

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II
Nephrologie und Allgemeine Innere Medizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Einfluss des p38 MAPK-Signalweges auf die subzelluläre
Lokalisation des Apoptosis Antagonizing Transcription Factor
(AATF)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt
von Fabian Röther
aus Freiburg im Breisgau

promoviert am 18. März 2015

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln.

Druckjahr: 2015.

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. B. Schumacher

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Dr. Henning Hagmann (Betreuung und Anregungen bei der wissenschaftlichen Diskussion der Ergebnisse)

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 28.08.2014

Fabian Röther

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir selbst mit Unterstützung von Herrn Dr. Henning Haggmann durchgeführt worden.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen herzlich bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Universitätsprofessor Dr. med. Thomas Benzing und den Leiter des Labors Privatdozent Dr. med. Bernhard Schermer, die mir die Möglichkeit und das Vertrauen gegeben haben, die Experimente der vorliegenden Arbeit in ihrem Labor an der Uniklinik Köln durchzuführen. Der freundschaftliche Umgang und ihr Enthusiasmus für die medizinische Forschung haben mich sehr begeistert. Durch ein strukturiertes Einarbeitungs- und Betreuungskonzept und die volle Integration in das Team habe ich ein großes Methodenspektrum erlernen können.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer Dr. med. Henning Hagmann bedanken, der mir stets freundschaftlich und kompetent mit Rat und Tat zur Seite stand. Sein unermüdliches Engagement für die Forschung und sein stetiger Wissensdrang haben mich sehr beeindruckt. Auch die fortwährende Unterstützung nach meiner Tätigkeit im Labor weiß ich sehr zu schätzen. Vielen Dank dafür.

Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. med. Tülay Kisner, die mich besonders zu Beginn meiner Arbeit sehr unterstützt und mich in die Thematik eingearbeitet hat.

Ich möchte mich des Weiteren bei dem restlichen Team des Forschungslabors für die stetige Unterstützung und die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken. So wurde mir bei Problemen und Fragen stets geholfen und durch die regelmäßigen Einarbeitungsseminare der Einstieg in die molekularbiologischen Methoden erleichtert. Auch die gemeinsamen Freizeitaktivitäten haben zu meinem angenehmen Aufenthalt in Köln beigetragen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinen Mitdoktoranden Jan Görtzen und Claudia Weitbrecht bedanken, die den Laboralltag und meinen Aufenthalt in Köln durch gemeinsame Aktivitäten bereicherten und mich freundschaftlich aufgenommen haben.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meiner Freundin Tina, die mir durchweg hilfreich und verständnisvoll zur Seite standen. Sie gaben mir Kraft und Motivation diese Arbeit erfolgreich durchzuführen.

Abschließend möchte ich nochmals Allen danken, die nach meinem Unfall durch ihre Hilfe und Unterstützung zu meiner schnellen Genesung beigetragen haben.

Meiner Familie und Freundin gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	4
1.1 DNA Damage Response und Zellzyklus-Kontrolle.....	4
1.2 Cellular Stress Response und p38-abhängige Signaltransduktion	6
1.3 Apoptosis Antagonizing Transcription Factor (AATF)	9
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Materialien und Lösungen.....	13
2.1.1 Zellkultur	13
2.1.2 Transfektion.....	13
2.1.3 Präparation nukleärer Proteine.....	13
2.1.4 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und Western Blot	14
2.1.5 Densitometrie	15
2.1.6 DNA-Schädigung.....	15
2.1.7 Behandlung mit Okadasäure.....	15
2.1.8 Hyperosmolarer Stress.....	15
2.1.9 Behandlung mit SB203580.....	15
2.1.10 Knockdown mit siRNA	15
2.1.11 Immunfluoreszenzmikroskopie	15
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Zellkultur	16
2.2.2 Transfektion.....	17
2.2.3 Präparation nukleärer Proteine.....	18
2.2.4 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und Western Blot	18
2.2.5 Densitometrie	20
2.2.6 DNA-Schädigung.....	20
2.2.7 Behandlung mit Okadasäure.....	20
2.2.8 Hyperosmolarer Stress.....	21
2.2.9 Behandlung mit SB203580.....	21
2.2.10 Knockdown mit siRNA	21
2.2.11 Immunfluoreszenzmikroskopie	22
3 Ergebnisse.....	24

3.1	AATF transloziert nach UV-C-Bestrahlung in den Zellkern.....	24
3.1.1	Die Translokation von AATF ist phosphorylierungsabhängig	25
3.2	AATF ist ein Substrat des p38 MAPK-Signalwegs	26
3.2.1	Hyperosmolarer Stress bewirkt eine Translokation von AATF.....	26
3.2.2	Überexpression von p38 beeinflusst die Lokalisation von AATF.....	27
3.2.3	p38-Inhibition verringert die nukleäre Translokation von AATF	29
3.3	Die Rolle von AATF bei der Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden	30
4	Diskussion.....	33
5	Zusammenfassung	39
6	Literaturverzeichnis	40
7	Lebenslauf.....	45

Abkürzungsverzeichnis

6-4-PP	6-4-Pyrimidin-Pyrimidonen
Abb.	Abbildung
AATF	Apoptosis Antagonizing Transcription Factor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATM	Ataxia Telangiectasia mutated
ATF2	aktivierender Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ATM- and Rad3-related
BAK	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
BSA	Bovines Serumalbumin
CD2AP	CD2 associated protein
CDKN1A	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A
CHK1/2	Checkpoint Kinase 1/2
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
DDR	DNA Damage Response
Dlk	Death Associated Protein like Kinase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DUSP	dual spezifische Phosphatase
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ERK	Extrazelluläres Signal-regulierte Kinase
FBS	Fetales Bovines Serum
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
HCT 116	humane Kolonkarzinom-Zellen
HDAC	Histon Deacetylase
HDM2	Human Double Minute 2
HEBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEK 293T	humane embryonale Nierenepithelzellen

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HOG1	Hohe Osmolarität Glycerol 1
HRP	horseradish (Meerrettich-) peroxidase
IR	ionisierende Strahlung
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKAP Kinase 2	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen-aktivierte Proteinkinase 2
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPKK Kinase
MK2	MAPKAP Kinase 2
MKK3/6	MAPKK 3/6
MKP	MAPK Phosphatase
min	Minute(n)
MRLC3	Myosin Regulatory Light Chain 3
NDS	Normal Donkey Serum
NRAGE	Neurotrophin Receptor-interacting MAGE Homolog
Par-4	Prostate Apoptosis Response-4
PARP	Poly (Adenosindiphosphat) Ribose Polymerase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIKK	Phosphoinositid-3-Kinase-like Protein Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvenylidenfluorid
Rb	Retinoblastom
RISC	RNA-induced silencing complex
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	small/short interfering RNA (Ribonukleinsäure)
Sp1	Specificity Protein 1

TEMED	Tetramethylethyldiamin
UPR	Unfolded Protein Response
UV	Ultraviolettes Licht
WB	Western Blot
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
ZIP Kinase	Zipper interacting Protein Kinase

1 Einleitung

1.1 DNA Damage Response und Zellzyklus-Kontrolle

Die genomische Stabilität einer Zelle ist für das Überleben und den Erhalt der Funktion von enormer Bedeutung. Die Integrität des Genoms ist jedoch ständig durch innere und äußere Einflüsse bedroht. So entstehen täglich in jeder Körperzelle tausende Schäden in der DNA (Lindahl und Barnes, 2000). Der Großteil tritt dabei während des normalen Zellstoffwechsels, beispielsweise durch spontane Hydrolyse und durch die Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies oder anderer Stoffwechselmetabolite auf. Des Weiteren können äußere Faktoren wie UV-Licht, ionisierende Strahlung oder zytotoxische Substanzen die Erbinformation schädigen. Die Schädigungsmuster sind dabei recht variabel. Es kann beispielsweise zu einfachen Basen-Fehlpaarungen oder Basen-Verlusten, aber auch Strangbrüchen im Phosphatgerüst der DNA kommen. Diese imponieren entweder als Einzelstrang- oder als Doppelstrangbrüche. Durch Bestrahlung von DNA mit UV-Licht entstehen hauptsächlich Dimere zweier benachbarter Pyrimidin-Basen eines Stranges. So kommt es zur Bildung von Thymidin-Addukten, wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) und 6-4-Pyrimidin-Pyrimidonen (6-4-PP) (Cadet et al., 1992).

Nach genotoxischer Schädigung wäre ein Fortschreiten im Zellzyklus und eine Zellteilung bei nicht intakter Erbinformation fatal und könnte zum Funktionsverlust, zur Entartung der Zelle oder zur mitotischen Katastrophe (Castedo et al., 2004) führen. Um dies zu verhindern, besitzen eukaryotische Zellen ein komplexes, hoch konserviertes Signalnetzwerk, das es ermöglicht, die genomische Integrität nach einem Schaden wiederherzustellen und sie zu erhalten. Das Netzwerk ist aus vielen, miteinander verknüpften Signalwegen zusammengesetzt und ermöglicht es der Zelle, spezifisch auf verschiedene Arten der DNA-Schädigung zu reagieren. Obwohl also die Antwort auf die einzelnen Arten von DNA-Schäden ganz unterschiedlich ausfallen kann, läuft sie dennoch nach einem gleichen Grundprinzip ab (Jackson und Bartek, 2009). Die Abläufe von der Wahrnehmung des Schadens bis zur Reaktion werden unter dem Begriff der DNA Damage Response (DDR) zusammengefasst. Die Abbildung 1.1.1 zeigt ein sehr vereinfachtes Schema der DDR. Sensoren leiten das Signal über so genannte Transducer an die Effektoren weiter, die letztlich für die Reaktion auf den Schaden verantwortlich sind. Dabei beruht die Signalübertragung der DDR hauptsächlich auf der posttranslationalen Modifikation der einzelnen Komponenten durch Phosphorylierung. Hierzu dienen besonders evolutionär konservierte Serin-/Threoninkinasen (Manke et al., 2005). Die Sensoren sind noch weitestgehend unbe-

kannt. Transducer sind beispielsweise Proteine der PIKK (Phosphoinositid-3-Kinase-like Protein Kinase)- und der PARP (Poly (ADP) Ribose Polymerase)-Familie. Die beiden bekanntesten Transducer der PIKK-Familie stellen die Kinasen ATM (Ataxia Telangiectasia mutated) und ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related) dar. Sie vollbringen ihre Wirkung entweder direkt oder durch ihre Effektorinasen CHK1 (Checkpoint Kinase 1) und CHK2 (Checkpoint Kinase 2) (Ciccia und Elledge, 2010). Ein weiterer Transducer, der sowohl parallel zu ATM/ATR wirken, als auch durch diese aktiviert werden kann, ist p38 und seine Effektorinasen MK2 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2) (Manke et al., 2005; Reinhardt et al., 2007).

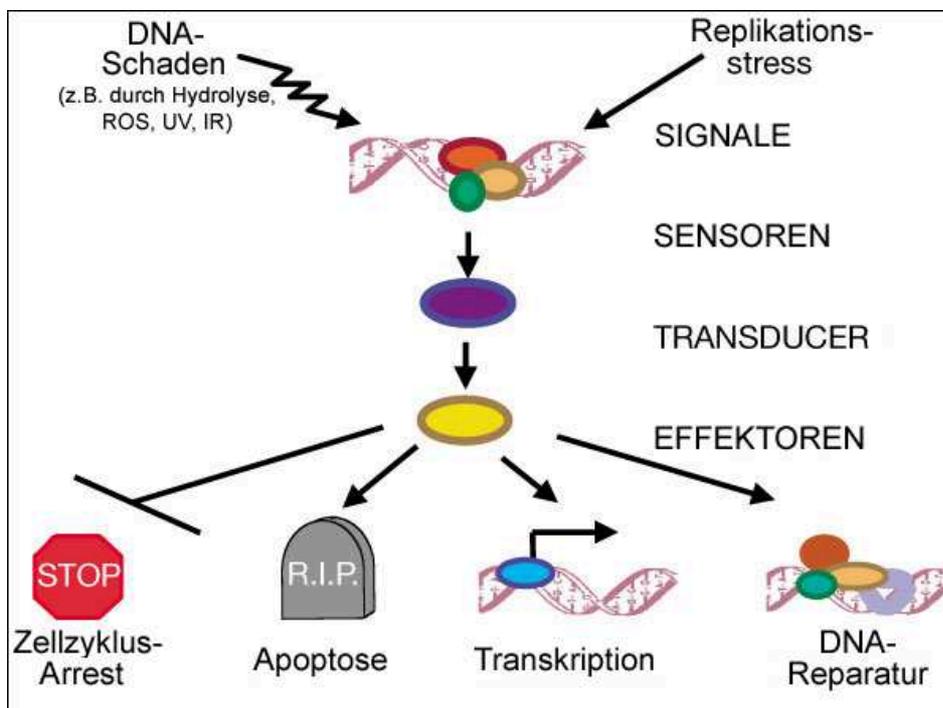


Abb. 1.1.1: Vereinfachtes Schema und Grundprinzip des DNA Damage Response Signalwegs (modifiziert nach Zhou und Elledge, 2000)

ROS = reaktive Sauerstoffspezies, UV = ultraviolettes Licht, IR = ionisierende Strahlung

Als Antwort auf einen DNA-Schaden wird das Fortschreiten im Zellzyklus verlangsamt oder gestoppt, die Transkription von Reparaturgenen gesteigert, Reparaturproteine an die Stelle des Schadens rekrutiert und das Chromatingerüst in der Umgebung des Schadens aufgelockert (Rouse und Jackson, 2002). Dies soll eine rasche Beseitigung der Läsion ermöglichen. Ist die Reparatur jedoch aufgrund eines zu ausgedehnten Defektes nicht mehr möglich, wird der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet oder es kommt zu einem dauerhaften Zellzyklus-Arrest (vorzeitige Zellalterung) (Di Leonardo et al., 1994).

Damit ist die DNA Damage Response untrennbar mit der Zellzyklus-Kontrolle verknüpft. Dieses Netzwerk regelt und überwacht den strukturierten Ablauf von einer Zellteilung zur nächsten. Der Zellzyklus einer intakten Zelle kann in die Gap 1 (G1)-, Synthese (S)-, Gap 2 (G2)- und Mitose (M)-Phase unterteilt werden. Bei Zell-Stress, DNA-Schädigung oder Replikationsfehlern kann das Fortschreiten an mehreren Kontrollpunkten des Zellzyklus, vor allem im Bereich der Phasenübergänge, verlangsamt oder gestoppt werden. Der G1/S-, der S-Phase- und der G2/M-Checkpoint sind die drei wichtigsten Kontrollpunkte im Rahmen der DNA Damage Response (Kastan und Bartek, 2004).

Angeborene Defekte in Genen der Zellzyklus-Kontrolle und DNA Damage Response finden sich in seltenen Tumorsyndromen, wie bei der Ataxia teleangiectatica (Louis-Bar-Syndrom), dem Li-Fraumeni-Syndrom oder dem Nijmegen-Breakage-Syndrom (Savitsky et al., 1995; Srivastava et al., 1990; Varon et al., 1998). Diese Erkrankungen gehen neben einem erhöhten Tumorrisiko unter anderem auch mit Immundefekten und neurologischen Defiziten einher.

Auch bei nicht angeborenen Tumorerkrankungen weisen Tumorzellen sehr häufig Mutationen in zentralen Komponenten der DNA Damage Response oder der Zellzyklus-Kontrolle auf (Halazonetis et al., 2008). Zudem können veränderte Signalwege in Tumorzellen Resistenzen gegen Standardtherapien vermitteln (Jackson und Bartek, 2009).

Wenn es gelingt die Signalwege der DNA Damage Response und der Zellzyklus-Kontrolle zu entschlüsseln und gezielt zu beeinflussen, bieten diese Signalkaskaden ein großes therapeutisches Potential.

1.2 Cellular Stress Response und p38-abhängige Signaltransduktion

Für das Überleben einer Zelle ist die Interaktion mit ihrer Umwelt von großer Bedeutung. Eine Zelle muss auf extrazelluläre Veränderungen reagieren und die eigene Aktivität darauf abstimmen können. Beispielsweise beeinflussen Veränderungen des pH-Wertes, der Osmolarität, des Nährstoffangebotes, der Temperatur oder der Wachstumsfaktor- und Zytokin-konzentration sehr stark die Zellhomöostase (Duch et al., 2012). Deshalb besitzen eukaryotische Zellen evolutionär hoch konservierte Signalwege, die extrazelluläre Signale an eine Vielzahl nukleärer und zytoplasmatischer Substrate weiterleiten können. Diese greifen regulierend in Kontrollpfade wichtiger Zellprozesse, wie Differenzierung, Proliferation, Migration, Apoptose und Mitose ein. Die Signalübertragung erfolgt weitestgehend durch posttranslationale Modifikation der einzelnen Signalwegkomponenten im Rahmen einer Phosphorylierungskaskade. Dabei spielen Mitglieder aus der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) eine zentrale Rolle (Cuadrado und Nebreda, 2010).

Diese Familie setzt sich aus den Extrazelluläres Signal-regulierten Kinasen (ERKs), den c-Jun N-terminal Kinasen (JNKs) und den p38-MAP Kinasen zusammen (Chen et al., 2001). Es handelt sich dabei um hoch konservierte Serin-/Threoninkinasen, die alle in vergleichbarer Weise in drei Schritten aktiviert werden. Die Abbildung 1.2.1 zeigt ein Schema dieser Aktivierungskaskade.

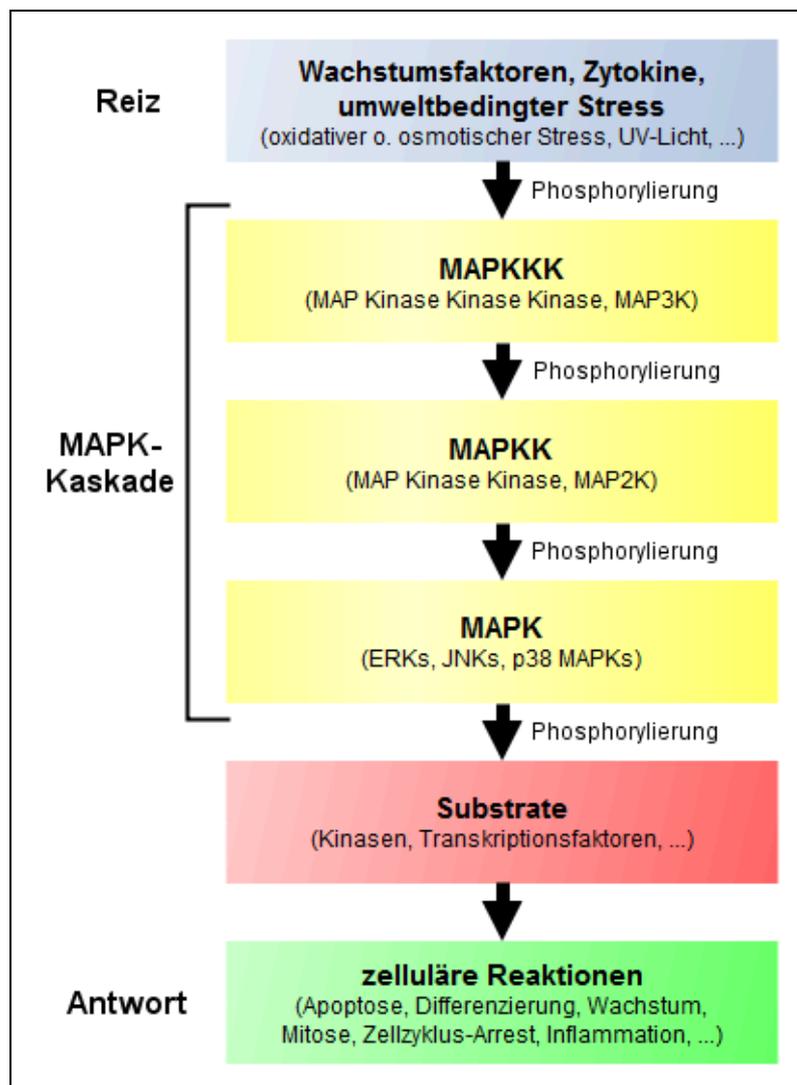


Abb. 1.2.1: Allgemeine Phosphorylierungskaskade der MAP Kinasen-Signalwege (modifiziert nach Kumar et al., 2003)

Die Phosphorylierung der MAPK erfolgt durch spezifische MAP Kinase Kinasen dual an benachbarten Tyrosin- und Threoninresten. Durch deren Dephosphorylierung werden die MAP Kinasen schließlich wieder inaktiviert. Dazu dienen einerseits unspezifische Phosphatasen, die entweder den Tyrosin- oder den Threoninrest dephosphorylieren. Andererseits können die MAPK durch dual-spezifische Phosphatasen (DUSPs), auch MAPK

Phosphatasen (MKPs) genannt, inaktiviert werden. Diese können sowohl den Tyrosin-, als auch den Threoninrest dephosphorylieren (Cuadrado und Nebreda, 2010). Die einzelnen MAPK-Signalwege werden durch verschiedene Stimuli angestoßen und lösen intrazellulär unterschiedliche Reaktionen aus. Dennoch verlaufen die Signalwege nicht linear, sondern sie kreuzen sich und interagieren in einem komplexen Netzwerk miteinander. So können sie sich gegenseitig aktivieren, aber auch hemmen (Cuschieri und Maier, 2005). Die ERK-Signalwege werden hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren aktiviert und greifen regulierend in die Zellproliferation und Differenzierung ein. Die p38 MAPK-Signalwege, ähnlich auch die JNK-Signalwege, reagieren dagegen auf eine große Anzahl unterschiedlicher Reize (Raingeaud et al., 1995). So kommt es unter anderem durch osmotischen oder oxidativen Stress, UV-Licht, ionisierende Strahlung, Hitze, endotoxisches Lipopolysaccharid (LPS) und proinflammatorische Zytokine zu einer Aktivierung dieser Signalwege. Zusammen mit den JNK-Signalwegen werden sie daher auch als Stress-aktivierte Proteinkinase-Signalwege (SAPK-Signalwege) bezeichnet (Coulthard et al., 2009). Die Abbildung 1.2.2 zeigt eine vereinfachte Übersicht über den Ablauf der p38 MAPK-Signalwege mit Aktivatoren und Substraten.

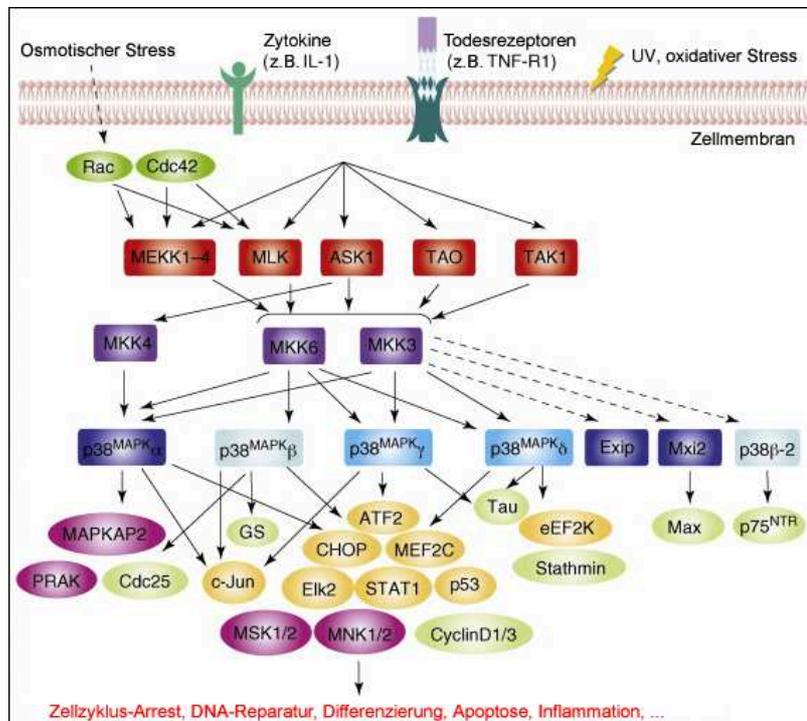


Abb. 1.2.2: Vereinfachtes Schema der p38 MAPK-Signalwege (modifiziert nach Coulthard et al., 2009)

Die Gruppe der p38 MAPKs setzt sich hauptsächlich aus den vier Kinasen p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 γ (MAPK12) und p38 δ (MAPK13) und deren Isoformen zusammen. Die Aminosäuresequenzen dieser Kinasen sind zu über 60 Prozent identisch und sie weisen alle ein ungefähres Molekulargewicht von 38 kDa auf (Cuadrado und Nebreda, 2010).

Das Expressionslevel der einzelnen p38 MAPKs ist in den verschiedenen Zellen und Geweben sehr unterschiedlich, wobei p38 α in den meisten Geweben vorhanden ist. Die Hauptaktivatoren der p38 MAPKs sind die beiden MAPK Kinasen MKK3 und MKK6. Diese können je nach Stimulus und Gewebe durch verschiedene MAPKK Kinasen aktiviert werden (Coulthard et al., 2009). Ihre Wirkung vollbringen die p38 MAPKs einerseits durch direkte Phosphorylierung der Zielproteine, wie Transkriptionsfaktoren, Phosphatasen oder Strukturproteine. Andererseits aktivieren sie weitere Kinasen, die letztlich für die Phosphorylierung der Zielproteine verantwortlich sind. Eine wichtige Effektor kinase der p38 MAPKs, besonders von p38 α , stellt die Serin-/Threoninkinase MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAPK2, MK2) dar. Diese wandert nach der Aktivierung in einem Komplex zusammen mit p38 α vom Zellkern in das Zytoplasma (Ben-Levy et al., 1998). MK2 spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Vermittlung eines Zellzyklusarrests nach UV-induzierten DNA-Schäden (Manke et al., 2005; Reinhardt et al., 2007; Reinhardt et al., 2010).

p38 MAPK-vermittelte Signalwege sind an proinflammatorischen Reaktionen beteiligt und spielen daher eine bedeutende Rolle in der Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen, wie beispielsweise der Rheumatoiden Arthritis (Coulthard et al., 2009). Für therapeutische Zwecke wurden deshalb in den letzten Jahren zunehmend Hemmstoffe der p38 MAPK-Signalwege gesucht. Die Pyridinylimidazole sind eine Gruppe älterer Hemmstoffe, die größtenteils selbst zur Entdeckung der p38 MAPK-Signalwege beigetragen haben (Lee et al., 1994). SB203580, ein Vertreter dieser Gruppe, hemmt die katalytische Aktivität von p38 α und p38 β durch eine kompetitive Bindung an die Bindungsstelle von ATP (Young et al., 1997; Evers et al., 1998). Dadurch wird eine Phosphorylierung und Aktivierung von MK2 und deren Substrate verhindert, ohne jedoch die Aktivierung der p38 MAPK selbst zu hemmen (Kumar et al., 1999).

1.3 Apoptosis Antagonizing Transcription Factor (AATF)

Der Apoptosis Antagonizing Transcription Factor (AATF), auch Che-1 genannt, ist ein wichtiger Mediator der DNA Damage und der Cellular Stress Response. Er spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellzyklus-Kontrolle und der Steuerung der Apoptose durch

transkriptionale Regulation einzelner Gene (Kaul und Mehrotra, 2007). AATF besteht aus 560 Aminosäuren, ist etwa 70 kDa groß und in eukaryotischen Organismen hoch konserviert. Im Bereich des N-terminalen Endes weist das Protein, wie für viele Transkriptionsfaktoren charakteristisch, hoch azide Regionen auf. Weiterhin enthält es mehrere Phosphorylierungsstellen verschiedener basophiler Kinasen, ein Leuzin-Zipper-Motiv, ein nukleäres Lokalisierungssignal und nukleäre Rezeptor-Bindungsmotive (Lindfors et al., 2000; Burgdorf et al., 2004). AATF wurde in eukaryotischen Zellen sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern nachgewiesen (Barbato et al., 2003; Passananti et al., 2007).

AATF bindet die RNA-Polymerase II und nimmt als Substrat der DNA Damage Response Kinasen ATM/ATR und CHK2 beispielsweise nach genotoxischer Schädigung Einfluss auf die transkriptionale Regulation antiapoptotischer Gene (Bruno et al., 2006). Dabei ist die Wirkung von AATF auf die Zellzyklus-Kontrolle komplex. Eine Überexpression von AATF in ruhenden Zellen führt zu einer Verdrängung von Histon Deacetylase Proteinen (HDAC 1-3) aus der Promotor-Bindung an Zielgenen des Transkriptionsfaktors E2F1 und so zu einem Fortschreiten im Zellzyklus mit einem schnellen Übergang in die S-Phase (Fanciulli et al., 2000; Bruno et al., 2002). Im Gegensatz dazu vermittelt AATF nach genotoxischer Schädigung mit Doxorubicin einen G2/M-Arrest (Bruno et al., 2006). Auch in Kolon- und Nierenkarzinomzellen konnte eine Hemmung der Zellzyklus-Progression gezeigt werden. Dabei verdrängt AATF die HDAC-Proteine von den Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors Sp1 (Specificity Protein 1) im Bereich der Promotoren des Zellzyklus-Inhibitors p21 und fördert so dessen Expression (Di Padova et al., 2003). Der zugrundeliegende Mechanismus für die unterschiedliche Wirkung von AATF auf HDAC-Proteine bei der Regulation des Zellzyklus ist bislang nicht aufgeklärt.

Die antiapoptotische Funktion von AATF wurde in einer Vielzahl von Arbeiten beschrieben (Page et al., 1999; Barbato et al., 2003; Xie und Guo, 2004, 2006; Kaul und Mehrotra, 2007). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass AATF für das Überleben von unterschiedlichen Tumorzellen und eine gesteigerte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verantwortlich ist. Die Ausschaltung von AATF in den Tumorzellen führte zu einer erhöhten Apoptoserate und zu einem verbesserten Ansprechen auf Chemotherapie. Diese Wirkung wird vor allem der Regulation der Transkription von p53 und seiner proapoptotischen Gene PUMA, BAX und BAK durch AATF zugeschrieben (Bruno et al., 2006; Bruno et al., 2010; Höpker et al., 2012). Ein weiterer antiapoptotischer Wirkmechanismus von AATF nach genotoxischem Stress scheint die Steigerung der Expression des Caspasen-Hemmers XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) zu sein (Bruno et al., 2008).

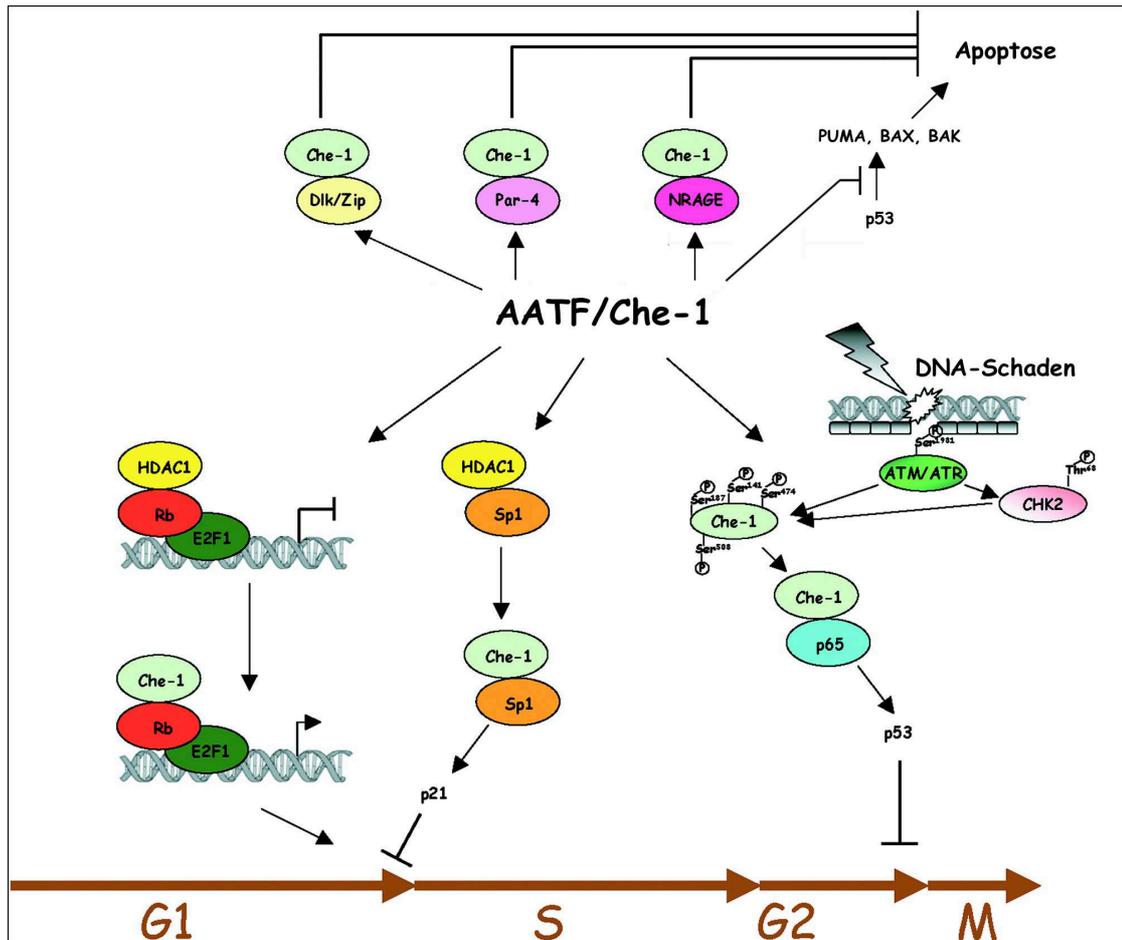


Abb. 1.3.1: Funktionen und Interaktionspartner von AATF (modifiziert nach Passananti et al., 2007)

Zusammenfassend vereint AATF bei der Regulation von Zellzyklus und Apoptose gegensätzliche Eigenschaften. Einerseits kann AATF ein Fortschreiten im Zellzyklus fördern und die Apoptose hemmen. Andererseits kann AATF auch zum Zellzyklus-Arrest und zum programmierten Zelltod beitragen. AATF ist daher ein wichtiger Mediator der DNA Damage und der Cellular Stress Response. Die jeweilige Funktion von AATF erscheint dabei Kontext-abhängig. Ein genaueres Verständnis der Rolle von AATF in der Tumorbologie und seiner unterschiedlichen Funktion in Abhängigkeit von der Aktivität Stress-spezifischer Kinasen-Signalwege ist Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

AATF ist ein wichtiger Mediator der DNA Damage und Cellular Stress Response. Er spielt dabei eine große Rolle in der Regulation von Zellzyklus und Apoptose. Ein generelles Prinzip in diesen Regulationsnetzwerken stellt die Phosphorylierungsabhängigkeit der einzelnen Signalwegkomponenten dar. Die Phosphorylierung führt zu einer veränderten

Funktion und Lokalisation des jeweiligen Proteins. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass AATF in ruhenden Zellen an dem zytoplasmatischen Protein MRLC3 (Myosin Regulatory Light Chain 3) gebunden vorliegt. Nach einer Bestrahlung mit UV-C-Licht wird diese Interaktion durch die Phosphorylierung von AATF aufgehoben. In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst geklärt werden, ob sich nach der Phosphorylierung und Loslösung von MRLC3 auch die subzelluläre Lokalisation von AATF verändert. Die Aminosäuresequenz von AATF weist mehrere Motive basophiler Kinasen auf. Es wäre daher zu überprüfen, welche Kinase und welcher Signalweg für die Phosphorylierung und die mögliche Translokation von AATF verantwortlich sind. Des Weiteren sollten die Untersuchungen beantworten, ob AATF auch eine direkte Rolle bei der Reparatur von UV-C-Licht induzierten DNA-Schäden spielen könnte.

Diese Arbeit dient einem besseren Verständnis der Funktion von AATF in der DNA Damage und Cellular Stress Response. Sie soll weitere Details in der Regulation der Apoptose und des Zellzyklus aufklären.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Lösungen

Es wurden für die verschiedenen Experimente unterschiedlichste Materialien und Lösungen verwendet, die nachfolgend kurz aufgelistet sind. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien und Reagenzien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.1.1 Zellkultur

- 10cm-Zellkulturschalen (Corning)
- 12-well-Platten (Corning) mit kollagenbeschichteten Deckgläsern
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; BioWhittaker), supplementiert mit 10% FBS (Fetales Bovines Serum; Biochrom AG)
- McCoy's 5A Medium (BioWhittaker), supplementiert mit 10% FBS
- Trypsin-EDTA (Gibco)
- 1x PBS: 136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,25 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; ddH₂O
- Collagen A: 100 µg/ml in 1x PBS (Biochrom AG)
- HEK 293T Zellen: humane embryonale Nierenepithelzellen (Prof. Dr. B. Seed, Harvard Medical School, Boston)
- HCT 116 p53 +/+ Zellen: humane Kolonkarzinom-Zellen (Prof. Dr. B. Vogelstein, John Hopkins School of Medicine, Baltimore)

2.1.2 Transfektion

- Steril filtrierte Calciumchlorid-Lösung 0,25 M
- 2x HEBS (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat), pH 7,09: 50 mM HEPES; 280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; 12 mM Dextrose
- Lipofectamine LTXTM Reagent (Invitrogen)
- Opti-MEM[®] I Reduced Serum Media (Invitrogen)

2.1.3 Präparation nukleärer Proteine

- Hypotoner Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 1 mM PMSF

- Extraktionspuffer: 20 mM HEPES-KOH, pH 7,8; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 0,4 M NaCl; 1 mM MgCl₂; 10% Glycerol; 0,5 mM DTT; 1x PIM (Roche); 1 mM PMSF
- Dounce Homogenisator

2.1.4 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und Western Blot

Gele:

- Gelkassetten (Invitrogen)
- Sammelgel: 5% Polyacrylamid; 125 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,05% APS; 0,1% TEMED
- Trenngel: 10% oder 12% Polyacrylamid; 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS; 0,05% APS; 0,05% TEMED

Puffer:

- 2x SDS-Probenpuffer/Lämmli-Puffer: 0,1 M Tris, pH 6,8; 4% (w/v) SDS; 20% Glycerol; 0,2% Bromphenolblau; 0,1 M DTT
- 5x SDS-Probenpuffer/Lämmli-Puffer: 0,25 M Tris, pH 6,8; 10% (w/v) SDS; 50% Glycerol; 0,5% Bromphenolblau; 0,25 M DTT
- Proteingrößenmarker: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas)
- Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
- Transferpuffer: 25 mM Tris, pH 8,3; 0,1% (w/v) SDS; 192 mM Glycin; 12% Methanol
- Proteinwaschpuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,1% (w/v) Tween20

Sonstige Materialien und Lösungen:

- Blotting Papier: Whatman-Papier (Schleicher & Schuell)
- PVDF Membran: Immobilon P (Millipore)
- Blockierungslösung: Proteinwaschpuffer mit 5% (w/v) BSA (Bovines Serumalbumin, Serva)
- Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Lösung: 100 mM Tris, pH 8,5; 2,5 mM Luminol; 0,4 mM Coumarinsäure; 1,5% H₂O₂
- Filme: Fuji Medical X-Ray-Film "Super RX"

Primärantikörper:

- anti-AATF polyklonaler Kaninchen IgG-Antikörper (Abnova), 1:250 in Proteinwaschpuffer
- anti- β -Tubulin monoklonaler Maus IgG₁-Antikörper (Developmental Studies Hybridoma Bank), 1:1000 in Proteinwaschpuffer
- anti-Fibrillarin monoklonaler Maus IgG-Antikörper (Abcam), 1:500 in Proteinwaschpuffer
- anti-FLAG® M2 monoklonaler Maus IgG₁-Antikörper (Sigma), 1:3000 in Proteinwaschpuffer

Sekundärantikörper:

- anti-Maus-HRP (Meerrettichperoxidase) (DAKO), 1:10000 in Proteinwaschpuffer
- anti-Kaninchen-HRP (GE/Amersham), 1:10000 in Proteinwaschpuffer

2.1.5 Densitometrie

- Flachbettscanner
- lizenzfreie ImageJ Software (Download unter: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>)

2.1.6 DNA-Schädigung

- UV-Lampe: Stratalinker® UV Crosslinker 1800 (Stratagene)

2.1.7 Behandlung mit Okadasäure

- Okadasäure Natrium Salz: 1,2 mM in ddH₂O (Calbiochem)

2.1.8 Hyperosmolarer Stress

- Ringer-Lösung plus 582 mosmol/l Sucrose

2.1.9 Behandlung mit SB203580

- 10 mM SB203580: 1 mg SB203580 in 265 μ l DMSO (Promega)

2.1.10 Knockdown mit siRNA

- Stealth Select RNAi™ siRNA für AATF (Invitrogen)
- Stealth RNAi™ siRNA Negative Control (Invitrogen)

2.1.11 Immunfluoreszenzmikroskopie

- 1x dPBS+: PBS supplementiert mit 1 mM CaCl₂ und 0,5 mM MgCl₂

- Fixierlösung: 4% PFA (Paraformaldehyd, Sigma) in 1x dPBS+
- Permeabilisierungslösung (dPBS-T): 0,1% Triton X100 (Sigma) in 1x dPBS+
- Blockierungslösung: 5% NDS (Normal Donkey Serum, Sigma) in 1x dPBS-T
- 2 M HCL-Lösung
- DAPI ProLong Gold (Invitrogen)
- Zeiss Axiovert Fluoreszenzmikroskop

Primärantikörper:

- anti-Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (anti-CPD) monoklonaler Mausantikörper (Cosmo Bio Co., Ltd.), 1:1000 verdünnt in dPBS-T

Sekundärantikörper:

- Eselantikörper gegen den Fc-Teil von Mausantikörpern, mit Cy3 (rot) konjugiert (Jackson Immuno Research), 1:250 verdünnt in dPBS-T

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Grundsätzlich erfolgte der Umgang mit sämtlichen Zelllinien an einer Sicherheitswerkbank mit einem sterilen Abzug. Um Kontaminationen zu vermeiden, waren alle Materialien steril verpackt und die an der Werkbank verwendeten Lösungen steril filtriert oder autoklaviert. Des Weiteren wurden regelmäßig die Werkbänke, Inkubatoren und verwendeten Geräte (z.B. Pipetten) mit 70% Ethanol desinfiziert.

Für die Versuche wurden HEK 293T und HCT 116 p53 +/+ Zellen verwendet. Die Inkubation der Zelllinien fand in befeuchteten Brutschränken bei 37 °C und 5% CO₂ und falls nicht anders beschrieben in 10cm-Schalen statt. Die Kultivierung der HEK 293T Zellen erfolgte in DMEM Nährmedium und die der HCT 116 Zellen in McCoy's 5A Nährmedium. Zu beiden Nährmedien kam noch 10% FBS hinzu.

In der Regel waren die Zellen nach 2-3 Tagen konfluent und konnten mit einer Verdünnung von 1:5 passagiert werden. Hierzu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 1x PBS gewaschen. Um die Zellen vollständig von der Zellschale zu lösen, wurden diese einige Minuten mit 1-2 ml Trypsin-EDTA im Brutschrank inkubiert und anschließend in entsprechendem Medium durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Danach konnten sie in der gewünschten Verdünnung in einem Endvolumen von 10 ml pro Schale verteilt werden.

Für die Immunfluoreszenz-Versuche wurden die Zellen auf 12-well-Platten mit kollagenbeschichteten Glasplättchen in einem Endvolumen von 1 ml pro Well verteilt. Zuvor muss-

ten die Glasplättchen mit einer 10%-CollagenA-Lösung bei 37 °C für mindestens eine halbe Stunde inkubiert und anschließend getrocknet werden.

2.2.2 Transfektion

Die Transfektion bezeichnet das Einbringen von Fremd-DNA/RNA in eukaryotische Zellen. Bei den beiden verwendeten Zellreihen wurden unterschiedliche Transfektionsmethoden angewandt.

Die transiente Transfektion der HEK 293T Zellen erfolgte hier nach der Calciumphosphat-methode(Chen und Okayama, 1987; Graham und van der Eb, 1973; Loyter et al., 1982). Diese Methode nutzt die Fähigkeit der Zellen, Calciumphosphatkristalle phagozytieren zu können, aus. Auf diese Weise kann kopräzipitierte Plasmid-DNA in die Zellen eingeschleust werden.

Die Zellen wurden am Vortag im Verhältnis 1:5 passagiert, sodass diese am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70-80% erreicht hatten. Unter dem sterilen Abzug wurden pro 10cm-Zellschale 5-10 µg Plasmid-DNA in Eppendorf-Gefäße pipettiert und 500 µl 0,25 M Calciumchlorid hinzugegeben. Zur Bildung der Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitate wurden nun auf dem Schüttler tropfenweise 500 µl 2x HEBS dazu pipettiert. Diese Mischung wurde nun ebenfalls tropfenweise auf die Kulturschalen gegeben und durch leichtes Schwenken gleichmäßig im Medium verteilt. Das Abstoppen der Transfektion erfolgte mit Hilfe des Ersetzens des kristallhaltigen Mediums durch frisches Medium nach ca. 8 Stunden Inkubation bei 37 °C. Die Zellen wurden daraufhin weiter im Brutschrank über Nacht inkubiert.

Als Transfektionskontrolle wurde immer eine 10cm-Schale mit GFP-DNA transfiziert und die Effizienz der Transfektion durch Abschätzen des Anteils GFP-positiver Zellen am nächsten Tag unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

Die transiente Transfektion der HCT 116 p53 +/+ Zellen für die Immunfluoreszenz-Versuche erfolgte mittels Lipofectamine LTX™ Reagent in 12-well-Platten. Dazu wurde pro Well 1-2 µg Plasmid-DNA unter dem Abzug in Eppendorf-Gefäßen mit 200 µl Opti-MEM® I Reduced Serum Media verdünnt. Anschließend musste je 3,5-5,5 µl Lipofectamine LTX™ Reagent hinzugefügt und das Gemisch für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Während dieser Inkubationszeit bildeten sich RNA-Lipofectamine-Komplexe, die letztlich in die Zellen aufgenommen werden konnten. Nach der Inkubationszeit wurde das Gemisch also den einzelnen Wells hinzugefügt und die Platten leicht vor und zurück geschwenkt. Das Abstoppen erfolgte auch hier nach ca. 8 Stunden mit dem Ersetzen des

Komplexbesatz durch frisches Medium. Die Zellen wurden dann über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.2.3 Präparation nukleärer Proteine

Zur Vermeidung von Denaturierung und Zerstörung von Zellen bzw. Proteinen wurden die folgenden Schritte auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt.

Zum Ernten der Zellen wurde das Medium aus den Zellschalen abgesaugt und die Zellen mit 7 ml kaltem PBS von dem Schalenboden gelöst. Die vollständige Ablösung der Zellen erfolgte durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren. Die nun in dem PBS gelösten Zellen wurden in 15ml-Falcon-Röhrchen überführt und mit 1.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Um die Proteinkonzentration zu erhöhen wurden vor der Zentrifugation pro Versuchsansatz jeweils 3 Zellschalen zusammengeführt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, die Zellpellets in 1 ml hypotonem Puffer resuspendiert und in Eppendorf-Gefäßen 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellwände wurden nun vorsichtig in einem Dounce Homogenisator mit 20 Stößen lysiert. Die anschließende Zentrifugation bei 4.000 rpm für 15 min trennte die Zellkerne von dem Zytoplasma und den Zellmembranbestandteilen ab. Zur Bestimmung der zytoplasmatischen Proteinfraction (Lysate) wurden 50 µl des Überstandes abgenommen und mit 50 µl 2x Lämmli-Puffer für 5 min bei 95 °C denaturiert. Der restliche Überstand wurde abgesaugt. Um verbliebene Zellmembran- und Zytoplasmareste von den Zellkernen zu entfernen, wurden die Pellets in 500 µl hypotonem Puffer resuspendiert und erneut bei 4.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Um die Kerne zu zerstören, wurden nach dem Absaugen des Überstandes die Kernpellets daraufhin in 200 µl Extraktionspuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Mit einer Zentrifugation bei 10.000 rpm für 30 min konnte anschließend die nukleäre Proteinfraction (Überstand) von den anderen Kernbestandteilen (Pellet) getrennt werden. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und 80 µl davon mit 20 µl 5x Lämmli-Puffer für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die gekochten Proben (Lysate und Kernextrakte) konnten dann mittels SDS-PAGE analysiert werden.

2.2.4 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und Western Blot

Ziel der SDS-PAGE ist es, Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufzutrennen. Mittels des Western Blot-Verfahrens können dann die Größe und die relative Proteinmenge der exprimierten Proteine analysiert werden (Towbin et al., 1979).

Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit 2x bzw. 5x Lämmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Durch das Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) wird erreicht, dass die Proteine nicht nur gelöst werden, sondern auch eine negative Gesamtladung erhalten. Ihre elektrophoretische Beweglichkeit in einem Polyacrylamid-Gel hängt somit allein von der Größe des Proteins ab. Die Proteine wandern umso schneller zur Anode je weniger Acrylamid ein Gel enthält und je kleiner ein Protein ist. Zur Auftrennung großer Proteine eignen sich Gele mit niedrigerem und zur Auftrennung kleiner Proteine Gele mit höherem Acrylamidanteil.

Die Gele wurden in leeren Gelkassetten gegossen und bestanden aus 2 Anteilen, die unterschiedliche Polyacrylamid-Konzentrationen enthielten. Das Sammelgel bestand zu 5% aus Polyacrylamid und machte das obere Drittel des Gels aus. In diesen Anteil wurden die Proben geladen und nach Anlage des Stroms (70 V für 30 min) in einer schmalen Zone konzentriert. Die unteren beiden Drittel bildete das Trenngel (10-12% PAA), in welchem die Proteine nun mit 25 mA für 2 Stunden nach ihrer Größe aufgetrennt wurden.

Unmittelbar im Anschluss daran erfolgte der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine proteinbindende Membran nach dem Semi-Dry-Verfahren. Dabei wurden die Proteine durch Anlegen einer Spannung von 12 V für 53 min aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF) übertragen (Gültekin und Heermann, 1988). Die Membran wurde zuvor in Methanol aktiviert und anschließend wie auch das Whatman-Papier in Transferpuffer gelegt. Das Gel wurde nun auf der Membran zwischen den beiden Papieren in die Transfereinheit geschichtet.

Um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde diese nach Abschluss des Transfers in 5% BSA für 1 Stunde bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C geschwenkt.

Nach drei Waschschritten mit Waschpuffer erfolgte eine 1-stündige Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur. Um überschüssige Antikörper, die keine Antigen-Antikörper-Bindung eingegangen waren, zu entfernen, wurden erneut drei Waschschrritte durchgeführt. Der Sekundärantikörper, mit dem die Membran anschließend für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde, war gegen den Fc-Teil des Erstantikörpers gerichtet und zur Detektion mittels Chemilumineszenz an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Mit gründlichen Waschschrritten wurden erneut die überschüssigen Antikörper entfernt und anschließend die Lichtreaktion der HRP mit ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Lösung gestartet. Die Lichtemission der Membran wurde mittels Belichtung eines Röntgenfilms festgehalten. Die Entwicklung des Films erfolgte daraufhin in einer Dunkelkammer.

2.2.5 Densitometrie

Die Densitometrie bezeichnet die quantitative Messung der Farbmenge pro Flächeneinheit, auch Farbdichte genannt. Mithilfe der Densitometrie können die einzelnen Western-Blot-Banden quantifiziert werden. Die Filme der Western-Blots wurden hierzu mit einem Flachbettscanner und einer Auflösung von 450dpi im Graustufen-Modus eingescannt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Farbdichte der einzelnen Banden mit Hilfe der lizenzfreien ImageJ Software des National Institutes of Health.

2.2.6 DNA-Schädigung

Um die Reaktion der Zellen auf DNA-Schädigung zu analysieren, erfolgte sowohl vor der Präparation nukleärer Proteine als auch vor den Immunfluoreszenz-Experimenten die Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht.

Zur Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht wurde der Stratalinker® UV Crosslinker 1800 von Stratagene benutzt. Durch das UV-Licht kommt es zur Dimerisierung benachbarter Pyrimidine (besonders der Thyminen). Was zur Folge hat, dass die Information der DNA nicht mehr korrekt abgelesen und die DNA auch nicht mehr repliziert werden kann. Bestrahlt wurden die Zellen mit einer Energie von 50 J/m^2 . Vor der Bestrahlung wurde das Medium der zu bestrahlenden, wie auch der Kontroll-Zellen (wurden nicht bestrahlt), abgesaugt und direkt danach neues zugefügt. Ebenso wurde der Deckel der Zellschalen für die Zeit der Bestrahlung (ca. 2 s) entfernt. Da die Zellen zur Reaktion auf die DNA-Schädigung Zeit brauchen, wurden sie nach der Bestrahlung erneut 1-72 Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.2.7 Behandlung mit Okadasäure

Okadasäure ist ein Inhibitor der zytoplasmatischen Serin-/Threonin-spezifischen Proteinphosphatasen 1, 2A und 2B.

Um die Dephosphorylierung von Proteinen zu verhindern und somit eine Phosphoserin-/Phosphothreoninspezifische Translokation untersuchen zu können, erfolgte vor der Präparation der nukleären Proteine eine Behandlung der Zellen mit Okadasäure. Hierzu wurde das Medium der Zellen durch 4 ml 1,2 mM okadasäurehaltiges, vorgewärmtes Medium ersetzt. Nach einer Stunde Inkubationszeit im Brutschrank konnten die Zellen, wie in 2.2.3 beschrieben, geerntet und lysiert werden. Unterschiedlich war nur, dass die Zellen diesmal in den 4 ml okadasäurehaltigem Medium geerntet wurden, um die Zellen nicht zu verlieren, die sich durch die Vorbehandlung mit Okadasäure abgelöst hatten.

2.2.8 Hyperosmolarer Stress

Im Rahmen von hyperosmolarem Stress kommt es in den Zellen zu einer Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs. Um dies zu erreichen, wurden die Zellen einer sucrosehaltigen Ringer-Lösung ausgesetzt.

Nach der Entfernung des Mediums inkubierten die HCT 116 p53+/+ Zellen für 10 Minuten bei 37°C in vorgewärmter, mit 582 mosmol/l Sucrose versetzter Ringer-Lösung. Anschließend konnten sie, wie unter 2.2.3 beschrieben, geerntet und lysiert werden.

2.2.9 Behandlung mit SB203580

SB203580 gehört zu der Gruppe der Pyridinylimidazole, einer Gruppe älterer Hemmstoffe der p38 MAPK-Signalwege. Durch eine kompetitive Anlagerung an die Bindungsstelle von ATP der p38 MAPKs hemmen sie die katalytische Aktivität der p38 α und p38 β MAPK (Young et al., 1997; Eyers et al., 1998).

Um eine ausreichende Hemmung der p38 MAPKs in den HCT 116 p53 +/+ Zellen zu erreichen, erfolgte eine halbe Stunde vor der Bestrahlung die Inkubation der Zellen in einer 10 μ M SB203580-Zellmedium-Lösung bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen, wie unter 2.2.3 und 2.2.6 beschrieben, bestrahlt und geerntet.

2.2.10 Knockdown mit siRNA

Als Knockdown bezeichnet man die Herunterregulierung der Expression einzelner Proteine. Dies kann auf den unterschiedlichen Ebenen der Proteinexpression geschehen. In dieser Arbeit erfolgte ein vorübergehender Knockdown des Proteins AATF mittels RNA-Interferenz. Hierzu wurde so genannte small/short interfering RNA (siRNA) in die Zellen eingeschleust (Carthew und Sontheimer, 2009). Die Sequenz dieser aus 21-23 Nukleotiden bestehenden Doppelstrang-RNA war komplementär zu der mRNA von AATF. Durch die Spaltung der siRNA in Einzelstränge und die Bildung des so genannten RNA-induced silencing complex (RISC) in den Zellen konnte spezifisch die Ziel-mRNA vorzeitig abgebaut und somit die Expression von AATF vermindert werden. Der Knockdown von AATF konnte mittels Western Blot-Analyse bestätigt werden.

Für die Immunfluoreszenz-Versuche wurden HCT 116 p53 +/+ Zellen in 12-well-Platten ausgesät und am Folgetag, wie unter 2.2.2 beschrieben, mittels Lipofectamine transfiziert. Die Transfektion erfolgte hierbei mit der von Invitrogen kommerziell erhältlichen „Stealth Select RNAi™ siRNA“ für AATF und die der Kontrollzellen mit der ebenfalls von Invitrogen erhältlichen „Stealth RNAi™ siRNA Negative Control“.

2.2.11 Immunfluoreszenzmikroskopie

Ähnlich wie bei der Detektion von Proteinen auf proteinbindenden Membranen, basiert das Prinzip der immunhistochemischen Untersuchung von Zellen auf der Erkennung spezifischer Epitope durch Primärantikörper. Die subzelluläre Lokalisation verschiedener Proteine kann durch speziesspezifische Bindung von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern an die Primärantikörper bestimmt werden.

Die hier verwendeten Sekundärantikörper waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Indocarbocyanin, rot) konjugiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit dem Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, blau).

Die Versuche wurden mit HCT 116 p53 +/+ Zellen durchgeführt. Dazu mussten die Zellen auf kollagenbeschichteten Glasplättchen in 12-well-Platten ausgesät (s. 2.2.1) und für den Knockdown von AATF transfiziert (s. 2.2.9) werden. Ein Tag später erfolgte die Schädigung der DNA mit 50 J/m² UV-C (s. 2.2.5) und eine erneute Inkubation der Zellen im Brutschrank für 1-48 Stunden.

Die Fixierung der Zellen mittels PFA erfolgte zu Unterschiedlichen Zeitpunkten nach der DNA-Schädigung (1 Stunde, 12 Stunden und 48 Stunden danach).

Zur Fixierung wurde dann das Medium abgesaugt und unter einem Abzug pro Well 1 ml auf Raumtemperatur vorgewärmte 4%ige PFA-Lösung hinzugefügt. Nach 15 min wurde das PFA abgenommen und gesondert entsorgt. Es erfolgte ein dreimaliger vorsichtiger Waschschrift der Zellen mit 1 ml dPBS+ für je 3 min. Daraufhin wurden die Zellmembranen mit dPBS-T über Nacht permeabilisiert und unspezifische Antikörperbindungsstellen durch die Zugabe von 5% NDS blockiert. Anschließend erfolgte dreimalig ein Waschschrift mit dPBS+ für je 3 min. Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper musste die DNA der Zellen noch denaturiert werden. Hierzu wurden die Zellen auf einem Shaker bei 37 °C für 5 min in einer 2 M HCL-Lösung inkubiert. Die Zellen mussten danach erneut dreimal mit dPBS+ für je 3 min gewaschen werden. Nach diesem Waschschrift wurden die Glasplättchen in eine feuchte Kammer überführt und der Primärantikörper für 5 Stunden auf die Zellen gegeben. Es folgte dreimaliges Waschen mit dPBS+ und danach die Inkubation der Zellen mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde. Nach erneutem Waschen mit dPBS+ folgte ein letzter Waschschrift der Glasplättchen mit H₂O. Anschließend wurden die Glasplättchen mit DAPI ProLong Gold auf den Objektträgern fixiert und für mindestens 24 Stunden im Dunkeln getrocknet.

Die Ergebnisse wurden durch ein Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 2) und dessen Software am PC dokumentiert und analysiert. Die Auswertung erfolgte durch das Zählen von Zellkernen, die mittels anti-CPD-Antikörper angefärbt waren. Hierzu wurden pro

Zeitpunkt in 4 repräsentativen Gesichtsfeldern die durch das Staining im Cy3-Kanal deutlich erkennbaren Zellkerne gezählt und anschließend mit der Gesamtzahl der Zellkerne in den einzelnen Gesichtsfeldern (DAPI-Kanal) in Relation gesetzt. So konnte die Prozentzahl der Zellen mit noch vorhandenem DNA-Schaden pro Zeitpunkt ermittelt werden.

3 Ergebnisse

3.1 AATF transloziert nach UV-C-Bestrahlung in den Zellkern

Wie Vordaten zeigen, interagiert AATF in unbehandelten Zellen mit dem Zytoskelett-assoziierten Protein MRLC3. Diese Bindung geht nach Behandlung der Zellen mit genotoxischen Stimuli, wie beispielsweise Doxorubicin oder UV-C-Bestrahlung, verloren. Die Aminosäuresequenz von AATF enthält mehrere nukleäre Lokalisationssignale. Somit stellte sich die Frage, ob es nach dem Loslösen von AATF aus seiner zytoskelettalen Bindung zu einer Translokation des Proteins in den Zellkern kommt.

Um dieser Frage nachzugehen, bestimmten wir den Gehalt an AATF in Zellkernen von HCT 116 p53 +/+ Zellen. Eine Stunde vor der Zellernte erfolgte eine Bestrahlung der Zellen mit UV-C-Licht. Die Kontrollzellen erhielten einen Mediumswechsel, blieben aber unbestrahlt. Anschließend wurden nach hypotoner Lyse der Zellen die Zellkerne abzentrifugiert. Nach der Auftrennung der zytoplasmatischen und nukleären Proteinfraktion mittels SDS-PAGE erfolgte der Nachweis von endogenem AATF im Western Blot mit einem AATF-spezifischen Antikörper. Die Immunfärbung auf Fibrillarin und Tubulin diente als

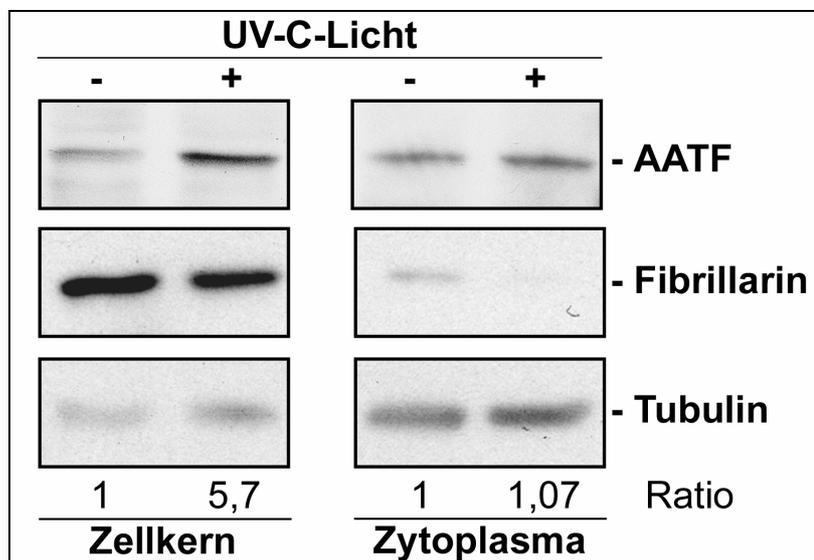


Abb. 3.1.1: Zellstress verändert die subzelluläre Lokalisation von AATF

Western Blot der Zellkern- und Zytoplasmafraktion von HCT 116 p53 +/+ Zellen ohne bzw. 1 Stunde nach UV-C-Bestrahlung. Fibrillarin dient als nukleärer, Tubulin als zytoplasmatischer Ladungsmarker. Die Ratio zwischen AATF und Fibrillarin bzw. Tubulin wurde mithilfe der ImageJ Software durch Densitometrie ermittelt.

Kontrolle für die Reinheit der Präparation und als Ladungskontrolle. Die densitometrische Analyse des Blots zeigt, dass der nukleäre Gehalt von AATF nach UV-Bestrahlung etwa 5 Mal größer ist als in unbehandelten Zellen (Abb. 3.1.1).

3.1.1 Die Translokation von AATF ist phosphorylierungsabhängig

Die Signalübermittlung nach einem DNA-Schaden wird durch konservierte Serin-/Threoninkinasen und Phosphoserin-/Phosphothreonin-Bindedomänen kontrolliert (Kastan und Bartek, 2004). Unsere Arbeitsgruppe fand heraus, dass die Phosphorylierung von AATF an Threonin 366 zu einem Aufbrechen der Bindung zwischen AATF und MRLC3 führt. Wir stellten daher die Frage, ob die Translokation von AATF in den Zellkern durch eine Phosphorylierung kontrolliert ist.

Zur Untersuchung dieser Frage behandelten wir HCT 116 p53 +/+ Zellen mit Okadasäure, einem Phosphatase-Inhibitor. Durch die Hemmung der zytoplasmatischen Serin-/Threonin-spezifischen Phosphatasen kommt es in der Zelle zu einer Verschiebung des Steady States zugunsten phosphorylierter Proteine. Es wurden drei 10cm-Schalen von HCT 116 p53 +/+ Zellen mit Okadasäure inkubiert. Drei weitere Zellschalen dienten als Negativkontrolle und blieben unbehandelt. Behandelte sowie unbehandelte Zellen wurden nach hypotoner Lyse, wie oben beschrieben, fraktioniert und endogenes AATF im Western

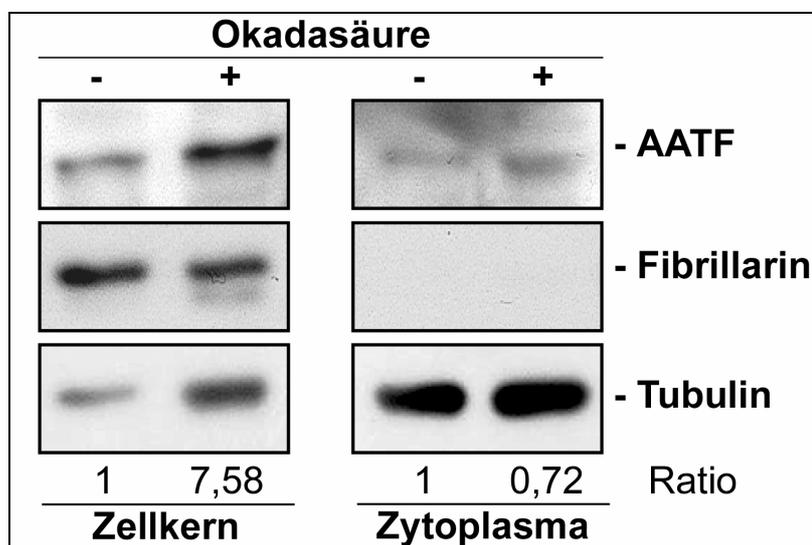


Abb. 3.1.2: Phosphorylierung verändert die subzelluläre Lokalisation von AATF

Western Blot der Zellkern- und Zytoplasmafraktion von HCT 116 p53 +/+ Zellen ohne bzw. 1 Stunde nach Behandlung mit Okadasäure. Fibrillarin dient als nukleärer, Tubulin als zytoplasmatischer Ladungsmarker. Die Ratio zwischen AATF und Fibrillarin bzw. Tubulin wurde mithilfe der ImageJ Software durch Densitometrie ermittelt.

Blot nachgewiesen. Der Nachweis von Fibrillarin und Tubulin diene als Ladungsmarker. Wie in der Abbildung 3.1.2 dargestellt, liegt nach der Behandlung mit Okadasäure deutlich mehr AATF in der Zellkernfraktion vor. Im Gegenzug nimmt die Menge von AATF im Zytoplasma durch die Behandlung mit Okadasäure ab. Die Inhibition der Phosphatasen und somit die Anreicherung von phosphoryliertem AATF in den Zellen bewirkt eine vermehrte Wanderung von AATF aus dem Zytoplasma in den Zellkern.

Das Ergebnis legt nahe, dass die subzelluläre Lokalisation von AATF von der Phosphorylierung durch Serin-/Threoninkinasen gesteuert wird. Im ruhenden Zustand scheint AATF im Zytoplasma an MRLC3 gebunden vorzuliegen. Nach der Phosphorylierung von AATF wird diese Bindung gelöst und es kommt zu einer Anreicherung von AATF im Zellkern.

3.2 AATF ist ein Substrat des p38 MAPK-Signalwegs

Um uns der Frage zu nähern, welche Kinase AATF an Threonin 366 phosphoryliert, testeten wir die nukleäre Translokation von AATF nach verschiedenen Stimuli.

Wie in den vorigen Experimenten gezeigt wurde, ist die subzelluläre Lokalisation von AATF nach genotoxischem Stress von dessen Phosphorylierungszustand abhängig. Es stellte sich jetzt die Frage, welche Kinase für diese Phosphorylierung verantwortlich sein könnte. Da AATF in ruhenden Zellen vermehrt an MRLC3 gebunden im Zytoplasma vorliegt, muss auch die Phosphorylierung in diesem Zellkompartiment stattfinden. AATF ist als ein Substrat der Kinasen ATM/ATR und dessen Effektorinasen CHK1/CHK2 beschrieben (Bruno et al., 2006). Der Hauptwirkort dieser Kinasen liegt jedoch im Zellkern und nicht im Zytoplasma (Zannini et al., 2003; Reinhardt et al., 2010).

Ein weiterer Signalweg, der durch Zellstress aktiviert wird, ist der p38 MAPK-Signalweg. Die MAPKAP Kinase 2 (MK2) stellt eine Effektorkinase dieses Signalwegs dar und zeigt eine ähnliche Substratspezifität wie CHK1 und CHK2. Nach einem DNA-Schaden wird MK2 im Zellkern aktiviert und wandert daraufhin in das Zytoplasma (Ben-Levy et al., 1998; Reinhardt et al., 2010).

3.2.1 Hyperosmolarer Stress bewirkt eine Translokation von AATF

Der p38 MAPK-Signalweg wird durch eine Vielzahl von Reizen angesprochen. Darunter fallen unter anderem die Bestrahlung mit UV-Licht, reaktive Sauerstoffspezies und inflammatorische Signale (Kyriakis und Avruch, 2001). Durch diese Stimuli werden meist mehrere Signalwege parallel aktiviert, so auch die Signalwege von CHK1/2. Im Gegensatz dazu aktiviert hyperosmolarer Stress die p38 MAPK selektiv, wobei CHK1/2 keine Aktivierung erfahren (Han et al., 1994).

In einem Experiment sollte nun überprüft werden, ob hyperosmolarer Stress zu einer Änderung der subzellulären Lokalisation von AATF führt. Hierzu wurden HCT 116 p53 +/+ Zellen für 10 Minuten einer hyperosmolaren Ringer-Lösung ausgesetzt. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle. Nach Separation und Aufreinigung der nukleären und zytoplasmatischen Proteinfractionen der Zellen wurde endogenes AATF in den einzelnen Fraktionen im Western Blot analysiert. Die Abbildung 3.2.1 zeigt, dass die Behandlung der Zellen mit einer hyperosmolaren Lösung zu einer deutlichen Zunahme von AATF in der Zellkernfraktion führt. Ebenso ist nach der Behandlung eine leichte Abnahme von AATF im Zytoplasma zu erkennen. Dies deutet daraufhin, dass tatsächlich die Aktivierung des p38-Signalwegs für die subzelluläre Translokation von AATF verantwortlich ist.

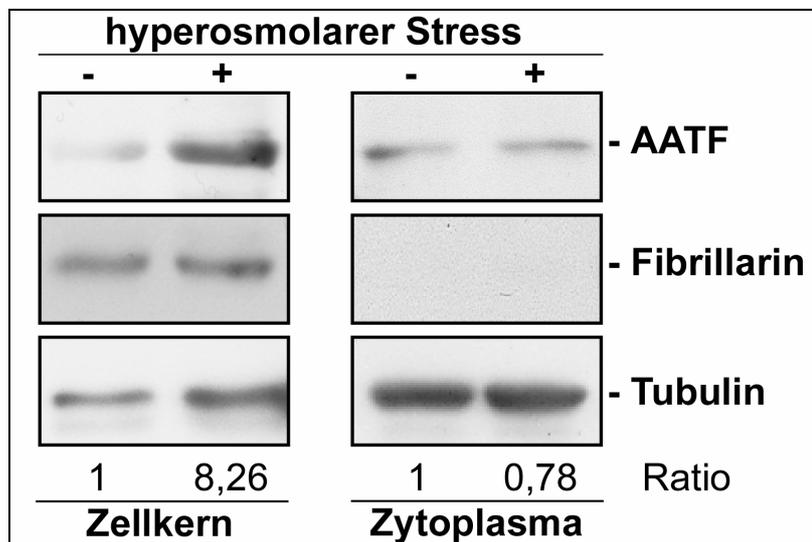


Abb. 3.2.1: Hyperosmolarer Stress verändert die subzelluläre Lokalisation von AATF

Western Blot der Zellkern- und Zytoplasmafraktion von HCT 116 p53 +/+ Zellen ohne bzw. 10 Minuten nach Behandlung mit einer hyperosmolaren Ringer-Lösung. Fibrillarin dient als nukleärer, Tubulin als zytoplasmatischer Ladungsmarker. Die Ratio zwischen AATF und Fibrillarin bzw. Tubulin wurde mithilfe der ImageJ Software durch Densitometrie ermittelt.

3.2.2 Überexpression von p38 beeinflusst die Lokalisation von AATF

Es konnte im Vorigen gezeigt werden, dass die spezifische Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs durch hyperosmolaren Stress zur Veränderung der Lokalisation von AATF beiträgt. Diese p38-Abhängigkeit sollte nun in einem Experiment mit p38-Überexpression weiter gefestigt werden. Hierzu wurden HEK 293T Zellen transient mit FLAG-markiertem p38 (p38.FLAG) transfiziert. Als Negativkontrolle diente die transiente Transfektion eines

FLAG-markierten Kontrollproteins (FLAG.Kontrolle). Als Positivkontrolle erfolgte eine Stunde vor der Zellernte bei untransfizierten Zellen eine Bestrahlung mit UV-C-Licht. Nach der Separation und Aufreinigung der nukleären und zytoplasmatischen Proteine wurden die Proteinfraktionen der Zellgruppen im Western Blot miteinander verglichen. Es erfolgte der Nachweis von endogenem AATF und der Ladungsmarker Fibrillarin und Tubulin. Zur Expressionskontrolle wurde in den Lysaten p38.FLAG und FLAG.Kontrolle mit einem anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.2.2 dargestellt.

Im Vergleich zu Zellen, die mit Kontrollprotein transfiziert waren, findet sich nach Überexpression von p38 mehr AATF im Nukleus. Im Zytoplasma zeigt AATF bei p38-Überexpression eine leichte Abnahme, wobei nach UV-C-Bestrahlung eine leichte Zunahme zu erkennen ist.

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass der p38-Signalweg für die Phosphorylierung und Translokation von AATF mitverantwortlich ist und AATF somit ein Substrat des p38 MAPK-Signalwegs darstellt.

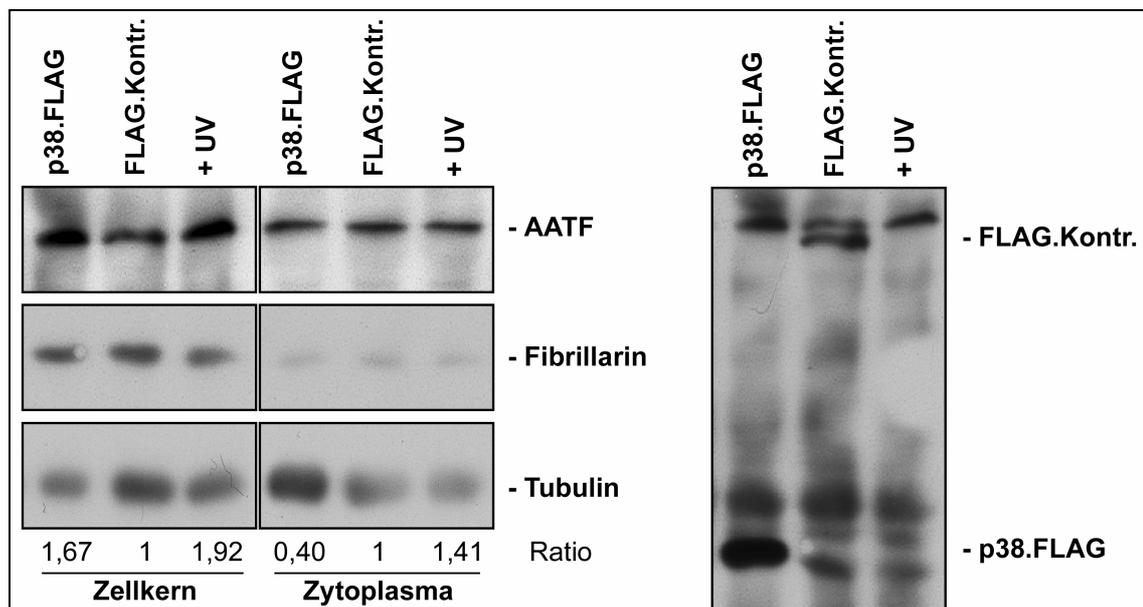


Abb. 3.2.2: Die Überexpression von p38 bewirkt eine nukleäre Translokation von AATF

Links: Western Blot der Zellkern- und Zytoplasmafraktion von HEK 293T Zellen mit Überexpression von p38 (p38.FLAG) bzw. eines Kontrollproteins (FLAG.Kontr.) bzw. 1 Stunde nach Bestrahlung mit 50 J/m² UV-C-Licht (+ UV). Fibrillarin dient als nukleärer, Tubulin als zytoplasmatischer Ladungsmarker. Die Ratio zwischen AATF und Fibrillarin bzw. Tubulin wurde mithilfe der ImageJ Software durch Densitometrie ermittelt.

Rechts: Western Blot der Zellysate zum Expressionsnachweis der transfizierten Plasmide mit einem anti-FLAG-Antikörper.

3.2.3 p38-Inhibition verringert die nukleäre Translokation von AATF

Nach der spezifischen Aktivierung durch hyperosmolaren Stress und der Überexpression sollte nun eine Inhibition von p38 durchgeführt und dessen Wirkung auf die subzelluläre Lokalisation von AATF nach UV-C-Bestrahlung untersucht werden. Hierzu kam der spezifische p38-Inhibitor SB203580 zum Einsatz. Dieser hemmt die katalytische Aktivität von p38 und somit die Phosphorylierung und Aktivierung der Effektor kinase MK2 ohne die Phosphorylierung von p38 selbst zu beeinflussen. Wenn AATF ein Substrat des p38 MAPK-Signalwegs darstellt, dann sollte die Hemmung von p38 die Translokation von AATF in den Zellkern nach der Bestrahlung mit UV-C-Licht vermindern.

Um diese Annahme zu testen, wurden HCT 116 p53 +/+ Zellen eine halbe Stunde lang in Zellmedium mit 10 μ M SB203580 bei 37 °C vorinkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Anschließend erfolgte bei allen Zellschalen eine Bestrahlung mit UV-C-Licht. Eine Stunde nach der Bestrahlung wurden die Zellen schließlich geerntet und lysiert. Nach der Fraktionierung der nukleären und zytoplasmatischen Zellbestandteile wurden die Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von AATF, Fibrillarin und Tubulin im Western Blot zeigt, dass es nach Bestrahlung mit UV-C-Licht unter Hemmung von p38 zu einer deutlich verminderten Anreicherung von AATF in der Zellkernfraktion kommt.

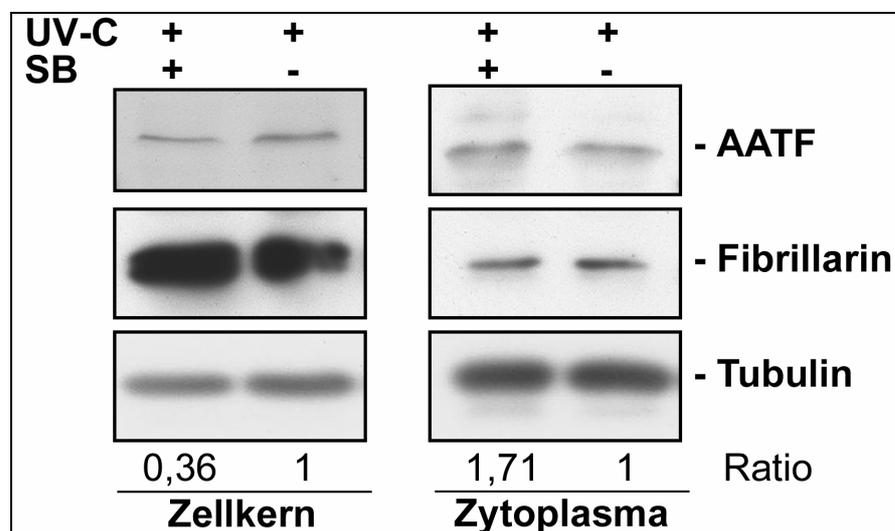


Abb. 3.2.3: Eine Inhibition von p38 vermindert nach UV-C-Bestrahlung die nukleäre Translokation von AATF

Western Blot der Zellkern- und Zytoplasmafraktion von HCT 116 p53 +/+ Zellen 1 Stunde nach der Bestrahlung mit UV-C-Licht mit bzw. ohne Vorbehandlung (halbe Stunde vor Bestrahlung) mit 10 μ M SB203580 (spezifischer p38-Inhibitor). Fibrillarin dient als nukleärer, Tubulin als zytoplasmatischer Ladungsmarker. Die Ratio zwischen AATF und Fibrillarin bzw. Tubulin wurde mithilfe der ImageJ Software durch Densitometrie ermittelt.

Im Gegenzug ist AATF nach der p38-Hemmung stärker im Zytoplasma vertreten, als ohne die Behandlung mit SB203580 (Abb. 3.2.3). Die Inhibition von p38 und somit auch von MK2 verringert also die nukleäre Translokation von AATF nach genotoxischem Stress. Dies erhärtet weiter die Annahme, dass AATF ein Substrat des p38 MAPK-Signalwegs darstellt und nach Aktivierung vom Zytoplasma in den Zellkern wandert.

In den vorigen Experimenten konnte somit gezeigt werden, dass AATF nach der spezifischen Aktivierung von p38 durch hyperosmolaren Stress vermehrt im Zellkern lokalisiert ist. Gleiches war nach der Überexpression von p38 zu sehen. Andererseits konnte die Wanderung von AATF aus dem Zytoplasma in den Zellkern nach einer Bestrahlung mit UV-C-Licht durch eine Hemmung von p38 verhindert werden. Der p38 MAPK-Signalweg scheint damit für die Phosphorylierung und nukleäre Translokation von AATF nach genotoxischem Stress verantwortlich zu sein. AATF besitzt auch ein Erkennungsmotiv der MAPKAP Kinase 2 (MK2). Ob allerdings MK2 direkt für die Phosphorylierung und Translokation von AATF verantwortlich ist, muss noch in weiteren Experimenten untersucht werden.

3.3 Die Rolle von AATF bei der Reparatur von UV-induzierten DNA-Schäden

Als nächstes stellten wir die Frage, welche Funktion AATF nach der Translokation in den Zellkern erfüllt. Da die Translokation von AATF in den Zellkern nach genotoxischem Schaden stattfindet und AATF im Kern von den DNA Damage Response Kinasen ATM/ATR und CHK1/2 phosphoryliert wird (Bruno et al., 2006), vermuteten wir eine Funktion von AATF in der Reparatur von DNA-Schäden.

Als direkte Folge der Bestrahlung mit UV-C-Licht kommt es in der DNA von Zellen zur Bildung von Dimeren benachbarter Basen, besonders zweier Thyminen. So entstehen neben Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) auch 6-4-Pyrimidin-Pyrimidone oder 6-4-Photoproducte (6-4-PP) (Cadet et al., 1992). Die gesunde Zelle kann diese DNA-Schäden innerhalb weniger Stunden reparieren. Sowohl CPDs als auch 6-4-PPs werden von spezifischen Antikörpern erkannt und können mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht werden. Um den Einfluss von AATF auf die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden herauszuarbeiten, bestrahlten wir AATF-profiziente und -defiziente HCT 116 p53 +/+ Zellen mit UV-C-Licht. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung fixiert und CP-Dimere wie unter 2.2.11 beschrieben mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. Pro Zeitpunkt wurden in 4 repräsentativen Gesichtsfeldern die Zellkerne mit deutlicher CPD-Anfärbung und die Gesamtzahl der Zellkerne ins Ver-

hältnis gesetzt. So konnte der Anteil der Zellen mit noch vorhandenem DNA-Schaden über die Zeit hinweg beurteilt werden. Hierzu erfolgte eine transiente Transfektion von HCT 116 p53 +/+ Zellen mit siRNA gegen AATF bzw. einem Kontrollkonstrukt. Die Abbildung 3.3.1a zeigt eine Kontrolle des Knockdowns von AATF im Western Blot nach Präparation der nukleären und der zytoplasmatischen Proteine. Man sieht, dass durch die Transfektion der siRNA auch noch 48 Stunden nach der Bestrahlung AATF deutlich vermindert vorliegt. In der Abbildung 3.3.1b sind Immunfluoreszenzaufnahmen der einzelnen Zeitpunkte in der CPD- und DAPI-Färbung dargestellt. Es ist zu sehen, dass es 1 Stunde nach der Bestrahlung zu einer vorwiegend nukleären Anreicherung der anti-CPD-Antikörper kommt. Das nukleäre Signal nimmt im Verlauf mit Fortschreiten des Reparaturprozesses ab. Über die Zeit hinweg kommt es zu einer zunehmenden zytoplasmatischen Ablagerung der Antikörper, wobei die nukleäre Anreicherung abnimmt. Dies zeigt die stattfindende Reparatur der Basen-Dimere. In AATF-profizienten Zellen ist nach 12 und 48 Stunden das nukleäre CPD-Signal schwächer als in Zellen mit AATF-Knockdown. Die Abbildung 3.3.1c stellt die Ergebnisse der statistischen Auswertung dar. Man sieht, dass die Reparatur der DNA-Schäden durch den Knockdown von AATF deutlich verlangsamt ist. In der Kontrollgruppe waren nach 48 Stunden bereits in mehr als 60 Prozent der Zellen die DNA-Schäden repariert, während in AATF-defizienten Zellen in mehr als der Hälfte der Zellen noch Schäden bestanden. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war allerdings nicht signifikant. Dennoch spricht dieses Ergebnis dafür, dass AATF an der Reparatur von UV-C-induzierten DNA-Schäden beteiligt sein könnte. Jedoch sollten zur Validierung noch weitere Experimente durchgeführt werden.

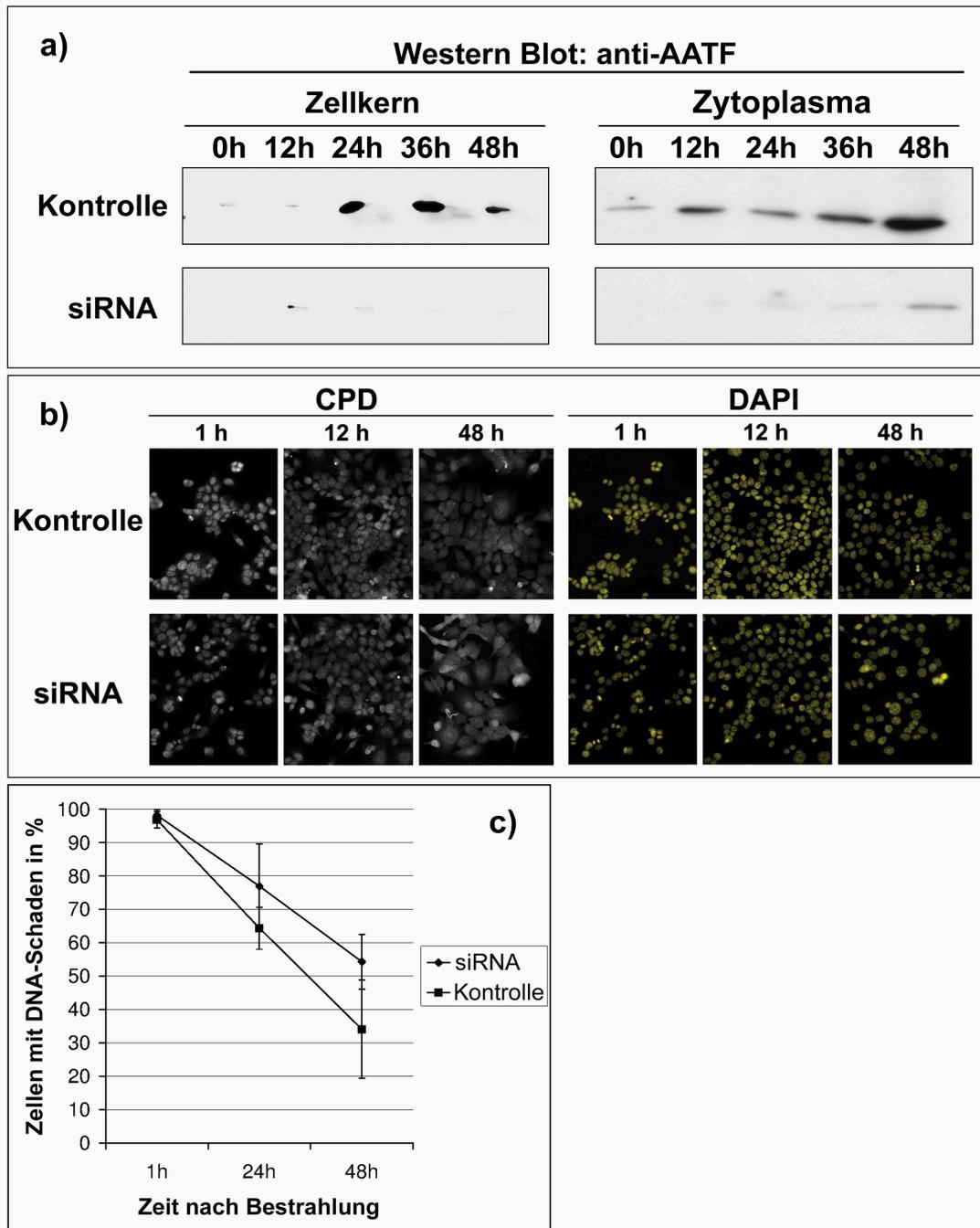


Abb. 3.3.1: Der Knockdown von AATF verlängert die Reparatur von UV-C-induzierten DNA-Schäden

- Western Blot der Zellkern- und Zytoplasmafraktion von HCT 116 p53 +/+ Zellen nach transienter Transfektion mit siRNA gegen AATF (siRNA) bzw. einem Kontrollkonstrukt (Kontrolle) und 0h, 12h, 24h, 48h nach einer Bestrahlung mit 50 J/m² UV-C-Licht zur Erfolgskontrolle des Knockdowns von AATF.
- Immunfluoreszenzaufnahmen von HCT 116 p53 +/+ Zellen mit (siRNA) bzw. ohne (Kontrolle) AATF-Knockdown 1h, 12h, 48h nach einer Bestrahlung mit 50 J/m² UV-C-Licht. Mit einem anti-CPD-Antikörper erfolgte die Anfärbung der UV-induzierten Basen-Dimere. Die Zellkerne wurden mit einer DAPI-Färbung sichtbar gemacht.
- Vergleich des Reparaturverlaufs von UV-C-induzierten DNA-Schäden zwischen HCT 116 p53 +/+ Zellen mit (siRNA) und ohne (Kontrolle) AATF-Knockdown nach einer Bestrahlung mit 50 J/m² UV-C-Licht.

4 Diskussion

AATF spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation von Zellzyklus und Apoptose. Unter anderem durch Bindung der RNA Polymerase II kontrolliert AATF die Transkription von p53-Zielgenen sowie p53 selbst und reguliert damit Apoptose und Zellzyklus (Fanciulli et al., 2000; Bruno et al., 2006). In Zellkulturmodellen hemmt AATF die Progression des Zellzyklus und verringert die Apoptoserate (Page et al., 1999; Lindfors et al., 2000; Thomas et al., 2000; Bruno et al., 2002; Bruno et al., 2010). Tumorzellen, welche AATF überexprimieren zeigen eine gesteigerte Chemotherapie- und Bestrahlungs-Resistenz (Bruno et al., 2006; Bruno et al., 2010). Mit der AATF-abhängigen Regulation von p53-Zielgenen, wie BAX, BAK, PUMA und ggf. Cyclin I, sowie der Modulation der c-Jun-Antwort sind bereits vielfältige Funktionen des Transkriptionsfaktors AATF beschrieben (Bruno et al., 2010; Höpker et al., 2012; Ferraris et al., 2012). Über die Regulation von AATF selbst war allerdings wenig bekannt.

Wie für einen Transkriptionsfaktor zu erwarten, ist AATF im Zellkern lokalisiert (Page et al., 1999; Andersen et al., 2002). Allerdings kann AATF auch im Zytoplasma nachgewiesen werden (Barbato et al., 2003; Di Certo et al., 2007) und besitzt in seiner Aminosäuresequenz ein nukleäres Lokalisationssignal, so dass eine Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern denkbar wäre (Lindfors et al., 2000). Unsere Arbeitsgruppe hatte bereits gezeigt, dass AATF in ruhenden Zellen an dem zytoplasmatischen Protein MRLC3 (Myosin Regulatory Light Chain 3) gebunden vorliegt und dass sich diese Bindung nach genotoxischem Stress, wie UV-C-Bestrahlung oder Doxorubicin-Behandlung löst (Höpker et al., 2012). Bedingung für die Aufgabe der Bindung zwischen AATF und MRLC3 ist die Phosphorylierung von AATF an Threonin 366. Wir erstellten die Hypothese, dass AATF nach Loslösung von MRLC3 in den Zellkern transloziert. Tatsächlich konnten wir nach genotoxischem Stress vermehrt AATF im Zellkern nachweisen (siehe 3.1). Auch nach der Behandlung mit Okadasäure und damit einer Hemmung der zytoplasmatischen Serin-/Threonin-spezifischen Phosphatasen und Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts hin zur phosphorylierten Form fand sich signifikant mehr AATF im Zellkern (siehe 3.1.1). Diese Ergebnisse deuten auf eine phosphorylierungsabhängige Regulation der subzellulären Lokalisation von AATF hin. AATF besitzt typische Phosphorylierungsmotive basophiler Kinasen, so auch um Threonin 366. Damit ist AATF ein mögliches Phosphorylierungs-Substrat von Serin-/Threoninkinasen der PK-Familie (PKA, PKB, PKC), der DNA-Damage-Kinasen wie CHK1/CHK2, sowie der MAP Kinasen wie p38 und MK2. Unserer Hypothese nach musste die gesuchte Kinase im Zytoplasma verfügbar sein, um dort das an

MRLC3-gebundene AATF zu phosphorylieren. Um nun herauszufinden, welche Kinase die Phosphorylierung vermittelt, stellten wir Experimente an, die uns halfen die möglichen Kinasen einzugrenzen. Zwar ist AATF als ein Substrat der Kinasen ATM/ATR und deren Effektorinasen CHK1/CHK2 beschrieben (Bruno et al., 2006), jedoch lokalisieren diese Kinasen ausschließlich in den Zellkern und nicht ins Zytoplasma (Zannini et al., 2003; Reinhardt et al., 2010). Daher kommen sie nicht für die zytoplasmatische Phosphorylierung von AATF, wie sie von uns erwartet wird, in Frage. Der MAP Kinase-Signalweg hat sowohl zytoplasmatische, wie auch nukleäre Zielproteine und wird von verschiedenen extrazellulären Stimuli aktiviert. Dazu gehört neben genotoxischen Stimuli z.B. auch eine hyperosmolare Zellumgebung (Han et al., 1994). Hyperosmolarer Stress aktiviert dagegen nicht PKA-C, ATM/ATR oder CHK1/2 (Matusaka und Pines, 2004; Mikhailov et al., 2004). In unseren Untersuchungen führte hyperosmolarer Stress zur Verlagerung von AATF in den Zellkern (siehe 3.2.1). Ebenso kam es nach der Überexpression einer aktiven p38 MAP Kinase zu einer vermehrten nukleären Anreicherung von AATF (siehe 3.2.2). Die Hemmung von p38 mit einem spezifischen, kleinen molekularen Inhibitor (SB203580) verhinderte die nukleäre Translokation von AATF nach einer Bestrahlung mit UV-C-Licht (siehe 3.2.3). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass eine Kinase des p38 MAPK-Signalwegs für die Phosphorylierung und damit auch für die nukleäre Translokation von AATF nach verschiedenen Arten von Stress verantwortlich ist.

AATF besitzt zwei mögliche nukleäre Lokalisationssignale (NLS) in der Aminosäuresequenz von 275 bis 296 und von 440 bis 475 (Lindfors et al., 2000). Die von uns identifizierte Phosphorylierungsstelle für basophile Kinasen am Threonin 366 der AATF Sequenz liegt damit zwischen den beiden NLS. Aufgrund der engen Nachbarschaft der NLS zum Threonin 366 wäre denkbar, dass die Phosphorylierung des Threonins 366 zu einer Konformationsänderung des AATF-Proteins und damit zu einer Freilegung der nukleären Lokalisationssequenzen führt. Dies könnte die Interaktion von AATF mit dem nukleären Transportapparat erlauben und somit den Transport in den Zellkern ermöglichen. Zur weiteren Abklärung dieser Hypothese wäre die Durchführung von Zellkultur-Experimenten mit punktmutierten Formen von AATF denkbar. Eine Punktmutation des Threonins 366 von AATF zu Aspartat oder Glutamat würde eine dauerhafte Phosphorylierung an dieser Stelle imitieren. Nach Überexpression dieser phosphorylierungsimitierenden Mutante in Zellen sollte AATF auch ohne die Einwirkung von Zellstress hauptsächlich im Zellkern lokalisiert sein. Gegensätzlich hierzu könnte AATF mit einer Punktmutation des Threonins 366 zu Alanin an dieser Stelle nicht mehr phosphoryliert werden. Eine Expression dieser nicht-phosphorylierungsfähigen Mutante sollte bereits in Ruhe eine ausschließ-

liche Lokalisation von AATF im Zytoplasma zeigen. Eine nukleäre Translokation von AATF nach dem Einwirken von Zellstress sollte dabei nicht mehr möglich sein. Einschränkung ist allerdings zu sagen, dass die transiente Überexpression aufgrund des Überangebots des exprimierten Proteins die subzelluläre Lokalisation verändern kann. Gegebenenfalls wäre daher eine Expression aus low-copy Expressionssystemen für dieses Experiment sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein neuer molekularer Mechanismus der Regulation von AATF charakterisiert werden. In den ruhenden Zellen wird AATF durch die Bindung an MRLC3 im Zytoplasma gehalten. Somit bleibt der Transkriptionsfaktor von den Interaktionspartnern an seinem Wirkort, dem Zellkern, getrennt. Nach Phosphorylierung durch eine Kinase des p38 MAPK-Signalwegs im Rahmen von Zellstress wird AATF frei, gelangt in den Zellkern und kann dort seine Funktion ausüben. Ein ähnlicher phosphorylierungsabhängiger Regulationsmechanismus der Proteinfunktion und der Wirkung auf den Zellzyklus im Rahmen der DNA Damage Response ist beispielsweise für den aktivierenden Transkriptionsfaktor 2 (ATF2) beschrieben (Lau und Ronai, 2012). Auch hier wird die subzelluläre Lokalisation von ATF2 phosphorylierungsabhängig bestimmt und somit die Wechselwirkung von ATF2 mit seinen verschiedenen Interaktionspartnern im Zellkern und Zytoplasma reguliert. Je nach Wirkort von ATF2 ist die endgültige Wirkung schließlich unterschiedlich.

Ob die p38 MAP Kinase selbst oder eine ihrer Effektor kinase downstream die Phosphorylierung von AATF vermittelt, ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend klären. Nach einem DNA-Schaden wird p38 im Zytoplasma aktiviert und transloziert in den Zellkern. Dort phosphoryliert sie die MAPKAP Kinase 2, welche daraufhin in das Zytoplasma entlassen wird und Zielproteine phosphoryliert (Ben-Levy et al., 1998; Reinhardt et al., 2010). In silico Aminosäuresequenzanalysen von AATF mit Hilfe der GPS-Software (Xue et al., 2008) haben gezeigt, dass die MK2 auch das basophile Kinasemotiv um Threonin 366 in der Aminosäuresequenz von AATF erkennt und somit auch MK2 für die direkte Phosphorylierung und die Regulation der subzellulären Lokalisation von AATF verantwortlich sein könnte. Dies muss jedoch noch in weiteren Experimenten untersucht werden. Hierzu wären einerseits Zellkulturversuche mit einer Überexpression von MK2 möglich. Eine Überexpression von MK2 sollte, ähnlich wie im vorliegenden p38-Überexpressionsversuch, im Vergleich zu Kontrollzellen durch eine vermehrte Phosphorylierung von AATF zu einer gesteigerten Translokation von AATF in den Zellkern führen. Andererseits wären Knockdown-Versuche mit Hilfe von RNA-Interferenz sinnvoll. Die gezielte Herun-

terregulierung oder Ausschaltung von p38MAPK oder MK2 mit small hairpin RNA (shRNA) oder small interfering RNA (siRNA) sollte unserer Hypothese nach die Translokation von AATF in den Zellkern nach genotoxischem Stimulus aufheben. Eine Zellstress-vermittelte Anreicherung von AATF im Zellkern wäre daraufhin nicht mehr nachweisbar. Es wäre also ein Modell denkbar, nach dem AATF einen multi-modalen Stress-Messenger darstellt. Nach verschiedenen Formen des Zellstress wird AATF p38- oder MK2-abhängig phosphoryliert. Es kommt zur Translokation in den Zellkern, wo AATF auf ein Set aktiver Kinasen, wie beispielsweise die DNA Damage Kinasen ATM/ATR und CHK1/CHK2, trifft. Durch weitere Phosphorylierungen von AATF können gegebenenfalls die Bindungseigenschaften und damit die Promotor-Spezifität von AATF moduliert werden. Je nach Art des initialen Stress-Reizes kann das nukleäre Kinasen-Setup und damit

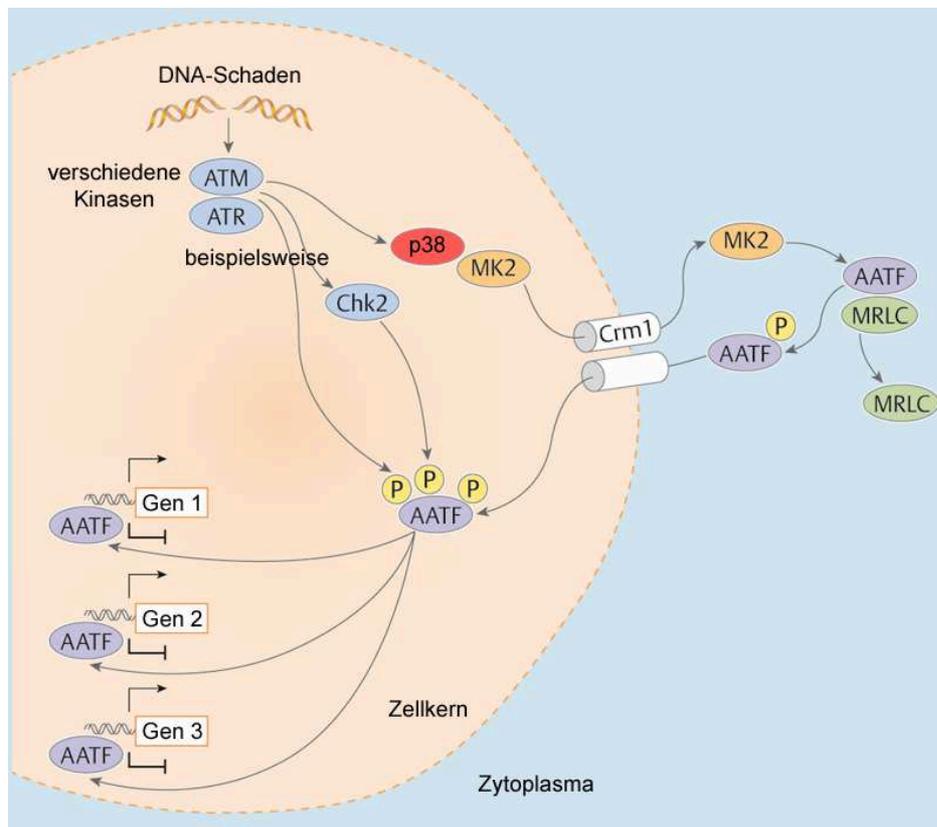


Abb. 4.1: AATF als multi-modaler Stress-Messenger

AATF wirkt nach einem DNA-Schaden im Zytoplasma phosphoryliert, löst sich von MRLC und wandert in den Zellkern. Dort wird AATF je nach Zellstress durch unterschiedliche Kinasen weiter phosphoryliert (hier bspw. ATM/ATR und CHK2), dies beeinflusst die Bindungsaktivität und Promotor-Spezifität von AATF. (modifiziert nach Höpker et al., 2013)

die weitere Phosphorylierung von AATF unterschiedlich ausfallen. AATF wäre somit ein zentraler Faktor in der Stressantwort der Zelle (siehe Abbildung 4.1).

Wir stellten uns in der vorliegenden Arbeit weiterhin die Frage, welche Funktion AATF nach der Translokation in den Zellkern ausübt. Neben antiapoptotischen Eigenschaften hatten Bruno et al. beschrieben, dass die Überexpression von AATF nach genotoxischem Stress auch zu einem verlängertem G2/M-Arrest führt (Bruno et al., 2006). Es wäre also denkbar, dass der durch AATF bedingte Zellzyklusarrest der Zelle Zeit gibt, um DNA-Schäden zu reparieren und die Zelle somit eher der mitotischen Katastrophe, wie sie bei einer Zellteilung mit beschädigter DNA geschieht, entgehen könnte. Mit der immunhistochemischen Anfärbung UV-induzierter DNA-Schäden konnten wir zeigen, dass der Reparaturprozess in AATF-defizienten Zellen verlangsamt abläuft (siehe 3.3.1). Der Unterschied zwischen AATF-profizienten und AATF-defizienten Zellen war hier jedoch nicht signifikant. In kultivierten Zellen können DNA-Schäden, wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und 6-4-Pyrimidin-Pyrimidone (6-4-PP), nach UV-Bestrahlung auf verschiedene Weise eliminiert werden oder letztlich nicht mehr nachweisbar sein. Den Hauptmechanismus in der einzelnen Zelle stellt die Reparatur und Beseitigung der Thymidin-Addukte mit Hilfe des physiologischen Reparaturprozesses dar. In der einzelnen Zelle trägt insbesondere die Transkriptions-Gekoppelte Reparatur (TCR) zur Beseitigung der UV-induzierten DNA-Schäden bei (Sarasin und Strydom, 2007). In einer Kultur von UV-geschädigten Zellen kommt es jedoch durch die Zellteilung nur leicht oder gar nicht geschädigter Zellen im Verlauf zu einer Verdünnung der Zellen mit noch vorhandenem DNA-Schaden. Schließlich trägt auch der Verlust von zu schwer geschädigten Zellen durch Apoptose und Zelltod zur Beseitigung von den nachweisbaren DNA-Schäden bei. Durch den im vorliegenden Experiment durchgeführten Knockdown von AATF könnte nicht nur direkt der Reparaturmechanismus der DNA-Schäden, sondern auch der Verdünnungs- und Apoptose-Aspekt beeinflusst worden sein. Der Knockdown von AATF führt in HCT 116 Zellen zu einer vermehrten Zellproliferation (Di Padova et al., 2003). Unterschiede der Proliferationsrate wären jedoch ein Störfaktor für unsere Untersuchung der DNA-Reparatur. In rasch proliferierenden Zelllinien würden Verdünnungseffekte den Anteil von nachweisbaren CPD oder 6-4-PPs reduzieren. In unseren Untersuchungen würden wir somit den Effekt des AATF-Knockdowns unterschätzen. Des Weiteren ist in AATF-defizienten Zellen die Apoptoserate nach genotoxischem Stress erhöht (Bruno et al., 2006). Das könnte dazu führen, dass AATF-defiziente Zellen mit signifikantem DNA-Schaden rascher zugrunde gehen. Eine Evaluation der Reparaturrate wäre nicht sicher möglich, denn auch in diesem Fall würden wir den Effekt unterschätzen. Eine geringere Strahlungs-

dosis des UV-C-Lichts könnte möglicherweise den Apoptose-Effekt vermindern. Dies war jedoch technisch in unserem Labor nicht durchführbar. Die Ergebnisse deuten dennoch daraufhin, dass AATF an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sein könnte. Weitere Untersuchungen könnten mit besser dosierbaren genotoxischen Substanzen, wie beispielsweise Doxorubicin oder Cisplatin durchgeführt werden.

Ebenso wäre interessant zu untersuchen, welche Wirkung AATF nach der nukleären Translokation auf die Transkription einzelner Zellzyklus- und Proapoptosegene ausübt und welche Gene AATF überhaupt beeinflusst. Bruno et al. beschreiben bereits, dass eine Verminderung von AATF zu einer gesteigerten Transkription der proapoptotischen Gene, wie PUMA und NOXA führt (Bruno et al., 2010). Um zu untersuchen welche weiteren Gene AATF beeinflusst, wäre die Durchführung von Chromatin-Immunoprecipitationsversuchen (ChIP) mit einer anschließenden Sequencinganalyse möglich. In Zellkulturexperimenten könnte so geschaut werden, an welche DNA-Abschnitte AATF bindet und von welchen Genen AATF möglicherweise die Transkription beeinflusst. Ebenso wäre es im Rahmen von ChIP-Versuchen möglich herauszufinden, ob sich das Bindungsverhalten von AATF unter verschiedenen Stressbedingungen ändert. Geht man von der überwiegend beschriebenen antiapoptotischen Wirkung von AATF aus, so könnte AATF einen negativen Einfluss auf die Transkription der weiteren proapoptotischen Gene, wie BAX und BAK haben. Die phosphorylierungsabhängige Regulation der subzellulären Lokalisation von AATF durch den p38 MAPK-Signalweg würde somit einen weiteren molekularen Mechanismus zur Kontrolle der Apoptose darstellen und könnte möglicherweise auch im Rahmen der Behandlung von Tumorerkrankungen ein Ziel sein.

5 Zusammenfassung

Die genomische Stabilität einer Zelle wird ständig durch innere und äußere Einflüsse bedroht. Für das Überleben und den Funktionserhalt der Zelle ist diese Stabilität jedoch von enormer Bedeutung. Deshalb besitzen eukaryotische Zellen komplexe, hoch konservierte Signalnetzwerke, die es den Zellen ermöglichen auf Schädigungen der Erbinformation und geänderte äußere Umstände zu reagieren. Die Zellen können dadurch ein Fortschreiten im Zellzyklus solange verhindern, bis entstandene DNA-Schäden repariert sind oder im Falle irreparabler Schäden können sie den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleiten. Die Mediatoren und Substrate dieser Signalwege werden unter den Begriffen der DNA Damage und Cellular Stress Response zusammengefasst. Die Signalübertragung erfolgt dabei weitestgehend durch posttranslationale Modifikation der einzelnen Signalwegkomponenten im Rahmen einer Phosphorylierungskaskade. Dabei spielen Mitglieder aus der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) eine zentrale Rolle.

Der Apoptosis Antagonizing Transcription Factor (AATF), auch Che-1 genannt, ist ein wichtiger Mediator der DNA Damage und der Cellular Stress Response und stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Er wurde ursprünglich als ein RNA Polymerase II bindendes Protein identifiziert. Hierdurch kann er die Transkription von Genprodukten beeinflussen, welche für die Apoptose- und Zellzyklusregulation wichtig sind. AATF besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen von hoch konservierten Serin-/Threoninkinasen, die in der Cellular Stress und DNA Damage Response eine bedeutende Rolle spielen. Die genaue Regulation der Funktion von AATF ist bisher jedoch unklar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass AATF in HCT 116 Zellen nach einer Bestrahlung mit UV-C-Licht aus dem Zytoplasma in den Zellkern wandert. Durch die Hemmung der zytoplasmatischen Serin-/Threonin-spezifischen Phosphatasen mit Okada-säure stellte sich eine Phosphorylierungsabhängigkeit dieser nukleären Translokation heraus. Als verantwortliche Kaskade für die Phosphorylierung und Translokation von AATF konnte mit Hilfe spezifischer Aktivierung, Überexpression und Hemmung der p38 MAPK-Signalweg identifiziert werden. Des Weiteren deuten Immunfluoreszenzversuche darauf hin, dass neben der Beeinflussung von Apoptose und Zellzyklus auch die Beteiligung an der Reparatur von DNA-Schäden eine Funktion von AATF nach der nukleären Translokation darstellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf einen molekularen Mechanismus hin, die Funktionen und Wirkung von AATF zu kontrollieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AKL, Lam YW, Steen H, Mann M, Lamond AI (2002): "Directed proteomic analysis of the human nucleolus." *Curr. Biol.*, 12(1): 1–11. PMID: 11790298.
2. Barbato C, Corbi N, Canu N, Fanciulli M, Serafino A, Ciotti M, Libri V, Bruno T, Amadoro G, Angelis R de, Calissano P, Passananti C (2003): "Rb binding protein Che-1 interacts with Tau in cerebellar granule neurons. Modulation during neuronal apoptosis." *Mol. Cell. Neurosci.*, 24(4): 1038–1050. PMID: 14697667.
3. Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ (1998): "Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2." *Curr. Biol.*, 8(19): 1049–1057. PMID: 9768359.
4. Bruno T, Angelis R de, Nicola F de, Barbato C, Di Padova M, Corbi N, Libri V, Benassi B, Mattei E, Chersi A, Soddu S, Floridi A, Passananti C, Fanciulli M (2002): "Che-1 affects cell growth by interfering with the recruitment of HDAC1 by Rb." *Cancer Cell*, 2(5): 387–399. PMID: 12450794.
5. Bruno T, Desantis A, Bossi G, Di Agostino S, Sorino C, Nicola F de, Iezzi S, Franchitto A, Benassi B, Galanti S, La Rosa F, Floridi A, Bellacosa A, Passananti C, Blandino G, Fanciulli M (2010): "Che-1 promotes tumor cell survival by sustaining mutant p53 transcription and inhibiting DNA damage response activation." *Cancer Cell*, 18(2): 122–134. PMID: 20708154.
6. Bruno T, Iezzi S, Nicola F de, Di Padova M, Desantis A, Scarsella M, Di Certo MG, Leonetti C, Floridi A, Passananti C, Fanciulli M (2008): "Che-1 activates XIAP expression in response to DNA damage." *Cell Death Differ.*, 15(3): 515–520. PMID: 18049476.
7. Bruno T, Nicola F de, Iezzi S, Lecis D, D'Angelo C, Di Padova M, Corbi N, Dimiziani L, Zannini L, Jekimovs C, Scarsella M, Porrello A, Chersi A, Crescenzi M, Leonetti C, Khanna KK, Soddu S, Floridi A, Passananti C, Delia D, Fanciulli M (2006): "Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint." *Cancer Cell*, 10(6): 473–486. PMID: 17157788.
8. Burgdorf S, Leister P, Scheidtmann KH (2004): "TSG101 interacts with apoptosis-antagonizing transcription factor and enhances androgen receptor-mediated transcription by promoting its monoubiquitination." *J. Biol. Chem.*, 279(17): 17524–17534. PMID: 14761944.
9. Cadet J, Anselmino C, Douki T, Voituriez L (1992): "Photochemistry of nucleic acids in cells." *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, 15(4): 277–298. PMID: 1432396.
10. Carthew RW, Sontheimer EJ (2009): "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." *Cell*, 136(4): 642–655. PMID: 19239886.
11. Castedo M, Perfettini J, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004): "Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition." *Oncogene*, 23(16): 2825–2837. PMID: 15077146.
12. Chen C, Okayama H (1987): "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." *Mol. Cell. Biol.*, 7(8): 2745–2752. PMID: 3670292.
13. Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001): "MAP kinases." *Chem. Rev.*, 101(8): 2449–2476. PMID: 11749383.

14. Ciccia A, Elledge SJ (2010): "The DNA damage response: making it safe to play with knives." *Mol. Cell*, 40(2): 179–204. PMID: 20965415.
15. Coulthard LR, White DE, Jones DL, McDermott MF, Burchill SA (2009): "p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics." *Trends Mol Med*, 15(8): 369–379. PMID: 19665431.
16. Cuadrado A, Nebreda AR (2010): "Mechanisms and functions of p38 MAPK signaling." *Biochem. J.*, 429(3): 403–417. PMID: 20626350.
17. Cuschieri J, Maier RV (2005): "Mitogen-activated protein kinase (MAPK)." *Crit. Care Med.*, 33(12 (Suppl.)): S417-419. PMID: 16340409.
18. Di Certo MG, Corbi N, Bruno T, Iezzi S, Nicola F de, Desantis A, Ciotti MT, Mattei E, Floridi A, Fanciulli M, Passananti C (2007): "NRAGE associates with the anti-apoptotic factor Che-1 and regulates its degradation to induce cell death." *J. Cell. Sci.*, 120(11): 1852–1858. PMID: 17488777.
19. Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994): "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts." *Genes Dev.*, 8(21): 2540–2551. PMID: 7958916.
20. Di Padova M, Bruno T, Nicola F de, Iezzi S, D'Angelo C, Gallo R, Nicosia D, Corbi N, Biroccio A, Floridi A, Passananti C, Fanciulli M (2003): "Che-1 arrests human colon carcinoma cell proliferation by displacing HDAC1 from the p21WAF1/CIP1 promoter." *J. Biol. Chem.*, 278(38): 36496–36504. PMID: 12847090.
21. Duch A, Nadal E de, Posas F (2012): "The p38 and Hog1 SAPKs control cell cycle progression in response to environmental stresses." *FEBS Lett.*, 586(18): 2925–2931. PMID: 22820251.
22. Eyers PA, Craxton M, Morrice N, Cohen P, Goedert M (1998): "Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution." *Chem. Biol.*, 5(6): 321–328. PMID: 9653550.
23. Fanciulli M, Bruno T, Di Padova M, Angelis R de, Iezzi S, Iacobini C, Floridi A, Passananti C (2000): "Identification of a novel partner of RNA polymerase II subunit 11, Che-1, which interacts with and affects the growth suppression function of Rb." *FASEB J.*, 14(7): 904–912. PMID: 10783144.
24. Ferraris SE, Isoniemi K, Torvaldson E, Anckar J, Westermarck J, Eriksson JE (2012): "Nucleolar AATF regulates c-Jun-mediated apoptosis." *Mol. Biol. Cell*, 23(21): 4323–4332. PMID: 22933572.
25. Graham FL, van der Eb AJ (1973): "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." *Virology*, 52(2): 456–467. PMID: 4705382.
26. Gültekin H, Heermann KH (1988): "The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix." *Anal. Biochem.*, 172(2): 320–329. PMID: 2461113.
27. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J (2008): "An oncogene-induced DNA damage model for cancer development." *Science*, 319(5868): 1352–1355. PMID: 18323444.
28. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ (1994): "A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells." *Science*, 265(5173): 808–811. PMID: 7914033.
29. Höpker K, Hagmann H, Khurshid S, Chen S, Hasskamp P, Seeger-Nukpezah T, Schilberg K, Heukamp L, Lamkemeyer T, Sos ML, Thomas RK, Lowery D, Roels F, Fischer M, Liebau MC, Resch U, Kisner T, Röther F, Bartram MP, Müller R, Fabretti F, Kurschat P, Schumacher B, Gaestel M, Medema RH, Yaffe MB, Schermer B, Reinhardt H, Benzing T (2012): "AATF/Che-1 acts as a phosphorylation-dependent

- molecular modulator to repress p53-driven apoptosis." *EMBO J*, 31(20): 3961–3975. PMID: 22909821.
30. Höpker K, Reinhardt H, Reinhardt HC (2013): "p53-regulierende Signaltransduktionskaskaden als Ziele für eine personalisierte Krebstherapie." *Dtsch med Wochenschr*, 138(3): 82–86. PMID: 23299342.
31. Jackson SP, Bartek J (2009): "The DNA-damage response in human biology and disease." *Nature*, 461(7267): 1071–1078. PMID: 19847258.
32. Kastan MB, Bartek J (2004): "Cell-cycle checkpoints and cancer." *Nature*, 432(7015): 316–323. PMID: 15549093.
33. Kaul D, Mehrotra A (2007): "Functional characterization of AATF transcriptome in human leukemic cells." *Mol. Cell. Biochem.*, 297(1-2): 215–220. PMID: 17006618.
34. Kumar S, Boehm J, Lee JC (2003): "p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases." *Nat Rev Drug Discov*, 2(9): 717–726. PMID: 12951578.
35. Kumar S, Jiang MS, Adams JL, Lee JC (1999): "Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 263(3): 825–831. PMID: 10512765.
36. Kyriakis JM, Avruch J (2001): "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." *Physiol. Rev.*, 81(2): 807–869. PMID: 11274345.
37. Lau E, Ronai ZA (2012): "ATF2 - at the crossroad of nuclear and cytosolic functions." *J. Cell. Sci.*, 125(Pt 12): 2815–2824. PMID: 22685333.
38. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW (1994): "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." *Nature*, 372(6508): 739–746. PMID: 7997261.
39. Lindahl T, Barnes DE (2000): "Repair of endogenous DNA damage." *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 65: 127–133. PMID: 12760027.
40. Lindfors K, Halttunen T, Huotari P, Nupponen N, Vihinen M, Visakorpi T, Mäki M, Kainulainen H (2000): "Identification of novel transcription factor-like gene from human intestinal cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 276(2): 660–666. PMID: 11027528.
41. Loyer A, Scangos G, Juricek D, Keene D, Ruddle FH (1982): "Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy." *Exp. Cell Res.*, 139(1): 223–234. PMID: 7084316.
42. Manke IA, Nguyen A, Lim D, Stewart MQ, Elia AEH, Yaffe MB (2005): "MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation." *Mol. Cell*, 17(1): 37–48. PMID: 15629715.
43. Matsusaka T, Pines J (2004): "Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells." *J. Cell Biol.*, 166(4): 507–516. PMID: 15302856.
44. Mikhailov A, Shinohara M, Rieder CL (2004): "Topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors delay the G2/M transition by triggering the p38 MAPK checkpoint pathway." *J. Cell Biol.*, 166(4): 517–526. PMID: 15302851.

45. Page G, Lödige I, Kögel D, Scheidtmann KH (1999): "AATF, a novel transcription factor that interacts with Dlk/ZIP kinase and interferes with apoptosis." FEBS Lett., 462(1-2): 187–191. PMID: 10580117.
46. Passananti C, Floridi A, Fanciulli M (2007): "Che-1/AATF, a multivalent adaptor connecting transcriptional regulation, checkpoint control, and apoptosis." Biochem. Cell Biol., 85(4): 477–483. PMID: 17713582.
47. Raugeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995): "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J. Biol. Chem., 270(13): 7420–7426. PMID: 7535770.
48. Reinhardt HC, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB (2007): "p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage." Cancer Cell, 11(2): 175–189. PMID: 17292828.
49. Reinhardt HC, Hasskamp P, Schmedding I, Morandell S, van Vugt MATM, Wang X, Linding R, Ong S, Weaver D, Carr SA, Yaffe MB (2010): "DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization." Mol. Cell, 40(1): 34–49. PMID: 20932473.
50. Rouse J, Jackson SP (2002): "Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage." Science, 297(5581): 547–551. PMID: 12142523.
51. Sarasin A, Strydom A (2007): "New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway." DNA Repair (Amst.), 6(2): 265–269. PMID: 17194629.
52. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y (1995): "A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase." Science, 268(5218): 1749–1753. PMID: 7792600.
53. Srivastava S, Zou ZQ, Pirolo K, Blattner W, Chang EH (1990): "Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome." Nature, 348(6303): 747–749. PMID: 2259385.
54. Thomas T, Voss AK, Petrou P, Gruss P (2000): "The murine gene, Traube, is essential for the growth of preimplantation embryos." Dev. Biol., 227(2): 324–342. PMID: 11071758.
55. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76(9): 4350–4354. PMID: 388439.
56. Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cerosaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanová E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A (1998): "Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome." Cell, 93(3): 467–476. PMID: 9590180.
57. Xie J, Guo Q (2004): "AATF protects neural cells against oxidative damage induced by amyloid beta-peptide." Neurobiol. Dis., 16(1): 150–157. PMID: 15207272.
58. Xie J, Guo Q (2006): "Apoptosis antagonizing transcription factor protects renal tubule cells against oxidative damage and apoptosis induced by ischemia-reperfusion." J. Am. Soc. Nephrol., 17(12): 3336–3346. PMID: 17065240.

59. Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X (2008): "GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy." *Mol. Cell Proteomics*, 7(9): 1598–1608. PMID: 18463090.
60. Young PR, McLaughlin MM, Kumar S, Kassis S, Doyle ML, McNulty D, Gallagher TF, Fisher S, McDonnell PC, Carr SA, Huddleston MJ, Seibel G, Porter TG, Livi GP, Adams JL, Lee JC (1997): "Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site." *J. Biol. Chem.*, 272(18): 12116–12121. PMID: 9115281.
61. Zannini L, Lecis D, Lisanti S, Benetti R, Buscemi G, Schneider C, Delia D (2003): "Karyopherin-alpha2 protein interacts with Chk2 and contributes to its nuclear import." *J. Biol. Chem.*, 278(43): 42346–42351. PMID: 12909615.
62. Zhou BB, Elledge SJ (2000): "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." *Nature*, 408(6811): 433–439. PMID: 11100718.

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.