

Aus der Abteilung Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Bax-Inhibitor-1-vermittelte Neuroprotektion

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Sandra Siedenberg
aus
Minden

Göttingen 2007

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: PD Dr. med. P. Kermer

2. Berichterstatter/in:

3. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

ABKÜRZUNGEN UND ANGLIZISMEN

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchonin-Säure
BI-1	Bax-Inhibitor-1
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Ca ²⁺	Kalzium
cDNA	<i>complementary DNA</i> , durch reverse Transkription von mRNA
CMV	Zytomegalievirus
CY3	<i>cyanine 3</i>
DAPI	<i>4',6-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
dATP/ddATP	desoxy-Adenosintriphosphat/didesoxy-Adenosintriphosphat
dCTP/ddCTP	desoxy-Cytidintriphosphat/didesoxy-Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP/ddGTP	desoxy-Guanosintriphosphat/didesoxy-Guanosintriphosphat
dITP	desoxy-Inosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's <i>modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DsRed1	<i>Discosoma sp. red fluorescent protein</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP/ddTTP	desoxy-Thymidintriphosphat/didesoxy-Thymidintriphosphat
dUTP	desoxy-Uridintriphosphat
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	<i>ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'tetraacetic acid</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS gold	Foetales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HA	Hämagglutinin
293-HEK-Zellen	<i>293-human embryonic kidney-Zellen</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)

HT1080-Zellen	humane Fibrosarkom-Zelllinie
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
kDa	KiloDalton
LB	Luria-Bertani
Luminol	3-Aminophthalhydrazide
NGS	Ziegenserum (<i>normal goat serum</i>)
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OGD	Sauerstoff-/Glukose-Deprivation (<i>oxygen glucose deprivation</i>)
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIPES	<i>piperazine-N,N'-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid)</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
STS	Staurosporin
SV40	<i>simian vacuolating virus 40</i>
<i>tag</i>	kurze, einem Protein angefügte Aminosäuresequenz
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS-T	<i>tris buffered saline-Tween</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEGT	<i>testis enhanced gene transcript</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
THPS	Thapsigargin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Trizma [®] Base (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
TUN	Tunicamycin
U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett
<i>well</i>	Kammer, Vertiefung
WST-1	(4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate)
WT	Wildtyp bzw. Leervektor (Plasmid ohne Insert)

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	9-18
1.1. Apoptose.....	9
1.1.1. Apoptose und ihre Bedeutung für den Organismus.....	9
1.1.2. Extrinsische und intrinsische Apoptosekaskade.....	9
1.2. Bax-Inhibitor-1 (BI-1).....	11
1.2.1. Genetik.....	11
1.2.2. BI-1 als integrales Membranprotein.....	12
1.2.3. BI-1-Homologe.....	12
1.2.4. Expression von BI-1 in Pflanzen.....	13
1.2.5. Wirkung von BI-1 in Pflanzen und Hefen.....	14
1.2.6. Expression von BI-1 in humanen Zellen und Tumoren.....	15
1.2.7. Wirkung von BI-1 in humanen Zellen.....	16
1.3. Fragestellung dieser Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	19-41
2.1. Klonierung der BI-1-Plasmide.....	19
2.1.1. BI-1-HA-Plasmid.....	19
2.1.2. BI-1-GFP-Plasmid.....	19
2.2. Amplifikation der BI-1-Plasmide.....	20
2.2.1. Transformation kompetenter Bakterien.....	20
2.2.2. Mini-Präparation.....	21
2.2.3. Maxi-Präparation.....	22
2.3. Restriktionsenzymverdau.....	22
2.3.1. Restriktionsenzymverdau.....	22
2.3.2. Agarosegelelektrophorese.....	23
2.4. Sequenzierung der BI-1-DNA.....	24
2.5. Zelllinien.....	25
2.5.1. 293-HEK-Zellen.....	25
2.5.2. CSM14.1-Zellen.....	25
2.5.3. SH-SY5Y-Zellen.....	26
2.6. Zellkultur.....	26
2.6.1. Kultivierung, Differenzierung, Fixierung.....	26

2.6.2.	Passagierung.....	27
2.6.3.	Quantifizierung der Zellen.....	27
2.6.4.	Einfrieren der Zellen.....	28
2.6.5.	Auftauen der Zellen.....	28
2.7.	Transfektion.....	28
2.7.1.	Transiente Transfektion.....	28
2.7.2.	Stabile Transfektion.....	29
2.8.	Proteinanalyse.....	30
2.8.1.	Herstellung von zellulären Lysaten.....	30
2.8.2.	Proteinkonzentrationsbestimmung im BCA-Assay.....	31
2.8.3.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
2.8.4.	Western Blot.....	32
2.8.5.	Immunodetektion der Proteine.....	33
2.9.	Kompartiment-spezifische Fluoreszenz- und Immunfärbungen.....	34
2.9.1.	Fluoreszenzfärbungen.....	34
2.9.1.1.	MitoTracker-Fluoreszenzfärbung.....	34
2.9.1.2.	Mito-RFP-Fluoreszenzfärbung.....	35
2.9.2.	Immunfärbungen.....	35
2.9.2.1.	Anti-PDI-Immunfärbung.....	36
2.9.2.2.	Anti-Cathepsin-D-Immunfärbung.....	36
2.9.2.3.	Anti-Ubiquitin-Immunfärbung.....	36
2.10.	Zelltod-Assay an transient transfizierten Zellen.....	37
2.10.1.	Bax-Assay.....	37
2.11.	Zelltod-Assays an stabil transfizierten Zellen.....	38
2.11.1.	Staurosporin-Assay.....	38
2.11.2.	Thapsigargin-Assay.....	38
2.11.3.	Sauerstoff/Glukose-Deprivation (OGD).....	39
2.11.4.	Serumdeprivation.....	39
2.12.	Auswertung der Zelltod-Assays.....	39
2.12.1.	Manuelle Auswertung.....	40
2.12.2.	Kristallviolett-Assay.....	40
2.12.3.	WST-1-Assay.....	41

3. Ergebnisse	42-63
3.1. BI-1-Konstrukte.....	42
3.2. Restriktionsenzymverdau der BI-1-Konstrukte.....	43
3.3. Sequenzierung der BI-1-Konstrukte.....	44
3.4. Transiente Transfektion der BI-1-Konstrukte.....	44
3.4.1. Transiente Überexpression von BI-1-HA in 293-HEK-Zellen.....	44
3.4.2. Transiente Überexpression von BI-1-HA in neuronalen CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen.....	45
3.4.3. Akkumulation von BI-1-GFP in transient transfizierten CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen.....	46
3.5. Subzelluläre Lokalisation von BI-1-GFP und BI-1-GFP-Akkumulationen in transient transfizierten CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen.....	47
3.5.1. BI-1-GFP und BI-1-GFP-Akkumulationen lokalisieren nicht in Mitochondrien.....	47
3.5.2. Transient überexprimiertes BI-1-GFP lokalisiert vorwiegend im ER und im perinukleären Randsaum.....	48
3.5.3. BI-1-GFP-Akkumulationen finden sich nicht in Lysosomen.....	49
3.5.4. Akkumuliertes BI-1-GFP wird nicht ubiquitiniert.....	50
3.6. Zelltod-Assay an transient transfizierten Zellen.....	51
3.6.1. Transient BI-1-überexprimierende CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen sind nicht vor Bax-induzierter Apoptose geschützt.....	51
3.7. Stabile Transfektion der BI-1-Konstrukte.....	53
3.7.1. Stabile Überexpression von BI-1-HA in CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen.....	53
3.7.2. In stabil BI-1-HA-überexprimierenden CSM14.1-Zellen können nahezu keine BI-1-Akkumulationen nachgewiesen werden.....	54
3.7.3. Stabile Überexpression von BI-1-GFP in CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen.....	55
3.8. Subzelluläre Lokalisation von BI-1-GFP in stabil transfizierten CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen.....	56
3.8.1. Stabil überexprimiertes BI-1-GFP lokalisiert nicht in Mitochondrien.....	56
3.8.2. Stabil überexprimiertes BI-1-GFP lokalisiert vorwiegend im ER und im perinukleären Randsaum.....	57

3.9. Zelltod-Assays an stabil transfizierten Zellen.....	59
3.9.1. Stabil BI-1-HA überexprimierende CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen sind nicht vor Staurosporin-induzierter Apoptose geschützt.....	59
3.9.2. Stabil überexprimiertes BI-1 schützt CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen vor Thapsigargin-induzierter Apoptose.....	61
3.9.3. Stabil überexprimiertes BI-1 schützt CSM14.1-Zellen vor OGD- und SH-SY5Y-Zellen vor Serumdeprivation-induziertem Zelltod.....	63
4. Diskussion.....	64-72
4.1. BI-1 und Bax-induzierter Zelltod.....	64
4.2. Subzelluläre Lokalisation von BI-1.....	65
4.3. BI-1 und mitochondrialer Stress.....	66
4.4. BI-1 und ER-Stress.....	67
4.5. BI-1 und OGD/Serumdeprivation-induzierter Stress.....	69
4.6. BI-1 als Ca ²⁺ -Regulator.....	70
4.7. Fazit dieser Arbeit.....	72
5. Zusammenfassung.....	73-74
5.1. Deutsch.....	73
5.2. Englisch.....	74
6. Literaturverzeichnis.....	75-79

1. EINLEITUNG

1.1. Apoptose

1.1.1. Apoptose und ihre Bedeutung für den Organismus

Der apoptotische oder programmierte Zelltod lässt sich aufgrund biochemischer und struktureller Unterschiede vom nekrotischen Zelltod abgrenzen. Im Gegensatz zur Nekrose kommt es bei der Apoptose nicht zu einer begleitenden Entzündungsreaktion. Die Plasmamembran und die Zellorganellen bleiben in ihrer Integrität erhalten, so dass es nicht zum Austritt intrazellulärer Bestandteile kommt. Apoptose kann in einzelnen Zellen eines Gewebes stattfinden, ohne Nachbarzellen zu beschädigen. Morphologisch kommt es zu einer Chromatinkondensation, einer Fragmentierung des Kerns (Pyknose), einer Zellschrumpfung und schließlich zum Zerfall in von Plasmamembran umgebene Fragmente (*apoptotic bodies*) (Kermer und Bähr 2002).

Apoptose ist sowohl ein physiologischer als auch ein pathologischer Prozess. Physiologisch ist der programmierte Zelltod wichtig für die Aufrechterhaltung einer konstanten Größe und Zellzahl in proliferativen Geweben, wie u.a. der Haut, dem Darmepithel und dem Immunsystem. Außerdem werden zum Schutz des Gewebes infizierte oder beschädigte Zellen über Apoptose eliminiert.

Sowohl zuviel als auch zu wenig Apoptose kann jedoch pathologisch sein. Dies lässt sich an der Entwicklung von Karzinomen sowie anhand der akuten und chronischen Schädigung von Nervenzellen veranschaulichen. Während bei vielen Karzinomen aufgrund eines fehlerhaften Apoptoseprogramms die Elimination entarteter Zellen nicht gelingt, sind neben dem akuten neuronalen Trauma und der Ischämie vor allem die chronisch neurodegenerativen Krankheiten, wie z.B. Morbus Alzheimer, Chorea Huntington, Morbus Parkinson und amyotrophe Lateralsklerose durch eine Überaktivität des Apoptoseprogramms mit fortschreitendem Untergang von Nervenzellpopulationen gekennzeichnet (Kermer und Bähr 2002).

1.1.2. Extrinsische und intrinsische Apoptosekaskade

Der apoptotische Prozess läuft kontrolliert nach einem genetisch festgelegten Programm ab, das in der Evolution hoch konserviert ist. In Säugetierzellen sind bisher mindestens zwei Apoptosesignalwege im Detail untersucht worden, welche vereinfachend als extrinsischer und

intrinsischer Weg bezeichnet werden. Zwischen diesen beiden Signalwegen gibt es mehrere Querverbindungen (Kermer und Bähr 2002).

Wesentlicher Bestandteil der Apoptosekaskade sind die so genannten Caspasen (*cysteine aspartyl-specific proteases*), die zu einer Familie intrazellulärer Cysteinproteasen gehören. Zu ihren Substraten gehören beispielsweise Proteinkinasen, Proteine des Zytoskeletts und der nukleären Matrix, sowie DNA-Reparaturproteine, die über die Spaltung an Aspartat-Resten aktiviert werden können (Alnemri et al. 1996). Caspasen können über den gleichen Mechanismus auch sich selbst und andere Caspasen aktivieren. Bisher konnten 14 verschiedene Caspasen identifiziert werden, von denen mindestens 11 im menschlichen Genom zu finden sind (Reed 2002). Abhängig von ihrer N-terminalen Prodomäne werden sie in Initiator- und Effektorcaspasen unterteilt (Reed 2000). Initiatorcaspasen (z.B. Caspase-1, -8 und -9) können über ihre lange Prodomäne mit anderen aktivierenden Proteinen interagieren, während für die Prodomäne der Effektorcaspasen (z.B. Caspase-3) bislang keine Funktion bekannt ist (Kermer und Bähr 2002).

Der extrinsische Apoptoseweg wird durch die Bindung von Liganden an Rezeptoren der TNF-Familie (z.B. Trail, Fas/CD95) in der Zellmembran initiiert. Diese Rezeptoren interagieren über eine Death-Domäne (DD) mit dem Death-Effektor-Domäne(DED)-Protein Fadd, welches aus einer DD und einer DED besteht. Die Initiatorcaspase-8 verfügt N-terminal ebenfalls über eine DED, über die sie nach Interaktion mit der DED des Proteins Fadd aktiviert wird. Caspase-8 aktiviert dann die Effektorcaspase-3, die den Tod der Zelle einleitet (Kermer und Bähr 2002). Welche Rolle der extrinsische Weg im Rahmen der neuronalen Apoptose spielt, ist noch unklar. Es konnte beispielsweise eine Caspase-8-Aktivierung in Neuronen nach verschiedenen Todesstimuli beschrieben werden (Velier et al. 1999; Martin-Villalba et al. 2001), während eine Induktion neuronaler Apoptose über Todesliganden und -rezeptoren noch kontrovers diskutiert wird.

Eine hohe Relevanz des intrinsischen Signaltransduktionsweges für die neuronale Apoptose konnte hingegen bereits anhand zahlreicher Knockout-Studien belegt werden (Yuan und Yankner 2000). Der intrinsische Apoptoseweg wird durch mitochondrialen Stress initiiert, wie z.B. DNA-Schädigung, erhöhte Expression des Tumorsuppressorgens p53, erhöhten Kalziumeinstrom nach Überstimulation von Glutamatrezeptoren (Exzitotoxizität), Schädigung der Plasmamembran, oxidativen Stress (Bildung freier Radikale) und metabolischen Stress. Dies führt zur Bildung von Poren in der Mitochondrienmembran (*permeability transition pores*) und zum Ausstrom mehrerer Apoptose-relevanter Moleküle (Cytochrom-C, SMAC/Diablo, AIF (*apoptosis-inducing factor*)). Dieser Prozess wird durch

Proteine der Bcl-2 Familie kontrolliert und moduliert, wobei es solche mit pro-apoptotischer (z.B. Bax, Bad, Bid) und solche mit anti-apoptotischer (z.B. Bcl-2, Bcl-X_L) Wirkung gibt (Reed 2000). Das pro-apoptotische Bax bildet dazu beispielsweise Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran, über die es vermutlich zu einer Freisetzung von Cytochrom-C ins Zytoplasma kommt (Green und Reed 1998). Heterodimerbildung und Verschiebungen des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen bestimmen die Sensitivität oder Resistenz einer Zelle gegenüber apoptotischen Stimuli (Reed 1997, 1998; Kroemer und Reed 2000). Nachdem Cytochrom-C ins Zytoplasma gelangt ist, bildet es zusammen mit Apaf-1 (*apoptotic protease activation factor-1*) und Caspase-9 einen oligomeren Komplex, der zur Aktivierung von Caspase-9 führt (Li et al. 1997; Zou et al. 1999). Apaf-1 und Caspase-9 interagieren über eine in beiden Proteinen enthaltene CARD-Domäne (*caspase-associated recruitment domain*) (Qin et al. 1999). Die aktivierte Caspase-9 spaltet und aktiviert schließlich die Effektorcaspase-3, die für die Induktion der Apoptose verantwortlich ist (Hengartner 2000).

1.2. Bax-Inhibitor-1 (BI-1)

1.2.1. Genetik

BI-1 wurde erstmals aus dem Hoden adulter Ratten als so genanntes *testis enhanced gene transcript* (TEGT) isoliert. Dieses Transkript konnte später auch im Genom anderer Spezies identifiziert werden (Walter et al. 1994, 1995). TEGT ist 1998 in BI-1 umbenannt worden, nachdem es im Rahmen eines cDNA-screenings in Hefen auf der Suche nach humanen Bax-Inhibitoren als solcher entdeckt worden ist (Xu Q und Reed 1998).

Bei Ratten findet sich das BI-1-Gen auf Chromosom 7, bei Mäusen auf Chromosom 15, bei Schweinen auf Chromosom 5 und bei Menschen auf Chromosom 12q12-q13 (Walter et al. 1994, 1995; Kim et al. 2003).

In BI-1 aus Ratten konnten zwei verschiedene TATA-lose Promotor-Regionen (P1 und P2) beschrieben werden, die die BI-1-Expression regulieren. Der distale Ratten-BI-1-Promotor kommt dabei ubiquitär im ganzen Organismus vor, während der proximale Promotor nur im Hoden gefunden werden konnte (Jean et al. 1999).

Bei BI-1 scheint es sich nicht um ein essentielles Gen zu handeln, da homozygot BI-1-negative Mäuse in der Entwicklung keinerlei schwerwiegende Verhaltensauffälligkeiten oder histologische Veränderungen zeigten (Chae et al. 2004).

1.2.2. BI-1 als integrales Membranprotein

Das humane BI-1-Protein besteht aus 237 Aminosäuren und ist ein 25-27 kDa schweres integrales Membranprotein mit 6-7 transmembranen Domänen (Xu Q und Reed 1998). Sowohl der N- als auch der C-Terminus zeigen dabei ins Zytoplasma, was an BI-1-Homologen aus Raps gezeigt werden konnte (Bolduc et al. 2003). Dafür spricht außerdem, dass in den meisten eukaryotischen BI-1-Proteinen eine RXR- und/oder KKXX-ähnliche Aminosäuresequenz in der Nähe des C-Terminus nachweisbar ist, was für Membranproteine, deren C-Terminus ins Zytoplasma zeigt, typisch ist (Shikano und Li 2003; Hückelhoven 2004).

Über den C-Terminus, der sich als essentiell für die Zelltod-regulierende Funktion von BI-1 erwiesen hat, erfolgen vermutlich Protein-Protein-Interaktionen (Yu LH et al. 2002; Chae et al. 2003; Kawai-Yamada et al. 2004). Beispielsweise erfolgt die Interaktion von BI-1 mit anti-apoptischen Bcl-2-Proteinen wie Bcl-2 und Bcl-X_L über deren sogenannte BH4-Domäne. BI-1 ist kein Mitglied der Bcl-2-Familie und verfügt selbst nicht über eine BH4-Domäne. Eine Komplexbildung von BI-1 mit Bax ist aus diesem Grund nicht möglich, da auch Bax, wie die meisten pro-apoptischen Bcl-2-Proteine, nicht über eine BH4-Domäne verfügt (Xu Q und Reed 1998).

1.2.3. BI-1-Homologe

BI-1 bzw. BI-1-ähnliche Genprodukte finden sich in vielen Lebensformen. Am besten untersucht sind BI-1-Homologe, die sich aus verschiedenen Pflanzenspezies, wie z.B. AtBI-1 aus Senf (*Arabidopsis thaliana*), OsBI-1 aus Reis (*Oryza sativa*), HvBI-1 aus Gerste (*Hordeum vulgare*), BnBI-1 bzw. BoBI-1 aus Raps (*Brassica napus* bzw. *oleracea*), NtBI-1 aus Tabak (*Nicotiana tabacum*) und LeBI-1 aus Tomaten (*Lycopersicon esculentum*) isolieren lassen (Kawai et al. 1999; Sanchez et al. 2000; Hückelhoven et al. 2001; Bolduc und Brisson 2002; Chae et al. 2003; Bolduc et al. 2003; Coupe et al. 2004). Aber auch in Bakterien, Viren (z.B. verschiedene Zytomegalieviren, humanes Herpesvirus), Hefen und Pilzen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Emericella nidulans*), Insekten (z.B. *Drosophila melanogaster*), Würmern (z.B. *Caenorhabditis elegans*), verschiedenen Säugetierspezies (z.B. Ratten, Mäuse) und Menschen lassen sich BI-1-Homologe nachweisen. Über 200 Proteine mit einer Homologie zu BI-1 konnten bisher in verschiedenen Eukaryoten und Bakterien identifiziert und zum Teil verglichen werden (Kawai et al. 1999; Chae et al. 2003; Bolduc et al. 2003).

Auf Ebene der Aminosäuresequenz weisen die oben genannten BI-1-Pflanzenhomologe alle zu einem hohen Prozentsatz (teilweise über 90%) identische oder zumindest ähnliche Aminosäuren auf. Weitere Vergleiche von BI-1 aus Pflanzen mit humanem bzw. Ratten-BI-1 haben eine zu 38-42% identische Aminosäuresequenz ergeben, während bei einem Vergleich von Pflanzen-BI-1 zu Drosophila-BI-1 diese nur zu 26-28% identische Aminosäuren zeigen (Bolduc et al. 2003).

Aufgrund der starken strukturellen Ähnlichkeit der Homologe wird vermutet, dass BI-1 möglicherweise bakteriellen Ursprungs ist, und über einen horizontalen Gentransfer in das eukaryotische Genom integriert wurde (Hückelhoven 2004). Eine ähnliche Evolution ist auch für andere Mitglieder der Apoptosekaskade, wie z.B. die Caspasen, bekannt (Aravind et al. 2001). Auch in seiner Funktion ist BI-1 hoch konserviert, was sich v.a. dadurch belegen lässt, dass die verschiedenen BI-1-Homologe auch in artfremden Geweben eine anti-apoptotische Wirkung gegenüber unterschiedlichen Zelltodinduktoren entfalten. Beispielsweise schützt sowohl humanes als auch pflanzliches BI-1 in Hefen oder humanen Zellen vor Bax-induziertem Zelltod (Xu Q und Reed 1998; Kawai et al. 1999; Bolduc et al. 2003). Obwohl z.B. in Pflanzen- und Hefezellen physiologisch keine Homologe von Bax oder Bcl-2 existieren, kann BI-1 hier dennoch als Bax-Inhibitor wirken (Hückelhoven 2004).

1.2.4. Expression von BI-1 in Pflanzen

BI-1 ist nicht nur in vielen Spezies verbreitet, sondern es kommt auch innerhalb einzelner Organismen beinahe ubiquitär vor. Dies gilt für Säugetiere, aber auch für verschiedene Pflanzenarten. BI-1 kann in Reispflanzen beispielsweise sowohl in den Wurzeln als auch in Trieben und Blättern lokalisiert werden (Kawai et al. 1999).

Die Expression von BI-1 kann dabei durch biotische und abiotische Zelltodstressoren beeinflusst werden. In Gerstepflanzen ließ sich beispielsweise eine Expressionserhöhung von endogenem HvBI-1 als Antwort auf die Interaktion mit dem Gerste-spezifischen Schimmelpilz *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Bgh) feststellen (Hückelhoven et al. 2001). Eine leichte HvBI-1-Expressionssteigerung konnte sogar nach Behandlung von Gerste mit einem Weizen-spezifischen Schimmelpilz (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (Bgt)) beobachtet werden. Eine Überexpression von HvBI-1 in Gerstезellen führte außerdem zu einer Senkung der Empfänglichkeit gegenüber einer Bgt-Penetration (Eichmann et al. 2004).

Eine gesteigerte Expression von endogenem AtBI-1 zeigte sich außerdem sowohl nach der Auslösung von oxidativem Stress durch H₂O₂ oder Salicylsäure in Arabidopsiszellen, als auch nach mechanischer Verletzung der Blätter der Arabidopsispflanze (Kawai-Yamada et al.

2004; Sanchez et al. 2000). Nach Interaktion dieser Pflanze mit Erregern wie *Escherichia coli* oder der virulenten bzw. avirulenten Form des phyto-genen Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (DC3000), ließ sich ebenfalls eine Induktion der AtBI-1-Expression nachweisen (Sanchez et al. 2000). Analog konnte auch in Tomatenpflanzen eine Steigerung der eigenen BI-1-Produktion nach stressabhängiger H₂O₂ - Akkumulation beobachtet werden. Der gleiche Effekt zeigte sich ebenfalls nach Behandlung der Pflanzen mit Cucumber-Mosaic-Virus-D-Satelliten-RNA (Xu P et al. 2003).

In verletztem oder infiziertem Pflanzengewebe kommt es somit in der Regel zu einer Induktion der BI-1-Expression, was auf eine Involvierung von BI-1 in zelltodregulatorische Prozesse hinweist. Bisher konnten für pflanzliches BI-1 jedoch noch keine Promotorelemente analysiert werden, die zu einem besseren Verständnis der Verteilung und Regulation des BI-1-Expressionsmusters beitragen könnten (Hückelhoven 2004).

1.2.5. Wirkung von BI-1 in Pflanzen und Hefen

Auch bei Pflanzen und Hefen gibt es viele Elemente, die sich mit Prozessen der Apoptose in Säugetierzellen überschneiden. Beispielsweise kommt es auch hier zu Phänomenen wie Pyknose, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung (Lam et al. 2001). Die Reaktion (*hypersensitive response* (HR)) von Pflanzen auf Bakterien, Viren, Pilze, u.a. kann als eine Form von programmiertem Zelltod beschrieben werden (Richberg et al. 1998; Ryerson und Heath 1996). Schlüsselsignale sind dabei u.a. die Akkumulation von H₂O₂ und O₂⁻ (Delledonne et al. 1998, 2001), die auch über eine Freisetzung von Cytochrom-C und verschiedenen Ionen zum Zelltod führen (Rao und Davis 1999; Houot et al. 2001; Maxwell et al. 2002; Tiwari et al. 2002).

Viele Apoptoseinduktoren, wie z.B. H₂O₂, Salicylsäure oder Bax, greifen in das zelleigene Redox-System von Pflanzen ein und lösen so eine HR-Reaktion aus (Rao und Davis 1999; Alvarez 2000; Hoeberichts und Woltering 2003; Baek et al. 2004). BI-1 zeigte dabei gegenüber solchen Stressoren eine vorwiegend anti-apoptotische Wirkung, wobei bisher nicht klar ist, an welcher Stelle BI-1 in die HR-Reaktion eingreift, da die begleitende H₂O₂ - und O₂⁻ - Akkumulation oft unbeeinflusst blieb.

So konnten BI-1-überexprimierende Hefen beispielsweise vor Zelltod durch H₂O₂ und Hitze geschützt werden. Umgekehrt führte die Ausschaltung des endogenen BI-1 zu einer Sensibilisierung von Hefezellen gegenüber diesen Stressoren. In LeBI-1-überexprimierenden Tabakpflanzen konnte ebenfalls, nach Zelltodinduktion durch Hitze, Kälte und Salz, eine erniedrigte Apoptoserate nachgewiesen werden (Chae et al. 2003). In BY-2-Tabakzellen, in

denen die endogene Expression von NtBI-1 unterdrückt worden war, ließ sich umgekehrt eine deutlich beschleunigte Apoptoserate im Vergleich zu Kontrollzellen beobachten, nachdem die Zellen durch Sucroseentzug und hypo-osmotischen Schock gestresst worden waren (Bolduc und Brisson 2002).

Ein protektiver Effekt von BI-1 konnte außerdem *in vivo* und *in vitro* nach Apoptoseinduktion durch Bax in Arabidopsispflanzen und -protoplasten bestätigt werden. AtBI-1-überexprimierende Arabidopsis-Protoplasten wurden dabei nicht direkt über einen Eingriff in die durch Bax ausgelösten oxidativen Prozesse geschützt, sondern über einen noch nicht weiter bekannten H_2O_2 - bzw. O_2^- - unabhängigen Weg (Baek et al. 2004; Kawai-Yamada et al. 2001). Hefezellen konnten nach Überexpression von BI-1 aus Pflanzen, Hefen oder Drosophila gleichermaßen vor Bax-induziertem Zelltod geschützt werden (Kawai et al. 1999; Sanchez et al. 2000; Chae et al. 2003).

1.2.6. Expression von BI-1 in humanen Zellen und Tumoren

Auch im Säugetierorganismus ist BI-1 beinahe ubiquitär nachweisbar. Expressionsmusteranalysen mit Hilfe von RNA-blots haben ergeben, dass BI-1 *in vivo* in den meisten Organen der Maus, wie z.B. Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere und Pankreas exprimiert wird (Xu Q und Reed 1998). Eine physiologisch erhöhte BI-1-Produktion konnte in primären Gelbkörperzellen aus den Ovarien von IVF(in-vitro-Fertilisation)-Patientinnen nach Behandlung mit den Gonadotropinen LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (follikelstimulierendes Hormon) festgestellt werden. LH und FSH beeinflussen cAMP-abhängig Proliferation und Hormonproduktion des Ovars. Es wird spekuliert, dass BI-1 über LH eine protektive Wirkung gegenüber Abstoßungsreaktionen auf den Gelbkörper hat (Sasson et al. 2004).

Aber auch in verschiedenen Tumorgeweben findet sich eine vorwiegend gesteigerte Expression von BI-1. Beispielsweise zeigte sich in Gliomzellen eine erhöhte BI-1-Produktion im Vergleich zur niedrigen BI-1-Basisproduktion des normalen Hirngewebes (Schmits et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen an Uterus-, Ovarial- und Lungen-Karzinomen (Grzmil et al. 2006; Tanaka et al. 2006).

In Brustkrebszellen ließ sich ebenfalls eine gesteigerte BI-1-Expression im Vergleich zu gesundem Brustgewebe nachweisen (van't Veer et al. 2002). Nach Behandlung mit dem Antiöstrogen Tamoxifen zeigte sich dagegen eine erniedrigte BI-1-Expression (del Carmen Garcia Molina Wolgien et al. 2005). Umgekehrt konnte in Östrogen-unabhängigen, nicht jedoch in Östrogen-abhängigen, humanen Mamma-Karzinom-Zelllinien, nach Ausschaltung

von BI-1, eine signifikant gesteigerte spontane Apoptoserate beobachtet werden (Grzmil et al. 2006). Es zeigt sich somit, dass BI-1 eine wichtige Rolle in der Apoptoseregulation von Brustkrebs spielt, in Expression und Wirkung jedoch von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden kann.

Analysen von Zellen aus Prostata-Karzinomen haben ergeben, dass in den meisten Tumoren dieser Art die BI-1-Expression im Vergleich zu gesundem Prostataepithel deutlich erhöht ist. Nach Degradierung zelleigener BI-1-mRNA kam es in verschiedenen Prostata-Karzinom-Zelllinien zu einer Caspase-3-Aktivierung und spontaner Apoptose. BI-1 scheint somit auch Karzinomzellen der Prostata vor Apoptose zu schützen und könnte einen Angriffspunkt für neue Therapieformen darstellen (Grzmil et al. 2003).

Auch in ALK(*anaplastic large cell kinase*)-positiven Zellen einer Zelllinie (COST) aus einem anaplastischen großzelligen Lymphom (ALCL) konnte eine erhöhte BI-1-Expression nachgewiesen werden (Villalva et al. 2002). Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 war im Gegensatz dazu in diesen Zellen bis zur Nachweisgrenze herunter reguliert (Schlaifer et al. 1996), weswegen es Überlegungen gibt, dass in diesen Zellen eine hohe BI-1-Produktion der Kompensation des praktisch fehlenden Bcl-2 dient (Villalva et al. 2002).

Die tatsächliche Bedeutung der BI-1-Überexpression in humanen Tumoren ist bisher noch wenig erforscht. Auch ist bisher wenig über die Faktoren bekannt, die die BI-1-Expression regulieren oder beeinflussen können. Es zeigt sich jedoch, dass BI-1 ebenfalls in zellprotektive Prozesse der Apoptoseregulation von Tumoren involviert ist.

1.2.7. Wirkung von BI-1 in humanen Zellen

Über die Wirkung von BI-1 in humanen Zellen ist bisher weitaus weniger bekannt, als über die Wirkung in Pflanzenzellen. Insgesamt lässt sich eine vorwiegend anti-apoptotische Wirkung von BI-1 anhand einiger Experimente mit verschiedenen humanen Zelllinien bestätigen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die anti-apoptotische Wirkung von BI-1 primär vom Apoptosestimulus abhängig zu sein scheint.

In 293-HEK(*human-embryonic-kidney*)-Zellen konnte beispielsweise eine protektive Wirkung von pflanzlichem NtBI-1, BnBI-1 (Bolduc et al. 2003) und humanem BI-1 (Xu Q und Reed 1998) gegenüber Bax-induzierter Apoptose dokumentiert werden. Umgekehrt führte die Hemmung des zelleigenen BI-1-Proteins in diesen Zellen zur Induktion von Apoptose (Xu Q und Reed 1998). In HeLa229-Zellen (humane Zervix-Adenokarzinom-Zellen) sind Experimente mit dem pathogenen, obligat intrazellulären Bakterium *Chlamydia psittaci* als Zelltodinduktor durchgeführt worden, wodurch es ebenfalls zu einer Aktivierung von Bax

kommt. Eine transiente BI-1-Überexpression in infizierten Zellen führte, über einen mutmaßlich Caspase-unabhängigen Weg, zu einer Reduktion der Apoptoserate von bis zu 90% (Perfettini et al. 2002). Auf ähnlich hohem Niveau wie Bcl-2 konnte BI-1 außerdem in FL5.12-Zellen (Interleukin-3-abhängige pro-B-Lymphozyten) vor Apoptose durch Interleukin-3-Entzug schützen (Xu Q und Reed 1998).

Gegenüber direkten Induktoren des extrinsischen Apoptosewegs konnte dagegen bisher keine anti-apoptotische Wirkung von BI-1 dokumentiert werden. Beispielsweise zeigte sich kein protektiver Effekt in BI-1-überexprimierenden 293-HEK-Zellen nach Behandlung mit dem TNF-Rezeptor Fas/CD95 (Xu Q und Reed 1998). In stabil transfizierten HT1080-Zellen (humane Fibrosarkom-Zelllinie) konnte BI-1 analog dazu nicht vor Apoptose durch anti-Fas-Rezeptor-Antikörper schützen. Diese Ergebnisse konnten auch in primären embryonalen Fibroblasten, Hepatozyten und Neuronen aus BI-1-Knockout-Mäusen bestätigt werden. Nach Behandlung der Zellen mit anti-Fas-Rezeptor-Antikörpern konnte auch hier kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate der BI-1^{-/-}-Knockout-Zellen im Vergleich zu BI-1^{+/+}-Zellen aus Kontrollmäusen festgestellt werden (Chae et al. 2004). In anderen Experimenten sind Zellen der Kolon-Karzinom-Zelllinien SW480 und HCT116 mit dem TNF-Rezeptor-Liganden TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) behandelt worden. TRAIL ist ebenfalls ein potenter Apoptoseinduktor des extrinsischen Wegs in vielen Tumorzelllinien, während gesunde Zellen vor seinen zytotoxischen Effekten geschützt sind (Walczak et al. 1999; Ashkenazi et al. 1999). Eine BI-1-Überexpression konnte in diesem Modell ebenfalls nicht vor Apoptose schützen (Burns und El-Deiry 2001).

1.3. Fragestellung dieser Arbeit

Zusammenfassend präsentiert sich BI-1 als ein strukturell und funktionell konserviertes integrales Membranprotein, dessen C-Terminus essentiell für seine Funktion ist. BI-1 konnte sowohl in verschiedenen Eukaryoten als auch in Prokaryoten und Viren nachgewiesen werden. Es wird in Pflanzen und Säugetieren weitgehend ubiquitär exprimiert. Die BI-1-Expression kann durch verschiedene abiotische und biotische Stressoren beeinflusst werden und ist in vielen Tumoren erhöht.

Zum jetzigen Stand der Forschung gibt es vorwiegend Erkenntnisse über BI-1 und seine Funktion als Apoptoseregulator anhand von Untersuchungen in Hefen, Pflanzen und verschiedenen humanen Tumorzelllinien. Die Wirkung von BI-1 in Neuronen ist jedoch bisher kaum betrachtet worden.

Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Frage nach der Relevanz von BI-1 für die neuronale Apoptose. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf die intrazelluläre Lokalisation von BI-1 in Neuronen gelegt. Aber auch die Funktion von BI-1 gegenüber verschiedenen Apoptosestimuli wird anhand von in-vitro-Experimenten in verschiedenen neuronalen Zelllinien untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Klonierung der BI-1-Plasmide

Klonierung beschreibt die Einführung eines DNA-Fragments (Insert) in ein Plasmid (zirkuläre Doppelstrang-DNA). Durch einen Verdau mit sogenannten Restriktionsenzymen wird die Plasmid-DNA an entsprechenden Punkten (Restriktionsstellen) geschnitten und das passende Fragment mit Hilfe des Enzyms Ligase in die Sequenz eingefügt (Ligation). Hierbei können auch kurze Erkennungssequenzen, sogenannte *tags*, an das Gen von Interesse angehängt werden (z.B. HA-, FLAG-, GFP-tag). Über ein so kloniertes Plasmid wird die Vermehrung des DNA-Fragments, die Expression in Zellen verschiedener Spezies und die Selektion durch Antibiotika ermöglicht.

2.1.1. BI-1-HA-Plasmid

Zur Konstruktion eines C-terminal HA-getaggten BI-1-Plasmids, wurde die 0,7 kb BI-1-cDNA mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoR I und Xho I in die Klonierungsstelle eines pcDNA3-HA-Vektors kloniert. HA (Hämagglutinin) determiniert eine kurze Sequenz, bestehend aus 11 Aminosäuren, über die das BI-1-Protein in Immunoblots detektiert werden kann. Der eukaryotische pcDNA3-Expressionsvektor (5,4 kb) enthält eine bakteriell exprimierbare Ampicillin-Antibiotikaresistenzkassette, ein virales CMV-Promotor-Element, ein SV40-Replikationsstart-Element und eine Neomycinresistenz-Expressionskassette, über die eine Selektion transfizierter eukaryoter Zellen möglich ist (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Das BI-1-HA-Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. John C. Reed, Burnham Institute (La Jolla, CA, USA) zur Verfügung gestellt.

2.1.2. BI-1-GFP-Plasmid

Zur Konstruktion eines C-terminal GFP-getaggten BI-1-Plasmids, wurde die BI-1-cDNA aus dem BI-1-HA-Plasmid herausgeschnitten und ebenfalls über EcoR I und Xho I in die Klonierungsstelle eines pEGFP-N2-Vektors (Clontech, Palo Alto, CA, USA) kloniert.

GFP detektiert ein fluoreszierendes 28 kDa Quallenprotein, welches nach Anregung durch blaues oder UV-Licht, grün fluoresziert (Prasher et al. 1992). EGFP ist eine GFP-Variante, welche in humanen Zellen schneller und effizienter exprimiert wird als Wildtyp-GFP. Der pEGFP-N2-Expressionsvektor (4,7 kb) enthält eine in *E. coli*-Bakterien exprimierbare

Kanamycin-Antibiotikaresistenzkassette, und ebenfalls ein virales CMV-Promotor-Element, ein SV40-Replikationsstart-Element und eine Neomycinresistenz-Expressionskassette, zur möglichen Selektion transfizierter Zellen mit den Antibiotika Neomycin bzw. G418 (Clontech).

2.2. Amplifikation der BI-1-Plasmide

2.2.1. Transformation kompetenter Bakterien

Für die Amplifikation ligierter Plasmide wird die Eigenschaft einiger Bakterien ausgenutzt, ringförmige DNA unabhängig von ihrem eigenen Genom vervielfältigen zu können. Über eine Transformation werden Plasmide in kompetente (d.h. aufnahmefähige) Bakterien eingebracht.

Sowohl das BI-1-HA-, als auch das BI-1-GFP-Plasmid wurden über eine Kalziumchlorid-vermittelte Transformation mit Hilfe von plötzlichen Temperaturänderungen in Bakterien eingeschleust. Als kompetente Bakterien wurden bei -80°C in steriler Kalziumchlorid-Lösung gelagerte E. coli DH5 α -Bakterien (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet. Für die Transformation wurden jeweils 100 μl kompetente E. coli-Bakterien mit je 5 μl BI-1-HA- bzw. BI-1-GFP-Ligationsansatz versetzt. Nach Inkubation für 30 min. auf Eis wurden beide Transformationsansätze im Wasserbad für 45 sek. auf 42°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Zur Vermehrung der Bakterien wurden die Proben in je 250 μl sterilem SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Für ein selektives Wachstum von einzelnen Bakterienkolonien wurden die mit BI-1-HA transformierten Bakterien dünn auf sterilem Ampicillin-haltigen LB-Agar ausgesät, während BI-1-GFP transformierte Bakterien auf Kanamycin-haltigem LB-Agar ausplattiert wurden. Nach Inkubation für 24 Stunden bei 37°C konnten auf diesen Selektionsnährböden aufgrund der Antibiotikaresistenzen beider BI-1-Plasmide nur erfolgreich transformierte Bakterien wachsen.

<u>Kalziumchlorid-Lösung</u>	60 mM CaCl ₂ ; 15 % Glycerol; 10 mM PIPES (pH 7,0)	
<u>SOC-Medium</u>	0,5 % Hefeextrakt; 2 % Tryptone; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glukose	
<u>Antibiotika-haltiger LB-Nährboden</u>	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin in LB-Agar	Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

<u>LB-Agar</u>	30 g/l LB-Agar in purifiziertem H ₂ O	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)
----------------	---	------------------------------------

2.2.2. Mini-Präparation

Mit Hilfe von Plasmid-Präparationen können amplifizierte Plasmide wieder aus Bakterien isoliert werden. Durch die Elution von Plasmiden über eine Mini-Präparation kann Plasmid-DNA in analytischen Mengen (etwa 20 µg) gewonnen werden.

Nach Transformation wurden für beide BI-1-Plasmide mehrere Bakterienkolonien von der Agarplatte in je 2 ml Ampicillin- bzw. Kanamycin-haltiges LB-Medium überführt und unter Schütteln für 16 h bei 37°C selektiv amplifiziert. Von jedem Ansatz wurde die Hälfte für eine Mini-Präparation verwendet, während die andere Hälfte bei 4°C für eine spätere Maxi-Präparation asserviert wurde.

<u>Antibiotika-haltiges LB-Medium</u>	100 µg/ml Ampicillin bzw. 10 µg/ml Kanamycin in LB-Medium	Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
<u>LB-Medium</u>	20 g/l LB Broth (Lennox) in purifiziertem H ₂ O	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

Die Mini-Präparation wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid-Präparations-Kits der Firma QIAGEN (Hilden) mit beiliegenden Puffern nach dem beigefügten QIAprep Spin Plasmid-Standardprotokoll durchgeführt.

Zur Lysierung der Bakterien wurden, nach kurzer Zentrifugation, die Pellets aller Mini-Präparations-Ansätze nacheinander mit je 250 µl Puffer P1 (Resuspensionspuffer), 250 µl Puffer P2 (Lysepuffer) und 350 µl Puffer N3 resuspendiert. Nach Abzentrifugieren des Bakteriendetritus bei 10000 x g für 10 min. bei Raumtemperatur, wurde der DNA-haltige Überstand in QIAprep-Spin-Säulen überführt. Durch anschließende Zentrifugation bei 10000 x g für 30-60 sek. bei Raumtemperatur wurden DNA und Überstand getrennt, wobei die DNA in den Säulen verblieb. Die DNA wurde in zwei Schritten mit je 0,5 ml Puffer PB (inaktiviert Nukleasen) und 0,75 ml Puffer PE gewaschen. Die Waschpuffer wurden zwischenzeitlich durch kurzes Abzentrifugieren entfernt. Durch Zugabe von je 50 µl TE-Puffer und anschließender kurzer Zentrifugation wurden die Plasmide aus den Säulen eluiert und später bei 4°C gelagert. Reinheit und Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA wurden mit Hilfe eines Bio-Photometers der Firma Eppendorf (Hamburg) bestimmt.

Alle so gewonnenen Plasmidansätze wurden über einen Restriktionsenzymverdau (2.3.) auf Anwesenheit der BI-1-HA- bzw. BI-1-GFP-Inserts im Plasmid überprüft. Anhand des Verdau wurden für beide BI-1-Inserts Mini-Präparations-Ansätze für eine weitere Plasmidamplifikation im Großansatz mit anschließender Maxi-Präparation ausgewählt.

TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-Cl (pH 8,0); 1 mM EDTA
--------------------	-----------------------------------

2.2.3. Maxi-Präparation

Über eine Maxi-Präparation kann Plasmid-DNA in präparativen Mengen (etwa 500 µg) aus transformierten Bakterien gewonnen werden. Ausgangspunkt für die Maxi-Präparation war für beide BI-1-Inserts jeweils ein über den Restriktionsenzymverdau ausgewählter Mini-Präparations-Ansatz. Die Bakterien beider Mini-Präparations-Ansätze wurden hierzu, nach Überführung in jeweils 200 ml Ampicillin- bzw. Kanamycin-haltiges LB-Medium, für 16 h bei 37°C selektiv amplifiziert.

Die Maxi-Präparation wurde mit Hilfe des QIAfilter Plasmid Maxi-Präparations-Kits (QIAGEN) mit beiliegenden Puffern nach dem beigefügten Protokoll durchgeführt. Dieses ist bis auf die Einführung zusätzlicher Reinigungsschritte mit der Mini-Präparation vergleichbar. Auf eine ausführliche Darstellung wird deshalb verzichtet.

Nach erneuter Kontrolle der Inserts über einen weiteren Restriktionsenzymverdau (2.3.) und eine zusätzliche Sequenzierung (2.4.), wurden die so gewonnenen BI-1-HA- bzw. BI-1-GFP-Plasmidansätze für alle weiteren Experimente verwendet.

2.3. Restriktionsenzymverdau

2.3.1. Restriktionsenzymverdau

Über einen Restriktionsenzymverdau kann die Anwesenheit eines Inserts in der Klonierungsstelle eines Plasmidvektors überprüft werden. Dazu wird amplifiziertes Plasmid z.B. mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, über die das Insert in den Vektor kloniert worden ist.

Die BI-1-HA- bzw. BI-1-GFP-Inserts wurden nach Mini- und Maxi-Präparation mit den Restriktionsenzymen EcoR I und Xho I aus ihren Plasmidvektoren geschnitten. Der BI-1-HA-Plasmidansatz wurde zusätzlich mit weiteren Enzymen (Bam HI, Hind III, Xba I) verdaut, welche das Plasmid innerhalb der Klonierungsstelle bzw. innerhalb des Inserts an bestimmten Restriktionsstellen schneiden. Die verschiedenen Restriktionsenzymverdau-Ansätze wurden

für jeweils 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Inaktivierung der Enzyme wurden die Proben bis zur Agarosegelelektrophorese bei 4°C gelagert. Alle verwendeten Reagenzien wurden unter vom Hersteller (NEB, Frankfurt a.M.) empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen kombiniert.

<u>EcoR I/Xho I-Verdau</u> (20 µl-Ansatz)	<u>Bam HI-Verdau</u> (20 µl-Ansatz)	<u>Hind III/Xba I-Verdau</u> (20 µl-Ansatz)
1 µg Plasmid-DNA 0,5 µl EcoR I; 0,5 µl Xho I 2 µl 10 x EcoR I-Puffer in purifiziertem H ₂ O	1 µg Plasmid-DNA 0,5 µl Bam HI 2 µl 10 x Bam HI-Puffer 0,2 µl 100 x BSA (10 mg/ml) in purifiziertem H ₂ O	1 µg Plasmid-DNA 0,5 µl Hind III; 0,5 µl Xba I 2 µl 10 x Puffer 2 0,2 µl 100 x BSA (10 mg/ml) in purifiziertem H ₂ O
1 x EcoR I-Puffer (pH 7,5 bei 25°C)	50 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 0,025 % Triton X-100	
1 x Bam HI-Puffer (pH7,9 bei 25°C)	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT	
1 x Puffer 2 (pH 7,9 bei 25°C)	50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT	

2.3.2. Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden. Die DNA wandert dabei aufgrund von negativ geladenen DNA-Bestandteilen zur Anode.

Die Agarosegelelektrophorese wurde mit Hilfe des Mini-Sub[®] Cell GT-Systems der Firma Bio-Rad (Hercules, CA, USA) durchgeführt. Nach dem Verdau wurden dazu 8 µl von jeder Probe im Verhältnis 4:1 mit Ladepuffer (Nucleic Acid Sample Loading Buffer 5 x, Bio-Rad) versetzt und in die Taschen eines Ethidiumbromid-haltigen 1 % Agarosegels (Volumen 40 ml) aufgetragen. Als DNA-Marker wurden jeweils 2 µl GIBCO[®] 1 kb plus-Marker der Firma Invitrogen verwendet. Die DNA-Fragmente wurden in TBE-Puffer bei Raumtemperatur für etwa eine Stunde bei 100 Volt aufgetrennt (Trennstrecke ca. 7 cm). Über die Fluoreszenzaktivität des interkalierenden Ethidiumbromids konnte die DNA anschließend, nach Anregung durch UV-Licht, in einem Gel doc-Imager (Bio-Rad) mit Hilfe des Computerprogramms Quantity One 4.2.1 sichtbar gemacht werden.

Agarosegel	1 % Agarose 0,006 % Ethidiumbromid (10 mg/ml) in TBE-Puffer	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg) Sigma-Aldrich (Steinheim)
TBE-Puffer	84 mM/l Tris-Base; 89 mM/l Borsäure; 2 mM/l Na ₂ -EDTA	

2.4. Sequenzierung der BI-1-DNA

Da über einen Restriktionsenzymverdau nur Lage und Anwesenheit, nicht aber die korrekte Basenfolge eines Inserts in einem Plasmid überprüft werden kann, wurde zusätzlich eine Sequenzierung durchgeführt, wodurch die genaue Nukleotidsequenz eines DNA-Fragments ermittelt und, zum Ausschluss von Mutationen, mit der in Gendatenbanken verzeichneten bekannten Basenfolge verglichen werden kann.

Methodisch beruht die Sequenzierung auf einem von Fred Sanger und Alan Coulson entwickelten PCR-ähnlichen Prinzip (Sanger et al. 1977). Bei einer Sequenzierungs-PCR werden einem Standard-PCR-Ansatz, zusätzlich zu den regulären Desoxynukleotiden (dNTPs), ddNTPs der A-, T-, C- und G-Form hinzugefügt. Dabei handelt es sich um mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide, denen an der 3'-Position der Desoxyribose die Hydroxylgruppe fehlt, die für die Verlängerung des DNA-Stranges notwendig ist. Nach Einbau eines ddNTPs kommt es zu einem Abbruch der DNA-Synthese, wodurch keine vollständigen Kopien der Template-DNA, sondern nur mehrere unterschiedlich lange komplementäre DNA-Fragmente synthetisiert werden können. Die Nukleotidsequenz der gesamten zu sequenzierenden DNA wird nach Auftrennung dieser DNA-Fragmente der Größe nach, mit Hilfe der spezifischen Fluoreszenzmarkierung der vier verschiedenen ddNTPs ermittelt.

Die doppelsträngige BI-1-DNA des BI-1-HA- und des BI-1-GFP-Konstrukts wurde in je zwei Ansätzen in beide Leserichtungen unter Verwendung spezifisch konstruierter Primer sequenziert, die jeweils ihren spezifischen Ansatzpunkt an den Enden der Klonierungsstellen der Vektoren haben. Alle PCR-Ansätze wurden auf Eis in autoklavierten Reaktionsgefäßen angesetzt. Die Sequenzierungs-PCR wurde in einer Cyclone 25-PCR-Maschine der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) durchgeführt. Zur Fällung und Aufreinigung der DNA wurden die PCR-Ansätze mit je 1 µl 3M Natriumacetat und 25 µl 100 % Ethanol absolut versetzt und für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur für 20 min. bei 16060 x g wurde jedes Pellet in 1 ml 70 % Ethanol aufgenommen und erneut bei Raumtemperatur für 10 min. bei 16060 x g abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde die DNA aller PCR-Ansätze für 15 min. bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert. Die Sequenzierung wurde, nach Resuspension der DNA, in einem automatischen Sequenzer (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

durchgeführt. Die so erhaltene Basenfolge wurde anschließend manuell mit der bekannten BI-1-Sequenz (Xu Q und Reed 1998) verglichen.

<u>PCR-Ansatz „vorwärts“ (10µl)</u>		<u>PCR-Ansatz „rückwärts“ (10µl)</u>		
500 ng Plasmid-DNA 2 µl Primer (5 pmol/µl) T7-Primer für BI-1-HA bzw. pEGFP-Primer 1 für BI-1-GFP 2 µl Sequenzier-Mix in H ₂ O+DEPC		500 ng Plasmid-DNA 2 µl Primer (5 pmol/µl) Sp6-Primer für BI-1-HA bzw. pEGFP-Primer 2 für BI-1-GFP 2 µl Sequenzier-Mix in H ₂ O+DEPC		SEQLAB (Göttingen) Sigma-Aldrich (Steinheim) Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
<u>Primer-Sequenzen</u>				
T7-Primer		5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'		
Sp6-Primer		5'- ATTTAGGTGACACTATAG -3'		
pEGFP-Primer 1 (565 bp-591 bp)		5'- AGCTGGTTT TAGTGAACCGTCAGATCC -3'		
pEGFP-Primer 2 (749 bp-728 bp)		5'- GTCGCCGTCCAGCTCGACCAGG -3'		
<u>Sequenzier-Mix</u> (ABI PRISM [®] Big Dye [™] Terminator-Sequenzier-Mix, Version 2.0)		dNTPs (dATP, dCTP, dITP, dUTP) ddNTPs (ddATP [R6G], ddCTP [ROX], ddGTP [R110], ddTTP [TAMRA]) Ampli Taq-DNA-Polymerase MgCl ₂ , Tris-HCl-Puffer (pH 9,0) [...] = Fluoreszenzmarkierung		
<u>Sequenzierprogramm</u>	Denaturierung	1 min.	94°C	
	Schritt 1	15 sek.	96°C	30 Zyklen
	Schritt 2	45 sek.	55°C	
	Schritt 3	4 min.	60°C	

2.5. Zelllinien

2.5.1. 293-HEK-Zellen

293-HEK-Zellen stammen von primären humanen embryonalen Nierenzellen ab und wurden durch Transformation mit Adenovirus-Typ-5-Fragmenten immortalisiert (Graham et al. 1977). Die Zellen wachsen Fibroblasten-artig als Monolayer und exprimieren neben Cytokeratinen und Vimentin auch Neurofilamente.

2.5.2. CSM14.1-Zellen

CSM14.1-Zellen sind nigro-striatale Rattenzellen, die durch Einführung eines Temperatursensitiven SV40-large-T-Antigens immortalisiert wurden. Die Zellen sind Neomycin-resistent

und können über das Temperatur-sensitive SV40-large-T-Antigen bei 39°C differenziert werden (Zhong et al. 1993).

2.5.3. SH-SY5Y-Zellen

Bei SH-SY5Y-Zellen handelt es sich um eine humane Neuroblastom-Zelllinie, die als Sublinie aus der Neuroepithelom-Zelllinie SK-N-SH hervorgegangen ist. SH-SY5Y-Zellen sind sympathische adrenerge Ganglienzellen (Scott et al. 1986), die 1970 aus der Knochenmarkbiopsie eines vierjährigen Mädchens mit metastasierendem Neuroblastom isoliert wurden (Biedler et al. 1973). Sie wachsen Epithel-artig als Monolayer bzw. in Clustern (bei hoher Konfluenz) und exprimieren Neurofilamente und Vimentin.

2.6. Zellkultur

2.6.1. Kultivierung, Differenzierung, Fixierung

293-HEK-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in Cellstar® 10-cm-Rundschalen (60 cm²) der Firma Greiner (Kremsmünster, Österreich) in Kulturmedium bei 37°C, 5 % CO₂ und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre kultiviert.

<u>Kulturmedium</u>	DMEM (4,5 g/l Glukose) mit L-Glutamin und Natrium-Pyruvat 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin 10 % FBS gold	PAA (Pasching, Österreich) PAA (Pasching, Österreich) PAA (Pasching, Österreich)
---------------------	--	--

CSM14.1-Zellen wurden ebenfalls in Kulturmedium in 10-cm-Rundschalen, allerdings bei 32°C, 5 % CO₂ und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre kultiviert. Differenziert wurden die Zellen durch Inkubation bei 39°C unter sonst gleichen Bedingungen. Zum Fixieren wurden die Zellen, nach zwei Waschschritten mit PBS, für 10 min. bei Raumtemperatur mit CSM-Fixans versetzt, das anschließend durch drei weitere Waschschrritte mit PBS entfernt wurde.

<u>CSM-Fixans (pH 7.5)</u>	4 % PFA in PBS	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)
----------------------------	-------------------	------------------------------------

SH-SY5Y-Zellen wurden, wie auch 293-HEK-Zellen, in 10-cm-Rundschalen bei 37°C, 5 % CO₂ und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre kultiviert, allerdings in SH-SY5Y-Kulturmedium. Differenziert wurden die Zellen durch Inkubation in

Retinolsäure-Medium unter sonst gleichen Kulturbedingungen (Harrison et al. 1998, Yu X et al. 2003). Zum Fixieren wurden SH-SY5Y-Zellen für 10 min. bei Raumtemperatur in SH-SY5Y-Fixans inkubiert. Aufgrund einer schlechten Adhärenz der Zellen, wurde dazu 8 % PFA-Lösung (in PBS, pH 7,5) direkt 1:1 mit SH-SY5Y-Medium verdünnt. Das Fixans wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS wieder entfernt.

<u>SH-SY5Y-Kulturmedium</u>	DMEM (4,5 g/l Glukose) mit L-Glutamin und Natrium-Pyruvat 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin 15 % FBS gold	PAA (Pasching, Österreich) PAA (Pasching, Österreich) PAA (Pasching, Österreich)
<u>Retinolsäure-Medium</u>	10 µM Retinolsäure in SH-SY5Y-Kulturmedium	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<u>SH-SY5Y-Fixans</u>	4 % PFA in SH-SY5Y-Medium	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)

2.6.2. Passagierung

Zum Passagieren unter sterilen Bedingungen wurden konfluente Zellen einmal mit PBS gewaschen. 293-HEK- und CSM14.1-Zellen wurden, zum Lösen des Zellrasens, für 10 min. bei 37°C bzw. 32°C in 2-3 ml 1 x Trypsin inkubiert. SH-SY5Y-Zellen wurden (ohne Waschen in PBS) für 2 min. bei 37°C mit 1 x Trypsin versetzt. Das Trypsin wurde mit der doppelten bis dreifachen Menge Kulturmedium neutralisiert. Die Zellen wurden anschließend bei 390 x g für 5 min. bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden sie in 1 ml des jeweiligen Kulturmediums wieder aufgenommen und auf die fünf- bis zehnfache Kulturfläche ausplattiert.

<u>1 x Trypsin</u>	10 x Trypsin 1:10 in PBS verdünnt	PAA (Pasching, Österreich)
<u>PBS (pH 7.4)</u>	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄	

2.6.3. Quantifizierung der Zellen

Um die Zellzahl zu ermitteln wurden alle drei Zelllinien wie beim Passagieren von den Kulturschalen gelöst. Nach dem Zentrifugieren wurde eine geringe Menge (10-25 µl) der in 1 ml Medium wieder aufgenommenen Zellen 1:10 in Zählmedium verdünnt. Die Zellzahl wurde für 0,4 µl dieses Gemisches lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer „improved“ der Firma Hecht-Assistent (Sondheim) ermittelt und anschließend auf 1 ml

hochgerechnet. Das Volumen mit der gewünschten Anzahl von Zellen wurde auf entsprechende Zellkulturplatten ausgesät.

<u>Zählmedium</u>	60 % Trypanblau-Lösung (0,4 %) in PBS	Sigma-Aldrich (Steinheim)
-------------------	--	---------------------------

2.6.4. Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren wurden alle Zelllinien wie beim Passagieren von den 10-cm-Rundschalen gelöst. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Zellen nicht in Kulturmedium, sondern in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und, nach langsamer Abkühlung, bei -80°C gelagert.

<u>Einfriermedium</u>	10 % DMSO in FBS gold	Fisher Scientific (Loughborough, Leics, UK) PAA (Pasching, Österreich)
-----------------------	--------------------------	---

2.6.5. Auftauen der Zellen

Alle Zelllinien wurden im Wasserbad rasch bei 37°C aufgetaut und anschließend zusammen mit dem Einfriermedium in 2 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden bei 174 x g für 5 min. bei Raumtemperatur abzentrifugiert, nach Verwerfen des Überstandes in 1 ml Medium resuspendiert, und in jeweiligem Kulturmedium auf 10-cm-Rundschalen ausplattiert.

2.7. Transfektion

2.7.1. Transiente Transfektion

Über eine Transfektion wird fremde DNA in eine eukaryote Zelle eingeschleust. Bei einer transienten Transfektion wird die DNA nicht fest in das Genom eingebaut, sondern, unter Kontrolle eines entsprechenden Promotors, auf hohem Niveau vom frei liegenden Plasmid abgelesen, so dass die Zelle das Plasmid nach einiger Zeit häufig wieder entfernt.

In alle Zelllinien wurden BI-1-HA und BI-1-GFP zunächst transient überexprimiert. Dazu wurden je 5×10^5 CSM14.1- oder 293-HEK-Zellen bzw. 10^6 SH-SY5Y-Zellen pro well (10 cm^2) einer 6-well Platte der Firma Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) einen Tag vor Transfektion in Antibiotika-freiem Kulturmedium ausplattiert. Die Transfektion wurde mit dem Transfektans Lipofectamine 2000® (Invitrogen) nach dem zugehörigen Protokoll durchgeführt. Dazu wurden pro well 4 µg BI-1-Plasmid und 10 µl

Lipofectamine 2000[®] getrennt voneinander in je 250 µl Antibiotika- und Serum-freiem Kulturmedium für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden DNA und Transfektans vermischt und, nach weiteren 30 min. Inkubationszeit bei Raumtemperatur, in einem Gesamtvolumen von 2 ml Antibiotika- und Serum-freiem Kulturmedium pro well auf die vorher mit PBS gewaschenen Zellen gebracht. Nach 12 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Medium in zellspezifisches Kulturmedium getauscht. CSM-Zellen wurden außerdem wieder bei 32°C inkubiert. Insgesamt 48 Stunden nach Transfektion wurden BI-1-HA-transfizierte Zellen für einen Expressionsnachweis per SDS-PAGE und anschließendem Western Blot lysiert (2.8.), während die Überprüfung der BI-1-GFP-Expression visuell mit Hilfe eines Axiovert 200 M-Fluoreszenzmikroskops der Firma Zeiss (Jena) unter einem EGFP-Filter erfolgte.

2.7.2. Stabile Transfektion

Ziel einer stabilen Transfektion ist es, dass die eingebrachte DNA fest in das Genom einer Zelle eingebaut wird, wobei das Protein von Interesse in der Regel auf niedrigerem Niveau exprimiert wird. Dies kann über die Ausnutzung eines Antibiotikaresistenzgens im Vektor, oder über eine Doppeltransfektion mit zwei separaten DNA- bzw. Antibiotikaresistenzplasmiden erreicht werden. Nicht transfizierte Zellen haben in Antibiotika-haltigem Medium einen Nachteil gegenüber transfizierten Zellen und können dadurch selektiert werden. Über die Herstellung von Zellkolonien, deren Zellen von einer einzelnen stabil transfizierten Zelle abstammen, wird zusätzlich sichergestellt, dass alle Zellen dieser Einzelzellklonkolonie das gewünschte Protein exprimieren und an Tochterzellen weiter geben.

Es wurden sowohl stabil BI-1-HA-, als auch BI-1-GFP-überexprimierende CSM14.1- und SH-SY5Y-Einzelzellklonkolonien hergestellt. Die stabile Transfektion wurde nach demselben Protokoll wie die transiente Transfektion durchgeführt (s. 2.7.1.).

In CSM14.1-Zellen mußte eine Doppeltransfektion durchgeführt werden, da die auf den pcDNA3-HA- bzw. pEGFP-N2-Vektoren vorhandene Neomycin-Antibiotikaresistenz aufgrund der genuinen Neomycin-Resistenz der CSM-Zellen nicht genutzt werden konnte. Bei einer Doppeltransfektion wird davon ausgegangen, dass statistisch beide Plasmide gleichermaßen in eine Zelle eingeschleust werden. Es ist daher zusätzlich das Puromycin-Antibiotikaresistenzplasmid pBabe-puro, welches freundlicherweise von Prof. John C. Reed vom Burnham Institute (La Jolla, CA, USA) zur Verfügung gestellt wurde, im Verhältnis 1:20 gegenüber BI-1-HA bzw. 1:10 gegenüber BI-1-GFP mit transfiziert worden. Die transfizierte

Gesamtplasmidmenge betrug 4 µg pro well einer 6-well Platte. SH-SY5Y-Zellen wurden hingegen einfach, mit je 4 µg beider BI-1-Plasmide pro well einer 6-well Platte transfiziert, da in diesen Zellen die vorhandene Neomycin-Antibiotikaresistenz der Plasmide ausgenutzt werden konnte. 48 Stunden nach Transfektion wurde das Medium in Antibiotika-haltiges CSM- bzw. SH-SY5Y-Selektionsmedium gewechselt.

Nach erneuter Konfluenz der 6-well Platte unter Selektion wurde ein Teil der Zellen bei -80°C eingefroren. Ein Teil der BI-1-HA-transfizierten Zellen wurde außerdem für einen proteinbiochemischen Expressionsnachweis (2.8.) aufbereitet. Die BI-1-GFP-Expression wurde fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

Zur Herstellung von Einzellklonkolonien wurden im Mittel 0,5 Zellen (CSM-Zellen) bzw. 1 Zelle (SH-SY5Y-Zellen) pro well (0,3 cm²) einer 96-well Platte (Becton Dickinson) im jeweiligen Selektionsmedium ausplattiert. Nach 3 bis 4 Wochen wurden die Platten lichtmikroskopisch auf Einzellklonkolonien durchsucht, welche anschließend auf größere Platten transferiert wurden. Nach einem weiteren Expressionscheck wurden mehrere BI-1-positive Klone für alle nachfolgenden Experimente expandiert.

<u>CSM-Selektionsmedium</u>	8 µg/ml Puromycin in Kulturmedium	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<u>SH-SY5Y-Selektionsmedium</u>	500 µg/ml G418 in SH-SY5Y-Kulturmedium	PAA (Pasching, Österreich)

2.8. Proteinanalyse

2.8.1. Herstellung von zellulären Lysaten

Die Lysierung von Zellen dient der Isolierung von zellulär exprimierten Proteinen. Die isolierten Proteine der Zelllysate können in nachfolgenden Analysen spezifisch untersucht werden.

Zur Lysierung transfizierter CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen wurden 80-90% konfluente wells einer 6-well Platte nach einem Waschschrift in PBS mit je 70 µl Lysepuffer versetzt. Die Zellen wurden anschließend mit einem Zellschaber von der Platte geschabt und, nach 15 min. Inkubation auf Eis, bei 4°C und 16060 x g für 15 min. zentrifugiert. Der so gewonnene Protein-haltige Überstand wurde bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

<u>Lysepuffer</u>	4 % Proteinase-Inhibitor 1 % IGEPAL CA-630 (C ₁₈ H ₃₀ O ₃) in HKME	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) Sigma-Aldrich (Steinheim)
<u>HKME</u>	10 mMol/l HEPES (pH 7,2); 142 mMol/l KCl; 5 mMol/l MgCl ₂ ; 1 mMol/l EGTA	

2.8.2. Proteinkonzentrationsbestimmung im BCA-Assay

Mit Hilfe eines BCA-Assays kann die Proteinkonzentration in einem Lysat bestimmt werden. Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der Bradford-Methode, wonach quantitativ die Bindung eines Farbstoffs (Coomassie-Brilliantblau) an ein Protein unbekannter Menge mit der Bindung des gleichen Farbstoffs an ein Standardprotein bekannter Konzentration verglichen wird (Bradford 1976). Bei einem BCA-Assay wird der Farbstoff durch Chelatbildung von zwei Molekülen Bicinchonin-Säure (BCA) mit einem Kupferion gebildet. Die BI-1-Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines BCATM Protein Assay-Kits der Firma Pierce (Rockford, Illinois, USA) bestimmt. In einer 96-well Platte wurden dazu verschiedene BSA-Proteinmengen (40 µg, 20 µg, 10 µg, 5 µg, 2,5 µg, 1,25 µg, 0,625 µg) als Konzentrationsstandard und jeweils 1 µl Lysat in einem Doppelansatz, mit je 200 µl BCA-Farblösung versetzt und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorbtion wurde mit einem Rainbow-ELISA-Photometer der Firma TECAN (Crailsheim), unter Verwendung des Computerprogramms easy WIN basic 6.1 gemessen (Messfilter 562 nm). Die Proteinkonzentration wurde durch Eichgraden anhand der BSA-Konzentrationsstandardreihe ermittelt.

<u>BCA-Farblösung</u>	2% Reagenz B in Reagenz A	
Reagenz A	beinhaltet BCA, Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid	
Reagenz B	beinhaltet 4 % Kupfersulfat	
<u>Stocklösung BSA-Standardprotein</u>	10 µg/µl BSA in Lysepuffer	Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.8.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld, und ermöglicht eine weitere spezifische Analyse von Proteinen eines Zellysats.

Für die SDS-PAGE wurde mit Hilfe von Material des Mini-PROTEAN® 3 cell-Systems (Bio-Rad) ein SDS-Polyacrylamidgel, bestehend aus einem 5 % igen Sammelgel und einem 12 % igen Trenngel hergestellt.

Des Weiteren wurden jeweils 20 µg Protein im Verhältnis 5:1 mit 6 x SDS-Ladepuffer versetzt und bei 50°C für 5 min. inkubiert. Von allen Proben wurde ein maximales Volumen von 20 µl in die Geltaschen des Sammelgels aufgetragen. Als Marker wurden jeweils 3-4 µl Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad) verwendet. Die SDS-PAGE wurde bei 4°C in Laufpuffer bei zunächst 75 Volt und, nach Erreichen des Trenngels, bei 100 Volt durchgeführt.

<u>5 % iges Sammelgel</u> (Angaben für 1 Gel)	<u>12 % iges Trenngel</u> (Angaben für 1 Gel)	
0,68 ml purifiziertes H ₂ O 0,17 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 0,13 ml 1 M Tris (pH 6,8) 0,01 ml 10 % SDS 0,01 ml 10 % APS 0,001 ml TEMED	1,60 ml purifiziertes H ₂ O 2,00 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 1,30 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % APS 0,002 ml TEMED	Th.Geyer (Renningen) Merck KGaA (Darmstadt) Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
<u>6 x SDS-Ladepuffer</u> (10 ml)	7 ml 4 x Tris Cl/SDS (pH 6,8); 3 ml Glycerol; 1 g SDS; 0,93 g DTT; 1,2 mg Bromphenol-Blau	
<u>Laufpuffer</u>	24 % 5x Tris/Glycin; 1,2 % SDS (10 %)	
<u>5x Tris/Glycin</u>	15 g/l Tris; 72 g/l Glycin	

2.8.4. Western Blot

Über einen Western Blot werden Proteine nach SDS-PAGE aus dem Polyacrylamidgel in einem elektrischen Feld auf eine Membran transferiert, auf der sie mit Hilfe von Antikörpern spezifisch nachgewiesen werden können.

Der Western Blot erfolgte in einer Transfer-Kammer des Mini-PROTEAN® Elektrophorese-Systems (Bio-Rad) zwischen zwei 6 x 9 cm großen Gel-Blotting-Papieren der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) in Transferpuffer bei 100 Volt für eine Stunde bei 4°C. Die Proteine wurden dabei auf eine 6 x 9 cm große PROTAN® Nitrocellulose Transfer Membran der Firma Schleicher & Schuell BioScience GmbH (Dassel) transferiert.

<u>Transferpuffer</u>	20 % 5x Tris/Glycin; 20 % Methanol; 0,1 % SDS (10 %)
-----------------------	--

2.8.5. Immunodetektion der Proteine

Für einen spezifischen Proteinnachweis wird eine Nitrocellulosemembran nach dem Western Blot mit Antikörpern inkubiert, welche eine spezifische Bindung mit bestimmten Epitopen des Zielproteins eingehen können. BI-1-HA konnte dabei nur über das HA-tag detektiert werden, da es derzeit keine ausreichend spezifischen Antikörper gegen das BI-1-Protein selbst gibt.

Nach einem Waschschrift für 5 min. bei Raumtemperatur in TBS-T wurden zunächst unspezifische Antikörperbindungsstellen durch Inkubation der Nitrocellulosemembran in Milchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit einem HRP-konjugierten monoklonalen Maus-Antikörper inkubiert, welcher spezifisch an das HA-tag des BI-1-Proteins binden konnte.

Nach dreimaligem Waschen der Membran für 5 min. in TBS-T wurde der gebundene anti-HA-Antikörper mit Hilfe eines ECL-Detektionsreagenz nachgewiesen. Zur Herstellung des ECL-Reagenz wurden ECL-Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1 vermischt und für 1 min. mit der Membran inkubiert. ECL reagiert dabei, unter Bildung von Chemolumineszenzsignalen, als Substrat der an den anti-HA-Antikörper gekoppelten HRP. Die Chemolumineszenzsignale wurden durch Exposition (150 sek.) der Membran in einem Fluor-STM MultiImager (Bio-Rad) mit Hilfe des Computerprogramms Quantity One 4.2.1 nachgewiesen.

Zur Kontrolle der Proteinmenge auf den verschiedenen Membranen wurde, vor allem bei den stabil BI-1-exprimierenden Zellklonen, eine Kontrollfärbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen das ubiquitäre Tubulin-Protein durchgeführt. Da dieser nicht direkt an HRP gekoppelt war, mussten die Membranen vor ECL-Entwicklung zusätzlich für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur in einem HRP-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper inkubiert werden.

<u>anti-HA-Antikörper</u> (HA-probe (F-7): sc-7392)	1:200 in Milchlösung	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
<u>Anti-β-Tubulin-Antikörper</u>	1:2000 in TBS-T	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<u>Anti-Maus-HRP-Antikörper</u>	1:1000 in TBS-T	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
<u>Milchlösung</u>	5 % Milchpulver in TBS-T	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
<u>TBS-T</u>	10 mM Tris (pH 7,5); 142 mM NaCl; 0,1 % Tween-20	

ECL-Lösung 1 (10 ml)	100 µl 250 mM Luminol in DMSO 44 µl 90 mM p-Coumarsäure in DMSO 1 ml 1 M Tris (pH 8,5) 8,85 ml purifiziertes H ₂ O	Sigma-Aldrich (Steinheim) Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)
ECL-Lösung 2 (10ml)	6 µl 30 % ige H ₂ O ₂ -Lösung 1 ml 1 M Tris (pH 8,5) 9 ml purifiziertes H ₂ O	Merck KGaA (Darmstadt)

2.9. Kompartiment-spezifische Fluoreszenz- und Immunfärbungen

Mit Hilfe von Fluoreszenz- und Immunfärbungen (Immunzytochemie) wurde die subzelluläre Lokalisation von BI-1 in den neuronalen CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen untersucht.

Alle Fluoreszenz- und Immunfärbungen wurden in 8-well-Objektträgern (Lab-Tek Chambered # 1.0) der Firma Nalgene Nunc International (Rochester, NY, USA) an transient und stabil BI-1-GFP-transfizierten Zellen (10^4 CSM14.1- bzw. 2×10^4 SH-SY5Y-Zellen pro well) durchgeführt. Nach 24 Stunden Kultivierung in jeweiligem Selektionsmedium wurde mit den Färbungen begonnen. Die Zellen wurden entweder mit Zellkompartiment-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen bzw. Fluoreszenzplasmiden behandelt und anschließend fixiert, oder erst fixiert und dann immunzytochemisch gefärbt.

Das Expressionsmuster von BI-1-GFP wurde anschließend, in 200 µl PBS pro well, unter dem 40 x bzw. 63 x Objektiv eines Axiovert 200 M-Fluoreszenzmikroskops (Zeiss) mit der spezifischen Fluoreszenz- bzw. Immunfärbung des jeweiligen Zellkompartiments bei entsprechender Filtereinstellung (EGFP-Filter für BI-1-GFP, Rhodamine-Filter für MitoTracker-Red[®] und Mito-RFP, CY3) nach Photodokumentation (AxioVision 3.1) verglichen. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen unter dem konfokalen Leica SP2 AOBS Mikroskop (Solms) untersucht.

2.9.1. Fluoreszenzfärbungen

2.9.1.1. MitoTracker-Fluoreszenzfärbung

MitoTracker-Red[®] ist ein chemischer Fluoreszenzfarbstoff, welcher sich spezifisch in Mitochondrien anreichert, und diese dadurch anfärbt. Hierfür wurden die Zellen für 30 min. bei 32°C (CSM14.1) bzw. 37°C (SH-SY5Y) in MitoTracker-Medium inkubiert und anschließend fixiert.

<u>MitoTracker-Medium</u>	20 nM MitoTracker-Red® (1µM in DMSO) in jeweiligem Kulturmedium	Molecular Probes (Karlsruhe)
---------------------------	--	------------------------------

2.9.1.2. Mito-RFP-Fluoreszenzfärbung

Das für die Mito-RFP-Fluoreszenzfärbung verwendete pDsRed1-Mito-Plasmid determiniert ein Fusionsprotein, bestehend aus einem rot fluoreszierenden Anteil (DsRed1) und der mitochondrialen targeting-Sequenz der Untereinheit VIII von humaner Cytochrom-C-Oxidase (Mito). Mitochondrien nehmen dieses Fusionsprotein spezifisch auf und werden dadurch markiert. Die Zellen wurden einen Tag vor Transfektion nicht in Selektionsmedium, sondern in Antibiotika-freiem Medium ausplattiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 0,4 µg pDsRed1-Mito-Plasmid (Clontech) pro well nach dem Lipofectamine 2000®-Protokoll transient transfiziert. 12 Stunden nach Transfektion wurde das Medium in Selektionsmedium getauscht. Nach insgesamt 48 Stunden wurden die Zellen mit jeweiligem Fixans fixiert.

2.9.2. Immunfärbungen

Für die Immunfärbungen wurden die Zellen zuerst in entsprechendem Fixans fixiert und für 10 min. bei Raumtemperatur in Triton X-100-Lösung permeabilisiert. Die Triton X-100-Lösung wurde in drei Waschschritten mit PBS wieder entfernt. Die Permeabilisierung der Zellmembran ermöglicht das Eindringen eines spezifischen Erstantikörpers gegen ein gewünschtes Zellkompartiment-spezifisches Antigen. Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden in NGS/BSA-Blocklösung (anti-PDI- und anti-Ubiquitin-Immunfärbung) bzw. NGS-Blocklösung (anti-Cathepsin-D-Immunfärbung) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Zellkompartiment-spezifischen Erstantikörper wurde dieser durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Um den ersten Antikörper unter Fluoreszenzlicht detektieren zu können, wurde den Zellen anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur ein entsprechender Fluorophor-getaggtter Zweitantikörper zugesetzt. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde dieser in drei weiteren Waschschritten mit PBS wieder entfernt. Als Negativ-Kontrolle wurde für jeden Ansatz ein Teil der Zellen ohne Erstantikörper nach sonst gleichem Protokoll inkubiert.

<u>Triton X-100-Lösung</u>	0,2 % Triton X-100 in PBS	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<u>NGS/BSA-Blocklösung</u>	5 % NGS 2 % BSA in PBS	PAA (Pasching, Österreich) Sigma-Aldrich (Steinheim)

<u>NGS-Blocklösung</u>	10 % NGS in PBS	PAA (Pasching, Österreich)
------------------------	--------------------	----------------------------

2.9.2.1. Anti-PDI-Immunfärbung

Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) ist ein Enzym, welches spezifisch im Lumen des ERs eukaryotischer Zellen vorkommt.

Als Erstantikörper wurde den Zellen ein monoklonaler Maus anti-PDI-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur zugesetzt. Als Zweitantikörper wurde ein CY 3-Fluorophor-getaggtter anti-Maus Ziegen-Antikörper verwendet.

<u>anti-PDI-Antikörper</u>	1: 250 in NGS/BSA-Blocklösung	Stressgene (Victoria, Kanada)
<u>anti-Maus CY 3-Antikörper</u>	1:1000 in NGS/BSA-Blocklösung	Dianova (Hamburg)

2.9.2.2. Anti-Cathepsin-D-Immunfärbung

Bei Cathepsin D handelt es sich um eine in Endosomen und Lysosomen enthaltene Aspartat-Protease. Endosomen dienen dem Transport von durch Phago- und Pinozytose aufgenommenem Zellmaterial. Lysosomen sind Endosomen, welche zusätzlich hydrolytische Enzyme und Phosphatasen enthalten, und dem Abbau von aufgenommenem Zellmaterial dienen.

Eine anti-Cathepsin-D-Immunfärbung wurde nur an transient mit BI-1-GFP transfizierten Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dazu für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit einem polyklonalen Kaninchen anti-Cathepsin-D-Antikörper versetzt. Der anti-Cathepsin-D-Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. S. Höning (Institut für Biochemie II, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. Als Zweitantikörper wurde ein Fluorophor-getaggtter anti-Kaninchen CY 3-Ziegen-Antikörper verwendet.

<u>anti-Cathepsin-D-Antikörper</u>	1:200 in NGS-Blocklösung	
<u>anti-Kaninchen CY 3-Antikörper</u>	1:500 in NGS-Blocklösung	Dianova (Hamburg)

2.9.2.3. Anti-Ubiquitin-Immunfärbung

Ubiquitin ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, welches im Rahmen einer Ubiquitinierung Proteine markiert, die u.a. dem Proteasom zugeführt und dort abgebaut werden sollen.

Eine anti-Ubiquitin-Immunfärbung wurde nur an transient mit BI-1-GFP transfizierten Zellen durchgeführt. Der polyklonale Kaninchen anti-Ubiquitin-Erstantikörper wurde den Zellen für

eine Stunde bei Raumtemperatur versetzt. Als Zweitantikörper wurde ein anti-Kaninchen CY 3-Ziegen-Antikörper verwendet.

<u>anti-Ubiquitin-Antikörper</u>	1: 300 in NGS/BSA-Blocklösung	Calbiochem (Darmstadt)
<u>anti-Kaninchen CY 3-Antikörper</u>	1:1000 in NGS/BSA-Blocklösung	Dianova (Hamburg)

2.10. Zelltod-Assay an transient transfizierten Zellen

Die Wirkung von transient überexprimiertem BI-1 auf die neuronalen Zelllinien sollte zunächst nach Apoptoseinduktion durch Bax, einem pro-apoptotischen Protein der Bcl-Familie, untersucht werden.

2.10.1. Bax-Assay

In diesem Assay wurde GFP-getaggetes Bax über ein Plasmid zusammen mit BI-1-GFP in einer Doppeltransfektion wie in nachfolgender Tabelle dargestellt transient in CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen überexprimiert. Das Bax-GFP-Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. John C. Reed, Burnham Institute (La Jolla, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Es wurden jeweils $0,5 \times 10^5$ CSM14.1- bzw. 10^5 SH-SY5Y-Zellen pro well (2 cm^2) auf 24-well Platten (Becton Dickinson) transfiziert. Die Transfektion erfolgte unter Verblindung.

24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in jeweiligem Fixans fixiert und für 3 min. bei Raumtemperatur in DAPI-Lösung gefärbt. DAPI bildet Komplexe mit doppelsträngiger DNA und färbt dadurch spezifisch die Zellkerne an.

Nach zwei Waschschrinen mit PBS wurden die Zellen mit 1 ml PBS pro well versetzt. Die Assays wurden verblindet unter dem 40 x Objektiv fluoreszenzmikroskopisch manuell ausgewertet. Der Bax-Assay wurde für jede Zelllinie viermal wiederholt.

<u>Transfektions-Ansatz 1</u> (0,8 µg Gesamt-DNA-Menge/well)	pEGFP-N2-Leervektor (als Leerwert)
<u>Transfektions-Ansatz 2</u> (0,8 µg Gesamt-DNA-Menge/well)	0,4 µg Bax-GFP-Plasmid 0,4 µg pEGFP-N2-Leervektor
<u>Transfektions-Ansatz 3</u> (0,8 µg Gesamt-DNA-Menge/well)	0,4 µg Bax-GFP-Plasmid 0,4 µg BI-1-GFP-Plasmid
<u>DAPI-Lösung</u>	2 µg/ml DAPI in PBS
	Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.11. Zelltod-Assays an stabil transfizierten Zellen

Die folgenden Zelltod-Assays wurden in 96-well Platten durchgeführt. Dazu wurden jeweils 10^4 CSM14.1- bzw. $1,5 \times 10^4$ SH-SY5Y-Zellen pro well ausplattiert, welche stabil BI-1-HA oder den pcDNA3-Leervektor überexprimierten. Nach Kultivierung der Zellen für 24 Stunden wurde mit den Assays begonnen.

2.11.1. Staurosporin-Assay

Staurosporin ist ein aus *Streptomyces staurosporeus*-Bakterien isolierbarer Breitspektrum-Kinaseinhibitor, welcher als Induktor des intrinsischen, mitochondrialen Apoptosewegs gilt (Chae et al. 2004).

CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen wurden für 48 Stunden bei jeweiligen Kulturbedingungen mit je 100 μ l/well verschieden konzentriertem Staurosporin-Medium bzw. Kulturmedium als Kontrolle versetzt. SH-SY5Y-Zellen sind zuvor für einen Tag in Retinolsäure-Medium differenziert worden. Der Staurosporin-Assay wurde viermal für jede Zellart wiederholt.

<u>Staurosporin-Stocklösung</u>	40 μ M Staurosporin in PBS mit 4 % DMSO	Sigma-Aldrich (Steinheim)
<u>Staurosporin-Medium (CSM14.1-Zellen)</u>	0,01 μ M; 0,05 μ M; 0,1 μ M; 0,5 μ M; 1 μ M Staurosporin-Stocklösung in Kulturmedium	
<u>Staurosporin-Medium (SH-SY5Y-Zellen)</u>	0,05 μ M; 0,5 μ M Staurosporin-Stocklösung in SH-SY5Y-Kulturmedium	

2.11.2. Thapsigargin-Assay

Thapsigargin, ein Sesquiterpen-Lakton aus der Pflanze *Thapsia garganica*, ist ein Tumorpromotor, welcher Zellmembranen passieren kann und spezifisch die ER-eigene CA^{2+} -ATPase inhibiert.

Beide Zelllinien wurden nach Differenzierung für einen Tag (SH-SY5Y-Zellen) bzw. 14 Tage (CSM14.1-Zellen) in je 100 μ l/well verschieden konzentriertem Thapsigargin-Medium für 48 Stunden bei jeweiliger Kulturtemperatur, bzw. in Kulturmedium als Kontrolle inkubiert. Der Thapsigargin-Assay wurde viermal für jede Zellart wiederholt.

<u>Thapsigargin-Stocklösung</u>	1 mM Thapsigargin in DMSO	Sigma-Aldrich (Steinheim)
---------------------------------	------------------------------	---------------------------

<u>Thapsigargin-Medium (CSM14.1-Zellen)</u>	0,3 µM; 3 µM Thapsigargin-Stocklösung in Kulturmedium
<u>Thapsigargin-Medium (SH-SY5Y-Zellen)</u>	0,03 µM; 0,3 µM Thapsigargin-Stocklösung in SH-SY5Y-Kulturmedium

2.11.3. Sauerstoff/Glukose-Deprivation (OGD)

Die OGD wurde aufgrund einer schlechten Adhärenz von SH-SY5Y-Zellen nur an CSM14.1-Zellen durchgeführt. Dazu wurden auf zwei 96-well Platten 3×10^4 BI-1-HA- bzw. Leervektor-überexprimierende CSM14.1-Zellen pro well ausplattiert. Nach 24 Stunden Kultivierung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann für eine Stunde entweder in 100 µl/well Serum-freiem oder regulärem Kulturmedium unter normalen Kulturbedingungen präinkubiert. Um Glukose gründlich zu entfernen, wurden die Zellen beider Platten weitere viermal mit PBS gewaschen. Die OGD wurde durch Inkubation der Zellen einer Platte in je 100 µl/well Glukose- und Serum-freiem OGD-Medium für 24 Stunden bei 32°C, 5 % CO₂, 1 % O₂ und Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre in einem OGD-Inkubator C42 der Firma Labotect (Göttingen) induziert. Das OGD-Medium ist dabei eine Stunde in 1 % O₂-Atmosphäre präinkubiert worden. Die Zellen der anderen Platte dienten der Kontrolle unter normalen Kulturbedingungen. Dieser Assay wurde insgesamt viermal wiederholt.

<u>OGD-Medium</u>	1 mM hyperosmolare 15 % ige Mannit-Lösung in Thomaëjonin®-Lösung	Serag Wiessner (Naila) Delta Select (Pfullingen)
-------------------	---	---

2.11.4. Serumdeprivation

Die Serumdeprivation wurde nur an SH-SY5Y-Zellen durchgeführt. Nach Differenzierung für einen Tag in Retinolsäure, wurden die Zellen einmal mit Serum-freiem Medium gewaschen, um FBS-Rückstände des Kulturmediums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden in je 100 µl/well Serum-freiem bzw. in normalem SH-SY5Y-Kulturmedium inkubiert. Dieser Assay wurde insgesamt viermal wiederholt.

2.12. Auswertung der Zelltod-Assays

Die Überlebensrate der Zellen nach einem Zelltod-Assay wurde auf verschiedene Arten ermittelt. Zum einen direkt über die Ermittlung der Anzahl der toten bzw. überlebenden Zellen, zum anderen indirekt über die Stoffwechselfähigkeit der überlebenden Zellen.

Die manuelle Auswertungsmethode erfasst selektiv nur erfolgreich transfizierte bzw. behandelte Zellen. Die Kristallviolett- und die WST-1-Auswertungsmethode erfassen dagegen nicht selektiv alle Zellen eines Assays, ohne Berücksichtigung eines tatsächlichen Transfektions- oder Behandlungserfolgs. Sie sind daher besser für Zelltod-Assays mit stabil transfizierten Zellen geeignet.

2.12.1. Manuelle Auswertung

Die manuelle Auswertungsmethode wurde nur bei dem transienten Bax-Assay angewendet, da die Effizienz der transienten Doppeltransfektionen nur etwa 50 % betrug. Es durften demnach nur nachweislich transfizierte Zellen in die Auswertung einbezogen werden. Da bei dem Bax-Assay nur GFP-getaggte Plasmide verwendet worden sind, konnte ein Transfektionserfolg in den einzelnen Zellen über ihre Fluoreszenz unter dem EGFP-Filter des Axiovert 200 M-Fluoreszenzmikroskops überprüft werden. Pro Zelllinie wurden für alle wells der drei Transfektions-Ansätze jeweils 1200 grün-fluoreszierende Zellen, d.h. insgesamt 3600 Zellen pro Assay, manuell ausgezählt.

Die Zellen wurden mit Hilfe der DAPI-gefärbten Zellkerne, nach Fluoreszenzanregung unter dem DAPI-Filter des Axiovert 200 M-Fluoreszenzmikroskops, verblindet als vital oder apoptotisch eingeordnet. Nach Aufhebung der Verblindung wurde der Anteil der vitalen Zellen, nach Abzug des Leerwerts, für BI-1/Bax- bzw. Leervektor/Bax-exprimierende Zellen prozentual ermittelt.

2.12.2. Kristallviolett-Assay

Über die Färbung von Zellen mit dem Vitalfarbstoff Kristallviolett wurden CSM14.1-Zellen nach Zelltod-Induktion durch Staurosporin, Thapsigargin und OGD ausgewertet. Dazu wurden die Zellen, nach Abkippen des Mediums aus den verwendeten 96-well Platten, in je 100 µl pro well Kristallviolett-Lösung für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Als Leerwert wurde ein well ohne Zellen ebenfalls mit Kristallviolett-Lösung versetzt. Nach Abkippen der Lösung, wurden tote Zellen und unspezifische Färbung vorsichtig mit destilliertem Wasser abgespült. Nach dem Trocknen wurden Leerwert und lebende Zellen mit je 100 µl Natriumcitrat-Lösung pro well versetzt. Die Absorption wurde im Rainbow-ELISA-Photometer unter Verwendung des Computerprogramms easy WIN basic 6.1 bei einer Wellenlänge von 550 nm im Messfilter gemessen. Die Anzahl der überlebenden Zellen wurde prozentual anhand dieser Werte berechnet.

<u>Kristallviolett-Lösung</u>	0,5 % Kristallviolett in 20 % Methanol
<u>Natriumcitrat-Lösung</u>	0,1 M Natriumcitrat in 50 % Ethanol

2.12.3. WST-1-Assay

WST-1 ist ein Tetrazolium-Salz, welches von mitochondrialen Dehydrogenasen in vitalen Zellen unter Bildung eines Farbstoffs gespalten wird, und dadurch zu einer Gelbfärbung des Zellkulturmediums führt. Je mehr lebende Zelle vorhanden sind, desto stärker ist die Gelbfärbung, da mehr WST-1 verstoffwechselt wird (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Mit WST-1 wurden SH-SY5Y-Zellen nach Zelltod-Induktion durch Staurosporin, Thapsigargin und Serumdeprivation ausgewertet. WST-1-Reagenz wurde dazu direkt in das Medium der zu untersuchenden Zellen gegeben. Als Leerwert diente WST-1-Reagenz in Medium alleine. Nach einer Inkubationszeit von 1-3 Stunden wurde die Absorption im Rainbow-ELISA-Photometer mit Hilfe des Computerprogramms easy WIN basic 6.1 bei einer Wellenlänge von 450 nm im Messfilter und 620 nm im Referenzfilter gemessen. Die Anzahl der überlebenden Zellen wurde prozentual anhand dieser Werte berechnet.

<u>WST-1-Medium</u>	10 % WST-1-Reagenz in Kulturmedium	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
---------------------	---------------------------------------	-----------------------------------

3. ERGEBNISSE

3.1. BI-1-Konstrukte

Humane BI-1-cDNA (0,7 kb) wurde zusammen mit einem HA-tag über die Restriktionsstellen EcoRI, XhoI und XbaI in die Klonierungsstelle eines pcDNA3-Plasmidvektors kloniert. Das BI-1-HA-Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. John C. Reed, Burnham Institute (La Jolla, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Das BI-1-GFP-Konstrukt wurde unter Verwendung der Restriktionsstellen für EcoRI und XhoI/Sall hergestellt.

In beiden Konstrukten wurde die BI-1-DNA unter Kontrolle eines viralen CMV-Promotors und eines SV40-Replikationsstart-Elements abgelesen. Für die Expression in Bakterien verfügt das BI-1-HA-Konstrukt über ein Ampicillin-Resistenzgen, während das BI-1-GFP-Konstrukt ein Kanamycin-Resistenzgen enthält. Beide Plasmide sind über die Antibiotika Neomycin bzw. G418 in eukaryoten Zellen selektionierbar.

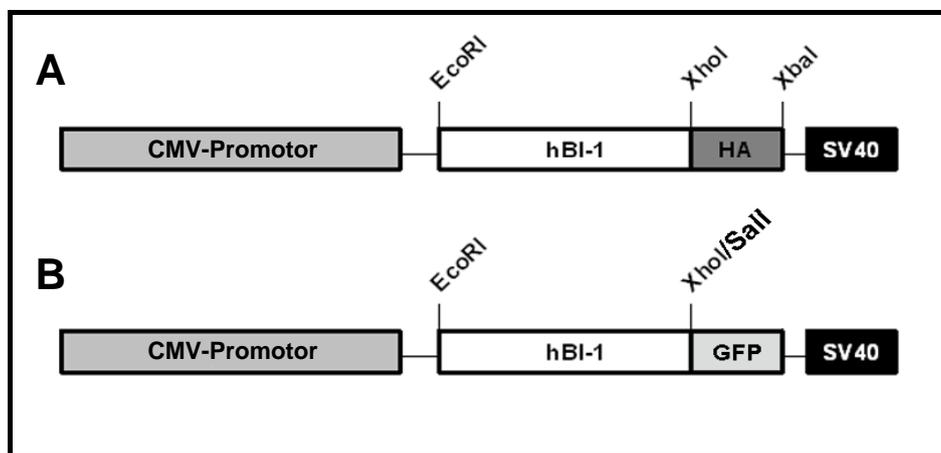


Abb. 1: BI-1-Konstrukte

A) BI-1-HA-Konstrukt (Vektor: pcDNA3-HA)

B) BI-1-GFP-Konstrukt (Vektor: pEGFP-N2)

3.2. Restriktionsenzymverdau der BI-1-Konstrukte

Zur Kontrolle der korrekten Ligation des BI-1-HA- und des BI-1-GFP-Konstrukts wurden die BI-1-Inserts nach Mini- bzw. Maxi-Präp-Amplifikation erneut mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Xho I aus ihren Vektoren herausgeschnitten. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch den Verdau des BI-1-HA-Konstrukts. Das BI-1-HA-Konstrukt wurde zusätzlich mit weiteren Enzymen (Bam HI, Hind III, Xba I) verdaut, welche das Plasmid innerhalb der Klonierungsstelle bzw. innerhalb des Inserts schneiden. Alle dargestellten DNA-Banden weisen die jeweils berechnete korrekte Größe auf.

Nach Restriktionsenzymverdau des BI-1-GFP-Konstrukts konnten ebenfalls BI-1-DNA-Banden der korrekten Größe nachgewiesen werden (Verdau nicht gezeigt).

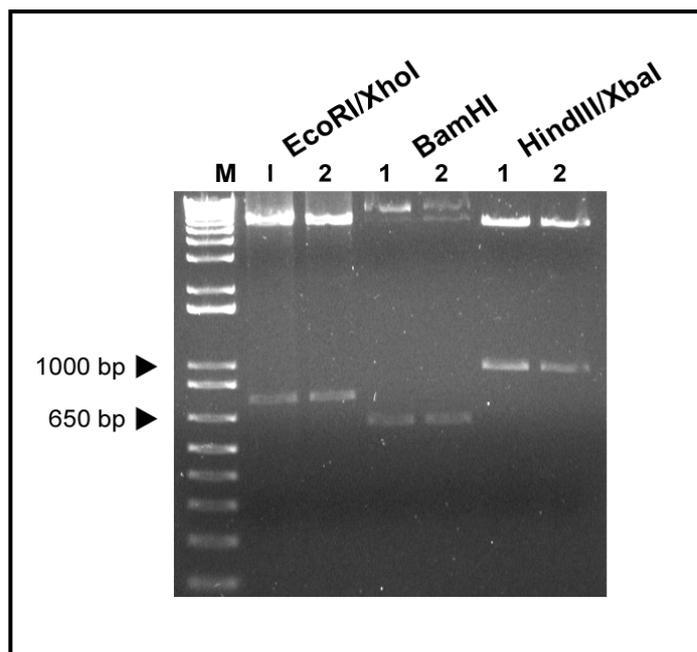


Abb. 2: Restriktionsenzymverdau des BI-1-HA-Konstrukts

M = 1kb plus DNA-Marker; 1, 2 = Eco RI/Xho I-Verdau (Doppelansatz);

1, 2 = Bam HI-Verdau (Doppelansatz); 1, 2 = Hind III/Xba I-Verdau (Doppelansatz)

3.3. Sequenzierung der BI-1-Konstrukte

Die nach Sequenzierung beider BI-1-Konstrukte erhaltenen Basenfolgen wurden manuell mit der bekannten BI-1-Sequenz verglichen. Sowohl im BI-1-HA-, als auch im BI-1-GFP-Konstrukt konnten Punkt- oder Rastermutationen ausgeschlossen werden, da die Basenfolgen vollständig mit der bekannten BI-1-Sequenz übereinstimmten.

3.4. Transiente Transfektion der BI-1-Konstrukte

3.4.1. Transiente Überexpression von BI-1-HA in 293-HEK-Zellen

Als Pilotversuch wurde das BI-1-Protein zunächst in 293-HEK-Zellen exprimiert. Diese zeichnen sich durch eine hohe Transfektions- und Expressionseffizienz für eingeschleuste Gene aus. Die folgende Abbildung zeigt den Nachweis einer erfolgreichen transienten Transfektion des BI-1-HA-Konstrukts in dieser Zelllinie.

Als Negativ-Kontrolle wurde jeweils Protein aus Lysaten von mit Leervektor (pcDNA3-Plasmid ohne Insert) transfizierten 293-HEK-Zellen verwendet. Als Positiv-Kontrolle dienten Zelllysate aus Transfektionen mit HA-getagtem TAT-Bcl_{XL}, welche freundlicherweise von Dr. Gunnar Dietz (Abteilung Neurologie, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt wurden.

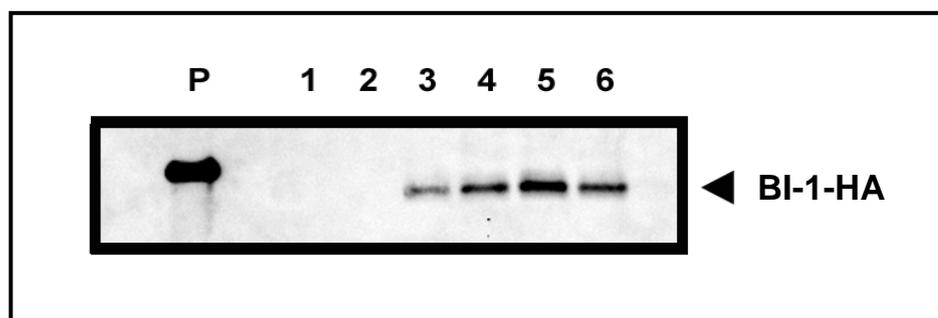


Abb. 3: Immunoblot nach transienter Transfektion von BI-1-HA in 293-HEK-Zellen
P = Positiv-Kontrolle (HA-getaggttes TAT-Bcl_{XL}); 1, 2 = Negativ-Kontrolle;
3, 4, 5, 6 = transiente BI-1-HA-Transfektionen (Proteinbanden bei ca. 30 kDa)

3.4.2. Transiente Überexpression von BI-1-HA in neuronalen CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen

Für die Überexpression von BI-1 in neuronalen Zelllinien wurden CSM14.1- (immortalisierte nigro-striatale Neurone aus der Ratte) und SH-SY5Y-Zellen (humane Neuroblastom-Zelllinie) ausgewählt. Die folgende Abbildung zeigt den Nachweis einer erfolgreichen transienten Transfektion von BI-1-HA in beiden neuronalen Zelllinien.

Als Negativ-Kontrolle wurde erneut jeweils Protein aus Lysaten von mit pcDNA3-Leervektor transfizierten CSM14.1- bzw. SH-SY5Y-Zellen verwendet. Als Positiv-Kontrolle dienten wieder Zelllysate aus Transfektionen mit HA-getagtem TAT-Bcl_{XL}.

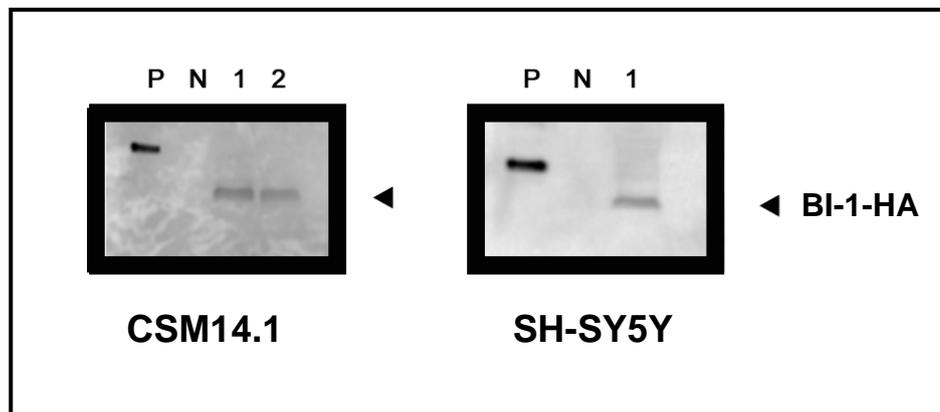


Abb. 4: Immunoblot nach transienter Transfektion von BI-1-HA in CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen

P = Positiv-Kontrolle (HA-getaggtes TAT-Bcl_{XL}); N = Negativ-Kontrolle;

1, 2 = transiente BI-1-HA-Transfektionen (Proteinbanden bei ca. 30 kDa)

3.4.3. Akkumulation von BI-1-GFP in transient transfizierten CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen

Das BI-1-GFP-Konstrukt wurde ebenfalls in beiden neuronalen Zelllinien erfolgreich transient überexprimiert. In ca. 70-80 % der erfolgreich transfizierten Zellen zeigte sich überraschenderweise jedoch kein gleichmäßiges BI-1-GFP-Expressionsmuster, sondern die in der folgenden Abbildung dargestellte BI-1-GFP-Akkumulation.

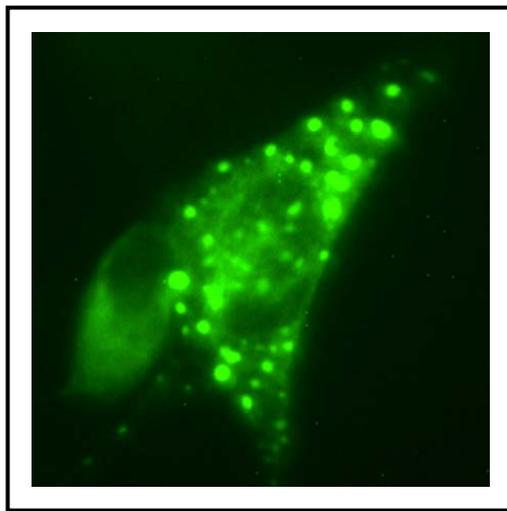


Abb. 5: Akkumulationen von BI-1-GFP nach transienter Überexpression am Beispiel einer CSM14.1-Zelle (63 x Objektiv)

3.5. Subzelluläre Lokalisation von BI-1-GFP und BI-1-GFP-Akkumulationen in transient transfizierten CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen

Die folgenden Abbildungen zeigen repräsentative Resultate aus Untersuchungen der subzellulären Lokalisation von transient transfiziertem BI-1-GFP. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Lokalisation der BI-1-GFP-Akkumulationen gelegt, da nicht klar war, ob es sich dabei möglicherweise um eine GFP-bedingte, unphysiologische Akkumulation des BI-1-GFP-Fusionsproteins, oder um eine Expression handelt, die in Zellorganellen lokalisiert ist. Exemplarisch werden im Folgenden nur Bilder von CSM14.1-Zellen gezeigt.

3.5.1. BI-1-GFP und BI-1-GFP-Akkumulationen lokalisieren nicht in Mitochondrien

Nach Mito-RFP-Fluoreszenzmarkierung transient BI-1-GFP-überexprimierender Zellen zeigte sich, dass weder gleichmäßig exprimiertes BI-1-GFP, noch die BI-1-GFP-Akkumulationen mit Mitochondrien koloalisieren.

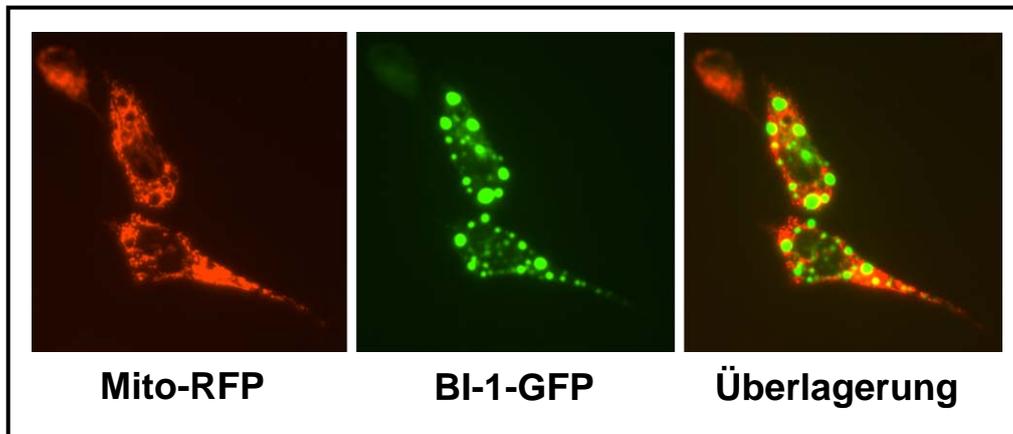


Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (63 x Objektiv) von transient BI-1-GFP-überexprimierenden CSM14.1-Zellen nach Mito-RFP- Fluoreszenzmarkierung

3.5.2. Transient überexprimiertes BI-1-GFP lokalisiert vorwiegend im ER und im perinukleären Randsaum

Nach anti-PDI-Immunfärbung, einer Darstellung des ER-spezifischen Proteins Proteindisulfidisomerase, an transient BI-1-GFP-überexprimierenden CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen, konnte eine vorwiegende Lokalisation des gleichmäßigen BI-1-GFP-Expressionsmusters im endoplasmatischen Retikulum (ER) beobachtet werden. Außerdem zeigte sich eine BI-1-GFP-Expression im perinukleären Randsaum (A-C). Die BI-1-GFP-Akkumulationen, die nach transients Transfektion zu beobachten sind, zeigten hingegen keine Immunpositivität für den ER-Marker PDI (D-F).

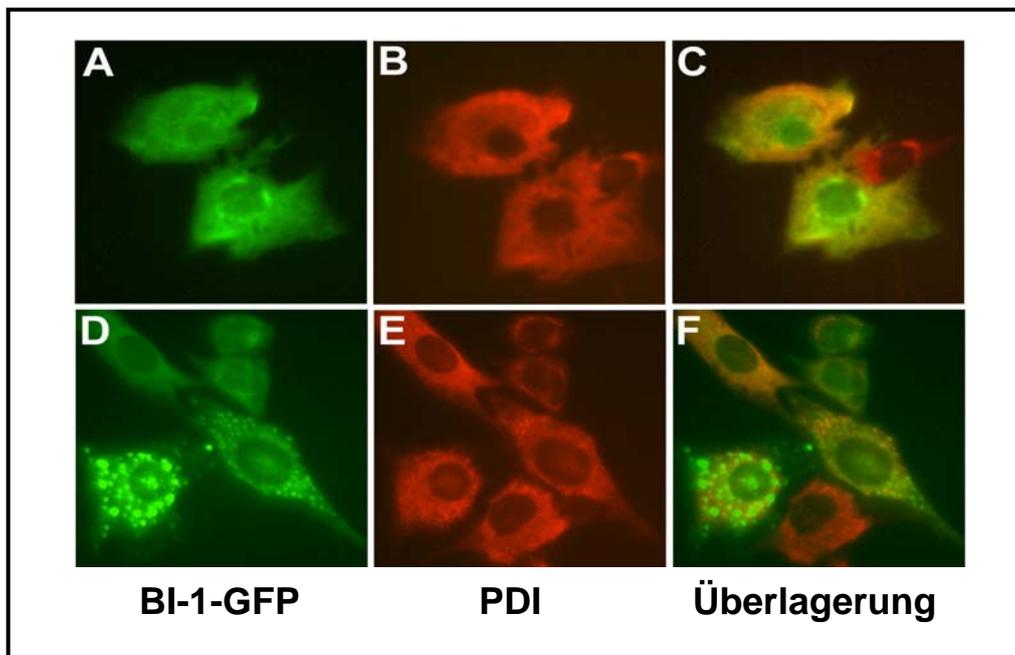


Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (63 x Objektiv) von transient BI-1-GFP-überexprimierenden CSM14.1-Zellen nach anti-PDI-Immunfärbung

3.5.3. BI-1-GFP-Akkumulationen finden sich nicht in Lysosomen

Als Marker für Lysosomen wurde ein anti-Cathepsin-D-Antikörper verwendet. Mit einer Darstellung der Lysosomen sollte insbesondere die Beobachtung der BI-1-GFP-Akkumulation weiter untersucht werden. Eine Lokalisation der Akkumulationen in Endosomen oder Lysosomen, welche dem Transport bzw. Abbau von Zellmaterial dienen, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

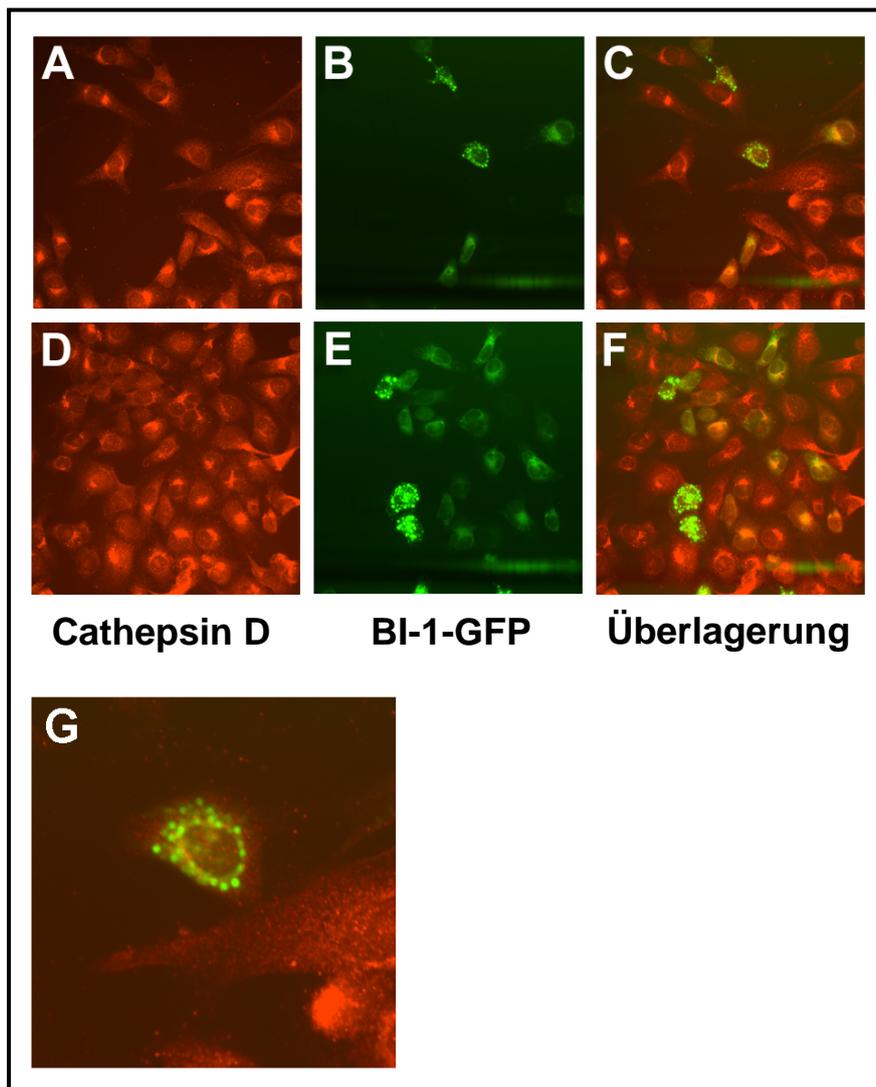


Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (40 x Objektiv) von transient BI-1-GFP-überexprimierenden CSM14.1-Zellen nach anti-Cathepsin-D-Immunfärbung (A-G). In Abbildung G ist zusätzlich ein vergrößerter Ausschnitt aus C dargestellt.

3.5.4. Akkumuliertes BI-1-GFP wird nicht ubiquitiniert

Mit Hilfe einer anti-Ubiquitin-Immunfärbung sollte die Hypothese einer Aggregation von BI-1-GFP nach Ubiquitinierung als Ursache der BI-1-GFP-Akkumulation überprüft werden. Eine Ubiquitinierung, die u.a. der Markierung von Zellmaterial für einen Abbau in Proteasomen dient, konnte jedoch für die BI-1-GFP-Akkumulationen nicht nachgewiesen werden.

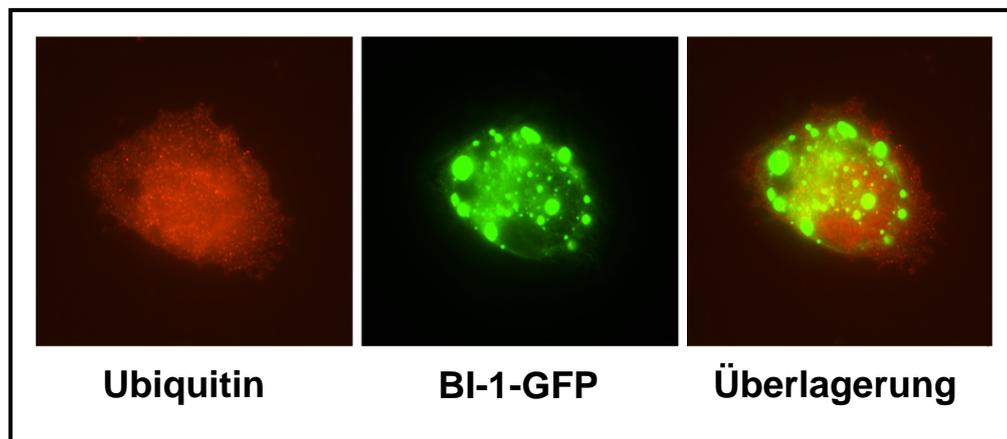


Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (63 x Objektiv) von transient BI-1-GFP-überexprimierenden CSM14.1-Zellen nach anti-Ubiquitin-Immunfärbung

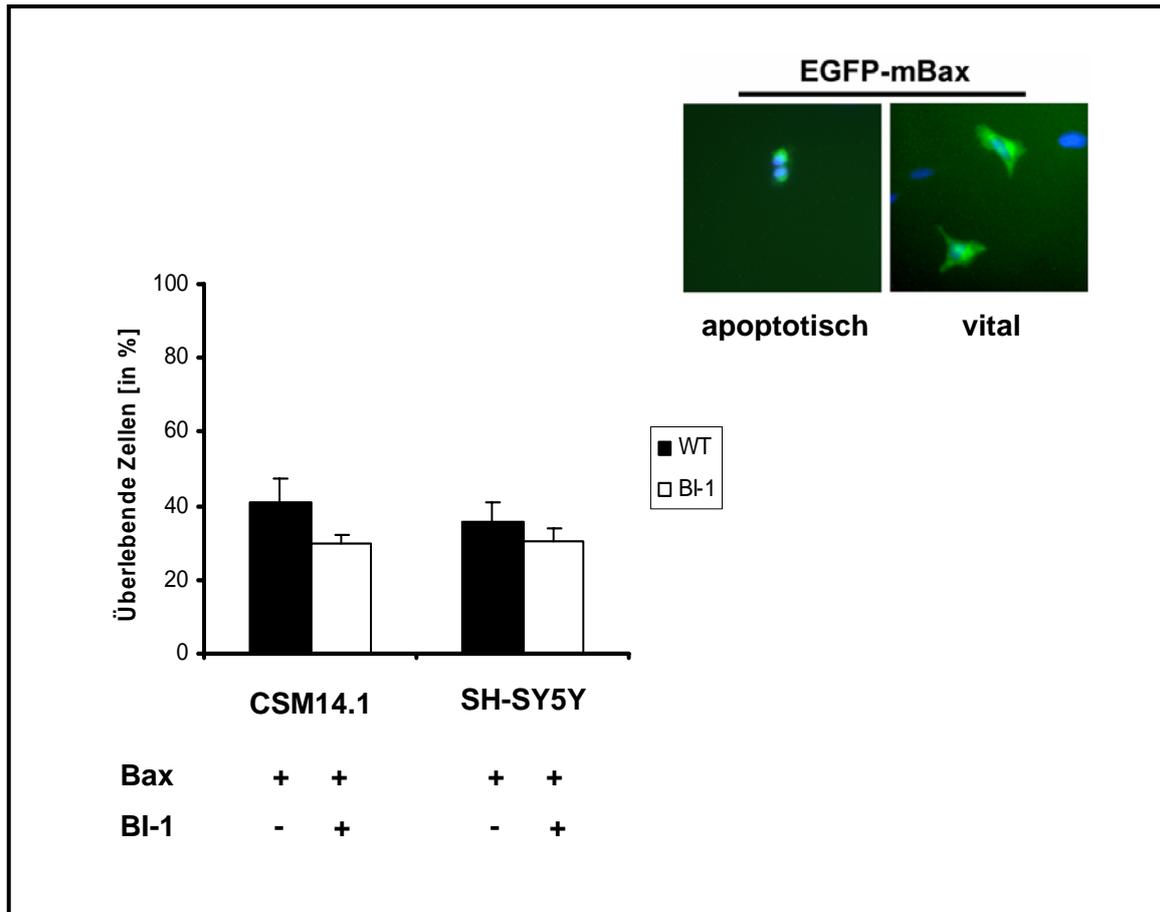
3.6. Zelltod-Assay an transient transfizierten Zellen

Die Wirkung von transient überexprimiertem BI-1 auf die neuronalen Zelllinien sollte zunächst nach Apoptoseinduktion durch den intrinsischen Apoptoseregulator Bax untersucht werden, da ein protektiver Effekt von BI-1 gegenüber Bax in der Literatur v.a. für Hefen und Pflanzen bereits beschrieben werden konnte (s. 1.).

3.6.1. Transient BI-1-überexprimierende CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen sind nicht vor Bax-induzierter Apoptose geschützt

In der folgenden Graphik ist der prozentuale Anteil von überlebenden CSM14.1- bzw. SH-SY5Y-Zellen nach 24 Stunden Apoptoseinduktion durch transient transfiziertes Bax dargestellt. Dabei werden transient BI-1-GFP- und pEGFP-N2-Leervektor-überexprimierende Zellen einander gegenübergestellt. Die Daten aus allen durchgeführten Assays dieser Art wurden für jede Zelllinie zusammengefasst. In der nebenstehenden Abbildung ist dargestellt, nach welchen morphologischen Charakteristika die Zellen in *apoptotisch* oder *vital* eingeteilt wurden.

Für beide Zelllinien konnte, entgegen den Erwartungen, kein protektiver Effekt gegenüber Bax in transient BI-1-überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden.



Graphik 1: Darstellung des prozentualen Anteils vitaler CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen nach 24 Stunden Bax-induzierter Apoptose mit nebenstehender (Insert rechts oben) morphologischer Charakterisierung nach der die Zellen, mit Hilfe der DAPI-Kernfärbung, in *vital* und *apoptotisch* eingeteilt wurden.

Schwarze Balken: WT = transient pEGFP-N2-Leervektor- und Bax-GFP-überexprimierende Zellen

Weißer Balken: BI-1 = transient BI-1-GFP- und Bax-GFP-überexprimierende Zellen

3.7. Stabile Transfektion der BI-1-Konstrukte

Aufgrund der BI-1-GFP-Akkumulationen unklarer Ursache im Großteil transient transfizierter Zellen und des möglicherweise darin begründeten, zur Literatur widersprüchlichen, Ergebnisses des Bax-Assays an transient transfizierten Zellen, wurden alle nachfolgenden Assays an stabil BI-1-HA-überexprimierenden Zellen durchgeführt.

3.7.1. Stabile Überexpression von BI-1-HA in CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen

Der folgende Immunoblot dokumentiert eine erfolgreiche, stabile Überexpression des BI-1-HA-Konstrukts in verschiedenen Einzelzellklonkolonien beider neuronaler Zelllinien nach Antibiotikaselektion. Zur quantitativen Abschätzung der geladenen Proteinmenge wurde für alle Lysate zusätzlich die Proteinbande für β -Tubulin bei 55 kDa als Ladekontrolle dargestellt.

Als Negativ-Kontrolle wurden erneut jeweils gleiche Proteinmengen aus Lysaten pcDNA3-Leervektor transfizierter CSM14.1- bzw. SH-SY5Y-Zellen verwendet. Als Positiv-Kontrolle dienten hier Zelllysate aus transienten Transfektionen mit BI-1-HA.

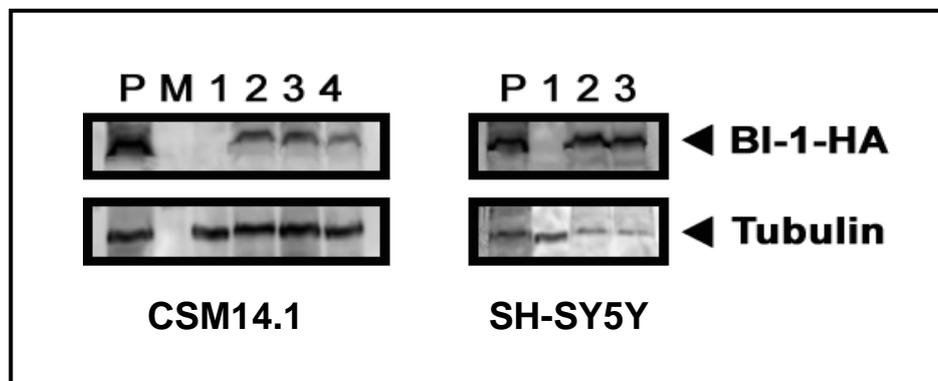


Abb. 10: Immunoblot nach stabiler Transfektion von BI-1-HA in CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen

P = Positiv-Kontrolle (transiente BI-1-HA-Transfektionen);

M = Marker; 1 = Negativ-Kontrolle;

2-4 = stabil BI-1-HA-überexprimierende Einzelzellklonkolonien

(Proteinbanden bei ca. 30 kDa)

3.7.2. In stabil BI-1-HA-überexprimierenden CSM14.1-Zellen können nahezu keine BI-1-Akkumulationen nachgewiesen werden

Die folgende Abbildung zeigt stabil BI-1-HA-überexprimierende CSM14.1-Zellen nach einer anti-HA-Immunfärbung. Die Abbildung wurde freundlicherweise von PD Dr. med. Pawel Kermer (Abteilung Neurologie, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt. In diesen Zellen konnte nahezu ausschließlich ein gleichmäßiges BI-1-HA-Expressionsmuster, ohne Hinweise auf BI-1-HA-Akkumulationen, nachgewiesen werden.

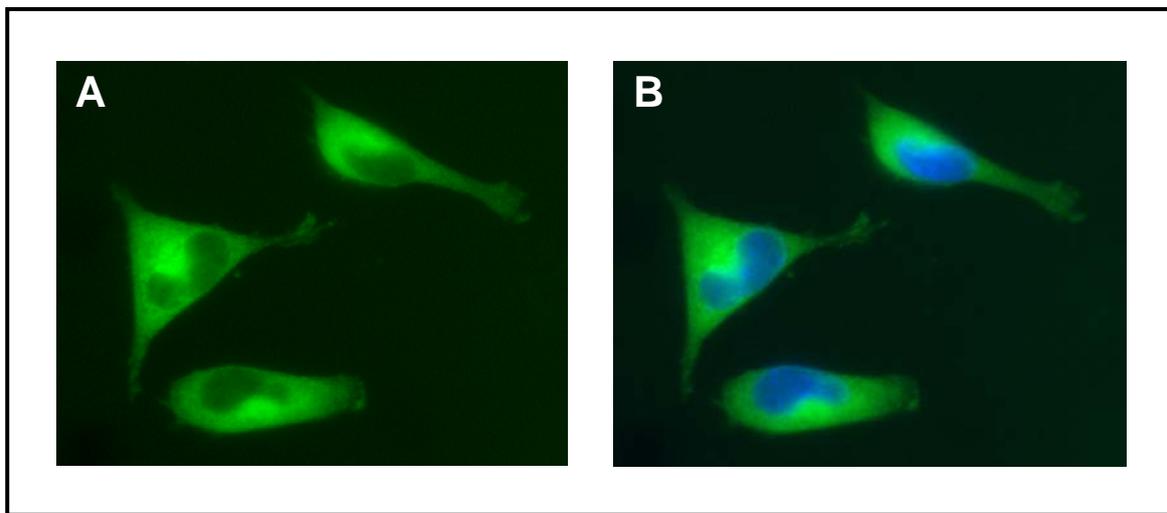


Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (40 x Objektiv) von stabil BI-1-HA-überexprimierenden CSM14.1-Zellen

A) nach anti-HA-Immunfärbung

B) nach anti-HA-Immunfärbung und zusätzlicher DAPI-Kernfärbung

3.7.3. Stabile Überexpression von BI-1-GFP in CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen

Die folgenden Abbildungen zeigen die erfolgreiche stabile Überexpression des BI-1-GFP-Konstrukts in beiden neuronalen Zelllinien. In stabil BI-1-GFP-transfizierten Zellen konnten nur noch in maximal 5 % der Zellen BI-1-GFP-Akkumulationen nachgewiesen werden, so dass der überwiegende Teil der Zellen ein gleichmäßiges BI-1-GFP-Expressionsmuster aufwies.

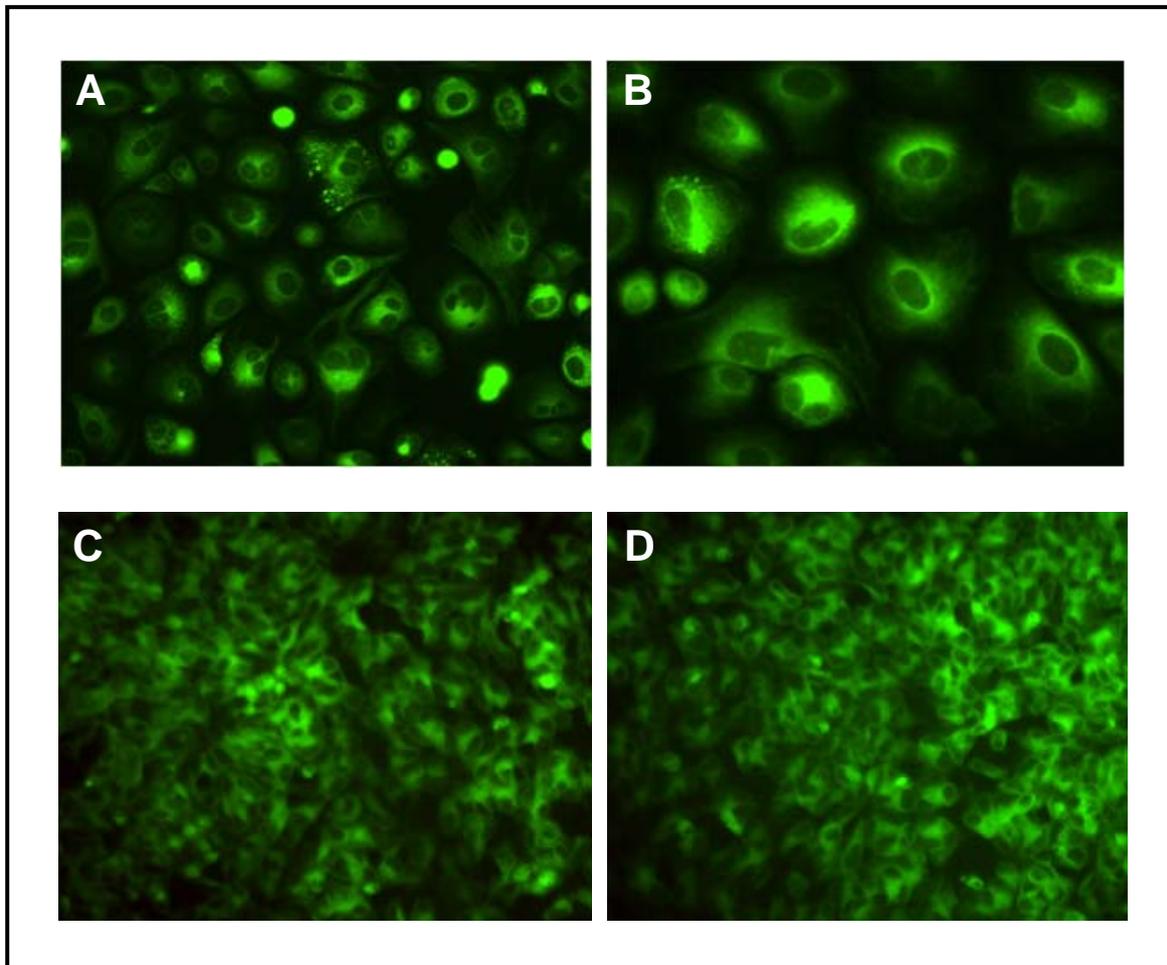


Abb. 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (40 x Objektiv) von BI-1-GFP-überexprimierenden CSM14.1- (A-B) und SH-SY5Y-Zellen (C-D)

3.8. Subzelluläre Lokalisation von BI-1-GFP in stabil transfizierten CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen

3.8.1. Stabil überexprimiertes BI-1-GFP lokalisiert nicht in Mitochondrien

Eine mögliche Assoziation von BI-1-GFP zu den Mitochondrien wurde, mit Hilfe von Mito-RFP- und zusätzlich MitoTracker-Fluoreszenzfärbungen, auch in stabil transfizierten CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen untersucht. In Analogie zu transient transfizierten Zellen, konnte keine Lokalisation von stabil überexprimiertem BI-1-GFP in Mitochondrien nachgewiesen werden. Exemplarisch werden in den folgenden Abbildungen nur Aufnahmen von CSM14.1-Zellen gezeigt.

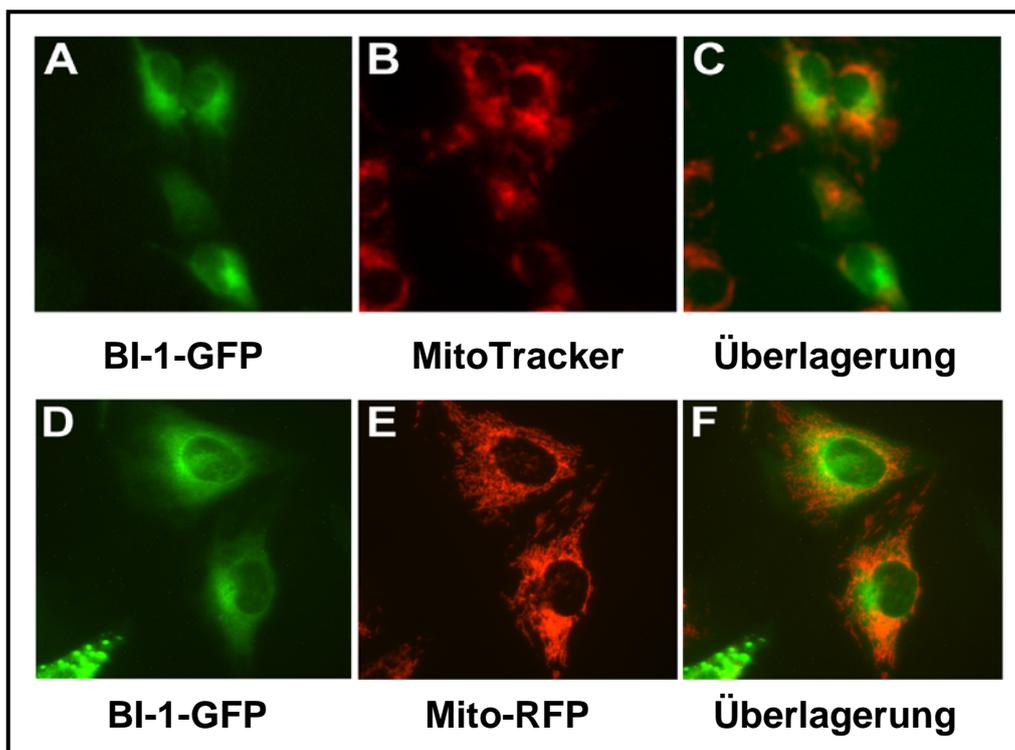


Abb. 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (63 x Objektiv) von stabil BI-1-GFP-überexprimierenden CSM14.1-Zellen nach MitoTracker- (A-C) bzw. Mito-RFP-Fluoreszenzfärbung (D-F)

3.8.2. Stabil überexprimiertes BI-1-GFP lokalisiert vorwiegend im ER und im perinukleären Randsaum

Die folgende Darstellung bestätigt den Nachweis einer überwiegenden Expression von BI-1-GFP im ER auch in stabil transfizierten CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen. Eine Expression von stabil transfiziertem BI-1-GFP in der perinukleären Region konnte ebenfalls gezeigt werden.

Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CSM14.1-Zellen nach anti-PDI-Immunfärbung.

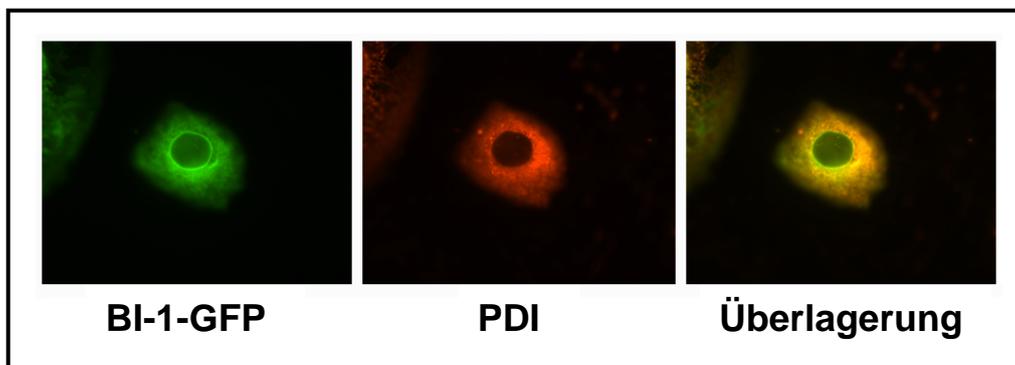


Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (63 x Objektiv) von stabil BI-1-GFP-überexprimierenden CSM14.1-Zellen nach anti-PDI-Immunfärbung

Dieses Resultat konnte auch mit Hilfe von konfokal-mikroskopischen Aufnahmen in beiden neuronalen Zelllinien bestätigt werden.

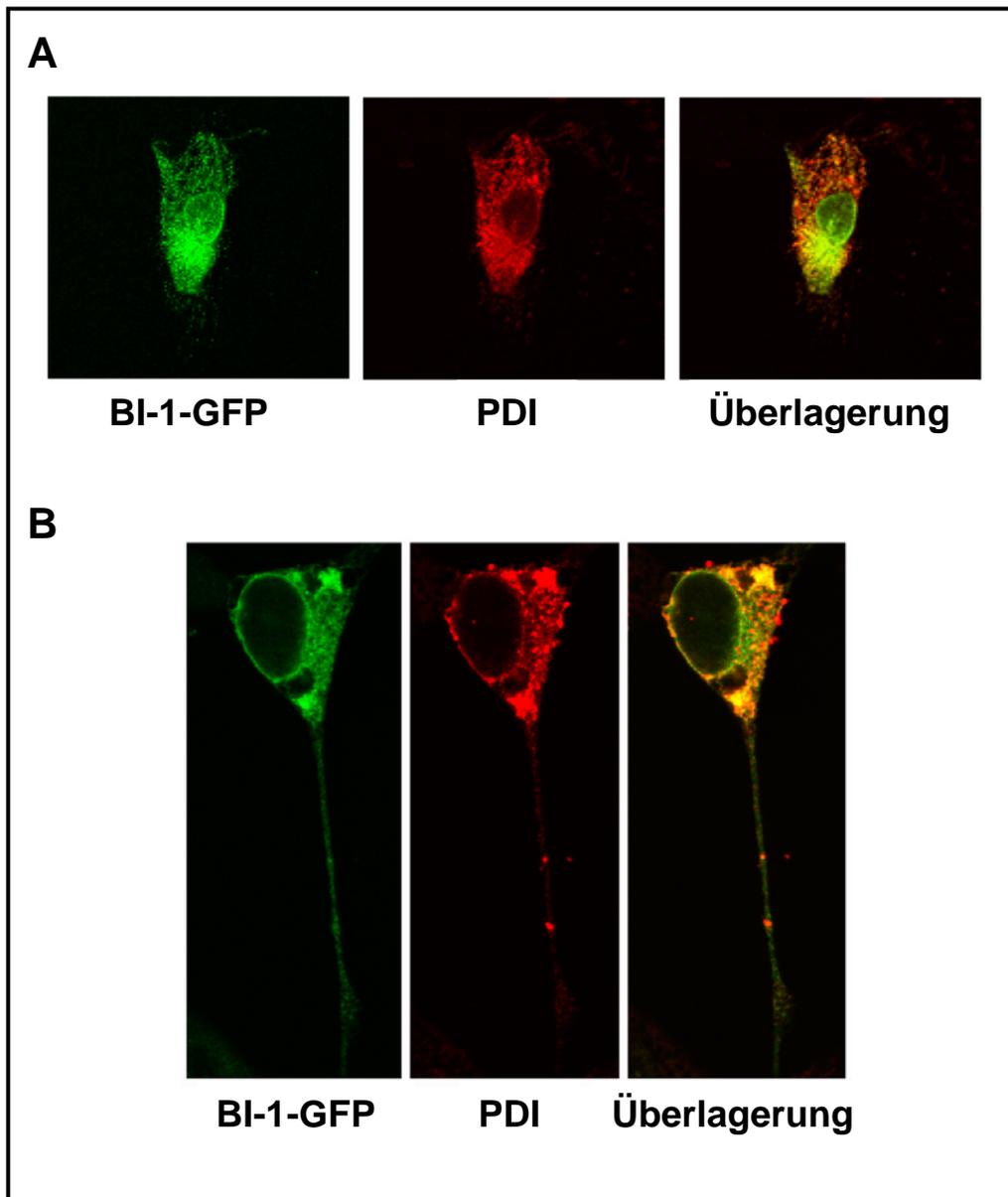


Abb. 15: Konfokalmikroskopische Aufnahmen (63 x Objektiv) von stabil BI-1-GFP-überexprimierenden CSM14.1- (A) und SH-SY5Y-Zellen (B) nach anti-PDI-Immunfärbung

3.9. Zelltod-Assays an stabil transfizierten Zellen

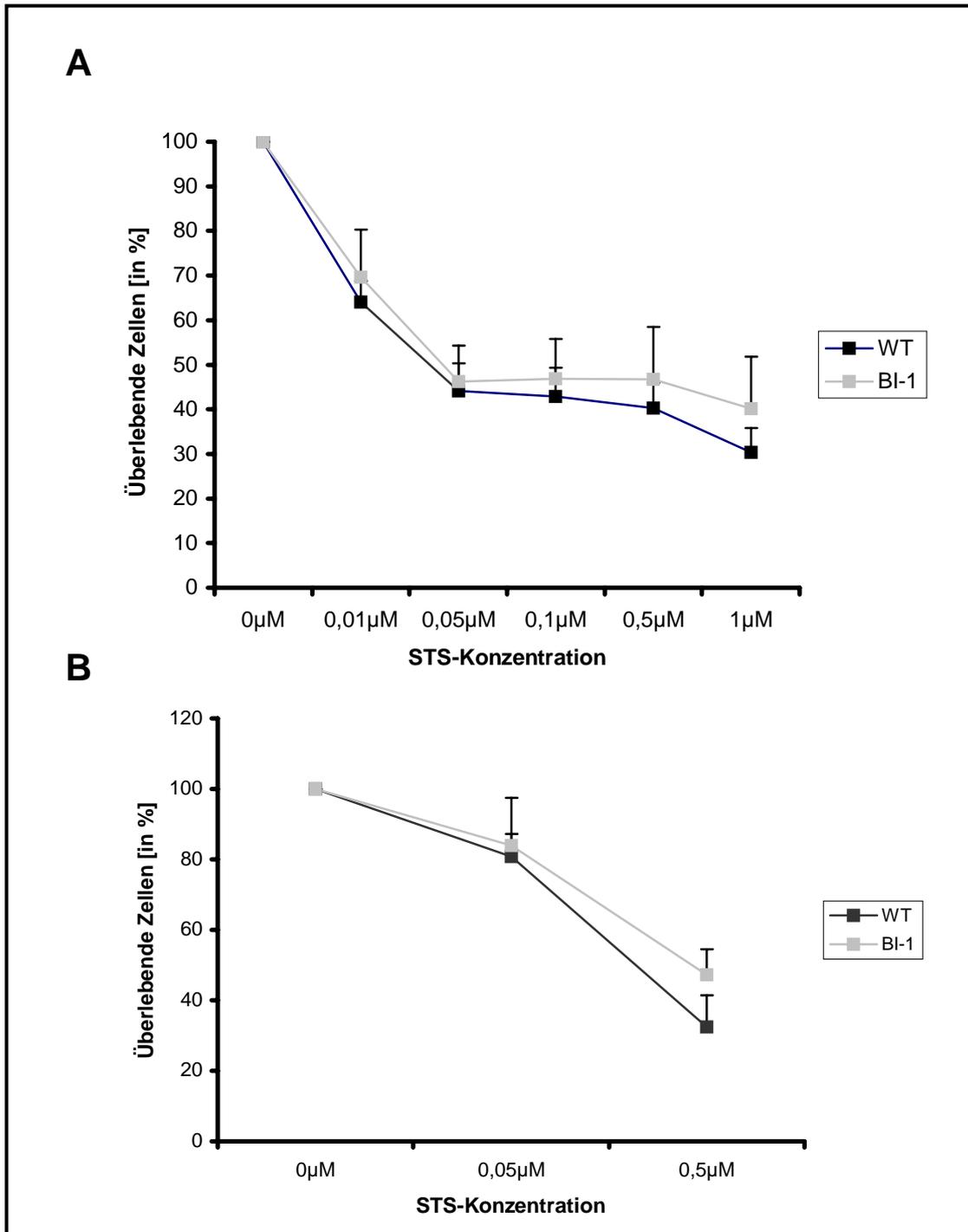
Die folgenden Graphiken zeigen die Resultate von verschiedenen Zelltod-Assays an stabil BI-1-HA-überexprimierenden CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Wirkung von BI-1 nach Zelltod-Induktion durch Mitochondrien- und ER-spezifische Stressoren gelegt.

3.9.1. Stabil BI-1-HA überexprimierende CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen sind nicht vor Staurosporin-induzierter Apoptose geschützt

Staurosporin ist ein Breitspektrum-Kinase-Inhibitor, welcher als Induktor des intrinsischen, mitochondrialen Apoptosewegs gilt (Chae et al. 2004).

Die folgenden Graphiken stellen den prozentualen Anteil überlebender CSM14.1- bzw. SH-SY5Y-Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Staurosporin dar. Als Kontrolle wurden pcDNA3-Leervektor-überexprimierende Zellen analog zu stabil BI-1-HA-überexprimierenden Zellen behandelt. Für jede Zelllinie wurden die Daten aus allen durchgeführten Assays dieser Art zusammengefasst.

Sowohl für CSM14.1-, als auch für SH-SY5Y-Zellen konnte kein signifikanter Schutz der BI-1-überexprimierenden Zellen gegenüber Leervektor-überexprimierenden Zellen vor Staurosporin nachgewiesen werden.



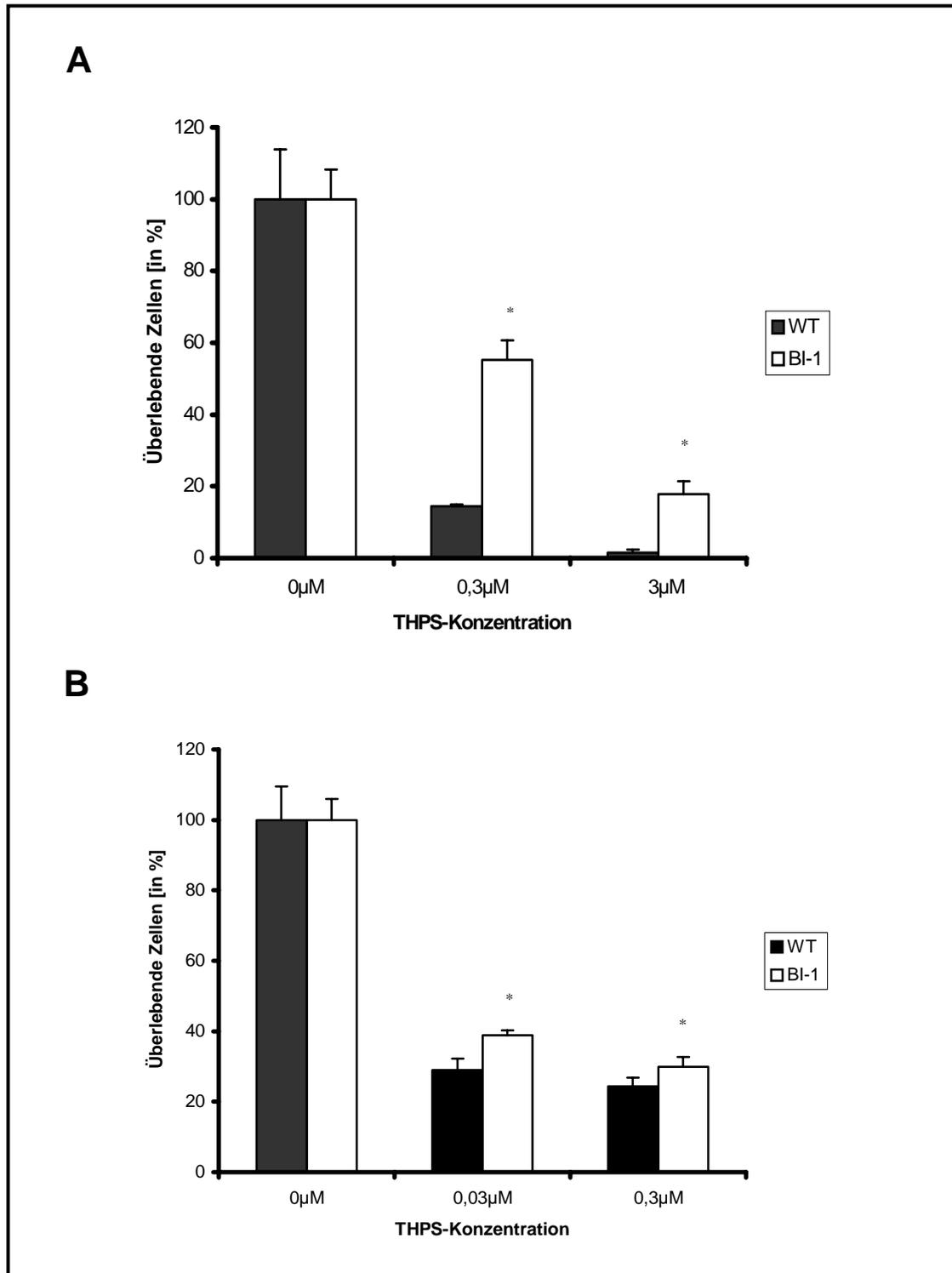
Graphik 2: Darstellung des prozentualen Anteils überlebender CSM14.1- (A) bzw. SH-SY5Y-Zellen (B) nach Staurosporin-induzierter Apoptose
Schwarze Linie: WT = pcDNA3-Leervektor-überexprimierende Zellen
Graue Linie: BI-1 = stabil BI-1-HA-überexprimierende Zellen

3.9.2. Stabil überexprimiertes BI-1 schützt CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen vor Thapsigargin-induzierter Apoptose

Thapsigargin ist ein spezifischer ER-Stressor, der über die Inhibition der ER-eigenen Ca^{2+} -ATPase wirkt.

Die folgende Graphik zeigt den prozentualen Anteil überlebender CSM14.1- bzw. SH-SY5Y-Zellen nach 48 Stunden Apoptoseinduktion durch Thapsigargin in aufsteigender Konzentration. Als Kontrolle wurden auch hier pcDNA3-Leervektor-überexprimierende Zellen analog zu stabil BI-1-HA-überexprimierenden Zellen behandelt. Die Daten aus allen durchgeführten Assays dieser Art wurden auch hier zusammengefasst.

Ein protektiver Effekt in BI-1-überexprimierenden Zellen gegenüber Thapsigargin konnte, im Vergleich zu Leervektor-überexprimierenden Zellen, in beiden Zelllinien mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ nach Students T-Test nachgewiesen werden.



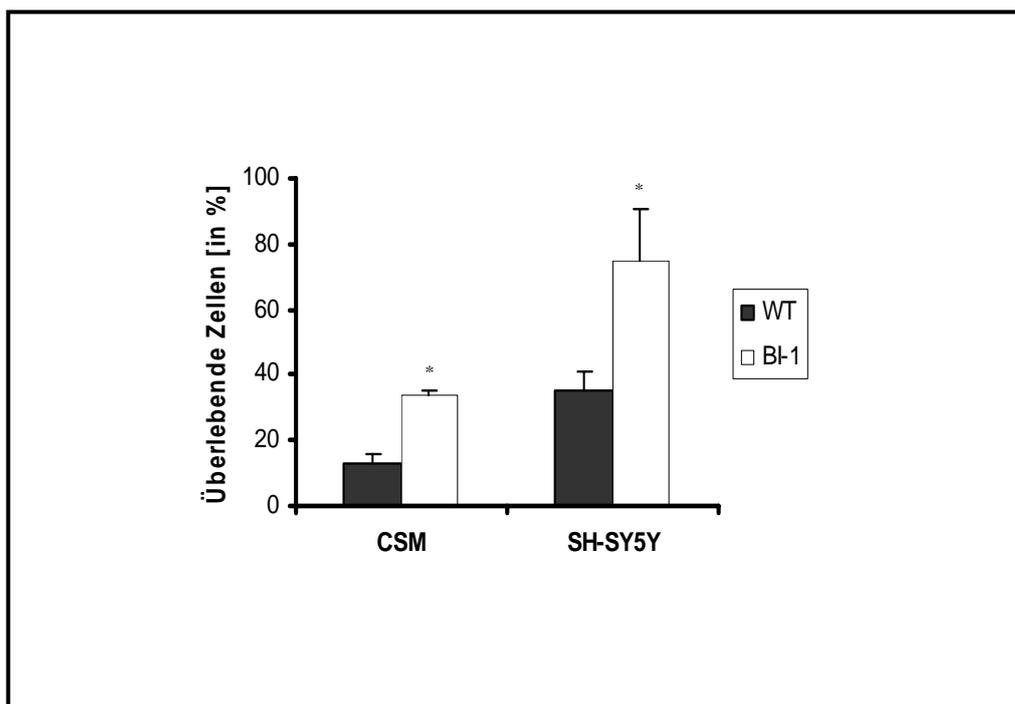
Graphik. 3: Darstellung des prozentualen Anteils überlebender CSM14.1- (A) bzw. SH-SY5Y-Zellen (B) nach Thapsigargin-induzierter Apoptose
Schwarze Balken: WT= pcDNA3-Leervektor-überexprimierende Zellen
Weiße Balken: BI-1= stabil BI-1-HA-überexprimierende Zellen

3.9.3. Stabil überexprimiertes BI-1 schützt CSM14.1-Zellen vor OGD- und SH-SY5Y-Zellen vor Serumdeprivation-induziertem Zelltod

Die Methoden der OGD bzw. Serumdeprivation dienen als Modell zur Induktion eines Ischämie-ähnlichen Zustands in beiden neuronalen Zelllinien, der ebenfalls mit ER-Stress assoziiert ist.

Die folgende Graphik stellt den prozentualen Anteil überlebender BI-1-überexprimierender CSM14.1-Zellen 24 Stunden nach OGD bzw. SH-SY5Y-Zellen 48 Stunden nach Serumdeprivation im Vergleich zu analog behandelten Leervektor-überexprimierenden Zellen dar. Die Daten aus allen durchgeführten Assays einer Art wurden zusammengefasst.

Ein neuroprotektiver Effekt von BI-1 in stabil transfizierten Zellen gegenüber Leervektor-überexprimierenden Zellen konnte mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ für beide Assays nach Students T-Test nachgewiesen werden.



Graphik 4: Darstellung des prozentualen Anteils überlebender CSM14.1-Zellen nach OGD (links) bzw. SH-SY5Y-Zellen nach Serumdeprivation (rechts)

Schwarze Balken: WT = pcDNA3-Leervektor-überexprimierende Zellen

Weißer Balken: BI-1 = stabil BI-1-HA-überexprimierende Zellen

4. DISKUSSION

BI-1 konnte bisher anhand von Untersuchungen an Hefen, Pflanzen und verschiedenen Säugetierzelllinien als vorwiegend anti-apoptotisches Protein charakterisiert werden. Die Wirkung von BI-1 in Neuronen ist dabei jedoch praktisch kaum betrachtet worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Rolle von BI-1 im Rahmen der neuronalen Apoptose zu untersuchen.

Hierzu wurde in den beiden neuronalen Zelllinien CSM14.1 (nigro-striatale Rattenzelllinie) und SH-SY5Y (humane Neuroblastomzelllinie) sowohl HA- als auch GFP-getaggetes BI-1 erfolgreich transient und stabil überexprimiert. Ein protektiver Effekt von BI-1 konnte in stabil transfizierten Zellen vor allem gegenüber ER-Stressoren wie Thapsigargin, aber auch gegenüber Sauerstoff- und Glukoseentzug bzw. Entzug von Serum gezeigt werden. Kein Effekt zeigte sich dagegen gegenüber dem mitochondrialen Stressor Staurosporin. Transient BI-1-überexprimierende Zellen konnten außerdem nicht vor Bax-induzierter Apoptose geschützt werden. Passend dazu konnte BI-1 vorwiegend im ER und der perinukleären Region lokalisiert werden, während es in Mitochondrien nicht nachzuweisen war. Die nur in transient transfizierten Zellen nachweisbaren BI-1-Akkumulationen konnten dagegen keinem untersuchten Zellkompartiment zugeordnet werden.

4.1. BI-1 und Bax-induzierter Zelltod

BI-1 wurde erstmals 1998, im Rahmen eines funktionellen cDNA-screenings in Hefen auf der Suche nach humanen Bax-Inhibitoren, als solcher entdeckt. Damals konnte bereits gezeigt werden, dass BI-1 und BI-1-Homologe nicht nur in Hefen, sondern auch in humanen 293-HEK-Zellen gegenüber Bax-induzierter Apoptose schützen (Bolduc et al. 2003; Xu Q und Reed 1998). Diese Erkenntnis konnte später zusätzlich in verschiedenen Pflanzen und Pflanzenzellen bestätigt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in transient transfizierten neuronalen CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen der erwartete protektive Effekt von BI-1 gegenüber Bax jedoch nicht beobachtet werden. Es zeigte sich im Gegenteil sogar ein eher pro-apoptotischer Effekt in BI-1-überexprimierenden Zellen. In der Literatur findet sich eine weitere Arbeit, in der ein toxischer Effekt von BI-1 in Bax-behandelten Zellen beschrieben wird. Dabei zeigte sich in AtBI-1 überexprimierenden HT1080-Zellen (humane Fibrosarkom-Zelllinie) eine proportional zur transfizierten BI-1-Menge ansteigende, Caspase-abhängige Apoptoseinduktion in den Bax-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Da in diesem

Fall pflanzliches BI-1 in artfremde Säugetierzellen eingebracht worden ist, wurden diese Beobachtungen über eine Inaktivierung des endogenen Säugetier-BI-1 der HT1080-Zellen durch das Pflanzen-BI-1 erklärt, wodurch Bax keinen Gegenspieler mehr hat (Yu LH et al. 2002). Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob dieses gegensätzliche Verhalten von der Zellart oder dem jeweiligen Pflanzen-BI-1 abhing (Hückelhoven 2004).

Dass es sich bei den Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit um einen ähnlichen Effekt handelt, ist jedoch unwahrscheinlich, da hier humanes BI-1 nicht nur in artfremde Rattenneurone, sondern ebenfalls in die artgleichen humanen SH-SY5Y-Zellen eingebracht worden ist. Wahrscheinlicher ist, dass der scheinbar toxische Effekt von BI-1 hier mit den, nur in transient mit BI-1-GFP transfizierten Zellen beobachteten Akkumulationen in Zusammenhang steht. Es ist nicht auszuschließen, dass die BI-1-GFP-Akkumulationen in transient transfizierten Zellen einen gegenüber Stress (z.B. durch Bax) sensibilisierenden Einfluss haben. Anhand der zellorganell-spezifischen Färbungen gegen Cathepsin D und Ubiquitin ließ sich jedoch kein Hinweis auf deren Abbau als Kompensationsversuch ihrer möglichen Toxizität finden. Somit konnte die anfängliche Vermutung, dass es sich bei akkumuliertem BI-1-GFP um ein überschüssiges toxisches Genprodukt handelt, dass als Folge einer für die Zelle überschießenden BI-1-GFP-Expression unter dem CMV-Promotor in Protein-abbauenden Zellorganellen abgebaut wird, nicht bestätigt werden. Bei den BI-1-GFP-Akkumulationen scheint es sich demnach um GFP-bedingte Artefakte zu handeln. Der Grund für die, zu den meisten Ergebnissen der Literatur kontroversen, fehlenden Wirkung von transient transfiziertem BI-1-GFP gegenüber Bax-induziertem Zelltod muss demnach unklar bleiben.

Sowohl in stabil BI-1-GFP-, als auch BI-1-HA-überexprimierenden Zellen, in denen das BI-1-Gen fest in das Genom der Zelle eingebaut ist, ließen sich dagegen, vermutlich wegen der im Vergleich zu transient transfizierten Zellen geringeren Expressionseffizienz, praktisch keine Akkumulationen nachweisen. Alle weiteren Zelltodassays wurden daher an stabil BI-1-HA-überexprimierenden Zellen durchgeführt.

4.2. Subzelluläre Lokalisation von BI-1

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die subzelluläre Lokalisation von BI-1 in neuronalen Zellen zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass BI-1 in CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen vorwiegend dem ER (endoplasmatisches Retikulum) und der perinukleären Region zuzuordnen ist, während es in Mitochondrien nicht nachgewiesen werden konnte. In transient und stabil transfizierten Zellen

ergab sich dabei kein Unterschied in der subzellulären Lokalisation von nicht-akkumuliertem BI-1.

Im Rahmen anderer Studien konnte BI-1 ebenfalls in verschiedenen nicht-neuronalen Säugetierzellen (293-HEK-, Cos-7- und GM701-Zellen), sowie diversen Pflanzen- und Hefezellen vorwiegend im ER und dem perinukleären Randsaum, jedoch praktisch nicht in den Mitochondrien lokalisiert werden (Xu Q und Reed 1998; Kawai-Yamada et al. 2001; Bolduc et al. 2003; Eichmann et al. 2004; Baek et al. 2004). Aktuelle Studien konnten dieses Ergebnis auch in CHO(*chinese hamster ovary*)-Zellen bestätigen und zusätzlich eine Kolokalisation von BI-1 und Bcl-2 im Zytosol, jedoch nicht am perinukleären Randsaum nachweisen (Westphalen et al. 2005).

4.3. BI-1 und mitochondrialer Stress

Der apoptotische Zelltod einer oder mehrerer Nervenzellpopulationen ist bei vielen sowohl akuten, als auch chronischen neuronalen Erkrankungen ein ursächlicher Pathomechanismus. Am besten erforscht sind dabei bisher zwei Signaltransduktionswege, die als extrinsischer und intrinsischer Apoptoseweg bezeichnet werden (s.1.1.2.). Während der extrinsische Apoptoseweg durch die Aktivierung von Zytokinrezeptoren der TNF-Familie an der Zelloberfläche initiiert wird, hängt der intrinsische Weg essentiell von Integrität und Funktion der Mitochondrien ab (Reed 2000).

Da eine hohe Relevanz des intrinsischen Signaltransduktionsweges für die neuronale Apoptose bereits bekannt ist (Yuan und Yankner 2000), wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht, ob eine stabile Überexpression von BI-1 in neuronalen Zellen einen protektiven Effekt gegenüber Induktoren dieses Mitochondrien-abhängigen Apoptosewegs hat. Als Zelltodstimulus wurde der aus *Streptomyces staurosporeus*-Bakterien isolierbare Breitspektrum-Kinaseinhibitor Staurosporin (STS) gewählt, welcher als Induktor des intrinsischen Apoptosewegs gilt (Chae et al. 2004). Sowohl in CSM14.1- als auch in SH-SY5Y-Zellen konnte nach stabiler BI-1-Überexpression jedoch kein schützender Effekt gegenüber STS nachgewiesen werden.

Auch in der Literatur sind bereits Untersuchungen beschrieben, die sich mit der Induktion intrinsischer Apoptose in BI-1-überexprimierenden nicht-neuronalen Zellen befassen.

Ältere Studien an BI-1-überexprimierenden FL5.12-Zellen (Interleukin-3-abhängige pro-B-Lymphozyten) zeigen ein zu den Ergebnissen dieser Arbeit kontroverses Resultat. Diese Zellen wurden ebenfalls mit STS bzw. zusätzlich VP16 (Etoposid), einem weiteren intrinsischen Zelltodinduktor, behandelt. In beiden Fällen zeigte sich jedoch eine deutlich

bessere Überlebensrate der stabil BI-1-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Xu Q und Reed 1998). Die in den FL5.12-Zellen ausgelöste Apoptoseinhibition durch mitochondriale Stressoren wird heute dadurch erklärt, dass es Querverbindungen zwischen dem ER- und dem Mitochondrien-abhängigen Apoptoseweg gibt, wodurch Mitochondrien-initiierte Zelltodsignale vom ER amplifiziert werden können (Chae et al. 2004).

Ergebnisse aus aktuelleren Untersuchungen untermauern dagegen die Resultate der vorliegenden Arbeit. Unter anderem konnte in stabil mit BI-1 transfizierten HT1080-Zellen (humane Fibrosarkom-Zelllinie) kein protektiver Effekt gegenüber mitochondrial induzierter Apoptose gezeigt werden. Die Zellen wurden dabei mit den mitochondrialen Stressoren VP16 und Doxorubicin behandelt. Diese Ergebnisse konnten auch in primären Zellen aus BI-1-Knockout-Mäusen bestätigt werden. Nach Behandlung primärer embryonaler Fibroblasten, Hepatozyten und Neurone dieser Mäuse mit VP16 bzw. STS konnte auch hier kein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate der BI-1^{-/-}-Knockout-Zellen im Vergleich zu BI-1^{+/+}-Zellen aus Kontrollmäusen festgestellt werden (Chae et al. 2004).

Dass sich auch in der vorliegenden Arbeit kein signifikant schützender Effekt in stabil BI-1-überexprimierenden CSM14.1- und SH-SY5Y-Zellen gegenüber STS ergeben hat, wird zusätzlich durch die Ergebnisse der durchgeführten Zellkompartiment-spezifischen Fluoreszenzfärbungen plausibel, da sowohl stabil als auch transient transfiziertes BI-1 den Mitochondrien nicht zugeordnet werden konnte.

Diese Resultate sprechen dafür, dass die anti-apoptotische Wirkung von BI-1 wahrscheinlich nicht auf der Interaktion mit Mitochondrien bzw. der Blockade mitochondrialer Apoptosevorgänge beruht.

4.4. BI-1 und ER-Stress

Es gibt Hinweise, dass Apoptose nicht nur über den extrinsischen oder intrinsischen Apoptoseweg eingeleitet werden kann, sondern auch von anderen Organellen, wie beispielsweise dem ER ausgehen kann. Das ER ist der größte intrazelluläre Ca²⁺ - Speicher und spielt eine wichtige Rolle für den zellulären Redox-Status. Es hat sich gezeigt, dass das ER über eine Akkumulation ungefalteter Proteine, durch Störungen der ER-eigenen Chaperonaktivität und eine veränderte Ca²⁺ - Freisetzung, an der Initiation von Apoptose beteiligt ist (Kaufman 1999; Patil und Walter 2001; Demarex und Distelhorst 2003). Durch ER-Stress kann so die Aktivierung von spezifischen Caspasen getriggert werden. Einige davon werden direkt mit dem ER (z.B. Caspase-12) oder dem Golgi-Apparat (z.B. Caspase-2)

assoziiert (Mancini et al. 2000; Nakagawa et al. 2000). Es kann dadurch außerdem zur sekundären Freisetzung von Cytochrom-C aus den Mitochondrien kommen (Hückelhoven 2004). Auch für neurodegenerative Erkrankungen, bei denen es zu Störungen der Faltung und Sekretion von Proteinen des ER-Golgi-Kompartiments kommt, könnte dieser Apoptoseweg bedeutsam sein (Chae et al. 2004).

Vor dem Hintergrund, dass BI-1 in den durchgeführten Zellkompartiment-spezifischen Immunfärbungen vorwiegend dem ER und dem perinukleären Randsaum zugeordnet werden konnte, sollte untersucht werden, ob analog dazu ein Zusammenhang zwischen Lokalisation und neuroprotektiver Wirkung von BI-1 besteht. Als spezifischer ER-Stressor wurde dazu das aus der Pflanze *Thapsia garganica* isolierbare Sesquiterpen-Lakton Thapsigargin (THPS) gewählt. THPS ist ein Tumorpromotor, der spezifisch die Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen und des sarkoplasmatischen Retikulums inhibiert, und dadurch letztlich die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER erhöht. Die Untersuchungen dieser Arbeit haben ergeben, dass stabil überexprimiertes BI-1 sowohl in CSM14.1- als auch in SH-SY5Y-Zellen signifikant vor Apoptose durch den ER-Stressor Thapsigargin schützt.

In der aktuellen Literatur finden sich einige Erkenntnisse, die sich mit den Resultaten der vorliegenden Dissertation decken. Nach Inkubation von beispielsweise HT1080-Zellen mit THPS bzw. Tunicamycin (TUN), einem Inhibitor der N-terminalen Glycosylierung, durch den der Glycoproteintransport zwischen ER und Golgi-Apparat gestört wird, ließ sich ebenfalls eine deutliche Protektion der BI-1-überexprimierenden Zellen nachweisen (Chae et al. 2004).

Ähnliche Erkenntnisse konnten aus Experimenten mit primären Zellen gewonnen werden. Im Rahmen eines BI-1-Knockout-Modells an Mäusen wurden primäre embryonale Fibroblasten, Hepatozyten und Neurone ebenfalls mit THPS bzw. TUN versetzt. Dabei wurden BI-1^{-/-}-Knockout-Zellen und BI-1^{+/+}-Kontrollzellen einander gegenüber gestellt. In allen Fällen ergab sich eine deutlich niedrigere Apoptoserate der BI-1^{+/+}-Kontrollzellen (Chae et al. 2004).

Erste in-vivo-Versuche, wobei Kontroll- und Knockout-Mäusen TUN injiziert worden ist, zeigten einen ähnlichen Effekt. In vivo injiziertes TUN führt dabei v.a. zum Tod epithelialer Zellen des renalen Tubulus (Zinszner et al. 1998; Nakagawa et al. 2000) und zur Apoptoseinduktion in hippokampalen Neuronen. In Tubuluszellen und Neuronen der BI-1^{+/+}-Kontrollmäuse zeigte sich histologisch eine deutlich niedrigere Apoptoserate als in den Zellen der Knockout-Mäuse (Chae et al. 2004).

Somit scheint BI-1 tatsächlich, analog zu seiner Lokalisierbarkeit im ER und der perinukleären Region, direkt über das ER oder über eine Störung der Signaltransduktionskette

zwischen ER, Golgi und den Mitochondrien, jedoch nicht über einen der klassischen Apoptosewege, einen anti-apoptotischen Einfluss auf die Zelltodregulation nehmen zu können (Chae et al. 2004). Aus diesem Grund wurde die Wirkung von BI-1 gegenüber weiteren, in der Neurologie relevanten, ER-assoziierten Stressoren untersucht.

4.5. BI-1 und OGD/Serumdeprivation-induzierter Stress

Es hat sich gezeigt, dass ER-Stress nicht nur den Untergang von Nervenzellen im Rahmen neurodegenerativer Erkrankung wie Morbus Alzheimer induziert (Katayama et al. 2004), sondern außerdem eine zentrale Rolle während der Gewebeverletzung durch Ischämie und Reperfusion z.B. im Rahmen von Schlaganfällen spielt (Lipton 1999). Ein ATP-Defizit, ausgelöst durch eine Hypoxie, kann dabei u.a. eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER in das Zytosol bewirken, wodurch weitere Apoptosewege getriggert werden können. Hypoxie und Hypoglykämie initiieren außerdem eine Fehlfaltung von Proteinen im ER und die Freisetzung von weiteren transmembranen Signaltransduktionsproteinen aus dem ER, welche ebenfalls an der Einleitung des Zelltodprogramms beteiligt sind (Orrenius et al. 2003; Breckenridge et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit diente v.a. die Methode der Sauerstoff-/Glukose-Deprivation (OGD) als Modell zur Induktion eines Ischämie-ähnlichen Zustands in CSM14.1-Zellen. Dabei wurde den Zellen innerhalb eines definierten Zeitraumes sowohl Sauerstoff und Glukose, als auch Serum entzogen. SH-SY5Y-Zellen wurden aus technischen Gründen nur der Serumdeprivation ausgesetzt. Dabei zeigte sich für beide Zelllinien eine signifikant höhere Überlebensrate in den BI-1-überexprimierenden Zellen während des jeweils Ischämie-ähnlichen Zustandes.

In der Literatur finden sich bisher nur wenige Artikel, die sich mit der Betrachtung von BI-1 im Rahmen einer Ischämie befassen. Diese bestätigen jedoch das Ergebnis der vorliegenden Arbeit anhand von Untersuchungen an anderen Zelllinien.

Die Überexpression von BI-1 konnte beispielsweise Zellen, welche aus den Ovarien von Hamstern stammen (CHO-Zellen), ebenfalls vor OGD-induzierter Apoptose schützen. Für Zellen, die als Vergleich mit einer ΔC -Deletionsmutante von BI-1 transfiziert worden waren, konnte dagegen kein protektiver Effekt nachgewiesen werden (Westphalen et al. 2005).

Ältere Untersuchungen weisen wiederum eine anti-apoptotische Wirkung von BI-1 gegenüber Zelltod, ausgelöst durch Serum- bzw. Wachstumsfaktorentzug in GM701-Zellen (humane Fibroblasten-Zelllinie) nach (Xu Q und Reed 1998).

Eine aktuelle Studie hat die Effekte von BI-1 gegenüber einer Ischämie bereits mit Hilfe von BI-1-Knockout-Mäusen *in vitro* und *in vivo* untersucht. Bei den *in-vitro*-Versuchen wurden primäre Hepatozyten dieser Mäuse ebenfalls für einen definierten Zeitraum unter OGD-Bedingungen kultiviert, wobei auch hier eine deutlich bessere Überlebensrate bei den BI-1^{+/+}-Kontrollzellen im Vergleich zu den BI-1^{-/-}-Knockout-Zellen nachweisbar war. *In vivo* wurde ein Ischämie-Zustand mit Hilfe eines Modells zur Okklusion von hepatischen bzw. renalen Arterien erreicht. Nach hepatischer Ischämie zeigte sich bei den BI-1^{-/-}-Knockout-Mäusen nicht nur eine signifikant höhere Zelltodrate der Hepatozyten, sondern auch ein verstärkter Anstieg der Serumtransaminasen AST (Aspartat-Aminotransferase), ALT (Alanin-Aminotransferase) und LDH (Laktat-Dehydrogenase), eine höhere Akkumulation neutrophiler Granulozyten im Ischämie-Gebiet und eine gesteigerte Caspase-Aktivität. Außerdem konnte in diesen Tieren im Vergleich zu den BI-1^{+/+}-Kontrollmäusen eine erhöhte Aktivierung bzw. Freisetzung ER-Stress-spezifischer Proteine, wie u.a. IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*), ATF6 (*activating transcription factor 6*), CHOP (*C/EBP homologous protein*) und sXBP-1 festgestellt werden. In den Nieren der BI-1^{-/-}-Knockout-Mäuse konnte, neben einer Erhöhung des Kreatinin-Wertes im Serum, ebenfalls eine gesteigerte Sensitivität des Gewebes gegenüber renaler Ischämie nachgewiesen werden (Bailly-Maitre et al. 2006). Des Weiteren zeigten *in-vivo*-Schlaganfallexperimente, nach Minderperfusion des Gehirns die Entstehung eines wesentlich größeren Schlaganfallareals in BI-1^{-/-}-Knockout-Mäusen im Vergleich zu den BI-1^{+/+}-Kontrollmäusen (Chae et al. 2004).

4.6. BI-1 als Ca²⁺-Regulator

In der Literatur finden sich inzwischen einige Hinweise auf mögliche Angriffspunkte von BI-1 in einer durch ER-Stress initiierten Apoptosekaskade, die sämtlich eine Assoziation des BI-1-Signaltransduktionsweges mit der Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER zeigen.

So konnte in BI-1-überexprimierenden HT1080-Zellen nach Apoptoseinduktion durch ER-Stressoren wie THPS bzw. TUN im Vergleich zur Kontrolle eine geringere Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER, eine deutlich reduzierte Caspaseaktivität und eine verminderte Depolarisation der Mitochondrienmembran beobachtet werden. Außerdem zeigte sich, dass eine durch den ER-Stress ausgelöste Aktivierung und Translokation von Bax zu den Mitochondrien durch die BI-1-Überexpression unterbunden werden konnte, während BI-1 auf die pro-apoptische Wirkung mitochondrialer Stressoren wie STS, keinen Einfluss hatte (Chae et al. 2004).

Auch in homozygot BI-1-positiven primären embryonalen Fibroblasten konnte als Antwort auf THPS bzw. TUN eine deutlich geringere Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER im Vergleich zu den BI-1^{-/-}-Knockout-Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte BI-1 nach Apoptoseinduktion durch klassische extrinsische (s.1.2.7.) oder intrinsische Stressoren keinen Einfluss auf Caspaseaktivitäten nehmen, wodurch deutlich wird, dass der Angriffspunkt von BI-1 selektiv mit dem ER assoziiert zu sein scheint (Chae et al. 2004).

Ein ähnlicher Effekt konnte auch in mit BI-1-EGFP transfizierten CHO-Zellen beobachtet werden. Dabei wurde mit Hilfe des Ca^{2+} -Chelators Fura-2 der Ca^{2+} -Gehalt im Zytosol einzelner Zellen nach Ca^{2+} -Induktion durch ATP gemessen. Bei 72 % der BI-1-EGFP-überexprimierenden Zellen konnte praktisch keine Ca^{2+} -Antwort nachgewiesen werden, während EGFP-Leervektor transfizierte Zellen eine normale Antwort zeigten. Nach spezifischer Fluoreszenz-Markierung des ER-eigenen Kalziums, konnte in diesen und anderen Zellen nach BI-1-Überexpression ebenfalls eine verminderte Ca^{2+} -Freisetzung speziell aus dem ER gezeigt werden. In Zellen, welche eine ΔC -Deletionsmutante von BI-1 überexprimierten, war dieser Effekt hingegen nicht zu beobachten. In BI-1-überexprimierenden CHO-Zellen konnte nach Ca^{2+} -Induktion durch ATP bzw. THPS außerdem ein verminderter Ca^{2+} -Anstieg in den Mitochondrien festgestellt werden. Es wird somit vermutet, dass BI-1 über eine Reduktion der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER auch dämpfend auf eine Ca^{2+} -Mobilisation im Zytosol und in den Mitochondrien wirkt (Westphalen et al. 2005).

Unterstützt werden diese Ergebnisse von der auch in dieser Arbeit demonstrierten Lokalisierbarkeit von BI-1 im ER, der protektiven Wirkung gegenüber ER-Stressoren und von der Tatsache, dass der Aufbau der transmembranen Domänen von BI-1 dem eines Ionen-Kanals ähnelt. Die transmembranen Elemente des BI-1-Proteins weisen dabei eine α -helikale Struktur mit sowohl hydrophilen als auch hydrophoben Resten auf, die in ähnlicher Anordnung vorkommen wie bei den meisten Ionen-Kanälen. Die nicht transmembranen Regionen sind relativ kurz, was ebenfalls typisch für Kanal-bildende Proteine ist (Xu Q und Reed 1998), so dass der Verdacht nahe liegt, dass es sich möglicherweise bei BI-1 selbst um ein Kanal-Protein handeln könnte (Xu Q und Reed 1998; Bolduc et al. 2003). In einer Funktion als Ionen-Kanal-Protein könnte BI-1 direkten Einfluss auf die Freisetzung von Ca^{2+} nehmen. Der tatsächliche Nachweis einer Kanal-Funktion von BI-1 ist allerdings bislang nicht gelungen.

4.7. Fazit dieser Arbeit

In der vorliegenden Dissertation konnte BI-1 erstmals als ER-Protein und potenter Apoptoseinhibitor gegenüber ER-assoziiertem Stress in Neuronen präsentiert werden. Gegenüber Induktoren der intrinsischen, von den Mitochondrien abhängigen Apoptosekaskade konnte dagegen kein protektiver Effekt von BI-1 nachgewiesen werden. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch den vorwiegenden Nachweis von BI-1 im ER und der perinukleären Region, während es in Mitochondrien nicht zu finden war.

BI-1 scheint somit auch in Neuronen nur über einen ER-assoziierten Signaltransduktionsweg und nicht über einen der klassischen Apoptosewege einen anti-apoptotischen Einfluss auf die Zelltodregulation nehmen zu können. Dadurch liegt eine Relevanz von BI-1 gegenüber der Entstehung neurodegenerativer Erkrankung wie Morbus Alzheimer nahe, da auch dort der Untergang von Nervenzellen durch ER-Stress ausgelöst werden kann (Katayama et al. 2004). Die anti-apoptotische Wirkung von BI-1 gegenüber ER-assoziiertem Stress ausgelöst durch die Erzeugung eines Ischämie-ähnlichen Zustandes über den Entzug von Sauerstoff und Glukose bzw. Serum zeigt außerdem, dass BI-1 nicht nur ein interessantes Kandidateng für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen ist, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Limitierung von Zellschäden im Rahmen von ischämischen Schlaganfällen spielen könnte.

Der neuroprotektive Effekt von BI-1 gegenüber Thapsigargin, das als Ca^{2+} -ATPase-Inhibitor des ERs direkten Einfluss auf die Ca^{2+} -Freisetzung hat, könnte ein erster Hinweis sein, dass BI-1 auch in Neuronen über Eingriffe in die Ca^{2+} -Mobilisation wirkt. An dieser Stelle bietet sich ein guter Ansatzpunkt für zukünftige Studien zur Aufdeckung des detaillierten Signaltransduktionsweges für die BI-1-vermittelte Neuroprotektion.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1. Deutsch

BI-1 (Bax-Inhibitor-1) konnte in Hefen, Pflanzen und verschiedenen Säugetierzellen vorwiegend als anti-apoptotisches Protein charakterisiert werden.

Um die Funktion von BI-1 in Neuronen zu untersuchen, wurde sowohl HA- als auch GFP-getaggttes BI-1 transient und stabil in CSM14.1- (nigro-striatale Rattenzelllinie) und SH-SY5Y-Zellen (humane Neuroblastomzelllinie) überexprimiert.

Überraschenderweise zeigte sich nach Bax-induzierter Apoptose kein verbessertes Überleben von transient BI-1-exprimierenden Zellen. Im Gegensatz dazu konnte nach stabiler Überexpression von BI-1, wobei sich ein gleichmäßiges BI-1-Expressionsmuster zeigte, ein neuroprotektiver Effekt abhängig vom Zelltodstimulus belegt werden. BI-1 konnte in beiden neuronalen Zelllinien vor ER-Stress durch den Ca^{2+} -ATPase-Inhibitor Thapsigargin schützen, während Mitochondrien-assoziiertes Zelltod, ausgelöst durch den Kinaseinhibitor Staurosporin nicht inhibiert werden konnte. Außerdem zeigte sich im Rahmen eines Modells zur Induktion eines Ischämie-ähnlichen Zustands durch den Entzug von Sauerstoff und Glukose bzw. Serum ebenfalls ein neuroprotektiver Effekt von BI-1.

Eine Betrachtung der subzellulären Lokalisation von BI-1 hat zusätzlich ergeben, dass BI-1 vorwiegend mit dem ER und dem perinukleären Randsaum, jedoch nicht mit den Mitochondrien assoziiert ist.

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine im ER lokalisierbare BI-1-Expression auf niedrigem Niveau neuroprotektiv gegenüber ER-assoziiertem Zelltod und Ischämie wirkt. BI-1 ist somit ein interessanter Kandidateng für die Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen und Schlaganfällen. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine Beteiligung von BI-1 an Prozessen der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER. Weitere Studien mit dem Ziel, den Signaltransduktionsweg von BI-1 in Neuronen aufzudecken, der ursächlich für die beobachtete ER-assoziierte Neuroprotektivität ist, sind somit notwendig.

5.2. Englisch

BI-1 (Bax-Inhibitor-1) has been characterized as anti-apoptotic protein in yeast, plants and various mammalian cell lines.

To explore the function of BI-1 in neurons, HA- as well as GFP-tagged BI-1 was transiently and stably overexpressed in rat nigro-striatal CSM14.1 and human SH-SY5Y neuroblastoma cells.

Surprisingly, increased survival of transiently BI-1 overexpressing cells could not be observed for bax-induced apoptosis. In contrast, after stable overexpression of BI-1 on a moderate level, showing a smooth expression pattern, a neuroprotective effect depending on the cell death stimulus could be documented. In both neuronal cell lines BI-1 protected against ER-stress induced by thapsigargin, blocking the Ca^{2+} -ATPase of the ER, but failed to inhibit mitochondria-associated cell death induced by the kinase inhibitor staurosporine. Moreover, a neuroprotective effect of BI-1 could be observed in a model mimicking ischemia-like conditions, namely oxygen-glucose or serum deprivation.

In addition, examination of the subcellular BI-1-localization revealed that BI-1 is predominantly associated with the ER and the nuclear envelope but not with mitochondria.

Taken together, BI-1-expression located to the ER on a moderate level is neuroprotective towards ER-associated cell death and ischemia. Thus, BI-1 appears as an interesting therapeutic target in neurodegenerative diseases and stroke. There is increasing evidence for BI-1 being involved in processes of Ca^{2+} -release from the ER. Future experiments may aim at the discovery of the signal transduction pathway of BI-1 in neurons underlying the observed ER-associated neuroprotectivity.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996): Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87 (2), 171.
2. Alvarez ME (2000): Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol*, 44 (3), 429-442.
3. Aravind L, Dixit VM, Koonin EV (2001): Apoptotic molecular machinery: Vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science*, 291 (5507), 1279-1284.
4. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH (1999): Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*, 104 (2), 155-162.
5. Baek D, Nam J, Koo YD, Kim DH, Lee J, Jeong JC, Kwak SS, Chung WS, Lim CO, Bahk JD, Hong JC, Lee SY, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Yun DJ (2004): Bax-induced cell death of Arabidopsis is mediated through reactive oxygen-dependent and -independent processes. *Plant Mol Biol*, 56 (1), 15-27.
6. Bailly-Maitre B, Fondevila C, Kaldas F, Droin N, Luciano F, Ricci JE, Croxton R, Krajewska M, Zapata JM, Kupiec-Weglinski JW, Farmer D, Reed JC (2006): Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (8), 2809-2814.
7. Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 33 (11), 2643-2652.
8. Bolduc N, Brisson LF (2002): Antisense down regulation of NtBI-1 in tobacco BY-2 cells induces accelerated cell death upon carbon starvation. *FEBS Lett*, 532 (1-2), 111-114.
9. Bolduc N, Ouellet M, Pitre F, Brisson LF (2003): Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. *Planta*, 216 (3), 377-386.
10. Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
11. Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC (2003): Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, 22 (53), 8608-8618.
12. Burns TF, El-Deiry WS (2001): Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive colon carcinoma cell line SW480 using a genetic approach. *J Biol Chem*, 276 (41), 37879-37886.
13. Chae HJ, Ke N, Kim HR, Chen S, Godzik A, Dickman M, Reed JC (2003): Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene*, 323, 101-113.
14. Chae HJ, Kim HR, Xu C, Bailly-Maitre B, Krajewska M, Krajewski S, Banares S, Cui J, Digicaylioglu M, Ke N, Kitada S, Monosov E, Thomas M, Kress CL, Babendure JR, Tsien RY, Lipton SA, Reed JC (2004): BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell*, 15 (3), 355-366.
15. Coupe SA, Watson LM, Ryan DJ, Pinkney TT, Eason JR (2004): Molecular analysis of programmed cell death during senescence in Arabidopsis thaliana and Brassica oleracea: cloning broccoli LSD1, Bax inhibitor and serine palmitoyltransferase homologues. *J Exp Bot*, 55 (394), 59-68.

16. del Carmen Garcia Molina Wolgien M, da Silva ID, Villanova FE, Yumi Otsuka A, Borra RC, Lima Reis LF, Carvalho AF, Baracat EC, Gebrim LH (2005): Differential gene expression assessed by cDNA microarray analysis in breast cancer tissue under tamoxifen treatment. *Eur J Gynaecol Oncol*, 26 (5), 501-504.
17. Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394 (6693), 585-588.
18. Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001): Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (23), 13454-13459.
19. Demarex N, Distelhorst C (2003): Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. *Science*, 300 (5616), 65-67.
20. Eichmann R, Schultheiss H, Kogel KH, Huckelhoven R (2004): The barley apoptosis suppressor homologue BAX inhibitor-1 compromises nonhost penetration resistance of barley to the inappropriate pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Mol Plant Microbe Interact*, 17 (5), 484-490.
21. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36 (1), 59-74.
22. Green DR, Reed JC (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281 (5381), 1309-1312.
23. Grzmil M, Thelen P, Hemmerlein B, Schweyer S, Voigt S, Mury D, Burfeind P (2003): Bax inhibitor-1 is overexpressed in prostate cancer and its specific down-regulation by RNA interference leads to cell death in human prostate carcinoma cells. *Am J Pathol*, 163 (2), 543-552.
24. Grzmil M, Kaulfuss S, Thelen P, Hemmerlein B, Schweyer S, Obenauer S, Kang TW, Burfeind P (2006): Expression and functional analysis of Bax inhibitor-1 in human breast cancer cells. *J Pathol*, 208 (3), 340-349.
25. Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE (1998): Tyr-W-MIF-1 attenuates down-regulation of opiate receptors in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 284 (2), 611-617.
26. Hengartner MO (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407 (6805), 770-776.
27. Hoerberichts FA, Woltering EJ (2003): Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays*, 25 (1), 47-57.
28. Houot V, Etienne P, Petitot AS, Barbier S, Blein JP, Suty L (2001): Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. *J Exp Bot*, 52 (361), 1721-1730.
29. Hükelhoven R (2004): BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis*, 9 (3), 299-307.
30. Hükelhoven R, Dechert C, Trujillo M, Kogel KH (2001): Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. *Plant Mol Biol*, 47 (6), 739-748.
31. Jean JC, Oakes SM, Joyce-Brady M (1999): The Bax inhibitor-1 gene is differentially regulated in adult testis and developing lung by two alternative TATA-less promoters. *Genomics*, 57 (2), 201-208.
32. Katayama T, Imaizumi K, Manabe T, Hitomi J, Kudo T, Tohyama M (2004): Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat*, 28 (1-2), 67-78.

33. Kaufman RJ (1999): Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*, 13 (10), 1211-1233.
34. Kawai M, Pan L, Reed JC, Uchimiya H (1999): Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast (1). *FEBS Lett*, 464 (3), 143-147.
35. Kawai-Yamada M, Jin L, Yoshinaga K, Hirata A, Uchimiya H (2001): Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 (AtBI-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (21), 12295-12300.
36. Kawai-Yamada M, Ohori Y, Uchimiya H (2004): Dissection of Arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death. *Plant Cell*, 16 (1), 21-32.
37. Kermer P, Bähr M (2002): Prävention neuronaler Apoptose: Implikationen für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen. *Neuroforum*, 2, 193-199
38. Kim JG, Nonneman D, Vallet JL, Christenson RK (2003): Linkage mapping of the porcine testis enhanced gene transcript (TEGT) gene to chromosome 5. *Anim Genet*, 34 (2), 152-153.
39. Kroemer G, Reed JC (2000): Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*, 6 (5), 513-519
40. Lam E, Kato N, Lawton M (2001): Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411 (6839), 848-853.
41. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91 (4), 479-489
42. Lipton P (1999): Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79 (4), 1431-1568.
43. Mancini M, Machamer CE, Roy S, Nicholson DW, Thornberry NA, Casciola-Rosen LA, Rosen A (2000): Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol*, 149 (3), 603-612.
44. Martin-Villalba A, Hahne M, Kleber S, Vogel J, Falk W, Schenkel J, Krammer PH (2001): Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ*, 8 (7), 679-686.
45. Maxwell DP, Nickels R, McIntosh L (2002): Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J*, 29 (3), 269-279.
46. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000): Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403 (6765), 98-103.
47. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003): Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4 (7), 552-565.
48. Patil C, Walter P (2001): Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol*, 13 (3), 349-355.
49. Perfettini JL, Reed JC, Israel N, Martinou JC, Dautry-Varsat A, Ojcius DM (2002): Role of Bcl-2 family members in caspase-independent apoptosis during Chlamydia infection. *Infect Immun*, 70 (1), 55-61.
50. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111 (2), 229-233.

51. Qin H, Srinivasula SM, Wu G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Shi Y (1999): Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature*, 399 (6736), 549-57.
52. Rao MV, Davis KR (1999): Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in Arabidopsis: the role of salicylic acid. *Plant J*, 17 (6), 603-614.
53. Reed JC (1997): Cytochrome c: can't live with it- can't live without it. *Cell*, 91 (5), 559-562.
54. Reed JC (1998): Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 17 (25), 3225-3236.
55. Reed JC (2000): Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*, 157 (5), 1415-1430.
56. Reed JC (2002): Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov*, 1 (2), 111-121.
57. Richberg MH, Aviv DH, Dangl JL (1998): Dead cells do tell tales. *Curr Opin Plant Biol*, 1 (6), 480-485.
58. Ryerson DE, Heath MC (1996): Cleavage of Nuclear DNA into Oligonucleosomal Fragments during Cell Death Induced by Fungal Infection or by Abiotic Treatments. *Plant Cell*, 8 (3), 393-402.
59. Sanchez P, de Torres Zabala M, Grant M (2000): AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant J*, 21 (4), 393-399.
60. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12), 5463-5467.
61. Sasson R, Rimon E, Dantes A, Cohen T, Shinder V, Land-Bracha A, Amsterdam A (2004): Gonadotrophin-induced gene regulation in human granulosa cells obtained from IVF patients. Modulation of steroidogenic genes, cytoskeletal genes and genes coding for apoptotic signalling and protein kinases. *Mol Hum Reprod*, 10 (5), 299-311.
62. Schlaifer D, Krajewski S, Galoin S, Rigal-Huguet F, Laurent G, Massip P, Pris J, Delsol G, Reed JC, Brousset P (1996): Immunodetection of apoptosis-regulating proteins in lymphomas from patients with and without human immunodeficiency virus infection. *Am J Pathol*, 149 (1), 177-185.
63. Schmits R, Cochlovius B, Treitz G, Regitz E, Ketter R, Preuss KD, Romeike BF, Pfreundschuh M (2002): Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas. *Int J Cancer*, 98 (1), 73-77.
64. Scott IG, Akerman KE, Heikkila JE, Kaila K, Andersson LC (1986): Development of a neural phenotype in differentiating ganglion cell-derived human neuroblastoma cells. *J Cell Physiol*, 128 (2), 285-292.
65. Shikano S, Li M (2003): Membrane receptor trafficking: evidence of proximal and distal zones conferred by two independent endoplasmic reticulum localization signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (10), 5783-5788.
66. Tanaka R, Ishiyama T, Uchihara T, Inadome Y, Iijima T, Morishita Y, Kano J, Goya T, Noguchi M (2006): Expression of the Bax inhibitor-1 gene in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer*, 106 (3), 648-653.
67. Tiwari BS, Belenghi B, Levine A (2002): Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol*, 128 (4), 1271-1281.
68. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH (2002): Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415 (6871), 530-536.

69. Velier JJ, Ellison JA, Kikly KK, Spera PA, Barone FC, Feuerstein GZ (1999): Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci*, 19 (14), 5932-5941.
70. Villalva C, Trempat P, Greenland C, Thomas C, Girard JP, Moebius F, Delsol G, Brousset P (2002): Isolation of differentially expressed genes in NPM-ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Br J Haematol*, 118 (3), 791-798.
71. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH (1999): Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*, 5 (2), 157-163.
72. Walter L, Dirks B, Rothermel E, Heyens M, Szpirer C, Levan G, Gunther E (1994): A novel, conserved gene of the rat that is developmentally regulated in the testis. *Mamm Genome*, 5 (4), 216-221.
73. Walter L, Marynen P, Szpirer J, Levan G, Gunther E (1995): Identification of a novel conserved human gene, TEGT. *Genomics*, 28 (2), 301-304.
74. Westphalen BC, Wessig J, Leyboldt F, Arnold S, Methner A (2005): BI-1 protects cells from oxygen glucose deprivation by reducing the calcium content of the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ*, 12 (3), 304-306.
75. Xu P, Blancaflor EB, Roossinck MJ (2003): In spite of induced multiple defense responses, tomato plants infected with Cucumber mosaic virus and D satellite RNA succumb to systemic necrosis. *Mol Plant Microbe Interact*, 16 (6), 467-476.
76. Xu Q, Reed JC (1998): Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell*, 1 (3), 337-346.
77. Yu LH, Kawai-Yamada M, Naito M, Watanabe K, Reed JC, Uchimiya H (2002): Induction of mammalian cell death by a plant Bax inhibitor. *FEBS Lett*, 512 (1-3), 308-312.
78. Yu X, Mao X, Blake AD, Li WX, Chang SL (2003): Morphine and endomorphins differentially regulate micro-opioid receptor mRNA in SHSY-5Y human neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 306 (2), 447-454.
79. Yuan J, Yankner BA (2000): Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407 (6805), 802-809.
80. Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SP, Edwards RH, Bredesen DE (1993): bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (10), 4533-4537.
81. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D (1998): CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 12 (7), 982-995.
82. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999): An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, 274 (17), 11549-11556

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Dohm CP*, Siedenberg S*, Liman J, Esposito A, Wouters FS, Reed JC, Bähr M, Kermer P (2006): Bax-Inhibitor-1 protects neurons from oxygen-glucose deprivation. *J Mol Neurosci.*, 29 (1), 1-8

* gleichwertige Autorenschaft

Poster:

Siedenberg S, Dohm CP, Liman J, Reed JC, Bähr M, Kermer P: BI-1 mediated neuroprotection. 30th Göttingen Neurobiology Conference, 6th Meeting of the Neuroscience Society, Göttingen, 17. bis 20. Februar 2005.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Mathias Bähr für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, mich an der Erforschung neurodegenerativer Vorgänge zu beteiligen, bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. Pawel Kermer. Ich danke ihm nicht nur für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine exzellente fachliche Betreuung, sondern auch für sein stets offenes Ohr für alle Fragen und Probleme, für jedes aufmunternde Wort, für seine ausgezeichnete Beratung bei der Ausarbeitung von Vorträgen, Abbildungen und der Verfassung dieser Arbeit, aber auch ganz besonders für die Freundschaft, die er mir in all der Zeit entgegengebracht hat.

Einen nicht weniger großen Dank möchte ich Dr. Christoph Dohm aussprechen, der fast von der ersten Stunde an die Rolle meines Zweitbetreuers übernommen hat. Ich danke ihm für die wunderbare Zusammenarbeit, die hervorragende Betreuung meiner praktischen Laborarbeit, seine Hilfe bei statistischen Auswertungen und ganz besonders für die stets geduldige Beantwortung aller Fragen und seine großartige Unterstützung bei allen Schwierigkeiten. Auch ihm danke ich nicht minder für seine Freundschaft, die er mir während meiner gesamten Arbeit im Labor entgegengebracht hat.

Ganz herzlich möchte ich mich außerdem bei Dr. Jan Liman bedanken, der mich vor allem zu Beginn meiner Dissertation exzellent in die Techniken der praktischen Laborarbeit eingeführt hat. Auch ihm danke ich für seine stets hervorragende Beratung, Hilfsbereitschaft und Freundschaft während meiner gesamten Dissertation.

Großen Dank schulde ich außerdem allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bähr, die mir sowohl fachlich, als auch moralisch immer freundlich und hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders hervorheben möchte ich dabei Katrin Meuer, Dr. Gunnar Dietz, Birgit Dietz und Barbara Müller aus dem Labor im Klinikum. Nicht zuletzt danke ich auch Alessandro Esposito vom European Neuroscience Institute in Göttingen für seine Hilfe bei der konfokalen Mikroskopie, Prof. John C. Reed vom Burnham Institute in La Jolla, CA, USA und Dr. S. Höning vom Institut für Biochemie II der Universität Göttingen.

Abschließend möchte ich mich noch bei meiner Familie und all meinen lieben Freunden bedanken. Den größten Dank möchte ich jedoch meinen Eltern Friedrich und Margarita Siedenber, meinen Großeltern und meiner Schwester Scarlett Siedenber aussprechen, die mir nicht nur während dieser Dissertation, sondern auch während der gesamten Dauer meines Studiums sowohl finanziell als auch moralisch immer eine große Stütze waren.

Die Unterstützung all dieser Menschen hat wesentlich dazu beigetragen, dass ich großen Spaß an dieser Dissertation und am wissenschaftlichen Arbeiten entwickelt habe.

Ich danke euch allen sehr!

LEBENS LAUF

Ich, Sandra Siedenbergr, wurde am 13.09.1979 als erstes Kind des Landwirtes Friedrich Siedenbergr (geb. am 15.03.1951) und der gelernten Zahnarzhelferin Margarita Siedenbergr geb. Drüsedau (geb. am 25.04.1956) in Minden geboren. Meine jüngere Schwester Scarlett Siedenbergr wurde am 29.04.1986 geboren.

Von 1986 bis 1990 besuchte ich die Grundschule Stolzenau in Nendorf und wechselte anschließend zum Städtischen Gymnasium Petershagen, wo ich 1999 die Allgemeine Hochschulreife erwarb.

Von November 1999 bis März 2000 absolvierte ich zur Vorbereitung auf das Universitätsstudium einen Vorsemesterkurs Medizin am Institut für Biologie und Medizin des Rheinischen Bildungszentrums e.V. in Köln.

Im April 2000 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen, wo ich im April 2002 die Vorklinik mit dem Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung erfolgreich abschloss. Den Ersten Teil der Ärztlichen Prüfung bestand ich im April 2003 und den Zweiten Teil im April 2006. Das Praktische Jahr absolvierte ich von April 2006 bis März 2007 am GZO Spital Wetzikon (Zh) in der Schweiz im Fach Chirurgie und am Universitätsklinikum Göttingen in den Fächern Innere Medizin (Abteilung Hämato-/Onkologie) und HNO. Im Frühjahr 2007 werde ich voraussichtlich den Dritten Teil der Ärztlichen Prüfung ablegen.