

Funktionelle Analyse der Riboflavinkinase
und ihre Rolle in
TNF induzierten Signalkaskaden

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Benjamin Yazdanpanah
aus Teheran
Köln 2008

Berichtersteller: Prof. Dr. Jens Brüning

Prof. Dr. Martin Krönke

Tag der mündlichen Prüfung: 25.Juni 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Tumornekrosefaktor.....	1
1.2	Adaptoren des TNF-RI und deren Signalkaskaden	2
1.3	Die Bedeutung des programmierten Zelltodes für die Physiologie des Organismus	6
1.4	Der mitochondriale Apoptoseweg	7
1.5	Redoxabhängigkeit des TNF induzierten Zelltodes.....	9
1.6	Ziele dieser Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Zellkulturmaterial.....	13
2.2	Chemikalien	13
2.3	Medien und Puffer	13
2.4	Kits und Enzyme.....	16
2.5	Antikörper	17
2.6	Oligonukleotide	17
2.7	Escherichia coli Stämme	21
2.8	Methoden zur Präparation, Propagation und Analyse von DNA	22
2.9	Klonierung	29
2.10	Arbeiten mit RNA.....	35
2.11	Proteinbiochemische Methoden	37
2.12	Zellkultur und Transfektion	41
2.13	Herstellung stabiler Zelllinien über lentivirale Transduktion	45
2.14	SV40.....	46
2.15	FACS Analysen.....	48
2.16	Quantitative Messmethoden zur Erfassung von zellulären Aktivitäten.....	49
2.17	Fluoreszenzmikroskopie.....	52
2.18	Mäuse	53
3	Ergebnisse.....	54
3.1	Sequenzanalysen und Homologievergleiche.....	54
3.2	Expressionsmuster der putativen Riboflavinkinase	56
3.3	Flj11149 kodiert für eine TNF stimulierbare Riboflavinkinase.....	58
3.4	Konstruktion eines Targeting Vektors zur konditionalen Deletion der murinen RFK.....	61
3.5	Etablierung und Charakterisierung rekombinanter ES-Zellklone	63
3.6	Funktionelle Analyse der homolog rekombinanten Klone	65
3.7	Herstellung einer Mauslinie mit konditional deletierbarer RFK.....	66
3.8	Embryonale Letalität durch Inaktivierung der RFK	68
3.9	Spezifische Herunterregulierung der RFK durch lentiviral exprimierte shRNA	70
3.10	Rolle der RFK in TNF vermittelte Zytotoxizität.....	72
3.11	Die Kinaseaktivität der RFK und TNF induzierte Apoptose.....	75
3.12	TNF induzierte mitochondriale Apoptose und RFK.....	77

3.13	Die essentielle Rolle der RFK in TNF induzierter Apoptose durch Produktion von ROS	78
3.14	Sensitivierung für SV40 Infektion über gesteigerte Caveolae/Lipid-Raft vermittelte Endozytose durch RFK Defizienz.....	82
4	<i>Diskussion</i>	88
4.1	RFK als neues TNF-RI Adaptorprotein	88
4.2	Glutamat-86 als katalytische Base der RFK.....	90
4.3	Die essentielle Rolle der RFK für die Embryogenese	92
4.4	TNF induzierter Zelltod und reaktive Sauerstoffspezies	94
4.5	Antivirale Aktivität der RFK	98
5	<i>Zusammenfassung</i>	101
6	<i>Summary</i>	103
7	<i>Referenzen</i>	104
8	<i>Anhang</i>	118
8.1	Vektorkarten	118
8.2	Erklärung.....	121
8.3	Lebenslauf	122
8.4	Danksagung.....	124

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ASK1	apoptosis signal-regulating knase 1
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	bacterial artifical chromosome
bp	basepair
DCFDA	Dichlorofluoreszeindiacetat
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
d.p.c	dies post coitum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
FADD	Fas-associated via death domain
FMN	Flavinmomonkleotid
hUBC9	<i>E2 ubiquitin conjugating enzyme</i>
kb	kilobase
LA	<i>long arm</i>
LB	Luria-Bertani
LD ₅₀	Dosis, bei der 50% Letalität auftritt
MCLA	<i>2-methyl-6-(4-methoxyphenyl)-3,7-. dihydroimidazol[1,2-a]pyrazin-3-one</i>
NF-κB	nukleärer Faktor κB
ORF	<i>open reading frame</i>
PIP5K	Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinase
p.T.	<i>post transfction</i>
Rip-1	<i>receptor interacting protein</i>
tBid	<i>truncated Bid</i>
SA	<i>short arm</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor-β-activated kinase 1</i>
TRADD	<i>TNF receptor-1-associated dath domain protein</i>
TRAF-2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
VSV	Vesicular stomatitis virus
wt	Wildtyp
YT	<i>yeast extract tryptone rich</i>
z-VAD	N-benzyloxycarbonyl-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketon.

1 Einleitung

1.1 Tumornekrosefaktor

Der Tumornekrosefaktor (TNF) zählt zu den prominentesten Zytokinen im Säugetierorganismus. Zytokine sind Proteine, die als Botenstoffe von Zellen sezerniert werden und mannigfaltige Antworten auslösen können. Zu ihnen werden neben TNF die Interferone, die Interleukine und die koloniestimulierenden Faktoren gezählt. Sie können autokrin, parakrin oder endokrin wirken. TNF ist ein pleiotropes Zytokin, das überwiegend von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, Lymphozyten und transformierten Zellen sezerniert wird (Aggarwal 2003). Die Primärstruktur besteht aus einer 233 Aminosäuren langen Polypeptidkette, die membranständig exprimiert wird und als Homotrimer vorliegt (Tang *et al.* 1996). Die Metalloprotease TACE (*TNF alpha converting enzyme*) kann TNF als 157 Aminosäuren langes Protein von der Zelloberfläche abspalten (Gearing *et al.* 1994). Sowohl das membrangebundene als auch das lösliche TNF ist biologisch aktiv. Während humanes TNF nach der Synthese unmodifiziert bleibt, liegt das zu 80 % homologe murine TNF glykolisiert vor (Pennica *et al.* 1985).

Auf die Wirkung von TNF wurde man zum ersten Mal im 19. Jahrhundert aufmerksam. Zunächst erkannte der deutsche Mediziner Bruns, dass eine bakterielle Infektion von Tumorpatienten zu einer Reduktion der Tumorgröße führte (Aggarwal 2003). Nach weitergehender Forschung an Tiermodellen stellte man fest, dass die Tumorregression besonders durch die Verabreichung von Lipopolysacchariden (LPS) gramnegativer Bakterien induziert werden konnte. Carswell und Mitarbeiter erkannten schließlich, dass die tumorregressive Substanz nicht bakteriellen Ursprungs war, sondern endogen vom Organismus als Folge der Infektion gebildet wurde und nannten den Faktor TNF (Carswell *et al.* 1975). Heute kennt man neben TNF noch 18 weitere Vertreter der Superfamilie. Die Wirkung von TNF ist jedoch nicht nur auf Tumorregression durch Apoptose oder Nekrose beschränkt. Das Zytokin spielt außerdem eine große Rolle bei normalen Prozessen wie

Inflammation, Differenzierung, Proliferation, Hämatopoiesis und der Morphogenese. Ebenso wird einer dysregulierten TNF Funktion eine Rolle bei pathologischen Zuständen wie rheumatische Arthritis, Knochenabbau, Abstoßungsreaktionen von Transplantaten, allergischen Reaktionen und Asthma, Diabetes mellitus oder viraler Replikation und schließlich septischem Schock zugeschrieben (Aggarwal 2003).

TNF kann seine Signalkaskaden durch zwei Rezeptoren (TNF Rezeptoren I und II) initiieren. Während der 55 kDa große TNF-RI ubiquitär exprimiert wird, ist die Expression des 75 kDa TNF-RII auf Blutzellen beschränkt und streng reguliert (Vandenabeele *et al.* 1995). TNF-RI Signalkaskaden wurden eingehender untersucht und die meisten oben aufgeführten Effekte sind auf die Aktion dieses Rezeptors zurückzuführen. Die Stimulation des TNF-RI durch TNF (Papa *et al.* 2005) kann die Induktion der Apoptose, die Produktion von Sauerstoffradikalen, die Aktivierung des für den proliferativen Effekt verantwortlichen Transkriptionsfaktors NF- κ B und die der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPKinasen) wie JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) oder p38, die mit Nekrose assoziiert werden, zur Folge haben. Zusätzlich ist TNF-RI an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Haubert *et al.* 2007) sowie der Aktivierung der Sphingomyelinasen beteiligt (Wiegmann *et al.* 1994; Malagarie-Cazenave *et al.* 2002). Die TNF-RI induzierten Signalkaskaden sind vom Zellkontext abhängig und werden durch unterschiedliche intrazelluläre Domänen des Rezeptors initiiert, an die unterschiedliche Adaptoren binden können.

1.2 Adaptoren des TNF-RI und deren Signalkaskaden

Mittlerweile sind 29 Rezeptoren aus der Superfamilie der TNF Rezeptoren bekannt, die von 19 verschiedenen Liganden aktiviert werden können. Zu den prominentesten Vertretern der so genannten Todesrezeptoren gehören neben TNF-RI der CD95/Fas Rezeptor und der TRAIL Rezeptor (*TNF related apoptosis inducing ligand*). Allen gemeinsam ist das Vorhandensein einer ca. 80 Aminosäurereste umfassenden intrazellulären Domäne (DD; *death domain*; Todesdomäne). Da die Todesrezeptoren keine enzymatische Aktivität besitzen, sind sie auf die Rekrutierung unterschiedlicher Adaptorproteine zur Initiation der diversen Signalkaskaden angewiesen (Aggarwal 2003). Im Falle des TNF-RI führt die Bindung des trimeren TNF zu einer

Konformationsänderung des intrazellulären Teils (Chen and Goeddel 2002), wodurch das Adapterprotein TRADD (*TNF receptor associated death domain protein*) an die C-terminale Todesdomäne rekrutiert wird (Hsu *et al.* 1996). Die homophile Interaktion des TNF-RI mit TRADD stellt gleichzeitig die Weiche für den kanonischen Signalweg dar. Über die Interaktionspartner TRAF-2 (*TNF-receptor associated factor-2*) (Hsu *et al.* 1996) und die Serin Threonin Kinase RIP-1 (*receptor interacting protein-1*) – ein weiteres Protein mit einer Todesdomäne (Hsu *et al.* 1996) – kann TRADD die NF- κ B Kaskade anstoßen. TRAF-2 rekrutiert die Proteinkinase IKK (I- κ B kinase), die wiederum von RIP-1 phosphoryliert wird (Devin *et al.* 2000). Phosphoryliertes IKK kann nun selbst den NF- κ B bindenden Inhibitor (I- κ B) phosphorylieren (Delhase *et al.* 1999), was zur Ubiquitinierung und schließlich zum proteosomalen Abbau von I- κ B führt. Nach dem Entfernen von I- κ B von NF- κ B kann letzterer nun in den Zellkern translozieren und dort die Transkription einer Reihe von Genen einschalten.

Die proliferative, antiapoptotische (Beg and Baltimore 1996) und proinflammatorische Wirkung von TNF wird auf die Induktion dieses wichtigen Transkriptionsfaktors zurückgeführt. Zu den von NF- κ B stimulierten Genen kodieren beispielsweise für IAPs -1 und -2 (*inhibitor of apoptosis*) sowie XIAP (*x-chromosome linked inhibitor of apoptosis*) und Survivin, die Caspasen binden und inhibieren, aber auch FLIP (*Fas-associated death domain like interleukin-1 converting enzyme inhibitory protein*) und DCR (*decoy receptor*), die die Bildung vom Multiproteinkomplex DISC (*death inducing signalling complex*) unterdrücken. Auch Bcl-X_L, das die Zytochrom C Ausschüttung aus den Mitochondrien und somit die Formation des Apoptosoms, eines weiteren Multiproteinkomplexes, verhindert, ist ein Zielgen von NF- κ B (Aggarwal 2003). Darüber hinaus aktiviert NF- κ B die antioxidative Reaktionen von Zellen (Papa *et al.* 2005) in Form von Heraufregulierung von SOD-2 (*superoxide dismutase-2*) (Bernard *et al.* 2002) und FHC (*ferritin heavy chain*) (Pham *et al.* 2004).

TRAF-2 kann darüber hinaus die Aktivierung der mitogenaktivierten Kinasen (MAPKs) wie JNK nach sich ziehen (Natoli *et al.* 1997). JNK kann den Transkriptionsfaktor c-Jun aktivieren, welcher mit dem TNF induzierten, nekrotischen und apoptotischen Zelltod assoziiert wird. Darüber hinaus sind Interaktionen von TRAF-2 und RIP-1 für die Aktivierung der p38 MAPK verantwortlich, die die

Heraufregulierung der Interleukine IL-1 und IL-6 zur Folge hat.

Die durch TNF induzierte Apoptose kann durch die Bildung eines Multiproteinkomplexes DISC (*death inducing signalling complex*) induziert werden, die mit der Aktivierung der Caspase-8 einhergeht. Obwohl angenommen wird, dass die Bildung von DISC am TNF-RI wie beim Fas Rezeptor zur direkten Aktivierung der Caspase-8 führen kann (Hsu *et al.* 1996), bleibt diese Annahme kontrovers beurteilt (Harper *et al.* 2003; Micheau and Tschopp 2003). Tschopp und Kollegen konnten zeigen, dass sich ein zytoplasmatischer Komplex aus TRADD, TRAF-2, Rip-1, FADD und Caspase-8 – der so genannte Komplex II, der nach dem membranständigem Komplex I mit TNF-RI, TRADD, Rip-1 und TRAF-2 gebildet wird – für die Aktivierung der Caspase-8 nach TNF Stimulation verantwortlich ist (Micheau and Tschopp 2003). Aktivierte Caspase-8 kann direkt die Effektor Caspase-3 aktivieren aber auch den intrinsischen Apoptoseweg (Kap. 1.4) initiieren. Darüber hinaus wurde berichtet, dass TNF auch die saure Sphingomyelinase (ASMase; *acidic sphingomyelinase*) aktivieren kann (Wiegmann *et al.* 1994). SMasen prozessieren das Membranlipid Sphingomyelin zu Phosphatidylcholin und Ceramid. Letzteres ist u.a. ein potenter Induktor der Apoptose und kann auch Cathepsin D aktivieren. Cathepsin D prozessiert spezifisch Bid zu jBid, das wie tBid den mitochondrialen Apoptoseweg einschalten kann (Heinrich *et al.* 2004). Hingegen wird die Aktivierung der neutralen Shingomyelinase (NSMase) durch die NSMase *activation domain* (NSD) des Rezeptors initiiert, an die das FAN Protein binden kann (Adam *et al.* 1995). Kürzlich wurde in unserem Labor die NSMase-3 kloniert, deren Aktivität durch TNF moduliert werden kann (Krut *et al.* 2006).

FAN (*factor associated with NSMase activity*) ist ein weiteres TNF-RI Adaptorprotein. Es besitzt eine N-terminale PH Domäne (*pleckstrin homology*) und C-terminale WD *repeats*, die eine BEACH Domäne (*Beige and Chediak-Higashi*) flankieren. Während die WD *repeats* für die Bindung des FAN an den TNF-RI unerlässlich sind (Adam-Klages *et al.* 1996), ist die PH Domäne für die spezifische Bindung des Proteins an das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P) verantwortlich. TNF Stimulation induziert die Bindung von FAN an filamentöses Aktin (F-Aktin). Über die sukzessive Aktivierung der GTPase cdc42 wird die Reorganisation des Aktinzytoskeletts in Gang gesetzt (Haubert *et al.* 2007), die für

die TNF vermittelte Zellwanderung essentiell ist.

Schließlich kann TNF Stimulation zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) führen und oxidativen Stress auslösen (Shen and Pervaiz 2006). Als Konsequenz kann Zelltod auftreten, wobei die Mechanismen, die zur Aktivierung dieser Kaskade führen nicht hinreichend aufgeklärt sind. Im Kapitel 1.5 wird näher auf diesen Zweig der TNF Signalkaskaden eingegangen.

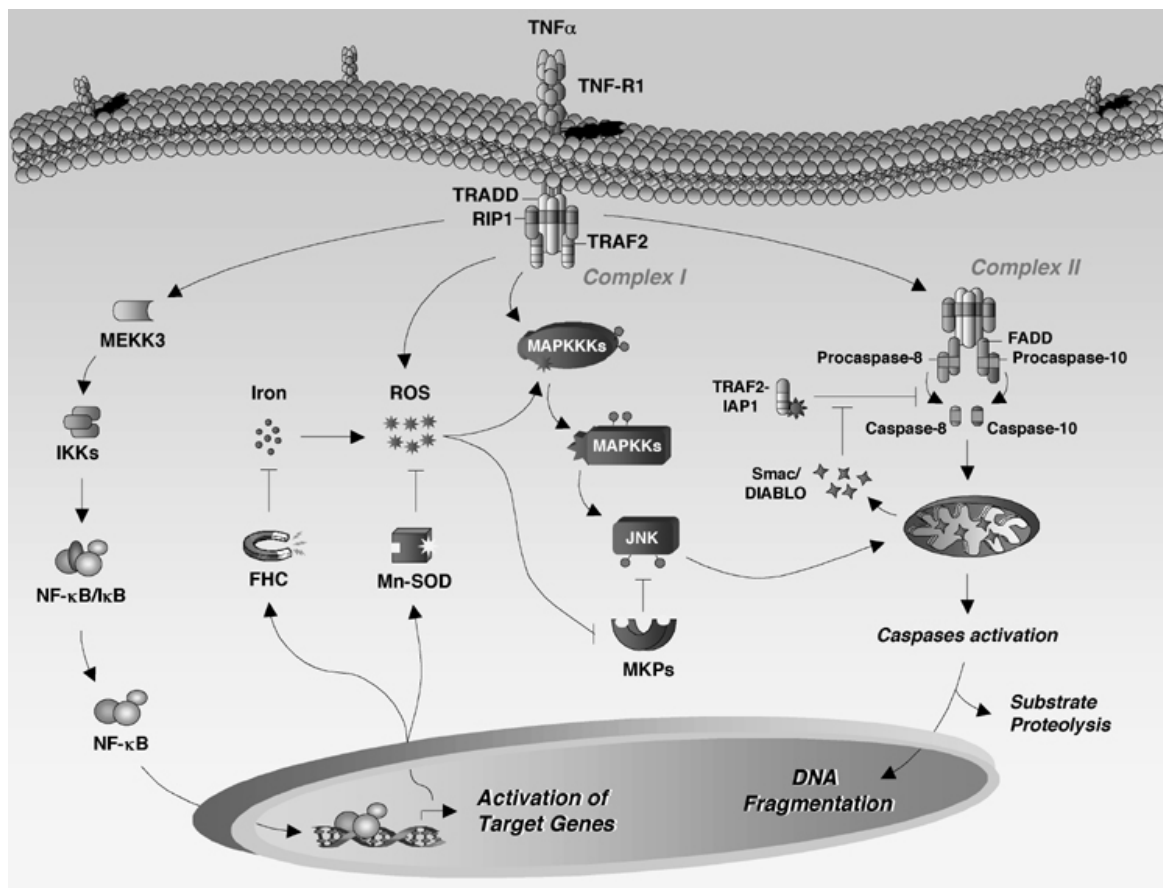


Abb. 1) TNF induzierter Zelltod. TNF kann Zelltod je nach Zellkontext sowohl über die Aktivierung von Caspase-8 oder der MAP Kinasen als auch über die TNF-R1 vermittelte Produktion von ROS initiieren. Die durch den synchron aktivierten Transkriptionsfaktor NF-κB heraufregulierten Gene wie die IAPs können den mitochondrialen Apoptoseweg inhibieren, während antioxidative Proteine wie SOD-2 und FHC den durch ROS induzierten Zelltod blockieren können (Papa *et al.* 2005).

1.3 Die Bedeutung des programmierten Zelltodes für die Physiologie des Organismus

Der Zelltod ist nicht nur ein essentielles Phänomen in der Entwicklung und der Homöostase des lebendigen Organismus, sondern spielt auch eine entscheidende Rolle bei vielen pathologischen Zuständen. Schweichel und Merker untersuchten die Morphologie sterbender Zellen anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von murinen Embryonen (Schweichel and Merker 1973). Dabei unterschieden sie drei Arten des programmierten Zelltodes. Die am häufigsten beobachtete Variante war mit einer Zell- und Zellkernkondensation verbunden und entsprach dem zuvor beschriebenen Phänomen der Apoptose. Die zweite Form war durch autophagische Vakuolen charakterisiert, in denen zelluläre Kompartimente und Bestandteile abgebaut wurden und war nicht von Veränderungen des Zellkerns begleitet. Die dritte Form schließlich entsprach morphologisch dem nekrotischen Zelltod. Die Nekrose kann durch äußere Stressfaktoren wie mechanische Reize, Temperaturveränderungen oder Verletzungen des Gewebes verursacht werden. Aber auch endogener Stress wie Energiedepression kann zur Nekrose führen. Die betroffenen Zellen schwellen bis die Integrität der Zellmembran aufgehoben ist und der Inhalt der Zellen in das umgebene Medium freigegeben wird. (Grooten *et al.* 1993). In der Regel löst dieser Vorgang eine Entzündungsreaktion aus.

Kerr, Wyllie und Currie führten 1972 den Begriff Apoptose ein (Kerr *et al.* 1972). Der Begriff leitet sich aus der griechischen Bezeichnung für das herbstliche Abfallen der Blätter und den Verlust des Haupthaars in der menschlichen Seneszenz ab. Bei dieser Form des Zelltodes schrumpfen die sterbenden Zellen, im Gegenteil zur Expansion der Zellen, wie es beim nekrotischen Zelltod zu beobachten ist. Neben dem Schrumpfen der Zelle definierten Kerr, Wyllie und Currie Apoptose noch anhand weiterer morphologischer Kriterien. Zu ihnen zählen die Kondensation des Zytosols und des Zellkerns, die Fragmentierung des Zellkerns, Ausstülpungen der Zellmembran (*membrane blebbing*) und das Vesikulieren der Zelle zu apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*), die von benachbarten Zellen oder professionellen Phagozyten phagozytiert werden. Inzwischen ist Apoptose auch biochemisch anhand

der Translokation von Phosphatidylserinresten an die Außenseite der Zellmembran (Martin *et al.* 1995) zwecks Erkennung apoptotischer Zellen durch professionelle Phagozyten, die Freisetzung proapoptotischer Proteine (Zytochrom C und Smac) aus den Mitochondrien ins Zytosol, der proteolytischen Spaltung von Substraten durch Caspasen (Enari *et al.* 1995) und der nukleolytischen Spaltung der DNA (*DNA laddering*) zu Fragmenten definierter Länge (Cohen *et al.* 1994) charakterisiert. Die Phagozytose apoptotischer Körperchen unterdrückt die bei der Nekrose übliche Entzündungsreaktion. Lange bekannt und gut untersucht ist Apoptose in der Ontogenese mehrzelliger Organismen. Die Apoptose ist bei Vertretern aller untersuchten Tierstämme, vom Nematoden *Caenorhabditis elegans* bis zum *Homo sapiens* hoch konserviert und absolut essentiell. Beispiele sind im Folgenden aufgeführt. Während der menschlichen Gehirnentwicklung stirbt – ausgelöst durch den Entzug von Wachstumsfaktoren – ein Großteil der Neuronen, die nicht mit anderen Neuronen interagieren oder falsch verschaltet sind (Naruse and Keino 1995). Weiterhin spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle bei der Metamorphose von Insekten und Amphibien und bei der Degeneration der Interdigitalhäute der Finger der Wirbeltiere (Jacobson *et al.* 1997). Zellen des Erwachsenenstadiums werden apoptotisch, wenn ihr Genom geschädigt wurde (Lowe *et al.* 1993). So wird vermieden, dass transformierte Zellen sich zu Tumoren entwickeln. Beim negativen Selektionsprozess von B- und T-Lymphozyten werden autoreaktive Zellen durch Apoptose eliminiert (Jacobson *et al.* 1997). Tumorzellen und mit Viren infizierte Zellen werden durch zytotoxische T-Zellen ebenfalls apoptotisch eliminiert (Nagata 1997). Umgekehrt kann fehlgeleitete Apoptose schwere Krankheiten auslösen. Neurodegenerativen Krankheiten, wie Parkinson oder Huntington werden durch Apoptose im Zentralen Nervensystem verursacht (Friedlander 2003).

1.4 Der mitochondriale Apoptoseweg

Mitochondrien sind nicht nur die Kraftwerke der Zelle, sie agieren auch als Sensoren für intrazellulären Stress. Der intrinsische Apoptoseweg beruht auf Aktionen der Mitochondrien (Fulda and Debatin 2006). Der durch Todesrezeptoren induzierte,

extrinsische Apoptoseweg und der intrinsische besitzen Schnittstellen und können parallel verlaufen.

Der intrinsische Apoptoseweg kann z.B. durch intrazellulären Stress ausgelöst werden. Zu den Auslösern gehören u.a. ionisierende Strahlen, die die DNA schädigen und so zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 und folglich einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus führen (Deng and Wu 2000). Auch Hypoxie und Nährstoffdeprivation können zur Aktivierung des intrinsischen Weges führen (Carmeliet *et al.* 1998). Apoptotische Zellen veranlassen ihre Mitochondrien, proapoptotische Faktoren ins Zytosol auszuschütten. Dazu gehören Cytochrom C, Smac/Diablo (*second mitochondria-derived activator of caspase* oder *direct IAP-binding protein with low PI*), AIF (*apoptosis inducing factor*) und Endonuklease G. Die Permeabilität der mitochondrialen Membran wird dabei durch Homologe von Bcl-2 reguliert. Über 20 Mitglieder umfasst die Familie der Bcl-2 Proteine, wovon manche pro- und andere antiapoptotische Funktionen besitzen (Cory and Adams 2002). Prominente antiapoptotische Vertreter sind u. a. Bcl-2 und Bcl-X_L. Sie sind normalerweise an der Außenmembran der Mitochondrien lokalisiert und unterstützen deren Integrität. Proapoptotische Homologe von Bcl-2 wie Bax und Bid sind an der Initiation des intrinsischen Apoptosewegs beteiligt. Z.B. wird Bid nach Apoptosestimulation proteolytisch modifiziert und kann nun zur Konformationsänderung von Bax beitragen. Das dadurch aktivierte Bax kann seinerseits vom Zytosol in die mitochondriale Membran translozieren (Jurgensmeier *et al.* 1998), wodurch proapoptotische Faktoren aus den Mitochondrien, wahrscheinlich durch eine durch Bax geformte Pore ins Zytoplasma gelangen können. Das freigesetzte Cytochrom C bindet Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) und Caspase-9, womit ein Multiproteinkomplex, das Apoptosom entsteht. Die Komplexierung benötigt die Bindung von ATP an Apaf-1 (Li *et al.* 1997). Procaspase-9 wird dabei autoproteolytisch in aktive Caspase-9 überführt. Die Prozessierung der Procaspase-9 ist allerdings nicht ohne weiteres möglich, da bestimmte Proteine, die so genannten IAPs dies verhindern (Salvesen and Duckett 2002). Die IAPs können umgekehrt durch mitochondriales Smac/Diablo gebunden und somit inhibiert werden (Du *et al.* 2000). Die stringente Regulation des Apoptosoms verdeutlicht einmal mehr die fundamentale Rolle der Apoptose.

Aktivierte Caspase-9 kann sukzessive die Effektor Caspasen-3 (Kuida *et al.* 1996) oder -7 aktivieren. Die Effektor Caspasen sind direkt für die proteolytische Spaltung von Substraten verantwortlich, die die morphologischen Veränderungen während der Apoptose verursachen. Z.B. schneidet aktive Caspase-3 den Inhibitor der DNase CAD (*caspase activated DNase*), was zur Freilassung von CAD führt. Letzteres transloziert aus dem zytosolischen Kompartiment in den Zellkern und bewirkt die nukleolytische Spaltung des Chromatins (Enari *et al.* 1998). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass Endonuklease G eine caspaseunabhängige nukleolytische Spaltung der DNA durchführen kann (Li *et al.* 2001). Die Translokation von Phosphatidylserinresten an die Außenseite der Lipiddoppelschicht der Zellmembran verläuft ebenfalls in einem caspaseabhängigen Prozess und impliziert die Proteolyse von Fodrin (Vanags *et al.* 1996).

1.5 Redoxabhängigkeit des TNF induzierten Zelltodes

Oxidativer Stress ist ein Status, der mit erhöhter Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS) und/oder einem verschlechterten antioxidativen Status der Zellen einhergeht (Shen and Pervaiz 2006). In lebenden Organismen entstehen ROS als Nebenprodukte während des oxidativen Metabolismus – d.i. die oxidative Phosphorylierung – und anderen Oxidoreduktionsreaktionen (Sies 1997). Die Bildung von ROS kann jedoch auch unter physiopathologischen Bedingungen induziert werden. Zu den physiologischen Induktoren gehören Zelloberflächenrezeptoren wie TNF-RI (Hennet *et al.* 1993; Kim *et al.* 2007) und der Angiotensin II Rezeptor AT₁R (Ushio-Fukai 2006). Röntgen-, UV- und Mikrowellenstrahlen sowie Ultraschall und selbst mechanische Reize können die Bildung von ROS induzieren (Sies 1997). Zu den wichtigsten ROS werden die hochreaktiven Komponenten Superoxidanion (O_2°) sowie Hydroxylradikale (OH°) als auch das stabilere Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gezählt. ROS werden als integrale Komponenten der antimikrobiellen Abwehr angesehen, sie können aber auch die Transkriptionsmaschinerie aktivieren oder, noch wichtiger, zum Zelltod führen (Shen and Pervaiz 2006). Die differentielle Reaktivität verschiedener ROS impliziert die Notwendigkeit unterschiedlicher Neutralisationssysteme – so genannte Antioxidanzien – der Zelle; es gibt

enzymatische und chemische Antioxidanzien. Zu den enzymatischen Antioxidanzien gehören – wie im vorigen Kapitel erwähnt – die durch TNF regulierbaren Genprodukte FHC und SOD-2 (Wong *et al.* 1989; Kucharczak *et al.* 2003; Papa *et al.* 2005) sowie die Catalase und die Glutathionperoxidasen bzw. –reduktasen. Während die Superoxiddismutasen Superoxidanione in Wasserstoffperoxid dismutieren, verwandeln die Catalasen letzteres in Wasser. FHC allerdings wirkt nur indirekt als Antioxidans, in dem es die katalytischen Eisensalze (Fe^{II} , Fe^{III} und Fe^{IV}) von der Fentonreaktion abkapseln kann, durch die hochreaktive Hydroxylradikale aus Wasserstoffperoxid entstehen würden (Pham *et al.* 2004). Das wichtigste Antioxidanz der Zelle scheint allerdings das reduzierte Tripeptid Glutathion (GSH; γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin) zu sein (Sies 1997), das in der Glutathionperoxidase in einer Catalasereaktion Wasserstoffperoxid zu Wasser reduzieren kann. Der entstandene Thioester kann wieder durch die Glutathionreduktase zu GSH recycelt werden. Die antioxidative Wirkung von N-Acetylcystein (NAC), einem weit verbreiteten Antioxidans, beruht auf dessen intrazellulären Umwandlung zu Glutathion. Zu den chemischen Antioxidanzien der Zelle zählen neben reduziertem Glutathion die Vitamine Tocopherol, Ascorbinsäure und Riboflavin. Riboflavin können sowohl pro- als auch antioxidative Wirkungen zugeschrieben werden. Während es z.B. durch ROS eine Degeneration von Axonen aus dem retinalen Ganglion – speziell nach voriger UV Exposition – auslösen kann (Lucius *et al.* 1998), wirkt es gegen oxidative Verletzung des Lungenepithels, ausgelöst durch Ischämie-Reperfusion (Seekamp *et al.* 1999). Einem Riboflavinderivat konnten auch antioxidative Wirkung bei Adriamycin induziertem oxidativem Stress in Cardiocyten zugeschrieben werden (Ogura *et al.* 1982).

TNF induzierter oxidativer Stress kann ohne Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C zum nekrotischen Zelltod führen oder aber auch, wie oben beschrieben, durch Freisetzung von Cytochrom C zum apoptotischen Zelltod führen. Der hier beschriebene nekrotische Zelltod ist durch das lipophile Reduktionsmittel *tert*-Butyl-4-hydroxyanisol inhibierbar und scheint vor allem bedingt durch mitochondriale ROS Formation (Hennet *et al.* 1993) in murinen Fibrosarcoma Zelllinien (L929) und NF- κ B defizienten embryonalen Fibroblasten (MEFs) eine wichtige Rolle zu spielen (Sakon *et al.* 2003; Kim *et al.* 2007). Inhibition der Caspasen durch einen Breitbandinhibitor wie z-VAD erhöht hierbei sogar die

Todesrate (Vercammen *et al.* 1998). Der nekrotische Zelltod wird mit anhaltender JNK Aktivierung verbunden, der durch direkte Inhibition von MAPKinase Phosphatasen durch ROS zustande kommen kann (Kamata *et al.* 2005). Der redoxabhängige Apoptoseweg des TNF induzierten Zelltodes wird auch oft mit anhaltender JNK Aktivierung assoziiert (Tournier *et al.* 2000; Deng *et al.* 2003; Pantano *et al.* 2007). Die initiierende MAPKinase ist hier offensichtlich ASK1 (Ichijo *et al.* 1997; Tobiume *et al.* 2001). In der Literatur sind zwei Inhibitoren beschrieben, die durch direkte Bindung an ASK1 die Aktivierung der JNK Signalkaskade unterdrücken können. Sowohl 14-3-3 (Zhang *et al.* 2003) als auch Thioredoxin-2 (Hsieh and Papaconstantinou 2006) dissoziieren durch TNF induzierten oxidativen Stress von ASK1 und ebnet den Weg für die Aktivierungskaskade. Die ASK1 Aktivierung durch TNF und Apoptose durch TNF Induktion lassen sich durch das lösliche Reduktionsmittel N-Acetylcystein (NAC) aufheben (Fiers *et al.* 1999; Zafarullah *et al.* 2003). Das durch TNF angeregte Wasserstoffperoxid selbst kann auch direkt zur Freisetzung von Zytochrom C und folglich Apoptose führen (Park *et al.* 1992; Higuchi *et al.* 1998).

Der Mechanismus des TNF induzierten oxidativen Stresses ist in der Literatur eingehend und teilweise kontrovers diskutiert. Z.B. wurde berichtet, dass durch TNF aktivierte Caspase-8 Komponenten der mitochondrialen Atmungskette direkt degradiert werden können, was zur Formation von ROS führt (Ricci *et al.* 2004). Neuerdings konnte eine direkte Aktivierung der NADPH Oxidase 1 (Nox1) durch TNF-RI gezeigt werden (Kim *et al.* 2007). Diese These wird durch frühere Befunde mit der GTPase Rac1, die als ein Aktivator der NADPH Oxidasen angesehen wird, unterstützt (Deshpande *et al.* 2000; Cheng *et al.* 2006). Außerdem wurde gezeigt, dass die Produktion von ROS über die Phospholipase A2 gesteuert werden kann (McPhillips *et al.* 2007).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Gegenstand dieser Arbeit ist die funktionelle Analyse eines Proteins, das ursprünglich in unserem Labor kloniert wurde und zunächst DDIF für *Death Domain Interacting Factor* benannt wurde. Das Protein wurde im Rahmen eines Hefe Zweikomponenten Screens als ein neuer Interaktionspartner des Tumornekrosefaktor Rezeptor Typ I (TNF-RI) entdeckt. Der offene Leseraster (ORF; *Open Reading Frame*) der korrespondierenden cDNA aus HeLa Zellen konnte in den öffentlichen Datenbanken zugeordnet werden und kodierte für das zu den Anfängen dieser Studie als hypothetisches Protein Flj11149 bezeichnete Genprodukt, das zu 36% mit der charakterisierten Riboflavinkinase von *S. cerevisiae* homolog ist. Basierend auf diesen Vorkenntnissen sollte zunächst überprüft werden, ob es sich bei Flj11149 um die humane Riboflavinkinase handelt. Dazu wurde das Protein rekombinant aufgereinigt und biochemisch charakterisiert. Zur Bestimmung der zellulären Funktion wurden zwei Strategien verfolgt: Erstens sollte mit Hilfe von RNA-Interferenz im Zellkultursystem eine mögliche Beteiligung dieses neuen TNF-RI Interaktionspartners in TNF induzierten Signalkaskaden untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Analyse einer zu konstruierenden Knockout-Mauslinie Einsichten in die Funktionsweise dieses Proteins *in vivo* ermöglichen.

2 *Material und Methoden*

2.1 Zellkulturmaterial

Zellkulturmedien, Puffer und Zusätze wurden von Biochrom AG (Berlin, Deutschland) bezogen. Medien und Zusätze für Kulturen embryonaler Stammzellen wurden von Gibco BRL (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) bezogen, Gelatine von Sigma-Aldrich (Buchs, Schweiz).

Plastikware für die Zellkultur wurde von TPP (Trasadingen, Schweiz), Nunc (Roskilde, Dänemark) oder BD Biosciences (Falcon™; Franklin Lakes, USA) bezogen.

2.2 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden entweder von Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Fluka (Buchs, Schweiz) – insbesondere Chemikalien für immunologische Nachweisverfahren – erworben. Molekulare oder fluoreszente Farbstoffe wurden von Molecular Probes (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) erworben. Agarose wurde von Peqlab (Erlangen, Deutschland) bezogen.

2.3 Medien und Puffer

BAC Lysis Puffer	0,2 M NaOH, 1% SDS
BAC Neutralisationspuffer	3 M KAc (pH 5,5), autoklavieren
BAC Resuspensionspuffer	50 mM Tris (pH 8), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, 0,2 µm filtern und bei 4°C lagern

Blockierungspuffer (Immunfluoreszenz)	0,1% Saponin, 3% BSA in PBS
Blockierungspuffer (Western Blots)	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 % Magermilch, 2 % BSA, 0,1 % Tween-20, (pH 7,4 – 7,6)
DNA Probenpuffer	20% Ficoll-400, 0,025% Xylencyanol, 0,025% Bromphenolblau (kann 1% SDS erhalten)
dYT (1l)	16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH 7, autoklavieren
Inoue Transformationspuffer	10 mM PIPES (pH 6,7), 55 mM MnCl ₂ , 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl; 0,2 µm filtern und bei -20°C lagern
HBSS Puffer:	ohne Phenolrot, 0.137 M NaCl, 5.4 mM KCl, 0.25 mM Na ₂ HPO ₄ , 0.44 mM KH ₂ PO ₄ , 4.2 mM NaHCO ₃ , 1 g/l D-Glucose
2 x HeBS Puffer	280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,05)
Hybridisierungspuffer für Southern Blots	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 M NaCl, 10 % Dextransulfat, 1 % SDS, 50 µg/ml frisch denaturierte ssDNA
Hybridisierungspuffer für Northern Blots	Rapid Hybridization Buffer (GE Healthcare; Piscataway, USA)
Kristallviolett (Lenti)	2% Kristallviolett in 3% Formaldehyd und 10% Ethanol
Kristallviolett	0,2% Kristallviolett, 2% Ethanol
LB (1l)	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, (pH 7), autoklavieren
LB Agar	LB mit 15 g/l Agar, autoklavieren und bei 55°C mit entsprechenden Antibiotika versetzt in Platten gießen
20 x S-PBS (2l)	14 g NaCl, 2,76 g NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O, 3,12 g NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O, 10,88 g K ₂ HPO ₄ , (pH 7,6)
Oligonukleotid Annealingpuffer	30 mM Hepes (pH 7,4), 100 mM KAc, 2 mM MgAc, 1 mM EDTA
5 x Proteinprobenpuffer	mM Tris (pH 6,8), 20% Glycerol, 5% SDS, 0,025% Bromphenolblau, 65 frisch: 5% β-Mercaptoethanol
Puffer A	50 mM PIPES, pH 7, 50 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , 5 mM EGTA, protease complete coctail (Roche)

2 x RNA Ladepuffer	95% Formamid, 0.025% SDS, 0.025% Bromophenolblau, 0.025% Xylencyanol, 0.025% Ethidiumbromid, 0.5 mM EDTA
10 x SDS Laufpuffer (SDS-PAGE)	0.25 M Tris; 2 M Glycin; 1 % SDS
SOB (1l)	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 mM KCl (pH 7,0), autoklavieren, frisch: 10 mM steriles MgCl ₂
SOC	wie SOB, jedoch zusätzlich mit 20 mM Glukose (frisch)
20 x SSC Puffer	3 M NaCl; 0,3 M Trinatriumcitrat (pH 7)
Transferpuffer (Southern Blots)	0,4 M NaOH, 1 M NaCl
Transferpuffer Western Blots	für 25 mM Tris (pH 8,3), 150 mM NaCl, 20% Methanol
50 x TAE Puffer (1l)	242 g TrisBase, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
Tail Lysis Buffer	100 mM Tris (pH 8,5), 200 mM NaCl, 0,2% SDS, 5 mM EDTA, frisch: 0,2 – 2 mg/ml Proteinase K
10 x TBE Puffer	108 g Tris Base, 55 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
TE Puffer	10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA
10 x MOPS Puffer	0,4 M MOPS (2-(N-Morpholino)-propansulfonsäure; pH 7), 0,1 M NaAc, 10 mM EDTA; mit DEPC Wasser ansetzen, steril filtern, kühl und dunkel lagern
Waschpuffer (Immunfluoreszenz)	0,1% Saponin in PBS

2.4 Kits und Enzyme

Sequenzierung	Big Dye™ Terminator Cycle (PE Applied Biosystems; Massachusetts, USA)
Radioaktive Markierung von DNA Sonden	Ladderman™ Labeling Kit (Takara Biomedicals, Kyoto, Japan) Rediprime II Labeling Kit (GE Healthcare, Piscataway, USA)
DNA Präparation	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
RNA Präparationen	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Gelextraktion und reaction clean-up	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
in vitro Transkription von siRNA	Silencer™ siRNA Construction Kit (Ambion, Austin, USA)
mRNA Präparation	Oligotex (Qiagen; Hilden, Deutschland)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (Leon-Roth, Deutschland) New England Biolabs (NEB, Ipswich, England)
cDNA Synthese	Protoscript® cDNA Synthesis Kit (NEB, Ipswich, England)
Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR	LightCycler® 480 SYBR® green I Master (Roche, Basel, Schweiz)
LR Clonase® II Enzyme Mix	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Buchs, Schweiz)
Mung Bean Nuclease	NEB (Ipswich, England)
Proteinase K	Fermentas (Leon-Roth, Deutschland)
Phosphatasen	Antarctic Phosphatase (NEB, Ipswich, England)
T4 DNA Polymerase	Fermentas (Leon-Roth, Deutschland)
Ligasen	<i>Rapid ligation kit</i> (Fermentas; Leon-Roth, Deutschland)

Thermophile DNA Taq DNA Polymerase (Fermentas, Leon-Roth, Polymerasen
 Deutschland),
 PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare; Piscataway, USA),
 Pfu DNA Polymerase (Promega, Madison, USA)
 Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, England)
 Expand Long Template PCR System (Roche, Basel, Schweiz)

2.5 Antikörper

Antigen	Isotyp	Firma	Verdünnung
Zytochrome C	monoklonal Maus	BD Biosciences	1:1000
GST	Hase	AP Biotech	1:3000
RFK	polykl. Hase (Serum)	eigene Herst.	1:200
β-Aktin	monoklonal Maus	Sigma	1:5000
Parp	polyklonal Maus	BD Biosciences	1:2000
SV40 LTag	PAB110, Maus	Santa Cruz Biotech	1:250
Maus IgG	polyklonal Ziege	Sigma	1:3000
Hase IgG	polyklonal Ziege	Sigma	1:3000
Maus IgG	polyklonal Ziege (Alexa Fluor 488)	Invitrogen	1:1000

2.6 Oligonukleotide

2.6.1 Primer

P2-Cla (SA) 5' GATCATCGATCAGAGGCAGGCGAATTTCTG 3'

P-Bam (SA) 5' GATCGGATCCCTGCCCAATCTTTGCAATCAC 3'

P-sXho (LA)	5' GATCGCTCGAGCAGCCAGGACTACTAGAGAG 3'
P2-asXho (LA)	5' GATCCCTCGAGGGGATGTTGCTCAGCCATAG 3'
P1-Sbf (flx)	5' ATGCTCAGCCTGCAGGAAGATTGGGCAGAATTTTATTC 3'
P-Sal (flx)	5' ATGCTCAGGTCTGACTCCTGGAACTATATATACCAG 3'
RA-RI	5' AATTACGATCTCTCTAGTAG 3'
23	5' AAGAATGTTCCCAACATAGA 3'
α -S1	5' AACATGGAGAAAACACTATCCC 3'
S1	5' TGGATCTCTGATATTCAAGG 3'
neoR	5' AACTTCGGAATAGGAACTTC 3'
frtR	5' TGCTCACAAGATAACTTAAG 3'
5'DD-Bam	5' GATCGGATCCATGCCCCGAGCGGACTG 3
3'DD-Sal	5' GATCGTCTGACTCAGTGGCCATTCATTATTTTGC 3'
E86Q-rev	5' GATATGTGTTTGCATAGACTTC 3'
E86Q-fw	5' GAAGTCTATGCAAACACATATC 3'
N36D-rev	5' CTCAGGAAAATCAGCTGTGG 3'
N36D-fw	5' CCACAGCTGATTTTCCTGAG 3'
N3-hDD-5'	5' CCGGAATTCATGCCCCGAGCGGACTGC 3'
N3-hDD-3'	5' CGCGGATCCGTGGCCATTCATTATTTT 3'
siDDresc-rev	5'GTTCTGGTAACTCTAGCCTCTTTTTTGCCTCTTCAATATCA CCTTG 3'
siDDresc-fw	5'CAAGGTGATATTGAAGAGGCAAAAAAGAGGCTAGAGTTA CCAGAAC 3'
WPRE-5'-Mlu	5' GATCACGGTAACAACCTCTGGATTACAAAATTTG 3'
WPRE-3'-Age	5' GATCACCGGTGCGGGGAGGCGGCCCAAAG 5'
5' GAPDH	5' TGC(A/C)TCCTGCACCACCAACT 3'
3' GAPDH	5' (C/T)GCCTGCTTCACCACCTTC 3'
TA-sense	5' GATCTCCAGTTCTGAATTGGCCAGTACACAAATGGA 3'

TA-antisense 5' AGCTTCCATTTGTGTACTGGCCAATTCAGAACTGGA 3'

**Sequenzierprimer
pENTR-Derivate**

3'Entr all 5' GGTGCTAGCGAGCTATTT 3'

5'Entr 2 5' CTAGCGAGCTATTTCTAGAAC 3'

**Sequenzierprimer
pLenti-Vektoren**

3'Lenti 5' GGTTAGGGATAGGCTTACC 3'

5'Lenti 5' GGTGGAATTCTGCAGATATC 3'

**Sequenzierprimer
shRNA-Vektoren**

H1 min 5' AATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTG 3'

super3' 5' AGGTCGACGGTATCGATAAG 3'

**Sequenzierprimer
CMV-Vektoren**

CMVseq1 5' GAGGTCTATATAAGCAGAGC 3'

CMVseq2 5' GCCCCATTGACGCAAATGGG 3'

**Sequenzierprimer
Targeting-
Vektoren**

1 5' ACTCATTAGGCACCCCAGGC 3'

2 5' AGGCCAGCCTGGTCTACAGA 3'

3 5' AATCCCTGAAGATGCCAGCC 3'

4 5' CCCGAGAATTGCATGAGAAT 3'

5 5' TTCTGACTTGATGACTAGATG 3'

6 5' TGGGGCCTGACATTAATCTT 3'

7 5' TTCCCTTTTTCTTTTCTTTT 3'

8 5' CGGTCTGGTCAATAGGGTGA 3'

9 5' CTCCTGGCATTATAAGTATG 3'

10 5' TTA CTGGGCGAGTGTCTATGGGGC 3'

11 5' GGATCCATAACTTCGTATAA 3'

12 5' CCTAGTCAGGAAGTTTCCCC 3'

13 5' TTCGACCAATTCGCTGTCTG 3'

14 5' GATTGAACAAGATGGATTGC 3'

15 5' CTCCTGTCATCTCACCTTGC 3'

16 5' GCTTTTCTGGATTCATCGAC 3'

17 5' CCTTTCCTAATAAAATGAGG 3'

18 5' TATTCAGCAAAGCCCAAAC 3'

19 5' AAATTCAAGTCGGAATGTGG 3'

20 5' CATCTTGCTCTTTTAAATGC 3'

21 5' CATGTGGTTGCTGGGATTTG 3'

22 5' TCACTGGTGATGAAGAACT 3'

23 5' AAGAATGTTCCCAACATAGA 3'

24 5' GACAGCAAGGGGGAGGATTG 3'

25 5' TAGGCCGTGGGCAGGGGACC 3'

26 5' CCAAAGGCTTCCTCTTACTC 3'

27 5' TCTGCTAATCTCTCTGTGTT 3'

28 5' TGAGCTATCACTTCAGCCCT 3'

29 5' CCCTCATCTTTCAAATTACCTGTT 3'

30 5' GACTCAAAGTGAGGCCCTT 3'

31 5' AGCCTCCTAACCCCTTCCATC 3'

32 5' CTGAGTTAAAATGCTGATGT 3'

33 5' TTGAGA ACTGCTGAAATAGT 3'

34 5' TCAA ACTCAGGTCTTCTAGA 3'

35 5' ACCTTGCCCATACCTAACAA 3'

36 5' ATTCCCCAGTCCTCTTTTCA 3'
 37 5' CCAGAAGAGGGCGTCAGATC 3'

Southern Blot

5'-Sonde P3 5' GCCGGTATCCAATTACCACC 3'
 5'-Sonde P4 5' TGCTATTGGGACGTAAGGTG 3'
 3'-Sonde P9 5' GTACAAAATAGATCTGTGGC 3'
 3'-Sonde P10 5' ATGCCTGCAAACATTCAGAC 3'
 Neo-Sonde Neo-3 5' GCCGCCAAGCTCTTCAGCAATAT 3'
 Neo-Sonde Neo-5 5' TGAATGAACTGCAGGACGAGGCA 3'

Northern Blot

T5-1 5' GCTCCAAGCAGCTGGGCATC 3'
 T5-2 5' GCTTTTAGAAACCTGGAAGA 3'

**shRNA
Expressions-
kassetten**

shRFK-sense 5'GATCCCCGAAGCTAAGAAACGACTAGTTCAAGAGACTAG
TCGTTTCTTAGCTTCTTTTAA3'
 shRFK-antisense 5'AGCTTAAAAAGAAGCTAAGAAACGACTAGTCTCTTGA
ACTAGTCGTTTCTTAGCTTCGGG3'
 shKon-sense 5'GATCCCCGGATTACTTTGATAACGCTATTCAAGAGATAGC
GTTATCAAGTAATCCTTTTAA3'
 shKon-antisense 5'AGCTTAAAAAGGATTACTTTGATAACGCTATCTCTTGA
ATA GCGTTATCAAGTAATCCGGG3'

2.7 Escherichia coli Stämme

XL1-Blue: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q
ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

BL-21 (DE3) pLysS: F⁻ ompT hsdSB (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam^R)

DB3.1TM: F⁻ gyrA462 endA Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Str^R) xyl5 λ ⁻ leu mtl1

Stbl3TM: F⁻ mcrB mrr hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) recA13 supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (Str^R) xyl5 λ ⁻ leu mtl1

JM110: F['] traD36 lacI^q Δ (lacZ) M15 proA+B+lrpsL (Str^f) thr leu thi lacY galK galT ara fhuA dam dcm glnV44 Δ (lac-proAB)

2.8 Methoden zur Präparation, Propagation und Analyse von DNA

2.8.1 Herstellung kompetenter Bakterien nach Inoue

Ultrakompetente Bakterien wurden nach der Methode von Inoue (Sambrook and Russell 2000) hergestellt. Dafür wurde zunächst eine klonale Starterkultur vom gewünschten Stamm in SOB inokuliert und 6 – 8 h bei 37°C geschüttelt (225 rpm). Jeweils 10, 4 oder 2 ml der Starterkultur wurden in 250 ml SOB Medium überführt und ÜN bei 18°C geschüttelt. Bei OD₆₀₀ = 0,55 wurde die ÜN Kultur auf Eis 10' inkubiert und (10', 2500 g, 4°C) pelletiert. Die Pellets wurden von allen Medienresten befreit, vorsichtig in 80 ml Inoue Transformationspuffer (4°C) resuspendiert und erneut pelletiert. Pellets wurden wieder von allen Mediumresten befreit und in 10 ml Inoue Transformationspuffer (4°C) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,75 ml DMSO wurden 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Durch diese Methode wurde eine Transformationseffizienz von $2 \times 10^7 - 10^8$ Kolonien/ μ g pUC18 DNA erzielt.

2.8.2 Plasmid DNA Präparation

Plasmid DNA wurde in *E. coli* transformiert. *High-copy* Plasmide wurden in LB Medium und *low-copy* Plasmide in dYT Medium ÜN propagiert. Die Selektion erfolgte mit entsprechenden Antibiotika in folgenden Konzentrationen:

Ampicillin: 150 µg/ml

Chloramphenicol: 24 µg/ml

Kanamycin: 30 µg/ml

Transformation von Plasmid DNA: 1 ng Plasmid DNA wurde bei 4°C, für 20' mit 100 µl kompetenten Bakterien inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 90". Danach wurden die Bakterien 3' auf Eis inkubiert. Die Expression des Resistenzmarkers erfolgte mit 500 µl SOC Medium bei 250 rpm, 37°C für 1 h. Die transformierten Bakterien wurden dann auf LB Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C ÜN inkubiert. Zur Blau/Weiß Selektion erfolgreich klonierter pCR2.1 Vektoren wurden diese in α-komplementierende XL1-Blue transformiert und auf LB Agarplatten ausgestrichen, die frisch mit 40 µl X-Gal (Stock: 40 mg/ml) und 100 µl IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, Stock: 100 mM) beschichtet worden waren.

Isolation von Plasmid DNA: Plasmid DNA wurde aus klonalen ÜN Kulturen isoliert. Für die Analyse von Klonierungsreaktionen wurde Plasmid DNA aus jeweils 1 ml der ÜN Kultur mit Silicagel Präparationssäulen nach alkalischer Lyse der Bakterien isoliert. Für die Isolation von Plasmid DNA, die in eukaryotische Zellen transfiziert werden sollte, wurden Ionenaustauschsäulen verwendet. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben.

2.8.3 BAC DNA Präparation

BAC DNA wurde als Stab Agar Kultur erworben, die zunächst auf LB Agar Platten mit Chloramphenicol ausgestrichen wurde. Die Isolation beruht auf differenzieller Präzipitation genomischer DNA und BAC DNA. Zur Isolation wurde eine 2 ml ÜN Kultur einer Kolonie verwendet. Die Bakterien wurden pelletiert (5', 4000 g) und das Pellet in 300 µl BAC Resuspensionspuffer aufgenommen. Danach erfolgte der Aufschluss mit 300 µl BAC Lysis Puffer für 5'. Genomische DNA wurde nach Addition von 300 µl BAC Neutralisationspuffer präzipitiert und pelletiert (10', 20.000 g). Der Überstand wurde sukzessive mit zwei Volumen Phenol (pH 8) und zwei Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. BAC DNA wurde mit einem

Volumen Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt (10', 20.000 g), mit 70% Ethanol gewaschen (10', 20.000 g) und in TE aufgenommen.

2.8.4 Präparation genomischer DNA

Eukaryotische DNA wurde nach Lyse von Zellen oder Organbruchstücken in *Tail Lysis Buffer* mit 0,5 – 2 mg/ml Proteinase K bei 56°C mit einem Volumen Isopropanol präzipitiert. Für ES Zell Screening wurden die Zellen in 96 well Mirotiterplatten lysiert (50 µl) und die DNA 2 h mit einem Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach Inversion der Platten über einen Filterpapierstapel wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen und ca. 1 Stunde an der Luft getrocknet.

2.8.5 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration DNA haltiger Lösungen wurde nach Verdünnung in TE spektrophotometrisch bei 260 nm nach folgender Formel berechnet:

$$C = OD_{260} \times 50 \text{ mg/ml}$$

Der Koeffizient OD_{260}/OD_{280} sollte mindestens 1,8 betragen damit eine Kontamination durch Proteine ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich wurde die Konzentration visuell gegenüber eines Leiter Standards mit bekannten DNA Mengen bestimmt.

2.8.6 Trennung und Visualisierung von DNA

Native Polyacrylamid Gelelektrophorese: DNA Moleküle unter einer Größe von 100 bp (z. B. annealed Oligonukleotide) wurden über 20% Polyacrylamid in TBE über vertikale Gelelektrophorese bei 200 V aufgetrennt. Die Extraktion gewünschter Banden erfolgte nach Elution des entsprechenden Gelausschnittes in 500 mM NaCl und 1 mM EDTA schüttelnd für 1 h bei 50°C. Danach konnte die DNA aus dem Eluat alkoholisch gefällt werden.

Agarose Gelelektrophorese: Die Trennung der DNA erfolgte entweder mit TAE (5

V/cm) bei Routineläufen oder mit TBE (1 V/cm, ÜN) für Southern Blots. Gele wurden mit 100 ng/ml Ethidiumbromid vorgefärbt.

UV-vermittelte Visualisierung von DNA: Ethidiumbromid interkalierende DNA konnte mit UV Licht (305 nm) visualisiert werden. Aufnahmen wurden mit einer CCD Kamera gemacht. Zur Exzision DNA haltiger Banden wurde das Gel bei 365 nm exponiert, um mögliches *cross-linking* zu minimieren.

2.8.7 Restriktionsendonucleolytische Spaltung von DNA

Restriktionsendonucleolytische Spaltung von Plasmid oder BAC DNA: 1 µg DNA wurde in 50 µl Gesamtvolumen mit dem zehnfachen Überschuss am gewünschten Enzym (10 U/µg) 1 – 2 h bei der optimalen Temperatur mit dem vorgesehenen Puffer inkubiert.

Partielle endonucleolytische Spaltung von Plasmid DNA: Vier Ansätze mit je 3 µg DNA und einer 1:5er Verdünnungsreihe des gewünschten Enzyms – beginnend bei 10 U im ersten Ansatz – wurden 10' bei der optimalen Temperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNA Probenpuffer mit 1% SDS gestoppt und die gewünschte Bande über Gelextraktion aufgereinigt.

Endonucleolytische Spaltung von genomischer DNA: Bis zu 20 µg DNA wurde in 50 µl Gesamtvolumen mit 50 U (ES Zellen in Mikrotiterformat) bzw 150 U (20 µg genomische DNA) hochkonzentriertem Enzym (50 U/µl) ÜN bei 37°C im vorgesehenen Puffer inkubiert. Ein Teil der Reaktion wurde über ein DNA Minigel analysiert und gegebenenfalls weitere 1 – 2 h mit 25 – 50 U frischem Enzym inkubiert.

2.8.8 In vitro Cre/loxP Rekombination

Der in dieser Arbeit angefertigte Targeting Vektor wurde vor der Transfektion in ES Zellen auf die Funktionalität der loxP Erkennungssequenzen hin überprüft. Dazu wurde der Vektor zunächst im Methylase defizienten Stamm JM110 amplifiziert und anschließend mit dem Restriktionsenzym *Cla I* linearisiert. 100 ng linearisierter

Targeting Vektor wurde einer *in vitro* Cre Rekombinase Reaktion unterworfen. Die Reaktion wurde in 50 µl bei 37°C für 30' mit 1 U Cre Rekombinase angesetzt. Die Analyse der Reaktion erfolgte über PCR mit den Primern RA-RI und 23, die bei erfolgreich rekombiniertem Targeting Vektor ein Produkt von 230 bp produzieren.

2.8.9 DNA Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung erfolgte nach der Sanger Methode (Sanger *et al.* 1977) mit differentiell fluoreszenzmarkierten, zu Kettenabbrüchen führenden 2'-3'-Dideoxyribonukleotiden. Die Einzelstrang PCR Reaktionen wurden in 10 µl Totalvolumen mit 1 – 2 µl Mastermix angesetzt. Die Reaktion enthielt 100 – 250 ng DNA Template sowie 3,3 pmol Sequenzierprimer und wurde mit einer zweiminütigen Denaturierung (2', 94°C) initiiert. Es folgten 30 Zyklen mit Denaturierung (10'', 94°C), Primerhybridisierung und Elongation (4', 60°C). Die Reaktion wurde mit einer finalen Elongation (10', 60°C) abgeschlossen. Die Sequenzen wurden im Servicelabor des Institutes für Genetik in Köln gelesen. Die Analyse erfolgte mit Chromas Software Version 2,33 (Technelysium, Tewantin, Australia).

2.8.10 Spezifischer Nachweis und Ampifikation von DNA mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktionen (PCR: *polymerase chain reaction*) wurden nach der 1987 beschriebenen Methode (Mullis and Faloona 1987) routinemäßig mit 5 ng Plasmid DNA oder 50 – 500 ng genomischer DNA als Template angesetzt. Die *sense* und *anti-sense* Primer wurden so gewählt, dass sie hochkonservierte 18 – 25 nt lange Sequenzen enthielten, bei ca. 60°C hybridisieren konnten, keine Sekundärstrukturen ausbilden konnten und wenn möglich mit den Basen Cytosin oder Guanosin am 3' Ende ausgestattet waren. Die Reaktionen wurden nach Bedarf in 10 – 50 µl Totalvolumen nach Herstellerangaben (bei den Kits) mit je 10 pmol der jeweiligen Primer, 200 µM dNTPs und dem mitgelieferten Puffer auf Eis angesetzt und sofort auf die entsprechende Denaturierungstemperatur eingestellt (Hotstart). Die PCR Reaktion begann standartmäßig mit einer zweiminütigen initialen Denaturierung (2', 94°C, 98°C bei Phusion™) gefolgt von 20 – 60 Zyklen von kurzen

Denaturierungen (10'' – 20''), Primerhybridisierungen (20'' – 30'', $T_m+3^\circ\text{C}$ bei Phusion™,) und Elongationen (1'/kb bei Taq Polymerase, 2'/kb bei *proof-reading* Polymerasen sowie 30''/kb bei Phusion™) bei 68°C (*proof-reading* Polymerasen) oder 72°C (Taq und Phusion™). Die Reaktionen wurden nach einer finalen fünfminütigen Elongation (5', 72°C) beendet.

2.8.11 PCR-Anwendungen

Kolonie PCR: Diese Methode wurde angewandt, um eine Vorauswahl zu pickender Kolonien bei komplizierten Klonierungsreaktionen mit vielen falschpositiven Kolonien zu treffen. Als Template diente hierbei Material einer Kolonie in der Größe etwa einer Stecknadelspitze. Die initiale Denaturierung genügte, um auch die Bakterien zu lysieren und deren DNA zu entlassen. Die PCR bestand aus 20 – 25 Zyklen.

Kompetitive PCR: Diese Methode wurde angewandt, um heterozygote Allele in einer Reaktion nachweisen zu können. Dafür wurden drei Primer verwendet, von denen einer auf beide Allele passt, während die anderen jeweils spezifisch für die beiden Allele sind.

Nested PCR: Diese Methode wurde angewandt, um kleinste Mengen von Templates besser amplifizieren zu können. Dafür wurde in einer ersten PCR ein größerer Bereich amplifiziert (25 Zyklen), der das endgültige Produkt beinhaltet. Das Amplikon der ersten Reaktion wurde dann als Template für die Nested PCR verwendet, die aus 25 – 30 Zyklen bestand.

Assembly PCR: Bei dieser Methode flankieren zwei Primer (Primer P1 und P4) das 3' Ende bzw. das 5' Ende des zu amplifizierenden DNA Fragments, während die Primer P2 und P3 zueinander komplementär sind und die entsprechenden Nukleotidsubstitutionen beinhalten. Nun werden in einem ersten Syntheseschritt jeweils unabhängig voneinander die zwei Subfragmente (Fragment I, flankiert von P1 und P2 sowie Fragment II, flankiert von P3 und P4) mit der Taq Polymerase amplifiziert, bevor diese in einem anschließenden Schritt in einem äquimolaren Verhältnis als Template für die Amplifikation des Gesamtfragments mit den Primern P1 und P4 eingesetzt werden. Die zweite PCR darf auch mit *proof-reading*

Polymerasen durchgeführt werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen Riboflavinkinase Derivate (RFK^{N36D} und RFK^{E86Q}) wurden über Assembly PCR kloniert.

2.8.12 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden für Nukleinsäure Blots

Zur radioaktiven Markierung von DNA Sonden wurden Kits basierend auf der *random priming* Technik von GE Healthcare (Rediprime II) oder Takara (Ladderman™ Labeling Kit) benutzt. Radioaktivität wurde in Form von dCT^{32P} in die Sonden inkorporiert. Als Templates dienten hochkonservierte DNA Moleküle von 250 bis 750 bp. Für Rediprime II wurden 25 ng DNA 10' bei 37°C inkubiert. Im Ladderman Labeling Kit wurden 100 ng DNA für 30' bei 37°C markiert. Die markierte Sonde wurde über negativen Größenausschluss (Sephadex S-200 Säulen; GE Healthcare; Piscataway, USA) aufgereinigt. Die Säulen wurden getrocknet (1', 500g) und die markierte Sonde eluiert (3', 500 g). Die Radioaktivität der Sonde wurde mit einem β -Counter gemessen. Für die Hybridisierungslösung wurden 2×10^6 cpm pro ml eingesetzt.

2.8.13 Spezifischer Nachweis von DNA mittels Southern Analyse

DNA wurde über 0,8% Agarosegele ÜN getrennt, in 0,25 M HCl für 20' depuriniert und alkalisch auf positiv geladene Nylon Membranen ÜN transferiert. Die Membran wurde nach dem Transfer mit einer Lösung aus 100 mM Tris (pH 8) und 1 M NaCl neutralisiert und anschließend mit 2 x SSC gewaschen. DNA wurde mit 150 mJoule/cm² UVC *cross-linked*. Die Blots wurden 4 h bei 65°C mit Hybridisierungslösung prähybridisiert und dann ÜN mit 2×10^6 cpm/ml radioaktiv markierter und an frisch denaturierte Sonde hybridisiert. Zum Waschen wurden Waschpuffer mit steigender Stringenz benutzt. Ungebundene Nukleotide wurden durch zweimaliges Waschen mit 2 x SSC/0,1% SDS bei 65°C entfernt. Danach wurde 15' mit 1 x SSC/0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Meist wurde zusätzlich 1 - 2 mal stringent (0,1 x SSC/0,1% SDS bei 65°C) gewaschen, bis die Radioaktivität auf dem Blot annähernd Hintergrundlevel erreicht hatte. Danach wurden die Blots mit 2 x

SSC in Folien eingeschweißt und für mehrere Stunden bis Tage auf autoradiographischen Filmen bei -70°C oder auf Phosphoimager Screens bei Raumtemperatur exponiert.

2.9 Klonierung

2.9.1 Manipulation kohäsiver DNA-Enden

Manipulation 5' oder 3' vorstehender DNA Enden: 1 μg Plasmid DNA wurde mit dem gewünschten Restriktionsenzym geschnitten und anschließend im selben Ansatz 30' mit 2 U T4 DNA Polymerase und 200 μM der gewünschten oder aller vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) inkubiert. Das Enzym besitzt eine $3' \rightarrow 5'$ Exonukleaseaktivität und generiert *blunt ends* aus 3' Überhängen. Die hohe Prozessivität bei ihrer $5' \rightarrow 3'$ Polymeraseaktivität kann darüber hinaus zum Auffüllen von 5' Überhängen genutzt werden.

Generierung von *blunt ends* aus 5' überhängenden DNA Enden: 1 μg geschnittene Plasmid DNA wurde 30' bei 30°C mit 1 U Mung Bean Nuclease in 1 x Mung Bean Nuclease Puffer inkubiert, um den 5' Überhang abzubauen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNA Probenpuffer mit 1% SDS gestoppt.

2.9.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Vektor DNA wurde nach endonukleolytischer Spaltung für *blunt end* Ligationen an den 5' Enden dephosphoryliert, um Selbstligation zu verhindern. Dazu wurde der Restriktionsansatz mit 1 μg Plasmid DNA mit 1 x Antarctic Phosphatase Puffer aufgefüllt und 15' mit 5 U Antarctic Phosphatase bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend 5' bei 65°C denaturiert.

2.9.3 Ligation

50 ng Vektor DNA wurde mit einem molaren Verhältnis von 1:3 zum entsprechenden Insert in 20 μl Totalvolumen und 5 U T4 DNA Ligase in 1 x *rapid ligation buffer* 5' –

30' bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Ligation von *annealed* Oligonukleotiden und Vektor wurden 80 ng Insert und 50 ng Vektor 30' ligiert.

2.9.4 Klonierung des Targeting Vektors p Δ mRFK

Zur Herstellung einer konditional deletierbaren Variante von muriner RFK (mRFK) wurde der Vektor p Δ mRFK konstruiert. Dieser beinhaltet drei Kassetten (*short* und *long homology arm* und *floxed region*), die durch homologe Rekombination ins murine Genom integriert werden sollten. Die drei Kassetten wurden unabhängig voneinander zuerst mit Pfu Polymerase aus dem *Mus musculus* BAC Klon RP23-77E4 (Chromosom 19) amplifiziert und nach dem Anhängen von Adenosin an die 3' Enden mit Taq Polymerase über TA Klonierung in pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. pCR2.1-TOPO ermöglicht über α -Komplementation in XL1-Blue Zellen Blau/Weiß Selektion erfolgreich klonierter Vektoren auf X-Gal LB-Platten. Die Kassetten wurden sequenziert und über die von den Primern eingeführten Schnittstellen in den Targeting Vektor subkloniert. Die drei homologen Bereiche sind durch Erkennungssequenzen für die Cre Rekombinase (loxP) voneinander getrennt. Dadurch soll *in vivo* eine konditionale Deletion der ca. 1,6 kb großen *floxed region* ermöglicht werden. Letztere beinhaltet ca 500 bp der Promotorregion sowie ca 1,1 kb der genomischen Region von murinem DDIF, das die Exons 1 und 2 umfaßt. Die *floxed region* (Primer: P1-Sbf und P-Sal) wurde im ersten Schritt mit *Sbf I* und *Sal I* aus dem TA Vektor herausgeschnitten und in den von Prof. Ari Waisman (Genetik, Köln) zu Verfügung gestellten Vektorrückgrat pRAPID-Flirt kloniert. Im zweiten Schritt wurde nach partiellem Verdau des durch Transformation in den methylierungsdefizienten *E. coli* Stamm JM110 demethylierten Vektorderivats mit *BamHI* und regulärem Verdau mit *Clal* ein ca 2,5 kb grosses Fragment (*short arm*, Primer: P2-Cla und P-Bam) stromaufwärts von der 5' loxP Erkennungssequenz und der Resistenzkassette für Neomycin (Marker für positive Selektion) kloniert. Schließlich wurden ca. 2,6 kb (*long arm*, Primer: P-sXho und P-asXho) stromabwärts von der *floxed region* und der 3' loxP Erkennungssequenz und stromaufwärts von der Thymidinkinase von Herpes simplex Virus (HSV-TK für negative Selektion mit Gancyclovir bei illegitimer Integration) über die *Xho I* Schnittstelle kloniert, nach dem der Vektor linearisiert und dephosphoryliert wurde

Die Neomycinkassette ist von Erkennungssequenzen der Flip Rekombinase (*flirt-site*) flankiert, die eine Entfernung der Neomycinkassette nach erfolgreicher homologer Integration ins ES Zellgenom ermöglichen sollen. Der Targeting Vektor p Δ mRFK wurde anschließend komplett sequenziert.

2.9.5 Klonierung der prokaryotischen GST Expressionsvektoren

RFK^{wt} und zwei Mutanten (RFK^{N36D} und RFK^{E86Q}) wurden zwecks rekombinanter Expression und Aufreinigung in *Escherichia coli* in den Vektor pGEX-4T-3 (GE Healthcare; Piscataway, USA) kloniert. Die Derivate wurden aus den sequenzierten pENTR Vektoren mit *Bam*HI und *Sal*I herausgeschnitten, in pGEX-4T-3 kloniert und sequenziert. Die Herstellung der Mutanten erfolgte über Assembly PCR. RFK^{N36D} wurde mit den Primerpaarungen 5' DD-Bam und N36D-rev sowie N36D-fw und 3' DD-Sal hergestellt. RFK^{E86Q} wurde mit den Primerpaarungen 5' DD-Bam und E86Q-rev sowie E86Q-fw und 3' DD-Sal amplifiziert.

2.9.6 Konstruktion und Klonierung von shRNA Expressionskassetten

Zu Klonierung der shRNA Expressionskassetten wurden für jede shRNA zwei 60 nt DNA Oligonukleotide bestellt, die nach intermolekularer Hybridisierung ein 19 nt *inverted repeat* bilden und den 9 nt *spacer* flankieren. Darüber hinaus beinhalten die Oligonukleotide die nötigen Nukleotide für den Start sowie den Stopp der RNA Polymerase III und ungepaarte Enden für die gerichtete Klonierung in die *Bgl* II und *Hind* III Schnittstellen des Vektors. Der stromaufwärts Teil des *inverted repeats* entspricht der Zielsequenz der zu herunterregulierenden mRNA (*sense* Strang), während der stromabwärts Teil des *repeats* komplementär zur Zielsequenz ist (*anti-sense* Strang) und somit in den RISC inkorporiert wird. Da die RNA Polymerase III nach dem zweiten Thymidinrest der Stoppkassette von dem Template abspringt, besitzt die shRNA den für den Kernexport durch Exportin-5 benötigten zweifachen 3' Uridin Überhang (Yi *et al.* 2003). Erst im Zytoplasma prozessiert DICER die shRNA zu funktionellen siRNA.

Die in dieser Arbeit verwendeten shRNA Expressionskassetten wurden zunächst in den multifunktionellen Vektor pENTR/siH1/mDD-Stuffer mit GATEWAY® Kompatibilität kloniert. Nach der Verifikation der Sequenz wurde die Funktionalität der siRNAs über Kotransfektion mit Reporterkonstrukten in HEK-293 Zellen überprüft. Anschließend wurde die Expressionskassette über attL/attR Rekombination (basiert auf dem λ -Integrase System (Landy 1993)) mit LR Clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) in lentivirale DESTINATION® Vektoren mit attB Erkennungssequenzen rekombiniert. Die in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen shRNA Vektoren sind Derivate des kommerziellen Vektors pLenti6/Ubc/V5-DEST (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland), von denen einer für stabile Zelllinien (pL) und der andere (pLG) für FACS Versuche nach transienter Transfektion verwendet wurde.

2.9.7 Konstruktion lentiviraler Vektoren

2.9.7.1 pENTR® Vektoren und Derivate

pENTR/siH1/mDD-Stuffer: Der Vektor basiert auf pENTRY-siRNA-H1 (Andreas Untergasser), der die H1-Promotor gefeuerte shRNA-Kassette aus pSUPER beinhaltet und wurde für unsere Zwecke modifiziert. Im ersten Schritt wurde zwecks besserer Klonierbarkeit eine Auffüllsequenz (*Stuffer*) von ca. 500 bp über gerichtete Ligation in den mit *Bgl*III und *Hind*III geschnittenen pENTRY-siRNA-H1 ligiert. Anschließend wurde der Vektor mit *Hpa*I und *Eco*RV geschnitten und das Fragment, das die attL Erkennungssequenzen und die shRNA Expressionskassette beinhaltete in den mit *Sna*BI und *Hpa*I geschnittenen Vektor Hintergrund pEGFP-N3 kloniert, um die Elemente SV40 polyA stromabwärts von der attL2 Erkennungssequenz sowie den SV40 *ori* und die Neomycinresistenzkassette im somit entstandenen pENTR/siH1/mDD-Stuffer zu inkorporieren.

pENTR/TA: Der Vektor pENTR/TA ist ein Derivat von pENTR/siH1/mDD-Stuffer und beinhaltet zwei invertierte *Xcm*I Schnittstellen, die nach entsprechendem Verdau einen linearisierten Vektor mit je einem einfachen 3' Thymidin Überhang an den Enden generiert und damit TA-cloning ermöglichen. Die benötigte Sequenz wurde über Hybridisierung von 36 nt Oligonukleotiden (TA-sense und TA-antisense)

hergestellt, die 5' einen *BamHI* und 3' einen *HindIII* Überhang ergaben. kloniert. Der Vektor wurde überwiegend für die Subklonierung von zu sequenzierenden genomischen Sequenzen eingesetzt.

2.9.7.2 DESTINATION[®] Vektoren und die Konstruktion der Derivate

pLenti6/Ubc/V5-DEST: Lentiviraler Expressionsvektor aus der Gateway[™] Reihe von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), der die Expression von ORFs – über LR Klonierung in den Vektor rekombiniert – mit Ubiquitin-C (UBC) Promotor ermöglicht.

pL: pL ist ein in dieser Arbeit hergestelltes Derivat von pLenti6/ Δ Ubc/V5-DEST. Der Ubc Promotor wurde mit den Enzymen *KpnI* und *SacII* aus dem parentalen Vektor herausgeschnitten. Die Reaktionen waren jeweils als partiellen Verdau angesetzt und erfolgten sequentiell. Der geschnittene Vektor wurde mit T4 DNA Polymerase gebluntet und religiert. Der Vektor wurde für die lentivirale Expression von shRNAs genutzt, die davor in pENTR/siH1/mDD-Stuffer kloniert und über LR Rekombination in pL rekombiniert wurden.

pLG: pLG (Abb xxx) ist ein Derivat von pLW und besitzt stromabwärts der 3' attR Erkennungssequenz (attR2) eine Expressionskassette für EGFP (*enhanced green fluorescent protein*). Die Expressionskassette besteht aus dem CMV Promotor und dem ORF von EGFP aus dem zuvor demethylierten pEGFP-N3 (Clontech-Takara Bio; Saint-Germain-en-Laye, Frankreich). Dafür wurde pEGFP-N3 zunächst mit *AflIII* linearsiert und mit T4 DNA Polymerase gebluntet. Das Insert wurde dann mit *XbaI* herausgeschnitten. pLW wurde zunächst mit *XhoI* geschnitten und gebluntet. Anschließend wurde er mit *XbaI* geschnitten und mit dem Insert ligiert.

pLCW: pLCW ist ein Derivat von pLenti6/V5-DEST (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) mit WPRE. WPRE wurde wie bei pLW in den parentalen Vektor kloniert. pLCW wurde für Überexpressionsstudien eingesetzt.

2.9.8 GATEWAY[®] Klonierung

Die in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Konstrukte wurden über GATEWAY[®] Klonierung hergestellt. Die zunächst in pENTR[®] Derivate klonierten

Expressions-kassetten wurden über gerichtete attL/attR Rekombination mit Hilfe des Kits LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) in die entsprechenden DESTINATION® Vektoren rekombiniert. Dabei ersetzt das zwischen den attL-Erkennungssequenzen des pENTR-Vektors gelegene Fragment ein für wt-*E. coli* toxisches, von attR-Erkennungssequenzen flankiertes Fragment auf dem lentiviralen DESTINATION® Vektor. Die Reaktionen wurden zwar nach Herstellerangaben allerdings in einem kleineren Gesamtvolumen (5µl total) und ÜN angesetzt. Die angegebenen Mengen wurden dementsprechend angepasst.

2.9.9 Klonierung der RFK in pLCW

Die cDNA für RFK wurde zwecks Überexpression in den lentiviralen Vektor pLCW (diese Arbeit) kloniert. Dafür wurde zunächst die wt RFK aus HeLa cDNA mit Phusion™ Polymerase unter Verwendung Primer 5' DD-Bam und 3' DD-Sal bzw. amplifiziert. Das gewonnene PCR Fragment wurde mit *BamHI* und *Sall* geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pENTR/siH1/mDD-Stuffer kloniert. Über GATEWAY®-Klonierung wurde RFK in pLCW subkloniert.

2.9.10 Fluoreszente Fusionsproteine

pEGFP-N3-RFK^{wt}: RFK^{wt} wurde mit den Primern N3-hDD-5' und N3-hDD-3' aus HeLa cDNA amplifiziert, mit *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pEGFP-N3 (Clontech-Takara Bio; Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) kloniert. Dabei entsteht eine an den N-Terminus des EGF Proteins fusionierte RFK.

pEGFP-C1-RFK^{wt}: RFK^{wt} wurde mit aus pENTR/RFK^{wt} mit *BamHI* und *Sall* herausgeschnitten und in die *BgIII* und *Sall* Schnittstellen des Vektors pEGFP-C1 (Clontech-Takara Bio; Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) kloniert. Dabei entsteht eine an den C-Terminus des EGF Proteins fusionierte RFK.

pEGFP-RFK^{wt/siR} und pEGFP-RFK^{E86Q/siR}: RFK^{wt/siR} und RFK^{E86Q/siR} sind siRNA resistente Mutanten von RFK^{wt} bzw. RFK^{E86Q}, dem kinasedefizienten Derivat, die an den C-Terminus von EGFP in den Vektorrückgrat pEGFP-C1 kloniert wurden. Sie

wurden zwecks Rekonstitution der RFK in den shRNA Zelllinien hergestellt. Die Mutationen wurden an zehn Basen innerhalb der Targeting Sequenz der in dieser Arbeit verwendeten sh/siRNA gegen RFK eingeführt. Dabei handelt es sich immer um stille Mutationen, die sich nicht in der Proteinsequenz niederschlagen. Sie wurden über Assembly PCR mit den Primerpaaren 5'DD-Bam und siDDresc-rev bzw. 3'DD-Sal und siDDresc-fw eingeführt. Als Matrize dienten jeweils die evaluierten Vektoren pENTR/RFK^{wt} bzw pENTR/RFK^{E86Q}. RFK^{E86Q} wurde zuvor über Assembly PCR hergestellt. Dazu wurden im ersten Schritt die Primerpaare 5'DD-Bam und E86Q-rev sowie E86Q-fw und 3'DD-Sal verwendet, um die Subfragmente aus pENTR/RFK^{wt} mit Taq Polymerase zu amplifizieren. Im zweiten Schritt wurden die Subfragmente als Matrize in einer Phusion™ Polymerase vermittelten PCR mit den Primern 5'DD-Bam und 3'DD-Sal verwendet. Die RFK^{E86Q} Mutante wurde über *BamHI* und *Sall* in pENTR/siH1/mDD-Stuffer kloniert.

2.10 Arbeiten mit RNA

2.10.1 Aufreinigung von RNA

über Silicagel Säulen: In dieser Arbeit wurde für die Herstellung von cDNA bzw. mRNA zunächst die gesamte RNA von bis zu 5×10^6 Zellen (Mini Prep) bzw. bis zu 2×10^7 Zellen (Midi Prep) über Silicagel Säulen aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Für cDNA Synthese wurde außerdem ein DNase Verdau auf der Säule (nach Herstellerangaben) durchgeführt.

Aufreinigung von RNA durch TRIZOL® Fällung: Die RNA Aufreinigung mit TRIZOL® basiert auf dem Zellaufschluss mit dem chaotropischen Salz Guanidiniumthiocyanat, das auch in den Lysispuffern der Kit Hersteller Verwendung findet, und einer phenolischen Extraktion von denaturierten Proteinen. Dafür wurde ein Zellpellet oder ein Organbruchstück (30 – 100 mg) mit 600 µl TRIZOL® homogenisiert und 10' auf Eis äquilibriert. Dann wurde 200 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) bei Raumtemperatur hinzugegeben, gevortext und 5' inkubiert. Debris wurde pelletiert (5', 20.000g). Die wässrige Phase enthielt die RNA und wurde mit einem Volumen Isopropanol präzipitiert (10', 20000 g). Das RNA Pellet wurde zweimal mit 70%

Ethanol gewaschen (10', 20000 g) und dann 5' – 15' luftgetrocknet. Das Pellet wurde schließlich mit DEPC (2 ml/l ÜN schütteln; autoklavieren) behandeltem Wasser resuspendiert.

2.10.2 cDNA Synthese und RT-PCR

Synthese von cDNA: cDNA wurde zum Zwecke der Bestimmung relativer Expressionslevel von einzelnen Genen oder für die Amplifikation von ORFs synthetisiert. Es wurde der Protoscript® First Strand cDNA Synthesis Kit von NEB (Ipswich, England) benutzt, der auf der RNA abhängigen DNA Polymerase von *Molony murine Leukaemia Virus* (M-MuLV) basiert. In der Regel wurde 1 µg RNA nach Herstellerangaben zur Synthese von cDNA eingesetzt. Allerdings wurde nur polyA RNA revers transkribiert, da ein polyT Primer zur Synthese verwendet wurde. Zur Überprüfung der Qualität der cDNA wurde ein 350 bp langes Amplikon mit den mitgelieferten GAPDH spezifischen Primern in einer 20 Zyklen PCR generiert.

2.10.3 Spezifischer Nachweis von RNA mittels Northern Analyse

Denaturierende Gelelektrophorese von RNA: 1% Agarose wurde in 72 ml DEPC Wasser gekocht und bei 60°C äquilibriert. Dann wurde 18 ml 12,3 M (= 37%) Formaldehyd (Endkonz.: 2,2 M) und 10 ml MOPS RNA Laufpuffer hinzugefügt und das Gel unter einem Abzug gegossen. RNA wurde mit 2 x RNA Loading Dye gemischt, 10' bei 70°C denaturiert und 5' auf Eis gequencht. Die Trennung erfolgte bei 2 – 4 V/cm für 2 – 4 h.

Northern Analyse von RNA: RNA wurde aus dem Gel mit 10 x SSC ÜN mittels *downward capillary transfer* (Chomczynski 1992) auf positiv geladene Nylonmembranen transferiert und mit 150 mJoule/cm² UVC *cross-linked*. Die Blots wurden mit Rapid Hybridization buffer 30' bei 65°C prähybridisiert und 90' mit 2 x 10⁶ cpm/ml radioaktiver Sonde hybridisiert. Zum Waschen wurden wie beim Southern Blot Waschpuffer mit steigender Stringenz benutzt. Ungebundene Nukleotide wurden mit mildem zweimaligem Waschen mit 2 x SSC/0,1% SDS bei 65°C entfernt. Danach wurde 15' mit 1 x SSC/0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Anschließend wurde

mindestens einmal stringent (0,1 x SSC/0,1% SDS bei 65°C) gewaschen, bis die Radioaktivität auf dem Blot annähernd Hintergrundlevel erreicht hatte. Danach wurden die Blots mit 2 x SSC in Folien eingeschweißt und für mehrere Stunden bis Tage auf autoradiographischen Filmen bei -70°C oder auf Phosphoimager Screens bei Raumtemperatur exponiert.

2.11 Proteinbiochemische Methoden

2.11.1 Größentrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese wurde im Tris Glycin Puffersystem durchgeführt (1 x Laufpuffer). Die Proben wurden zunächst im reduzierenden 1 x Probenpuffer aufgekocht (5') und über ein 4% Sammelgel und ein 12 – 14%iges Trenngel getrennt. Die Trennung erfolgte bei 120 V im vertikalen Minigelsystem von Bio-Rad (München, Deutschland).

4% Sammelgel (10 ml): 2,5 ml 0,5 M Tris (pH 6,8), 6,4 ml H₂O, 100 µl 10% SDS, 1 ml 40% Polyacrylamid, 150 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat), 15 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin)

12% Trenngel (10 ml): 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 4,5 ml H₂O, 100 µl 10% SDS, 3 ml 40% Polyacrylamid, 150 µl 10% APS, 15 µl TEMED

14% Trenngel (10 ml): 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 4 ml H₂O, 100 µl 10% SDS, 3,5 ml 40% Polyacrylamid, 150 µl 10% APS, 15 µl TEMED

2.11.2 Silberfärbung

Das Polyacrylamidgel wurde 1 h in Fixierlösung fixiert (oder ÜN) und anschließend 2 x für 25' mit Waschlösung gewaschen. Danach wird das Gel 1' in Sensitivierlösung geschwenkt und 3 x mit H₂O gewaschen. Die Färbung erfolgt 20' in Färbelösung. Nach extensivem, dreifachem Waschen mit H₂O erfolgt die Entwicklung in Entwicklerlösung je nach gewünschter Stärke des Signals für bis zu 20'. Nach

Erreichen des gewünschten Signals wird die Färbung mit Stopplösung gestoppt. Danach kann das gefärbte Gel in 1% Essigsäure bei 4°C aufbewahrt werden.

Fixierlösung: 500 ml Ethanol, 100 ml Essigsäure, 400 ml H₂O, 0,5 ml 12,3 M (37%) Formaldehydlösung

Waschlösung: 500 ml Ethanol, 500 ml H₂O

Sensitivierlösung: 0,2 g Na₂S₂O₃ x 5H₂O/l H₂O

Färbelösung: 2 g AgNO₃/l H₂O (dunkel und kühl), frisch; 600 µl 37%Formaldehyd

Entwicklerlösung: 40 g Na₂CO₃, 4 mg Na₂S₂O₃ x 5 H₂O in 1 l H₂O, frisch; 500 µl 37%Formaldehyd

Stopplösung: 60 ml Eisessig, 220 ml Ethanol, 220 ml H₂O

2.11.3 Zelllysate

Zytosolische Extrakte: Für zytosolische Extrakte wurden im Wesentlichen wie beschrieben durchgeführt. Zellen wurden pelletiert (5', 300 g) und mit hypotonischem Puffer A inkubiert (20', 4°C). Danach wurden die Zellen durch eine 27G Nadel homogenisiert pelletiert (20', 20000 g, 4°C). Anschließend wurde die Proteinkonzentration des resultierenden Überstandes (zytosolischer Extrakt) mittels BCA assay bestimmt. Proben wurden in 1 x Proteinladepuffer gekocht (5', 95°C) und pelletiert (1', 20000 g). Angegebene Proteinmengen wurden auf SDS Gele aufgetragen.

2.11.4 Spezifischer Nachweis von Proteinen über Western Blot

Blot: Proteine wurden auf PVDF Membranen von Schleicher & Schuell (Whatman®; Dassel, Deutschland) geblottet. Für das Blotten wurde die Mini Blot Kammer von Bio-Rad (München, Deutschland) benutzt. Es wurde bei 300 mA 60' in 1 x Transferpuffer geblottet. Der Transfer wurde mit der reversiblen Färbung durch Ponceau evaluiert.

Blocken: Die Membranen wurden zwecks Blockierung unspezifischer

Antikörperinteraktionen 30' in Blockierungspuffer inkubiert.

Bindung spezifischer Erstantikörper: Die verwendeten Erstantikörper wurden in den vom Hersteller angegebenen Verdünnungen in Blockierungspuffer verdünnt und entweder 1 h bei Raumtemperatur oder ÜN bei 4°C mit der Membran bei schüttelnd (45 rpm) inkubiert.

Nachweis des Erstantikörpers mittels HRP konjugierter Zweitantikörper: Zum immunhistochemischen Nachweis der Proteine wurden HRP (*horseradish peroxidase*) konjugierte Zweitantikörper verwendet, die spezifisch am Erstantikörper gebunden, nach Umsatz des ECL® Reagenz (Pierce; Fischer Scientific; Schwerte, Deutschland) Licht emittieren.

Visualisierung: Die Detektion des Lichtsignals erfolgte über autoradiographische Filme von AP Biotech (GE Healthcare; Piscataway, USA). Die Entwicklung der Filme erfolgte über den automatischen Entwickler von von Kodak.

2.11.5 Herstellung und Aufreinigung rekombinanter Proteine

RFK^{wt} und mutierte Derivate (RFK^{N36D} und RFK^{E86Q}) wurden als C-terminale GST (Glutathion-S-Transferase) Fusionsproteine im *E. coli* Stamm BL-21 (DE3) pLysS überexprimiert und aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteine wurden einem Riboflavinkinaseassay unterzogen.

Kolonie Blot: Zunächst wurden 10 pg der entsprechenden Plasmide in BL-21 (DE3) pLysS transformiert und die Bakterien ÜN auf IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) LB Agarplatten bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde ein Kolonieimmunblot durchgeführt, um hoch exprimierende Klone identifizieren zu können. Dazu wurde zunächst ein Abklatsch der Kolonien auf PVDF Membran (Schleicher & Schuell, Whatman®; Dassel, Deutschland) hergestellt. Die auf Membran übertragenen Kolonien wurden lysiert (10', 10% SDS) und 5' denaturiert (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl). Danach wurde der Blot mit einer Lösung von 0,5 M Tris (pH 7,4) und 1,5 M NaCl neutralisiert. Nach zweimaligem Waschen des Blots in 2 x SSC wurde dieser wie Western Blots behandelt. Der verwendete Erstantikörper ist ein in unserem Labor hergestelltes Serum (Katja Wiegmann-Krönke) aus

Kaninchen und wurde 1:200 verdünnt für 1 h auf dem Blot inkubiert. Der Zweitantikörper wurde nach 30 minütigem mehrfachem Waschen mit S-PBS für 1 h bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:5000 inkubiert.

Expression: Jeweils eine Kolonie wurde für eine Starterkultur ÜN in 50 ml LB (150 µg/ml Ampicillin) inokuliert. Am nächsten Morgen wurde die Starterkultur 1:1000 in 500 ml LB (150 µg/ml Ampicillin) inokuliert. Nach ca. 2 h bei 37°C wurde die OD₆₀₀ von 0,6 erreicht, bei der die Expression der rekombinanten Proteine mit 300 µM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) für 3 h induziert wurde. Die Zellen wurden danach pelletiert (10', 4000 g).

Zellaufschluß: Da das Protein in der löslichen Fraktion lokalisiert ist, konnte die Aufreinigung unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden. Die Pellets wurden dafür zunächst mit 40 ml PBS resuspendiert und die Zellen 30' rollend bei Raumtemperatur nach Zusatz von 1% Triton und 200 µg/ml Lysozym leicht aufgeschlossen. Danach erfolgte ein stringenterer Aufschluss mit dreimaligem Sonifizieren (je 10'') auf Eis. Zelldebris wurde 2 x pelletiert (20', 15.000 g, 4°C) und der Überstand für die Aufreinigung verwendet.

Aufreinigung: Die GST Fusionsproteine wurden 30' auf dem Roller bei Raumtemperatur mit je 1 ml rekonstituierter (2 x 10 Volumen PBS) Sepharose 4B (GE Healthcare; Piscataway, USA) aus dem Überstand gebunden und anschließend präzipitiert (5', 300 g). Das Präzipitat wurde 3 x mit PBS gewaschen (5'' gevortext; 5', 300 g pelletiert). Die gebundenen Proteine wurden 3 x sukzessive für 10' bei Raumtemperatur rollend mit 500 µl Elutionspuffer bestehend aus 50 mM Tris (pH 8) und 10 mM reduziertem Glutathion eluiert. Die Eluate wurden anschließend mit 50% Glycerol bei -20°C aufbewahrt. Auf diese Weise konnten ca. 3 – 4 mg aufgereinigtes Protein aus 500 ml Kultur gewonnen werden. Aliquots der rekombinanten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und der Grad der Aufreinigung der volle Länge Proteine (18,4 kDa RFK + 26,3 kDa GST = ca. 46 kDa) nach Silberfärbung densitometrisch auf >85% geschätzt. Das Protein wurde darüber hinaus mit einem Antiserum gegen RFK über Western Blot wie oben beschrieben spezifisch nachgewiesen.

2.11.6 Riboflavinkinaseassay

Die rekombinanten GST-RFK Fusionsproteine wurden hinsichtlich ihrer Riboflavinkinaseaktivität untersucht. Dazu wurden serielle Verdünnungen der aufgereinigten Proteine 1 h in 50 µl Riboflavinkinasepuffer (25 mM Tris (pH 8), 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 50 µM Riboflavin) bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proteine mit 0,2 M TCA (Trichloressigsäure) präzipitiert (5', 20.000 g) (Zempleni and Mock 2000) und 10 µl des Überstandes auf TLC Platten (vorgelaufen mit Methanol:H₂O = 1:1) in einem Laufpuffer mit 1-Butanol:Essigsäure:H₂O (12:3:5) getrennt (White *et al.* 2001). Zu Identifizierung der Flavine wurden 10 µl von 5 µM Stocklösungen (= 50 pmol) Riboflavin, Flavinmononukleotid oder Flavinadenindinukleotid verwendet. Riboflavin absorbiert Licht im UV und blauen Bereich (3 Absorptionsmaxima zwischen 265 nm – 440 nm) und fluoresziert im sichtbaren Bereich mit einem Emissionsmaximum von 489 nm (Koziol and Knobloch 1965). Somit konnten die Flavine auf den TLC Platten im Geldoc System (UV = 365 nm) visualisiert werden.

2.12 Zellkultur und Transfektion

2.12.1 Erhaltung von Zellen

HeLa und HT1080 Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS (fötales Kälberserum) und 100 Einheiten/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin kultiviert (DMEM-10). Das Medium für stabil transduzierte HeLa Zellen wurde zusätzlich mit 3µg/ml Blasticidin (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) versetzt. HEK-293 FT Zellen (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) erhielten 400 µg/ml G418 in DMEM-10 (Geneticin, Biochrom; Berlin, Deutschland). Alle genannten Zellen wurden in Inkubatoren mit 5% CO₂ Atmosphäre bei 37°C gehalten.

Murine ES Zellen (Bruce4) wurden mit DMEM w/o Glutamax von Gibco (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) kultiviert. Es wurden 15% FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, nicht-essentielle Aminosäuren (alle Zusätze von Gibco), 100 µM β-Mercaptoethanol und

1,6 ml LIF (*leukemia inhibitory factor*; Prof. Jens Brüning, Genetik, Köln) zugesetzt. Die Zellen wurden in Inkubatoren mit 9% CO₂ Atmosphäre bei 37°C kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt. ES Zellen wurden auf einem mit dem Spindelgift Mitomycin (10 µg/ml, 2 h, extensiv waschen) behandelten Rasen von 12,5 Tage *post coitus* gewonnene murine embryonale Fibroblasten (*feeder cells*; Prof. Jens Brüning, Genetik, Köln) ausplattiert. Die *feeder* Zellen wurden höchstens dreimal nach Isolation passagiert. Die Zellkulturplatten wurden vorher 30' bei 37°C mit 0,1% Gelatine (Sigma-Aldrich; Buchs, Schweiz) in PBS behandelt.

2.12.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen ($10^6 - 5 \times 10^6$) wurden in 1 ml Cryomedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen und in Cryoröhrchen (Saarstedt; Nümbrecht, Deutschland) für einige Tage bei -70°C eingefroren. Für längere Perioden wurden sie auf flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert. Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 50 ml Erhaltungsmedium gewaschen (5', 300 g) und in Medium ohne Antibiotika ausplattiert. Gegebenenfalls wurde das benötigte Antibiotikum nach 48 h hinzugegeben.

2.12.3 Transiente Transfektion

2.12.3.1 Kalziumphosphat vermittelte Transfektion von Plasmid DNA

1 – 2 µg DNA/6-Well bzw 5 – 10 µg/10 cm Schale wurde mit dieser Methode in HEK-293 FT Zellen transfiziert. Routinemäßig wurde eine Transfektionseffizienzen von bis zu 80% erzielt (mit FACS anhand von GFP Fluoreszenz bestimmt). Die DNA wurde hierfür in 250 mM CaCl₂ (Stock; 2,5 M) verdünnt (100 µl für 6-Well oder 500 µl für 10 cm Schale) und mit dem gleichen Volumen 2 x HeBS Puffer versetzt, gevortext und nach 1' auf die Zellsuspension in Erhaltungsmedium (1,8 ml für 6-Well und 9 ml für 10 cm Schale) gegeben. Die adhärierenden Zellen lagern beim Herabsinken die Kalziumphosphat-DNA-Präzipitate an ihre Oberflächen und können diese während einer ÜN Inkubation endozytieren. Die Expression der Transgene ist nach der ÜN Inkubation detektierbar, erhöht sich aber bei weiterer Inkubation für bis zu 72 h. Meist wurden 2×10^5 Zellen im 6-Well oder 2×10^6 Zellen in 10 cm Schalen transfiziert.

2.12.3.2 Transfektion von DNA und siRNA mittels kationischen Lipiden

Lipofectamine 2000[®] vermittelte Transfektion von Plasmid DNA und siRNA: Die Formulierung mit kationischen Lipiden wurde verwendet, um HEK-293 FT Zellen für die Produktionen von Lentiviren oder HeLa Zellen zu transfizieren. Die Transfektionen erfolgten in DMEM-10 ohne Pen/Strep Zusatz.

Für die Herstellung von Lentiviren wurden 6×10^6 Zellen in 10 ml (10 cm) oder 10^6 Zellen in 1,7 ml Medium gleichzeitig mit den zuvor gebildeten Komplexen aus DNA und Lipofectamine 2000[®] (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) ÜN ausgesät. Am nächsten Morgen wurde das Medium durch Komplettmedium ersetzt.

Auch weniger Zellen konnten mit dieser Methode transfiziert werden. Dafür wurden sie ÜN so ausplattiert, dass sie am nächsten Morgen 30 – 50% Konfluenz aufwiesen. Die Transfektion erfolgte für 4 – 6 h.

Transfiziert wurden 2 µg DNA im 6-Well, 12 µg DNA in 10 cm Schalen oder 4 – 100 nM (Endkonzentration im Transfektionsansatz) synthetische siRNAs. Die zu transfizierenden Substanzen wurden in 170 µl (für 6-Well) oder 1 ml (für 10 cm Schalen) Opti-MEM (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) verdünnt. 6 µl Lipofectamine 2000[®] für 6-Well ebenfalls in 170 µl bzw. 36 µl in 1 ml für 10 cm Schalen wurden ebenfalls in Opti-MEM aufgenommen. Nach 5' Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Komponenten für 20' vereinigt und zu den Zellen gegeben.

ExGene[®] Transfektion von Plasmid DNA: HeLa Zellen wurden in 6-Well mit ExGene[®] transfiziert, wenn keine sehr hohe Transfektionsrate notwendig war. 1 – 2 µg DNA wurden mit 3,3 – 6,6 µl ExGene[®] in 200 µl 150 mM NaCl aufgenommen und nach 10' Inkubation bei Raumtemperatur zu den Zellen mit 1,8 ml DMEM-10 ohne Pen/Strep Zusatz gegeben.

2.12.3.3 ES Zell Transfektion über Elektroporation

In dieser Arbeit wurde der Targeting Vektor über Elektroporation in ES Zellen (Bruce4) transfiziert. Dazu wurden 40 µg linearisierter Vektor mit Isopropanol präzipitiert und nach Waschen mit 70% Ethanol in 400 µl RPMI (ohne Phenolrot und

Glutamin) resuspendiert. Ein ES Zellpellet mit 10^7 Zellen wurde in 400 μ l RPMI (ohne Phenolrot und Glutamin) resuspendiert, mit der DNA Lösung vereinigt und in 4 mm Elektroporationsküvetten (Peqlab; Erlangen, Deutschland) elektroporiert. Folgende Einstellungen des Elektroporators (Bio-Rad; München, Deutschland) wurden verwendet: 200 Ω , 500 μ F und 240 V. 5' nach Elektroporation (Raumtemperatur) wurden die Zellen ausplattiert.

2.13 Herstellung stabiler Zelllinien über lentivirale Transduktion

2.13.1 Herstellung viraler Partikel

Die Produktion lentiviraler Partikel erfolgte nach Herstellerangaben, die im Manual ViraPower™ Lentiviral Expression System (Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland) ausführlich beschrieben werden.

6×10^6 HEK-293 FT Zellen wurden ÜN mit 12 µg Plasmid DNA Mix – bestehend aus je 3 µg der Verpackungsplasmide (pLP1, pLP2 und pLP/VSV-G) sowie 3 µg lentiviraler Vektor – mit Lipofectamine® 2000 transfiziert Alternativ wurden 10 µg einer Mischung von den 3 Verpackungsplasmiden zusammen mit 5 µg lentiviralem Vektor via Kalziumphosphat transfiziert. Am nächsten Morgen wurde das Medium durch Komplettmedium ersetzt und der erste Virusüberstand nach 24 h geerntet. Nach weiteren 24 h erfolgte die zweite Ernte. Gegebenenfalls wurde 72 h *p. T.* ein weiterer Virusüberstand gesammelt. Auf diese Weise konnte ein Titer von $10^5 - 5 \times 10^5$ TU (*transduction units*) pro Milliliter Überstand erreicht werden. Wurden grössere Titer benötigt, mussten die Überstände entweder über Größenausschlussäulen eingeeengt (100 kDa *cut-off* mit regenerierter Cellulose von Millipore; Billerica, USA) werden oder virale Partikel über Ultrazentrifugation (90', 60000 g, SS34 Rotor von Beckman) pelletiert und im kleinen Volumen (PBS oder Medium) aufgenommen werden. Beide Methoden konnten auch sequenziell kombiniert werden. Durch beide Methoden wurde die gesamte TU der Überstände um ca. 50% reduziert.

Lentivirale Transduktion zur Titerbestimmung: 2×10^5 zu transduzierende Zellen oder HT1080 Fibroblasten wurden mit einer fünffachen seriellen 10er Verdünnung von viraler Suspension im 6-Well Format (2 ml Medium/Well) in Anwesenheit von 6 µg/ml Polybrene® (Sigma-Aldrich; Buchs, Schweiz) ÜN transduziert. Danach wurde das Medium durch Komplettmedium für 30 – 32 h ersetzt. 48 h nach Transduktion erfolgte die Selektion erfolgreich transduzierter Zellen mit 10 µg/ml Blasticidin für 5 Tage (Medium wurde alle 2 – 3 Tage wechseln) und gegebenenfalls für weitere 3 – 5

Tage mit 3 µg/ml Blastocidin. Anschließend wurden die adhärennten Kolonien dreimal mit PBS gewaschen und mit Kristallviolett (Lenti) gefärbt. Überschüssige Farbe wurde durch extensives Waschen mit ddH₂O entfernt. Der Titer wurde mit TU/ml angegeben und als die Anzahl angefärbter Kolonien, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor ermittelt.

2.13.2 Etablierung stabiler Zelllinien

2×10^5 Zellen wurden wie oben beschrieben mit einer MOI von 0,1 transduziert. Nach 48 h wurden die Zellen in 8 ml Kompletmedium mit 3 µg/ml Blastocidin aufgenommen und auf die 12 horizontalen Wells von drei 96-Well Platten verteilt (200 µl/Well). In alle übrigen Wells wurden 100 µl Kompletmedium mit 3 µg/ml Blastocidin vorgelegt und die Zellsuspension in einer siebenfachen seriellen 3er Verdünnung vertikal verdünnt. Das Medium wurde für zehn Tage alle 2 Tage gewechselt, bis einzelne Kolonien in den Wells identifiziert werden konnten. Mehrere einzelne Kolonien wurden gepickt, klonal expandiert und anschließend analysiert.

2.14 SV40

SV40 wurde im Wesentlichen wie beschrieben (Pelkmans *et al.* 2001) mit im Folgenden aufgeführten Veränderungen aufgereinigt und fluoreszent markiert:

$0,75 \times 10^6$ COS-7 Zellen pro *triple-flask* (5 x) wurden mit SV40 (0,1 PFU/Zelle) infiziert. Zellen wurden nach 9 Tagen pelletiert (4000 g, 15'), durch dreimaliges Schockfrieren und Auftauen lysiert und der Überstand zusammen mit dem Überstand der letzten 4 Tage durch 0,45 µm-Filter gereinigt und durch 100 kDa Größenausschlussfilter 50-fach eingeeengt. Der eingeeengte Virus wurde zunächst über ein Kissen von CsCl₂ (1.4 g/ml PBS) im SW41Ti Rotor zentrifugiert (3 h, 10°C, 25000 rpm). Die Bande bei ca. 1,34 g/ml (refraktometrisch mit Hilfe einer Standardreihe überprüft) wurde isoliert und über ein kontinuierlichen Sucrosegradienten (70%; 30%; 25%; 20%; 15% und 10%; alle w/v) zentrifugiert (SW41Ti, 16 h, 25000 rpm, 4°C), die Viren anschließend pelletiert (SW60Ti, 55000 rpm, 50', RT) und in PBS resuspendiert und auf 1 µg/ml protein eingestellt.

Markierung mit Alexa Fluor 594 oder 647 wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Alexa Fluor rotein Labeling Kit, Invitrogen) und der markierte Virus zweimal über Polyacrylamid Größenausschluss (Bio-Spin P-30 Säulen, Bio-RAD, 4', 1000 g aufgereinigt, aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt. Die Konzentration der Viruspräparationen wurde mit einer SV40-Sonde (ca. 320bp mit *PvuII* und *Eco147I* aus pEGFP-N3) und einer definierten Standardreihe (pEGFP-N3) über Dot Blots quantifiziert (Quantity One Software).

Dot Blot:

Denaturierung: 3' in Soak 1 (0,5M NaOH; 1M NaCl), Neutralisation: 5' in Soak 2 (0,5M Tris-Cl, pH 7,5; 3M NaCl), UV-crosslinking mit 150 mJoule/cm², Vorhybridisierung : 10 ml Denhardt mit 100 µg/ml denaturierter ssDNA; 1 h bei 65°C, Hybridisierung: mit 3×10^7 cpm radioaktiver Sonde ÜN bei 65°C (DecaLabel DNA Labelling Kit, Fermentas, nach Herstellerangaben)Wash @ 65°C; 2-mal mit 2 x SSC/0,1 % SDS für je 10'.

2.15 FACS Analysen

2.15.1 Bestimmung von Transfektions- und Transduktions-effizienzen

Die Effizienz von Transfektionen bzw. Transduktionen konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS; *fluorescence activated cell scanning*) bestimmt werden, wenn die Konstrukte GFP koexprimierten. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert und in 0,5 ml PBS aufgenommen. Mindestens 2×10^5 lebendige Zellen wurden mit FACSCalibur (BD Biosciences; Franklin Lakes, USA) analysiert. Dazu wurde der blaue Laser (488 +/- 20 nm) des Gerätes verwendet und die Fluoreszenz mit dem 530 nm FITC Filter gescannt. Die Transfektions- bzw. Transduktionseffizienz wurde als der Anteil fluoreszierender Zellen zur Gesamtzellzahl in Prozent angegeben.

2.15.2 Messung von oxidativem Stress

Intrazellulärer oxidativer Stress wurde mit Hilfe vom membrangängigen carboxy-H₂DCFDA (5-(und-6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetat, Invitrogen; Karlsruhe, Deutschland), einem verbreitet eingesetzten Indikator oxidativen Stresses, untersucht (Keller *et al.* 2004; Soh 2006). Das reduzierte farblose Derivat vom hoch fluoreszente DCF (2',7'-dichlorofluorescein) wird zunächst durch intrazelluläre Esterasen zu carboxy-H₂DCF hydrolysiert. Diese Reaktion – zusammen mit den negativen Ladungen aus den Carboxygruppen – ist für die intrazelluläre Retention des Derivates verantwortlich. In Anwesenheit von Peroxiderivaten oder Peroxylradikalen wird schließlich carboxy-H₂DCF zum carboxy-DCF oxidiert. Letzteres ist für die Fluoreszenz des Derivates verantwortlich. Zur Messung vom oxidativen Stress wurden die Zellen 6h mit CHX/TNF (7 µg/ml, 70 ng/ml) stimuliert und dann mit 20 µM carboxy-H₂DCFDA in HBSS 30' bei 37°C geladen. DCF Fluoreszenz wurde mit dem blauen Laser (488 nm) des FACSCalibur angeregt und mit dem FITC Filter (530 +/- 20 nm) detektiert.

2.15.3 Annexin-V Markierung apoptotischer Zellen

Annexin V Färbung apoptotischer Zellen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Annexin V-PE Apoptosis Kit, BD Biosciences). Kurz: Ca. 10^5 Zellen wurden sequenziell mit PBS und 1 x binding buffer gewaschen und in 100 μ l 1 x binding buffer aufgenommen. Die Färbung erfolgte in 5ml FACS Röhrchen mit 5 μ l Annexin V-PE (Phycoerythrin) und 5 μ l 7-AAD (7-Amino-actinomycin D) für 15min bei RT und im Dunkeln. Nach Zugabe von 400 μ l 1 x binding buffer wurden die Zellen per FACS analysiert. Angeregt wurden die Zellen mit dem blauen Laser (488 nm) und die Messung von PE erfolgte mit dem 585 nm Filter und die von 7-AAD mit dem *long pass* Filter ab 670 nm.

2.16 Quantitative Messmethoden zur Erfassung von zellulären Aktivitäten

2.16.1 Kristallviolett färbung zum Nachweis vom Zelltod

10^4 Zellen/well einer 96well Mikrotiterplatte wurden ausgesät und 24 h kultiviert. Zelltod wurde für 16 – 24 h mit H_2O_2 , CHX/TNF oder STS induziert. Adhärenz Zellen wurden 10' mit Kristallviolett gefärbt. Überschüssige Farbe wurde nach intensivem Waschen mit dd H_2O entfernt und die Platten getrocknet. Gebundener Farbstoff wurde mit 100 μ l 0,2% Natriumcitrat/ 50% Ethanol gelöst und die OD bei 595 nm gemessen. Je 8 Wells pro Behandlung wurden gemittelt und gegen unbehandelte Kontrollen normalisiert.

2.16.2 XTT basierte kolorimetrische Quantifizierung der Zellviabilität

Das Tetrazoliumsalz XTT wird durch die Succinate-Tetrazolium Reduktase der mitochondrialen Atmungskette in metabolisch aktiven Zellen zum Formazan umgewandelt. Der Farbumschlag wird mit einem ELISA *reader* bei 500 nm gegen die Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen. Diese Methode wurde für die Quantifizierung vom TNF und VSV induzierten Zelltod eingesetzt. Die Durchführung

erfolgte nach der Anleitung des Kit Herstellers (Cell Proliferation Kit II (XTT), Roche, Basel, Schweiz). Die Messung erfolgte 2 – 3 h nach der Zugabe des Reagenz. Es wurden jeweils 8 Wells gemessen und gegen unbehandelte Kontrollen normalisiert.

2.16.3 Fluoreszenzquantifizierung im Mikrotiterformat

Für Fluoreszenzquantifizierung wurden HeLa-Zellen in einer Mikrotiterplatte für Fluoreszenzmikroskopie (Nunc; Roskilde, Dänemark) entsprechend behandelt und mit einem Fluoreszenz-plate reader (GENios pro, Tecan Austria GmbH), dem Programm Magellan und den angegebenen Anregungs- bzw. Emissionsfiltern analysiert.

FITC-Cholera Toxin B Aufnahme in HeLa Zelllinien:

2×10^4 Zellen wurden pro well (je 8 Wells) ausgesät und nach Aufnahme von FITC-ChTxB (0,5 ng/ml, 30', 37°C) und intensivem Waschen mit PBS analysiert. Die Messung erfolgte bei 485 nm (Anregung) und 535 nm (Emission).

Texas Red-Transferrin Aufnahme in HeLa Zelllinien:

2×10^4 Zellen wurden pro well (je 8 Wells) ausgesät und nach Aufnahme von TexRed-Tfn (5 ng/ml, 30', 37°C) und intensivem Waschen mit PBS analysiert. Die Messung erfolgte bei 590 nm (Anregung) und 650 nm (Emission).

Alexa Fluor 594-SV40 Aufnahme:

AF594-SV40 (1000 Genomäquivalente/Zelle) wurde 90 Minuten bei 4°C an 2×10^4 Zellen pro well (je 8 Wells ÜN ausgesät) gebunden. Nach Internalisierung (bis 3 h, 37°C) und intensivem Waschen mit PBS erfolgte die Messung bei 590 nm (Anregung) und 650 nm (Emission).

Quantifizierung von SV40 LTag Expression:

SV40 Infektion wurde über Immunfluoreszenznachweis von SV40 LTag quantifiziert. 10^4 Zellen wurden pro well (je 8 Wells) ausgesät und am nächsten Tag mit SV40 (20 PFU/Zelle) infiziert. LTag wurde 36 h nach Infektion mit einem spezifischen

Erstantikörper (1:250 *mouse* α LTag, PAB110, Santa Cruz Biotech., USA) und einem Alexa 488 gekoppelten Zweitantikörper (1:1000 *goat* α *mouse*, Invitrogen) fluorometrisch quantifiziert und gegen Zweitantikörperkontrollen normalisiert. Die Messung erfolgte bei 485 nm (Anregung) und 535 nm (Emission).

2.16.4 Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit

10^5 Zellen wurden pro Well einer 12-Wellplatte ÜN mit 1 μ g Plasmid-DNA und 3 μ l Lipofectamine2000 nach Herstellerangaben, allerdings in Suspension transfiziert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 6 h mit 7 μ g/ml CHX und 70 ng/ml TNF stimuliert. Der Assay (Invitrogen) wurde in 300 μ l vorgewärmtem Opti-MEM ohne Zusätze und ohne Phenolrot pro Well mit 0,25 u/ml HRP und 50 μ M Amplex Red für 30' bei 37°C durchgeführt. Die Messung erfolgte mit 200 μ l im Fluoreszenz plate reader mit Anregung bei 535 nm und Emission bei 590 nm.

2.16.5 Messung von Superoxidanionen mit MCLA

Die Messung von Superoxidanionen von Makrophagen erfolgte wie beschrieben (Yoshida *et al.* 2002) mit MCLA, das durch das erstere chemiluminesziert. Murine Makrophagen wurden mit Peritoneal-Lavage aus dem Peritoneum poly-(I:C) behandelte Mäuse gewonnen und auf 10^6 /ml HBSS eingestellt. Die Messung erfolgte nach Stimulation mit 10 ng/ml TNF mit je 100 μ l Zellsuspension (2 Wells/Maus) mit 5 μ M MCLA in weissen Mikrotiterplatten bei 37°C zu den angegebenen Zeitpunkten in einem Luminometer (Luminoskan Ascent, Thermo Fischer Scientific, Deutschland) und der dazugehörigen Ascent Software.

2.17 Fluoreszenzmikroskopie

2.17.1 Intrazelluläre Lokalisation

Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen ÜN kultiviert oder transfiziert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 20' mit 3% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit Einbettmedium auf Objektträgern befestigt und dem Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 analysiert.

2.17.2 Endozytose fluoreszenzmarkierter SV40 Partikel und Immunfluoreszenznachweis von SV40 LTag

HeLa^{shRFK} oder Kontrollzellen wurden auf Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (Nunc; Roskilde, Dänemark) kultiviert oder transfiziert. Fluoreszierender Virus wurde mit einer MOI von 50 – 500 für 90' auf Eis an die Zellen gebunden und die Zellen zur Initiation der Endozytose in einen 37°C Inkubator übertragen. Zum Nachweis des grossen T-Antigens vom SV40 (LTag) wurden die Zellen wie oben beschrieben fixiert und 10' mit Waschpuffer und 1:10000 Hoechst (Bis-Benzimid; Nr: 33258) inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation mit Blockierungspuffer für 30'. LTag wurde 1 h mit 1:250 in Blocking Puffer verdünntem spezifischem Antikörper (PAB 110, BD Biosciences; Franklin Lakes, USA) gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde mit dem 1:1000 verdünnten Zweitantikörper (Alexa 488 *goat anti mouse*) inkubiert. Zellen wurden nach jeweils dreimaligem Waschen mit Waschpuffer und PBS mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus IX81 analysiert.

2.18 Mäuse

Haltung und Aufzucht der Mäuse wurden im „Center for mouse genetics“, Institut für Genetik der Universität zu Köln und im Institut für med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Unikliniken Köln wie beschrieben (Hogan *et al.* 1987; Silver 1995) durchgeführt.

Die Etablierung der Mauslinie RFK^{fl/fl} erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Brüning im Institut für Genetik der Universität zu Köln im Wesentlichen wie beschrieben (Torres and Kuehn 1997). Blatozysteninjektion und Embryotransfers erfolgten auch durch das „Center for mouse genetics“.

C57BL/6, Flp Deleter Mäuse (Rodriguez *et al.* 2000) sowie MxCre Mäuse (Kuhn *et al.* 1995) wurden von „Center for mouse genetics“ zur Verfügung gestellt.

3 *Ergebnisse*

Das hypothetische Protein Flj11149 wurde in unserem Labor im Rahmen eines Interaktionsscreens beruhend auf dem Hefe-Zweikomponentensystem (*yeast two-hybrid system*) als TNF-RI bindendes Protein entdeckt und zunächst *death domain interacting factor* (DDIF) genannt. Später wurde die Interaktion in überexprimierenden humanen Fibroblasten (Katja Krönke-Wiegmann, persönliche Kommunikation) gezeigt. Die Interaktion der endogenen Proteine wurde im Rahmen einer Kolaboration mit Prof. Stefan Schütze bestätigt. Nach der Veröffentlichung der Röntgenstruktur von DDIF (Karthikeyan *et al.* 2003) wurde das Protein in den öffentlichen Datenbanken als humane Riboflavinkinase (RFK) deklariert, wofür allerdings der biochemische Beweis bislang ausblieb.

3.1 Sequenzanalysen und Homologievergleiche

Das humane Gen der putativen RFK ist innerhalb eines 9 kb Fragmentes (Position: 78190253 – 78199253) auf der q21.13 Bande des Chromosom 9 lokalisiert. Das murine Homolog liegt in einem etwas kompakteren Locus auf Chromosom 19 (Position: 17468573-17475825). Das dazugehörige humane primäre Transkript (gi145199238) ist eine ca. 2,7 kb große mRNA, die aus vier Exons besteht. Das resultierende Protein hat bei 162 Aminosäuren ein errechnetes Molekulargewicht von ca. 18,4 kDa (errechnet mit PeptideMass von ExPASy Proteomics tools). Das murine primäre Transkript (gi142378133) ist etwas über 2,4 kb groß, besitzt ebenfalls vier Exons und kodiert für ein 155 Aminosäurereste umfassendes Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von ca. 17,5 kDa (errechnet mit PeptideMass von ExPASy Proteomics tools). Die Homologie der beiden Polypeptide liegt bei 93%. Der in Abb. 2) dargestellte Vergleich zeigt eine Auswahl verwandter Proteine. Das N-terminale PTAN Motiv ist in allen biochemisch analysierten Vertretern der monofunktionalen Riboflavinkinasen hochkonserviert (Bauer *et al.* 2003) und ist auch in den hier gezeigten Spezies vorhanden. Die nächste biochemisch analysierte RFK

stammt aus *Saccharomyces cerevisiae* (Santos et al. 2000) und ist auf Aminosäureebene zu 36% (BLAST) mit der humanen Isoform homolog.

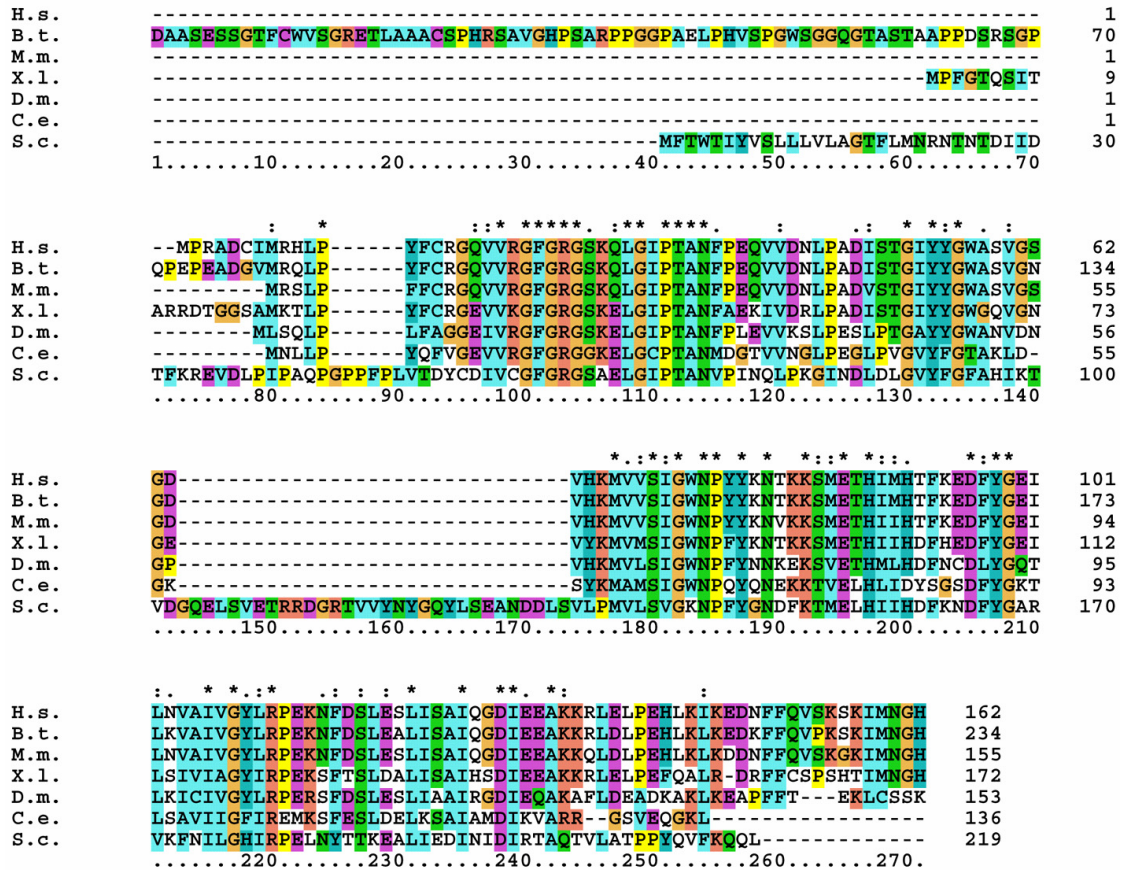


Abb. 2) Sequenzvergleich humaner RFK mit homologen Proteinen. Die in unserem Labor klonierte Sequenz der RFK wurde in einer BLAST Suche gegen GenBank™ abgeglichen. Homologe des Proteins finden sich in allen großen Domänen der Lebewesen. Eine Auswahl mit signifikant homologen Spezies ist in dieser Abbildung dargestellt. Putative RFK von Homo sapiens (H.s., gi145199238) wurde mit dem ClustalX Algorithmus gegen homologe Sequenzen aus Mus musculus (M.m., gi142378133), Bos taurus (B.t., gi74354693), Xenopus laevis (X.l., gi28422186), Drosophila melanogaster (D.m., gi24644927), das hypothetische Protein R10H10 von Caenorhabditis elegans (C.e., gi3879154) sowie die biochemisch als RFK charakterisierte Spezies aus Saccharomyces cerevisiae (S.c., Fmn1p: gi6320442) abgeglichen. Allen gemeinsam ist das N-terminale PTAN Motiv. Ähnliche Aminosäurereste sind in gleicher Farbe hinterlegt. Sterne und Punkte symbolisieren hochkonservierte Bereiche.

3.2 Expressionsmuster der putativen Riboflavinkinase

Um die organspezifische Expression der putativen RFK zu bestimmen, wurden Northern Blot Hybridisierungen von MTN[®] Blots (Clontech) durchgeführt (Abb. 3A-B). Dabei wurde jeweils das humane bzw. murine ORF (*open reading frame*; offenes Leseraster) als spezifische Sonde radioaktiv markiert und auf die entsprechenden Blots hybridisiert. Die murine Sonde konnte bis zu drei Banden auf dem *8 lane* MTN[®] Blot detektieren, von denen zwei publizierten Sequenzen (gi12846169 und gi142378133) zugeordnet werden können (Abb. 3A). Das Expressionsmuster der hier untersuchten Organe – außer der Skelettmuskulatur – entspricht in etwa dem der humanen Organe (Abb. 3B). Die Analyse des humanen *12 lane* MTN[®] Blots ergab eine differenzielle Expression der RFK. Dabei ist die Expression in Muskeln, gefolgt von Placenta, Niere und Leber am Höchsten. Vergleichsweise geringere Mengen der Transkripte wiesen Leukozyten sowie Milz und Thymus auf. Die humane Sonde konnte zwei unterschiedlich große Banden (bei ca. 2,8 kb und 1,6 kb) detektieren (Abb. 3B), die die publizierten Transkripte gi145199238 und gi 7023633 repräsentieren könnten. Weiterhin wurde die Expression der RFK in den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien untersucht. Northern Blot Analysen von je 2 µg mRNA aus HeLa und HEK-293 zeigten ein ähnlich hohes Expressionsniveau (Abb. 3C). Somit stellen die untersuchten Zellen geeignete Modellsysteme zur Funktionsanalyse der RFK *in vitro* dar.

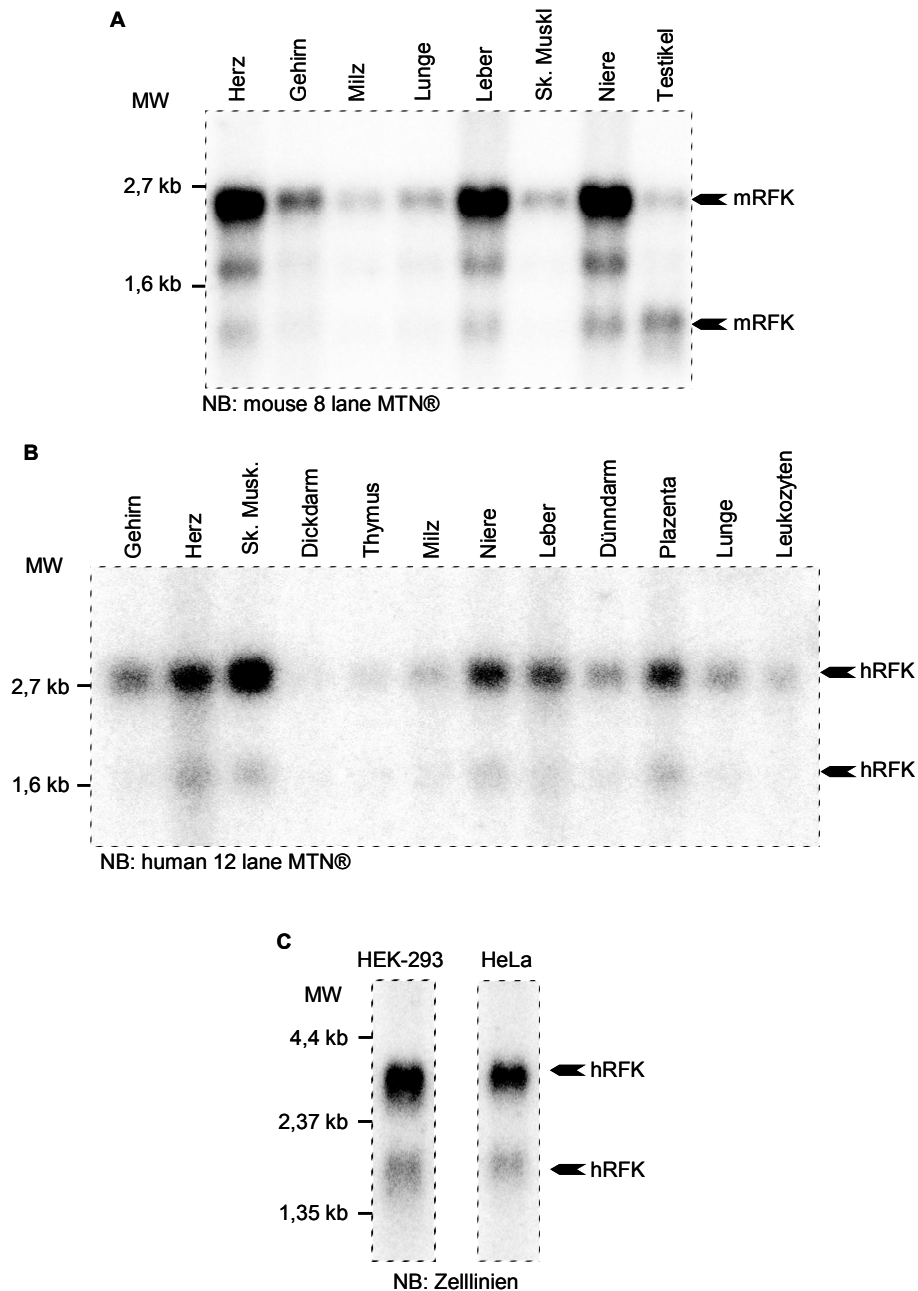


Abb. 3) Expressionsmuster der putativen RFK. Das murine bzw humane ORF der putativen RFK wurde PCR amplifiziert und als radioaktiv markierte Sonde auf Organ Northern Blots (MTN[®]; Clontech) oder Zelllinien Northern Blots hybridisiert. A) Nachweis muriner putativer RFK in je 2 µg polyA RNA aus multiplen Organen (mouse 8 lane MTN[®]). B) Nachweis der Expression der humanen putativen RFK in je 1 µg polyA RNA aus multiplen Organen (human 12 lane MTN[®]). C) Je 2 µg polyA angereicherte RNA aus HEK-293 oder HeLa Zellen wurde auf positiv geladene Nylonmembranen geblottet und mit humanspezifischer RFK Sonde hybridisiert. Pfeile deuten die Banden an, die auf der erwarteten Höhe der veröffentlichten Transkripte laufen (s. Text).

3.3 Flj11149 kodiert für eine TNF stimulierbare Riboflavinkinase

Homologe von DDIF sind in zahlreichen Organismen vertreten. FMN1 ist das Genprodukt des nächsten, auf molekularer Ebene charakterisierten Verwandten von DDIF in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und kodiert für eine monofunktionale Riboflavinkinase (Santos *et al.* 2000). Die Primärstrukturen von DDIF und FMN1 sind zu 36 % homolog. Eine größere Homologie besitzen DDIF und das FMN Protein aus *Schizosaccharomyces pombe*, nämlich 46 %. Von Letzterem wurde im Jahre 2003 die Kristallstruktur aufgelöst (Bauer *et al.* 2003). Im selben Jahr wurde auch die Röntgenstruktur von Flj11149 (gi19923525) veröffentlicht (Karthikeyan *et al.* 2003). Das Protein wurde mit ADP, FMN und einem Mg^{2+} Ion kokristallisiert und sukzessive als humane Riboflavinkinase deklariert. Auf Grund der vorhandenen Homologie werden die verwandten Proteine seither in den öffentlichen Datenbanken als Riboflavinkinasen aufgeführt. Allerdings wurden die Säugetier Riboflavinkinasen bislang nicht biochemisch charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen dieser Arbeit die putative RFK zunächst als rekombinantes Protein aufgereinigt. Anschließend wurden mit dem rekombinanten Protein *in vitro* Kinase-Untersuchungen durchgeführt.

Die korrespondierende cDNA wurde aus HeLa Zellen amplifiziert und stromabwärts des offenen Leserasters der Glutathion-S-Transferase (GST) in pGEX-4T-3 (AP-Biotech) in *frame* kloniert. Dadurch entsteht eine N-terminal GST-fusionierte Variante der putativen Riboflavinkinase (GST-RFK^{wt}). Das rekombinante Protein wurde in *E. coli* exprimiert und mit Hilfe von Sepharose 4B aus nativen Lysaten aufgereinigt (Abb. 4A). Der Reinheitsgrad des Proteins mit voller Länge wurde densitometrisch mit Quantity One[®] Software ermittelt und betrug über 90% (Abb. 4A). Eine Bande unterhalb des Fusionsproteins ist wahrscheinlich ein Degradationsprodukt, da diese im Western Blot mit einem Antiserum gegen Flj11149 erkannt wurde (Abb. 4A). Um herauszufinden, ob die putative RFK tatsächlich Riboflavinkinaseaktivität besitzt, wurden serielle Verdünnungen des aufgereinigten Proteins in einem Riboflavinkinasepuffer 1 h bei 37°C inkubiert. Das aufgereinigte Protein konnte in

einer dosisabhängigen Weise zur Bildung eines Flavinderivates führen, das im Dünnschichtchromatogramm (TLC) auf der Höhe des Flavinmononukleotid (FMN) Standards läuft (Abb. 4B). Diese Daten zeigen, dass Flj11149 die humane monofunktionale Riboflavinkinase ist.

Wie eingangs erwähnt, wurde die RFK als Interaktionspartner von TNF-RI gefunden. Deshalb sollte überprüft werden, ob die Riboflavinkinaseaktivität einer möglichen Modulation durch TNF unterliegt. Zu diesem Zweck wurde die cDNA der humanen RFK in den lentiviralen Vektor pLCW kloniert und in HEK-293 FT Zellen überexprimiert. Die Überexpression führte zu einer Überproduktion von FMN, wie die TLC Analyse intrazellulärer Flavine zeigt (Abb. 4C). Eine dreißigminütige TNF Stimulation erhöhte sogar die Produktion an FMN im Vergleich zu einer unbehandelten Probe der Zellen. Daraus geht hervor, dass die Aktivität der RFK in unserem Modellsystem durch TNF positiv reguliert wird.

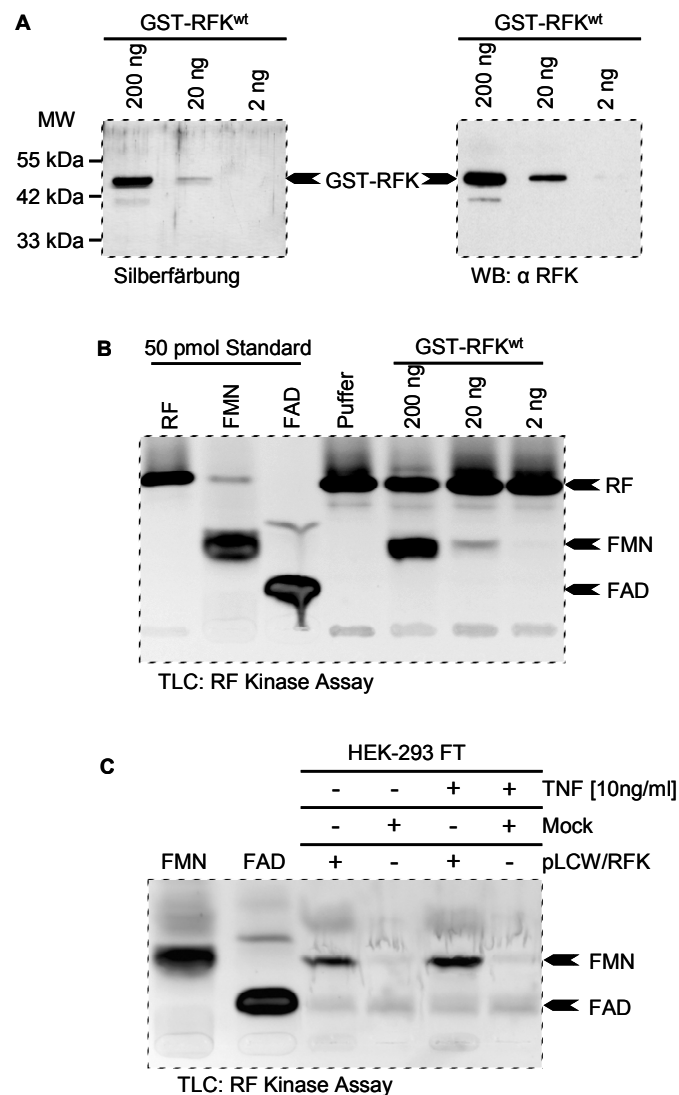


Abb. 4) Flj11149 kodiert für eine TNF responsive Riboflavinkinase. A) Die humane RFK wurde C-terminal an GST fusioniert (pGEX-4T-1) und im induzierbaren E. coli Stamm BL-21 (DE3) pLysS rekombinant exprimiert und aufgereinigt. 200, 20 und 2 ng des aufgereinigten Fusionsproteins wurden auf 12% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silberfärbung und einem spezifischen Antikörper für RFK im Immunblot nachgewiesen. Der Stern signalisiert ein Abbauprodukt, das mit dem RFK spezifischen Antikörper detektiert werden kann. Der Anteil des Proteins voller Länge wurde mit Quantity One® Software densitometrisch auf über 80% berechnet. B) Die gleichen Mengen Protein wurden für eine Riboflavin Kinaseassay eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in 50 µl 1 x RFK Puffer (25 mM Tris (pH 8), 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 50 µM Riboflavin) 1 h bei 37°C. Nach TCA Fällung wurde ein Aliquot der Reaktion neben Standards auf TLC Platten aufgetrennt. C) 5 µg der Expressionsvektor für RFK und wurde ÜN in 2 x 10⁶ HEK-293 FT Zellen transfiziert. Eine Hälfte der durch Waschen mit Medium abgelösten Zellen wurde 30 Minuten mit 10 ng/ml TNF behandelt, während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Die Zellen wurden in 0,1% Triton lysiert und die Proteine mit 0,2 M TCA präzipitiert. Äquivalente Aliquots wurden auf TLC Platten aufgetrennt.

3.4 Konstruktion eines Targeting Vektors zur konditionalen Deletion der murinen RFK

TNF ist ein zentrales Zytokin, das durch die Wirkung auf eine Vielzahl von Zielzellen (z.B. Granulozyten, Endothelzellen, Hepatozyten, Hypothalamus, Fett- und Muskelzellen, Monozyten/Makrophagen) eine entscheidende Rolle bei systemischen und lokalen Entzündungs- und Immunreaktion spielt (Aggarwal 2003). Der Ablauf und die Regulation von Immunantworten sind außerordentlich komplexe Vorgänge. Die Koordination der Immunantwort erfolgt sowohl über lösliche Faktoren wie Zytokine und Chemokine als auch über Zell-Zell-Kontakte. Des Weiteren sind verschiedene Organe und Gewebe wie Haut, Lymphknoten und Milz beteiligt. Die Analyse dieser Prozesse ist daher *in vitro* nur in unzureichendem Maße möglich. Die Aktivität der RFK ist durch TNF stimulierbar, was ihre Beteiligung an den physiologischen Wirkungsmechanismen von TNF sehr wahrscheinlich macht. Deshalb kann eine konditional inaktivierbare Mauslinie einen erheblichen Beitrag zum Verständnis TNF induzierter Immunreaktionen beitragen.

Zur Herstellung einer konditional deletierbaren Variante der murinen RFK (mRFK) wurde der Vektor p Δ mRFK konstruiert (Abb. 5A), der auf pRAPID-Flirt (Prof. Ari Waisman) basiert. Dieser beinhaltet drei Kassetten (*short* und *long homology arm* und *floxed region*: kurzer und langer Homologiearm, gefloxtete Region) zur homologen Rekombination in das murine Genom. Die drei Kassetten sind durch zwei Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase (loxP) voneinander getrennt. Die gefloxtete Region beinhaltet ca. 500 bp der Promotorregion sowie die Exons 1 und 2 von mRFK, so dass eine Cre-Rekombinase vermittelte Deletion die vollständige Inaktivierung des Gens zur Folge hätte. Zur Auswahl eines geeigneten Insertionsortes für die 5'-loxP Erkennungssequenz im Promotorbereich wurde eine TRANSFAC Datenbankanalyse (Wingender *et al.* 2001) durchgeführt, um mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren zu umgehen. Um das korrekte Spleißen des Transkriptes nicht zu beeinträchtigen, wurde die 3'-loxP Erkennungssequenz in einen Bereich des zweiten Introns gelegt, der frei von möglichen *Branch sites* (YNYURAC; Y, Pyrimidin, R, Purin, N, Nukleotid, **fett** = invariant) war (Zhuang *et al.* 1989).

p Δ mRFK beinhaltet eine Resistenzkassette für Neomycin (positive Selektion), die von Erkennungssequenzen der Flp-Rekombinase (FRT) flankiert ist (Abb. 5A). Die *in vivo* Deletion der Resistenzkassette nach Kreuzung mit einer Flp transgenen Mauslinie verhindert schädliche Einflüsse der Resistenzkassette.

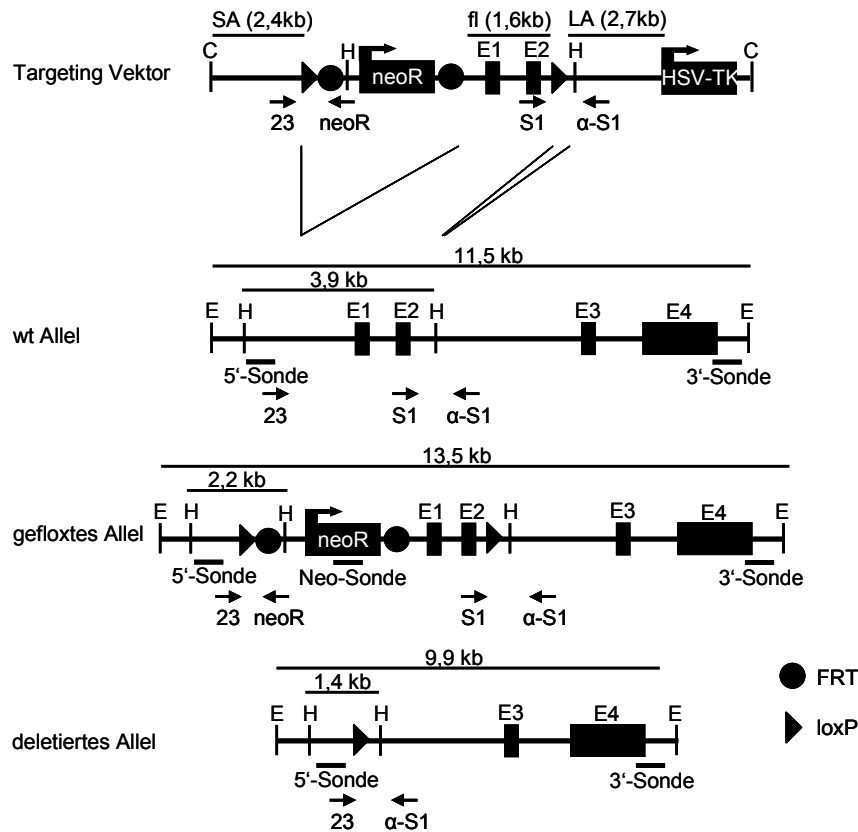


Abb. 5) Schematische Darstellung der Targeting Strategie. Der Targeting Vektor beinhaltet 3 Kassetten (SA, fl, LA) und ermöglicht nach homologer Rekombination ins murine Genom die konditionale Inaktivierung des RfK Gens durch Cre-loxP-vermittelte Rekombination. Die loxP Erkennungssequenzen flankieren ein 1,6 kb Fragment, das die ersten zwei Exons (E1 und E2) und ca. 500 bp der Promotorregion umfasst. Die Neomycinkassette ist von FRT Erkennungssequenzen flankiert, die eine Deletion durch Flp Rekombinase ermöglichen. Der große homologe Arm (LA) beinhaltet intronische Sequenzen (Intron 2) und ist stromaufwärts der negativen Selektionskassette (HSV-TK) positioniert. Das gefloxtete Allel kann über Southern Analyse mit Hilfe der genomischen 3'-Sonde oder der 5'-Sonde vom deletierten oder dem wt-Allel differenziert werden. Die Größe der zu erwartenden Banden ist oberhalb der Darstellungen für einen Restriktionsverdau mit EcoRV oder HindIII angegeben. Pfeile unterhalb der Darstellungen stehen für Typisierungsprimer. E1-E4; Exons, E; EcoRV, H; HindIII, C; ClaI, NeoR; Neomycinresistenzkassette, HSV-TK; Herpes Simplex Virus Thymidinkinase.

3.5 Etablierung und Charakterisierung rekombinanter ES-Zellklone

Nach Transfektion des sequenzierten und linearisierten Targeting Vektors in Bruce4-ES-Zellen (C57/Bl6) und anschließender Selektion mit G418 und Gancyclovir wurden 770 Klone gepickt. Durch Southern Blot Analysen konnten 24 homolog rekombinante Klone identifiziert werden, von denen vier beide loxP-Erkennungssequenzen vorwiesen. Abb. 6A) zeigt die Southern Blot Analyse der vier Klone nach Hybridisierung mit einer genomischen 3'-Sonde. Die 3'-Sonde detektiert in den Klonen das wt-Allel mit 11,5 kb, das auch in der wt-DNA sichtbar ist und das geflochte Allel mit 13,5 kb, das durch die Insertion der Neomycinkassette größer ist. Zur Überprüfung der Integrität des geflochten Allels wurde parallel eine 5'-Sonde verwendet. Auch die 5'-Sonde detektiert sowohl eine wt-Bande als auch eine größere Bande, die dem geflochten Allel entspricht und in der wt-Kontrolle fehlt (Abb. 6B). Um die Kointegration der 5'-loxP Erkennungssequenz zu prüfen wurde sie in den ES-Klonen mittels PCR mit den Primern 23 (genomisch; *sense*) und neoR (vektorspezifisch; *anti-sense*) durchgeführt (vergl. Abb. 5). Die PCR amplifizierte das entsprechende Fragment nur in den rekombinanten Klonen (Abb. 6C). Darüber hinaus wurden PCR Analysen mit den Primern S1 und α -S1 (vergl. Abb. 5) durchgeführt, die in der genomischen Region lokalisiert sind und die 3'-loxP Erkennungssequenz flankieren. Wie in Abb. 6D zu sehen ist produziert die PCR nur in den homolog rekombinanten Klonen die Banden (210 bp und 270 bp), die dem wt- bzw. dem geflochten Allel entsprechen. Um illegitime Rekombinationsereignisse in den Klonen ausschließen zu können wurde zusätzlich eine Southern Blot Hybridisierung mit einer Targeting Vektor spezifischen Sonde (Neo-Sonde) durchgeführt. Die Abb. 6E) zeigt, dass die Neo-Sonde in den rekombinanten Klonen eine Bande detektiert, die auf der erwarteten Höhe des geflochten Allels verläuft und für eine singuläre Integration des Targeting Vektors in das ES Zellgenom spricht.

Die Analysen bestätigen insgesamt, dass die Klone durch homologe Integration des Targeting Vektors in den genomischen Locus von RFK entstanden sind und dass keine illegitimen Rekombinationsereignisse stattgefunden haben. Außerdem sind

beide loxP Erkennungssequenzen in allen vier Klonen enthalten, wie die PCR Analysen veranschaulichen.

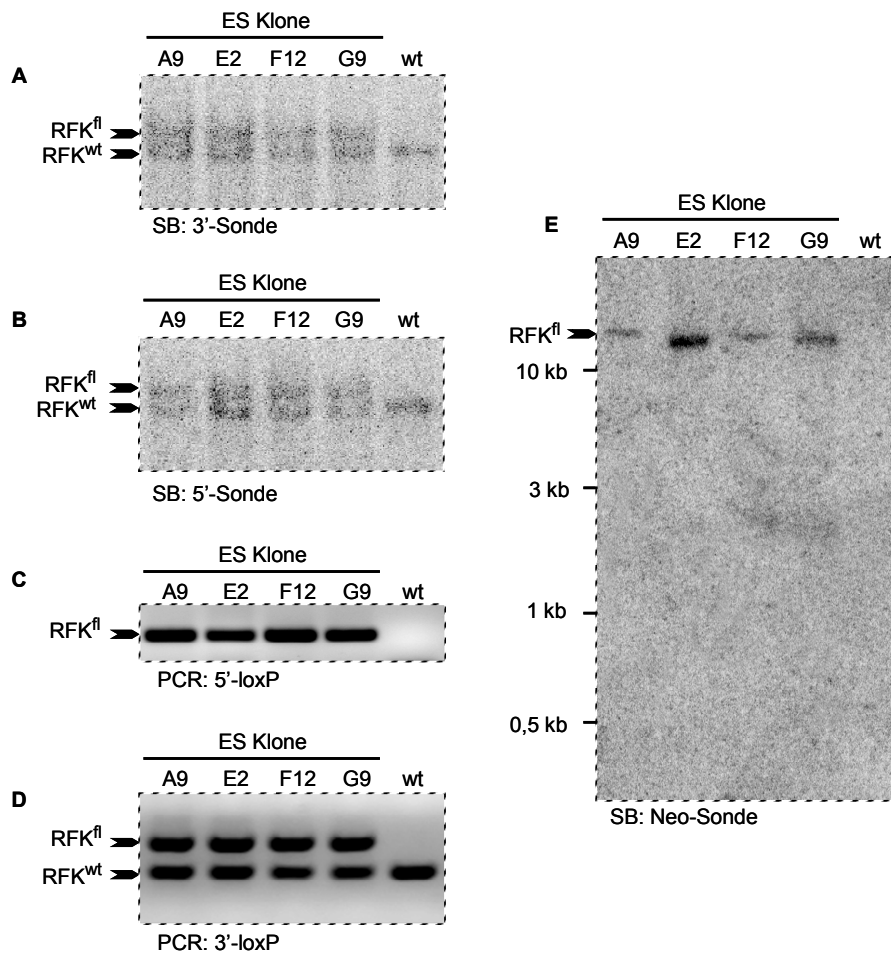


Abb. 6) Analyse homolog rekombinanter ES Klone. Die Analyse von 770 individuellen ES Klonen ergab 4 homolog rekombinante Klone, die in dieser Abbildung dargestellt sind. A) Southern Blot EcoRV (50 u) verdauter DNA (5 µg) mit der genomischen 3'-Sonde, die das gefloخته Allel bei 13,5 kb und das wt Allel bei 11,5 kb detektiert. B) Southern Analyse wie in A) jedoch mit der 5'-Sonde. C) PCR zum Nachweis der 5'-loxP Erkennungssequenz mit den Primern 23 und neoR, die ein 180 bp Fragment amplifiziert. D) PCR zum Nachweis der 3'-loxP Erkennungssequenz mit den Primern S1 und α-S1. Die größere (270 bp) Bande repräsentiert das gefloخته Allel, während die kleinere (210bp) aus dem wt-Allel amplifiziert wurde. E) Nachweis der Integrationsereignisse des Targeting Vektors über Southern Analyse mit einer Sonde aus Neomycin cDNA. 20 µg DNA wurden dafür mit 150 u EcoRV ÜN verdaut.

3.6 Funktionelle Analyse der homolog rekombinanten Klone

Um die Funktionalität der loxP Erkennungssequenzen zu bestätigen, wurden die isolierten Klone mit HTN-Cre (Carsten Merkwirth) transduziert. HTN-Cre ist eine transduzierende Variante der Cre-Rekombinase mit einem basischen Peptid aus dem Tat-Protein des HIV-1 (*human immunodeficiency virus type 1*) und dem nukleären Lokalisationssignal (NLS) aus SV40 (Peitz *et al.* 2002). Nach HTN-Cre Transduktion wurde genomische DNA aus den Zellen präpariert und mit *HindIII* geschnitten, um die möglichen Rekombinationsereignisse mittels Southern Blot Analyse mit der 5'-Sonde (vergl. Abb. 5) zu unterscheiden. Abb. 7) zeigt die Southern Blot Analyse der HTN-Cre transduzierten ES-Zellen. In den unbehandelten Proben detektierte die 5'-Sonde zwei Banden von 3,9 und 2,2 kb, die dem wt-Allel (RFK^{wt}) respektive dem geflochten Allel (RFK^{f1}) entsprechen. Nach HTN-Cre Transduktion ist anstelle der 2,2 kb Bande eine zu erwartende Bande von 1,4 kb zu beobachten, die dem deletierten Allel (RFK^Δ) entspricht. Daraus geht hervor, dass alle vier homolog rekombinanten Klone über funktionelle loxP Erkennungssequenzen verfügen. Zwei Klone (A9 und E2) wurden für die Blastozysteninjektion vorbereitet.

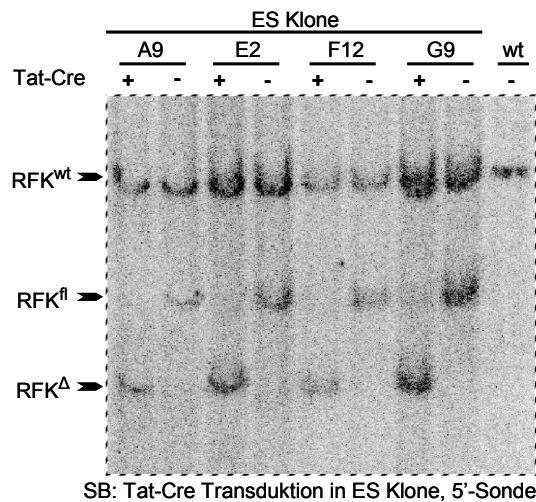


Abb. 7) Tat-Cre Transduktion homolog rekombinanter ES Klone. ES Zellen wurden im 6Wellformat mit Tat-Cre (3 μ M in DMEM:PBS (1:1)) Δ N transduziert und anschließend weitere 5 Tage mit ES Medium inkubiert. DNA wurde mit HindIII verdaut und im Southern Blot mit der 5'-Sonde detektiert. In unbehandelten Kontrollen detektiert die Sonde zwei Banden bei 3,9 und 2,2 kb, die dem wt- (RFK^{wt}) respektive dem geflochten Allel (RFK^{fl}) entsprechen. Nach Tat-Cre Transduktion erscheint eine Bande bei 1,4 kb, die dem deletierten Allel (RFK ^{Δ}) entspricht.

3.7 Herstellung einer Mauslinie mit konditional deletierbarer RFK

Für die Blastozysteninjektion wurden zwei homolog rekombinante ES-Klone (A9 und E2) herangezogen. Die Injektion der aus C57/Bl6-Mäusen gewonnenen Blastozysten erfolgte durch „Center for Mouse Genetics“ des Institutes für Genetik, Köln. Die PCR Strategie zur Analyse der unterschiedlichen Zuchten ist in Abb. 8A) schematisch dargestellt. Nach der Transplantation der chimären Blastozysten in pseudoschwangere Leihmütter entstanden chimäre F1-Nachkommen (Abb. 8B), wie die PCR Analyse für die 5'-loxP Erkennungssequenz von Schwanzbiopsien zeigt. F2-Nachkommen der Chimären wurden durch Rückkreuzung mit wt-Mäusen (C57/Bl6) generiert. Die PCR Analyse des Genoms der Nachkommen ergab, dass das geflochte Allel (RFK^{fl}) keimbahngängig war, da es auf die Nachkommen vererbt wurde (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden RFK^{wt/fl} Mäuse mit einer für Flp-Rekombinase transgenen Maus (Center for Mouse Genetics) gekreuzt, um die Neomycinkassette *in vivo* zu deletieren (Rodriguez *et al.* 2000). Abb. 8C) fasst die Typisierungs-PCR für

die vorangegangenen Verpaarungen zusammen. Mit den Primern S1 und α -S1 konnte zwischen dem wt- (RFK^{wt}; 210 bp) und dem geflochtenen Allel (RFK^{fl}; 270bp) differenziert werden (Abb. 8C, oben). Mit den genomischen Primern 23 und frtR konnte zwischen dem wt-Allel (RFK^{wt}; 156 bp) und dem Neomycin deletierten geflochtenen Allel (RFK^{fl(neo Δ)}; 285 bp) unterschieden werden (Abb. 8C, unten).

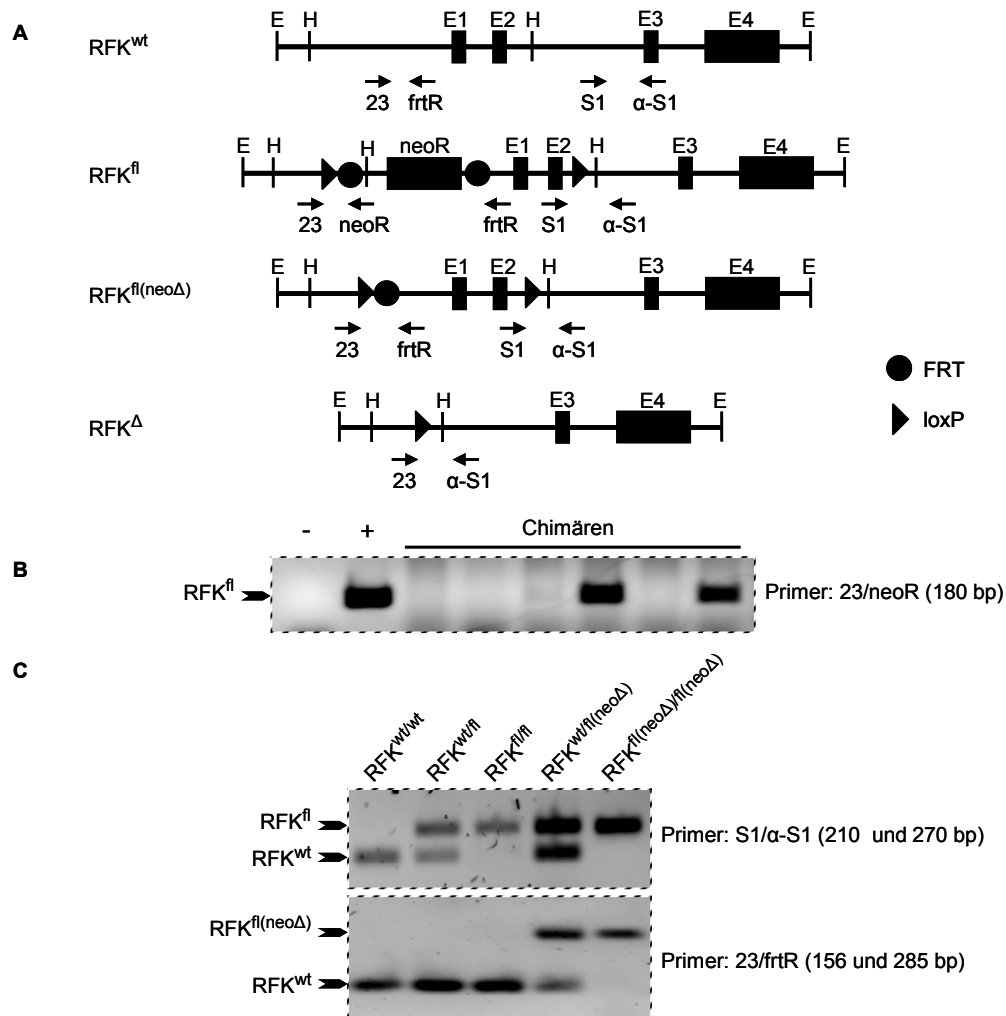


Abb 8) PCR Strategie zur Etablierung einer konditional deletierbaren Mauslinie. A) Schematische Darstellung der möglichen Allele und die Position der Primer. B) Nachweis der Chimären über PCR mit den Primern 23 und neoR. C) PCR mit den Primern S1 und α -S1 zum Nachweis des wt- bzw. des geflochtenen Allels. Die Deletion der Neomycinkassette konnte über PCR mit den Primern 23 und frtR nachgewiesen werden, die ein 285 bp Fragment produziert. Das kleinere Fragment (156 bp) entspricht dem wt-Allel.

3.8 Embryonale Letalität durch Inaktivierung der RFK

Für die Etablierung einer Knockout Linie (RFK^{Δ/Δ}) wurden zunächst homozygot gefloxt Mäuse (RFK^{fl(neoΔ)/fl(neoΔ)}) mit einer Cre-Deleter Linie (Center for Mouse Genetics) gekreuzt, um heterozygote Knockout Mäuse (RFK^{Δ/wt}) zu erhalten. Um homozygote Knockout Mäuse (RFK^{Δ/Δ}) zu generieren, wurden im nächsten Schritt heterozygote Knockout Mäuse in einer Inzucht verpaart (RFK^{Δ/wt} x RFK^{Δ/wt}). Abb. 9A zeigt die zwei möglichen Genotypen aus den Inzuchtverpaarungen. Nach Cre-Rekombinase vermittelter Deletion der gefloxten Region produziert die PCR mit den Primern 23 und α-S1 ein Produkt von 330 bp (vergl. Abb.8A). Alle F1-Nachkommen der Inzuchtverpaarungen hatten mindestens ein wt-Allel, dass wie beschrieben mittels PCR (Primer s1 und α-S1) nachgewiesen werden konnte. In der Tabelle (Abb. 9B) sind die Genotypen von 219 Nachkommen zusammengefasst. Die Genotypisierung ergab 95 wt Mäuse (RFK^{wt/wt}), 124 heterozygote Knockout Mäuse (RFK^{Δ/wt}) und keine homozygoten Knockout Mäuse (RFK^{Δ/Δ}). Daraus resultiert, dass entweder homozygote Knockout Mäuse (RFK^{Δ/Δ}) letal sind oder dass eines der Geschlechter unfruchtbar ist. Das von der Mendelschen Spaltungsregel abweichende Verhältnis der Heterozygoten (RFK^{wt/Δ}) zum wt (RFK^{wt/wt}) lässt vermuten, dass einer der haploiden Gameten möglicherweise unproduktiv sein könnte. Um diese These zu prüfen, wurden heterozygote Knockout Mäuse (RFK^{wt/Δ}) mit wt-Mäusen (C57/Bl6) rückgekreuzt. Beide Geschlechter waren fruchtbar und konnten das mutierte Allel durch funktionelle haploide Keimzellen (Oocyten oder Spermatozoen) vererben (Abb. 9C). Daraus folgt, dass heterozygote Knockout Mäuse einen Überlebensnachteil gegenüber wt-Mäusen haben. Um den Zeitpunkt für den letalen Phänotypen eingrenzen zu können, wurden Schwangerschaften von Inzuchtverpaarungen (RFK^{Δ/wt} x RFK^{Δ/wt}) 7,5 – 8,5 d.p.c abgebrochen und der Genotyp der Embryonen bestimmt. In der Abb. 9D-E) sind die Ergebnisse der PCR (Primer; 23/S1/α-S1) für die Genotypisierung dargestellt. In allen untersuchten Embryos konnte das wt-Allel (RFK^{wt}) nachgewiesen werden, einige Embryonen waren dabei heterozygote Knockouts, wie das 330 bp Fragment verdeutlicht. Die Daten suggerieren, dass die Inaktivierung der RFK zum letalen Phänotypen führt und

dass die Letalität nach der Befruchtung der Eizelle und vor 7,5 d.p.c auftritt.

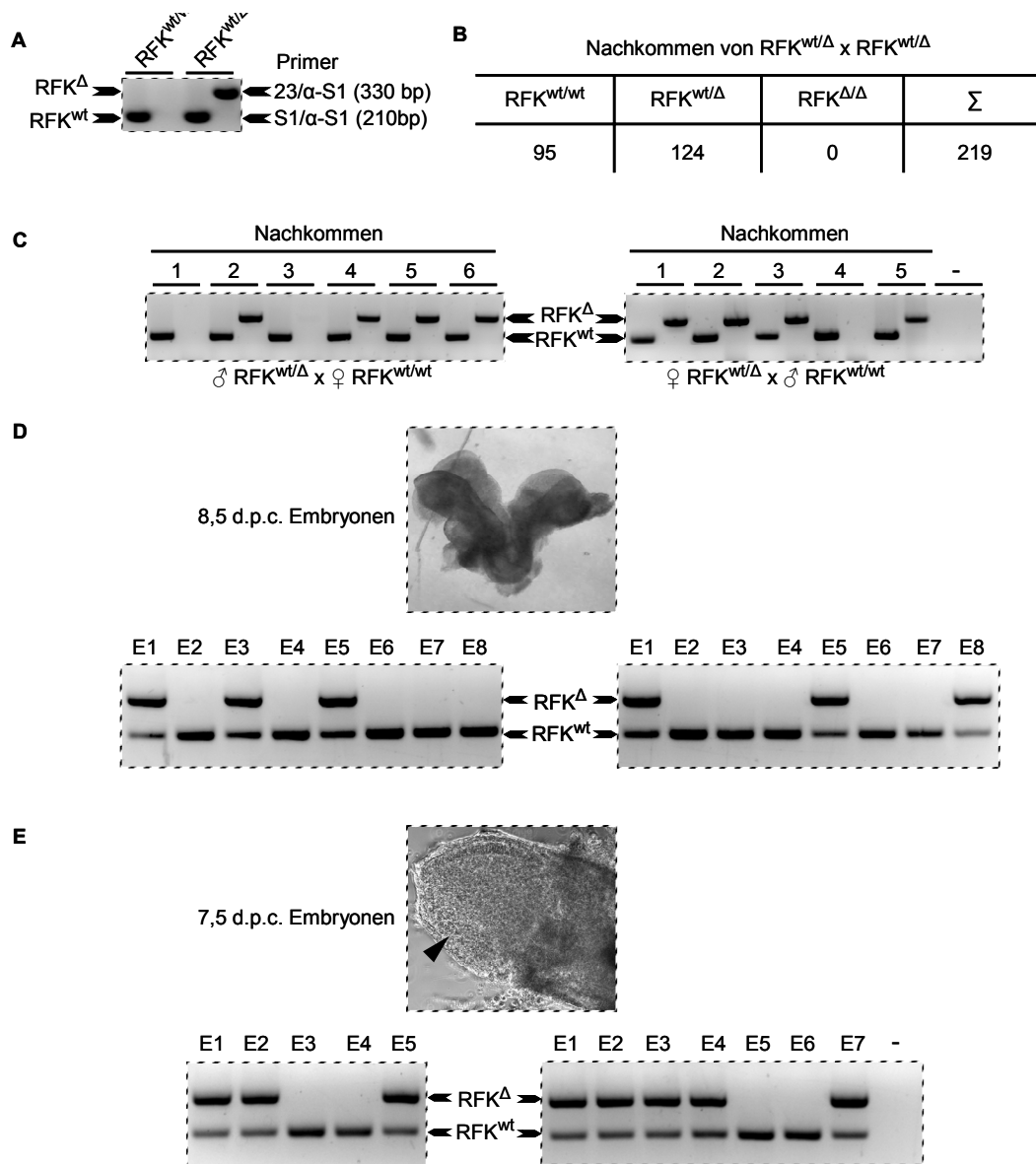


Abb. 9) RFK^{Δ/Δ} ist embryonal letal. A) Der Nachweis des deletierten Allels (RFK^Δ) gelingt über PCR mit den Primern 23 und α-S1, die ein 330 bp Fragment amplifiziert. Das wt-Allel wird weiterhin über PCR mit den Primern S1 und α-S1 nachgewiesen. Die zwei Reaktionen können in einer kompetitiven PCR (D-E) kombiniert werden. B) 219 Nachkommen von Inzuchtverpaarungen heterozygoter Knockout Mäuse (RFK^{wt/Δ}) wurden genotypisiert. Die Ergebnisse sind in dieser Tabelle wiedergegeben. C) Rückkreuzung von heterozygoten Knockout Mäusen (RFK^{wt/Δ}) beider Geschlechter mit wt-Mäusen (RFK^{wt/wt}) zur qualitativen Bestimmung der Fruchtbarkeit der Gameten. Sowohl weibliche als auch männliche Gameten können das deletierte Allel, das wie in A) nachgewiesen wurde vererben. D) und E) Schwangerschaftsabbrüche von Inzuchtverpaarungen heterozygoter Knockout Mäuse (RFK^{wt/Δ}) 8,5 d.p.c. D) bzw. 7,5 d.p.c. E) und Genotypisierung über kompetitive PCR mit den Primern 23, S1 und α-S1. Alle genotypisierten Embryonen wiesen mindestens ein wt-Allel auf.

3.9 Spezifische Herunterregulierung der RFK durch lentiviral exprimierte shRNA

Um die zelluläre Funktion der RFK näher untersuchen zu können, wurde ein lentivirales Vektorsystem etabliert, das eine stabile Herunterregulierung spezifischer Gene über RNA Interferenz (RNAi) ermöglicht. RNAi (Novina and Sharp 2004; Filipowicz 2005) beschreibt einen in Eukaryoten post-transkriptional erscheinenden Regulationsmechanismus, der die Expression von einzelnen Genen oder Gen-Clustern spezifisch minimieren kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 21 bp lange doppelsträngige *short interfering RNAs* (siRNAs) mit 2 nt Überhängen eingesetzt, die spezifisch und effektiv ihre homologen Transkripte herunterregulieren konnten. Öffentliche siRNA Design Algorithmen (Ambion) halfen bei der Auswahl von siRNA Sequenzen. Vier Spezies wurden als shRNA Expressionskassetten zunächst in den GATEWAY® kompatiblen Vektor pENTR/siH1/mDD-Stuffer (Abb. 10A) kloniert. Die shRNA Expressionskassette basiert auf dem pSUPER Vektor (Brummelkamp *et al.* 2002). Für die lentivirale Expression der shRNA Spezies wurden die Expressionskassetten aus dem pENTR Derivat in den GATEWAY® kompatiblen lentiviralen Vektor pL subkloniert (Abb. 10B). pL ist ein Derivat von pLenti6/Ubc/V5-DEST (Invitrogen), aus dem der Ubiquitin-C Promotor entfernt wurde. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten lentiviralen shRNA Expressionsvektoren wurden für die erfolgreiche Herunterregulierung von unterschiedlichen Zielgenen in verschiedenen Zellen eingesetzt (Kashkar *et al.* 2006; Abdullah *et al.* 2007; Kashkar *et al.* 2007). Um die Effizienz der lentiviralen shRNA Vektoren zu prüfen, wurden diese zusammen mit einem EGFP-RFK Fusionskonstrukt (pEGFP-N3-RFK) in HEK-293 FT Zellen kotransfiziert. Abb. 10C zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen 48 h nach der Kotransfektion. Nur das shRNA Konstrukt gegen RFK (shRFK), nicht aber das Kontrollkonstrukt (shKon) konnte die Expression des Fusionsproteins signifikant blockieren. Die Western Blot Analyse der Lysate aus den transfizierten Zellen bestätigten die hohe Effizienz der shRFK und (Abb. 10D).

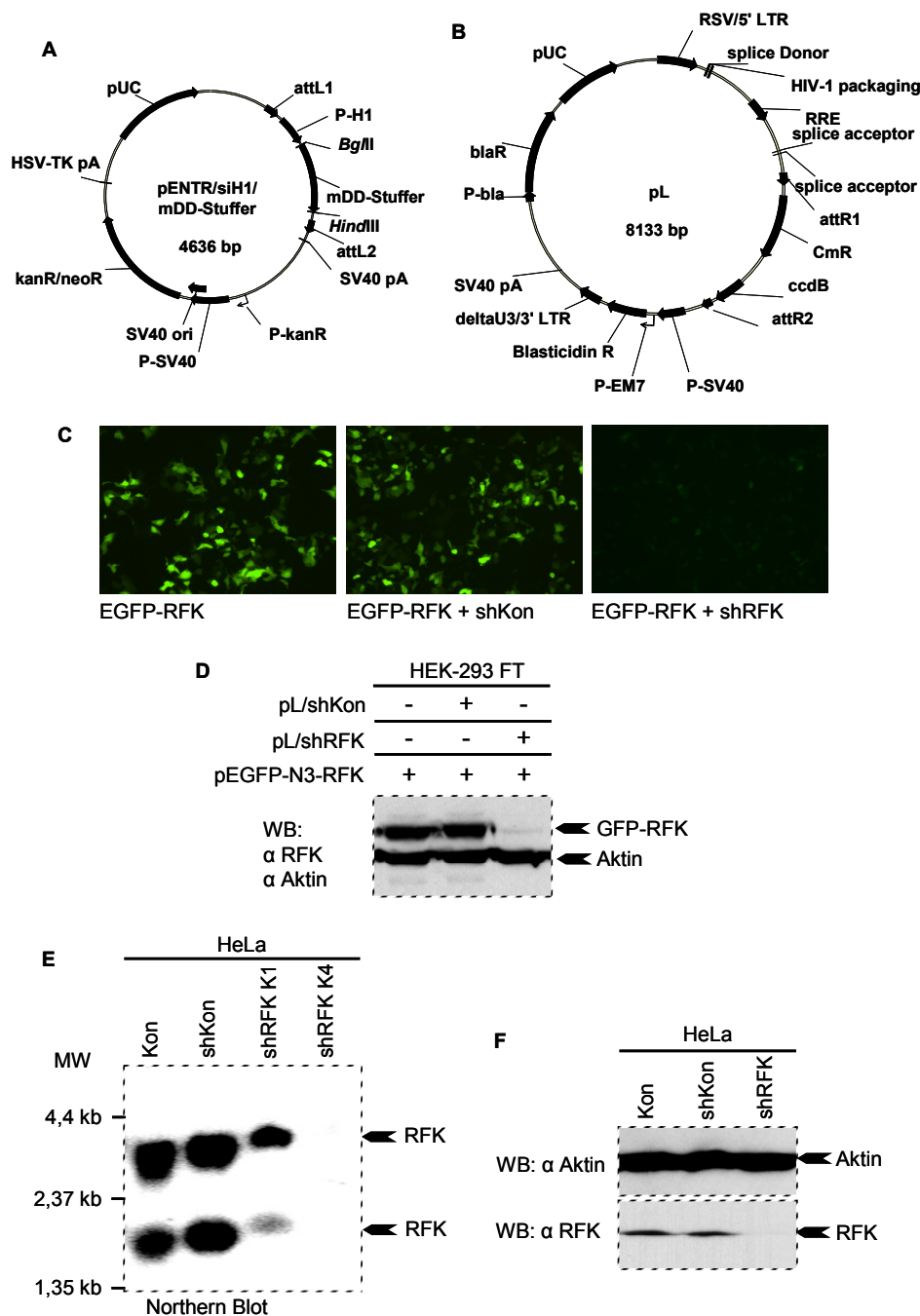


Abb. 10) Etablierung stabil herunterregulierender HeLa Zelllinien mittels lentiviraler Transduktion. Zwei potente siRNA Sequenzen gegen RFK wurden über einen veröffentlichten Algorithmus (Ambion) ausgesucht und zusammen mit einer *non-targeting* Kontrollsequenz über Oligonukleotidligation in den Vektor A) pENTR/siH1/mDD-Stuffer kloniert. Die shRNA Expressionskassette wurde über LR Rekombination (GATEWAY®, Invitrogen) in B) den lentiviralen Vektor pL subkloniert. C) und D) Lentivirale shRNA Vektoren und EGFP-RFK Fusionskonstrukte wurden in HEK-293 FT kotransfiziert (CaPO; je 5 µg Vektor) und 48 h später C) fluoreszenzmikroskopisch oder D) im Immunblot mit RFK spezifischem Antikörper analysiert. E) Es wurden Lentiviren mit pL/shRFK hergestellt und für die Etablierung stabiler HeLa verwendet. Die Expression der RFK wurde über Northern Blot mit je 100 µg RNA aus den Zelllinien nachgewiesen. Es wurde mit dem effektiven Klon shRFK K4 witergearbeitet. F) Immunblotanalyse mit RFK spezifischem Antikörper von je 500 µg Protein aus den in dieser Arbeit verwendeten HeLa Zelllinien.

Für die Etablierung stabil herunterregulierender HeLa Zelllinien wurden lentivirale Partikel mit den Vektoren pL/shKon und pL/shRFK hergestellt. Northern Blot Analysen (Abb. 10E) zeigten, dass die RFK Expression einer der zwei Klone signifikant herunterreguliert werden konnte. Western Blot Analysen mit einem RFK spezifischen Antikörper (Abb. 10F) zeigten eine effektive Herunterregulierung der RFK im verwendeten Klon auf Proteinebene.

3.10 Rolle der RFK in TNF vermittelte Zytotoxizität

Ein Markenzeichen der TNF induzierten Signalkaskaden ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Aktive NF- κ B Moleküle sind Homo- oder Heterodimere aus den 4 Untereinheiten p50, p52, p65 und cRel (Leung *et al.* 2004), die aus dem Zytoplasma in den Zellkern wandern und dort DNA Konsensussequenzen binden, was zur Aktivierung der Transkriptionsmaschinerie führt. Um zu überprüfen, ob dieser kanonische Signalweg in RFK defizienten HeLa Zellen (HeLa^{shRFK}) beeinträchtigt ist wurde die NF- κ B Bindungsaktivität dieser Zellen nach TNF Stimulation mittels *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA, durchgeführt durch Katja Krönke-Wiegmann (Wiegmann *et al.* 1994)) mit HeLa und HeLa^{shKon} verglichen (Abb. 11A). TNF aktiviertes NF- κ B war in allen Zelllinien gleichermaßen effektiv, was anhand des beobachteten elektrophoretischen Mobilitäts-Shift von radioaktiv markierter NF- κ B Konsensussequenz durch die Bindung des Transkriptionsfaktors verdeutlicht wird. Die Daten zeigen, dass die Herunterregulierung von RFK die TNF Signaltransduktion, die zu NF- κ B Aktivierung führt nicht beeinflusst.

Ein weiterer Effekt von TNF ist die Induktion von Zelltod. In HeLa Zellen kann TNF induzierter Zelltod mit Cycloheximid (CHX) eingeleitet werden (Miura *et al.* 1995; Bernard *et al.* 2001), was auf die Inhibition der *de novo* Synthese NF- κ B aktivierter Gene zurückzuführen ist. Nur in Anwesenheit von CHX konnte TNF in einer dosisabhängigen Weise Zelltod induzieren, wie die Kristallviolett färbung (KV) zeigt (Abb. 11B). Steigende CHX Konzentrationen sind zwar toxisch, verstärkten aber den zytotoxischen Effekt von TNF (Abb 11B). Um den spezifischen zytotoxischen Effekt von TNF ermitteln zu können, wurden die HeLa, HeLa^{shKon} und HeLa^{shRFK} über Nacht mit steigenden Konzentrationen von TNF bei konstanter CHX Konzentration

(10 µg/ml) behandelt (Abb. 11C). Die Todesrate wurde mit Kristallviolett-Färbung quantifiziert. Abb. 11C zeigt eine im Vergleich zu HeLa und HeLa^{shKon} signifikante Resistenz von HeLa^{shRFK} gegenüber TNF induziertem Zelltod nach 16 h.

TNF kann nekrotischen oder apoptotischen Zelltod induzieren (Fiers *et al.* 1999). Ob TNF induzierter Zelltod in Anwesenheit von CHX durch Apoptose oder Nekrose verursacht wird, wurde im Folgenden untersucht. z-VAD ist ein potenter Inhibitor der Caspasen (Pan-Caspase-Inhibitor) und somit des apoptotischen Zelltodes. Die Applikation von z-VAD (10 µM) konnte Apoptose, die im Folgenden mit 7 µg/ml CHX und 70 ng/ml TNF induziert wurde, komplett blockieren (Abb. 11D). Diese Daten zeigen, dass die von TNF in HeLa Zellen induzierte Apoptose RFK abhängig ist.

Staurosporin (STS) ist ein potenter Inhibitor von PKC (Proteinkinase C) und induziert Apoptose über die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs (Estoppey *et al.* 1997), das mit der Freisetzung mitochondrialer Proteine zur Bildung des Apoptosoms einhergeht. 0,5 µM STS induzierte unabhängig von RFK Expression vergleichbare Zelltodraten in den HeLa Zelllinien (Abb. 11E).

Die beschriebenen Daten suggerieren, dass HeLa^{shRFK} eine hohe Resistenz gegenüber TNF induzierter Apoptose aufweist. Dieser Effekt ist spezifisch, da die TNF induzierte NF-κB Aktivierung und der STS induzierte Zelltod in HeLa^{shRFK} sich nicht von HeLa oder HeLa^{shKon} unterscheidet.

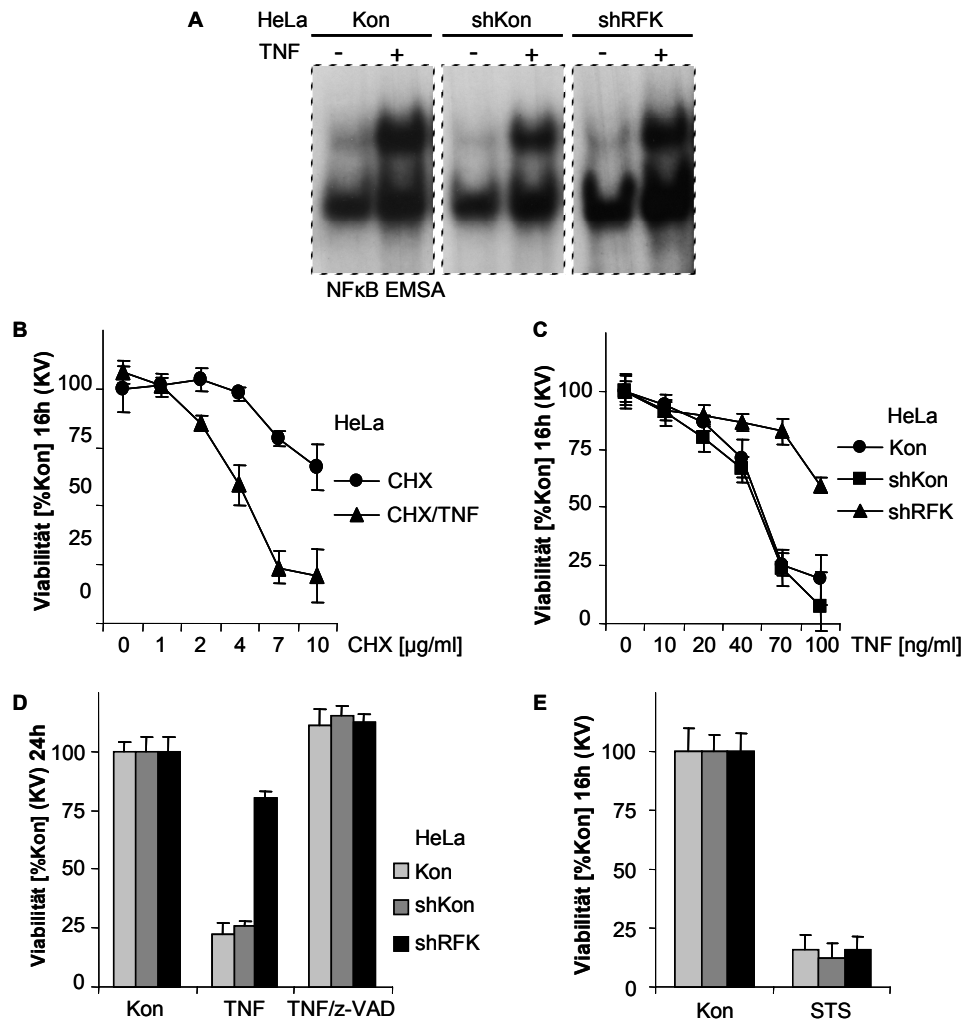


Abb. 11) TNF induzierte Apoptose nicht aber NF- κ B Aktivierung ist von RFK abhängig. NF- κ B EMSA nach TNF Stimulation (10 ng/ml, 30') zeigt keine Unterschiede in den HeLa Zelllinien. B) TNF induziert Zelltod in HeLa nur in Anwesenheit von CHX. Steigende Konzentrationen von CHX (0-10 μ g/ml) wurden mit oder ohne TNF (100 ng/ml) 16 h im Mikrotiterformat (je 8 Wells) zu je 10^4 HeLa/Well appliziert und die Viabilität mit Kristallviolett färbung (KV) analysiert. C) TNF induziert Zelltod in Abhängigkeit der RFK. KV Analyse des dosisabhängigen (0-100 ng/ml) zytotoxischen Effekts von TNF in Anwesenheit von 10 μ g/ml CHX 16 h nach Applikation. D) TNF induziert Apoptose in HeLa. Zellen wurden wie in B) – C) behandelt, jedoch mit 7 μ g/ml CHX und 70 ng/ml TNF für 24 h. Die Applikation von 10 μ M Pan Caspase Inhibitor z-VAD hebt den zytotoxischen Effekt von TNF vollständig auf. Der Zelltod wurde mit KV Färbung analysiert und auf CHX behandelte Kontrollen normalisiert. A) Funktionelle Apoptosemaschinerie in HeLa^{shRFK}. 10^4 Zellen wurden im Mikrotiterformat 16 h mit 0,5 μ M STS behandelt und mittels KV Färbung analysiert.

3.11 Die Kinaseaktivität der RFK und TNF induzierte Apoptose

Die veröffentlichte Röntgenstruktur der RFK legt nahe, dass die Aminosäurereste N36 und E86 an der katalytischen Reaktion beteiligt sein könnten (Karthikeyan et al. 2003). Basierend auf diesen Daten wurden zusätzlich zum wt-Protein (GST-RFK^{wt}) zwei Mutanten (GST-RFK^{N36D}, GST-RFK^{E86Q}) in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt (Abb. 12A). Beide Varianten wurden mit hoher Reinheit (>80%, densitometrisch mit Quantity One[®] Software ermittelt) rekombinant hergestellt, wie die Silberfärbung in Abb. 12A) veranschaulicht. Anschließend wurden die Mutanten hinsichtlich ihrer Kinaseaktivität überprüft (Abb. 12B). Überraschenderweise hatte die N36D Mutation (GST-RFK^{N36D}) keinen signifikanten Einfluss auf die Kinaseaktivität, während GST-RFK^{E86Q} eine kinasedefiziente Mutante darstellte. RFK^{E86Q} wurde als kinasedefiziente Kontrolle neben dem wt-Protein für die Rekonstitution der RFK Expression in HeLa^{shRFK} eingesetzt. Dazu wurde sie als siRNA resistente Mutante – da an 10 Nukleotiden innerhalb der siRNA Zielsequenz verändert – an den C-Terminus von EGFP fusioniert (pEGFP-RFK^{wt/siR} bzw. pEGFP-RFK^{E86Q/siR}). Die Expression von RFK^{wt/siR}, nicht aber die von RFK^{E86Q/siR} in HeLa^{shRFK} konnte die TNF Zytotoxizität rekonstituieren (Abb.12C). Annexin-V bindet Ca²⁺ abhängig Phosphatidylserine, die während der frühen Phase der Apoptose auf die Außenseite der Plasmamembran transloziert werden. Durch die Konjugation von Annexin-V mit Fluorochromen (z.B. Phycoerithrin; PE) kann das Protein als Marker für fortlaufende Apoptose z.B. in FACS Analysen verwendet werden (Koopman *et al.* 1994). Durch die synchrone Verwendung von membranundurchlässigen Farbstoffen wie 7-Aminoactinomycin (7-AAD) kann zwischen toten Zellen allgemein und apoptotischen Zellen unterschieden werden. Die angehende Apoptose wurde in HeLa Zellen durch extrazelluläre Annexin-V Markierung 7-AAD negativer Zellen 8 h nach TNF Stimulation über FACS Analyse quantifiziert (Abb. 12D). Mit Annexin-V Färbung apoptotischer Zellen konnte auch gezeigt werden, dass die TNF induzierte Apoptose in HeLa^{shRFK} mit RFK^{wt/siR} aber nicht mit der kinasedefizienten Mutante RFK^{E86Q/siR} rekonstituierbar ist. Daraus folgt, dass die Kinaseaktivität der RFK unverzichtbar für TNF induzierte Apoptose ist.

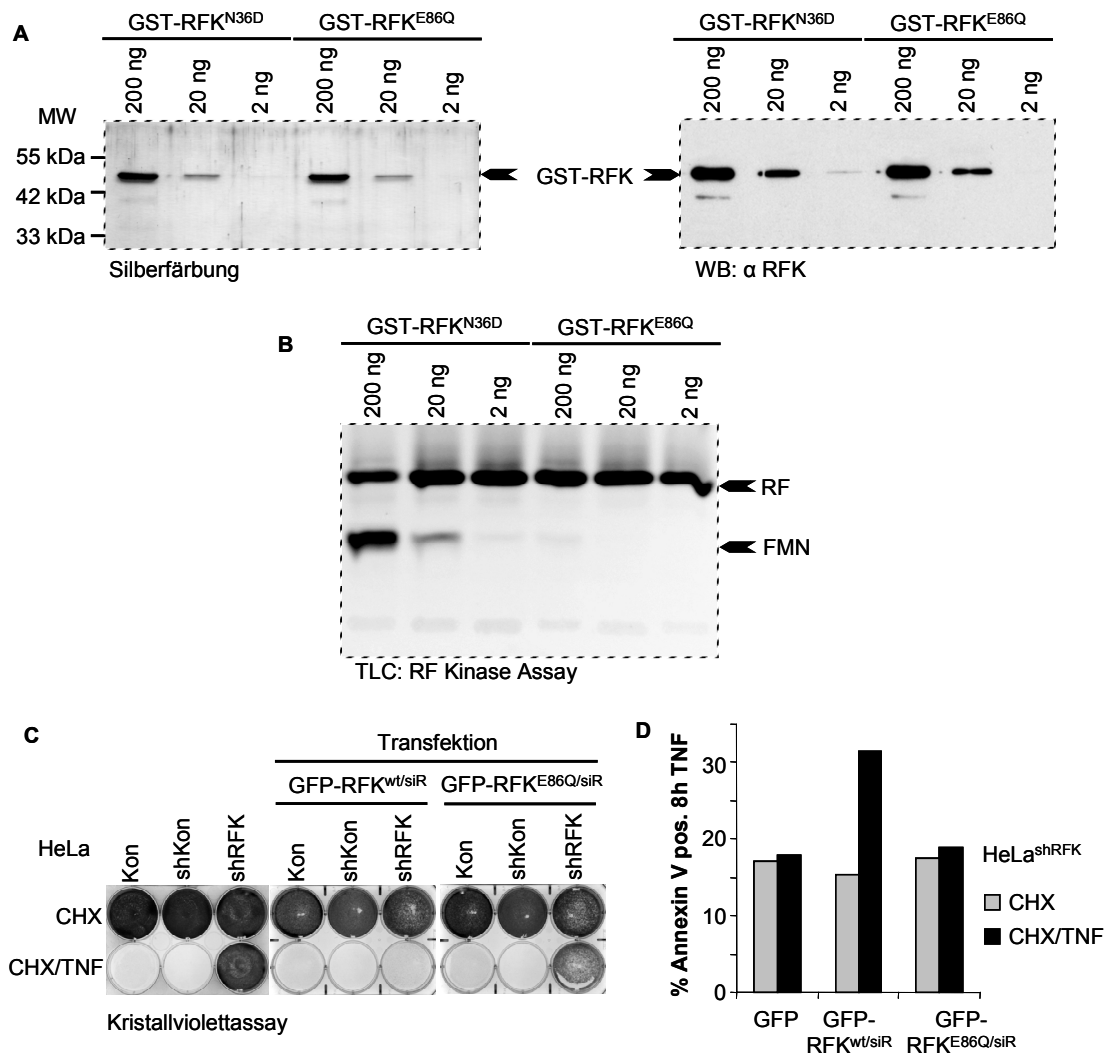


Abb. 12) Die Kinaseaktivität der RFK ist für TNF induzierte Apoptose unentbehrlich. A) Analog zum RFK^{wt} (Abb. 4) wurden zwei mögliche Kinase defiziente Mutanten in pGEX-4T-1 kloniert, bakteriell exprimiert und aufgereinigt. B) Riboflavinkinaseassay wurde wie in Abb. 4) durchgeführt und enthüllt E86Q aber nicht N36D als *loss of function* Mutation. C) Für die Rekonstitution der RFK in HeLa^{shRFK} wurden C-terminal an EGFP fusionierte Konstrukte mit der Kinase defizienten Variante sowie dem wt Protein hergestellt, deren siRNA Zielsequenz auf Nukleotidebene an 10 Positionen mutiert wurde und somit nicht mehr von der endogenen shRNA attackiert werden konnte. Nach Rekonstitution von RFK^{wt} und CHX/TNF Stimulation (7 µg/ml bzw. 70 ng/ml) sterben HeLa^{shRFK} Zellen, wie KV Färbung 24 h nach Applikation verdeutlicht. Dies ist mit der Kinase defizienten Mutante RFK^{E86Q} nicht der Fall. D) Rekonstituierte Zellen wurden 8 h nach TNF Stimulation (wie in C)) mit Annexin-V PE und 7-AAD angefärbt und die Apptoserate als der Anteil Annexin-V positiver und 7-AAD negativer Zellen angegeben. Nur RFK^{wt} nicht aber RFK^{E86Q} rekonstituierte HeLa^{shRFK} zeigen eine signifikante Annexin-V Färbung nach TNF Stimulation.

3.12 TNF induzierte mitochondriale Apoptose und RFK

Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs ist ein Markenzeichen Todesrezeptor vermittelter Apoptose und ist durch die Ausschüttung proapoptotischer mitochondrialer Faktoren wie Zytocrom C (CytC) charakterisiert. HeLa und HeLa^{shKon} zeigten 8 h nach TNF Behandlung eine signifikante Erhöhung von zytoplasmatischem CytC, wie Western Blot Analysen von zytoplasmatischen Extrakten zeigten (Abb. 13). Die TNF induzierte CytC Ausschüttung führte konsequenterweise zum apoptotischen Zelltod, wie Western Blot Analysen von prozessiertem Parp-Protein zeigten. Auffallend hier war die geringe Ausschüttung von mitochondrialem CytC ins Zytoplasma von HeLa^{shRFK} Zellen, verbunden mit signifikant geringerer Prozessierung von Parp, die als Indikator für Caspase-3 Aktivität und apoptotischen Zelltod gilt. Interessanterweise konnte der Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD in unserem System zwar die Prozessierung von Parp inhibieren, jedoch nicht die CytC Ausschüttung unterbinden. Diese Daten lassen vermuten, dass TNF in HeLa Zellen den mitochondrialen Apoptoseweg aktiviert, der Caspase unabhängig verläuft und von RFK abhängt.

Weiterhin waren HeLa^{shRFK} Zellen in der Lage, nach STS Applikation (0,5 μ M, 3 h) vergleichbare Mengen von mitochondrialem CytC auszuschütten und Apoptose zu induzieren (s. Parp Prozessierung), was als ein Indiz für eine funktionelle intrinsische Apoptosemaschinerie in diesen Zellen gelten darf.

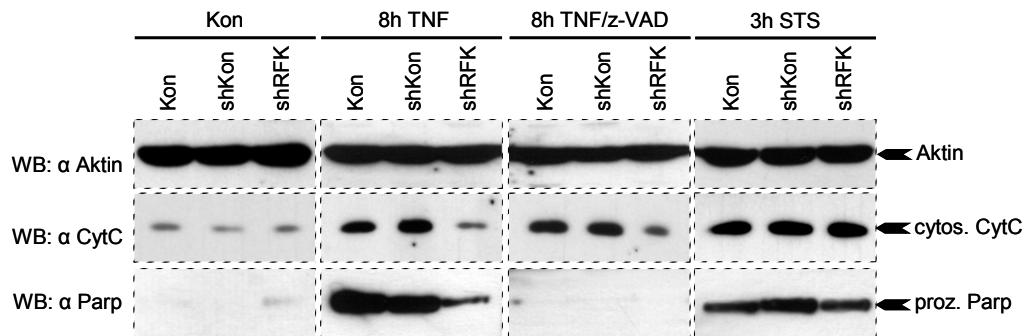


Abb. 13) TNF aktiviert den mitochondrialen Apoptoseweg in HeLa Zellen in Abhängigkeit von RFK. HeLa Zelllinien wurden 8 h in Anwesenheit von CHX (7 µg/ml), mit TNF (70 ng/ml) und TNF/z-VAD (10 µM) oder 3 h mit 0,5 µM STS behandelt. Zytosolische Extrakte wurden zwecks Ermittlung der Freisetzung mitochondrialen Cytochrom C (CytC) ins Zytosol hergestellt. CytC Freisetzung nach TNF Stimulation erfolgt in Caspase unabhängiger Weise, wie die Behandlung mit z-VAD zeigt und ist in HeLa^{shRFK} signifikant verringert. Prozessiertes Parp ist ein Markenzeichen apoptotischer Zellen und ist auch in HeLa^{shRFK} nach TNF Stimulation verringert. 0,5 µM STS kann in allen drei Zelllinien vergleichbare Mengen an CytC freisetzen. Hier korreliert die CytC Freisetzung mit Parp Prozessierung.

3.13 Die essentielle Rolle der RFK in TNF induzierter Apoptose durch Produktion von ROS

Die Tatsache, dass z-VAD die TNF induzierte Freisetzung von CytC in unserem Modellsystem nicht inhibieren konnte, lässt vermuten, dass die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs ohne die Beteiligung von Caspasen vonstatten geht. ROS gelten als potente Mediatoren der TNF Zytotoxizität (Shen and Pervaiz 2006). Folglich lässt sich letztere in einigen Systemen durch das chemische Antioxidanz NAC aufheben (Cossarizza *et al.* 1995; Brown *et al.* 2001; Zhang and Wang 2006; Li *et al.* 2008). Tatsächlich konnte mit NAC die Freisetzung von mitochondrialem CytC und die Prozessierung von Parp in HeLa und HeLa^{shKon} 8 h nach TNF Behandlung signifikant inhibiert werden, wie Western Blot Analysen verdeutlichten (Abb. 14A). Dies ging mit einer deutlich reduzierten TNF Zytotoxizität einher (Daten nicht gezeigt).

NADPH Oxdasen (Lambeth 2004) oder Enzyme der Atmungskette (Burdon *et al.* 1993) produzieren Superoxidanionen, die durch konstitutive und induzierbare SODs

in Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Letzteres kann über die Aktivierung der mitochondrialen Apoptosemaschinerie in HeLa (Takeyama *et al.* 2002; Djavaheri-Mergny *et al.* 2003; Singh *et al.* 2007) und anderen Zellen (Sugano *et al.* 1999; Wagner *et al.* 2000; Takeyama *et al.* 2002; Gautam *et al.* 2006) Zelltod auslösen. Diese These konnte durch exogen appliziertes H₂O₂ bestätigt werden. Behandlung mit H₂O₂ führte nach 4 h sowohl in HeLa^{shKon} als auch in HeLa^{shRFK} zur Freisetzung von mitochondrialem CytC (Abb. 14B) und zu vergleichbaren Todesraten nach 16 h (Abb. 14C). Diese Daten lassen vermuten, dass die TNF induzierte Produktion von ROS und nicht die ROS Sensitivität in HeLa^{shRFK} Zellen vermindert sein könnte. Deshalb wurde untersucht, ob in unserem Modellsystem TNF Stimulation zum oxidativen Stress führt. Der Grad des intrazellulären oxidativen Stresses wurde zunächst mit dem durch ROS aktivierbaren Pro-Fluorophor carboxy-H₂DCFDA via Durchflusszytometrie analysiert (Kinnula *et al.* 1998). HeLa und HeLa^{shKon} zeigten 6 h nach TNF Stimulation eine signifikante, durch NAC inhibierbare Erhöhung der DCF Fluoreszenz, was bei HeLa^{shRFK} nicht der Fall war (Abb. 14D). Weiterhin wurde untersucht, ob der Defekt in HeLa^{shRFK} durch Rekonstitution mit RFK behoben werden kann. Dazu wurden HeLa^{shKon} und HeLa^{shRFK} Zellen mit GFP, GFP-RFK^{wt/siR} oder GFP-RFK^{E86Q/siR} transfiziert und TNF induziertes, extrazelluläres H₂O₂ 6h nach TNF Stimulation mittels Amplex[®] Red Reagenz quantifiziert. Die TNF induzierte relative Erhöhung der Amplex[®] Red Fluoreszenz war in HeLa^{shRFK} geringer als in HeLa^{shKon}, erreichte aber fast das Niveau von Letzterem, wenn zuvor GFP-RFK^{wt/siR} transfiziert wurde. Dies war mit GFP oder GFP-RFK^{E86Q/siR} nicht der Fall.

Schliesslich wurde untersucht, ob TNF induzierte ROS Produktion auch in primären Zellen *ex vivo* von RFK abhängt. Dazu wurden MxCre Mäuse mit RFK^{fl/fl} bis zu Homozygotie des RFK-Allels verpaart und 3-mal intraperitoneal mit poly-(I:C) behandelt (Kuhn *et al.* 1995), das den Mx-Promotor aktivieren kann und eine effektive, konditionale Deletion in Makrophagen ermöglicht (Akiyama *et al.* 2002). Peritoneale Macrophagen aus poly-(I:C) behandelten RFK^{wt/wt}/MxCre und RFK^{fl/fl}/MxCre Mäusen wurden Acht Tage nach der ersten Behandlung mit poly-(I:C) isoliert und hinsichtlich ihrer Superoxidanionproduktion nach TNF Stimulation untersucht. Dazu wurde der hochsensitive und für Superoxidanionen spezifische Chemielumineszenzsubstrat MCLA verwendet (Uehara *et al.* 1993; Tyurina *et al.* 2004). RFK^{wt/wt}/MxCre Makrophagen produzierten eine nach TNF Stimulation

signifikante Erhöhung der MCLA Chemilumineszenz, wohingegen Makrophagen aus $\text{RFK}^{\text{fl}(\text{neo}\Delta)/\text{fl}(\text{neo}\Delta)}/\text{MxCre}$ eine bis über zweimal geringere Chemilumineszenz zeigten.

Die Daten deuten auf eine Beteiligung der RFK an TNF induzierte ROS Produktion in HeLa Zellen und murinen Makrophagen hin. Überdies suggerieren die Daten, dass TNF induzierte Apoptose in HeLa Zellen über die Produktion von ROS reguliert wird, welche in $\text{HeLa}^{\text{shRFK}}$ nur unzureichend gebildet werden. Die Kinaseaktivität der RFK ist auch für die TNF induzierte ROS Produktion essentiell. Zusammenfassend kann die inhibierte ROS Produktion von $\text{HeLa}^{\text{shRFK}}$ für die hohe Apoptoseresistenz dieser Zellen nach TNF Stimulation verantwortlich gemacht werden.

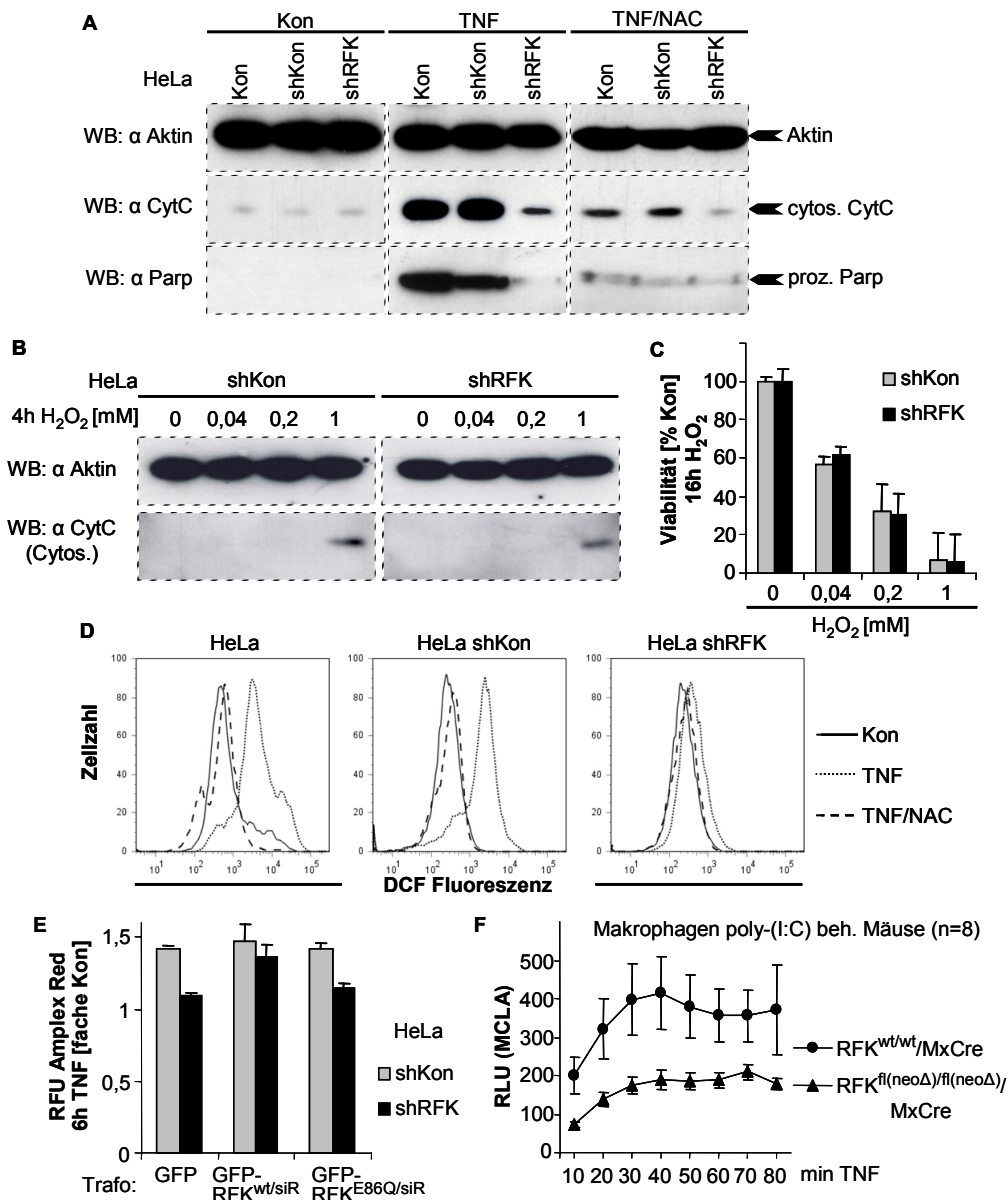


Abb. 14) RfK ist für TNF stimulierte ROS Formation und Apoptose in HeLa Zellen verantwortlich. A) NAC inhibiert die Freisetzung von mitochondrialem CytC und Parp Prozessierung in HeLa Zellen nach 8h TNF Stimulation (Legende von Abb. 13). B) und C) Exogenes H_2O_2 kann nach 4h sowohl in HeLa^{shKon} als auch in HeLa^{shRFK} CytC freisetzen und nach 16 h vergleichbare dosisabhängige Zelltodraten induzieren. D) Zur Bestimmung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurden die Zellen 6 h nach TNF Behandlung mit 20 μ M carboxy- H_2 DCFDA in HBSS beladen (20 Minuten, 37°C). DCF Fluoreszenz wurde mit FACSCalibur (488 nm Laser, FITC Filter) quantifiziert. Kontrollzellen zeigen eine signifikante durch NAC (25 mM) inhibierbare DCF Fluoreszenz nach TNF Stimulation, während HeLa^{shRFK} kaum DCF Fluoreszenz zeigt. E) Messung von relativem, extrazellulärem H_2O_2 über HRP-vermittelte Amplex[®] Red Fluoreszenz. Die gegenüber HeLa^{shKon} geringere H_2O_2 Ausschüttung von HeLa^{shRFK} Zellen 6h nach TNF Stimulation kann durch Transfektion mit GFP-RFK^{wt}, nicht aber mit GFP oder GFP-RFK^{E86Q} rekonstituiert werden. F) Superoxidation vermittelte MCLA Lumineszenz TNF induzierter Makrophagen. RfK^{wt/wt}/MxCre und RfK^{fl(neo Δ)/fl(neo Δ)/MxCre Mäuse wurden 3-mal intraperitoneal mit je 250 μ g poly-(I:C) behandelt (Tage 0, 3, 6) und am 8. Tag durch *peritoneal lavage* gewonnen. TNF (10ng/ml) induzierte Chemilumineszenz wurde direkt nach Präparation der Zellen als Duplikate mit je 10⁵ Zellen/Well in 100 μ l HBSS/5 μ M MCLA mit Hilfe eines Mikrotiter-Luminometers (Berthold) bei 37°C gemessen.}

3.14 Sensitivierung für SV40 Infektion über gesteigerte Caveolae/Lipid-Raft vermittelte Endozytose durch RFK Defizienz

Im Jahre 2005 wurde eine Studie veröffentlicht (Pelkmans *et al.* 2005), in der der Einfluss siRNA vermittelter transienter Knockdowns (Herunterregulierung) von genomweiten Kinasen auf Clathrin- und Caveolae/Lipid-Raft vermittelte Endozytose hin untersucht wurde. RFK (Flj11149) war einer der Kinasen, deren Herunterregulierung zur Erhöhung des Expressionslevels vom großen SV40 T-Antigen (LTag; *large T antigen*) führte, welche als indirekter Nachweis für die Endozytose des Virus gilt. Eine Vielzahl von Viren penetrieren die Wirtszelle als Cargos von endozytotischen Vesikeln (Marsh and Helenius 2006). Dabei werden unterschiedliche endozytotische Wege aktiviert (Spooner *et al.* 2006). Die meisten Viren wie z.B. VSV (Schlegel *et al.* 1982; Sun *et al.* 2005) werden über Clathrin *coated pits* endozytiert. Simian Virus 40 (SV40) wird über die induzierbare Caveolae/Lipid-Raft vermittelte Endozytose (Anderson *et al.* 1996; Pelkmans *et al.* 2002) eingeschleust.

Um die Rolle der RFK in SV40 Infektionen zu untersuchen, wurden HeLa, HeLa^{shKon} und HeLa^{shRFK} mit SV40 infiziert und die Expression von LTag 24 h bzw. 48 h nach Infektion mittels Western Blot detektiert (Abb. 15A). LTag konnte in HeLa^{shRFK} bereits nach 24 h nachgewiesen werden, wogegen dessen Expression in HeLa und HeLa^{shKon} zu diesem Zeitpunkt noch unter der Detektionsgrenze lag. Zwar konnte LTag nach weiteren 24 h auch in HeLa und HeLa^{shKon} nachgewiesen werden, allerdings war dessen Expression in HeLa^{shRFK} zu diesem Zeitpunkt signifikant höher (Abb. 15A). Um die Unterschiede quantifizieren zu können, wurden die Zellen mit SV40 infiziert und LTag 36 h nach Infektion mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen und mit einem Fluoreszenz *plate reader* quantifiziert (Abb. 15B). Im Mittel konnten im Vergleich zu Kontrollzellen eine mindestens dreifache Erhöhung der LTag Expression zu diesem Zeitpunkt in HeLa^{shRFK} nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse sind mit der veröffentlichten Studie konform und legen die Vermutung nahe, dass SV40 Infektionen in HeLa^{shRFK} erleichtert oder beschleunigt sind.

Eine erfolgreiche Infektion durch VSV manifestiert sich durch eine potente Induktion des Zelltodes und bietet sich somit als geeignetes Werkzeug zur negativen Selektion von Zellen mit exzessiver Clathrin-vermittelter Endozytose an. HeLa^{shRFK} und HeLa^{shKon} wurden mit VSV infiziert und zeigten einen vergleichbaren Verlauf der Infektion (Abb. 15C). Bei beiden Zellen lag der LD₅₀ Wert bei ca. 0,5 infektiösen Partikeln pro Zelle. Diese Daten sprechen dafür, dass die Clathrin vermittelte Endozytose nach Herunterregulierung von RFK in HeLa Zellen unverändert ist.

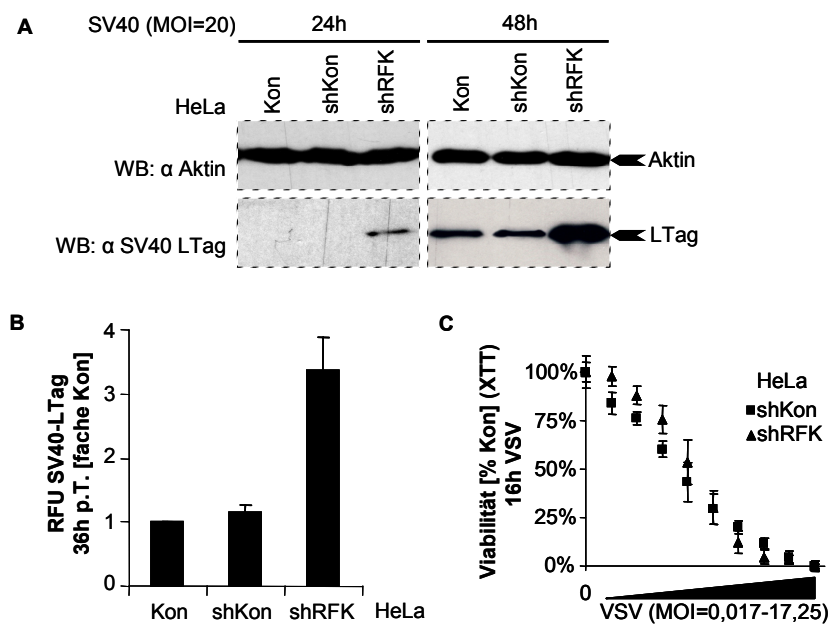


Abb. 15) SV40 Infektionen sind in RFK defizienten HeLa Zellen erleichtert. A) 2×10^5 Zellen wurden $\ddot{U}N$ im 6Wellformat mit SV40 (20 PFU/Zelle) infiziert. Die Infektion wurde nach 24 h bzw. 48 h indirekt über Immunblot von SV40 LTag nachgewiesen. B) Fluometrische Quantifizierung der SV40 Infektion über Immunfluoreszenznachweis von SV40 LTag. 10^4 Zellen wurden pro well einer speziellen Mikrotiterplatte wie in A) mit SV40 infiziert. LTag wurde 36 h nach Infektion mit einem spezifischen Erstantikörper und einem Alexa488 gekoppelten Zweitantikörper fluorometrisch quantifiziert und gegen Zweitantikörperkontrollen normalisiert. Herstellung dieser Viruspräparation und die Titerbestimmung an CV-1 Zellen wurden durch Dr. Olaf Utermöhlen durchgeführt. C) $\ddot{U}N$ Infektion mit dem zytotoxischen Virus VSV (MOI = 0.017-17,25) auf 2×10^4 Zellen/Well einer Mikrotiterplatte und Quantifizierung des Zelltodes als Zeichen einer erfolgreichen Infektion über XTT Assay.

Da es sich bei den hier dargestellten Experimenten um indirekte Nachweismethoden handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die RFK Defizienz nicht die Endozytose des Virus, sondern möglicherweise die LTag Expression positiv beeinflusst. Um diese Unklarheit aufklären zu können, wurde die Endozytose von SV40 mit fluoreszenzmarkierten viralen Partikeln evaluiert. Dazu wurde SV40 mit

AlexaFluor594 (AF594) (Pelkmans *et al.* 2001) markiert (Abb. 16A). Die Anzahl viraler Partikel wurde mittels Southern Dot-Blot mit einer SV40 spezifischen Sonde (SV40 Promotor) und bekannten Mengen eines Standards (pEGFP-N3) ermittelt (Abb. 16B). Zur Quantifizierung der Endozytoserate wurden AF594-SV40 Partikel (1000 Genomäquivalente/Zelle) zunächst 90 Minuten mit Zellen auf Eis inkubiert und zur Initiation der Endozytose in einen 37°C Inkubator übertragen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen 3 h nach AF594-SV40 Aufnahme verdeutlichen die erhöhte Endozytoserate von HeLa^{shRFK} gegenüber HeLa^{shKon} (Abb. 16C). Zusätzlich erfolgte der Immunfluoreszenznachweis des SV40 LTag 18 h nach AF594-SV40 Aufnahme. Die Expression von LTag ist in HeLa^{shRFK} signifikant höher als in HeLa^{shKon} (Abb. 16D), was mit der erhöhten Aufnahme von AF594-SV40 korreliert. Weiterhin wurde die Internalisierung des Virus fluorometrisch quantifiziert. Dazu wurde AF594-SV40 wie oben endozytiert. Die Endozytoserate wurde zu den in Abb. 16E) angegebenen Zeiten quantifiziert. Aus der Abbildung geht hervor, dass die direkte Endozytose des SV40 in HeLa^{shRFK} gegenüber HeLa und HeLa^{shKon} signifikant erhöht ist.

Das proteinogene Cholera Toxin B (ChTxB) bindet wie SV40 (Tsai *et al.* 2003) das Gangliosid GM1 (ein Membranglykolipid) als Rezeptor für Zellpenetration, das neben Cholesterol in Lipid-Rafts angereichert ist (Spooner *et al.* 2006) und wird wie SV40 über Caveolae/Lipid-Rafts endozytiert. Auch die Aufnahme von FITC-ChTxB in HeLa^{shRFK} war gegenüber HeLa und HeLa^{shKon} erhöht (Abb. 16F). TexasRed-Transferrin (TexRED-Tfn), das vornehmlich über Clathrin *coated pits* endozytiert wird (Bleil and Bretscher 1982) wurde jedoch von allen drei Zelllinien gleichermaßen aufgenommen (Abb. 16G). Die Daten zeigen, dass in HeLa^{shRFK} spezifisch die Caveolae/Lipid-Raft vermittelte aber nicht die Clathrin vermittelte Endozytoserate erhöht ist.

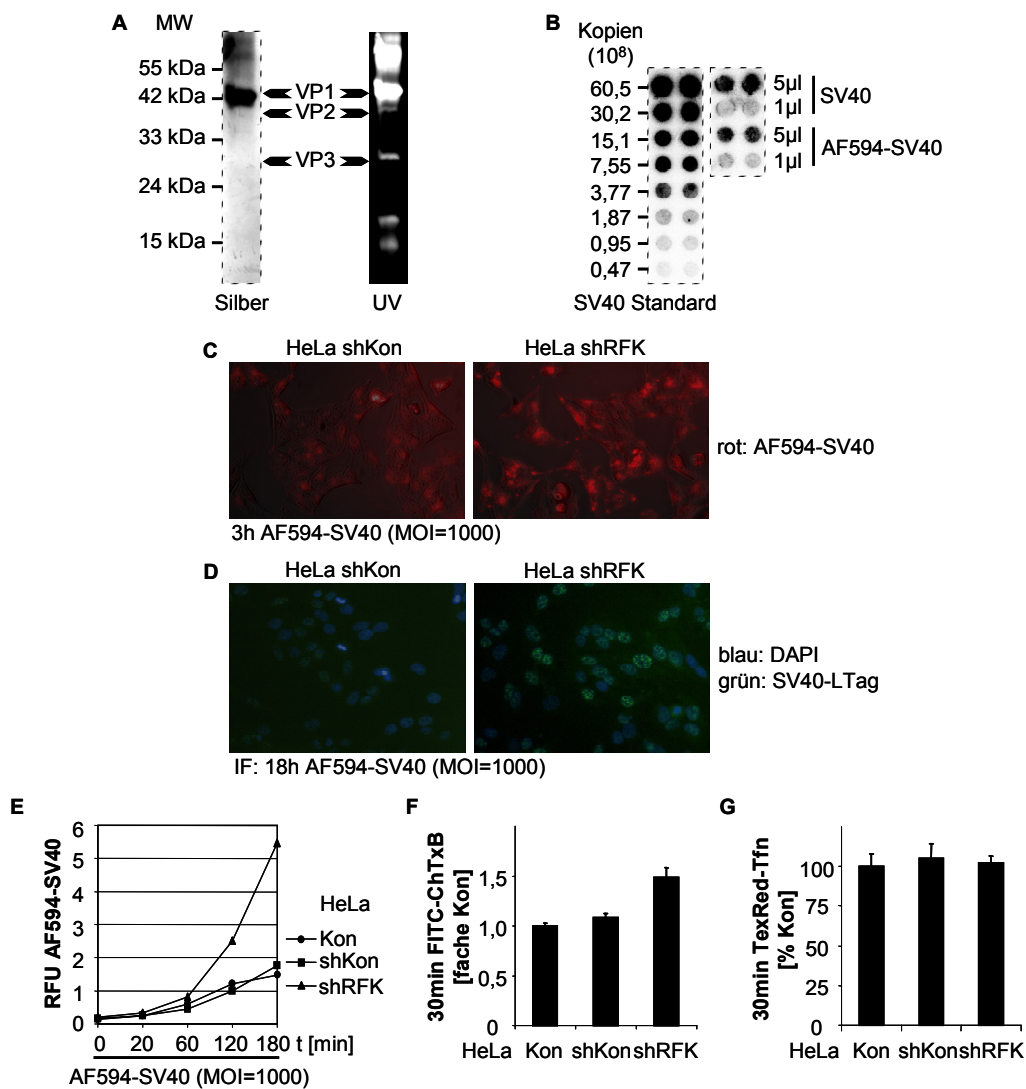


Abb. 16) RfK Defizienz hyperaktiviert spezifisch die Caveolae/Lipid Raft vermittelte Endozytose. Zum Zwecke des direkten Nachweises der SV40 Infektion wurden Viren mit Alexa Fluorophoren markiert und internalisierte SV40 Partikel direkt nachgewiesen. A) SV40 wurde in COS-7 Zellen propagiert und über zweimalige Ultrazentrifugation über einen kontinuierlichen Sucrosegradienten angereichert. 100 µg der angereicherten Virenfraktion wurde wie vorher beschrieben (Pelkmans *et al.* 2001) mit Alexa594 markiert. Markierter Virus wurde zweimal über inverse Größenausschlußsäulen vom Chromophor und Pufferresten befreit und für die Infektion von Zellen verwendet. 1 µg markierter Virus wurde über 12% SDS-PAGE mittels Silberfärbung und UV Visualisierung ($\lambda_{\text{Abs.}} = 365\text{nm}$) des Chromophors analysiert. Die erwarteten Höhen der drei Hüllproteine (VP1-VP3) ist mit Pfeilen angegeben. B) Bestimmung des Titers der Viruspräparationen über Southern Dot-Blot Analyse mit einer SV40 spezifischen Sonde (SV40 Promotor). Als Standard wurden bekannte Mengen des Plasmids pEGFP-N3 verwendet. C) AF594-SV40 (1000 Genomäquivalente/Zelle) wurde 90 Minuten bei 4°C an HeLa^{shKon} oder HeLa^{shRFK} gebunden, 3 h bei 37°C internalisiert und fluoreszenzmikroskopisch visualisiert. D) HeLa^{shKon} oder HeLa^{shRFK} wurden wie in C) infiziert und LTag 18 h nach Infektion über Immunfluoreszenz wie in Abb. 15 nachgewiesen und fluoreszenzmikroskopisch visualisiert. Blau; DAPI Färbung, grün; SV40 LTag. E) Quantifizierung der AF594-SV40 Internalisierung. AF594-SV40 wurde wie in C) jedoch im Mirotitformat an Zellen gebunden und für die angegebenen Zeiten internalisiert. Nach extensivem Waschen wurde die Internalisierung fluorometrisch im *plate reader* quantifiziert und als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) angegeben. F) Dreißigminütige Aufnahme von FITC-ChTxB (0,5 ng/ml) in HeLa Zelllinien. G) Dreißigminütige Aufnahme von TexRed-Tfn (5 ng/ml) in HeLa Zelllinien.

Um unsere Befunde zu bestätigen, wurde weiterhin die SV40 Endozytose in transient mit RFK rekonstituierten HeLa^{shRFK} evaluiert. Dazu wurde die Endozytose von AF647-SV40 in mit pEGFP, pEGFP/RFK^{wt/siR} oder pEGFP/RFK^{E86Q/siR} transfizierten HeLa^{shRFK} evaluiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass Zellen, die mit EGFP-RFK^{wt} rekonstituiert wurden (Abb. 17A) weniger Virus aufnahmen als nicht transfizierte Zellen, wogegen die Rekonstitution mit EGFP-RFK^{E86Q} keine restriktive Wirkung auf die Aufnahme des Virus hatte (Abb. 17B). Zur Quantifizierung der Endozytose wurde die AF647-SV40 Aufnahme nach 2 h im Fluoreszenz *plate reader* (Abb. 17C) oder mittels FACS (Abb. 17D) analysiert. Rekonstitution mit EGFP-RFK^{wt} nicht aber mit EGFP oder EGFP-RFK^{E86Q} konnte die Endozytose des Virus signifikant inhibieren.

Die Rekonstitution mit RFK^{wt}, nicht aber mit der Kinase defizienten Variante RFK^{E86Q} führt zur Wiederherstellung der ursprünglichen endogenen Resistenz der HeLa Zellen gegenüber einer Infektion mit SV40 und unterstreicht die Rolle der Kinaseaktivität der RFK in diesem Prozess.

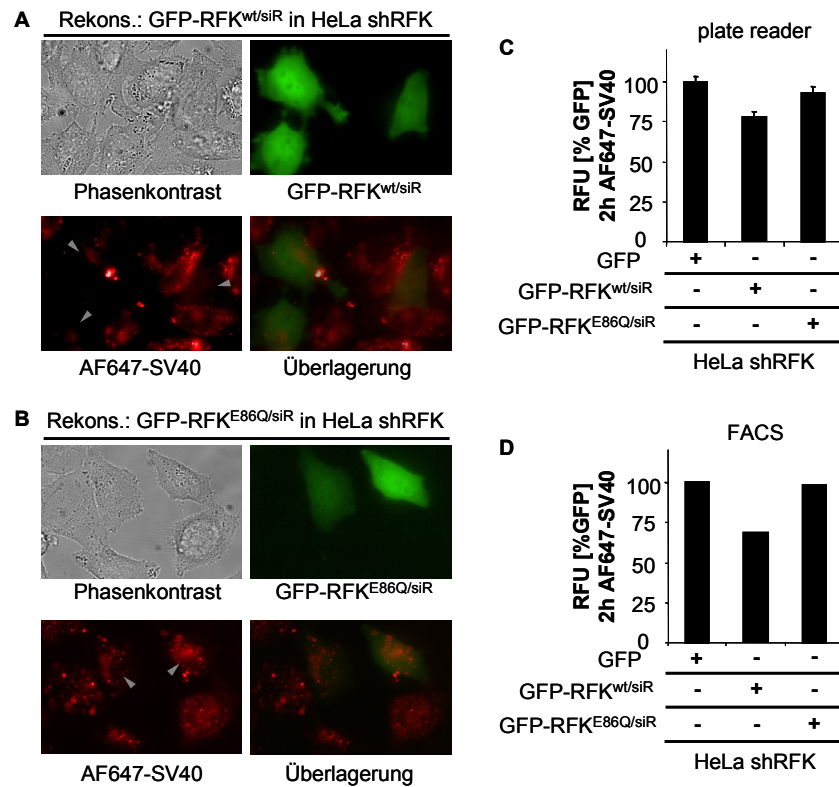


Abb. 17) Rekonstitution der RFK Aktivität in HeLa^{shRFK} restauriert die Resistenz gegen SV40 Infektionen. siRNA resistente EGFP Fusionskonstrukte von RFK^{wt} bzw. RFK^{E86Q} wurden in HeLa^{shRFK} Zellen transfiziert und die Virusinternalisierung (AF647-SV40) wie in der Legende zu Abb. 16) beschrieben durchgeführt und anschließend fluorometrisch analysiert. A) Quantifizierung der Virusinternalisierung (2h) nach Rekonstitution der RFK mittels Fluoreszenz *plate reader*. B) FACS vermittelte Quantifizierung der AF647-SV40 Internalisierung (2h) in EGFP positiven HeLa^{shRFK} Zellen. C) Rekonstitution mit RFK^{wt} oder D) RFK^{E86Q} und fluoreszenzmikroskopische Analyse der AF647-SV40 Aufnahme 2 h nach Initiation der Internalisierung.

4 Diskussion

Im Rahmen der Suche nach Interaktionspartnern des TNF-Rezeptors wurde das humane Protein Flj11149 in unserem Labor in einem Hefe Zweikomponenten Screen mit einer HeLa cDNA Bibliothek als ein neuer Interaktionspartner von TNF-RI entdeckt und kloniert (Dr. Oleg Krut). Anschließend konnte die Interaktion mit Hilfe von Koimmunpräzipitation und Pulldown in überexprimierenden humanen Fibroblasten bestätigt werden (Katja Krönke-Wiegmann). Außerdem liegen Daten vor, die die Interaktion der endogenen Proteine zeigen (Kooperation mit Prof. Stefan Schütze, Kiel). Als Ausgangspunkt der funktionellen Analyse wurde Flj11149 im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit als rekombinantes GST-Fusionsprotein aufgereinigt und eindeutig gezeigt, dass es sich dabei um eine humane monofunktionale Riboflavinkinase (RFK) handelt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der RFK durch TNF stimulierbar ist. Im Folgenden wurde eine Knockout-Mauslinie mit konditional deletierbarem RFK-Allel hergestellt. Die komplette Inaktivierung der RFK führte zu embryonaler Letalität und weist damit auf die essentielle Funktion der RFK in der Embryogenese hin. Parallel wurde ein lentivirales shRNA Expressionsystem adaptiert und angewandt, um die zelluläre Funktion der RFK untersuchen zu können. Die funktionellen Untersuchungen deuten auf eine wichtige Rolle der RFK in i) TNF induzierter Apoptose und ii) Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) hin. Darüber hinaus konnte der RFK iii) eine antivirale Funktion zugeschrieben werden, die über die Regulation des Caveolae/Lipid-Raft Endozytosesignalwegs vermittelt wird.

4.1 RFK als neues TNF-RI Adaptorprotein

Die Signalkaskaden, die durch TNF initiiert werden, sind sehr vielfältig. Dazu gehören nicht nur Apoptose oder Nekrose, sondern auch Inflammation, Abwehr von Mikroorganismen, Differenzierung, Morphogenese, Zellwanderung und Proliferation (Aggarwal 2003). Zwar können in ein und derselben Zelle mehrere TNF induzierte

Signalkaskaden synchron ablaufen. Die höchst unterschiedlichen Konsequenzen zur Folge haben und differenzielle molekulare Interaktionen voraussetzen. Es wird angenommen, dass die pleiotropen Effekte durch ein strikt reguliertes Netzwerk von Adaptormolekülen transduziert werden. Es wurde schon früh gezeigt, dass TNF-RI mit TRAF2, FADD, TRADD, RIP-1, Caspase-8 und FAN interagieren kann. Neuere Berichte zeigten unter anderem TAK1, hUBC9, PIP5K und NOX1 als Interaktionspartner von TNF-RI (Castellino *et al.* 1997; Saltzman *et al.* 1998; Jiang *et al.* 1999; Blonska *et al.* 2005; Kim *et al.* 2007). Die Expression der genannten Faktoren ist in der Regel organ- und zelltypspezifisch. Es ist somit nahe liegend, dass eine zelltypspezifische Expression von Adaptormolekülen in den verschiedenen Organen durch differenzielle Interaktion mit TNF-RI unterschiedliche Signalkaskaden induzieren.

Bisher unveröffentlichte Daten identifizieren RFK als einen neuen Interaktionspartner von TNF-RI (Dr. Oleg Krut). Bis heute gibt es keine Publikationen, die sich mit der zellulären Funktion der RFK befassen, allerdings wurde die Röntgenstruktur der RFK bereits analysiert (Karthikeyan *et al.* 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protein erstmalig biochemisch als humane RFK (ATP:Riboflavin-5'-Phosphotransferase; E.C.2.7.1.26) charakterisiert. Im Gegensatz zu den prokaryotischen bifunktionalen Enzymen (z.B. aus *Escherichia coli*, gi: 85674289 oder *Streptococcus agalactiae*, gi: 2289231), die sowohl Riboflavinkinase- als auch FAD Synthetaseaktivität besitzen (Clarebout *et al.* 2001), handelt es sich beim humanen Homolog um eine monofunktionale RFK, da sie nur die Umwandlung von Riboflavin zu FMN katalysiert.

Es wurde gezeigt, dass Thyroidhormone die Flavinbiosynthese (Rivlin 1970; Lee and McCormick 1985) regulieren können. Außerdem wurde die Mobilisierung von Riboflavin während einer lokalen Infektion (Brijlal *et al.* 1996; Brijlal and Lakshmi 1999) aus Organen mit dem höchsten Gehalt an Flavinen (Van Duyne and Sherman 1941; Decker and Byerrum 1954) beobachtet. Über eine Regulation der Flavinbiosynthese durch immunstimulatorische Faktoren jedoch ist bis jetzt nicht berichtet worden. Die Bindung der RFK an TNF-RI suggeriert die Modulation der RFK Aktivität durch TNF. Die hier präsentierte Arbeit identifiziert TNF als posttranslationalen Effektor der RFK Aktivität. So konnte gezeigt werden, dass TNF

Stimulation die Aktivität der RFK in überexprimierenden HEK-293 FT Zellen signifikant erhöht. Damit kann TNF eine neue Rolle bei der Modulation der Flavinbiosynthese durch die Erhöhung der Aktivität der RFK zugeschrieben werden. Die Aktivierung der RFK durch TNF würde dem erhöhten Bedarf einer Zelle an freien Flavinen Rechnung tragen. Es wurde gezeigt, dass TNF die Expression einiger Flavoproteine induziert, für die Flavine als Kofaktoren essentiell sind. Dazu gehören die NADPH Oxidase der Phagozyten (Cassatella *et al.* 1989), die NO-Synthase 2A (Geller *et al.* 1993), die NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase 1 (NQO1) (Nho and O'Dwyer 2004) und die Xanthinoxidase (Page *et al.* 1998). Es wurde gezeigt, dass die Aufnahme von Riboflavin auf *metabolic trapping* durch Phosphorylierung beruht (Aw *et al.* 1983; Gastaldi *et al.* 2000). Daher kann angenommen werden, dass die hier beschriebene TNF induzierte Aktivität der RFK die Aufnahme von Riboflavin positiv beeinflusst. Der Mechanismus der Aktivierung der RFK durch TNF muss jedoch noch eingehend untersucht werden.

4.2 Glutamat-86 als katalytische Base der RFK

TNF-RI besitzt selbst keine enzymatische Aktivität. Die Analyse der enzymatischen Aktivität ihrer Adaptormoleküle und der möglichen Beteiligung dieser an TNF induzierten Signalkaskaden ist somit von großem wissenschaftlichem Interesse. Basierend auf der veröffentlichten Kristallstruktur (1NB9) sollten durch zielgerichtete Mutagenese Derivate der RFK rekombinant hergestellt und aufgereinigt werden. Weiterhin sollten die Mutanten hinsichtlich ihrer Riboflavinkinaseaktivität untersucht werden. Im ternären Komplex der kristallinen RFK mit MgADP und Riboflavin interagiert der konservierte Aminosäurerest Asparagin-36 (N36) über die Carbamoylgruppe der Seitenkette mit dem β -Phosphatrest von ADP sowie dem komplexierten Mg^{2+} -Ion (Abb 18). Außerdem interagiert die Carboxygruppe des konservierten Aminosäurerestes Glutaminsäure-86 (E86) mit den 3'- und 5'-Hydroxygruppen der Ribitylseitenkette des Riboflavin. Die 5'-Hydroxygruppe liegt in FMN, dem Produkt der RFK phosphoryliert vor. Sowohl N36 als auch E86 wurden als katalytische Reste in Betracht gezogen (Karthikeyan *et al.* 2003).

In Analogie zu anderen Studien mit Kinasen (Uyeda *et al.* 1997) wurde Asparagin-36 nach Asparaginsäure mutiert. Da dabei die ungeladene Carbamoylgruppe der Seitenkette in die geladene Carboxygruppe umgewandelt wurde, ist es möglich, dass die oben beschriebene elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem β -Phosphatrest des ADP und N36 aufgehoben würde. Überraschenderweise war die Kinaseaktivität von RFK^{N36D} vergleichbar mit der von RFK^{wt}. Damit kann N36 mit hoher Wahrscheinlichkeit als katalytischer Rest ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist N36 zusammen mit anderen Resten für die Stabilisierung der Bindung von MgADP zuständig. Im Falle von RFK^{N36D} würden andere Aminosäurereste den möglichen Funktionsausfall von N36 kompensieren. Diese Reste könnten Glycin-22, Lysin-28, Tyrosin-34 und -98 sein, die alle in der Nähe des MgADP-Komplexes lokalisiert sind (Karthikeyan *et al.* 2003).

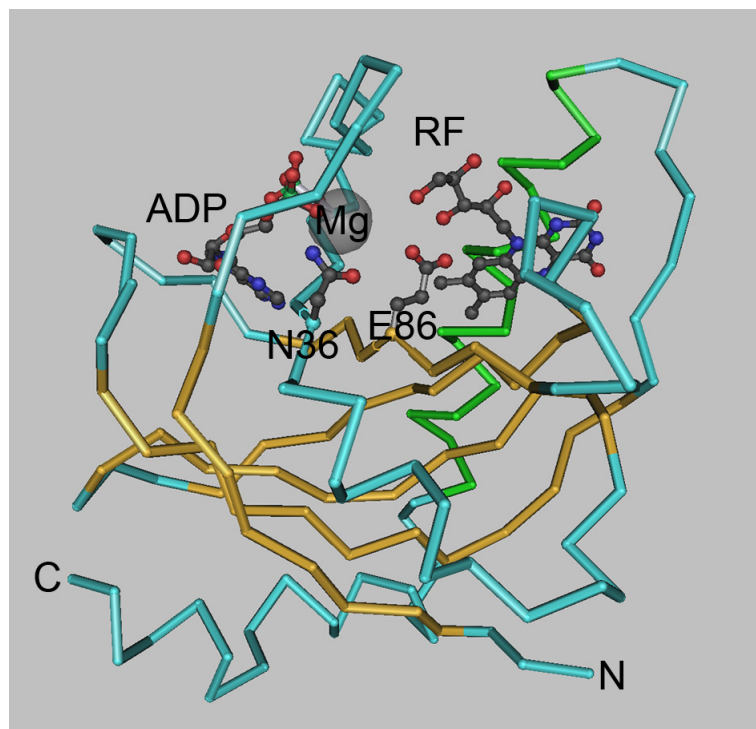


Abb. 18) Die Kristallstruktur der RFK. Der Komplex aus RFK, Mg^{2+} , ADP und Riboflavin (RF) (1NB9) nach Karthikeyan *et al.*. Das Polypeptid ist zur besseren Übersicht im Röhrenmodell und die annotierten Reste als *ball and sticks* dargestellt. Die sechs β -Faltblätter sind hellbraun und die α -Helix B grün eingefärbt. Es kann angenommen werden, dass Glutamat-86 als katalytische Base an der Phosphorylierung der 5'-Hydroxygruppe der Ribitylseitenkette von Riboflavin durch deren Deprotonierung beteiligt ist. Die Darstellung wurde mit dem Programm Cn3D angefertigt.

Glutaminsäure liegt bei physiologischem pH als Glutamat vor und fungiert bei einigen Enzymen als katalytische Base (Hofstein *et al.* 1999; Tuganova *et al.* 2001). Tatsächlich generierte die Mutation von Glutaminsäure-86 nach Glutamin (E86Q) eine *loss of function* Mutante. Die Daten identifizieren somit E86 als essentiellen katalytischen Aminosäurerest der RFK. Es ist möglich, dass RFK^{E86Q} eine dominant-negative Mutante darstellt, da die Substratbindestellen unverändert sind. Diese These muss jedoch experimentell überprüft werden. Der Mechanismus der Reaktion wird wie folgt vermutet: Über die Interaktion der Sauerstoffatome des γ -Phosphatrestes des ATP-Moleküls mit dem Mg^{2+} -Ion oder einem benachbarten Aminosäurerest könnte ein Übergangszustand des ATP in Form eines „Phosphateniumions“ (in Anlehnung an Carbeniumion) entstehen. Auf der anderen Seite würde Glutaminsäure-86 den primären Alkohol der Ribitylseitenkette des Riboflavins am 5'-Kohlenstoff deprotonieren. Dadurch würde ein nukleophiler Angriff der 5'-Hydroxygruppe auf das γ -Phosphat des ATP ermöglicht, wodurch die Hydrolyse des ATP und die Phosphorylierung des Riboflavins erfolgen könnte. Somit entspricht der Reaktionsmechanismus einer reversiblen, säurekatalysierten Veresterung. Zusätzliche Mutagenesestudien könnten eine Beteiligung anderer Aminosäurereste an der Katalyse definieren.

4.3 Die essentielle Rolle der RFK für die Embryogenese

Es ist bislang wenig über die Funktion der RFK bekannt und ihre spezielle Rolle in TNF vermittelten Signalkaskaden wird erstmalig in der vorliegenden Studie behandelt. Die murine und die humane RFK weisen eine hohe Homologie auf (93% auf Aminosäureebene). Northern Blot Analysen konnten außerdem zeigen, dass auch das organspezifische Expressionsmuster in beiden Organismen vergleichbar ist. Daher sollte der aus einer Geninaktivierung resultierende Phänotyp *in vivo*, d.h. im Mausmodell auch Rückschlüsse auf die Funktion der humanen RFK zulassen. Die hier angewandte Technik basiert auf einer modifizierten *flox-and-delete* Methode, bei der zwei loxP-Erkennungssequenzen mittels homologer Rekombination in den genomischen RFK Locus integriert wurden. Diese Methode erlaubt eine konditionale Deletion der RFK. Im *Targeting* Vektor befand sich die 5'-loxP-Erkennungssequenz

zusammen mit den FRT-Erkennungssequenzen, die die Neomycinkassette flankieren innerhalb der Selektionskassette. Die Frequenz der homolog rekombinanten ES-Zellklone betrug 3,1% (24 von 770). Die 3'-loxP-Erkennungssequenz wurde als nicht selektierbare Mutation ins ES-Zellgenom integriert, sodass die Kointegrationsrate 16,7% (4 von 24 homologen Rekombinanten) betrug. HTN-Cre Transduktion der homolog rekombinanten Klone führte zur effizienten Deletion des loxP flankierten Segmentes *in vitro*. Darüber hinaus war das mutierte Allel keimbahngängig, was ein Indiz für die hohe Qualität der verwendeten ES-Zellen (Bruce4) zu diesem Zeitpunkt (Jahr 2005) ist. Nach der Deletion der Neomycinkassette aus dem geflochtenen Allel (RFK^{fl}) über die Kreuzung mit einem Flp-Deleter-Stamm wurde die Initiallinie für Mutagenesestudien erfolgreich etabliert. Das so veränderte Allel konnte zu Homozygotie gekreuzt werden. Hererozygote Knockout-Mäuse (RFK^{wt/Δ}) entstanden nach Kreuzung homozygot gefloxter Mäuse (RFK^{fl/fl}) mit einem Cre-Deleter-Stamm. Der Versuch der Etablierung homozygoter Knockout-Mäuse (RFK^{Δ/Δ}) über die Inzuchtverpaarung hererozygoter Knockout-Mäuse scheiterte allerdings, wie die Genotypisierung von 219 Nachkommen dieser Verpaarungen verdeutlichte. Dabei sollte der Genotyp der Nachkommen (F2-Generation) – der Mendelschen Spaltungsregel folgend – im Verhältnis von 1 : 2 : 1 (RFK^{wt/wt} : RFK^{wt/Δ} : RFK^{Δ/Δ}) verteilt sein. Die tatsächliche Verteilung betrug allerdings 1 : 1,32 : 0 (RFK^{wt/wt} : RFK^{wt/Δ} : RFK^{Δ/Δ}), was vermuten lässt, dass während der Embryogenese beide Allele der RFK aktiv sein müssen. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass die Keimzellen beider Geschlechter funktionell sind, wie Rückkreuzungen hererozygoter Knockout-Mäuse mit wt-Mäusen verdeutlichten. Somit ist klar, dass die Inaktivierung der RFK zu Embryoletalität führt. Die Letalität tritt zu einem frühen Zeitpunkt der Schwangerschaft, d.h. bis zu 7,5 d.p.c auf, wie die Genotypisierung der Embryonen verdeutlichte.

Es wurde gezeigt, dass die genetische Deletion von TNF-RI in Mäuse nicht letal ist (Pfeffer *et al.* 1993). Deshalb darf angenommen werden, dass die Rolle der RFK für die Embryogenese nicht auf die TNF induzierten Signalkaskaden zurückzuführen ist. Die hier präsentierten Daten zeigen, dass RFK in vielen Organen hoch exprimiert ist. Dabei handelt es sich um metabolisch aktive Organe wie Herz, Niere, Leber und Gehirn (Macbeth and Bekesi 1962; Akhmedov 1972). Die Flavine dienen als

Kofaktoren für die Speicherung oder den Transfer von Elektronen bei den von ihnen katalysierten Redoxreaktionen (Massey 2000). Es wurde gezeigt, dass der Energiehaushalt der Säugetierföten hauptsächlich durch mütterliche Glucose gedeckt wird (Oey *et al.* 2006) und schon in frühen Phasen von oxidativer Phosphorylierung abhängt (Thompson *et al.* 1996). Der Glucose-Metabolismus und die oxidative Phosphorylierung benötigen Enzyme, die auf Flavine als Kofaktoren angewiesen sind (Depeint *et al.* 2006). Es wurde außerdem im Tiermodell gezeigt, dass akute Riboflavindefizienz während der Schwangerschaft zu einer verringerten Anzahl an Nachkommen und Geburtsfehlern führt (Nelson *et al.* 1956). Die vorliegende Arbeit verdeutlicht jedoch erstmalig die essentielle Rolle der RFK in der Embryogenese. Es wurde berichtet, dass die zelluläre Aufnahme von Riboflavin überwiegend rezeptorvermittelt verläuft (Said *et al.* 1998; Huang and Swaan 2001; Said *et al.* 2005), obwohl bei hohen, physiologisch allerdings eher irrelevanten Konzentrationen auch eine passive Aufnahme durch Diffusion möglich scheint. Der noch unbekannte Rezeptor für Riboflavin – das Substrat der RFK – scheint auch eine signifikante Affinität zu den anderen Flavinen FMN und FAD zu haben (Huang and Swaan 2001). Es wurde aber gezeigt, dass Riboflavin und nicht FMN oder FAD durch die Plazenta zum Fötus transferiert wird (Lust *et al.* 1954; Dancis *et al.* 1985), was die Notwendigkeit der RFK im restlichen embryonalen Gewebe für dessen Metabolisierung zu FMN voraussetzt. In diesem Fall würde das Fehlen der RFK zum Verlust der Fähigkeit zur Metabolisierung des essentiellen Vitamins führen, was zweifelsohne mit dem Tod des Fötus einhergehen würde. Diese These schließt eine mögliche Rolle der RFK in der Präimplantationsphase des Embryos nicht aus. Weitere Untersuchungen zur Bestimmung des genauen Zeitpunktes der Letalität sollten diesbezüglich mehr Aufschluss geben.

4.4 TNF induzierter Zelltod und reaktive Sauerstoffspezies

Es wurden zwei Strategien zur Analyse der Funktion der RFK verfolgt. Parallel zu Untersuchungen im Mausmodell wurde die Funktion der RFK in der humanen Zelllinie HeLa, deren cDNA für die Suche nach Interaktionspartnern von TNF-RI

diente untersucht. Zu diesem Zweck wurde das Gen für die humane RFK mittels lentiviraler RNA-Interferenz (RNAi) herunterreguliert. Das hierbei verwendete System beruhte auf dem pSUPER-Vektor, der durch Modifikationen mit dem lentiviralen GATEWAY®-System kompatibel gemacht wurde. Stabile RNAi erwies sich in unserem System als äußerst effizient und die gegenüber transienten Transfektionen geringere Vektoranzahl pro Zelle dürfte die Möglichkeit von unerwünschten Nebeneffekten reduzieren.

Die durch lentivirale shRNA-Expression erhaltenen HeLa^{shRFK} Zellen waren vital und zytomorphologisch unauffällig, was auf verschiedene Funktionen der RFK *in vitro* im Zellkulturmodell und *in vivo* während der Embryogenese hindeutet.

Zu den prominenten TNF induzierten Signalkaskaden gehören neben der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, die Induktion der zellulären Todesmaschinerie und die Produktion von ROS (Chen and Goeddel 2002; Aggarwal 2003). Der Vergleich der TNF induzierten NF- κ B Aktivierung in HeLa^{shRFK}, HeLa^{shKon} und unmodifizierten HeLa Zellen zeigte keinen Unterschied, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der kanonische Signalweg der NF- κ B Aktivierung nicht von der Expression der RFK abhängt.

In HeLa Zellen und vielen anderen Modellsystemen führt nur die Kombination von TNF und metabolischen Inhibitoren wie dem Proteinbiosyntheseinhibitor CHX zur Initiation des apoptotischen Programms, was sich mit den hier präsentierten Daten deckt. Es wird angenommen, dass CHX die *de novo* Synthese der durch TNF heraufregulierten antiapoptotischen Gene inhibiert und somit das Gleichgewicht in Richtung Zelltod verschiebt. In der vorliegenden Studie wurde der TNF induzierte Zelltod in HeLa Zellen in Abhängigkeit der RFK Expression untersucht. TNF induzierte Apoptose war in HeLa^{shRFK} Zellen gegenüber HeLa oder HeLa^{shKon} stark reduziert. Im Gegensatz dazu war die Induktion der Apoptose durch STS in den drei Zelllinien vergleichbar und verdeutlichte, dass RFK spezifisch für den TNF induzierten Signalweg benötigt wird.

Die Aktivierung der mitochondrialen Apoptosemaschinerie ist ein Markenzeichen Todesrezeptorvermittelter Apoptose und manifestiert sich durch die Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Zytochrom C aus den Mitochondrien. Auch die TNF

induzierte Freisetzung von Zytochrom C war in HeLa^{shRFK} Zellen stark reduziert und interessanterweise in Kontrollzellen nicht durch die Zugabe von z-VAD inhibierbar. Letzteres ist ein Hinweis darauf, dass die Freisetzung von Zytochrom C in den hier analysierten Zelllinien unabhängig von Caspasen vonstatten geht.

Es wurde gezeigt, dass TNF in HeLa Zellen und anderen die Produktion von ROS und Apoptose induzieren kann (Kim *et al.* 2004; Jin *et al.* 2008). Die TNF induzierte ROS Produktion wurde aber auch in anderen Zellsystemen beobachtet (Klebanoff *et al.* 1986; Deshpande *et al.* 2000; Kamata *et al.* 2005; Shen and Pervaiz 2006; Kim *et al.* 2007; Yang and Rizzo 2007). Auch konnte gezeigt werden, dass die Phox (*Phagocyte oxidase* = NOX2) der Makrophagen (McPhillips *et al.* 2007; Park *et al.* 2008) und Neutrophile (Klebanoff *et al.* 1986; Nathan 1989; Ottonello *et al.* 1998; Saeki *et al.* 1998) durch TNF Stimulation aktiviert werden kann. Möglicherweise ist hierfür die TNF vermittelte Phosphorylierung der regulatorischen p47(Phox)-Untereinheit (Dewas *et al.* 2003) verantwortlich, da gezeigt wurde, dass die Phosphorylierung der SH-3 Domäne von p47(Phox) ein entscheidender Schritt für die Aktivierung der NOX2 ist (Groemping *et al.* 2003). Die sensibilisierende Wirkung von CHX beim TNF induzierten Zelltod wurde unter anderem auf die Inhibition der Expression antioxidativer Genprodukte wie SOD-2 (Wong and Goedel 1988; Wong *et al.* 1989; Basuroy *et al.* 2006; Jin *et al.* 2008) und FHC (Pham *et al.* 2004) zurückgeführt. Konsequenterweise lässt sich die Zytotoxizität von TNF in vielen Modellsystemen durch chemische Antioxidanzien wie NAC (Cossarizza *et al.* 1995; Brown *et al.* 2001; Zhang and Wang 2006; Li *et al.* 2008) oder Resveratrol (Manna *et al.* 2000) aufheben. Schließlich konnte gezeigt werden, dass TNF induzierter Zelltod unter hypoxischen Bedingungen inhibiert war (Zimmerman *et al.* 1989). Somit können ROS als potente Mediatoren der TNF Zytotoxizität in Betracht gezogen werden. Die durch NADPH Oxidasen (Lambeth 2004) oder Enzyme der Atmungskette (Burdon *et al.* 1993) produzierten Superoxidanionen können durch konstitutive und induzierbare SODs in Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Letzteres kann über die Aktivierung der mitochondrialen Apoptosemaschinerie Zelltod auslösen (Takeyama *et al.* 2002; Djavaheri-Mergny *et al.* 2003; Singh *et al.* 2007). Tatsächlich konnten in HeLa Zelllinien mit NAC die Freisetzung von Zytochrom C und der Zelltod nach TNF Stimulation inhibiert werden. HeLa^{shKon} und HeLa^{shRFK} Zellen zeigten außerdem nach Zugabe von exogenem

Wasserstoffperoxid eine vergleichbare Freisetzung von Zytochrom C und Apoptose, was als ein weiteres Indiz für die Beteiligung von ROS in RFK abhängigem, TNF induziertem Zelltod angesehen werden kann. Weiterhin korrelierte die im Gegensatz zu HeLa oder HeLa^{shKon} verringerte Zytotoxizität von TNF auf HeLa^{shRFK} Zellen mit einer erheblich reduzierten Produktion von ROS in Letzteren, wie Messungen mit dem Sauerstoffradikalsensor DCF ergaben. Außerdem konnte die TNF induzierte DCF Fluoreszenz durch NAC inhibiert werden. Während DCF mit einigen Sauerstoffradikalen reagieren kann, fluoresziert das Amplex[®] Red Reagenz nur in Anwesenheit von H₂O₂ und HRP. TNF induziertes, extrazelluläres H₂O₂ wurde mit Hilfe von Amplex[®] Red in transfizierten HeLa^{shKon} und HeLa^{shRFK} Zellen untersucht. Im Vergleich zu HeLa^{shKon} führte TNF Stimulation kaum zur Bildung von H₂O₂ in HeLa^{shRFK}. Nur die Transfektion mit RFK^{wt}, nicht aber mit RFK^{E86Q} konnte diesen Effekt rekonstituieren. Schliesslich wurden Experimente mit Peritoneal-Makrophagen aus poly-(I:C) induzierbaren Knockout-Mäusen (RFK^{fl(neoΔ)/fl(neoΔ)/MxCre}) durchgeführt. Diese zeigten eine im Vergleich zu RFK^{wt/wt}/MxCre signifikante Reduktion der TNF induzierten Superoxidanionproduktion, was ein Hinweis auf die *in vivo* Beteiligung der RFK an der Produktion von ROS sein könnte.

Die RFK katalysiert den essentiellen ersten Schritt zur Metabolisierung der zellulären Flavine, die als wichtige Coenzyme der Oxidoreduktasen fungieren (Massey 2000). Da die Transfektion mit RFK^{wt} nicht aber mit der kinasedefizienten Mutante RFK^{E86Q} zur Rekonstitution der TNF induzierte Zytotoxizität und ROS Produktion in HeLa^{shRFK} Zellen führte, muss die Riboflavinkinaseaktivität für diesen Prozess unerlässlich sein. Es liegen Daten vor, die eine defekte Assoziation der p22(Phox)-Untereinheit der am TNF-RI in HeLa^{shRFK} Zellen zeigen (Kooperation mit Prof. S. Schütze, Kiel). Inwieweit die Kinaseaktivität der RFK an diesem Prozess beteiligt ist müssen Rekonstitutionsexperimente mit RFK^{wt} und RFK^{E86Q} zeigen. Es wurde berichtet, dass die Bindung von FAD an die gp91(Phox)-Untereinheit der NOX2 während der Assoziation der Untereinheiten stattfindet und für die Produktion von Superoxidanionen unerlässlich ist (Hashida *et al.* 2004). Es wäre möglich, dass die Bindung von FAD die korrekte Zusammensetzung von NOX Untereinheiten unterstützt. In diesem Zusammenhang wäre die Frage nach der Beteiligung der FAD-

Synthetase an diesem neuen TNF-RI Multiproteinkomplex von Interesse.

Eine wichtige Rolle beim TNF induzierten Zelltod wird der Aktivierung von JNK zugeschrieben. Die zugrunde liegenden Mechanismen waren entweder eine direkte Aktivierung der MAP-Kinase ASK1 über die Produktion von ROS (Hsieh and Papaconstantinou 2006) oder die Inhibition der MAPK-Phosphatasen, was folglich zu anhaltender Aktivierung von MAP-Kinasen führte (Kamata *et al.* 2005). Zukünftige Experimente müssen noch zeigen, ob RFK an diesem Prozess beteiligt ist.

4.5 Antivirale Aktivität der RFK

Es wird allgemein angenommen, dass TNF sowohl antibakterielle als auch antivirale Funktion (Rook *et al.* 1991) besitzt, wobei der Mechanismus der antimikrobiellen Funktion von TNF bislang nur unzureichend entschlüsselt ist. Für die Abwehr von Bakterien scheinen die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RNS), deren Produktion über TNF stimuliert werden kann eine zentrale Rolle zu spielen (Miller and Britigan 1997; Leto and Geiszt 2006). ROS und RNS können bakterielle Komponenten direkt angreifen und dadurch unschädlich machen. Sie sind auch mit den antiviralen Effekten von TNF in Verbindung gebracht worden. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass ROS von Neutrophilen bei der Abwehr viraler Infektionen von Bedeutung sind (Jones 1982), wobei sich der Wirkmechanismus von der antibakteriellen Wirkung zu unterscheiden scheint (Lidbury *et al.* 1995; Skulachev 1998).

Die vorliegende Arbeit deutet darauf hin, dass das TNF-RI Adaptormolekül RFK an der antiviralen Abwehr beteiligt ist. Eine derartige Beteiligung von RFK an der Infektivität von SV40 konnte im Rahmen eines genomweiten siRNA Screens gegen alle bekannten und putativen Kinasen nachgewiesen werden (Pelkmans *et al.* 2005). Als indirekten Nachweis der Infektion verwendeten die Autoren die Expression von SV40 LTag. In der vorliegenden Studie konnte auch eindeutig gezeigt werden, dass die Expression von LTag nach SV40 Infektionen in HeLa^{shRFK} Zellen erheblich erhöht ist. Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter viraler Partikel konnte darüber hinaus bewiesen werden, dass durch die Expression der RFK die direkte Endozytose des Virus

inhibiert wird. Diese Daten konnten auch in transienten RNAi Experimenten bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). In HeLa^{shRFK} konnte die Rekonstitution mit RFK^{wt}, nicht aber mit der kinasedefizienten Mutante RFK^{E86Q} die antivirale Funktion wiederherstellen, womit gezeigt wurde, dass die Kinaseaktivität für diesen Effekt verantwortlich ist. Die Analyse des Infektionsweges von SV40 enthüllte die Existenz der induzierbaren Caveolae/Lipid-Raft vermittelten Endozytose (Anderson et al. 1996; Pelkmans et al. 2002), die auch von anderen Viren (Pietiainen et al. 2004; Pietiainen et al. 2005) und auch von einer Reihe pathogener Bakterien (Zaas et al. 2005) verwendet wird. Die antivirale Funktion der RFK wird über die Regulation dieses Endozytoseweges vermittelt. Diese These wird durch die erhöhte Aufnahme von Cholera Toxin B in HeLa^{shRFK} unterstützt, da allgemein angenommen wird, dass die Endozytose dieses Toxins ausschließlich über Caveolae/Lipid-Rafts vermittelt wird (Spooner et al. 2006).

Eine Vielzahl von Viren wie z.B. VSV (Schlegel et al. 1982; Sun et al. 2005) oder das humane Polyoma Virus *John Cunningham virus* (JCV) (Pho et al. 2000) werden im Gegensatz zu SV40 über Clathrin coated pits endozytiert (Marsh and Helenius 2006). Interessanterweise war die Infektionsrate von VSV in HeLa^{shRFK} Zellen gegenüber HeLa^{shKon} Zellen unverändert. Konsequenterweise war auch die Endozytose von Transferrin, einem weiteren Marker für Clathrin vermittelte Endozytose (Bleil and Bretscher 1982; Marsh and Helenius 2006) in HeLa^{shRFK} Zellen unverändert, sodass angenommen werden kann, dass RFK spezifisch die Caveolae/Lipid-Rafts vermittelte Endozytose reguliert. Eine mögliche Beteiligung von TNF und die molekularen Mechanismen dieser neuartigen Regulation müssen allerdings noch eingehend untersucht werden.

Es wurde gezeigt, dass einige Viren in der Zielzelle oxidativen Stress auslösen können (Beck et al. 2000; Jan et al. 2000; Qadri et al. 2004), sodass eine RFK vermittelte Regulation der SV40 Infektion durch die Produktion von ROS nahe liegend ist, jedoch noch experimentell überprüft werden muss. Die Beobachtung dass SOD-1 (Siafakas et al. 2006) und NOX-2 (Vilhardt and van Deurs 2004) in Lipid-Rafts angereichert sind, legt eine mögliche regulatorische Rolle von ROS an Caveolae/Lipid-Rafts vermittelten Endozytose nahe. Eine weitere mögliche Rolle der RFK an diesem Prozess könnte in der Modulation der Membranlipide bestehen, da

die Flavine für den Metabolismus von Lipiden unerlässlich sind. Eine detaillierte Analyse dieser Lipide in Abhängigkeit der RFK Expression wäre diesbezüglich von großem Interesse.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen einer Suche nach neuen Adaptormolekülen von TNF-RI wurde die putative Riboflavinkinase (RFK) in unserem Labor als Interaktionspartner des Rezeptors identifiziert und kloniert. Obwohl die Kristallstruktur des Proteins publiziert und diese als RFK identifiziert wurde (Karthikeyan *et al.* 2003), fehlte bislang der biochemische Beweis für die Riboflavinkinaseaktivität. Basierend hierauf wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl wt-RFK, als auch zwei Punktmutanten – RFK^{N36D} und RFK^{E86Q} – als rekombinante GST-Fusionsproteine aufgereinigt und anschließend hinsichtlich ihrer Kinaseaktivität untersucht. Während RFK^{wt} und RFK^{N36D} eine vergleichbare Riboflavinkinaseaktivität aufwiesen, stellte sich RFK^{E86Q} als *loss of function* Mutante heraus. Die Daten verdeutlichten, dass es sich bei diesem neuen TNF-RI assoziierten Protein tatsächlich um die humane RFK handelt und dass der Aminosäure Glutamat-86 eine essentielle Rolle – vermutlich als katalytische Base – zugeschrieben werden kann. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität der RFK durch TNF Stimulation erhöht werden kann.

Um die zelluläre Funktion der RFK untersuchen zu können, wurde zunächst eine Mauslinie mit konditional deletierbarem RFK-Allel konstruiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung der RFK zu einem frühen Zeitpunkt der Embryogenese zu embryonaler Letalität führt, was die essentielle Rolle der RFK für die Entwicklung des Organismus verdeutlicht. Parallel wurde mit Hilfe lentiviraler RNAi in HeLa Zellen gezeigt, dass 1) die RFK für TNF induzierte Apoptose, nicht aber für NF- κ B Aktivierung in HeLa Zellen benötigt wird, 2) dass die RFK für die Produktion von ROS nach TNF Stimulation in HeLa Zellen und murinen Makrophagen essentiell ist und 3) dass die RFK als ein neuer Regulator der Caveolae/Lipid-Rafts vermittelten Endozytose an der antiviralen Abwehr der Zelle beteiligt ist. Die Kinaseaktivität der RFK scheint für all diese Effekte von Bedeutung zu sein, da nur die Transfektion von HeLa^{shRFK} Zellen mit RFK^{wt}, nicht aber mit der kinasedefizienten Mutante RFK^{E86Q} zu Rekonstitution dieser Signalkaskaden führte. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die RFK neben normalen zellulären

Aufgaben auch an TNF induzierten Signalkaskaden in Form von Regulation der ROS Produktion sowie Apoptose beteiligt ist.

6 Summary

Previous studies in our lab identified the putative riboflavin kinase (RFK) as a TNF-RI associated factor. Until recently, little is known about the biochemical and cellular function of this protein, although the published crystal structure (Karthikeyan *et al.* 2003) led to the assumption, that it is the riboflavin kinase. For the purpose of understanding the nature of this novel TNF-RI adaptor molecule, we have first purified recombinant RFK^{wt} and two point mutants RFK^{N36D} and RFK^{E86Q} and subjected them to riboflavin kinase assays. We found, that RFK^{E86Q} turned out to be a loss of function mutant, while RFK^{N36D} and RFK^{wt} possessed comparable enzymatic activities. Based on our findings we pinpoint glutamate-86 as the catalytic base involved in the phosphorylation of riboflavin to FMN. Furthermore, we could show an increased activity of RFK upon stimulation by TNF *in vitro*.

To further identify the role of RFK, we decided to generate a conditional targeting allele of the murine RFK. Inactivation of the gene led to embryonal lethality and underlined its essential function during the development of the organism. In parallel, we generated cell-lines by means of lentiviral RNAi and could show that i) RFK is indispensable for TNF induced apoptosis but not NF-κB activation in HeLa cells, ii) RFK is essential for TNF induced ROS production in HeLa cells and murine macrophages and iii) RFK exerts antiviral activities as a novel regulator of caveolae/lipid-rafts mediated endocytic pathway. We could reverse these effects by transfecting RFK^{wt} but not the kinase-deficient RFK^{E86Q}, suggesting that the kinase activity is important for the ascribed functions. Taken together, our data reveal, that RFK is not only involved in the normal homeostasis of the organism, but also in cellular innate immunity and in TNF mediated signalling via the regulation of ROS production and apoptosis.

7 Referenzen

- Abdullah, Z., *et al.* (2007). "Serpin-6 expression protects embryonic stem cells from lysis by antigen-specific CTL." J Immunol **178**(6): 3390-9.
- Adam-Klages, S., *et al.* (1996). "FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase." Cell **86**(6): 937-47.
- Adam, D., *et al.* (1995). "Identification of p55 tumor necrosis factor receptor-associated proteins that couple to signaling pathways not initiated by the death domain." J Inflamm **47**(1-2): 61-6.
- Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-56.
- Akhmedov, R. (1972). "[Tissue respiration changes in different organs under exposure to high environmental temperature]." Biull Eksp Biol Med **13**(2): 50-1.
- Akiyama, T. E., *et al.* (2002). "Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux." Mol Cell Biol **22**(8): 2607-19.
- Anderson, H. A., *et al.* (1996). "Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae." Mol Biol Cell **7**(11): 1825-34.
- Aw, T. Y., *et al.* (1983). "Uptake of riboflavin by isolated rat liver cells." J Nutr **113**(6): 1249-54.
- Basuroy, S., *et al.* (2006). "HO-2 provides endogenous protection against oxidative stress and apoptosis caused by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **291**(5): C897-908.
- Bauer, S., *et al.* (2003). "Crystal structure of *Schizosaccharomyces pombe* riboflavin kinase reveals a novel ATP and riboflavin-binding fold." J Mol Biol **326**(5): 1463-73.
- Beck, M. A., *et al.* (2000). "The role of oxidative stress in viral infections." Ann N Y Acad Sci **917**: 906-12.
- Beg, A. A. and D. Baltimore (1996). "An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death." Science **274**(5288): 782-4.
- Bernard, D., *et al.* (2002). "The c-Rel transcription factor can both induce and inhibit apoptosis in the same cells via the upregulation of MnSOD." Oncogene

21(28): 4392-402.

- Bernard, D., *et al.* (2001). "Antiproliferative and antiapoptotic effects of crel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase." Cancer Res **61(6)**: 2656-64.
- Bleil, J. D. and M. S. Bretscher (1982). "Transferrin receptor and its recycling in HeLa cells." Embo J **1(3)**: 351-5.
- Blonska, M., *et al.* (2005). "TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-kappaB activation." J Biol Chem **280(52)**: 43056-63.
- Brijlal, S. and A. V. Lakshmi (1999). "Tissue distribution and turnover of [3H]riboflavin during respiratory infection in mice." Metabolism **48(12)**: 1608-11.
- Brijlal, S., *et al.* (1996). "Flavin metabolism during respiratory infection in mice." Br J Nutr **76(3)**: 453-62.
- Brown, L. A., *et al.* (2001). "Chronic ethanol ingestion potentiates TNF-alpha-mediated oxidative stress and apoptosis in rat type II cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281(2)**: L377-86.
- Brummelkamp, T. R., *et al.* (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." Science **296(5567)**: 550-3.
- Burdon, R. H., *et al.* (1993). "Reduction of a tetrazolium salt and superoxide generation in human tumor cells (HeLa)." Free Radic Res Commun **18(6)**: 369-80.
- Carmeliet, P., *et al.* (1998). "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis." Nature **394(6692)**: 485-90.
- Carswell, E. A., *et al.* (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72(9)**: 3666-70.
- Cassatella, M. A., *et al.* (1989). "Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically induce cytochrome b-245 heavy-chain gene expression and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate hydrogenase oxidase in human leukemic myeloid cells." J Clin Invest **83(5)**: 1570-9.
- Castellino, A. M., *et al.* (1997). "A novel interaction between the juxtamembrane region of the p55 tumor necrosis factor receptor and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase." J Biol Chem **272(9)**: 5861-70.
- Chen, G. and D. V. Goeddel (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." Science **296(5573)**: 1634-5.
- Cheng, G., *et al.* (2006). "Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1." J Biol Chem **281(26)**: 17718-26.

- Chomczynski, P. (1992). "One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA." Anal Biochem **201**(1): 134-9.
- Clarebout, G., *et al.* (2001). "Macrolide resistance gene *mreA* of *Streptococcus agalactiae* encodes a flavokinase." Antimicrob Agents Chemother **45**(8): 2280-6.
- Cohen, G. M., *et al.* (1994). "Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes." J Immunol **153**(2): 507-16.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-56.
- Cossarizza, A., *et al.* (1995). "Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria." Exp Cell Res **220**(1): 232-40.
- Dancis, J., *et al.* (1985). "Transfer of riboflavin by the perfused human placenta." Pediatr Res **19**(11): 1143-6.
- Decker, L. E. and R. U. Byerrum (1954). "The relationship between dietary riboflavin concentration and the tissue concentration of riboflavin-containing coenzymes and enzymes." J Nutr **53**(2): 303-15.
- Delhase, M., *et al.* (1999). "Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK β subunit phosphorylation." Science **284**(5412): 309-13.
- Deng, Y., *et al.* (2003). "A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis." Cell **115**(1): 61-70.
- Deng, Y. and X. Wu (2000). "Peg3/Pw1 promotes p53-mediated apoptosis by inducing Bax translocation from cytosol to mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 12050-5.
- Depeint, F., *et al.* (2006). "Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism." Chem Biol Interact **163**(1-2): 94-112.
- Deshpande, S. S., *et al.* (2000). "Rac1 inhibits TNF- α -induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species." Faseb J **14**(12): 1705-14.
- Devin, A., *et al.* (2000). "The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation." Immunity **12**(4): 419-29.
- Dewas, C., *et al.* (2003). "TNF- α induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." J Immunol **171**(8): 4392-8.

- Djavaheri-Mergny, M., *et al.* (2003). "2-Methoxyestradiol induces apoptosis in Ewing sarcoma cells through mitochondrial hydrogen peroxide production." Oncogene **22**(17): 2558-67.
- Du, C., *et al.* (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
- Enari, M., *et al.* (1995). "Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis." Nature **375**(6526): 78-81.
- Enari, M., *et al.* (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." Nature **391**(6662): 43-50.
- Estoppey, S., *et al.* (1997). "Bcl-2 prevents activation of CPP32 cysteine protease and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase and U1-70 kD proteins in staurosporine-mediated apoptosis." Cell Death Differ **4**(1): 34-8.
- Fiers, W., *et al.* (1999). "More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage." Oncogene **18**(54): 7719-30.
- Filipowicz, W. (2005). "RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine." Cell **122**(1): 17-20.
- Friedlander, R. M. (2003). "Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases." N Engl J Med **348**(14): 1365-75.
- Fulda, S. and K. M. Debatin (2006). "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy." Oncogene **25**(34): 4798-811.
- Gastaldi, G., *et al.* (2000). "Riboflavin phosphorylation is the crucial event in riboflavin transport by isolated rat enterocytes." J Nutr **130**(10): 2556-61.
- Gautam, D. K., *et al.* (2006). "H₂O₂ at physiological concentrations modulates Leydig cell function inducing oxidative stress and apoptosis." Apoptosis **11**(1): 39-46.
- Gearing, A. J., *et al.* (1994). "Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases." Nature **370**(6490): 555-7.
- Geller, D. A., *et al.* (1993). "Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 522-6.
- Groemping, Y., *et al.* (2003). "Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase." Cell **113**(3): 343-55.
- Grooten, J., *et al.* (1993). "Cell membrane permeabilization and cellular collapse, followed by loss of dehydrogenase activity: early events in tumour necrosis factor-induced cytotoxicity." Cytokine **5**(6): 546-55.
- Harper, N., *et al.* (2003). "Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex

- during tumor necrosis factor-induced apoptosis." J Biol Chem **278**(28): 25534-41.
- Hashida, S., *et al.* (2004). "Binding of FAD to cytochrome b558 is facilitated during activation of the phagocyte NADPH oxidase, leading to superoxide production." J Biol Chem **279**(25): 26378-86.
- Haubert, D., *et al.* (2007). "PtdIns(4,5)P-restricted plasma membrane localization of FAN is involved in TNF-induced actin reorganization." Embo J **26**(14): 3308-21.
- Heinrich, M., *et al.* (2004). "Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation." Cell Death Differ **11**(5): 550-63.
- Hennet, T., *et al.* (1993). "Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells." Biochem J **289** (Pt 2): 587-92.
- Higuchi, M., *et al.* (1998). "Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis." Oncogene **17**(19): 2515-24.
- Hofstein, H. A., *et al.* (1999). "Role of glutamate 144 and glutamate 164 in the catalytic mechanism of enoyl-CoA hydratase." Biochemistry **38**(29): 9508-16.
- Hogan, B., *et al.* (1987). "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual
" Cold Spring Harbor Laboratory Press(2).
- Hsieh, C. C. and J. Papaconstantinou (2006). "Thioredoxin-ASK1 complex levels regulate ROS-mediated p38 MAPK pathway activity in livers of aged and long-lived Snell dwarf mice." Faseb J **20**(2): 259-68.
- Hsu, H., *et al.* (1996). "TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex." Immunity **4**(4): 387-96.
- Hsu, H., *et al.* (1996). "TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways." Cell **84**(2): 299-308.
- Huang, S. N. and P. W. Swaan (2001). "Riboflavin uptake in human trophoblast-derived BeWo cell monolayers: cellular translocation and regulatory mechanisms." J Pharmacol Exp Ther **298**(1): 264-71.
- Ichijo, H., *et al.* (1997). "Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways." Science **275**(5296): 90-4.
- Jacobson, M. D., *et al.* (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-54.
- Jan, J. T., *et al.* (2000). "Potential dengue virus-triggered apoptotic pathway in human neuroblastoma cells: arachidonic acid, superoxide anion, and NF-kappaB are sequentially involved." J Viro **74**(18): 8680-91.

- Jiang, Y., *et al.* (1999). "Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains." Science **283**(5401): 543-6.
- Jin, S., *et al.* (2008). "TNF- α /cycloheximide-induced apoptosis in intestinal epithelial cells requires Rac1-regulated reactive oxygen species." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **294**(4): G928-37.
- Jin, S., *et al.* (2008). "TNF- α /cycloheximide-induced apoptosis in intestinal epithelial cells requires Rac1-regulated reactive oxygen species." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.
- Jones, J. F. (1982). "Interactions between human neutrophils and vaccinia virus: induction of oxidative metabolism and virus inactivation." Pediatr Res **16**(7): 525-9.
- Jurgensmeier, J. M., *et al.* (1998). "Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 4997-5002.
- Kamata, H., *et al.* (2005). "Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases." Cell **120**(5): 649-61.
- Karhikeyan, S., *et al.* (2003). "Crystal structure of human riboflavin kinase reveals a beta barrel fold and a novel active site arch." Structure **11**(3): 265-73.
- Karhikeyan, S., *et al.* (2003). "Ligand binding-induced conformational changes in riboflavin kinase: structural basis for the ordered mechanism." Biochemistry **42**(43): 12532-8.
- Kashkar, H., *et al.* (2007). "NF-kappaB-independent down-regulation of XIAP by bortezomib sensitizes HL B cells against cytotoxic drugs." Blood **109**(9): 3982-8.
- Kashkar, H., *et al.* (2006). "XIAP targeting sensitizes Hodgkin lymphoma cells for cytolytic T-cell attack." Blood **108**(10): 3434-40.
- Keller, A., *et al.* (2004). "Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species." Free Radic Res **38**(12): 1257-67.
- Kerr, J. F., *et al.* (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Kim, J. R., *et al.* (2004). "Oxidation of thioredoxin reductase in HeLa cells stimulated with tumor necrosis factor- α ." FEBS Lett **567**(2-3): 189-96.
- Kim, Y. S., *et al.* (2007). "TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death." Mol Cell **26**(5): 675-87.
- Kinnula, V. L., *et al.* (1998). "Similarities between TNF and exogenous oxidants on the cytotoxic response of c-Myc-expressing fibroblasts in vitro." Cancer Lett **125**(1-2): 191-8.

- Klebanoff, S. J., *et al.* (1986). "Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor." J Immunol **136**(11): 4220-5.
- Koopman, G., *et al.* (1994). "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis." Blood **84**(5): 1415-20.
- Koziol, J. and E. Knobloch (1965). "The solvent effect on the fluorescence and light absorption of riboflavin and lumiflavin." Biochim Biophys Acta **102**(1): 289-300.
- Krut, O., *et al.* (2006). "Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein." J Biol Chem **281**(19): 13784-93.
- Kucharczak, J., *et al.* (2003). "To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis." Oncogene **22**(56): 8961-82.
- Kuhn, R., *et al.* (1995). "Inducible gene targeting in mice." Science **269**(5229): 1427-9.
- Kuida, K., *et al.* (1996). "Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice." Nature **384**(6607): 368-72.
- Lambeth, J. D. (2004). "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen." Nat Rev Immunol **4**(3): 181-9.
- Landy, A. (1993). "Mechanistic and structural complexity in the site-specific recombination pathways of Int and FLP." Curr Opin Genet Dev **3**(5): 699-707.
- Lee, S. S. and D. B. McCormick (1985). "Thyroid hormone regulation of flavocoenzyme biosynthesis." Arch Biochem Biophys **237**(1): 197-201.
- Leto, T. L. and M. Geiszt (2006). "Role of Nox family NADPH oxidases in host defense." Antioxid Redox Signal **8**(9-10): 1549-61.
- Leung, T. H., *et al.* (2004). "One nucleotide in a kappaB site can determine cofactor specificity for NF-kappaB dimers." Cell **118**(4): 453-64.
- Li, L. Y., *et al.* (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." Nature **412**(6842): 95-9.
- Li, P., *et al.* (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-89.
- Li, X., *et al.* (2008). "SENP1 mediates TNF-induced desumoylation and cytoplasmic translocation of HIPK1 to enhance ASK1-dependent apoptosis." Cell Death Differ.
- Lidbury, B. A., *et al.* (1995). "The antiviral activity of tumour necrosis factor on herpes simplex virus type 1: role for a butylated hydroxyanisole sensitive factor." Arch Virol **140**(4): 703-19.

- Lowe, S. W., *et al.* (1993). "p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes." Nature **362**(6423): 847-9.
- Lucius, R., *et al.* (1998). "Riboflavin-mediated axonal degeneration of postnatal retinal ganglion cells in vitro is related to the formation of free radicals." Free Radic Biol Med **24**(5): 798-808.
- Lust, J. E., *et al.* (1954). "The transport of riboflavin by human placenta." J Clin Invest **33**(1): 38-40.
- Macbeth, R. A. and J. G. Bekesi (1962). "Oxygen consumption and anaerobic glycolysis of human malignant and normal tissue." Cancer Res **22**: 244-8.
- Malagarie-Cazenave, S., *et al.* (2002). "Sphingolipid signalling: molecular basis and role in TNF-alpha-induced cell death." Expert Rev Mol Med **4**(28): 1-15.
- Manna, S. K., *et al.* (2000). "Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation." J Immunol **164**(12): 6509-19.
- Marsh, M. and A. Helenius (2006). "Virus entry: open sesame." Cell **124**(4): 729-40.
- Martin, S. J., *et al.* (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." J Exp Med **182**(5): 1545-56.
- Massey, V. (2000). "The chemical and biological versatility of riboflavin." Biochem Soc Trans **28**(4): 283-96.
- McPhillips, K., *et al.* (2007). "TNF-alpha inhibits macrophage clearance of apoptotic cells via cytosolic phospholipase A2 and oxidant-dependent mechanisms." J Immunol **178**(12): 8117-26.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." Cell **114**(2): 181-90.
- Miller, R. A. and B. E. Britigan (1997). "Role of oxidants in microbial pathophysiology." Clin Microbiol Rev **10**(1): 1-18.
- Miura, M., *et al.* (1995). "Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8318-22.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloon (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-50.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell **88**(3): 355-65.
- Naruse, I. and H. Keino (1995). "Apoptosis in the developing CNS." Prog Neurobiol **47**(2): 135-55.

- Nathan, C. F. (1989). "Respiratory burst in adherent human neutrophils: triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G." Blood **73**(1): 301-6.
- Natoli, G., *et al.* (1997). "Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway." Science **275**(5297): 200-3.
- Nelson, M. M., *et al.* (1956). "Multiple congenital abnormalities in the rat resulting from riboflavin deficiency induced by the antimetabolite galactoflavin." J Nutr **58**(1): 125-34.
- Nho, C. W. and P. J. O'Dwyer (2004). "NF-kappaB activation by the chemopreventive dithiolethione oltipraz is exerted through stimulation of MEKK3 signaling." J Biol Chem **279**(25): 26019-27.
- Novina, C. D. and P. A. Sharp (2004). "The RNAi revolution." Nature **430**(6996): 161-4.
- Oey, N. A., *et al.* (2006). "Fatty acid oxidation in the human fetus: implications for fetal and adult disease." J Inherit Metab Dis **29**(1): 71-5.
- Ogura, R., *et al.* (1982). "Anti-oxidative effects of vitamin B2-butyrate on the cardiac mitochondrial disorders induced by adriamycin." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) **28**(4): 329-34.
- Ottonello, L., *et al.* (1998). "Activation of neutrophil respiratory burst by cytokines and chemoattractants. Regulatory role of extracellular matrix glycoproteins." Inflamm Res **47**(8): 345-50.
- Page, S., *et al.* (1998). "Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines." Biochim Biophys Acta **1381**(2): 191-202.
- Pantano, C., *et al.* (2007). "Nonphagocytic oxidase 1 causes death in lung epithelial cells via a TNF-RI-JNK signaling axis." Am J Respir Cell Mol Biol **36**(4): 473-9.
- Papa, S., *et al.* (2005). "NF-kappaB meets ROS: an 'iron-ic' encounter." Cell Death Differ **12**(10): 1259-62.
- Park, S. Y., *et al.* (2008). "Inhibitory effect of simvastatin on the TNF-alpha- and angiotensin II-induced monocyte adhesion to endothelial cells is mediated through the suppression of geranylgeranyl isoprenoid-dependent ROS generation." Arch Pharm Res **31**(2): 195-204.
- Park, Y. M., *et al.* (1992). "Hypoxia and resistance to hydrogen peroxide confer resistance to tumor necrosis factor in murine L929 cells." Radiat Res **131**(2): 162-8.
- Peitz, M., *et al.* (2002). "Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4489-94.

- Pelkmans, L., *et al.* (2005). "Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis." Nature **436**(7047): 78-86.
- Pelkmans, L., *et al.* (2001). "Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER." Nat Cell Biol **3**(5): 473-83.
- Pelkmans, L., *et al.* (2002). "Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae." Science **296**(5567): 535-9.
- Pennica, D., *et al.* (1985). "Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(18): 6060-4.
- Pfeffer, K., *et al.* (1993). "Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection." Cell **73**(3): 457-67.
- Pham, C. G., *et al.* (2004). "Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species." Cell **119**(4): 529-42.
- Pho, M. T., *et al.* (2000). "JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis." J Virol **74**(5): 2288-92.
- Pietiainen, V., *et al.* (2004). "Echovirus 1 endocytosis into caveosomes requires lipid rafts, dynamin II, and signaling events." Mol Biol Cell **15**(11): 4911-25.
- Pietiainen, V. M., *et al.* (2005). "Viral entry, lipid rafts and caveosomes." Ann Med **37**(6): 394-403.
- Qadri, I., *et al.* (2004). "Induced oxidative stress and activated expression of manganese superoxide dismutase during hepatitis C virus replication: role of JNK, p38 MAPK and AP-1." Biochem J **378**(Pt 3): 919-28.
- Ricci, J. E., *et al.* (2004). "Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain." Cell **117**(6): 773-86.
- Rivlin, R. S. (1970). "Riboflavin metabolism." N Engl J Med **283**(9): 463-72.
- Rodriguez, C. I., *et al.* (2000). "High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP." Nat Genet **25**(2): 139-40.
- Rook, G. A., *et al.* (1991). "Evaluation of TNF as antiviral, antibacterial and antiparasitic agent." Biotherapy **3**(2): 167-75.
- Saeki, K., *et al.* (1998). "Cooperative stimulatory effects of tumor necrosis factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the particular respiratory burst activity in human neutrophils: synergistic priming effect on concanavalin A-induced response, no interactive priming effect on the chemotactic peptide-induced response and additive triggering effect." Int J Hematol **68**(3): 269-78.

- Said, H. M., *et al.* (1998). "Riboflavin uptake by the human-derived liver cells Hep G2: mechanism and regulation." J Cell Physiol **176**(3): 588-94.
- Said, H. M., *et al.* (2005). "Mechanism of riboflavin uptake by cultured human retinal pigment epithelial ARPE-19 cells: possible regulation by an intracellular Ca²⁺-calmodulin-mediated pathway." J Physiol **566**(Pt 2): 369-77.
- Sakon, S., *et al.* (2003). "NF-kappaB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death." Embo J **22**(15): 3898-909.
- Saltzman, A., *et al.* (1998). "hUBC9 associates with MEKK1 and type I TNF-alpha receptor and stimulates NFkappaB activity." FEBS Lett **425**(3): 431-5.
- Salvesen, G. S. and C. S. Duckett (2002). "IAP proteins: blocking the road to death's door." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 401-10.
- Sambrook, J. and D. Russell (2000). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." (3).
- Sanger, F., *et al.* (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Santos, M. A., *et al.* (2000). "Molecular characterization of FMN1, the structural gene for the monofunctional flavokinase of *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **275**(37): 28618-24.
- Schlegel, R., *et al.* (1982). "Amantadine and dansylcadaverine inhibit vesicular stomatitis virus uptake and receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(7): 2291-5.
- Schweichel, J. U. and H. J. Merker (1973). "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues." Teratology **7**(3): 253-66.
- Seekamp, A., *et al.* (1999). "Protection by vitamin B2 against oxidant-mediated acute lung injury." Inflammation **23**(5): 449-60.
- Shen, H. M. and S. Pervaiz (2006). "TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution." Faseb J **20**(10): 1589-98.
- Siafakas, A. R., *et al.* (2006). "Lipid rafts in *Cryptococcus neoformans* concentrate the virulence determinants phospholipase B1 and Cu/Zn superoxide dismutase." Eukaryot Cell **5**(3): 488-98.
- Sies, H. (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." Exp Physiol **82**(2): 291-5.
- Silver, L. M. (1995). "Mouse genetics: concepts and practice." Oxford University Press.
- Singh, M., *et al.* (2007). "Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway." Mitochondrion **7**(6): 367-73.

- Skulachev, V. P. (1998). "Possible role of reactive oxygen species in antiviral defense." Biochemistry (Mosc) **63**(12): 1438-40.
- Soh, N. (2006). "Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species." Anal Bioanal Chem **386**(3): 532-43.
- Spooner, R. A., *et al.* (2006). "Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins." Virology **3**: 26.
- Sugano, N., *et al.* (1999). "Cyclosporin A inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human fibroblasts." FEBS Lett **447**(2-3): 274-6.
- Sun, X., *et al.* (2005). "Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells." Virology **338**(1): 53-60.
- Takeyama, N., *et al.* (2002). "Role of the mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide-induced apoptosis." Exp Cell Res **274**(1): 16-24.
- Tang, P., *et al.* (1996). "Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer." Biochemistry **35**(25): 8216-25.
- Thompson, J. G., *et al.* (1996). "Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos." J Reprod Fertil **106**(2): 299-306.
- Tobiume, K., *et al.* (2001). "ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis." EMBO Rep **2**(3): 222-8.
- Torres, R. M. and R. Kuehn (1997). "Laboratory protocols for conditional gene targeting." Oxford University Press.
- Tournier, C., *et al.* (2000). "Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway." Science **288**(5467): 870-4.
- Tsai, B., *et al.* (2003). "Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40." Embo J **22**(17): 4346-55.
- Tuganova, A., *et al.* (2001). "An essential role of Glu-243 and His-239 in the phosphotransfer reaction catalyzed by pyruvate dehydrogenase kinase." J Biol Chem **276**(21): 17994-9.
- Tyurina, Y. Y., *et al.* (2004). "Lipid antioxidant, etoposide, inhibits phosphatidylserine externalization and macrophage clearance of apoptotic cells by preventing phosphatidylserine oxidation." J Biol Chem **279**(7): 6056-64.
- Uehara, K., *et al.* (1993). "The first application of a chemiluminescence probe, 2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one (MCLA), for detecting O₂⁻ production, in vitro, from Kupffer cells stimulated by phorbol myristate acetate." FEBS Lett **335**(2): 167-70.
- Ushio-Fukai, M. (2006). "Localizing NADPH oxidase-derived ROS." Sci STKE **2006**(349): re8.

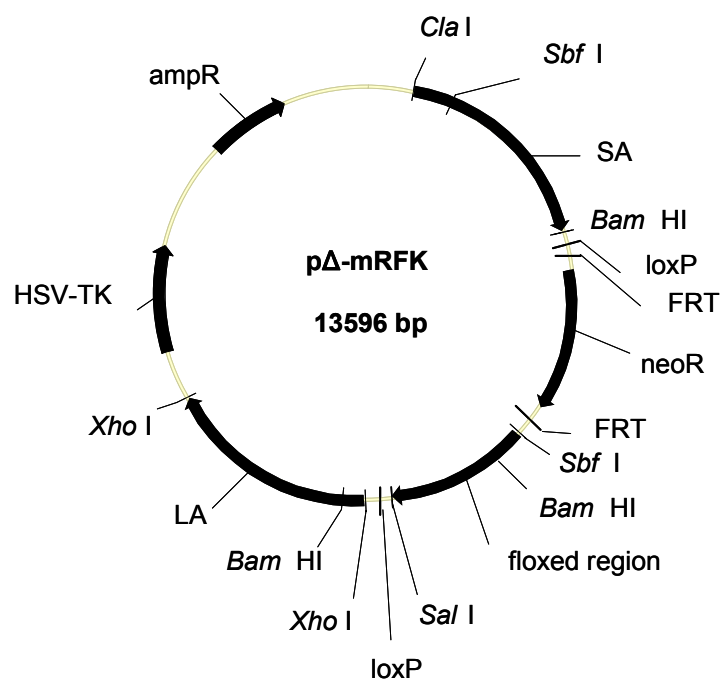
- Uyeda, K., *et al.* (1997). "The active sites of fructose 6-phosphate,2-kinase: fructose-2, 6-bisphosphatase from rat testis. Roles of Asp-128, Thr-52, Thr-130, Asn-73, and Tyr-197." J Biol Chem **272**(12): 7867-72.
- Van Duyne, F. O. and H. C. Sherman (1941). "Riboflavin Contents of Tissues as Stabilized in the Adult at Liberal Levels of Intake." Proc Natl Acad Sci U S A **27**(6): 289-91.
- Vanags, D. M., *et al.* (1996). "Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis." J Biol Chem **271**(49): 31075-85.
- Vandenabeele, P., *et al.* (1995). "Two tumour necrosis factor receptors: structure and function." Trends Cell Biol **5**(10): 392-9.
- Vercammen, D., *et al.* (1998). "Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor." J Exp Med **187**(9): 1477-85.
- Vilhardt, F. and B. van Deurs (2004). "The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly." Embo J **23**(4): 739-48.
- Wagner, B. A., *et al.* (2000). "Myeloperoxidase is involved in H₂O₂-induced apoptosis of HL-60 human leukemia cells." J Biol Chem **275**(29): 22461-9.
- White, D. J., *et al.* (2001). "GidA is an FAD-binding protein involved in development of *Myxococcus xanthus*." Mol Microbiol **42**(2): 503-17.
- Wiegmann, K., *et al.* (1994). "Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling." Cell **78**(6): 1005-15.
- Wingender, E., *et al.* (2001). "The TRANSFAC system on gene expression regulation." Nucleic Acids Res **29**(1): 281-3.
- Wong, G. H., *et al.* (1989). "Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor." Cell **58**(5): 923-31.
- Wong, G. H. and D. V. Goeddel (1988). "Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism." Science **242**(4880): 941-4.
- Yang, B. and V. Rizzo (2007). "TNF-alpha potentiates protein-tyrosine nitration through activation of NADPH oxidase and eNOS localized in membrane rafts and caveolae of bovine aortic endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(2): H954-62.
- Yi, R., *et al.* (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-6.
- Yoshida, W., *et al.* (2002). "Effect of estrogenic compounds on superoxide and nitric oxide production by activated macrophages assessed by sensitive microplate assays. ." journal of health science **48**(5): 455-459.

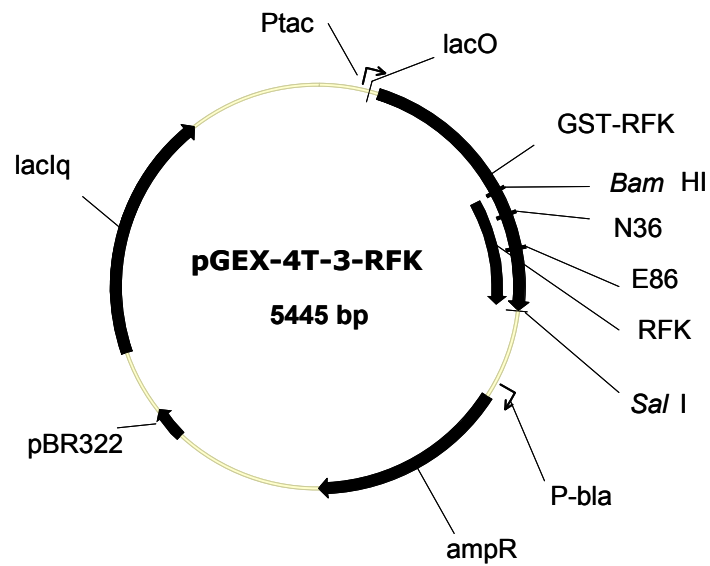
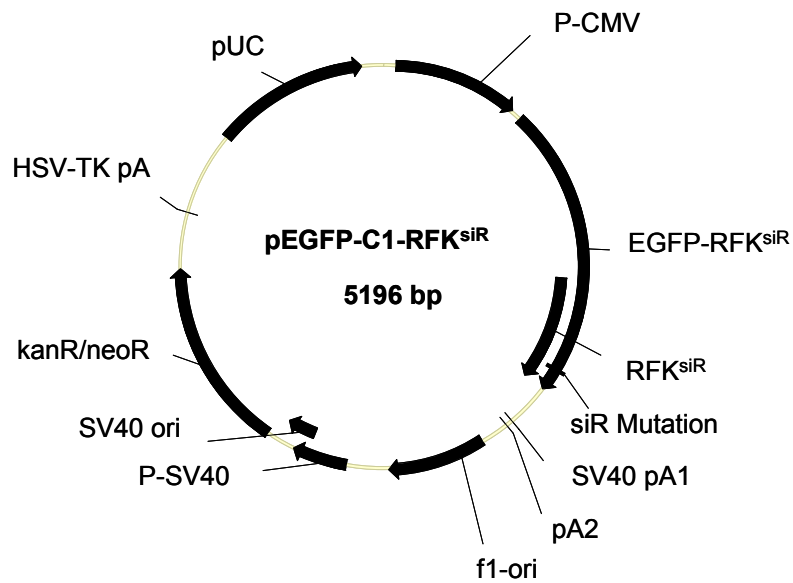
- Zaas, D. W., *et al.* (2005). "The role of lipid rafts in the pathogenesis of bacterial infections." Biochim Biophys Acta **1746**(3): 305-13.
- Zafarullah, M., *et al.* (2003). "Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions." Cell Mol Life Sci **60**(1): 6-20.
- Zempleni, J. and D. M. Mock (2000). "Proliferation of peripheral blood mononuclear cells increases riboflavin influx." Proc Soc Exp Biol Med **225**(1): 72-9.
- Zhang, H. S. and S. Q. Wang (2006). "Notoginsenoside R1 inhibits TNF-alpha-induced fibronectin production in smooth muscle cells via the ROS/ERK pathway." Free Radic Biol Med **40**(9): 1664-74.
- Zhang, R., *et al.* (2003). "AIP1 mediates TNF-alpha-induced ASK1 activation by facilitating dissociation of ASK1 from its inhibitor 14-3-3." J Clin Invest **111**(12): 1933-43.
- Zhuang, Y. A., *et al.* (1989). "UACUAAC is the preferred branch site for mammalian mRNA splicing." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2752-6.
- Zimmerman, R. J., *et al.* (1989). "The role of oxidant injury in tumor cell sensitivity to recombinant human tumor necrosis factor in vivo. Implications for mechanisms of action." J Immunol **142**(4): 1405-9.

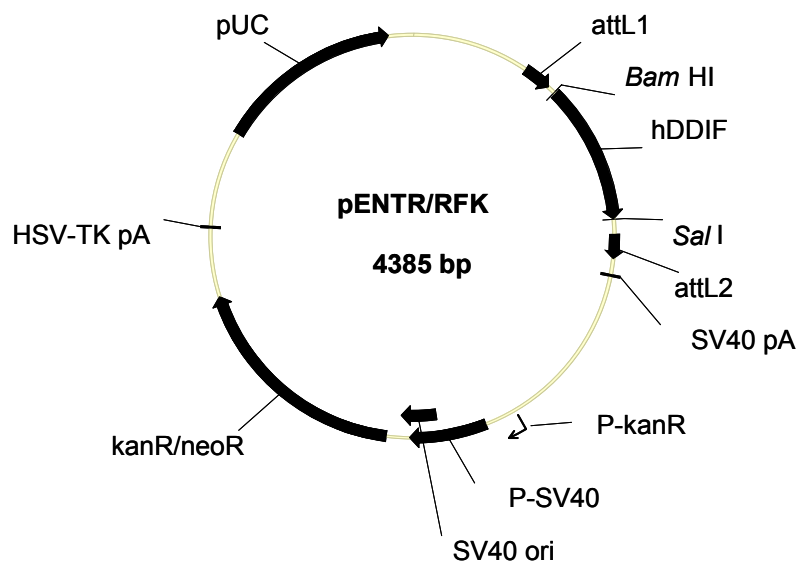
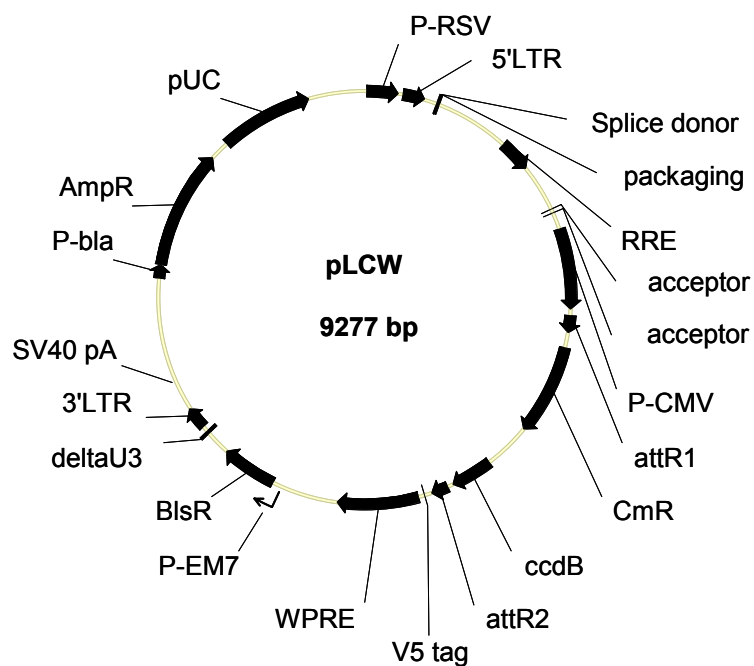
8 Anhang

8.1 Vektorkarten

Targeting Vektor:



Vektor für bakterielle Expression:siRNA-resistente EGFP-RFK-Derivate:

GATEWAY®-kompatibles pENTR-Derivat für lentivirale Expression der RFK:GATEWAY®-kompatibler Vektor für lentivirale Überexpression von cDNA:

8.2 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich der Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Jens C. Brüning betreut worden.

Köln, im April 2007

Benjamin Yazdanpanah

8.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Benjamin Yazdanpanah
 Adresse: Balthasarstrasse 13
 50670 Köln
 Telefon: 0178 4927575
 Email: benjamin.yazdanpanah@uk-koeln.de
 Geburtsdatum: 07. April 1975
 Geburtsort: Teheran, Iran
 Familienstand: Ledig
 Nationalität: iranisch

Schulische Ausbildung:

1981 – 1989 Iran. Schulwesen in Teheran und Sari, Iran
 1989 Förderklasse für ausländische Kinder an der
 „Martin-Luther-King“ Hauptschule, Köln
 1989 - 1990 „Martin-Luther-King“ Hauptschule, Köln
 1990 – 1995 „Schiller –Gymnasium“, Köln mit dem
 Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Akademische Ausbildung:

1995 – 1998 Studium der Biologie und Erlangung des
 Vordiploms an der Mathematisch –
 Naturwissenschaftlichen Fakultät der

„Friedrich-Wilhelm Universität“, Bonn

1998 – 2000	Hauptstudium der Biologie an der Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
2001	Diplomprüfungen, Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Biochemie & org. Chemie
2001 – 2002	Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität zu Köln zum Thema $\gamma\delta$ -Resolvase/Hin-Invertase-Chimären unter Leitung von Herrn Prof. Peter Dröge
2002 – 2008	Dissertation am Institut für med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Uni-Kliniken Köln zum Thema Funktionsanalyse der Riboflavinkinase

Publikationen:

Kashkar, H., *et al.* (2005). "Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane." J Biol Chem **280**(21): 20804-13

Kashkar, H., *et al.* (2006). "XIAP targeting sensitizes Hodgkin lymphoma cells for cytolytic T-cell attack." Blood **108**(10): 3434-40.

Krut, O., *et al.* (2006). "Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein." J Biol Chem **281**(19): 13784-93.

Abdullah, Z., *et al.* (2007). "Serpine-6 expression protects embryonic stem cells from lysis by antigen-specific CTL." J Immunol **178**(6): 3390-9.

Kashkar, H., *et al.* (2007). "NF-kappaB-independent down-regulation of XIAP by bortezomib sensitizes HL B cells against cytotoxic drugs." Blood **109**(9): 3982-8.

8.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde sowohl am Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Uniklinik Köln unter Leitung von Prof. Dr. Martin Krönke und Herrn Dr. Hamid Kashkar als auch am Institut für Genetik der Universität zu Köln unter Leitung von Prof. Dr. Jens Brüning wissenschaftlich betreut.

Für die wissenschaftliche Unterstützung und Diskussionen während der Promotionszeit möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Martin Krönke, Prof. Dr. Jens Brüning, Herrn Dr. Hamid Kashkar und Herrn Dr. Dr. Oliver Coutelle bedanken. Herrn Prof. Dr. Jens Brüning danke ich darüber hinaus für die Übernahme der Betreuung der Dissertation und die Anfertigung des Gutachtens.

Herrn Dr. Thomas Wunderlich und Herrn Dr. Andre Kleinriders danke ich für die schöne und produktive Zeit und die fachliche Unterstützung bei der Konstruktion der Maus am Institut für Genetik. Herrn Dr. Carsten Merkwirth danke ich für die Bereitstellung von HTN-Cre.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe Kashkar und Katja Krönke-Wiegmann für die tägliche Hilfsbereitschaft und die schöne Arbeitsatmosphäre bedanken.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Hamid, Oliver und Frau Dipl. Biol. Carola Pongratz für die kritische und kompetente Korrektur dieses Manuskriptes bedanken.

Caro gilt außerdem mein spezieller Dank für die technische und private Unterstützung und für die Liebe, die sie mir in all der Zeit zukommen ließ.

Mein abschließender Dank gebührt Frau Marlene Dickler und Gleichgesinnten am Schiller-Gymnasium, Köln, die durch ihr unvergessliches Engagement für mein Bleiberecht in Deutschland gesorgt haben sowie meiner Familie und meinen treuesten Freunden.