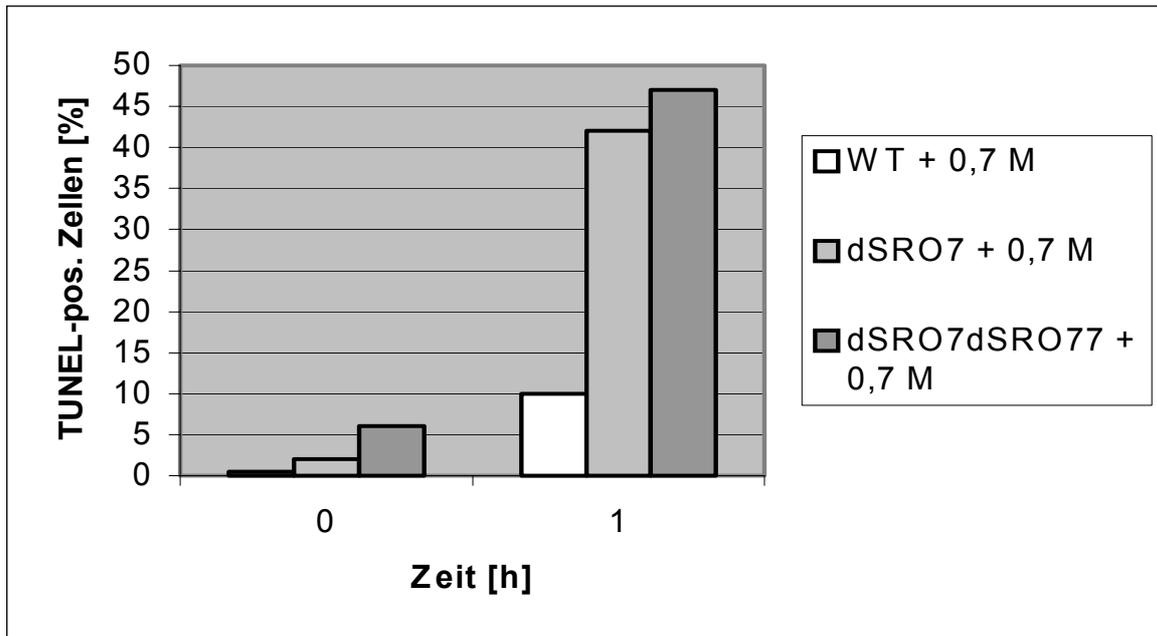


Abb. 13: Prozentualer Anteil von TUNEL-positiven Zelle.

Weder der Wildtyp noch  $\Delta$ GPD1 und  $\Delta$ CKB1 zeigten bei 0,7 M NaCl eine veränderte Morphologie ihres Chromatins, wohingegen die Hälfte der Kerne von  $\Delta$ SRO7 und  $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77 kondensiertes Chromatin aufwiesen. Bei niedrigeren Salzkonzentrationen nahm die Menge der kondensierten Kerne ab, wobei der SRO7-Disruptionsstamm noch weniger Chromatinkondensation als die Doppeldisruptante zeigte (Daten nicht gezeigt).

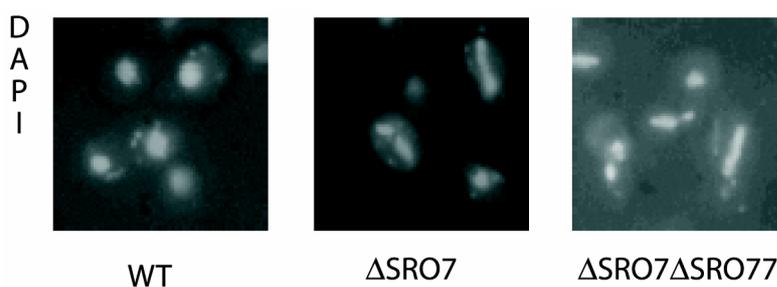


Abb. 14: DAPI-Färbung von WT,  $\Delta$ SRO7,  $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77.

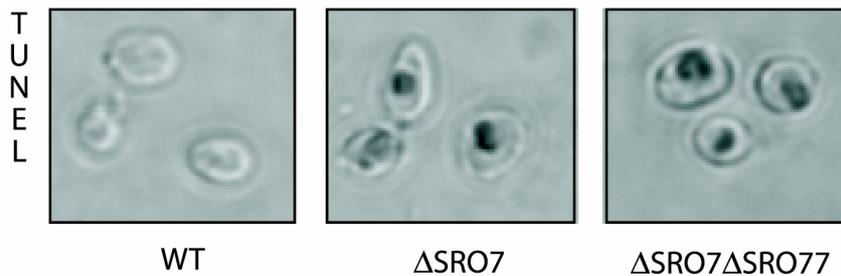


Abb. 15: TUNEL-Färbung von WT,  $\Delta$ SRO7,  $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77.

Bei einem Salzstress von 0,7 m NaCl für eine Stunde trat beim Wildtyp keine DNA-Fragmentierung auf, wohingegen sowohl bei  $\Delta$ SRO7 als auch bei  $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77 fast die Hälfte aller Kerne TUNEL-positiv waren.

### 3.2.4 Salzstress aktiviert die Hefecaspase YCA1 in einem Überexpressions-Konstrukt

YCA1 codiert für die bis dato einzige beschriebene Caspase in Hefe (Madeo *et al.*, 2002). Um zu untersuchen, ob Salzstress zu einer Aktivierung der Hefecaspase führt, wurde mit einem Überexpressionsvektor (FMY 17), in dem sich YCA1 unter Einfluss eines Galaktose Promotors befand, gearbeitet. Als Kontrolle diente das entsprechende Leerplasmid ohne Insert (FMY 29). Mit einer Übernachtskultur wurden 30 ml Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 beimpft und bei 28°C auf dem Schüttler kultiviert, bis die Kulturen eine OD<sub>600</sub> von 0,3-0,6 besaßen. Dann wurde durch einen Medienwechsel auf galaktosehaltiges Medium die Expression der Hefecaspase induziert und die Kultur wurde in 3x10 ml Aliquots aufgeteilt. 17 h nach dem Medienshift wurden die Kulturen durch die Zugabe einer sterilen wässrigen NaCl-Lösung auf eine Kochsalzkonzentration von 0,5 und 1 M eingestellt. Nachdem die Kulturen weitere 3 h auf dem Schüttler inkubiert worden waren, erfolgte eine Überlebensplattierung.

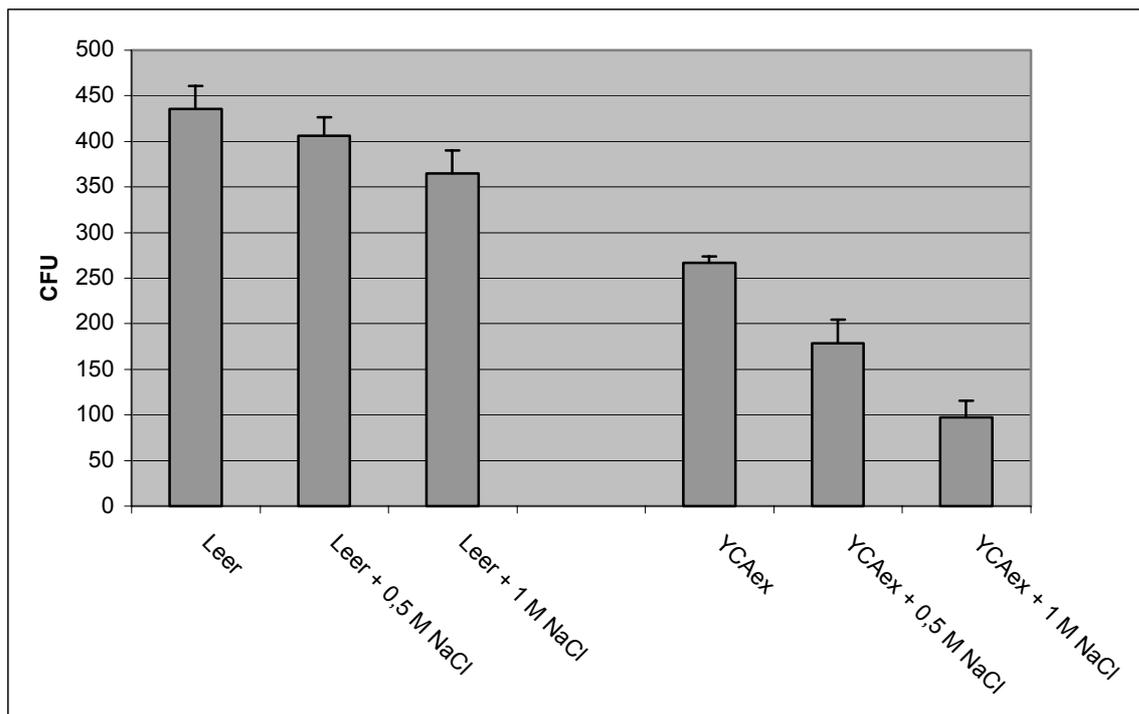


Abb. 16: Einfluss von NaCl auf die Überlebensfähigkeit von YCA1-Überexprierer und Leerplasmid.

Die Überlebensplattierung zeigt deutlich, dass Salzstress Hefen mit überexprimierender Caspase konzentrationsabhängig tötet. Von 500 ausplattierten Zellen waren bei 0,5 M NaCl noch etwa 180 Zellen in der Lage Kolonien zu bilden, bei 1 M NaCl waren es gerade noch etwa 100 Zellen. Auf die Überlebensfähigkeit der Kontrolle hatten die selben NaCl-Konzentrationen hingegen kaum Einfluss: die CFU betrug bei 0,5 M NaCl 406 und bei 1 M NaCl noch 365.

Zusätzlich zur Überlebensfähigkeit nach Salzstress wurde in einer FACS-Messung die Caspaseaktivität des Stammes mit YCA1-Überexpression und der Leerplasmidkontrolle getestet. FITC-VAD-fmk bindet im katalytischen Zentrum von aktiven Caspasen und bewirkt dadurch eine Änderung der Fluoreszenz, die durch eine FACS-Messung dokumentiert wurde.

Kultur	Caspaseaktivität [%]
YCA1ex	21,7
YCA1ex + 1,5M NaCl	29,8
Leerplasmid	2,7
Leerplasmid + 1,5M NaCl	4,2

Abb. 17: Caspaseaktivität vom Stamm mit YCA1-Überexpression und der Leerplasmidkontrolle, abhängig von der zugesetzten NaCl Konzentration.

Die Kultur mit überexprimierter Caspase zeigte alleine durch den Medienwechsel, der zur Expression der Hefecaspase führte, eine Caspaseaktivität von über 20 %. Durch den Zusatz von 1,5 M NaCl konnten diese Aktivität auf fast 30 % erhöht werden. Beim Leerplasmid stieg die Caspaseaktivität durch Salzstress hingegen nur unmerklich an.

### **3.2.5 Die Hefecaspase YCA1 ist in Wildtyphefen notwendig für den Salzstress induzierten Zelltod**

Wird YCA1 in Wildtyphefen deletiert, überleben die Zellen starken Sauerstoffstress besser als der Wildtyp. YCA1 vermittelt folglich Apoptose, die durch Wasserstoffperoxid ausgelöst wird. Auch wenn Essigsäure als Stimulus fungiert, verläuft die Apoptose über YCA1 (Ludovico *et al.*, 2002). Daher liegt es nahe zu untersuchen, ob auch durch starken Salzstress induzierter Apoptose in Wildtyphefen von der Hefecaspase YCA1 vermittelt wird.

In der exponentiellen Wachstumsphase wurden Wildtyphefen (KFY 715) mit 1,2 M NaCl für 4 Stunden gestresst, wodurch sie deutlich in einer Überlebensplattierung starben (nicht gezeigt). Der  $\Delta$ YCA1-Stamm (KFY 729) zeigte unter den gleichen Bedingungen kaum eine Verringerung seiner Überlebensfähigkeit.

In einer FACS-Messung wurde die Caspaseaktivität vom Wildtyp und dem YCA1-Disruptionsstamm getestet. Sowohl der Wildtyp als auch  $\Delta$ YCA1 wurden 4 Stunden mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen inkubiert.

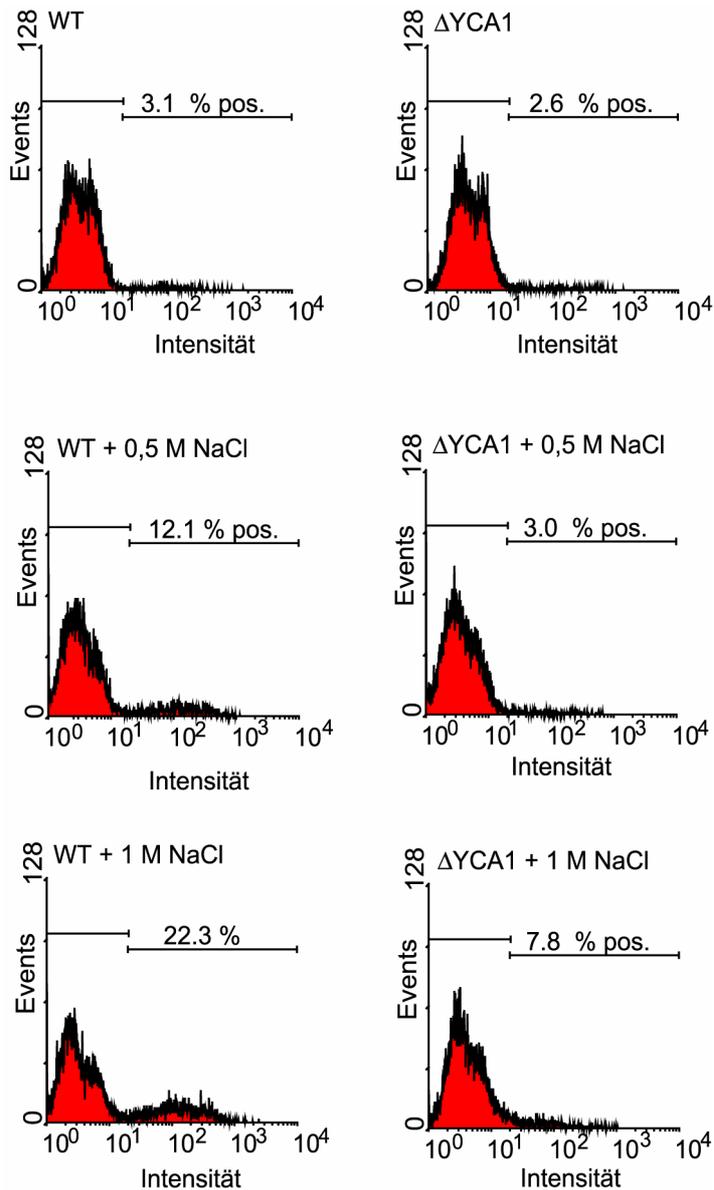


Abb. 18: Caspaseaktivität von WT und  $\Delta$ YCA1 nach Salzstress.

Ohne Salzstress zeigten beide Stämme nur eine sehr geringe Caspaseaktivität – es waren jeweils etwa 3 % der Zellen caspasepositiv. Die Gegenwart von 0,5 M NaCl führte im Wildtyp zu 12,1 % Caspaseaktivität; die Vergleichsprobe des Caspase Disruptionsstammes zeigte hingegen nur ein basales Level an Caspaseaktivität. Bei 1,0 M NaCl war der Unterschied der Caspaseaktivität beträchtlich: 22,3 % der Wildtyphefen waren Caspasepositiv, wohingegen bei  $\Delta$ YCA1 nur 7,8 % der Zellen Caspaseaktivität aufwiesen.

### 3.2.6 Durch Salzstress ausgelöste Apoptose ist im SRO7-Disruptionsstamm caspaseabhängig

Um herauszufinden, ob durch Salzstress ausgelöste Hefeapoptose im SRO7-Disruptionsstamm caspaseabhängig ist, haben wir die Überlebensfähigkeit von Wildtyp,  $\Delta YCA1$ ,  $\Delta SRO7$  und  $\Delta SRO7\Delta YCA1$  (FMY 394) miteinander verglichen. Alle vier Stämme wurden mit 0,7 M NaCl gestresst und es wurden 10 min, 20 min, 60 min und 120 min nach dem Salzstress eine Überlebensplattierung durchgeführt.

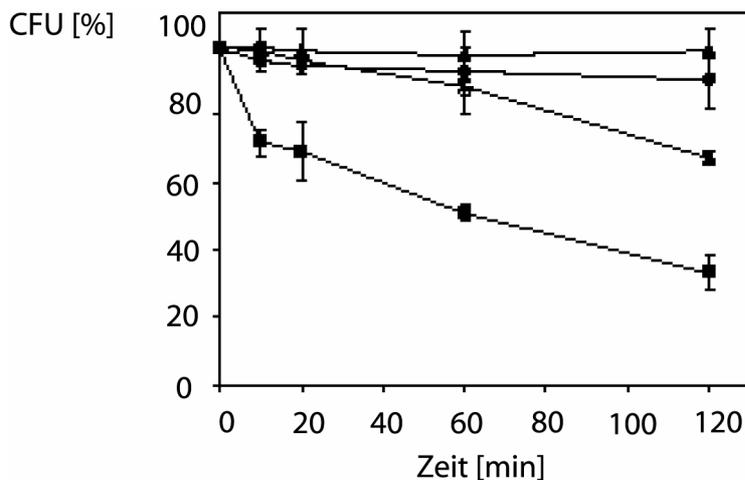
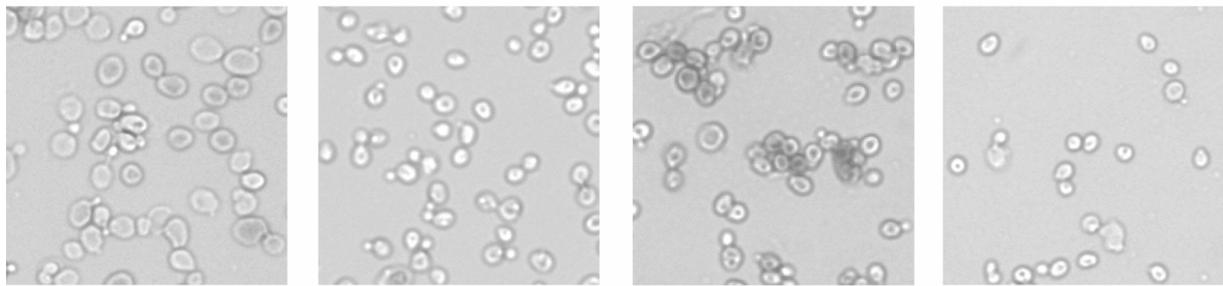


Abb. 19: Überlebenskinetik von WT (▲),  $\Delta YCA1$  (●),  $\Delta SRO7\Delta YCA1$  (dritte Kurve von oben) und  $\Delta SRO7$  (■) nach 0,7 M NaCl.

Von 500 ausplattierten Zellen waren beim Wildtyp und dem YCA1-Disruptionsstamm fast alle Zellen in der Lage Kolonien zu bilden. Der SRO7-Disruptionsstamm starb hingegen stark; 2 Stunden nach dem Salzstress überlebten bei ihm nur noch ca. 40 % der ausplattierten Zellen. Die zusätzliche Disruption der Hefecaspase rettete den  $\Delta SRO7$  Stamm deutlich: der  $\Delta SRO7\Delta YCA1$ -Stamm besaß nach 2 Stunden Salzstress noch etwa 75 % überlebensfähige Zellen.

Auch zeigte  $\Delta SRO7\Delta YCA1$  viel weniger DNA-Fragmentierung als der SRO7-Disruptionsstamm.

0 M NaCl



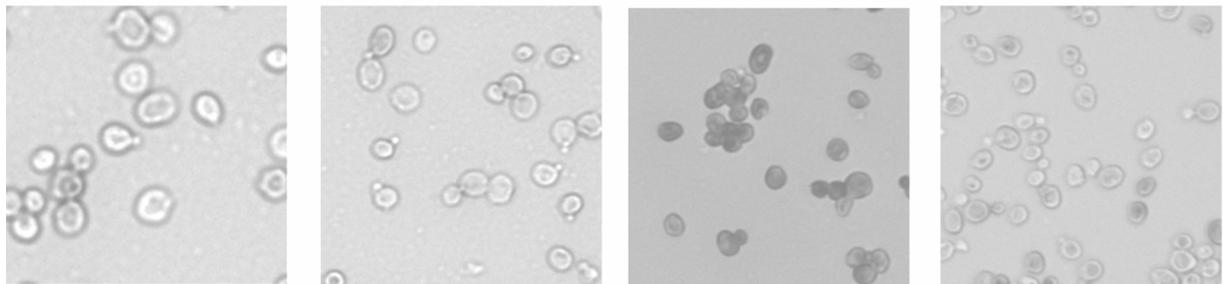
WT

$\Delta YCA1$

$\Delta SRO7$

$\Delta SRO7\Delta YCA1$

0,7 M NaCl



WT

$\Delta YCA1$

$\Delta SRO7$

$\Delta SRO7\Delta YCA1$

Abb. 20: TUNEL-Färbung von WT,  $\Delta YCA1$ ,  $\Delta SRO7$ ,  $\Delta SRO7\Delta YCA1$  nach einstündiger Inkubation mit und ohne 0,7 M NaCl.

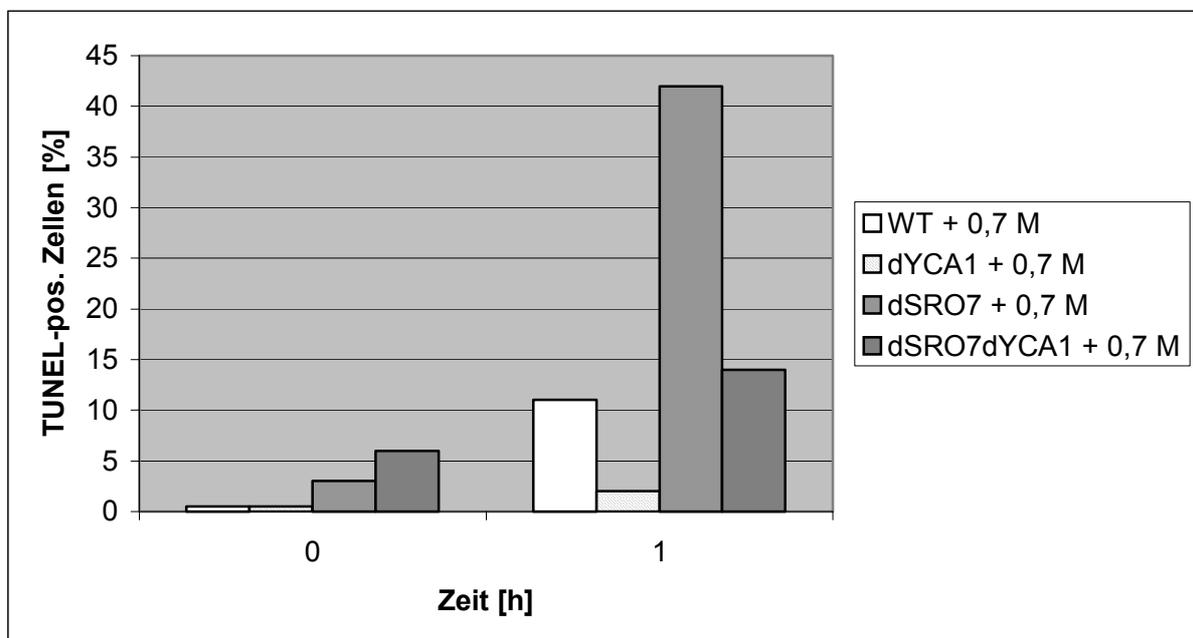


Abb. 21: Prozentualer Anteil der TUNEL-positiven Kerne von WT,  $\Delta SRO7$ ,  $\Delta YCA1$ ,  $\Delta SRO7\Delta YCA1$  nach Salzstress.

Ohne Salzstress besaßen, mit Ausnahme von  $\Delta$ SRO7, alle getesteten Stämme intakte DNA. Einzig der SRO7-Disruptionsstamm zeigte eine leichte DNA-Fragmentierung im TUNEL-Test. Nach einstündigem Stress mit 0,7 M NaCl traten beim Wildtyp wenige, leicht gefärbte Kerne auf. Die Disruption der Hefecaspase verhinderte unter diesen Bedingungen jegliche DNA-Fragmentierung. Im SRO7-Hintergrund waren mehr als 40 % der Kerne TUNEL-positiv; eine zusätzliche Disruption von YCA1 führte zu einer Reduktion der DNA-Fragmentierung auf etwa 15 %.

Neben der DNA-Fragmentierung haben wir die Caspaseaktivität der salzgestressten Stämme in Gegenwart von FITC-VAD-fmk mittels Durchflußzytometrie gemessen. Untersucht wurde eine einstündige Inkubation mit 0, 0,7 und 1,2 M NaCl.

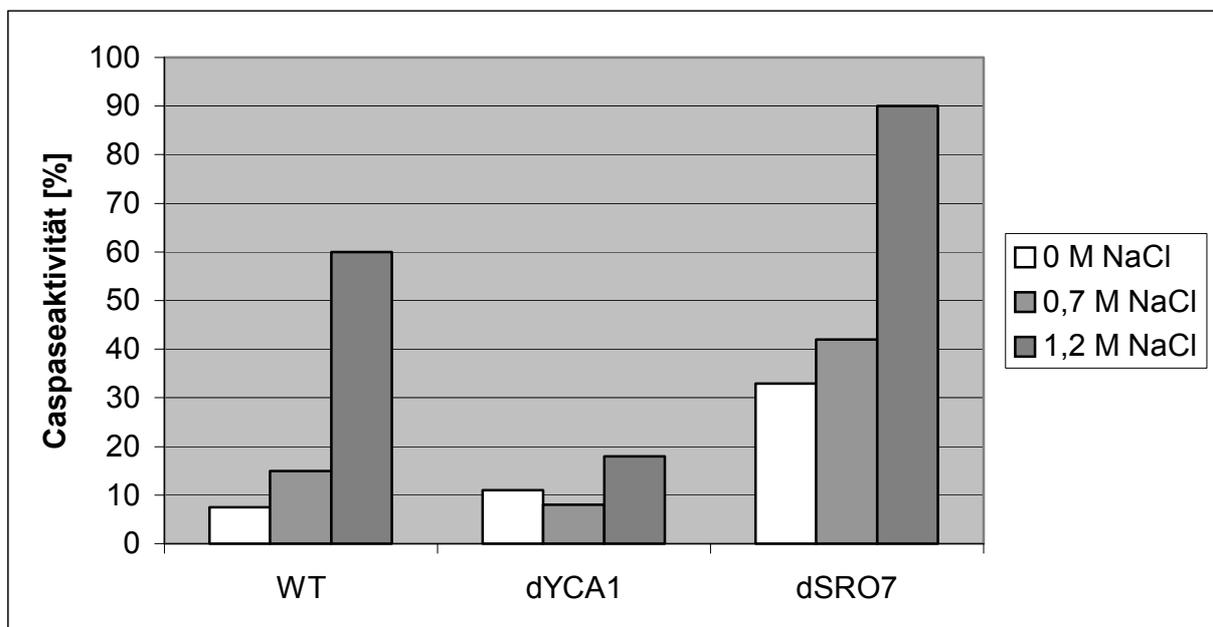


Abb. 22: Caspaseaktivität von WT,  $\Delta$ YCA1,  $\Delta$ SRO7 und  $\Delta$ SRO77.

### 3.2.7 Salzstress induzierte Apoptose ist in $\Delta$ SRO77 unabhängig von YCA1

Nachdem wir nachweisen konnten, dass die Disruption der Hefecaspase im SRO7-Hintergrund zu einem verbesserten Überleben nach Salzstress führte und zusätzlich eine Verringerung der DNA-Fragmentierung bewirkte, wollten wir testen, ob salzinduzierte Apoptose im  $\Delta$ SRO77-Stamm ebenfalls caspaseabhängig ist.

Bei einem milden Salzstress von 0,4 M NaCl haben wir eine Überlebenskinetik der Doppelmutante  $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77 (FMY 396) und der Tripelmutante  $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77 $\Delta$ YCA1 (FMY 397) aufgenommen.

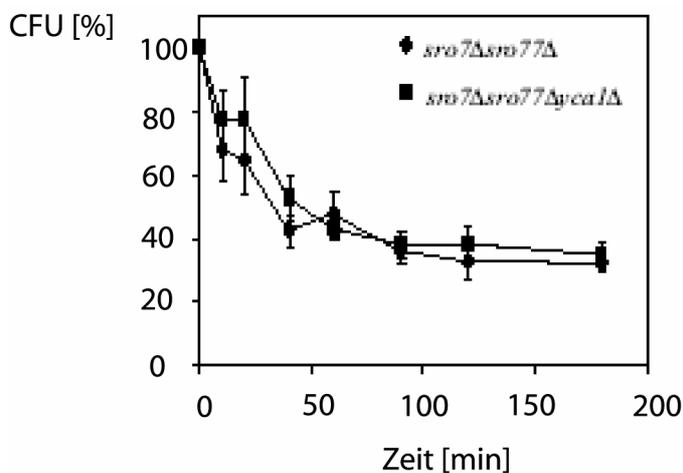


Abb. 23: Überlebenskinetik der Doppel- und Tripelmutante nach 0,4 M NaCl.

Beide Stämme überlebten bei mildem Salzstress gleich schlecht; sie besaßen nach 3 h Inkubation mit 0,4 M NaCl eine CFU von etwa 40. Wenn sowohl SRO7 als auch SRO77 deletiert waren, führte eine Zusätzlich Disruption der Hefecaspase folglich zu keinem verbesserten Überleben. Als nächstes wollten wir die Frage klären, ob eine zusätzlich Disruption von YCA1 im  $\Delta$ SRO77-Hintergrund einen protektiven Effekt auf das Überleben des Stammes hätte.

Um dies zu testen, haben wir dem SRO77-Disruptionsstamm und  $\Delta$ SRO77 $\Delta$ YCA1 in der exponentiellen Wachstumsphase mit 1,2 M NaCl versetzt und die Kulturen für 4 Stunden weiter kultiviert.

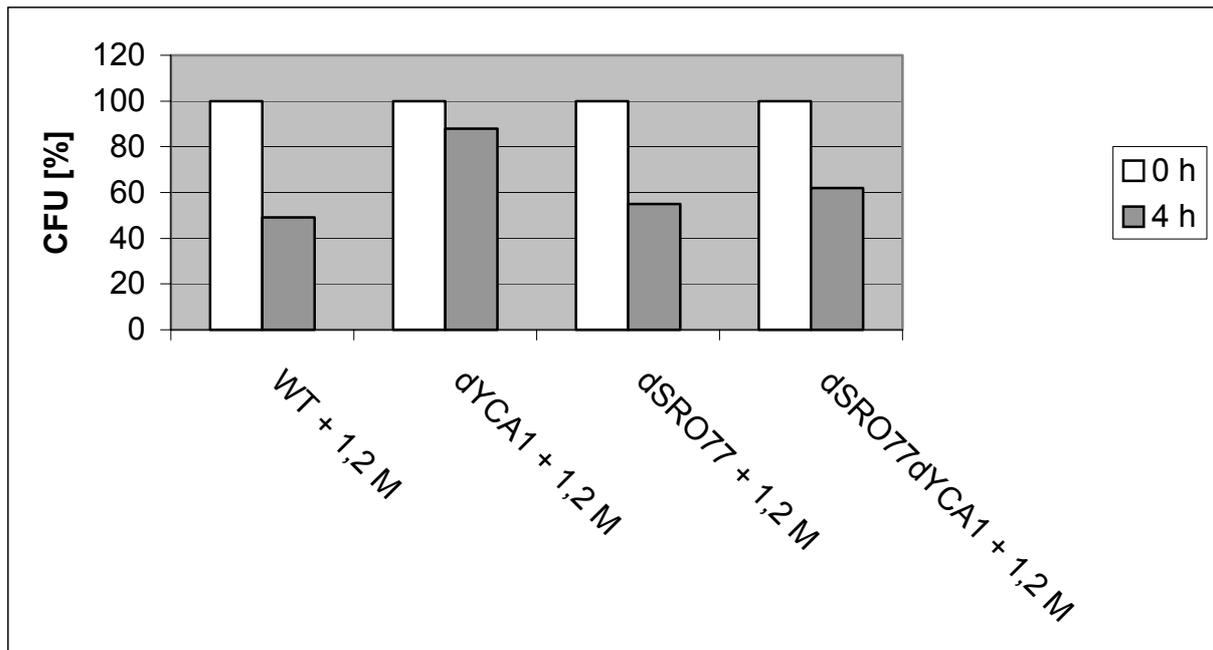
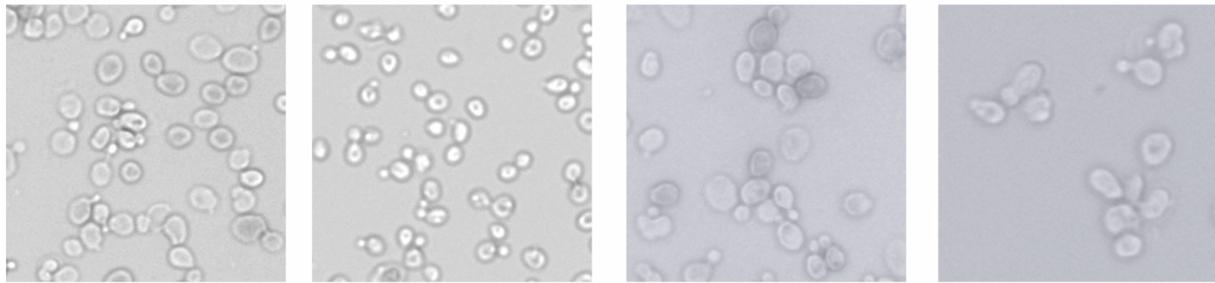


Abb. 24: Überlebensplattierung von WT,  $\Delta$ YCA1,  $\Delta$ SRO77,  $\Delta$ SRO77 $\Delta$ YCA1 nach 1,2 M NaCl.

Dieser starke Salzstress führte sogar zu einem deutlichen Absinken der CFU des Wildtypes auf ca. 50 %. Die Disruption der Hefecaspase im Wildtyphintergrund rettete die Überlebensfähigkeit des Stammes; ca. 95 % der Zellen waren in der Lage Kolonien zu bilden.  $\Delta$ SRO77 starb ähnlich stark wie der Wildtyp und eine zusätzliche Disruption von YCA1 konnte den Stamm auch nicht vollständig retten.

Nachdem erstaunlicherweise die Disruption von YCA1 im SRO77-Hintergrund zu keinem verbesserten Überleben nach Salzstress führte, haben wir getestet, wie sich  $\Delta$ SRO77 $\Delta$ YCA1 bezüglich der DNA-Fragmentierung verhielt.

0 M NaCl



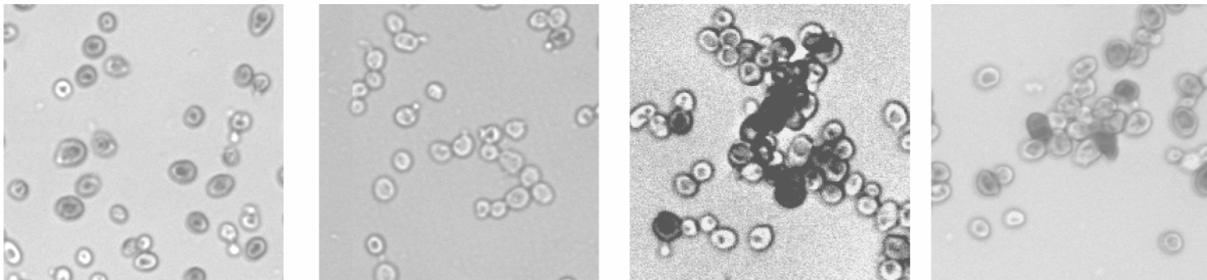
WT

$\Delta$ YCA1

$\Delta$ SRO77

$\Delta$ SRO77 $\Delta$ YCA1

1,2 M NaCl



WT

$\Delta$ YCA1

$\Delta$ SRO77

$\Delta$ SRO77 $\Delta$ YCA1

Abb. 25: TUNEL-Färbung von WT,  $\Delta$ YCA1,  $\Delta$ SRO77,  $\Delta$ SRO77 $\Delta$ YCA1 nach 1,2 M NaCl.

Der Wildtyp zeigte unter diesen Bedingungen leichte DNA-Fragmentierung, die bei  $\Delta$ YCA1 nicht vorhanden war. Stark positiv gefärbte Kerne bei der TUNEL-Färbung traten nach einstündiger Inkubation mit 1,2 M NaCl sowohl bei  $\Delta$ SRO77, als auch bei der Doppeldisruptanten mit zusätzlich deletiertem YCA1 auf.

Nachdem nun gezeigt wurde, dass Salzstress bei  $\Delta$ SRO77 $\Delta$ YCA1 zum Tod mit DNA-Fragmentierung als apoptotischem Marker führt, haben wir die Caspaseaktivität dieses Stammes untersucht.

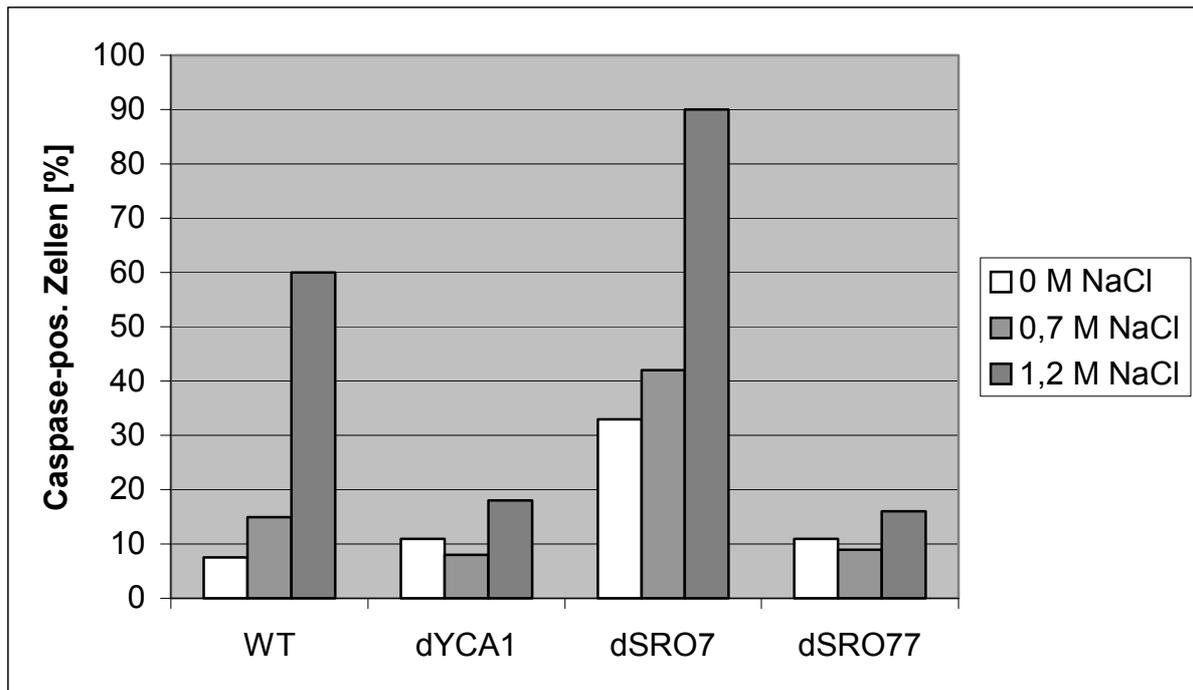


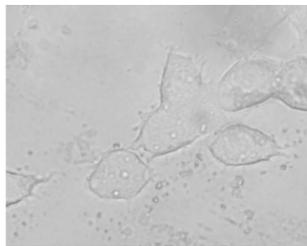
Abb. 26: Caspaseaktivität von WT,  $\Delta$ YCA1,  $\Delta$ SRO7 und  $\Delta$ SRO77 in Gegenwart von 0,7 M NaCl und Kontrolle ohne Salzstress.

Wildtyp Hefen ohne NaCl als Apoptosestimulus zeigten erwartungsgemäß kaum Caspaseaktivität bei der FACS-Messung. Die Gegenwart von 0,7 M NaCl erzeugte etwa 15 % Caspaseaktivität und starker Salzstress durch 1,2 M NaCl bewirkte etwa 60 % Caspaseaktivität. Beim YCA1-Disruptionsstamm konnte auch starker Salzstress die Caspaseaktivität nicht merklich erhöhen und selbst bei 1,2 M NaCl waren nur etwa 20 % der Zellen caspasepositiv. Beim SRO7-Disruptionsstamm stieg die Caspaseaktivität mit steigender Salzkonzentration bis auf etwa 90 % caspasepositive Zellen an. Hingegen zeigte der  $\Delta$ SRO77-Stamm auch bei 1,2 M NaCl keine merkliche Aktivierung der Caspase. Hier war die Caspaseaktivität sogar noch niedriger als bei  $\Delta$ YCA1, bei dem die Hefecaspase disrumpt ist.

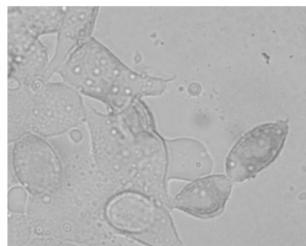
Bei  $\Delta$ SRO77 führt Salzstress folglich zum Tod mit DNA-Strangbruch, nicht aber zu einer Aktivierung der Hefecaspase YCA1.

### 3.2.8 WISH-Zellen sterben durch Salzstress mit einem apoptotischem Phänotyp

WISH-Zellen wurden in Zellkulturplatten für 3-4 Tage in DME-Medium im 37°C Brutschrank kultiviert. Vor der Salzgabe wurde das alte Kulturmedium mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und gegen 1,2 ml neues DME-Medium ersetzt. Von einer 4,5 M wässrigen Kochsalzlösung wurden die entsprechenden Volumina zugesetzt, um 0 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,5 M und 1 M NaCl in der WISH-Zellen Kultur zu erhalten. Nach der Kochsalzgabe wurden die Zellkulturen für 15,5 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend für eine TUNEL-Färbung mit Formaldehyd fixiert.



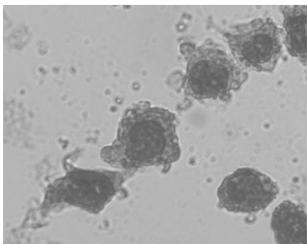
0 M NaCl



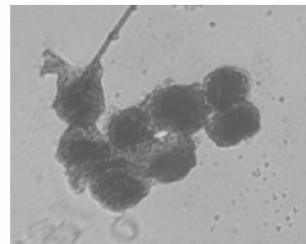
0,05 M NaCl



0,1 M NaCl



0,5 M NaCl



1,0 M NaCl

Abb. 27: TUNEL-Färbung von Wish-Zellen nach Salzstress.

Die Zellen der Negativkontrolle zeigten keinerlei DNA-Strangbruch im TUNEL-Test. Aber bereits bei 0,05 M NaCl war eine leichte Braunfärbung vorhanden, die bei 0,1 M NaCl noch verstärkt wurde. Die Kochsalzgabe von 0,5 und 1 M führte zu sehr starkem DNA-Strangbruch, der in der TUNEL-Färbung durch eine tiefe Braunfärbung der gesamten Zelle erkennbar war.

### **3.2.9 Salzstress, ein Apoptoseauslöser: Diskussion**

#### **3.2.9.1 Salzstress führt in Säugerzellen zu Apoptose**

Bei WISH-Zellen handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die aus humanen Amnionzellen etabliert wurde. Bereits milder Salzstress führt bei dieser adherent wachsenden Zelllinie zu DNA-Strangbruch.

#### **3.2.9.2 Salzstress führt bei der $\Delta$ SRO7 Mutanten zu Apoptose**

Seit wenigen Jahren 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).

SRO7 ist ein Hefehomologes des Tumorsuppressors *l(2)gl* in *Drosophila*. In meiner Arbeit konnte ich demonstrieren, dass bereits milder Salzstress von 0,4 M NaCl im SRO7-Disruptionsstamm zu Apoptose führt. Der Stamm zeigte typische apoptotische Marker wie verringertes Überleben, Akkumulation von ROS, DNA-Strangbruch, Chromatinkondensation und Caspaseaktivierung. Die Disruption von SRO7 scheint in Hefen zu einer gesteigerten Sensitivität gegen durch Salzstress induzierte Apoptose zu führen.  $\Delta$ GPD1 und  $\Delta$ CKB1, zwei ähnlich salzempfindliche Disruptionsstämme wie  $\Delta$ SRO7, zeigten unter den selben Bedingungen aber keine Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und auch keine DNA-Fragmentierung. Folglich ist die Salzempfindlichkeit von  $\Delta$ SRO7 nicht der einzige Grund für die gesteigerte Apoptoseneigung des Stammes.

Salzstress führt bei Hefen zu einem osmotischen Ausstrom von H<sub>2</sub>O aus der Zelle. Dadurch sinkt das Zellvolumen, dies hat einen Wachstumarrest der Zelle zur Folge. Hefen besitzen zwei Strategien, um auf eine erhöhte Konzentration von osmotisch aktiven Teilchen in der Umgebung zu reagieren. Sie synthetisieren verstärkt kleine, osmotisch wirksame Moleküle und sie Minimieren das Ausschleusen von osmotisch aktiven Teilchen aus der Zelle (Brown *et al.*, 1972; Yancey *et al.*, 1982). Meist handelt es sich bei den osmotisch wirksamen Teilchen um Glycerol (Blomberg *et al.*, 1989). In der  $\Delta$ GPD1-Disruptante ist die Synthese von Glycerol gestört, der Stamm wird dadurch salzsensitiv. CKB1 codiert für die Casein Kinase II, warum seine Disruption den Stamm salzempfindlich macht, ist noch unklar. Vor allem, weil in dieser Disruptante die intrazelluläre Ionenhomöostase nicht gestört ist (de Nadal *et*

*al.*, 1999). Nichts desto trotz scheint der Hauptgrund für die gesteigerte Apoptoseeigung in Gegenwart von Salzstress der Zusammenbruch der anorganischen Ionenhomöostase zu sein (Huh *et al.*, 2002).

Hefen besitzen keine Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, die das Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Verhältnis aufrecht erhalten könnte. Da das natürliche Hefeumfeld mehr Na<sup>+</sup>- als K<sup>+</sup>-Ionen besitzt, in der Zelle das Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Verhältnis aber kleiner als 1 ist, müssen Na<sup>+</sup>-Ionen folglich laufend aus der Zelle transportiert werden und K<sup>+</sup> nach innen befördert werden. Hefen besitzen hierfür 2 Transporter: der ENA1-Transporter ist für das Ausschleusen von Na<sup>+</sup> aus der Zelle verantwortlich, Trk1/2 befördert K<sup>+</sup>-Ionen ins Zellinnere. Diese beiden Transporter halten die Kationenhomöostase aufrecht (Haro *et al.*, 1991; Wieland *et al.*, 1995).

Im  $\Delta$ SRO7-Stamm ist das Targeting des Natriumtransporters ENA1 gestört; der frisch synthetisierte ENA1-Transporter gelangt also nicht an seinen Bestimmungsort, sondern wird in der Vakuole abgebaut. Wird  $\Delta$ SRO7 nun erhöhtem Salzstress ausgesetzt, hat dies einen intrazellulären Anstieg des Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Verhältnisses zur Folge (Larsson *et al.*, 1998).

Die Expression von ENA1 wird sehr komplex reguliert, dies könnte zu der Spekulation verleiten, dass dadurch die Ionenhomöostase aufrecht gehalten werden soll, um unnötige Apoptose zu verhindern.

Einen weiteren Hinweis auf die Wichtigkeit von ENA1 in diesem Zusammenhang, zeigt die Beobachtung, dass die Expression des antiapoptotischen Säugerproteins Bcl-2 im  $\Delta$ CKB1-Disruptionsstamm zu einer transkriptionalen Aktivierung von ENA1 führt (Huh *et al.*, 2002).

### **3.2.9.3 Die Hefecaspase YCA1 vermittelt Salzstress induzierte Apoptose**

YCA1 kodiert in *Saccharomyces cerevisiae* für eine Metacaspase, die unter anderem durch Wasserstoffperoxid oder Altern aktiviert werden kann (Madeo *et al.*, 2002). Alle bis dato bekannten Apoptoseszenarien in der Bäckerhefe werden durch YCA1 vermittelt, sie besitzt folglich eine wichtige Rolle als Effektor der Apoptose. Um nun herauszufinden, ob auch salzstressinduzierte Apoptose abhängig von Yca1p ist, haben wir Wildtyphefen und den Disruptionsstamm  $\Delta$ SRO7 mit den korrespondierenden Stämmen verglichen, bei denen YCA1 deletiert war. Im Wildtyp führte die Disruption von YCA1 zu einem verbesserten Überleben und einer deutlichen Verringerung der Caspaseaktivität bei starkem Salzstress. Diese

Beobachtungen scheinen also für eine generelle Funktion von YCA1 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.

#### **3.2.9.4 Funktionen von SRO7 und SRO77 während der Apoptose**

Die Proteine der SRO Familie 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.

SRO77 ist mit mehr als 50 % Übereinstimmung ein Isogen von SRO7. In einem Yeast-Two-Hybrid Screen konnten Uetz *et al.* und Drees *et al.* *in vivo* Interaktion zwischen Yca1p und Sro77p nachweisen (Uetz *et al.*, 2000; Drees *et al.*, 2001). Wir wollten nun die Funktion von SRO77 bei der Hefeapoptose ermitteln. Interessanterweise vermochte die Disruption von YCA1 im  $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77-Hintergrund oder im  $\Delta$ SRO77-Disruptionsstamm nicht die Überlebensfähigkeit nach Salzstress zu erhöhen und beide Stämme zeigten unter den gewählten Bedingungen starke DNA-Fragmentierung. Sowohl  $\Delta$ SRO77 $\Delta$ YCA1 als auch  $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77 $\Delta$ YCA1 (nicht gezeigt) starben also apoptotisch. Folglich vermochte die Disruption von YCA1 im SRO77- bzw. SRO7SRO77-Hintergrund die Stämme nicht vor salzinduzierter Apoptose zu retten. Hingegen rettete die Disruption von YCA1 im SRO7-Hintergrund vor Apoptose nach Salzstress. Dies gab erste Hinweise darauf, dass die Funktion von Yca1p von einem funktionstüchtigen Sro77p abhängig sein könnte. Tatsächlich zeigte der SRO77-Disruptionsstamm nach Salzstress keine Caspaseaktivierung in der FACS-Messung. Es scheint also in *S. cerevisiae* einen oder mehrere Yca1p unabhängige Apoptose Signalwege zu geben. Diese Wege könnten dann unter negativer Kontrolle, von Sro77p oder einem, mit Sro77p interagierenden Protein, stehen.

### 3.2.9.5 Relevanz für die Onkologie

Ob die beschriebene Salzsensitivität von  $\Delta$ SRO7 und von  $\Delta$ SRO7 $\Delta$ SRO77 eine Relevanz für die Tumorentwicklung in der *Drosophila* Larve besitzt, bleibt spekulativ. Homozygote *l(2)g/* Mutanten zeigen verringerte Zellpolarität und neoplastisches Überwuchern von Geweben (Wodarz, 2000). Jüngste Studien haben gezeigt, dass eine Verringerung der epithelialen Polarität zu einer verstärkten Apoptoseneigung führt (Weaver *et al.*, 2002). Nicht polarisierte Zellen besitzen einen Proliferationsvorteil, der aber durch die verstärkte Apoptoseneigung überkompensiert wird, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer malignen Transformation sinkt (Humbert *et al.*, 2003). Interessanterweise konnten De Lorenzo *et al.* (De Lorenzo *et al.*, 1999) zeigen, dass eine mutierte Form von *l(2)g/* während der Oogenese Apoptose induziert. Hier unterstützt ein defekter Tumorsuppressor folglich Apoptose. In den meisten Epithelzellen ist die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase selektiv auf der basolateralen Seite der Membran angeordnet (Dunbar und Caplan, 2001). Ob in der *l(2)g/* Mutante die Verteilung dieses Transporters gestört ist und die Mutante dadurch eine gestörte Ionenhomöostase besitzt, steht noch offen. Zukünftige Studien in diese Richtung werden sicherlich unser Verständnis von Tumorentwicklung und Apoptose vergrößern.

### 3.3 Apoptose und Fusion

Im Verlauf der Säugerapoptose wird der Zellinhalt abgebaut und in apoptotische Vesikel - apoptotic bodies genannt - verpackt. Hierfür muss die Zellmembran komplett umorganisiert werden - Fusionsprozesse finden statt und die Rezeptorausstattung der Zelloberfläche sowie die Phospholipidverteilung werden verändert.

In manchen Organismen gibt es bereits Erkenntnisse, die das Zusammenspiel von Apoptose und Membranfusion näher charakterisieren.

So konnte in zellfreiem *Xenopus laevis*-Oocytenexzakt gezeigt werden, dass Rapaptin 5 - ein in Säugerzellen endogen vorkommender Faktor, der an der Endosomenfusion beteiligt ist - selektiv durch Caspasen gespalten werden kann und es dadurch zur Blockierung der Endosomenfusion kommt (Cosulich *et al.*, 1997). Folglich kann Endocytose während der exekutiven Phase der Apoptose nicht mehr ablaufen. Wahrscheinlich sind aber auch andere Membran-Transportwege betroffen.

Die Spaltung von Rapaptin-5 und somit die Blockierung der Endocytose konnte durch den spezifischen humanen Caspaseinhibitor zVAD-fmk verhindert werden. Auch die Expression der negativen Apoptoseregulatoren Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> verhinderte die Spaltung von Rapaptin-5.

Eine ähnliche protektive Wirkung von Bcl-2 kann auch bei Bäckerhefe beobachtet werden: durch Überexpression des Caspaseauslösers Bax stirbt die Bäckerhefe mit apoptotischem Phänotyp; der Zellselbstmord kann aber durch gleichzeitige Überexpression von Bcl-2 verhindert werden (Ligr *et al.*, 1998). Auch konnte ich in meiner Diplomarbeit zeigen, dass der humane Caspaseinhibitor zVAD-fmk ebenfalls in der Lage ist, die Hefecaspase YCA1 zu inhibieren (Madeo *et al.*, 2002). Des Weiteren führt die Überexpression von Bax in der Bäckerhefe zu einem apoptotischem Phänotyp. Levine *et al.* konnten zeigen, dass durch gleichzeitige Expression von Bax und AtVAMP, einem v-SNARE aus *Arabidopsis*, in Hefe Apoptose unterbleibt. Auch Wasserstoffperoxid induzierte Apoptose kann durch AtVAMP unterbunden werden. (Levine *et al.*, 2001). Es liegt daher nahe, in Bäckerhefe den Zusammenhang zwischen Membranfusion und Apoptose zu untersuchen.

Breitenbach und Kollegen (Universität Salzburg) haben mit der apoptotischen Zellzyklusmutante *cdc48<sup>S565G</sup>* eine Chipanalyse durchgeführt. Es handelt sich hierbei um den Stamm, an dem Madeo *et al.* erstmalig DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation und Phosphatidylserinexternalisation, also die wichtigsten apoptotischen Marker von Mehrzellern in der einzelligen Hefe nachweisen konnten (Madeo *et al.*, 1999). Beim Vergleich des Expressionsmusters dieses apoptotischen Hefestammes mit gesunden Hefen fiel auf, dass die Expression von mehreren Genen, die in der Vesikelfusionsmaschinerie eine Rolle spielen, gesteigert ist (persönliche Mitteilung).

Einen weiteren Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Apoptose und Membranfusion in der Bäckerhefe erhielten wir in einer Datenbankrecherche bei der Suche nach Interaktoren der Hefecaspase Yca1p. In der *Saccharomyces* Genome Database gab es 5 Interaktoren (Tfb1p, Yak1p, Srb4p, Kre11p und Sro77p) von Yca1p, die durch einen high-throughput Yeast-Two-Hybrid ermittelt worden waren (Ito *et al.*, 2001). Auch hier fanden wir Treffer im Bereich der Membranfusion: Kre11p und Sro77p. Des Weiteren fiel uns die Proteinkinase YAK1 als Interaktor von Yca1p auf; auch mit ihr habe ich mich während meiner Doktorarbeit beschäftigt.

Wie wichtig das Forschungsgebiet Membranfusionsprozesse ist, zeigt seine Relevanz bei Krebserkrankungen. Kürzlich wurde EWS-WT, ein neu entdeckter Transkriptionsfaktor, beschrieben (Palmer *et al.*, 2002). EWS-WT bindet an den Promotor des Genes BAIAP3, welches für ein Protein kodiert, das an der regulierten Exocytose beteiligt ist. In Tumorzellen wird es zu einem onkogenen Fusionsprotein.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Membranfusion und Apoptose in Hefe näher zu beleuchten, haben Astrid Proksch und ich in einem Gemeinschaftsprojekt mit folgenden Genen gearbeitet:

- SRO77: ist an der nicht-selektiven Vesikelfusion beteiligt
- VAM7: spielt beim Transport vom Golgi-Apparat zur Vakuole eine Rolle
- KRE11: ist am Transport vom ER zum Golgi-Apparat involviert
- YAK1: ist eine Proteinkinase

### 3.3.1 YCA1 benötigt die Membranfusionsgene SRO77 und KRE11 sowie die Proteinkinase YAK1, um aktiv sein zu können

Es wurde mit den Disruptions-Stämmen der drei Membranfusionsgene (FMY 477, FMY 478, FMY 480) bzw. der Proteinkinase (FMY 479) gearbeitet. In diese Stämme wurde die Hefecaspase YCA1, die sich in einem Überexpressionsplasmid befand, hineintransformiert (FMY 34-37). Als Kontrollen dienten die Disruptionsstämmen mit Leerplasmid (FMY 38-41), der Wildtyphintergrund mit YCA1 Überexpression (FMY 17) und mit Leerplamid (FMY 29). Mit stationären Übernachtskulturen wurden die Kulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 beimpft und kultiviert, bis sie eine OD<sub>600</sub> von 0,3-0,6 besaßen. Dann wurde durch einen Medienshift die Expression der Hefecaspase induziert. Wasserstoffperoxid wurde als Apoptosestimulus zugesetzt und die Kulturen wurden für 20 Stunden weiterkultiviert, bevor ihre Vitalität in Überlebensplattierungen ermittelt wurde und sie auf apoptotische Marker getestet wurden.

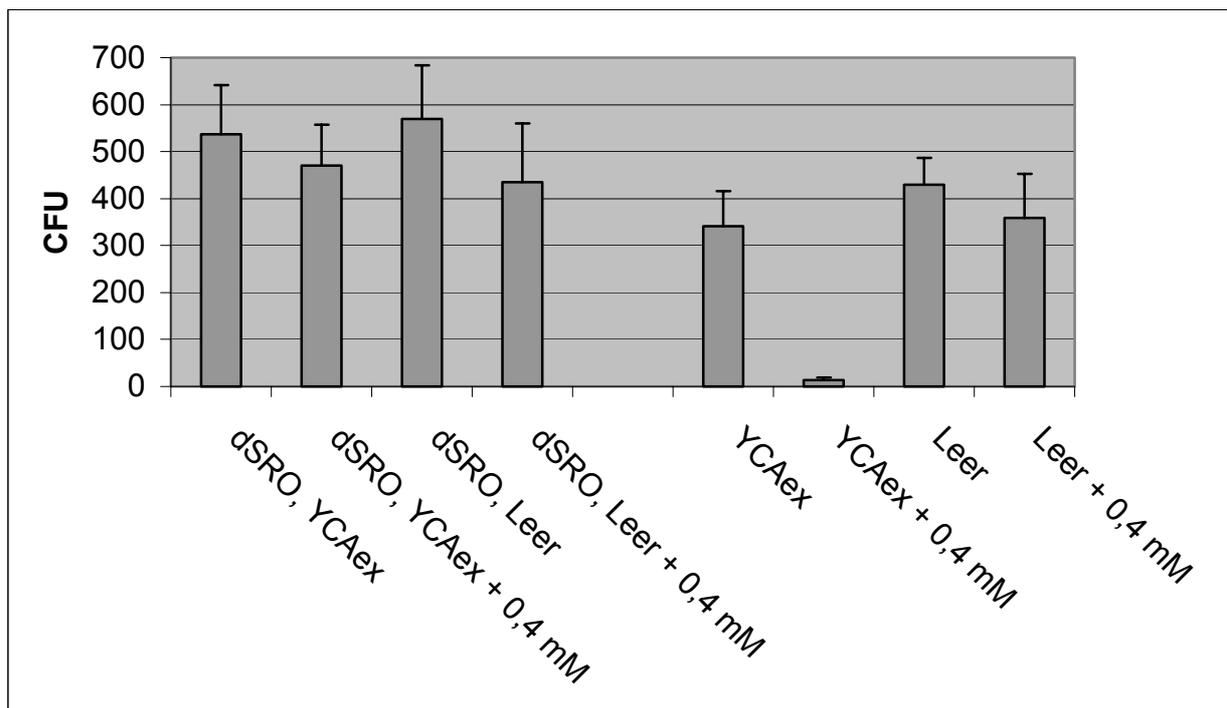


Abb. 28: Überlebensplattierung von YCA1ex. und Leerplasmid mit und ohne Wasserstoffperoxid in  $\Delta$ SRO77 sowie im Wildtyphintergrund.

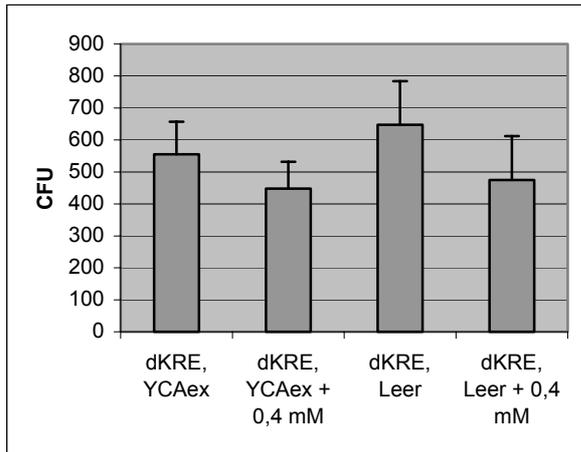


Abb. 29: Überlebensplattierung YCA1ex. und Leerplasmid mit und ohne Wasserstoffperoxid in  $\Delta$ KRE11.

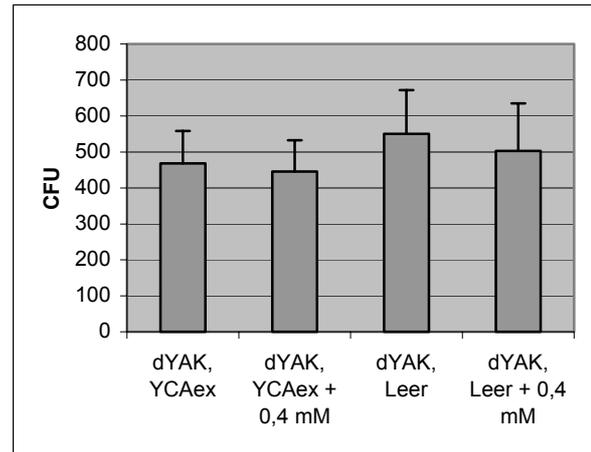


Abb. 30: Überlebensplattierung YCA1ex. und Leerplasmid mit und ohne Wasserstoffperoxid in  $\Delta$ YAK1.

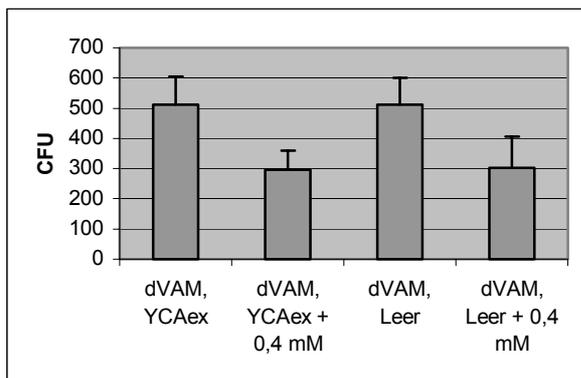


Abb. 31: Überlebensplattierung YCA1ex. und Leerplasmid mit und ohne Wasserstoffperoxid in  $\Delta$ VAM7.

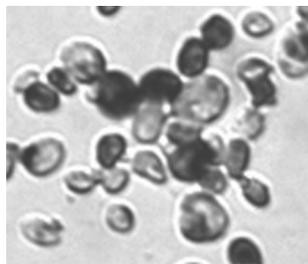
Die Überexpression der Hefecaspase im Wildtyphintergrund bewirkte, dass von 500 ausplattierten Zellen nur noch etwa 350 in der Lage waren, Kolonien zu bilden; durch die Gegenwart von Wasserstoffperoxid sank die CFU drastisch auf 50. Bei der Leerplasmidkontrolle im Wildtyphintergrund überlebten fast alle ausplattierten Zellen und die Belastung mit Wasserstoffperoxid senkte die Überlebensfähigkeit nur geringfügig.

Die Deletion von SRO77, YAK1 und KRE11 führte dazu, dass YCA1 nicht mehr töten konnte. Alle ausplattierten Zellen waren bei den drei Disruptions-Stämmen mit überexprimierter Caspase in der Lage Kolonien zu bilden und auch die Gegenwart von 0,4 mM Wasserstoffperoxid verringerte ihre Überlebensfähigkeit nur unmerklich.

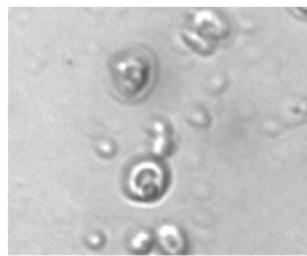
Die CFU der drei Disruptions-Stämme mit Leerplasmid wurde unter den selben Bedingungen nur ähnlich schwach beeinflusst.

Einzig im VAM7-Deletionsstamm mit überexprimiertem YCA1 war die Caspase noch in der Lage zu töten. Von 500 ausplattierten Zellen überlebten nach der Belastung mit 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nur noch etwa 300 Zellen. Aber auch die Leerplasmidkontrolle zeigte sich unter den gleichen Bedingungen genauso sensitiv gegenüber Wasserstoffperoxid; auch hier betrug die CFU etwa 300.

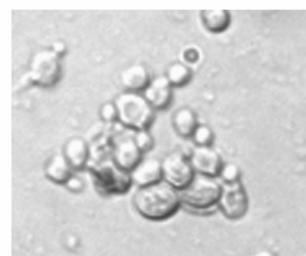
Neben der Vitalität der 4 Stämme in der Überlebensplattierung wurden die Kulturen von Astrid Proksch und mir auf DNA-Fragmentierung in einer TUNEL-Färbung getestet.



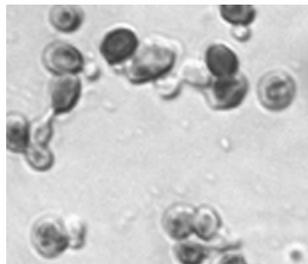
WT, YCAex  
+ 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



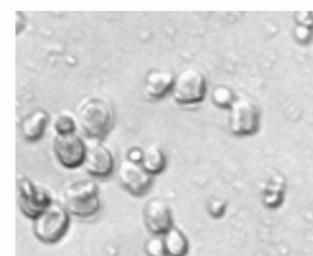
WT, Leerplasmid  
+ 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



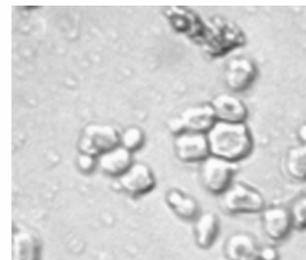
ΔSRO77, YCAex  
+ 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



ΔVAM7, YCAex  
+ 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



ΔKRE11, YCAex  
+ 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



ΔYAK1, YCAex  
+ 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Abb. 32: TUNEL-Färbung der Membranfusions Disruptionsstämme.

Nur der ΔVAM7-Stamm mit überexprimierter Caspase besaß nach der Gabe von 0,4 mM Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus TUNEL positive Kerne. Die Kontrolle mit Leerplasmid zeigte auch in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keine DNA-Fragmentierung. In keinem der anderen Disruptions-Stämme führte die Überexpression von YCA1 in Gegenwart des Apoptosestimulus Wasserstoffperoxid zu einer Fragmentierung der DNA.

Analog verhielten sich die 4 Stämme in der *in vivo* Messung der Caspaseaktivität mit FITC-VAD-fmk.

Kultur	Caspaseaktivität [%]	Kultur mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Caspaseaktivität [%]
ΔSRO77+YCA1ex	5,9	ΔSRO77+YCA1ex	18,5
ΔKRE11+YCA1ex	6,5	ΔKRE11+YCA1ex	15,8
ΔYAK1+YCA1ex	4,0	ΔYAK1+YCA1ex	14,9
ΔVAM7+YCA1ex	6,5	ΔVAM7+YCA1ex	37,2
WT+YCA1ex	20,3	WT+YCA1ex	52,3

Kultur	Caspaseaktivität [%]	Kultur mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Caspaseaktivität [%]
ΔSRO77+Leer	4,0	ΔSRO77+Leer	6,8
ΔKRE11+Leer	1,7	ΔKRE11+Leer	6,4
ΔYAK1+Leer	4,7	ΔYAK1+Leer	12,7
ΔVAM7+Leer	5,0	ΔVAM7+Leer	12,0
WT+Leer	2,7	WT+Leer	5,0

Abb. 33: Caspaseaktivität der Membranfusions Disruptionsstämme.

Der Wildtyphintergrund mit überexprimiertem YCA1 zeigte etwa 20 % Caspaseaktivität, die durch die Zugabe von 0,4 mM Wasserstoffperoxid auf über 50 % gesteigert werden konnte. Unter den gewählten Versuchsbedingungen wurde also die Hefecaspase stark aktiviert. Bei der Leerplasmidkontrolle im Wildtyphintergrund traten ohne Wasserstoffperoxid weniger als 3 % Caspaseaktivität auf und in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stieg der Anteil an caspasepositiven Zellen nur unmerklich auf 5 %.

Bei ΔSRO77, ΔYAK1 und ΔKRE11 mit überexprimierter Caspase war nur eine basale Caspaseaktivität vorhanden, die durch Wasserstoffperoxid nur leicht erhöht werden konnte. Im VAM7-Disruptionsstamm mit überexprimierter Caspase war in Gegenwart von Wasserstoffperoxid mit 39,2 % eine starke Caspaseaktivität messbar, die aber noch unter der im Wildtyphintergrunde mit Caspase-Überexpression (52,3 %) lag. Die Leerplasmidkontrollen in ΔSRO77 und ΔKRE11 zeigten in Gegenwart von Wasserstoffperoxid kaum erhöhte Caspaseaktivität; bei ΔYAK1 und ΔVAM war die Caspaseaktivität hingegen auf 12,7 bzw. 12 % leicht erhöht.

ΔSRO77, ΔYAK1 und ΔKRE11 mit überexprimierter Caspase zeigten sich bei sämtlichen durchgeführten Apoptosetests unauffällig. Einzig im VAM7-Hintergrund

war die Hefecaspase noch fähig zu töten und der Stamm zeigte Caspaseaktivierung und DNA-Fragmentierung.

Um nachzuweisen, ob in den oben beschriebenen Versuchen die Hefecaspase auch wirklich exprimiert war, wurde FLAG-getaggttes YCA1 eingesetzt. 20 Stunden nach der Induktion der Caspaseexpression wurden die Kulturen geerntet und Rohextrakte wurden hergestellt. Ein Immunoblot mit FLAG als primärem Antikörper wurde von Astrid Proksch durchgeführt (nicht gezeigt); er zeigte bei allen 4 Stämmen eine einheitlich starke Bande von etwa 55 Da – die Expression von YCA1 war also in allen getesteten Kulturen gleich stark. Obwohl die Caspase in allen getesteten Disruptionsstämmen gleich stark exprimiert wurde, war sie nur noch im VAM7-Disruptionsstamm in der Lage, einen apoptotischen Phänotyp zu erzeugen. Die Hefecaspase benötigt also die Membranfusionsgene SRO77 und KRE11 sowie die Proteinkinase YAK1, um aktiv sein zu können. Erste Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang von Membranfusion und Apoptose in der Bäckerhefe verdichteten sich folglich.

### **3.3.2 Weder Kre11p, Yak1p noch Vam7p werden durch die Hefercaspase prozessiert**

Um nachzuweisen, ob Kre11p, Yak1p und Vam7p durch die Hefecaspase prozessiert werden, haben wir die Gene chromosomal C-terminal an HA getaggt.

Das chromosomale Tagging von Sro77p blieb sowohl bei HA, als auch bei cmcy erfolglos. Ein möglicher Grund hierfür könnte die stattliche Größe von Sro77p mit 111,7 Da sein. Auch wäre es möglich, dass Sro77p zwar chromosomal getaggt werden kann, eine Detektion des Taggings aber nicht möglich ist. Beispielsweise könnte die endogene Hefecaspase YCA1 das Tag schneiden, bevor es in einem Immunoblot nachgewiesen werden kann. Um dies auszuschließen, nahmen wir die nächsten Taggingversuche von Sro77p im  $\Delta$ YCA1-Hintergrund vor. Aber auch hier konnte weder ein HA- noch ein cmcy-Tag C-terminal an SRO77 angehängt werden. Auch die Zugabe von 20  $\mu$ M zVAD-fmk als Caspaseinhibitor vor der Rohextraktherstellung ermöglichte keinen Nachweis von chromosomalem Tagging im Immunoblot (Daten nicht gezeigt).

In die Stämme mit chromosomal getaggttem Kre11p, Yak1p und Vam7p wurde die FLAG-getaggte Hefecaspase, die sich in einem Überexpressionskonstrukt befand, hineintransformiert. Die Kulturen wurden in gewohnter Weise angezchtet, geshiftet und mit 0,4 mM Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus versetzt. 20 Stunden nach

der Induktion der Hefecaspase durch Medienwechsel wurden die Zellen geerntet, Rohextrakte wurden hergestellt und ihr Proteingehalt wurde ermittelt. Jeweils 200 µg Protein wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Anschließend wurde eine Immunoblot gegen HA als primärer Antikörper durchgeführt. Die Exposition des Films erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran von den Antikörpern befreit und es wurde mit ihr ein zweiter Immunoblot gegen FLAG als primärer Antikörper zur Detektion von YCA1 durchgeführt. Wegen der starken Expression der Hefecaspase wurde der Film nur wenige Minuten aufgelegt.

In allen Spuren des Immunoblots (nicht gezeigt) war bei etwa 55 Da eine gleichstarke Bande zu erkennen, die Hefecaspase wurde folglich in allen chromosomal getaggten Konstrukten gleich stark exprimiert. Die Proteine Kre11p, Yak1p und Vam7p zeigten nur ein schwaches Signal bei ca. 60, 90 und 35 Da, diese Banden entsprachen in etwa den vorhergesagten Proteingrößen von Kre11p, Yak1p und Vam7p. Ein kleines Fragment, das durch Abspaltung des C-terminalen Endes von Kre11p, Yak1p und Vam7p bei der Prozessierung gebildet worden wäre, trat nicht auf. Um einen größeren Bereich an Proteingrößen abdecken zu können haben wir ein Gradientengel durchgeführt. Ferner haben wir die eingesetzte Proteinkonzentration auf 400 µg Protein in jeder Spur erhöht, um ausschließen zu können, dass die Konzentration an Kre11p, Yak1p und Vam7p einfach zu gering war, um ein so kleines Fragment finden zu können. Aber auch unter diesen Bedingungen konnte ein kleines Fragment nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt), Yca1p scheint folglich das Genprodukt der Membranfusionsgene und die Proteinkinase nicht zu prozessieren.

### **3.3.3 Für den Verlauf von Apoptose ist eine funktionierende Membranfusionsmaschinerie nötig: Diskussion**

Die Hefecaspase YCA1 benötigt die Fusionsgene SRO77 und KRE11, sowie die Proteinkinase YAK1, um aktiv sein zu können. Dies zeigt sich an der Beobachtung, dass ein Überexpressionskonstrukt von YCA1 in den Stämmen, in denen diese Gene disruptiert sind, nicht mehr in der Lage war zu töten und die Kulturen auch keinen apoptotischen Phänotyp aufwiesen. Selbst die Gabe von 0,4 mM Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus vermochte in diesen Stämmen nicht, Apoptose zu induzieren. Einzig das Membranfusionsgen VAM7 war für die Funktion von YCA1 nicht essentiell. Im VAM7-Disruptionstamm mit überexprimierter Caspase war ein apoptotischer Phänotyp zu beobachten: die Kulturen starben, zeigten DNA-Fragmentierung und Caspaseaktivität. Da bei allen 4 getesteten Konstrukten die Hefecaspase YCA1 einheitlich stark exprimiert war, führt dies zu dem Schluss, dass SRO77, KRE11 und YAK1 essentiell für Hefeapoptose, die von YCA1 vermittelt wird, sind. Bis dato sind keine Szenarien bekannt, in denen Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae* explizit nicht über YCA1 verläuft; aber wir haben YCA1 auch erst vor etwa 2 Jahren beschrieben – viele apoptotische Szenarien wurden folglich noch nicht auf eine Beteiligung von YCA1 untersucht. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass für Hefeapoptose eine funktionierende Fusionsmaschinerie notwendig ist.

Kre11p, Yak1p und Vam7p werden nicht durch die Hefecaspase Yca1p prozessiert. Ob hingegen die Hefecaspase durch das Genprodukt dieser Kandidaten geschnitten wird, steht noch offen. Bis jetzt war es Astrid Proksch leider noch nicht möglich, die Fusionsgene und die Proteinkinase erfolgreich in ein Überexpressionskonstrukt mit C-terminalem Tag zu klonieren. Wenn diese Vorarbeiten erfolgreich abgeschlossen sein werden, können jeweils ein Plasmid mit überexprimierter Hefecaspase und ein Konstrukt mit überexprimierten Fusionsgenen bzw. mit überexprimierter Proteinkinase in Wildtyphefen transformiert werden. Ein anschließender Immunoblot wird dann sicherlich darüber Aufschluss geben, ob Kre11p, Yak1p, Vam7p oder Sro77p die Hefecaspase prozessieren.

Mit den bis jetzt bekannten Fakten lässt sich also nicht eindeutig klären, ob in Bäckerhefe ein Zusammenhang zwischen Apoptose und Membranfusion existiert.

### 3.4 Apoptose und DNA-Reparatur

Bak gehört zur Familie der proapoptotischen Bcl-2 Familie. Eine Überexpression von Bak kann sowohl in der Spalthefe *Saccharomyces pombe*, als auch in der Bäckerhefe Apoptose auslösen (Ink *et al.*, 1997; Jurgensmeier *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1994), die durch die „high-mobility group box-1“-Proteine (HMGB1) inhibiert werden kann. Wird HMGB1 in Säugerzellen überexpimiert, führt dies zu einem Schutz vor, durch UV-Strahlung, Caspase 8 oder Bax ausgelöster Apoptose. Darüber hinaus ist HMGB1 an biologisch wichtigen Prozessen des DNA-Metabolismus wie Transkription und DNA-Reparatur beteiligt (Bianchi *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 1998) Brezniceanu *et al.* konnten zeigen, dass das HMGB1-Protein als Onkoprotein fungieren kann, indem es während der Tumorgenese Apoptose inhibiert (Brezniceanu *et al.*, 2003).

*S. cerevisiae* besitzt zwei Orthologe zu HMGB1 der Spalthefe: NHP6A und NHP6B. Es soll im folgenden untersucht werden, ob auch NHP6A und B in das apoptotische Geschehen involviert sind.

#### 3.4.1 Die Disruption von NHP6A und B führt im chronologischen Altern zu vermehrter Apoptose

Mit einem Stamm, in dem NHP6A und B deletiert wurden (FMY 461) und dem korrespondierenden Wildtyp (FMY 459) wurden Langzeitexperimente durchgeführt. Dazu wurden 10 ml SMD mit Glucose und allen Aminosäuren in 100 ml Kolben mit Schikane beimpft. Ein Tag nach dem Beimpfen der beiden Kulturen wurde ein Aliquot (=Tag 1) entnommen, seine Zellzahl/ml wurde bestimmt und es wurden 500 Zellen ausplattiert, um die Überlebensfähigkeit beider Stämme zu vergleichen. Auch in den folgenden drei Tagen wurden Überlebensplattierungen durchgeführt. Drei Tage nach dem Ausplattieren waren die Kolonien groß genug, um ausgezählt werden zu können.

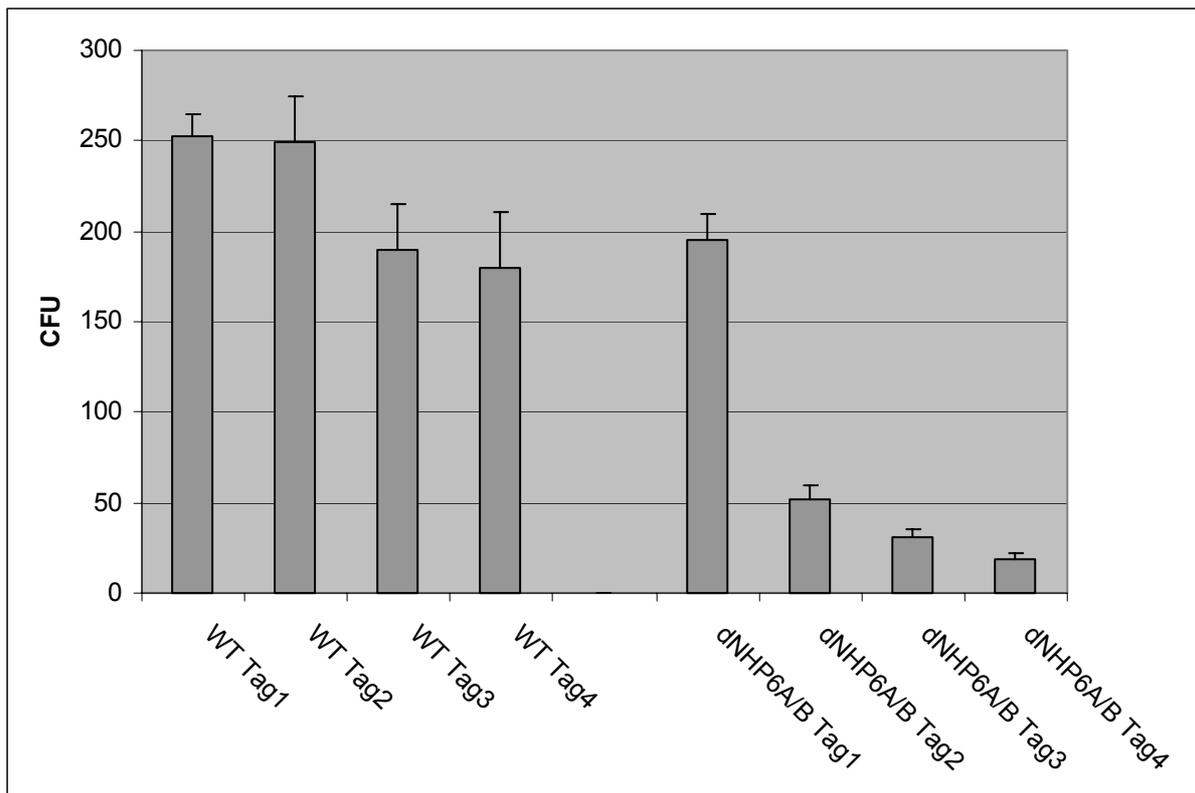


Abb. 34: Überlebensplattierung vom WT und  $\Delta$ NHP6A/B während des Agings.

Von 500 ausplattierten Zellen waren beim Wildtyp am Tag 1 etwa 250 Zellen in der Lage Kolonien zu bilden, bei der Doppeldisruptanten betrug die CFU 197. Am Folgetag überlebten beim Wildtyp unverändert etwa 250 Kolonien, die Doppeldisruptante zeigte mit 53 Kolonien ein stark vermindertes Überleben. Am Tag 3 und 4 sank die CFU von  $\Delta$ NHP6A/B auf 31 bzw. 18 Kolonien deutlich, wohingegen vom Wildtyp immer noch 186 bzw. 178 Zellen in der Lage waren, Kolonien zu bilden. Um herauszufinden, ob es sich bei dem beschriebenen Sterben auch wirklich um Apoptose handelte, wurden im gleichen Zeitfenster der Wildtyp und die  $\Delta$ NHP6A/B Mutante auf apoptotische Marker untersucht.

Getestet wurden DNA-Fragmentierung (nicht gezeigt), Chromatinkondensation und die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies.

Der Wildtyp wies am Tag 1 keinerlei DNA-Fragmentierung im TUNEL-Test auf. Bei der Doppeldisruptanten waren hingegen bereits einige Kerne braun gefärbt und zeigten folglich DNA-Strangbruch. Am Tag 4 besaßen beide Stämme einen hohen Anteil an TUNEL-positiven Kernen. Beim  $\Delta$ NHP6A/B-Stamm schien die DNA-Fragmentierung jedoch stärker ausgeprägt zu sein. Ähnlich verhielten sich die beiden getesteten Stämme in der DAPI-Färbung. Einen Tag nach dem Beimpfen war beim

Wildtyp keine Chromatinkondensation zu erkennen, wohingegen bei  $\Delta$ NHP6A/B bereits einige Kerne apoptotisch verändertes Chromatin aufwiesen (nicht gezeigt). Drei Tage später zeigten einige Wildtypkerne leichte Chromatinkondensation und das Chromatin des Doppeldisruptionsstammes wies ein ausgeprägtes apoptotisches Erscheinungsbild auf: es war halbmondförmig an der Kernmembran aggregiert oder in kleinere Fragmente gespalten.

Mit Dihydrofluorescein wurden die beiden Stämme an Tag 1 und 4 auf eine Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies untersucht.

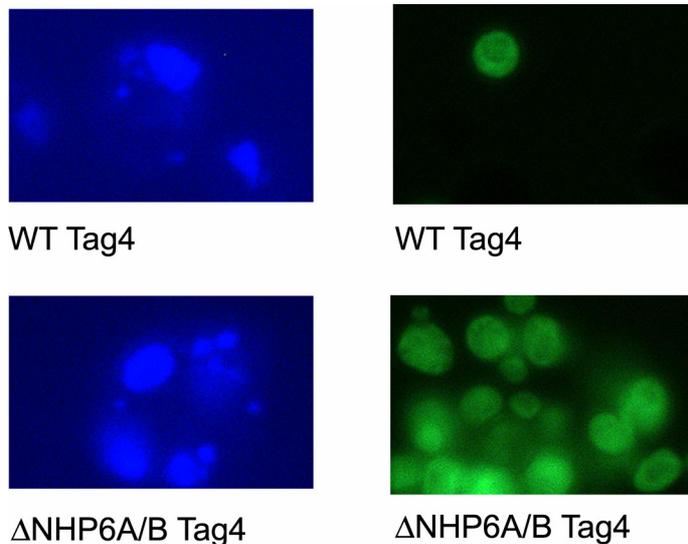


Abb. 35: Die linke Seite der Abbildung zeigt eine DAPI-Färbung, auf der rechten Seite wurde eine Dihydrofluoresceinfärbung zum Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies durchgeführt.

Sowohl der Wildtyp, als auch die  $\Delta$ NHP6A/B Mutante zeigten am Tag 1 praktisch keine Dihydrofluorescein gefärbten Kerne. 3 Tage später leuchteten beim Wildtyp viele Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop rot auf. Bei der Doppeldisruptanten hatten aber noch mehr Kerne reaktive Sauerstoffspezies akkumuliert; hier war fast jeder Kern angefärbt.

Nachdem wir nachweisen konnten, dass im chronologischen Altern der  $\Delta$ NHP6A/B-Stamm gegenüber dem korrespondierendem Wildtyp ein verringertes Überleben besaß und auch verstärkt apoptotische Marker wie DNA-Strangbruch, Chromatinkondensation und die Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies aufwies, interessierte uns, ob dieser apoptotische Weg caspaseabhängig ist.

Aus diesem Grunde haben wir in einer FACS-Messung mit FITC-VAD-fmk die Caspaseaktivität des Wildtyps und der  $\Delta$ NHP6A/B Mutanten am Tag 1 und 4 gemessen.

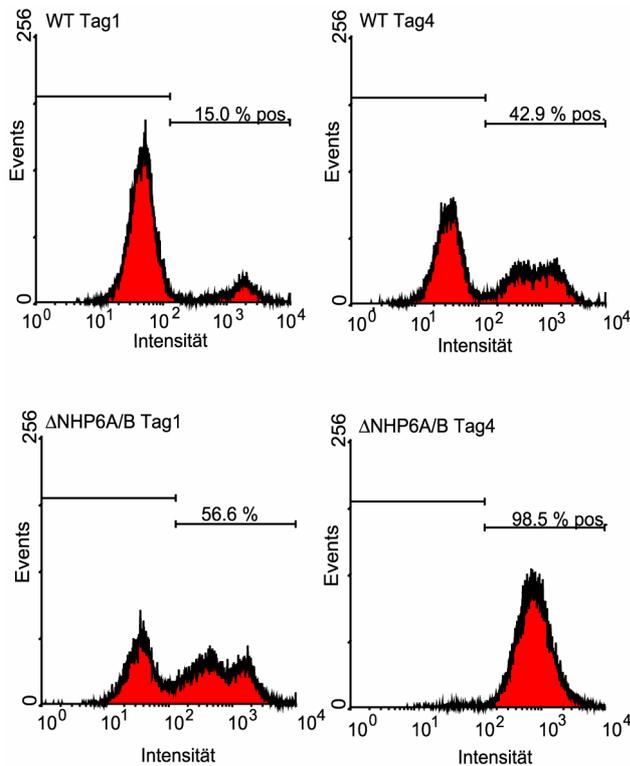


Abb. 36: Caspaseaktivität von WT und  $\Delta$ NHP6A/B während des Agings.

15 % der Wildtyp Zellen zeigten am Tag 1 Caspaseaktivität; bei der Doppeldisruptanten waren es bereits 56,6 %. Am Tag 4 hatte sich die Caspaseaktivität des Wildtyps auf 42,9 % erhöht, lag damit aber noch deutlich unter dem Wert von  $\Delta$ NHP6A/B mit 98,5 % caspasepositiven Zellen.

NHP6A/Bp fungiert folglich in der Bäckerhefe während des chronologischen Alterns als ein antiapoptotischer Faktor, dessen Disruption zu vermehrter Apoptose führt. Des weiteren ist das apoptotische Absterben der chronologisch alternden Kultur im  $\Delta$ NHP6A/B-Stamm caspaseabhängig.

### 3.4.2 Funktion von NHP6Ap in der exponentiellen Wachstumsphase

Um herauszufinden, ob NHP6Ap auch in der exponentiellen Wachstumsphase antiapoptotisch wirkt, haben wir mit einem Überexpressionskonstrukt gearbeitet (FMY 463). Das verwendete Konstrukt besaß keinen induzierbaren Promotor – NHP6A wurde folglich permanent exprimiert. Als Kontrolle diente das entsprechende Leerplasmid (FMY 462). Jeweils 30 ml SMD Medium mit Glucose wurden beim Wildtyp auf  $2 \cdot 10^5$  Zellen/ml beimpft, bei der langsam wachsenden Doppeldisruptanten auf  $6 \cdot 10^5$  Zellen/ml und die Kulturen wurden für 4 Stunden bei 28°C kultiviert. Nachdem mit dem Zellzähler sichergestellt worden war, dass alle Kulturen angewachsen waren und auch eine vergleichbare Zellzahl/ml besaßen, wurden die 30 ml Kulturen in je drei 10 ml Aliquots aufgeteilt und mit 0, 0,2 und 0,4 mM Wasserstoffperoxid als Apoptosestimulus versetzt. Anschließend wurden die Kulturen für weitere 4 Stunden auf dem Schüttler inkubiert, bevor jeweils 500 Zellen ausplattiert wurden.

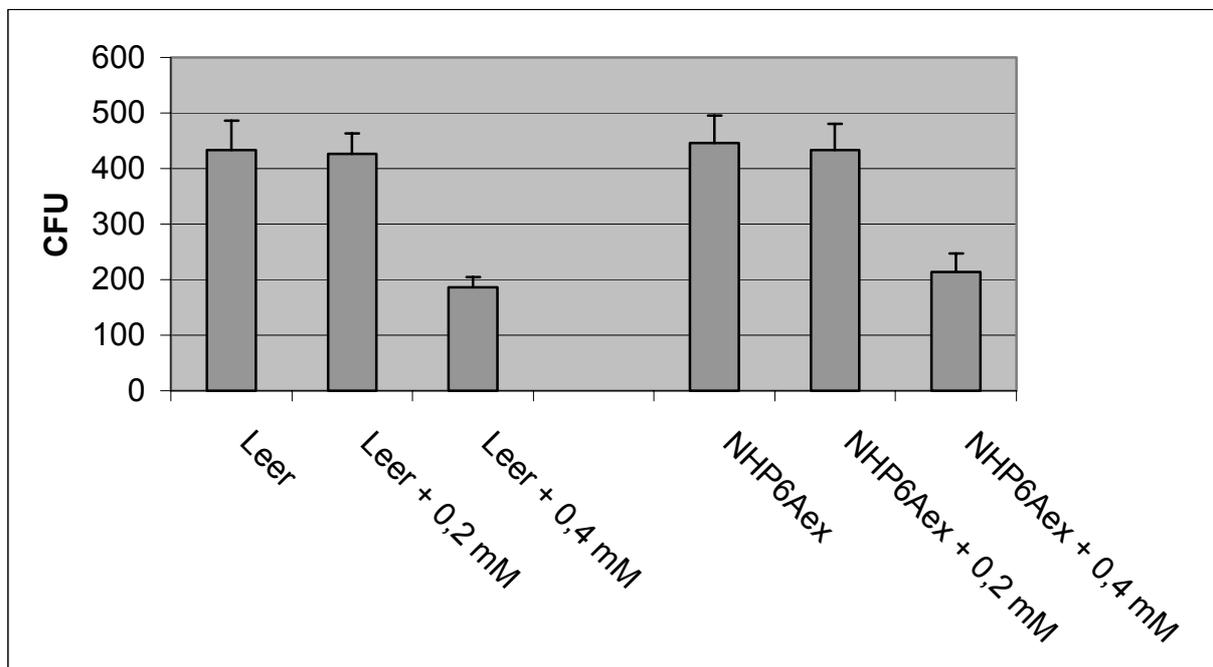


Abb. 37: Überlebensplattierung von NHP6A-Überexprimierer und dem Leerplasmid mit und ohne Wasserstoffperoxid.

Die Gegenwart von Wasserstoffperoxid führte zu einem konzentrationsabhängigen Absterben sowohl beim Überexpressionskonstrukt, als auch beim Leerplasmid. Beide Stämme zeigten hierbei annähernd die gleiche Sensitivität gegenüber dem

zugewetzten Apoptosestimulus; bei 0,4 mM Wasserstoffperoxid überlebten beim Leerplasmid 187 Kolonien, beim Stamm mit NHP6A-Überexpression betrug die CFU 214. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte NHP6Ap folglich in der exponentiellen Wachstumsphase nur geringfügig vor Apoptose schützen.

Eventuell wurde das Protein NHP6Ap aber auch nicht ausreichend stark exprimiert, um seine volle antiapoptotische Wirkung entfalten zu können. Aus diesem Grunde haben wir zusätzlich den Wildtyp und die  $\Delta$ NHP6A/B-Disruptante in der exponentiellen Wachstumsphase mit Wasserstoffperoxid belastet. Beide Stämme wurden analog zum NHP6A-Überexpressionskonstrukt und dem Leerplasmid angezogen. 0,5 mM  $H_2O_2$  wurden zugewetzt. 4 Stunden nach der Belastung mit Wasserstoffperoxid wurden Überlebensplattierungen durchgeführt.

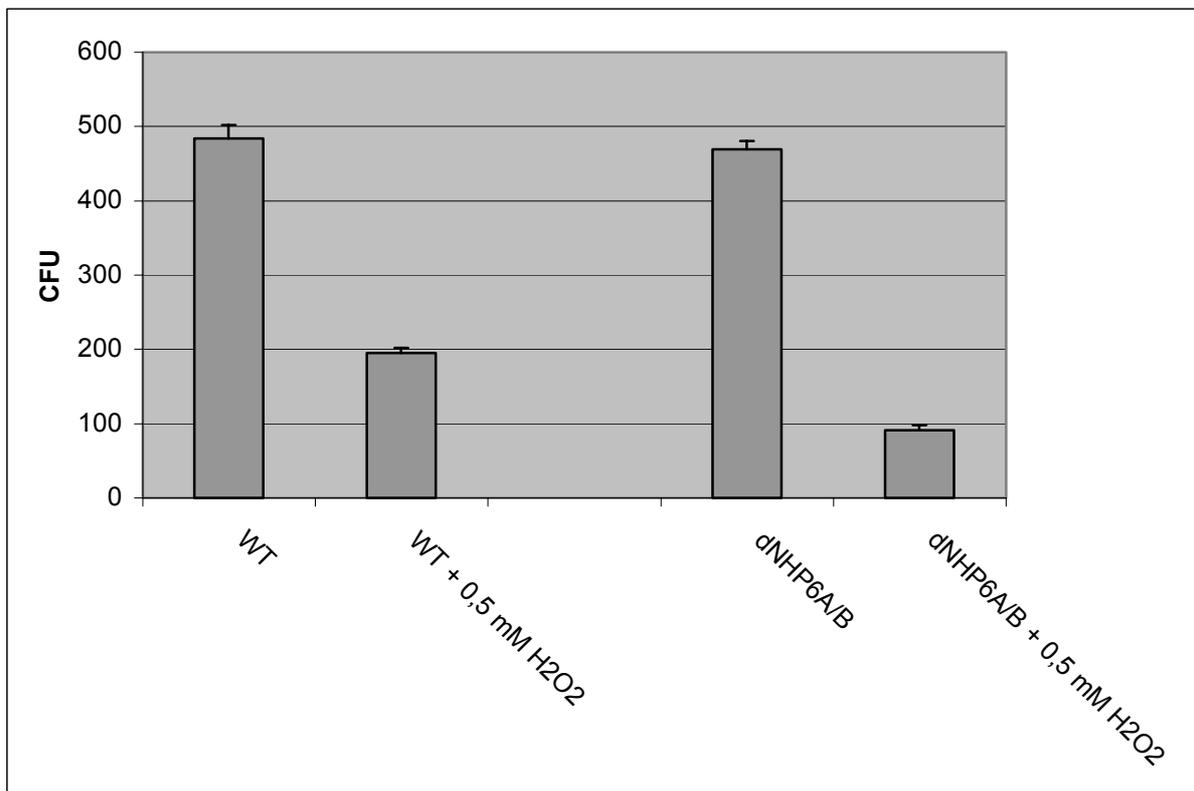


Abb. 38: Überlebensplattierung WT und  $\Delta$ NHP6A/B 4 Stunden nach einer Belastung mit 0,5 mM Wasserstoffperoxid.

Bei beiden Stämmen überlebten in der Überlebensplattierung fast alle unbehandelten Zellen. Nach dem Zusatz von 0,5 mM Wasserstoffperoxid waren beim Wildtyp 195 Zellen in der Lage Kolonien zu bilden, beim Disruptionsstamm waren es hingegen nur 91. NHP6A und NHP6B scheinen folglich auch in der exponentiellen Wachstumsphase eine leichte antiapoptotische Wirkung zu besitzen.

### 3.4.3 Zusammenhang DNA-Reparatur und Apoptose: Diskussion

HMGB1 wirkt in der Spaltheife antiapoptotisch. NHP6A und NHP6B sind die Bäckerhefe-Homologen von HMGB1.

Die Doppeldisruptante  $\Delta$ NHP6A $\Delta$ NHP6B zeigte ein stark verlangsamtes Wachstum; ausplattierte Zellen bildeten erst nach 3–4 Tagen ausreichend große Kolonien, um ausgezählt werden zu können. Und bereits einen Tag nach dem Beimpfen wies  $\Delta$ NHP6A $\Delta$ NHP6B verstärkt apoptotische Marker wie verringertes Überleben, Caspaseaktivität und DNA-Fragmentierung auf. Die Doppeldisruptante war zwar lebensfähig, die beiden Gene scheinen aber für einen gesunden Phänotyp essentiell zu sein. Erstaunlich war es zu sehen, dass auch der korrespondierende Wildtyp eine größere Apoptoseneigung als unser Standard-Wildtyp (KFY 715) zeigte. Auch er wies ein etwas verlangsamtes Wachstum auf; erst 3 Tage nach dem Ausplattieren war es möglich, die gewachsenen Kolonien auszuzählen, bei KFY 715 sind bereits nach 2 Tagen die Kolonien groß genug, um ausgezählt werden zu können.

In meinen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass die Disruption von NHP6A/B im chronologischen Altern die Apoptoseneigung erhöht und dadurch die alternde Doppeldisruptante deutlich schlechter als der korrespondierende Wildtyp überlebt und verstärkt apoptotische Marker aufweist.

Auch in der exponentiellen Wachstumsphase konnte von mir eine antiapoptotische Wirkung von NHP6A/B nachgewiesen werden. Da HMGB1 in Spaltheife an der DNA-Reparatur beteiligt ist, kann man sicherlich davon ausgehen, dass die Hefehomologen NHP6A/B auch in der DNA-Reparatur involviert sind. Damit wäre in der Bäckerhefe erstmalig ein Zusammenhang von DNA-Reparatur und Apoptose aufgezeigt und Hefe als Modellsystem weiter bestätigt.

## 4 Zusammenfassung

Bei der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* handelt es sich um einen einzelligen eukaryontischen Organismus, der befähigt ist Apoptose zu begehen, obwohl bei ihm lange Zeit keine Homologen der Exekutoren der Säugerapoptose gefunden werden konnten. Mit meiner Doktorarbeit konnte ich dazu beitragen, die Hefecaspase YCA1 als Caspase der Bäckerhefe zu etablieren. Sie besitzt caspaseartige Aktivität und ihre Überexpression führt zu einem Tod der Hefe mit apoptotischem Phänotyp. Durch diese Entdeckung konnten wir Hefe als Modellsystem für Apoptoseforschung bestätigen.

In einer Internetrecherche stießen wir auf das Fusionsgen SRO77, einem Interaktor der Hefecaspase YCA1. SRO77 besitzt mit SRO7 eine weitere Isoform in Hefe, die ein Homologes des Tumorsuppressors *I(2)gl* in *Drosophila* ist. Werden die Gene der SRO-Familie disruptiert, führt dies dazu, dass die Hefen sensitiver gegen Salzstress induzierte Apoptose werden. Im Falle des SRO7-Disruptionsstammes ist die Apoptose caspaseabhängig, bei  $\Delta$ SRO77 hingegen nicht.

Neben SRO77 existieren mit VAM7 und KRE11 noch zwei weitere Interaktoren der Hefecaspase YCA1 aus dem Bereich der Membranfusion. Die Hefecaspase YCA1 benötigt die Fusionsgene SRO77 und KRE11 um aktiv sein zu können. Es existieren damit erste Hinweise, die dafür sprechen, dass eine funktionierende Fusionsmaschinerie für die Exekution der Apoptose in Hefe nötig ist.

Des Weiteren konnte ich in der Bäckerhefe erstmalig einen Zusammenhang zwischen DNA-Reparatur und Apoptose aufzeigen. NHP6A und B sind unter anderem an der DNA-Reparatur beteiligt; sie fungieren sowohl in der exponentiellen Wachstumsphase, als auch während des chronologischen Alterns als antiapoptotischer Faktor.

## 5 Literatur

- Bianchi, M. E., Beltrame, M. (2000). Upwardly mobile proteins. Workshop: the role of HMG proteins in chromatin structure, gene expression and neoplasia. *EMBO Rep* 1: 109-114
- Bischoff, J. R., Casso, D., Beach, D. (1992). Human p53 inhibits growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 12: 1405-1411
- Bjornsti, M. A. (2002). Cancer therapeutics in yeast. *Cancer Cell* 2(4): 267-273
- Blomberg, A., Adler, L. (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 171(2): 1087-1092
- Brezniceanu, M.-L., Völp, K., Bösse, S., Solbach, C., Lichter, P., Joos, S., Zörnig, M. (2003). HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *FASEB J* 17(10): 1295-1297
- Brown, A. D., Simpson, J. R. (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol* 72(3): 589-591
- Chen, J. M., Rawlings, N. D., Stevens, R. A. E., Barrett, A. J. (1998). Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases. *FEBS Lett* 441: 361-365
- 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
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16
- Costigan, C., Kolodrubetz, D., Snyder, M. (1994). NHP6A and NHP6B, which encode HMG1-like proteins, are candidates for downstream components of the yeast SLT2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* 14(4): 2391-23403
- 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
- De Lorenzo, C., Mechler, B. M., Bryant, P. J. (1999). What is *Drosophila* telling us about cancer? *Cancer Metastasis Rev* 18(2): 295-311
- De Nadal, E., Calero, F., Ramos, J. (1999). Biochemical and genetic analyses of the role of yeast casein kinase 2 in salt tolerance. *J Bacteriol* 181: 6456-6462
- 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
- Dunbar, L. A., Caplan, M. J. (2001). Ion pumps in polarized cells: sorting and regulation of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>- and H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPases. *J Biol Chem* 276: 29617-29620.
- 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
- Fröhlich, K.-U.; Madeo, F. (2000). Apoptosis in yeast – a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett* 473: 6-9

- 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
- Haro, R., Garcíadeblas, 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
- Hockenberry, D. M., Oltavi, Z. N., Yin, X.-M., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251
- 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
- Humbert, P., Russell, S., Richardson, H. (2003). Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *Bioessays* 25: 542-553
- 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
- Ink, B., Zornig, M., Baum, B., Hajibagheri, N., James, C., Chittenden, T., Evan, G. (1997). Human Bak induces cell death in *Schizosaccharomyces pombe* with morphological changes similar to those with apoptosis in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 17: 2468-2474
- 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
- James, C., Gewschmeissner, S., Fraser, A., Evan, G. I. (1997). CED-4 induces chromatin condensation in *Schizosaccharomyces pombe* and is inhibited by direct physical association with CED-9. *Curr Biol* 7: 246-252
- 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
- Jurgensmeier, J. M., Krajewski, S., Armstrong, R. C., Wilson, G. M., Oltersdorf, T., Fritz, L. C., Reed, J. C., Oltvie, S. (1997). Bax- and Bak- induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 8: 325-339
- 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
- Kirkin, V., Joos, S., Zornig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3): 229-249
- Komatsu, K., Hopkins, K. M., Lieberman, H. B., Wang, H. (2000). *Schizosaccharomyces pombe* Rad9 contains a BH3-like region and interacts with the anti-apoptotic protein Bcl-2. *FEBS Lett* 481(2): 122-126

- Kwon, J., Imbalzano, A. N., Matthews, A., Oettinger, M. A. (1998). Accessibility of nucleosomal DNA to V(D)J cleavage is modulated by RSS positioning and HMG1. *Mol Cell* 2: 829-839
- 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
- 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
- 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
- Lowary, P. T., Widom, J. (1989). Higher-order structure of *Saccharomyces cerevisiae* chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(21): 8266-8270
- 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* 147(9): 2409-2415
- 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
- Madeo, F., Fröhlich E., Ligr, M., Grey, M., Sigrit, 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., Sigrist, S., Wesselborg, S., Fröhlich, K.-U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9: 911-917
- Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S., Fröhlich, K.-U. (2002). Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr Genet* 41(4): 208-216
- Manon, S., Chaudhuri, B., Guerin, M. (1997). Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-x<sub>L</sub>. *FEBS Lett* 415(1): 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): 1545-1556
- Matsuyama, S., Xu, Q., Velours, J., Reed, J. C. (1998). The mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast. *Mol Cell* 1: 327-336

- Nigro, J. M., Sikorski, R., Reed, S. I., Vogelstein, B. (1992). *Mol Cell Biol* 12: 1357-1365
- O'Brien, I. E. W., Reutelingsperger, C. P. M., Holdaway, K. M. (1997). *Cytometry* 29: 28-33
- 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
- Pavlov, E. V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E. H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S. J., Mannella, C. A., Kinnally, K. W. (2001). A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol* 155(5): 725-731
- Pender, M. P. (2003). Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends Immunol* 24(11): 584-588
- Rothstein, R. (1991). Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol* 194:281-301
- Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L. H., Thomson, C. B., Golemis, E., Fong, L., Wang, H. G. (1994). Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9238-9242
- Schulz, J. B., Bremen, D., Reed, J. C., Lommatzsch, J., Takajama, S., Wüllner, U., Löschmann, 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
- Severin, F.F., Hyman, A. A. (2002). Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 12, R233-R235.
- 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
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267(5203): 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
- 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
- Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9(4): 138-141
- 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
- Weaver, V. M., Lelievre, S., Lakins, J. N., Chrenek, M. A., Jones, J. C., Giancotti, F., Werb, Z., Bissell, M. J. (2002). Beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* 2(3): 205-216
- 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<sup>+</sup> 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
- Wodarz, A. (2000). Tumor suppressors: linking cell polarity and growth control. *Curr Biol* 10, R624-R626
- 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
- Xu, Q., Reed, J. C. (1998). Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis supressor identified by functional screen in yeast. *Mol Cell* 1: 337-346
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217(4566): 1214-1222
- Yu, S. P., Canzoniero, L. M., Choi, D. W. (2001). Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 13 (4): 405-411

## Meine akademischen Lehrer waren:

- Anatomie K. Reutter
- Anorganische Chemie E. Lindner, J. Strähle
- Botanik W.-E. Mayer
- Organische Chemie E. Bayer, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, E. Maier, H. Schott
- Humanphysiologie J. Ruppertsberg,
- Mathematik H. Pommer
- Mikrobiologie K. Poralla
- Pflanzenphysiologie K. Wegmann
- Physik W. Nakel, G. Staudt
- Physikalische Biochemie H. Bauer, W. Voelter
- Physikalische Chemie G. Gauglitz, V. Hoffmann
- Physiologische Chemie H. Bisswanger, P. Bohley, K. Eisele, K.-U. Fröhlich, B. Hamprecht, F. Madeo, D. Mecke, H. Probst, U. Weber, U. Weser
- Strahlenschutz H.-J. Reinecke
- Toxikologie K. Bock, U. Breyer-Pfaff, M. Schwarz, E. Pfaff
- Zoologie H. Günzel, W. Pfeiffer

## Lebenslauf

Corinna Maldener, Tübingen  
\*29.08.1973 in Esslingen

### Ausbildung, Schule

Seit 04/2001	Promotion im Rahmen des Graduiertenkollegs 686/1 am Physiologisch–Chemischen-Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Frank Madeo Thema der Doktorarbeit: Caspaseabhängige Apoptose in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
09/2000– 04/2001	Diplomarbeit im Physiologisch–Chemischen–Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fröhlich und Dr. Madeo Thema der Diplomarbeit: Suche nach Executoren der Apoptose in <i>S. cerevisiae</i> Note der Diplomarbeit: 1,0
10/1994- 08/2000	Studium der Biochemie an der Eberhard–Karls–Universität, Tübingen Abschluss: Diplombiochemikerin mit Humanphysiologie als Wahlfach Notendurchschnitt: 1,3
1990- 1993	Justus von Liebig Schule, Göppingen Abschluss: allgemeine Hochschulreife Notendurchschnitt: 1,6
1984– 1990	Schiller–Realschule, Göppingen Abschluss: mittlere Reife Notendurchschnitt: 1,8
1980– 1984	Südstadt–Grundschule, Göppingen

### Publikationen

- Wadskog, I., Maldener, C., Madeo, F., Adler, L. (2004). 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.
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K., 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.* 2004 Feb; 164(4):501-7.
- 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. Gen.* 2002 Jul; 41(4):208-16.
- Madeo, F., Herker E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., Fröhlich, K.-U. (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cel.* 2002 Apr; 9(4):911-7.