

**Altruistischer Zelltod  
und neue Wege der Caspase vermittelten  
Apoptose  
in *Saccharomyces cerevisiae***

**DISSERTATION**

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von  
**Eva Herker**

Tag der mündlichen Prüfung:

01.07.2005

Dekan:

Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. F. Madeo

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. D. Mecke

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. W. Neupert

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Frank Madeo am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Mein Dank gilt zu allererst Frank Madeo für die Bereitstellung des Themas, die sehr gute und persönliche Betreuung, für experimentelle Freiheiten und die Möglichkeit an vielen Kooperationen teilzunehmen. Und natürlich für die zahlreichen Kuchen, die in stressigen Zeiten das Arbeiten versüßt haben.

Prof. Dr. Dieter Mecke danke ich für die Betreuung meiner Arbeit.

Bei Silvia Engelhardt, Corinna Maldener, Astrid Proksch, Silke Wissing, Ralf Braun, Sabrina Büttner, Thorsten Decker, Marcel Deponte, Tobias Eisenberg, Helmut Jungwirth, Nina Lehmann, Alexander Link, Stefan Picker, Nadja Valtcheva und allen Hiwis möchte ich mich für das freundschaftliche Klima im Labor und die vielen Espressopausen, die das Arbeiten doch viel angenehmer machen, bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Silke Wissing: für ihre Freundschaft, ihre Diskussionsbereitschaft und für die gute Zusammenarbeit, insbesondere während der Revisionsphasen.

Helmut Jungwirth danke ich für die Zusammenarbeit beim „aging“ Projekt und die Hilfe bei den Northern blots.

Dank auch an Cristina Mazzoni für die unkomplizierte und fruchtbare Zusammenarbeit.

Danke an alle, die mich die letzten drei Jahre begleitet haben.





## Publikationen

- Madeo, F., E. Herker, C. Maldener, S. Wissing, S. Lächelt, M. Herlan, M. Fehr, K. Lauber, S.J. Sigrist, S. Wesselborg und K.U. Fröhlich. 2002. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell* 9:911-917.
- Madeo, F., S. Engelhardt, E. Herker, N. Lehmann, C. Maldener, A. Proksch, S. Wissing und K.U. Fröhlich. 2002. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr. Genet.* 41:208-216.
- Mazzoni, C., P. Mancini, L. Verdone, F. Madeo, A. Serafini, E. Herker und C. Falcone. 2003. A Truncated Form of KILsm4p and the Absence of Factors Involved in mRNA Decapping Trigger Apoptosis in Yeast. *Mol. Biol. Cell* 14:721-729.
- Herker, E., H. Jungwirth, K.A. Lehmann, C. Maldener, K.U. Fröhlich, S. Wissing, S. Büttner, M. Fehr, S. Sigrist und F. Madeo. 2004. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 164:501-507.
- Wissing, S., P. Ludovico, E. Herker, S. Büttner, S.M. Engelhardt, T. Decker, A. Link, A. Proksch, F. Rodrigues, M. Corte-Real, K.U. Fröhlich, J. Manns, C. Cande, S.J. Sigrist, G. Kroemer und F. Madeo. 2004. An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 166:969-974.
- Madeo, F., E. Herker, S. Wissing, H. Jungwirth, T. Eisenberg und K.U. Fröhlich. 2004. Apoptosis in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:655-660.
- Reiter, J., E. Herker, F. Madeo und M.J. Schmitt. 2005. Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 168:353-358.
- Mazzoni, C., E. Herker, V. Palermo, H. Jungwirth, F. Madeo und C. Falcone. Yeast Caspase 1 links mRNA stability to apoptosis in yeast. *Eingereicht.*
- Büttner, S., T. Eisenberg, E. Herker, S. Wissing und F. Madeo. Why it's good for yeast to kill itself. *Eingeladener Artikel, FEMS Yeast Research; eingereicht.*
- Laun, P., L. Ramachandran, P. Liang, J. Wang, M. Weinberger, D.T. Burhans, E. Herker, S. Jarolim, B. Suter, F. Madeo, W.C. Burhans und M. Breitenbach. A comparison of the *S. cerevisiae* aging and apoptotic transcriptome. *Eingereicht.*



---

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>I.1</b>	<b>Apoptose</b>	<b>1</b>
I.1.1	Mechanismen der Apoptose in Säugern	2
I.1.2	Caspasen: ‚ <i>natural born killers</i> ‘	3
I.1.3	AIF: ein mitochondrialer Todesbote	6
<b>I.2</b>	<b>Apoptose im Einzeller <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>8</b>
I.2.1	Konservierte Apoptosemechanismen	8
I.2.1.1	Die Hefemetacaspase <i>YCA1</i> und die Funktion von Metacaspasen in der Apoptose	10
I.2.1.2	Aif1p: ein ‚ <i>apoptosis-inducing factor</i> ‘ in Hefe	13
I.2.2	Exogen induzierte Apoptose	13
<b>I.3</b>	<b>Alterungsprozesse</b>	<b>14</b>
<b>I.4</b>	<b>mRNA Abbau und die Funktionen von Lsm Proteinen in Hefe</b>	<b>16</b>
<b>I.5</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>19</b>
<b>II</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>II.1</b>	<b>Geräte</b>	<b>21</b>
<b>II.2</b>	<b>Chemikalien und Kits</b>	<b>22</b>
<b>II.3</b>	<b>Primer</b>	<b>22</b>
<b>II.4</b>	<b>Verwendete Organismen</b>	<b>23</b>
II.4.1	<i>E. coli</i>	23
II.4.2	<i>S. cerevisiae</i>	24
<b>II.5</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>25</b>
<b>II.6</b>	<b>Stammhaltung und Kultivierung</b>	<b>26</b>
II.6.1	Kulturmedien	26
II.6.2	Flüssigkulturen	26
II.6.2.1	Kultivierung in chronologischen Alterungsexperimenten	26
II.6.2.2	Kultivierung von Wildtyp und Deletionsmutanten bei proapoptischen Stimuli	27

---

II.6.2.3	Induktion der Überexpression von Genen	27
II.6.3	Plattenkulturen	27
II.6.4	Dauerkulturen	27
<b>II.7</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>28</b>
II.7.1	Agarosegele	28
II.7.2	PCR	28
II.7.3	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung	28
II.7.4	Ligation	29
II.7.5	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	29
II.7.6	Transformation in <i>E. coli</i>	29
II.7.7	Kolonien PCR in <i>E. coli</i>	30
II.7.8	Plasmid Präparation aus <i>E. coli</i>	30
II.7.9	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	30
II.7.10	Disruption von Genen in <i>S. cerevisiae</i>	31
II.7.11	Präparation genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	31
II.7.12	Northern Hybridisierung	32
II.7.12.1	RNA-Präparation	32
II.7.12.2	RNA-Gelelektrophorese	32
II.7.12.3	Northern Blot	32
II.7.12.4	Herstellung radioaktiv markierter Sonden mittels „random priming“	32
II.7.12.5	Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden und Entwicklung	33
II.7.12.6	Strippen	33
<b>II.8</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>34</b>
II.8.1	Überlebensplattierung	34
II.8.2	Kompetitives Überlebensassay	34
II.8.3	Fixierung von Hefezellen	34
II.8.4	TUNEL Test	35
II.8.5	DAPI Färbung	36
II.8.6	DHR Färbung	36
II.8.7	Annexin V Färbung	36
II.8.8	<i>In-vivo</i> Caspase Aktivitätsassay	37
<b>II.9</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>38</b>
II.9.1	Gewinnung von Rohextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	38
II.9.1.1	Chemische Lyse	38
II.9.1.2	Glasperlenaufschluss	38
II.9.2	SDS-PAGE	39

---

II.9.3	Coomassie Färbung von SDS Gelen	39
II.9.4	Immunoblots	40
II.9.5	His <sub>6</sub> -Tag Aufreinigung von rekombinantem Aif1p	40
II.9.6	Immunopräzipitation	41
II.9.7	DNase Assay	42
II.9.8	Gewinnung von Sekreten	42
<b>III</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>43</b>
<b>III.1</b>	<b>Chronologisches Altern als physiologischer Apoptosestimulus</b>	<b>43</b>
III.1.1	Hefezellen sterben während des chronologischen Alterns mit einem apoptotischen Phänotyp	43
III.1.2	ROS als Regulatoren des chronologischen Alterns	46
III.1.2.1	Akkumulation von ROS während des chronologischen Alterns	46
III.1.2.2	Überexpression von <i>YAP1</i> verbessert das Überleben im chronologischen Altern	47
III.1.2.3	Die Überexpression von <i>YAP1</i> vermindert die Akkumulation von ROS	48
III.1.3	Die Rolle der Hefecaspase Yca1p im chronologischen Altern	50
III.1.3.1	Chronologisches Altern führt zur Aktivierung der Hefecaspase Yca1p	50
III.1.3.2	Die Deletion der Hefecaspase <i>YCA1</i> verzögert den Zelltod beim chronologischen Altern	51
III.1.4	Diskussion	52
<b>III.2</b>	<b>Sterbende Hefezellen sezernieren überlebensfördernde Substanzen</b>	<b>54</b>
III.2.1	Sekrete von älteren Kulturen zeigen einen überlebensfördernden Effekt auf andere alte Kulturen	54
III.2.2	Die aktive Substanz der Sekrete ist hitzestabil und hat ein MW > 5 kD	56
III.2.3	Diskussion	57
<b>III.3</b>	<b>Apoptotisches Sterben während des chronologischen Alterns stellt einen Selektionsvorteil für die Kultur dar</b>	<b>58</b>
III.3.1	Gealterte <i>YCA1</i> Deletionsmutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp keine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress	58
III.3.2	Deletion von <i>YCA1</i> verschlechtert adaptives Wachstum	59
III.3.3	Wildtyp-Hefen überleben <i>YCA1</i> Deletionsmutanten	61
III.3.4	Diskussion	62
<b>III.4</b>	<b>mRNA Stabilität und Apoptose in Hefe</b>	<b>63</b>
III.4.1	mRNA Stoffwechselstörungen lösen Yca1p vermittelte Apoptose aus	63

III.4.1.1	<i>YCA1</i> Deletion verbessert das Überleben von <i>Kllsm4Δ1</i> Mutanten in der stationären Phase und verhindert DNA Fragmentierung	63
III.4.1.2	<i>Kllsm4Δ1/Δyca1</i> zeigen wie die <i>Kllsm4Δ1</i> Mutanten erhöhte mRNA Stabilität	65
III.4.1.3	<i>Kllsm4Δ1</i> Mutanten zeigen Caspase Aktivität	67
III.4.1.4	<i>Kllsm4Δ1</i> Mutation führt zu einer Erhöhung der <i>YCA1</i> mRNA	68
III.4.2	mRNA decapping Deletionsmutanten sterben apoptotisch	69
III.4.3	Diskussion	70
<b>III.5</b>	<b>Mechanismen Yca1p vermittelter Apoptose</b>	<b>72</b>
III.5.1	Nur unter apoptotischen Bedingungen ist der Zelltodmechanismus abhängig von Yca1p	72
III.5.2	Ygl129cp – ein DAP3 Homologes reguliert den Yca1p vermittelten Zelltod	73
III.5.3	Die Hydrolase Ypl095cp und ihr Zusammenspiel mit Yca1p	75
III.5.4	Diskussion	78
<b>III.6</b>	<b>Untersuchungen zur Nukleaseaktivität von Aif1p</b>	<b>81</b>
III.6.1	Immunopräzipitation von Aif1p	81
III.6.2	Reinigung von rekombinantem Aif1p	82
III.6.3	Rekombinantes Aif1p besitzt Nukleaseaktivität	83
III.6.4	Diskussion	84
<b>IV</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>86</b>
<b>V</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>88</b>
<b>VI</b>	<b>REFERENZEN</b>	<b>91</b>

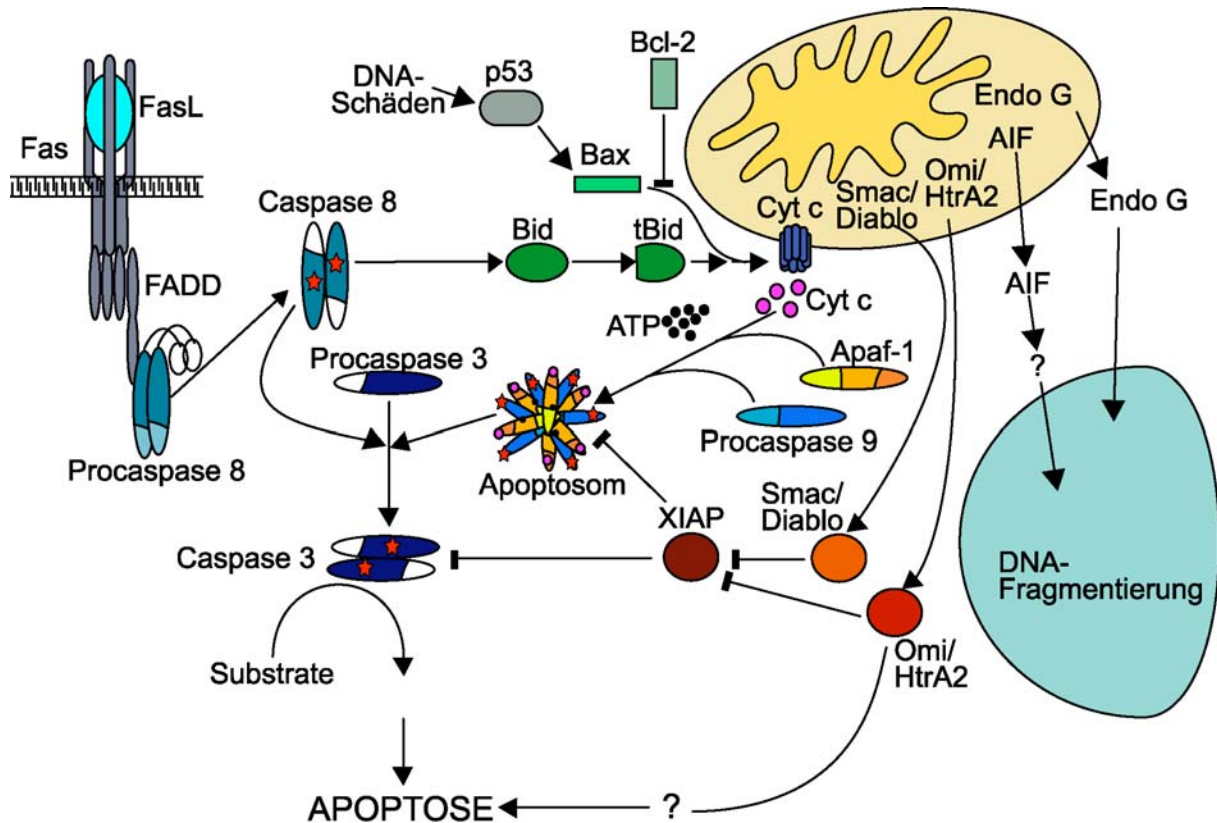
# I EINLEITUNG

## I.1 Apoptose

„Einförmig stellt Natur sich her, doch tausendförmig ist ihr Tod“ (Karl August Graf von Platen-Hallermünde). Zellen können auf unterschiedliche Weise sterben, Nekrose und Apoptose sind die wichtigsten Zelltodwege. Der nekrotische Zelltod ist charakterisiert durch das Platzen der Zellen, wodurch der Zellinhalt in das umgebende Gewebe freigesetzt wird, was wiederum Entzündungsreaktionen auslöst. Im Gegensatz dazu ist die Apoptose ein gerichteter aktiver Prozess, bei dem die Zellen sich in kleine, membranumhüllte Einheiten, die apoptotischen Körper, zerlegen, welche von Makrophagen aufgenommen werden. Die Apoptose (griech: *apo* = ab, weg, los; *ptosis* = Senkung) ist charakterisiert durch distinkte morphologische Veränderungen, die von Kerr, Wyllie und Currie (Kerr et al., 1972) erstmals beschrieben wurden. Die immense Wichtigkeit dieses Todesprogramms für den Organismus wurde aber erst sehr spät erkannt. Im Wesentlichen können zwei sehr unterschiedliche Hauptaufgaben der Apoptose unterschieden werden. Während der Embryonalentwicklung dient sie der Entfernung überschüssiger Zellen, so wird z.B. im Gehirn zunächst ein Überschuss an Nervenzellen gebildet von denen später die Neuronen, die keine Synapsen gebildet haben, apoptotisch sterben (Marin-Teva et al., 2004; Yuan und Yankner, 2000). Aber nicht nur bei der Entwicklung sondern auch für die Aufrechterhaltung eines Organismus ist die Apoptose unersetzlich. Krebszellen entstehen, wenn genotoxisch geschädigte Zellen den apoptotischen Zelltod nicht mehr einleiten können. Ebenso sterben autoreaktive Immunzellen im Normalfall apoptotisch, überleben sie dennoch, kommt es zur Ausprägung von Autoimmunerkrankungen (Hayashi und Faustman, 2001). Aber auch eine übermäßige Apoptoserate kann schädlich sein. Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer kommt es zu einem massiven Absterben von Neuronen (Su et al., 1994). Außerdem ist ein Charakteristikum von AIDS der apoptotische Zelltod von T-Helferzellen (Ameisen et al., 1995).

### I.1.1 Mechanismen der Apoptose in Säugern

Mechanistisch lassen sich in Säugerzellen zwei unterschiedliche Signalwege unterscheiden (Abb. 1; van Loo et al., 2002; Hengartner, 2000).



**Abb. 1: Mechanismen der Apoptose in Säugerzellen.**

Linke Seite Rezeptor vermittelter Apoptoseweg, Rechte Seite mitochondrialer Apoptoseweg. Verändert nach van Loo et al., 2002.

Bei der Rezeptor vermittelten oder extrinsischen Apoptose kommt es durch die Bindung eines Liganden an einen Todesrezeptor (*death receptor family*) wie dem Fas- oder TNF (*tumor necrosis factor*)-Rezeptor zur Oligomerisierung des Rezeptors und zur Komplexierung der FADD (*Fas-associated death domain protein*) Domänen. An diesen Komplex bindet Procaspase 8 (Muzio et al., 1998; Donepudi et al., 2003). Es kommt zur Prozessierung und Aktivierung von Procaspase 8, die aktive Caspase 8 leitet das Todessignal durch Prozessierung von Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) oder Caspase 3 weiter. Die



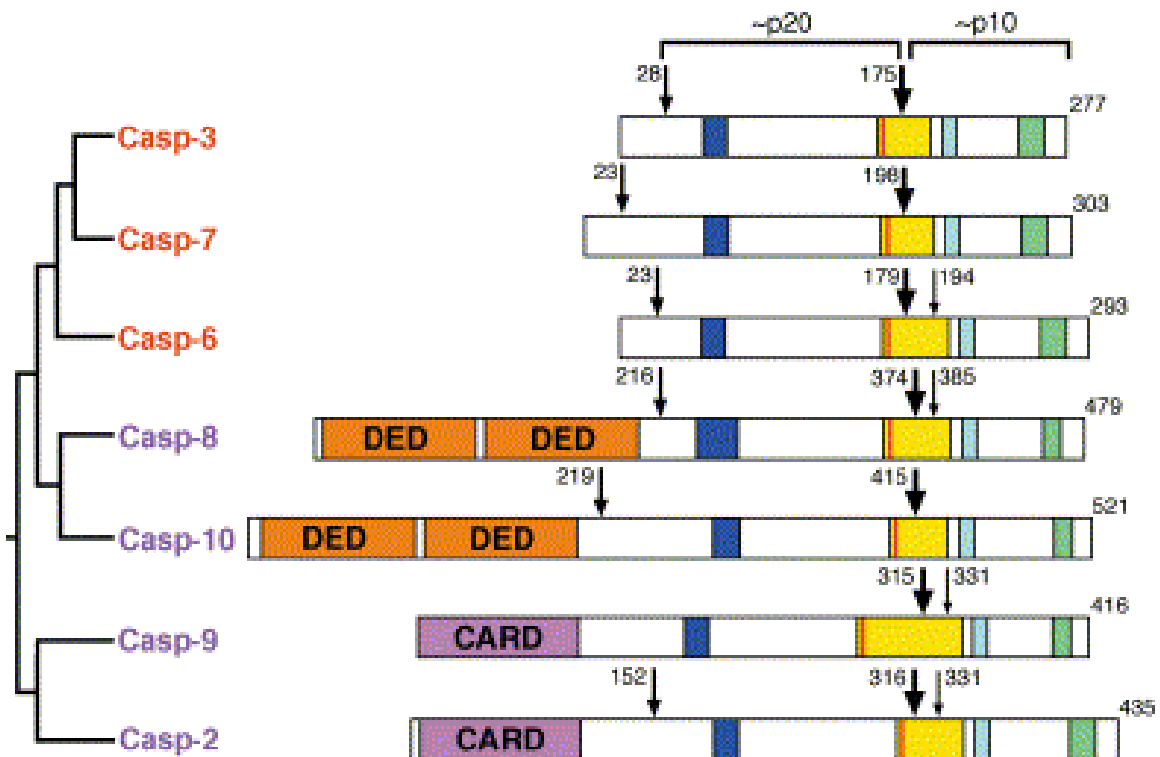
trunkierte Form von Bid (tBid) führt zur Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und zur Aktivierung des Apoptosoms durch Komplexbildung mit Apaf-1 (*Apoptotic protease-activating factor 1*) und Caspase 9 (Luo et al., 1998; Li et al., 1998).

Die Mitochondrien sind die zentralen Organellen der intrinsischen Apoptose. Bei DNA Schädigungen führt p53 zu einer Bax (*Bcl-2 associated X-factor*) vermittelten Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und somit zur Aktivierung des Apoptosoms (Sionov und Haupt, 1999). Dieser Prozess kann durch andere Mitglieder der Bcl-Proteinfamilie wie Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) verhindert werden. Cytotoxische Substanzen und andere Stressfaktoren können außerdem zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und zur Freisetzung proapoptotischer Proteine wie EndoG (*endonuclease G*) und AIF (*apoptosis-inducing factor*) führen. Diese translozieren in den Kern und degradieren DNA (Susin et al., 1999; Li et al., 2001). Zwei weitere proapoptotische mitochondriale Proteine, Smac/DIABLO (*Second mitochondrial activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI*) und Omi/HtrA2 (*high temperature requirement A 2*), führen nach ihrer Freisetzung zur Aktivierung der Caspase Kaskade indem sie IAPs (*inhibitor of apoptosis*) inhibieren (Verhagen et al., 2000; Verhagen et al., 2002; Du et al., 2000).

### **I.1.2 Caspasen: ‚natural born killers‘**

Caspasen (*cysteinyll aspartate-specific proteinases*) sind aus molekularer Sicht die Exekutoren der Apoptose (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die meisten morphologischen Veränderungen während der Apoptose werden durch ihre Aktivierung hervorgerufen. Sie werden in der Zelle als inaktives Zymogen synthetisiert und müssen während der Apoptose aktiviert werden. Alle Caspasen bestehen aus drei Domänen: einer N-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit (p20) und einer kleinen, C-terminalen Untereinheit (p10) (Abb. 2; Shi, 2002). Aktivierte Caspasen liegen als Heterotetramer aus je zwei p10 und p20 Untereinheiten vor und haben in dieser Form zwei aktive Zentren. Es gibt zwei Klassen von apoptotischen Caspasen: Initiator- und Effektorcaspasen (Shi, 2002).

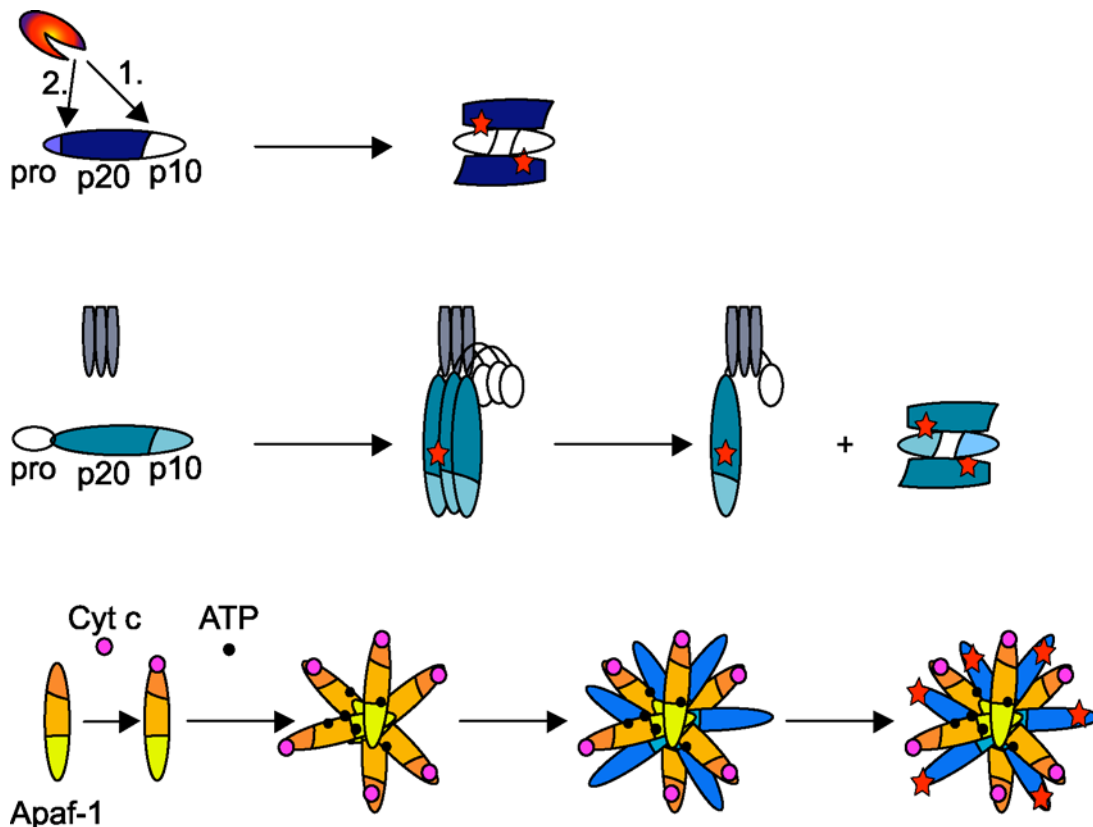
Nach proapoptotischen Stimuli kann es in der Zelle zur Aktivierung der Initiatorcaspasen kommen. Diese prozessieren und aktivieren wiederum Effektorcaspasen, wodurch es zu einer Amplifikation des Todessignals kommt. Die Effektorcaspasen schneiden dann Zielproteine, das führt zu den morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zellen, letztlich zu deren Tod. Abb. 2 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum der Caspasen aus Säugern, der deutlich macht, dass ihr Ursprung mit der jeweiligen Funktion korreliert. Oben sind die Effektor- und unten die Initiatorcaspasen der Apoptose gezeigt, wobei sich die Initiatorcaspasen durch eine große Prodomäne auszeichnen, die bei der Aktivierung mit den entsprechenden Aktivierungspartnern interagiert.



**Abb. 2: Stammbaum und Aufbau der Caspasen aus Säugern.**

Links: der phylogenetische Ursprung der Caspasen scheint mit der jeweiligen Funktion in der Apoptose zu korrelieren. Die Effektorcaspasen sind rot beschriftet, die Initiatorcaspasen violett. Der dicke schwarze Pfeil kennzeichnet die Schnittstelle der ersten proteolytischen Spaltung, die zur Aktivierung führt, weitere Schnittstellen sind mit dünnen Pfeilen gekennzeichnet. Die vier *loops* (L1 blau, L2 gelb, L3 hellblau, L4 grün), die an der Oberfläche des aktiven Zentrums liegen, sind farblich gekennzeichnet. Das katalytisch aktive Cystein liegt bei der roten Linie am Anfang des L2 *loops* (gelb). Aus Shi, 2002.

Die Aktivierung von Caspasen erfolgt meist durch ihre Prozessierung. Am besten verstanden ist der Vorgang bei den Effektorcaspasen 3 und 7. Diese werden durch die Initiatorcaspasen 8 oder 9 zuerst zwischen der p20 und p10 Untereinheit geschnitten, anschließend wird die kurze Prodomäne proteolytisch abgespalten (Abb. 3, oben). Die aktivierte Caspase liegt als Heterotetramer vor.



**Abb. 3: Aktivierungsmechanismen von Caspasen.**

Oben: Aktivierungsmechanismus der Effektorcaspasen durch proteolytische Prozessierung durch andere Caspasen. Mitte: Die Aktivierung von Procaspase 8 durch autokatalytische Prozessierung nach Assemblierung an Rezeptoren. Unten: Aktivierungsmechanismus von Caspase 9 durch die Formierung des Apoptosoms ohne Prozessierung. Verändert nach Hengartner, 2000.

Nach der Bindung eines Liganden an einen so genannten Todesrezeptor (vgl. I.1.1) wird die Procaspase 8 zu diesem rekrutiert und bindet dort über die in der Prodomäne befindliche DED (*dead effector domain*) Domäne. Durch die räumliche Nähe zwischen verschiedenen Caspase 8 Molekülen kommt es zur

autokatalytischen Prozessierung und Aktivierung (Abb. 2, Abb. 3, mitte; Muzio et al., 1998; Donepudi et al., 2003).

Die Aktivierung von Caspase 9, welche ebenfalls eine Initiatorcaspase ist, erfolgt nicht durch Prozessierung sondern durch Interaktion mit Apaf-1 und Cytochrom c im Apoptosom. Die Assemblierung des Komplexes erfolgt über CARD (*caspase recruiting domain*) Domänen innerhalb der Prodomäne der Caspase und Apaf-1 (Abb. 2, Abb. 3, unten; Li et al., 1997; Stennicke et al., 1999).

Aktivierete Effektorcaspasen degradieren allerdings nicht unspezifisch die Proteine der Zelle, sondern wirken gezielt über ihre Substratproteine. Sie haben eine sehr hohe Substratspezifität, welche von den vier N-terminalen Aminosäuren vor dem Aspartatrest der Schnittstelle bestimmt wird (Thornberry et al., 1997). Inzwischen wurden mehr als 280 Substratproteine von Caspasen identifiziert (Fischer et al., 2003). Zu den Zielproteinen gehört unter anderem ICAD, der Inhibitor der DNase CAD (*caspase activated DNase*), welche nach Translokation in den Kern DNA fragmentiert (Sakahira et al., 1998). Außerdem wird die Kernlamina aufgelöst, indem Caspasen spezifische Proteinkomplexe, die Lamine, proteolytisch spalten (Rao et al., 1996). Aber auch die Degradation antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> und somit deren Inaktivierung oder die Aktivierung anderer proapoptotischer Proteine wie Bad oder Bid sind Ziele der Caspasen (Desagher et al., 2001; Condorelli et al., 2001; Cheng et al., 1997; Clem et al., 1998).

### **I.1.3 AIF: ein mitochondrialer Todesbote**

Nicht alle Apoptoseszenarien werden durch Caspasen vermittelt. AIF (*Apoptosis-inducing Factor*) ist ein mitochondriales Flavoprotein, das bei apoptotischen Stimuli in den Kern transloziert und dort zu DNA Fragmentierung führt (Susin et al., 1999; Daugas et al., 2000). Es enthält eine funktionelle Oxidoreduktase-Domäne sowie mitochondriale und nukleäre Lokalisationssequenzen, ebenso findet sich eine DNA bindende Region (Susin et al., 1999; Ye et al., 2002; Miramar et al., 2001). Die apoptogene Funktion von AIF ist unabhängig von der Oxidoreduktase-Domäne (Susin et al., 1999). Bei Induktion der Apoptose wird AIF aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt. Nach der

Translokation in den Kern kommt es durch kooperative Effekte mit Cyclophilin A zur Chromatinlyse. Hierbei entstehen große, etwa 50 kbp lange, DNA Fragmente. Gereinigtes AIF zeigt keine DNase Aktivität *in-vitro*, es steigert aber die intrinsische DNase Aktivität von Cyclophilin A (Cande et al., 2004). Die Caspaseabhängigkeit von AIF vermittelter Apoptose ist umstritten. Aktive Caspasen können die Freisetzung von AIF bewirken, AIF Überexpression führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, was im Weiteren die Assemblierung des Apoptosoms auslöst (Arnoult et al., 2002; Arnoult et al., 2003). Im Gegensatz dazu ist die AIF vermittelte Apoptose in der Embryonalentwicklung Caspase unabhängig, und Caspase Inhibitoren können die Translokation von AIF nicht verhindern (Daugas et al., 2000; Joza et al., 2001). Es wird vermutet, dass AIF sowohl an Caspase abhängigen wie auch Caspase unabhängigen Zelltodmechanismen beteiligt ist, und je nach Zelltyp und Stimulus verschiedene Signalkaskaden induziert werden können (Cande et al., 2002).

## **I.2 Apoptose im Einzeller *Saccharomyces cerevisiae***

Lange glaubte man, dass sich die Apoptose auf mehrzellige Organismen beschränkt. Ein Selbstmordprogramm eines Einzellers erschien keinen offensichtlichen Zweck zu haben. Als im Rahmen der vollständigen Sequenzierung des Hefegenoms (1997) keine Homologen der klassischen Säugerapoptosegene gefunden werden konnten, war das Dogma der Nichtexistenz der Hefeapoptose gefestigt. Die Entdeckung eines apoptotischen Hefestammes, einer *CDC48* Mutante, der alle typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose wie z.B. DNA Fragmentierung, Chromatinkondensation und Phosphatidylserin Externalisierung zeigte, machte deutlich, dass auch einzellige Organismen einen apoptotischen Phänotyp zeigen können (Madeo et al., 1997). Inzwischen wurden apoptotische Szenarien auch in anderen Einzellern wie *Candida albicans* (Phillips et al., 2003), *Trypanosoma* (Debrabant et al., 2003), *Aspergillus nidulans* und *fumigatus* (Cheng et al., 2003; Mousavi und Robson, 2003; Mousavi und Robson, 2004) und *Leishmania* (Lee et al., 2002) gefunden. Die Entdeckung von homologen Exekutoren in Einzellern war der letzte Beweis, dass die Apoptose evolutionär konserviert und nicht auf mehrzellige Organismen beschränkt ist (Madeo et al., 2002; Fahrenkrog et al., 2004; Blanchard et al., 2002).

### **I.2.1 Konservierte Apoptosemechanismen**

Der erste Hinweis auf funktionelle Homologie zwischen Säuger- und Hefeapoptose war die Entdeckung, dass reaktive Sauerstoffspezies an der Regulation der Hefeapoptose beteiligt sind. So lässt sich nicht nur Apoptose durch Zugabe von Wasserstoffperoxid induzieren, sondern apoptotische Hefen akkumulieren auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und können durch die Zugabe von Radikalfängern vor dem Zelltod gerettet werden (Madeo et al., 1999; Ludovico et al., 2002; Laun et al., 2001; Mazzoni et al., 2003).



Ein weiterer Beweis für funktionelle Homologien war die Entdeckung, dass die heterologe Expression sowohl pro- als auch antiapoptotischer Säugerproteine in Hefe den Zelltod auslöst bzw. verhindert. So führt die heterologe Expression von Bax zum apoptotischen Tod der Zelle, hierbei wird Cytochrom c freigesetzt (Manon et al., 1997) und ROS gebildet (Ligr et al., 1998; Madeo et al., 1999). Durch gleichzeitige Expression von BI-1 (*Bax inhibitor 1*) oder Bcl-x<sub>L</sub> kann dieser Tod verhindert werden (Manon et al., 1997; Chae et al., 2003). Außerdem bewirkt die heterologe Expression klassischer antiapoptotischer Gene erhöhte Stressresistenz gegenüber oxidativem und osmotischen Stress und verlängerte Lebensdauer im chronologischen Altern (Chae et al., 2003; Wadskog et al., 2004; Longo et al., 1997).

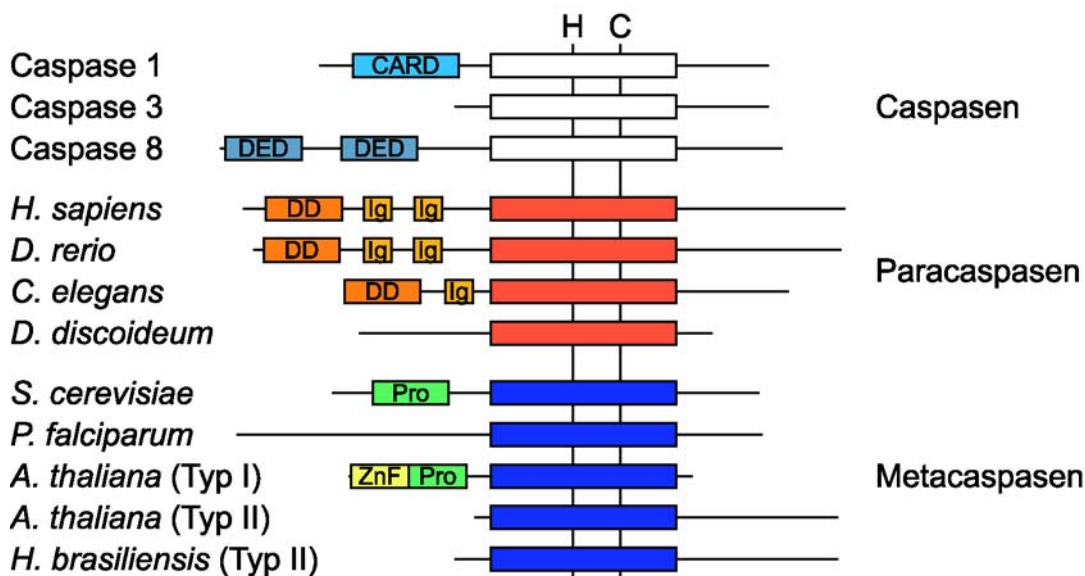
Im Jahr 2000 entdeckte Uren durch *in-silico* Studien eine Gruppe von Proteinen, die er aufgrund ihrer Homologie zu den Caspasen Meta- und Paracaspasen nannte. Sie kommen sowohl in Ein- wie auch in Mehrzellern vor (Uren et al., 2000). Die Metacaspase aus *S. cerevisiae* (*YOR197w*, *MCA1 metacaspase 1*, *YCA1 yeast caspase 1*) wurde später als zentraler Regulator der Apoptose in Hefe erkannt (Madeo et al., 2002). Inzwischen wurden weitere homologe Apoptosemechanismen beschrieben: Nma111 (*nuclear mediator of apoptosis*), ein Omi/Htr2A Homolog, hat auch in Hefe proapoptotische Funktionen (Fahrenkrog et al., 2004), und BI-1 ist ein hochkonserviertes antiapoptotisches Protein (Chae et al., 2003). Auch proteasomale Apoptosewege wie die Zerstörung von Cdc6p wurden in Hefe gefunden (Blanchard et al., 2002). Inzwischen konnte auch die apoptoserelevante Funktion von *CDC48* in Säugern gezeigt werden. Das Orthologe VCP hat antiapoptotische Funktion und ist an neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt (Shirogane et al., 1999; Kimura und Kakizuka, 2003).

### **I.2.1.1 Die Hefemetacaspase YCA1 und die Funktion von Metacaspasen in der Apoptose**

Caspasen bestehen im katalytischen Zentrum aus einer Cystein Histidin Diade, die von konservierten basischen Aminosäuren umgeben ist. Uren fand im Jahr 2000 zwei Gruppen von Proteinen: Meta- und Paracaspasen. Metacaspasen kommen im Genom von Pflanzen, Pilzen und Protozoen vor, Paracaspasen in



Tieren (Uren et al., 2000). Die Homologien dieser beiden Proteinfamilien zu Caspasen beschränken sich nicht nur auf das katalytische Zentrum, auch die vorhergesagte Sekundärstruktur weist Ähnlichkeiten zu den Caspasen auf (Abb. 5; Uren et al., 2000). Die Metacaspasen lassen sich noch in zwei weitere Typen aufteilen, wobei Typ I-Metacaspasen eine große putative Prodomäne mit einer Prolin-reichen Region enthalten, die aufgrund ihrer Größe den Prodomänen der Initiatorcaspasen aus Säugern ähnelt (Abb. 5). Inzwischen hat sich gezeigt, dass Metacaspasen eine essentielle Rolle in der Apoptose spielen und dort ähnliche Funktionen wie die Caspasen in Säugern übernehmen (Madeo et al., 2002; Suarez et al., 2004).

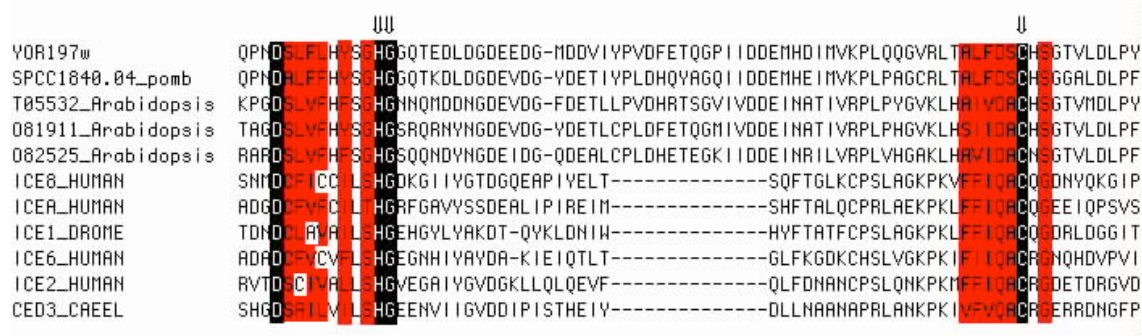


**Abb. 5: Schematischer Aufbau der Domänen von nicht prozessierten Caspasen, Paracaspasen und Metacaspasen aus verschiedenen Organismen.**

Die relative Lage der aktiven Zentren aus Histidin (H) und Cystein (C) ist gekennzeichnet. Caspasen haben eine C-terminale Caspase Domäne (weiss) und je nach Typ eine große Prodomäne mit CARD (*caspase recruiting domain*) oder DED (*death effector domain*) Domänen, die der Oligomerisierung dienen. Paracaspasen aus mehrzelligen Organismen enthalten eine DD (*death domain*) und ein bis zwei Iq Domänen. Metacaspasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Metacaspasen vom Typ I haben große Prodomänen mit Prolin reichen Regionen (Pro), die aus Pflanzen enthalten außerdem noch Zink Finger Motive (ZnF). Metacaspasen vom Typ II haben keine Prodomänen. Verändert nach Uren et al., 2000.

In Pflanzen konnte während des apoptotischen Zelltods Caspase Aktivität mit besonderer Spezifität für VEID gemessen werden und der Metacaspase abhängige Zelltod ist essentiell für die embryonale Entwicklung (Bozhkov et al., 2004; Suarez et al., 2004; Lam und del Pozo, 2000): Außerdem verhindern synthetische Caspase Inhibitoren pflanzliche Apoptose (Bozhkov et al., 2004).

Die Metacaspase aus *S.cerevisiae* (Yca1p) zeigt sowohl auf molekularer als auch auf funktioneller Ebene Ähnlichkeiten zu Säugercaspasen in verschiedenen apoptotischen Szenarien. Das katalytische Zentrum von Yca1p ist dem von Caspasen hoch homolog (Abb. 6; Uren et al., 2000).



**Abb. 6: Das aktive Zentrum der Metacaspase Yca1p ist hoch konserviert.**

Alignment der aktiven Zentren der Metacaspase aus *S. cerevisiae* (YOR197w) mit der Metacaspase aus *S. pombe* (SPCC1840.04\_pomp), drei Metacaspasen aus *A. thaliana* (T05532\_Arabidopsis, 081911\_Arabidopsis, 082525\_Arabidopsis), den Säugercaspasen 8, 4, 1, 6, 2 (ICE: interleukin converting enzyme) und CED3 aus *C. elegans*.

Ein Überexpressionsstamm von Yca1p zeigt in der *in-vivo* Caspase Aktivitätsmessung eine sehr hohe Aktivität, im fluorometrischen Caspaseassay an Rohextrakten zeigt sich eine Schnittspezifität für VEID, dem gleichen Substrat, das auch bei Pflanzen am besten gespalten wird (Bozhkov et al., 2004; Madeo et al., 2002). Außerdem kommt es während der Aktivierung von Yca1p zu einer Caspase typischen Prozessierung, bei der C-terminal ein kleines Fragment abgespalten wird, das eventuell die p10 Untereinheit der aktiven Metacaspase darstellt (Wissing, 2005, Madeo et al., 2002). Die Überexpression von Yca1p führt zu einem apoptotischen Zelltod der Hefe, der durch Zugabe von Caspase Inhibitoren vermindert werden kann (Madeo et al., 2002). Mutation des aktiven Zentrums verhindert den durch Überexpression ausgelösten Zelltod und die Generierung

des C-terminalen Fragmentes, also die Prozessierung der Caspase (Wissing, 2005, Madeo et al., 2002).

Die Deletion von *YCA1* verhindert den Zelltod bei verschiedenen proapoptotischen Stimuli wie oxidativem und Salzstress (Wadskog et al., 2004; Madeo et al., 2002). Außerdem rettet die Deletion von *YCA1* vor dem Zelltod, der durch die Deletion von *UBP10* (*ubiquitin-specific protease*) ausgelöst wird (Bettiga et al., 2004).

### **I.2.1.2 Aif1p: ein ‚apoptosis-inducing factor‘ in Hefe**

Ynr074cp ist als AIF Ortholog an dem apoptotischen Zelltod in *S. cerevisiae* beteiligt (Wissing, 2005; Wissing et al., 2004). Wie das entsprechende Säugerprotein ist Aif1p eine putative Oxidoreduktase, die in gesunden Zellen in den Mitochondrien lokalisiert ist und nach apoptotischem Stimulus in den Zellkern wandert, wo es zu DNA Fragmentierung und Chromatinkondensation kommt. In Hefe ist der Zelltodmechanismus von Aif1p Caspase und Cyclophilin A abhängig. Die Überexpressionsmutante von Aif1p stirbt mit den phänotypischen Markern der Apoptose. Die Deletion von *AIF1* vergrößert die Toleranz von Hefen gegenüber oxidativem Stress, scheint aber gleichzeitig eine Störung der Atmungskette zu bewirken. Somit hat Aif1p auch eine physiologische Rolle außerhalb des Zelltodes.

## **I.2.2 Exogen induzierte Apoptose**

Die Kultivierung von Wildtyp-Hefen in Gegenwart toxischer Substanzen, z.B. geringe Dosen Wasserstoffperoxid oder Essigsäure, oder unter osmotischem Stress führt zum apoptotischen Tod der Zellen (Madeo et al., 1999; Ludovico et al., 2001; Wadskog et al., 2004; Huh et al., 2002). Aber auch physiologische Substanzen, wie das von Pflanzen zum Schutz vor pathogenen Pilzen ausgeschüttete Osmotin oder das Hefepheromon  $\alpha$ -Faktor können einen apoptotischen Zelltod auslösen (Narasimhan et al., 2001; Severin und Hyman, 2002).

### **I.3 Alterungsprozesse**

Die Hefe *S. cerevisiae* dient als Modell zur Untersuchung von Alterungsprozessen. Es können zwei Formen des Alterns unterschieden werden: chronologisches und replikatives Altern.

Der klassische Ansatz um Alterungsprozesse zu untersuchen, ist die Messung des replikativen Alterns. Hierbei wird die Zahl der Teilungen einer Hefezelle gemessen, bevor diese seneszent wird und stirbt (Mortimer und Johnston, 1959). Replikativ alte Zellen akkumulieren extrachromosomale ribosomale DNA Ringe, die so genannten ERCs (*extrachromosomal ribosomal DNA circles*), die durch homologe Rekombination aus dem Hefegenom entstehen und asymmetrisch auf Mutter- und Tochterzelle verteilt werden (Sinclair und Guarente, 1997). Gene, die das replikative Altern regulieren sind unter anderem *SIR2* (*NAD-dependent histone deacetylase; silent information regulator 2*), *RAS1* und *RAS2* (Kaeberlein et al., 1999; Sun et al., 1994). Die Rolle von *SIR2* im Altern wurde auch in *C. elegans* bestätigt (Tissenbaum und Guarente, 2001). Hungern in Form von ‚*Calorie restriction*‘ verlängert die replikative Lebenslänge von Hefe und hat auch bei Säugern einen lebensverlängernden Effekt (Lin et al., 2000; Ramsey et al., 2000).

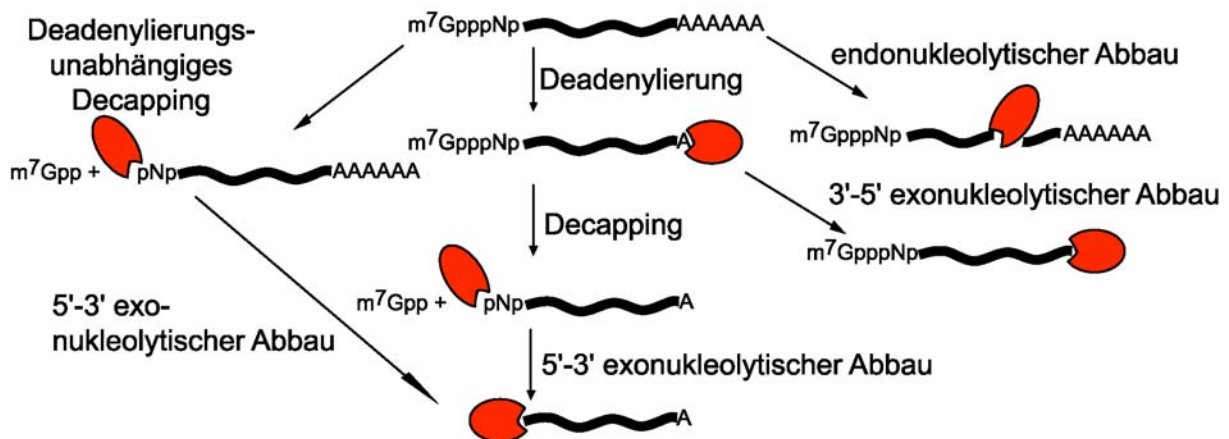
Das chronologische Altern kann als Modell für Alterungsprozesse in Geweben benutzt werden (MacLean et al., 2001). Um das chronologische Altern zu untersuchen werden Hefen auf Minimalmedium (SCD) kultiviert und die Lebensfähigkeit dieser nicht mehr teilungsfähigen Kultur bestimmt (Fabrizio und Longo, 2003). Es konnte ein Zusammenhang zwischen Stressanfälligkeit und vorzeitigem Sterben nachgewiesen werden: die Deletion von *SOD1* oder *SOD2* führt zu einer kürzeren chronologischen Lebenszeit und hat zudem einen negativen Einfluss auf das replikative Altern (Longo et al., 1996; Barker et al., 1999). Da Hefen in ihrer natürlichen Umgebung an lange Hungerperioden adaptiert sind und eher selten ausreichend Nahrung haben, entspricht diese Art der Kultivierung physiologischen Bedingungen. Hierdurch ist es möglich, Regulatoren des Alterungsprozesses zu identifizieren, die sich eventuell auch in höheren Eukaryoten erhalten haben (Longo, 1999). Werden Hefen in

---

Minimalmedium kultiviert, zeigen sie zuerst einen hohen metabolischen Umsatz und verbrauchen die Glucose unter fermentativen Bedingungen. Nach etwa zehn Stunden exponentiellen Wachstums ist die Glucose verbraucht, und es folgt die Umstellung des Stoffwechsels auf oxidative Phosphorylierung (*diauxic shift*). Eine Phase des langsamen Wachstums folgt, in der das vorher produzierte Ethanol verbraucht wird. Diese dauert etwa 48 Stunden. Danach stoppt die Zellteilung und zwischen dem fünften und 20sten Tag sterben die Zellen. Der genaue Zeitpunkt hängt von dem genetischen Hintergrund des untersuchten Stammes ab. Kultiviert man Hefen in Wasser, so leben diese deutlich länger als in Minimalmedium. Der absolute Nahrungsmangel ist also nicht für den Zelltod in Minimalmedium verantwortlich (Fabrizio und Longo, 2003).

## I.4 mRNA Abbau und die Funktionen von Lsm Proteinen in Hefe

Die Menge an mRNA wird von der Zelle streng reguliert, sie ist sowohl von der Transkriptions- als auch der Abbaurate abhängig. Man kennt mittlerweile vier Wege des cytoplasmatischen mRNA Abbaus (Abb. 7; Tucker und Parker, 2000).



**Abb. 7: Die cytoplasmatischen Abbauwege der mRNA in Hefe.** Modifiziert nach Tucker und Parker, 2000.

Der Hauptabbauweg erfordert die Deadenylierung der mRNA durch die Pab1p-abhängige poly(A) Nuklease Pan1p (Sachs und Deardorff, 1992; Muhlrud und Parker, 1992). Anschließend wird die am 5'-Ende befindliche 7-Methylguanocap der mRNA durch Dcp1p entfernt (*decapping*) und die mRNA durch die 5'-3' Exonuklease Xrn1p abgebaut (Muhlrud et al., 1994; Beelman et al., 1996). Am *decapping* Komplex sind des weiteren Pat1p und Dcp2p beteiligt (Dunckley und Parker, 1999; Bonnerot et al., 2000).

Nach der Deadenylierung kann die mRNA bei Behinderung des 5'-3' Exonukleaseabbaus auch 3'-5' abgebaut werden (Muhlrud et al., 1995). Mit Ski2p (*super killer protein*), einer RNA-Helikase, Ski3p und Ski8p, die Bestandteile des Exosom-Komplexes sind, konnten drei Proteine identifiziert werden, die für diesen 3'-5' Abbau der mRNA verantwortlich sind (Anderson und Parker, 1998).

Es konnten auch zwei deadenylierungs-unabhängige Abbauwege identifiziert werden: Zum einen konnte ein endonukleolytischer mRNA Abbau nachgewiesen

werden, dieser ist aber sehr langsam und läuft wahrscheinlich nur bei einem Überangebot an Substrat-mRNA (Binder et al., 1994).

Der wichtigere Weg ist der ‚*nonsense-mediated-decay pathway*‘ (NMD). Er dient dazu, jene mRNA-Transkripte abzubauen, die innerhalb der proteinkodierenden Region Translations-Terminations-Codons aufweisen und somit zu verkürzten Proteinen führen würden (Muhlrad und Parker, 1994). Diese durch ‚*nonsense*‘ Mutationen veränderten Codons können während der DNA-Replikation, der mRNA-Transkription, beim *Splicing*-Prozess oder durch DNA-Mutagenese entstehen. Liegen vorzeitige Terminationssignale vor, kommt es zur Assemblierung des ‚*surveillance complex*‘ (Überwachungskomplex), der aus Upf1p, Nmd2p/Upf2p und Upf3p zusammengesetzt ist (Messenguy et al., 2002). Anschließend kommt es zum deadenylierungs-unabhängigen *decapping* und schließlich zum Abbau der mRNA durch Xrn1p in 5'-3' Richtung (He und Jacobson, 2001).

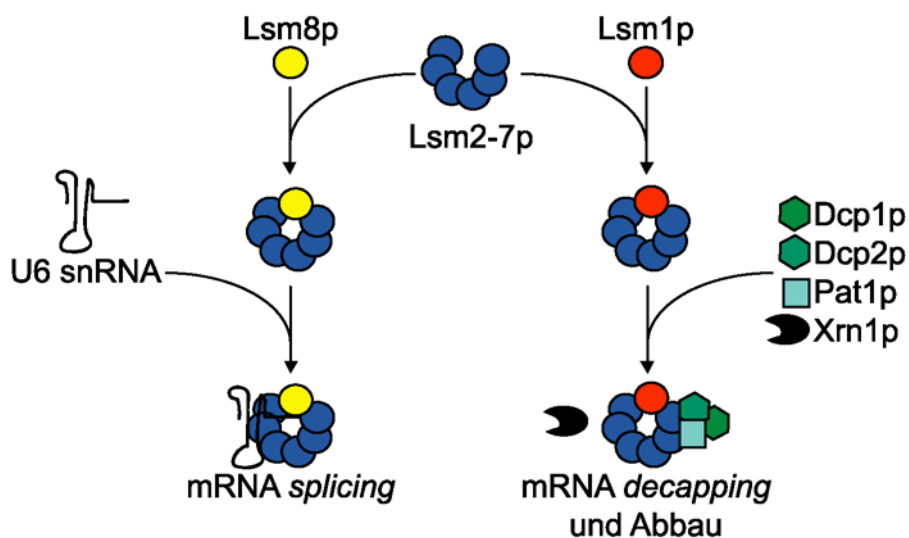


Abb. 8: Die Funktionen der zwei Lsm Komplexe.

Eine weitere Gruppe von Proteinen ist an effizientem mRNA Abbau beteiligt: Lsm oder *Sm-like proteins* (Abb. 8, Tucker und Parker, 2000). Sie gehören einer hochkonservierten Gruppe von Proteinen an, die eine Sm Domäne enthalten (Salgado-Garrido et al., 1999). In Hefe kommen neun Lsm Proteine vor: Lsm1-9p. Die Sm Domäne wurde erstmals in den so genannten Sm Proteinen beschrieben. Sie sind mit snRNAs (small nuclear RNAs) assoziiert, so dass ihnen eine Rolle

beim *splicing* zugeschrieben wird (Seraphin, 1995; Cooper et al., 1995). Das Sm Motiv dient wahrscheinlich der Protein-Protein-Interaktion und ermöglicht die Assemblierung von Sm Motive enthaltenden Proteinen zu einem ringförmigen Heptamer. Lsm Proteine interagieren miteinander und bilden eine Untereinheit des U6 *small nuclear ribonucleoprotein* (snRNP) Komplexes, der beim prä-mRNA *splicing* beteiligt ist. Mutationen in den Genen *LSM2-8* führen dementsprechend zu einem *splicing* Defekt, ausgelöst durch die Destabilisierung des U6 snRNA Komplexes (Salgado-Garrido et al., 1999). Der Lsm2-7p Komplex hat aber noch eine weitere Funktion. Zusammen mit Lsm1p scheint er am mRNA *decapping* beteiligt zu sein. Deletionen von *LSM1*, *LSM6* oder *LSM7*, oder Mutationen der essentiellen Gene *LSM2*, *LSM3*, *LSM4* oder *LSM5* führen zu einer verminderten mRNA Abbaurate (Tharun et al., 2000). Lsm1-7p werden also für einen effizienten mRNA Abbau benötigt, vor allem für das *decapping*.

Die Kontrolle der mRNA Stabilität scheint ein wichtiger Kontrollpunkt in der humanen Apoptose zu sein. Es gibt Hinweise auf eine Verbindung zwischen Lsm Proteinen und Autoimmunerkrankungen bzw. Krebs (Schweinfest et al., 1997; Stinton et al., 2004). Allerdings konnte bisher weder in Säuger- noch in Hefezellen eine mechanistische Verbindung zwischen mRNA Stabilität und Apoptose hergestellt werden.



## I.5 Zielsetzung

Die unausweichliche Frage bei der Erforschung des programmierten Zelltodes in *Saccharomyces cerevisiae* ist: Welchen evolutionären Vorteil hat ein einzelliger Organismus durch die Auslösung seines eigenen Todes. Ein Ziel dieser Arbeit war es, aufzuklären, ob das Vorhandensein eines apoptotischen Programms der Bäckerhefe einen Selektionsvorteil verschafft. Aus diesem Grund sollte der Zelltod während des chronologischen Alterns näher charakterisiert werden, da dieser unter physiologischen Bedingungen stattfindet und somit eventuell Hinweise auf die physiologische Funktion der Apoptose in Hefe birgt.

Um die Apoptose in dem Modellorganismus *S. cerevisiae* zu etablieren, ist es notwendig, konservierte Apoptosemechanismen herauszuarbeiten. Es wurde schon gezeigt, dass viele Zelltodwege in *S. cerevisiae* von der Metacaspase Yca1p vermittelt werden. Die Prozesse, die unterhalb von Yca1p das apoptotische Signal weiterleiten und in der Folge zu den morphologischen Veränderungen in der Zelle führen, sind dagegen noch weitgehend unbekannt und sollten im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert werden.

Die Klärung noch offener Fragen der Apoptoseforschung in Säugerzellen und die Entdeckung und Charakterisierung neuer Zelltodmechanismen, die möglicherweise auf Säugerzellen übertragbar sind, sind Fernziele der Hefeapoptoseforschung.

Beispielweise konnte in Hefe bereits eine Verbindung zwischen mRNA Stabilität und Apoptose hergestellt werden. Über die Mechanismen, die bei einem gestörten mRNA Stoffwechsel zur Initiation der Apoptose führen, ist aber weder im Säuger- noch im Hefesystem genaueres bekannt. Hier könnte der Modellorganismus dazu dienen erste Hinweise auf Mechanismen aufzudecken.



## **II MATERIAL UND METHODEN**

### **II.1 Geräte**

Autoklav Ventilab S 3000  
Elektroblotapparat Multiphor II  
Elektrophoresekammern für Agarosegele  
Mini-gele

Midi-Gele  
Elektrophoresekammern für Proteingele  
Hoefer SE 400 Serie  
Mini-Protean 3 System  
Elektroporator 2510  
ELISA-Reader MR 5000  
Entwicklermaschine SRX-101  
FACS Calibur  
Geldokumentationssystem CS-1  
Mikroskope  
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20  
Fluoreszenzmikroskop BH-2 RFCA  
Mikroskop Ortholux 2  
pH-Meter  
Photokamera Modell c35AD-4  
Rotationsverdampfer Rotavapor R110  
Spektralphotometer Modell UV-120-01  
Sterilbank Modell ET 130 V  
Thermocycler  
Transilluminator  
Zellzähler CASY1 DT  
Zentrifugen  
Tischzentrifuge 3200  
Biofuge pico  
Biofuge fresco  
3K12 mit Rotor Nr. 11133  
RC-5 Superspeed mit Rotor SS 34  
Suprafuge 22 mit Rotor HFA 12.500

MMM, München  
Amersham-Pharmacia, Freiburg

Werkstatt des Physiologisch-  
Chemischen Instituts, Tübingen  
Biorad, München

Amersham-Pharmacia, Freiburg  
Biorad, München  
Eppendorf AG, Hamburg  
Dynatech Instruments, Torrance, USA  
Konica  
Becton Dickinson, USA  
Cybertech, Berlin

Zeiss, Jena  
Olympus, Japan  
E. Leitz, Wetzlar  
Knick, Berlin  
Olympus, Japan  
Büchi  
Shimadzu  
Ehret Reinraumtechnik, Deutschland  
Biorad, München  
Vilber Lourmat, Frankreich  
Schärfe System, Deutschland

Eppendorf AG, Hamburg  
Heraeus Christ, Osterode  
Heraeus Christ, Osterode  
Sigma, München  
Sorvall  
Heraeus Christ, Osterode

## II.2 Chemikalien und Kits

Alle Feinchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham, AppliChem, Merck, Serva, ICN, Roche, Promega und Sigma bezogen. Die Bestandteile für Kulturmedien wie Hefeextrakt, Bacto-Pepton, Bactotrypton und Hefe-Stickstoffbase ohne Aminosäuren stammten von DIFCO (USA), Agar von Otto Nordwald KG und die Aminosäuren für die Kulturmedien von AppliChem. Molekulargewichtsstandards für Gelelektrophoresen sowie alle Enzyme für die Molekularbiologie wurden von MBI Fermentas bezogen.

Alle Erstantikörper waren von Sigma, die POD gekoppelten sekundären Antikörper von Biorad.

Kits zur Aufreinigung von DNA (Miniprep, Gelextraktion und CyclePure) wurden von Peqlab bezogen.

## II.3 Primer

In Tabelle 1 sind die für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotid Primer aufgelistet.

Name	Sequenz
<i>YPL095c_pESC</i> sense	5'-GATCGCGGCCGCATGTTTCGCTCGGGTACTATCCAACTGTC-3'
<i>YPL095c_pESC</i> antisense	5'-GATCGCGGCCGCTAAACTAACTCATCAAAGCTGCCC AAGAAC-3'
<i>YCA1_pESC</i> sense	5'-CACTGAATTCATGAAGATGAGCCTCGAAG-3'
<i>YCA1_pESC</i> antisense	5'-CACTGCGGCCGCCATAATAAATTGCAGATTTACGTC-3'
<i>AIF1_pQE-60</i> sense	5'-CATGCCATGGCATTAAACACAAAGAACATAG-3'
<i>AIF1_pQE-60</i> antisense	5'-CATGAGATCTTTTTTTGAATAAAGGTTCCATTTTG-3'
<i>delt_YCA1</i> sense	5'-ATAGGAGCCAAAAATATGAAGATGAGCCTC GAAGTTTATCCAGCTGAAGCTTCGTACGC-3'
<i>delt_YCA1</i> antisense	5'-CTACATAATAAATTGCAGATTTACGTCAATAG GGTGTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'
FLAG ANTI	5'-CGTCATCCTTGTAATCCAT-3'
kangegen	5'-GGACGAGGCAAGCTAAACAG-3'

**Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotid-Primer (bezogen von MWG).**

## II.4 Verwendete Organismen

### II.4.1 *E. coli*

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden in dem *E. coli* Stamm DH5  $\alpha$  (F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, endA1, recA1, hsdR17 ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), supE44, thi-1, gyrA96, relA1,  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169,  $\lambda^-$ ) durchgeführt.

Zur rekombinanten Expression von Proteinen wurde der *E. coli* Stamm M15 [pREP4] (Qiagen) verwendet. Plasmide in diesem Stamm sind gekennzeichnet.

Tabelle 2 listet die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme und ihre Plasmide auf.

Stamm	Plasmid	Referenz
pFM126	M15 [pREP] Kan <sup>R</sup>	Qiagen
pKF899	pQE60; Amp <sup>R</sup> ; ColE1 Origin; T5 Promoter/lac Operator; T5 His <sub>6</sub> tag; Lambda $t_0$ Terminator <i>rrnB</i> T1 Terminator	Qiagen
pFM128	M15 [pREP] Kan <sup>R</sup> [pQE60- <i>AIF1</i> ] Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pFM13	pESC- <i>LEU</i> : <i>LEU2</i> ; Amp <sup>R</sup> ; f1 Origin; pUC Origin; 2 $\mu$ Origin GAL10 Promoter; FLAG tag; ADH1 Terminator GAL10 Promoter; c-myc tag; CYC1 Terminator	Stratagene
pFM16	pESC- <i>HIS</i> : <i>HIS3</i> ; Amp <sup>R</sup> ; f1 Origin; pUC Origin; 2 $\mu$ Origin GAL10 Promoter; FLAG tag; ADH1 Terminator GAL10 Promoter; c-myc tag; CYC1 Terminator	Stratagene
pKF784	pUG6; Amp <sup>R</sup> ; f1 Origin; loxP-kanMX4-loxP; <i>TEF2</i> Promoter; <i>TEF2</i> Terminator	Güldener et al., 1996
pFM21	pESC- <i>HIS</i> - <i>YCA1</i> -FLAG	diese Arbeit
pFM46	pESC- <i>LEU</i> - <i>YPL095c</i> -FLAG	diese Arbeit
pFM48	pESC- <i>HIS</i> - <i>AIF1</i> -FLAG	Wissing et al., 2004
YEp351	<i>LEU2</i> ; 2 $\mu$ Origin; Amp <sup>R</sup>	Hill et al., 1986
pFW300	YEp351- <i>YAP1</i>	Wendler et al., 1997

Tabelle 2: Verwendete *E. coli* Stämme und Plasmide.

## II.4.2 *S. cerevisiae*

In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme aufgelistet.

Stamm	Stamm-bezeichnung	Genotyp	Referenz
KFY159	DBY2068	Mat a; <i>ura3-52</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>his4-619</i> (S288C)	D. Botstein
KFY715	BY4741	Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>	EURO-SCARF
FMY540	W303	Mat a; <i>ura3-52</i> ; <i>trp1Δ2</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>his3-11</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>can1-100</i>	S. D. Kohlwein
KFY729	BY4741Δ <i>yca1</i>	Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>yca1::kanMX</i>	EURO-SCARF
FMY17	BY4741/ pESC-HIS-YCA1	Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; pESC-HIS-YCA1	diese Arbeit
FMY29	BY4741/ pESC-HIS	Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; pESC-HIS	diese Arbeit
FMY30	BY4741Δ <i>ygl129c</i> pESC-HIS	Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>ygl129c::kanMX</i> ; pESC-HIS	diese Arbeit
FMY31	BY4741Δ <i>ygl129c</i> pESC-HIS-YCA1	Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>ygl129c::kanMX</i> ; pESC-HIS-YCA1	diese Arbeit
FMY63	BY4741Δ <i>ypl095c</i>	Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>ypl095c::kanMX</i>	EURO-SCARF
FMY192	BY4741/ pESC-LEU	Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; pESC-LEU	diese Arbeit
FMY193	BY4741Δ <i>yca1</i> / pESC-LEU	Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>yca1::kanMX</i> ; pESC-LEU	diese Arbeit
FMY196	BY4741/ pESC-LEU-YPL095c	Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; pESC-LEU-YPL095c	diese Arbeit
FMY197	BY4741Δ <i>yca1</i> / pESC-LEU-YPL095c	Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>yca1::kanMX</i> ; pESC-LEU-YPL095c	diese Arbeit
FMY191	BY4741/ pESC-HIS-AIF1	Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; pESC-HIS-AIF1	Wissing et al., 2004
FMY149	YRP840	Mat a; <i>ura3-52</i> ; <i>trp1</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>his4-539</i> ; <i>cup1::LEU2(PM)</i>	Hatfield et al., 1996
FMY150	YRP1069 Δ <i>dcp1</i>	Mat α; <i>ura3-52</i> ; <i>trp1</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>cup1::LEU2(PM)</i> ; <i>lys2-201</i> ; <i>dcp1::URA3</i>	Roy Parker

FMY152	YRP1346 <i>Δdcp2</i>	Mat a; <i>ura3-52; trp1; leu2-3,112; his4-539; cup1::LEU2(PM); lys2-201; dcp2::TRP1</i>	Dunckley und Parker, 1999
FMY151	YRP1372 <i>Δpat1</i>	Mat a; <i>ura3-52; trp1; leu2-3,112; his4-539; cup1::LEU2(PM); pat1::LEU2</i>	Tharun et al., 2000
FMY153	YRP1580 <i>Δdhh1</i>	Mat a; <i>ura3-52; trp1; leu2-3,112; his4-539; cup1::LEU2(PM); lys2-201; dhh1::URA3</i>	Coller et al., 2001
FMY291	MCY4/ <i>313Kllsm4Δ1</i>	Mat α; <i>ade1-101; his3Δ1; trp1-289; ura3; LEU2-GAL1-SDB23; pRS313/Kllsm4Δ1</i>	Cristina Mazzoni
FMY292	CML39-11A	Mat a; <i>ade1-101; his3Δ1; leu2; ura3; trp1-289</i>	Cristina Mazzoni
FMY293	CML39-9A <i>Δyca1</i>	Mat a; <i>ade1-101; his3Δ1; leu2; ura3; trp1-289; yca1::kanMX4</i>	Cristina Mazzoni
FMY294	CML39-8D <i>Δyca1/ 313Kllsm4Δ1</i>	Mat a; <i>ade1-101; his3Δ1; leu2; ura3; trp1-289; LEU2-GAL1-SDB23; yca1::kanMX4; pRS313/Kllsm4Δ1</i>	Cristina Mazzoni

Tabelle 3: In dieser Arbeit benutzte Hefestämmen.

## II.5 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer wurden für verschiedene Methoden verwendet:

PBS	25 mM Kaliumphosphatpuffer; 0,9 % NaCl; pH 7,0
TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0
TBS	mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,6
TBS-T	10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 0,02 % Triton-X 100; pH 7,6
KPP	35 mM Kaliumphosphat-Puffer; 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 6,8

## II.6 Stammhaltung und Kultivierung

### II.6.1 Kulturmedien

LB-Medium	0,5 % Natriumchlorid 0,5 % Yeast Extract 1 % Bactotrypton
TB-Medium	1,2 % Bacto-tryptone 2,4 % Yeast Extract 0,4 % Glycerin 72 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 17 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Vollmedium (YPD)	1 % Hefeextrakt 2 % Bacto-Pepton 4 % Glucose
Synthetisches Minimalmedium (SC)	0,17 % Stickstoffbase ohne Aminosäuren 0,5 % Ammoniumsulfat 2 % Glucose/Galactose 80 mg/l Histidin 200 mg/l Leucin 160 mg/l Uracil 30 mg/l alle anderen Aminosäuren und Adenin

### II.6.2 Flüssigkulturen

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden in LB- oder TB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C geschüttelt.

Kulturen von *Saccharomyces cerevisiae* wurden bei 30 °C in YPD oder einem geeigneten SC Medium unter Schütteln angezogen.

#### II.6.2.1 Kultivierung in chronologischen Alterungsexperimenten

Zur Untersuchung des chronologischen Alterns wurden 10 ml Hefekulturen in 100 ml Schikanekolben in den entsprechenden SCD Medien oder YPD auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und für einen längeren Zeitraum unter Schütteln kultiviert. Um den Flüssigkeitsverlust bei längeren Experimenten zu minimieren, wurden Silikonstopfen verwendet.



### **II.6.2.2 Kultivierung von Wildtyp und Deletionsmutanten bei pro-apoptotischen Stimuli**

Die Zugabe von Apoptose-auslösenden Substanzen wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfolgte in der frühen exponentiellen Wachstumsphase, da dort die Hefezellen besonders suszeptibel sind. Dazu wurden Kulturen auf eine geringe Zelldichte (2-3 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml) angeimpft, nach 2 bis 4 h mit den entsprechenden Substanzen versetzt. Nach weiteren 2 bis 4 h wurden Überlebensplattierungen (II.8.1) durchgeführt.

### **II.6.2.3 Induktion der Überexpression von Genen**

Zur Induktion der Überexpression von Genen unter einem Galactose Promoter wurden Kulturen aus eine Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 in SCD Medium angeimpft und in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 auf SCG Medium überführt. Als zusätzlicher proapoptotischer Stimulus wurde den Kulturen 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugesetzt. Die vollständige Expression ist unter diesen Bedingungen nach ca. 16 h erreicht.

## **II.6.3 Plattenkulturen**

Plattenkulturen wurden für die Anzucht von Klonen (z.B. zur Selektion nach Transformation mit rekombinanter DNA, Verdünnungsausstrich) und für die Überlebensplattierung eingesetzt. Dabei wurden Platten für *E. coli* bei 37 °C, Platten für *S. cerevisiae* bei 30 °C inkubiert. Außerdem dienten Plattenkulturen der mittelfristigen Stammhaltung.

## **II.6.4 Dauerkulturen**

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

## **II.7 Molekularbiologische Methoden**

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

### **II.7.1 Agarosegele**

Die Agarosegelelektrophorese wurde in 1-2 % Agarose in TAE (40 mM Tris/Acetat; 1 mM EDTA; pH 8,0) durchgeführt. Zur Detektion der DNA wurde 0,001 % Ethidiumbromid zugesetzt, als Laufpuffer diente TAE. Die Elektrophorese wurde bei 80V (Minigele) bzw. 120V (Midigele) durchgeführt, das Gel wurde anschließend mit einem UV-Transilluminator ausgewertet und dokumentiert. Die Abschätzung der DNA-Menge erfolgte durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der zu bestimmenden Bande mit dem DNA-Längenstandard.

### **II.7.2 PCR**

PCRs wurden mit Produkten der Firma MBI Fermentas und Primern von MWG durchgeführt. Ein typischer PCR Ansatz enthielt in 100 µl einfach konzentrierten PCR Puffer 200 µM dNTPs, 1-3 mM MgCl<sub>2</sub> (je nach Primer), je 1 pM Primer, 1-10 ng Template und 2,5 U Taq (rekombinant). Die Annealing Temperatur wurde so gewählt, dass sie 4 °C unter der von MWG angegebenen Schmelztemperatur der Primer lag. Die Elongationszeit wurde in Abhängigkeit von der Länge des Gens variiert (1 min für 1000 bp). Nach 30 Zyklen folgte eine Elongation für 10 min. Um PCR Produkte für Restriktionsverdau weiter zu verwenden wurden sie mit E.Z.N.A. Cycle Pure (Peqlab) aufgereinigt.

### **II.7.3 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung**

Restriktionsverdau wurden mit Endonukleasen und den entsprechenden Puffern der Firma MBI Fermentas durchgeführt.

Zur Generierung von *sticky ends* vor Ligationen wurden präparative Verdau (Ansatzgröße 20 µl) mit 0,5 bis 3 µg DNA und 10 U der entsprechenden Endonukleasen in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 3 h bei 37 °C inkubiert.

Zur zusätzlichen Dephosphorylierung von Vektoren wurde nach 2 h 1 µl alkalische Phosphatase (*shrimp*, Promega, 1 U/µl) und 2,4 µl des 10-fach Puffers zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch 15 min Inkubation bei 65 °C. Nach der Auftrennung der Fragmente im Agarosegel konnte die DNA mittels Gelextraktion (E.Z.N.A Peqlab) isoliert und für Ligationen eingesetzt werden.

Zur Restriktionsanalyse von Plasmiden wurde 1 µg DNA mit 5 U der entsprechenden Endonukleasen in einem Ansatzvolumen von 10 µl 1h bei 37 °C inkubiert und mittels Gelelektrophorese analysiert.

#### **II.7.4 Ligation**

Die Ligation von DNA-Fragmenten aus präparativen Restriktionsverdauen erfolgte mit der T4 DNA-Ligase der Firma MBI Fermentas. Es wurden ca. 50–300 ng der Vektor-DNA mit einem etwa dreifachen molaren Überschuss der zu klonierenden DNA und 0,5 µl Ligase (200 *cohesive ligation* U/µl) in 10 µl des entsprechenden Puffers 1 h bei RT oder 12 h bei 14 °C inkubiert. Nach Inaktivierung der Ligase (5 min; 65 °C) konnte der Ligationsansatz direkt transformiert werden.

#### **II.7.5 Herstellung elektrokompetenter *E. coli***

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurden 100 ml Zellkultur in der exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> 0,4 -0,6) zentrifugiert (15 min; 5000 rpm; 4 °C), 2-mal in 50 ml ddH<sub>2</sub>O und einmal in 50 ml 10 % Glycerin gewaschen, das Zellpellet in 200 µl 10 % Glycerin resuspendiert und 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### **II.7.6 Transformation in *E. coli***

Die Transformation von *E. coli* erfolgte meist durch Elektroporation. Dafür wurde ein Aliquot kompetenter Zellen (II.7.5) auf Eis aufgetaut, mit 0,1-1µg Plasmid-DNA oder 2-5 µl einer Ligation gemischt und bei 1,6 kV in einer vorgekühlten Küvette durch Elektroporation transformiert. Die Zellen wurden sofort in 1 ml LB- oder TB-

Medium aufgenommen und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf die entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

### **II.7.7 Kolonien PCR in *E. coli***

Um den Erfolg von Klonierungen zu verifizieren wurde als erster Schritt eine Kolonien PCR durchgeführt, wobei der *sense* Primer im zu klonierenden Gen und der *antisense* Primer im Plasmid bindet. Die typische Ansatzgröße betrug 20 µl mit 0,4 µl Taq (1 U/µl), 2µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µl dNTPs (2 mM) und jeweils 20 pmol Primer. Es wurde eine kleine Menge der *E. coli* Kolonie direkt zu dem Ansatz gegeben. Zum Aufschluss der Zellen und zur Denaturierung der Plasmide wurde zu Beginn der PCR 10 min bei 94 °C inkubiert. Das PCR Programm wurde der Beschaffenheit der Primer und dem des Gens entsprechend angepasst (Annealing: 4 °C unter T<sub>M</sub> der Primer, Elongation: 1000 bp/min).

### **II.7.8 Plasmid Präparation aus *E. coli***

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

### **II.7.9 Transformation von *S. cerevisiae***

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach einem veränderten Protokoll nach Gietz (Gietz, 1994). Eine exponentiell wachsende 50 ml Kultur wurde bei OD<sub>600</sub> 0,4 - 0,6 geerntet (3 min, 5000 rpm), mit 10 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen und in 2 ml TE/LiAc (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 50 mM LiAc) resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden 100 µl der Zellsuspension mit ca. 1- 10 µg (max 15 µl) der zu transformierenden DNA, 10 µl Heringssperma-ssDNA (10 mg/ml) und 700 µl PEG/TE/LiAc (40 % PEG-4000; 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 100 mM LiAc) gemischt. Die Heringssperma-DNA wurde unmittelbar vor Gebrauch für 15 min auf 100 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Nach 30 min Inkubation bei 30 °C und Zugabe von 85 µl DMSO (optional) wurden die Zellen durch einen 7 minütigen

Hitzeschock bei 42 °C transformiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (1 min, 13.000 rpm), mit 500 µl TE gewaschen, in 100 µl TE resuspendiert und auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Bei der Transformation mit Kan<sup>R</sup>-Kassetten wurden die Zellen vor der Plattierung zur Ausbildung der Resistenz noch 3 h in YPD geschüttelt.

### **II.7.10 Disruption von Genen in *S. cerevisiae***

Zur Herstellung von Disruptionsmutanten wurde die Methode von Güldener (Güldener et al., 1996) verwendet. Das Plasmid pUG6 diente als Template für die PCR der Disruptionskassetten. Die Primer wurden so gewählt, dass sie das zu deletierende Gen flankieren. Nach der Fällung des PCR Produkts mit Ethanol wurde die Kasette transformiert (II.7.9). Der Erfolg der Disruption wurde mittels einer PCR von genomischer DNA (II.7.10) verifiziert.

### **II.7.11 Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae***

Die Isolierung genomischer DNA aus Hefe wurde zur Verifizierung von Disruptionsklonen und zur Gewinnung von Templates für Klonierungen eingesetzt. Dazu wurden 5 ml einer Übernachtskultur durch Zentrifugation geerntet, mit 1 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen und das Pellet in 500 µl Lysepuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 1 % SDS) resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µl Glasperlen wurde für 2 min gevortext und die flüssige Phase in ein neues Eppi überführt. Danach wurden 275 µl 7 M Ammoniumacetat pH 7,0 zugegeben, gemischt, für 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Die Abtrennung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 500 µl Chloroform. Anschließend wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit 1 ml Isopropanol für 5 min bei RT gefällt. Nach Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm) wurde das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 50-100 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

## **II.7.12 Northern Hybridisierung**

### **II.7.12.1 RNA-Präparation**

Die Gewinnung von Gesamt-RNA aus Hefe erfolgte durch ‚*Rneasy Mini Columns*‘ der Firma Qiagen und wurde laut ‚*Rneasy Mini Handbook*‘ mittels enzymatischer Lyse durchgeführt. Abweichend von dieser Beschreibung wurde die RNA nicht 2-, sondern 3-mal mit 35 µl von den Säulchen eluiert. Außerdem wurden pro Säulchen jeweils 14-15 ml Zellkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,3- 0,4 eingesetzt.

### **II.7.12.2 RNA-Gelelektrophorese**

Die RNA-Gelelektrophorese erfolgte in 1,2 %-igen Agarosegelen mit 1,2 M Formaldehyd für 1-3 Stunden bei 60 V entsprechend der Anleitung des Qiagen ‚*Rneasy Mini Handbooks*‘. Es wurden 20 µg RNA pro Ansatz eingesetzt. Als Kontrolle für das Auftragen der gleichen Mengen an RNA wurden die Banden der 26S- bzw. der 18S-rRNA im UV-Licht herangezogen.

### **II.7.12.3 Northern Blot**

Der Transfer der RNA auf die Filtermembran erfolgte über Kapillartransfer (Sandwich-Diffusionsblot) nach Standardvorschrift auf Nylonmembranen (Hybond<sup>TM</sup>-N, Amersham) über Nacht bei Raumtemperatur mit 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Na-citrate, HCl, pH 7). Nach ungefähr 16 Stunden wurde der Filter kurz in 2 x SSC gewaschen und die RNA in einem GS Gene Linker von Biorad mit dem Programm C3 fixiert. Die Membranen wurden dann entweder sofort für die Hybridisierung verwendet oder noch einmal in 2 x SSC gewaschen, in einen Plastikbeutel eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

### **II.7.12.4 Herstellung radioaktiv markierter Sonden mittels „*random priming*“**

100-500 ng der zu markierenden DNA wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf 11,5 µl aufgefüllt. Die DNA wurde 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und auf Eis gelagert. Anschließend wurden 2,5 µl Hexanukleotidgemisch (10 x), 2,5 µl random priming-Puffer (10 x), 2 µl Klenow-Polymerase (2 Units/µl) und 5 µl α-markiertes P<sup>32</sup>-dATP (mit einer spezifischen Aktivität von 3000 oder 6000 Ci/mmol) der Firma

Amersham zugesetzt. Der Ansatz wurde kurz abzentrifugiert und mindestens 3 Stunden im 37 °C Heizblock inkubiert.

#### **II.7.12.5 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden und Entwicklung**

Die Membranen wurden mit 50 ml Hybridmix NaPi (0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2; 1 mM EDTA; 7 % SDS; 1 % BSA; 100 µg/ml Heringssperma DNA) überschichtet und bei 68 °C über Nacht mit 50 - 100 µl radioaktiv markierter, denaturierter Sonde hybridisiert. Die hybridisierten Membranen wurden einmal für 20 Minuten mit 50 ml Pi-Wash (40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,2; 1 % SDS) und zweimal für 20 Minuten mit 25-50 ml Pi-Wash bei 68 °C gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit Klarsichtfolie umhüllt. Die umhüllten Membranen wurden in eine Entwickler-Kassette gelegt, beidseitig mit einem Röntgenfilm bedeckt und für 1-48 Stunden (Sonden-abhängig) bei -70 °C exponiert.

#### **II.7.12.6 Strippen**

Das Strippen wurde mit 1 %-igem SDS durchgeführt. Die hybridisierten Membranen wurden dreimal für 20 Minuten bei mindestens 68 °C gewaschen. Entweder wurde die gestrippte Membran sofort wieder verwendet oder noch einmal in 2 x SSC gewaschen, in einen Plastikbeutel eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

## **II.8 Zellbiologische Methoden**

### **II.8.1 Überlebensplattierung**

Um die Anzahl lebender Hefezellen in einer Kultur zu bestimmen wurde die Zellzahl einer Kultur mit dem Zellzähler CASY 1 in CASYton (0,9 % NaCl; 0,1 mM EDTA, pH 8,0) gemessen. Nach geeigneten Verdünnungsschritten wurden 500 Zellen auf YPD Platten ausplattiert. Nach 2 Tagen Inkubation bei 28 °C konnte die Überlebensrate anhand der *colony forming units* (CFU) bestimmt werden.

### **II.8.2 Kompetitives Überlebensassay**

Zwei bis auf ein Gen und einem das Gen ersetzenden Marker (Kan<sup>R</sup>) isogene Stämme wurden getrennt von einander aus einer Vorkultur auf OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft. Nach 6 Stunden wurden jeweils  $1 \times 10^8$  Zellen von beiden Stämmen in einem Kolben gemischt. Durch Überlebensplattierung auf YPD und YPD-Geneticin (200 mg/l) Platten konnte sowohl die Zahl aller überlebenden Zellen, als auch die Anzahl der überlebenden Mutanten mit Geneticin Resistenz bestimmt werden. Die Differenz aus beiden ergibt die CFU des Wildtyps.

### **II.8.3 Fixierung von Hefezellen**

Zur Immobilisierung fixierter Zellen werden Polylysin beschichtete Objektträger benötigt. Die Objektträger wurden nacheinander in wässriger Detergenzlösung, in deionisiertem Wasser und schließlich in Ethanol gewaschen. Auf die getrockneten Fenster wurden jeweils 25 µl 0,1 % Polylysinlösung aufgetragen, 30 bis 60 min inkubiert, die Lösung wieder abgesaugt und die beschichteten Objektträger getrocknet. Die Objektträger können bei 4 °C gelagert werden.

$1 \times 10^7$  Zellen einer Kultur wurden geerntet (1 min; 13.000 rpm), mit 500 µl Puffer B (35 mM Kaliumphosphat-Puffer; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 6,8) gewaschen und in 1 ml Puffer B resuspendiert. Die Fixierung erfolgte nach Zugabe von 120 µl 37 % Formaldehyd 1 h bei RT. Danach wurden die Zellen 3-mal in Puffer B+S (1,2 M Sorbitol; 35 mM Kaliumphosphat-Puffer; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 6,8) gewaschen, in 330 µl Puffer B+S aufgenommen, mit 5 µl Lyticase (1000 U/ml in PBS, Sigma) und



20 µl β-Glucuronidase / Arylsulfatase (14 U/ml, Roche) versetzt und zur Sphäroplastierung 2 h bei 30 °C inkubiert. Die Sphärplastierung von gealterten Zellen erfolgte mit 40 µl Lyticase und 30 µl β-Glucuronidase / Arylsulfatase. Danach wurden die Sphäroplasten in 500 µl Puffer B+S gewaschen (3 min; 2000 rpm), in 60 µl Puffer B+S resuspendiert und 30 µl der Zellsuspension auf Polylysin beschichtete Objektträger aufgetragen. Nach 15 bis 30 min wurde die Flüssigkeit abgesaugt, die Objektträger getrocknet und bei 4 °C aufbewahrt.

#### **II.8.4 TUNEL Test**

Zur Detektion von fragmentierter DNA im TUNEL Test (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) wurde das ‚*In Situ Cell Death Detection Kit*‘ (Roche) verwendet. Durch Nukleasen entstandene freie 3'-OH-Gruppen werden durch die terminale Desoxynukleotidyltransferase mit Fluorescein gekoppeltem dUTP markiert, welches wiederum durch einen Peroxidase gekoppelten Antikörper erkannt werden kann.

Die TUNEL Färbung wurde an auf Objektträgern fixierten Zellen (II.8.3) durchgeführt. Diese wurden 2-mal mit PBS gewaschen und zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität 30 min mit 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch Inkubation mit Permeabilisierungslösung (0,1 % Triton X-100; 0,1 % Natriumcitrat) für 2 min auf Eis permeabilisiert. Anschließend wurde erneut 2-mal mit PBS gewaschen und mit 10 µl TUNEL-Reaktionsmix (25 mM Tris/HCl; 200 mM Na-Kakodylat; 5 mM CoCl<sub>2</sub>; 10 mM FITC-markiertes dUTP; 200 U/ml T4 Terminale Desoxynukleotidyltransferase) 1h bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Danach wurde 3-mal mit PBS gewaschen, 10 µl ‚*Converter-POD*‘ aufgetragen und 30 min bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde durch 3-maliges Waschen mit PBS entfernt und die Farbreaktion durch Applikation von 30 µl DAB-Substratlösung (‚*DAB Substrate/Metal enhanced*‘ 1:10 in ‚*Peroxidpuffer*‘ verdünnt, Roche) gestartet. Die Reaktion wurde nach 15 min durch Absaugen des Substrats und Waschen mit PBS gestoppt. Die getrockneten gefärbten Zellen wurden mit Kaiser-Gelatine eingedeckelt und im differentiellen Phasenkontrast mikroskopiert.

### **II.8.5 DAPI Färbung**

Um die Kernmorphologie von Zellen mikroskopisch zu untersuchen kann die DNA mit Diaminophenolindol (DAPI) angefärbt werden.

Hierzu wurden fixierte Zellen (II.8.3) 2-mal mit PBS gewaschen und danach mit 30 µl DAPI-Lösung (1 µg/ml in PBS, Sigma) 15 min bei RT in der Dunkelheit inkubiert. Um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren wurde danach 6-mal mit PBS gewaschen, anschließend Kaiser-Gelatine aufgetragen und ein Deckglas aufgelegt.

### **II.8.6 DHR Färbung**

Dihydrorhodamin 123 (DHR) dient zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Es ist ein membrangängiger Farbstoff der durch ROS zu Rhodamin 123 oxidiert wird. Zellen mit erhöhtem Sauerstoffstress lassen sich so anfärben und können fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden.

Ein 1 ml Aliquot einer Kultur wurde mit 2 µl DHR-123-Lösung (2,5 mg/ml in Ethanol, Sigma) versetzt und für 2 Stunden bei 30 °C geschüttelt. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (1 min; 13.000 rpm), der Überstand abgesaugt, die Zellen im Rest Medium resuspendiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### **II.8.7 Annexin V Färbung**

Um die Externalisierung von Phosphatidylserin als frühen apoptotischen Marker zu untersuchen, wurden Annexin V Färbungen (*Apo Alert Annexin V Apoptosis Kit*, Clontech) durchgeführt.

$1 \times 10^7$  Zellen einer Kultur wurden geerntet (1 min; 13.000 rpm), mit 500 µl Puffer B+S (1,2 M Sorbitol; 35 mM Kaliumphosphat-Puffer; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 6,8) gewaschen und zur Späroplastierung in 330 µl Puffer B+S mit 5 µl Lyticase (1000 U/ml in PBS, Sigma) und 20 µl β-Glucuronidase / Arylsulfatase (14 U/ml, Roche) versetzt und 2 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Sphäroplasten in 500 µl Puffer C+S (1,2 M Sorbitol; 10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) gewaschen und in 20 bis 50 µl Puffer C+S resuspendiert. 10 µl dieser

Suspension wurden mit 2  $\mu\text{l}$  ‚FITC-Annexin V‘ und 1  $\mu\text{l}$  Propidiumiodid (1:30 in Puffer C) versetzt, 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Kofärbung mit Propidiumiodid wird zur Überprüfung der Zellmembranintegrität durchgeführt.

### **II.8.8 In-vivo Caspase Aktivitätsassay**

Die Messung der Caspaseaktivität mit CaspACE™ (Promega) beruht auf der Bindung des membrangängigen FITC-VAD-fmk als Substratanalogen im katalytischen Zentrum aktivierter Caspasen. Durch die durchflußcytometrische Messung der Fluoreszenzintensität kann der Prozentsatz von Zellen mit aktiven Caspasen bestimmen werden.

Es wurden  $5 \times 10^6$  Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, in 200  $\mu\text{l}$  FITC-VAD-fmk (1:1000 in PBS) resuspendiert und 20 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 500  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen, in 200  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen und im FACS Calibur bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und Emissionswellenlänge von 525-550 nm (Filter FL1) quantifiziert.

## **II.9 Proteinbiochemische Methoden**

### **II.9.1 Gewinnung von Rohextrakten aus *S. cerevisiae***

#### **II.9.1.1 Chemische Lyse**

Nach der Messung der OD<sub>600</sub> einer Hefekultur wurde ein Volumen, das 3 OD<sub>600</sub> entsprach, abgenommen, durch Zentrifugation geerntet, mit 1 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen und zur Lyse in 150 µl Lysepuffer CL (1,84 M NaOH; 7,5 % β - Mercaptoethanol) 10 min auf Eis inkubiert. Die Fällung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 150 µl 55 % TCA und 10 minütiger Inkubation auf Eis. Danach wurde für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 300 µl Harnstoff-Ladepuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8; 8 M Harnstoff; 5 % SDS; 1 mM EDTA; 0,1 % Bromphenolblau als pH-Indikator; 15 mM DTT) aufgenommen. Falls die Pufferkapazität des Ladepuffers nicht ausreichte, wurde 1-3 µl einer untitrierten 1 M Tris-Lösung bis zum Farbumschlag zugegeben. Die Suspension wurde für 10 min auf 65 °C erhitzt und anschließend 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Es wurden 30 µl des Überstandes unmittelbar für die Gelelektrophorese eingesetzt.

#### **II.9.1.2 Glasperlenaufschluss**

Um aus Hefe Rohextrakte für die Immunopräzipitation oder Immunoblots mit definierten Proteinmengen zu erhalten, wurde ein Glasperlenaufschluss durchgeführt, wobei unterschiedliche Lysepuffer verwendet wurden: Immunoblot Lysepuffer IBL (20 mM HEPES, pH 7,4; 84 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM EGTA; 0,5 % NP-40; Zugabe unmittelbar vor Gebrauch: 1 mM PMSF; 1 mM DTT; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 5 µg/ml Aprotinin) und Immunopräzipitation Lysepuffer CPL (50 mM Tris/HCl pH7,4; 150 mM NaCl; 1 % Triton X-100; Zugabe unmittelbar vor Gebrauch: 1 mM DTT; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 5 µg/ml Aprotinin; alle Protease-Inhibitoren von Sigma). Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3 min; 5000 rpm) geerntet, in 300 µl Lysepuffer aufgenommen und in dickwandige Reagenzgläser überführt. Nach einer erneuten Zentrifugation (5 min; 5000 rpm) wurde der Überstand entfernt und etwa das doppelte Volumen Glasperlen zugegeben. Der Aufschluss erfolgte durch 3-5 min

vortexen. Danach wurde das Rohextrakt direkt in 500 µl Lysepuffer aufgenommen und die Glasperlen und Zelltrümmer durch mehrmalige Zentrifugation entfernt (10 min; 13.000 rpm; 4 °C). Der Proteingehalt der Proben wurde durch Bradford Assay bestimmt. Dazu wurden 5-20 µl des 1:10 verdünnten Rohextrakts mit 700 µl ‚Bradford working buffer‘ (425 ml destilliertes Wasser; 15 ml 95 % Ethanol; 30 ml 88 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 30 ml Bradfordstammlösung; Stammlösung: 100 ml 95 % Ethanol; 200 ml 88 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 350 mg Serva Blau G-250) versetzt und im ELISA-Reader bei 595 nm die Extinktion bestimmt.

## **II.9.2 SDS-PAGE**

Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde verändert nach der Methode von Lämmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Gele wurden entweder als Midigele (Hoefer) oder als Minigele (Biorad) gegossen. Als Trenngel wurden 8-12 % Acrylamid in 250 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,2 % SDS; 0,32 % N,N'-Methylenbisacrylamid; 0,1 % APS (Ammoniumperoxodisulfat); 0,01 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) verwendet. Das Sammelgel bestand aus 250 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,2 % SDS; 5 % Acrylamid; 0,13 % N,N'-Methylenbisacrylamid; 0,1 % APS; 0,01 % TEMED. Die Proben wurden mit 6 x Lämmli Auftragspuffer (375 mM Tris/HCl, pH6,8; 25,8 % Glycerin; 12,3 % SDS; 600 µg/ml Bromphenolblau; 60 µl/ml β-Mercaptoethanol) versetzt und 15 min auf 100 °C erhitzt. Nach dem Auftragen der Proben wurde das Gel in Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin; 0,2 % SDS) bei 40 V über Nacht (Midigele) oder bei 200 V für ca. 1 h (Minigele) laufen gelassen.

## **II.9.3 Coomassie Färbung von SDS Gelen**

Zur Coomassie Färbung wurde das Gel für 3-mal 30 sec in Färbelösung (0,5 - 1,0 % Coomassieblue; 40 % Methanol; 10 % Eisessig) in der Mikrowelle erhitzt und anschließend in Entfärbelösung (40 % Methanol; 10 % Eisessig) so lange geschüttelt, bis die Banden deutlich sichtbar und keine Hintergrundfärbung mehr zu sehen war.

### II.9.4 Immunoblots

Um die Expression von Proteinen im Immunoblot nachzuweisen, wurden die Proben im SDS-PAGE aufgetrennt und durch *Semidry-Blot* auf Nitrocellulose-Membranen (Hybond-ECL, Amersham) überführt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA (Midigel) bzw. 200 mA (Minigel). Zuvor waren sowohl das Whatman Papier als auch die Membran in Blotpuffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 0,05 % SDS; 20 % Methanol) getränkt worden. Um den Transfer zu überprüfen, wurden die Membranen in Ponceau S Lösung (0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure) gefärbt. Die Membranen wurden 1 h mit 5 % Milchpulver in TBS-T geblockt, 3 - 6-mal mit TBS-T gewaschen, 1 h mit dem ersten Antikörper inkubiert (siehe Tabelle 4), anschließend 6-mal mit TBS-T gewaschen und 1 h mit dem sekundären, Peroxidase gekoppelten Antikörper inkubiert (siehe Tabelle 4). Nach gründlichem Waschen (3 x kurz, 3 x 15 min) mit TBS-T wurde die Membran mit dem ECL System entwickelt. Dazu wurden 5 ml ECL Lösung (100 mM Tris/HCl, pH 8,5; 2,5 mM Luminol; 0,4 mM Cumarinsäure) mit 10 ml ddH<sub>2</sub>O und 6 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt, die Membran darin für 1 min inkubiert, in Folie eingeschweißt und für 30 sec bis 20 min ein Film (ECL, Amersham) aufgelegt und dieser in einer Entwicklermaschine entwickelt.

Antikörper	Konzentration	Bezugsquelle
α - FLAG; Monoklonal; Maus	1 µg/ml	Sigma
α - His <sub>6</sub> ; Monoklonal; Maus	0,5 µg/ml	Sigma
Peroxidase gekoppelter α - Maus Zweitantikörper	1:4000	Biorad

Tabelle 4: Verwendete Antikörper.

### II.9.5 His<sub>6</sub>-Tag Aufreinigung von rekombinantem Aif1p

*AIF1* wurde in *E. coli* Expressionsvektor pQE-60 (Qiagen) kloniert und in *E. coli* Expressionsstamm M15 (Qiagen) transformiert. Nach Expression erfolgte die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen nach dem Qiagen Protokoll ‚*QIAexpressionist*‘. 200 ml LB<sub>Amp/Kan</sub> wurden mit 10 ml einer Vorkultur beimpft und

die Genexpression durch Zugabe von 1mM IPTG bei einer  $OD_{600}$  von 0,5 induziert. 5 h nach der Induktion wurden die Zellen geerntet (20 min; 4000 g) und in 10 ml Lysepuffer B (100 mM  $NaH_2PO_4$ ; 8 M Harnstoff; 10 mM Tris/NaOH, pH 8,0) resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte durch 6 x 10 Sekunden Ultraschall im Eisbad und 30 min Inkubation bei RT. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (20 min; 10.000 rpm) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 4 ml Ni-NTA *beads* (Qiagen) 1h bei RT rotiert. Anschließend wurde der Ansatz auf 2 Säulchen verteilt, 3-mal mit je 8 ml Waschpuffer C (100 mM  $NaH_2PO_4$ ; 8 M Harnstoff; 10 mM Tris, pH 6,3) gewaschen, 3-mal mit je 1 ml Elutionspuffer D (100 mM  $NaH_2PO_4$ ; 8 M Harnstoff; 10 mM Tris, pH 5,9) und 7-mal mit je 2 ml Elutionspuffer E (100 mM  $NaH_2PO_4$ ; 8 M Harnstoff; 10 mM Tris, pH 4,5) eluiert. Alle Elutionsfraktionen, die das gereinigte Aif1p enthielten wurden gepoolt. Die Renaturierung wurde durch Dialyse gegen 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 50 mM Glycin, 0,1 % NP-40, 150 mM NaCl, 10 % Glycerin und 50 mM HEPES pH 7,9 erreicht. Danach wurde das gereinigte Aif1p mit Centriprep YM-30 (Millipore) aufkonzentriert (1,5 h Zentrifugation; 1.500 g; 4 °C) und bei -80 °C gelagert.

## **II.9.6 Immunopräzipitation**

Die Immunopräzipitation wurde zur Reinigung von Proteinen aus *S. cerevisiae* verwendet. Dazu wurden FLAG-Epitop markierte Proteine für 12-20 h in Hefe exprimiert (pESC-Vektoren) und der *pull-down* mit  $\alpha$ -FLAG Agarose ( $\alpha$ -FLAG M2 affinity gel, Sigma) aus Rohextrakten (II.9.1.2) durchgeführt. Als erstes musste die  $\alpha$ -FLAG Agarose durch 2-maliges Waschen mit TBS (50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl) equilibriert werden (5 s; 10.000 rpm; 4 °C). Danach wurden 8-10 mg Protein aus Rohextrakten mit 40  $\mu$ l  $\alpha$ -FLAG Agarose in 1 ml Lysepuffer IPL (II.9.1.2) für 2 h bei 4 °C rotiert. Nach 3-maligem Waschen mit 500  $\mu$ l TBS wurden die präzipitierten Proteine mit 100 ml Puffer E (100 mM Glycin, pH 2,6) eluiert, die Agarosebeads durch Zentrifugation abgetrennt und das Eluat durch Zugabe von 5  $\mu$ l 1M Tris (pH 9) neutralisiert. Aliquots vom Rohextrakt, dem ersten Waschschrift, den in Lämmli-Puffer aufgekochten Agarosebeads und dem Eluat wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt.

### **II.9.7 DNase Assay**

1 µg Plasmid (pYES2, Invitrogen) wurde zusammen mit rekombinantem Aif1p (II.9.5) oder BSA (Kontrolle) und mit oder ohne 2 mM MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub> für 30 min bei 30 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurde rekombinantes Aif1p für 10 min auf 100 °C erhitzt. 16 µg rekombinantes Aif1p wurde zu gereinigten Kernen (200 µg Protein) gegeben und bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die genomische DNA durch Lyse der Kerne in 1 % SDS, 1 % Triton-X-100, 50mM NaCl, 50 mM MES, pH 6,4 und 0,66 µg Proteinase K für 2 h, darauf folgende Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-fällung isoliert. Durch 1 h Inkubation in 1 mg/ml RNase in TE wurde die RNA entfernt. Alle Proben wurden durch Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht.

### **II.9.8 Gewinnung von Sekreten**

Um Sekrete von Hefezellen zu isolieren wurden 4 l Kultur nach einem Wachstum von 2 bis 8 Tagen abzentrifugiert (12 min., 8000 rpm), 3-mal in 1 l ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in 4 l ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Danach wurden die Zellen weitere 3 Tage geschüttelt und die Zellen vom Überstand durch 2-malige Zentrifugation (12 min., 8000 rpm) und Sterilfiltrieren getrennt (Porengröße 0,22 µm). Der Überstand wurde im Rotationsverdampfer konzentriert, und danach lyophilisiert. Durchschnittlich wurden 0,6 g Sekrete aus 4 l Kulturvolumen gewonnen. Die Sekrete wurden in einer Konzentration von 200 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O gelöst.



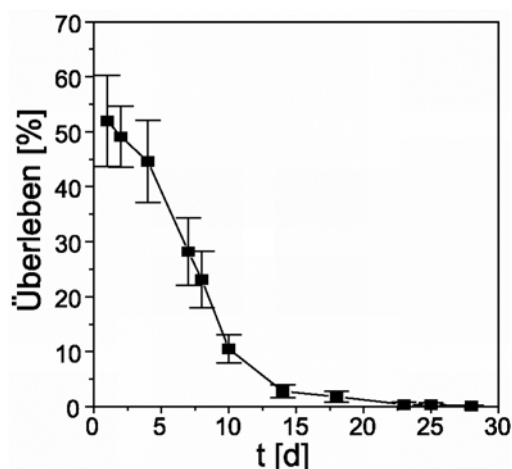
### III ERGEBNISSE UND DISKUSSION

#### III.1 Chronologisches Altern als physiologischer Apoptosestimulus

Bei der Hefe werden zwei Formen des Alterns unterschieden: chronologisches und replikatives Altern. Replikatives Altern beschreibt den Alterungsprozess einer individuellen Zelle. Da *Saccharomyces cerevisiae* sich asymmetrisch teilt, kann man zwischen Mutter- und Tochterzelle unterscheiden, nur die Mutterzelle trägt einen Chitinring von der Abknospung als ‚Geburtsnarbe‘. Einzelne Zellen können sich zwischen 20 und 30 Mal teilen, bevor sie in einem apoptotischen Prozess sterben (Laun et al., 2001). Im Gegensatz dazu ist chronologisches Altern als Alterungsprozess einer Kultur in der postdiauxischen Phase definiert. Wenn die Nahrungsressourcen knapp werden stoppt die Zellteilung und es wurde schon von V.D. Longo gezeigt, dass die Zellen in dieser Phase zu einem großen Teil absterben (Longo et al., 1996).

##### III.1.1 Hefezellen sterben während des chronologischen Alterns mit einem apoptotischen Phänotyp

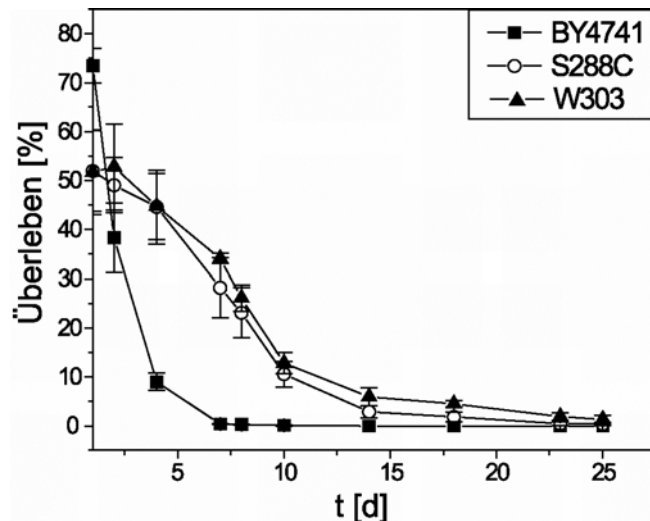
Um das chronologische Altern und die zeitliche Kinetik des Absterbens näher zu untersuchen wurden Wildtyp Zellen (KFY159) in Minimalmedium kultiviert und der Prozentsatz lebender Zellen durch Plattierungen bestimmt.



**Abb. 9: Überlebenskurve chronologisch alternder Wildtyp-Hefen.**

Wildtyp KFY 159 wurde in Minimalmedium chronologisch gealtert und das Überleben mittels Überlebensplattierung bestimmt (100 % ist die Anzahl der plattierten Zellen).

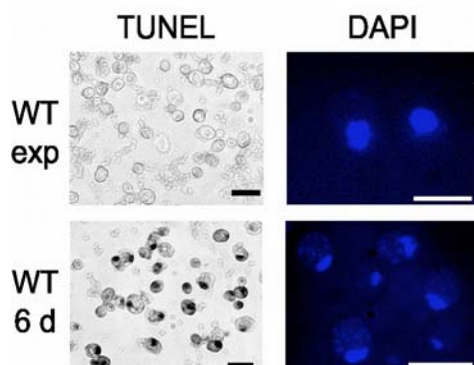
Die Überlebensrate von chronologisch alternden Hefezellen auf Minimalmedium nimmt zwischen dem fünften und zehnten Tag stark ab (Abb. 9). Nach 25 Tagen gibt es nur noch vereinzelt überlebende Zellen. Unterschiedliche Wildtypen zeigen eine differierende zeitliche Kinetik: BY4741 stirbt deutlich früher als die beiden anderen untersuchten Wildtypen S288C und W303 (Abb. 10).



**Abb. 10: Überlebenskurven verschiedener Wildtyp-Hefen im chronologischen Altern.**

(100 % ist die Anzahl der plattierten Zellen).

Der apoptotische Zelltod ist durch typische morphologische Veränderungen definiert. Unter anderem kommt es zu einer Fragmentierung der DNA, zu Chromatinkondensation und Chromatinmargination, d.h. das Chromatin kondensiert an der Kernmembran, und schließlich zur Kernfragmentierung (Kerr et al., 1972). Um zu untersuchen, ob die kernspezifischen Marker der Apoptose beim Zelltod im chronologischen Altern auftreten, wurden mit exponentiell wachsenden und sechs Tage gealterten Wildtyp-Hefen (BY4741) TUNEL und DAPI Färbungen durchgeführt.

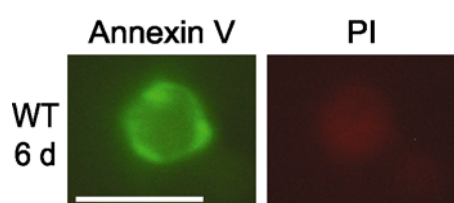


**Abb. 11: Chronologisch alternde Hefen zeigen DNA-Strangbrüche und Chromatinkondensation.**

Zellen von exponentiell wachsenden und sechs Tage gealterten Wildtyp-Hefen (BY4741) wurden fixiert und mit TUNEL-Reagenz (DNA-Strangbrüche) und DAPI (Chromatinkondensation) gefärbt. Balken 5  $\mu\text{m}$ .

Lichtmikroskopische Aufnahmen des TUNEL Tests zeigen ca. 80 % tiefschwarz gefärbte Zellkerne bei sechs Tage alten Zellen, d.h. die Kern-DNA ist zu diesem Zeitpunkt stark fragmentiert (Abb. 11). Im Gegensatz dazu zeigen exponentiell wachsende Hefen keine Färbung (Abb. 11). In der DAPI Färbung sieht man bei den exponentiell wachsenden Wildtyp-Hefen einen runden gesunden Zellkern, bei gealterten Hefen kondensiert das Chromatin halbmondförmig an der Kernmembran. In 20 % der Zellen ist der Zellkern fragmentiert (Abb. 11).

Ein früher Marker der Apoptose ist die Externalisierung von Phosphatidylserin, die mittels Annexin V Färbung sichtbar gemacht werden kann (Martin et al., 1995). Um sicherzustellen, dass die Zellmembran intakt ist, wurde mit einer Propidiumiodid (PI)-Kofärbung die Zellintegrität kontrolliert. Sechs Tage chronologisch gealterte Hefen zeigen bei 20 % der Zellen eine positive Annexin V Färbung bei negativer PI Kontrolle (Abb. 12). Etwa 10 % der Zellen lassen sich mit beiden Farbstoffen anfärben, diese Zellen sind geplatzt und akkumulierten Annexin V unspezifisch (nicht gezeigt).



**Abb. 12: Phosphatidylexternalisierung von alternden Hefen.**

Zellen von sechs Tage gealterten Wildtyp-Hefen (BY4741) wurden mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) gefärbt. Balken 5  $\mu\text{m}$ .

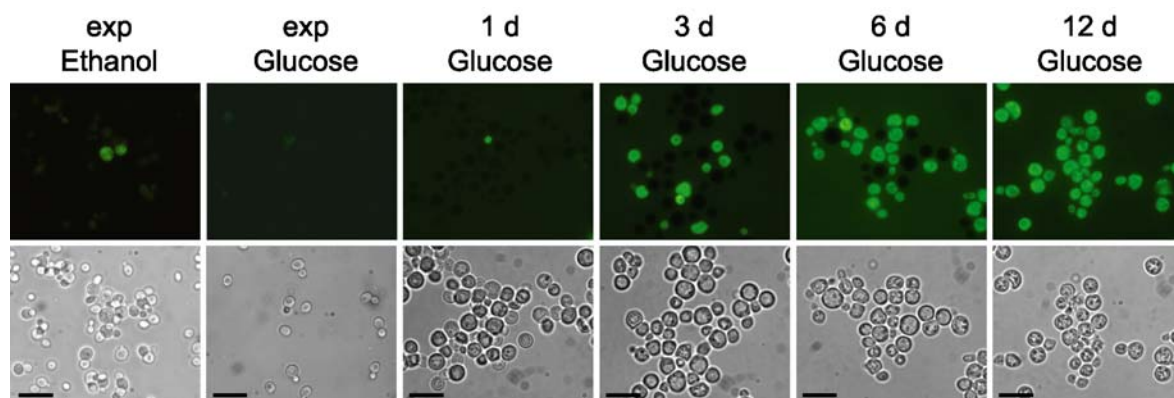
Damit führt chronologisches Altern von *Saccharomyces cerevisiae* zum apoptotischen Tod fast der gesamten Population, der mit den phänotypischen Markern der Apoptose einhergeht.

### III.1.2 ROS als Regulatoren des chronologischen Alterns

#### III.1.2.1 Akkumulation von ROS während des chronologischen Alterns

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind als Regulatoren der Apoptose sowohl in Säugerzellen als auch in der Hefe gut charakterisiert (Madeo et al., 1999).

Um eine Beteiligung von ROS am apoptotischen Tod von Hefen im chronologischen Altern zu untersuchen, wurden alternde Wildtyp-Hefen (BY4741) mit Dihydrorhodamin (DHR) gefärbt. Im Verlauf des Alterungsprozesses steigt der Prozentsatz an Zellen, die mit DHR färbbar sind (Abb. 13), nach zwölf Tagen sind alle Zellen gefärbt, zeigen also eine Akkumulation von ROS. Zur Kontrolle wurde untersucht, ob die Zunahme von ROS akkumulierenden Zellen nur auf die Umstellung des Stoffwechsels von Fermentierung auf oxidative Phosphorylierung und der damit verbundenen aktiven Atmungskette zurückzuführen ist. Dazu wurden Zellen, kultiviert in Medium mit Ethanol als Kohlenstoffquelle, mit DHR gefärbt. Trotz der aktiven Atmungskette zeigen diese Zellen fast keine Akkumulation von ROS (Abb. 13).

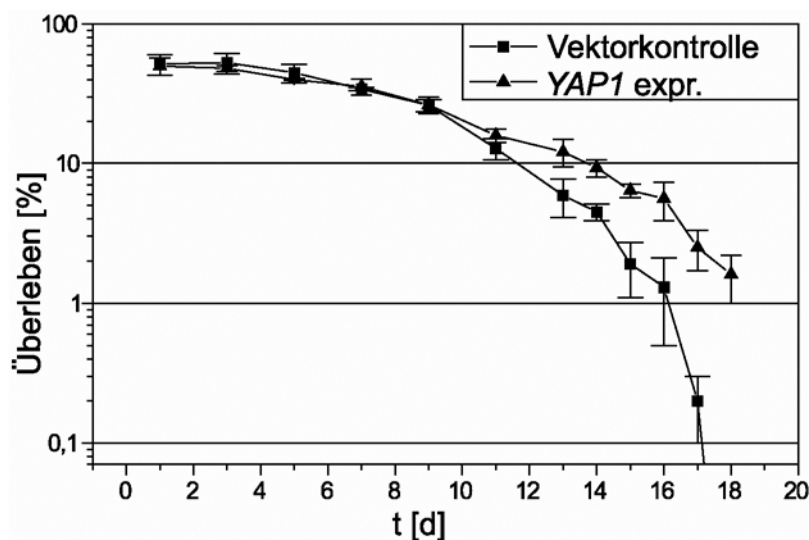


**Abb. 13: Chronologisch alternde Hefen akkumulieren ROS.**

DHR Färbung von exponentiell wachsenden und ein bis 12 Tagen in Minimalmedium mit Glucose oder Ethanol als Kohlenstoffquelle gealterten Wildtyp-Hefen (BY4741). Balken 10  $\mu\text{m}$ .

### III.1.2.2 Überexpression von YAP1 verbessert das Überleben im chronologischen Altern

V.D. Longo konnte zeigen, dass das Sterben von Zellen im chronologischen Altern durch Disruption von *SOD1* verstärkt, durch eine Überexpression verlangsamt wird (Longo et al., 1996). *YAP1* ist ein Transkriptionsfaktor, der die Stressantwort der Hefe bei einer Vielzahl von unterschiedlichen Stressfaktoren moduliert. Insbesondere bei oxidativem Stress wird Yap1p, ein funktionelles Homolog des humanen Apoptose Regulators AP-1 (*activator protein 1*), aktiviert (Moye-Rowley et al., 1988; Moye-Rowley et al., 1989). Eines der Gene, die unter der Kontrolle des *YAP1* Transkriptionsfaktors stehen, ist die *SOD1*.



**Abb. 14: Die Überexpression von YAP1 verbessert das Überleben beim chronologischen Altern.**

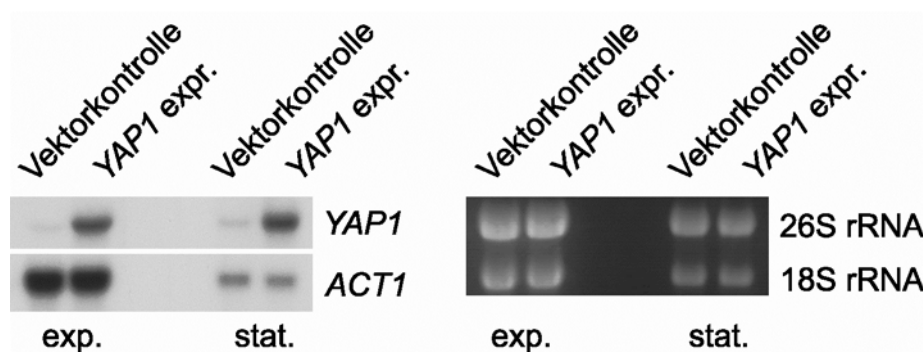
*YAP1* Überexpressions- und Vektorkontrollstämme wurden in Minimalmedium chronologisch gealtert und das Überleben mittels Überlebensplattierung bestimmt (100 % ist die Anzahl der plattierten Zellen).

Es wurde ein Stamm untersucht, bei dem *YAP1* unter der Kontrolle des eigenen Promoters in einem 2 $\mu$  Plasmid exprimiert wird (Wendler et al., 1997). Wie in Abb. 14 zu sehen, verlängert die Expression von *YAP1* das Überleben in der stationären Phase im Vergleich zur Vektorkontrolle. Ab dem zehnten Tag findet

sich ein höherer Prozentsatz lebender Zellen in der YAP1 Überexpressionskultur. Ab dem 18ten Tag gibt es nur noch in dieser Kultur lebensfähige Zellen.

Hefezellen besäßen also theoretisch die Möglichkeit, das Sterben im Altern zu verzögern.

Um die Expression von *YAP1* zu überprüfen, wurde eine Northern Hybridisierung von mRNA aus exponentiell wachsenden und stationären Kulturen durchgeführt. Sogar unter der Kontrolle des eigenen Promoters ist *YAP1* in diesem Stamm deutlich stärker exprimiert als in der Vektorkontrolle (Abb. 15). Auffallend ist, dass die Expression von *YAP1* in der stationären Phase insgesamt, also auch in der Vektorkontrolle stark erhöht ist, wenn man die aufgetragene Menge RNA und die Expressionskontrolle *ACT1* zum Vergleich heranzieht. Die Zellen reagieren also auf den oxidativen Stress während des chronologischen Alterns mit einer erhöhten Transkription von *YAP1*.



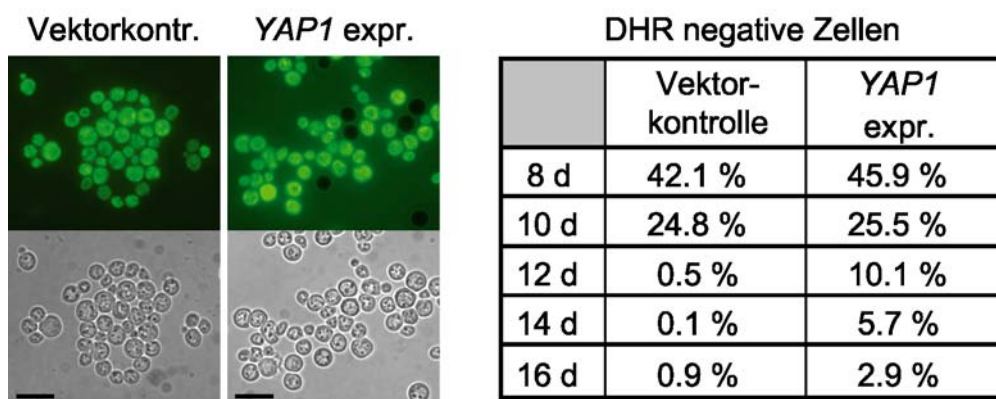
**Abb. 15: Expressionskontrolle von *YAP1*.**

Die mRNA von exponentiell wachsenden und stationären *YAP1* Expressions- und Kontrollkulturen wurde im Northern Blot mit *YAP1* und *ACT1* (Kontrolle) Sonden hybridisiert. Zur Kontrolle der aufgetragenen RNA Mengen wurden die 26S und 18S rRNA Banden herangezogen.

### III.1.2.3 Die Überexpression von *YAP1* vermindert die Akkumulation von ROS

Um den kausalen Zusammenhang zwischen dem verbesserten Überleben in der stationären Phase, vermittelt durch *YAP1* Expression, und der Akkumulation von ROS näher zu untersuchen, wurden *YAP1* Expressionsstämme und die zugehörige Vektorkontrolle während des chronologischen Alterns mit DHR gefärbt.

Tatsächlich zeigt sich in den *YAP1* Expressionsstämmen eine verminderte ROS Akkumulation (Abb. 16). Am Tag 12 sind in der Vektorkontrolle schon alle Zellen DHR positiv, während in der *YAP1* überexprimierenden Kultur noch DHR negative Zellen sind. Eine Auszählung von jeweils mindestens 1000 Zellen an verschiedenen Zeitpunkten des chronologischen Alterns ergab, dass der Prozentsatz an DHR negativen Zellen in den *YAP1* Expressionsstämmen stets über dem der Kontrolle lag. An Tag 12 zeigte sich die größte Differenz mit 10 % zu 0,5 % (Abb. 16).



**Abb. 16: *YAP1* Überexpression vermindert die Akkumulation von ROS.**

DHR Färbung von 12 Tagen gealterten *YAP1* Expressions- und Kontrollstämmen. Der Prozentsatz an DHR negativen Zellen wurde in einer zeitlichen Kinetik durch Auszählen von jeweils 1000 Zellen bestimmt.

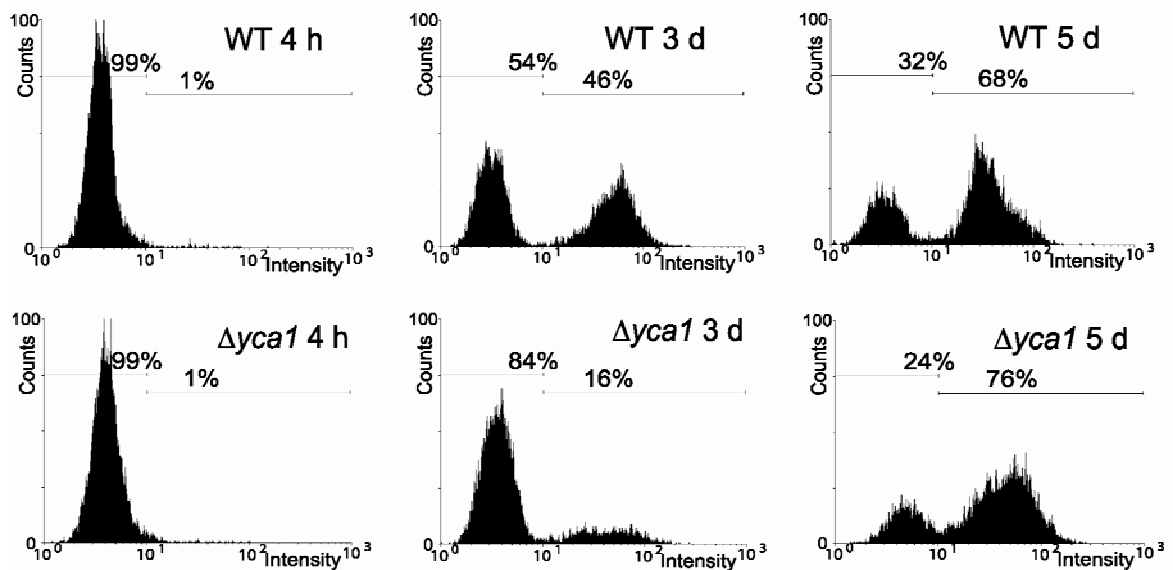
Die vermehrte Expression von *YAP1* vermindert somit die Akkumulation von ROS in chronologisch alternden Hefezellen.

### III.1.3 Die Rolle der Hefecaspase Yca1p im chronologischen Altern

#### III.1.3.1 Chronologisches Altern führt zur Aktivierung der Hefecaspase Yca1p

Die Hefecaspase Yca1p ist ein zentraler Regulator der Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae*. Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass sie bei verschiedenen proapoptotischen Stimuli an der Exekution der Apoptose beteiligt ist, z.B. bei oxidativem Stress und Salzstress (Madeo et al., 2002; Wadskog et al., 2004).

Eine Beteiligung von Yca1p am Zelltod während des Alterns sollte zu einer Aktivierung der Caspase führen. FITC-VAD-fmk ist ein Caspase Inhibitor, der in Zellen mit aktivierten Caspasen akkumuliert. Chronologisch gealterte Wildtyp-Hefen (BY4741) wurden gefärbt und im FACS analysiert.



**Abb. 17: Chronologisches Altern führt zur Aktivierung von Caspasen.**

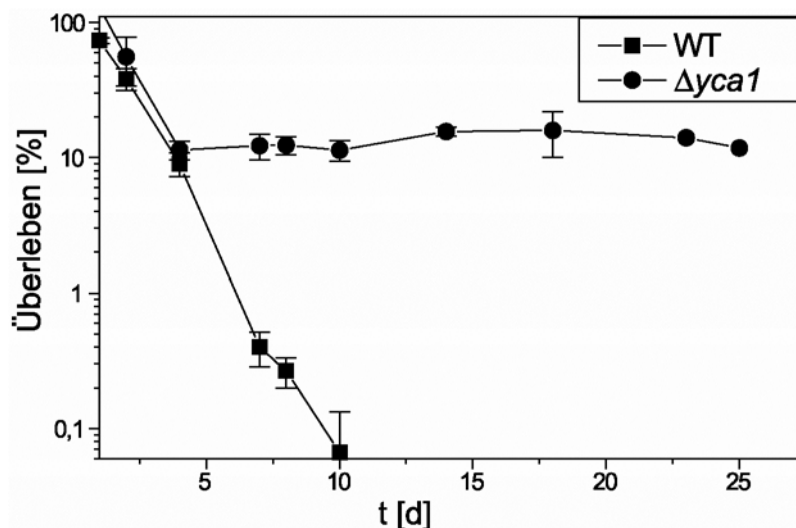
Wildtyp (BY4741) und  $\Delta yca1$  Stämme wurden in Minimalmedium chronologisch gealtert, mit FITC-VAD-fmk gefärbt und der Anteil gefärbter Zellen im FACS bestimmt.



Der prozentuale Anteil von Zellen mit aktiven Caspasen nimmt im Verlauf des chronologischen Alterns zu. Exponentiell wachsende Hefen zeigen nur eine Hintergrundfluoreszenz. Nach drei Tagen auf Minimalmedium sind 46 %, nach fünf Tagen 68 % der Zellen FITC-VAD positiv (Abb. 17). Die Deletion der Hefecaspase *YCA1* vermindert den Anteil von Zellen mit aktivierter Caspase in der frühen Phase des chronologischen Alterns, nach drei Tagen sind 16 % der Zellen im Caspase Assay positiv, im Vergleich zu fast 50 % im Wildtyp (Abb. 17). Später liegt der Anteil positiver Zellen in der gleichen Größenordnung (Abb. 17). Eventuell werden andere Cysteinproteasen aktiviert, die FITC-VAD binden können. Vor kurzem wurde gezeigt, dass viele Cysteinproteasen durch Caspase Inhibitoren hemmbar sind (Rozman-Pungercar et al., 2003) und somit eventuell auch fluorogene Caspaseinhibitoren binden könnten.

### III.1.3.2 Die Deletion der Hefecaspase *YCA1* verzögert den Zelltod beim chronologischen Altern

Da chronologisches Altern als Apoptosestimulus zur Aktivierung von Yca1p führt, sollte untersucht werden, wie sich die Deletion von *YCA1* auf das Überleben unter diesen Bedingungen auswirkt.



**Abb. 18: Deletion der Hefecaspase *YCA1* verhindert den Zelltod während des Alterns.**

$\Delta yca1$  und der isogene Wildtyp BY4741 wurden in Minimalmedium chronologisch gealtert und das Überleben mittels Überlebensplattierung bestimmt (100 % ist die Anzahl der plattierten Zellen).

Obwohl vor allem in der frühen Phase des chronologischen Alterns Yca1p aktiviert wird, zeigt sich vor allem in der sehr späten Phase ein signifikanter Überlebensunterschied zwischen dem  $\Delta yca1$  Disruptionsstamm und dem isogenen Wildtyp. Während in Wildtypkulturen die Überlebensrate bis zum zehnten Tag kontinuierlich sinkt und danach die Anzahl der lebensfähigen Zellen im Promille Bereich liegt, stabilisiert sich die Zahl der überlebenden Zellen des  $\Delta yca1$  Mutantenstammes ab Tag fünf bei etwa 10 % (Abb. 18).

Die Deletion der Hefecaspase *YCA1* verhindert also den Zelltod in der späten Phase des chronologischen Alterns.

### **III.1.4 Diskussion**

Es konnte gezeigt werden, dass chronologisches Altern ein physiologischer Apoptosestimulus für den Einzeller *Saccharomyces cerevisiae* ist. Der Zelltod betrifft den überwiegenden Anteil einer Kultur, es sterben aber nicht alle Zellen, denn im Promillebereich finden sich auch nach langen Phasen des Alterns noch überlebende Zellen. Es kommt zur Ausbildung von phänotypischen Markern der Apoptose: den nukleären Markern wie DNA Fragmentierung und Chromatinkondensation sowie der Externalisierung von Phosphatidylserin. Der apoptotische Zelltod im Altern wird durch die Hefecaspase Yca1p und andere bisher nicht identifizierte Cysteinproteasen vermittelt. So kann im Altern eine verstärkte Yca1p abhängige Aktivierung von Caspasen gemessen werden, und die Disruption von *YCA1* verlängert das Überleben in den späten Phasen des chronologischen Alterns. Der apoptotische Prozess ist gekoppelt an die Akkumulation von ROS. Im Verlauf des Alterns akkumulieren immer mehr Zellen ROS, der Prozentsatz korreliert mit dem Prozentsatz sterbender Zellen in der Überlebensplattierung. Bei einer Überexpression des Transkriptionsfaktors *YAP1* unter der Kontrolle des eigenen Promoters zeigt sich ein verzögertes Sterben in der stationären Phase. In diesem Stamm akkumulieren auch weniger Zellen ROS. Auch Wildtyp Zellen reagieren auf vermehrten oxidativen Stress im chronologischen Altern mit einer leicht erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors *YAP1*, der wiederum für die zelluläre Antwort gegenüber dem oxidativem Stress sorgt. Der bessere Schutz vor

intrinsisch gebildeten ROS des *YAP1* Exprimierers ermöglicht diesem Stamm eine längere Lebensdauer. Theoretisch hätte somit jede Zelle die Möglichkeit, das Sterben in der stationären Phase zu verzögern, indem sie die Expression von *YAP1* stark erhöht.

Die Regulation der Apoptose durch ROS erklärt eventuell auch den Ursprung und die primäre Funktion dieses Todesprogrammes. ROS entstehen in der Zelle durch die oxidative Phosphorylierung, UV-Strahlung und chemische Reaktionen. Sie sind für die Zelle toxisch indem sie Proteine, Lipide und Nukleinsäuren oxidieren. Die Zellen haben aber Schutzmechanismen entwickelt, wie sie ROS detoxifizieren können, dennoch kommt es oft zu massiven Schädigungen. Die meisten geschädigten Zellen sterben aber nicht sofort, sogar wenn sie nicht mehr proliferieren können. Während dieser Zeit verbrauchen sie noch Nahrungsressourcen. Es wäre demnach für eine monoklonale Population evolutionär sinnvoll, die knappe Nahrung gesunden Zellen zu überlassen, anstatt sie für geschädigte oder alte Zellen zu verschwenden, die kaum noch in der Lage sind zu proliferieren. Alte oder geschädigte Zellen opfern sich in einem altruistischen Todesprozess für die klonale Population.

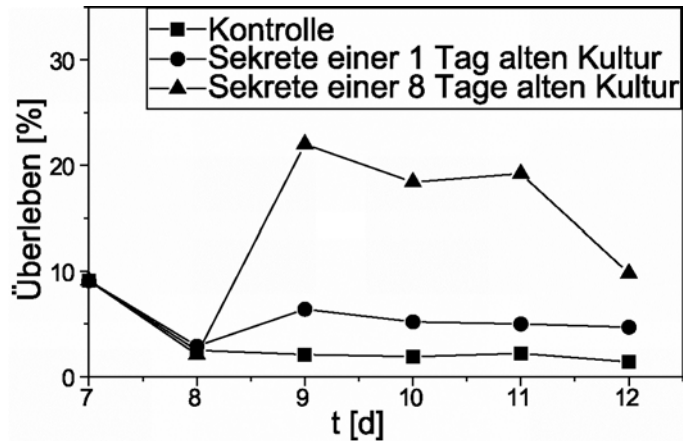
## **III.2 Sterbende Hefezellen sezernieren überlebensfördernde Substanzen**

V.D. Longo konnte zeigen, dass Hefen ohne Nahrungsressourcen quasi unsterblich sind (Longo et al., 1997). Kultiviert man sie dagegen in Minimalmedium, so kommt es sehr schnell zu einem Absterben der meisten Zellen einer Kultur. Fehlt die Nahrung komplett (wie in Wasser), gibt es keine Gründe für einen altruistischen Tod der Hefen. Gibt es jedoch ein knappes Nahrungsangebot erscheint es sinnvoll, dass dieses den fittesten Zellen zugute kommt, diese also überleben. Um zu erforschen, ob dieses Sterben nur die knappen Nahrungsressourcen schont, oder ob alte Hefezellen aktiv Substanzen in das umgebende Medium abgeben, wurden alte Kulturen auf bidestilliertes Wasser umgesetzt. Nach einer dreitägigen Inkubation wurden die Sekrete der Zellen isoliert (II.9.8), analysiert und auf ihre Wirkung auf andere Hefezellen hin untersucht.

### **III.2.1 Sekrete von älteren Kulturen zeigen einen überlebensfördernden Effekt auf andere alte Kulturen**

Der Überstand von gealterten auf bidestilliertes Wasser umgesetzten Kulturen besteht zum Großteil aus niedermolekularen Verbindungen. Proteine konnten in der HPLC-MS nicht nachgewiesen werden. Die gewonnenen Sekrete unterscheiden sich sowohl im Aussehen (hellgelb) als auch im Geruch (aromatisch) von gekauftem oder selbst hergestelltem Hefeextrakt. Sie scheinen deshalb nicht das Ergebnis einer einfachen Zelllyse zu sein. Um die Effekte dieser Sekrete auf andere Hefen zu untersuchen, wurden sie zu Zellen in unterschiedlichen Wachstumsphasen gegeben und der Anteil lebender Zellen in der Überlebensplattierung bestimmt. Die Zugabe der Sekrete zu exponentiell wachsenden Hefen ergab keine Veränderung der Überlebensrate im Vergleich zu den Kontrollen (nicht gezeigt). Die Zugabe von Sekreten acht Tage alter Kulturen zu sieben Tagen gealterten Kulturen steigert die Überlebensrate um das

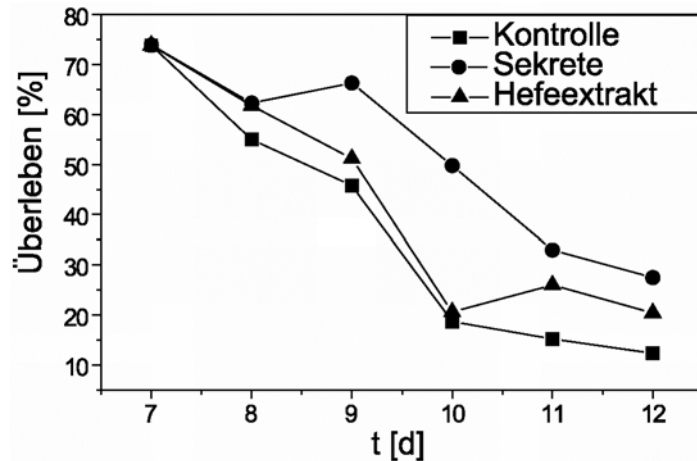
Achtfache (Abb. 19). Sekrete von jüngeren, z.B. einen Tag gewachsener Kulturen zeigen nicht so starke überlebensfördernde Effekte (Abb. 19).



**Abb. 19: Sekrete von alten Kulturen fördern das Überleben anderer alter Zellen.**

Das Überleben von Wildtyp-Hefen (S288C) nach Zugabe von Sekreten 1 bzw. 8 Tage alter Kulturen (Endkonz.: 2 mg Trockensubstanz/ml, Zugabe an Tag 7 und Tag 11) und der Kontrollkultur wurde durch Überlebensplattierung bestimmt.

Versetzt man alternde Kulturen mit Hefeextrakt aus ganzen Zellen (Rohextrakt, Herstellung siehe II.9.1.2), so zeigt sich durch den Fütterungseffekt ein leicht verbessertes Überleben, welches aber deutlich unter der Steigerung durch die Sekrete liegt (Abb. 20). Auffallend ist, dass das Überleben nach einer Zugabe nur deutlich ansteigt, wenn die Kulturen vorher eine sehr niedrige Überlebensrate (am besten unter 10 %) hatten. Obwohl die Kinetik des Sterbens im chronologischen Altern in jedem Experiment variiert, sind die Effekte relativ zueinander gut reproduzierbar.



**Abb. 20: Die Zugabe von Hefeextrakt hat kaum Effekt auf das Überleben.**

Das Überleben von Wildtyp-Hefen (S288C) nach Zugabe von Sekreten 8 Tage alter Kulturen und Heferohextrakt (Endkonz.: 2 mg Trockensubstanz/ml, Zugabe an Tag 7 und Tag 11) und der Kontrollkultur wurde durch Überlebensplattierung bestimmt.

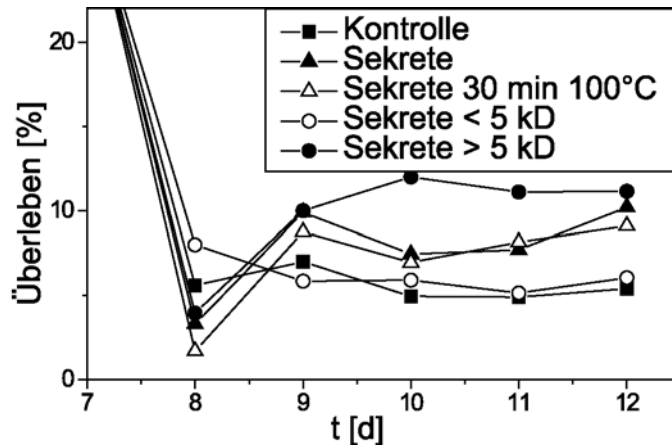
### **III.2.2 Die aktive Substanz der Sekrete ist hitzestabil und hat ein MW > 5 kD**

Um die Sekrete näher zu charakterisieren, wurden sie auf ihre Hitzestabilität und die molekulare Größe der aktiven Substanzen hin untersucht.

Um die Sekrete anhand des Molekulargewichts in unterschiedliche Fraktionen zu teilen, wurden ‚*Molecular weight cut off filter*‘ mit einem Ausschlussvolumen von 5 kD verwendet (Millipore). 200 µl der Sekretlösung (200 mg/ml) wurden durch Zentrifugation bei 2500 g aufgetrennt und anschließend wurde sowohl der Überstand als auch das Zentrifugat auf 200 µl aufgefüllt. 100 µl dieser Lösungen wurden für die Zugabeversuche verwendet. Die Kontrollsekrete wurden wie in den vorherigen Versuchen mit einer Enkonzentration von 2 mg/ml eingesetzt (100 µl der 200 mg/ml Sekretlösung).

Wie in Abb. 21 zu erkennen ist, zeigt die Erwärmung der Sekrete auf 100 °C für 30 Minuten keinen Effekt auf die Überlebensrate im Vergleich zu der Zugabe nicht erhitzter Kontrollsekrete. Trennt man die Sekrete nach ihrer Größe, so zeigt sich, dass die aktive Substanz größer als 5 kD ist. Bei der Zugabe der Fraktion mit den kleineren Molekülen (< 5 kD) liegt das Überleben im Bereich der Kontrolle ohne Zugabe (Abb. 21). Die Zugabe der Substanzen mit einem Molekulargewicht

größer als 5 kD hat sogar einen stärkeren überlebensfördernden Effekt als die nicht aufgetrennte Kontrollzugabe (Abb. 21).



**Abb. 21: Die aktive Substanz der Sekrete ist hitzestabil und hat ein MW > 5 kD.**

30 min auf 100 °C erhitzte und aufgrund ihrer Größe in der Ultrafiltration getrennte Sekrete wurden zu sieben Tagen gealterten Hefen gegeben und die Überlebensrate in den folgenden Tagen bestimmt (100 % ist die Anzahl der plattierten Zellen).

### III.2.3 Diskussion

Alternde Hefen sezernieren Substanzen, die bei anderen alten Zellen eine lebensverlängernde Wirkung zeigen. Dieser Effekt kann teilweise auf einen Fütterungseffekt zurückgeführt werden. Es könnte sein, dass die sezernierten Substanzen für die anderen Hefen leichter aus dem Medium aufnehmbar sind als die Inhaltsstoffe von Hefeextrakt aus ganzen Zellen. Für Bakterienkulturen wurde schon ein Phänomen namens ‚*GASPing*‘ beschrieben, bei dem sich Bakterien unter Nahrungsmangel von ihren toten Verwandten ernähren (Zambrano und Kolter, 1996). Die Tatsache aber, dass Sekrete von älteren Kulturen einen stärkeren Einfluss haben als die von jungen, deutet auf zusätzliche überlebenssteigernde Mechanismen hin. Hefen sind in verschiedenen Szenarien wie Mating oder Sporulation in der Lage, durch die Sekretion von Substanzen einen Einfluss auf andere Zellen zu nehmen (Jakubowski und Goldman, 1988). Daher wäre es denkbar, dass alternde Hefen Substanzen sezernieren, die das Überleben von anderen, evtl. replikativ jüngeren Zellen verbessern, also ein Überlebenssignal darstellen.

### **III.3 Apoptotisches Sterben während des chronologischen Alterns stellt einen Selektionsvorteil für die Kultur dar**

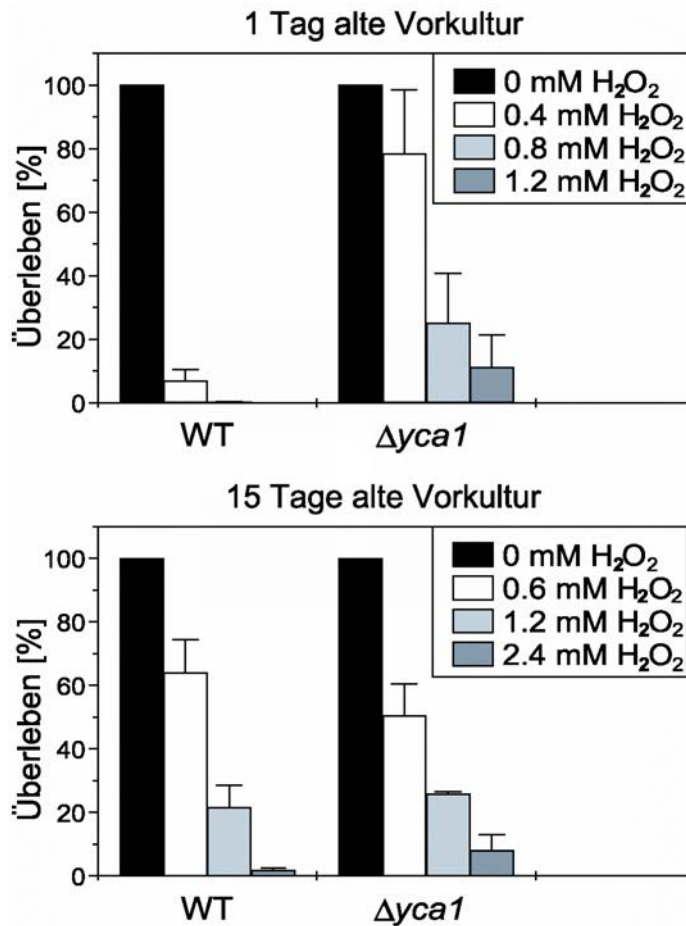
Die Deletion der Hefecaspase *YCA1* erhöht die Resistenz gegenüber oxidativem Stress wie Wasserstoffperoxid (Madeo et al., 2002) und verlängert das Überleben im chronologischen Altern. Somit sollte die Deletion der Caspase einen Selektionsvorteil für die Mutanten darstellen. Da es unwahrscheinlich ist, dass sich ein apoptotisches Programm im Einzeller Hefe während der Evolution erhalten hat, wenn dieses einen Selektionsnachteil birgt, sollte untersucht werden, ob durch mimikrieren ökologischer Bedingungen Zellen auf lange Sicht im Vorteil sind, die ein funktionierendes apoptotisches Programm besitzen.

#### **III.3.1 Gealterte *YCA1* Deletionsmutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp keine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress**

Die erhöhte Überlebensrate von *YCA1* Deletionsmutanten gegenüber dem Wildtyp bei oxidativem Stress ist ein entscheidender Vorteil der Mutanten. Es sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auch mit gealterten Stämmen noch vorhanden ist.

Versetzt man exponentiell wachsende Wildtyp-Hefen mit geringen Konzentrationen Wasserstoffperoxid sterben die Zellen mit einem apoptotischen Phänotyp (Madeo et al., 1999). Die Störung des apoptotischen Programms durch Deletion der Hefecaspase *YCA1* erhöht die Überlebensrate deutlich (Abb. 22; Madeo et al., 2002). Bei höheren Wasserstoffperoxid Konzentrationen (1,2 mM) sterben beide Stämme nekrotisch, es gibt keine Überlebenden mehr (Abb. 22).





**Abb. 22: YCA1 Deletionsmutanten zeigen höhere Überlebensraten unter apoptotischen Bedingungen, gealterte Deletionsmutanten verlieren diesen Überlebensvorteil.**

*Δyca1* und isogene Wildtyp Stämme wurden in der exponentiellen Wachstumsphase mit verschiedenen Konzentrationen Wasserstoffperoxid versetzt und die Überlebensraten durch Plattierungen bestimmt (100 % ist die Anzahl überlebender Zellen der Kontrolle).

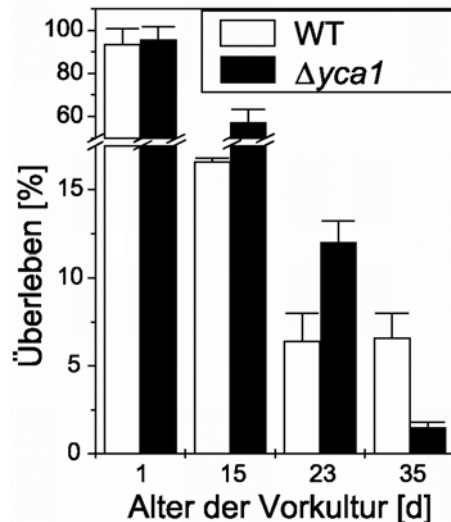
Verwendet man gealterte Vorkulturen für dieses Experiment, so zeigt sich ein anderes Bild. Hier zeigen Wildtyp und YCA1 Deletionsmutanten die gleichen Überlebensraten (Abb. 22). Wegen der größeren Toleranz alter Zellen gegenüber oxidativem Stress (siehe auch III.1.2.2) mussten leicht erhöhte Mengen Wasserstoffperoxid verwendet werden, um ein Sterben zu induzieren.

Gealterte YCA1 Mutanten verlieren somit ihren Überlebensvorteil gegenüber oxidativem Stress.

### III.3.2 Deletion von YCA1 verschlechtert adaptives Wachstum

In ihrer normalen Umgebung müssen sich Hefezellen ständig auf unterschiedliche Umweltbedingungen einstellen, was sowohl fehlende als auch im Überfluss vorhandene Nahrungsquellen einschließt. Ist eine Nahrungsquelle verbraucht, stellt sich die Hefezelle auf eine Hungerphase ein, der Zellzyklus arretiert (Fabrizio

und Longo, 2003). Aber gleichzeitig muss die Zelle sehr schnell in der Lage sein bei neuem Nahrungsangebot wieder zu proliferieren. Diese Situation sollte unter experimentellen Bedingungen nachgestellt und das Verhalten von *YCA1* Deletionsmutanten untersucht werden.



**Abb. 23: Deletion der Hefecaspase verhindert adaptives Wachstum.**

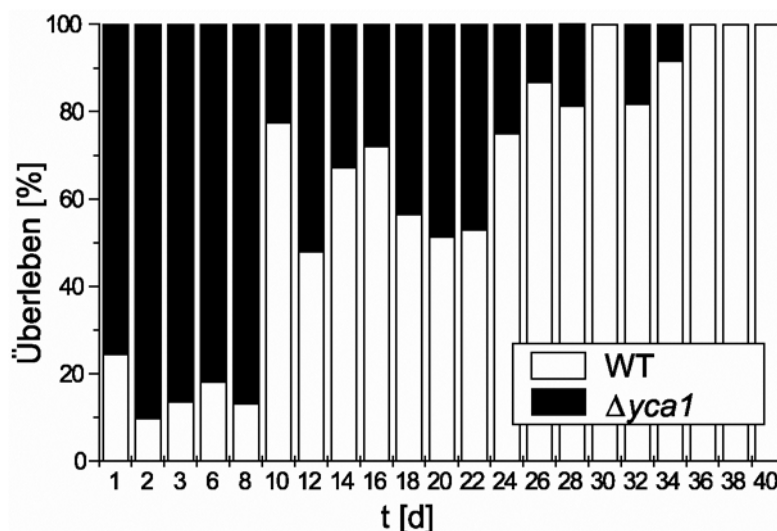
Das Überleben in Abhängigkeit vom Alter der Vorkultur von  $\Delta yca1$  Mutanten und dem isogenem Wildtyp BY4741 wurde 6 h nach dem Animpfen mittels Überlebensplattierung bestimmt (100 % ist die Anzahl der plattierten Zellen).

Chronologisch alternde Wildtyp und  $\Delta yca1$  Stämme wurden zu verschiedenen Alterungszeitpunkten in frisches Medium überführt und das Überleben nach einer Erholungsphase und dem Erreichen der frühen exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Sieht man sich das Überleben von Kulturen an, die mit frischen Vorkulturen beimpft wurden, so zeigen beide Stämme gleiches Überleben. Bei Vorkulturen aus der frühen Phase des chronologischen Alterns hat die *YCA1* Deletionsmutante einen Überlebensvorteil: Bei 15 Tage alten Vorkulturen überleben von der angewachsenen Wildtyp Kultur 17 %, bei der Mutante 57 %, nach 23 Tagen sind es 6,5 % zu 12 % (Abb. 23). Sind die Vorkulturen aber sehr alt, beispielsweise 35 Tage, so sieht man, dass der Wildtyp nach Neuanimpfung in etwa ein konstantes Überleben bei 7 % zeigt, die *YCA1* Deletionsmutante aber nur noch 1 % lebensfähige Zellen aufweist (Abb. 23). Gealterte Mutanten sind offensichtlich nicht in der Lage, sich an die neue Umgebung mit frischen Nährstoffen anzupassen. Das adaptive Wachstum ist gestört. Daraus kann man schließen, dass sich die Yca1p vermittelte Apoptose entwickelt haben könnte, um Zellen, die

sich nicht mehr optimal anpassen können, zu eliminieren. Dies könnte z.B. replikativ alte oder auch schon geschädigte Zellen betreffen. Der apoptotische Prozess gewährleistet, dass nur die fittesten und anpassungsfähigen Zellen überleben.

### III.3.3 Wildtyp-Hefen überleben YCA1 Deletionsmutanten

Will man untersuchen, ob sich eine genetische Veränderung der Hefe als evolutionär dominant erweist, so kann man zwei Hefestämme in einem kompetitiven Ansatz miteinander kultivieren, und untersuchen welcher Stamm sich durchsetzt (II.8.2).



**Abb. 24: Wildtyp Hefen erweisen sich in einem kompetitiven Überlebensassay als lebensfähiger als YCA1 Deletionsmutanten.**

Je  $1 \times 10^8$  Zellen von  $\Delta yca1$  und dem isogenen Wildtyp wurden in einer Kultur gemischt und das Überleben beider Stämme während des Alterns untersucht (100 % ist die Anzahl insgesamt überlebender Zellen). Dieses Experiment wurde vier Mal durchgeführt, ein repräsentativer Versuch ist in der Abbildung dargestellt.

YCA1 Deletionsmutanten und der isogene Wildtyp wurden in so einem kompetitiven Test untersucht. Bei jedem der Einzelversuche zeigte sich zunächst, dass die Deletionsmutanten den Wildtyp überwachsen und ein deutlich besseres Überleben zeigen (Abb. 24). Verfolgt man diesen Ansatz während des

chronologischen Alterns, so überlebt der Wildtyp die Deletionsmutante (Abb. 24). Nach 36 Tagen finden sich fast nur noch lebensfähige Wildtypzellen in der Kultur. Die Deletion der Hefecaspase bewirkt einen entscheidenden Selektionsnachteil in diesem Mikroevolutionsversuch.

### **III.3.4 Diskussion**

Verhindert man den apoptotischen Tod im chronologischen Altern, führt dies zu einem Selektionsnachteil für den Stamm. Durch Deletion der Hefecaspase *YCA1* kann das apoptotische Programm effektiv gestört werden, und die Deletionsmutanten haben gegenüber oxidativem, Alterungs- und Salzstress einen Vorteil verglichen mit dem Wildtyp. Bei stark gealterten Kulturen verlieren aber Deletionsmutanten ihren Überlebensvorteil gegenüber oxidativem Stress. Außerdem können unter Hungerbedingungen gealterte *YCA1* Deletionsmutanten in neuem Medium nicht mehr so gut proliferieren wie der Wildtyp und der Wildtyp überlebt in einem kompetitiven Überlebensassay die Mutanten, scheint also bei einem direkten Vergleich einen Selektionsvorteil zu haben.

Für eine monoklonale Einzellerkultur ist es evolutionär sinnvoll, knappe Nahrungsressourcen optimal zu nutzen, geschädigte Zellen zu eliminieren, so dass wenige, aber gesunde und anpassungsfähige Zellen überleben.

Das apoptotische Programm scheint eine wichtige Funktion für den Einzeller zu haben, so dass nur die Zellen überleben und die knappen Nahrungsressourcen nutzen, die sich noch optimal an neue Umweltbedingungen anpassen können und nicht etwa replikativ alte oder geschädigte Zellen.

Inzwischen wurden diese Ergebnisse durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt: Stämme, die in der stationären Phase früh sterben, haben eine deutlich verbesserte Überlebenschance im adaptivem Wachstum, sie adaptieren sich gut an ihre Umweltbedingungen. Dagegen haben in der stationären Phase gut überlebende Stämme, wie der Überexprimierer des antiapoptotischen Proteins Bcl-2, einen Selektionsnachteil (Fabrizio et al., 2004).

### **III.4 mRNA Stabilität und Apoptose in Hefe**

Ein Regulationsweg humaner apoptotischer Prozesse ist die mRNA Stabilität. Wir konnten zeigen, dass es auch in der Hefe einen Zusammenhang zwischen mRNA *turnover* und Apoptose gibt (Mazzoni et al., 2003). Eine trunkierte Form des *Kluyveromyces lactis* Gens *LSM4* (*Klism4Δ1*) kann die lebensnotwendigen Funktionen des essentiellen *Saccharomyces cerevisiae* Gens *LSM4* komplementieren (Mazzoni und Falcone, 2001).

*LSM4* ist ein essentielles Gen, das sowohl beim pre-mRNA *splicing* als auch beim mRNA *decapping* involviert ist. Die von Archebakterien bis zum Menschen hochkonservierten Lsm Proteine gehören zu Gruppe der ‚*Small nuclear ribonucleoproteins*‘. Sie besitzen eine N-terminale Sm-Domäne, die aus 70 bis 80 Aminosäuren besteht, und einen variablen C-Terminus. Lsm4p hat zwei unterschiedliche Funktionen im mRNA Stoffwechsel in der Zelle: *splicing* und *decapping*. Mazzoni et al. konnten zeigen, dass Hefestämme, die anstelle des vollständigen Lsm4p nur die Sm-Domäne enthaltenden ersten 72 Aminosäuren von *Klism4p* exprimieren, zwar lebensfähig sind, aber eine Störung im mRNA Abbau haben und in der stationären Phase mit apoptotischem Phänotyp sterben (Mazzoni et al., 2003).

Im Weiteren sollte in Zusammenarbeit mit Cristina Mazzoni der Mechanismus der durch mRNA Stabilisierung ausgelösten Apoptose untersucht werden.

#### **III.4.1 mRNA Stoffwechselstörungen lösen Yca1p vermittelte Apoptose aus**

##### **III.4.1.1 YCA1 Deletion verbessert das Überleben von *Klism4Δ1* Mutanten in der stationären Phase und verhindert DNA Fragmentierung**

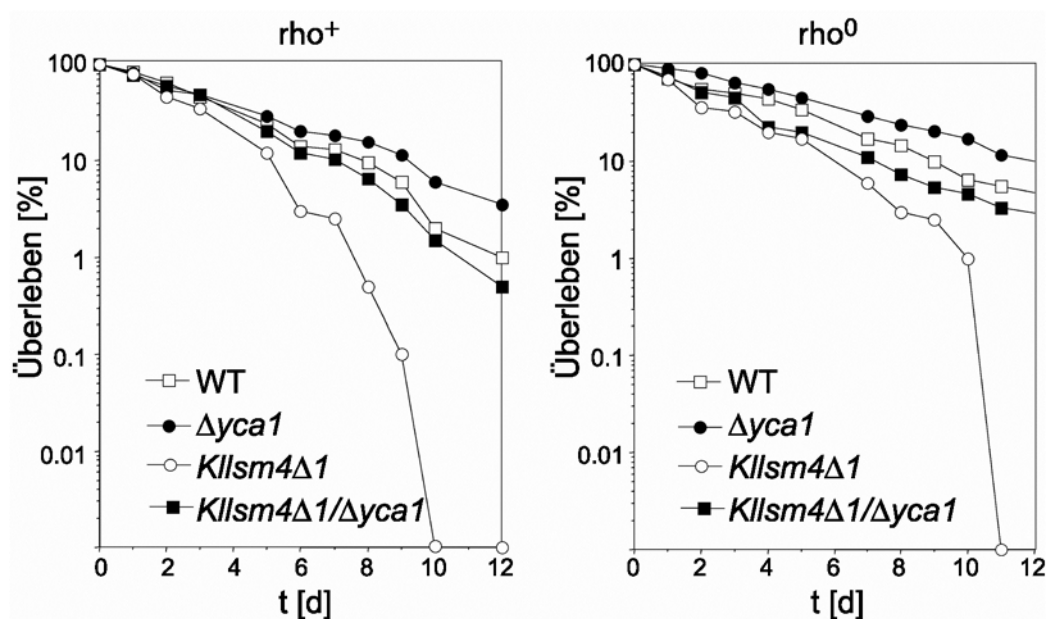
Da die Hefecaspase Yca1p in einer Vielzahl apoptotischer Prozesse als Regulator fungiert, wurde das Überleben von *Klism4Δ1/Δyca1* Doppelmutanten in der stationären Phase auf Vollmedium untersucht.

Die Überlebenskurve von *Klism4Δ1* Mutanten zeigt einen deutlichen Abfall verglichen mit der Wildtyp Kontrolle (Abb. 25). Ist gleichzeitig das Gen der

Hefecaspase *YCA1* deletiert, so gleicht die Überlebenskurve der der Wildtyp Kulturen (Abb. 25). Ebenso ist in Abb. 25 zu erkennen, dass die Deletion der Caspase im Wildtyp zu einem besseren Überleben in der stationären Phase führt (vgl. III.1.3.2).

Mitochondrien gelten als zentrale Organellen im apoptotischen Geschehen sowohl in Säugerzellen als auch in der Hefe. Um die Abhängigkeit der durch mRNA Stabilisierung ausgelösten Apoptose von mitochondrialen Prozessen zu untersuchen wurden von allen Stämmen  $\rho^0$  Mutanten erzeugt. In Abb. 25 ist zu erkennen, dass das fehlende mitochondriale Genom den Todesprozess in der stationären Phase verlangsamt, die Stämme sich untereinander aber ähnlich wie bei  $\rho^+$  Mutanten verhalten.

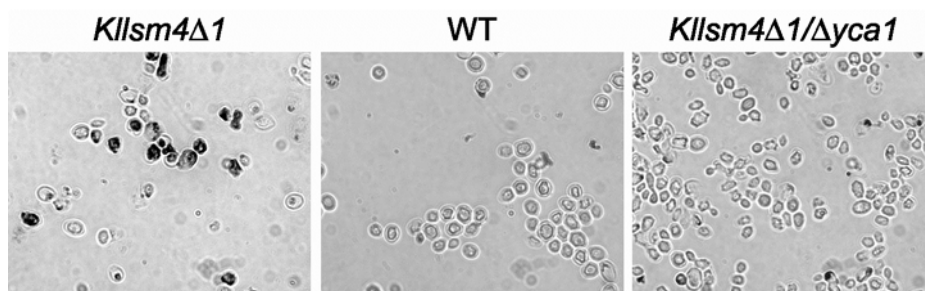
Mitochondriale Prozesse scheinen also beim chronologischen Altern generell eine Rolle zu spielen, jedoch nicht bei spezifisch durch mRNA Stabilisierung ausgelösten und Yca1p vermittelten apoptotischen Signalwegen mitzuwirken.



**Abb. 25: Die Deletion von *YCA1* verhindert das Sterben von *Kllsm4Δ1* Mutanten in der stationären Phase.**

Überlebenskurve von Wildtyp,  $\Delta yca1$ , *Kllsm4Δ1* und *Kllsm4Δ1/Δyca1* während des stationären Phase in YPD Medium in  $\rho^+$  und  $\rho^0$  Hefen (von Cristina Mazzoni).

Ein apoptotischer Phänotyp, der durch Lsm4p Mutation in der stationären Phase ausgelöst wird, ist die Fragmentierung der DNA, hier durch einen TUNEL Test visualisiert (Abb. 26; Mazzoni). Nach neun Tagen chronologischen Alterns in Vollmedium weisen 70 % der Mutanten eine DNA Fragmentierung auf (Abb. 26), was anhand der tiefschwarzen Färbung der Zellkerne sichtbar ist. Dagegen zeigt der Wildtyp noch keine morphologische Färbung. Die Deletion der Hefecaspase *YCA1* verhindert die DNA Fragmentierung (Abb. 26).



**Abb. 26: Die Deletion von *YCA1* verhindert DNA Fragmentierung von *Kllsm4Δ1* Mutanten in der stationären Phase.**

TUNEL Test von neun Tagen gealterten Wildtyp, *Kllsm4Δ1* und *Kllsm4Δ1/Δyca1* Stämmen. Balken 5  $\mu$ m.

Damit ist sowohl das Sterben von Lsm4p Mutanten als auch der apoptotische Phänotyp abhängig von Yca1p.

#### **III.4.1.2 *Kllsm4Δ1/Δyca1* zeigen wie die *Kllsm4Δ1* Mutanten erhöhte mRNA Stabilität**

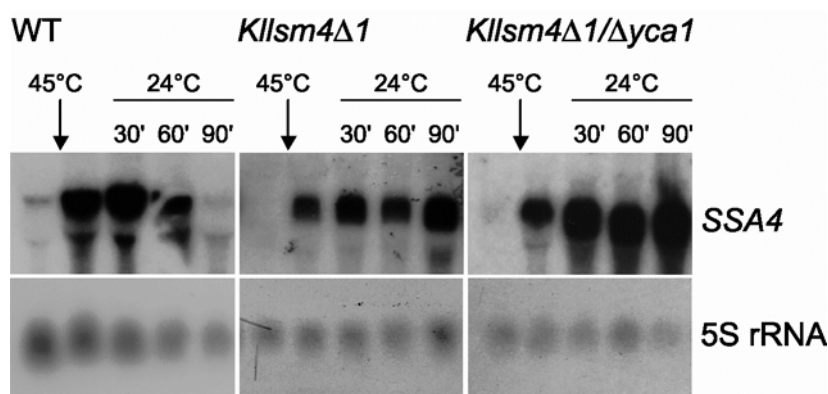
Wie von uns gezeigt wurde, bewirkt die Expression der trunkierten Form von *KILSM4* eine erhöhte Stabilisierung der mRNA, die zu einem Yca1p vermittelten apoptotischen Tod in der stationären Phase führt.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Deletion von *YCA1* einen Einfluss auf die mRNA Veränderungen hat. Dazu wurde die Expression des *heat shock* Proteins *SSA4* durch Hitzeschock induziert und nach einer Inkubation bei 24 °C, bei der *SSA4* nicht induziert ist, die Menge an *SSA4* mRNA mittels Northern Hybridisierung quantifiziert. *SSA4* eignet sich für die Untersuchung von mRNA

Stabilität besonders, da seine Expression durch Hitzeschock gut induziert werden kann und die *SSA4* mRNA relativ schnell abgebaut wird.

Bei Wildtyp Hefen ist die Konzentration von *SSA4* mRNA nach ca. 90 Minuten wieder auf dem normalen Niveau (Abb. 27). *Klism4Δ1* Mutanten zeigen eine erhöhte mRNA Stabilität. Hier ist die Konzentration der *SSA4* mRNA noch nach 90 Minuten auf dem gleichen Level wie 30 Minuten nach dem Hitzeschock (Abb. 27). Die zusätzliche Deletion von *YCA1* verringert die extreme mRNA Stabilität nicht. *Klism4Δ1/Δyca1* Doppelmutanten zeigen eher eine nochmals erhöhte Stabilisierung der mRNA von *SSA4* (Abb. 27).

Die Deletion von *YCA1* verhindert somit den apoptotischen Zelltod von *Klism4Δ1* Mutanten, ohne einen Einfluss auf den durch die *Lsm4p* Mutation ausgelösten mRNA Phänotyp zu haben. Im apoptotischen Geschehen liegt die Hefecaspase *Yca1p* also *downstream* der mRNA Stoffwechselstörung



**Abb. 27: Die Deletion von *YCA1* verhindert die durch *LSM4* Mutation ausgelöste mRNA Stabilisierung nicht.**

Northern Hybridisierung mit *SSA4* und *5S rRNA* Sonden (Kontrolle) von Gesamt mRNA Präparationen von Wildtyp, *Klism4Δ1* und *Klism4Δ1/Δyca1* Zellen. Die Expression von *SSA4* wurde durch 15 min bei 45 °C induziert, anschließend erfolgte eine Inkubation bei 24 °C für 30, 60 und 90 min (von Cristina Mazzoni).

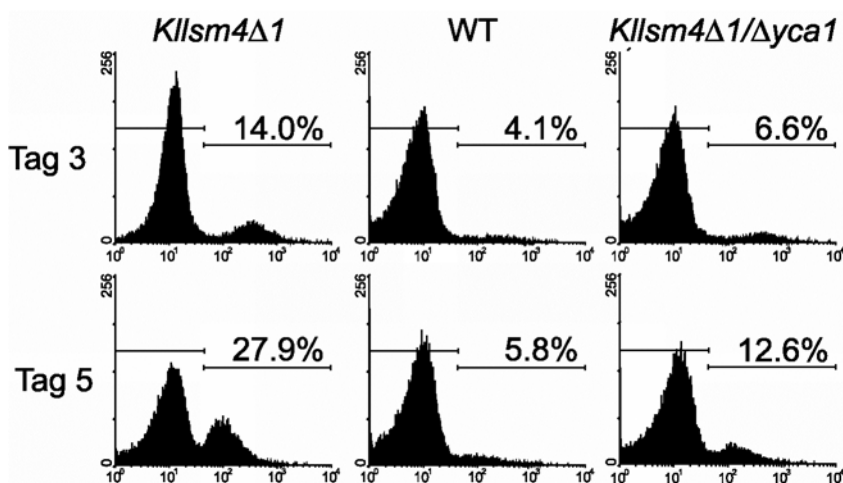


### III.4.1.3 *Kllsm4Δ1* Mutanten zeigen Caspase Aktivität

Da eine Störung der mRNA Stabilität in *Kllsm4Δ1* Mutanten zu apoptotischem Sterben führt, welches abhängig von der Hefecaspase Yca1p ist, wurden *Kllsm4Δ1* Mutanten in der stationären Phase auf eine Aktivierung von Caspasen untersucht.

Nach drei Tagen in der stationären Phase zeigt sich bei den *Kllsm4Δ1* Mutanten eine leichte Erhöhung der Caspase Aktivität im FITC-VAD-fmk FACS Assay. In 14 % der Mutantenzellen konnte eine Caspaseaktivität gemessen werden (Abb. 28). Dieser Anteil steigt nach fünf Tagen auf 28 %, während der Wildtyp zu diesen Zeitpunkten nur eine Hintergrundfluoreszenz von ca. 5 % aufweist. Die Deletion der Hefecaspase Yca1p in den *Kllsm4Δ1* Mutanten senkt die Caspase Aktivität fast auf Wildtypniveau (6,6 % an Tag drei, 12,6 % an Tag fünf, Abb. 28).

Bei der durch mRNA Stabilisierung ausgelösten Apoptose kommt es zu einer Yca1p abhängigen Aktivierung von Caspasen.



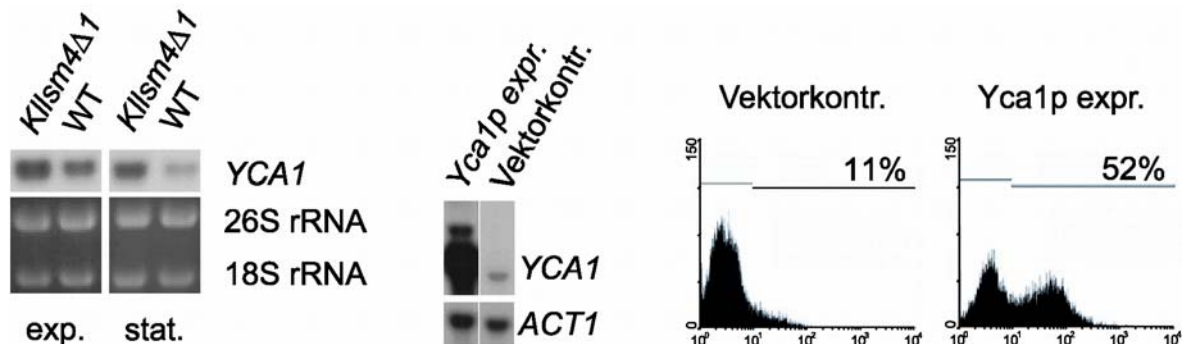
**Abb. 28:** In *Kllsm4Δ1* Mutanten kommt es im chronologischen Altern zu einer Yca1p abhängigen Caspaseaktivität.

FACS Assay von Wildtyp, *Kllsm4Δ1* und *Kllsm4Δ1/Δyca1* nach 3 und 5 Tagen in der stationären Phase.

### III.4.1.4 *Kllsm4Δ1* Mutation führt zu einer Erhöhung der *YCA1* mRNA

Caspasen können sich durch Autokatalyse selbst prozessieren und damit aktivieren, wenn sie in hoher Konzentration vorliegen. Da die trunkierte Form von Lsm4p eine Akkumulation der mRNA auslöst, könnte dies eine Möglichkeit der Aktivierung von Yca1p sein.

Es wurde eine Northern Hybridisierung von *Kllsm4Δ1* und Wildtyp mRNA aus Zellen in der exponentiellen und stationären Phase durchgeführt, um die Menge an *YCA1* mRNA zu bestimmen. Die *YCA1* mRNA ist in der *Kllsm4Δ1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase erhöht (Abb. 29, links). Der Unterschied ist in der stationären Phase stärker ausgeprägt. Eine Autokatalyse von Yca1p erscheint dennoch unwahrscheinlich da im Vergleich zu exponentiell wachsenden Zellen die Gesamtmenge der *YCA1* mRNA keine starke Akkumulation zeigt.



**Abb. 29: Expressionslevel von Yca1.**

Northern Hybridisierung von *Kllsm4Δ1* und Wildtyp mRNA in der exponentiellen und stationären Phase (rechts) und Yca1p Expression und Vektorkontrollstämmen (mitte) mit *YCA1* Sonden und FACS Analyse von Yca1p Überexpressionsstämmen und Vektorkontrollen (links).

Zum Vergleich wurde ein Northernblot mit Yca1p Überexpressionsstämmen durchgeführt (Abb. 29, mitte). Dieser macht deutlich, dass unter Bedingungen, bei denen 50 % der Zellen durch Yca1p Expression sterben und Caspase Aktivität zeigen (Abb. 29, rechts), die Menge an *YCA1* mRNA deutlich über der in der *Kllsm4Δ1* Mutante liegt. Eine Autoaktivierung von Yca1p durch Akkumulation der *YCA1* mRNA in der *Kllsm4Δ1* Mutante erscheint dadurch unwahrscheinlich.

### III.4.2 mRNA decapping Deletionsmutanten sterben apoptotisch

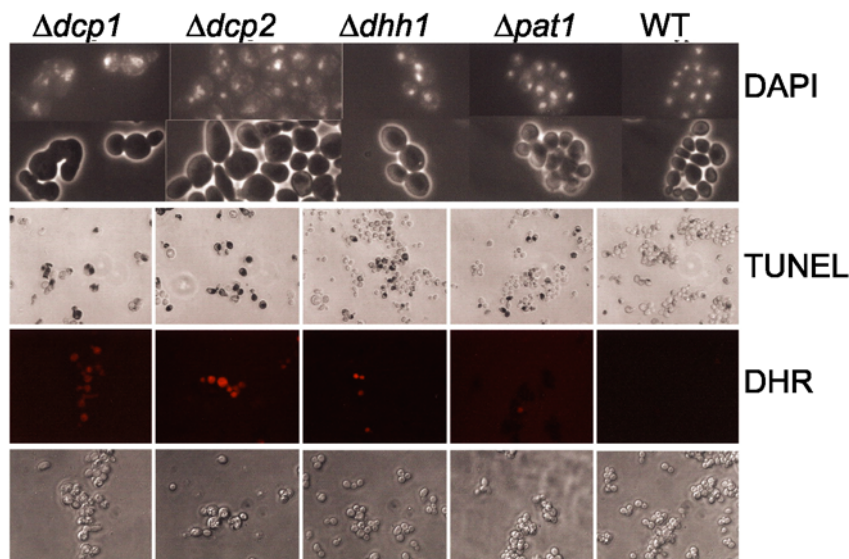
Da Lsm4p sowohl beim mRNA *decapping* als auch beim *splicing* involviert ist, wurden Deletionsmutanten von Proteinen, die mit Lsm4p beim mRNA *decapping* interagieren, auf einen apoptotischen Phänotyp hin untersucht.

Die Deletionsmutanten von *DCP1* und *DCP2* (zwei Untereinheiten des *decapping* Holoenzym), *DHH1* und *PAT1* (interagieren beim *decapping* mit dem Lsm1p-7p Komplex) wurden auf DNA Strangbrüche, Chromatinkondensation und ROS Akkumulation hin untersucht. Dazu wurden die vier Stämme in der exponentiellen Wachstumsphase TUNEL, DAPI und DHR gefärbt.

$\Delta dcp1$  und  $\Delta dcp2$  Mutanten weisen starke DNA Schädigungen auf. Die TUNEL Färbung zeigt in fast allen Zellen schwarze Zellkerne, in denen die DNA fragmentiert ist (Abb. 30). Die  $\Delta dhh1$  und  $\Delta pat1$  Mutanten weisen nur in etwa 50 % der Zellen DNA Strangbrüche auf, in dem Kontrollwildtyp sind alle Zellen ungefärbt (Abb. 30). In der DAPI Färbung kann man in den beiden *DCP* Mutanten fragmentierte Zellkerne erkennen (Abb. 30, oben). Außerdem sind die Zellen im Phasenkontrast ungewöhnlich groß und deformiert (Abb. 30, oben). Die Zellen vom Wildtyp und den  $\Delta dhh1$  und  $\Delta pat1$  Mutanten zeigen normal runde Zellkerne (Abb. 30).

$\Delta dcp2$  Mutanten zeigen in der DHR Färbung eine starke Akkumulation von ROS, fast alle Zellen sind intensiv rot gefärbt (Abb. 30). In den  $\Delta dcp1$  Mutante sind auch fast alle Zellen gefärbt, jedoch in einer schwächeren Intensität.  $\Delta dhh1$  und  $\Delta pat1$  Stämme sowie der Wildtyp akkumulieren kaum ROS (Abb. 30).

Mutationen, die eine Akkumulation von mRNA durch defektes *decapping* bewirken, führen zu einem apoptotischen Tod der Zellen, wobei die Nullmutanten der beiden *decapping* Enzyme  $\Delta dcp1$  und  $\Delta dcp2$  den stärksten apoptotischen Phänotyp zeigen.



**Abb. 30: mRNA *decapping* Deletionsmutanten zeigen einen apoptotischen Phänotyp.**

Zellen von Wildtyp,  $\Delta dcp1$ ,  $\Delta dcp2$ ,  $\Delta dhh1$  und  $\Delta pat1$  Stämmen wurden nach 4 h auf Vollmedium TUNEL, DAPI und DHR gefärbt.

### III.4.3 Diskussion

In der stationären Phase sterben *Klsm4 $\Delta$ 1* Mutanten mit einem apoptotischen Phänotyp (Mazzoni et al., 2003). Da Lsm Proteine sowohl beim *decapping* als auch beim mRNA *splicing* involviert sind, wurde durch die Untersuchung von weiteren *decapping* Mutanten bestätigt, dass ein *decapping* Defekt zu einem apoptotischen Phänotyp führt. Die zusätzliche Deletion von der Hefecaspase *YCA1* verhindert sowohl das Sterben als auch die Ausprägung der apoptotischen Marker. Die Veränderungen der mRNA Stabilität werden durch die zusätzliche Deletion von *YCA1* aber nicht beeinträchtigt. Die Doppelmutante ist also trotz eines gestörten mRNA Abbaus genauso lebensfähig wie der Wildtyp.

Das mitochondriale Genom scheint bei dem durch mRNA Stabilisierung ausgelösten Tod nicht beteiligt zu sein, da  $\rho^0$  Mutanten sich untereinander gleich verhalten wie  $\rho^+$  Stämme. Sie sterben aber insgesamt langsamer, d.h. mitochondrial codierte Proteine haben sehr wohl eine Rolle beim Zelltod in der stationären Phase.

*Klsm4 $\Delta$ 1* Mutanten zeigen eine erhöhte Caspaseaktivität in der stationären Phase, die auf Yca1p zurückzuführen ist, da die Doppelmutante keine

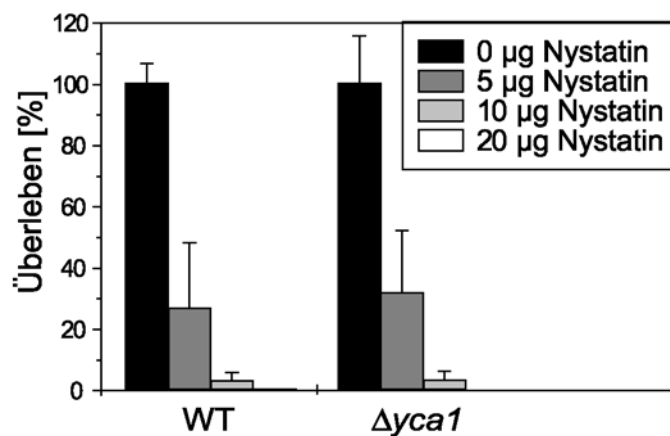
Caspaseaktivität zeigt. Die Akkumulation der *YCA1* mRNA durch *LSM4* Mutation scheint aber nicht der Grund für die erhöhte Caspase Aktivität zu sein; der Vergleich mit *Yca1p* Überexpressionsstämmen zeigt, dass die Erhöhung der *YCA1* mRNA nur sehr gering ausfällt. Es muss also noch eine unbekannte Verbindung zwischen mRNA Stabilisierung und Aktivierung von *Yca1p* geben. Trotzdem ist der Befund, dass eine Stabilisierung von mRNA in einem Caspase vermittelten Prozess Apoptose auslöst, die erste funktionelle Verknüpfung zwischen mRNA Stoffwechselstörungen und Apoptose.

### III.5 Mechanismen Yca1p vermittelter Apoptose

#### III.5.1 Nur unter apoptotischen Bedingungen ist der Zelltodmechanismus abhängig von Yca1p

Es konnte schon für verschieden Stresssituationen gezeigt werden, dass der apoptotische Zelltod abhängig von der Hefecaspase Yca1p ist (Wadskog et al., 2004; Madeo et al., 2002). Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die Deletion von *YCA1* auf das Überleben unter nekrotischen Bedingungen auswirkt.

Dazu wurden Wildtyp und  $\Delta yca1$  Mutanten mit dem Fungizid Nystatin, das Poren in der Zellmembran bildet, gestresst. Es gibt keine Differenz in den Überlebensraten der beiden Stämme (Abb. 22).



**Abb. 31: *YCA1* Deletionsmutanten zeigen bei nekrotischem Zelltod keine höhere Überlebensraten als der Wildtyp.**

$\Delta yca1$  und isogene Wildtyp Stämme wurden in der exponentiellen Wachstumsphase mit verschiedenen Konzentrationen Nystatin versetzt und die Überlebensraten durch Plattierungen bestimmt (100 % ist die Anzahl der plattierten Zellen).

In Zusammenarbeit mit Manfred Schmitt und Jochen Reiter konnte außerdem gezeigt werden, dass bei dem Zelltod ausgelöst durch Killertoxine sich die Deletion von *YCA1* nur überlebensfördernd auswirkt, wenn die Konzentrationen so niedrig sind, dass sich ein apoptotischer Phänotyp zeigt (Reiter et al., 2005). Bei nekrotischen Szenarien scheinen die Zellen derart in Mitleidenschaft gezogen zu werden, dass der aktive apoptotische Prozess nicht mehr eingeleitet werden kann.

Die Caspase Yca1p scheint nur bei proapoptotischen und nicht bei nekrotischen Todesszenarien aktiviert und zum Zelltod benötigt zu werden.

### **III.5.2 Ygl129cp – ein DAP3 Homologes reguliert den Yca1p vermittelten Zelltod**

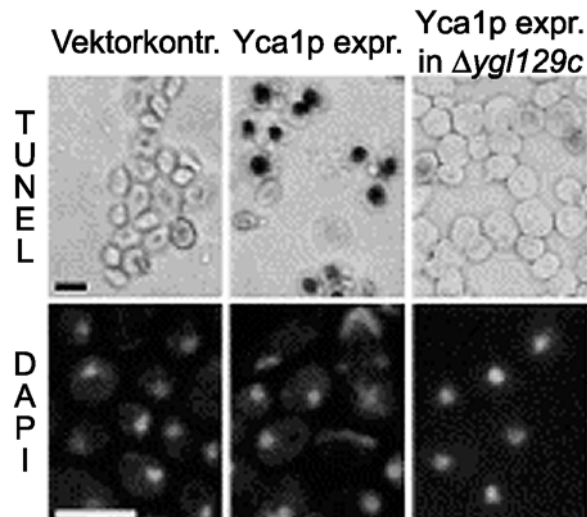
DAP3 (*death associated protein*) ist ein mitochondriales Protein, das erstmals als Apoptose assoziiertes Protein in Interferon-Gamma induzierter Apoptose beschrieben wurde (Kissil et al., 1995). Später konnte ein homologes Gen in Hefe identifiziert werden (*YGL129c*). Der Phänotyp der Deletionsmutante  $\Delta ygl129c$  ist durch den Verlust mitochondrialer DNA charakterisiert und kann durch die heterologe Expression des humanen Gens komplementiert werden (Berger et al., 2000).

Der durch die Überexpression der Hefecaspase Yca1p ausgelöste Zelltod konnte durch die Deletion von *YGL129c* (Madeo et al., 2002) verhindert werden. Im Folgenden wurde diese Inhibition des Zelltodes näher untersucht.

Eine Überexpression von Yca1p induziert in *S. cerevisiae* einen apoptotischen Zelltod. Um die Auswirkungen der Deletion von *YGL129c* auf die phänotypischen nukleären Marker der Apoptose nach deren Induktion durch Yca1p Überexpression zu untersuchen, wurden die entsprechenden Stämme TUNEL und DAPI gefärbt.

Die Expression der Hefecaspase Yca1p in Kombination mit einem zusätzlichen proapoptotischen Stimulus (0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) führt zu starker DNA Fragmentierung (Abb. 32, Maldener, 2004; Madeo et al., 2002), was durch die tiefschwarze Färbung der Zellkerne in der TUNEL Färbung deutlich wird. Unter den gleichen Bedingungen sind die Zellen der Vektorkontrolle TUNEL negativ (Abb. 32, Maldener, 2004; Madeo et al., 2002). Die Deletion des DAP3 Homologen *YGL129c* verhindert die Fragmentierung der DNA, die Zellkerne sind im TUNEL Assay nicht anfärbbar (Abb. 32). Auch die Kondensation des Chromatins wird durch die Deletion von *YGL129c* verhindert. In der DAPI Färbung gleichen die Chromatinstrukturen in ihrer runden Form eher denen der Vektorkontrolle als den

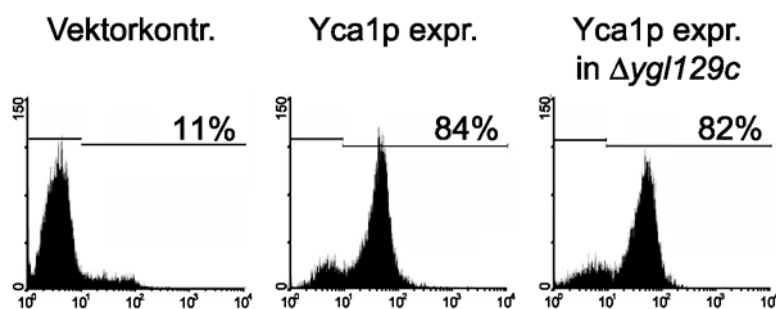
Kondensierten, z. T. auf Kernfragmentierung hindeutenden Strukturen des Yca1p Expressionsstammes.



**Abb. 32: Die Disruption von *YGL129c* verhindert den apoptotischen Phänotyp nach Expression von Yca1p.**

Yca1p Expressions- und Vektorkontrollen im Wildtyp und  $\Delta ygl129c$  Stammhintergrund wurden nach dem Umsetzen auf SCG mit 0,4 mM  $H_2O_2$  versetzt und nach 26 h wurden die Zellen TUNEL und DAPI gefärbt. Balken 10  $\mu m$ .

Um zu unterscheiden, ob Ygl129cp zur Aktivierung von Yca1p notwendig ist, oder das Todessignal *downstream* weiterleitet, wurde ein *in vivo* Caspase Aktivitätsassay durchgeführt. Als zusätzlicher proapoptotischer Stimulus wurde nach dem Umsetzen auf SCG-Medium 0,4 mM  $H_2O_2$  zugesetzt. Wie in Abb. 33 zu erkennen ist, stört die Disruption von *YGL129c* die Aktivierung der Caspase nicht. Der Prozentsatz an Zellen mit aktiven Caspasen ist mit 82 % fast gleich groß wie im Wildtyp Stammhintergrund mit 84 %.



**Abb. 33: Die Disruption von *YGL129c* hat keinen Einfluss auf die Caspaseaktivität.**

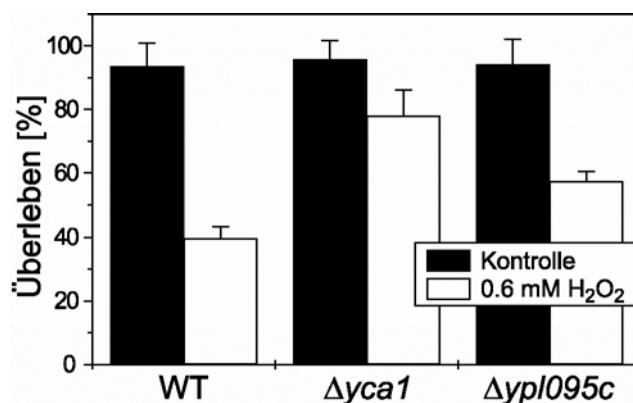
Yca1p Expressions und Vektorkontrollen im Wildtyp und  $\Delta ygl129c$  Stammhintergrund wurden in der exponentiellen Wachstumsphase auf SCG umgesetzt, mit 0,4 mM  $H_2O_2$  versetzt und nach 26 h mit FITC-VAD gefärbt und im FACS quantifiziert.



### III.5.3 Die Hydrolase Ypl095cp und ihr Zusammenspiel mit Yca1p

Durch Datenbankrecherchen wurde ein ORF identifiziert, der in funktioneller Nähe zu der Hefecaspase Yca1p gebracht werden kann: die putative  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Ypl095cp. Der einzige bis jetzt beschriebene Ypl095cp abhängige Phänotyp ist die Respirationsdefizienz des  $\Delta ypl095c$  Mutationsstammes (Karpichev und Small, 1998).

Oxidativer Stress in Form von Wasserstoffperoxid ist ein gut charakterisierter Induktor der Hefeapoptose. Um die Beteiligung der Hydrolase Ypl095cp am apoptotischen Geschehen unter oxidativem Stress zu untersuchen, wurden Wildtyp,  $\Delta ypl095c$  und  $\Delta yca1$  Stämme bei geringen Zelldichten mit Wasserstoffperoxid gestresst und die Überlebensrate bestimmt. Wie in Abb. 34 zu erkennen ist, steigert die Deletion von *YPL095c* das Überleben der Kultur in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Allerdings ist dieser Effekt nicht so ausgeprägt wie der rettende Effekt der Deletion der Hefecaspase *YCA1* (Abb. 34).

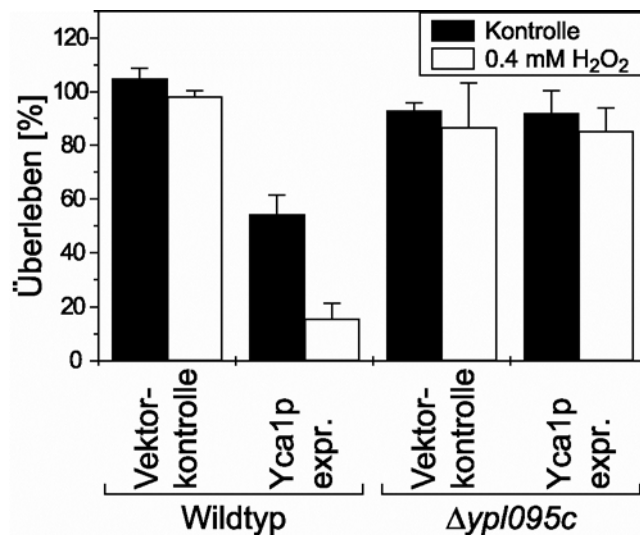


**Abb. 34: Die Deletion von *YPL095c* verstärkt die Toleranz gegenüber oxidativem Stress.**

Wildtyp-,  $\Delta ypl095c$ - und  $\Delta yca1$ -Stämme bei geringen Zelldichten in der exponentiellen Wachstumsphase mit 0,6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestresst und die Überlebensrate mittels Überlebensplattierung bestimmt (100 % ist die Anzahl der plattierten Zellen).

Um zu untersuchen, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen Yca1p vermittelter Apoptose und Ypl095cp besteht, wurde die Überexpression von Yca1p

in *YPL095c* Deletionsstämmen untersucht. Die Überexpression von Yca1p führt zu einem 50 %-igen Sterben der Kultur (Abb. 35). Setzt man nach dem Medienwechsel von SCD auf SCG noch als zusätzlichen proapoptotischen Stimulus Wasserstoffperoxid zu, so überleben weniger als 20 % der Zellen des Yca1p Expressierers (Abb. 35). Unter den gleichen Bedingungen ist das Überleben der Vektorkontrolle nicht eingeschränkt, es überleben mit und ohne Wasserstoffperoxid fast alle Zellen. Die Deletion von *YPL095c* verhindert das durch Yca1p Expression induzierte Sterben komplett, das Überleben gleicht der Vektorkontrolle (Abb. 35).

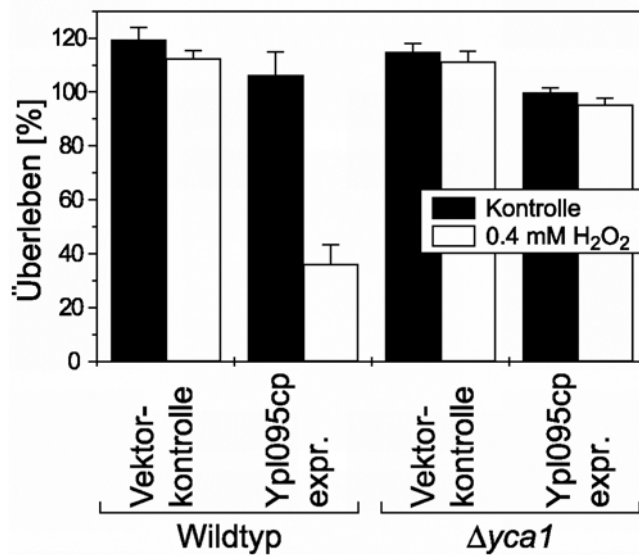


**Abb. 35:** Die Disruption von *YPL095c* verhindert den durch Yca1p Expression induzierten Zelltod.

Yca1p Expressions- und Vektorkontrollstämmen im Wildtyp und  $\Delta ypl095c$  wurden in der exponentiellen Wachstumsphase auf SCG umgesetzt, mit 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt und nach 20 h das Überleben mittels Überlebensplattierung bestimmt (100 % ist die Anzahl der plattierten Zellen).

Da die Deletion von *YPL095c* sowohl vor oxidativem als auch vor Yca1p induziertem Zelltod schützt, wurde ein Überexpressionskonstrukt von *YPL095c* hergestellt und dessen Einfluss auf das Überleben untersucht. Ohne proapoptotischen Stimulus beeinflusst die Überexpression von Ypl095cp das Überleben eines Wildtyp Stammes nicht (Abb. 36). Setzt man aber nach dem Umsetzen auf SCG Medium Wasserstoffperoxid zu, so überleben nur noch 30 % bis 40 % der Zellen der Ypl095cp Expressionskultur, während die Vektorkontrolle

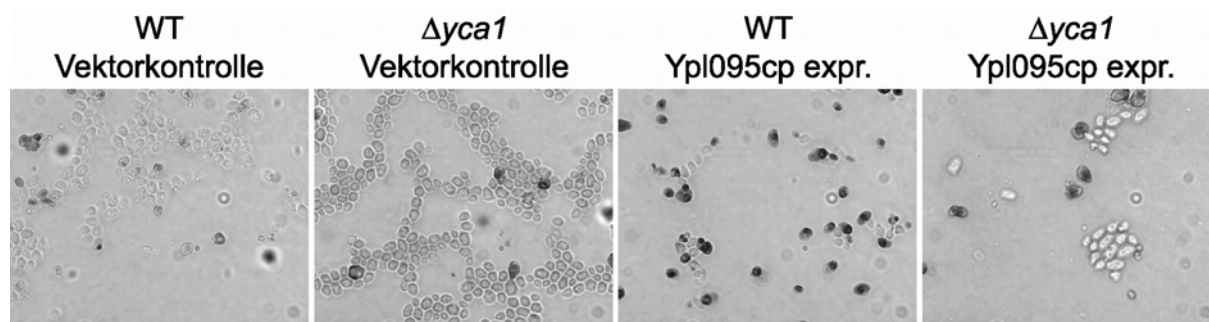
noch 100 % überlebende Zellen hat (Abb. 36). Führt man das gleiche Experiment in einem *YCA1* Deletionsstamm durch, so zeigt sich kein verschlechtertes Überleben.



**Abb. 36: Die Überexpression von Ypl095cp in Kombination oxidativem Stress führt zu einem Yca1p abhängigen Zelltod.**

Ypl095cp Expressions- und Vektorkontrollen im Wildtyp und  $\Delta yca1$  Stammhintergrund wurden in der exponentiellen Wachstumsphase auf SCG umgesetzt, mit 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt und nach 20 h das Überleben in der Überlebensplattierung bestimmt (100 % ist die Anzahl der plattierten Zellen).

Während des Zelltodes, ausgelöst durch Ypl095cp Überexpression, kommt es zur Fragmentierung der Kern DNA, wie in Abb. 37 anhand der schwarzen Färbung der Zellkerne im TUNEL Assay zu erkennen ist. Etwa 60 % der Zellkerne weisen Fragmentierungen der DNA auf im Vergleich zu den ungefärbten Zellen in der Vektorkontrolle. Die Fragmentierung der DNA ist schon ohne zusätzlichen Stress durch Wasserstoffperoxid deutlich zu erkennen, obwohl unter diesen Bedingungen nur etwa 10 % der Zellen sterben. Diese DNA Fragmentierung ist, wie auch der Zelltod, abhängig von Yca1p. Die Deletion der Hefecaspase verhindert die durch Ypl095cp Expression verstärkte DNA Fragmentierung.



**Abb. 37: Ypl095cp Überexpressionsstämme zeigen DNA Fragmentierung.**

Ypl095cp Expressions- und Vektorkontrollen im Wildtyp und  $\Delta yca1$  Stammhintergrund wurden in der exponentiellen Wachstumsphase auf SCG umgesetzt und nach 20 h TUNEL gefärbt.

Um die Beteiligung von Caspasen näher zu charakterisieren wurde eine *in-vivo* Caspase Aktivitätsmessung mit FITC-VAD durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Stamm	Kontrolle	0,4 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Ypl095cp expr.	3 %	5 %
Vektorkontrolle	2 %	2 %

**Tabelle 5: Ypl095cp Expressionsstämme sterben ohne Caspaseaktivierung.**

Die aufgelisteten Stämme wurden in der exponentiellen Phase auf SCG umgesetzt und mit und ohne 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 h geschüttelt. Dann wurden die Zellen mit FITC-VAD-fmk gefärbt und die Färbung im FACS quantifiziert. Die Prozentzahlen sind der Anteil von Zellen mit Caspaseaktivität.

Alle Stämme zeigen nur eine Hintergrundfluoreszenz im Caspase Assay. Die Überexpression von Ypl095cp führt in Kombination mit Wasserstoffperoxid zu einem Zelltod ohne Caspaseaktivierung.

### III.5.4 Diskussion

Es wurden zwei Mechanismen der Yca1p vermittelten Apoptose untersucht, die beide auf eine mitochondriale Wirkungsweise von Yca1p hindeuten.

Die Deletion von *YPL095c*, einer putative cytoplasmatischen Hydrolase, die als einzigen beschriebenen Phänotyp eine respiratorische Defizienz hat (Karpichev und Small, 1998), verhindert den Zelltod durch Yca1p Überexpression. Weiterhin

sterben Ypl095cp Überexpressionsstämme bei Zugabe von Wasserstoffperoxid ohne Caspaseaktivierung; die Deletion von *YCA1* verhindert aber diesen Zelltod und auch das Auftreten von DNA Fragmentierung. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Ypl095cp das Todessignal *downstream* von Yca1p weiterleitet. Dafür spricht, dass die Deletion von *YPL095c* den Zelltod verhindert, und Ypl095cp Überexpressionsstämme ohne Caspaseaktivierung sterben. Diese Überexpression von Ypl095cp wirkt nur in Kombination mit Wasserstoffperoxid tödlich. Der Hefecaspase Yca1p kommt in der apoptotischen Signalkaskade bei oxidativem Stress eine Hauptrolle zu. Eventuell fehlt in Zellen ohne Yca1p der Sensor, der die Apoptose einleitet. Das würde erklären, warum die Deletion der Caspase *YCA1* den Zelltod ausgelöst durch Ypl095cp Überexpression zwar verhindert, die Überexpressionmutante im Wildtyphintergrund aber ohne Caspaseaktivierung stirbt. Die endogen kodierte Metacaspase scheint auch in anderen Szenarien wichtig für den Todesmechanismus unter oxidativem Stress zu sein. So kann ein plasmidkodiertes Yca1p die Suszeptibilität von *YCA1* Deletionsmutanten zwar komplementieren, es werden aber höhere Dosen Wasserstoffperoxid für die Initiation der Apoptose benötigt (Madeo et al., 2002).

Ygl129cp ist ein DAP-3 Homologes in Hefe. Die Deletion von *YGL129c* verhindert den durch Yca1p Überexpression ausgelösten Zelltod und das Auftreten der morphologischen Marker der Apoptose. Die Caspase Aktivität ist in den Deletionsstämmen ähnlich hoch wie im Wildtyphintergrund, d.h. die Aktivierung der Caspase wird durch die Deletion von *YGL129c* nicht beeinträchtigt. Da Ygl129c auch funktionell ein DAP-3 Homologes ist, dessen Funktion durch das humane Gen komplementiert werden kann (Berger et al., 2000), ist anzunehmen, dass auch die apoptogene Funktion in Hefe konserviert ist. DAP-3 trägt zu der Fragmentierung von Mitochondrien während der Apoptose bei (Mukamel und Kimchi, 2004), diese apoptogene Funktion ist abhängig von der Aktivierung von Caspasen und spielt bei der Rezeptor vermittelten Apoptose eine Rolle (Kissil et al., 1999). Zur Fragmentierung der Mitochondrien kommt es auch während der Hefeapoptose, und die Mechanismen weisen Homologien auf (Fannjiang et al., 2004). Somit verbindet Ygl129c den Caspase abhängigen Zelltod in Hefe mit den Prozessen der Mitochondrien-Fragmentierung. Die Ergebnisse deuten darauf hin,

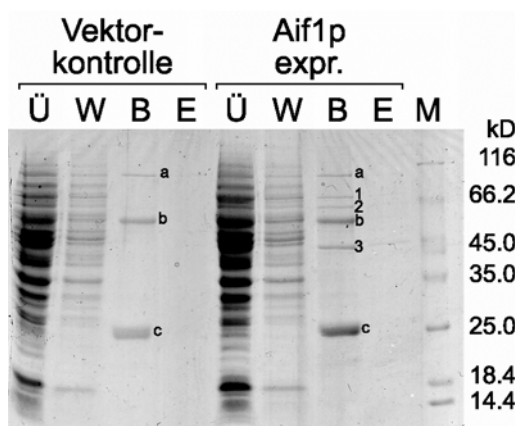
dass Yca1p die mitochondrialen Prozesse während der Hefeapoptose initiiert und in der Kaskade oberhalb der Mitochondrien steht. Die apoptogene Funktion von Yca1p könnte von mitochondrialen Prozessen abhängig sein.

### III.6 Untersuchungen zur Nukleaseaktivität von Aif1p

Humanes AIF transloziert während der Apoptose in den Zellkern und ist dort an der Degradation der chromosomalen DNA beteiligt. Rekombinantes Maus AIF induziert in gereinigten Zellkernen Chromatinkondensation und DNA Fragmentierung, ist aber nicht in der Lage, Plasmid DNA zu degradieren (Susin et al., 1999). Es scheint, als bräuchte AIF zum nukleolytischen Angriff weitere Kofaktoren, wie Cyclophilin A (Cande et al., 2004). Um die putative Nukleaseaktivität von Hefe Aif1p zu untersuchen, sollte sowohl aus Hefe isoliertes als auch rekombinantes Aif1p für Nukleaseassays eingesetzt werden.

#### III.6.1 Immunopräzipitation von Aif1p

Die Reinigung von Aif1p aus Hefe erfolgte durch Immunopräzipitation eines FLAG-Aif1p Fusionsproteins (II.9.6.9). In Abb. 38 ist die Coomassie Färbung einer SDS-PAGE der Fraktionen der Reinigung zu sehen.



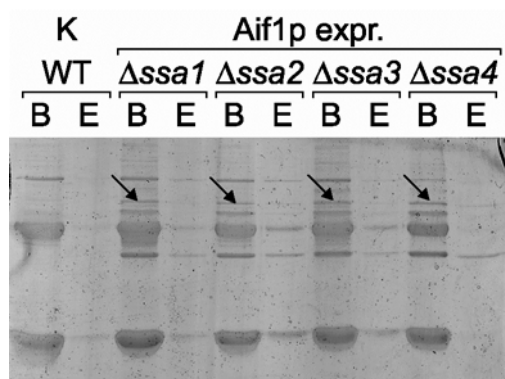
**Abb. 38: Immunopräzipitation von Aif1p.**

Aus Rohextrakten von 20 h auf SCG inkubierten Aif1p-FLAG Expressions- und Vektorkontrollstämmen wurde Aif1p durch Immunopräzipitation mit  $\alpha$ -FLAG Agarose gereinigt. Die verschiedenen Fraktionen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie Färbung visualisiert. Ü (Überstand), W (1 Wasch-fraktion), B (beads), E (Eluat), M (Marker).

Die Banden a, b und c sind unspezifisch, da sie auch in der Vektorkontrolle sichtbar sind, b und c entsprechen der leichten und der schweren Kette des Antikörpers, der zum *pull-down* verwendet wurde. Im Eluat des *pull-downs* aus Aif1p Überexpressionsstämmen ist die Bande 3 zu erkennen, die aufgereinigtem Aif1p entspricht (wurde später im MALDI-MS bestätigt). Die Inkubation dieses Proteins mit DNA zeigte keine Effekte. Da Säuger-AIF zur Degradation weitere interagierende Proteine benötigt, wurden die kopräzipitierten Proteine, die in der

Spur mit den beads sichtbar (Abb. 38) sind, im MALDI-MS (AK Stevanovic) identifiziert. Die Bande 2 ist HSP60, die Bande 1 ein HSP70 homologes Protein, das zur SSA Proteinfamilie gehört.

Um zu differenzieren welche der SSA Proteine mit Aif1p interagiert, wurde ein *pull-down* von Aif1p in den vier Disruptionsstämmen  $\Delta ssa1$ ,  $\Delta ssa2$ ,  $\Delta ssa3$  und  $\Delta ssa4$  durchgeführt. In allen vier Disruptionsstämmen ist die Bande des HSP70 Homologes deutlich sichtbar (Abb. 39). Die genaue Identität des Interaktorproteins von Aif1p ließ sich mit dieser Methode nicht klären.



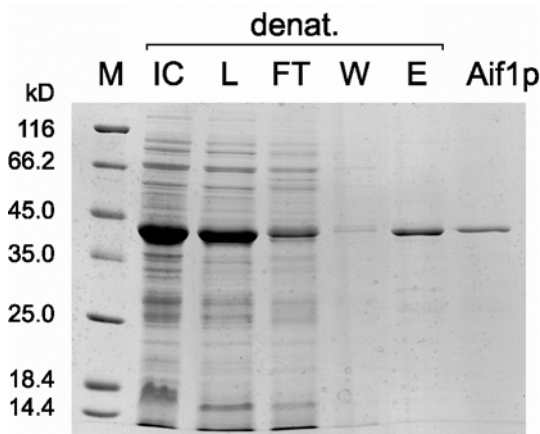
**Abb. 39: Immunopräzipitation von Aif1p in SSA Deletionsstämmen.**

Aus Rohextrakten von 20 h auf SCG inkubierten Aif1p-FLAG Expressions- und Vektorkontrollstämmen im Wildtyp und  $\Delta ssa1$ ,  $\Delta ssa2$ ,  $\Delta ssa3$  und  $\Delta ssa4$  Stammhintergrund wurde Aif1p durch  $\alpha$ -FLAG Agarose präzipitiert. Gezeigt ist die Coomassie Färbung der SDS-PAGE. B (beads), E (Eluat).

### III.6.2 Reinigung von rekombinantem Aif1p

Um die nukleolytische Aktivität von rekombinantem Aif1p aus *S. cerevisiae* zu bestimmen, wurde dieses über einen His<sub>6</sub>-Epitop aus *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt (II.9.5). Abb. 40 zeigt die Coomassie Färbung der SDS-PAGE unterschiedlicher Fraktionen der Aufreinigung und das durch Dialyse zurückgefaltete Aif1p. Im Eluat (E) sind keine verunreinigenden Proteinbanden mehr zu erkennen.



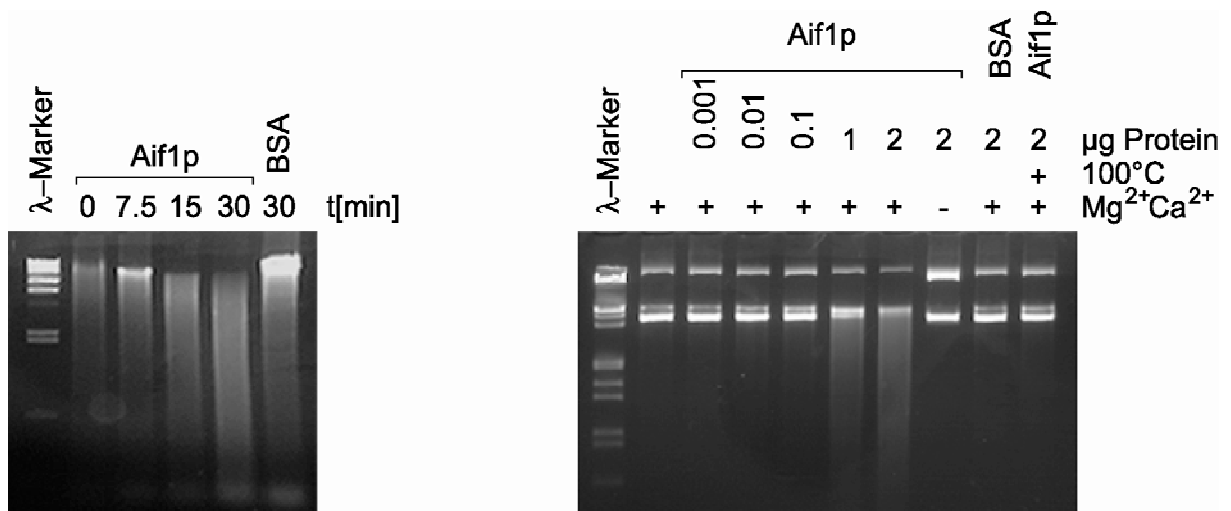


**Abb. 40: Aufreinigung von rekombinatem Aif1p aus *E. coli*.**

Rekombinant exprimiertes Aif1p wurde unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und mittels Dialyse renaturiert. Die verschiedenen Fraktionen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie Färbung visualisiert. IC (induzierte Kontrolle); FT (Durchfluss); W (Waschschritt); E (Eluat) und renaturiertes Aif1p.

### III.6.3 Rekombinantes Aif1p besitzt Nukleaseaktivität

Die Nukleaseaktivität von rekombinatem Aif1p wurde in Zusammenarbeit mit Silke Wissing untersucht. Die Inkubation von gereinigten Hefezellkernen mit rekombinatem Aif1p führt zur Degradation der chromosomalen DNA (Abb. 41). In einer zeitlichen Kinetik wurde der DNA Verdau verfolgt.



**Abb. 41: Degradation von gereinigten Hefezellkernen und Plasmid DNA durch rekombinantes Aif1p.**

16µg rekombinantes Aif1p wurde zusammen mit gereinigten Hefezellkernen inkubiert. Nach Extraktion der DNA wurde die DNA im Agarosegel getrennt und visualisiert. (links). 1µg Plasmid DNA wurde mit den jeweils angegebenen Konzentrationen von rekombinatem Aif1p oder BSA für 30 min. bei 30 °C inkubiert, nach der Inkubationszeit kurz hitzeinaktiviert und die DNA Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt (rechts).

Man kann in Abb. 41 erkennen, dass rekombinantes Aif1p chromosomale DNA degradiert und ein diffuser DNA Abbau zu sehen ist. In Säugern kommt es bei der Degradation von chromosomaler DNA zu DNA Leitern, weil die DNasen vor allem in der Linkerregion zwischen den Nucleosomen schneiden. In Hefe tritt so eine DNA Leiter nicht auf, was wahrscheinlich mit dem anderen Aufbau der Linkerregion zusammenhängt, sie ist in der Hefe sehr viel kürzer als bei Säugerzellen (Lowary und Widom, 1989).

Säuger AIF kann nur in Zusammenarbeit mit anderen Proteinen wie Cyclophilin A DNA degradieren und ist daher nicht in der Lage Plasmid DNA ohne Zugabe anderer Proteine zu schneiden. Rekombinantes Aif1p aus der Hefe schneidet Plasmid DNA (Abb. 41). In einer Konzentrationsreihe ist deutlich zu erkennen, wie zuerst die lineare Form der Plasmid DNA zunimmt, und bei höherer Aif1p Konzentration schließlich ein diffuser DNA Abbau sichtbar wird (Abb. 41). Die Nukleaseaktivität von Aif1p ist abhängig von der Gegenwart divalenter Kationen und kann durch Erhitzen des Proteins zerstört werden (Abb. 41). Da die Rückfaltung von rekombinantem Aif1p in Abwesenheit von FAD stattfand, ist die DNase Aktivität von Aif1p unabhängig von der Oxidoreduktase Funktion (II.9.5).

### **III.6.4 Diskussion**

Rekombinantes isoliertes Hefe Aif1p ist im Gegensatz zu den Säuger-Homologen in der Lage, DNA zu degradieren. Diese Aktivität ist abhängig von divalenten Kationen und bedarf einer nativen Form des Proteins. Aif1p kann sowohl Plasmid als auch genomische DNA abbauen. Die hohe Aif1p Konzentration, die für die Degradation von Plasmid DNA benötigt wird (ungefähr 1 µg/1 µg Plasmid DNA), deutet darauf hin, dass Aif1p *in-vivo* mit anderen Proteinen bei der Chromatinlyse interagiert und kooperiert. Die Durchführung des DNase Assays mit aus Hefe aufgereinigtem Aif1p blieb erfolglos. Dies kann daran liegen, dass bei der Reinigung noch andere Proteine kopräzipitiert wurden, die diese Aktivität verhindern.

Für Säuger AIF wurde gezeigt, dass HSP70 die Nukleaseaktivität von AIF an gereinigten Kernen inhibieren kann (Ravagnan et al., 2001) und die Translokation

von AIF unter apoptotischen Bedingungen in den Kern verhindert (Gurbuxani et al., 2003). Die Kopräzipitation von den HSP70 Homologen SSA Proteinen bestätigt somit eine Interaktion, die im Säugersystem schon gezeigt wurde. Da die Proteine der SSA Familie hoch homolog untereinander sind, konnte die genaue Identität des Interaktionspartners nicht geklärt werden. Es ist aber wahrscheinlich, dass sich die Proteine der SSA Familie gegenseitig komplementieren, wenn in den jeweiligen Disruptionsstämmen gearbeitet wird. Die nicht nachweisbare Nukleaseaktivität von aus Hefe durch *pull-down* gereinigten Aif1p scheint somit an der Bindung von SSA Proteinen zu liegen.

HSP60, ein Protein der mitochondrialen Matrix, ist als Chaperonin an dem Import von Proteinen in die mitochondriale Matrix beteiligt und hilft dort bei der korrekten Faltung (Heyrovska et al., 1998). Es kann aber auch Proteine, die in die Matrix importiert werden, in einem ungefalteten Zustand halten, damit diese in den Intermembranraum gelangen können (Koll et al., 1992). Da eine mitochondriale Lokalisation von Aif1p gezeigt wurde, (Wissing, 2005; Wissing et al., 2004) ist eine Interaktion zwischen HSP60 und Aif1p nicht unwahrscheinlich. Auch ist für das Hefe Aif1p die genaue Lokalisation in den Mitochondrien noch nicht geklärt. Es befindet sich entweder in der Matrix oder ist fest an die innere Membran assoziiert (Wissing, 2005; Wissing et al., 2004). Die Interaktion zwischen HSP60 und Aif1p kann diese Frage nicht klären, da HSP60 an beiden Transportwegen beteiligt ist.

## **IV ZUSAMMENFASSUNG**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein altruistischer Aspekt des apoptotischen Zelltodes des Einzellers *Saccharomyces cerevisiae* aufgeklärt werden. Unter physiologischen Bedingungen, im chronologischen Altern, sterben die meisten Zellen einer klonalen Kultur mit den phänotypischen Markern der Apoptose. Der apoptotische Zelltod im Altern ist abhängig von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der Hefecaspase Yca1p. Der zelluläre Selbstmord ist aber kein notwendiger Prozess, da jede einzelne Zelle über die genetische Möglichkeit verfügt, den Tod herauszuzögern, z.B. über die erhöhte Expression von *YAP1*, die wiederum die Menge an intrinsisch gebildeten ROS vermindert. Verhindert bzw. verzögert man den Zelltod im chronologischen Altern durch die Deletion der Hefecaspase Yca1p birgt das auf lange Sicht Selektionsnachteile für die Population. Gealterte Mutantenzellen sind im adaptiven Wachstum behindert, ihre Fähigkeit in frischem Medium zu proliferieren ist schwächer als beim Wildtyp. Es scheint, als hätten Zellen überlebt, die nicht mehr anpassungsfähig sind. Außerdem überlebt der Wildtyp die Mutanten in einem kompetitiven Überlebensassay, hat also im direkten Vergleich langfristig Selektionsvorteile. Es konnte zudem gezeigt werden, dass alternde Hefezellen Substanzen sezernieren, die das Überleben von anderen alten Zellen fördern. Die monoklonale Population hat also durch einen Zelltod nicht nur die Möglichkeit, knappe Nahrungsressourcen für die anpassungsfähigsten Zellen zu nutzen, sondern es werden von sterbenden Zellen noch zusätzlich Nahrung und Überlebenssignale zur Verfügung gestellt.

Des Weiteren konnte die durch *Lsm4p* Mutation ausgelöste Apoptose sowohl mechanistisch als auch in ihrem Ursprung näher charakterisiert werden. Da *Lsm* Proteine beim mRNA *splicing* und *decapping* involviert sind, wurde untersucht, welche von beiden Funktionen bei einer Fehlregulation Apoptose auslöst. Störungen im mRNA *decapping* durch Mutationen oder Disruptionen der beteiligten Proteine führen zu einem Zelltod, der mit den klassischen Markern der Apoptose einhergeht. Dieser Zelltod, nicht aber die mRNA Stoffwechselstörung kann durch die Disruption der Hefecaspase Yca1p verhindert werden. Die

Aktivierung der Caspase scheint nicht durch die erhöhte Stabilität ihrer mRNA und demnach ihrer Akkumulation in der Zelle hervorgerufen zu werden. Es muss einen noch nicht geklärten Mechanismus der Aktivierung von Yca1p geben. Dennoch ist der hier aufgezeigte, durch mRNA *decapping* Defekte ausgelöste und Caspase abhängige Zelltod der erste mechanistische Hinweis, wie mRNA Stabilität und Apoptose zusammenhängen.

Die Aufklärung der Mechanismen Yca1p vermittelter Apoptose war ein weiterer Teil dieser Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass Yca1p nur in apoptotischen und nicht in nekrotischen Todesszenarien involviert ist. Mechanistisch liegt Yca1p wahrscheinlich *upstream* von mitochondrialen apoptotischen Prozessen. Es konnten zwei Proteine identifiziert werden, die bei einer Disruption den Yca1p vermittelten Zelltod verhindern: Ygl129cp und Ypl095cp. Ygl129cp ist als DAP-3 Homologes vermutlich an den Prozessen der Mitochondrien-Fragmentierung beteiligt, die eine wichtige Rolle im apoptotischen Geschehen spielen. In diesem Disruptionsstamm ist Yca1p trotz Aktivierung nicht in der Lage, den Zelltod auszulösen. Ypl095cp ist ein neues proapoptotisches Protein, dessen apoptogene Funktion von Yca1p abhängt und das ohne Caspase Aktivierung tötet. Außerdem rettet die Disruption vor Yca1p vermittelter Apoptose. Es ist demnach ein weiterer Kandidat für die *downstream* von Yca1p liegenden Prozesse.

Außerdem konnten in dieser Arbeit zwei Interaktionspartner von Aif1p ermittelt werden: HSP60 und ein HSP70 Homolog. HSP60 spielt eine Rolle beim Import von Proteinen in die mitochondriale Matrix und deren Ausschleusung in den Intermembranraum. Somit ist diese Interaktion ein weiterer Beweis für die mitochondriale Lokalisation von Aif1p. Der zweite Interaktionspartner stammt aus der Familie der SSA Proteine und ist wahrscheinlich ähnlich wie im Säugersystem in der Lage die Aif1p vermittelte DNA Degradation zu inhibieren, da durch Immunopräzipitation aufgereinigtes Aif1p nicht in der Lage war, DNA zu schneiden. Rekombinantes, aus *E. coli* aufgereinigtes, Aif1p zeigte eine intrinsische DNase Aktivität gegenüber aufgereinigten Kernen und Plasmiden.

## **V ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AIF	Apoptosis-inducing factor
Amp	Ampicillin
AP-1	Activator protein 1
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bad	Bcl-2 agonist of cell death
Bax	Bcl-2 associated X-factor
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BI-1	Bax inhibitor 1
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAD	Caspase-activated DNase
CARD	Caspase recruiting domain
Caspase	Cysteiny l aspartate-specific proteinases
CDC48	Cell division Cycle (mutant) 48
CED	C. elegans death
CFU	Colony Forming Units
CML	Hefestammsammlung Cristina Mazzoni
DAB	Diaminobenzidine
DAP3	Death associated protein 3
DAPI	Diaminophenylindol
DBY	Hefestammsammlung David Botstein
Dcp	mRNA Decapping
DD	Death Domain
dH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
DED	Death Effector Domain
DHR	Dihydrorhodamin 123
DIABLO	Direct IAP-binding protein with low pl
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EndoG	Endonuclease G
ERC	Extrachromosomal ribosomal DNA circles
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAD	Flavinadenindinukleotid
FADD	FAS-associating death domain-containing protein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

---

FLAG	Synthetisches Epitop, Sequenz DYKDDDDK
FMY	Hefestammsammlung Frank Madeo
GFP	Green fluorescent protein
HPLC-MS	High-performance liquid chromatography - massspectrometry
HSP	Heat shock protein
HtrA2	High temperature requirement A 2
IAP	Inhibitory apoptosis protein
ICAD	Inhibitor of CAD
ICE	Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme
Kan <sup>R</sup>	G418 resistance
kD	Kilo Dalton
KFY	Hefestammsammlung Kai-Uwe Fröhlich
LB	Luria Bertani-Medium
LiAc	Lithiumacetat
Lsm	Like Sm protein
MALDI-MS	matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry
Mat	Mating type
MCA1	Metacaspase 1
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
Nma111	Nuclear mediator of apoptosis 111
NMD	Nonsense-mediated mRNA decay
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	Open reading frame
Pab	Poly(A) Binding protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pan	Poly(A)-binding protein-dependent poly(A) riboNuclease
Pat1	Protein Associated with Topoisomerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pFM	Plasmidstammsammlung Frank Madeo
pKF	Plasmidstammsammlung Kai-Uwe Fröhlich
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
POD	Peroxidase
Pro	Prolin rich region
PTP	Permeability transition pore
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rotations per Minute)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SC	Synthetic complete
SCD	Synthetic complete dextrose
SCG	Synthetic complete galactose
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIR2	Silent Information Regulator

SMAC	Second mitochondrial activator of caspases
snRNAs	Small nuclear RNA
snRNP	Small Nuclear Ribonucleoprotein Particle
SOD	Superoxiddismutase
SSA	Stress-Seventy subfamily
SSC	Sodium chloride-sodium citrate
TAE	Tris-acetate EDTA
tBid	Truncated Bid
TBS	Tris-buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethylethylendiamin
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
UBP10	UBiquitin-specific Protease
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
VCP	Valosin containing protein
VDAC	Voltage-dependent anion channel
VEID	Caspase Substrat (Val-Glu-Ile-Asp)
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit
WT	Wildtyp
YAP1	Yeast activator protein 1
YCA1	Yeast Caspase 1
yEGFP	Yeast-enhanced green fluorescent protein
YPD	Yeast extract peptone dextrose
ZnF	Zink Finger
Z-VAD-fmk	Caspase Inhibitor (Carbobenzoxy-Val-Ala-Asp-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Peptid)



## **VI REFERENZEN**

- Ameisen, J.C., J. Estaquier, T. Idziorek und F. De Bels. 1995. The relevance of apoptosis to AIDS pathogenesis. *Trends Cell Biol.* 5:27-32.
- Anderson, J.S. und R.P. Parker. 1998. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *Embo J.* 17:1497-1506.
- Arnoult, D., B. Gaume, M. Karbowski, J.C. Sharpe, F. Cecconi und R.J. Youle. 2003. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J.* 22:4385-4399.
- Arnoult, D., P. Parone, J.C. Martinou, B. Antonsson, J. Estaquier und J.C. Ameisen. 2002. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J. Cell Biol.* 159:923-929.
- Barker, M.G., L.J. Brimage und K.A. Smart. 1999. Effect of Cu,Zn superoxide dismutase disruption mutation on replicative senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 177:199-204.
- Beelman, C.A., A. Stevens, G. Caponigro, T.E. LaGrandeur, L. Hatfield, D.M. Fortner und R. Parker. 1996. An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature* 382:642-6.
- Berger, T., M. Brigl, J.M. Herrmann, V. Vielhauer, B. Luckow, D. Schlondorff und M. Kretzler. 2000. The apoptosis mediator mDAP-3 is a novel member of a conserved family of mitochondrial proteins. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 20):3603-3612.
- Bettiga, M., L. Calzari, I. Orlandi, L. Alberghina und M. Vai. 2004. Involvement of the yeast metacaspase Yca1 in ubp10Delta-programmed cell death. *FEMS Yeast Res.* 5:141-147.
- Binder, R., J.A. Horowitz, J.P. Babilion, D.M. Koeller, R.D. Klausner und J.B. Harford. 1994. Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves an endonucleolytic cleavage within the 3' UTR and does not involve poly(A) tail shortening. *Embo J.* 13:1969-1980.

- Blanchard, F., M.E. Rusiniak, K. Sharma, X. Sun, I. Todorov, M.M. Castellano, C. Gutierrez, H. Baumann und W.C. Burhans. 2002. Targeted destruction of DNA replication protein Cdc6 by cell death pathways in mammals and yeast. *Mol. Biol. Cell* 13:1536-1549.
- Bonnerot, C., R. Boeck und B. Lapeyre. 2000. The two proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p interact in vivo, are required for mRNA decay, and are functionally linked to Pab1p. *Mol. Cell Biol.* 20:5939-5946.
- Bozhkov, P.V., L.H. Filonova, M.F. Suarez, A. Helmersson, A.P. Smertenko, B. Zhivotovsky und S. von Arnold. 2004. VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death Differ.* 11:175-182.
- Cande, C., F. Cecconi, P. Dessen und G. Kroemer. 2002. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J. Cell Sci.* 115:4727-4734.
- Cande, C., N. Vahsen, I. Kouranti, E. Schmitt, E. Daugas, C. Spahr, J. Luban, R.T. Kroemer, F. Giordanetto, C. Garrido, J.M. Penninger und G. Kroemer. 2004. AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* 23:1514-1521.
- Chae, H.J., N. Ke, H.R. Kim, S. Chen, A. Godzik, M. Dickman und J.C. Reed. 2003. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene* 323:101-113.
- Cheng, E.H., D.G. Kirsch, R.J. Clem, R. Ravi, M.B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno und J.M. Hardwick. 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278:1966-1968.
- Cheng, J., T.S. Park, L.C. Chio, A.S. Fischl und X.S. Ye. 2003. Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* 23:163-177.
- Clem, R.J., E.H. Cheng, C.L. Karp, D.G. Kirsch, K. Ueno, A. Takahashi, M.B. Kastan, D.E. Griffin, W.C. Earnshaw, M.A. Veluona und J.M. Hardwick. 1998. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:554-559.

- Coller, J.M., M. Tucker, U. Sheth, M.A. Valencia-Sanchez und R. Parker. 2001. The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA*. 7:1717-1727.
- Condorelli, F., P. Salomoni, S. Cotteret, V. Cesi, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri und B. Calabretta. 2001. Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD. *Mol. Cell Biol.* 21:3025-3036.
- Cooper, M., L.H. Johnston und J.D. Beggs. 1995. Identification and characterization of Uss1p (Sdb23p): a novel U6 snRNA-associated protein with significant similarity to core proteins of small nuclear ribonucleoproteins. *Embo J.* 14:2066-2075.
- Daugas, E., S.A. Susin, N. Zamzami, K.F. Ferri, T. Irinopoulou, N. Larochette, M.C. Prevost, B. Leber, D. Andrews, J. Penninger und G. Kroemer. 2000. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* 14:729-739.
- Debrabant, A., N. Lee, S. Bertholet, R. Duncan und H.L. Nakhasi. 2003. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *Int. J. Parasitol.* 33:257-267.
- Desagher, S., A. Osen-Sand, S. Montessuit, E. Magnenat, F. Vilbois, A. Hochmann, L. Journot, B. Antonsson und J.C. Martinou. 2001. Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8. *Mol. Cell* 8:601-611.
- Donepudi, M., S.A. Mac, C. Briand und M.G. Grutter. 2003. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol. Cell* 11:543-549.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li und X. Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
- Dunckley, T. und R. Parker. 1999. The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *Embo J.* 18:5411-5422.

- Fabrizio, P., L. Battistella, R. Vardavas, C. Gattazzo, L.L. Liou, A. Diaspro, J.W. Dossen, E.B. Gralla und V.D. Longo. 2004. Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 166:1055-1067.
- Fabrizio, P. und V.D. Longo. 2003. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2:73-81.
- Fahrenkrog, B., U. Sauder und U. Aebi. 2004. The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. *J. Cell Sci.* 117:115-126.
- Fannjiang, Y., W.C. Cheng, S.J. Lee, B. Qi, J. Pevsner, J.M. McCaffery, R.B. Hill, G. Basanez und J.M. Hardwick. 2004. Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev.*
- Fischer, U., R.U. Janicke und K. Schulze-Osthoff. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* 10:76-100.
- Gietz, D.R., R.H. Schiestl, A.R. Willems und R.A. Woods. 1994. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/ss-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11:355-360.
- Güldener, U., S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer und J.H. Hegemann. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24:2519-2524.
- Gurbuxani, S., E. Schmitt, C. Cande, A. Parcellier, A. Hammann, E. Daugas, I. Kouranti, C. Spahr, A. Pance, G. Kroemer und C. Garrido. 2003. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 22:6669-6678.
- Hatfield, L., C.A. Beelman, A. Stevens und R. Parker. 1996. Mutations in trans-acting factors affecting mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 16:5830-5838.
- Hayashi, T. und D.L. Faustman. 2001. Implications of altered apoptosis in diabetes mellitus and autoimmune disease. *Apoptosis.* 6:31-45.
- He, F. und A. Jacobson. 2001. Upf1p, Nmd2p, and Upf3p regulate the decapping and exonucleolytic degradation of both nonsense-containing mRNAs and wild-type mRNAs. *Mol. Cell Biol.* 21:1515-1530.

- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
- Heyrovska, N., J. Frydman, J. Hohfeld und F.U. Hartl. 1998. Directionality of polypeptide transfer in the mitochondrial pathway of chaperone-mediated protein folding. *Biol. Chem.* 379:301-309.
- Hill, J.E., A.M. Myers, T.J. Koerner und A. Tzagoloff. 1986. Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2:163-167.
- Huh, G.H., B. Damsz, T.K. Matsumoto, M.P. Reddy, A.M. Rus, J.I. Ibeas, M.L. Narasimhan, R.A. Bressan und P.M. Hasegawa. 2002. Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J.* 29:649-659.
- Jakubowski, H. und E. Goldman. 1988. Evidence for cooperation between cells during sporulation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 8:5166-5178.
- Joza, N., S.A. Susin, E. Daugas, W.L. Stanford, S.K. Cho, C.Y. Li, T. Sasaki, A.J. Elia, H.Y. Cheng, L. Ravagnan, K.F. Ferri, N. Zamzami, A. Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y.Y. Kong, T.W. Mak, J.C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer und J.M. Penninger. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410:549-554.
- Kaeberlein, M., M. McVey und L. Guarente. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 13:2570-2580.
- Karpichev, I.V. und G.M. Small. 1998. Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 18:6560-6570.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie und A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-57.
- Kimura, Y. und A. Kakizuka. 2003. Polyglutamine diseases and molecular chaperones. *IUBMB. Life* 55:337-345.
- Kissil, J.L., O. Cohen, T. Raveh und A. Kimchi. 1999. Structure-function analysis of an evolutionary conserved protein, DAP3, which mediates TNF-alpha- and Fas-induced cell death. *Embo J.* 18:353-362.

- Kissil, J.L., L.P. Deiss, M. Bayewitch, T. Raveh, G. Khaspekov und A. Kimchi. 1995. Isolation of DAP3, a novel mediator of interferon-gamma-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 270:27932-27936.
- Koll, H., B. Guiard, J. Rassow, J. Ostermann, A.L. Horwich, W. Neupert und F.U. Hartl. 1992. Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. *Cell* 68:1163-1175.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lam, E. und O. del Pozo. 2000. Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol. Biol.* 44:417-428.
- Laun, P., A. Pichova, F. Madeo, J. Fuchs, A. Ellinger, S. Kohlwein, I. Dawes, K.U. Fröhlich und M. Breitenbach. 2001. Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.* 39:1166-1173.
- Lee, N., S. Bertholet, A. Debrabant, J. Muller, R. Duncan und H.L. Nakhasi. 2002. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ.* 9:53-64.
- Li, H., H. Zhu, C.J. Xu und J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
- Li, L.Y., X. Luo und X. Wang. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412:95-99.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri und X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
- Ligr, M., F. Madeo, E. Fröhlich, W. Hilt, K.U. Fröhlich und D.H. Wolf. 1998. Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett* 438:61-5.
- Lin, S.J., P.A. Defossez und L. Guarente. 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289:2126-2128.

- Longo, V.D. 1999. Mutations in signal transduction proteins increase stress resistance and longevity in yeast, nematodes, fruit flies, and mammalian neuronal cells. *Neurobiol. Aging* 20:479-486.
- Longo, V.D., L.M. Ellerby, D.E. Bredesen, J.S. Valentine und E.B. Gralla. 1997. Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J. Cell Biol.* 137:1581-1588.
- Longo, V.D., E.B. Gralla und J.S. Valentine. 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J. Biol. Chem.* 271:12275-12280.
- Lowary, P.T. und J. Widom. 1989. Higher-order structure of *Saccharomyces cerevisiae* chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:8266-8270.
- Ludovico, P., F. Rodrigues, A. Almeida, M.T. Silva, A. Barrientos und M. Corte-Real. 2002. Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 13:2598-2606.
- Ludovico, P., M.J. Sousa, M.T. Silva, C. Leao und M. Corte-Real. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* 147:2409-2415.
- Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter und X. Wang. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
- MacLean, M., N. Harris und P.W. Piper. 2001. Chronological lifespan of stationary phase yeast cells; a model for investigating the factors that might influence the ageing of postmitotic tissues in higher organisms. *Yeast* 18:499-509.
- Madeo, F., E. Fröhlich und K.U. Fröhlich. 1997. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell Biol.* 139:729-34.
- Madeo, F., E. Fröhlich, M. Ligr, M. Grey, S.J. Sigrist, D.H. Wolf und K.U. Fröhlich. 1999. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 145:757-67.

- Madeo, F., E. Herker, C. Maldener, S. Wissing, S. Lächelt, M. Herlan, M. Fehr, K. Lauber, S.J. Sigrist, S. Wesselborg und K.U. Fröhlich. 2002. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell* 9:911-917.
- Maldener, C. 2004. Caspaseabhängige Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation Universität Tübingen.
- Manon, S., B. Chaudhuri und M. Guerin. 1997. Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL. *FEBS Lett.* 415:29-32.
- Marin-Teva, J.L., I. Dusart, C. Colin, A. Gervais, N. van Rooijen und M. Mallat. 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41:535-547.
- Martin, S.J., C.P. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C. van Schie, D.M. LaFace und D.R. Green. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182:1545-56.
- Mazzoni, C. und C. Falcone. 2001. Isolation and study of KILSM4, a *Kluyveromyces lactis* gene homologous to the essential gene LSM4 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18:1249-1256.
- Mazzoni, C., P. Mancini, L. Verdone, F. Madeo, A. Serafini, E. Herker und C. Falcone. 2003. A Truncated Form of KILsm4p and the Absence of Factors Involved in mRNA Decapping Trigger Apoptosis in Yeast. *Mol. Biol. Cell* 14:721-729.
- Messenguy, F., F. Vierendeels, A. Pierard und P. Delbecq. 2002. Role of RNA surveillance proteins Upf1/CpaR, Upf2 and Upf3 in the translational regulation of yeast CPA1 gene. *Curr. Genet.* 41:224-231.
- Miramar, M.D., P. Costantini, L. Ravagnan, L.M. Saraiva, D. Haouzi, G. Brothers, J.M. Penninger, M.L. Peleato, G. Kroemer und S.A. Susin. 2001. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J. Biol. Chem.* 276:16391-16398.
- Mortimer, R.K. und J.R. Johnston. 1959. Life span of individual yeast cells. *Nature* 183:1751-1752.



- Mousavi, S.A. und G.D. Robson. 2003. Entry into the stationary phase is associated with a rapid loss of viability and an apoptotic-like phenotype in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Fungal. Genet. Biol.* 39:221-229.
- Mousavi, S.A. und G.D. Robson. 2004. Oxidative and amphotericin B-mediated cell death in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* is associated with an apoptotic-like phenotype. *Microbiology* 150:1937-1945.
- Moye-Rowley, W.S., K.D. Harshman und C.S. Parker. 1988. YAP1 encodes a yeast homolog of mammalian transcription factor AP-1. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 53 Pt 2:711-7.
- Moye-Rowley, W.S., K.D. Harshman und C.S. Parker. 1989. Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev.* 3:283-92.
- Muhlrad, D., C.J. Decker und R. Parker. 1994. Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'-->3' digestion of the transcript. *Genes Dev.* 8:855-66.
- Muhlrad, D., C.J. Decker und R. Parker. 1995. Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA. *Mol. Cell Biol.* 15:2145-2156.
- Muhlrad, D. und R. Parker. 1992. Mutations affecting stability and deadenylation of the yeast MFA2 transcript. *Genes Dev.* 6:2100-2111.
- Muhlrad, D. und R. Parker. 1994. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370:578-581.
- Mukamel, Z. und A. Kimchi. 2004. DAP3 localizes to the mitochondria and is involved in the process of mitochondrial fragmentation during cell death. *J. Biol. Chem.*
- Muzio, M., B.R. Stockwell, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen und V.M. Dixit. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273:2926-2930.
- Narasimhan, M.L., B. Damsz, M.A. Coca, J.I. Ibeas, D.J. Yun, J.M. Pardo, P.M. Hasegawa und R.A. Bressan. 2001. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol. Cell* 8:921-930.

- Phillips, A.J., I. Sudbery und M. Ramsdale. 2003. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:14327-14332.
- Ramsey, J.J., R.J. Colman, N.C. Binkley, J.D. Christensen, T.A. Gresl, J.W. Kemnitz und R. Weindruch. 2000. Dietary restriction and aging in rhesus monkeys: the University of Wisconsin study. *Exp. Gerontol.* 35:1131-1149.
- Rao, L., D. Perez und E. White. 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J. Cell Biol.* 135:1441-1455.
- Ravagnan, L., S. Gurbuxani, S.A. Susin, C. Maise, E. Daugas, N. Zamzami, T. Mak, M. Jaattela, J.M. Penninger, C. Garrido und G. Kroemer. 2001. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* 3:839-843.
- Reiter, J., E. Herker, F. Madeo und M.J. Schmitt. 2005. Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 168:353-358.
- Rozman-Pungercar, J., N. Kopitar-Jerala, M. Bogyo, D. Turk, O. Vasiljeva, I. Stefe, P. Vandenabeele, D. Bromme, V. Puizdar, M. Fonovic, M. Trstenjak-Prebanda, I. Dolenc, V. Turk und B. Turk. 2003. Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: when reaction mechanism is more important than specificity. *Cell Death. Differ.* 10:881-888.
- Sachs, A.B. und J.A. Deardorff. 1992. Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* 70:961-73.
- Sakahira, H., M. Enari und S. Nagata. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391:96-99.
- Salgado-Garrido, J., E. Bragado-Nilsson, S. Kandels-Lewis und B. Seraphin. 1999. Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *Embo J.* 18:3451-3462.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edition. *New York, Cold Spring Harbour Laboratory.*
- Schweinfest, C.W., M.W. Graber, J.M. Chapman, T.S. Papas, P.L. Baron und D.K. Watson. 1997. CaSm: an Sm-like protein that contributes to the transformed state in cancer cells. *Cancer Res.* 57:2961-2965.

- Seraphin, B. 1995. Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *Embo J.* 14:2089-2098.
- Severin, F.F. und A.A. Hyman. 2002. Pheromone induces programmed cell death in *S-cerevisiae*. *Curr. Biol.* 12:R233-R235.
- Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* 9:459-470.
- Shirogane, T., T. Fukada, J.M. Muller, D.T. Shima, M. Hibi und T. Hirano. 1999. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity.* 11:709-719.
- Sinclair, D.A. und L. Guarente. 1997. Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell* 91:1033-1042.
- Sionov, R.V. und Y. Haupt. 1999. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18:6145-6157.
- Stennicke, H.R., Q.L. Deveraux, E.W. Humke, J.C. Reed, V.M. Dixit und G.S. Salvesen. 1999. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 274:8359-8362.
- Stinton, L.M., T. Eystathioy, S. Selak, E.K. Chan und M.J. Fritzler. 2004. Autoantibodies to protein transport and messenger RNA processing pathways: endosomes, lysosomes, Golgi complex, proteasomes, assemblyosomes, exosomes, and GW bodies. *Clin. Immunol.* 110:30-44.
- Su, J.H., A.J. Anderson, B.J. Cummings und C.W. Cotman. 1994. Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 5:2529-2533.
- Suarez, M.F., L.H. Filonova, A. Smertenko, E.I. Savenkov, D.H. Clapham, S. von Arnold, B. Zhivotovsky und P.V. Bozhkov. 2004. Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Curr. Biol.* 14:R339-R340.
- Sun, J., S.P. Kale, A.M. Childress, C. Pinswasdi und S.M. Jazwinski. 1994. Divergent roles of RAS1 and RAS2 in yeast longevity. *J. Biol. Chem.* 269:18638-18645.

- Susin, S.A., H.K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B.E. Snow, G.M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D.R. Goodlett, R. Aebersold, D.P. Siderovski, J.M. Penninger und G. Kroemer. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.
- Tharun, S., W. He, A.E. Mayes, P. Lennertz, J.D. Beggs und R. Parker. 2000. Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* 404:515-518.
- Thornberry, N.A. und Y. Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.
- Thornberry, N.A., T.A. Rano, E.P. Peterson, D.M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V.M. Houtzager, P.A. Nordstrom, S. Roy, J.P. Vaillancourt, K.T. Chapman und D.W. Nicholson. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272:17907-17911.
- Tissenbaum, H.A. und L. Guarente. 2001. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410:227-230.
- Tucker, M. und R. Parker. 2000. Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 69:571-595.
- Uren, A.G., K. O'Rourke, L.A. Aravind, M.T. Pisabarro, S. Seshagiri, E.V. Koonin und V.M. Dixit. 2000. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol. Cell* 6:961-967.
- van Loo, G., X. Saelens, M. van Gorp, M. MacFarlane, S.J. Martin und P. Vandenameele. 2002. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.* 9:1031-1042.
- Verhagen, A.M., P.G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L.M. Connolly, G.E. Reid, R.L. Moritz, R.J. Simpson und D.L. Vaux. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102:43-53.

- Verhagen, A.M., J. Silke, P.G. Ekert, M. Pakusch, H. Kaufmann, L.M. Connolly, C.L. Day, A. Tikoo, R. Burke, C. Wrobel, R.L. Moritz, R.J. Simpson und D.L. Vaux. 2002. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J. Biol. Chem.* 277:445-454.
- Wadskog, I., C. Maldener, A. Proksch, F. Madeo und L. Adler. 2004. Yeast lacking the SRO7/SOP1-encoded tumor suppressor homologue show increased susceptibility to apoptosis-like cell death on exposure to NaCl stress. *Mol. Biol. Cell* 15:1436-1444.
- Wendler, F., H. Bergler, K. Prutej, H. Jungwirth, G. Zisser, K. Kuchler und G. Högenauer. 1997. Diazaborine resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals a link between YAP1 and the pleiotropic drug resistance genes PDR1 and PDR3. *J. Biol. Chem.* 272:27091-8.
- Wissing, S., P. Ludovico, E. Herker, S. Büttner, S.M. Engelhardt, T. Decker, A. Link, A. Proksch, F. Rodrigues, M. Corte-Real, K.U. Fröhlich, J. Manns, C. Cande, S.J. Sigrist, G. Kroemer und F. Madeo. 2004. An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 166:969-974.
- Wissing, S. 2005. Endogen induzierter programmierter Zelltod in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation Universität Tübingen*.
- Ye, H., C. Cande, N.C. Stephanou, S. Jiang, S. Gurbuxani, N. Larochette, E. Daugas, C. Garrido, G. Kroemer und H. Wu. 2002. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat. Struct. Biol.* 9:680-684.
- Yuan, J. und B.A. Yankner. 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
- Zambrano, M.M. und R. Kolter. 1996. GASping for life in stationary phase. *Cell* 86:181-184.

Akademische Lehrer:

H. Bauer, G. Baumann, H. Bisswanger, K. Bock, P. Bohley, K.-U. Fröhlich, D.O. Fürst, G. Kempter, E. Kleinpeter, K. Klopfer, L. Lehnhardt, F. Madeo, E. Maier, D. Martin, D. Mecke, B. Micheel, E. Pfaff, K. Poralla, H. Probst, K. Reutter, H. Ritschel, J. Ruppertsberg, H. Scheel, F.W. Scheller, U M. Schwarz, R. Seckler, M. Steup, E. Uhlemann, M. Vater, W. Voelter, B. Walz, L. Wilmitzer

# Lebenslauf

**Eva Herker**

\*14.3.1977 in Nürnberg

## Ausbildung

- Seit 09/2001      Promotion am Physiologisch-Chemischen Institut der Eberhardt-Karls Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Madeo  
Thema der Arbeit:  
„Altruistischer Zelltod und neue Wege der Caspase vermittelten Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae*“
- 08/2001            Diplom im Fach Biochemie an der Eberhardt-Karls Universität Tübingen  
Note: 1,0
- 03/2001 – 08/2001    Diplomarbeit am Physiologisch-Chemischen Institut der Eberhardt-Karls Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Fröhlich und Dr. Madeo  
Thema der Arbeit:  
„YCA1 – eine Caspase in *Saccharomyces cerevisiae*“
- 1998 – 2001        Studium der Biochemie an der Eberhardt-Karls Universität Tübingen
- 09/1998            Vordiplom im Fach Biochemie an der Universität Potsdam  
Note: 1,4
- 1996 – 1998        Studium der Biochemie an der Universität Potsdam
- 1996                Abitur am Hans-Sachs Gymnasium, Nürnberg  
Note: 1,8
- 1987 – 1996        Hans-Sachs Gymnasium, Nürnberg
- 1983 – 1987        Tusnelda Grundschule, Nürnberg

## Publikationen

- Madeo, F., E. Herker, C. Maldener, S. Wissing, S. Lächelt, M. Herlan, M. Fehr, K. Lauber, S.J. Sigrist, S. Wesselborg und K.U. Fröhlich. 2002. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell* 9:911-917.
- Madeo, F., S. Engelhardt, E. Herker, N. Lehmann, C. Maldener, A. Proksch, S. Wissing und K.U. Fröhlich. 2002. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr. Genet.* 41:208-216.
- Mazzoni, C., P. Mancini, L. Verdone, F. Madeo, A. Serafini, E. Herker und C. Falcone. 2003. A Truncated Form of KILsm4p and the Absence of Factors Involved in mRNA Decapping Trigger Apoptosis in Yeast. *Mol. Biol. Cell* 14:721-729.
- Herker, E., H. Jungwirth, K.A. Lehmann, C. Maldener, K.U. Fröhlich, S. Wissing, S. Büttner, M. Fehr, S. Sigrist und F. Madeo. 2004. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 164:501-507.
- Wissing, S., P. Ludovico, E. Herker, S. Büttner, S.M. Engelhardt, T. Decker, A. Link, A. Proksch, F. Rodrigues, M. Corte-Real, K.U. Fröhlich, J. Manns, C. Cande, S.J. Sigrist, G. Kroemer und F. Madeo. 2004. An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 166:969-974.
- Madeo, F., E. Herker, S. Wissing, H. Jungwirth, T. Eisenberg und K.U. Fröhlich. 2004. Apoptosis in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:655-660.
- Reiter, J., E. Herker, F. Madeo und M.J. Schmitt. 2005. Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* 168:353-358.
- Mazzoni, C., E. Herker, V. Palermo, H. Jungwirth, F. Madeo und C. Falcone. Yeast Caspase 1 links mRNA stability to apoptosis in yeast. *Eingereicht.*
- Büttner, S., T. Eisenberg, E. Herker, S. Wissing und F. Madeo. Why it's good for yeast to kill itself. *Eingeladener Artikel, FEMS Yeast Research; eingereicht.*
- Laun, P., L. Ramachandran, P. Liang, J. Wang, M. Weinberger, D.T. Burhans, E. Herker, S. Jarolim, B. Suter, F. Madeo, W.C. Burhans und M. Breitenbach. A comparison of the *S. cerevisiae* aging and apoptotic transcriptome. *Eingereicht.*



## Vorträge

„Chronological aging leads to apoptosis in yeast.“ Auf dem „3<sup>rd</sup> International Meeting on Yeast Apoptosis“, Salzburg, Österreich