

Endogen Induzierter Programmierter Zelltod in *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von
Silke Wissing

Tag der mündlichen Prüfung:

15.06.2005

Dekan:

Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. F. Madeo

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. D. Mecke

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. W. Neupert

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. Dieter Mecke und Prof. Dr. Frank Madeo durchgeführt. Bei ihnen möchte ich mich für das Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Bei Prof. Dr. Frank Madeo bedanke ich mich weiterhin für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung, seine kreativen Vorschläge und Ideen und die Fähigkeit, einen über Durststrecken hinweg zu motivieren. Ein weiterer Dank an dieselbe Adresse für die Möglichkeit, nach intensiven anregenden Diskussionen eigene Ansätze verfolgen und auch einfach mal etwas ausprobieren zu können.

Bei Silvia Engelhardt, Eva Herker, Corinna Maldener, Astrid Proksch, Ralf Braun, Sabrina Büttner, Thorsten Decker, Marcel Deponte, Tobias Eisenberg, Helmut Jungwirth, Nina Lehmann, Alexander Link, Stefan Picker, Nadja Valtcheva und zahlreichen Hiwis möchte ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre im Labor und die zahlreichen Espressopausen, die mich immer wieder aufbauten und besonders am Morgen wach machten, bedanken.

Eva Herker möchte ich als erstes für ihre Freundschaft danken, zusätzlich möchte ich ihr noch für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen und für ihren wissenschaftlichen Sachverstand, der mich oftmals vor unsinnigen Experimenten bewahrt hat, danken. Des Weiteren ein großer Dank für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für mehrere miteinander durchgestandene Revisionsphasen.

Den Diplomanden Sabrina Büttner, Thorsten Decker und Alexander Link möchte ich für ihre Mitarbeit am Aif1p Projekt danken.

Bei Ralf Braun und Dr. Hans Zischka möchte ich mich für die Durchführung der Proteomanalysen, bei Dr. Peter Laun für die Durchführung der Transkriptomanalyse der Cdc48p Mutante bedanken.

Ein großer Dank geht an Dr. Helmut Jungwirth für seine Hilfe bei den Northern Blots.

Ein riesengroßes Dankeschön an Nina Lehman und Erika Herker für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zum Schluss möchte ich all den Leuten danken, die mich die letzten Jahre begleitet haben. Sie schafften es mich immer wieder aufzubauen, hatten stets Verständnis für lange Abende im Labor und zeigten trotz teilweise biochemischem Nichtwissen eine enorme Anteilnahme.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern und meinen Geschwistern dafür danken, dass sie genau so sind, wie sie sind.

Danke

Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht bzw. sind zur Publikation eingereicht:

F.Madeo, E.Herker, C.Maldener, S.Wissing, S.Lächelt, M.Herlan, M.Fehr, K.Lauber, S.J.Sigrist, S.Wesselborg, K.U.Fröhlich. (2002). **A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast.** *Mol. Cell.*;9(4):911-7.

F.Madeo, S.Engelhardt, E.Herker, K.A.Lehmann, C.Maldener, A.Proksch, S.Wissing, und K.U.Fröhlich. 2002. **Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine.** *Curr. Genet.*;41(4):208-16.

M.Breitenbach, F.Madeo, P.Laun, G.Heeren, S.Jarolim, K.U.Fröhlich, S.Wissing, und A.Pichova. 2003. **Yeast as a model for ageing and apoptosis.** Topics in *Curr. Genet.*; 3: 61-97

E.Herker, H.Jungwirth, K.A.Lehmann, C.Maldener, K.U.Fröhlich, S.Wissing, S.Büttner, M.Fehr, S.Sigrist, und F.Madeo. 2004 **Chronological aging leads to apoptosis in yeast.** *J. Cell Biol.* 164(4):501-7.

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

F.Madeo, E.Herker, S.Wissing, H.Jungwirth, T.Eisenberg, und K.U.Fröhlich. 2004 **Apoptosis in yeast.** *Curr. Opin. Microbiol.* 7(6):655-60

N.Vahsen, C.Candé, J.J.Brière, P.Bénil, N.Joza, N.Larochette, P.G.Mastroberardino, M.O.Pequignot, N.Casares, V.Lazar, O.Feraud, N.Debili, S.Wissing, S.Engelhardt, F.Madeo, M.Piacentini, J.M.Penninger, H.Schägger, P.Rustin, und G.Kroemer. 2004. **AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation.** *EMBO Journal* 23(23):4679-89.

R.J.Braun, H.Zischka, F.Madeo, S.M.Engelhardt, S.Wissing, D.Büringer und M.Ueffing. **Mutated CDC48, the yeast orthologue of valosin-containing protein, triggers mitochondria-dependent apoptosis.** *In Revision*

L.Ramachandran, P.Laun, L.Feng, P.Liang, X.Wang, D.T.Burhans, S.Wissing, S.Jarolim, B.Suter, F.Madeo, M.Breitenbach, und W.C.Burhans. **Evidence for global silencing by ORC of budding yeast genes associated with starvation, sporulation, aging and apoptosis.** *In Revision*

S.Wissing, F.Madeo und B.Fahrenkrog. **Bir1p is a substrate for Nma111p and is able to inhibit apoptosis in yeast.** *eingereicht*

S.Büttner, T.Eisenberg, E.Herker, S.Wissing und F.Madeo. **Why it's good for yeast to kill itself.** *eingeladener Artikel, FEMS Yeast Research; eingereicht*

S.Wissing, H.Zischka, R.Braun, H.Jungwirth, P.Laun, M.Breitenbach, K.U.Fröhlich, D.Wolf, M.Ligr, E.Herker, S.Sigrist, F.Madeo. **Cdc48 regulates apoptosis by NFkappaB orthologue-dependent downregulation of mitochondrial superoxide dismutase.** *In Vorbereitung*

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Apoptose: ein Überblick.....	1
1.1.1	Apoptose und ihre Bedeutung in mehrzelligen Organismen.....	1
1.1.2	Morphologische Marker der Apoptose.....	2
1.1.3	Grundzüge der Apoptosemaschinerie in Säugerzellen.....	3
1.1.3.1	Die Aktivierung der Apoptose.....	3
1.1.3.2	Das Mitochondrium, Quelle des Lebens und Forum des Todes.....	5
1.1.3.3	Proteine der Bcl-2 Familie.....	5
1.1.3.4	Caspasen	6
1.2	Apoptosis Inducing Factor (AIF).....	9
1.2.1	AIF vermittelte Apoptose in Metazoen	9
1.2.1.1	AIF und Cyclophilin A.....	10
1.2.1.2	AIF und Caspasen.....	10
1.2.2	Die Funktion von AIF in gesunden Zellen	11
1.3	Apoptose in <i>S. cerevisiae</i>	12
1.3.1	Exogen induzierte Apoptose in <i>S. cerevisiae</i>	13
1.3.2	Endogen induzierte Apoptose in <i>S. cerevisiae</i>	14
1.3.2.1	Yca1p eine Metacaspase in <i>S. cerevisiae</i>	14
1.3.2.2	Nma111 ein Omi/HtrA2 Homolog in <i>S. cerevisiae</i>	15
1.3.3	Der evolutionäre Sinn der Apoptose von <i>S. cerevisiae</i>	16
1.4	Cdc48/VCP.....	17
1.4.1	Neurodegenerative Erkrankungen und VCP	17
1.4.2	Neurodegenerative Erkrankungen und Superoxidanionen.....	18
1.4.3	NFκB und NFκB Homologe in <i>S. cerevisiae</i>	19
1.4.3.1	NFκB: Funktion und Aktivierung von NFκB in Säugerzellen.....	19
1.4.3.2	Spt23p und Mga2p: zwei NFκB Homologe in <i>S. cerevisiae</i>	20
1.5	Zielsetzung.....	22

2	MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1	Geräte.....	23
2.2	Chemikalien.....	23
2.3	Primer-Oligonukleotide.....	24
2.4	Puffer und Lösungen.....	25
2.5	Organismen.....	25
2.5.1	<i>Escherichia coli</i>	25
2.5.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
2.6	Kulturmedien.....	28
2.6.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
2.6.2	<i>Escherichia coli</i>	28
2.7	Stammhaltung und Kultivierung.....	28
2.7.1	Flüssigkulturen.....	28
2.7.1.1	Kultivierung von Deletionsmutanten für apoptotische Tests.....	29
2.7.1.2	Überexpression von Proteinen.....	29
2.7.1.3	Aufzucht der Cdc48p Mutante für verschiedene Apoptosetest.....	29
2.7.2	Plattenkulturen.....	30
2.7.3	Dauerkulturen.....	30
2.8	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.8.1	Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	31
2.8.2	Agarosegelelektrophorese.....	31
2.8.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.8.4	Restriktionsverdau.....	31
2.8.5	Ethanol-fällung.....	32
2.8.6	Transformation von <i>E. coli</i>	32
2.8.7	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	32
2.8.8	Präparation genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	33
2.8.9	Disruption von spezifischen Genen in <i>S. cerevisiae</i>	33

2.8.10	Epitop-Markierung in <i>S. cerevisiae</i>	34
2.8.11	Klonierung von Genen in Vektoren	34
2.8.12	Northern Hybridisierung.....	35
2.8.12.1	RNA-Präparation.....	35
2.8.12.2	Northern Blot.....	35
2.9	Zellbiologische Methoden	36
2.9.1	Überlebensplattierung.....	36
2.9.2	Tüpfeltest.....	36
2.9.3	Beschichtung von Objektträgern mit Polylysin.....	36
2.9.4	Sphäroplastierung von Zellen.....	37
2.9.5	Fixierung der Zellen mit Formaldehyd.....	37
2.9.6	TUNEL-Färbung	37
2.9.7	Diaminophenylindol (DAPI)-Färbung	38
2.9.8	Färbung der Zellen mit Calcein-Acetoxy-methylester	38
2.9.9	Fluoreszenzmikroskopie.....	39
2.9.10	Messung der Caspaseaktivität <i>in vivo</i>	40
2.10	Biochemische Methoden.....	40
2.10.1	Gewinnung von Rohextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	40
2.10.2	Chemische Lyse.....	41
2.10.3	Zellfraktionierung.....	41
2.10.4	SDS-PAGE.....	42
2.10.5	Expressionskontrollen durch Immunoblotting	42
2.10.5.1	<i>Semi-dry</i> Transfer	42
2.10.5.2	Detektion von Proteinen	43
2.10.6	<i>In vitro</i> Transkription und Translation	44
2.10.7	Importstudien in das Mitochondrium	44
2.10.8	DNase Aktivitätstest.....	45
2.10.9	Sod2p Aktivitätsmessung	46

3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	47
3.1	Aif1p	47
3.1.1	Der ORF YNR074c ist ein AIF Homolog in <i>S. cerevisiae</i>	47
3.1.2	Aif1p ist in gesunden Zellen mitochondrial lokalisiert.....	50
3.1.2.1	<i>in-vivo</i> Fluoreszenz Mikroskopie von yEGFP markiertem Aif1p	50
3.1.2.2	Aif1p ist im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert.....	51
3.1.2.3	Der Import von Aif1p ist abhängig vom TOM-Komplex	54
3.1.3	Induktion der Apoptose bewirkt Translokation von Aif1p in den Kern....	55
3.1.3.1	Ein Abbau der Zellwand induziert in der Hefe Apoptose.....	56
3.1.4	Die Disruption von AIF1 verhindert einen durch H ₂ O ₂ induzierten Zelltod ..	57
3.1.5	Überexpression von Aif1p induziert Apoptose in <i>S. cerevisiae</i>	58
3.1.6	Aif1p besitzt die Fähigkeit DNA zu schneiden.....	60
3.1.7	Die Rolle von Cyclophilinen bei der Aif1p vermittelten Apoptose.....	64
3.1.8	Das Zusammenspiel von Aif1p und Yca1p.....	70
3.1.9	Disruption von AIF1 verzögert einen durch chronologisches Altern hervorgerufenen Zelltod.....	71
3.1.10	Die Funktion von Aif1p in gesunden Zellen.....	73
3.1.11	Diskussion	79
3.2	Yca1p	83
3.2.1	Yca1p, eine Metacaspase in <i>S. cerevisiae</i>	83
3.2.2	Diskussion	85
3.3	Nma111p	86
3.3.1	Die Disruption von YCA1p rettet vor einem Nma111p vermittelten Zelltod.	86
3.3.2	Diskussion	88
3.4	Cdc48p	90
3.4.1	Proteom Untersuchungen des apoptotischen Cdc48p ^{S565G} Hefestamms identifizieren Cdc48p als weiteren Regulator der mitochondrialen Apoptose in Hefe	90
3.4.2	Transkriptom Analyse des apoptotischen Cdc48p ^{S565G} Hefestamms.....	93

3.4.3	In der proapoptotischen Cdc48p Mutante kommt es zu einer Verringerung der Sod2p Aktivität.....	96
3.4.4	Cdc48 ^{S565G} induzierte Apoptose führt zu einem erhöhten Level an freien Eisenionen in der Zelle.....	97
3.4.5	Eine Disruption von Mga2p führt zu einem erhöhten Sauerstoffstress in der Zelle.....	99
3.4.6	Der Δ mga2 Stamm weist eine niedrigere Transkription von Superoxiddismutase 2 mRNA auf.....	102
3.4.7	Die Überexpression eines N-terminalen Fragments von Mga2p verbessert das Überleben der Cdc48p Mutante.....	104
3.4.8	Diskussion	105
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	109
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	111
6	REFERENZEN.....	114

1 Einleitung

1.1 Die Apoptose: ein Überblick

Unter Apoptose, oder programmiertem Zelltod, versteht man eine durch definierte morphologische Marker charakterisierte Form des physiologischen Zelltodes. Diese morphologischen Marker wurden zuerst von Kerr, Wyllie und Currie (Kerr et al., 1972) beschrieben. Die Autoren erkannten, dass die physiologische Zelleliminierung eine eigenständige und genetisch kontrollierte Form des Zelltodes ist und prägten den Begriff Apoptose, ein Wort aus dem altgriechischen, das den Blätterfall im Herbst beschreibt (apo = ab, weg, los; ptosis = Senkung). Die Bedeutung der Apoptose bei der Aufrechterhaltung des Lebens aller Organismen wurde lange unterschätzt: Erst in den letzten Jahren wurde die zentrale Rolle der Apoptose bei verschiedenen Krankheiten erkannt.

1.1.1 Apoptose und ihre Bedeutung in mehrzelligen Organismen

Die Apoptose spielt in der Entwicklung von Organismen eine ebenso entscheidende Rolle wie die Mitose. Während der Embryogenese sorgt sie für die korrekte Formgebung von Körper und Organen, so werden zum Beispiel die Häute zwischen den Fingern apoptotisch entfernt (Jacobson et al., 1997) und bei der Metamorphose der Kaulquappe zum Frosch wird der Schwanz apoptotisch zurückgebildet. Nervenzellen werden in der Embryonalentwicklung des Menschen im Überfluss gebildet, um danach nur diejenigen von der Apoptose zu verschonen, die eine Synapse ausgebildet haben (Yuan et al., 2000). Ebenso wird im Uterus die innere Schleimhaut durch apoptotische Prozesse kurz vor Einsetzen der Menstruation von der Gebärmutterwand abgelöst (Hopwood und Levison, 1976). Dies ermöglicht die ständige Erneuerung der Gebärmutter Schleimhaut, eine der Grundvoraussetzungen für die Fortpflanzung von Säugetieren. Eine besondere Bedeutung hat die Apoptose bei der Selektion von Keimzellen: Schadhafte Keimzellen werden während der Reifung apoptotisch degradiert. So wird vermieden, dass krankhafte Veränderungen im genetischen Material sich auf die Nachkommen übertragen.

Die Apoptose ist aber auch für die Homöostase des adulten Körpers von größter Wichtigkeit. Sie dient dem Ausschalten von genotoxischen Zellen und somit der

Tumorsuppression. Viral infizierte Zellen werden ebenso apoptotisch entfernt (Shub, 1994) wie diejenigen Zellen des Immunsystems, die autoreaktiv auf den eigenen Organismus reagieren.

Angesichts der zentralen Rolle der Apoptose in der Entwicklung und der Homöostase von mehrzelligen Organismen ist es nicht erstaunlich, dass eine Fehlregulation der Apoptose zu schwerwiegenden Krankheiten führt. So kann die Tumorgenese auf eine verminderte Apoptoserate zurückzuführen sein, wie auch Autoimmunerkrankungen oder Diabetes. Ein erhöhter apoptotischer Abbau von T-Zellen charakterisiert das Krankheitsbild Aids (Ameisen, 1991), und auch bei neurodegenerativen Erkrankungen liegt eine vermehrte Apoptoserate von Neuronen vor (Thompson und Thompson, 1995).

1.1.2 Morphologische Marker der Apoptose

Zellen können nekrotisch oder apoptotisch sterben. Im Gegensatz zur Nekrose, dem ungerichteten und meistens unkontrollierten Zelltod, ist die Apoptose ein aktiver, und damit energieabhängiger Prozess.

Die Apoptose lässt sich durch verschiedene morphologische Veränderungen der Zelle von der Nekrose abgrenzen. In der frühen Phase der Apoptose wird das Phospholipid Phosphatidylserin, das normalerweise nur im inneren Blatt der Cytoplasmamembran zu finden ist, in das äußere Blatt externalisiert (Martin et al., 1995). Später wird die chromosomale DNA durch spezifische Endonukleasen in kleine Bruchstücke fragmentiert. In höheren Eukaryonten wird die DNA meistens in der Linkerregion zwischen zwei Nukleosomen geschnitten, so dass nach der Auftrennung der DNA eine typische Leiter mit den Vielfachen von ca. 150 bp entsteht. Des Weiteren kommt es zu einer Kondensation des Chromatins (Kerr et al., 1972) und zu einer Verringerung des Zellvolumens. Es entstehen apoptotische Körperchen, die dann von den Zellen des Immunsystems aufgenommen und abgebaut werden.

Im Laufe des apoptotischen Prozesses baut sich die Zelle also kontrolliert ab, wobei die Cytoplasmamembran beim Ablauf des apoptotischen Programms bis zum Ende funktionell intakt bleibt. So werden im Gegensatz zur Nekrose, bei der Zellinhalte austreten können, entzündliche Reaktionen im umgebenden Gewebe verhindert.

1.1.3 Grundzüge der Apoptosemaschinerie in Säugerzellen

Die Apoptosemaschinerie in Säugerzellen besteht aus verschiedenen Elementen, dazu gehören: die regulatorisch wirkenden Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*) Proteine (Übersichtsartikel siehe: Antonsson und Martinou, 2000), ausführende Caspasen (*cysteiny l aspartate-specific proteinases*) (Alnemri et al., 1996) und mitochondriale Proteine (van Loo et al., 2002), die im Zuge der Apoptose aus den Mitochondrien freigesetzt werden. Diese Kernelemente sind miteinander vernetzt, ebenso sind sie auch mit anderen pro- und antiapoptotischen Proteinen durch verschiedenste Reaktionsketten verbunden (Cohen et al., 1996).

1.1.3.1 Die Aktivierung der Apoptose

Die Apoptose kann über zwei Hauptwege aktiviert werden, einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg (Abbildung 1). Bei dem extrinsischen Weg werden die Todesrezeptoren, wie z.B. der CD95 Rezeptor oder der TNF Rezeptor (*tumor necrosis factor receptor 1*) durch ihre Liganden aktiviert (Übersichtsartikel, Krammer, 2000), welches zu einer Komplexierung der Rezeptoren und der Formierung des sogenannten todesinduzierenden Komplexes führt. Dieser Komplex bindet und aktiviert über das Adaptorprotein FADD (*Fas-associated death domain protein*) Caspase 8 Proteine. Der intrinsische oder mitochondriale Weg der Apoptoseinitiation dient als Antwort der Zelle auf extrazelluläre Reize wie z.B. Sauerstoffstress oder auf intrazelluläre Schäden wie z.B. Schädigung der DNA (Rich et al., 2000).

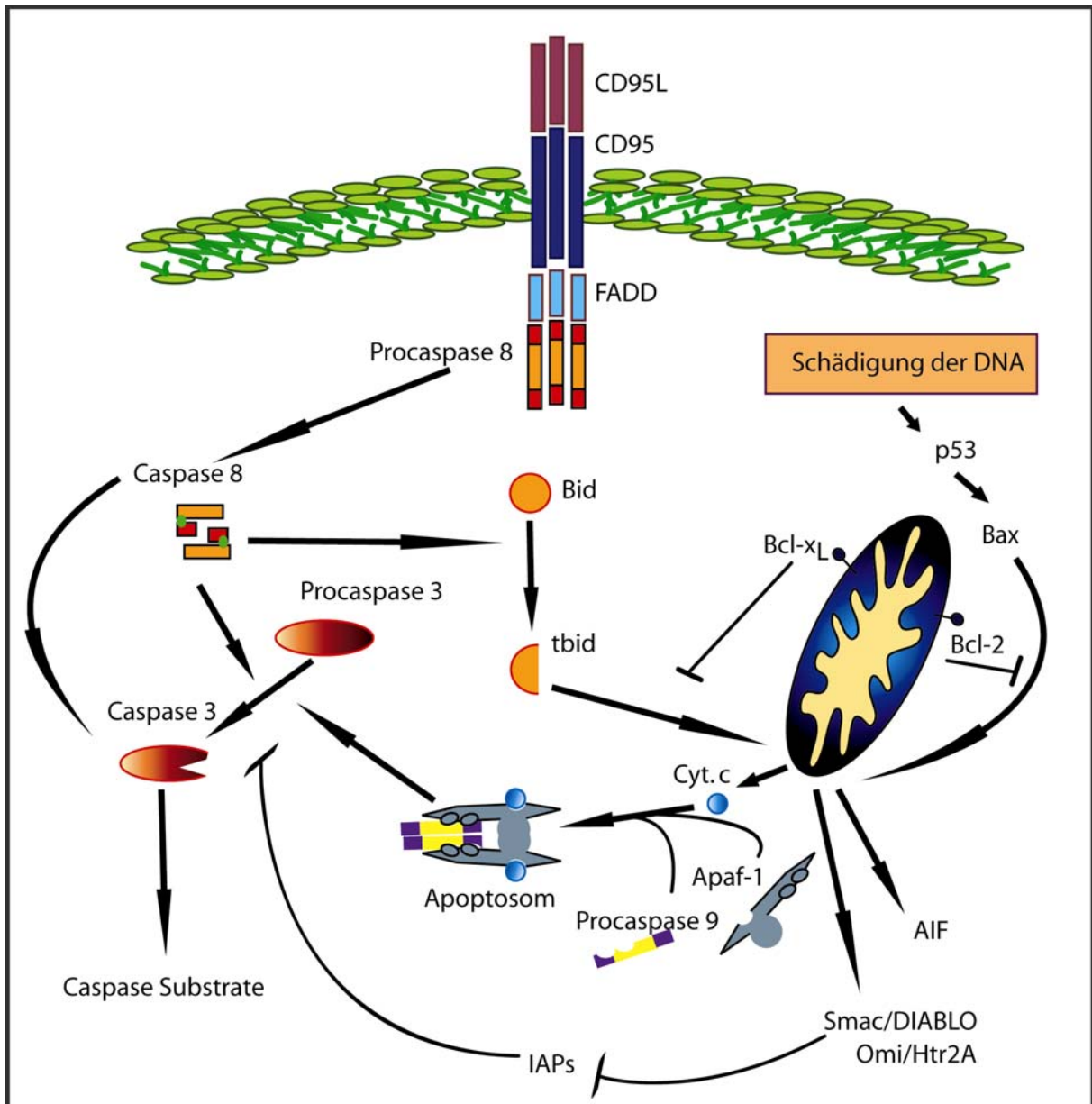


Abbildung 1: Überblick über die zwei Hauptwege der Apoptoseaktivierung in Säugerzellen, modifiziert nach Hengartner, 2000.

Durch proapoptische Proteine der Bcl-2 Familie kommt es hierbei zu einer Freisetzung von weiteren proapoptischen Proteinen aus dem Mitochondrium. Cytosolisches Cytochrom c bindet an Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*). Die Procaspase 9 wird an diesen Komplex assoziiert und aktiviert. Der Komplex als Ganzes wird dann Apoptosom genannt (Li et al., 1997; Henzel et al., 1997). Der extrinsische und intrinsische Weg laufen auf der Ebene der Caspase 3 Aktivierung wieder zusammen. Die Caspase 3 Aktivierung kann durch IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) blockiert werden, welche wiederum von dem

proapoptotischen Smac/DIABLO (*Second mitochondria-derived activator of caspase; Direct IAP binding protein with low pI*) (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000) oder von Omi/HtrA2 (*high temperature requirement A 2*) Proteinen aus dem Mitochondrium antagonisiert werden (Hegde et al., 2002). Die Aktivierung der Caspase 3 führt dann zu einer Vielzahl von Folgereaktionen und schließlich zum Abbau der Zelle.

Das proapoptotische Protein Bid aus der Familie der Bcl-2 Proteine stellt eine direkte Verbindung zwischen extrinsisch und intrinsisch vermittelten Apoptose dar. Bid wird durch Caspase 8 geschnitten (Li et al., 1998), das prozessierte Bid (tBid) transloziert zum Mitochondrium, wo es in der Folge zu einem Ausstrom von Cytochrom c (Gross et al., 1999) und der Assemblierung des Apoptosoms kommt.

1.1.3.2 Das Mitochondrium, Quelle des Lebens und Forum des Todes

Auf der einen Seite sind die Mitochondrien die Kraftwerke der Zelle, denn hier wird die Energie gewonnen, die eine Zelle zum Leben benötigt. Auf der anderen Seite beherbergt das Mitochondrium aber auch eine Vielzahl von proapoptotischen Proteinen. Das prominenteste unter ihnen ist Cytochrom c, das in gesunden Zellen Elektronen bei der oxidativen Phosphorylierung transferiert, dagegen aktiviert aus dem Mitochondrium freigesetztes cytosolisches Cytochrom c Caspase 9. Andere proapoptotische Proteine sind Smac/DIABLO, Omi/Htr2A, AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) (Susin et al., 1999b) und EndoG (*Endonuclease G*) (Li et al., 2001). Diese proapoptotischen Faktoren gelangen unter Beteiligung von Proteinen der Bcl-2 Familie aus dem Mitochondrium in das Cytosol.

1.1.3.3 Proteine der Bcl-2 Familie

Die Bcl-2 Familie beinhaltet ein ganzes Arsenal an verschiedenen pro- und antiapoptotischen Regulatorproteinen. Zu den antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen gehören Bcl-2 und Bcl-x_L, zu den proapoptotischen Mitgliedern gehören Bax, Bid und Bad. Die Proteine dieser Familie koordinieren die Funktion der Mitochondrien im apoptotischen Geschehen. Im Gegensatz zu Bcl-2, das größtenteils am Mitochondrium lokalisiert ist, befinden sich Bax, Bad oder Bid im Cytosol (Gross et al., 1999; Puthalakath et al., 1999). Diese cytosolischen, inaktiven Proteine können bei einem proapoptotischen Signal zum Mitochondrium translozieren, wo sie dann die Wirkung der antiapoptotischen Bcl-2 Proteine antagonisieren. In der

Folge werden weitere proapoptotische Proteine aus dem Mitochondrium freigesetzt. Der genaue Mechanismus der Freisetzung ist noch unklar, es werden verschiedene Modelle diskutiert: Da die Proteine der Bcl-2 Familie in der Lage sind, Poren zu formen (Reed, 1997), wurde diskutiert, dass Bax Kanäle bildet, durch die dann Cytochrom c aus dem Mitochondrium ins Cytosol strömen könnte. Eine zweite Möglichkeit ist die Interaktion mit und die Modulierung von vorhanden mitochondrialen Poren, wie z.B. des VDAC (*voltage dependent anion channel*). Des Weiteren wurde eine Änderung der Homöostase der Mitochondrien durch die Bcl-2 Proteine diskutiert. Eine Veränderung der Ionenkonzentrationen könnte zu einem Schwellen der Mitochondrien führen, was wiederum zu einem Aufreißen der äußeren Mitochondrienmembran und zu der Freisetzung von proapoptotischen Proteinen führen würde (Sattler et al., 1997).

1.1.3.4 Caspasen

Die meisten morphologischen Veränderungen während der Apoptose werden von einer Gruppe von Cystein-Proteasen hervorgerufen. Diese „Todesproteasen“, Caspasen genannt, sind untereinander homolog. Caspasen gelten als die Schlüsseleffektoren der Apoptose, da eine Inhibierung der Caspasen die Apoptose in Säugerzellen stark verringert oder sogar völlig blockiert (Earnshaw et al., 1999).

Die Aktivierung von Caspasen bewirkt eine definierte Degradation von Proteinen, da Caspasen eine hohe Substratspezifität besitzen, die jeweils von den vier N-terminalen Aminosäuren vor dem Aspartatrest der Schnittstelle bestimmt werden (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die Aktivierung von Caspasen hat verschiedene Effekte: So führt das Zerschneiden des Caspasezielproteins PARP (*Poly [ADP-ribose] polymerase*) zu einer Inaktivierung dieses Proteins; Multiproteinkomplexe wie die Kernlamina werden durch die Caspasen aufgelöst und somit ebenfalls inaktiv (Rao et al., 1996). Durch die Degeneration von Inhibitoren können aber auch proapoptotische Proteine, wie z.B. CAD (*caspase activated DNase*), freigesetzt und aktiviert werden. Die CAD ist immer in der Zelle vorhanden, wird aber durch den Inhibitor ICAD in einem inaktiven Zustand gehalten. Während der Apoptose wird ICAD durch Caspasen geschnitten und CAD freisetzt (Sakahira et al., 1998). Die CAD ist hauptsächlich für die Fragmentierung der DNA in apoptotischen Zellen verantwortlich (Wyllie et al., 1980).

Wie die meisten Proteasen werden auch die Caspasen als inaktive Zymogene synthetisiert. Sie bestehen aus drei Domänen, einer N-terminalen Prodomäne, und den p20 und p10 Domänen. Die Aktivierung erfolgt durch eine proteolytische Spaltung zwischen der p20 und der p10 Domäne. Aktive Säugercaspasen bestehen aus einem Heterotetramer mit jeweils zwei p20/p10 Domänen und zwei aktiven Zentren.

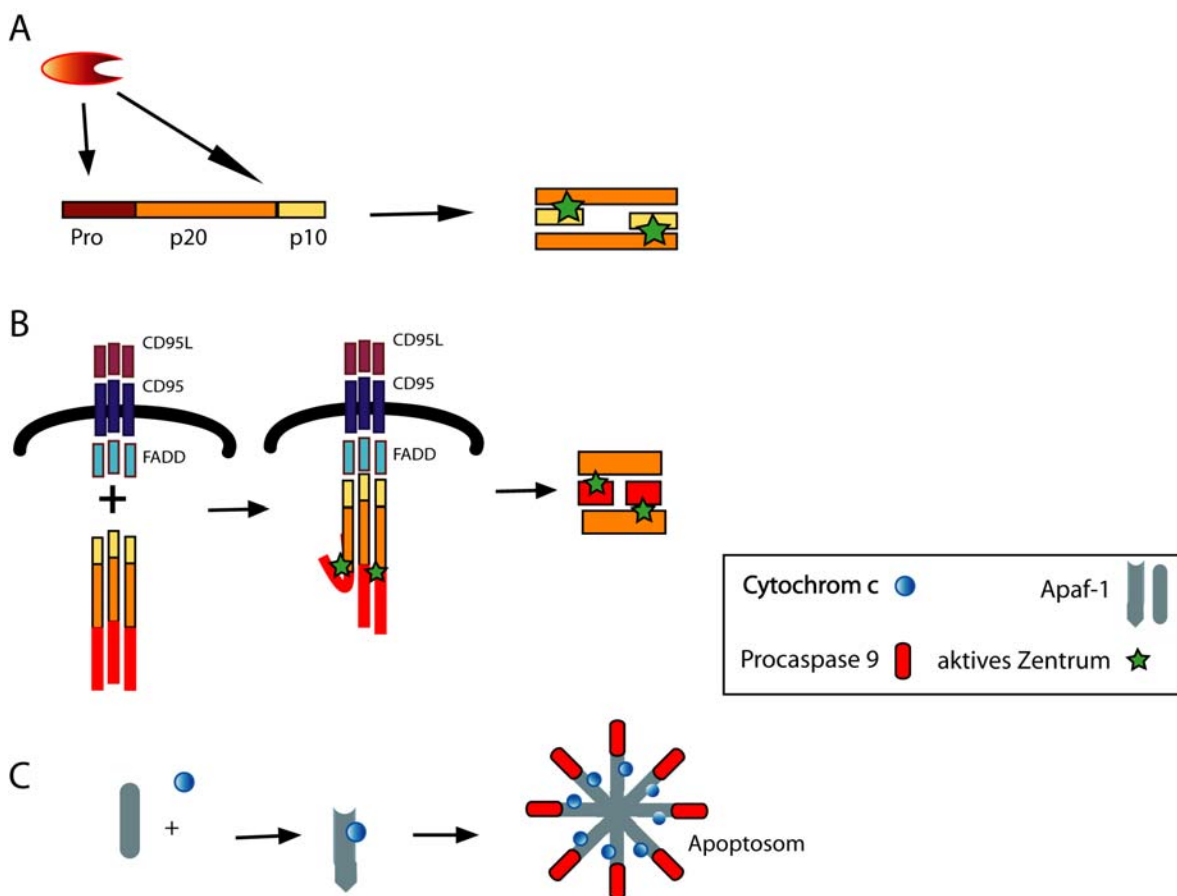


Abbildung 2: Schematische Übersicht der Caspaseaktivierung, modifiziert nach Hengartner, 2000.

Am besten verstanden ist die Aktivierung der Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7), diese werden in der Regel durch andere Caspasen geschnitten und aktiviert (Abbildung 2A). Hierdurch wird eine Caspase Kaskade ausgelöst, die das apoptotische Signal amplifiziert.

Initiatorcaspasen, wie die Caspasen 8 und 9, werden durch Protein-Proteinwechselwirkungen aktiviert.

Caspase 8, die Initiatorcaspase im Todesrezeptorweg, wird autokatalytisch prozessiert. Durch die Komplexierung von mehreren Procaspasen 8 am Todesrezeptor reicht die geringe intrinsische Proteaseaktivität der Procaspase 8 aus, um andere Procaspasen 8 zu aktivieren (Muzio et al., 1998) (Abbildung 2B). Im Gegensatz zu den anderen Caspasen wird die Aktivität der Caspase 9 durch eine Prozessierung nicht wesentlich erhöht (Rodriguez und Lazebnik, 1999; Stennicke et al., 1999). Die Aktivierung der Caspase 9 erfolgt durch eine Komplexierung mit Apaf-1 und Cytochrom c (Li et al., 1997) (Abbildung 2C).

Wie oben erwähnt, nehmen die Caspasen eine Schlüsselrolle in der Apoptose ein, es werden aber auch caspaseunabhängige Apoptosewege diskutiert. Ein wichtiger, wenigstens zum Teil caspaseunabhängiger Apoptoseweg, scheint der AIF vermittelte Zelltod zu sein, auf den nun im folgenden näher eingegangen wird.

1.2 Apoptosis Inducing Factor (AIF)

AIF ist ein phylogenetisch altes Flavoprotein, das im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist. Es wurde erstmals von Susin et al., (Susin et al., 1999b) charakterisiert. Wie die meisten mitochondrialen Proteine wird AIF im Cytosol synthetisiert und zum Mitochondrium transportiert. Nach der proteolytischen Abspaltung der mitochondrialen Lokalisationssequenz, und der Inkorporation der prosthetischen Gruppe FAD entsteht das reife 57 kDa schwere Protein.

In Sequenzvergleichen mit Proteinen bekannter enzymatischer Funktion weist AIF die größte Homologie zu pflanzlichen Ascorbat Reduktasen und bakteriellen NADH-Oxidoreduktasen auf (Lorenzo et al., 1999). Kristallstrukturanalysen des murinen und humanen AIF haben bestätigt (Mate et al., 2002; Ye et al., 2002), dass das Protein eine stark konservierte Oxidoreduktasedomäne enthält.

Neben der Oxidoreduktaseaktivität besitzt AIF einen DNA-bindenden Anteil, der sich auf eine Furche an der Oberfläche des Proteins zurückführen lässt, die mit positiv geladenen Aminosäureresten ausgekleidet ist (Ye et al., 2002).

1.2.1 AIF vermittelte Apoptose in Metazoen

Eine Induktion der Apoptose führt zu einer Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium und zu einer Translokation in den Kern. Hier bewirkt AIF eine Fragmentierung der DNA in 50 kbp große Bruchstücke. Da aufgereinigtes AIF ohne die prosthetische Gruppe FAD ebenfalls zu einer Fragmentierung von DNA und zu Chromatinkondensation in gereinigten Kernen führt, ist die Oxidoreduktasedomäne für die proapoptotische Funktion von AIF nicht essentiell (Susin et al., 1999b). Durch Mutagenesestudien konnte allerdings gezeigt werden, dass die DNA-Bindung für die apoptogene Funktion von AIF erforderlich ist (Ye et al., 2002).

Durch verschiedene Studien wurde gezeigt, dass AIF zur Degradation der chromosomalen DNA Interaktionspartner benötigt. Bei der Zugabe von rekombinant aufgereinigtem AIF zu gereinigten Zellkernen, welche noch die gesamten Proteine des Zellkerns in funktioneller Form besitzen, kommt es zu einer Degradation von DNA. Aufgereinigtes AIF zeigt aber keine DNase Aktivität bei zuvor erhitzten Zellkernen oder nackter Plasmid-DNA (Susin et al., 1999b;

Wang et al., 2002). Candé et al. konnten zeigen, dass AIF und Cyclophilin A interagieren, und dass aufgereinigtes AIF die intrinsische Nukleaseaktivität von Cyclophilin A in erheblichem Maße steigert (Candé et al., 2004).

1.2.1.1 AIF und Cyclophilin A

Cyclophiline sind hochkonservierte ubiquitäre Proteine mit vielfältigen Aufgaben in der Zelle. Sie katalysieren die *cis-trans*-Isomerisierung von Peptidylprolyl Bindungen, einer der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte in der Proteinfaltung, und besitzen somit auch Chaperonwirkung (Takahashi et al., 1989; Wittmann-Liebold et al., 1989; Schiene und Fischer, 2000).

Neben ihrer Aufgabe bei der Proteinfaltung besitzen die Cyclophiline noch weitere Funktionen in der Zelle. Montague et al. fanden, dass Cyclophilin A eine Sequenzhomologie zur Nuklease NUC18 aufweist (Montague et al., 1994). Rekombinantes Cyclophilin A vermag denaturierte DNA zu degradieren, diese Fähigkeit ist unabhängig von der Peptidylprolyl-Isomerase Aktivität von Cyclophilin A (Montague et al., 1997). Kürzlich fanden Candé et al., dass Cyclophilin A mit AIF interagiert und die Nukleaseaktivität von Cyclophilin A steigert (Candé et al., 2004). Ebenso wie AIF transloziert Cyclophilin A nach einem proapoptotischen Stimulus in den Kern und führt dort zur Chromatinlyse. Da jedoch eine AIF-Defizienz zu schweren Entwicklungsschäden in murinen embryonalen Stammzellen (Joza et al., 2001) und in *C. elegans* (Wang et al., 2002) führt, das Fehlen von Cyclophilin A aber keinen erkennbaren Nachteil für die Entwicklung mit sich bringt (Colgan et al., 2000), scheinen noch weitere Nukleasen und AIF interagierende Proteine an der Chromatinlyse beteiligt zu sein.

1.2.1.2 AIF und Caspasen

Es ist noch sehr umstritten, inwiefern die AIF vermittelte Apoptose abhängig von einer Caspaseaktivierung ist, es scheint sowohl caspaseabhängige als auch caspaseunabhängige Szenarien für die Apoptoseexekution zu geben. So erfolgt die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium zeitlich kurz nach der Ausschüttung von AIF (Arnoult et al., 2003), Caspase Inhibitoren konnten aber weder die Ausschüttung von AIF noch von Cytochrom c verhindern. Außerdem konnte gezeigt werden, dass AIF in der frühen Embryonalentwicklung ohne Mitwirkung von Caspasen Apoptose auslöst (Joza et al., 2001; Daugas et al.,

2000; Cregan et al., 2002). Diese Ergebnisse deuten auf einen caspaseunabhängigen apoptotischen Signalweg hin. Verschiedene andere Studien weisen jedoch darauf hin, dass AIF auch in dem Caspase vermittelten Zelltod eine Rolle spielt (Arnoult et al., 2002). Ob AIF caspaseabhängig oder unabhängig tötet, könnte vom Zelltyp und von dem jeweiligen apoptotischen Stimulus abhängen (Cande et al., 2002). Eventuell stellt der caspaseunabhängige AIF vermittelte Zelltod eine evolutionär ältere Möglichkeit zur Einleitung der Apoptose dar, die nur noch in physiologischen Fällen, wie der frühen Embryonalentwicklung, in reiner Form auftritt. So konnte gezeigt werden, dass embryonale Stammzellen mit deletiertem AIF Gen eine normale Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Reagenzien und UV-Licht zeigen, aber resistent gegenüber Serumzug sind (Joza et al., 2001). Ebenso verhindert die Deletion des AIF Gens in diesen Stammzellen die für die Initiation der Gastrulation essentielle Cavitation.

Weiterhin wurde inzwischen ein AIF-ähnliches Protein gefunden: AMID (*apoptosis inducing factor homologous mitochondrion associated inducer of death*) (Wu et al., 2002); welches ebenfalls am Mitochondrium lokalisiert ist und bei apoptotischen Stimuli caspaseunabhängig in den Kern transloziert.

1.2.2 Die Funktion von AIF in gesunden Zellen

Die physiologische Funktion der Oxidoreduktasedomäne von AIF ist noch weitgehend unklar. *In vitro* Studien zeigen, dass AIF in Gegenwart von NADH Cytochrom c reduzieren kann (Miramar et al., 2001). Deshalb wurde über eine Beteiligung von AIF am Elektronentransfer der Atmungskette spekuliert (Mate et al., 2002). Klein et al. (2002) diskutieren basierend auf Beobachtungen an der Harlequin Mausmutante eine antioxidative, möglicherweise auch antiapoptische Funktion der Oxidoreduktasedomäne. Sie fanden heraus, dass diese Mausmutanten, deren Phänotyp aus einer mit dem Alter fortschreitenden Degeneration cerebraler und retinaler Neuronen besteht, eine Insertion im ersten Intron des AIF Gens aufweisen, was zu einer um 80 % verminderten AIF Expression führt. Dies steht jedoch im Widerspruch zu *in vitro* Studien, in denen die Oxidoreduktasedomäne eher reaktive Sauerstoffspezies generiert als entschärft (Miramar et al., 2001).

1.3 Apoptose in *S. cerevisiae*

Da bei einem Einzeller nicht ohne weiteres zu erkennen ist, welchen evolutionären Vorteil er davon haben könnte, sich selber zu vernichten, war die Existenz eines apoptotischen Programms in Einzellern lange umstritten. Die Tatsache aber, dass apoptoseartige Szenarien inzwischen in verschiedenen Einzellern beschrieben wurden, hat zu der Akzeptanz dieses Phänomens beigetragen. So wurden die typischen morphologischen Veränderung der Apoptose inzwischen bei *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Tetrahymena thermophila* und *Dictyostelium discoideum* gefunden (Ameisen, 1996).

Saccharomyces cerevisiae ist schon seit Jahrzehnten ein beliebter Modellorganismus zur Aufklärung von komplexen physiologischen Prozessen in Metazoen. So wurde z.B. die Regulation des Zellzyklus oder der Transport von Proteinen hauptsächlich in der Hefe aufgeklärt. Nachdem 1997 die vollständige Sequenzierung des Genoms von *S. cerevisiae* abgeschlossen war, wurde versucht, durch eine einfache Homologiesuche zentrale Effektoren der Apoptose in Hefe zu finden, was aber nicht gelang. 1997 entdeckte jedoch die Gruppe um Madeo eine Mutante, die die typischen morphologischen Veränderung der Apoptose aufzeigte: Diese Cdc48^{S565G} Mutante zeigte DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation und Phosphatidylserin Externalisierung (Madeo et al., 1997).

Die Entdeckung, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in der Bäckerhefe Apoptose auslösen können (Madeo et al., 1999), bewies, dass der apoptotische Phänotyp nicht auf eine Mutante beschränkt ist, sondern auch im Wildtyp ausgelöst werden kann. Inzwischen wurden auch zentrale Effektoren der Apoptose in Hefe entdeckt, wie z.B. die Caspase Yca1p (Madeo et al., 2002), ein Omi/Htr2A Homolog (Fahrenkrog et al., 2004), das Bax Inhibitorprotein Bi-1 (Chae et al., 2003) und der konservierte Cdc6p-Proteasom Apoptoseweg (Blanchard et al., 2002). Ebenso wurden physiologische Szenarien beschrieben, in denen die Bäckerhefe apoptotisch stirbt, dazu gehören chronologisches (Herker et al., 2004) und replikatives Altern (Laun et al., 2001). Abbildung 3 zeigt einen Überblick über die bisher bekannten Auslöser der Apoptose in Hefe und die daran beteiligten Proteine.

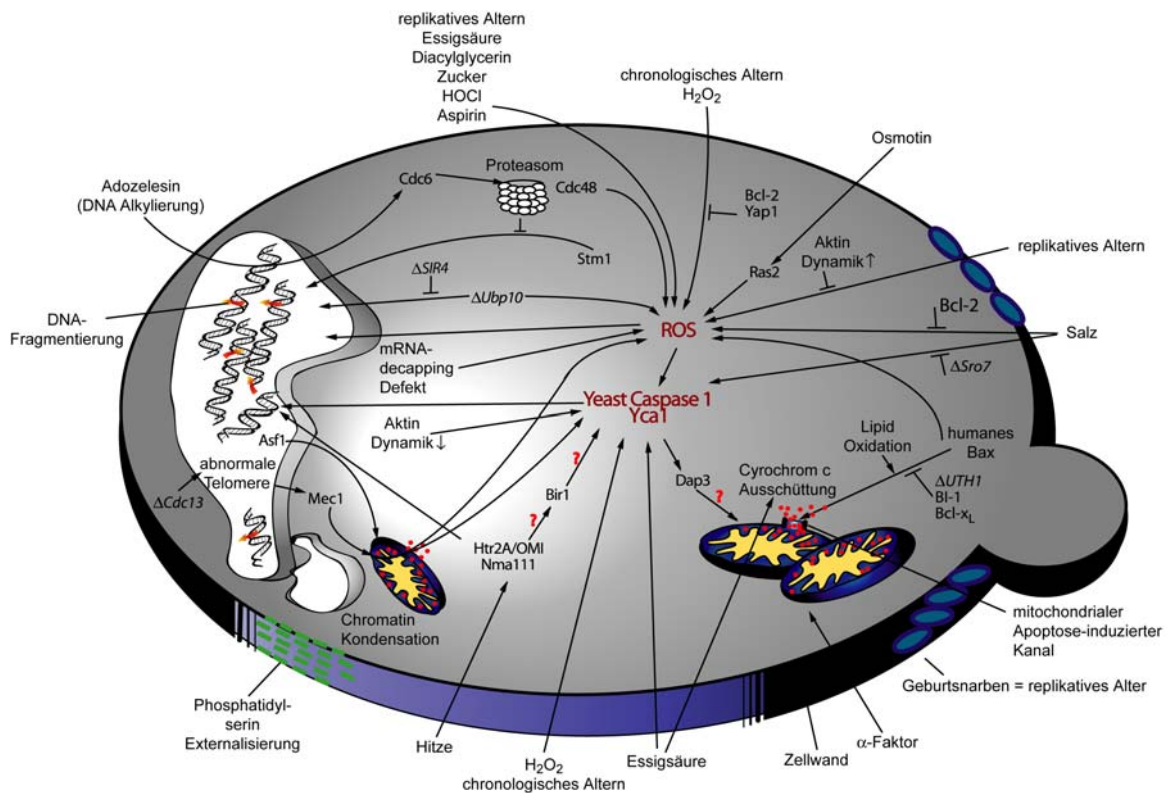


Abbildung 3: Die apoptotische Hefezelle.

Dargestellt sind die bisher bekannten Auslöser der Apoptose in Hefe (außen) und bekannte Apoptosewege (innen). Die roten Fragezeichen symbolisieren in Säugern bekannte Apoptosewege, die in der Hefe bisher noch nicht aufgeklärt werden konnten. Die zwei Schlüsselfaktoren Yca1p und ROS (reaktive Sauerstoffspezies) sind rot gekennzeichnet.

Durch die Untersuchungen der Apoptose in Hefe konnten auch neue Apoptosewege und Effektoren in Säugerzellen entdeckt werden. So demonstrierten Shirogane et al. eine apoptoseregulierende Funktion bei VCP/p97, dem humanen Homolog von Cdc48p (Shirogane et al., 1999). Auch in *C. elegans* wurde eine antiapoptotische Rolle für das Cdc48p Homolog beschrieben (Wu et al., 1999).

1.3.1 Exogen induzierte Apoptose in *S. cerevisiae*

Die Apoptose kann durch viele verschiedene äußere Faktoren ausgelöst werden: Wasserstoffperoxid und Essigsäure lösen in geringen Dosen in der logarithmischen Wachstumsphase den Zelltod aus. Dieser geht einher mit den typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose (Madeo et al., 1999; Ludovico et al., 2001). Bei der Gabe von Osmotin, einem Peptid, welches von

Pflanzen zum Schutz vor Pilzen produziert wird, sterben die Hefezellen apoptotisch (Narasimhan et al., 2001). Ebenso können Kochsalz (Huh et al., 2002) und das Hefe Pheromon α -Faktor Apoptose in Hefe auslösen (Severin und Hyman, 2002). Aber nicht nur exogene Faktoren können einen apoptotischen Zelltod auslösen, inzwischen sind auch verschiedene endogene Faktoren bekannt, die in der Hefe einen apoptotischen Zelltod induzieren.

1.3.2 Endogen induzierte Apoptose in *S. cerevisiae*

Eine Überexpression von proapoptotischen Proteinen in *S. cerevisiae* sensibilisiert die Zellen für proapoptotische Reize, wie beispielsweise Wasserstoffperoxid. So führt die Gabe von geringen Dosen Wasserstoffperoxid zu Zellen, welche ein proapoptotisches Gen überexprimieren, wie z.B. Nma111p oder Yca1p, zur Apoptose. Eine Disruption von proapoptotischen Genen verringert die Sensibilität gegenüber proapoptotischen Reizen, wie Wasserstoffperoxid. Ebenso führt eine Disruption zu einem längeren Überleben im chronologischen Altern.

1.3.2.1 Yca1p eine Metacaspase in *S. cerevisiae*

Im Jahre 2000 konnten in einer genomweiten Homologiesuche caspaseähnliche Proteine in verschiedenen Organismen entdeckt werden (Uren et al., 2000): Meta- und Paracaspasen. Paracaspasen kommen in Tieren, Metacaspasen in Pflanzen, Pilzen und Protozoen vor. Das katalytische Zentrum besteht wie bei humanen Caspasen aus einer Cystein-Histidin Diade, umgeben von basischen Aminosäuren. Die, aus der Sequenz, vorhergesagte Sekundärstruktur von Meta- und Paracaspasen gleicht denen von Säugercaspasen.

Inzwischen wurde die essentielle caspaseartige Funktion der pflanzlichen Metacaspasen während der Entwicklung gezeigt (Bozhkov et al., 2004; Suarez et al., 2004).

Auch die Funktion der Metacaspase Yca1p in *S. cerevisiae* wurde genauer untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Yca1p eine zentrale Rolle während der Apoptose einnimmt. So führt die Überexpression von Yca1p zu einem apoptotischen Sterben der Zellen (Madeo et al., 2002), das mit einer Erhöhung der *in vivo* Caspaseaktivität im fluorometrischen Caspaseaktivitätsassay einher geht (Madeo et al., 2002). Der Zelltod während einer Überexpression von Yca1p kann durch Caspaseinhibitoren verhindert werden. Ebenso verhindert eine Mutation im

katalytischen Zentrum das Sterben der Zellen (Madeo et al., 2002). Eine Deletion von Yca1p verhindert den Zelltod im chronologischen Altern (Madeo et al., 2002; Herker et al., 2004), nach oxidativem Stress oder Salzstress (Madeo et al., 2002; Wadskog et al., 2004), siehe auch Abbildung 3.

1.3.2.2 Nma111 ein Omi/HtrA2 Homolog in *S. cerevisiae*

Omi (Faccio et al., 2000), auch HtrA2 (Gray et al., 2000) genannt, ist eine Serin-Protease und im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert. Sie wird nach proapoptotischen Stimuli wie anti-Fas Liganden, TRAIL, Staurosporin oder UV Strahlung aus dem Intermembranraum freigesetzt und gelangt in das Cytosol. Dort interagiert Omi/HtrA2 mit cytosolischen IAP Proteinen (siehe auch Abbildung 1). Durch die Komplexierung mit IAP Proteinen wird eine Inhibierung der Caspase 3 aufgehoben, Omi/HtrA2 wirkt somit im Cytosol proapoptotisch. Neben diesem Effekt, der auf die IAP Komplexierung zurückzuführen ist, wirkt Omi/HtrA2 auch durch seine Serin-Protease Aktivität proapoptotisch, und eine Überexpression von reifem Omi/HtrA2, das keine mitochondriale Lokalisationssequenz besitzt, führt auch ohne Caspaseaktivierung zum Zelltod (Martins et al., 2002; Hegde et al., 2002).

Omi/HtrA2 ist ein evolutionär altes Protein, konserviert in fast allen Organismen. Das *E. coli* Orthologe DegP/HtrA ist eine Endoprotease, die essentiell für Hitzetoleranz, oxidative und osmotische Toleranz ist (Pallen und Wren, 1997). Bei hohen Temperaturen fungiert das bakterielle HtrA als Protease, bei normaler Temperatur dagegen als Chaperon (Spiess et al., 1999). Diese Ergebnisse lassen eine ähnliche Funktion für das humane Omi/HtrA2 vermuten, so dass Omi/HtrA2 eine schützende Funktion in den Mitochondrien besitzt und eine cytotoxische Funktion im Cytosol.

Fahrenkrog et al. beschrieben kürzlich ein Omi/HtrA2 Ortholog in *S. cerevisiae* (2004): Nma111p (*Nuclear mediator of apoptosis*). Die proapoptotische Funktion von Nma111p ist abhängig von dessen Serin-Protease Aktivität. Eine Deletion von NMA111 erhöht die Hitzetoleranz von Hefezellen und schützt vor einer durch H₂O₂ ausgelösten Apoptose (Fahrenkrog et al., 2004).

1.3.3 Der evolutionäre Sinn der Apoptose von *S. cerevisiae*

Herker et al. (2004) konnten zeigen, dass Hefekulturen, die chronologisch gealtert sind, apoptotisch sterben. Gleichzeitig zeigten sie auf, warum es auch für Einzeller einen Sinn macht, Selbstmord zu begehen. Denn durch das Sterben der alten Zellen werden geschädigte Zellen aus der Kultur entfernt und somit Nahrungsressourcen eingespart. Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, dass alte, nicht aber junge Hefezellen, Substanzen ins Medium abgeben, die das Überleben anderer gealterter Hefezellen fördert.

Eine verringerte Apoptoserate, z.B. durch die Deletion von proapoptischen Genen, führt zu einem anfänglich besseren Überleben der Kulturen, allerdings verlieren diese Zellen ihre Fähigkeit, auf frischem Medium wieder anzuwachsen. Durch eine Verminderung der Apoptose kommt es also zu einer Anhäufung von geschädigten Zellen, die nicht mehr in der Lage sind zu proliferieren. Ein apoptotisches Programm gewährleistet also, dass nur die gesunden und anpassungsfähigsten Zellen überleben und sichert so das Überleben der klonalen Kultur.

1.4 Cdc48/VCP

Cdc48 und sein humanes Homolog VCP (*valosin-containing-protein*)/p97 gehören zu der AAA (*ATPase associated with diverse cellulare activities*) Proteinfamilie. Cdc48/VCP sind beteiligt an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Mitose (Moir et al., 1982; Fröhlich et al., 1991), Spindelpol Bildung (Fröhlich et al., 1991), Membranfusion (Latterich et al., 1995; Kondo et al., 1997), Ubiquitin abhängige Proteindegradation (Ghislain et al., 1996; Dai et al., 1998; Dai und Li, 2001), ERAD (*ER-associated protein degradation*) (Rabinovich et al., 2002; Ye et al., 2001), Prozessierung der Transkriptionsfaktoren Mga2p und Spt23p in *S. cerevisiae* (Hoppe et al., 2000; Hitchcock et al., 2001; Rape et al., 2001) und der Aktivierung von NF κ B in Säugerzellen (Dai et al., 1998).

Cdc48^{S565G}, das eine Mutation in der zweite ATPase Domäne trägt, war das erste proapoptotische Protein, das in Hefe gefunden wurde (Madeo et al., 1997). Erst kürzlich wurde entdeckt, dass das humane Homolog VCP ein wichtiger Effektor in der ER-Stress induzierten Apoptose ist (Rao et al., 2004).

1.4.1 Neurodegenerative Erkrankungen und VCP

Viele neurodegenerative Erkrankungen beruhen auf einer abnormalen Proteinaggregation, Beispiele hierfür sind Morbus Alzheimer, Amyotrophe Laterale Sklerose, Morbus Parkinson, Prionen Erkrankungen und neun weitere vererbare Polyglutamin (polyQ) Erkrankungen einschließlich Morbus Huntington und der Machado-Joseph Erkrankung. Weitere Merkmale vieler neurodegenerativer Erkrankungen sind cytoplasmatische und/oder nukleäre Vakuolisierung, ein verminderter Abbau von Proteinen durch das Proteasom, freie Sauerstoffradikale und eine Fehlfunktion der Mitochondrien (Übersichtsartikel, siehe: Jellinger, 2003).

Ein Protein, welches mit polyQ Aggregaten *in situ* kolokalisiert, ist das humane VCP. Ebenso konnte VCP in Lewy Körperchen, also in den nukleären Einschlüssen von Morbus Huntington Patienten und in Proteinaggregaten, der Alzheimer Erkrankung, identifiziert werden (Mizuno et al., 2003; Hirabayashi et al., 2001). Diese Proteinaggregate führen in der Folge zu einem apoptotischen Tod der Zellen.

Die Überexpression von mutiertem VCP in neuronalen Zellen induziert die Bildung von vakuolären Strukturen, entstehend aus dem ER, und führt in der Folge zu einem apoptotischen Zelltod (Kobayashi et al., 2002).

Kakizuka und Kollegen vermuteten, dass die Interaktion von Wildtyp VCP mit Proteinaggregaten zur Inhibierung seiner zweiten ATPase Domäne führt. Damit hat die Bindung von Wildtyp VCP an Proteinaggregate dieselbe toxische Wirkung wie eine Mutation dieser Domäne und beide Szenarien münden in eine apoptotische Zellantwort (Rao et al., 2004; Shirogane et al., 1999; Kobayashi et al., 2002). Diese apoptotische Zellantwort scheint hoch konserviert zu sein, da inzwischen VCP Orthologe in verschiedenen Organismen, z.B. in *S. cerevisiae* (Madeo et al., 1997), im Zebrafisch (Imamura et al., 2003) oder in *C. elegans* (Wu et al., 1999), als Regulatoren der Apoptose beschrieben wurden.

1.4.2 Neurodegenerative Erkrankungen und Superoxidanionen

Verminderte Expression von Sauerstoffstress-abbauenden Enzymen, wie z.B. der Superoxiddismutase, kann ebenfalls eine Ursache für die Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen sein (Benzi et al., 1995).

In Säugern sind drei verschiedene Superoxiddismutasen (SOD) bekannt, eine cytosolische Kupfer/Zink abhängige SOD (SOD1), eine Mangan abhängige (SOD2) und eine extrazelluläre (SOD3). In *S. cerevisiae* sind nur zwei SOD Proteine bekannt, die cytosolische Cu/ZnSOD (SOD1) und die mitochondriale MnSOD (SOD2).

Eine Deletion der SOD1 oder der SOD3 in Mäusen ist in einer stressfreien Umgebung ohne Einfluss. SOD1 *knock out* Mäuse sind allerdings anfälliger gegenüber Reperfusionsschäden nach einer Ischämie (Yoshida et al., 2000), sie zeigen motorische Axonopathie und sind anfälliger gegenüber Hirnparenchymschädigungen (Shefner et al., 1999; Reaume et al., 1996). SOD3 *knock out* Mäuse sind sensitiv gegenüber durch Hyperoxidie ausgelöste Lungenschäden (Carlsson et al., 1995), Reperfusionsschäden nach einer Ischämie (Sheng et al., 1999) und einem durch Alloxan induzierten Diabetes (Sentman et al., 1999).

Eine völlige Eliminierung der SOD2 Funktion führt schon kurze Zeit nach Geburt der Mäuse zum Tod (Li et al., 1995). Die *knock out* Mäuse sterben an verschiedenen

neurodegenerativen Erkrankungen und einer Cardiomyopathie (Lebovitz et al., 1996).

Eine verminderte SOD2 Aktivität, durch eine verminderte oder gestörte Expression, lässt sich auch bei verschiedenen Tumoren feststellen (Oberley und Buettner, 1979; St Clair und Holland, 1991). Dagegen führt die Überexpression von SOD2 in Tumorzelllinien zu einem Rückgang der Malignität (Zhong et al., 1996). Bei Untersuchungen der Promotorregion des SOD2 Gens konnten in 5 von 14 Tumorzelllinien Mutationen festgestellt werden, die zu einer verminderten Expression führten (Xu et al., 1999). Die Expression von SOD2 wird durch die Transkriptionsfaktoren Interleukin β , TNF (*tumor necrosis factor*), NF κ B (*nuclear factor- κ B*) und C/EBP β (*CCAAT/enhancer-binding protein β*) reguliert (Jones et al., 1997; McCord, 2002).

1.4.3 NF κ B und NF κ B Homologe in *S. cerevisiae*

1.4.3.1 NF κ B: Funktion und Aktivierung von NF κ B in Säugerzellen

Der Transkriptionsfaktor NF κ B ist in Säugerzellen für eine Vielzahl von Prozessen lebensnotwendig, wie z.B. Zellwachstum, Immun- und Stressantwort der Zelle (Thanos und Maniatis, 1995; Verma et al., 1995; Baeuerle und Kaltschmidt, 1996). NF κ B wird durch mehr als 150 verschiedene Stimuli aktiviert und induziert in der Folge die Transkription von mehr als 150 verschiedenen Genen (Pahl, 1999). NF κ B kommt in den Zellen als Homo- oder als Heterodimer vor, welche sich aus den verschiedenen in der Zelle vorkommenden NF κ B Proteinen zusammensetzen. Hierzu gehören beispielsweise NF κ B1 (P50 und das p105 Präprotein), c-Rel, RelA, NF κ B2 (p52 und p100) und RelB. Das Dimere ist im Cytosol an einen NF κ B Inhibitorprotein gebunden. Zu der Gruppe der Inhibitorproteine gehören I κ B α , I κ B γ , Bcl-3 und die Vorläuferproteine p105 und p100.

Als Antwort auf einen Stimulus wird der Inhibitor phosphoryliert, ubiquitinyliert, an VCP gebunden und dann durch das Proteasom degradiert. Durch den Abbau des Inhibitors wird die nukleäre Lokalisationssequenz des NF κ B exponiert und das Dimer in den Kern transportiert (für einen Überblick, siehe Verma et al., 1995).

1.4.3.2 Spt23p und Mga2p: zwei NF κ B Homologe in *S. cerevisiae*

In *S. cerevisiae* sind zwei NF κ B Homologe bekannt, Spt23p und Mga2p. Die beiden Proteine sind untereinander zu 38 % identisch und zu 54 % ähnlich. Beide besitzen eine einfache Kernlokalisationssequenz und eine Kernexportsequenz, zwei Ankyrin Wiederholungssequenzen und eine TIG Sequenz. Die TIG Sequenz ist eine Ig ähnliche Sequenz, wie sie typisch ist für Zelloberflächenrezeptoren oder für intrazelluläre Transkriptionsfaktoren, wie NF κ B. Des Weiteren besitzen beide Proteine eine carboxyterminale Transmembrandomäne (Abbildung 4).

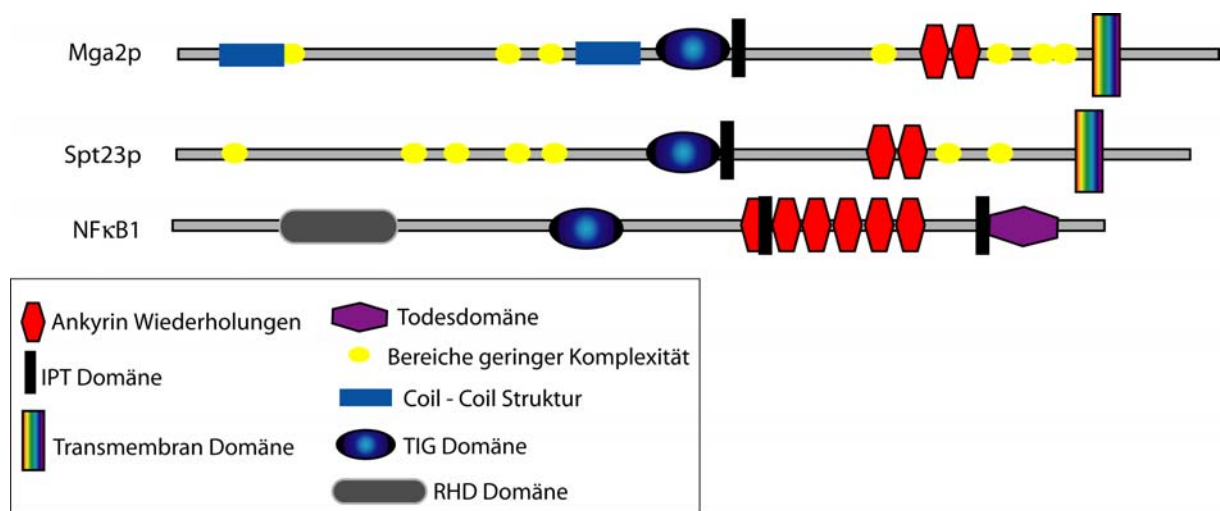


Abbildung 4: Vergleich der Domänenstruktur von Mga2p, Spt23p und NF κ B1.

Folgende Domänen konnten identifiziert werden: Ankyrin Wiederholungen = eines der häufigsten Protein-Protein Interaktionsmotive; IPT Domäne = Immunoglobulin ähnliche Foldstruktur; Todesdomäne = FAS/TNF cytosolische Interaktionsdomäne; Bereiche geringer Komplexität = Bereiche von unausgewogener Aminosäurestruktur, oft wichtig für die Funktionalität der Proteine; Coil-Coil = Schleifen Struktur; TIG = TIG Sequenz ist eine Ig ähnliche Sequenz, die typisch ist für Zelloberflächenrezeptoren oder intrazelluläre Transkriptionsfaktoren, RHD (*Rel homology domain*).

Mga2p wurde zum ersten Mal als ein Suppressor von SNF2 Deletionen beschrieben. Snf2p ist ein Schlüsselprotein des Swi/Snf Nukleosom Remodulierungskomplexes (*nucleosome remodelling complex*), welcher für die Transkription von vielen verschiedenen Genen wichtig ist (Kornberg und Lorch, 1999; Travers, 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Mga2p die Transkription von Genen erhöht (Zhang et al., 1997; Zhang et al., 1999) und direkt aktiviert, wenn das Protein an die DNA bindet.

In Eukaryoten wird der intrazelluläre Level von vielen Proteinen durch den Ubiquitin/Proteasom Abbauweg reguliert. Diese Proteolyse resultiert normalerweise in einem kompletten Abbau der Proteine (Überblick, siehe: (Hochstrasser, 1996; Hilt und Wolf, 1996). Nur in ein paar Ausnahmen dient dieser Abbauweg auch der partiellen Prozessierung und einer daraus resultierenden Aktivierung des Zielproteins, so z.B. bei der teilweisen Prozessierung des NF κ B Vorläuferproteins p150 (Thanos und Maniatis, 1995; Dai et al., 1998). Hoppe et al. entdeckten, dass auch Mga2p und Spt23p über solch einen Mechanismus aktiviert werden (Hoppe et al., 2000) (Abbildung 5).

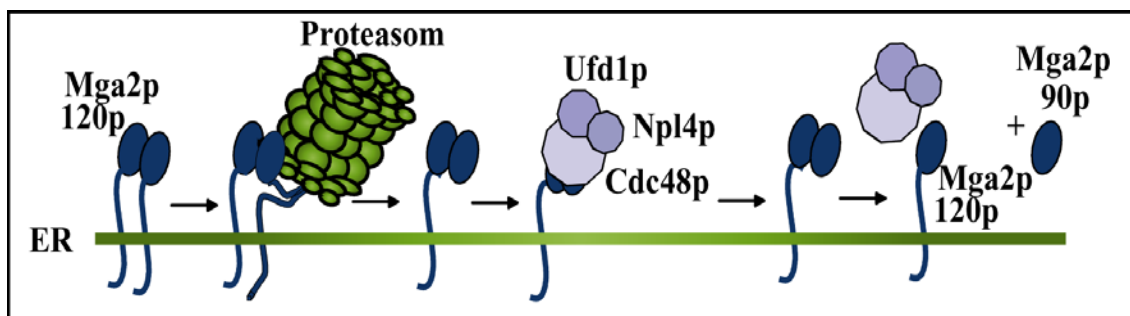


Abbildung 5: Schema der Prozessierung und Aktivierung von Spt23p und Mga2p.

Die Vorläuferproteine von Mga2 und Spt23 sind C-terminal in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert. Sie liegen als Homo- oder Heterodimere vor. Nach einem geeigneten Stimulus wird ein Protein durch Rsp5p am N-Terminus monoubiquityliert. Die Linkerregion zwischen dem N-Terminus und der Transmembrandomäne formt eine Schleife, welche in das Proteasom gezogen wird. Der gesamte C-Terminus wird degradiert, die enge Interaktion der N-terminalen Domäne mit dem Prozessierungspartner schützt diese vor der Entfaltung und der anschließenden Degradation. Die prozessierte p90 Form wird durch den Chaperon ähnlichen Cdc48/Ufd1/Npl4 vom Prozessierungspartner gelöst und ins Cytosol freigesetzt. Nach der Translokation in den Kern agiert das prozessierte p90 Protein (Spt23p oder Mga2p) nun als Transkriptionsfaktor (Hoppe et al., 2000; Rape et al., 2001; Rape und Jentsch, 2002).

1.5 Zielsetzung

Der Modellorganismus *S. cerevisiae* wurde bereits zur Erforschung komplexer eukaryotischer Prozesse, wie z.B. der Zellteilung, dem intrazellulärem Transport und der Transkriptionsregulation, erfolgreich eingesetzt. Die einfache genetische Manipulierbarkeit und geringe Anfälligkeit für Kontaminationen prädestiniert die Hefe für die Untersuchung zellbiologischer Fragestellungen. Weitere Vorteile des Modellorganismus Hefe ergeben sich durch das komplett sequenzierte Genom, systematische Deletionsprojekte, zugängliche proteomweite *Two-Hybrid-Analysen* sowie genomweite Expressionsstudien, die eine schnelle und umfassende Analyse von intrazellulärer Prozesse ermöglichen.

All dies legt nahe, sich die Vorteile von *S. cerevisiae* auch bei der Erforschung apoptotischer Prozesse zu Nutze zu machen. Somit ist aufgrund ihrer möglichen Anwendungen für die humane Apoptoseforschung die Hefeapoptose mehr als eine mikrobiologische Besonderheit.

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation und die Mechanismen der Apoptose in Hefe genauer aufzuklären, insbesondere bei von Hefe- bis zu Säugerzellen konservierten mitochondrialen Zelltodwegen.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Identifizierung und Beschreibung eines *Apoptosis Inducing Factors* in *S. cerevisiae*. Hier wurde besonders Wert darauf gelegt, offene Fragen der AIF induzierten Apoptose in Säugerzellen und der Funktion von AIF in gesunden Zellen aufzuklären.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde versucht, den Mechanismus der Cdc48p^{S565G} vermittelten Apoptose näher zu charakterisieren. Hier wurden Untersuchungsmethoden, wie z.B. Proteom- und Transkriptomanalyse, eingesetzt, um ein besseres Verständnis über die zellulären Vorgänge während der Cdc48p vermittelten Apoptose zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Autoklav Ventilab S 3000	MMM, München
Elektroblotapparat Multiphor II	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammern für Agarosegele 50x75x8 mm (Minigele)	Werkstatt des Physiologisch- Chemischen Instituts, Tübingen
Midi-Gele	Biorad, München
Elektrophoresekammern für Proteingele	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Hofer SE 400 Serie	Biorad, München
Mini-Protean 3 System	Eppendorf AG, Hamburg
Elektroporator 2510	Dynatech Instruments, USA
ELISA-Reader MR 5000	Becton Dickinson, USA
FACS Calibur	Cybertech, Berlin
Geldokumentationssystem	
Mikroskope	
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 200	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop BH-2 RFCA	Olympus, Japan
Mikroskop Ortholux 2	Leitz, Wetzlar
pH-Meter	Knick, Berlin
Photokamera Modell c35AD-4	Olympus, Japan
Spektralphotometer Modell UV-120-01	Shimadzu
Sterilbank Modell ET 130 V	Ehret Reinraumtechnik, Deutschland
Transilluminator	Vilber Lourmat, Frankreich
Zellzähler CASY1 DT	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifugen	
Tischzentrifuge 3200	Eppendorf AG, Hamburg
Biofuge pico	Heraeus Christ, Osterode
3K12 mit Rotor Nr. 11133	Sigma, München
RC-5 Superspeed mit Rotor SS 34	Heraeus Christ, Osterode
Suprafuge 22 mit Rotor HFA 12.500	Heraeus Christ, Osterode

2.2 Chemikalien

Alle Feinchemikalien und Enzyme wurden - soweit nicht anders angegeben - von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), ICN (Eschwege), Roche (Mannheim) und Sigma (Taufkirchen) bezogen. Die Bestandteile für Kulturmedien wie Hefeextrakt, Bacto-Pepton, Bactotrypton und Hefe-Stickstoffbase ohne Aminosäuren stammten von DIFCO (USA), Agar von Otto Nordwald KG (Hamburg). Molekulargewichtsstandards für Gelelektrophoresen sowie alle

Enzyme für die Molekularbiologie stammten von MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Kits zur Aufreinigung von DNA wurden von Peqlab (Erlangen) bezogen.

2.3 Primer-Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden als Auftragssynthesen von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Das Lyophilisat wurde in einer Konzentration von 100 pM in ddH₂O gelöst und bei -20°C gelagert.

Name	Sequenz
Flag-Epitop anti2	5'- CGT CAT CCT TGT AAT CCA T -3'
S2-YNR074c	5'- GTT ATC AAG CGA TTG ATA ACT CTA ATG CAC AGG TGT AAT ACC GAT CGA TGA ATT CGA GCT -3'
S3-YNR074c	5'- GAA TCT TTT CTC CGA CAA AAT GGA ACC TTT ATT CAA AAA ACG TAC GCT GCA GGT CGA -3'
Mga2 pESC sense	5'-ATC AGC GGC CGC AGC AGC AGA ACA GTG AGT TCT TA-3'
Mga2 pESC antisense	5'-ACT CAT CGA TGC CTC ACT CCA GCA TTG CGT AGA AAG -3'
Sod2 sense	5'-ATC TGA ATT CAT GTT CGC GAA AAC AGC AGC TGC
Sod2 antisense	5'-ATC TGC GGC CGC GAT CTT GCC AGC ATC GAA TCT TCT G -3'
Aif pGBKT7 sense	5'-GAC TGA ATT CAT GAC AAT TAA CAC AAA GAA CAT AG-3'
Aif pGBKT7 antisense	5'-GAT TGT CGA CTC CAG CGG CCT TCT TTG TTT C-3'
Yca1 pESC sense	5'-CAC TGA ATT CAT GAA GAT GAG CCT CGA AG-3_
Yca1 pESC antisense	5'-CAC TGC GGC CGC CAT AAT AAA TTG CAG ATT TAC GTC-3
YCA1 pYM sense	5'-CAC AAT TAT CAT CGT CAC ACC CTA TTG ACG TAA ATC TGC AAT TTA TTA TGC GTA CGC TGC AGG TCG AC -3_
YCA1 pYM antisense	5_-GAA TCA CAT ACT ACA CCA GTC TGA ATA CAT CTA CCA ACG TAC ACA TTC ATC GAT GAA TTC GAG CTC G-3_
Aif yEGFP sense	5'-GTT ATC AAG CGA TTG ATA ACT CTA ATG CAC AGG TGT AAT ACC GAT CGA TGA ATT CGA GCT-3'
Aif yEGFP antisense	5'-GAA TCT TTT CTC CGA CAA AAT GGA ACC TTT ATT CAA AAA ACG TAC GCT GCA GGT CGA-3'
YNR074c pesc anti	5'- AGT CGC GGC CGC TTT TTT GAA TAA AGG TTC CAT TTT G -3'
YNR074c pESC sense	5'- GAC TGA ATT CAT GAC AAT TAA CAC AAA GAA CAT AG -3'

Tabelle 1: Primer, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

2.4 Puffer und Lösungen

Methodenspezifische Puffer werden im jeweiligen Abschnitt aufgeführt. Folgende Puffer wurden für verschiedene Methoden verwendet:

PBS	25 mM Kaliumphosphat-Puffer; 0,9 % NaCl; pH 7,0
TE	10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0
TBS-T	10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween-20; pH 7,6
TBS-Tx	10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 0,02 % Triton-X 100; pH 7,6

2.5 Organismen

2.5.1 *Escherichia coli*

Plasmide wurden im Stamm DH5 α (Stratagene, Heidelberg) propagiert.

Plasmid	Alias	Referenz / Quelle
pFM 1	pYM 1	(Knop et al., 1999)
pFM 12	pYM 12	(Knop et al., 1999)
pFM 127	pQE 60	QIAGEN, Hilden
pFM 128	pQE 60 / AIF1	(Herker, 2005)
pFM 129	pYX142 / DsRed Su1-69	(Jakobs et al., 2003)
pFM 138	pGBKT7	Clontech, Heidelberg
pFM 139	pGBKT7 / AIF1	diese Arbeit
pFM 16	pESC-His	Stratagene, Heidelberg
pFM 21	pFM 16 / YCA1	diese Arbeit
pFM 22	pFM 16 / YCA1 ^{C297A}	diese Arbeit
pFM 42	pUG 35	mips.gsf
pFM 43	pUR 36	(Rodrigues et al., 2001)
pFM 44	pFM 42 / AIF1	diese Arbeit
pFM 48	pFM 16 / AIF1	diese Arbeit
pFM 87	pYES-CT	(Invitrogen, Karlsruhe)
pFM 89	pFM 87 / NMA111	(Fahrenkrog et al., 2004)
pFM 91	pFM 16 / SOD2	diese Arbeit
pFM 93	pFM 16 / MGA2 N-term.	diese Arbeit

Tabelle 2: Vektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

2.5.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Stamm	Genotyp	Alias	Referenz
KFY 715	BYa = MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0	BYa	Euroscarf
KFY 729	BYa / YCA1::kanMX4	Δyca1	Euroscarf
FMY 17	BYa / pFM 21	Yca1p üex.	diese Arbeit
FMY 18	BYa / pFM 22	Yca1p ^{C297A} üex..	diese Arbeit
FMY 183	BYa / pFM 43, pFM 44	BYa, NLS, Aif1p-GFP	diese Arbeit
FMY 191	BYa / pFM 48	Aif1p üex.	diese Arbeit
FMY 22	BYa / kanMX6::YCA1-3HA	Yca1p-3HA	diese Arbeit
FMY 23	BYa / kanMX6::YCA1-yEGFP	Yca1p-GFP	diese Arbeit
FMY 274	BYa / kanMX6, AIF1-yEGFP	Aif1p-GFP	diese Arbeit
FMY 282	BYa / YCA1::kanMX4, pFM 48	Δyca1 Aif1p üex.	diese Arbeit
FMY 29	BYa / pFM 16	BYa Vektorkontrolle	diese Arbeit
FMY 399	KFY 417; pFM 16	WT CDC48 Vektorkontrolle	diese Arbeit
FMY 400	KFY 417; pFM 91	WT CDC48 Sod2p üex.	diese Arbeit
FMY 401	KFY 417; pFM 93	WT CDC48 Mga2p N-term. üex	diese Arbeit
FMY 402	KFY 437; pFM 16	Cdc48 ^{S565G} Vektorkontrolle	diese Arbeit
FMY 403	KFY 437; pFM 91	Cdc48 ^{S565G} Sod2p üex.	diese Arbeit
FMY 404	KFY 437; pFM 93	Cdc48 ^{S565G} Mga2p N-term. üex	diese Arbeit

FMY 428	BYa / CPR1::kanMX4; pFM 16	Δ cpr1 Vektorkontrolle	diese Arbeit
FMY 429	BYa / CPR1::kanMX4; pFM 48	Δ cpr1 Aif1p üex.	diese Arbeit
FMY 430	BYa / CPR2::kanMX4; pFM 16	Δ cpr2 Vektorkontrolle	diese Arbeit
FMY 431	BYa / CPR2::kanMX4; pFM 48	Δ cpr2 Aif1p üex.	diese Arbeit
FMY 438	BYa / CPR1::kanMX4	Δ cpr1	Euroscarf
FMY 439	BYa / CPR2::kanMX4	Δ cpr2	Euroscarf
FMY 470	BYa / MGA2::kanMX4	Δ mga2	Euroscarf
FMY 546	BYa / pFM 44; pFM 129	BYa, MLS, Aif1p-GFP üex.	diese Arbeit
FMY 79	BYa / AIF1::kanMX4	Δ aif1	Euroscarf
KFY 417	MATa cdc48::URA3 his4-619;leu3-3, 112ura3-52 YEp52/CDC48	WT CDC48	(Madeo et al., 1997)
KFY 437	MATa cdc48::URA3 his4-619;leu3-3, 112ura3-52 YEp52/CDC48 ^{S565G}	Cdc48 ^{S565G}	(Madeo et al., 1997)
	BYa / SPT23::kanMX4	Δ spt23	Euroscarf
	BYa / TOM5::kanMX4	Δ tom5	Euroscarf
	BYa, pFM 87	BYa Vektorkontrolle	diese Arbeit
	BYa, pFM 89	BYa Nma111p üex.	diese Arbeit
	BYa / YCA1::kanMX4, pFM 87	Δ yca1 Vektorkontrolle	diese Arbeit
	BYa / YCA1::kanMX4, pFM 89	Δ yca1 Nma111p üex.	diese Arbeit

Tabelle 3: Auflistung sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme.

2.6 Kulturmedien

2.6.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Vollmedium (YPD)	1 % Hefeextrakt 2 % Bacto-Pepton 4 % Glucose
Synthetisches Selektionsmedium	0,17 % Stickstoffbase ohne Aminosäuren 0,5 % Ammoniumsulfat 2 % Glucose/Galactose 80 mg/l Histidin 200 mg/l Leucin 160 mg/l Uracil 30 mg/l alle anderen Aminosäuren und Adenin
Nicht fermentierbares Medium	SMD mit 3 % Ethanol 2 % Lactat 3 % Glycerin als Kohlenstoffquelle

2.6.2 *Escherichia coli*

Luria-Bertani-Medium	0,5 % Natriumchlorid 0,5 % Hefeextrakt 1 % Bacto-Trypton
----------------------	--

2.7 Stammhaltung und Kultivierung

2.7.1 Flüssigkulturen

Kulturen von *S. cerevisiae* wurden bei 28°C in YPD oder einem geeigneten Selektionsmedium unter Schütteln kultiviert. Kulturen von *E. coli* wurden in LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C angezogen.

2.7.1.1 Kultivierung von Deletionsmutanten für apoptotische Tests

Die Zellen wurden in einer Übernachtskultur in einem Reagenzglas mit einem Kulturvolumen von 3 ml in Minimalmedium mit allen Aminosäuren angezogen. Für apoptotische Tests wurden dann in der Regel Kulturvolumina von 10 ml in 100 ml-Kolben mit Schikane verwendet. Die Zellzahl wurde mit dem CASY bestimmt und das Kulturvolumen für die apoptotischen Test mit 3×10^5 Zellen pro ml angeimpft. Nach 3 h wurde zu den Zellen die angegebene Menge H_2O_2 hinzugegeben. Nach weiteren drei Stunden Inkubation wurde die Zellzahl erneut mit dem CASY gemessen und nach den benötigten Verdünnungsschritten wurden genau 500 Zellen ausplattiert.

2.7.1.2 Überexpression von Proteinen

Für die Expression von Proteinen mit Hilfe von Expressionsvektoren wurde zunächst eine Übernachtskultur des jeweiligen Stamms in dem entsprechenden glucosehaltigen Selektionsmedium angezogen. Am nächsten Morgen wurden die eigentlichen Kulturen auf eine OD_{600} von 0,1 inokuliert und für ca. 5 h bis zu einer OD_{600} 0,4-0,6 bei $28^\circ C$ geschüttelt. Nach Erreichen der frühen Exponentialphase wurde die Kultur für 3 min. bei $4000 \times g$ abzentrifugiert und auf galactosehaltiges Selektionsmedium überführt. Gegebenenfalls wurde an dieser Stelle H_2O_2 zugegeben. Nach einer Induktionsperiode von 20 h stand die Kultur für weitere Experimente zur Verfügung.

2.7.1.3 Aufzucht der Cdc48p Mutante für verschiedene Apoptosetest

Die Stämme KFY 417 (WT) und KFY 437 wurden in einer Übernachtskultur in einem 100 ml Kolben mit einem Kulturvolumen von 10 ml in YPG angezogen. Zur Beimpfung dieser Übernachtskultur dienten Zellen des jeweiligen Stammes von einer YPG Platte. Anschließend wurde eine YPG Hauptkultur mit einem Volumen von 50 ml in einem 250 ml Kolben mit einer OD_{600} von 0,05 (KFY 437) oder 0,1 (KFY 417) angeimpft. Nach ca. 20 h wurden die Zellen zentrifugiert (3 min.; $4000 \times g$; RT) und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Zellen wurden in YPD resuspendiert und die OD_{600} bestimmt. Diesen Zellen dienten nun zum Beimpfen der YPD Hauptkultur. 50 ml YPD wurden auf eine OD_{600} von 0,1 (KFY 437) oder 0,3 (KFY417) angeimpft.

Nach 13 h bzw. 20 h wurde die Zellen einem einstündigen bzw. dreistündigen Hitzeschock unterzogen.

2.7.2 Plattenkulturen

Plattenkulturen wurden für die Anzucht von Klonen, Tüpfeltests, Überlebensplattierungen und für die mittelfristige Lagerung von Hefe- und *E. coli*-Stämmen eingesetzt. Dabei wurden Platten für *E. coli* bei 37°C, Platten für *S. cerevisiae* bei 28°C inkubiert.

2.7.3 Dauerkulturen

Dauerkulturen dienen der langfristigen Stammhaltung und sind bei – 80°C über Jahre hinweg haltbar. Zum Anlegen einer Dauerkultur wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl 87 % (w/v) Glycerin (*E. coli*) bzw. 500 µl 50 % (w/v) Glycerin (*S. cerevisiae*) gemischt und anschließend sofort bei – 80°C eingefroren.

2.8 Molekularbiologische Methoden

Zur genetischen Manipulation von *E. coli* und *S. cerevisiae* wurden Standardmethoden (Sambrook, 1989) verwendet.

2.8.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR wurde verwendet um Gene, Selektionskassetten oder Matrizen für die *in vitro* Transkription und Translation zu erstellen. Ein PCR Ansatz erhielt in der Regel einfach konzentrierter PCR Puffer der Firma Fermentas; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; je 1 pM Primer; 10 ng Matrize; 0,04 U/µl Taq-Polymerase. Die Annealing Temperatur und Dauer richtete sich nach der Länge und Beschaffenheit der Oligonukleotide. Die Elongationszeit nach der Länge der zu vervielfältigenden Matrize, wobei 1 min. für 1000 Basenpaare veranschlagt wurde.

2.8.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde in 1 % Agarose in TAE (40 mM Tris/Acetat; 1 mM EDTA; pH 8,0) durchgeführt. Zur Detektion der DNA wurde 0,001 % Ethidiumbromid zugesetzt, als Laufpuffer diente TAE. Die Elektrophorese wurde bei 100 V (Minigele) bzw. 130 V (Midigele) durchgeführt und beendet, wenn sich die Lauffront aus Bromphenolblau dem Ende des Gels näherte. Die Ethidiumbromidfluoreszenz wurde mit einem UV-Transilluminator ausgewertet und dokumentiert. Die Abschätzung der DNA-Menge erfolgte durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der zu bestimmenden Bande mit dem DNA-Längenstandard.

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab, Erlangen) nach den Angaben des Herstellers.

2.8.4 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau wurden zur Restriktionsanalyse von Plasmiden sowie zur Generierung von *sticky ends* vor Ligationen verwendet. In beiden Fällen wurden sie in einem Ansatzvolumen von 20 µl durchgeführt. Ca. 0,5 bis 3 µg der zu verdauenden DNA, 2 µl des für das entsprechende Restriktionsenzym empfohlenen zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers und 10 U des jeweiligen

Restriktionsenzymen wurden eingesetzt und mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 2 bis 5 h bei 37°C inkubiert.

2.8.5 Ethanolfällung

Die Fällung von DNA mittels Ethanol wurde durchgeführt, um DNA aus verdünnten Lösungen zu konzentrieren oder umzupuffern. Sofern nötig wurde die Konzentration monovalenter Kationen mit 7 M Ammoniumacetatlösung auf 2 M Ammoniumacetat eingestellt. Anschließend wurde das 2,5 fache Volumen des Ansatzes an Ethanol zugegeben und die DNA für mindestens 10 min. bei – 20°C gefällt. Nach Zentrifugation (10 min.; 10000 x g) wurde das Pellet einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, um überschüssige Salze zu entfernen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in Wasser aufgenommen.

2.8.6 Transformation von *E. coli*

Der Stamm DH5 α wurde in LB-Medium auf eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 kultiviert, dann zentrifugiert (10 min; 4000 x g; 4°C), je zweimal mit eiskaltem Wasser und mit eiskaltem 10 %igem Glycerin gewaschen. Das Zellpellet wurde im vierfachen Volumen 10 %igem Glycerin resuspendiert, aliquotiert und bei – 80°C eingefroren.

Für die Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit 3 μ l eines Ligationsansatzes gemischt und bei 1,6 kV in einer gekühlten Elektroporationsküvette transformiert. Die Zellen wurden sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und zur Ausbildung der Ampicillinresistenz für 30 min. bei 37°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (10000 x g 15 s) wurden die Zellen in 100 μ l LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert.

2.8.7 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* beruht auf der Lithiumacetat/PEG-Methode von Gietz et al. (Gietz, 1994). Eine logarithmisch wachsende Kultur wurde zentrifugiert (3 min; 4000 x g; RT) und mit einem fünftel Volumen sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einem fünfundzwanzigstel Volumen TE/LiAc (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; 100 mM LiAc; pH 8,0) resuspendiert und für 10 min. bei RT inkubiert. 100 μ l der Zellsuspension wurden

mit 5-15 µl der zu transformierenden DNA, 10 µl Heringssperma-ssDNA (10 mg/ml) und 700 µl PEG/TE/LiAc (40 % PEG-4000; 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; 100 mM LiAc; pH 8,0) gemischt. Der Transformationsansatz wurde für 30 min. unter Schütteln bei 28°C inkubiert, mit 85 µl Dimethylsulfoxid versetzt und für 7 min. bei 42°C einem Hitzeschock unterworfen. Die Zellen wurden danach abzentrifugiert (15 s; 10000 x g), mit 1 ml TE gewaschen, in 100 µl TE resuspendiert und auf entsprechendes Selektionsmedium ausplattiert. Fand die Selektion auf geneticinhaltigen Platten statt, so wurde zur Ausbildung der Resistenz vor der Plattierung für 3 h in YPD bei 28°C geschüttelt.

2.8.8 Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

5 ml einer Übernachtskultur des Hefestammes wurden durch Zentrifugation geerntet und mit 1 ml H₂O gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl Lysepuffer GP (100 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 1 % SDS) resuspendiert. Anschließend wurden 500 µl Glasperlen zugegeben und für 2 min. gevortext. Zellen und Zelltrümmer wurden kurz abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 275 µl 7 M Ammoniumacetat pH 7,0 zugegeben, gemischt und für 10 min. bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde für 5 min. auf Eis gekühlt. Proteine wurden durch Zugabe von 500 µl Chloroform extrahiert. Zur Phasentrennung wurde für 5 min. bei 10000 x g zentrifugiert, die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfggefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1 ml Isopropanol für 5 min. bei RT gefällt. Nach Zentrifugation (5 min; 10000 x g) wurde das Pellet mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50-100 µl H₂O resuspendiert.

2.8.9 Disruption von spezifischen Genen in *S. cerevisiae*

Zur Herstellung von Disruptanten wurde die Methode von Güldener *et al.* (Guldener et al., 1996) verwendet. Plasmide mit einer Selektionskassette flankiert von *loxP* Seiten dienten als Matrize für die Generierung einer spezifischen Disruptionskassette mittels PCR. Die Primer wurden so gewählt, dass sie zum einen in der Selektionskassette annealen, zum anderen aber noch einen Teil der flankierenden Regionen des zu disruptierenden Genes enthielten. Das PCR-Produkt wurde durch Fällung mit Ethanol konzentriert und in den gewünschten Stamm transformiert, um das Gen durch homologe Rekombination zu disruptieren.

Die Transformanten wurden auf YPD mit 200 mg/ml Geneticin selektiert und nochmals auf geneticinhaltigem YPD ausgestrichen oder auf Minimalmedium Platten ohne die entsprechende Aminosäure plattiert und dann ebenfalls nochmals umgestrichen. Aus den gewachsenen Klonen wurde genomische DNA isoliert und mittels PCR auf die Insertion der Selektionskassette überprüft.

2.8.10 Epitop-Markierung in *S. cerevisiae*

Zur Herstellung chromosomal kodierter Fusionsproteine wurde die Methode von Knop et al. (Knop et al., 1999) verwendet. Vektoren mit einem Selektionsmarker für Hefen und dem gewünschten Epitop wurden als Matrizen für die Generierung Gen-spezifischer Fusionskassetten verwendet. Der PCR Ansatz enthielt einfach konzentrierten PCR Puffer der Firma Fermentas; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; je 1 pM Primer; 10 ng Matrize; 0,04 U/µl Taq-Polymerase. Das PCR Produkt wurde mittels des E.Z.N.A ‚Cycle Pure Kit‘ (Peqlab, Erlangen) aufgereinigt. Es wurden etwa 2 µg des resultierenden Produktes direkt zur Transformation eingesetzt. Aus den gewachsenen Klonen wurde genomische DNA isoliert und mittels PCR auf die Insertion der Selektionskassette überprüft. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch einen Immunoblot verifiziert.

2.8.11 Klonierung von Genen in Vektoren

Zur Klonierung von Genen in die Überexpressionvektoren wurden diese mittels PCR aus genomischer DNA des Stamms KFY 715 amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit dem E.Z.N.A ‚Cycle Pure Kit‘ (Peqlab, Erlangen) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt und mit den passenden Restriktionsenzymen verdaut. Störende Restriktionsfragmente wurden durch Gelextraktion mit dem E.Z.N.A ‚Gelextraction Kit‘ (Peqlab, Erlangen) entfernt. Anschließend wurden je 100 ng mit 200 ng des analog behandelten Plasmids ligiert. Hierfür wurde mit 100 U T4-Ligase in 20 µl Ligase-Puffer für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Erhitzen auf 65°C für 10 min. inaktiviert. In der Regel konnten 3 µl des Ligationsansatzes direkt zur Elektrotransformation von *E. coli* eingesetzt werden. Positive Transformanten wurden durch Kolonien-PCR identifiziert. Die resultierenden Plasmide wurden aufgereinigt, die korrekte Insertion und Sequenz wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert.

2.8.12 Northern Hybridisierung

2.8.12.1 RNA-Präparation

Für die Gewinnung von RNA wurden 15 ml einer Kultur eingesetzt. Die Gesamt-RNA wurde mit dem Qiagen Rneasy Mini Column (Qiagen, Hilden), nach Anleitung des Herstellers gewonnen. Die Zellen wurden durch enzymatischer Lyse aufgeschlossen.

2.8.12.2 Northern Blot

Die RNA wurde in einem Agarosegels (1,2 % Agarose; 1,2 M Formaldehyd; 60 V; 2 h) der Größe nach aufgetrennt. Pro Spur wurden 20 µg RNA eingesetzt. Durch Kapillartransfer wurde die RNA auf eine Nylonmembranen (HybondTM-N, Amersham) überführt. Dies erfolgt über Nacht mit einem 20 x SSC Puffer (1 x SSC Puffer: 150 mM NaCl; 15 mM Na-Citrat/HCl, pH 7). Anschließend wurde die Membran kurz in 2 x SSC Puffer geschwenkt. Die RNA wurde mit einem GS Gene Linker von Biorad mit dem Programm C3 fixiert.

Radioaktiv markierte Sonden wurden durch *random priming* hergestellt. Hierzu wurden 100-500 ng der zu markierenden DNA nach der Denaturierung (5 min.; 95°C) mit 2,5 µl 10 x Hexanukleotidgemisch; 2,5 µl 10 x random priming-Puffer; 2 µl Klenow-Polymerase (2 U/µl) und 5 µl α -markiertes P³²-dATP mit einer Aktivität von 3-6 kCi/mmol (Amersham) 3 h bei 37°C inkubiert.

Zur Hybridisierung des Northern Blot mit der radioaktiv markierten Sonde wurde die Membran mit 50 ml Hybridisierungspuffer (0,5 M Na₂HPO₄, pH 7.2; 1 mM EDTA; 7 % SDS; 1 % BSA; 100 µg/ml Heringssperma DNA) überschichtet und bei 68°C über Nacht mit 50- 100 µl radioaktiv markierter, denaturierter Sonde inkubiert.

Nicht hybridisierte Sonde wurde durch zweimaliges waschen mit Hybridisierungswaschpuffer (40 mM Na₂HPO₄; pH 7.2; 1% SDS) bei Raumtemperatur und zweimaligem waschen bei 68°C entfernt (je 20 min.).

Die Membran wurde in eine Klarsichtfolie eingeschweißt, beidseitig ein Röntgenfilm (Amersham) aufgelegt und sondenabhängig für 1-48 h bei - 80°C exponiert.

2.9 Zellbiologische Methoden

2.9.1 Überlebensplattierung

Nachdem die Zellen für diesen Apoptosetest nach 2.7.1.1 oder 2.7.1.2 kultiviert und behandelt wurden, wurde ein Aliquot der Hefekultur in 10 ml filtriertem CASYton (0,9 % NaCl; 0,1 mM EDTA; pH 8,0) verdünnt. Mit dem Zellzähler CASY 1 wurde die Anzahl der Partikel zwischen 1,5 und 15 µm Durchmesser ermittelt. Hierbei wurde die Verdünnung so gewählt, dass die Anzahl der absoluten Zählereignisse mindestens das 10fache des Hintergrundes betrug. Die Messung erfolgte in einer Kapillare mit 60 µl Durchmesser und einem Volumen von 200 µl als Doppelbestimmung. Anschließend wurden 500 Zellen auf YPD ausplattiert. Hierzu wurde die Kultur so verdünnt, dass das ausplattierte Volumen zwischen 50 und 200 µl lag. Nach 2 Tagen wurde die Überlebensrate anhand der *colony forming units* (cfu) bestimmt.

2.9.2 Tüpfeltest

Vorkulturen von *S. cerevisiae* wurden über Nacht in SMD Medium kultiviert. Eine OD₆₀₀ wurde entnommen, zentrifugiert und in 1 ml dH₂O resuspendiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe von OD₆₀₀ 1,0 bis OD₆₀₀ 0,00001 in Zehnerschritten auf einer Replikplatte hergestellt und die Verdünnungen mit einem Replikastempel auf YPD Platten gestempelt. Nach einer Inkubation von 48 h bei 28°C, wurde die Platte fotografiert und ausgewertet.

2.9.3 Beschichtung von Objektträgern mit Polylysin

Zur Immobilisierung fixierter Zellen wurden Objektträger mit Polylysin beschichtet. Um die Objektträger für Zellen zu affinieren wurden sie erst mit einem Detergenz von Fettrückständen befreit, dann in Wasser und schließlich in Ethanol gewaschen. Die einzelnen Fenster wurden mit je 25 µl 0,1 % Polylysinlösung beschichtet. Nach 30 min. wurde die Lösung entfernt, der Objektträger an der Luft getrocknet, noch dreimal mit deionisiertem Wasser gewaschen und konnte dann bei 4°C gelagert werden.

2.9.4 Sphäroplastierung von Zellen

Die Zellen wurden in einem dem Zweck entsprechenden Kulturvolumen kultiviert. Nach der Zentrifugation der Zellen (5 min; 3000 rpm; RT) wurden sie in 2 ml DTT-Puffer pro Gramm Zellen (10 mM DTT; 0,1 M Tris/H₂SO₄, pH 9,4) resuspendiert und 10 min. bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min.; 3000 rpm; RT), einmal mit S-Puffer (1,2 M Sorbitol; 20 mM Kaliumphosphat Puffer, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in S-Puffer aufgenommen und mit Lyticase versetzt (7 ml S-Puffer und 2000 U Lyticase pro Gramm Zellen). Die Inkubation erfolgte bei 28°C für mindestens 60 min.. Zur Kontrolle des Zellwandabbaus wurden jeweils 10 µl Zellsuspension entnommen und in 2 ml Wasser bzw. 2 ml S-Puffer gegeben. Die Sphäroplasten bleiben in S-Puffer intakt, lysieren aber in Wasser.

2.9.5 Fixierung der Zellen mit Formaldehyd

Einer Kultur wurden 10⁷ Zellen entnommen und einmal mit 500 µl Puffer B (35 mM Kaliumphosphat-Puffer; 0,5 mM MgCl₂; pH 6,8) gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer B resuspendiert, mit 120 µl 37 %iger Formaldehydlösung versetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend dreimal in je 500 µl Puffer BS (1,2 M Sorbitol; 35 mM Kaliumphosphat-Puffer; 0,5 mM MgCl₂; pH 6,8) gewaschen und in 330 µl Puffer BS resuspendiert. Zur Entfernung der Zellwand wurden 5 µl Lyticase (1000 U/ml in PBS) und 20 µl β-Glucuronidase/Arylsulfatase (14 U/ml) zugegeben und für mindestens 2 h bei 28°C inkubiert. Es wurde einmal mit 500 µl Puffer BS gewaschen. Die Sphäroplasten wurden vorsichtig in 30 µl des selben Puffers resuspendiert und auf polylysinbeschichtete Objektträger aufgetragen. Nach 15 min. wurde überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger bei 4°C gelagert. Die Qualität anschließender Färbungen wurde durch eine Lagerung bis zu 3 Wochen nicht beeinträchtigt.

2.9.6 TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Färbung (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) wurde mit dem ‚In Situ Cell Death Detection Kit‘ und dem ‚DAB Substrate/Metall enhanced Kit‘ der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt, die angegebenen Lösungen entstammen dem Kit. Die Reaktion beruht auf der enzymatischen Reaktion der T4 Terminalen Desoxynukleotidyltransferase, die in

fixierten, permeabilisierten Zellen mit Fluorescein markiertes dUTP an freie 3'-OH-Gruppen anhängen kann. Dieses kann mit einem Peroxidase gekoppelten Antikörper in einer Farbreaktion nachgewiesen werden.

Jedes Fenster des Objektträgers wurde 2 mal mit PBS gewaschen, anschließend für 30 min. mit 0,3 % Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert, dann zweimal mit PBS gewaschen. Nach Trocknen der Objektträger wurde für 2 min. auf Eis mit Permeabilisierungslösung (0,1 % Triton X-100; 0,1 % Natriumcitrat) inkubiert. Die Permeabilisierungslösung wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Je Fenster wurden 10 µl TUNEL-Reaktionsmix (25 mM Tris/HCl; 200 mM Na-Kakodylat; 5 mM CoCl₂; 10 mM FITC-markiertes dUTP; 200 U/ml T4 Terminale Desoxynukleotidyltransferase) aufgetragen. Die Objektträger wurden für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen und 10 µl ‚Converter-POD‘ je Fenster aufgetragen. Nach erneutem inkubieren (30 min; 37°C) in der feuchten Kammer, wurde dreimal mit PBS gewaschen und schließlich 30 µl DAB-Substratlösung (‚DAB Substrate/Metal enhanced‘ 1:10 in ‚Peroxidpuffer‘ verdünnt) aufgetragen. Die Farbreaktion wurde nach 15 min. durch Absaugen des Substrates und dreimaligem Waschen mit PBS gestoppt. Nach dem Trocknen der Objektträger wurde Kaiser-Gelatine aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt.

2.9.7 Diaminophenylindol (DAPI)-Färbung

Die Zellen wurden wie in 2.9.5 beschrieben fixiert. Jedes Fenster wurde zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 30 µl einer 1 µg/ml DAPI-Lösung in PBS auf jedes Fenster des Objektträgers gegeben und 15 min. bei RT in der Dunkelheit inkubiert. Zur Minimierung des Hintergrundes wurde jedes Fenster sechsmal mit PBS gewaschen. Nach dem Aufbringen der Kaiser-Gelatine und des Deckglases, konnten die Präparate nach dem Aushärten der Gelatine unter dem Epifluoreszenzmikroskop untersucht werden.

2.9.8 Färbung der Zellen mit Calcein-Acetoxy-methylester

Der intrazelluläre freie Eisenpool wurde durch eine Färbung der Zellen mit Calcein-Acetoxy-methylester ermittelt. Das membrangängige Calcein-Acetoxy-methylester wird nach der Aufnahme in die Zellen durch Esterasen in die saure, nicht membranpermeable Form des Calceins umgewandelt. Calcein bindet

in zellfreien Systemen mit einer Stabilität von 10^{-10} bis 10^{-24} M^{-1} an zwei- und dreiwertige Eisenionen, dies resultiert in einer Verringerung der Fluoreszenz (Fish, 1988). Da Calcein nicht sensitiv gegenüber Calcium oder Magnesiumionen ist, kann aus dem Grad der Verringerung der Fluoreszenz direkt auf die Konzentration an labilen freien Eisenionen geschlossen werden. Die Calcein-Färbung wurde modifiziert nach Cabiscol et al. (2002) durchgeführt.

Die Zellen wurden wie in 2.7.1.1 oder 2.7.1.3 beschrieben kultiviert. 1×10^7 Zellen wurden entnommen, zweimal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS aufgenommen und 2 h mit einer Calcein-Acetoxy-methylesterlösung (Endkonzentration $10 \mu\text{M}$) bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und die Fluoreszenz unter dem Mikroskop (Anregung 465–495 nm; Ausstrahlung 505 nm) beurteilt.

2.9.9 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der mitochondrialen Lokalisation des $\gamma\text{EGFP-Aif1p}$ Fusionsproteins wurde der Stamm FMY 715 nacheinander mit den Plasmiden pFM 129 und pFM 44 wie in 2.8.7 beschrieben transformiert. Zum Nachweis der Lokalisierung des $\gamma\text{EGFP-Aif1p}$ Fusionsproteins im Kern wurde der Stamm FMY 715 nacheinander mit den Plasmiden pFM 42 und pFM 44 nach 2.8.7 transformiert. Die Lokalisation des $\gamma\text{EGFP-Aif1p}$ Fusionsprotein wurde durch die Kolokalisierung mit dem Kern- bzw. Mitochondrienmarker ermittelt. Hierzu wurden die Zellen nach der Kultivierung auf dem entsprechenden Selektionsmedium kurz abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in $20 \mu\text{l}$ Wasser resuspendiert. $3 \mu\text{l}$ der Zellsuspension wurde mit $3 \mu\text{l}$ einer 1 % *low melting* Agarose auf einen Objektträger aufgetragen, gemischt und mit einem Deckglas abgedeckt. Zur Visualisierung wurde ein Zeiss Axiovert 200 Mikroskop, ausgestattet mit einem Filterrad zur Kontrolle der Anregung und Ausstrahlung verwendet. Das Mikroskop war ebenfalls mit einer gekühlten (CCD) Video Kamera (Zeiss AxioCam HRm), und den passenden Programmen zur Bilddarstellung und Verarbeitung (AXIOVISION 4) ausgestattet. In allen Versuchen diente eine 100 W/DC Quecksilberbogendampf Lampe (Zeiss) als Anregungsquelle.

2.9.10 Messung der Caspaseaktivität *in vivo*

Zur Messung der Caspaseaktivität *in vivo* wurde CaspACE™ (Promega) verwendet. Es besteht aus VAD-fmk, einem zellpermeablen Pan-Caspase-Inhibitor, welcher als Substratanalogon im katalytischen Zentrum aktivierter (d.h. prozessierter) Caspasen bindet und dem fluoreszierenden Derivat FITC (FITC-VAD-fmk). Es wurden 5×10^6 Zellen geerntet, mit 1 ml PBS gewaschen und in 200 μ l FITC-VAD-fmk-Färbelösung resuspendiert. Nach der Inkubation (20 min; 28°C), wurde die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und in 200 μ l PBS resuspendiert. Die Messung der relativen Fluoreszenzintensität erfolgte durchflußcytometrisch im FACS Calibur (Becton Dickinson) bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge zwischen 525 nm und 550 nm (Filter FL1). Das Ergebnis wurde mit der Software ‚CellQuest‘ ausgewertet.

2.10 Biochemische Methoden

2.10.1 Gewinnung von Rohextrakten aus *S. cerevisiae*

Nach der Kultivierung der Zellen wurden diese durch Zentrifugation bei 4000 x g geerntet, in 300 μ l Lysepuffer RE (20 mM HEPES pH 7,4; 84 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM EGTA; 0,5 % NP-40; Zugabe unmittelbar vor Gebrauch: 1 mM PMSF; 1 mM DTT; 1 μ g/ml Leupeptin; 1 μ g/ml Pepstatin; 5 μ g/ml Aprotinin) aufgenommen und in dickwandige Reagenzgläser überführt, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu den Zellen wurde das dreifache Volumen Glasperlen gegeben und für 4 min. gevortext. Das entstandene Lysat wurde in 600 μ l eiskühlem Lysepuffer RE aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und zur Entfernung von Zellen und Debris kurz bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und erneut 10 min. bei 10000 x g, 4°C zentrifugiert. Die Lipidphase und das Sediment wurden verworfen. Das entstandene Lysat wurde aliquotiert und bei - 80°C eingefroren. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die von Bradford (Bradford, 1976) beschriebene Methode für die Anwendung in einer 96-Well Mikrotiterplatte adaptiert.

2.10.2 Chemische Lyse

Nach Anzucht der Zellen und Messung der OD_{600} , wurden 3 OD abgenommen, zentrifugiert (1min; 10000 x g; RT) und die Zellen in 150 μ l Lysepuffer (1,84 M NaOH; 7,5 % β -Mercaptoethanol) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 10 min. bei 0°C inkubiert, dann mit 150 μ l Trichloressigsäure versetzt und weitere 10 min. bei 0°C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation sedimentiert (10 min; 4°C; 10000 x g), anschließend in 300 μ l Harnstoffladepuffer (200 mM Tris/HCl; 8 M Harnstoff; 5 % SDS; 1 mM EDTA; 0,1 % Bromphenolblau als pH-Indikator; 15 mM DTT; pH 6,8) aufgenommen. Die Suspension wurde für 10 min. auf 65°C erhitzt und anschließend 5 min. bei 10000 x g zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Bei unzureichender Pufferung des Ladepuffers, wurden 1-3 μ l einer untitrierten 1 M Tris-Lösung bis zum Farbumschlag zugegeben. Es wurden 30 μ l des Überstandes unmittelbar für die Gelelektrophorese eingesetzt.

2.10.3 Zellfraktionierung

Kerne, Mitochondrien und Cytosol wurden durch differentielle Zentrifugation getrennt. Die Zellen wurden in Minimalmedium auf eine $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und 4 h kultiviert. Nach erfolgter Sphäroplastierung der Zellen (siehe 2.9.4), wurden die Hälfte der Sphäroplasten in Mitochondrien Lysepuffer (0,5 M Sorbitol; 20 mM Tris/HCl, pH7.5; 1 mM EDTA) aufgenommen. Die Zellen wurden im Potter Elvelijan Homogenisator mit 35 Hüben bei 0°C aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert (5 min; 1000 x g; 4°C). Das Pellet wurde verworfen, nach erneuter Zentrifugation des Überstandes (10 min; 2500 x g; 4°C), wurde dieser in ein neues Zentrifugationsgefäß überführt und 15 min. bei 4°C mit 12000 rpm im SS 34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde als Cytosol definiert und aufbewahrt, das Pellet wurde noch einmal mit Mitochondrien Lysepuffer gewaschen, dann aliquotiert und bei - 80°C eingefroren. Die zweite Hälfte der Sphäroplasten wurde in Kern Lysepuffer (40 mM MES; 10 mM MgCl; 0,5 mM PMSF; 0,2 % Triton-X-100) aufgenommen, im Potter Elvelijan Homogenisator mit 35 Hüben bei 0°C aufgeschlossen und zentrifugiert (5 min; 500 x g; 4°C). Das Pellet wurde in Kern Percoll Puffer aufgenommen (40 mM MES; 10 mM MgCl; 0,5 mM PMSF; 0,05 % Triton-X-100; 40 % Percoll) und 35 min. bei 4°C mit 38000 x g ohne Bremse zentrifugiert. Die entstandene Kernbande wurde abgenommen, und die Kerne

zweimal mit Kern Waschpuffer (40 mM MES; 10 mM MgCl₂; 0,5 mM PMSF) gewaschen (5 min; 500 g; 4°C) dann aliquotiert und bei – 80°C eingefroren. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die von Bradford (1976) beschriebene Methode angewendet.

2.10.4 SDS-PAGE

Proteine wurden durch die diskontinuierlichen, denaturierende PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese) nach Lämmli (Laemmli et al., 1970) aufgetrennt. Die Gele wurden entweder als Midigele oder als Minigele gegossen. Die Endkonzentrationen im Trenngelansatz waren wie folgt: 250 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,2 % SDS; 8-12 % Acrylamid; 0,32 % N,N'-Methylenbisacrylamid; 0,1 % Ammoniumperoxodisulfat; 0,01 % N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin. Gradientengele enthielten normalerweise einen Acrylamidgradienten von 8-12 %. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel aufgebracht. Die Endkonzentrationen im Sammelgel betragen: 250 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,2 % SDS; 4 % Acrylamid; 0,13 % N,N'-Methylenbisacrylamid; 0,1 % Ammoniumperoxodisulfat; 0,01 % N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin. Zur Auftrennung der Proteine wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gestellt, diese mit Laufpuffer (25 mM Tris/HCl; 192 mM Glycin; 0,2 % SDS; pH 8,3) gefüllt, und das Gel beladen. Die SDS-PAGE erfolgte bei 30 V über Nacht (Midigel) bzw. 200 V für 40 min. (Minigel).

2.10.5 Expressionskontrollen durch Immunoblotting

2.10.5.1 *Semi-dry* Transfer

Um die Proteine im Polyacrylamidgel immunologisch zu detektieren, wurden diese nach der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Nitrocellulosemembran und Whatman 3 MM-Papier wurde in Transferpuffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 0,05 % SDS; 20 % Methanol) äquilibriert. Anschließend wurden in der Elektrolotapparatur ein *Sandwich* luftblasenfrei übereinandergeschichtet: von der Anode ausgehend 3 Blatt Whatman 3MM-Papier; Nitrocellulosemembran; Polyacrylamidgel; 3 Blatt Whatman 3MM-Papier. Bei Midigelen erfolgte der Transfer bei 400 mA in 45 min, bei Minigelen bei 250

mA in 15 min.. Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung (0,1 % Poncau S in 5 % Essigsäure) gefärbt.

2.10.5.2 Detektion von Proteinen

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde diese für 1 h bei RT in Blockpuffer (5 % Milchpulver in TBS-Tx) geschüttelt. Anschließend wurde für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in der Erstantikörperlösung (1 µg/ml Antikörper verdünnt in TBS-Tx) inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für 5 min. mit TBS-Tx entfernt. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation mit Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat (1µg/ml in Blockpuffer). Nach sechsmaligem Waschen mit TBS-Tx wurden die Proteine mittels des *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-System detektiert.

Gleiche Volumina der Reagenzien ECL-1 (100 mM Tris/HCl; 2,5 mM Luminol; 0,4 mM Cumarsäure; pH 8,5) und ECL-2 (100 mM Tris/HCl; pH 8,5; 5,4 mM H₂O₂) wurden zusammen mit der behandelten Membran für 1 min. inkubiert und anschließend luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweißt. In der Dunkelkammer wurde für eine angemessene Zeit ein Film (ECL, Amersham) aufgelegt und in einer Entwicklermaschine entwickelt.

Antikörper	Bezugsquelle	Konz.	verwendet für Versuch
α-FLAG, polyklonal; Hase	Geschenk von S. Baksh	1:2000	3.2.1
α-FLAG, monoklonal; Maus	Sigma	1µg/ml	3.1.7
α-HA, monoklonal; Maus	Cell Signaling Technology	1 µg/ml	3.2.1
α-Alk. Phosphatase, monoklonal; Maus	Molecular Probes	1 µg/ml	3.2.1
α-GFP, monoklonal; Maus	Roche	1:1000	3.1.3.1
α-Cox2, polyklonal; Hase	Geschenk von A. Barrtientos	1:1000	3.1.3.1
mAB414, monoklonal; Maus	Convance	1:1000	3.1.3.1
Peroxidase gekoppelter α-Maus Zweitantikörper	Sigma	1:4000	
Peroxidase gekoppelter α-Hase Zweitantikörper	Sigma	1:4000	

Tabelle 4: Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper zur Detektion von Proteinen.

Zur erneuten Detektion von Proteinen auf derselben Membran, wurden die zuvor verwendeten Antikörper durch eine 30 min. Inkubation der Membran in Stripping Puffer (62,5 mM Tris/HCl; 0,4 % SDS; pH 8; 0,56 % β -Mercaptoethanol) bei 50°C entfernt. Die Membran wurde dann fünfmal in TBS-Tx gewaschen. Nach einem erneuten Blocken der unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran, konnte diese erneut mit Antikörpern dekoriert werden.

2.10.6 *In vitro* Transkription und Translation

Radioaktiv markierte Proteine wurden durch eine *in vitro* Transkription und Translation mit dem TNT T7 gekoppelten Retikulozytenlysat von Promega in Anwesenheit von *redivue* L-[³⁵S]-Methionin (Amersham Pharmacia Biotech) nach den Herstellerangaben hergestellt. Als Template für die *in vitro* Transkription und Translation wurde ein AIF1 Konstrukt in einem pGBKT7 Plasmid (Clontech) verwendet. Diese Konstrukt resultiert in einem AIF1 mit einem N terminalem cMyc-Epitop und einem Linker zwischen dem Myc-Epitop und dem Startcodon des Proteins.

2.10.7 Importstudien in das Mitochondrium

Um zu überprüfen, ob das durch *in vitro* Transkription und Translation (2.10.6) erhaltene radioaktiv markierte Aif1p ins Mitochondrium transportiert wird, wurden Mitochondrium Importstudien durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt zwischen 1-5 % Retikulozytenlysate (v/v) in 1 % Rinderserumalbumin (BSA) (w/v); 600 mM Sorbitol; 50 mM KCl; 2 mM Natriumphosphat; 10 mM MgCl₂; 50 mM HEPES-KOH pH 7,4, 2 mM NADH und 2 mM ATP. Dieser Reaktionsmix wurde mit isolierten Mitochondrien (25–50 mg Protein) (2.10.3) für 1 h bei 25°C inkubiert.

Um die genaue Lokalisation von Aif1p im Mitochondrium zu ermitteln, wurden die Mitochondrien zu Mitoplasten, d.h. Mitochondrien ohne äußere Membran, konvertiert. Dies geschah durch eine zehnfache Verdünnung des Importreaktionsansatzes mit eiskaltem Schwellpuffer (20 mM HEPES, pH 7,4). Dabei platzt die äußere Membran der Mitochondrien auf und der Intermembranraum wird frei zugänglich für verschiedene Reagenzien. Mitochondrien und Mitoplasten wurden dann zusammen mit Protease K inkubiert. Zur Protease K Behandlung wurden 50 μ g/ml Protease K zum Reaktionsgemisch gegeben und der Ansatz für 30 min. bei 0°C inkubiert. Die Protease wurde durch

die Zugabe von 1 mM PMSF inaktiviert. Mitochondrien oder Mitoplasten wurden zentrifugiert (15 min; 14000 x g; 4°C), mit eiskaltem Waschpuffer (600 mM Sorbitol; 80 mM KCl; 20 mM HEPES, pH 7,4) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in Lämmli Ladepuffer (2.10.4) resuspendiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (2.10.4) getrennt und anschließend auf eine ImmobilonTM-PVDF Membran (Millipore) mittels *Semi dry* (2.10.5.1) transferiert. Die einzelnen Protein Banden wurden durch das Auflegen eines Films (Amersham) und der anschließenden Entwicklung in einer Entwicklermaschine sichtbar gemacht.

2.10.8 DNase Aktivitätstest

Zur Untersuchung einer eventuellen DNase Aktivität von Aif1p wurden DNase Aktivitätstest zum einen mit Zellrohextrakt und zum anderen mit gereinigtem Aif1p durchgeführt. Die Rohextrakte wurden wie in 2.10.1 beschrieben gewonnen, allerdings mit einem modifiziertem Zellysepuffer (150 NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 5 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 1 mM PMSF). Zu der jeweiligen Menge an Rohextrakt wurde jeweils 1 µg Plasmid-DNA (pESC-His, Stratagene) und 2 mM MgCl₂/CaCl₂ hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 90 min. bei 37°C inkubiert, anschließend wurden die DNA-Fragmente auf einem 1 % Agarosegel wie in 2.8.2 beschrieben aufgetrennt.

Rekombinates Aif1p wurde nach (Wissing et al., 2004) von Eva Herker (siehe auch Herker, 2005) aufgereinigt. Zu den im Ergebnisteil angegebenen Mengen an rekombinatem Aif1p oder Rinderserumalbumin wurde 1 µg Plasmid-DNA (pYES2, Invitrogen) gegeben und der Reaktionsmix in der An- oder Abwesenheit von MgCl₂/CaCl₂ bei 30°C für 30 min. inkubiert. Hitzeinaktiviertes Aif1p wurde für 10 min. bei 100°C erhitzt. Die DNA-Fragmente wurden wie in 2.8.2 beschrieben mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Ebenso wurde rekombinantes Aif1p zusammen mit aufgereinigten Hefezellkernen (siehe 2.10.3) inkubiert. Hierzu wurden 16 µg Aif1p oder BSA zusammen mit 200 µg gereinigten Hefezellkernen für verschiedene Zeiträume inkubiert. Nach der angegebenen Zeit wurde die DNA der Hefezellkerne durch eine zweistündige Inkubation mit 1% SDS; 1% Triton-X-100; 50 mM NaCl; 50 mM MES pH 6,4 und 0,66 µg Protease K und einer anschließenden Phenol/Chloroform Extraktion, gefolgt von einer Fällung der DNA mittels Ethanol, isoliert. Nach einem Verdau der

RNA durch einem einstündigem Verdau mit 1 mg/ml RNase wurden die DNA-Fragmente mittels einer Agarosegelelektrophorese getrennt.

2.10.9 Sod2p Aktivitätsmessung

Die Zellen wurden wie in 2.7.1.3 beschrieben kultiviert, der Zellrohextrakt wurde wie in 2.10.1 beschrieben gewonnen. Die Messung der Sod2p Aktivität erfolgte mittels der Methode der Autooxidation von 6-Hydroxydopamin (Heikkila und Cabbat, 1976). Für die Messung wurde 1 ml Assaypuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4; 0,1 mM DETATAC) mit 10-15 µl 6-Hydroxydopamin Lösung (0,5 % HClO₄; 0,25 % 6-Hydroxydopaminhydrobromid) und einer bestimmten Menge Rohextrakt (5-100 µg) vermischt. Zuerst wurde jedoch der Leerwert ohne Rohextrakt bestimmt. Die Menge der zugefügten 6-Hydroxydopamin Lösung während des Assays richtete sich nach der Steigung des Leerwertes bei den verschiedenen 6-Hydroxydopamin Konzentrationen, und wurde so ausgesucht, dass die Steigung der Gerade 0,15-0,2 betrug. Die Menge des Rohextraktes wurde so gewählt, dass ungefähr eine 50 %ige Inhibierung der Autooxidation erreicht wurde. Die Inhibierung der Autooxidation von 6-Hydroxydopamin durch Zellrohextrakt wurde bei 490 nm in einem 930 UVIKON Spektrometer (Kontron Instruments) verfolgt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Aif1p

3.1.1 Der ORF YNR074c ist ein AIF Homolog in *S. cerevisiae*

1999 wurde erstmals von Susin et al das mitochondrial lokalisierte *Apoptosis Inducing Factor* (AIF) Protein beschrieben (Susin et al., 1999). Seither wurden weitere Proteine gefunden, die der AIF-Familie zuzuordnen sind: z.B. WAH-1, ein Protein aus *C. elegans*, das Homologie zum humanen AIF zeigt (Wang et al., 2002), und das humane Protein AMID (AIF-homologous mitochondrion-associated inducer of death), das ebenfalls Ähnlichkeit zu AIF aufweist (Ohiro et al., 2002; Wu et al., 2002).

Bei einer Datenbankrecherche mit dem Suchalgorithmus BLAST-P wurde das Hefeprotein Ynr074cp als potentiell Homologes des humanen Proteins *Apoptosis-inducing Factor* identifiziert. Die Homologie wurde durch Sequenzvergleiche mit dem Programm CLUSTAL-W weiter untermauert (Abbildung 6).

Die Untersuchung der Lokalisationssequenzen deutet auf ein Fehlen sowohl der mitochondrialen als auch der nukleären Lokalisationssequenzen im Hefeprotein Ynr074cp hin.

Die an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäurereste, die für das humane AIF durch Mutagenesestudien identifiziert (Ye et al., 2002) wurden, sind nur moderat konserviert. Es handelt sich um die positiv geladenen sieben Aminosäurereste K255, R265, K510, K518, R584, K590 und K593. Die Untersuchung der entsprechenden Positionen im vorliegenden Sequenzalignment (Abbildung 6) zeigt zwischen Mensch und Maus vollständige Übereinstimmung. Bei *D. discoideum* sind drei der sieben Aminosäurereste identisch, einer zeigt den konservativen Austausch von Arginin gegen Lysin. Bei *C. elegans* ist lediglich eine Aminosäure aus sieben identisch, zwei sind ähnlich. Im humanen AMID und im Ynr074cp hingegen ist keine der sieben Positionen konserviert, es findet sich jeweils ein Austausch gegen eine ähnliche Aminosäure, alle anderen Aminosäuren sind unterschiedlich.

Hs_AIF	102	-----LGLTP EQKQKKAAL SASEGEEVPQDKAPSHV
Mm_AIF	101	-----LGLSP EQRRRAIAS ATEGGSVQIRAPSHV
Dd_AIF	67	-----IDVK EKKSQPPKTK EDYQKKMDEEYDIEQF
Ce_AIF	181	RQTEEA VHARRAPAAAE EPAPSTSKADAVEEKSS EQQSMKPS ESTEENTTTTSADGLLHC
Hs_AMID	1	-----MG SQVSV ESG-----AL
Ynr074c	1	-----MG SQVSV -----MTINTK
Hs_AIF	133	PFL LIGGGTAAFAA ARSTR ARDPGAR VLI VEDPELPYMRPPLSKELWF SDDPNVTKTLR
Mm_AIF	132	PFL LIGGGTAAFAA ARSTR ARDPGAR VLI VEDPELPYMRPPLSKELWF SDDPNVTKTLQ
Dd_AIF	97	KY VIIIGGGTAA YHAI DKL L ENDK EA TILLIS KEYE VPYQRPPLTKSL WATKDDNVVNTLN
Ce_AIF	241	E YV I IGSGTAA Y ASLS TR RKQAE A KVLMIG EE PEPYNRPPLSKELW Y GD ETSATK LA
Hs_AMID	13	H VV I VGGG FG GGIAA S QLQ L NVP F MLVDM K DSFH N VAA L RA S VET G FAK KT FIS YS VT
Ynr074c	7	NI VV V GAG V FGV SV AN H LY R ELGG TY A IK L V TAS NY V Y F L P SA V R L T V S K DY T K S IL P L K
Hs_AIF	193	F Q W N G E RS I Y F Q P P S F V S A Q D L P H I E N G G V A V L T G K K V V Q L D V R D N M V K L N D G S Q I T
Mm_AIF	192	F Q W N G E RS I Y F Q P P S F V S A Q D L P N I E N G G V A V L T G K K V V H L D V R G N M V K L N D G S Q I T
Dd_AIF	157	S D W S G K K Q N L L Y E Q E S A Y G ----- N E I L Q F I R T K K V I D L H I D E K L V L L N D G K L I R
Ce_AIF	301	Y T P L S G K R D I F Y E V D G F V S P E D L P K A V H G G V A L L R G R K A V K I C E E D K K V I L D G T T I G
Hs_AMID	73	F K D N----- F R Q G L V V G I D L K N Q M V L Q G G E A L P
Ynr074c	67	N V L D S G----- I E V I K D T A A S F D D K E V V L G S D R A I K
Hs_AIF	253	Y E K C L I A T G T P R S L S A I D R A G A E V K S R T T L F R K I G D F R S L E K- I S R - E V K S I T I I G G G F
Mm_AIF	252	F E K C L I A T G T P R S L S A I D R A G A E V K S R T T L F R K I G D F R A L E K- I S R - E V K S I T I I G G G F
Dd_AIF	208	Y D K C L I A T G E P R Q L K F T S T N----- D K K I S T Y R T V E D F R K L Y E- V V K D G G K H V T V L G G G F
Ce_AIF	361	Y D K L L I A T G V R P K K E Q V F E A S E E A K Q K I T Y F H Y P A D F K R V E R G L A D K S V Q K V I M I G N G L
Hs_AMID	102	F S H L I L A T G S T G P F P G K F E V S ----- S Q A A I Q A Y E D M V R Q V Q R ----- S R F I V V V G G S
Ynr074c	98	F D I L V L A T G ----- S K W A D P I G S T Y T F D G N Y K E Y E R E A S R I S D A D ----- H L L F L G G G F
Hs_AIF	311	L G S E L A C A L G R K A R A L G T E V I Q L F P E K G N M G K I L P ----- E Y L S N W T M E K V R R E G V K V M
Mm_AIF	310	L G S E L A C A L G R K S Q A S G I E V I Q L F P E K G N M G K I L P ----- Q Y L S N W T M E K V R E G V K V M
Dd_AIF	263	L G S E L T C A I N S N F Q D K N I K I D O I F P E S G V L S T L F P ----- D Y L S K Y A T E I I K S G V N V H
Ce_AIF	421	L A S E L S Y S I K R K Y G- E N V E H Q V E E K Y P A E D I L P----- E H I A Q S I E A I S K G V D V R
Hs_AMID	153	A G V E M A A E I K T E Y P----- E K E V T L I H S Q V A L A D K E L----- P S V R Q E V K E I L L R K G V Q L L
Ynr074c	148	V N C E L A G E L L F K Y L E E I R S G K R I S I I H N S D K L L P D S G L Y N D T L R K N V T D Y L S K N G I T L Y
Hs_AIF	365	P N A I V Q S V G ----- V S S G L L I K L K D G R K V E T D H I V A V G L E P N V E L A K T G G L E F D S D F G
Mm_AIF	364	P N A I V Q S V G ----- V S G G R L L I K L K D G R K V E T D H I V A V G L E P N V E L A K T G G L E I D S D F G
Dd_AIF	317	T G T L I K D V D N----- S E N G R L T V T L N N G K T F E T D H V V A A G I P N T N V V K S T L E I D P I N G
Ce_AIF	474	A E Q K V E G V R ----- K C C K N V V L K L S D G S E L R T D L V V V A T G E E P N S E I E A S G L K I D E K L G
Hs_AMID	205	L S E R V S N L E E L P L N E Y R E Y I K V Q T D K G T E V A T N L V I L C T G I K I N S A Y R K A F E S R L A S S G
Ynr074c	208	L N T V G A S L D ----- T S P K R I F L G E G S S K Y I D A D L I Y R G V G I S P N V P V N S I S D L C D K K G F I
Hs_AIF	420	G F R V N A E L Q A R -- S N I W V A G D A A C F Y D I K L G- R R R V E H H D H A V V S G R L A G E N M T G -----
Mm_AIF	419	G F R V N A E L Q A R -- S N I W V A G D A A C F Y D I K L G- R R R V E H H D H A V V S G R L A G E N M T G -----
Dd_AIF	374	G Y V V N P E L Q A R -- T D L Y V A G D V A S Y D F S L G V R R R V E H H D H A R A T G E M A G S N M S T K-----
Ce_AIF	529	G V R A D K C L K V G -- E N V W A A G A I A T E D G V L G - A S R V S S W E N A Q I S G R L A G E N M A T A A A D G
Hs_AMID	265	A L R V N E H L Q V E G H S N V Y A T G D C A D V R T P K M A -----
Ynr074c	263	Q V E K N F R V K A V E A G N V F A I G D V T N R Y H G L V-----
Hs_AIF	472	-- A A K P Y W H Q S M F W S D L G D D V G Y E A I G L V D S S L P T V G V F A K A T A Q D N P K S A T E Q S G T G I R
Mm_AIF	471	-- A A K P Y W H Q S M F W S D L G D D V G Y E A I G L V D S S L P T V G V F A K A T A Q D N P K S A T E Q S G T G I R
Dd_AIF	428	-- D T P A P Y T Y Q P F W S D L T P G V G F E A V G N T S S K L K T F S V W E K P S S D E----- T K Q S-----
Ce_AIF	586	K S E G K A F W Y Q P S F T K F A P H L H I N A I C K C D S S L E T V S V H A E P D K D T P-----
Hs_AMID	296	----- Y L A G L H A N I A V A N H V N S V K Q R P L Q A Y K P G -----
Ynr074c	294	----- K R D N V D V L T R N V I S S L Q E G T E A S L V D A D C L E T G H A P S G-----
Hs_AIF	530	S E S E T E S E A S E I T I P P S T P A V P Q A P V Q G E D Y G K G V I F Y L R D K-- V V V G I V L W N I F N- R M P
Mm_AIF	529	S E S E T E S E A S E I T I P P S A P A V P Q V P V E G E D Y G K G V I F Y L R D K-- V V V G I V L W N V F N- R M P
Dd_AIF	477	----- Y T K G N I Y L N D N N- N V V G V L C Y G N Y G- K M D
Ce_AIF	633	----- L E K A V V F Y K S K E D G S I V G V L L L N V F G P S L D
Hs_AMID	325	----- A L T E L L S M G R N D G V G Q I S G ----- F Y
Ynr074c	333	----- V S L G P N A G F G Q F P L P L G - T I N
Hs_AIF	587	I A R K I I K D G E Q H E D L N E V A K L F N I H E D -----
Mm_AIF	586	I A R K I I K D G E Q H E D L N E V A K L F N I H E D -----
Dd_AIF	505	T A R D L L K R R T I E D L N Q L Q H A I D F E H H-----
Ce_AIF	663	V A R R M I D S K K V E Y K E I A K L F L P L Y D P V K S E D D A K S A
Hs_AMID	346	V G R L M V R L T K S R D L F V S T S W K T M R Q S P P-----
Ynr074c	354	I P S F L I S R A K S K N L F S D K M E P L F K-----

Abbildung 6: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Mitglieder der AIF-Familie.

Die Aminosäuresequenzen von AIF aus *Homo sapiens* (Hs_AIF, SwissProt O95831), *Mus musculus* (Mm_AIF, SwissProt Q9Z0X1), *Dictyostelium discoideum* (Dd_AIF, TrEMBL Q9GRX6), *Caenorhabditis elegans* (Ce_AIF, Entrez AAN60212) sowie die Sequenzen des AIF-ähnlichen Proteins AMID aus *Homo sapiens* (hAMID, Entrez AAM77596) und des AIF-Homologen Ynr074cp aus *Saccharomyces cerevisiae* (SwissProt P52923) wurden mit CLUSTAL-X in einem multiplen Alignment verglichen. Reste, die in mindestens vier Sequenzen identisch sind, wurden schwarz, Reste, die in mindestens vier Sequenzen ähnlich sind, grau hinterlegt.

Zur weiteren Analyse der Sequenzen wurde mit dem Programm CLUSTAL-X ein phylogenetischer Stammbaum generiert und mit TREEVIEW 32 visualisiert (Abbildung 7). Die AIF-Proteine aus Mensch, Maus, *D. discoideum* und *C. elegans* bilden hier einen eigenen Ast, innerhalb dessen die Proteine aus Mensch und Maus die nächste Verwandtschaft zeigen. AIF aus *D. discoideum* zweigt bereits früher ab, die entfernteste Verwandtschaft zum humanen AIF zeigt innerhalb dieses Astes das Protein aus *C. elegans*. Trotz seiner funktionellen Ähnlichkeit zum humanen AIF fällt AMID nicht in die Gruppe der AIF-Proteine, sondern bildet zusammen mit Ynr074cp aus *S. cerevisiae* einen eigenen Ast des Baums.

Die phylogenetische Analyse deutet darauf hin, dass das Hefeprotein Ynr074cp näher mit dem humanen Protein AMID als mit dem humanen AIF verwandt ist.

Ein direkter Sequenzvergleich zwischen AMID und Ynr074cp ergibt über eine Länge von 291 Aminosäuren 21 % Identität (64 Aminosäuren) und 43 % Ähnlichkeit (127 Aminosäuren), der Vergleich zwischen AIF und Ynr074cp über eine Länge von 169 Aminosäuren eine Identität von 21% (47 Aminosäuren) und eine Ähnlichkeit von 41 % (80 Aminosäuren).

Da jedoch die Homologie von humanem AMID und AIF sehr stark ausgeprägt ist, wurde der ORF YNR074c von uns in Aif1p (AIF1 für das Gen) umbenannt, diese Nomenklatur wird auch im weiteren Text beibehalten.

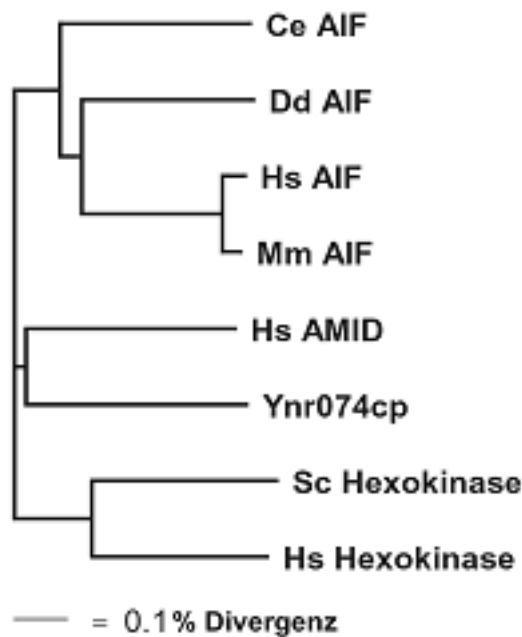


Abbildung 7: Phylogenetischer Stammbaum der AIF-Familie.

Mit CLUSTAL-X wurde ein phylogenetischer Stammbaum der Sequenzen aus Abbildung 7 berechnet. Die Daten wurden mit dem Programm TREEVIEW 32 visualisiert. Als Kontrollen, für die keine phylogenetische Verwandtschaft zu erwarten ist, wurden die Sequenzen der Hexokinase A aus *S. cerevisiae* (Sc Hexokinase, SwissProt P04806) und Hexokinase I aus *H. sapiens* (Hs Hexokinase, P19367) in die phylogenetische Analyse aufgenommen. Nomenklatur und Sequenzen der übrigen Proteine entsprechen Abbildung 6.

3.1.2 Aif1p ist in gesunden Zellen mitochondrial lokalisiert

3.1.2.1 *in-vivo* Fluoreszenz Mikroskopie von yEGFP markiertem Aif1p

Das humane AIF ist in gesunden, nicht apoptotischen Zellen im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert (Susin et al., 1999b), im Gegensatz dazu ist AMID mit der Außenwand der Mitochondrien assoziiert (Wu et al., 2002). Um eine potentielle mitochondriale Lokalisation des Hefe Aif1p zu ermitteln, wurden Kolokalisationsstudien von yEGFP-Aif1p und einem mitochondrialen Marker, DsRed mit der mitochondrialen Lokalisationssequenz Su1-69 (Jakobs et al., 2003) (pFM 129), durchgeführt. Nach der Induktion der

Expression des yGFP-Aif1p durch den Wechsel auf methioninfreies Medium konnte die Lokalisation untersucht werden.

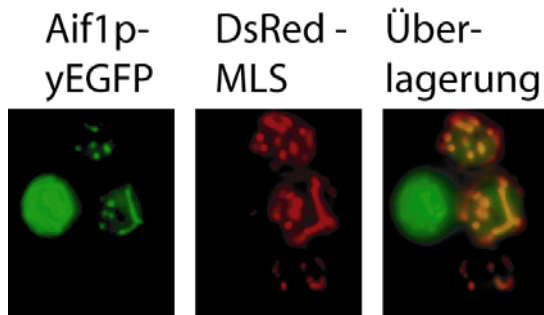


Abbildung 8: *In vivo* fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Aif1p-yEGFP in gesunden nicht apoptotischen Zellen.

Der Hefestamm FMY 546 (Aif1p-yEGFP und Su1-69 DsRed) wurde auf SMD-His, Ura, Met, Cys kultiviert, in der frühen logarithmischen Phase wurden die Zellen zentrifugiert und mit demselben Volumen *low melting* Agarose vermischt und auf einen Objektträger gegeben. Zur Visualisierung wurde ein Zeiss Axiovert 200 Mikroskop verwendet.

Wie in Abbildung 8 gut zu erkennen, ist das Aif1p-yEGFP in tubulären Strukturen in der Zelle lokalisiert, welche für die Mitochondrien typisch sind. Dass es sich bei diesen tubulären Strukturen um Mitochondrien handelt, zeigt die Kolokalisierung des yEGFP-Aif1p Konstruktes mit dem mitochondrialen Su1-69 DsRed Marker.

3.1.2.2 Aif1p ist im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert

Proteine, die in das Mitochondrium transportiert werden, besitzen eine mitochondriale Lokalisationssequenz (MLS), die nach dem Import in den Intermembranraum der Mitochondrien durch spezifische Proteasen abgespalten wird (Blobel, 1980). Die mitochondriale Lokalisationssequenz besteht in der Hefe aus einer amphipatischen α -Helix, in der normalerweise keine sauren Aminosäuren vorhanden sind. Mit bioinformatischen Studien konnte keine herkömmliche MLS im Aif1p ermittelt werden. Abbildung 9 zeigt, dass nahe des N-Terminus keine α -Helix zu erwarten ist, jedoch auch keine aziden Aminosäuren anwesend sind.

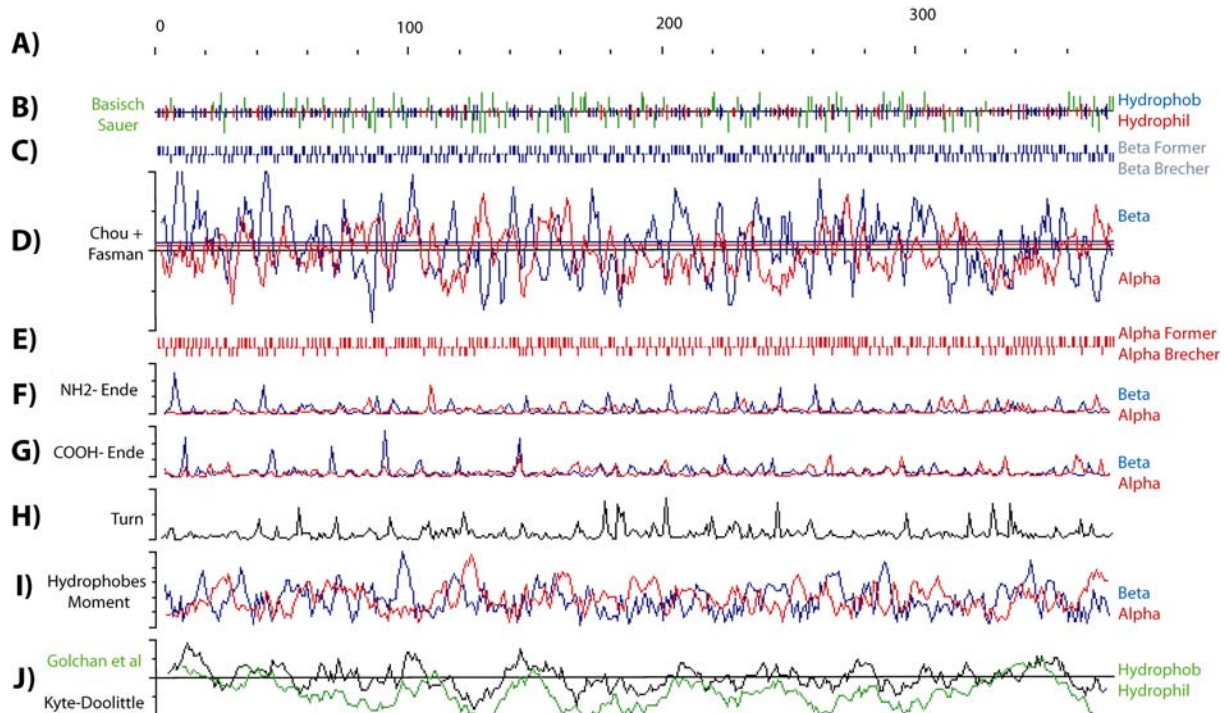


Abbildung 9: Vorhergesagte Sekundärstrukturen von Aif1p.

Die Sekundärstrukturvorhersagen wurden mit dem Programm <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/protein/secStructure> erstellt. A) Länge des Proteins; B) Schematische Darstellung der Aminosäurereste in Bezug auf ihre Ladung; C) Einteilung der einzelnen Aminosäuren in β -Faltblatt Former oder β -Faltblatt Brecher nach den Vorhersagen; D) Vorhersagen über α -Helix oder β -Faltblatt; E) Einteilung der einzelnen Aminosäure in α -Helix Former oder α -Helix Brecher nach den Vorhersagen; F) Vorhersagen über die typische Struktur N-terminal von α -Helices oder β -Faltblättern; G) Vorhersagen über die typische Struktur C-terminal von α -Helices oder β -Faltblättern; H) Vorhersagen über eine Drehung in der Sekundärstruktur; die Vorhersagen C bis H basieren auf Berechnungen von Chou und Fasman (1978); I) Darstellung des hydrophoben Moments an jeder Position des Proteins, die die statistische Wahrscheinlichkeit ausdrückt, dass die Sequenz amphipatisch ist. Die Vorhersagen beruhen auf Eisenberg (1984) und Finerman et al. (1984). Die Goldman-Kurve zeigt die Hydrophobie an, berechnet über 20 Aminosäurereste (Engelman et al., 1986), dagegen beruhen die Berechnungen von Kyte und Doolittle auf einer neun Aminosäuren umfassenden Sequenz (Kyte und Doolittle, 1982).

Um zu ermitteln, ob Aif1p an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist oder eventuell doch eine MLS besitzt und in das Mitochondrium transportiert wird, wurde Aif1p mittels *in vitro* Transkription und Translation mit radioaktivem S^{35} -Methionin markiert, und eine Import Studie in isolierte Wildtyp Mitochondrien durchgeführt.

In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass nach Inkubation von isolierten Mitochondrien mit radioaktiv markiertem Protein eine beträchtliche Menge

radioaktives Material in den gut zu pelletierenden Mitochondrien zu finden ist. Obwohl durch verschiedene bioinformatische Methoden keine MLS in der Sequenz von Aif1p gefunden werden konnte, weist die Abspaltung eines Fragmentes nach der Inkubation von Aif1p mit den Mitochondrien darauf hin, dass eine MLS vom Protein durch im Mitochondrium befindliche Proteasen abgespalten wird.

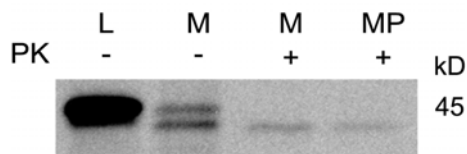


Abbildung 10: Autoradiographie einer Importstudie von radioaktiv markiertem Aif1p in isolierte Mitochondrien.

Wildtyp Mitochondrien wurden mit radioaktiv markiertem Aif1p inkubiert. Außerdem wurden Wildtyp Mitochondrien (M) und Mitoplasten (MP) mit Protease K (PK) behandelt. In der Spur 1 wurde zur Kontrolle reines Lysat (L) aufgetragen.

Durch eine geeignete Wahl des Mitochondrienpuffers ist es möglich, eine osmotische Schwellung der Mitochondrien zu induzieren. Dies führt zum Platzen der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch Mitoplasten entstehen; die innere Mitochondrienmembran bleibt intakt. Durch Inkubation von Mitochondrien und Mitoplasten mit Protease K kann dann die genaue Lokalisation von radioaktiv markierten Proteinen im Mitochondrium bestimmt werden.

Proteine, die sich in der mitochondrialen Matrix befinden, sollten sowohl in den Mitoplasten als auch in den intakten Mitochondrien nach Protease K Verdau vorhanden sein. Bei einer Lokalisation des Proteins im Intermembranraum wird dieses, durch das Platzen der äußeren Mitochondrienmembran, in den Mitoplasten zugänglich für die Protease K und somit abgebaut.

In Abbildung 10 ist eine Autoradiographie einer SDS-PAGE der Proben des Imports von Aif1p in isolierte Mitochondrien mit nachfolgender Konvertierung der Mitochondrien in Mitoplasten und anschließender Protease K Behandlung abgebildet. Das Vorläufer Aif1p ist nur in den Mitochondrien ohne Protease K Verdau vorhanden, und somit mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert.

Nach dem Protease K Verdau von ganzen Mitochondrien findet sich nur noch das reife geschnittene Aif1p ohne MLS. Das reife Aif1p befindet sich also in den Mitochondrien. Die Bande des reifen Aif1p nimmt in den Mitoplasten, im Vergleich zu der Aif1p Bande in den Mitochondrien nach Protease K Verdau, weiter ab. Dies deutet darauf hin, dass sich das reife Aif1p im Intermembranraum befindet. Der nicht vollständige Verdau des Proteins lässt vermuten, dass das Protein stark mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert oder in der Matrix lokalisiert ist.

3.1.2.3 Der Import von Aif1p ist abhängig vom TOM-Komplex

Der Import von Proteinen in das Mitochondrium ist abhängig vom Membranpotential, von der Verfügbarkeit von ATP und benötigt eine funktionierende Transportmaschinerie (für einen Übersichtsartikel siehe: Neupert, 1997). Diese Mitochondrien-Importmaschinerie besteht aus verschiedenen Proteinkomplexen, die einzelnen Proteine werden als TOM-Proteine (*Translocase of the Outer Membrane*) oder TIM-Proteine (*Translocase of the Inner Membrane*) bezeichnet. Der Import von Proteinen in das Mitochondrium ist bei einem Fehlen von TOM Proteinen stark verlangsamt bzw. völlig blockiert, je nachdem welchen Anteil die einzelnen Proteine am Import besitzen. Um den Import von Aif1p in das Mitochondrium zu bestätigen, wurden aus dem lebensfähigen $\Delta tom5$ Stamm Mitochondrien isoliert und diese mit radioaktiv markiertem Aif1p inkubiert.

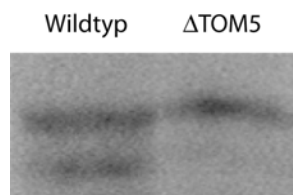


Abbildung 11: Importstudie von radioaktiv markiertem Aif1p in importdefiziente, isolierte Mitochondrien.

Wildtyp Mitochondrien und $\Delta tom5$ Mitochondrien wurden isoliert und mit radioaktiv markiertem Aif1p inkubiert.

Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, ist der Import von Aif1p in Mitochondrien, die aus einem $\Delta tom5$ Stamm isoliert wurden, stark reduziert. Dieses Ergebnis ist eine zusätzliche Bestätigung für den aktiven Import von Aif1p in die Mitochondrien.

3.1.3 Induktion der Apoptose bewirkt Translokation von Aif1p in den Kern

Humanes AIF transloziert während der Apoptose aus dem Mitochondrium in den Kern (Susin et al., 1999b). Um eine eventuelle Translokation von Aif1p aus dem Mitochondrium in den Kern zu untersuchen, wurde das yEGFP-Aif1p Konstrukt (pFM 44) zusammen mit dem nukleären DsRed-NLS Marker Plasmid (pFM 42) in den Stamm *BY α Δ ynr074c* (FMY 183) transformiert. Nach Induktion der Expression des yGFP-Aif1p durch den Wechsel auf methioninfreies Medium wurde die Apoptose durch zwei verschiedene Stimuli induziert. Zum einen wurden logarithmisch wachsende Zellen mit einer geringen Dosis Wasserstoffperoxids gestresst (Madeo et al., 1999), zum anderen wurden die Zellen chronologisch gealtert (Herker et al., 2004), beides löst in *S. cerevisiae* Apoptose mit allen typischen subzellulären Apoptosemarkern aus.

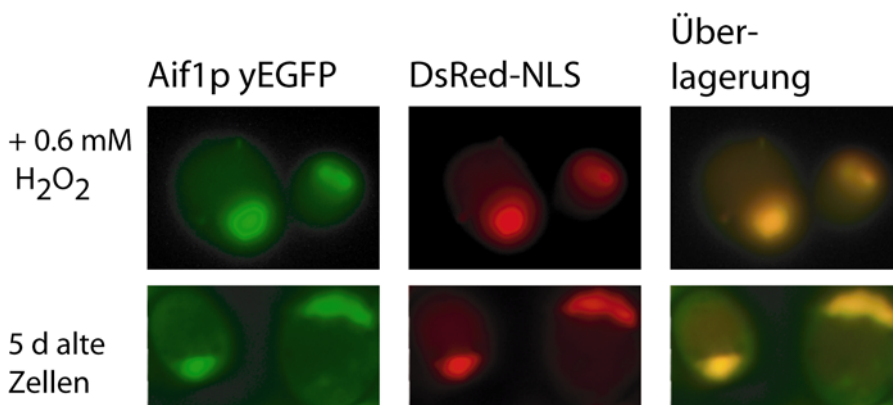


Abbildung 12: *In vivo* fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Aif1p-yEGFP bei apoptotischen Szenarien.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von logarithmisch wachsenden Zellen (FMY183) nach der Zugabe von 0,6 mM H₂O₂ für 5 h und von gealterten Zellen nach 5 d auf SMD Medium. Die Zellen wurden zentrifugiert, mit demselben Volumen *low melting* Agarose vermischt und auf einen Objektträger gegeben. Zur Visualisierung wurde ein Zeiss Axiovert 200 Mikroskop verwendet.

Wie in Abbildung 12 zu erkennen, ist das yGFP-Aif1p Konstrukt nach einer Induktion der Apoptose nicht mehr im Mitochondrium sondern im Kern lokalisiert. Somit wurde für zwei verschiedene apoptotische Szenarien eine Translokation von Aif1p vom Mitochondrium in den Kern nachgewiesen.

3.1.3.1 Ein Abbau der Zellwand induziert in der Hefe Apoptose

Um die Lokalisierung von Aif1p mit einer weiteren Methode zu verifizieren, wurde eine Zellfraktionierung von nichtapoptotischen Zellen durchgeführt. In diesem Stamm wurde Aif1p chromosomal mit GFP (*Green Fluorescent Proteine*) fusioniert. Bei dieser Methode bleibt der natürliche Promotor intakt.

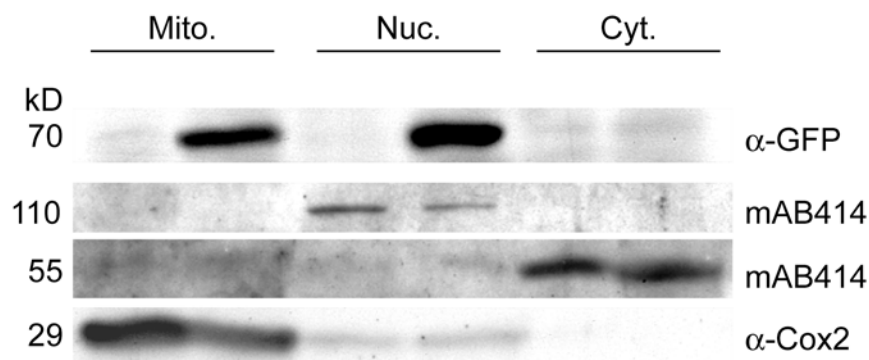


Abbildung 13: Immunoblot der Zellfraktionierung von nichtapoptotischen Zellen.

Immunoblot einer Zellfraktionierung von endogenen Aif1p-yEGFP-Epitop markierten Hefezellen (Spur 2, 4, 6) und Kontrollen (Spur 1, 3, 5) in der exponentiellen Wachstumsphase. Der Immunoblot wurde mit Antikörpern gegen GFP, Cox2p oder mit mAB 414, einem monoklonalen Antikörper, der mit einem 110 kD großen Kernporenprotein und mit einem 55 kD großem cytosolischem Protein reagiert (Aris und Blobel., 1989), dekoriert.

Wie in Abbildung 13 zu erkennen befindet sich das Aif1p-yEGFP Konstrukt nach einer Zellfraktionierung sowohl im Mitochondrium als auch im Kern. Dies könnte daran liegen, dass während einer Zellfraktionierung die Zellen einem enormen Stress unterliegen. Sie werden mehrmals zentrifugiert, mit reduzierenden Reagenzien behandelt, und außerdem wird die Zellwand während einer zweistündigen Inkubationszeit abgedaut. Vermutlich wird durch diese Behandlung in einem Teil der Zellen Apoptose induziert, so dass in diesen Zellen Aif1p aus dem Mitochondrium in den Kern transloziert. Dieses Ergebnis wurde durch *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie mit dem Stamm FMY 183, welcher das nukleäre DsRed Marker Plasmid und das yEGFP-Aif1p Konstrukt enthält, bestätigt (siehe Abbildung 14).

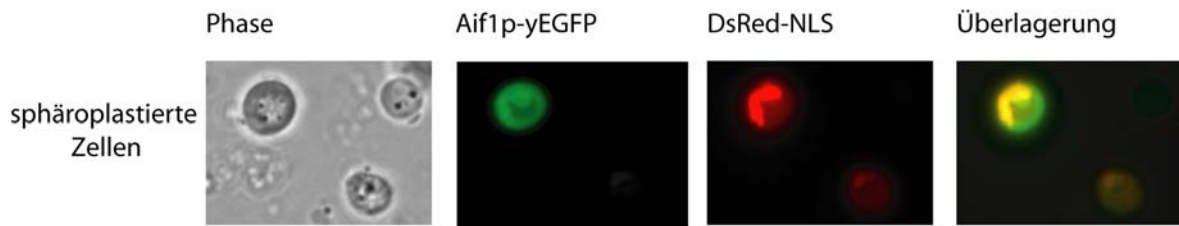


Abbildung 14: *In vivo* fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Aif1p-yEGFP nach einem Verdau der äußeren Zellwand.

Fluoreszenz mikroskopische Aufnahmen von logarithmisch wachsenden Zellen (FMY183) nach dem Verdau der Zellwand. Die Zellen wurden nach der Sphäroplastierung vorsichtig zentrifugiert und mit demselben Volumen *low melting* Agarose, gelöst in 1.2 M Sorbitol, vermischt und auf einen Objektträger gegeben. Zur Visualisierung wurde ein Zeiss Axiovert 200 Mikroskop verwendet.

Wie in Abbildung 14 zu sehen, ist in einem Teil der Zellen nach dem Abbau der Zellwand das Aif1p im Kern lokalisiert.

3.1.4 Die Disruption von AIF1 verhindert einen durch H_2O_2 induzierten Zelltod

Bei der Zugabe von geringen Dosen H_2O_2 zu exponentiell wachsenden Hefezellen wird im Wildtyp das apoptotische Programm eingeleitet (Madeo et al., 1999). Das Fehlen von Schlüsselproteinen der Apoptose bewirkt eine Erhöhung der Toleranz gegenüber H_2O_2 (Madeo et al., 2002). Um den Einfluss, den Aif1p auf apoptotischen Zelltod von Hefen hat, zu ermitteln, wurden Überlebensplattierungen mit und ohne H_2O_2 mit dem AIF1 Disruptionsstamm ($\Delta aif1$) durchgeführt.

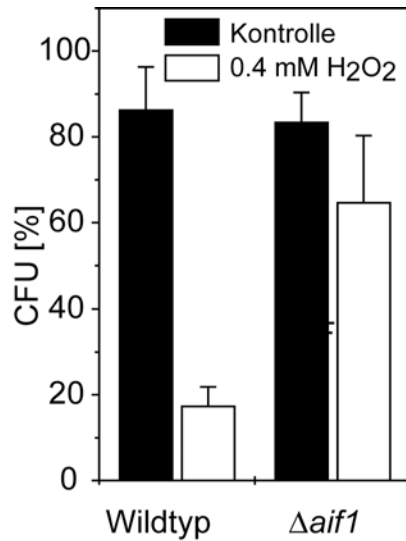


Abbildung 15: Überlebensplattierung des $\Delta aif1$.

$\Delta aif1$ und Wildtyp wurden mit 0,4 mM H_2O_2 für 4 h in der frühen exponentiellen Wachstumsphase gestresst und das Überleben mittels Plattierung bestimmt.

Die Disruption von AIF1 bewirkt eine höhere Toleranz gegenüber oxidativem Stress. Wie in Abbildung 15 erkennbar ist, sterben ca. 85 % der Wildtypzellen nach der Zugabe von 0,4 mM H_2O_2 . Im Gegensatz dazu sterben nur ca. 45 % der $\Delta aif1$ Disruptanten. Aif1p ist also für den apoptotischen Zelltod unter oxidativem Stress notwendig.

3.1.5 Überexpression von Aif1p induziert Apoptose in *S. cerevisiae*

Um zu überprüfen, ob eine vermehrte Expression von Aif1p zum Zelltod in *S. cerevisiae* führt, wurden Überexpressionsstudien durchgeführt. Hierzu wurde der ORF AIF1 in den durch Galactose induzierbaren Überexpressionsvektor pESC kloniert; hierdurch wurde das Protein gleichzeitig mit einem Flag-Epitop (synthetisches Epitop, Sequenz DYKDDDDK) markiert.

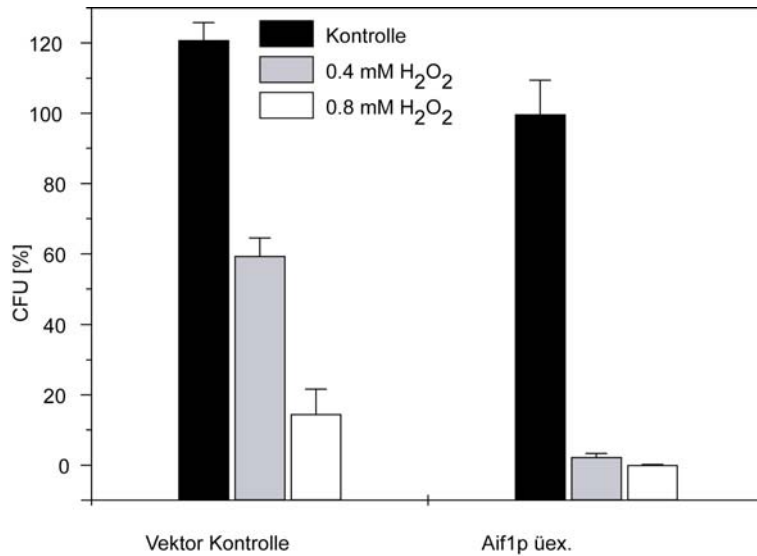


Abbildung 16: Überlebensplattierung des Aif1p Überexprimierers.

Das Überleben des Aif1p Überexprimierers und der Vektorkontrolle nach einer 20 stündigen Induktion der Proteinexpression auf Galactose mit und ohne H₂O₂. Das Überleben wurde mittels Plattierung bestimmt.

Wie in Abbildung 16 ersichtlich, reicht eine Überexpression des Aif1p alleine nicht aus, um einen Zelltod in Hefezellen auszulösen. Die Zugabe einer geringen Menge H₂O₂, in diesem Fall 0,4 mM, reicht allerdings aus, um im Überexprimierer einen massiven Zelltod zu induzieren. Hier sterben etwa 90 % der Zellen, während in der gleichbehandelten Vektorkontrolle die Sterberate bei etwa 40 % liegt. Auch bei höheren H₂O₂ Konzentrationen ist ein deutlich besseres Überleben der Vektorkontrolle erkennbar.

Die geringere Überlebensrate des Überexprimierers bei oxidativem Stress (Abbildung 16) könnte durch apoptotischen oder nekrotischen Zelltod verursacht sein. Zur Differenzierung zwischen den beiden Zelltodwegen wurde der Stamm auf apoptotische Marker hin untersucht.

Zur Visualisierung von DNA-Strangbrüchen wurde die TUNEL-Färbung durchgeführt. Zellen mit DNA-Strangbrüchen weisen dabei unter dem Lichtmikroskop eine schwarze Färbung des Zellkerns auf. Die Überexpression von Aif1p in Kombination mit 0,4 mM H₂O₂, führt in rund 80 % der Zellen zu einer schwarzen Färbung des Kerns (Abbildung 17) und damit zu extensiven DNA-Strangbrüchen. In der Vektorkontrolle zeigen dagegen nur 40 % der Zellen eine Färbung des Zellkerns (Abbildung 17).

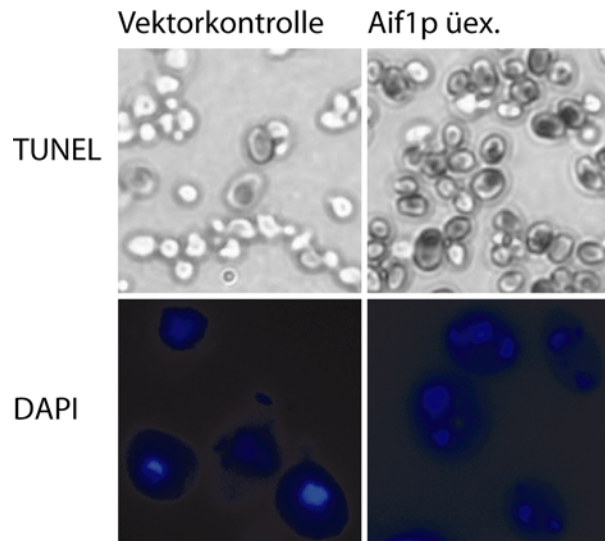


Abbildung 17: Aif1p Überexpression induziert die nukleären Marker der Apoptose.

TUNEL- und DAPI-Färbung der Vektorkontrolle und des Aif1p Überexprimierer. Die Zellen wurden zur Induktion der Proteinexpression bei $OD_{600} = 0,3$ auf galactosehaltiges Selektionsmedium umgesetzt und mit $0,4 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ belastet. Nach 20 h wurden TUNEL-Tests und DAPI-Färbungen durchgeführt.

Zur Visualisierung von Chromatinkondensation wurde das Chromatin fixierter Zellen mit DAPI gefärbt. Die Vektorkontrolle zeigte überwiegend intakte, runde Zellkerne. Bei Überexpression von Aif1p dagegen erschienen die Kerne kleiner als in der Vektorkontrolle; viele waren entweder länglich deformiert oder zeigten kondensiertes Chromatin (Abbildung 17). Sowohl die TUNEL- als auch die DAPI-Färbungen belegen, dass der Zelltod des Aif1p-Überexpressionsstammes mit typischen Merkmalen des apoptotischen Zelltods einhergeht.

3.1.6 Aif1p besitzt die Fähigkeit DNA zu schneiden

Humanes AIF bindet durch elektrostatische Wechselwirkungen von basischen Aminosäuren an DNA-Stränge und ist während der Apoptose an ihrer Fragmentierung beteiligt. Eine gezielte Mutagenese bestimmter positiv geladener Aminosäuren verhindert diese Wechselwirkung mit der DNA und reduziert in der Folge das apoptotische Potential von AIF (Ye et al., 2002). Wie in Abschnitt 3.1.1 erwähnt, sind diese basischen Aminosäuren zwischen Maus AIF und humanem AIF hochkonserviert, nicht aber im Hefehomolog Aif1p. Um dennoch Aif1p auf eine eventuelle DNase Aktivität zu testen, wurde von dem Aif1p Überexprimierer und

der Leervektorkontrolle mit und ohne Induktion der Apoptose durch H_2O_2 Rohextrakt gewonnen. In diesem Rohextrakt befinden sich die gesamten Proteine der Zelle in den zum Zeitpunkt des Aufschlusses vorhanden Mengenverhältnissen. Diese Rohextrakte wurden für einen DNase Test eingesetzt.

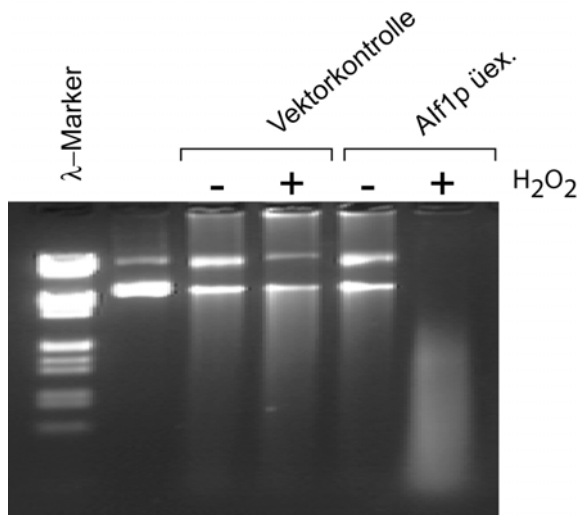


Abbildung 18: Degradation von Plasmid-DNA durch Rohextrakt.

1 μ g Plasmid-DNA wurde mit 2.5 μ g Rohextrakt, gewonnen aus der Leervektorkontrolle und dem Aif1p Überexprimierer mit und ohne H_2O_2 , inkubiert.

Wie in Abbildung 18 zu sehen, wird Plasmid-DNA besonders stark durch Rohextrakt, der aus Aif1p überexprimierenden Hefezellen nach H_2O_2 Behandlung gewonnen wurde, fragmentiert.

Der Rohextrakt von mit H_2O_2 behandelten Zellen scheint eine größere DNase Aktivität zu besitzen. Signifikant ist dieser Befund besonders bei den Aif1p überexprimierenden Hefezellen. Dies könnte an einer allgemein veränderten Konzentration von apoptoseinduzierenden Proteinen liegen. Im Immunoblot ist zu erkennen, dass bei Aif1p überexprimierenden Zellen die relative Konzentration von Aif1p nach Zugabe von H_2O_2 steigt (nicht gezeigt). Der Grund scheint eine Verminderung der allgemeinen Proteintranslation in apoptotischen Zellen zu sein; hiervon würde Aif1p nicht betroffen sein, da die Expression des Proteins durch den Gal10 Promotor gesteuert wird und nicht vom endogenen Promotor abhängt. Um die DNase Aktivität von Aif1p weiter zu charakterisieren, wurde Aif1p rekombinant in *E. coli* exprimiert und mittels eines His₈-Epitop aufgereinigt, dies wurde von Eva Herker durchgeführt (Herker, 2005).

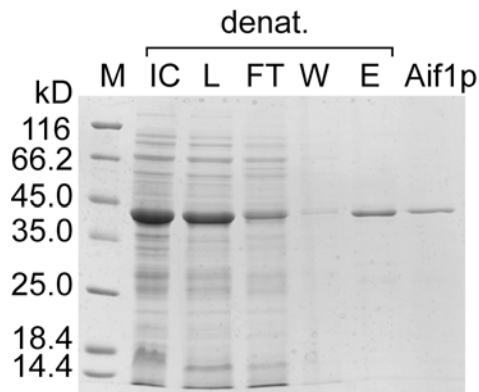


Abbildung 19: Aufreinigung von Aif1p.

Die Fraktionen der Aufreinigung von rekombinanten Aif1p aus *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen und der Zurückfaltung des Proteins mittels Dialyse wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie visualisiert (Herker, 2005). IC (induzierte Kontrolle); FT (Durchfluss); W (Waschschritt); E (Eluat) und zurückgefaltetes Aif1p.

Das aufgereinigte Aif1p wurde zusammen mit aufgereinigten Hefezellkernen inkubiert, die DNA extrahiert und im Agarosegel aufgetrennt und visualisiert.

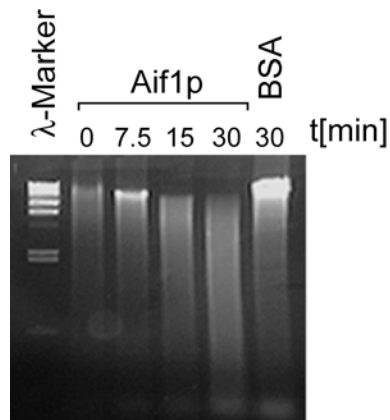


Abbildung 20: Degradation der DNA von aufgereinigten Hefezellkernen durch Aif1p.

16µg rekombinantes Aif1p oder BSA (Kontrolle) wurde zusammen mit aufgereinigten Hefezellkernen inkubiert. Nach Extraktion der DNA wurde diese in einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt und visualisiert.

Abbildung 20 zeigt den zeitlichen Verlauf der Fragmentierung von DNA aus Hefezellkernen durch Aif1p. Rekombinant aufgereinigtes Aif1p ist in der Lage, die DNA in aufgereinigten Hefekernen zu fragmentieren. Nach 15 min. ist eine deutliche Degradation festzustellen. Die chromosomale DNA wird allerdings nicht

zwischen den Nukleosomen geschnitten, es entsteht keine DNA-Leiter. Der Grund dafür liegt wohl in der unterschiedlichen DNA-Linker Komposition von humanen Zellen und Hefezellen. Die internukleosomale Linker-DNA ist in der Hefe sehr viel kürzer als in Säugerzellen (Lowary und Widom, 1989).

Rekombinant gewonnenes Maus AIF induziert Chromatinkondensation in aufgereinigten Kernen und verursacht eine Fragmentierung der DNA in Bruchstücke von bis zu 50 kBp, aber es hat kaum einen Effekt auf Plasmid-DNA oder auf DNA in hitzeinaktivierten Kernen. Dies deutet darauf hin, dass das Maus AIF *in vivo* mit anderen Proteinen interagiert, die während der Apoptose im Kern lokalisiert sind. Humanes AIF hat somit bei der Fragmentierung der DNA nur eine unterstützende Rolle.

Um die DNA-Degradationskapazität von isoliertem Hefe Aif1p zu bestimmen, wurde aufgereinigtes Protein zusammen mit Plasmid-DNA inkubiert.

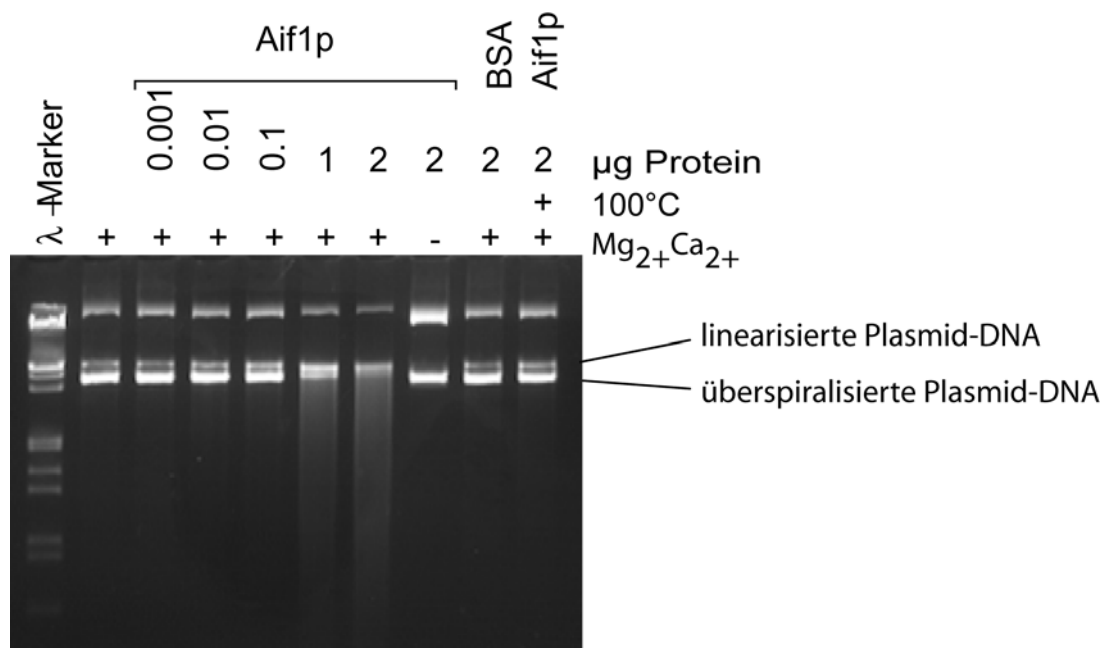


Abbildung 21: Aif1p fragmentiert nackte Plasmid DNA.

1µg Plasmid-DNA wurde mit den jeweils angegebenen Konzentrationen von aufgereinigtem Aif1p oder BSA für 30 min. bei 30°C inkubiert, nach der Inkubationszeit kurz hitzeinaktiviert und die DNA Fragmente in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt.

Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, schneidet Aif1p konzentrationsabhängig Plasmid DNA. Bei 1 µg Protein pro 1 µg Plasmid-DNA ist deutlich sichtbar, dass die überspiralisierte Form des Plasmids abnimmt und die linearisierte Form zunimmt. Außerdem entstehen kleine DNA-Abbauprodukte. Die DNase Aktivität von Aif1p ist außerdem abhängig von divalenten Kationen. Sie benötigt eine Rückfaltung des Proteins, und die Aktivität ist durch Hitzeeinwirkung zerstörbar. Die putative Oxidoreduktasedomäne ist an der DNase Aktivität nicht beteiligt, da die Rückfaltung des Proteins in der Abwesenheit von FAD stattfand. Allerdings ist die benötigte Konzentration von Aif1p zur Fragmentierung von 1 µg Plasmid-DNA mit 1 µg Protein sehr hoch, was darauf hindeutet, dass Aif1p *in vivo* weitere Interaktionspartner zur Degradation der DNA benötigt.

3.1.7 Die Rolle von Cyclophilinen bei der Aif1p vermittelten Apoptose

Ein bekannter Interaktor von Säuger AIF ist das Cyclophilin A (Cande et al., 2004). Cyclophiline sind Proteine, die während der Proteinfaltung als Peptidylprolyl *cis-trans* Isomerasen wirken. Für mehrere Cyclophiline wurde auch eine latente Nukleaseaktivität beschrieben (Montague et al., 1997), welche aber unabhängig von der Peptidylprolyl *cis-trans* Isomeraseaktivität ist. Kroemer und Kollegen publizierten kürzlich, dass Säuger AIF im Komplex mit Cyclophilin A zu einer Degradation von Plasmid-DNA führt (Cande et al., 2004). AIF allein ist nur zur Degradation von Chromosomen in gereinigten Kernen fähig (Susin et al., 1999). Sie schlossen aus ihren Versuchen, dass Cyclophilin A der Faktor ist, der *in vivo* zusammen mit AIF für die 50 kBp Fragmentierung der DNA zuständig ist.

Die erforderliche Konzentration von rekombinantem Aif1p zur Fragmentierung von Plasmid-DNA ist mit 1 µg Protein pro 1 µg DNA für eine Nuklease relativ hoch, so dass zu vermuten ist, dass Aif1p *in vivo* mit einem Interaktionspartner bei der Fragmentierung von DNA zusammenarbeitet. Um zu untersuchen, ob Cyclophilin A auch in *S. cerevisiae* mit Aif1p in der Apoptose kooperiert, wurden Überlebensplattierungen mit einem Cyclophilin A Homolog in Hefe (CPR1) durchgeführt. Hierzu wurde ein CPR1 Disruptionsstamm mit einem Überexpressionsplasmid von Aif1p mit einem FLAG-Epitop und einem mit Galactose induzierbaren GAL10 Promotor transformiert.

Die Expression von Aif1p wurde mittels Immunoblot überprüft. Die Immunoblots zeigten eine geringere Expression von Aif1p im CPR1 Disruptionsstamm. Daraufhin wurde die Expression von Aif1p im Wildtyp dem von Aif1p im CPR1 Disruptionsstamm angepasst. Abbildung 22 zeigt den Immunoblot, der zur Überprüfung des Expressionsniveaus von Aif1p bei verschiedenen Galactosekonzentrationen durchgeführt wurde. Bei dem Wildtyp zeigte sich bei der Induktion des Galactose Promotors mit 1 % Galactose und 1 % Glucose ungefähr dieselbe Expressionsstärke von Aif1p wie bei dem CPR1 Disruptionsstamm mit 2 % Galactose. In den folgenden Versuchen wurden diese Galactosekonzentrationen zur Induktion des Promotors beibehalten.

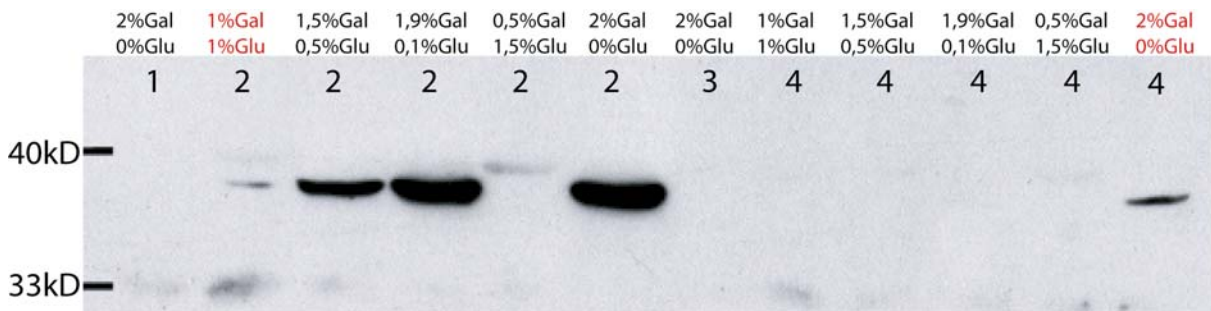


Abbildung 22: Immunoblot zur Überprüfung des Expressionsniveaus von Aif1p bei verschiedenen Galactosekonzentrationen.

Immunoblot der Rohextrakte von 1) Wildtypkontrolle mit Leervektor, 2) Wildtyp Aif1p Überexpressionsstamm, 3) $\Delta cpr1$ Leervektorkontrolle und 4) $\Delta cpr1$ Aif1p Überexpressionsstamm. Die Galactosekonzentrationen der Medien wurden wie angegeben variiert. Es wurden jeweils 100 μ g Proteinextrakt aufgetragen.

Wie in Abbildung 23 zu sehen, schützt die Disruption von CPR1 vor einer Aif1p vermittelten Apoptose. Die Zahl der überlebenden Zellen steigt von 45 % im Wildtyp-Aif1p Überexprimierer auf 95 % im $\Delta cpr1$ -Aif1p Überexpressionsstamm. Die Überlebenszahlen vom $\Delta cpr1$ -Aif1p Überexpressionsstamm sind auf demselben Niveau wie die der Wildtyp Vektorkontrolle.

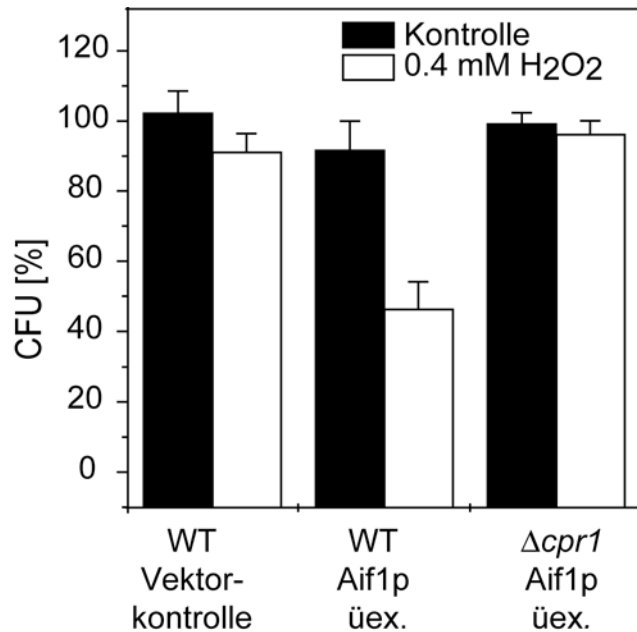


Abbildung 23: Die Disruption von CPR1 rettet bei einem durch Aif1p Überexpression vermittelten Zelltod.

Das Überleben der Aif1p Überexpressionsstämme und der Vektorkontrolle im Wildtyphintergrund und im $\Delta cpr1$ Stamm wurde nach einer 20 h Induktion der Proteinexpression auf galactosehaltigem Selektionsmedium und der Belastung mit 0,4 mM H₂O₂ mittels Überlebensplattierung bestimmt.

Um zu überprüfen, ob dieser Effekt spezifisch für CPR1 ist, oder ob eine Deletion von Cyclophilinen generell die Apoptoserate bei einer Aif1p vermittelten Apoptose verringert, wurde Aif1p in einem CPR2 Disruptionstamm überexprimiert. CPR2 ist ein Cyclophilin B Homolog in Hefe. Als erstes wurde die Expression von Aif1p im $\Delta cpr2$ Stamm mittels Immunoblot überprüft. Da die Expressionsniveaus von Aif1p im CPR2 Disruptionstamm mit denen im Wildtyp vergleichbar waren, wurde bei den folgenden Versuchen 2 % Galactose zur Induktion des Promotors eingesetzt.

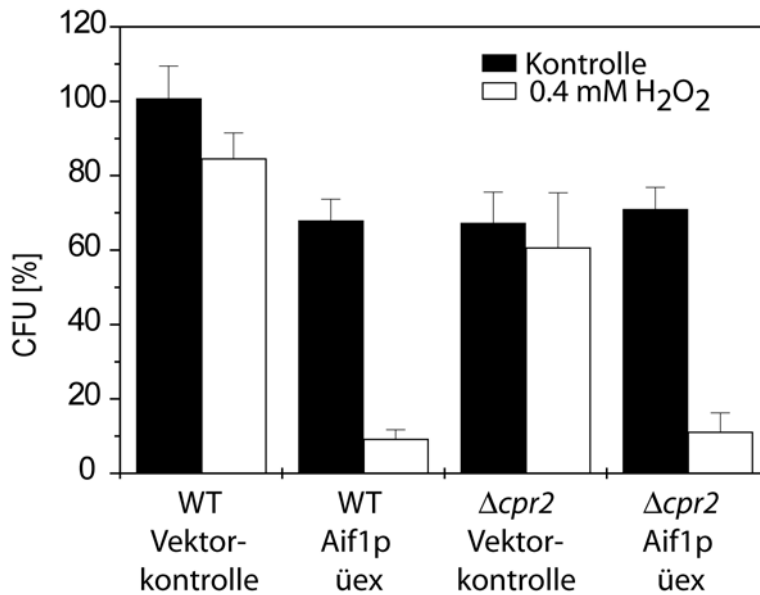


Abbildung 24: Die Disruption von CPR2 rettet nicht vor einem durch Aif1p Überexpression vermittelten Zelltod.

Das Überleben der Aif1p Überexpressionsstämme und der Vektorkontrolle im Wildtyphintergrund und im $\Delta cpr2$ Stamm wurde nach einer 20 h Induktion der Proteinexpression auf galactosehaltigem Selektionsmedium und der Belastung mit 0,4 mM H₂O₂ mittels Überlebensplattierung bestimmt.

Die Disruption von CPR2 hat keinen steigernden Effekt auf die Überzahlen des Aif1p Überexprimierers. Die Überlebenszahlen der Stämme Wildtyp Aif1p Überexprimierer und der $\Delta cpr2$ Überexprimierer liegen beide bei ungefähr 10 % (Abbildung 24). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Cpr1p, nicht aber Cpr2p, mit Aif1p während der Apoptose interagiert.

Um zu überprüfen, inwiefern der apoptogene Effekt von Cpr1p von der Peptidylprolyl *cis-trans* Isomerase Aktivität abhängig ist, wurde diese durch Cyclosporin A (CsA) inhibiert.

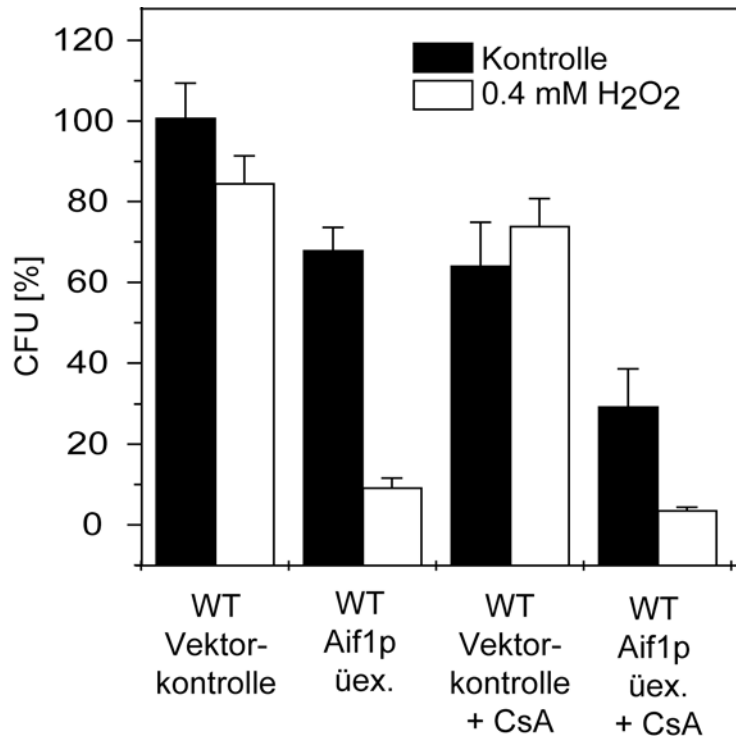


Abbildung 25: CsA hat keinen Einfluss auf die Überlebensrate von Wildtypzellen bei einer Aif1p Überexpression.

Das Überleben der Aif1p Überexpressionsstämme und der Vektorkontrolle im Wildtyphintergrund wurde nach einer 20 h Induktion der Proteinexpression auf galactosehaltigem Selektionsmedium und mit bzw. ohne 0,4 mM H₂O₂ und 50 µg/ml Cyclosporin A mittels Überlebensplattierung bestimmt.

Wie aus der Abbildung 25 deutlich hervorgeht, hat die Zugabe von CsA keinen Einfluss auf die Überlebensrate von Hefezellen bei einer Aif1p vermittelten Apoptose. CsA kann also den rettenden Effekt der Disruption von CPR1 nicht ersetzen, und somit ist der rettende Effekt dieser Disruption unabhängig von der Peptidylprolyl *cis-trans* Isomerase Aktivität.

Susin et al. konnten zeigen, dass in Säugerzellen die Ausschüttung von AIF aus dem Mitochondrium durch Calcium induziert werden konnte (Susin et al., 1999a). Dieser Effekt wurde auf ein Calmodulin vermitteltes Signal zurück geführt. Die Calcium vermittelte Ausschüttung von AIF aus dem Mitochondrium konnte durch CsA, einem Inhibitor von Calcineurin (einer Ca²⁺/Calmodulin abhängigen Proteinphosphatase), verringert werden. Würde dies auch in Hefe zutreffen, wäre das im Widerspruch zu den in Abbildung 25 gezeigten Ergebnissen, besonders da in der Abbildung zu erkennen ist, dass der Wildtyp mit CsA eher schlechter

überlebt als ohne; dieser Effekt wird noch durch die Überexpression von Aif1p verstärkt. Um zu überprüfen, ob auch in Hefe Aif1p calciumvermittelt aus dem Mitochondrium entlassen wird, wurden die Versuche von Susin et al., mit isolierten Hefemitochondrien wiederholt. Hierzu wurden Mitochondrien eines Stamms, in dem Aif1p yEGFP-Epitop markiert ist (FMY 274), isoliert, mit verschiedenen Konzentrationen Calcium inkubiert, zentrifugiert und der Überstand mehrmals von festen Bestandteilen abgetrennt. Die Überstände wurden auf eine SDS Page geladen und einem Immunoblot unterzogen. Dieser Versuch wurde in verschiedenen Variationen wiederholt. Es konnte jedoch niemals eine Calcium vermittelte Aif1p Ausschüttung aus dem Mitochondrium beobachtet werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde überprüft, ob Aif1p nach einer Behandlung der Zellen mit CsA noch vom Mitochondrium in den Kern transloziert.

Hierzu wurde die nukleäre Lokalisation von Aif1p-yEGFP unter oxidativen Stress bei gleichzeitiger Zugabe von Cyclosporin A untersucht.

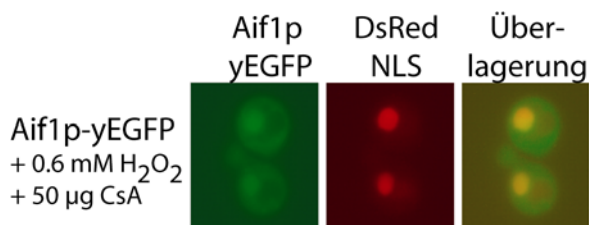


Abbildung 26: Eine Inkubation der Zellen mit CsA verhindert die Translokation von Aif1p in den Kern nicht.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von logarithmisch wachsenden Zellen nach der Zugabe von 50 µg/ml CsA und 0,6 mM H₂O₂ für 5 h in SMD Medium. Die Zellen wurden zentrifugiert und mit demselben Volumen *low melting* Agarose vermischt und auf einen Objektträger gegeben. Zur Visualisierung wurde ein Zeiss Axiovert 200 Mikroskop verwendet

Wie in Abbildung 26 zu sehen, verhindert eine Inkubation der Zellen mit CsA nicht, dass Aif1p aus dem Mitochondrien entlassen wird und in den Kern gelangt. Somit hat in *S. cerevisiae* CsA keine Auswirkungen auf die Freisetzung von Aif1p aus dem Mitochondrium.

3.1.8 Das Zusammenspiel von Aif1p und Yca1p

Die Caspaseabhängigkeit des AIF vermittelten Zelltods in Säugerzellen ist umstritten. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die apoptogene Funktion von Aif1p caspaseabhängig oder -unabhängig ist.

Hierzu wurde Aif1p im Wildtyp und in einem Caspasedelelionsstamm ($\Delta yca1$) überexprimiert, die Zellen wurden mit einer geringen Dosis H_2O_2 gestresst und die Anzahl der überlebenden Zellen bestimmt.

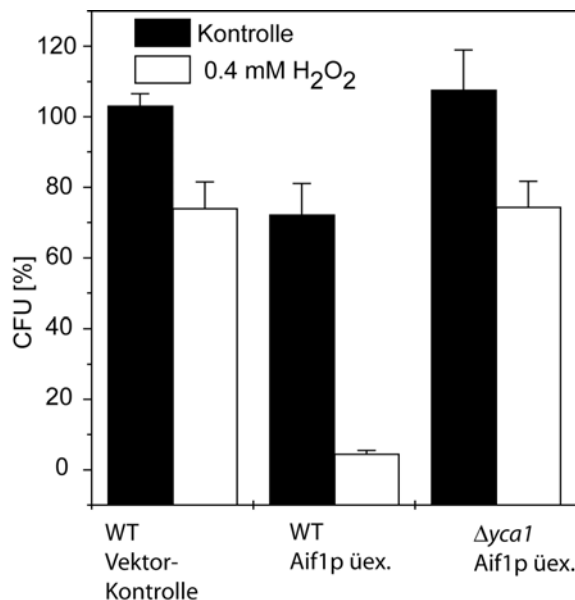


Abbildung 27: Die Deletion des YCA1 Gens rettet vor einer durch Aif1p vermittelten Apoptose.

Wildtyp und $\Delta yca1$ Stämme mit einem Aif1p Überexpressionsplasmid und einer Vektorkontrolle wurden zur Induktion der Proteinexpression 20 h auf galactosehaltigem Selektionsmedium kultiviert und mit 0,4 mM H_2O_2 gestresst. Die Anzahl der überlebenden Zellen wurde mittels Plattierung bestimmt.

Wie in Abbildung 27 zu sehen, schützt die Deletion des Caspasegens vor einem durch Aif1p Überexpression ausgelösten Zelltod. Die Aif1p vermittelte Apoptose scheint also caspaseabhängig zu sein. Um dies zu bestätigen, wurde die Caspaseaktivität des Aif1p Überexprimierers *in vivo* gemessen.

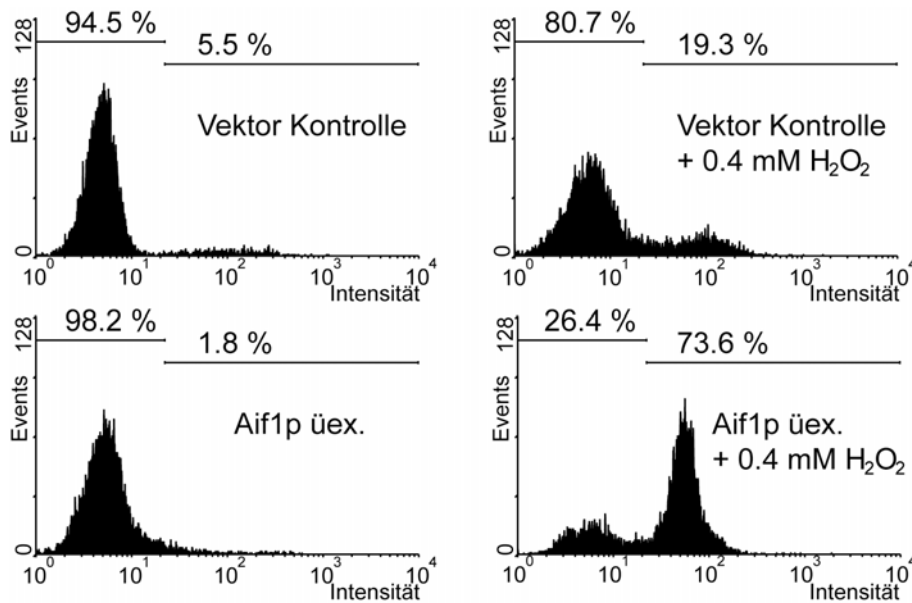


Abbildung 28: Die Überexpression von Aif1p führt zu einer erhöhten Caspaseaktivität.

Vektorkontrolle und Aif1p Überexpressionsstämme wurden zur Induktion der Proteinexpression auf galactosehaltigem Medium kultiviert und mit H_2O_2 inkubiert. 20 h später wurden 5×10^6 Zellen entnommen, mit dem fluoreszierenden Pan-Caspaseinhibitor FITC-VAD-fmk gefärbt und die relative Fluoreszenz durchflusscytometrisch bestimmt.

Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, weisen in der Vektorkontrolle nach Behandlung mit 0,4 mM H_2O_2 20 % aller Zellen eine erhöhte Caspaseaktivität auf, welcher als Hintergrund nach H_2O_2 Zugabe gewertet wurde. Bei Überexpression von Aif1p hingegen steigt der Prozentsatz der Subpopulation mit aktiven Caspasen auf 74 %. Der durch Aif1p-Überexpression vermittelte Zelltod scheint also mit einer Aktivierung von Caspasen einherzugehen.

Diese Ergebnisse legen es nahe, Aif1p als ein Aktivorenzym der Caspase Yca1p einzuordnen.

3.1.9 Disruption von AIF1 verzögert einen durch chronologisches Altern hervorgerufenen Zelltod

Ein physiologischer Auslöser der Apoptose in *S. cerevisiae* ist das chronologische Altern (Herker et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass Aif1p während des chronologischen Alterns vom Mitochondrium in den Kern wandert (Abbildung 12). Um eine mögliche Beteiligung von Aif1p am Zelltodmechanismus im chronologischen Altern zu untersuchen, wurden $\Delta aif1$ und

Wildtyp Stämme für mehrere Tage auf Minimalmedium kultiviert und Überlebensplattierungen durchgeführt.

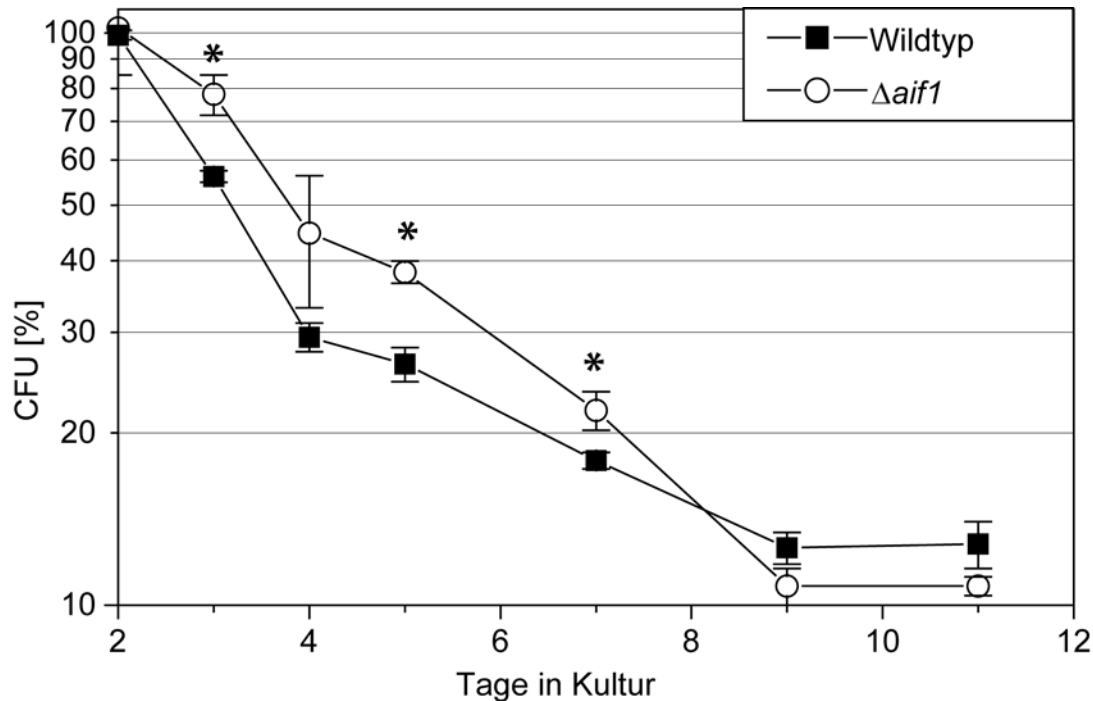


Abbildung 29: Der $\Delta aif1$ Stamm überlebt in der frühen Phase des chronologischen Alterns besser als der isogene Wildtyp.

$\Delta aif1$ und Wildtyp wurden auf Minimalmedium kultiviert und das Überleben der beiden Stämme mittels Plattierung bestimmt. Die Sterne stehen für einen signifikanten Unterschied in einem unabhängigen T-Test (Tag 3 und 5 mit 0,02 und am Tag 7 mit 0,075).

Abbildung 29 zeigt, dass der $\Delta aif1$ Stamm am Tag 3, 5 und 7 ein signifikant besseres Überleben zeigt als der isogene Wildtyp. Eine Disruption des AIF1 Gens schützt die Zelle also im Anfangsstadium des chronologischen Alterns vor dem Zelltod.

Herker et al. zeigten, dass die Apoptose im chronologischen Altern mit einer Aktivierung der Caspase Yca1p einhergeht (Herker et al., 2004). Um zu überprüfen, ob die verminderte Apoptoserate im $\Delta aif1$ Stamm von einer verminderten Caspaseaktivierung begleitet ist, wurde am Tag 3 von beiden Stämmen, Wildtyp und Δaif , ein Caspaseaktivitätstest durchgeführt.

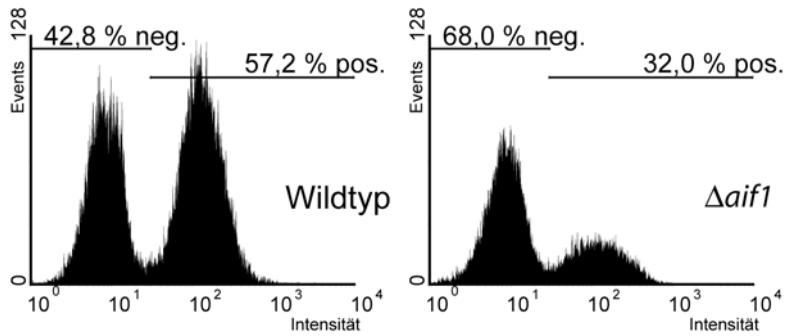


Abbildung 30: Eine Deletion von AIF1 führt zu einer Verminderung der Caspaseaktivität im chronologischen Altern.

Die Stämme Wildtyp und $\Delta aif1$ wurden auf Minimalmedium kultiviert. Nach 3 Tagen wurden 5×10^6 Zellen entnommen, mit dem fluoreszierenden Pan-Caspaseinhibitor FITC-VAD-fmk inkubiert und die relative Fluoreszenz durchflusscytometrisch bestimmt.

In dem Caspaseaktivitätsassay ist zu erkennen, dass im Wildtyp 57 % aller Zellen eine Aktivierung der Caspase aufweisen. Zellen, in denen das AIF1 Gen deletiert ist, zeigen dagegen nur eine positiven Subpopulation von 32 % (Abbildung 30). Diese Daten legen nahe, dass die Disruption von AIF1 eine Aktivierung der Caspase im chronologischen Altern vermindert.

3.1.10 Die Funktion von Aif1p in gesunden Zellen

Der AIF1 Disruptionsstamm überlebt nur in der frühen Phase des chronologischen Alterns besser, ab dem 8. Tag zeigt der Wildtyp gegenüber dem $\Delta aif1$ einen Überlebensvorteil (Abbildung 29). Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 31 dieser Teil der Überlebenskurve noch mal vergrößert dargestellt.

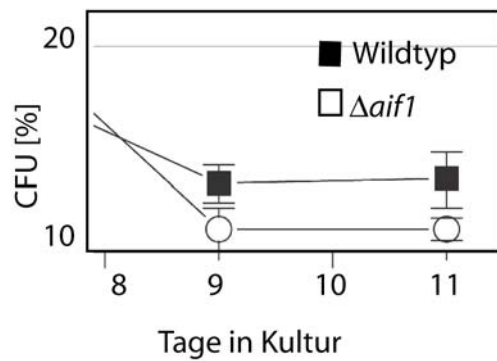


Abbildung 31: In der späten Phase des chronologischen Alterns hat der Wildtyp einen Überlebensvorteil gegenüber dem $\Delta aif1$ Stamm.

Gezeigt ist ein Teilausschnitt der Abbildung 29.

Obwohl dieser Unterschied nicht hochsignifikant ist, seien hier einige Spekulationen erlaubt.

Am 3. Tag sind beim chronologischen Altern in Minimalmedium sämtliche Glucose- und Ethanolvorräte aufgebraucht sind, die Zellen hungern. Während dieser Hungerphase sinkt die ATP Konzentration in den Zellen (Ball et al., 1997). Zellen mit funktionell intakten Mitochondrien überleben in dieser Hungerphase besser als Zellen mit einer Fehlfunktion der Mitochondrien (Ball et al., 1997). Am Tag 8 gewinnen die Zellen also seit längerer Zeit ihre Energie nur noch über den Citratzyklus und der anschließenden oxidativen Phosphorylierung.

In der Zelle entstehen besonders während dieser Phase freie Radikale. Für eine funktionierende oxidative Phosphorylierung ist die Inaktivierung dieser freien Radikale unabdingbar, da sie Atmungskettenproteine irreparabel inaktivieren können.

Klein et al. (2002) konnten zeigen, dass bei Harlequin Mäusen mit reduzierter AIF-Expression eine erhöhte Konzentration an freien Radikalen entsteht. Sie schlossen daraus, dass AIF in gesunden Zellen die Aufgabe eines Radikalfängers besitzt (Klein et al., 2002).

Andere *in vitro* Studien zeigen, dass humanes AIF in Gegenwart von NADH Cytochrom c reduzieren kann (Miramar et al., 2001), weshalb über eine Beteiligung von AIF am Elektronentransfer der Atmungskette spekuliert wurde. Aufgrund dieser Tatsachen und des schlechteren Überlebens des $\Delta aif1$ Stammes in der späten Phase des chronologischen Alterns, wurde eine Funktion von Aif1p

in gesunden Zellen bei der oxidativen Phosphorylierung sowie dem Abfangen von freien Radikalen erwogen. Eingeschränktes Wachstum auf nichtfermentierbaren Medien ist ein deutlicher Hinweis auf eine Fehlfunktion der Atmungskette der Zellen. Um dies für das Aif1p zu untersuchen, wurden gemeinsam mit S. Engelhardt eine *aif1*Δ Nullmutante und ein isogener WT auf verschiedenen nichtfermentierbaren Medien angezogen und die Wachstumsgeschwindigkeit bestimmt. Hierfür wurden die Stämme ausgestrichen und nach dem Anwachsen mindestens drei Tage bei 4°C gelagert, um einen Übertritt fast aller Hefen in die G₀ Phase zu ermöglichen. Anschließend wurden die Hefen direkt von Platte auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft (Engelhardt, 2004).

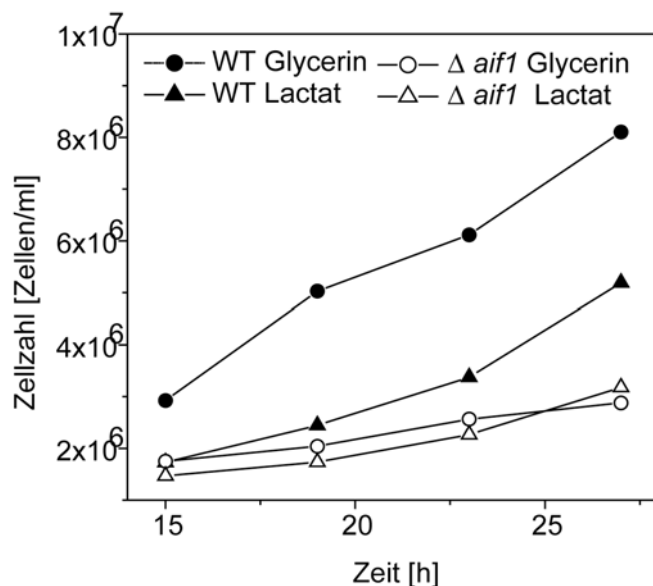


Abbildung 32: Wachstumskurven von WT und *Δaif1* Nullmutante auf Minimalmedium mit Glycerin bzw. Lactat als Kohlenstoffquelle.

Δaif1 und Wildtyp wurden auf Minimalmedium mit Glycerin und Lactat als Kohlenstoffquelle für den angegebenen Zeitraum kultiviert.

Bei der Verwendung von Lactat oder Glycerin als Kohlenstoffquelle wächst die *Δaif1* Nullmutante signifikant schlechter als der Wildtyp (Engelhardt, 2004). Die Generationszeit auf Glucosemedium ist für beide Stämme mit ca. 1.3 h gleich.

	Glucose Medium	Glycerin Medium	Lactat Medium
WT	1,31 ± 0,06	10,2h ± 1,03	9,4h ± 0,31
$\Delta aif1$	1,29 ± 0,01	23,2h ± 2,6	10,9h ± 0,28

Tabelle 5: Generationszeiten von Wildtyp und $\Delta aif1$.

Generationszeiten von Wildtyp und $\Delta aif1$ auf verschiedenen fermentierbaren und nicht fermentierbaren Medien in Stunden. Die Fehlerwerte beziehen sich auf den Standardfehler.

Als nächstes wurde getestet, ob das verlangsamte Wachstum auf eine erhöhte Zelltodrate zurückzuführen ist. Hierzu wurden die Zellzahlen der $aif1\Delta$ Nullmutante und des isogenen Wildtyps bestimmt und eine definierte Zellzahl auf verschiedene nicht fermentierbare Medien plattiert.

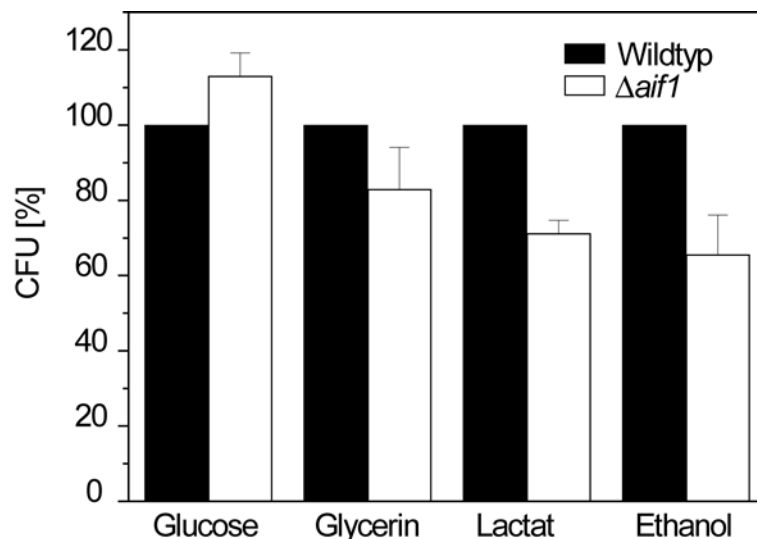


Abbildung 33: Die Überlebensrate des $\Delta aif1$ Stammes auf nicht fermentierbaren Medien ist verringert.

$\Delta aif1$ und Wildtyp wurden von einer 4°C gelagerten Platte gepickt und in Wasser resuspendiert. Es wurden jeweils 1000 Zellen auf 2 % Glucose, 2 % Glycerin, 2 % Lactat und 3 % Ethanol ausplattiert. Die CFU wurde nach 2 d (Glucose Medium) bzw. 5 d (nicht fermentierbare Medien) ermittelt. Die CFU Zahl des Wildtyps wurde zur Normierung auf 100 % gesetzt.

Das Überleben des $\Delta aif1$ Stammes ist im Vergleich zum Wildtyp bei einer Plattierung auf nicht fermentierbaren Medien verringert (Abbildung 33).

Das schlechtere Wachstum des $\Delta aif1$ Stammes auf nichtfermentierbaren Medien ist also zumindest zum Teil auf eine höhere Sterberate zurückzuführen.

Wären AIF und Aif1p wirklich NADH Peroxidasen, so würde das für die $\Delta aif1$ Deletionsstämme folgendes bedeuten: Bei der Atmung und unter oxidativem Stress kann NADH/NADPH nicht ausreichend oxidiert werden. Andere Reduktionsäquivalente werden zur Reduktion von Sauerstoffradikalen verbraucht, was zu einer Verringerung oder einem vollständigen Verbrauch von reduziertem Glutathion (GSH) führt. Als Folge steht Glutathion nicht mehr für andere Prozesse zur Verfügung.

Um zu testen, ob die Gabe von reduziertem Glutathion das Überleben des $\Delta aif1$ Stammes auf nicht fermentierbaren Medien erhöhen kann, wurden je 1000 Wildtyp und $\Delta aif1$ Hefezellen auf Glucose, Glycerin, Lactat und Ethanol Platten mit und ohne 1 mM GSH ausgestrichen.

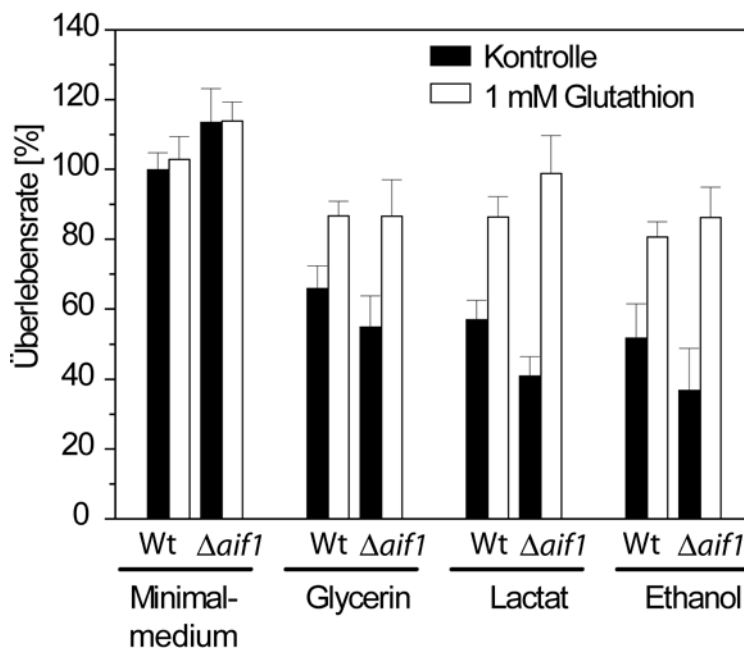


Abbildung 34: Reduziertes GSH erhöht die Überlebensrate des $\Delta aif1$ Stammes auf nicht fermentierbaren Medien.

$\Delta aif1$ und Wildtyp wurden von einer bei 4°C gelagerten Platte gepickt und in Wasser resuspenziert. Es wurden jeweils 1000 Zellen auf 2 % Glucose, 2 % Glycerin, 2 % Lactat und 3 % Ethanol (jeweils mit und ohne 1 mM Glutathion versetzt) ausplattiert. Die CFU wurde nach 2 d (Glucose Medium) bzw. 5 d (nicht fermentierbare Medien) ermittelt.

Wie in Abbildung 34 zu erkennen, führt die Zugabe von 1 mM Glutathion bei den Zellen, die auf Glycerin, Lactat oder Ethanol ausplattiert wurden, zu einer erheblichen Steigerung des Überlebens. Vergleicht man den

überlebensfördernden Effekt von GSH auf die beiden Stämme, so zeigt sich, dass GSH bei fehlendem Aif1p einen stärkeren Effekt zeigt als bei dem isogenen Wildtyp.

Um den rettenden Effekt von GSH auf den Wildtyp und die Disruptionsmutante besser vergleichen zu können, wurde die prozentuale Steigerung der Überlebensrate durch GSH Zugabe errechnet und in der Abbildung 35 graphisch dargestellt.

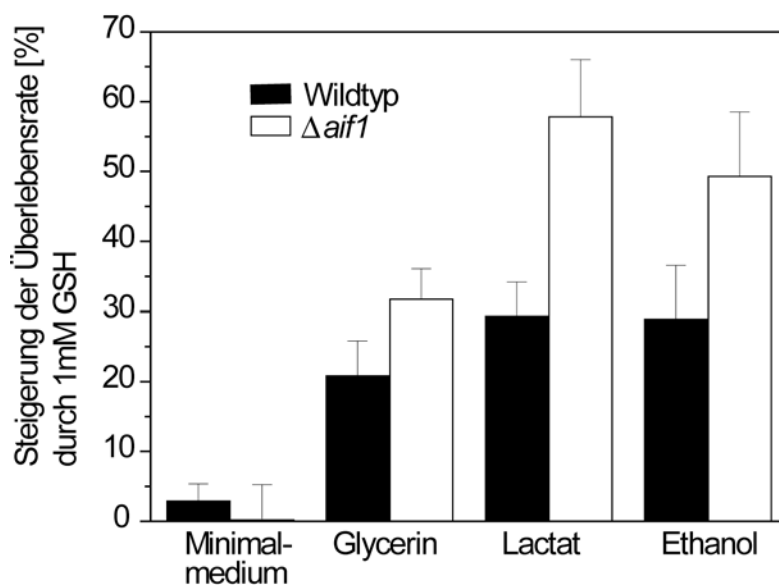


Abbildung 35: Prozentuale Steigerung des Überlebens hervorgerufen durch 1 mM GSH.

Aus den Ergebnisse der Abbildung 34 wurde die prozentuale Steigerung der Überlebensrate durch GSH Zugabe errechnet.

Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Zugabe von GSH bei dem $\Delta aif1$ Stamm einen größeren Effekt hat als beim isogenen Wildtyp. GSH führt im Wildtyp zu einer Überlebenssteigerung von durchschnittlich 27 %. Hingegen zeigt die $\Delta aif1$ Nullmutante einen Anstieg auf durchschnittlich 46 %.

Der Nachteil, den der $\Delta aif1$ Stamm auf nicht fermentierbaren Medien zeigt, lässt sich durch die Zugabe von GSH fast vollständig beseitigen. Eine Beteiligung von Aif1p bei der Reduktion von Substraten scheint daher wahrscheinlich.

3.1.11 Diskussion

Die oben genannten Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei Aif1p um ein AIF Homolog in *S. cerevisiae* handelt.

Der ORF Ynr074c weist eine 22 prozentige Identität und 41 prozentige Ähnlichkeit zu dem humanen AIF auf, wobei die Oxidoreduktasedomäne am höchsten konserviert ist. In der Proteinsequenz von Aif1p ist durch herkömmliche Vorhersagen der Lokalisierung, basierend auf der Suche nach Lokalisationssequenzen, keine mitochondriale oder nukleäre Lokalisation zu erwarten. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit durch verschiedene Experimente die mitochondriale Lokalisation von Aif1p in gesunden Zellen nachgewiesen werden: zum einen durch die Überlagerung des GFP markiertem Aif1p mit dem mitochondrialen DsRed Marker (Abbildung 8), zum anderen war Aif1p nach der Zellfraktion in der mitochondrialen Fraktion angereichert (Abbildung 13). Dieses Ergebnis konnte durch Importstudien von radioaktiv markiertem Protein in isolierte Mitochondrien biochemisch bestätigt werden. In diesen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass Aif1p in das Mitochondrium transportiert und eine kurze Peptidsequenz von dem Aif1p Vorläuferprotein abgeschnitten wird. Das Vorläufer Aif1p war nur in Mitochondrien ohne Protease K Verdau vorhanden. Nach einem Protease K Verdau von ganzen Mitochondrien existierte nur noch das reife geschnittene Aif1p ohne die putative MLS. Dies beweist, dass das reife Aif1p sich in den Mitochondrien befindet. Die Bande des reifen Aif1p nahm in den Mitoplasten nach Protease K Verdau weiter ab, was darauf hindeutet, dass sich das reife Aif1p im Intermembranraum befindet. Der nicht vollständige Verdau des Proteins lässt vermuten, dass das Protein stark mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert ist. Aif1p besitzt eine vorhergesagte Transmembrandomäne nahe des N-Terminus, so dass auch eine Lokalisation des Proteins in der inneren Mitochondrienmembran möglich wäre (Abbildung 36).

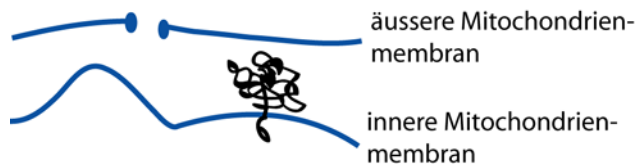


Abbildung 36: Modell der Lokalisation von Aif1p im Mitochondrium.

Aif1p besitzt nahe des N-Terminus eine putative Transmembrandomäne; zusammen mit den hier gezeigten Ergebnissen lässt sich diese Lokalisation vorhersagen.

Der Import von Aif1p war weiterhin abhängig von der Importmaschinerie des Mitochondriums, was für einen aktiven Transport von Aif1p spricht.

Genau wie das Säuger AIF transloziert das Hefe Aif1p nach einem proapoptotischen Stimulus in den Kern, wie die Überlagerung des Aif1p-yEGFP Konstruktes beweist (Abbildung 12). Auch in der Zellfraktionierung war eine Anreicherung von Aif1p in der Kernfraktion nachweisbar (Abbildung 13). Interessanterweise war Aif1p nach einer Zellfraktionierung von nichtapoptotischen Zellen sowohl in der mitochondrialen als auch in der nukleären Fraktion angereichert, im Gegensatz zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, in denen Aif1p nur im Mitochondrium nachzuweisen war. Dies ließ uns vermuten, dass die Sphäroplastierung für die Zellen einen proapoptotischen Reiz darstellt und Aif1p in den Kern transloziert. Diese Vermutung konnte durch eine Überlagerung des Aif1p-GFP Konstruktes mit dem DsRed Kernmarker in sphäroplastierten Zellen bestätigt werden.

Die Überexpression von Aif1p führt zu einem apoptotischen Sterben der Hefezellen. Es kommt zu einer Verringerung der Überlebenszahlen in den Überlebensplattierungen (Abbildung 16). Die Zellen zeigen typische Apoptosemarker wie z.B. DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation und eine erhöhte Caspaseaktivität (Abbildung 17 und Abbildung 28). Durch eine Disruption des AIF1 Gens wird ein durch Wasserstoffperoxid ausgelöster apoptotischer Zelltod (Abbildung 15) vermindert. Ebenso verzögert sich das Sterben im chronologischem Altern bei dem $\Delta aif1$ Disruptionsstamm signifikant (Abbildung 30). Diese Ergebnisse zeigen, dass Aif1p eine zentrale Rolle in der Hefeapoptose einnimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten auch erste Mechanismen der Aif1p vermittelten Apoptose erforscht werden. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Aif1p eine DNase Aktivität besitzt: Rekombinant aufgereinigtes Aif1p degradiert sowohl die DNA in aufgereinigten Hefekernen als auch nackte Plasmid-DNA. Die DNase Aktivität ist abhängig von zweiwertigen Kationen und erfordert eine korrekte Proteinfaltung, denn die Zerstörung der Proteinkonformation durch Hitze verhinderte die DNase Aktivität von Aif1p (Abbildung 21). Allerdings wird zum Schneiden von Plasmid-DNA eine relativ hohe Aif1p Konzentration benötigt, was darauf hindeutet, dass Aif1p bei der Degradation von DNA *in vivo* in Kooperation mit anderen Proteinen arbeitet.

Candé et al. (2004) zeigten, dass das murine AIF mit Cyclophilin A interagiert und die beiden Enzyme bei der Degradation von DNA zusammenarbeiten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aif1p vermittelte Apoptose in Hefe von Cyclophilin A abhängig ist. Die Disruption von Cyclophilin A (CPR1) verhindert den durch Aif1p Überexpression induzierten Zelltod. Dies war spezifisch für den $\Delta cpr1$ Stamm, denn die Deletion des Cyclophilin B Homologs (CPR2) verhindert diesen Zelltod nicht. Der apoptogene Effekt von Cpr1p ist nicht von seiner Peptidylprolyl *cis-trans* Isomerase Aktivität abhängig, da Cyclosporin A (CsA), das die Aktivität dieser Isomerase inhibiert, keinen positiven Einfluss auf die Überlebensrate hatte (siehe auch 3.1.7).

Die Aif1p vermittelte Apoptose in *S. cerevisiae* ist zum größten Teil caspaseabhängig. Dies beweisen die Ergebnisse der Überlebensplattierung des Aif1p Überexprimierers im Caspase *knock out* Stammhintergrund. Hier schützt die Deletion des Caspasegens vor einer Aif1p vermittelten Apoptose (Abbildung 27). Ebenso lässt sich eine erhöhte Caspaseaktivität bei einer Überexpression von Aif1p in den Zellen nachweisen (Abbildung 28). Diese Ergebnisse legen es nahe, Aif1p als ein Aktivatorenzym der Caspase einzuordnen. Somit konnte für das AIF Homolog in Hefe, Aif1p, ein Aspekt aufgeklärt werden, der für das Säuger AIF noch sehr umstritten ist.

Die Funktion von AIF in Säugerzellen im Mitochondrium war bis vor kurzen noch nicht geklärt. In Zusammenarbeit mit G. Kroemer konnte im Rahmen dieser Arbeit die apoptoseunabhängige Funktion von Aif1p in *S. cerevisiae* gefunden werden (Vahsen et al., 2004). Der $\Delta aif1$ Disruptionsstamm zeigt ein eingeschränktes Wachstum auf nichtfermentierbaren Medien, dies ist ein deutlicher Hinweis auf

eine eingeschränkte Atmungsfähigkeit der Zellen. Dieser Wachstumsdefekt konnte durch die gleichzeitige Gabe von GSH deutlich aufgehoben werden. Eine Beteiligung von Aif1p bei der Reduktion von Substraten scheint daher sehr wahrscheinlich.

Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei Aif1 um eine NADH Peroxidase handelt. Dies bedeutet für die $\Delta aif1$ Mutantenstämme, dass bei der Atmung und bei oxidativem Stress NADH/NADPH nicht ausreichend oxidiert und somit andere Reduktionsäquivalente zur Reduktion von Sauerstoffradikalen verbraucht werden. Es kommt zu einer vollständigen Oxidation von vorhandenem Glutathion (GSH) zum Disulfid. Dies erklärt den rettenden Effekt, den reduziertes GSH auf das Überleben des $\Delta aif1$ Deletionsstamm auf nichtfermentierbaren Medien hat.

3.2 Yca1p

3.2.1 Yca1p, eine Metacaspase in *S. cerevisiae*

Die Hefecaspase Yca1p ist ein zentraler Regulator der Apoptose in *S. cerevisiae* (Madeo et al., 2002). Säugercaspasen werden als Zymogene synthetisiert und liegen im Cytosol in einer inaktiven Form vor. Diese Zymogene bestehen aus drei Domänen, einer N-terminalen Prodomäne, und der p20 und p10 Domäne. Aktive Säugercaspasen bestehen aus einem Heterotetramer mit jeweils zwei p20/p10 Domänen und zwei aktiven Zentren. Die Aktivierung erfolgt durch eine proteolytische Spaltung nach einem Aspartatrest zwischen der p20 und der p10 Domäne (siehe auch Abbildung 2).

Um die Expression und potentielle Prozessierung von chromosomal markiertem Yca1p unter apoptotischen Bedingungen zu untersuchen, wurde die Metacaspase chromosomal mit einem HA-Epitop markiert. Der daraus resultierende Stamm (FMY 20) besitzt ein HA-Epitop am C-Terminus von Yca1p, wobei der Promotor des YCA1 Gens unverändert bleibt. Die Zellen wurden bei geringer Zelldichte mit 0,4 mM H₂O₂ belastet, um einen apoptotischen Zelltod zu induzieren. Mit dem anschließend gewonnenen Rohextrakt wurde ein Immunoblot durchgeführt.

In der Abbildung 37 auf der rechten Seite ist gut zu erkennen, dass die Bande des C-terminal markierten Caspasekonstruktes (Yca1p-HA) nach einer Induktion der Apoptose durch H₂O₂ im Immunoblot nicht mehr zu erkennen ist. Dies lässt auf eine Prozessierung der Caspase am C-Terminus schließen. Das geschnittene, Epitop markierte, C-terminale Ende des Proteins ließ sich im Immunoblot allerdings nicht mehr nachweisen. Dies könnte an dem geringen Molekulargewicht kombiniert mit einer geringen Expression liegen. Zur Kontrolle der Proteinmengen wurden die Antikörper vom Blot entfernt und dieser erneut mit Antikörpern gegen die alkalische Phosphatase dekoriert. Die Proteinmenge war in allen Spuren des Immunoblots vergleichbar.

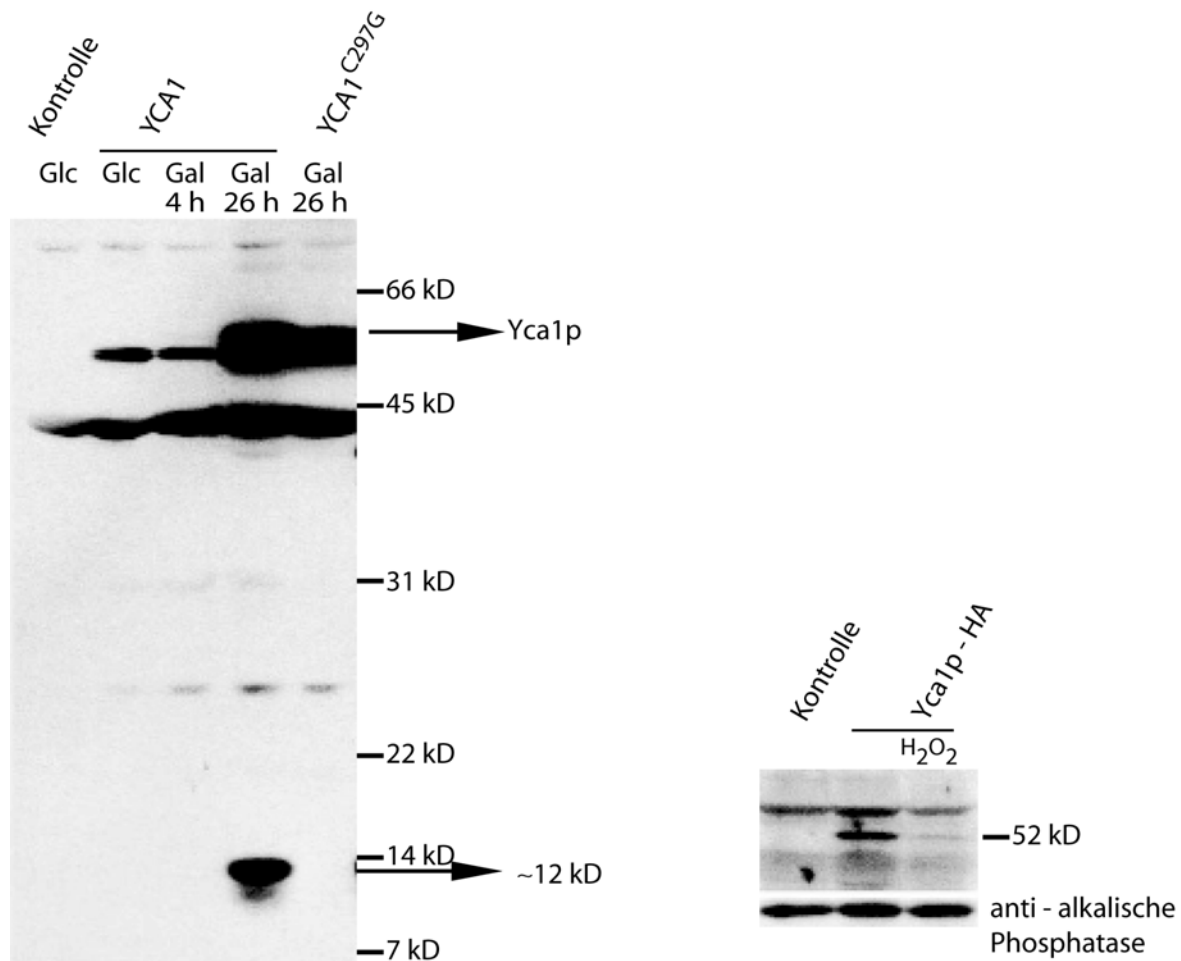


Abbildung 37: Yca1p wird als Zymogen gebildet, die aktive Form von Yca1p wird durch Prozessierung gebildet.

Die Stämme FMY 17 (Yca1p-FLAG) und FMY 18 (Yca1^{C297G}-FLAG) wurden auf glucose- bzw. galactosehaltigem Selektionsmedium kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und Rohextrakt gewonnen. Der Immunoblot wurde mit FLAG Antikörpern als ersten Antikörper dekoriert. Der Stamm FMY 20 (Yca1p-HA) wurde bei einer geringen Zelldichte mit H₂O₂ gestresst, 4 h nach der H₂O₂ Zugabe wurden die Zellen geerntet und mit dem anschließend gewonnen Rohextrakt wurde ein Immunoblot durchgeführt. Dieser wurde mit HA Antikörpern dekoriert.

Des Weiteren wurden Expressionsstudien mit FLAG-Epitop markierten Yca1p durchgeführt. Hierzu wurden Überexpressionskonstrukte hergestellt, bei denen das Wildtyp Yca1p oder eine im katalytischen Zentrum mutierte Form c-terminal mit einem FLAG-Epitop markiert ist. Die Zellen wurden zur Induktion der Proteinexpression auf galactosehaltiges Medium überführt. Mit den zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Rohextrakten wurde ein Immunoblot durchgeführt.

Auf der linken Seite der Abbildung 37 ist der Immunoblot des FLAG-Epitop markierten Yca1p Konstrukts abgebildet. Dort ist zu erkennen, dass Yca1p auch ohne Induktion des GAL10 Promotors in geringen Mengen exprimiert wird. Die Proteinmenge von Yca1p ohne Induktion und 4 h nach Induktion des Promotors ist identisch. 26 h nach der Induktion des Promotors kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Yca1p Proteinmenge in den Zellen. Zu diesem Zeitpunkt kommt es zu der Generierung eines C-terminalen 12 kDa großen Fragments, wobei die Mutation des katalytischen Zentrums diese Prozessierung verhindert.

3.2.2 Diskussion

Die hier beschriebenen Ergebnisse beweisen eine Säuger-ähnliche Prozessierung der *S. cerevisiae* Caspase Yca1p. Durch einen proapoptotischen Stimulus, wie z.B. geringe Dosen H₂O₂, wird am C-terminalen Ende des Proteins eine ca. 12 kDa große Domäne vom Protein entfernt. Ebenso führt eine einfache Überexpression der Caspase zu einer Prozessierung am C-Terminus. Die Prozessierung wird durch die Mutation im katalytischen Zentrum der Caspase verhindert. Diese Prozessierung scheint für die Aktivität der Caspase notwendig zu sein, da die Zellen nur bei den Szenarien sterben, in denen auch im Immunoblot eine Prozessierung nachzuweisen ist (siehe auch: Madeo et al., 2002): Weder bei einer vierstündigen Expression der Caspase, noch bei der Expression der im katalytischen Zentrum mutierten Form, kommt es zu einem apoptotischen Zelltod. Somit ähnelt das C-terminale Ende der Metacaspase Yca1p der p10 Domäne der Säuger Caspasen. Des Weiteren scheint sich die Caspase autokatalytisch zu aktivieren, da eine Anreicherung von Yca1p in der Zelle ausreicht, um eine Prozessierung in Gang zu setzen. Hier kommt es wahrscheinlich aufgrund der räumlichen Nähe zu einer autokatalytischen Aktivierung.

Der Aktivierungsmechanismus von Yca1p scheint also am ehesten dem der Caspase 8 zu ähneln. Auch hier führt die räumliche Nähe von vielen Procaspasen 8 an dem Todesrezeptor zu einer Prozessierung und autokatalytischen Aktivierung.

3.3 Nma111p

3.3.1 Die Disruption von YCA1p rettet vor einem Nma111p vermittelten Zelltod

Neben AIF ist OMI/HtrA2 ein weiteres proapoptotisches Protein, das im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert ist.

Fahrenkrog et al. beschrieben kürzlich ein Omi/HtrA2 Ortholog in *S. cerevisiae* (2004): Nma111p. Die proapoptotische Funktion von Nma111p ist von dessen Serin-Protease Aktivität abhängig. Eine Deletion von NMA111 erhöht die Hitzetoleranz von Hefezellen, und schützt vor einer durch H₂O₂ induzierten Apoptose.

In Säugerzellen kann die Aktivierung der Caspase 3 durch IAPs (*Inhibitor of Apoptosis*) blockiert werden, welche wiederum von den proapoptischen mitochondrialen Smac/DIABLO (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000) oder Omi/HtrA2 Proteinen antagonisiert werden (Hegde et al., 2002). Omi/HtrA2 sind also proapoptotische Proteine, die die Aktivierung der Caspase durch ihre Bindung an die IAPs modulieren.

Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob Nma111p, das Omi/HtrA2 Hefehomolog, abhängig von der Hefecaspase Yca1p tötet. Hierzu wurde eine Überexpressionsstudie von Nma111p in einem $\Delta yca1$ Stamm und dem korrespondierenden Wildtyp durchgeführt.

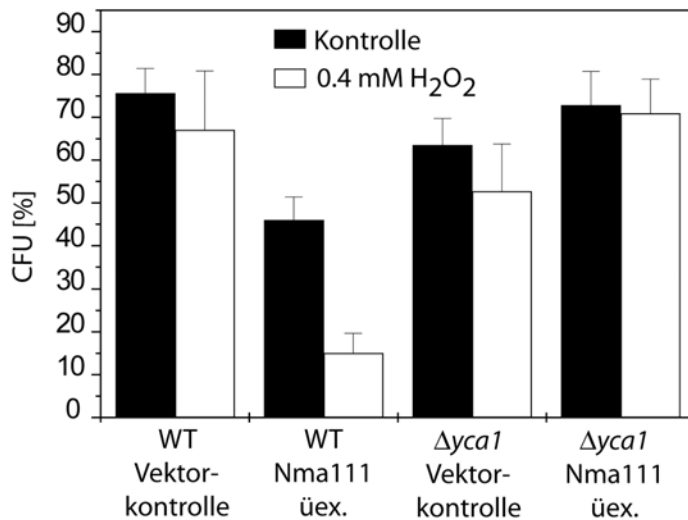


Abbildung 38: Überlebensplattierung des Nma111p Überexprimierers im Wildtyp und im $\Delta yca1$.

Das Überleben von Nma111p Überexprimierer und der Vektorkontrolle im Wildtyp und im $\Delta yca1$ nach 20 h Induktion der Proteinexpression auf Galactose mit und ohne H₂O₂ wurde durch Plattierung bestimmt.

Wie in Abbildung 38 zu erkennen, führt die Überexpression von Nma111p zu einer Verringerung der Überlebenszahlen. Schon ohne einen weiteren Stimulus überleben bei Nma111p Überexpression nur noch 45 % der Zellen im Vergleich zu 75 % in der Vektorkontrolle. Setzt man als zusätzlichen proapoptischen Stimulus 0,4 mM H₂O₂ zu, so sinkt der Anteil lebensfähiger Zelle auf 15 % (siehe auch: Fahrenkrog et al., 2004).

Eine Überexpression von Nma111p im $\Delta yca1$ hingegen hat mit und ohne H₂O₂ keinen Einfluss auf die Überlebensrate. In diesen Stämmen ist die CFU mit denen der Vektorkontrolle vergleichbar. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde von den Stämmen eine TUNEL-Färbung durchgeführt. Die Stämme wurden wie beschrieben kultiviert und mit H₂O₂ gestresst, nach 20 h wurde ein Aliquot von Zellen entnommen, die Zellen fixiert und mit dem TUNEL-Reagenz gefärbt.

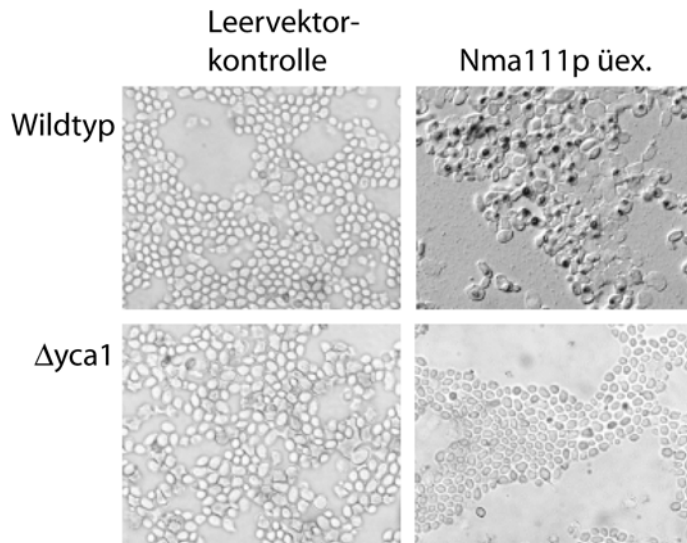


Abbildung 39: Deletion von YCA1 verhindert die Fragmentierung der DNA nach Nma111p Überexpression.

TUNEL-Färbung der Vektorkontrollen und der Nma111p Überexprimierer im Wildtyp und $\Delta yca1$ Stammhintergrund. Die Zellen wurden zur Induktion der Proteinexpression bei $OD_{600} = 0,3$ auf galactosehaltiges Selektionsmedium umgesetzt und mit $0,4 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ belastet. Nach 20 h wurden Zellen entnommen, fixiert und im TUNEL-Test gefärbt. Zellen mit DNA-Strangbrüchen erscheinen in der TUNEL-Färbung schwarz. Die Präparate wurden im DIC bei 40facher Vergrößerung untersucht, gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt.

Die TUNEL-Färbung zeigt, dass die Überexpression von Nma111p im Wildtyp zu einem apoptotischen Phänotyp führt. Es sind massive DNA-Strangbrüche zu erkennen. Die Deletion der Hefecaspase YCA1 verhindert die durch Nma111p Überexpression ausgelöste DNA-Fragmentierung. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der Überlebensplattierungen.

3.3.2 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass die Nma111p vermittelte Apoptose in *S. cerevisiae* von Yca1p abhängig ist. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Nma111p die Aktivierung von Yca1p ebenso moduliert wie Omi/HtrA2 die Aktivierung der Säugercaspasen. Um dies zu ermöglichen, müsste Nma111p vorhandene IAPs in der Zelle antagonisieren, welche wiederum die Caspase inhibieren. Ein IAP wurde in Hefe bereits identifiziert: Bir1p (Li et al., 2000; Uren et al., 1999; Yoon und Carbon, 1999). Dieses Protein besitzt die für IAPs typische Bir

Domäne (*baculoviral inhibitor of apoptosis repeat*). Bisher wurde Bir1p eine Funktion im Zellzyklus zugeschrieben (Li et al., 2000; Uren et al., 1999; Yoon und Carbon, 1999), aber eine mögliche Funktion von Bir1p im apoptotischen Geschehen wurde bisher noch nicht untersucht. Nun wird die Rolle von Bir1p in der Hefeapoptose in Zusammenarbeit mit Birthe Fahrenkrog (Basel) genauer charakterisiert (Veröffentlichung in Vorbereitung). Im Rahmen dieser Experimente ist es gelungen, das BIR1-Gen zu deletieren, obwohl es bisher als lebensnotwendig galt (Uren et al., 1999). Der resultierende Stamm kann nun in weiteren Studien auf sein verändertes Verhalten nach apoptotischen Stimuli untersucht werden.

3.4 Cdc48p

3.4.1 Proteom Untersuchungen des apoptotischen Cdc48p^{S565G} Hefestamms identifizieren Cdc48p als weiteren Regulator der mitochondrialen Apoptose in Hefe

Eine Mutation in der zweiten ATPase Domäne des AAA-Proteins Cdc48p (Cdc48p^{S565G}) resultiert in einen Hefestamm, der durch geringe proapoptotische Stimuli, wie z.B. Hitzestress oder geringe Dosen Wasserstoffperoxid apoptotisch stirbt. Die Zellen zeigen die typischen apoptotischen morphologischen Marker (Madeo et al., 1997). Ähnliche Mutationen in dem Cdc48p homologen VCP führen auch in Säugerzellen zu einer erhöhten Apoptoserate. Diese Mutationen haben eine bedeutende medizinische Relevanz bei neurodegenerativen Erkrankungen. Allerdings ist der Mechanismus, der zur Apoptose und somit zur Manifestation der verschiedenen Krankheiten führt, noch völlig unbekannt.

In Zusammenarbeit mit Ralf Braun und Hans Zischka (München) wurde zur Identifikation der Mechanismen und weiterer beteiligter Stoffwechselwege eine 2 Dimensions-Gelelektrophorese (2-D-Gelelektrophorese) des apoptotischen Cdc48p^{S565G} Stamms im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt.

Wildtypzellen und Cdc48p^{S565G} Zellen wurden zur Induktion des apoptotischen Phänotyps der Mutante folgendermaßen behandelt: Die Proteinexpression von Cdc48p wurde durch das Umsetzen von galactosehaltigem Medium auf glucosehaltiges Medium gestoppt. Nach 20 Stunden wurden die Zellen einem 4 h Hitzestress unterzogen. Dieses Verfahren resultiert in ca. 80 % TUNEL positiven Zellen im Cdc48p^{S565G} Stamm. Anschließend wurde der Gesamtzellextrakt gewonnen, oder die Zellen in Mitochondrien und Cytosol aufgetrennt. Bei einem direkten Vergleich des Cdc48p^{S565G} Stammes mit dem Wildtyp konnte auf der Ebene des Gesamtzellextrakts und des Cytosols in der 2-D-Gelelektrophorese kein Unterschied festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ergab ein Vergleich der Mitochondrienextrakte von Cdc48p^{S565G} und dem Wildtyp einen massiven Unterschied (Abbildung 40) (Braun et al., Veröffentlichung eingereicht).

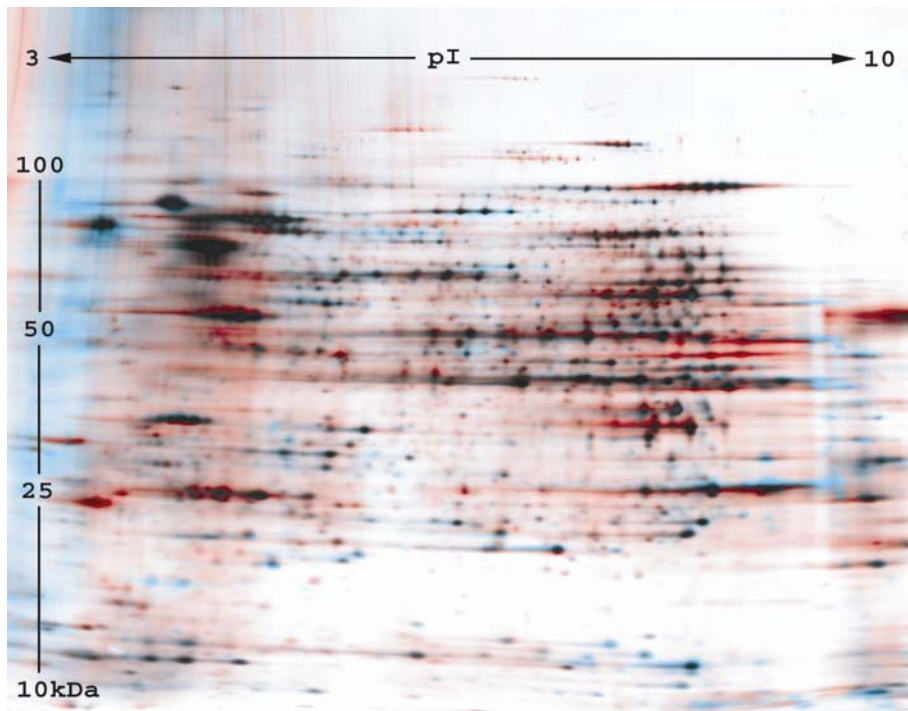


Abbildung 40: Ein Vergleich der Mitochondrienextrakte von der Cdc48p^{S565G} Mutante und vom Wildtyp resultiert in einem massiven Unterschied in der Proteinzusammensetzung in der 2-D-Gelelektrophorese.

Das gezeigte Image wurde mit dem Programm Proteom Weaver™ Image Analysis (Definiens AG, München, Deutschland) erstellt. Der Wildtyp ist in blau dargestellt, die Cdc48p^{S565G} Mutante in rot.

2,5 % oder 28 verschiedene Proteine waren in dem Cdc48p^{S565G} dereguliert (Braun et al., Veröffentlichung eingereicht). Die Identität der im 2-D-Gel deregulierten Proteine wurden mittels MALDI-TOF Massenspektroskopie in einem Maldi-TOF Reflectron (Waters, Eschborn, Deutschland) und einer nachfolgenden Analyse mit dem ProteinLynx Globalserver 1.1 (PLGS, Waters) aufgeklärt, wobei zehn der deregulierten Proteine als mitochondriale Proteine identifiziert werden konnten. Dieses Ergebnis zeigt, wie wichtig mitochondriale Prozesse für die Cdc48^{S565G} vermittelte Apoptose sind. Zu den deregulierten mitochondrialen Proteinen gehören unter anderem die manganabhängige Superoxiddismutase 2 (Sod2p) und besonders Sauerstoffstress-sensitive [4FE-4S]-Cluster Proteine, wie die Aconitase (Aco1p), eine putative Aconitase (Yil200cp) und die Homoaconitase (Lys4p). Diese Proteine waren in der Cdc48p Mutante herunterreguliert.

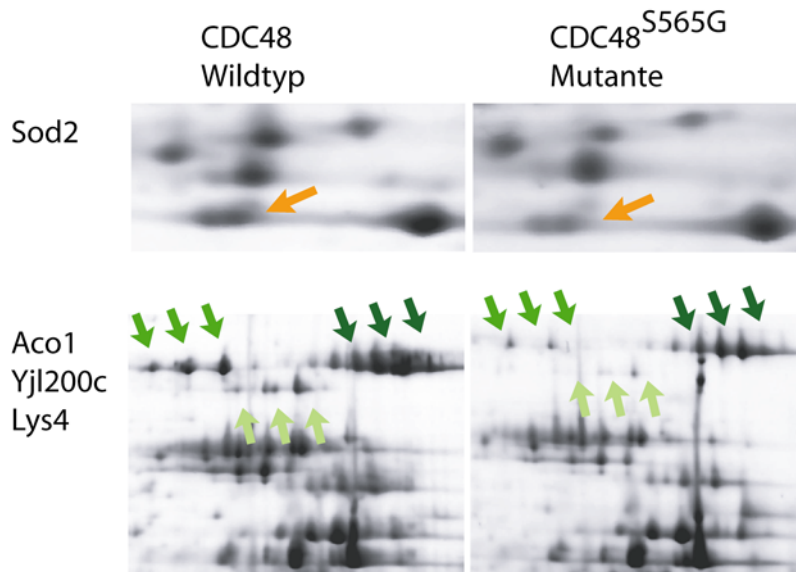


Abbildung 41: Mitochondriale Proteine sind in der Cdc48p^{S565G} Mutante dereguliert.

Gezeigt sind einzelne ausgewählte Proteinspots. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die 2-D-Gelelektrophoreseanalyse des Wildtyps zu sehen, auf der linken Seite die des Cdc48p^{S565G} Stamms. Oben: Die Abnahme der Sod2p Konzentration. Unten: Die Abnahme von drei verschiedenen [4FE-4S] Proteinen, Punkte der Aconitase (Aco1p) sind mit dunkelgrünen, die der putativen Aconitase (Yjl200cp) mit mittelgrünen und die der Homoaconitase (Lys4p) mit hellgrünen Pfeilen gekennzeichnet.

Neben der Deregulation von mitochondrialen Proteinen war eine Akkumulation von ER-NE (*endoplasmatic reticulum-nuclear envelopment*) assoziierten Proteinen in der 2-D-Gelelektrophorese der apoptotischen Cdc48^{S565G} Mutante feststellbar. Hierzu gehörten z.B. Sec72p, Sec53p und Hsp27 (Braun et al., Veröffentlichung eingereicht) und Untereinheiten des Proteasoms wie z.B. Pre3p und Pre8.

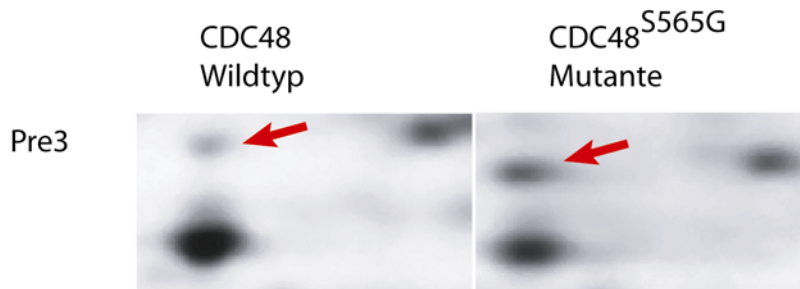


Abbildung 42: Pre3p, ein Protein des Proteasoms, ist in der Cdc48p^{S565G} Mutante hochreguliert.

Gezeigt ist ein einzelner ausgewählter Proteinspot. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die 2-D-Gelelektrophoreseanalyse des Wildtyps zu sehen, auf der linken Seite die des Cdc48p^{S565G} Stamms.

3.4.2 Transkriptom Analyse des apoptotischen Cdc48p^{S565G} Hefestamms

Zusätzlich zu den 2-D-Gelelektrophorese Untersuchungen des proapoptotischen Cdc48p^{S565G} Stammes wurde in Zusammenarbeit mit Peter Laun und Michael Breitenbach eine mRNA Array Chip Analyse des Cdc48p Mutantenstammes gegen den Wildtyp durchgeführt. Die Bedingungen ähnelten denen bei der 2-D-Gelelektrophorese, allerdings wurden die Zellen schon 13 h nach dem Wechsel auf glucosehaltiges Medium einem 1 h Hitzestress ausgesetzt.

Bei dieser Analyse wurden insgesamt 182 verschiedene Gene identifiziert, die in der Cdc48p Mutante im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 2 stärker transkribiert wurden. Diese Gene können mit Hilfe des *Go term finder* Programms der *Saccharomyces Genome Database* (<http://www.yeastgenome.org/>) in verschiedene funktionelle Gruppen unterteilt werden.

Für einen allgemeinen Überblick sind in der Tabelle 6 die molekularen Prozesse aufgelistet, die in der Cdc48p Mutante nach einer Induktion der Apoptose signifikant hochreguliert werden.

Biologische Prozesse	Häufigkeit der 182 analysierten Gene, in %	Anzahl aller Gene, in % (von 7286 annotierten Genen)	Wahrscheinlichkeit
Antwort auf abiotische Stimuli	7,6 %	2,8 %	0,00077
Antwort auf externe Stimuli	7,6 %	3,0 %	0,00149
Antwort auf Temperatur	2,1 %	0,2 %	0,00170
Antwort auf Stimuli	13,1 %	6,9 %	0,00203
Antwort auf Stress	9,3 %	5,1 %	0,01301
Antwort auf Hitze	1,6 %	0,2 %	0,00920
Regulation der Transkription vom Pol II Promoter durch Pheromon	1,0 %	0,0 %	0,00714
Protein Polyubiquitinylierung	1,6 %	0,2 %	0,01239
Protein Monoubiquitinylierung	1,6 %	0,3 %	0,02046
Protein Ubiquitinylierung	1,6 %	0,3 %	0,03082

Tabelle 6: Analyse der 182 Gene, die in der Cdc48 Mutante mindestens um den Faktor zwei hochreguliert sind.

Insgesamt 182 Gene wurden im *Go term finder* der *Saccharomyces Genome Database* aufgrund ihrer Beteiligung an verschiedenen biologischen Prozessen in der Zelle in verschiedene Kategorien eingeteilt. In der zweiten Spalte ist der Anteil der 182 verschiedenen Gene, die dem jeweiligen Prozess zuzuordnen sind in % aufgezeigt. In der dritten Spalte ist die Gesamtmenge an Genen, die dem Prozess in der Zelle zugeordnet sind aufgelistet. Aus diesen beiden Werten ergibt sich die Wahrscheinlichkeit, mit der diese Anhäufung von Genen innerhalb eines Prozesses auf einem Zufall beruht.

In der Tabelle 6 ist eindeutig zu erkennen, dass die Mutation im Cdc48 Stamm zu einer erhöhten Stressantwort in der Zelle führt. Es zeigt sich beispielsweise, dass von den 182 hochregulierten Genen 2,1 % die Zellantwort auf Temperaturstress vermitteln, obwohl von den 7286 annotierten Genen der Hefe nur 0,2 % zu dieser Gruppe gehören. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich hierbei um einen Zufall handelt, liegt bei $P = 0,0017$. Außerdem kommt es in der Transkriptom Analyse, wie im 2-D-Gel, zu einer Anhäufung von Proteinen, die am Abbau von Proteinen durch das Ubiquitin-Proteasom System beteiligt sind. Diese deregulierten Proteine sind in der Tabelle 7 noch einmal separat aufgelistet.

Transkription im Vergleich zum WT	Biologischer Prozess	Funktion	Name
1,82	Ubiquitin-abhängige Protein Degradation	Multikatalytische Endopeptidase	PRE3
1,88	Ubiquitin-abhängige Protein Degradation	Ubiquitin-Protein Ligase	APC5
1,93	Ubiquitin abhängige Protein Degradation	Multikatalytische Endopeptidase	RPN8
2,18	Polyubiquitylierung	Ubiquitin-Protein Ligase	UBR2
2,32	Stress Antwort	Protein Degradation Tagging	UBI4
2,52	Ubiquitin-abhängige Protein Degradation	Ubiquitin-Protein Ligase	CDC27
3,17	Polyubiquitylierung	unbekannt	BUL2
4,55	Ubiquitin-abhängige Protein Degradation	Multikatalytische Endopeptidase	PRE1

Tabelle 7: Liste von Proteinen, die in der Cdc48 Mutante nach der Induktion einer Apoptose akkumulieren.

Die mRNA von Pre1p, einer Endopeptidase des Proteasoms, gehört mit einer 4,55-fach höheren Transkription zu den am stärksten hochregulierten mRNAs in der Transkriptom Analyse. Ebenso kommt es zu einer Akkumulation von PRE3 mRNA, einer weiteren Endopeptidase des Proteasoms, die auch auf Proteomebene in der Cdc48p Mutante erhöht war (Abbildung 42).

Ein Zusammenhang von proteasomalen Untereinheiten und der Cdc48p^{S565G} vermittelten Apoptose konnte schon früher durch die genetische Letalität von Cdc48p^{S565G}/Pre1-1p und Cdc48p^{S565G}/Pre3-6 Mutanten hergestellt werden (Wissing, 2001), wobei die Doppelmutanten einen erhöhten Level an reaktiven Sauerstoffradikalen und typische Marker der Apoptose wie z.B. DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation aufwiesen.

3.4.3 In der proapoptotischen Cdc48p Mutante kommt es zu einer Verringerung der Sod2p Aktivität

Viele neurodegenerative Erkrankungen gehen mit einer verminderten Detoxifizierungskapazität von Superoxidanionen einher. Weiterhin wurde eine Beteiligung des humanen Homologs von Cdc48p, dem VCP, an der Entstehung von verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen vermutet (Mizuno et al., 2003; Hirabayashi et al., 2001; Kobayashi et al., 2002). Diese beiden Tatsachen, zusammen mit dem verminderten Proteinlevel der Sod2p in der Proteom Analyse der Cdc48 Mutante, legten nahe, die Aktivität der Sod2 in der Cdc48p Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu untersuchen. Die Sod2p Aktivität wurde in einem 6-Hydroxydopamin Aktivitätsassay bestimmt.

Hefestamm	Sod2p Aktivität
Wildtyp	100 %
Cdc48p ^{S565G}	72,23 %

Tabelle 8: Gemessene Sod2p Aktivität im Wildtyp und der Cdc48p^{S565G} Mutante.

Die gemessene Sod2p Aktivität in der Cdc48p^{S565G} Mutante war im Vergleich zum Wildtyp um 30 % vermindert. Diese erniedrigte Sod2p Aktivität könnte in der Cdc48 Mutante zu einer Akkumulation von reaktiven Superoxidradikalen führen. Dies ist konsistent mit früheren Arbeiten, die zeigen, dass eine Akkumulation von Sauerstoffradikalen notwendig für die Cdc48p^{S565G} vermittelte Apoptose ist (Madeo et al., 1999).

Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) werden in aeroben Organismen ständig gebildet. Aus diesem Grund ist die Expressionsstärke der Superoxid abbauenden Proteine sehr hoch, sodass das Gleichgewicht von $[O_2^{\cdot-}]$ sich mit $\sim 10^{-10}$ M (Imlay und Fridovich, 1991) auf einem sehr geringen Level befindet. Eine hohe Expression von Sod2p und somit eine geringe Konzentration von $O_2^{\cdot-}$ ist eine unbedingte Notwendigkeit für das aerobe Leben (McCord et al., 1971). Verschiedenste Proteine werden durch Superoxidanionen oxidiert oder reduziert (Übersichtsartikel: Fridovich, 1995). Besonders anfällig für die Zerstörung der Enzymaktivität sind (De)hydratasen mit einem Eisenschwefel-[Fe4-S4]-Cluster (Fridovich, 1995), da $O_2^{\cdot-}$ das katalytisch wirksame und exponierte Eisenatom im $[4Fe-4S]^{2+}$ Zentrum

oxidiert. Dies resultiert in der Einelektronen-Oxidation des [4Fe-4S] Clusters, der Freisetzung des oxidierten Eisenatoms und der Inaktivierung des Enzyms.

3.4.4 Cdc48^{S565G} induzierte Apoptose führt zu einem erhöhten Level an freien Eisenionen in der Zelle

Die Proteomanalyse des Cdc48^{S565G}_p zeigte eine verminderte Konzentration von drei verschiedenen Eisenschwefel-Proteinen (3.4.1). Dies kann entweder auf eine verringerte Expression oder auf eine verstärkte Inaktivierung mit anschließendem Abbau hindeuten.

Eine Inaktivierung von [4Fe-4S]-Proteinen wie z.B. der Aconitase, Homoaconitase und der putativen Aconitase, kann zu einer erhöhten Konzentration von freien Eisenionen führen. Calcein ist ein Fluoreszenzfarbstoff der in lebende Zellen eindringt. Die Fluoreszenz des Farbstoffs wird vermindert, wenn Calcein an freie Eisenionen bindet (Cabisco et al., 2002). Diese Färbung wurde benutzt, um bei dem Wildtyp und der Cdc48p Mutante die Konzentration an freien Eisenionen zu visualisieren, hierzu wurden die Stämme nach der Induktion der Apoptose 2 h mit Calcein-Acetoxy-methylester inkubiert und die Fluoreszenz unter dem Mikroskop beurteilt.

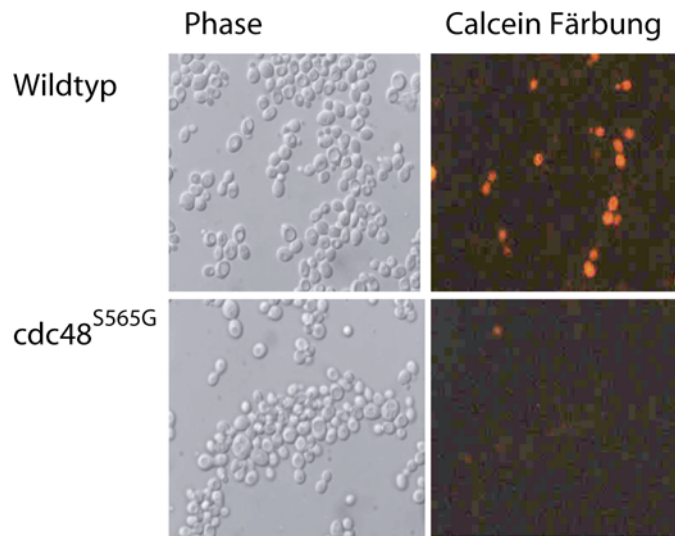


Abbildung 43: *In vivo* fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Wildtyps und der Cdc48p Mutante.

Die Proteinexpression von Cdc48p im Wildtyp und in der Cdc48p Mutante wurde durch das Umsetzen von galactosehaltigem Medium auf glucosehaltiges Medium gestoppt. Nach 20 Stunden wurden die Zellen einem 4 h Hitzestress unterzogen und anschließend 2 h mit Calcein-Acetoxy-methylester inkubiert.

In Abbildung 43 ist zu erkennen, dass die Fluoreszenz in der Cdc48p^{S565G} Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindert ist, und somit die Konzentration an freien Eisenionen in der Cdc48p^{S565G} Mutante größer ist als im Wildtyp. Die Deregulierung der Eisenschwefel-Cluster-Proteine im 2-D-Gel könnte also auf eine Zerstörung dieser zurückzuführen sein, was wiederum zu einer Erhöhung der intrazellulären Eisenionenkonzentration führt. Diese freien Eisenionen sind für die Zelle gefährlich, da sie über die Fenton-Reaktion mit Wasserstoffperoxid zu OH⁻ und OH[•] reagieren ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$).

3.4.5 Eine Disruption von Mga2p führt zu einem erhöhten Sauerstoffstress in der Zelle

Cdc48p und das Proteasom sind an der Prozessierung der NF κ B Homologe Mga2p und Spt23p in *S. cerevisiae* beteiligt (Hitchcock et al., 2001). Beide Proteine sind in der Membran des ER verankert. Durch eine partielle Proteindegradation des Carboxyterminus des Proteins wird der N-Terminus freigesetzt und gelangt in den Kern, wo er als Transkriptionsfaktor agiert (Hoppe et al., 2000; Rape et al., 2001; Rape und Jentsch, 2002). Eine Aktivierung von NF κ B aus Säugerzellen kann *in vivo* und *in vitro* durch Proteaseinhibitoren verhindert werden (Palombella et al., 1987). Bei der Expression des Säuger NF κ B Vorläuferproteins p105 in Hefezellen wird dieses ebenfalls prozessiert und damit aktiviert. Eine Mutation des Pre1p Proteins (*pre1-1*) verhindert diese Aktivierung, während eine Pre2p Mutation (*pre2-2*) wirkungslos bleibt (Sears et al., 1998). Der Einfluss von Cdc48p oder der Endopeptidase Pre3 auf die Prozessierung des humanen NF κ B wurde bislang nicht getestet.

Allerdings ist bekannt, dass Mutationen des Cdc48 Gens oder proteasomaler Untereinheiten die Prozessierung und Aktivierung der NF κ B Homologen, Mga2p und Spt23p, in Hefe minimieren (Hitchcock et al., 2001; Hoppe et al., 2000). Die nächsten Experimente wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Cdc48p^{S565G} Phänotyp teilweise auf eine mangelnde Aktivierung von Mga2p und Spt23 zurückzuführen ist. Als erstes wurde das Überleben der MGA2 und SPT23 Deletionsstämme bei oxidativem Stress untersucht.

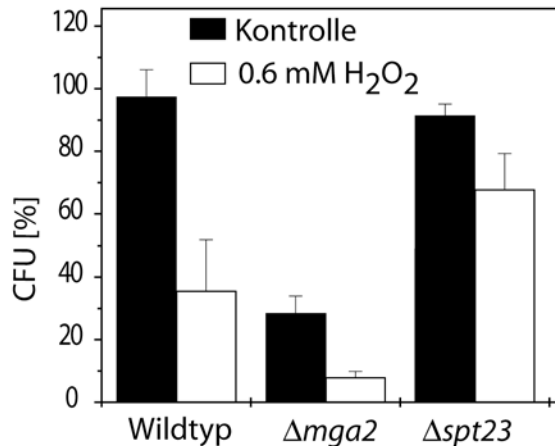


Abbildung 44: Überlebensplattierungen des $\Delta mga2$ und $\Delta spt23$.

Wildtyp, $\Delta mga2$ und $\Delta spt23$ wurden mit 0,6 mM H_2O_2 für 4 h in der frühen exponentiellen Wachstumsphase gestresst und das Überleben in Plattierungen bestimmt.

In Abbildung 44 ist zu erkennen, dass der $\Delta mga2$ Stamm ein signifikant schlechteres Überleben mit und ohne H_2O_2 aufweist. Ohne H_2O_2 überleben nur ca. 30 % der Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Dieses Verhältnis der Überlebensraten ändert sich nach einer Belastung mit H_2O_2 nicht. Das Überleben des $\Delta spt23$ Stammes ist ohne H_2O_2 mit dem des Wildtyps vergleichbar, mit H_2O_2 überlebt der $\Delta spt23$ Stamm besser als der Wildtyp.

Um zu überprüfen, ob das schlechtere Überleben des $\Delta mga2$ durch eine vermehrte Apoptoserate hervorgerufen wird, wurden die Zellen mit 0,6 mM Wasserstoffperoxid gestresst und Apoptoseassays durchgeführt. Sowohl der Test auf DNA-Fragmentierung (TUNEL-Färbung) als auch der Test auf Chromatinkondensation war bei beiden Stämmen negativ (Daten nicht gezeigt). Aber der $\Delta mga2$ Stamm zeigte in der frühen logarithmischen Phase, ohne einen zusätzlichen H_2O_2 Stress, eine Akkumulation an reaktiven Sauerstoffspezies (siehe Abbildung 45).

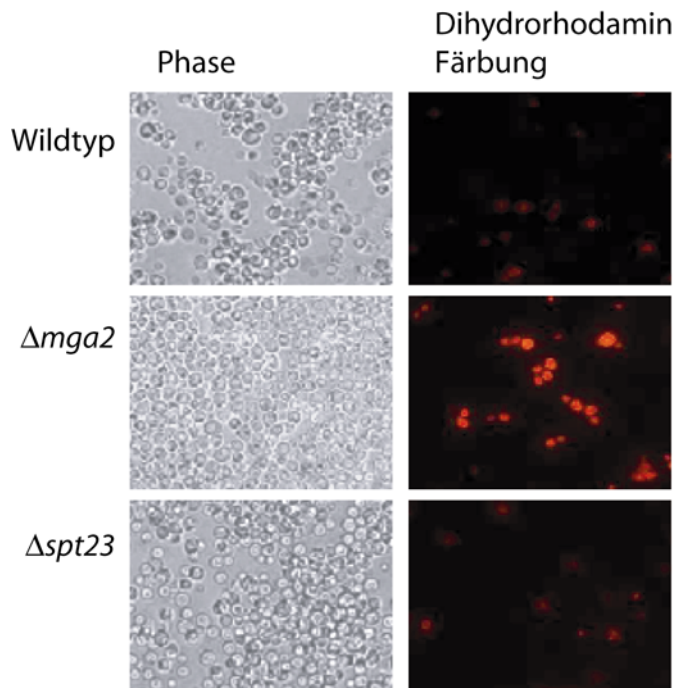


Abbildung 45: Dihydrorhodamin Färbung des $\Delta mga2$ und $\Delta spt23$ Deletionsstamm.

Von Wildtyp, $\Delta mga2$ und $\Delta spt23$ wurden in der frühen exponentiellen Wachstumsphase jeweils ein Aliquot Zellen entnommen und zur Visualisierung von ROS mit Dihydrorhodamin (DHR) inkubiert. Die Zellen wurden im Mikroskop bei 40facher Vergrößerung untersucht, gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt.

Die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies, besonders von Superoxidanionen, resultiert in einer Zerstörung von [4Fe-4S]-Proteinen, was zu einer Freisetzung von freien Eisenionen aus dem aktiven Zentrum führt.

Um den Gehalt an freien Eisenionen in den Zellen abschätzen zu können, wurden Wildtyp- und $\Delta mga2$ Zellen in der frühen logarithmischen Phase 2 h mit Calcein-Acetoxy-methylester inkubiert und die Fluoreszenz unter dem Mikroskop beurteilt.

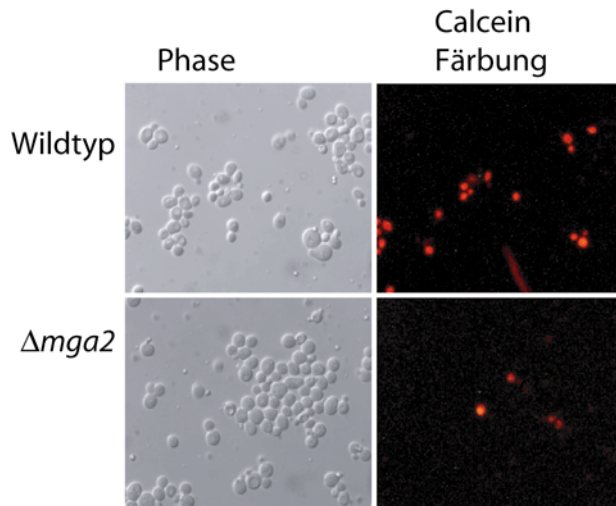


Abbildung 46: *In vivo* fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Wildtyps und der $\Delta mga2$ Deletionsmutante nach einer Calcein Färbung.

Wildtyp und $\Delta mga2$ Zellen wurden in der frühen logarithmischen Phase 2 h mit Calcein-Acetoxy-methylester inkubiert.

In Abbildung 46 ist zu erkennen, dass die Fluoreszenz im $\Delta mga2$ Stamm im Vergleich zum Wildtyp verringert ist, und somit die Konzentration an freien Eisenionen in der Deletionsmutante höher ist als im Wildtyp. Dies deutet auf eine verstärkte Zerstörung von Eisenschwefel-Proteinen hin, was den erhöhten Level von Sauerstoffradikalen erklären könnte (Abbildung 45).

3.4.6 Der $\Delta mga2$ Stamm weist eine niedrigere Transkription von Superoxiddismutase 2 mRNA auf

Bisher konnte ein signifikant schlechteres Überleben des $\Delta mga2$ Stammes, eine Akkumulation von Sauerstoffradikalen und eine Erhöhung der Konzentration von freien Eisenionen im $\Delta mga2$ Stamm nachgewiesen werden.

Mga2p ist ein NF κ B Homolog in *S. cerevisiae*. In Säugerzellen spielt NF κ B eine große Rolle bei der Stressantwort, denn durch NF κ B werden über 150 Gene reguliert, unter anderem die manganabhängige SOD2 (Das et al., 1995).

Diese Information und die bisherigen Ergebnisse ließen die Überlegung zu, ob Mga2p ein echtes NF κ B Ortholog sein könnte, also ein Transkriptionsfaktor für Enzyme, die für die Stressantwort der Zelle, insbesondere bei Sauerstoffstress

eine Rolle spielen. Aus diesem Grund wurde die Konzentration der SOD2 mRNA im Wildtyp mit der in den $\Delta spt23$ und $\Delta mga2$ Stämmen verglichen.

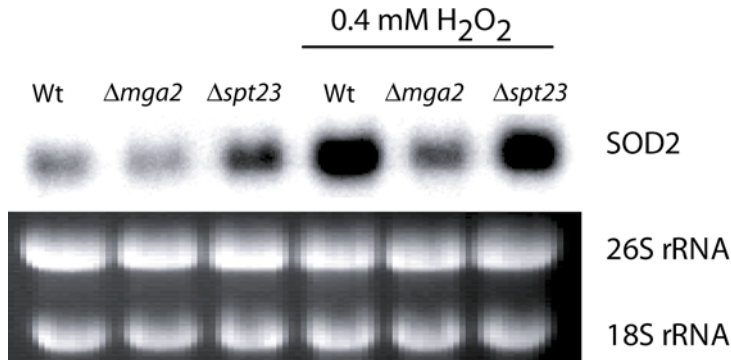


Abbildung 47: Northern Blot der SOD2 mRNA vom Wildtyp, den $\Delta mga2$ und $\Delta spt23$ Deletionsmutanten mit und ohne H_2O_2 .

Wildtyp, $\Delta mga2$ und $\Delta spt23$ Deletionsmutanten wurden in der frühen logarithmischen Phase mit und ohne H_2O_2 inkubiert. Die Transkription der SOD2 wurde durch die Belastung der Zellen mit $0,4 \text{ mM } H_2O_2$ induziert. Die RNA wurde nach 4 h nach H_2O_2 Zugabe isoliert. Die 26S und 18S rRNA ist zur Kontrolle der aufgetragenen RNA Mengen abgebildet.

Im Northern Blot (Abbildung 47) ist zu erkennen, dass die Konzentration der SOD2 mRNA im $\Delta mga2$ Stamm ohne H_2O_2 im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist. Bei einer Induktion der SOD2 Transkription durch H_2O_2 kommt es nur zu einer geringen Erhöhung der SOD2 mRNA Menge in der $\Delta mga2$ Mutante. Dem gegenüber steht eine starke Induktion der SOD2 Transkription nach H_2O_2 Belastung im Wildtyp.

Die Konzentration der SOD2 mRNA im $\Delta spt23$ Stamm ohne H_2O_2 ist im Vergleich zum Wildtyp erhöht, nach einer Induktion der Transkription durch H_2O_2 sind die mRNA Konzentration im Wildtyp und in der $\Delta spt23$ Mutante vergleichbar.

Mit dem Ergebnis des Northern Blots könnten auch die ermittelten Überlebensraten in der Abbildung 44 erklärt werden. Die geringe Konzentration an SOD2 im $\Delta mga2$ Stamm führt zu einer Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies, einer verminderten Fähigkeit der einzelnen Zelle, auf Sauerstoffstress zu reagieren und in der Folge zu einem schlechteren Überleben. Der höhere Grundlevel an SOD2 mRNA im $\Delta spt23$ Stamm führt dazu, dass die Zelle besser auf Sauerstoffstress reagieren kann. Die Zellen verfügen schon am

Anfang einer Stressreaktion über einen besseren Schutz. Dies erklärt das bessere Überleben der $\Delta spt23$ Hefezellen nach der Zugabe von H_2O_2 .

3.4.7 Die Überexpression eines N-terminalen Fragments von Mga2p verbessert das Überleben der Cdc48p Mutante

Um zu verifizieren, ob die schlechtere Überlebensrate der Cdc48p Mutante auf eine verminderte Konzentration von aktiviertem Mga2p zurückzuführen ist, wurde die N-terminale Domäne von Mga2p in der Cdc48p Mutante exprimiert und die Lebensfähigkeit untersucht. Hierzu wurde der N-terminale Teil von Mga2p (Aminosäuren 1-576), in welchem sich die vorhergesagte Transkriptionsaktivatordomäne befindet, und das putative Zielprotein Sod2p in dem Wildtyp und in dem Cdc48^{S565G} Mutantenstamm exprimiert und von einer Übernachtskultur ein Tüpfeltest durchgeführt.

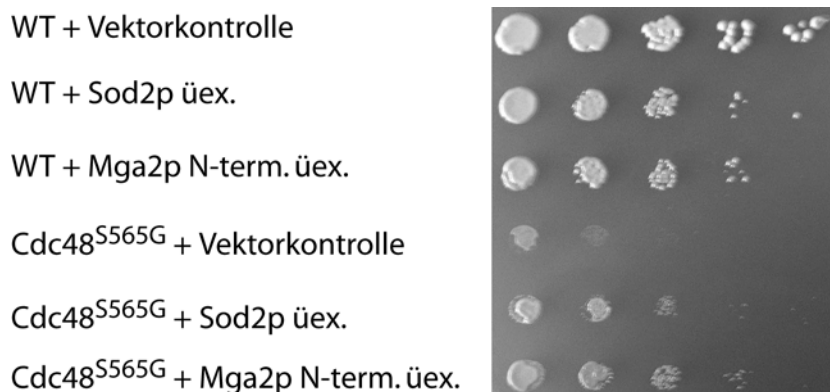


Abbildung 48: Die Expression der N-terminalen Domäne von Mga2p verbessert das Überleben der Cdc48p Mutante.

Wildtyp und Cdc48p Mutante, jeweils mit Leervektorkontrolle, Sod2p Exprimierer und Mga2p Exprimierer wurden über Nacht in SMD-His Medium in einem Reagenzglas bei 30°C kultiviert, nach der Bestimmung der OD_{600} wurde ein Tüpfeltest durchgeführt.

Wie in Abbildung 48 zu erkennen, verbessert sich durch die Expression von Mga2p das Überleben der Cdc48p Mutante. Ebenso scheint die Expression von Sod2p einen rettenden Effekt zu haben.

3.4.8 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurde in Zusammenarbeit mit Ralf Braun und Hans Zischka (München) eine Proteom Analyse des proapoptotischen Cdc48^{S565G} Stammes durchgeführt. Diese Analyse zeigte, dass in der Cdc48 Mutante die Sod2p im Vergleich zum Wildtyp geringer exprimiert ist. Dieses Ergebnis wurde durch Sod2p Enzymaktivitätsassays bestätigt, in denen die Mutante eine um 30 % geringere Sod2p Aktivität im Vergleich zum isogenen Wildtyp zeigte (Tabelle 8).

Eine verminderte Sod2p Expression führt zu einer Erhöhung der Superoxidanionenkonzentration, diese sehr reaktiven Sauerstoffradikale oxidieren vorzugsweise die exponierten Eisenionen in Eisenschwefel-[Fe4-S4]-Cluster Proteinen, was zu deren Zerstörung dieser führt.

Im Einklang damit steht ein weiteres Ergebnis der Proteom Analyse des Cdc48^{S565G} Stammes. Von den zehn gefunden deregulierten mitochondrialen Proteinen waren drei verschiedene Eisenschwefel-[Fe4-S4]-Cluster Proteine, alle drei waren herunterreguliert (Abbildung 41).

Die Zerstörung von Eisenschwefel-[Fe4-S4]-Cluster Proteinen führt, wie oben erwähnt, zu einer Freisetzung von Eisenionen, die dann über die Fenton-Reaktion zur Bildung von Hydroxylanionen führen, einer der schädlichsten reaktiven Sauerstoffspezies. In der Cdc48p Mutante konnte in der Calcein Färbung ein erhöhter Level an freien Eisenionen nachgewiesen werden (Abbildung 43).

Im mRNA Chip, der von Peter Laun aus der Arbeitsgruppe von Michael Breitenbach in Salzburg durchgeführt wurde, konnte bestätigt werden, dass Zellen, die eine Mutation in der zweiten ATPase Domäne des CDC48 Gens tragen, unter einem erheblich Stress stehen. Es sind besonders die Gene hochreguliert, die für die Stressantwort der Zellen notwendig sind (Tabelle 6).

Warum kommt es zu einer Verringerung der Sod2p Aktivität in der Cdc48 Mutante? Cdc48p ist in der Zelle an verschiedensten Stoffwechselwegen beteiligt. Eine Funktion ist der Abbau von falsch gefalteten Proteinen aus dem ER, hier kooperiert Cdc48p mit dem Proteasom. Außerdem prozessieren Cdc48p und das Proteasom die Transkriptionsfaktoren Mga2p und Spt23p.

Die Auswertung der hochregulierten Gene der Transkriptom Analyse ergab außerdem, dass Proteine, die an dem selektiven Abbau von anderen Proteinen durch das Ubiquitin Proteasom System beteiligt sind, ebenfalls signifikant in der

Cdc48p Mutante erhöht sind (Tabelle 7). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Proteom Analyse der Cdc48p Mutante, hier war die Pre3 Untereinheit hochreguliert. Frühere unveröffentlichte Untersuchungen zeigten schon, dass Doppelmutationen von Pre3 und Cdc48p oder Pre1 und Cdc48p synthetisch letal sind (Wissing, 2001).

Es stellte sich nun im Rahmen dieser Arbeit die Frage, ob die verminderte Sod2p Aktivität und die Hochregulation von Proteinen des Ubiquitin Proteasom Stoffwechselweges zusammenhängen könnten. Die Hochregulation der proteasomalen Untereinheiten könnte eine Art Gegenregulation der Zelle darstellen, wenn bestimmte Stoffwechselwege, die das proteasomale System benötigen, nur noch vermindert ablaufen.

Aus diesem Grund wurden die Deletionsmutanten der beiden Transkriptionsfaktoren, Mga2p und Spt23p, näher untersucht. Nur bei dem $\Delta mga2$ Stamm zeigte sich ein vermindertes Überleben in den Plattierungsassays (Abbildung 44). Ebenso wies dieser Stamm eine Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (Abbildung 45), ein verringertes Transkriptionsniveau der Sod2p mRNA (Abbildung 47) und eine Akkumulation von freien Eisenionen (Abbildung 46) auf.

Der $\Delta mga2$ Stamm zeigt somit einen ähnlichen Phänotyp wie die Cdc48p Mutante. Da Mga2p ein Transkriptionsaktivator ist, der unter Mitwirkung des Proteasoms und des Cdc48p aktiviert wird, könnte es sein, dass Teile des Cdc48^{S565G} Phänotyps auf eine zu geringe Konzentration von aktiviertem Mga2p zurückzuführen sind. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Ergebnisse der Expression der N-terminalen Domäne von Mga2p in der Cdc48p Mutante, die die Lebensfähigkeit der Mutante deutlich verbessert.

In Abbildung 49 wurde ein möglicher zellulärer Mechanismus dargestellt. Alle in dieser Arbeit aufgezeigten Ergebnisse sind in dieses Schema eingeflossen. Es zeigt einen möglichen Zusammenhang zwischen dem hier beschriebenen Phänotyp der Cdc48 Mutante und dem oben beschriebenen Phänotyp des $\Delta mga2$ Stammes auf.

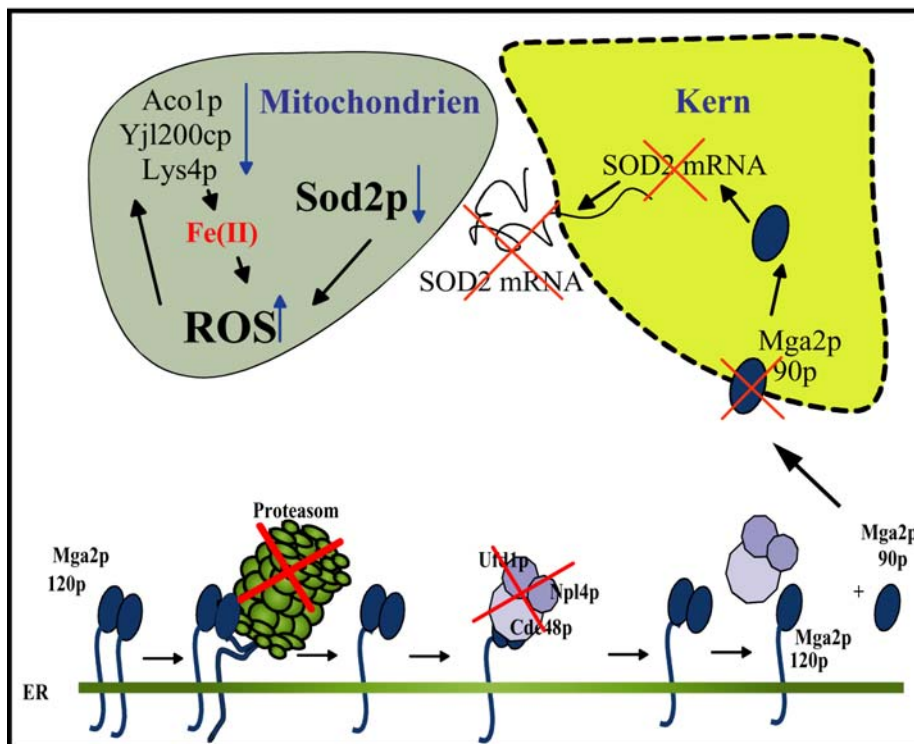
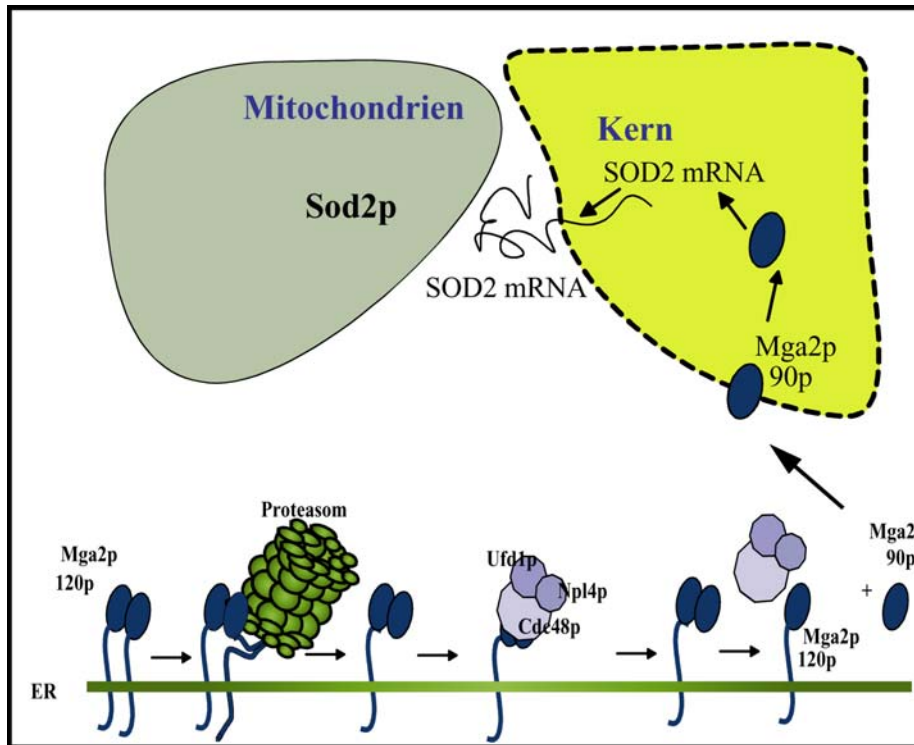


Abbildung 49: Modell eines möglichen Zusammenhang des Cdc48^{S565G} Phänotyps und der unvollständigen Prozessierung und Aktivierung von Mga2p.

Bei einer unvollständigen Prozessierung des Transkriptionsaktivators Mga2p 120p, z.B. durch Mutation eines an der Aktivierung beteiligten Proteine, kann die

90p Untereinheit nicht in den Kern gelangen und die Transkription von verschiedenen Genen aktivieren. Ein möglicher Kandidat für so ein zu aktivierendes Gen wäre die Sod2p. Diese Vermutung wird unterstützt durch die geringere Konzentration der SOD2 mRNA im $\Delta mga2$ Stamm, die Herunterregulation der Sod2p im 2-D-Gel im Cdc48^{S565G} Stamm und durch eine reduzierte Sod2p Aktivität im Cdc48^{S565G} Stamm. Ein verminderter Sod2p Level in den Mitochondrien erhöht die Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien. In der Folge kommt es zu einer Inaktivierung von Eisenschwefel-[Fe4-S4]-Cluster Proteinen. Hierbei werden Eisenionen freigesetzt, die über die Fenton Reaktion die Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies noch weiter erhöhen.

Die Vermutung, dass Mga2p ein Aktivator der SOD2 Transkription sein könnte, wird auch dadurch gestützt, dass Mga2p ein NF κ B Homolog in *S. cerevisiae* ist. NF κ B ist ein Transkriptionsaktivator der humanen manganabhängigen SOD2 (Jones et al., 1997; McCord, 2002).

Zur Verifizierung des in Abbildung 49 gezeigten Schemas sind allerdings noch abschließende Untersuchungen notwendig, z.B. eine Quantifizierung der Konzentration von Mga2p p90 im Kern von Mutantenstämmen, deren Proteine an der Aktivierung von Mga2p beteiligt sind. Um Gene zu identifizieren, deren Transkription durch Mga2p aktiviert werden, wird im Moment eine Transkriptom Untersuchung des $\Delta mga2$ Stammes versus den Wildtyp durchgeführt.

Abschließend stellt sich die Frage, ob die hier aufgezeigten Ergebnisse sich auf die Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen und den dort wirkenden Mechanismen übertragen lässt? Wäre dies der Fall, so könnte in der Zukunft die Hefe als ein Modell für die Erforschung dieser Krankheiten dienen.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue endogene Induktoren der Apoptose von *S. cerevisiae* identifiziert und näher charakterisiert. Diese Induktoren sind entweder mitochondrial lokalisiert, oder haben starke Auswirkung auf die mitochondriale Proteinzusammensetzung. Hierzu gehört das AIF Orthologe Aif1p, das im Mensch ein Schlüsselprotein der Säugerapoptose ist. Die Überexpression von Hefe Aif1p führt zum Zelltod und zu den phänotypischen Markern der Apoptose, wie z.B. DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation. Es konnte gezeigt werden, dass das Aif1p in der Hefe, ähnlich dem humanen AIF, ein mitochondriales Protein ist, das nach einem proapoptotischen Stimulus in den Kern transloziert und dort an der Fragmentierung der DNA beteiligt ist. Ebenso gelang es, den Mechanismus der Aif1p vermittelten Apoptose teilweise aufzuklären. Aif1p scheint *in vivo* mit Cpr1, einem Cyclophilin A Homolog, bei der Induktion der Apoptose zu interagieren. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Kooperation von Säuger AIF und Cyclophilin A bei der Chromatinolyse. Im Unterschied zu humanem AIF besitzt Hefe Aif1p aber eine intrinsische Nukleaseaktivität. Die Funktion von Aif1p war in den hier gezeigten Ergebnissen zum größten Teil caspaseabhängig. Da die Deletion von AIF1 das Überleben der Zellen nach oxidativem Stress und in der frühen Phase des chronologischen Alterns verbessert, scheint Aif1p eine essentielle Rolle im apoptotischen Mechanismus der Hefe einzunehmen.

Aber die apoptogene Funktion von Aif1p scheint nicht seine einzige zu sein: In gesunden nicht apoptotischen Zellen hat Aif1p eine radikalabfangende Funktion. Die Deletion von Aif1p verlangsamt das Wachstum auf nicht fermentierbaren Medien, ein deutliches Indiz für eine beschädigte Atmungskette.

Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit sowohl die proapoptotischen als auch die antiapoptotischen Funktionen von Aif1p teilweise aufgeklärt werden.

Ein zweiter wichtiger endogener Induktor der Apoptose in *S. cerevisiae*, die Hefe Caspase Yca1p, konnte ebenfalls näher charakterisiert werden. Es wurde gezeigt, dass Yca1p ähnlich wie die Säugercaspasen prozessiert wird und dass diese Prozessierung für die Aktivität der Caspase essentiell ist.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die proapoptotische Funktion von Nma111p, einem OMI/HtrA2 Homologen in Hefe, von der Aktivität der Hefecaspase Yca1p abhängig ist.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde versucht, einen potentiellen Mechanismus der Cdc48p^{S565G} vermittelten Apoptose aufzuklären. Durch Transkriptom- und Proteom- Untersuchungen des apoptotischen Cdc48p^{S565G} Stammes konnte ein Zusammenhang zwischen der Cdc48p induzierten Apoptose und einem erhöhten Sauerstoff- bzw. Superoxidanionenstress herausgearbeitet werden. Die Proteinkonzentration von mitochondrialer Superoxiddismutase ist in der Cdc48p Mutante deutlich verringert. Dies führt zu einem erhöhten Level an Sauerstoffradikalen und in der Folge zu einer Zerstörung von Eisenschwefel-Proteinen.

Der hier beschriebene Phänotyp der Cdc48p Mutante könnte die Folge einer verringerten Aktivierung des Transkriptionsaktivators Mga2p sein, einem potentiellen NFκB Homologen in *S. cerevisiae*. Bei einer Deletion von Mga2p kommt es zu einer Verringerung der Sod2 mRNA Konzentration, zu einer Erhöhung von Superoxidradikalen und der Zerstörung von Eisenschwefel-Proteinen. Damit wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Letalität der Cdc48p Mutation ein plausibler Mechanismus herausgearbeitet, der sich in weiteren Experimenten bewähren muss.

5 Abkürzungsverzeichnis

Δ	Deletionsstamm
[4FE-4S]	Eisen 4-Schwefel 4 Cluster Protein
°C	Grad Celsius
2 D	2 Dimensions-
AAA	ATPase Associated with diverse cellulare Activities
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
AMID	Apoptosis Inducing Factor homologous Mitochondrion Associated Inducer of Death
Amp	Ampicillin
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
Bad	Bcl-2 agonist of cell death
Bax	Bcl-2 associated X-factor
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BI-1	Bax Inhibitor 1
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bir1	Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Repeat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAD	Caspase-Activated DNase
CARD	Caspase Recruiting Domain
Caspase	Cysteinylnyl aspartate-specific proteinases
CD95	Cluster of Differentiation
CDC	Cell Division Cycle
C/EBPβ	CCAAT/enhancer-binding protein β
CFU	Colony Forming Units
CPR	Cyclosporin-sensitive Proline Rotamase
CsA	Cyclosporin A
d	day (Tage)
DAB	Diaminobenzidine
DAPI	Diaminophenylindol
DD	Death Domain
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DHR	Dihydrorhodamin 123
DIABLO	Direct IAP-binding Proteine with low pI
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EndoG	Endonuclease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER-NE	Endoplasmatic Reticulum-Nuclear Envelopment
ERAD	ER-associated protein degradation
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	FAS-associating death domain-containing protein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FMY	Hefestammsammlung Frank Madeo
g	relative Zentrifugalkraft
GFP	Green fluorescent protein
GSH	Glutathion
h	Stunden
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid
HSP	Heat shock protein
HtrA2	High temperature requirement A 2
I κ B α	Inhibitor of NF- κ B
IAP	Inhibitory apoptosis protein
ICAD	Inhibitor of CAD
Kan ^R	G418 resistance
kDa	Kilo Dalton
KFY	Hefestammsammlung Kai-Uwe Fröhlich
LB	Luria Bertani-Medium
LiAc	Lithiumacetat
M	Mitochondrien
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie-time-of Flight
Mat	Mating type
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
MLS	mitochondriale Lokalisationssequenz
MP	Mitoplasten
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NF κ B	Nuclear Factor- κ B
NLS	Kernlokalisationssequenz
Nma111	Nuclear mediator of apoptosis 111
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly [ADP-ribose] polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFM	Plasmidstammsammlung Frank Madeo
PK	Protease K
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
POD	Peroxidase
polyQ	Polyglutamin Erkrankungen
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rotations per Minute)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIR2	Silent Information Regulator
SMAC	Second mitochondrial activator of caspases

SMD	Synthetic complete dextrose
snRNAs	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear Ribonucleoprotein Particle
SOD	Superoxiddismutase
Spt23	Supressor of Ty
ssDNA	single strand DNA
TAE	Tris-acetate EDTA
tBid	truncated Bid
TBS	Tris-buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TIM	Translocase of the Inner Membrane
TNF	Tumor necrosis factor
TOM	Translocase of the Outer Membrane
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
U	Units
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
VCP	Valosin containing protein
VDAC	Voltage-dependent anion channel
VEID	Caspase Substrat (Val-Glu-Ile-Asp)
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit
WAH-1	Worm AIF Homolog
WT	Wildtyp
YCA1	Yeast Caspase 1
yEGFP	Yeast-enhanced green fluorescent protein
YPD	Yeast extract peptone dextrose
ZnF	Zink Finger
Z-VAD-fmk	Caspase Inhibitor (Carbobenzoxy-Val-Ala-Asp-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Peptid)

6 Referenzen

- Alnemri, E.S., D.J. Livingston, D.W. Nicholson, G. Salvesen, N.A. Thornberry, W.W. Wong, und J. Yuan. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 87:171.
- Ameisen, J.C. 1991. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today*. 12:102-5.
- Ameisen, J.C. 1996. The origin of programmed cell death. *Science*. 272:1278-9.
- Antonsson, B., und J.C. Martinou. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* 256:50-7.
- Aris, J.P., und G. Blobel. 1989. Yeast nuclear envelope proteins cross react with an antibody against mammalian pore complex proteins. *J. Cell Biol.* 108:2059-67.
- Arnoult, D., B. Gaume, M. Karbowski, J.C. Sharpe, F. Cecconi, und R.J. Youle. 2003. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* 22:4385-4399.
- Arnoult, D., P. Parone, J.C. Martinou, B. Antonsson, J. Estaquier, und J.C. Ameisen. 2002. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J. Cell Biol.* 159:923-929.
- Ball W.J. Jr., und D.E. Atkinson. 1975. Adenylate energy charge in *Saccharomyces cerevisiae* during starvation. *J. Bacteriol.* 121:975-82.
- Baeuerle, P.A., und C. Kaltschmidt. 1996. NF-kappa B: ten years after. *Gene*. 176:119-24.
- Benzi G, und M. A. 1995. Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic. Biol. Med.* 19:77-101.
- Blanchard, F., M.E. Rusiniak, K. Sharma, X. Sun, I. Todorov, M.M. Castellano, C. Gutierrez, H. Baumann, und W.C. Burkans. 2002. Targeted destruction of DNA replication protein Cdc6 by cell death pathways in mammals and yeast. *Mol. Biol. Cell.* 13:1536-1549.
- Blobel, G. 1980. Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S A.* 77:1496-1500.
- Bozhkov, P.V., L.H. Filonova, M.F. Suarez, A. Helmersson, A.P. Smertenko, B. Zhivotovsky, und S. von Arnold. 2004. VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death. Differ.* 11:175-182.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Braun, R.J., H. Zischka, F. Madeo, S.M. Engelhardt, S. Wissing, D. Büringer, und M. Ueffing. Veröffentlichung eingereicht. Mutated CDC48, the yeast orthologue of valosin-containing protein, triggers mitochondria-dependent apoptosis. *Submitted*.

- Cabiscol, E., G. Belli, J. Tamarit, P. Echave, E. Herrero, and J. Ros. 2002. Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277:44531-44538.
- Cande, C., F. Cecconi, P. Dessen, and G. Kroemer. 2002. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J. Cell. Sci.* 115:4727-4734.
- Cande, C., N. Vahsen, I. Kouranti, E. Schmitt, E. Daugas, C. Spahr, J. Luban, R.T. Kroemer, F. Giordanetto, C. Garrido, J.M. Penninger, and G. Kroemer. 2004. AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene.* 23:1514-1521.
- Carlsson, L.M., J. Jonsson, T. Edlund, and S.L. Marklund. 1995. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:6264-8.
- Chae, H.J., N. Ke, H.R. Kim, S. Chen, A. Godzik, M. Dickman, and J.C. Reed. 2003. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene.* 323:101-113.
- Chou, P.Y., and G.D. Fasman. 1978. Empirical predictions of protein conformation. *Annu. Rev. Biochem.* 47:251-76.
- Cohen, D.J., Y. Tian, B.S. Ooi, and P.A. Henkart. 1996. Differential effects of costimulator signals and interleukin-2 on T cell receptor-mediated cell death of resting and activated CD4+ murine splenic T cells. *Transplantation.* 61:486-91.
- Colgan, J., M. Asmal, and J. Luban. 2000. Isolation, characterization and targeted disruption of mouse ppia: cyclophilin A is not essential for mammalian cell viability. *Genomics.* 68:167-78.
- Cregan, S.P., A. Fortin, J.G. MacLaurin, S.M. Callaghan, F. Cecconi, S.W. Yu, T.M. Dawson, V.L. Dawson, D.S. Park, G. Kroemer, and R.S. Slack. 2002. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J. Cell. Biol.* 158:507-517.
- Dai, R.M., E. Chen, D.L. Longo, C.M. Gorbea, and C.C. Li. 1998. Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with I κ B α and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of I κ B α . *J. Biol. Chem.* 273:3562-73.
- Dai, R.M., and C.C. Li. 2001. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat. Cell Biol.* 3:740-4.
- Das, K.C., Y. Lewis-Molock, and C.W. White. 1995. Activation of NF-kappa B and elevation of MnSOD gene expression by thiol reducing agents in lung adenocarcinoma (A549) cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* 269:L588-602.
- Daugas, E., S.A. Susin, N. Zamzami, K.F. Ferri, T. Irinopoulou, N. Larochette, M.C. Prevost, B. Leber, D. Andrews, J. Penninger, and G. Kroemer. 2000. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* 14:729-739.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 102:33-42.
- Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Rev. Biochem.* 68:383-424.

- Eisenberg, D. 1984. Three-dimensional structure of membrane and surface proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 53:595-623.
- Engelhardt, S. 2004. *Eberhard-Karls-Universität Tübingen*. Dissertation.
- Engelman, D.M., T.A. Steitz, und A. Goldman. 1986. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15:321-53.
- Faccio, L., C. Fusco, A. Chen, S. Martinotti, J.V. Bonventre, und A.S. Zervos. 2000. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J. Biol. Chem.* 275:2581-8.
- Fahrenkrog, B., U. Sauder, und U. Aebi. 2004. The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. *J. Cell Sci.* 117:115-126.
- Finer-Moore, J., R.M. Stroud, B. Prescott, und G.J. Thomas, Jr. 1984. Subunit secondary structure in filamentous viruses: predictions and observations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2:93-100.
- Fish, W.W. 1988. *Methods Enzymol.* 158:357-364.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64:97-112.
- Fröhlich, K.U., H.W. Fries, M. Ruediger, R. Erdmann, und D. Botstein. 1991. Yeast Cell Cycle Protein CDC48p Shows Full-Length Homology to the Mammalian Protein VCP and Is a Member of a Protein Family Involved in Secretion, Peroxisome Formation, and Gene Expression. *J. Cell Biol.* 114:443-453.
- Ghislain, M., R.J. Dohmen, F. Levy, und A. Varshavsky. 1996. Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15:4884-99.
- Gietz, D.R.S.R.H.W.A.R.a.W.R.A. 1994. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/ss-DNA/PEG procedure. *Yeast.* 11:355-360.
- Gray, C.W., R.V. Ward, E. Karran, S. Turconi, A. Rowles, D. Viglienghi, C. Southan, A. Barton, K.G. Fantom, A. West, J. Savopoulos, N.J. Hassan, H. Clinkenbeard, C. Hanning, B. Amegadzie, J.B. Davis, C. Dingwall, G.P. Livi, und C.L. Creasy. 2000. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur. J. Biochem.* 267:5699-710.
- Gross, A., J.M. McDonnell, und S.J. Korsmeyer. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13:1899-911.
- Guldener, U., S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer, und J.H. Hegemann. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24:2519-24.
- Hegde, R., S.M. Srinivasula, Z. Zhang, R. Wassell, R. Mukattash, L. Cilenti, G. DuBois, Y. Lazebnik, A.S. Zervos, T. Fernandes-Alnemri, und E.S. Alnemri. 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J. Biol. Chem.* 277:432-8.
- Heikkila, R.E., und F. Cabbat. 1976. A sensitive assay for superoxide dismutase based on the autoxidation of 6-hydroxydopamine. *Anal. Biochem.* 75:356-62.

- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407:770-776.
- Henzel, W.J., X. Liu, A. Lutschg, X. Wang, und H. Zou. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 90:405-13.
- Herker, E. 2005. *Eberhardt-Karls-Universität Tübingen*. Dissertation.
- Herker, E., H. Jungwirth, K.A. Lehmann, C. Maldener, K.U. Fröhlich, S. Wissing, S. Buttner, M. Fehr, S. Sigrist, und F. Madeo. 2004. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 164:501-507.
- Hilt, W., und D.H. Wolf. 1996. Proteasomes: destruction as a programme. *TiBS*. 21:96-102.
- Hirabayashi, M., K. Inoue, K. Tanaka, K. Nakadate, Y. Ohsawa, Y. Kamei, A.H. Popiel, A. Sinohara, A. Iwamatsu, Y. Kimura, Y. Uchiyama, S. Hori, und A. Kakizuka. 2001. VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death.Differ.* 8:977-984.
- Hitchcock, A.L., H. Krebber, S. Fietze, A. Lin, M. Latterich, und P.A. Silver. 2001. The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Mol. Biol. Cell.* 12:3226-41.
- Hochstrasser, M. 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30:405-39.
- Hoppe, T., K. Matuschewski, M. Rape, S. Schlenker, H.D. Ulrich, und S. Jentsch. 2000. Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell*. 102:577-86.
- Hopwood, D., und D.A. Levison. 1976. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J. Pathol.* 119:159-66.
- Huh, G.H., B. Damsz, T.K. Matsumoto, M.P. Reddy, A.M. Rus, J.I. Ibeas, M.L. Narasimhan, R.A. Bressan, und P.M. Hasegawa. 2002. Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J.* 29:649-659.
- Imamura, S., N. Ojima, und M. Yamashita. 2003. Cold-inducible expression of the cell division cycle gene CDC48 and its promotion of cell proliferation during cold acclimation in zebrafish cells. *FEBS Let.* 549:14-20.
- Imlay, J.A., und I. Fridovich. 1991. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266:6957-65.
- Jacobson, M.D., M. Weil, und M.C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 88:347-54.
- Jakobs, S., N. Martini, A.C. Schauss, A. Egner, B. Westermann, und S.W. Hell. 2003. Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J. Cell Sci.* 116:2005-14.
- Jellinger, K.A. 2003. General aspects of neurodegeneration. *J. Neural Transm.* 101-44.
- Jones, P.L., D. Ping, und J.M. Boss. 1997. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-beta and NF-kappaB. *Mol. Cell. Biol.* 17:6970-81.
- Joza, N., S.A. Susin, E. Daugas, W.L. Stanford, S.K. Cho, C.Y. Li, T. Sasaki, A.J. Elia, H.Y. Cheng, L. Ravagnan, K.F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y.Y. Kong, T.W. Mak, J.C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer, und J.M. Penninger. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 410:549-554.

- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, und A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. 26:239-57.
- Klein, J.A., C.M. Longo-Guess, M.P. Rossmann, K.L. Seburn, R.E. Hurd, W.N. Frankel, R.T. Bronson, und S.L. Ackerman. 2002. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*. 419:367-74.
- Knop, M., K. Siegers, G. Pereira, W. Zachariae, B. Winsor, K. Nasmyth, und E. Schiebel. 1999. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*. 15:963-972.
- Kobayashi, T., K. Tanaka, K. Inoue, und A. Kakizuka. 2002. Functional ATPase activity of p97/valosin-containing protein (VCP) is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *J. Biol. Chem*. 277:47358-65.
- Kondo, H., C. Rabouille, R. Newman, T.P. Levine, D. Pappin, P. Freemont, und G. Warren. 1997. p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion *Nature*. 388:75-8.
- Kornberg, R.D., und Y. Lorch. 1999. Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr. Op. Genet. Dev*. 9:148-51.
- Krammer, P.H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 407:789-95.
- Kyte, J., und R.F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol*. 157:105-132.
- Laemmli, U.K., E. Molbert, M. Showe, und E. Kellenberger. 1970. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol*. 49:99-113.
- Latterich, M., K.U. Fröhlich, und R. Schekman. 1995. Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell*. 82:885-93.
- Laun, P., A. Pichova, F. Madeo, J. Fuchs, A. Ellinger, S. Kohlwein, I. Dawes, K.U. Fröhlich, und M. Breitenbach. 2001. Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol*. 39:1166-1173.
- Lebovitz, R.M., H. Zhang, H. Vogel, J. Cartwright, Jr., L. Dionne, N. Lu, S. Huang, und M.M. Matzuk. 1996. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:9782-7.
- Li, F., P.L. Flanary, D.C. Altieri, und H.G. Dohlman. 2000. Cell division regulation by BIR1, a member of the inhibitor of apoptosis family in yeast. *J. Biol. Chem*. 275:6707-6711.
- Li, H., H. Zhu, C.J. Xu, und J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 94:491-501.
- Li, L.Y., X. Luo, und X. Wang. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. 412:95-99.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, und X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91:479-489.

- Li, Y., T.T. Huang, E.J. Carlson, S. Melov, P.C. Ursell, J.L. Olson, L.J. Noble, M.P. Yoshimura, C. Berger, und P.H. Chan. 1995. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 11:376-81.
- Lorenzo, H.K., S.A. Susin, J. Penninger, und G. Kroemer. 1999. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ.* 6:516-524.
- Lowary, P.T., und J. Widom. 1989. Higher-order structure of *Saccharomyces cerevisiae* chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:8266-8270.
- Ludovico, P., M.J. Sousa, M.T. Silva, C. Leao, und M. Corte-Real. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiol.* 147:2409-2415.
- Madeo, F., E. Fröhlich, und K.U. Fröhlich. 1997. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell Biol.* 139:729-34.
- Madeo, F., E. Fröhlich, M. Ligr, M. Grey, S.J. Sigrist, D.H. Wolf, und K.U. Fröhlich. 1999. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 145:757-67.
- Madeo, F., E. Herker, C. Maldener, S. Wissing, S. Lachelt, M. Herlan, M. Fehr, K. Lauber, S.J. Sigrist, S. Wesselborg, und K.U. Fröhlich. 2002. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell.* 9:911-917.
- Martin, S.J., C.P. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C. van Schie, D.M. LaFace, und D.R. Green. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182:1545-56.
- Martins, L.M., I. Iaccarino, T. Tenev, S. Gschmeissner, N.F. Totty, N.R. Lemoine, J. Savopoulos, C.W. Gray, C.L. Creasy, C. Dingwall, und J. Downward. 2002. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J. Biol. Chem.* 277:439-44.
- Mate, M.J., M. Ortiz-Lombardia, B. Boitel, A. Haouz, D. Tello, S.A. Susin, J. Penninger, G. Kroemer, und P.M. Alzari. 2002. The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat. Struct. Biol.* 9:442-446.
- McCord, J.M. 2002. Superoxid Dismutase in Aging and Disease: An Overview. *In Meth. in Enzymology.* Vol. 349. J.C.Reed, Editor. Academic Press. 311-341.
- McCord, J.M., B.B. Keele, Jr., und I. Fridovich. 1971. An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68:1024-7.
- Miramar, M.D., P. Costantini, L. Ravagnan, L.M. Saraiva, D. Haouzi, G. Brothers, J.M. Penninger, M.L. Peleato, G. Kroemer, und S.A. Susin. 2001. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J. Biol. Chem.* 276:16391-16398.
- Mizuno, Y., S. Hori, A. Kakizuka, und K. Okamoto. 2003. Vacuole-creating protein in neurodegenerative diseases in humans. *Neurosci. Lett.* 343:77-80.
- Moir, D., S.E. Stewart, B.C. Osmond, und D. Botstein. 1982. Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics.* 100:547-63.

- Montague, J.W., M.L. Gaido, C. Frye, and J.A. Cidlowski. 1994. A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. Recombinant cyclophilins A, B, and C have nuclease activity. *J. Biol. Chem.* 269:18877-80.
- Montague, J.W., F.M. Hughes, Jr., and J.A. Cidlowski. 1997. Native recombinant cyclophilins A, B, and C degrade DNA independently of peptidylprolyl cis-trans-isomerase activity. Potential roles of cyclophilins in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272:6677-84.
- Muzio, M., B.R. Stockwell, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen, and V.M. Dixit. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273:2926-2930.
- Narasimhan, M.L., B. Damsz, M.A. Coca, J.I. Ibeas, D.J. Yun, J.M. Pardo, P.M. Hasegawa, and R.A. Bressan. 2001. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol. Cell.* 8:921-930.
- Neupert, W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66:863-917.
- Oberley, L.W., and G.R. Buettner. 1979. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res.* 39:1141-9.
- Ohiro, Y., I. Garkavtsev, S. Kobayashi, K.R. Sreekumar, R. Nantz, B.T. Higashikubo, S.L. Duffy, R. Higashikubo, A. Usheva, D. Gius, N. Kley, and N. Horikoshi. 2002. A novel p53-inducible apoptogenic gene, PRG3, encodes a homologue of the apoptosis-inducing factor (AIF). *FEBS Letters.* 524:163-71.
- Pahl, H.L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 18:6853-66.
- Pallen, M.J., and B.W. Wren. 1997. The HtrA family of serine proteases. *Mol. Microbiol.* 26:209-21.
- Palombella, V.J., D.J. Yamashiro, F.R. Maxfield, S. Decker, and J.J. Vilcek. 1987. Tumor necrosis factor increases the number of epidermal growth factor receptors on human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 262:1950-1954.
- Puthalakath, H., D.C. Huang, L.A. O'Reilly, S.M. King, and A. Strasser. 1999. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell.* 3:287-96.
- Rabinovich, E., A. Kerem, K.U. Fröhlich, N. Diamant, and S. Bar-Nun. 2002. AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol. Cell. Biol.* 22:626-34.
- Ramachandran, L., P.Laun, L.Feng, P.Liang, X.Wang, D.T.Burhans, S.Wissing, S. Jarolim, B.Suter, F.Madeo, M.Breitenbach, and W.C.Burhans. Veröffentlichung eingereicht. Evidence for global silencing by ORC of budding yeast genes associated with starvation, sporulation, aging and apoptosis. *eingereicht*
- Rao, L., D. Perez, and E. White. 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* 135:1441-1455.
- Rao, R.V., K.S. Poksay, S. Castro-Obregon, B. Schilling, R.H. Row, G. del Rio, B.W. Gibson, H.M. Ellerby, and D.E. Bredesen. 2004. Molecular Components of a Cell Death Pathway Activated by Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Biol. Chem.* 279:177-187.
- Rape, M., T. Hoppe, I. Gorr, M. Kalocay, H. Richly, and S. Jentsch. 2001. Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell.* 107:667-77.

- Rape, M., und S. Jentsch. 2002. Taking a bite: proteasomal protein processing. *Nat. Cell Biol.* 4:E113-6.
- Reaume, A.G., J.L. Elliott, E.K. Hoffman, N.W. Kowall, R.J. Ferrante, D.F. Siwek, H.M. Wilcox, D.G. Flood, M.F. Beal, R.H. Brown, Jr., R.W. Scott, und W.D. Snider. 1996. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Genetics.* 13:43-7.
- Reed, J.C. 1997. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semi. Hematol.* 34:9-19.
- Rich, T., R.L. Allen, und A.H. Wyllie. 2000. Defying death after DNA damage. *Nature.* 407:777-83.
- Rodriguez, J., und Y. Lazebnik. 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 13:3179-84.
- Rodrigues, F., M. van Hermet, H.Y. Steensma, M. Corte-Real, und C. Leao. 2001. Red fluorescent protein (DsRed) as a reporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 183:3791-3794.
- Sakahira, H., M. Enari, und S. Nagata. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 391:96-99.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, und T. Maniatis. 1989. *In Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 Auflage, New York, Cold Spring Harbour Laboratory.
- Sattler, M., A. Astier, J.S. Phifer, T. Canty, C. Morimoto, B.J. Druker, R. Salgia, J.D. Griffin, und A.S. Freedman. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Exp. Hematol.* 25:45-50.
- Schiene, C., und G. Fischer. 2000. Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 10:40-5.
- Schreiber, S.L., und G.R. Crabtree. 1992. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today.* 13:136-42.
- Sears, C., J. Olesen, D. Rubin, D. Finley, und T. Maniatis. 1998. NF-kappa B p105 Processing via the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *J. Biol. Chem.* 273:1409-1419.
- Sentman, M.L., L.M. Jonsson, und S.L. Marklund. 1999. Enhanced alloxan-induced beta-cell damage and delayed recovery from hyperglycemia in mice lacking extracellular-superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* 27:790-6.
- Severin, F.F., und A.A. Hyman. 2002. Pheromone induces programmed cell death in *S-cerevisiae*. *Curr. Biol.* 12:R233-R235.
- Shefner, J.M., A.G. Reaume, D.G. Flood, R.W. Scott, N.W. Kowall, R.J. Ferrante, D.F. Siwek, M. Upton-Rice, und R.H. Brown, Jr. 1999. Mice lacking cytosolic copper/zinc superoxide dismutase display a distinctive motor axonopathy. *Neurol.* 53:1239-46.
- Sheng, H., T.C. Brady, R.D. Pearlstein, J.D. Crapo, und D.S. Warner. 1999. Extracellular superoxide dismutase deficiency worsens outcome from focal cerebral ischemia in the mouse. *Neurosci. Lett.* 267:13-6.
- Shirogane, T., T. Fukada, J.M. Muller, D.T. Shima, M. Hibi, und T. Hirano. 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.* 4:555-6.
- Spiess, C., A. Beil, und M. Ehrmann. 1999. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell.* 97:339-47.
- St Clair, D., und J. Holland. 1991. Complementary DNA encoding human colon cancer manganese superoxide dismutase and the expression of its gene in human cells. *Cancer Res.* 51:939-943.
- Stennicke, H.R., Q.L. Deveraux, E.W. Humke, J.C. Reed, V.M. Dixit, und G.S. Salvesen. 1999. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 274:8359-8362.
- Suarez, M.F., L.H. Filonova, A. Smertenko, E.I. Savenkov, D.H. Clapham, S. von Arnold, B. Zhivotovsky, und P.V. Bozhkov. 2004. Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Curr. Biol.* 14:R339-R340.
- Susin, S.A., H.K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, C. Brenner, N. Larochette, M.C. Prevost, P.M. Alzari, und G. Kroemer. 1999a. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J. Exp. Med.* 189:381-394.
- Susin, S.A., H.K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B.E. Snow, G.M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D.R. Goodlett, R. Aebersold, D.P. Siderovski, J.M. Penninger, und G. Kroemer. 1999b. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 397:441-446.
- Takahashi, N., T. Hayano, und M. Suzuki. 1989. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature.* 337:473-5.
- Thanos, D., und T. Maniatis. 1995. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell.* 80:529-32.
- Thompson, E.B., und C.B. Thompson. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Recent Prog. Horm. Res.* 50:417-21.
- Thornberry, N.A., und Y. Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. *Science.* 281:1312-1316.
- Travers, A. 1999. An engine for nucleosome remodeling. *Cell.* 96:311-4.
- Uren, A.G., T. Beilharz, J. O'Connell, S.J. Bugg, R. van Driel, D.L. Vaux, und T. Lithgow. 1999. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:10170-10175.
- Uren, A.G., K. O'Rourke, L.A. Aravind, M.T. Pisabarro, S. Seshagiri, E.V. Koonin, und V.M. Dixit. 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.* 6:961-967.
- N. Vahsen, Cande C, Briere JJ, Benit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schagger H, Rustin P, und Kroemer G. 2004. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* 23(23):4679-89.
- van Loo, G., X. Saelens, M. van Gurp, M. MacFarlane, S.J. Martin, und P. Vandenabeele. 2002. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.* 9:1031-1042.

- Verhagen, A.M., P.G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L.M. Connolly, G.E. Reid, R.L. Moritz, R.J. Simpson, und D.L. Vaux. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 102:43-53.
- Verma, I.M., J.K. Stevenson, E.M. Schwarz, D. Van Antwerp, und S. Miyamoto. 1995. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev*. 9:2723-35.
- Wadskog, I., C. Maldener, A. Proksch, F. Madeo, und L. Adler. 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*. 15:1436-1444.
- Wang, X., C. Yang, J. Chai, Y. Shi, und D. Xue. 2002. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 298:1587-92.
- Wissing, S. 2001. Potentielle Mechanismen der Cdc48p vermittelten Apoptose. In Diplomarbeit. Eberhardt-Karls-Universität Tübingen.
- Wissing, S., P. Ludovico, E. Herker, S. Buttner, S.M. Engelhardt, T. Decker, A. Link, A. Proksch, F. Rodrigues, M. Corte-Real, K.U. Fröhlich, J. Manns, C. Cande, S.J. Sigrist, G. Kroemer, und F. Madeo. 2004. An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 166:969-974.
- Wittmann-Liebold, B., K. Lang, T. Kiefhaber, F.X. Schmid, und G. Fischer. 1989. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*. 337:476-8.
- Wu, D., P.J. Chen, S. Chen, Y. Hu, G. Nunez, und R.E. Ellis. 1999. *C. elegans* MAC-1, an essential member of the AAA family of ATPases, can bind CED-4 and prevent cell death. *Development*. 126:2021-31.
- Wu, M., L.G. Xu, X. Li, Z. Zhai, und H.B. Shu. 2002. AMID, an apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated protein, induces caspase-independent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277:25617-23.
- Wyllie, A.H., J.F. Kerr, und A.R. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251-306.
- Xu, Y., A. Krishnan, X.S. Wan, H. Majima, C.C. Yeh, G. Ludewig, E.J. Kasarskis, und D.K. St Clair. 1999. Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. *Oncogene*. 18:93-102.
- Ye, H., C. Cande, N.C. Stephanou, S. Jiang, S. Gurbuxani, N. Larochette, E. Daugas, C. Garrido, G. Kroemer, und H. Wu. 2002. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct. Biol.* 9:680-684.
- Ye, Y., H.H. Meyer, und T.A. Rapoport. 2001. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature*. 414:652-6.
- Yoon, H.J., und J. Carbon. 1999. Participation of Bir1p, a member of the inhibitor of apoptosis family, in yeast chromosome segregation events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:13208-13213.
- Yoshida, T., N. Maulik, R.M. Engelman, Y.S. Ho, und D.K. Das. 2000. Targeted disruption of the mouse Sod 1 gene makes the hearts vulnerable to ischemic reperfusion injury. *Circ. Res.* 86:264-9.
- Yuan, J., und B.A. Yankner. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 407:802-809.

- Zhang, S., T.J. Burkett, I. Yamashita, and D.J. Garfinkel. 1997. Genetic redundancy between SPT23 and MGA2: regulators of Ty-induced mutations and Ty1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17:4718-29.
- Zhang, S., Y. Skalsky, and D.J. Garfinkel. 1999. MGA2 or SPT23 is required for transcription of the delta9 fatty acid desaturase gene, OLE1, and nuclear membrane integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 151:473-83.
- Zhong, W., L.W. Oberley, T.D. Oberley, T. Yan, F.E. Domann, and D.K. St Clair. 1996. Inhibition of cell growth and sensitization to oxidative damage by overexpression of manganese superoxide dismutase in rat glioma cells. *Cell Growth Differ.* 7:1175-86

Akademischen Lehrer:

- Anatomie
 - Anorganische Chemie
 - Botanik
 - Organische Chemie

 - Mathematik
 - Mikrobiologie
 - Pflanzenphysiologie
 - Physik
 - Physikalische Biochemie
 - Physikalische Chemie
 - Physiologische Chemie

 - Strahlenschutz
 - Toxikologie

 - Zoologie
- K. Reutter
 - E. Lindner, J. Strähle
 - W.-E. Mayer
 - E. Bayer, G. Häfelinger, H. Hagenmaier,
M. Hanack, E. Maier, H. Schott
 - H. Pommer
 - K. Poralla
 - K. Wegmann
 - W. Nakel, G. Staudt
 - H. Bauer, W. Voelter
 - G. Gauglitz, V. Hoffmann
 - H. Bisswanger, P. Bohley, K. Eisele,
K.-U. Fröhlich, B. Hamprecht, F. Madeo,
D. Mecke, H. Probst, U. Weber, U. Weser
 - H.-J. Reinecke
 - K. Bock, U. Breyer-Pfaff,
M. Schwarz, E. Pfaff
 - H. Günzl, W. Pfeiffer

Lebenslauf

Silke Wissing, Tübingen

* 15.04.1971 in Emsdetten

Ausbildung, Schule

seit 01.10.2001	Promotion im Physiologisch–Chemischen-Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Madeo Thema der Doktorarbeit: Endogen Induzierter Programmierter Zelltod in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
05/2001-09/20001	Diplomarbeit im Physiologisch–Chemischen-Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fröhlich und Dr. Madeo Thema der Diplomarbeit: Mechanismen der Cdc48p ^{S565G} -vermittelten Apoptose in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
10/1999-09/2000	Praktikum am Max-Planck Institut für Biochemie in München
04/1996-09/2001	Studium der Biochemie an der Eberhard–Karl–Universität, Tübingen Abschluss: Diplombiochemikerin Wahlfach: Pharmakologie und Toxikologie Notendurchschnitt: 1.0
02/1993-01/1996	Comenius Kolleg, Mettingen Abschluss: allgemeine Hochschulreife Notendurchschnitt: 1,6
1988-1991	Ausbildung zur examinierten Krankenschwester im Herz-Jesu-Krankenhaus in Münster-Hiltrup
1987-1988	Einjährige Berufsfachschule für Ernährung und Hauswirtschaft, Hildegardisschule Münster
1981-1987	Geschwister Scholl-Realschule, Emsdetten Abschluss: mittlere Reife
1977-1981	Kardinal van Galen-Grundschule, Emsdetten

Publikationen

F.Madeo, E.Herker, C.Maldener, S.Wissing, S.Lächelt, M.Herlan, M.Fehr, K.Lauber, S.J.Sigrist, S.Wesselborg, K.U.Fröhlich. (2002). **A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast.** *Mol. Cell.*;9(4):911-7.

F.Madeo, S.Engelhardt, E.Herker, K.A.Lehmann, C.Maldener, A.Proksch, S.Wissing, und K.U.Fröhlich. 2002. **Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine.** *Curr. Genet.*;41(4):208-16.

M.Breitenbach, F.Madeo, P.Laun, G.Heeren, S.Jarolim, K.U.Fröhlich, S.Wissing, und A.Pichova. 2003. **Yeast as a model for ageing and apoptosis.** *Topics in Curr. Genet.*; 3: 61-97

E.Herker, H.Jungwirth, K.A.Lehmann, C.Maldener, K.U.Fröhlich, S.Wissing, S.Büttner, M.Fehr, S.Sigrist, und F.Madeo. 2004 **Chronological aging leads to apoptosis in yeast.** *J. Cell Biol.* 164(4):501-7.

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

F.Madeo, E. Herker, S.Wissing, H.Jungwirth, T.Eisenberg, und K.U.Fröhlich. 2004 **Apoptosis in yeast.** *Curr. Opin. Microbiol.* 7(6):655-60

N.Vahsen, C.Candé, J.J.Brière, P.Bénil, N.Joza, N.Larochette, P.G.Mastroberardino, M.O. Pequignot, N.Casares, V.Lazar, O.Feraud, N.Debili, S.Wissing, S.Engelhardt, F.Madeo, M.Piacentini, J.M.Penninger, H.Schägger, P.Rustin, und G.Kroemer. 2004. **AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation.** *EMBO Journal* 23(23):4679-89.

R.J.Braun, H.Zischka, F.Madeo, S.M.Engelhardt, S.Wissing, D.Büringer und M.Ueffing. **Mutated CDC48, the yeast orthologue of valosin-containing protein, triggers mitochondria-dependent apoptosis.** *In Revision*

L.Ramachandran, P.Laun, L.Feng, P.Liang, X.Wang, D.T.Burhans, S.Wissing, S.Jarolim, B.Suter, F.Madeo, M.Breitenbach, und W.C.Burhans. **Evidence for global silencing by ORC of budding yeast genes associated with starvation, sporulation, aging and apoptosis.** *In Revision*

S.Wissing, F.Madeo und B.Fahrenkrog. **Bir1p is a substrate for Nma111p and is able to inhibit apoptosis in yeast.** *eingereicht*

S.Büttner, T.Eisenberg, E. Herker, S.Wissing und F.Madeo. **Why it's good for yeast to kill itself.** *eingeladener Artikel, FEMS Yeast Research; eingereicht*

S.Wissing, H.Zischka, R.Braun, H.Jungwirth, P.Laun, M.Breitenbach, K.U.Fröhlich, D.Wolf, M.Ligr, E.Herker, S.Sigrist, F.Madeo. **Cdc48 regulates apoptosis by NFkappaB orthologue-dependent downregulation of mitochondrial superoxide dismutase.** *In Vorbereitung*

Vorträge

“Potential Mechanisms of *cdcd48*^{S565G} Induced Apoptosis.” 2nd International Meeting on Yeast Apoptosis, in Smolenice, Slowakische Republik.

“An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast.” Eingeladener Vortrag bei dem Söllerhaus-Meeting 2004; "Yeast, an Eukaryotic Model Organism to elucidate Central Questions in Cell Biology", in Hirschegg, Kleinwalsertal, Österreich

Poster

“An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast” 3rd International Meeting on Yeast Apoptosis, in Salzburg, Österreich