

Forschungszentrum Karlsruhe
Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 6583

**Expression und
antiapoptotische Funktion
des Bag-1 Proteins während
der Embryonalentwicklung
der Maus**

A. Crocoll

Institut für Toxikologie und Genetik

Februar 2001

Forschungszentrum Karlsruhe

Technik und Umwelt

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6583

**Expression und antiapoptotische Funktion des Bag-1 Proteins
während der Embryonalentwicklung der Maus***

Alexander Crocoll

Institut für Toxikologie und Genetik

* Von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH)
genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2001

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)**

ISSN 0947-8620

Zusammenfassung

Bag-1 gehört zu einer wachsenden Familie von Proteinen, die vermutlich über Hsp70 mit verschiedenen anderen Proteinen interagieren. Die unterschiedlichen Isoformen von Bag-1 werden durch Nutzung alternativer Translationsstartstellen von einer mRNA generiert. Bislang sind beim Menschen vier Proteinprodukte von Bag-1 beschrieben, bei der Maus hingegen nur zwei. In *in vitro* Systemen wurde Bag-1 als multifunktionelles Protein charakterisiert, dessen Wirkungen von der Modulation der Steroidhormonrezeptorwirkung bis zur Aktivierung des Oncoproteins Raf-1 reichen. In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, daß Bag-1 sowohl in Kooperation mit Bcl-2 aber auch alleine Apoptose zu supprimieren vermag.

Als Referenz für mögliche *in vivo* Funktionen von Bag-1 wurde in der vorliegenden Arbeit das isoformspezifische Expressionsmuster von Bag-1 während der Embryonalentwicklung der Maus bestimmt. Ab Tag 10,5 *post coitum* war Bag-1 annähernd ubiquitär exprimiert, wobei allerdings die unterschiedlichen Isoformen sowohl stadienspezifisch als auch gewebespezifisch auftraten. Darüberhinaus zeigten einige Gewebe, die zunächst Bag-1 exprimierten einen Verlust der Expression in späteren embryonalen Entwicklungsstadien.

Die antiapoptotische Funktion von Bag-1 wurde bei der Ausformung der Finger bzw. Zehen der sich entwickelnden Extremitäten untersucht. In der undifferenzierten Extremitätenknospe war Bag-1 ubiquitär im gesamten Mesenchym exprimiert. Mit Erscheinen der Knorpelblasteme der zukünftigen Finger bzw. Zehen war die Expression von Bag-1 auf das Interdigitalgewebe begrenzt. Das Einsetzen der Apoptose im Interdigitalgewebe korrelierte mit dem Verlust der Bag-1 Expression in diesem Gewebe. Da Apoptose im Interdigitalgewebe durch Retinsäure reguliert wird, wurde schwangeren Mäusen Retinsäure verabreicht, um die Apoptoserate im Interdigitalgewebe der sich entwickelnden Embryonen zu erhöhen. Hierbei ergab sich eine Verminderung der Bag-1 Expression in diesem Gewebe bei erhöhter Apoptoserate. Den zur Retinsäureapplikation komplementären Ansatz bot die Analyse von RAR β -doppeltdefizienten Mäusen, die phänotypisch persistierendes interdigitales Mesenchym ("Schwimmhäute") aufgrund einer verminderten Apoptoserate aufweisen. In diesem persistierenden Mesenchym blieb die Expression von Bag-1 erhalten. Sämtliche bislang in diesem System untersuchten, bei der Ausformung der Finger bzw. Zehen beteiligten Gene, wie z.B. Bmp-2, Bmp-4, Bmp-7, Msx-1, Msx-2, Hoxa-13, Hoxd-13, Hoxd-11, Bcl-2, Bax und p53 zeigten in diesem Gewebe eine unveränderte Expression im Vergleich zum Wildtyp.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Bag-1 erstmals ein Molekül nachgewiesen, das bei der Regulation der Apoptose im Interdigitalgewebe offenbar die entscheidende Rolle spielt.

Expression and antiapoptotic function of Bag-1 proteins during mouse embryogenesis

Abstract

Bag-1 belongs to a growing family of proteins that interact with Hsp70 and other proteins. Different isoforms of Bag-1 are generated through the usage of alternative translational start sites on the same mRNA. So far, in humans, four Bag-1 proteins are described while only two have been identified in the mouse. In *in vitro* systems, Bag-1 was characterized as a multifunctional protein with diverse functions ranging from modulation of steroid hormone receptor action to the activation of Raf-1 oncoprotein. In cell culture experiments it was shown that Bag-1 inhibits apoptosis in cooperation with Bcl-2 but is also capable of exerting this function on its own.

As a reference point for possible *in vivo* functions, Bag-1 isoform-specific expression pattern during mouse embryogenesis was determined. From day 10.5 *post coitum* onwards, Bag-1 was ubiquitously expressed with the different isoforms occurring in a stage- and tissue-specific manner. In addition, some of the tissues which showed Bag-1 expression at earlier stages lost this expression at later developmental stages.

Antiapoptotic function of Bag-1 was investigated during the formation of the digits of the developing limbs. In the undifferentiated limb bud Bag-1 was expressed ubiquitously in the entire mesenchyme. With the appearance of the cartilage blastema of the future digits, Bag-1 expression was restricted to the interdigital mesenchyme. The onset of apoptosis in the interdigital tissue correlated with the downregulation of Bag-1 expression in this tissue. As interdigital apoptosis is regulated by retinoic acid, pregnant mice were treated with this substance to increase apoptosis in the interdigital tissue of the developing embryos. As a consequence a decreased expression of Bag-1 was found along with the increased rate of apoptosis. Experiments complementary to the treatment with retinoic acid made possible by the analysis of RAR $\beta\gamma$ -double deficient mice. These animals phenotypically show persistent interdigital mesenchyme ("webbed fingers") due to a decreased rate of apoptosis. In this persistent mesenchyme, the expression of Bag-1 was not downregulated. All the genes analyzed which play a role in digit formation, for example Bmp-2, Bmp-4, Bmp-7, Msx-1, Msx-2, Hoxa-13, Hoxd-13, Hox-11, Bcl-2, Bax and p53 show no alterations in their expression patterns in the double deficient RAR $\beta\gamma$ mice compared to their wild-type counterparts.

In this work it has been shown that Bag-1 is the first molecule which seems to play the crucial role in regulation of interdigital apoptosis.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungen	VII
1. Einleitung	1
1.1. Zelltod: Nekrose <i>versus</i> Apoptose.....	1
1.2. Zelluläre Veränderungen beim apoptotischen Zelltod	2
1.3. Genetische Regulation der Apoptose	3
1.4. Die Bcl-2 Familie	4
1.5. Mitochondriale Dysfunktion und Caspasen	7
1.6. Bag-1: Ein außergewöhnliches Bcl-2 assoziiertes Protein	8
1.6.1. Bag-1 und Apoptose	8
1.6.2. Struktur der Bag-1 Proteine	9
1.6.3. Regulation von Apoptose durch Bag-1.....	10
1.7. Apoptose und Organbildung	11
1.8. Ziel der vorliegenden Arbeit.....	12
2. Material	13
2.1. Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	13
2.2. Radiochemikalien	16
2.3. Plasmide.....	16
2.3.1. Allgemeine Vektoren	16
2.3.2. Matrizen für die <i>in vitro</i> Transkription	17
2.4. Oligonukleotide.....	17
2.4.1. Primer für Sequenzierungen.....	17
2.4.2. Primer für die PCR.....	17
2.5. Antikörper	18
2.6. Bakterien und eukaryontische Zellen	19
2.6.1. Bakterienstämme	19

2.6.2.	Zelllinien und Kulturbedingungen	19
2.7.	Mausstämme	20
3.	Methoden	21
3.1.	Allgemeine Methoden zur Behandlung von Nukleinsäuren.....	21
3.1.1.	Phenol / Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren	21
3.1.2.	Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen	21
3.1.3.	Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	22
3.2.	DNA-Klonierungstechniken.....	22
3.2.1.	Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	22
3.2.2.	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	22
3.2.3.	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	23
3.2.4.	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren.....	23
3.2.5.	Präparation kompetenter Bakterien (nach Hanahan, 1986)	23
3.2.6.	Transformation kompetenter Bakterien (nach Hanahan, 1986).....	24
3.2.7.	Klonierung von PCR-Produkten mit dem "TOPO"-Klonierungs- system (Invitrogen)	24
3.2.8.	Herstellung von Selektivagarplatten.....	24
3.3.	DNA-Präparationen.....	25
3.3.1.	Präparation rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien.....	25
3.3.1.1.	Präparation kleiner Mengen von Plasmid DNA ("Mini-Präp")	25
3.3.1.2.	Präparation großer Mengen von Plasmid DNA ("Maxi-Präp").....	26
3.3.2.	Präparation von genomischer DNA.....	26
3.4.	PCR-Techniken.....	26
3.4.1.	Standard PCR-Protokoll.....	26
3.4.2.	5'-RACE-PCR	27
3.4.3.	Genotypisierung von " <i>Knock-Out</i> "-Mäusen mittels PCR.....	27
3.5.	Sequenzierung von Plasmid-DNA und Auftrennung der Reaktionsprodukte.....	28
3.5.1.	Sequenzierung von DNA (nach Sanger et al., 1977, modifiziert).....	28
3.5.2.	Auftrennung der Sequenzierungsreaktion durch denaturierende..... Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
3.6.	Allgemeine Methoden zur Behandlung von Proteinen.....	29
3.6.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (Lowry et al., 1951).....	29
3.6.2.	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamid- gele (SDS-PAGE, Laemmli, 1970)	29
3.6.3.	Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen.....	30

3.7.	Präparation und Auftrennung von Proteinextrakten für den <i>Western blot</i>	30
3.7.1.	Präparation und Auftrennung von Proteinextrakten aus Zellen	30
3.7.2.	Präparation und Auftrennung von Proteinextrakten aus embryonalen	31
	Geweben	
3.8.	Analyse von Proteinen durch Transfer auf Membranen und Detektion durch	31
	spezifische Antikörper (<i>Western blot</i>)	
3.9.	Zellkultur	32
3.9.1.	Passagieren von Zellen	32
3.9.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	33
3.9.3.	Behandlung von Zellen mit Retinsäure	33
3.9.4.	Transiente Transfektionen nach der Calciumphosphat-Kopräzipitations-	33
	methode (nach Graham und Van der Eb, 1973)	
3.10.	Tierexperimentelle Methoden	34
3.10.1.	Verpaaren der Mäuse und Bestimmung der embryonalen	34
	Entwicklungsstadien	
3.10.2.	Applikation von Retinsäure an schwangere Mäuse	34
3.10.3.	Generierung RAR β -doppeltdefizienter Mausembryonen.....	34
3.11.	Allgemeine histologische Techniken.....	35
3.11.1.	Isolierung und Fixieren von Embryos und Geweben.....	35
3.11.2.	Einbetten von Embryonen und Geweben und Anfertigen von.....	36
	histologischen Schnitten	
3.12.	Immunhistochemie (IHC).....	37
3.12.1.	Nachweis von Proteinen an Gewebeschnitten	37
3.12.2.	Nachweis apoptotischer Zellen an Gewebeschnitten ("TUNEL").....	38
3.13.	Radioaktive <i>In situ</i> Hybridisierung an Gewebeschnitten (nach Wilkinson und	39
	Green, 1990)	
3.13.1.	Behandlung von Objektträgern, Deckgläsern, Glaskästen und.....	39
	Glasfärbegestellen	
3.13.2.	Radioaktive Markierung von Bag-1-RNA durch <i>in vitro</i> Transkription.....	39
3.13.3.	Vorbehandlung der Gewebeschnitte ("Prähybridisierung").....	40
3.13.4.	Hybridisierungsreaktion	40
3.13.5.	Waschen der hybridisierten Gewebeschnitte	41
3.13.6.	Beschichten der Objektträger mit Photoemulsion	42
3.13.7.	Entwickeln, Färben und Auswerten der Schnitte	42
3.14.	<i>In situ</i> Hybridisierung im Ganzpräparat (nach Belo et al., 1997).....	42
3.14.1.	Markierung von Bag-1-RNA und RAR β 2-RNA mit Digoxigenin durch.....	42
	<i>in vitro</i> Transkription	
3.14.2.	Vorbehandlung der Embryonen bzw. Gewebe ("Prähybridisierung")	43
3.14.3.	Hybridisierung und Waschen.....	44

3.14.4. Visualisierung und Auswertung.....	44
4. Ergebnisse.....	45
4.1. Bestimmung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters der Bag-1 mRNA während der Embryonalentwicklung der Maus.....	45
4.2. 5'-Extension der Bag-1 cDNA der Maus.....	49
4.3. Bestimmung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters der Bag-1 Proteine während der Embryonalentwicklung der Maus.....	50
4.4. Expression spezifischer Bag-1 Isoformen in adultem Gewebe.....	56
4.5. Immunhistochemische Analyse des adulten Mausgehirns..... mit dem N15 Antikörper	57
4.6. Bag-1 und Nierenentwicklung.....	59
4.6.1. Expression von Bag-1 während der Nierenentwicklung.....	59
4.6.2. Bag-1 Expression in der Niere AP-2 β -defizienter Tiere.....	61
4.7. Bag-1 und Extremitätenentwicklung.....	63
4.7.1. Expression von Bag-1 mRNA während der Entwicklung der Extremitäten....	63
4.7.2. Apoptose während der Extremitätenentwicklung.....	64
4.7.3. Verminderung der Bag-1 mRNA Expression im Interdigitalgewebe der Extremitäten nach Retinsäurebehandlung schwangerer Mäuse.....	66
4.7.4. Erhöhte Apoptose im Interdigitalgewebe der Extremitäten nach Retinsäurebehandlung schwangerer Mäuse.....	69
4.7.5. Expression von Bag-1 mRNA in RAR $\beta\gamma$ -doppeltdefizienten Mäusen.....	71
5. Diskussion.....	75
5.1. Expressionsmuster von Bag-1.....	75
5.2. Bag-1 Isoformen.....	76
5.3. Bag-1 und Nierenentwicklung.....	79
5.4. Bag-1 und Extremitätenentwicklung.....	80
5.5. Ausblick.....	83
6. Literatur.....	84

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Apaf-1	engl.: <i>apoptosis activating factor 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
Bag-1	<u>B</u> cl-2-assoziiertes <u>A</u> thano- <u>G</u> en <u>1</u> (vom gr.: <i>athanos</i> für "Antitod")
Bcl-2	engl.: <i>B cell lymphoma 2</i>
BH-Region	Bcl-2 Homologie-Region
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
Caspase	engl.: <i>cysteine aspartate-specific protease</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	(3-[(Cholamimidopropyl)- Dimethylammonio]-1-Propan-Sulfonat
cm	Zentimeter
cpm	Zerfälle pro Minute, (<i>counts per minute</i>)
C-terminal	carboxyterminal
CTP	Cytidintri-phosphat
DAM	engl.: <i>death adaptor molecule</i>
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
$\Delta\Psi_m$	Veränderung im Membranpotential der äußeren Mitochondrienmembran
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E10,5	Embryonalstadium Tag 10,5 p.c.
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	<i>et alii</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GBq	Gigabequerel
gr.	griechisch
GR	Glucocorticoidrezeptor
h	Stunde/n
hBag-1	humanes Bag-1
HCl	Salzsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
IHC	Immunhistochemie
IL-3	Interleukin-3
ISH	<i>In situ</i> Hybridisierung
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KH ₂ HPO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
M	molar
mA	Milliampere
mBag-1	murines Bag-1

mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mM	millimolar
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
MR	Mineralocorticoidrezeptor
mRAR	muriner Retinsäurerezeptor
mRNA	Boten-RNA
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nb	engl.: <i>newborn</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal
°C	Grad Celsius
OD	optische Dichte
PBS	engl.: <i>phosphate buffer saline</i>
PBS*	PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
p.c.	<i>post coitum</i>
PCR	Polymerasenkettenreaktion
pH	<i>potentium hydrogenium</i>
pp	<i>post partum</i>
PTP-Kanal	vom engl.: <i>permeability transition pore</i>
RA	all-trans Retinsäure
RAR	Retinsäurerezeptor
RARE	engl.: <i>retinoic acid response element</i>
ROS	engl.: <i>reactive oxygen species</i>
RXR	Retinoid X Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
SSC	<i>standard saline citrat</i>
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.	und
U	Enzymeinheiten (Units)
u.a.	und andere
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
UTP	Uridintriphosphat
5'-UTR	5' untranslatierte Region

V
vgl.
Vol.
W
z.T.

Volt
vergleiche
Volumen
Watt
zum Teil

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asp	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Glu	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1. Einleitung

Die Entwicklung eines multizellulären Organismus erfordert die präzise Regulation zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Zelltod. Ist die Balance zwischen diesen fundamentalen Prozessen gestört, erfolgt häufig unkontrolliertes Wachstum wie es in Krebszellen beobachtet wird, bei denen oftmals Zelltod inhibiert ist. Apoptose oder programmierter Zelltod ist ein aktiver, genetisch kontrollierter Prozeß, um unerwünschte Zellen während der Embryogenese, der Metamorphose und beim Gewebeumsatz zu eliminieren. Der Prozeß der Apoptose spielt eine entscheidende Rolle bei der präzisen Kontrolle von Zellpopulationen und der Ausbildung der spezifischen Form vieler sich entwickelnder Organe.

1.1. Zelltod: Nekrose *versus* Apoptose

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten von Zelltod, Nekrose und Apoptose (Kerr et al., 1972; Schwartzman und Cidlowski, 1993; Kroemer et al., 1995; Steller et al., 1995; Thompson et al., 1995).

Nekrose bezeichnet die "passive" Form des Absterbens von Zellen. Sie erfolgt aufgrund von physikalischen oder chemischen Einwirkungen, die direkt oder indirekt die Integrität der Zelle verletzen und zu ihrer Lyse führen. Anschaulich läßt sich Nekrose als eine Art zufälliger "Unfalltod" umschreiben, der häufig Spuren hinterläßt. Solche Spuren können dauerhaft sein, wie z.B. Narbenbildung im Gewebe, oder transient in Form von Entzündungen, die durch bei der Zellyse ins Interstitium freigesetzte intrazelluläre Bestandteile ausgelöst werden (Kerr et al., 1972; Schwartzman und Cidlowski, 1993).

Im Gegensatz zur Nekrose ist Apoptose ein aktiver, genetisch kontrollierter Prozeß. Die zum apoptotischen Zelltod führenden Einflüsse sind lediglich Signale, die über einen Signaltransduktionsmechanismus ein intrazelluläres Programm auslösen, durch das die betroffene Zelle sich selbst, in einer Art Suizid, zerstört. Die apoptotische Zelle stirbt "unbemerkt", ohne Spuren zu hinterlassen, woraus verständlich wird, daß Apoptose den physiologischen Modus des Zelltods darstellt (Gerschenson und Rotello, 1992; Reed, 1994; Sanders und Wride, 1995; Rich et al., 1999). Unentwegt sterben Zellen in vielen Geweben und Organen des Körpers als Teil der physiologischen Balance zwischen Zellvermehrung und Zellverlust beim Gewebeumsatz. Darüberhinaus tritt Apoptose auch in pathologischen Situationen auf, wie z.B. viralen Infektionen, Hyperthermie, im Rahmen der Immunabwehr durch cytotoxische T-Lymphocyten oder Krankheiten wie Alzheimer und Huntington, bei

denen Apoptose zu neurodegenerativen Prozessen führt (Eischen et al., 1994; Nagata und Goldstein, 1995; Thompson, 1995; Pellegrini und Strasser, 1999).

1.2. Zelluläre Veränderungen beim apoptotischen Zelltod

Der Prozeß der Apoptose ist sowohl auf morphologischer als auch auf biochemischer Ebene nachweisbar und vollzieht sich in den unterschiedlichsten pathologischen und physiologischen Situationen nach einem stereotypen Muster.

Morphologisch läßt sich der Prozeß der Apoptose mikroskopisch durch Licht-, Transmissions- und Elektronenmikroskopie beobachten und verfolgen (Schwartzman und Cidlowski, 1993; Hurlle et al., 1996). Die betreffende Zelle verliert zunächst den Kontakt zu Nachbarzellen, schrumpft und rundet sich ab, wobei an der Zellmembran blasenartige Vorwölbungen gebildet werden. Währenddessen kommt es im Zellkern zu einer charakteristischen Kondensation des Chromatins, was zur Ausbildung sichelförmiger elektronendichter Bereiche führt (Kerr et al., 1972). Nach dem Zerfall des Zellkerns in Chromatin enthaltende Fragmente werden diese, zusammen mit intakten Organellen, in größere Vesikel von der nun ebenfalls zerfallenden Zelle abgeschnürt. Schließlich werden diese abgeschnürten Vesikel als sogenannte apoptotische Körperchen (engl.: *apoptotic bodies*) von Nachbarzellen oder von Makrophagen phagozytiert (Steller, 1995).

Neben diesen mikroskopisch sichtbaren, morphologischen Veränderungen läuft eine Vielzahl biochemischer Prozesse ab. Zu diesen gehören (1) die Fragmentierung der chromosomalen DNA, (2) die Vernetzung zellulärer Proteine und (3) die Spaltung bestimmter Proteine.

1. Die DNA-Fragmentation in den betroffenen Zellen ist die Folge einer Aktivierung oder *de novo* Synthese von Endonukleasen, die die internukleosomale Spaltung der DNA verursachen (Wyllie, 1980; Compton, 1992; Schwartzman und Cidlowski, 1993). Da diese DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aber auch histologisch mittels TUNEL-Methode leicht nachweisbar sind, ist die DNA-Fragmentierung zu einem wichtigen analytischen Kriterium der Apoptose geworden. Allerdings ist die DNA-Fragmentierung für die übrigen zellulären Veränderungen während der Apoptose nicht von Belang, da gezeigt werden konnte, daß Apoptose auch unabhängig von Endonuklease-Aktivität und DNA-Fragmentierung auftritt (Cohen et al., 1992; Cohen, 1993; Jacobson et al., 1994; Schultze-Osthoff et al., 1994).

2. Die Vernetzung von zellulären Proteinen erfolgt durch Gewebetransglutinasen, deren Aktivität in apoptotischen Zellen stark erhöht ist (Fesus et al., 1991; Piacentini et al., 1991; Jiang und Kochhar, 1992). Durch eine während der Apoptose spezifisch aktivierte Ca^{2+} -abhängige Gewebetransglutaminase (Typ II-Transglutaminase; Gentile et al., 1992; Melino et al., 1994) werden zelluläre Proteine über N^{ϵ} -(γ -Glutamyl)Lysin-Querverbindungen verknüpft. Auf diese Weise entsteht eine Proteinmatrix, die für die hohe

Widerstandsfähigkeit der apoptotischen Körperchen gegenüber Detergenzien *in vitro* verantwortlich ist (Fesus et al., 1987, 1989); *in vivo* wird vermutlich die Freisetzung potentiell schädlicher Bestandteile, wie z.B. lysosomaler Enzyme, verhindert. Darüberhinaus führt die Überexpression der Gewebetransglutaminase zu den für die Apoptose charakteristischen morphologischen Veränderungen wie Bläschenbildung an der Zellmembran und Zellfragmentierung (Gentile et al., 1992). Diese morphologischen Veränderungen sind daher möglicherweise eine direkte Konsequenz der Aktivierung der Gewebetransglutaminase.

3. Zu den spezifisch während der Apoptose gespaltenen Proteinen gehören Lamine und Caspasen. Lamine sind Intermediärfilamente aus denen die mit der inneren Kernmembran assoziierte Kernlamina aufgebaut ist. Da Lamine sowohl Strukturkomponenten beim Aufbau der Kernhülle sind als auch bei der Organisation des Chromatins eine Rolle spielen, ist ihre Spaltung essentiell für die Kernfragmentierung während der Apoptose (Lazebnik et al., 1994; Orth et al., 1996; Rao et al., 1996). Caspasen sind eine Familie von Cystein-Proteasen, die durch Spaltung aktiviert werden. Sie bilden zusammen eine proteolytische Kaskade, die letztendlich Haushalts- und Strukturproteine spalten, was schließlich zum Zelltod führt.

1.3. Genetische Regulation der Apoptose

An der Regulation der Apoptose ist die Expression spezifischer Gene beteiligt. Die ersten Gene, die direkt mit Apoptose in Verbindung stehen, wurden beim Nematoden *Caenorhabditis elegans* identifiziert. Von den ursprünglich angelegten 1090 somatischen Zellen sterben 131 während der Entwicklung durch Apoptose, deren Verlauf in diesem Organismus durch mindestens 12 Gene reguliert wird (Ellis und Horvitz, 1986; Liu und Hengartner, 1999). Diese Gene fallen in drei Kategorien: Gene, die beim Töten von Zellen eine positive oder negative Rolle spielen (*ced-3*, *ced-4*, *egl-1* und *ced-9*), Gene, die die Phagozytose sterbender Zellen durch Nachbarzellen kontrollieren (*ced-1*, *ced-2*, *ced-5-8* und *ced-10*) und ein Gen, das bei der Degradation bereits phagozytierter Zellen eine Rolle spielt (*nuc-1*; Liu und Hengartner, 1999). Von diesen Genen wirken *ced-3*, *ced-4* und *egl-1* proapoptotisch, wohingegen *ced-9* Zellen vor Zelltod schützt (Ellis und Horvitz, 1986; Yuan und Horvitz, 1990, 1992; Hengartner et al., 1992; Yuan et al., 1993; Conradt und Horvitz, 1998; Liu und Hengartner, 1999). Die Genprodukte von *ced-3* und *ced-4* wirken autonom und verursachen Zelltod in den Zellen, in denen sie exprimiert werden. Mutationen, die eines dieser beiden Gene inaktivieren, verhindern den Zelltod in den Zellen, die normalerweise während der Entwicklung sterben würden (Ellis und Horvitz, 1986; Yuan et al., 1993; Liu und Hengartner, 1999).

Bei Vertebraten wurden drei Genfamilien identifiziert, die bei apoptotischen Signalwegen eine zentrale Rolle spielen: die Bcl-2 Proto-Oncogen-Familie (siehe 1.4.; Boise et al., 1995; Tsujimoto und Shimizu, 2000), die Caspase Familie der Cystein-Proteasen (siehe 1.5.; Yuan,

1995; Nunez et al., 1998) und die Tumor Nekrose Faktor (TNF) Familie einschließlich ihrer Rezeptoren (siehe 1.5.; Nagata und Goldstein, 1995; Yang et al., 1997).

1.4. Die Bcl-2 Familie

Die Familie der Bcl-2 Proteine bildet eine der biologisch bedeutendsten Klassen Apoptose regulierender Genprodukte. Bcl-2 ist das zuerst entdeckte, namensgebende Mitglied dieser Genfamilie, die Einfluß auf die Regulation des programmierten Zelltods ausübt, sei es durch Aktivierung oder Inhibition desselben. Es erhielt seinen Namen aufgrund seiner Entdeckung in B-Zell-Lymphomen (engl.: *B cell lymphomas*), bei denen es in mehr als 85 % der Fälle (Yunis et al., 1982) infolge der Chromosomentranslokation t(14;18)(q32;q21) unter die Kontrolle des Enhancers des Immunglobulin-Schwer-Ketten-Gens gerät und dadurch überexprimiert wird. Diese Translokation ermöglichte die Klonierung (Bakhshi et al., 1985; Tsujimoto et al., 1985; Cleary et al., 1986) und Analyse (Tsujimoto und Croce, 1986) des bcl-2 Gens. Das Bcl-2 Genprodukt vermag durch verschiedenste Stimuli ausgelöste Apoptose in den unterschiedlichsten zellulären Kontexten zu unterdrücken (Hale et al., 1996).

Mittlerweile besteht die Bcl-2 Familie aus mehr als 20 Mitgliedern, die entweder proapoptotisch (Bax, Bak, Bcl-X_s, Bad, Bid, Bik, u.a.) oder anti-apoptotisch (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, u.a.) wirken (Reed, 1994; Thompson, 1995; Yang und Korsmeyer, 1996; Kelekar und Thompson, 1998; Gross et al., 1999a, 1999b; Tsujimoto und Shimizu, 2000). Die Mitglieder dieser Genfamilie unterscheiden sich in ihren gewebespezifischen und aktivierungsabhängigen Expressionsmustern sowie in strukturellen Merkmalen (Kroemer, 1997). Die meisten Mitglieder besitzen eine carboxyterminale Transmembrandomäne. Über diese Transmembrandomäne wird die subzelluläre Lokalisation beeinflußt.

Der Hauptwirkungsort von Bcl-2 Proteinen ist die äußere Membran der Mitochondrien (Hockenbery et al., 1990; Green und Kroemer, 1998; Zamzami et al., 1998; Gross et al., 1999b; Tsujimoto und Shimizu, 2000). Bcl-2 aber auch nahezu alle anderen antiapoptotischen Familienmitglieder sind integrale Membranproteine, die vorwiegend in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind (Hockenbery et al., 1990; Krajewski et al., 1993; De Jong et al., 1994; Zhu et al., 1996; Gross et al., 1999b). Im Gegensatz hierzu sind die proapoptotischen Proteine überwiegend im Cytosol lokalisiert (Hsu et al., 1997; Hsu und Youle, 1997; Gross et al., 1998, 1999b; Puthalakath et al., 1999; Gross et al., 1999b). Als Folge apoptogener Stimuli translozieren sie jedoch ebenfalls zu den Mitochondrien; eine Konformationsänderung befähigt sie zur Integration in die äußere Membran.

Darüberhinaus besitzen die Mitglieder der Bcl-2 Familie eine variable Anzahl von Bcl-2 Homologie (BH)-Regionen (BH1 bis BH4), die deren biologische Aktivität bestimmen

(Kroemer, 1997; Kelekar und Thompson, 1998; Pellegrini und Strasser, 1999; Gross et al., 1999b; Tsujimoto und Shimizu, 2000). Für die antiapoptotische Aktivität sind die Regionen BH1, BH2 und BH4 notwendig (Huang et al., 1998; Gross et al., 1999b; Tsujimoto und Shimizu, 2000), die BH3-Region hingegen ist essentiell und auch alleine ausreichend für die proapoptotische Wirkung (Chittenden et al., 1995; Kelekar und Thompson, 1998; Gross et al., 1999b; Tsujimoto und Shimizu, 2000).

Weiterhin sind die BH-Regionen wichtig für Protein-Protein-Interaktionen. Sie legen die Fähigkeit der Bcl-2 Familienmitglieder fest, sowohl untereinander als auch mit anderen nicht verwandten Proteinen zu interagieren (Abb. 1; Chittenden et al., 1995; Kelekar und Thompson, 1998; Gross et al., 1999b). Zu letzteren gehören Raf-1 und Bag-1. Raf-1 vermittelt die Phosphorylierung von Bad, wodurch dessen proapoptotische Wirkung blockiert wird (Abb. 1; Wang et al., 1994, 1996a; Wang und Reed, 1998). Bag-1 ist ein neu identifiziertes Bcl-2 bindendes Protein mit ebenfalls antiapoptotischer Wirkung (siehe 1.6.). Bei den Interaktionen von Bcl-2 Familienmitgliedern untereinander wurde sowohl eine selektive Heterodimerisierung aber auch Homodimerisierung bestimmter Bcl-2 Familienmitglieder nachgewiesen. Der durch diese Protein-Protein-Interaktionen in der äußeren Mitochondrienmembran gebildete Bcl-2 Komplex ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

Heterodimerisierung kommt dadurch zustande, daß die Regionen BH1, BH2 und BH3 eines antiapoptotischen Proteins eine hydrophobe Spalte ausbilden, in die die BH3-Region eines proapoptotischen Proteins gelangt (Muchmore et al., 1996; Sattler et al., 1997; Kelekar und Thompson, 1998; Tsujimoto und Shimizu, 2000). Durch Heterodimerisierung wird die biologische Aktivität der Partnerproteine aufgehoben. Diese selektive Dimerisierung bildet vermutlich die molekulare Basis für die antagonistische Wirkung der pro- und antiapoptotisch wirkenden Bcl-2 homologen Proteine. Beispielsweise kann die Apoptose-supprimierende Wirkung von Bcl-2 in IL-3-abhängigen Zellen nach IL-3 Deprivation durch gleichzeitige Expression von Bax aufgehoben werden (Oltvai et al., 1993). Ebenso gibt es einen funktionellen Antagonismus zwischen Bcl-X_L und Bcl-X_S (Boise et al., 1993), sowie zwischen Bak und Bcl-2 (Chittenden et al., 1995; Kiefer et al., 1995). Das Bcl-2 homologe Protein Bad kann durch Bindung an Bcl-X_L Bax aus dem Bax:Bcl-X_L-Heterodimer verdrängen und somit die Apoptose beschleunigen (siehe Abb. 1; Yang et al., 1995).

Bax vermag beispielsweise sowohl Homodimere zu bilden, als auch mit Bcl-2 oder Bcl-X_L zu heterodimerisieren (siehe Abb. 1; Oltvai et al., 1993; Yin et al., 1994; Chittenden et al., 1995; Kelekar und Thompson, 1998). Cytosolisches, als Monomer vorliegendes Bax transloziert nach apoptogenem Stimulus zu den Mitochondrien, um als Homodimer in deren äußere Membran zu integrieren (siehe Abb. 1; Wolter et al., 1997; Gross et al., 1998, 1999b); bereits membranassoziiert vorliegendes Bax integriert ebenfalls aufgrund einer Konformationsänderung in die Membran (Goping et al., 1998; Desagher et al., 1999; Gross et al., 1999b).

In Gegenwart von sog. Überlebensfaktoren wie beispielsweise Wachstumsfaktoren liegt Bad phosphoryliert vor und wird durch das Phosphoserin-Bindeprotein 14-3-3 im Cytoplasma zurückgehalten (siehe Abb. 1; Zha et al., 1996). Nach einem apoptogenen Stimulus wie IL-3 Deprivation wird Bad dephosphoryliert und interagiert mit Bcl-X_L:Bcl-2 (siehe Abb. 1; Kelekar et al., 1997; Otilie et al., 1997; Zha et al., 1997). Ausschließlich dephosphoryliertes Bad ist in der Lage Bcl-X_L zu binden und durch Verdrängung von Bax aus dem Bax:Bcl-X_L-Heterodimer den Gleichgewichtszustand zu verändern und Apoptose zu beschleunigen (Zha et al., 1997).

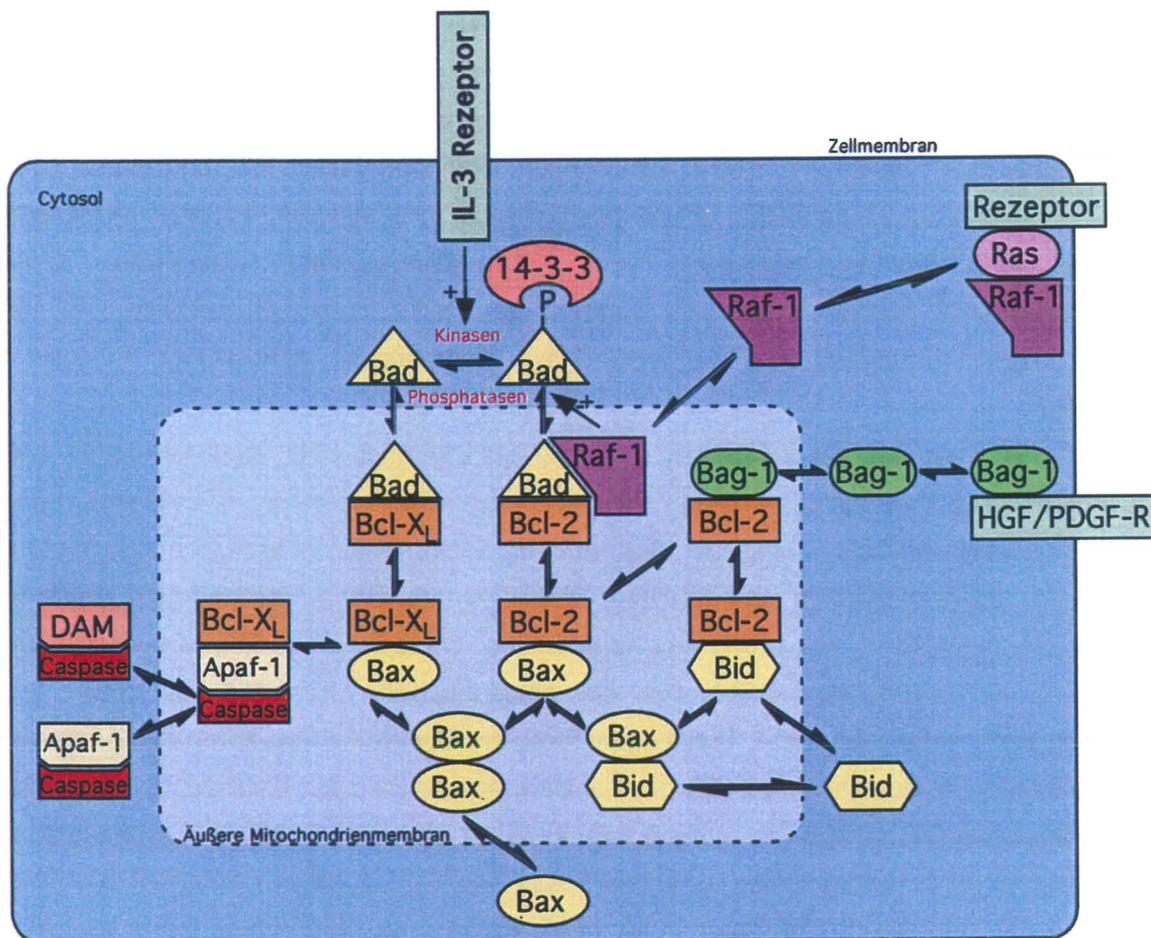


Abb. 1.: Schematische Darstellung der Regulation der Zusammensetzung des Bcl-2 Komplexes. Proapoptotische (gelb) und antiapoptotische (orange) Mitglieder der Bcl-2 Familie wirken auf der Ebene der äußeren Mitochondrienmembran (hell unterlegter Bereich). Das Cytoplasma ist dunkelblau dargestellt, auf die Repräsentation des Zellkerns wurde verzichtet. Die relativen Mengen von pro- und antiapoptotischen Proteinen bestimmen die Empfindlichkeit gegenüber programmiertem Zelltod. Bcl-2 Homologe können mit Apaf-1 (hellgelb) und anderen nicht verwandten, Apoptose inhibierenden Proteinen wie Bag-1 (grün) und Raf-1 (lila) interagieren. Bcl-2 Familienmitglieder unterliegen einem selektiven Dimerisierungsprozeß. Das Verhältnis verschiedener Dimere wird von der relativen vorhandenen Menge der interagierenden Partnerproteine, deren subzellulärer Verteilung sowie durch posttranslationelle Modifikation durch Serin/Threonin-Kinasen festgelegt. Der Bcl-2 Komplex hat lokale Auswirkungen auf die Funktion der äußeren Mitochondrienmembran und kann Todeseffektoren wie Apaf-1 neutralisieren, das mit bestimmten Caspasen (rot) interagiert. DAM steht für "Todesadaptormolekül" (engl.: *death adaptor molecule*) und bringt Signale der Zelloberfläche (Fas Rezeptor) zu bestimmten Caspasen. Nach Kroemer, 1997, verändert.

Das Verhältnis der relativen Mengen von proapoptotischen und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie ist entscheidend für die Integration der apoptogenen Stimuli. Die Bcl-2 Familie bildet in der äußeren Mitochondrienmembran den entscheidenden Kontrollpunkt bei der Festlegung des zukünftigen Schicksals einer Zelle.

1.5. Mitochondriale Dysfunktion und Caspasen

Ist der durch die Bcl-2 Familie gebildete Kontrollpunkt überschritten, erfolgt unwiderruflich die Degradation und die Zelle stirbt. Dies geschieht einerseits durch den Verlust der normalen Funktion der Mitochondrien und andererseits auf dem Weg über Caspasen und deren Substrate (Kroemer et al., 1995; Nunez et al., 1998; Gross et al., 1999b).

Die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie führen über unbekannte molekulare Mechanismen zur Dysfunktion der Mitochondrien (Jurgensmeyer et al., 1998; Luo et al., 1998; Gross et al., 1999a; Han et al., 1999; Susin et al., 1999a, 1999b). Diese beinhaltet Veränderungen im Membranpotential ($\Delta\Psi_m$), Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS, engl.: *reactive oxygen species*), Öffnung des PTP-Kanals (PTP, engl.: *permeability transition pore*) und Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum (Xiang et al., 1996; McCarthy et al., 1997; Eskes et al., 1998; Gross et al., 1998, 1999b; Pastorino et al., 1998; Finucane et al., 1999).

Die Veränderungen im Membranpotential führen schließlich zum vollständigen Zusammenbruch desselben, d.h. einer Depolarisation mit einer Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung; letztendlich kommt es zu einem Anschwellen der Mitochondrien, einem unspezifischen Bruch der äußeren Mitochondrienmembran und zur Freisetzung von Cytochrom c (Zoratti und Szabo, 1995; Zamzami et al., 1998).

Freigesetztes Cytochrom c bindet an Apaf-1 (engl.: *apoptosis activating factor 1*) und induziert dessen aktivierende Oligomerisation. Es entsteht das sog. "Apoptosom", das wiederum ein nachgeschaltetes Caspase Programm aktiviert (Li et al., 1997; Zou et al., 1997). Die Aktivität von Apaf-1 wird zudem auch durch Bcl-2 Proteine direkt reguliert. So verhindern die antiapoptotischen Proteine Bcl-X_L und Boo durch Bindung an Apaf-1 dessen aktivierende Oligomerisation (siehe Abb. 1; Huang et al., 1998). Im Gegensatz dazu verhindern proapoptotische Proteine wie Bak und Bik die Entstehung dieses Komplexes bzw. bewirken seine Dissoziation und setzen dadurch Apaf-1 frei, welches dann wiederum als Oligomer Caspase-9 aktiviert (Inohara et al., 1998; Nunez et al., 1998; Pan et al., 1998; Song et al., 1999).

Als Caspasen (vom engl.: *cysteine aspartate-specific proteases*) bezeichnet man eine wachsende Familie von Cystein-Proteasen mit mehr als 14 Mitgliedern, von denen den meisten eine Rolle bei der Apoptose zukommt (Alnemri et al., 1996; Nunez et al., 1998;

Thornberry und Lazebnik, 1998). Sie bilden zusammen eine proteolytische Kaskade, bei der Initiator-Caspasen nachfolgende Effektor-Caspasen aktivieren. Caspasen werden durch zwei Spaltungsschritte aktiviert: Abspaltung der Prodomäne von der großen Untereinheit und Trennung der großen von der kleinen Untereinheit (Kumar und Colussi, 1999). Die aktivierte Caspase ist ein Tetramer aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten. Letztendlich spalten Caspasen Haushalts- und Strukturproteine, was schließlich zum Zelltod führt (Nunez et al., 1998).

Caspasen können durch Apaf-1/Cytochrom c über die Initiator-Caspase-9 aktiviert werden oder direkt über die Aktivierung von TNF α /Fas-"Todesrezeptoren" der Zelloberfläche, welche die Initiator-Caspase-8 aktivieren (Eischen et al., 1994; Medema et al., 1997; Nagata, 1997; Ashkenazi und Dixit, 1998; Wallach et al., 1998; Luo et al., 1998).

Caspasen können auch auf die Mitochondrien zurückwirken. Die Bindung von TNF α oder Fas Ligand (FasL) an ihre Rezeptoren führt durch Caspase-8 zur aminoterminalen Spaltung der proapoptotischen Proteine Bid und Bax welche in die Mitochondrienmembran inserieren und zur Freisetzung von Cytochrom c führen (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Gross et al., 1999; Han et al., 1999). Aber auch antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-X_L werden durch Caspasen gespalten, wodurch proapoptotische Fragmente derselben entstehen. Diese dienen möglicherweise als positives Rückkopplungssignal und verstärken bzw. beschleunigen dadurch apoptotische Prozesse (Nunez et al., 1998).

1.6. Bag-1: Ein außergewöhnliches Bcl-2 assoziiertes Protein

Eines der neu entdeckten Proteine, die mit Bcl-2 assoziieren, ist Bag-1. Mit Hilfe der Protein-Interaktions-Klonierungstechnik wurde es als ein Bcl-2 bindendes Protein identifiziert (Takayama et al., 1995). Seine Interaktion mit Bcl-2 führte zu der Bezeichnung Bag-1 für Bcl-2-assoziertes Athano-Gen 1 (vom gr. *athanos* für "Antitod"). Bag-1 ist als Bcl-2-bindendes antiapoptotisches Protein in der Lage, Apoptose zu inhibieren, zeigt jedoch keinerlei Homologie zu Mitgliedern der Bcl-2 Genfamilie.

1.6.1. Bag-1 und Apoptose

Bag-1 wirkt zusammen mit Bcl-2 synergistisch bei der Suppression von durch verschiedene Stimuli induzierter Apoptose, wie z.B. Anti-Fas Antikörper und cytolytische T-Zellen, beides Stimuli, die wenn überhaupt nur sehr gering durch Bcl-2 oder Bag-1 alleine unterdrückt werden können (Takayama et al., 1995).

Neben der Kooperation mit Bcl-2 kann Bag-1 auch alleine Apoptose hemmen. So schützt eine Überexpression von Bag-1 in den verschiedensten Zelllinien unabhängig von Bcl-2 vor Apoptose, die durch eine ganze Reihe unterschiedlichster Stimuli ausgelöst wird, wie z.B. Staurosporin, Wachstumsfaktordeprivation, chemotherapeutische Verbindungen, Glucocorticoide oder Retinsäure (Takayama et al., 1995; Bardelli et al., 1996; Clevenger et al., 1997; Kullmann et al., 1998; Liu et al., 1998; Yang et al., 1999b).

Mittlerweile ist Bag-1 eine wachsende Familie von Proteinen, die vermutlich alle mit Bcl-2 interagieren. Die verschiedenen Bag-1 Isoformen wurden *in vitro* hinsichtlich ihrer Wirkung bei der Hemmung von Apoptose untersucht, und es zeigte sich, daß alle Bag-1 Isoformen eine antiapoptotische Wirkung aufweisen (Yang et al., 1999b). Es ist jedoch nicht klar, ob alle Bag-1 Proteinprodukte die gleiche Potenz bezüglich der Inhibition von Apoptose besitzen.

1.6.2. Struktur der Bag-1 Proteine

Bislang sind vier menschliche Bag-1 Isoformen bekannt, die alle von einer mRNA translatiert werden (Packham et al., 1997; Yang et al., 1998; Takayama et al., 1998). Die größte Bag-1 Isoform (Bag-1L, p50) wird von einem als Startcodon ungewöhnlichen CTG-Triplett aus generiert. Stromabwärts hiervon liegen im offenen Leseraster mehrere ATG-Startcodons, von denen aus die kleineren Isoformen Bag-1M (Rap46, p46), Bag-1 (p33) und p29 gebildet werden (siehe Abb. 2 und 4.2.). In der Maus wurden u.a. auch durch diese Arbeit zwei Isoformen, Bag-1L und Bag-1, beschrieben, die ebenfalls von einer mRNA ausgehend generiert werden (siehe Abb. 2 und 4.2.; Packham et al., 1997; Takayama et al., 1998).

Alle Proteine der Bag-1 Familie besitzen eine konservierte, carboxyterminale Domäne, über die sie an Hsp70 binden und dessen Aktivität modulieren (Takayama et al., 1997; Höfeld und Jentsch, 1997; Zeiner et al., 1997; Gebauer et al., 1997, 1998; Bimston et al., 1998; Höfeld et al., 1998; Kanelakis et al., 1999; Stuart et al., 1998; Lüders et al., 2000; Nollen et al., 2000). Darüberhinaus enthalten alle Bag-1 Isoformen eine ubiquitinähnliche Domäne, die auf eine Verbindung zum Ubiquitin/Protease-System schließen läßt. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß Bag-1 mit dem 26S Proteasom assoziiert (Lüders et al., 2000). Ein Motiv [EE(X)₄] mit bisher unbekannter Funktion ist bei den verschiedenen Isoformen in variabler Anzahl im Aminoterminus vorhanden, der am wenigsten konservierten Region der Bag-1 Proteine (Abb. 2).

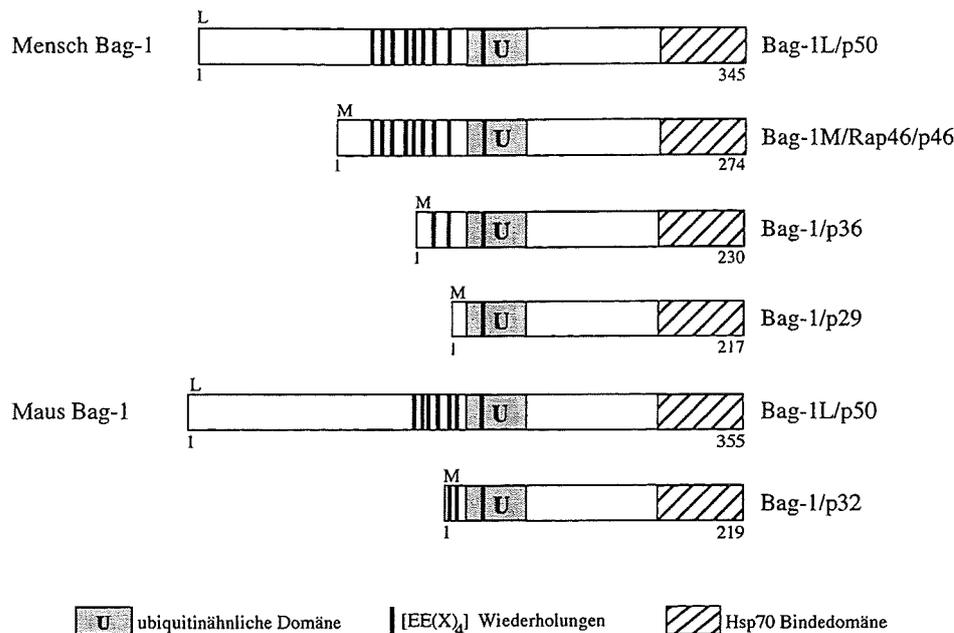


Abb. 2.: Schematische Darstellung der Struktur der Bag-1 Isoformen von Mensch und Maus. Angegeben sind die konservierte Hsp70 Bindedomäne, die ubiquitinähnliche Domäne und das $[EE(X)_4]_n$ Motiv. E = Glutaminsäure, L = Leucin, M = Methionin, X = beliebige Aminosäure. Die Zahlen stehen für die Anzahl der Aminosäuren der entsprechenden Proteine.

1.6.3. Regulation von Apoptose durch Bag-1

Bag-1 zeigt keinerlei Homologie weder zu Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilie noch zu anderen Bcl-2 bindenden Proteinen wie Raf-1, das ebenfalls mit Bag-1 interagiert (Wang et al., 1996b; Wang und Reed 1998). Da die Bindung von Bag-1 an Bcl-2 somit auch nicht über bekannte, von anderen Bcl-2 bindenden Proteinen benutzte Interaktionsdomänen erfolgt, ist über den Mechanismus der Apoptose inhibierenden Wirkung von Bag-1 wenig bekannt. Bag-1 bindet an Bcl-2 durch seine carboxyterminale Domäne (siehe Abb. 1 und 2; Takayama et al., 1995), man geht jedoch davon aus, daß keine direkte Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen auftritt. Ebenfalls durch die carboxyterminale Domäne von Bag-1 erfolgt die sehr starke Bindung von Bag-1 an Hsp70; vermutlich wird die Interaktion von Bag-1 mit Bcl-2 über Hsp70 vermittelt (Zeiner et al., 1997; Takayama et al., 1997; Höhfeld und Jentsch, 1997; Gebauer et al., 1997, 1998).

Hsp70 selbst ist ebenfalls ein antiapoptotisches Protein (Jäättelä et al., 1992; Jäättelä und Wissing, 1993; Simon et al., 1995; Karlseder et al., 1996; Mosser et al., 1997). Einerseits verhindert Hsp70 auf der Ebene der Mitochondrienmembran den Zusammenbruch des Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ (Jäättelä et al., 1998; Creagh et al., 2000). Andererseits wirkt Hsp70 nach der Freisetzung von Cytochrom c und vor der Aktivierung der Effektor-Caspase-3 (Beere et al., 2000; Li et al., 2000; Saleh et al., 2000). Wie bereits erwähnt, bindet

Cytochrom c an Apaf-1 und induziert dessen aktivierende Oligomerisation. Es entsteht das sog. "Apoptosom", an das mehrere Moleküle Procaspase-9 gebunden und aktiviert werden. Caspase-9 aktiviert nachfolgend die Effektor-Caspasen 3 und 7. Hsp70 bindet an Apaf-1 und verhindert dadurch die Bindung und Aktivierung von Procaspase-9 (Beere et al., 2000; Saleh et al., 2000).

Da Bag-1 an Hsp70 bindet und dessen Chaperonaktivität verändert, ist es wahrscheinlich, daß es ebenfalls die antiapoptotische Funktion von Hsp70 beeinflusst. Diese Möglichkeit wurde bislang nicht untersucht, aber vermutlich wird die antiapoptotische Wirkung von Bag-1 teilweise auch durch Hsp70 vermittelt.

1.7. Apoptose und Organbildung

Im adulten Organismus spielt der programmierte Zelltod eine Rolle beim Gewebeumsatz, d.h. bei der physiologischen Balance zwischen Zellvermehrung und Zellverlust. Eine besondere Bedeutung kommt der Apoptose jedoch während der Embryonalentwicklung zu. Während der Embryogenese von Wirbeltieren spielt Apoptose eine Rolle bei einer Vielzahl von sich entwickelnden Organen und Geweben, wie z.B. Herz, Linse, Neuralrohr, Somiten, und Kiemenbögen (Übersichten in Sanders und Wride, 1995; Vaux und Korsmeyer, 1999). Im sich entwickelnden Nervensystem sterben ungefähr die Hälfte der Neuronen, die während der Embryogenese gebildet werden noch vor dem Erwachsenenalter (Oppenheim, 1989; Garcia et al., 1992; Yoshida et al., 1998). Bei der Ausprägung der Geschlechtsdimorphismen spielt Apoptose eine herausragende Rolle sowohl bei den inneren wie bei den äußeren Geschlechtsorganen (Jost et al., 1971; Drews und Dietrich, 1978; Rodriguez et al., 1997). Das Öffnen der sich entwickelnden, anfänglich geschlossenen Vagina erfolgt durch hormoninduzierte Apoptose; die Verhinderung eines vorzeitigen Öffnens ist abhängig von Bcl-2 (Rodriguez et al., 1997). Auch die geschlechtsspezifische Entwicklung der Brustdrüsen erfolgt in Abhängigkeit von Apoptose, so z.B. die Degeneration der männlichen Brustdrüse während der Embryonalentwicklung. Im adulten weiblichen Organismus erfolgt eine Regression der Brustdrüsen nach Schwangerschaften bzw. Lactationsperioden. Diese Regression ist ebenfalls ein apoptotischer Prozeß, der durch Bcl-2 und vermutlich andere Mitglieder dieser Familie reguliert wird (Jäger et al., 1997). Ebenso bei der Nierenentwicklung, die in enger Beziehung zur Geschlechtsentwicklung verläuft, spielt diese Form des Zelltodes eine kritische Rolle, an deren Regulation Bcl-2, Bcl-X_L und Bcl-w beteiligt sind (Veis et al., 1993; Kamada et al., 1995; Moser et al., 1997a). Ein besonders anschauliches Beispiel ist die Gliedmaßenentwicklung, bei der der Apoptose eine entscheidende Bedeutung bei der Ausformung der Finger durch das Absterben der zunächst

angelegten Zellen im Interdigitalgewebe zukommt (Hammar und Mottet, 1971; Mori et al., 1995; Chen und Zhao, 1998; Rodriguez-Leon et al., 1999).

1.8. Ziel der vorliegenden Arbeit

Da Mitglieder der Bcl-2 Familie bei der Regulation von Apoptose während der Organbildung eine Rolle spielen und durch Zellkulturexperimente Bag-1 als antiapoptotisches Protein charakterisiert wurde, war das Ziel dieser Arbeit, zunächst die Expression von Bag-1 und seiner Isoformen während der Embryonalentwicklung der Maus zu untersuchen. Von besonderem Interesse waren hierbei Gewebe oder Organe, bei denen die Expression von Bag-1 mit Apoptose negativ korreliert. Zwei Expressionssorte von Bag-1, bei denen eine solche Korrelation vorliegt, sollten ausgewählt werden, um die Rolle von Bag-1 beim apoptotischen Prozeß näher zu untersuchen.

2. Material

2.1. Bezugsquellen der Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (30:0,8)	Serva, Heidelberg
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Advantage cDNA PCR Kit	Clontech, Heidelberg
3-Aminopropyltriethoxy-Silan (TESPA)	Sigma, Deisenhofen
Agarose (Typ I)	Appligene, Heidelberg
Aktivkohle	Sigma, Deisenhofen
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
All-trans Retinsäure	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BioRad Laboratories, München
Ammoniumthiosulfat	Sigma, Deisenhofen
ApopTag Plus Peroxidase Kit	Appligene, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Augsburg
Bakterienschalen (10 cm)	Greiner, Nürtingen
Econo-Pack Säulen	BioRad Laboratories, München
Blaukappengefäße (15 ml und 50 ml)	Greiner, Nürtingen
BM Purple Alkalische Phosphatase Substrat	Roche Diagnostics, Mannheim
Boehringer Blockierungs-Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
CHAPS (3-[(Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propan-Sulfonat)	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva, Heidelberg
Deckgläschen	Bender und Hobein, Karlsruhe
Desoxy-Nukleosidtriphosphate	Roche Diagnostics, Mannheim
Dextransulfat	Roth, Karlsruhe
D-Glucose	Roche Diagnostics, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka Buchs, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu-Ulm
Digoxygenin-dNTP-Labeling Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I (RNase-frei)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Eggenstein
Easy-Pure DNA Purification Kit	Biozym Diagnostik, Oldendorf
ECL-Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Eichproteine, gefärbt	BioRad Laboratories, München

Einbettkassetten	Leica Vertrieb GbmH, Bensheim
Entellan neu (Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie)	Merck, Darmstadt
Eosin B	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Folin Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenstein
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Gewebekulturschalen	Greiner, Nürtingen
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	BRL, Inc., Neu-Isenburg
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	BioRad Laboratories, München
Heparin	Sigma, Deisenhofen
Heringssperma-DNA Typ III	Sigma, Deisenhofen
Histowax	Leica Vertrieb GmbH, Bensheim
Hybond-N ⁺ Membranen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immobilon-P Transfer Membranen	Millipore, Eschbronn
Immu-Mount, wäßriges Einbettmedium	Shandon, Frankfurt
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol (2-Butanol)	Roth, Karlsruhe
Kodak Developer D-19	Kodak, Rochester
Lambda DNA	Gibco, Eggenstein
Ligase Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Lithiumchlorid (LiCl)	Serva, Heidelberg
LM-1 Emulsion für die Autoradiographie	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Lysozym	Roche Diagnostics, Mannheim
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Maleinsäure	Sigma, Deisenhofen
Marathon-Ready-cDNA	Clontech, Heidelberg
Mayer's Hämatoxylin	Sigma, Deisenhofen
Methylgrün	Vector Alexis, Grünberg
Mikrotiterplatten	Greiner, Nürtingen
Minimal Medium Alpha (MEM)	Gibco, Eggenstein
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Serva, Heidelberg
Natriumthiosulfat	Sigma, Deisenhofen

N, N'-Methylen-Bisacrylamid	BioRad Laboratories, München
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad Laboratories, München
Objekträger	Bender und Hobein, Karlsruhe
Oligo-d(T)-Cellulose	Gibco, Eggenstein
Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Paraplast Plus Histowax	Sherwood, Athy
peqGold TriFast Lösung	peqLab, Erlangen
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polyoxymethylen Färbegestelle	Bender und Hobein, Karlsruhe
Polyoxymethylen Färbetröge	Bender und Hobein, Karlsruhe
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Düsseldorf
Qiagen-tip-500-Säulen	Qiagen, Düsseldorf
QuikHyb-Hybridisierungslösung	Stratagene, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
RediPrime Random Primer Labeling	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Restriktionsendonukleasen und Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim Promega, Heidelberg USB, Cleveland Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Sigma, Deisenhofen
Retinsäure (all-trans)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ribonukleotidtriphosphate	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase A	Promega, Heidelberg
RNASin	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	Gibco, Eggenstein
RPMI 1640 Kulturmedium	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sephadex G 50 Nick Columns	Serva, Heidelberg
Silikonlösung	Sigma, Deisenhofen
Spermidin	Costar, Bodenheim
Spin-X Röhrchen	Renner GmbH, Darmstadt
Sterilfilter	Labonord, Mönchengladbach
Superfrost Plus Objekträger	Packard Instruments, Illinois
Szintillationsflüssigkeit (Emulsifier-Safe)	Packard Instruments, Illinois
Szintillationsröhrchen	Promega, Heidelberg
T4-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
T3-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
T7-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim

Taq-DNA-Polymerase und Puffer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermosequenase Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen, Groningen,
Niederlande	
Transkriptionspuffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Triethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCl, Tris-Base	Sigma, Deisenhofen
Tristar	AGS, Heidelberg
Triton X-100	BioRad Laboratories, München
Torula RNA (aus Hefe)	Sigma, Deisenhofen
t-RNA (aus Hefe)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Gibco, Eggenstein
Tween 20	Serva, Heidelberg
Vectastain ABC Peroxidase Standard Kit	Vector Alexis, Grünberg
Vectastain AEC Peroxidase Substrat Kit	Vector Alexis, Grünberg
Wasserstoffperoxid	Sigma, Deisenhofen
Whatmann 3MM-Papier	Bender und Hobein, Karlsruhe
Wizard Plus SV Miniprep Kit	Promega, Mannheim
Zellkulturartikel	Greiner, Nürtingen
Ziegenserum	Sigma, Deisenhofen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Merck, Darmstadt und Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen bezogen.

2.2. Radiochemikalien

$[\alpha^{35}\text{S}]\text{-UTP}$	(370 Mbq/ml)
$[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$	(370 Mbq/ml)
$[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ddNTPs}$ ($[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ddATP}$, $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ddCTP}$, $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ddGTP}$ und $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ddTTP}$)	(17 Mbq/ml)

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg bezogen.

2.3. Plasmide

2.3.1. Allgemeine Vektoren

pCDNA3 (5,4 kb)	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pCRII-TOPO (3,9 kb)	Invitrogen, Groningen, Niederlande

pBSIISK⁺ (2,9 kb) Stratagene, Heidelberg

pBSIISK⁻ (2,9 kb) Stratagene, Heidelberg

2.3.2. Matrizen für die *in vitro* Transkription

mBAG-1: EcoRI/NotI Fragment (659 bp) der murinen Bag-1 cDNA
(Takayama et al., 1995; Position 83-742) im Plasmid pBSIISK⁻
(Stratagene, Heidelberg), (Crocoll et al., 2000b).

mRAR-β2: KpnI/NotI Fragment (374 bp) der murinen mRAR-β2 cDNA
(Zelent et al., 1991; Position 125-499) im Plasmid pBSIISK⁺
(Stratagene, Heidelberg), (Zelent et al., 1991).

2.4. Oligonukleotide

2.4.1. Primer für Sequenzierungen

T7-Primer: 5'-AATACGACTCATTATAG-3'

Sp6-Primer: 5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'

2.4.2. Primer für die PCR:

Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation von Fragmenten des murinen RARβ-Wildtyp-Allels (275 bp) bzw. mutierten Allels (300 bp):

UD96: 5'-CCAGGCTCCTTTTTCTTCTACCATA-3'

UD97: 5'-CTGTTTCTGTGTCATCCATTTCCAA-3'

UD98: 5'-AGGCCTACCCGCTTCCATTGCTCAG-3'

Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation von Fragmenten des murinen RARγ-Wildtyp-Allels (1195 bp) bzw. mutierten Allels (1238 bp):

WG60: 5'-CAACAAGCTACAAAGAGTGGTGGTC-3'

WG61: 5'-AAAGCAGTTACAGGGCAGGCGAGAT-3'

NM9: 5'-GCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGT-3'

Die nachfolgend aufgeführten Primer wurden ausschließlich zur Generierung der 5'-elongierten mBag-1 cDNA verwendet.

Bag5'rev: 5'-CGTCTGGACCATCTCCTCGGTCTTGGCCAT-3'

Bag-EST-5': 5'-CCGCGAGGCGACCGGGAGCC-3'

Bag248-5': 5'-GCCTCCCTCTCAGCGTTCCTCTGTGCG-3'

Bag#31: 5'-GCTCGGTGGTCAAAGGGCTGTCCTTCACCT-3'

5'Bag#31rev: 5'-ACCTCTCATTGCTGTGGGTGACGATCACGCTGAGTCT-3'

5'Bag-316rev: 5'-TCGGTCGCCCCGTACTGGCTAGGTGG-3'

5'Bag-EcoRI: 5'-CCGAATTCGCTCCCTCTCAGCGTTCCTCTGTGCGCAG-3'

3'Bag-NotI: 5'-CCGCGGCGGCTCAGGTTGCAAAGACAGGACTTTTTTCATTG
AGAACCGACG-3'

EST9: 5'-CGCGCCGCGTG(AGCT)CATAGCCGC-3'

EST9rev: 5'-GCGGCTATG(AGCT)CACGCGGCGCG-3'

EST-NotI(3): 5'-CCGCGGCCGCACTGGCCACTGTTACTTGCTGT
GGGTAACAAGAG-3'

AP-1: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Sämtliche Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg bezogen, mit Ausnahme des Adaptorprimers AP-1, der im *Marathon Ready cDNA* System (Clontech, Heidelberg) enthalten war.

2.5. Antikörper

Primärantikörper für die Immunhistochemie und *Western blot* Analysen

Anti-Bag-1 (C16), polyklonale IgG aus Kaninchen (Santa Cruz, Heidelberg).

Anti-Bag-1L (N15), polyklonale IgG aus Kaninchen (Eurogentec, Seraing, Belgien).

Anti-AR (Biogenex F39.41), monoklonale IgG aus Maus (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg).

Anti-PARP (Anti-Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase), polyklonale IgG aus Kaninchen (Roche Diagnostics, Mannheim).

Sekundärantikörper für die Immunhistochemie (IHC)

Biotinylierte IgG aus der Ziege, gerichtet gegen Kaninchen-Immunglobuline (Zymed, San Francisco, USA).

Sekundärantikörper für *Western blot* Analysen

Polyklonale IgG aus der Ziege, gerichtet gegen Kaninchen-Immunglobuline, Meerrettichperoxidase-konjugiert (Dako, Glostrup, Dänemark).

Polyklonale IgG aus Kaninchen, gerichtet gegen Maus-Immunglobuline, Meerrettichperoxidase-konjugiert (Dako, Glostrup, Dänemark).

Antikörper für die *Whole Mount In Situ* Hybridisierung

Anti-Digoxigenin, IgG aus dem Schaf (Fab-Fragmente), konjugiert mit alkalischer Phosphatase (AP; Roche Diagnostics, Mannheim).

Antikörper für den Nachweis apoptotischer Zellen an Gewebeschnitten (TUNEL)

Anti-Digoxigenin, polyklonale IgG aus dem Schaf, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (AP), Bestandteil des ApopTag Kits (Appligene, Heidelberg).

2.6. Bakterien und eukaryontische Zellen

2.6.1. Bakterienstämme

E. coli DH5 α (aus der Zellbank des Instituts für Toxikologie und Genetik, ITG)
Genotyp: F⁻, end A1, hsd R17 (rk⁻, mk⁺), sup E44, thi-1,1⁻, rec A1, gyr A96, rel A1.

TOP10 F['] (Bestandteil des TOPO-TA Klonierungssystems, Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Genotyp: F[']mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80, lacZ Δ M15 Δ lacX74deoR, recA1, araD139 Δ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG.

2.6.2. Zelllinien und Kulturbedingungen

Cos-7

Affen-Nierenzelllinie; Glucocorticoidrezeptordefizient; Bag-1-defizient. Cos-7 Zellen wurden in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS) kultiviert.

Die Bakterien und Zelllinien stammen, falls nicht anders vermerkt, aus der Zellbank des Instituts für Toxikologie und Genetik (ITG), Forschungszentrum Karlsruhe.

2.7. Mausstämme

Adulte Mäuse des Mausstammes C57BL/6 (OlaHsd) wurden von Harlan Winkelmann, Borcheln, bezogen und werden seit 1995 in den Tierställen des Instituts für Toxikologie und Genetik gehalten.

Zwei adulte männliche, homozygot RAR β -defiziente und zwei adulte weibliche, heterozygot RAR γ -defiziente Tiere wurden von Pierre Chambon (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) CNRS/INSERM/ULP, Illkirch, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Diese befanden sich in einem gemischten Stammhintergrund von 129/Sv ν und C57BL/6.

Alle Mäuse wurden artgerecht in den Tierställen des Instituts für Toxikologie und Genetik in einem 12-stündigen Lichtzyklus gehalten. Die Tiere hatten i.d.R. (Ausnahmen siehe 3.10.2.) freie Verfügung über Futter (Ssniff R/M H, extrudiert, Ssniff, Soest) und Wasser.

Paraffinschnitte von Nieren AP2 β -defizienter Mäuse (Stamm: C57BL/6) wurden von Reinhard Buettner (Institut für Neuropathologie, Rheinisch Westfälische Technische Hochschule (RWTH), Aachen) zur Verfügung gestellt.

3. Methoden

Vorbemerkung: Falls nicht anders vermerkt handelt es sich bei Prozentangaben zur Zusammensetzung von Lösungen und Puffern um Volumenprozent (v/v).

3.1. Allgemeine Methoden zur Behandlung von Nukleinsäuren

3.1.1. Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Die Reinigung einer Nukleinsäurelösung von Proteinen wurde in einem Mindestvolumen von 100 µl durchgeführt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol (mit 1xTNE gesättigt, 1xTNE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0) wurde gut gemischt und nach Zugabe eines weiteren Volumens Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) nochmals gut gemischt. Die Trennung der Phasen erfolgte durch 3 min Zentrifugation bei 10000 g. Proteine sammeln sich zwischen den beiden sich ausbildenden Phasen. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und zur Beseitigung von Phenolresten nochmals mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) auf die gleiche Weise extrahiert. Die gereinigte nukleinsäurehaltige Oberphase wurde dann zur weiteren Verwendung abgenommen.

3.1.2. Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen

Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit 3 M Natriumacetat (pH 4,8) auf eine Endkonzentration von 0,3 M gebracht. Nach Zugabe des 2,5-fachen Volumens Ethanol wurde gut gemischt, 15 min bei -80 °C oder mindestens 30 min bei -20 °C gefällt und anschließend 20 min bei 10000 g zentrifugiert. Zur Entfernung von Salz wurde das Präzipitat mit kaltem 75 % Ethanol gewaschen und anschließend im Vakuum-Konzentrator ("*SpeedVac*"- Evaporator, Savant, Farmingdale) getrocknet.

Sowohl bei der Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (siehe 3.3.1.2.) als auch bei der Präparation genomischer DNA (siehe 3.3.2.) wurde die Ethanolfällung durch eine Isopropanolfällung ersetzt. Hierbei wurde die DNA durch Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde entweder als "fädiges" Präzipitat abgenommen oder durch Zentrifugation gewonnen und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen.

3.1.3. Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung einer wässrigen Nukleinsäurelösung wurde ihre Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (E260) in einem Spektralphotometer (Spekol UV/VIS, Carl Zeiss, Jena) bestimmt. Eine Extinktion von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml Ribonukleinsäure (RNA) oder 20 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide. Die Extinktion bei 280 nm (E280) zeigt Verunreinigungen durch Proteine an. Der Quotient aus E260 und E280 sollte bei DNA etwa 1,8 und bei RNA etwa 2 betragen, ansonsten ist eine weitere Reinigung der Nukleinsäuren nötig.

3.2. DNA-Klonierungstechniken

3.2.1. Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen

Eine Enzymeinheit U ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µg DNA des Phagen Lambda (λ) in einer Stunde vollständig verdaut. Für analytische und präparative Zwecke wurde die zu verdauende DNA mit 2-3 Einheiten Restriktionsenzym pro µg DNA bei den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen (in der Regel 37 °C) für 2 h bis über Nacht inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das Zehnfache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glycerin-Lösung. Bei Doppelverdau wurden Enzyme mit gleichem Pufferanspruch gemeinsam zugegeben; andernfalls wurde zuerst der Verdau mit dem Enzym und Puffer niedriger Ionenstärke durchgeführt, und nach Phenol/Chloroform-Extraktion und EtOH-Fällung erfolgte dann der Verdau mit dem zweiten Enzym und entsprechendem Puffer höherer Ionenstärke. Bei Plasmid-DNA aus Minipräparationen, die mit RNA verunreinigt war, wurde der Reaktion 0,5 µg/µl RNaseA zugesetzt. Zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente wurde die DNA anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.2. Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Agarosegelen. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8 bis 1,8 % (w/v) Agarosegele benutzt. Hierzu wurde ein geeignetes Volumen 1xTBE-Puffer (90 mM Tris pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA pH 8,0) bzw. 1xTAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,5) mit der entsprechenden Menge Agarose versetzt und im Mikrowellenherd erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlen der gelösten Agarose auf ca. 60 °C und Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,4 µg/ml) wurde das Gel in eine horizontale Gelkammer gegossen und nach dem Aushärten mit 1xTBE- bzw. 1xTAE-Laufpuffer überschichtet. Die mit DNA-Probenpuffer (10 mM EDTA pH 8,0, 10 % Glycerin, 0,1 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) versetzten Proben wurden in die von einem Kamm ausgesparten Taschen pipettiert. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde gleichzeitig ein geeigneter

DNA-Fragmentlängenstandard (spezifisch restriktionsfragmentierte (λ DNA) mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 50-140 V. Danach konnten die Nukleinsäurefragmente durch Fluoreszenz unter einem UV-Transilluminator bei 256 nm (IL-350M, Bachofer, Reutlingen) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

3.2.3. Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des kommerziellen Systems "*Easy Pure DNA Purification Kit*" (Biozym). Die entsprechende DNA-Bande wurde unter UV-Durchlicht aus dem TBE-Gel ausgeschnitten und ihr "Volumen" bestimmt, wobei eine Masse von 100 mg einem Volumen von 100 μ l gleichgesetzt wurde. Anschließend wurden dem Gelstück 0,5 Volumina "MELT"-Lösung und 4,5 Volumina "SALT"-Lösung zugegeben und für mindestens 5 min bei 55 °C unter Schütteln inkubiert bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Fünf μ l + 1 μ l/ μ g der erwarteten Ausbeute an DNA wurden an "BIND"-Lösung zugegeben und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur unter häufigem Mischen inkubiert. Die (gebundene) DNA wurde durch kurzes Zentrifugieren pelletiert, mit 1 ml "WASH"-Lösung gewaschen, nochmals durch kurzes Zentrifugieren pelletiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Die gereinigte DNA wurde in 10-20 μ l ddH₂O eluiert und nach erneuter Zentrifugation für 1 min als Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.2.4. Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in einem vierfachen molaren Überschuß mit dem entsprechend geschnittenen Vektor gemischt und mit 3 U T4-DNA-Ligase und 2 μ l 10xLigasepuffer (50 mM Tris pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP) in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l über Nacht bei 15 °C inkubiert. Zehn μ l des Ligationsansatzes wurden in kompetente Bakterien transformiert.

3.2.5. Präparation kompetenter Bakterien (nach Hanahan, 1986)

Eine Kolonie von *E.coli* DH5 α wurde in 10 ml LB-Medium (1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl) über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Einhundert ml SOB-Medium (2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) wurden mit 1 ml dieser Übernachtskultur angeimpft und solange bei 37 °C geschüttelt, bis die optische Dichte bei 560 nm etwa 0,3-0,35 betrug. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Bakterienkultur für 10 min bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde auf Eis vorsichtig in 20 ml eiskaltem STB (100 mM KCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 3 mM HAcCoCl₃, 10 mM K-Mes pH 6,3, 15 % Glycerin) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 2000 g und 4 °C wurden die Bakterien vorsichtig in 4 ml eiskaltem STB resuspendiert. Die nun kompetenten Bakterien wurden entweder direkt transformiert oder in 100 μ l Aliquots bei - 80 °C aufbewahrt.

3.2.6. Transformation kompetenter Bakterien (nach Hanahan, 1986)

Ein 100 µl Aliquot kompetenter Bakterien (siehe 3.2.5.) wurde auf Eis aufgetaut, 10 µl eines Ligationsansatzes oder 10 ng Plasmid-DNA zugemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 90 s Hitzeschock bei 42 °C und 2 min Inkubation auf Eis wurden 3 ml SOC-Medium (2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) zugegeben und unter Schütteln 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 3 min bei 1000 g sedimentiert und das Bakterienpellet in 200 µl SOC-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde auf Selektivagarplatten (LB/Ampicillin-Platten, siehe 3.2.8.) ausgestrichen und zum Wachstum der ampicillinresistenten Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus den resultierenden Kolonien konnten Klone gepickt und zunächst in kleinem Maßstab weiterkultiviert werden. Bakterien mit rekombinanter DNA wurden durch Restriktionsanalyse der in kleinem Maßstab präparierten Plasmid-DNA identifiziert.

3.2.7. Klonierung von PCR-Produkten mit dem "TOPO"-Klonierungssystem (Invitrogen)

Das "TOPO"-Klonierungssystem bietet aufgrund einer schnellen, einstufigen Klonierungsstrategie die Möglichkeit der direkten Insertion von Taq-Polymerase-amplifizierten PCR-Produkten in einen Plasmidvektor. Es beruht auf einer von der DNA-Matrize unabhängigen Aktivität der thermostabilen Taq-Polymerase während PCR-Reaktionen. Diese heftet an alle 3'-Enden von doppelsträngiger DNA ein zusätzliches Desoxyadenosin (A). Da der Vektor pCRTMII-TOPO einzelne 3'-Desoxythymidin (T)-Überhänge besitzt ist es möglich, PCR-Produkte direkt mit diesem zu ligieren. Im "TOPO"-Klonierungssystem waren neben dem Vektor zusätzlich kompetente Bakterien (Top10F' *One Shot Cells*), SOC-Medium (0,5 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt, 2 % (w/v) Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) und β-Mercaptoethanol für die Transformation enthalten. Diese Klonierungsmethode wurde für die Klonierung von RACE-PCR Produkten von mBag-1 (siehe 3.4.2.) angewandt. Jeweils 0,5-2 µl (10 ng/µl) PCR-Produkt wurden für die Ligation eingesetzt. Die Konzentration an PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese, durch Vergleich mit definierten Markermengen ermittelt. Die Ligation wurde wie folgt angesetzt: 0,5-2 µl frisches PCR-Produkt wurden mit ddH₂O auf ein Volumen von 4 µl aufgefüllt. Nach Zugabe und vorsichtigem Mischen von 1 µl Vektor pCRII-TOPO erfolgte die Ligation innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur, so daß unmittelbar im Anschluß direkt mit der Transformation nach Vorschrift des "TOPO"-Klonierungssystems begonnen werden konnte.

3.2.8. Herstellung von Selektivagarplatten

In einem 2 l Erlenmeyerkolben wurden 5 g Hefeextrakt, 10 g Bacto-Trypton, 10 g NaCl und 15 g Bacto-Agar in einem Liter ddH₂O gelöst, und autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 45 °C wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Damit

konnten etwa 30 Agarplatten (9 cm Durchmesser) gegossen werden. Luftblasen wurden durch Überstreichen mit einer Bunsenbrennerflamme entfernt. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten bei 4 °C aufbewahrt.

3.3. DNA-Präparationen

3.3.1. Präparation rekombinanter Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien

3.3.1.1. Präparation kleiner Mengen von Plasmid-DNA ("Mini-Präp")

Eine Bakterienkolonie mit dem entsprechenden Plasmid wurde in 3 ml LB-Selektionsmedium (1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Bakterienkultur wurden 1,5 ml für 5 min bei 5000 g zentrifugiert und das Bakterienpellet in 100 µl GTE-Lösung (50 mM Glucose, 25 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA pH 7,8) resuspendiert. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl alkalischer SDS-Lösung (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) zugegeben, durch dreimaliges Invertieren vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl 3 M NaAc, pH 4,8 und erneutem dreimaligem Invertieren wurde für 5 min bei 10000 g zentrifugiert, um Zellfragmente und chromosomale DNA abzutrennen. Der Überstand wurde Phenol/Chloroform-extrahiert (siehe 3.1.1.). Die in der wässrigen Phase enthaltene Plasmid-DNA wurde schließlich mit Ethanol präzipitiert. Das Präzipitat wurde mit 75 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl ddH₂O oder TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) mit RNase (100 µg/ml) aufgenommen. Zur Analyse der Plasmid-DNA wurden hiervon 10 µl für einen Restriktionsverdau verwendet.

Sollte die DNA-Präparation im kleinen Maßstab zur Sequenzierung eingesetzt werden, wurde alternativ das kommerzielle *WIZARD Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega) eingesetzt. Hierbei wurden ebenfalls von einer Übernacht-Bakterienkultur (siehe oben) 1,5 ml für 5 min bei 5000 g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 250 µl *WIZARD* Resuspensionslösung durch mehrmaliges Invertieren resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl *WIZARD* Lysislösung wurde nach 4-maligem Invertieren für 1-5 min bei Raumtemperatur inkubiert bis das Lysat klar erschien. Nach Zugabe von 10 µl alkalischer Proteaselösung und erneutem 4-maligem Invertieren wurde für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 350 µl *WIZARD* Neutralisierungslösung zugegeben und erneut 4 mal invertiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 10000 g und Raumtemperatur wurde der Überstand auf eine *WIZARD* Zentrifugationssäule gegeben und für 1 min bei 14000 g zentrifugiert. Die auf der Säule zurückgehaltene DNA wurde durch Zugabe von zunächst 750 µl, dann 250 µl *WIZARD* Waschlösung durch Zentrifugation für je 1 min bei 14000 g gewaschen und anschließend mit 50 µl ddH₂O durch erneute Zentrifugation eluiert. Nach Analyse der Plasmid-DNA durch einen Restriktionsverdau wurde die so gewonnene DNA zur Sequenzierung (siehe 3.5.) verwendet.

3.3.1.2. Präparation großer Mengen Plasmid-DNA ("Maxi-Präp")

Die Plasmidpräparation erfolgte durch Ionenaustausch-Säulenchromatographie mit Qiagen-tip-500-Säulen. 250 ml einer über Nacht in LB-Selektionsmedium (1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) inkubierten Bakterienkultur mit dem entsprechenden Plasmid wurden 10 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Resuspension des Bakterienpellets in 10 ml Puffer 1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 µg/ml RNase A) wurden 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS) zugegeben. Die Suspension wurde durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 10 ml 2,6 M KAc pH 4,8 zugegeben, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Ethanol, 0,15 % Triton X-100) äquilibrierte Qiagen-tip-500-Säule gegeben, wobei die Plasmid-DNA an die Säulenmatrix bindet. Nach Durchfluß dieses Überstandes wurde die Säule mit 30 ml Puffer QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Ethanol) gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM MOPS pH 8,2, 15 % Ethanol) eluiert. Durch Zugabe von 12 ml Isopropanol wurde die DNA präzipitiert und durch Zentrifugation für 30 min bei 16000 g und 4 °C pelletiert. Nach Waschen des Pellets mit 75 % Ethanol und Trocknen wurde die DNA in Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) gelöst und die Konzentration bestimmt (siehe 3.1.3.). Die so präparierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.2. Präparation genomischer DNA

Schwanzspitzen (0,1-0,6 cm) von Embryonen oder adulten Mäusen wurden in je 200 µl Lysis-Puffer (100 mM Tris pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2 % (w/v) SDS, 200 mM NaCl, Proteinase K 100 µg/ml) gegeben und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde gut gemischt (Vortex) und 5 min bei 10000 g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die genomische DNA mit Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt (siehe 3.1.2).

3.4. PCR-Techniken

3.4.1. Standard PCR-Protokoll

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden 2,5 µl 2 mM dNTP's, 2,5 µl 10xPCR-Puffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl), 0,2 µl thermostabiler DNA-Polymerase (Taq), Template (10 ng Plasmid DNA bzw. 100-200 ng genomische DNA) und jeweils 10 pmol der entsprechenden Primer in einem Gesamtvolumen von 25 µl gemischt und in einen Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC-225, Biozym, Hameln) eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen der Zyklen richteten sich jeweils nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments, sowie der Schmelztemperatur (T_m für engl.: *melting temperature*) der Amplifikationsprimer und wurden empirisch ermittelt. In der Regel wurde zunächst das Template für eine Minute bei 95 °C denaturiert. Anschließend erfolgten meist 35 der nachfolgend beschriebenen Zyklen:

30 Stunden Denaturierung bei 95 °C; eine Minute Hybridisierung der Primer an das Template bei einer Temperatur, die 3-5 °C unterhalb der errechneten Schmelztemperatur der Amplifikationsprimer (siehe unten) lag; DNA-Synthese bei 72 °C für 1 min pro 1 kb zu amplifizierender DNA. Als Annäherung zur Berechnung der Schmelztemperatur von Amplifikationsprimern gilt folgende Gleichung: $T_m = 20 \times (4 \times G/C + 2 \times A/T) \times n-1$. Hierbei stehen G/C für die Anzahl der hybridisierenden G/C-Basenpaare, A/T für die Anzahl der hybridisierenden A/T-Basenpaare und n für die Gesamtzahl der hybridisierenden Basenpaare.

3.4.2. 5'-RACE-PCR

Die Klonierung 5'-elongierter mBag-1 cDNAs erfolgte mittels des kommerziellen Systems "Marathon-Ready cDNA" (Clontech). Dieses System enthielt einen Pool embryonaler cDNAs (E15,5). Die cDNA-Enden sind hierbei mit speziellen Adaptoren versehen, zu denen sequenzspezifische Adapteroligonukleotide als Primer im System enthalten sind. PCRs erfolgten entweder mit einem sequenzspezifischen Primer und einem Adapter-Primer oder mit zwei sequenzspezifischen Primern entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Sequenzen der eingesetzten Primer sind unter 2.4.2. aufgeführt. Die erhaltenen Reaktionsansätze wurde auf Agarosegelen analysiert (siehe 3.2.2.) und gegebenenfalls mittels "TOPO" kloniert (siehe 3.2.7.) und anschließend sequenziert (siehe 3.5.).

3.4.3. Genotypisierung von "Knock-Out"-Mäusen mittels PCR

Für die Bestimmung des Genotyps der Embryonen oder der geborenen Nachkommenschaft der verwendeten RAR β -, RAR γ - defizienten bzw. RAR $\beta\gamma$ -doppeltdefizienten Mauslinien wurde zunächst aus Schwanzbiopsien der zu untersuchenden Tiere genomische DNA isoliert (siehe 3.3.2.). In der daran anschließenden PCR wurden die Wildtypallele bzw. mutierten Allele der RAR β - und RAR γ -Genloci nachgewiesen.

Zur Untersuchung des RAR β -Genotyps wurden durch Verwendung von Wildtyp-Allelspezifischen Primern (UD96 und UD 97) bzw. Primern, die sequenzspezifisch für das mutierte Allel (UD96 und UD98) sind, 275 bp bzw. 300 bp große Fragmente in einem Reaktionsansatz amplifiziert und auf 1,8 % Agarosegelen nachgewiesen (siehe 3.2.2.). Ein entsprechender Reaktionsansatz enthielt 3 μ l genomische DNA, 2,5 μ l 10xPCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCL pH 8,3, 15 mM MgCl₂), 2,5 μ l 2mM dNTPs, 0,25 μ l 100x BSA (10 mg/ml), 0,25 μ l der entsprechenden Oligos (je 300 μ g/ml UD96, UD97 und UD98), 0,3 μ l Taq-DNA-Polymerase und 19,2 μ l ddH₂O. Die Reaktionsbedingungen waren folgende: 3 min 94 °C, 2 Zyklen 1 min 94 °C, 30 s 55 °C, 30 s 72 °C, 30 Zyklen 15 s 92 °C, 15 s 55 °C, 15 s 72 °C, 5 min 72 °C.

Zur Untersuchung des RAR γ -Genotyps wurde durch Verwendung von Wildtyp-Allelspezifischen Primern (WG60 und WG61) bzw. Primern, die sequenzspezifisch für das mutierte Allel (WG61 und NM9) sind, 1195 bp bzw. 1238 bp große Fragmente in zwei getrennten Reaktionsansätzen amplifiziert und auf 0,8 % Agarosegelen nachgewiesen (siehe

3.2.2.). Ein entsprechender Reaktionsansatz enthielt 3 µl genomische DNA, 2,5 µl 10xPCR-Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 15 mM MgCl₂), 2,5 µl 2mM dNTPs, 0,25 µl 100xBSA (10 mg/ml), 0,25 µl der entsprechenden Oligos (je 300 µg/ml WG60 und WG61 bzw. WG61 und NM9), 0,3 µl Taq-DNA-Polymerase und 19,2 µl ddH₂O. Die Reaktionsbedingungen waren folgende: 3 min 94 °C, 2 Zyklen 1 min 94 °C, 1,5 min 57 °C, 2,5 min 72 °C, 30 Zyklen 30 s 94 °C, 30 s 57 °C, 2 min 72 °C, 5 min 72 °C.

3.5. Sequenzierung von Plasmid-DNA und Auftrennung der Reaktionsprodukte

3.5.1. Sequenzierung von DNA (nach Sanger et al., 1977, modifiziert)

Die zur Sequenzierung verwendete Plasmid-DNA (pCR II-TOPO-Vektor) wurde nach der Isolierung mittels *Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega, siehe 3.3.1.1.) in 100 µl ddH₂O aufgenommen und deren Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (siehe 3.1.3.). Für jeden zu sequenzierenden Klon wurden zwei PCR-Reaktionen angesetzt, um die Sequenz von beiden Seiten der Insertion im "TOPO"-Vektor, d.h. mit Hilfe des T7- bzw. Sp6-Primers, lesen zu können. Für jede dieser beiden Reaktionen wurden jeweils vier PCR-Reaktionen angesetzt, von denen jede 2,5 µl Terminationsmix, der aus 2 µl dGTP Nukleotid-Mastermix (7,5 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 0,5 µl des entsprechenden [α -P³³]-ddNTP ([α -P³³]-ddATP, [α -P³³]-ddCTP, [α -P³³]-ddGTP oder [α -P³³]-ddTTP) besteht, enthält. Jeder dieser PCR-Reaktionsansätze enthielt somit 0,25 µl des entsprechenden Primers (2 pmol), 0,5 µl 10xReaktionspuffer (260 mM Tris-HCl pH 9,5, 65 mM MgCl₂), 3,75 µl DNA (1-3 µg), 0,5 µl Taq-Polymerase (4 U/µl) und 2,5 µl Terminationsmix. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC-225, Biozym, Hameln) unter folgenden Bedingungen: 30 Sekunden 95 °C, 30 Sekunden 55 °C, 1 Minute 72 °C für 45 Zyklen. Anschließend wurden die Reaktionen durch Zugabe von je 4 µl Stop-Lösung (95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylen Cyanol FF) abgestoppt und bei -20 °C bis zur Auftrennung der Reaktionsprodukte aufbewahrt.

3.5.2. Auftrennung der Sequenzierungsreaktion durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse wurden die im Verlauf der Sequenzierungsreaktion entstandenen DNA-Fragmentgemische in denaturierenden 6 % Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Um die DNA-Fragmente in denaturiertem Zustand zu halten, wurden Sequenzgele mit einer hohen Harnstoffkonzentration von 7 M hergestellt. Unter Verwendung einer Sequenzierapparatur (SequiGen GT *Sequencing Cell*, BioRad, München) wurde die Elektrophorese bei einer hohen Leistung (100 W) durchgeführt, um die erforderliche Temperatur von 45-50 °C aufrechtzuerhalten. Die Elektrophoresedauer richtete sich nach dem Ausmaß der gewünschten Sequenzinformation und betrug zwischen 1,5 und 4,5 Stunden. 150 ml einer Gellösung (6 % (w/v) Acrylamid, 0,16 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 8 M

Harnstoff in 1xTBE; 1xTBE: 90 mM Tris pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA pH 8,0) wurden mit 900 µl 10 % (w/v) APS und 90 µl TEMED versetzt und nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei, durch zwei konisch zulaufende 0,2 bis 0,4 mm dicke Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Nach Einsetzen eines Taschenformers ("Haifischkamm") erfolgte die Polymerisation des Gels in horizontaler Lage über Nacht. Das polymerisierte Gel wurde in eine Vertikalgelapparatur gespannt und oberes und unteres Pufferreservoir mit 1xTBE gefüllt. Nach einem 30 minütigen Vorlauf des Gels wurden 3 µl der zuvor 20 min bei 80 °C denaturierten Proben in die Taschen überführt. Nach Beendigung der Elektrophorese und Abkühlen des Gels auf Raumtemperatur wurden die beiden Glasplatten voneinander getrennt. Das Gel wurde auf 3MM-Papier aufgezogen, für 2 h bei 80 °C im Vakuum getrocknet und einem Röntgenfilm (Hyperfilm-MP, Amersham) über Nacht bei Raumtemperatur exponiert.

3.6. Allgemeine Methoden zur Behandlung von Proteinen

3.6.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (Lowry et al., 1951)

Die Bestimmung der Proteinmenge in Zell- oder Gewebeextrakten erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951). Für das Erstellen einer Eichkurve wurden 0, 10, 20, 30, 40 und 50 µl einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml) mit Lowry-Reagenz I (2 % (w/v) Na₂CO₃, 0,1 M NaOH) auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt. Von den Proteinextrakten wurden je 5 µl mit 495 µl Lowry-Reagenz I gemischt. Nach Zugabe von 1 ml Lowry-Reagenz IV (100 Volumen Lowry-Reagenz I, 1 Volumen 2 % (w/v) Na-K-Tartrat, 1 Volumen 1 % (w/v) CuSO₄) wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden unter sofortigem Mischen 100 µl 50 % Folin-Lösung zugegeben. Nach Inkubation für 5 min bei 37 °C im Dunkeln wurden jeweils 300 µl der Proben in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 600 nm gegen den Leerwert ohne Protein gemessen (Multiscan Plus MK II, Labsystems, Finnland). Anhand der Eichkurve wurde dann die Proteinmenge in den Proben bestimmt.

3.6.2. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE, Laemmli, 1970)

Polyacrylamidgelen zur Auftrennung von Proteinen bestanden aus einem 10 oder 14 % Trenngelen und einem 5 % Sammelgelen und wurden zwischen zwei durch Kunststoff-Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Die Glasplatten wurden vor dem Gießen mit 2 % Agarose abgedichtet. Für eine 10 oder 14 % Trenngellösung wurden 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 10 oder 14 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8) durch Zugabe von 0,1 % (w/v) APS und 0,05 % TEMED polymerisiert. Das Gel wurde bis zu einer Höhe von ca. 3 cm unterhalb des oberen Randes gegossen mit Isopropanol überschichtet. Für die 5 % Sammelgellösung wurden 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS und 5 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30/0,8) mit 0,1 % (w/v) APS und 0,1 % TEMED versetzt. Nach Entfernen des Isopropanols wurde das Sammelgelen

auf das Trenngel gegossen und ein geeigneter Kamm zum Aussparen der Probenaschen eingesetzt. Nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in eine vertikale Laufapparatur eingespannt. Die aufzutrennenden Proteinproben wurden in Laemmli-Probenpuffer (80 mM Tris pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 10 % Glycerin, 2 % β -Mercaptoethanol, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen, für 10 min bei 95 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und in die vom Kamm ausgesparten Taschen pipettiert. Um das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können, wurde ein geeigneter Molekulargewichts-Standard (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) mit vorgefärbten Proteinen auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) bei 20 mA bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, anschließend bei 35 mA bis die Bromphenolblau-Bande den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Wurden ^{35}S -Methionin markierte Proteine aufgetrennt, so wurde das Gel auf Whatman 3MM Papier aufgezogen und auf einem Geltrockner (BioRad Laboratories GmbH, München) bei 80 °C getrocknet. Das Gel wurde dann über Nacht bei -80 °C einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia) exponiert. Ansonsten wurden nach der Elektrophorese die Proteine im Gel entweder mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt (siehe 3.6.3.) oder auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 3.8.).

3.6.3. Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Durch Coomassie-Brillant-Blau-Färbung wurden Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht. Hierzu wurde das Gel 15 min in Färbelösung (0,2 % (w/v) Coomassie-Brillantblau, 50 % Methanol und 7,5 % Essigsäure) geschwenkt. Die Entfärbung erfolgte in 50 % Methanol und 7,5 % Essigsäure über mehrere Stunden, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel auf Whatman 3MM Papier auf einem Geltrockner (BioRad Laboratories GmbH, München) bei 80 °C getrocknet.

3.7. Präparation und Auftrennung von Proteinextrakten für den *Western blot*

3.7.1. Präparation und Auftrennung von Proteinextrakten aus Zellen

Für *Western blot* Analysen wurden die Zellen auf 9 cm Kulturschalen ausgesät. Die Kultivierung und Behandlung der Zellen erfolgte wie im einzelnen im Ergebnisteil angegeben. Nach der Behandlung wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl_2 , 0,6 mM MgCl_2 , 5 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4) gewaschen. Als Lysispuffer wurden 400 μl 2xLaemmli-Probenpuffer (0,16 M Tris pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 20 % Glycerin, 4 % β -Mercaptoethanol, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden während Inkubation auf Eis geerntet und in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Zum Scheren der DNA wurden die Proben auf Eis sonifiziert (Branson *Sonifier Cell Disruptor* B15, G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd) und die Zelltrümmer 5 min bei 10000 g und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proteinextrakte für 5 min bei 95 °C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei

-80 °C aufbewahrt. Zur Analyse dieses Proteinextraktes wurden gleiche Proteinmengen in 25-50 µl Volumen in einem 10 bzw. 14 % SDS-Polyacrylamidgel (siehe 3.6.2.) aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde ein Teil des Gels, der nicht auf eine Membran transferiert werden sollte, mit Coomassie-Blau gefärbt (siehe 3.6.3.), um zu bestätigen, daß bei unterschiedlichen Proben jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt worden waren. Alternativ hierzu wurden Zellen meist in 2xLaemmli-Probenpuffer geerntet, der zunächst kein β -Mercaptoethanol und kein Bromphenolblau enthielt. Nach Sonifizieren und Denaturieren wurde dann die Proteinmenge mittels Lowry bestimmt (siehe 3.6.1.) und anschließend die entsprechende Menge β -Mercaptoethanol und Bromphenolblau zu den Extrakten zugegeben.

Das SDS-Polyacrylamidgel bzw. der das zu analysierende Protein enthaltene Gelbereich wurde für den *Western blot* verwendet.

3.7.2. Präparation und Auftrennung von Proteinextrakten aus embryonalen Geweben

Die Embryonen wurden wie unter 3.11.1. beschrieben isoliert, die entsprechenden Gewebe präpariert und bei -80 °C aufbewahrt. Das Gewebematerial wurde zunächst in flüssigem Stickstoff pulverisiert und nach Abdampfen des Stickstoffs in einen vorgekühlten Dounce-Homogenisator überführt. In einem geeigneten Volumen 2xLaemmli-Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol und Bromphenolblau (0,16 M Tris pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 20 % Glycerin) wurde durch 15 Stöße homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wurde in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt und zum Scheren der DNA auf Eis sonifiziert (Branson *Sonifier Cell Disruptor* B15, G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd). Zelltrümmer wurden für 10 min bei 10000 g und 4 °C abzentrifugiert, die Proteinextrakte für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis inkubiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Lowry (siehe 3.6.1.) wurden 4 % β -Mercaptoethanol und 0,02 % (w/v) Bromphenolblau zu den Extrakten zugegeben und diese bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Analyse solcher Proteinextrakte wurden gleiche Proteinmengen in 10 bzw. 14 % SDS-Polyacrylamidgelen (siehe 3.6.2.) aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde ein Teil des Gels, der nicht auf eine Membran transferiert werden sollte, mit Coomassie-Blau gefärbt (siehe 3.6.3.) um zu bestätigen, daß bei unterschiedlichen Proben jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden.

Das SDS-Polyacrylamidgel bzw. der das zu analysierende Protein enthaltende Gelbereich wurde für den *Western blot* verwendet.

3.8. Analyse von Proteinen durch Transfer auf Membranen und Detektion durch spezifische Antikörper (*Western blot*)

Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden durch Elektrotransfer mit Hilfe einer Naßtransferkammer (Trans-Blot, BioRad Laboratories GmbH, München) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Zuvor wurde die Membran 1 min in

Methanol aktiviert, 5 min in ddH₂O gewässert und für mindestens 5 min in Transferpuffer (48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 10 % Methanol) äquilibriert. Mit Hilfe eines Trägers wurde die Membran zusammen mit dem Gel luftblasenfrei zwischen je 3 Lagen Whatman 3MM-Papier feucht in Transferpuffer zusammengebaut. Der Träger wurde dann senkrecht in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer so eingesetzt, daß die Membran zur Anode hin orientiert war. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei 4 °C für mindestens 4 h mit 300 mA.

Nach beendetem Transfer wurde die Membran kurz in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 2-16 h bei Raumtemperatur in PBS mit 5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,2 % Tween-20 geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper (polyklonaler Kaninchen anti Bag-1L (N15) Antikörper bzw. Polyklonaler Kaninchen anti Bag-1 (C16) Antikörper in den Verdünnungen 1:400 bzw. 1:1000 in PBS mit 1 % (w/v) Magermilchpulver, 0,2 % Tween-20) luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schwenken inkubiert. Die Membran wurde dann viermal für 10 min in PBS mit 0,2 % Tween-20 gewaschen und mit dem Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper (1:2000 verdünnt in PBS mit 1 % (w/v) Magermilchpulver, 0,2 % Tween-20) im Plastikbeutel unter Schwenken für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen für jeweils 10 min in PBS mit 0,2 % Tween-20 und einmaligem Waschen in PBS wurden die spezifisch erkannten Proteinbanden mit Hilfe des an den Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörpers durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Die Chemolumineszenz basiert auf der Oxidation eines Substrates, bei der Licht freigesetzt wird und die in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid von Meerrettichperoxidase katalysiert wird. Hierzu wurde die Membran mit 3 ml einer frisch zubereiteten 1:1-Mischung der ECL Western-Blot Nachweisreagenzien (RPN 2106, Amersham Pharmacia) beschichtet und in Folie eingeschlagen. In der Dunkelkammer wurde dann so lange ein Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia) exponiert, bis die Proteinbanden nach Entwicklung des Films gut sichtbar waren.

3.9. Zellkultur

Alle eukaryontischen Zelllinien wurden in einem Brutschrank (Heraeus, Stuttgart) in befeuchteter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturschalen kultiviert. Die Arbeitsschritte mit Zelllinien erfolgten soweit möglich an einer Sterilbank (Glatt AG, Schweiz). Medien, Puffer, Glaswaren und sonstiges Verbrauchsmaterial für die Zellkultur wurde vor Gebrauch sterilisiert (120 °C, 1,4 bar, 20 min).

3.9.1. Passagieren von Zellen

Bei allen verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärent wachsende Zellen. Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz von der Zellkulturschale abgelöst und in geringerer Dichte erneut ausgesät. Hierzu wurden alle Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Das Medium wurde abgesaugt und die Kulturschale mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM

CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gespült. Je nach verwendeter Zelllinie wurde 0,05 bzw. 0,25 % Trypsinlösung (0,1 ml/cm Durchmesser der Kulturschale) auf die Zellen gegeben. Bis zum Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurde diese in den Brutschrank gestellt (1-5 min). Anschließend wurden die Zellen je nach Größe der Kulturschale in 5-10 ml Kulturmedium aufgenommen und vor dem Ausplattieren aus dem trypsinhaltigen Medium für 3 min bei 300 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und in der jeweils gewünschten Verdünnung auf neue Kulturschalen verteilt. Für ein Experiment wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Anzahl an Zellen ausgesät.

3.9.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden trypsinisiert und die erhaltene Zellsuspension 3 min bei 400 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in kaltem (4 °C) Einfriermedium (Kulturmedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO) resuspendiert (ca. 1 ml pro 5x10⁶ Zellen). Jeweils 1 ml wurde in ein Einfriereröhrchen gegeben und zunächst 45 min auf Eis inkubiert; in einem Styroporbehälter wurden die Zellen dann über Nacht auf -80 °C abgekühlt und schließlich in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt.

Das Auftauen von eingefrorenen Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Die Zellen wurden sogleich in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, 3 min bei 400 g zentrifugiert und zur Kultivierung erneut in Medium aufgenommen.

3.9.3. Behandlung von Zellen mit Retinsäure

Von all-trans Retinsäure wurden 10⁻² M Stocklösungen in DMSO angesetzt. Hiervon wurden 10 µl mit 990 µl 80 % Ethanol zu einer 10⁻⁴ M Gebrauchslösung verdünnt. Von dieser wurden jeweils 10 µl auf eine 9 cm Zellkulturschale mit 10 ml Medium gegeben; dies entsprach einer Endkonzentration von 10⁻⁷ M. Als Kontrollbehandlung wurde jeweils die entsprechende Menge DMSO in 80 % Ethanol verabreicht.

3.9.4. Transiente Transfektion nach der Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode (nach Graham und Van der Eb, 1973)

Diese Methode wurde verwendet, um Cos-7 Zellen zu transfizieren. Einen Tag vor der Transfektion wurden 7x10⁵ Zellen pro 9 cm Kulturschale im entsprechenden Kulturmedium ausgesät. Es wurden jeweils 10 µg Plasmid-DNA pro Kulturschale transfiziert. Die Präzipitatbildung erfolgte mit einem Volumen von 500 µl pro Kulturschale. Hierzu wurde die DNA zunächst in ddH₂O gegeben (ddH₂O-Volumen: 250 µl abzüglich der Volumina der DNA- und der CaCl₂-Lösung). Dann wurden 250 µl 2xHBS (274 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 1,4 mM Na₂HPO₄, 1 mM D-Glucose, 40 mM HEPES pH 7,05) zugegeben und die Lösung gut gemischt. Unter Schütteln wurden dann 25 µl 2,5 M CaCl₂ zugetropft und das Präzipitat für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Präzipitat (500 µl) wurde dann direkt auf das Medium in der Zellkulturschale der zu

transfizierenden Zellen zugetropft und über Nacht auf den Zellen belassen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit je 10 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und dann neues Medium zugegeben. Die Zellen wurden nach 24 h geerntet (siehe 3.7.1.) und im *Western blot* (siehe 3.8.) auf Expression des Plasmids überprüft.

3.10. Tierexperimentelle Methoden

3.10.1. Verpaaren der Mäuse und Bestimmung der embryonalen Entwicklungsstadien

Um Embryonen eines definierten Embryonalstadiums zu erhalten, wurden weibliche Mäuse des entsprechenden Mausstammes mit männlichen Tieren des entsprechenden Mausstammes am späten Nachmittag verpaart. Bei Vorhandensein eines Vaginalpfropfs (engl.: *vaginal plug*) am folgenden Morgen wurde der Mittag als Stadium der Embryonalentwicklung 0,5 dpc (0,5 *days post coitum*) angenommen, da die cervixstimulierte Ovulation der weiblichen Mäuse, die in einem 12 Stundentag-Rhythmus gehalten wurden, in der Mitte der Dunkelphase stattfindet.

Für eine genauere Bestimmung des Embryonalstadiums wurden die entsprechenden Tiere für jeweils 1,5 Stunden miteinander verpaart und anschließend auf das Vorhandensein eines Vaginalpfropfs untersucht. Bei dieser Methode konnte das Embryonalstadium auf +/- 45 min genau bestimmt werden.

3.10.2. Applikation von Retinsäure an schwangere Mäuse

Am Tag 12,0 dpc (Tage nach Vaginalpfropf, siehe 3.10.1) wurde schwangeren Mäusen 50 mg / kg Körpergewicht all-trans Retinsäure über eine Magensonde oral verabreicht. Hierzu wurde die entsprechende Menge Retinsäure in 50 µl DMSO gelöst. Diese Lösung wurde in 450 µl Speiseöl aufgenommen, so daß pro Tier ein Volumen von 500 µl oral verabreicht wurde. Als Kontrolle wurden 50 µl DMSO in 450 µl Speiseöl gegeben. Um die Resorption der Retinsäure zu erleichtern, wurden die Tiere 12 Stunden vor oraler Verabreichung der Retinsäure ohne Futter gehalten. Die behandelten Tiere wurden nach 6 bzw. 8 Stunden getötet und die Embryonen isoliert (siehe 3.11.1.).

3.10.3. Generierung RARβγ-doppeltdefizienter Mausembryonen

Der Phänotyp RARβγ-doppeltdefizienter Mäuse ist embryonal letal; die Embryonen sterben spätestens am Tag 18,5 *post coitum* (Ghyselinck et al., 1997). Die RARβ- bzw. RARγ-defizienten Tiere hingegen sind lebensfähig. Die Generierung der RARβγ-doppeltdefizienten Embryonen erfolgte daher in drei Schritten. Die notwendigen Genotypisierungen erfolgten wie unter 3.4.3. beschrieben. Die von Pierre Chambon (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) CNRS/INSERM/ULP, Illkirch, Frankreich, siehe 2.7.) zur Verfügung gestellten Tiere (zwei

adulte männliche, homozygot RAR β -defiziente und zwei adulte weibliche, heterozygot RAR γ -defiziente Mäuse) dienen zum Aufbau einer Zuchtpopulation RAR $\beta^{+/-}$ bzw. RAR $\gamma^{+/-}$ heterozygot defizienter Tiere (Schritt 1). Diese wurden untereinander gekreuzt, so daß u.a. RAR $\beta^{+/-}$ /RAR $\gamma^{+/-}$ -heterozygot doppeldefiziente Tiere geboren wurden (Schritt 2). Diese wurden dann im dritten Schritt untereinander gekreuzt, so daß u.a. die zur Analyse erforderlichen Embryonen der Genotypen RAR $\beta^{+/-}$ /RAR $\gamma^{-/-}$ und RAR $\beta^{-/-}$ /RAR $\gamma^{-/-}$ und die Wildtyp-Wurfskontrollen (RAR $\beta^{+/+}$ /RAR $\gamma^{+/+}$) gewonnen werden konnten. Zur Verdeutlichung der drei erforderlichen Schritte dient nachfolgendes Kreuzungsschema. Aufgrund der Hypofertilität der Tiere (Ghyselinck et al., 1997) wurde ausschließlich wie beschrieben vorgegangen.

Schritt 1:

RAR $\beta^{-/-}$ X C57BL/6	⇒	RAR $\beta^{+/-}$	(1)
RAR $\gamma^{+/-}$ X C57BL/6	⇒	RAR $\gamma^{+/-}$	(1/2)
		RAR $\gamma^{+/+}$	(1/2)

Schritt 2:

RAR $\beta^{+/-}$ X RAR $\gamma^{+/-}$	⇒	RAR $\beta^{+/+}$ / RAR $\gamma^{+/+}$	(1/4)
		RAR $\beta^{+/+}$ / RAR $\gamma^{+/-}$	(1/4)
		RAR $\beta^{+/-}$ / RAR $\gamma^{+/+}$	(1/4)
		RAR $\beta^{+/-}$ / RAR $\gamma^{+/-}$	(1/4)

Schritt 3:

RAR $\beta^{+/-}$ / RAR $\gamma^{+/-}$ X RAR $\beta^{+/-}$ / RAR $\gamma^{+/-}$	⇒	RAR $\beta^{+/+}$ / RAR $\gamma^{-/-}$	(1/16)
		RAR $\beta^{+/+}$ / RAR $\gamma^{+/-}$	(2/16)
		RAR$\beta^{+/+}$ / RAR$\gamma^{+/+}$	(1/16)
		RAR $\beta^{+/-}$ / RAR $\gamma^{+/+}$	(2/16)
		RAR $\beta^{+/-}$ / RAR $\gamma^{+/-}$	(4/16)
		RAR$\beta^{+/-}$ / RAR$\gamma^{-/-}$	(2/16)
		RAR $\beta^{-/-}$ / RAR $\gamma^{+/+}$	(1/16)
		RAR $\beta^{-/-}$ / RAR $\gamma^{+/-}$	(2/16)
		RAR$\beta^{-/-}$ / RAR$\gamma^{-/-}$	(1/16)

3.11. Allgemeine histologische Techniken

3.11.1. Isolierung und Fixieren von Embryonen und Geweben

Schwangere Mäuse wurden zur Isolation der Embryonen durch cervikale Dislokation getötet und median an der Peritonealhöhle aufgeschnitten. Der Uterus mit den Implantationen wurde entnommen und in eiskaltes PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) überführt. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Binokular (Wild M 10, Leica, Bensheim). Mit einer Schere wurde der Uterus zwischen den einzelnen Implantationen durchtrennt. Mit zwei

#5 Uhrmacherpinzette wurde das Uterusgewebe vorsichtig entfernt. Die Föten wurden von sämtlichen embryonalen Hüllen (Dottersack und Amnion) befreit, sowie die Plazenten an der Nabelschnur entfernt. Die Embryonen bzw. die entsprechenden präparierten Gewebe wurden 2 mal 5 min in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und über Nacht bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd in PBS* (PBS* = PBS, Ca²⁺- und Mg²⁺-frei) fixiert. Anschließend wurden die Embryonen drei mal 5 min in PBS* gewaschen und schrittweise (25, 50, 75, 100, 100 % Methanol in PBS*) in Methanol überführt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Embryonen bzw. isolierte Organe oder Gewebe, die für Ganzpräparat-Hybridisierungen vorgesehen waren, wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C in 100 % Methanol aufbewahrt. Probenmaterial, das für histologische Schnitte vorgesehen war, wurde um eine vollständige Dehydrierung zu vermeiden, bei -20 °C in 75 % Methanol in PBS* aufbewahrt.

3.11.2. Einbetten von Embryonen und Geweben und Anfertigen von histo-logischen Schnitten

Die fixierten Embryonen wurden mit einer Pinzette in eine Einbettkassette transferiert und in einem Gewebeprozessor (Shandon Hypercenter XP, Frankfurt) in folgenden Schritten mit Gewebewachs perfundiert:

Ethanol (100 %)	3 x 30 min
Xylol	2 x 30 min
Histowax bei 60 °C	2 x 40 min

Die angegebenen Zeiten wurden für isolierte Organe und Gewebe entsprechend modifiziert. Anschließend wurden die Embryonen bzw. die isolierten Organe oder Gewebe mit Hilfe eines Gewebeeinbettautomaten (Leica EG1160, Leica, Bensheim) in Wachs eingebettet. Hierzu wurden diese aus den Einbettkassetten herausgenommen und in auf 59 °C vorgewärmte Einbettformen gelegt. Die Einbettformen wurden mit flüssigem Wachs aufgefüllt und eine Haltekassette aufgedrückt. Nach Erkalten des Wachses wurden die Wachsblöcke aus den Einbettformen genommen. Das Loslösen des Wachsblockes aus der Einbettform wurde, nachdem das Wachs auf Raumtemperatur abgekühlt war, durch Abschrecken auf Eis unterstützt.

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden die Wachsblöcke in die Halterung eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom 2035, Reichert und Jung, Nußloch) eingespannt und parallel zum Messer ausgerichtet. Es wurden Schnitte von 7 µm angefertigt. Diese wurden in einem Wasserbad bei 42 °C geglättet und auf beschichteten Objektträger (siehe 3.13.1.) transferiert.

3.12. Immunhistochemie (IHC)

3.12.1. Nachweis von Proteinen an Gewebeschnitten

Der immunhistologische Nachweis von Proteinen erfolgte an Paraformaldehyd-fixierten Paraffinschnitten (siehe 3.11.2.). Diese wurden zunächst durch zweimalige Inkubation für je 5 min in Xylol deparaffiniert. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min in Ethanol wurden die Gewebeschnitte über eine absteigende Ethanolreihe stufenweise rehydriert (je 3 min in 95 %, 70 %, 50 % Ethanol, 3 mal je 3 min in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄). Um eine bessere Zugänglichkeit des Antigens für den Primärantikörper im Gewebe zu erreichen, wurden die Gewebeschnitte zunächst in vorgewärmtes PBS überführt und bei 37 °C für 5 min präinkubiert, um dann 15 min in 0,25 % zitratgepufferter Trypsinlösung bei 37 °C inkubiert zu werden. Nach dreimaligem Waschen für je 3 min in PBS erfolgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur in 2 N HCl. Während dreimaligem Waschen für je 3 min in PBS wurden die einzelnen Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem Wachsstift umrandet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte für 15 min in 10 % Ziegen Serum in PBS inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper¹⁾ in 10 % FCS / 1 % Ziegen Serum in PBS über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer. Nach dreimaligem Waschen für je 3 min in PBS wurde mit einem biotinylierten Zweitantikörper²⁾ in 10 % FCS in PBS für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS für je 3 min wurden endogene Peroxidasen durch fünfminütige Inkubation in 3 % H₂O₂ blockiert. Anschließend wurde wiederum dreimal für je 3 min in PBS gewaschen. Während einer Inkubation für 30 min mit Vectastain Peroxidase Standard Lösung ABC (Vector Alexis) wurde der an den Erstantikörper gebundene Zweitantikörper mit Streptavidin-Peroxidase komplexiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 3 min erfolgte die Visualisierung durch eine Farbreaktion mit Vectastain AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol, Vector Alexis) als Substrat. Der Verlauf dieser Reaktion wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und nach 5-10 min durch Spülen in ddH₂O gestoppt. Nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die Gewebeschnitte mit wässrigem Einbettmedium (Immu-Mount, Shandon) eingedeckelt. Die Präparate wurden anschließend mit einem Zeiss Axioskop-Mikroskop (Zeiss, Jena) analysiert und mit einer Digitalkamera (ProgRes 3012, Jenoptik, Jena) photographiert. Für die Analyse von kleinen Vergrößerungen wurde das Binokular Wild M 10 (Leica, Bensheim) verwendet.

Anmerkungen:

Verwendete Antikörper und deren Verdünnungen:

- 1) Erstantikörper: - polyklonaler Kaninchen anti Bag-1L (N15, siehe 2.5.);
 verwendete Verdünnung: 1:4.
 - polyklonaler Kaninchen anti Bag-1 (C16, siehe 2.5.);
 verwendete Verdünnung: 1:40.
- 2) Zweitantikörper: - biotinylierte Ziegen anti Kaninchen IgG (siehe 2.5.);
 verwendete Verdünnung: 1:100.

3.12.2. *In situ* Detektion apoptotischer Zellen an Gewebeschnitten (TUNEL)

Der Nachweis basiert auf der Extension freier 3'-OH-Enden von DNA durch das Enzym Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT). Die an die DNA gefügten Nukleotide sind mit Digoxigenin markiert und werden mit einem an Meerrettichperoxydase konjugierten, gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper nachgewiesen. Verwendet wurde das Apoptag-Kit der Firma Appligene gemäß dem Herstellerprotokoll.

Der immunhistologische Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte an Paraformaldehyd-fixierten Paraffinschnitten (siehe 3.10.2.). Diese wurden zunächst durch zweimalige Inkubation für je 5 min in Xylol deparaffiniert. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min in Ethanol wurden die Gewebeschnitte über eine absteigende Ethanolreihe stufenweise rehydriert (je 3 min in 95 %, 70 %, 50 % Ethanol, 2 mal je 5 min in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄). Um eine bessere Zugänglichkeit des Enzyms TdT im Gewebe zu erreichen, wurden die deparaffinierten Schnitte zunächst für 15 min bei Raumtemperatur in Proteinase K (20 µg/ml in PBS) inkubiert. Nach viermaligem Waschen in ddH₂O für je 2 min wurden endogene Peroxidasen durch eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur in 3 % H₂O₂ in PBS inaktiviert. Anschließend wurden nach zweimaligem Waschen für je 5 min in PBS die einzelnen Schnitte mit einem Wachsstift (Dakopen) umrandet, in 30 µl Äquilibriumspuffer (Appligene) pro 2 cm² Gewebe äquilibriert und schließlich in 27 µl Enzym-Mix pro 2 cm² Gewebe für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Enzym-Mix bestand pro Schnitt aus 2,5 µl ddH₂O, 5,5 µl TdT-Enzym sowie 19 µl Reaktionspuffer (Appligene), der u.a. die markierten Nukleotide enthält. Als Positiv-Kontrolle wurden jeweils Leberschnitte mitgeführt, da in der Leber jederzeit Apoptose stattfindet. Als Negativ-Kontrolle wurden parallel hierzu Schnitte mit H₂O in Reaktionspuffer (3:10) versehen. Die Reaktion wurde durch dreimaliges Waschen mit Stop/Wasch-Puffer (Appligene) bei 37 °C beendet. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für je 5 min in PBS gewaschen und für 30 min mit 27 µl an Peroxidase konjugierten anti-Digoxigenin Antikörper pro 2 cm² Gewebe in einer Feuchtkammer bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte für 3-6 min mit dem Farbreagenz DAB (Diaminobenzidin, Anti-Digoxigenin Peroxidase Konjugat) inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen in ddH₂O wurde die Reaktion abgestoppt. Nach Gegenfärbung der Gewebe mit Methylgrün wurden die Gewebe stufenweise dehydriert und dreimal mit Xylol gewaschen. Anschließend wurden Deckgläschen mit dem Schnelleindeckmittel Entellan montiert.

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen (braune Färbung) an der Gesamtzellzahl wurden bei 400-facher Vergrößerung 10 Gesichtsfelder pro Schnitt ausgezählt.

3.13. Radioaktive *In situ* Hybridisierung an Gewebsschnitten (nach Wilkinson und Green, 1990)

3.13.1. Behandlung von Objektträgern, Deckgläsern, Glaskästen und Färbegestellen

Die Objektträger wurden durch aufeinanderfolgendes Eintauchen in 10 % HCl / 70 % Ethanol, ddH₂O und 96 % Ethanol gereinigt und 10 min bei 150 °C getrocknet. Die Beschichtung der Objektträger erfolgte durch Eintauchen für 10 s in eine 2 % TESP/Aceton-Lösung. Nach zweimaligem Waschen in 100 % Aceton und einmal Waschen in ddH₂O wurden die Objektträger über Nacht bei 42 °C im Ofen getrocknet.

Die Deckgläser wurden in eine Silikon-Lösung (Serva, Heidelberg) getaucht und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie in 100 % Ethanol durch kurzes Eintauchen gewaschen und ebenfalls bei Raumtemperatur getrocknet. Die Deckgläser wurden in einem Becherglas gesammelt und im Ofen bei 160 °C für 2 h gebacken. Zur Beseitigung von Spuren von RNase wurden die Glaskästen und Glasfärbegestelle im Ofen bei 250 °C für mindestens vier Stunden gebacken.

3.13.2. Radioaktive Markierung von Bag-1 RNA durch *in vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription (siehe unten) zur Herstellung von *antisense* und *sense* RNA-Sequenzen wurde mit einem Transkriptionsvektor (Bluescript pBSIIS⁺, Stratagene) durchgeführt.

Ein carboxyterminales (C-terminales) Fragment der mBag-1 cDNA (659 bp, EcoRI und NotI) wurde zwischen die im Transkriptionsvektor enthaltenen Promotorsequenzen für zwei Phagen-RNA-Polymerasen (T3 und T7) kloniert (siehe 2.3.2.). Durch Linearisierung der Transkriptionsplasmide wurde der nicht für die Transkription benötigte Promotor von der cDNA-Sequenz abgetrennt. Dadurch konnten durch zwei Linearisierungsansätze von einem Transkriptionsvektor zwei Matrizen hergestellt werden, die jeweils für die *Sense*- oder *Antisense*-Transkription benutzt wurden. Der mit EcoRI linearisierte Vektor bildete die Matrize für die T7-RNA-Polymerase, es wurden *Antisense*-Transkripte gewonnen. Linearisierung des Vektors mit NotI führte zur Matrize für die T3-RNA-Polymerase, es wurden *Sense*-Transkripte zur Kontrolle erzeugt.

Zur radioaktiven Markierung des Transkriptes wurde [$\alpha^{35}\text{S}$]-UTP als Nukleotid verwendet. In einem 20 μl Transkriptionsansatz wurden 200 ng der entsprechenden DNA-Matrize in 1xTSC-Puffer (40 mM Tris pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 10 mM NaCl, 4 mM Spermidin, 50 $\mu\text{g/ml}$ BSA) mit 20 mM DTT, 2 U RNasin, 625 μM rNTPs (ohne UTP), 50 μCi [$\alpha^{35}\text{S}$]-UTP und 30 U Phagenpolymerase (T7 bzw. T3) für 120 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 7,5 μg tRNA und 3 U RNase-freier DNase-I wurde die Plasmid-DNA für 15 min bei 37 °C verdaut. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion, um die Proteine zu extrahieren. Das RNA-Transkript wurde zur Entfernung nicht inkorporierter Nukleotide zweimal mit 2 M NH₄OAc und 2,5 Volumina Ethanol gefällt. Nach der letzten Zentrifugation (10 min bei 10000 g) wurde

das Pellet getrocknet und in 50 µl 100 mM DTT aufgenommen. Davon wurde 1 µl in 3 ml Szintillationslösung in einem Szintillationszähler (Kontron Analytical, Schweiz) gemessen; 2 µl wurden auf einem denaturierenden Acrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die restliche Probe wurde in 2 M NH₄OAc und 2,5 Volumina Ethanol aufgenommen und bis zum Gebrauch bei -80 °C aufbewahrt.

3.13.3. Vorbehandlung der Gewebeschnitte ("Prähybridisierung")

Bei dieser Behandlung wurden die Gewebeschnitte (siehe 3.11.2.) für die Hybridisierung mit der RNA-Probe so vorbereitet, daß die aufgetragene Probe in das Gewebe eindringen konnte, unspezifische Bindungen vermieden wurden und das RNA:RNA-Hybrid nicht aus dem Gewebe diffundieren konnte.

Die Objektträger mit Gewebeschnitten, die zur Hybridisierung vorgesehen waren, wurden in ein Glasfärbegestell transferiert. Die Prähybridisierung der Schnitte erfolgte durch Eintauchen der Gestelle in die mit 250 ml der folgenden Lösungen vorbereiteten Glaskästen: Um die Schnitte zu entwachsen, wurden die Färbegestelle je 2 x 10 min in Xylol inkubiert. Durch die folgende absteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte rehydriert (100 %, 95 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %, 30 % Ethanol, je 2 min). Nach zwei Waschstritten in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) und 0,83 % NaCl für je 5 min wurden die Schnitte 20 min in 4 % Paraformaldehyd in PBS (Ca²⁺- und Mg²⁺-frei) fixiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS für je 5 min erfolgte ein partieller Verdau der Gewebe mit Proteinase K (10 mg/ml, Endkonzentration: 500 µl / 250 ml) in 20 mM Tris pH 4,7, 1 mM EDTA für 10 min. Nach erneutem Waschen für 5 min in PBS erfolgte eine weitere Fixierung in 4 % Paraformaldehyd in PBS (Ca²⁺- und Mg²⁺-frei) für 5 min und nochmaliges Waschen in PBS (5 min). Die darauffolgende 10 minütige Inkubation in einer Triethanolamin / Essigsäureanhydridlösung (3,125 ml / 0,625 ml pro 250 ml Wasser) diente zur Neutralisierung positiver Ladungen und damit zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Nach jeweils 5 min Waschen in PBS und 0,83 % NaCl wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und danach bei Raumtemperatur getrocknet.

3.13.4. Hybridisierungsreaktion

Die in Ethanol aufbewahrte radioaktiv markierte RNA Probe (siehe 3.13.2.) wurde 10 min bei 10000 g abzentrifugiert und einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Präzipitat wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 mM DTT (1/10 des Hybridisierungsvolumens) aufgenommen. Dabei wurde die spezifische Aktivität der RNA-DTT-Lösung auf 1,5x10⁶ cpm/µl eingestellt. Nach Zugabe von 9/10 Volumina Hybridisierungspuffer (1xHybridisierungs-Salz (10xHybridisierungs-Salz: 0,2 % PVP, 0,2 % Ficoll, 0,38 % NaH₂PO₄ pH 6,8, 50 mM EDTA, 3 M NaCl, 0,1 M Tris pH 8,0), 50 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 10 mM DTT, 10 µg tRNA) betrug die Aktivität 1,5x10⁵ cpm/µl. Um die Probe vollständig zu denaturieren, wurde die Hybridisierungslösung vor dem Auftragen auf die Gewebeschnitte 5 min bei 95 °C inkubiert und auf Eis abgeschreckt. Vierzig µl Hybridisierungslösung wurden auf einem vorhybridisierten Schnitt gleichmäßig verteilt und

mit einem silikonisierten Deckgläschen (siehe 3.13.1.) abgedeckt. Zur Inkubation der Objektträger wurde eine Styrolwanne mit Benchcoat und drei Lagen 3MM Whatman-Filterpapier ausgelegt. Das Filterpapier wurde mit 40 ml 2xSSC / 50 % Formamid getränkt. Die Objektträger wurden in diese Hybridisierungswanne gelegt, diese mit einem Deckel abgedichtet und über Nacht bei 58 °C im Wasserbad inkubiert.

3.13.5. Waschen der hybridisierten Gewebeschnitte

Nach der Inkubation wurden die Objektträger aus der feuchten Kammer genommen und in Glasfärbegestelle transferiert. Das Waschen der Schnitte erfolgt unter stringenten und ³⁵S-stabilisierenden Bedingungen. Dieses wird erreicht durch die hohe Formamidkonzentration von 50 %, die den Schmelzpunkt der RNA:RNA-Hybride herabsetzt, durch die relativ hohe Temperatur von 65 °C und durch die Anwesenheit von β-Mercaptoethanol, welches vor Oxidation des Schwefels schützt.

Die Färbegestelle mit den Objektträgern wurden in die mit 250 ml der folgenden Lösungen vorbereiteten Glaskästen eingetaucht:

- 2xSSC, 50 % Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol bei 37 °C 15 min
- 2xSSC, 50 % Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol bei 65 °C 30 min
- 2xSSC, 50 % Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol bei 37 °C 2,5 h
- NTE (0,5 M NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 5 mM EDTA) bei 37 °C 15 min
- NTE mit RNase A (Endkonzentration: 20 (g/ml) bei 37 °C 15 min
- NTE bei 37 °C 15 min
- 2xSSC, 50 % Formamid, 20 mM β-Mercaptoethanol bei 65 °C 30 min
- 2xSSC bei Raumtemperatur 15 min
- 0,1xSSC bei Raumtemperatur 15 min

Eine Dehydrierung der Schnitte erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe:

- 30 % Ethanol, 0.25 M NH₄OAc 2 min
- 50 % Ethanol, 0.25 M NH₄OAc 2 min
- 70 % Ethanol, 0.25 M NH₄OAc 2 min
- 80 % Ethanol 2 min
- 90 % Ethanol 2 min
- 95 % Ethanol 2 min
- 100 % Ethanol 2 min

Anschließend wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet, mit einem Klebeband in einer Expositionskassette befestigt, und über Nacht ein Röntgenfilm (HyperMP, Amersham Pharmacia) aufgelegt.

3.16.6. Beschichten der Objektträger mit Photoemulsion

Die Photoemulsion (LM-1, Amersham Pharmacia) wurde in der Dunkelkammer in einem Wasserbad bei 43 °C geschmolzen und mit ddH₂O 1:1 verdünnt. Das Gemisch wurde dann luftblasenfrei in ein Gefäß gefüllt, das speziell zur Beschichtung der Objektträger angefertigt wurde. Diese Vorrichtung wurde in das Wasserbad (43 °C) gestellt, um die Photoemulsion flüssig zu halten. Die Objektträger wurden nacheinander durch Eintauchen in die Photoemulsion beschichtet. Nach der zweimaligen Beschichtung sollte die Photoemulsion so gleichmäßig wie möglich auf den Objektträgern verteilt sein. Die beschichteten Objektträger wurden in waagerechter Position im Dunkeln 2 h bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden sie in Polyoxymethylen-Färbegestelle überführt, in die entsprechenden Färbetröge eingepackt und mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Objektträger wurden für sechs bis acht Tage bei 4 °C exponiert.

3.13.7. Entwickeln, Färben und Auswerten der Schnitte

Nach Ablauf der Expositionsdauer wurden die Objektträger in folgenden Lösungen entwickelt:

- | | |
|--|------------|
| • 16 % (w/v) Kodak D-19 Entwickler in Leitungswasser | 3 min |
| • 1 % Eisessig | 1 min |
| • 30 % (w/v) Natriumthiosulfat | 5 min |
| • Leitungswasser | 2 x 10 min |
| • Leitungswasser | 1 x 30 min |

Die Schnitte wurden getrocknet und mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt (Mayer's Hämatoxylin 4 min, bewegtes Leitungswasser 15 min, ddH₂O 2 min, Eosin in 1 % Essigsäure 1 min, 70 % Ethanol 15 s, 100 % Ethanol 15 s). Die über Nacht getrockneten Objektträger wurden mit dem Eindeckmittel Entellan eingedeckelt. Die Präparate wurden anschließend im Zeiss Axioskop-Mikroskop (Zeiss, Jena) im Hell- und Dunkelfeld analysiert und photographiert. Für die Analyse von kleinen Vergrößerungen wurde das Binokular Leica Wild M 10 verwendet. Zur Photographie wurden Farbfilme für Kunstlicht (Kodak Extrachrome 160T oder 320T und Fuji 64T oder 160T) verwendet oder alternativ eine Digitalkamera (ProgRes 3012, Jenoptik, Jena).

3.14. *In situ* Hybridisierung im Ganzpräparat (nach Belo et al., 1997)

3.14.1. Markierung von Bag-1 RNA und RARβ2 RNA mit Digoxigenin durch *in vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde zur Herstellung von *antisense* und *sense* RNA-Sequenzen von Transkriptionsvektoren (Bluescript pBSIISK⁻ bzw. pBSIISKII⁺ Stratagene, siehe 2.3.2.) durchgeführt.

Ein C-terminales Fragment der mBag-1-cDNA (659 bp, EcoRI und NotI) wurde zwischen die im Transkriptionsvektor enthaltenen Promotorsequenzen für zwei Phagen-RNA-Polymerasen (T3 und T7) kloniert (siehe 2.3.2.). Durch Linearisierung der Transkriptionsplasmide wurde der nicht für die Transkription benötigte Promotor von der cDNA-Sequenz abgetrennt. Dadurch konnten durch zwei Linearisierungsansätze von einem Transkriptionsvektor zwei Matrizen hergestellt werden, die jeweils für die *Sense*- oder *Antisense*-Transkription benutzt wurden. Der mit EcoRI linearisierte Vektor bildete die Matrize für die T3-RNA-Polymerase, es wurden *Antisense*-Transkripte gewonnen. Linearisierung des Vektors mit NotI führte zur Matrize für die T7-RNA-Polymerase, es wurden *Sense*-Transkripte zur Kontrolle erzeugt.

Transkripte von RAR β 2 (siehe 2.3.2.) wurden von einer 374 bp Matrize aus, die zwischen die im Transkriptionsvektor enthaltenen Promotorsequenzen für zwei Phagen-RNA-Polymerasen (T7 und T3) kloniert war, generiert. Der mit NotI linearisierte Vektor bildete die Matrize für die T7-RNA-Polymerase, es wurden *Antisense*-Transkripte gewonnen. Linearisierung des Vektors mit KpnI führte zur Matrize für die T3-RNA-Polymerase, es wurden *Sense*-Transkripte erzeugt.

Zur Erzeugung Digoxigenin-markierter Transkripte wurde folgender *in vitro* Transkriptionsansatz gewählt: Ein μ g DNA-Matrize wurde mit 4 μ l 5xTranskriptionspuffer (200 mM Tris pH 8,0, 50 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 50 mM NaCl, 20 mM Spermidin, 250 μ g/ml BSA), 2 μ l 10xDigoxigenin dNTP-Mix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-11-UTP, pH 7,5), 1 μ l RNase Inhibitor, 2 μ l RNA-Polymerase in einem Volumen von 20 μ l für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 μ l 4 M LiCl, 75 μ l EtOH und 30 min Inkubation auf Eis präzipitiert. Nach Zentrifugation für 30 min mit 14000 g bei 4 °C wurde die RNA mit 500 μ l 75 % EtOH gewaschen und in 50 μ l ddH₂O gelöst. Qualität und Menge der RNA wurden gelelektrophoretisch durch Vergleich vor und nach Präzipitation bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C aufbewahrt.

3.14.2. Vorbehandlung der Embryonen bzw. Gewebe ("Prähybridisierung")

Vorbemerkungen:

Sämtliche nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte bis zur eigentlichen Prähybridisierung wurden auf Eis durchgeführt, mit Ausnahme des Proteinase K-Verdau, der bei Raumtemperatur erfolgte. Als Reaktionsgefäße dienten 5 ml Glasröhrchen, in die zu Beginn des Experiments die entsprechenden Embryonen bzw. Organe oder Gewebe (im folgenden zusammenfassend als Embryonen bezeichnet) überführt wurden. Da Luftkontakt mit den Embryonen zu unspezifischer Hintergrundfärbung führt, erfolgte das Wechseln von Lösungen stets so, daß die Embryonen in einem minimalen Restvolumen der zu entfernenden Lösung verblieben, bevor eine neue Lösung hinzugegeben wurde.

Die in 100 % Methanol aufbewahrten Embryonen (siehe 3.11.1.) wurden zunächst über eine absteigende Methanolreihe stufenweise rehydriert. Dies erfolgte durch eine Inkubation für je 5 min in 75 %, 50 % und 25 % Methanol in PBSw (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl,

0,7 mM CaCl₂, 0,6 mM MgCl₂, 5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,1 % Tween-20). Anschließend wurde 3 mal für je 5 min in PBSw gewaschen. Um eine bessere Zugänglichkeit der Probe ins Gewebe zu ermöglichen erfolgte ein partieller Verdau mit Proteinase K. Die Proteinase K Konzentration betrug 4,5µg / ml PBSw; die Verdauzeiten hingen von der Größe des Untersuchungsgegenstandes ab und wurden empirisch ermittelt. Der Verdau wurde durch Zugabe frischer Glycinlösung (2 mg / ml PBSw) und dreimaligem Waschen mit PBSw für je 5 min gestoppt. Anschließend wurden die Gewebe durch Inkubation in 4 % Paraformaldehyd / 0,2 % Glutaraldehyd in PBSw nachfixiert. Nach viermaligem Waschen in PBSw für je 5 min erfolgten Inkubationen für je 5 min zunächst in 50 % Hybridisierungslösung in PBSw (50 ml 100 % Hybridisierungslösung: 0,5 g Boehringer Block, 25 ml Formamid, 12,5 ml 20xSSC pH 7,0, 6 ml H₂O, 5 ml 10 mg/ml Torula RNA, 100 µl 50 mg/ml Heparin, 250 µl 20 % Tween-20, 500 µl 10 % CHAPS, 500 µl 0,5 M EDTA) gefolgt von 100 % Hybridisierungslösung. Anschließend erfolgte eine "Prähybridisierung" in 900 µl Hybridisierungslösung für drei Stunden bei 65 °C.

3.14.3. Hybridisierung und Waschen

Zu den 900 µl Volumina-Ansätzen wurden 200 ng digoxigeninmarkierter RNA in 100 µl Hybridisierungslösung gegeben, die zuvor für 5 min bei 95 °C denaturiert wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 70 °C. Das Waschen zur Entfernung freier, nicht hybridisierter Probe erfolgte zunächst in 800 µl Hybridisierungslösung für 5 min bei 70 °C. Nach dreimaliger Zugabe von je 400 µl 2 x SSC pH 4,5 erfolgte eine zweimalige Inkubation von je 30 min bei 70 °C in 2 x SSC pH 7,0. Daraufhin wurde zweimal in Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5) für je 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zweimal in Maleinsäurepuffer für je 30 min bei 70 °C. Nach zweimaligem Waschen in PBS für je 10 min bei Raumtemperatur und einmaligem Waschen in PBSw für 5 min erfolgte eine Inkubation in einem ml Antikörperpuffer (10 % Ziegenserum, 1 % Boehringer Block, in PBSw) für mindestens zwei Stunden bei 4 °C.

3.14.4. Visualisierung und Auswertung

Schließlich erfolgte die Inkubation in 1,5 ml Antikörperpuffer mit Alkalischer Phosphatase konjugiertem Anti-Digoxigenin Antikörper (Roche Diagnostics, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10000 über Nacht bei 4 °C. Nach einmal Spülen in 0,1 % BSA in PBSw erfolgten fünf Waschschritte in 0,1 % BSA in PBSw für je 45 min bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen für je 30 min in PBSw erfolgte eine zweimalige Inkubation für je 10 min in AP1-Puffer (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂). Die Farbreaktion erfolgte nach Überführen der Präparate in BM-Purple (präzipitierendes Alkalische Phosphatase Substrat, Roche Diagnostics, Mannheim) im Dunkeln. Nach Eintritt einer zufriedenstellenden Farbreaktion wurde diese durch mehrmaliges Waschen in PBS gestoppt. Die Präparate wurden anschließend stufenweise in MeOH überführt und so aufbewahrt. Die Analyse erfolgte nach stufenweiser Rehydrierung in PBS unter dem Binokular Leica Wild M 10 mit Hilfe einer Digitalkamera (ProgRes 3012, Jenoptik, Jena).

4. Ergebnisse

Bag-1 war in Zellkultursystemen als antiapoptotisches Protein charakterisiert worden, das vor, durch verschiedenste Stimuli induzierter, Apoptose schützt. Bislang ist allerdings nicht geklärt, ob Bag-1 auch *in vivo* Apoptose zu inhibieren vermag. Da Apoptose insbesondere während der Embryonalentwicklung eine bedeutsame Rolle spielt, wurde als erster Schritt zu einem besseren Verständnis der Wirkungen von Bag-1 *in vivo* das Expressionsmuster von Bag-1 während der Embryonalentwicklung der Maus untersucht.

4.1. Bestimmung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters der Bag-1 mRNA während der Embryonalentwicklung der Maus

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die transkriptionelle Expression von Bag-1 während der Embryonalentwicklung der Maus untersucht. Die Technik der *In situ* Hybridisierung (ISH) ermöglichte den Nachweis endogener Bag-1 mRNA in fixiertem Gewebe isolierter Embryonen und Organe verschiedener Entwicklungsstadien. Dadurch konnte die differentielle Genexpression im Organismus räumlich und zeitlich bestimmt werden.

Zwei Arten von *In situ* Hybridisierungen wurden durchgeführt: radioaktive ISH an histologischen Schnitten isolierter Embryonen und ISH am Ganzpräparat (engl.: *whole mount*). Die Methode der Ganzpräparat-ISH bietet den Vorteil mit Totalpräparaten arbeiten zu können, ist jedoch nur mit Präparaten begrenzter Größe durchführbar. Mit dieser Technik lassen sich vollständige Embryonen bis zum Tag 12,5 der Embryonalentwicklung oder isolierte Organe bzw. Gewebe auch späterer Embryonalstadien analysieren. Die Methode der radioaktiven ISH bietet den Vorteil größerer Sensitivität, ist jedoch nur an histologischen Schnitten durchführbar.

Beide Methoden beruhen auf dem Nachweis endogener mRNA und basieren auf der Hybridisierung der endogenen Bag-1 mRNA mit spezifisch markierter *antisense*-Bag-1 RNA in fixiertem Gewebe. Die *antisense*-RNA wurde durch *in vitro* Transkription der murinen Bag-1 cDNA mittels Phagen-RNA-Polymerase in Gegenwart spezifisch markierter Nukleotide generiert. Bei der radioaktiven ISH erfolgte die Markierung durch [$\alpha^{35}\text{S}$]-UTP, bei der ISH am Ganzpräparat durch an Digoxigenin gekoppeltes UTP.

Der Nachweis der radioaktiv markierten Hybride erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilmes, der in flüssiger Form auf die Gewebeschnitte aufgebracht wurde. Nach der Entwicklung und Fixierung dieses Filmes liegt elementares Silber in Form kleiner Körnchen

auf dem Gewebe, genau an den Stellen der Expression der Bag-1 Transkripte. Bei Hellfeldmikroskopie erscheint das elementare Silber als schwarze Körnchen auf den Zellen liegend; bei der sog. Dunkelfeldbetrachtung wird das schräg einfallende Licht vom elementaren Silber reflektiert und Signale erscheinen daher weiß leuchtend gegenüber einem schwarzen Hintergrund. Der Nachweis der mit Digoxigenin markierten Hybride erfolgte über einen mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Anti-Digoxigenin Antikörper. Signale erscheinen über eine enzymatische Farbreaktion der alkalischen Phosphatase mit dem präzipitierenden Substrat "BM-Purple" in blau.

Mit diesen beiden Methoden wurden Embryonen ab Tag 7,0 post coitum (p.c.) untersucht. Zwischen Tag 7,0 und 8,5 der Embryogenese konnten keine Bag-1 Transkripte nachgewiesen werden. Die früheste Expression von Bag-1 mRNA erschien am Tag 8,5 p.c. und 9,5 p.c. ausschließlich im Myocard, allerdings auf einem äußerst geringen Expressionsniveau. Die ersten deutlichen Signale einer Expression von Bag-1 konnten am Tag 10,5 p.c. detektiert werden.

Vom Embryonalstadium E10,5 an wurde eine annähernd ubiquitäre Expression der Bag-1 mRNA nachgewiesen (Abb. 3 A, B, B'). Dabei zeigte sich, daß bestimmte Organe und Gewebe ein höheres Expressionsniveau erreichten, das über das allgemeine ubiquitäre Expressionsniveau hinausging. Am Tag 10,5 p.c. und 11,5 p.c. zeigten das Vorderhirn, die Kiemenbögen, die Vorder- und Hinterextremitäten, der Schwanz und der sich in beiden Geschlechtern zunächst zum Phallus entwickelnde Geschlechtshöcker eine besonders hervortretende Expression (siehe Abb. 3 A als Beispiel für E11,5). Zum Embryonalstadium E14,5 erstreckten sich die Orte mit prominenter Bag-1 RNA Expression auch auf die Rippen, die lateralen Nasenwände, die Neuralbögen, das Sphenoid der Schädelbasis, Leber, Lunge, cervikale dorsale (posteriore) Wurzelganglien (Abb. 3 K-K', B-E'), Hoden und Meckelschen Knorpel (siehe Pfeil in Abb. 3 B'). Weitere Expressionsorte zwischen E14,5 und E16,5 umfassten das Rectum, die Speicheldrüsen, den Thymus, die Knorpelringe der Trachea (Abb. 3 F-H') und die Niere (hier nicht gezeigt).

In bestimmten Geweben veränderten sich die Expressionsniveaus der Bag-1 mRNA im Verlauf der Embryonalentwicklung. So wurde die Expression in den Knorpelprimordien der Rippen, die in E12,5 und E14,5 nachgewiesen werden konnte (Abb. 3 I-K'), mit Beginn der Ossifikation dieser Strukturen (E16,5) herunterreguliert (Abb. 3 L-L'). Darüberhinaus konnte die Bag-1 Expression, die in den sich zu Hodenkanälchen entwickelnden Hodensträngen zwischen E13,5 und E16,5 vorhanden ist (Abb. 3 M-N'), zum Zeitpunkt der Geburt nicht mehr nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auch die Expression, die im Meckelschen Knorpel im Embryonalstadium E14,5 detektiert wurde (siehe Pfeil in Abb. 3 B'), konnte in späteren Stadien während der Mineralisation zu den Mandibularknochen nicht mehr nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

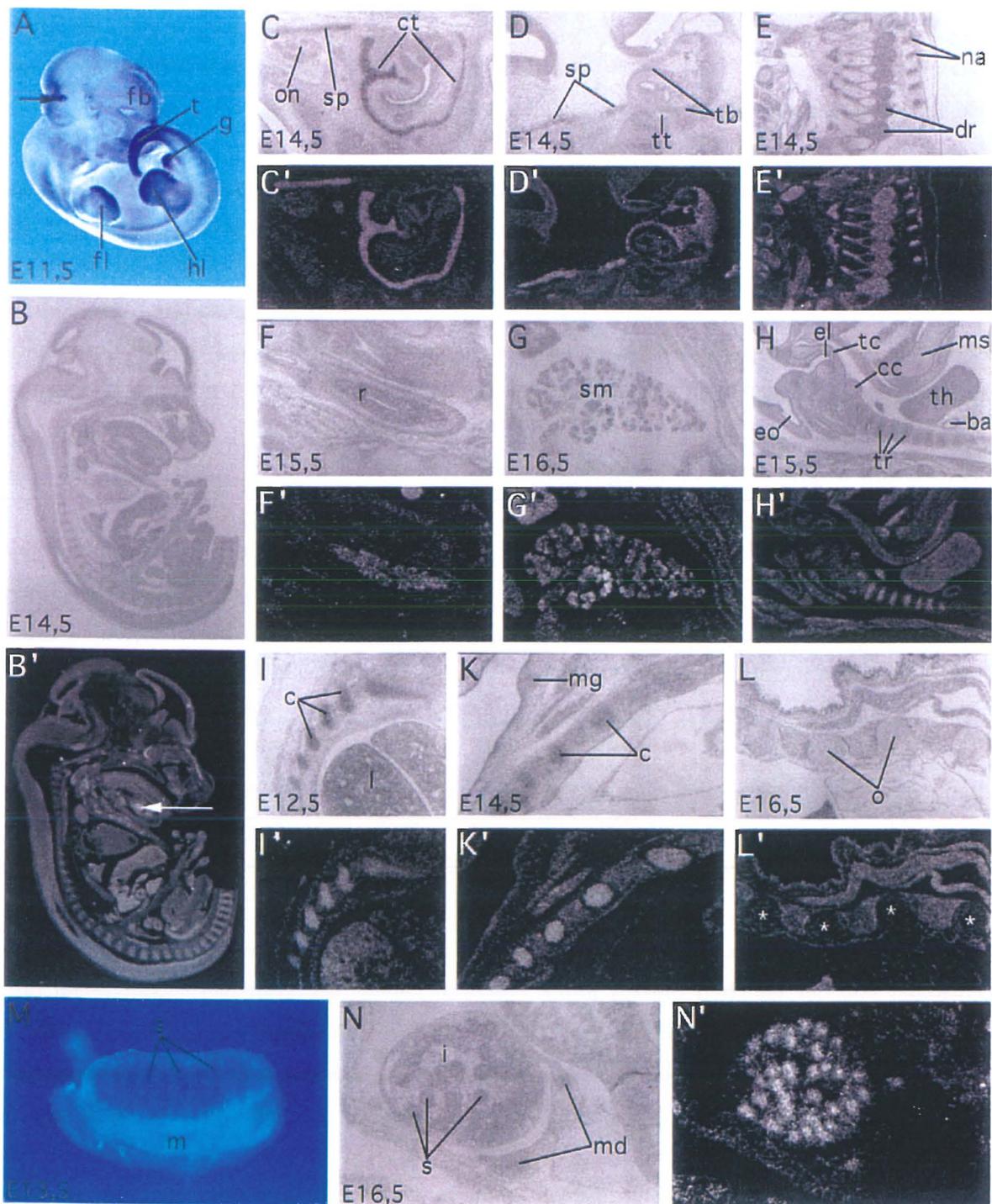


Abb. 3: Expressionsmuster der Bag-1 mRNA während der Embryonalentwicklung der Maus. Die transkriptionelle Expression von Bag-1 wurde durch *In situ* Hybridisierungen ermittelt. Die beiden Übersichten veranschaulichen, daß Bag-1 während der gesamten Embryogenese annähernd ubiquitär exprimiert ist. Aus den Detailaufnahmen geht hervor, daß einige Organe bzw. Gewebe eine besonders starke Expression der Bag-1 mRNA aufweisen. Am Beispiel der sich entwickelnden Rippen ist gezeigt, daß es in bestimmten Geweben im Verlauf der Entwicklung zu einem Verlust der Bag-1 Expression kommt. A, M: Ganzpräparat-Hybridisierungen eines Embryonen und eines isolierten Hodens mit darunterliegendem Mesonephros. B-L', N, N': radioaktive *In situ* Hybridisierungen an Sagittalschnitten. B-L, N: Hellfeldaufnahmen; B'-L', N' entsprechende Dunkelfeldaufnahmen. ba = branchiocephale Arterie; c = Knorpelprimordien der Rippen; cc = Cricoidknorpel; ct = Knorpelprimordien der lateralen Nasenwände; dr = cervikales dorsales (posteriore) Wurzelganglion; E = Embryonalstadium in Tagen post coitum; el = Eingang zum Larynx (Kehlkopf); eo = Eingang zum Ösophagus; fb = Vorderhirn; fl = mesenchymale Zellen der

In anderen Strukturen wie den sich entwickelnden Brustdrüsen konnte zu keinem Zeitpunkt eine Expression von Bag-1 mRNA nachgewiesen werden (siehe Abb. 3 K und K' als Beispiel einer degenerierten Brustdrüse des männlichen Geschlechts).

Das komplexe, annähernd ubiquitäre Expressionsmuster der Bag-1 Transkripte läßt zunächst keine schlüssige Interpretation hinsichtlich möglicher *in vivo* Funktionen von Bag-1 zu. Dennoch könnte Bag-1 als antiapoptotisches Protein verschiedene Gewebe, bei denen im Verlauf der Entwicklung Apoptose auftritt, in bestimmten Entwicklungsstadien vor Apoptose schützen. So ist Bag-1 mRNA beispielsweise im Meckelschen Knorpel und in der Region des Rektums, die sich zum Anus entwickelt, zunächst exprimiert. In späteren Stadien, in denen in diesen Geweben Apoptose auftritt (Trichilis und Wroblewski, 1997) konnte jedoch keine Bag-1 Expression mehr nachgewiesen werden.

Eine alternative Interpretation dieses annähernd ubiquitären Expressionsmusters könnte darin begründet liegen, daß verschiedene Bag-1 Isoformen mit verschiedenen Funktionen gewebespezifisch exprimiert werden; durch die *In Situ* Hybridisierungen wurden möglicherweise mehrere, verschiedene Isoformen detektiert. Dafür spricht, daß das humane Bag-1 Protein (Rap46) im Vergleich zum murinen eine aminoternale Extension von 55 Aminosäuren aufweist (Takayama et al., 1995; Zeiner und Gehring, 1995). Ein Sequenzvergleich der 5'-untranslatierten Region der murinen cDNA mit dem entsprechenden Sequenzbereich der humanen cDNA (hier jedoch kodierender Bereich) ergab eine hohe Homologie. Bei den Proteinen in Mensch und Maus handelt es sich vermutlich nicht um Homologe im eigentlichen Sinne, sondern eher um zwei verschiedene Isoformen. Grundsätzlich könnte ein zweites Proteinprodukt von Bag-1 existieren. Isoformen könnten entweder von der gleichen mRNA durch Nutzung alternativer Translationsstartstellen oder durch alternatives Spleißen gebildet werden. Im zweiten Falle wäre die Wahl der Sonde für *In situ* Hybridisierungen wichtig, um zu bestimmen in welchen Organen die verschiedenen Isoformen exprimiert werden. Daher wurde zunächst, ausgehend von der ursprünglich publizierte murinen Bag-1 cDNA (Takayama et al., 1995) mittels 5'-RACE-PCR eine vollständige cDNA in der Maus kloniert, um zu klären, ob eine oder mehrere mRNAs existieren.

Vorderextremitätenknospe; hl = mesenchymale Zellen der Hinterextremitätenknospe; i = interstitielle Zellen (zu diesem Zeitpunkt ist es nicht möglich, morphologisch zwischen mesenchymalen Zellen und Leydigzellen zu unterscheiden); l = Leber; m = Mesonephros; md = Wolffscher Gang (das obere Signal markiert den Epididymis, das untere den Vas deferens); mg = männliche Brustdrüse; ms = Knorpelprimordium des Manubrium sterni; na = Knorpelprimordien der Neuralbögen; o = Ossifikation innerhalb der Knorpelprimordien der Rippen; on = Sehnerv; r = Rektum; s = aus den Hodensträngen (E13,5 in M) hervorgehende Samenkanälchen (E16,5 in N, N'); sm = Speicheldrüse; sp = Knorpelprimordium des Sphenoids; t = Schwanz; tb = Knorpelprimordium des Os temporale; tc = Thyroidknorpel; th = Thymus; tr = Trachea mit sog. Knorpelringen; tt = Recessus tubo-tympanicus; * = Abwesenheit von Signalen in o. Der Pfeil in A markiert unspezifisches Signal (engl. "probe trapping"), der in B' den Meckelschen Knorpel.

4.2. 5'-Extension der Bag-1 cDNA der Maus

Die Verlängerung der Sequenz des 5'-Endes der murinen Bag-1 cDNA erfolgte mittels 5'-RACE-PCR (engl.: RACE = *rapid amplification of cDNA ends*). Als DNA Matrize wurde eine kommerzielle, aus mRNA von E15,5 Embryonen hergestellte cDNA Bibliothek ("Marathon-Ready cDNA", Clontech) verwendet. Dieses System enthielt einen Pool embryonaler cDNAs, deren Enden mit speziellen Adaptoren versehen sind. Als Primer wurden ein Oligonukleotid aus dem 5'-Ende der publizierten murinen Bag-1 cDNA

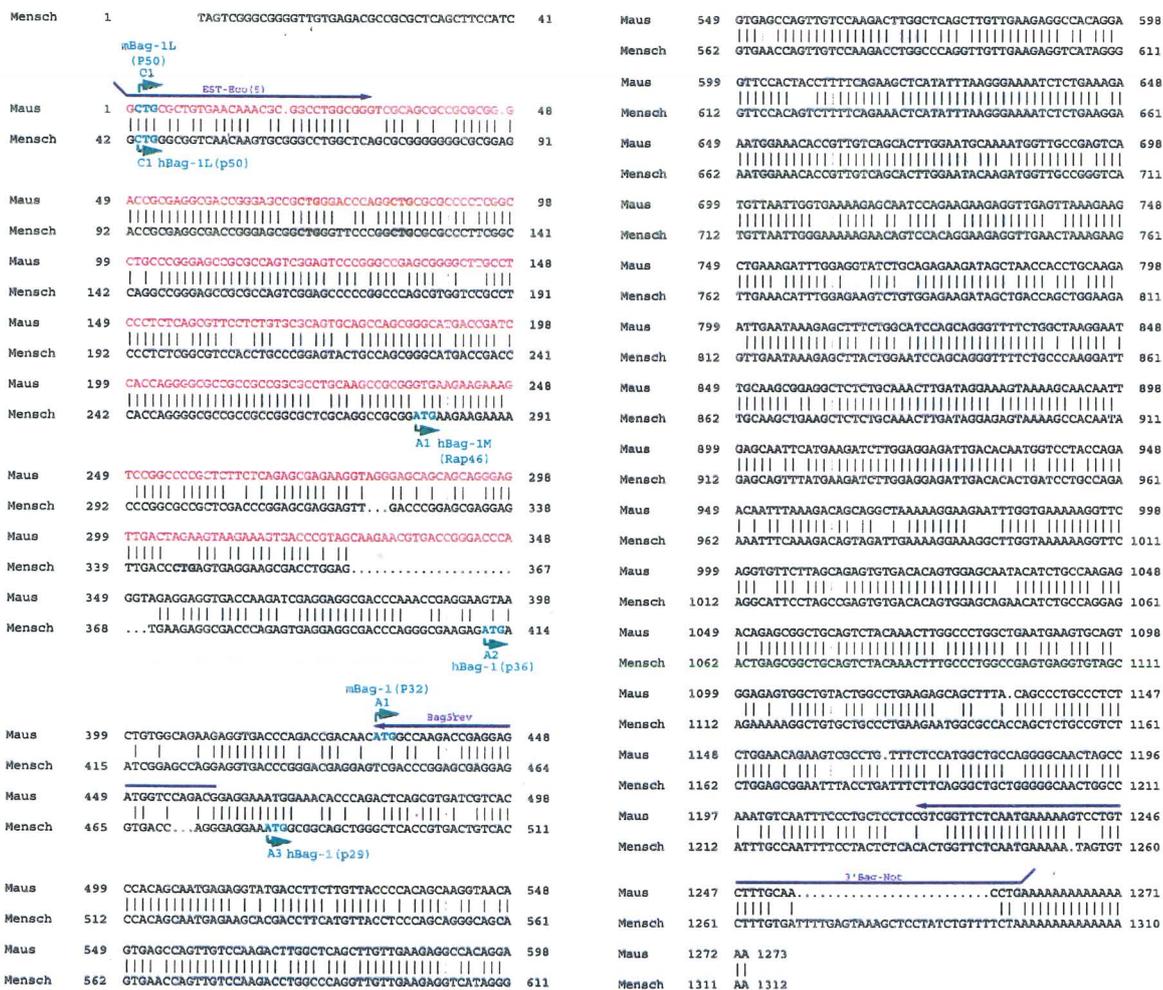


Abb. 4: Nukleinsäuresequenzvergleich der Bag-1 cDNAs von Maus und Mensch. Dargestellt ist ein Nukleinsäuresequenzvergleich der cDNAs von Maus (jeweils oben) und Mensch (jeweils unten). Der rot unterlegte Sequenzbereich bei der Maus wurde in dieser Arbeit durch 5'-RACE-PCR erhalten. Die blauen Pfeile symbolisieren die verwendeten Primer. In grün dargestellt und durch Pfeile markiert sind die unterschiedlichen Startstellen für die Transkription zur Generierung der unterschiedlichen Bag-1 Isoformen. A = Adenosin, C = Cytidin, G = Guanodin, T = Thyminid, | = identische Nukleotide. 80 % der Nukleotide sind in beiden Spezies identisch. Zahlen geben die Länge der Sequenzen in Nukleotiden an. Dieser Nukleinsäuresequenzvergleich wurde mit dem Computerprogramm GAP (Wilconson computer package software) erstellt.

(Takayama et al., 1995) und ein Adapter-Primer, der im kommerziellen System enthalten war, verwendet. PCR Amplifikationen mit Hilfe dieser Primer und der cDNA-Bibliothek als Matrize lieferten verschiedene Fragmente. Sequenzierungen ergaben, daß das längste dieser Fragmente mit der murinen Bag-1 cDNA überlappte (rot unterlegte Sequenz in Abb. 4).

Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit wurden diese Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen bestätigt und vervollständigt. Diese zeigten ebenfalls, daß in der murinen Bag-1 cDNA zusätzlich zur bis dahin publizierten Sequenz 5'-gelegene Sequenzen vorhanden sind, und daß zwei murine Isoformen von Bag-1 existieren, Bag-1L (50 kDa) und Bag-1 (32 kDa; Packham et al., 1997; Takayama et al., 1998).

Darüberhinaus wurden vier Translationsstartstellen in der humanen cDNA verifiziert, die zur Generation von vier humanen Isoformen führen: Bag-1L (50 kDa), Bag-1M (46 kDa), Bag-1 (33 kDa) und p29 (29 kDa; siehe Abb. 4; Packham et al., 1997; Takayama et al., 1998; Yang et al., 1998). Sequenzvergleiche zwischen Mensch und Maus legen nahe, daß die murine Isoform Bag-1L von einer entsprechenden Translationsstartstelle der murinen Bag-1 cDNA gebildet wird (Abb. 4). Somit existiert bei Mensch und Maus jeweils nur eine mRNA, die für die Synthese mehrerer Bag-1 Proteine durch alternative Translationsstartstellen benutzt wird (Packham et al., 1997; Yang et al., 1998).

Da nur eine mRNA vom Bag-1 Gen exprimiert wird, ist es unmöglich spezifische Sonden für *In Situ* Hybridisierungen zu generieren, mit denen die Bag-1 Produkte unterschieden werden könnten. Das isoformspezifische Expressionsmuster der verschiedenen, von einer mRNA gebildeten, Bag-1 Isoformen konnte daher nicht ausschließlich durch *In situ* Hybridisierungen bestimmt werden. Daher wurden die RNA Expressionsdaten durch immunchemische Nachweise ergänzt, um zu bestimmen welche Bag-1 Proteine in welchen Geweben in bestimmten Entwicklungsstadien vorhanden sind. Hierfür waren jedoch spezifische Antikörper erforderlich. Ein Antikörper war verfügbar (C16, Santa Cruz), der jedoch gegen ein C-terminales Epitop gerichtet ist und somit alle zwei Isoformen der Maus erkennen sollte. Um neben *Western blot* Analysen mit Hilfe der Immunhistochemie auch *in situ* zwischen den beiden Isoformen unterscheiden zu können, wurde ein für das große Proteinprodukt spezifischer Antikörper benötigt.

4.3. Bestimmung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters der Bag-1 Proteine während der Embryonalentwicklung der Maus

Sämtliche kommerziell erhältlichen Bag-1 Antikörper sind entweder gegen eine C-terminale Region des Proteins gerichtet oder gegen andere Bereiche, die ebenfalls in allen

Familienmitgliedern vorhanden sind. Um spezifische Bag-1 Proteine detektieren zu können, mußten spezifische Antikörper generiert werden. In der N-terminalen Region des größten Bag-1 Proteins wurde ein Peptid von 15 Aminosäuren ausgewählt, das in Mensch und Maus gut konserviert ist (Abb. 5). Da diese Sequenz nicht in den anderen Bag-1 Proteinen vorhanden ist, sollten Antikörper, die hiergegen gerichtet sind, ausschließlich das größte Bag-1 Proteinprodukt (Bag-1L) erkennen. Gegen dieses Peptid (RPGREPRQSEPPAQR) wurden in Kaninchen Antikörper erzeugt und diese später aufgereinigt (Eurogentech, Belgien).

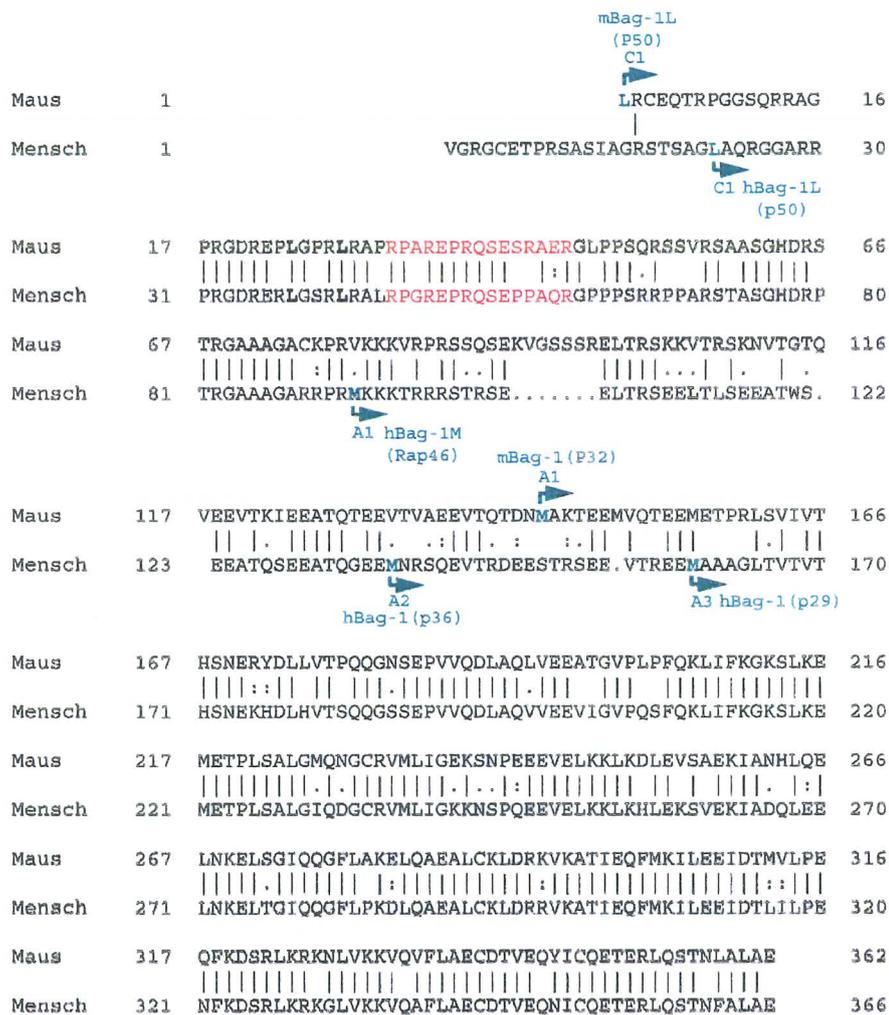


Abb. 5: Epitop des Bag-1L monospezifischen Antikörpers im Aminosäuresequenzvergleich von Bag-1 bei Maus und Mensch. Dargestellt ist ein Vergleich der Aminosäuren von Bag-1 bei Maus und Mensch. In grün hervorgehoben und durch Pfeile markiert sind die ersten Aminosäuren der unterschiedlichen Proteinprodukte. Die rot unterlegte Aminosäuresequenz markiert das Peptid, gegen das Antikörper generiert wurden. Dieser Aminosäuresequenzvergleich wurde mit dem Computerprogramm MAP (Wilconson computer package software) unter Verwendung folgender Symbole erstellt: | = identische Aminosäuren, : = gleiche chemische Eigenschaften von zwei Aminosäuren, . = ähnliche chemische Eigenschaften zweier Aminosäuren.

Die Spezifität dieser Antikörper wurde in *Western blot* Experimenten mit Extrakten von Bag-1 transfizierten Cos-7 Zellen überprüft. Bag-1 negative Cos-7 Zellen waren mit leerem Expressionsvektor transfiziert worden bzw. mit Expressionsvektoren, die die humane Bag-1M cDNA (hBag-1M) oder Bag-1L cDNA (hBag-1L) enthielten (siehe Abb. 6). Proteinextrakte dieser transfizierten Zellen wurden zusammen mit Extrakten von Mausembryonen verschiedener Embryonalstadien (E10,5 - E18,5) für eine *Western blot* Analyse verwendet. Die Proteinextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Als primäre Antikörper wurden der Bag-1L spezifische Antikörper, N15, (Abb. 6 A) sowie ein carboxyterminaler C16 Antikörper (Santa Cruz), der beide Bag-1 Isoformen erkennen sollte (Abb. 6 B), verwendet. Die Visualisierung erfolgte über einen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundäntikörper mittels Chemolumineszenz.

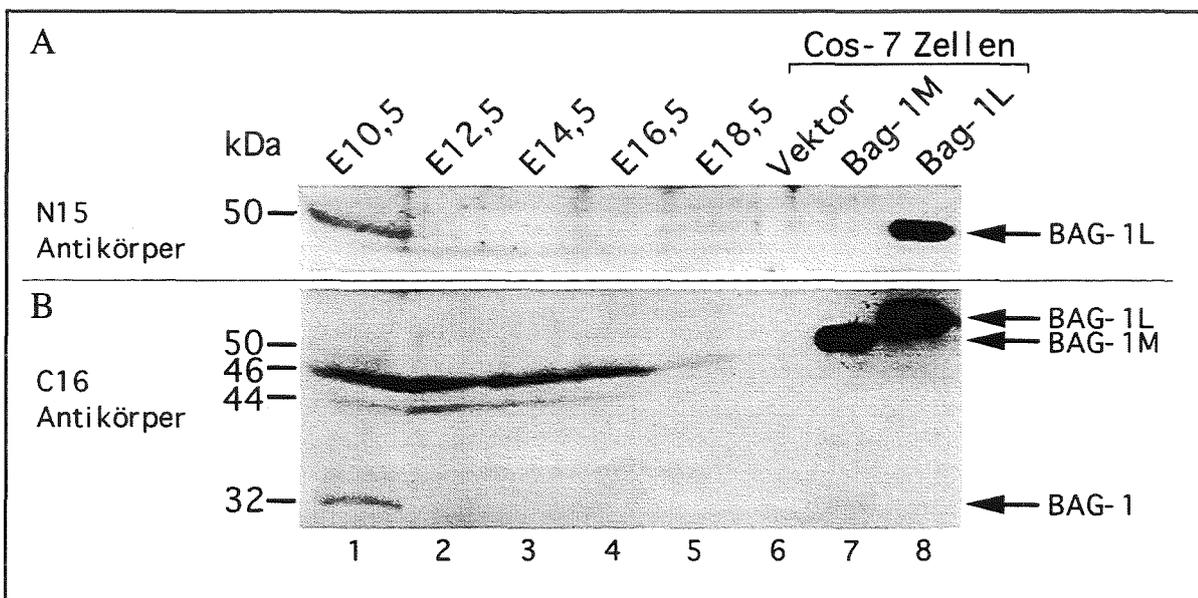


Abb. 6: Expression spezifischer Bag-1 Isoformen während der Embryonalentwicklung der Maus. *Western blot* Analyse mit Extrakten von Embryonen verschiedener Embryonalstadien. Gleiche Proteinmengen von Extrakten der angegebenen Entwicklungsstadien wurden neben Extrakten von mit leerem Expressionsvektor bzw. mit Expressionsvektoren für humanes Bag-1M oder Bag-1L transfizierten Cos-7 Zellen zur Immunoblotanalyse eingesetzt. Als primäre Antikörper wurden der Bag-1L spezifische N15 Antikörper (A) und der C16 Antikörper (B) eingesetzt. Die Visualisierung erfolgte über einen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundäntikörper mittels Chemolumineszenz.

Die Untersuchung der Antikörper ergab, daß die Spezifität beider Antikörper den Erwartungen entsprach. Der Bag-1L spezifische N15 Antikörper (Abb. 6 A) lieferte ausschließlich in den mit hBag-1L transfizierten Cos-7 Zellen ein Signal (Abb. 6 A, Spalte 8), nicht jedoch in den mit Leervektor oder mit hBag-1M transfizierten Zellen (Abb. 6 A, Spalten 6 und 7). Der C16 Antikörper lieferte in den mit Leervektor transfizierten Zellen kein Signal (Abb. 6B, Spalte 6), detektierte jedoch Proteine von 46 kDa und 29 kDa, die die humanen

Isoformen Bag-1M und p29 repräsentieren (Abb. 6 B, Spalten 7 und 8). Darüberhinaus erkannte dieser Antikörper das humane 50 kDa Protein Bag-1L (Abb. 6 B, Spalte 8) und ein weiteres Protein von 44 kDa, das bisher nicht beschrieben wurde (Abb. 6 B, Spalten 7 und 8). Eine potentielle, im Leseraster liegende Transkriptionsstartstelle für ein Protein entsprechender Größe ist jedoch in der humanen Bag-1 cDNA vorhanden.

Die Isoform von 33 kDa war weder in den hBag-1M noch in den hBag-1L transfizierten Zellen nachzuweisen, die Isoform von 29 kDa ausschließlich in den hBag-1M transfizierten Zellen. Dies entspricht den Angaben der Literatur, nach denen kleine Isoformen bevorzugt bei Abwesenheit der größeren gebildet werden (Packham et al., 1997; Yang et al., 1998).

In den Embryoextrakten erkannte der N15 Antikörper klar das murine Protein Bag-1L (Abb. 6 A). Der C16 Antikörper hingegen erkannte mehrere Bag-1 Proteine jedoch nur sehr schwach das Bag-1L Proteinprodukt von 50 kDa (Abb. 6 B, Spalten 1-5) obwohl dieses Protein in den transfizierten Cos-7 Zellen erkannt wurde. Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Der C16 Antikörper wurde daher in murinen Geweben als spezifisch für die anderen Bag-1 Proteine angesehen. Das am deutlichsten hervortretende Bag-1 Protein, das während der untersuchten Embryonalstadien der Maus detektiert werden konnte, war ein 46 kDa Proteinprodukt, das in seiner Größe dem humanen Bag-1M entsprach (Abb. 6 B, Spalten 1-5). Ein weiteres Proteinprodukt von ungefähr 44 kDa wurde ebenfalls während der Embryogenese nachgewiesen (Abb. 6 B, Spalten 1-4). Diese beiden Proteine wurden in allen untersuchten Embryonalstadien nachgewiesen mit Ausnahme des 44 kDa Proteins, das in E18,5 nicht nachweisbar war. Die Translationsstartstellen für diese Proteinprodukte konnten jedoch bisher nicht in der cDNA der Maus verifiziert werden. Es bleibt deshalb unklar, ob diese von der Bag-1 mRNA aus generiert werden oder ob sie zur kürzlich beschriebenen Familie der Bag-1 verwandten Proteine gehören (Takayama et al., 1999), die wie auch die Bag-1 Proteine das Epitop besitzen, welches vom C16 Antikörper erkannt wird. Darüberhinaus erkannte der C16 Antikörper das 32 kDa Bag-1 Protein, das von der murinen Bag-1 cDNA translatiert wird.

Mit Hilfe dieser beiden Antikörper wurde gezeigt, daß Bag-1L (50 kDa) und Bag-1 (32 kDa) im Embryonalstadium E10,5 translatiert werden, nicht jedoch in späteren Entwicklungsstadien (Abb. 6 A, B, vergleiche Linie 1 mit Linien 2-4). Ein sehr schwaches Signal für Bag-1L konnte im Embryonalstadium E18,5 wieder detektiert werden (Abb. 6 A, Linie 5).

Obwohl spezifische Bag-1 Proteine in bestimmten Entwicklungsstadien nachgewiesen wurden, geht aus der *Western blot* Analyse nicht hervor, in welchen Organen und Geweben

die entsprechende Isoform translatiert wird. Um dies zu klären, mußte die Methode der Immunhistochemie verwendet werden.

Diese Technik ermöglichte den Nachweis spezifischer Bag-1 Proteine in fixiertem Gewebe. Dadurch konnte die isoformspezifische Expression von Bag-1 im Organismus räumlich und zeitlich bestimmt werden. Von Embryonen verschiedener Embryonalstadien wurden histologische Schnitte von 7 µm angefertigt und der Antikörperfärbung zugeführt. Als primäre Antikörper wurden der C16 Antikörper oder der Bag-1L-spezifische N15 Antikörper verwendet. Ein an die Primärantikörper gebundener, biotinylierter Sekundärantikörper wurde

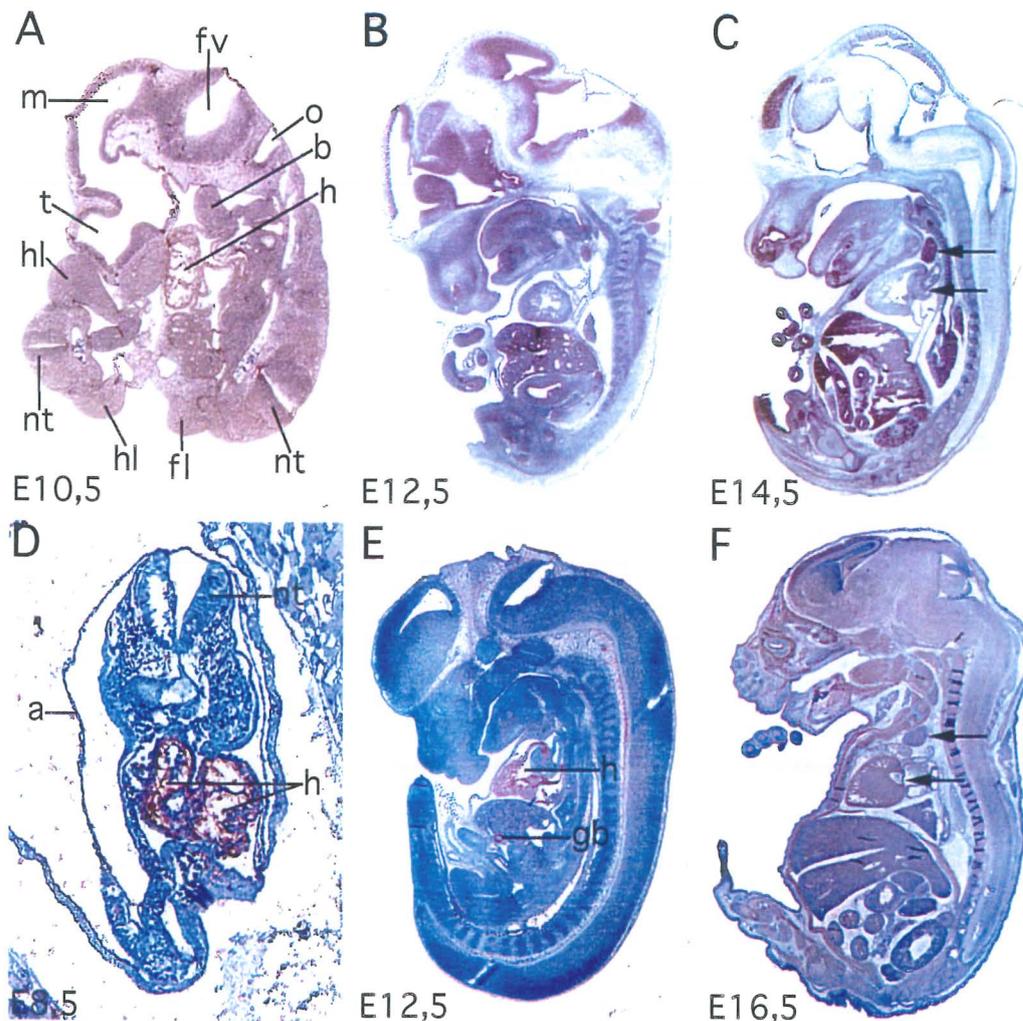


Abb. 7: Gewebe- und stadienspezifische Verteilung der Bag-1 Isoformen. Immunhistochemische Analyse an Gewebeschnitten von Mausembryonen der angegebenen Entwicklungsstadien. Als primäre Antikörper wurden der Bag-1L spezifische N15 Antikörper (A-C) und der C16 Antikörper (D-F) eingesetzt. Schnittebenen: D ist transversal, alle übrigen sagittal. a = Amnion; b = mandibuläre Komponente des ersten Kiemenbogens; fl = Vorderextremitätenknospe; fv = vierter Ventrikel; gb = Gallenblase; h = Herz; hl = Hinterextremitätenknospe; m = mesencephalisches Vesikel; nt = Neuralrohr; o = Otocyst . Die Pfeile in C und F markieren Unterschiede in der Färbung durch die N15 und C16 Antikörper.

nach Blockierung endogener Peroxidasen mit Streptavidin-Peroxidase komplexiert. Die Visualisierung erfolgte durch eine Farbreaktion mit AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol) als Substrat und lieferte rötliche bis braune Signale.

Mit Hilfe der Immunhistochemie wurden Bag-1 Proteine auch in Entwicklungsstadien nachgewiesen, in denen im *Western blot* keine Signale detektiert wurden. Dies erklärt sich aus der größeren Sensitivität der Immunhistochemie und der Tatsache, daß bestimmte im Embryo lokal begrenzte Synthesorte eines bestimmten Proteins im Gesamtproteinextrakt für die *Western blot* Analysen unterrepräsentiert sind.

Mittels Immunhistochemie konnte gezeigt werden, daß die mit dem N15 Antikörper detektierte Isoform Bag-1L am Tag 10,5 p.c. ubiquitär auftrat (Abb. 7 A). In nachfolgenden Entwicklungsstadien wurde dieses ubiquitäre Signal auf spezifische Gewebe begrenzt (Abb. 7 B und C). Im Embryonalstadium E12,5 ließ sich das Bag-1L Protein hauptsächlich in der Kopfreion, der Hypophyse, im Vorder- und Mittelhirn aber auch in der Leber, den lateralen Nasenwänden, im Duodenum und im Thymus nachweisen (Abb. 7 B). Im Stadium E14,5 wurden die Signale der Kopfreion ausschließlich auf das Vorderhirn begrenzt; die Signale im Thymus, den lateralen Nasenwänden, Duodenum und der Leber wurden stärker. Zusätzlich konnte in diesem Stadium Bag-1L auch in der Nebenniere, der Niere, der Lunge sowie in Skelettmuskeln nachgewiesen werden (Abb. 7 C). In späteren Embryonalstadien konnten keine positiven Signale von Bag-1L durch den N15 Antikörper nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Mit Hilfe des C16 Antikörpers ließen sich Bag-1 Proteinprodukte bereits ab Tag 8,5 der Embryonalentwicklung nachweisen, einem Stadium der Entwicklung, in dem Bag-1L noch nicht nachgewiesen wurde. Am Tag 8,5 p.c. waren Bag-1 Proteinprodukte ausschließlich im Myocard exprimiert (Abb. 7 D). Dieses herzspezifische Expressionsmuster blieb bis zum Tag 10,5 p.c. bestehen (nicht gezeigt). Am Tag 12,5 p.c. wurden dann weitere Synthesorte der kleineren Bag-1 Proteinprodukte nachgewiesen, wie die Gallenblase und das Rückenmark (Abb. 7 E) und der Sphenoidknochen der Schädelbasis (nicht gezeigt). In nachfolgenden Entwicklungsstadien ab Tag 16,5 p.c. konnte dann in weiteren Organen, die schon bei den *In situ* Hybridisierungen Signale zeigten (Abb. 3), Bag-1 Proteinprodukte nachgewiesen werden (Abb. 7 F).

Die Reaktivität des N15 und des C16 Antikörpers zeigte ein sich ausschließendes Muster der Expression von Bag-1 Isoformen im Herz und im Thymus von Tag 12,5 p.c. an (siehe Pfeile in Abb. 7 C und F). Im Herz konnten vom Tag 12,5 p.c. an Bag-1 Proteinprodukte nur noch mit Hilfe des C16 Antikörpers nachgewiesen werden (Abb. 7, vergleiche E und F mit B und C). Der Thymus hingegen reagierte vom Tag 12,5 an ausschließlich mit dem Bag-1L spezifischen N15 Antikörper positiv (Abb. 7 B, C). Darüberhinaus zeigte z.B. der Meckelsche Knorpel am Tag 14,5 kein Signal mit dem N15 Antikörper; in den *In situ* Hybridisierungen hingegen war dieses Gewebe eindeutig positiv (Abb. 3 B und B'). Daraus

läßt sich schließen, daß im Meckelschen Knorpel andere Bag-1 Isoformen und nicht Bag-1L vorhanden sind.

Diese immunhistochemischen Analysen verdeutlichen, daß zusätzlich zur stadienspezifischen Expression von Bag-1 Isoformen auch gewisse Organe distinkte Formen von Bag-1 Proteinen exprimieren.

4.4. Expression spezifischer Bag-1 Isoformen in adultem Gewebe

Um zu klären, ob die Bag-1 Proteine in bestimmten Organen im adulten Tier isoformspezifisch auftreten, wurden exemplarisch einige wenige Gewebe immunochemisch mit den C16 und N15 Antikörpern untersucht.

Proteinextrakte von Leber, Niere, Gehirn, Lunge und Herz der adulten Maus wurden mittels *Western blot* analysiert (Abb. 8, Spalten 1-5). Als Kontrollen dienten die Extrakte von Cos-7 Zellen, die mit Expressionsvektoren für humanes Bag-1M bzw. Bag-1L transfiziert worden waren (Abb. 8, Spalten 6 und 7).

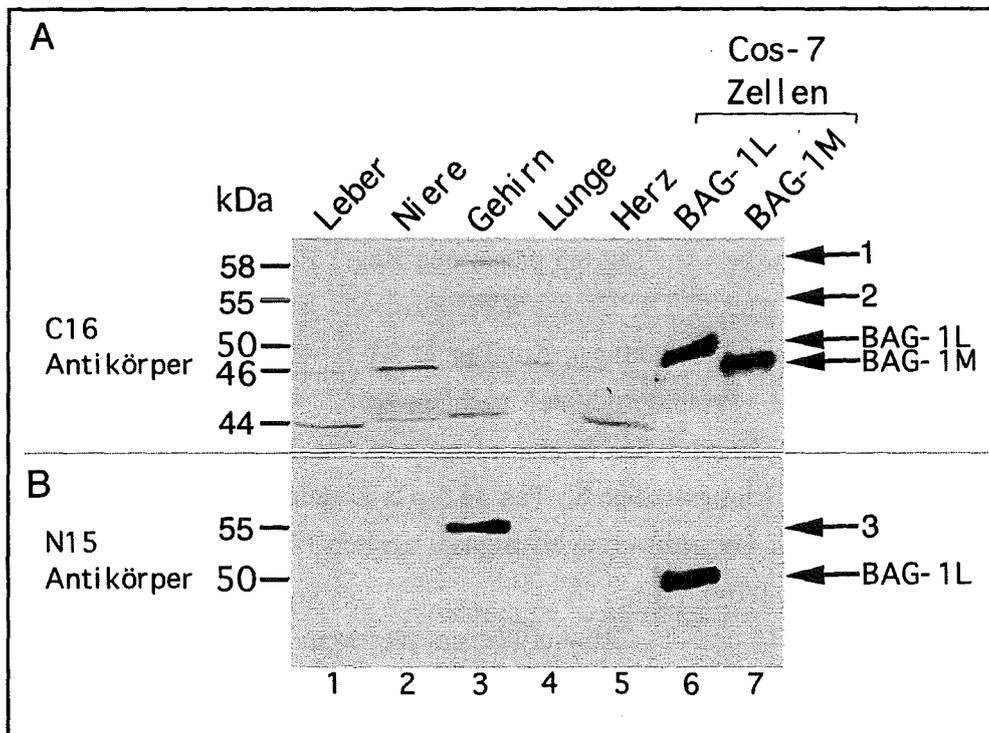


Abb. 8: Expression spezifischer Bag-1 Isoformen in verschiedenen adulten Geweben der Maus. *Western blot* Analyse mit Extrakten verschiedener adulter Gewebe der Maus. Gleiche Proteinmengen von Extrakten von Leber, Niere, Gehirn, Lunge und Herz wurden neben Extrakten von transfizierten Cos-7 Zellen zur Immunoblotanalyse eingesetzt. Die Cos-7 Zellen waren mit Expressionsvektoren transfiziert worden, die die humane Bag-1M cDNA oder Bag-1L cDNA enthielten. Als primäre Antikörper wurden der C16 Antikörper (A) und der Bag-1L spezifische N15 Antikörper (B) eingesetzt. Die Pfeile eins bis drei markieren geirnspezifische Proteinprodukte unbekannter Identität.

In allen analysierten Geweben war das 46 kDa Proteinprodukt, das in seiner Größe dem humanen Bag-1M entspricht und auch schon während der Embryonalentwicklung auftrat (siehe 4.3. und Abb. 6 B), nachzuweisen (Abb. 8 A, Spuren 1-5). Das stärkste Signal ergab sich in der Niere. Das 44 kDa Proteinprodukt Bag-1 war in Leber, Niere, Gehirn und Herz, nicht jedoch in der Lunge nachzuweisen (Abb. 8 A, vergleiche Spuren 1,2,3 und 5 mit 4). Das 32 kDa Bag-1 Proteinprodukt, das ebenfalls von dem C16 Antikörper erkannt wird, war in keinem der Gewebe detektierbar (nicht gezeigt). Die große Isoform Bag-1L war in keinem der untersuchten Gewebe detektierbar (Abb. 8 B).

Von allen untersuchten Organen unterschied sich das Gehirn in der Zusammensetzung der Bag-1 Isoformen (Abb. 8 A, B, Spur 3). Zusätzlich zu den 46 kDa und 44 kDa Proteinen, die vom C16 Antikörper detektiert wurden, wurden im Gehirn zwei weitere Proteinprodukte von 55 kDa und 58 kDa detektiert, die keiner bekannten Isoform zuzuordnen waren (Pfeile 1 und 2 in Abb. 8 A). Der Bag-1L spezifische N15 Antikörper detektierte im Gehirn (Spur 3 in Abb. 8 B) ausschließlich das 55 kDa Protein (Pfeil 3 in Abb. 8 B), das auch vom C16 Antikörper, jedoch ungleich schwächer, erkannt wurde (Pfeil 2 in Abb. 8 A).

Ausschließlich der Ursprung der murinen Isoformen Bag-1 (32 kDa) und Bag-1L (50 kDa) ist bekannt (siehe 1.6.2., 4.2. und Abb. 4 und 5). Die Translationsstartstellen für die weiteren detektierten Proteinprodukte konnten bisher nicht in der Maus verifiziert werden. Es bleibt somit unklar, ob diese von der Bag-1 mRNA aus generiert werden oder ob sie zur kürzlich beschriebenen Familie der Bag-1 verwandten Proteine gehören (Takayama et al., 1999), die wie auch die Bag-1 Proteine das Epitop besitzen, welches vom C16 Antikörper erkannt wird.

4.5. Immunhistochemische Analyse des adulten Mausgehirns mit dem N15 Antikörper

Da im adulten Mausgehirn ein unbekanntes Proteinprodukt von 55 kDa auftritt, war die Bestimmung der räumlichen Verteilung dieses Proteins mit Hilfe der Immunhistochemie notwendig.

Das Gehirn einer 12 Wochen alten Maus wurde isoliert, fixiert und es wurden histologische Schnitte von 7 µm in sagittaler Orientierung angefertigt. Diese Schnitte wurden mit dem N15 Antikörper, der im Gehirn ausschließlich das 55 kDa Protein erkennt, einer immunhistochemischen Analyse unterworfen.

Das 55 kDa Protein konnte ausschließlich im Hirnstamm, Mittelhirn und Kleinhirn nachgewiesen werden (Abb. 9 A). Das Vorhandensein dieses Proteins im Kleinhirn war auf Purkinje-Zellen begrenzt (Abb. 9 B). Die Synthese dieses Proteins ist folglich nicht nur spezifisch für das Gehirn sondern auch spezifisch für bestimmte Gehirnbereiche. Das

55 kDa Protein ist immunologisch mit Bag-1 verwandt; über seine tatsächliche Identität oder über seine Funktion kann aber zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Aussage gemacht werden.

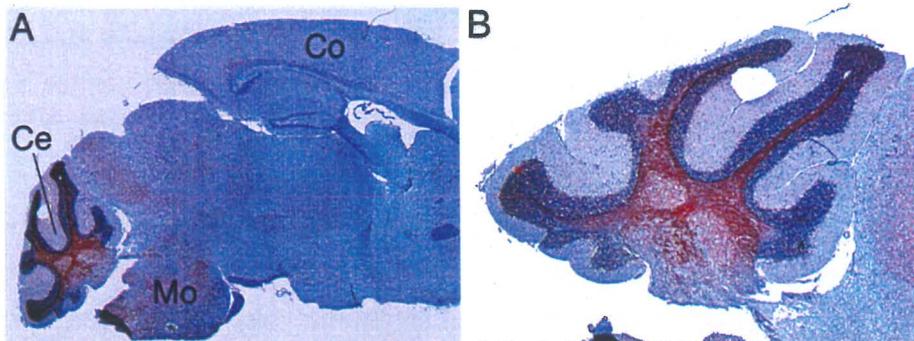


Abb. 9: Immunhistochemische Analyse des adulten Mausgehirns mit dem N15 Antikörper. An Gewebeschnitten des adulten Mausgehirns wurde als primärer Antikörper der Bag-1L spezifische N15 Antikörper eingesetzt. Schnittebene: sagittal. B ist eine Ausschnittsvergrößerung von A. Ce = Cerebellum; Co = Cortex; Mo = Medulla oblongata.

Um Anhaltspunkte für eine mögliche Funktion *in vivo* zu erhalten, wurde das Expressionsmuster von Bag-1 bestimmt. Diese Untersuchungen lassen auf unterschiedliche Funktionen von Bag-1 *in vivo* schließen, was die verschiedenen *in vitro* Bag-1 zugeschriebenen Funktionen widerspiegeln könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die mögliche antiapoptotische Funktion von Bag-1 *in vivo* näher untersucht. Bag-1 war in Überexpressionsanalysen als Inhibitor von durch verschiedene Stimuli ausgelöster Apoptose charakterisiert worden (Takayama et al., 1995; Bardelli et al., 1996; Clevenger et al., 1997; Liu et al., 1998; Kullmann et al., 1998; Yang et al., 1999b). Aus der vorgelegten Expressionsanalyse geht hervor, daß Bag-1 in einigen Geweben wie dem Meckelschen Knorpel und dem zukünftigen Anus zunächst exprimiert ist; in späteren Entwicklungsstadien, in denen Apoptose auftritt, ist Bag-1 nicht mehr nachweisbar. In diesen Geweben könnte Bag-1 zu bestimmten Zeiten der Entwicklung eine antiapoptotische Funktion innehaben.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden zwei ausgewählte Organe bzw. Gewebe durch spezifischere Studien analysiert. Sowohl bei der Entwicklung der Niere als auch bei der Ausformung der Finger während der Extremitätenentwicklung spielt Apoptose eine kritische Rolle (Zakeri und Ahuja, 1994; Mori et al., 1995; Hurler et al., 1996; Moser et al., 1997a; Chen und Zhao, 1998). Darüberhinaus stehen in beiden Fällen Systeme mit veränderter Apoptoserate zur Verfügung.

4.6. Bag-1 und Nierenentwicklung

4.6.1. Expression von Bag-1 während der Nierenentwicklung

Embryonal entsteht die Niere aus dem intermediären Mesoderm, das zwischen den Somiten und der Seitenplatte liegt. In craniocaudaler Sequenz entstehen drei Nierensysteme, der Pronephros (Vorniere, E9,0), der Mesonephros (Urnieren, E10,0) und der Metanephros, die eigentliche Niere (E12,5). Bei der Entwicklung dieser drei Nierensysteme spielt Apoptose eine entscheidende Rolle. Da die "Nierenvorläufer" Bag-1 nicht exprimieren (siehe Abb. 3 M als Beispiel für den Bag-1-negativen Mesonephros), beschränkten sich die Untersuchungen von Bag-1 während der Nierenentwicklung auf den Metanephros. Bei dessen Entwicklung spielt Apoptose eine kritische Rolle, insbesondere bei der Ausbildung der Sammelkanäle und im Epithel der distalen Tubuli (Moser et al., 1997a).

Um die Hypothese der inversen Korrelation der Expression von Bag-1 mit Apoptose zu überprüfen, wurde zunächst die Expression von Bag-1 während der Entwicklung der Niere im Detail untersucht.

Die Expression von Bag-1 während der Entwicklung des Metanephros wurde auf transkriptioneller Ebene durch Ganzpräparat-ISH an isolierten Nieren und durch radioaktive ISH an Gewebeschnitten durchgeführt.

Die Expression von Bag-1 mRNA in der Niere konnte nicht vor Tag 13,5 der Embryogenese nachgewiesen werden. Am Tag 13,5 p.c. waren Bag-1 Transkripte ubiquitär in der gesamten Niere nachweisbar, sowohl im induzierten Mesenchym als auch in den sich entwickelnden tubulären Strukturen (Abb. 10 A, E, E'). Zwischen E13,5 und E17,5 wurde Bag-1 in allen Nierenzelltypen mit Ausnahme der Glomeruli stark exprimiert (Abb. 10 B, C, F-G'). Im Verlauf der Entwicklung erfolgte eine fortschreitende Restriktion der Expression, so daß an den Tagen 16,5 p.c. und 17,5 p.c. Bag-1 Transkripte nurmehr in tubulären Strukturen nachweisbar waren, mit Ausnahme der Sammelrohre (Abb. 10 C, G, G'). Um den Zeitpunkt der Geburt ließ sich keine Bag-1 Expression nachweisen (Abb. 10 D); diese trat erst im adulten Tier wieder auf (Abb. 10 H und H'). In der adulten Niere wurden besonders starke Signale in der Medulla nachgewiesen, weniger starke Signale im Cortex und in der Papille (Abb. 10 H und H'). Glomeruli und Sammelrohre erwiesen sich wie auch in der embryonalen Niere als Bag-1 negativ.

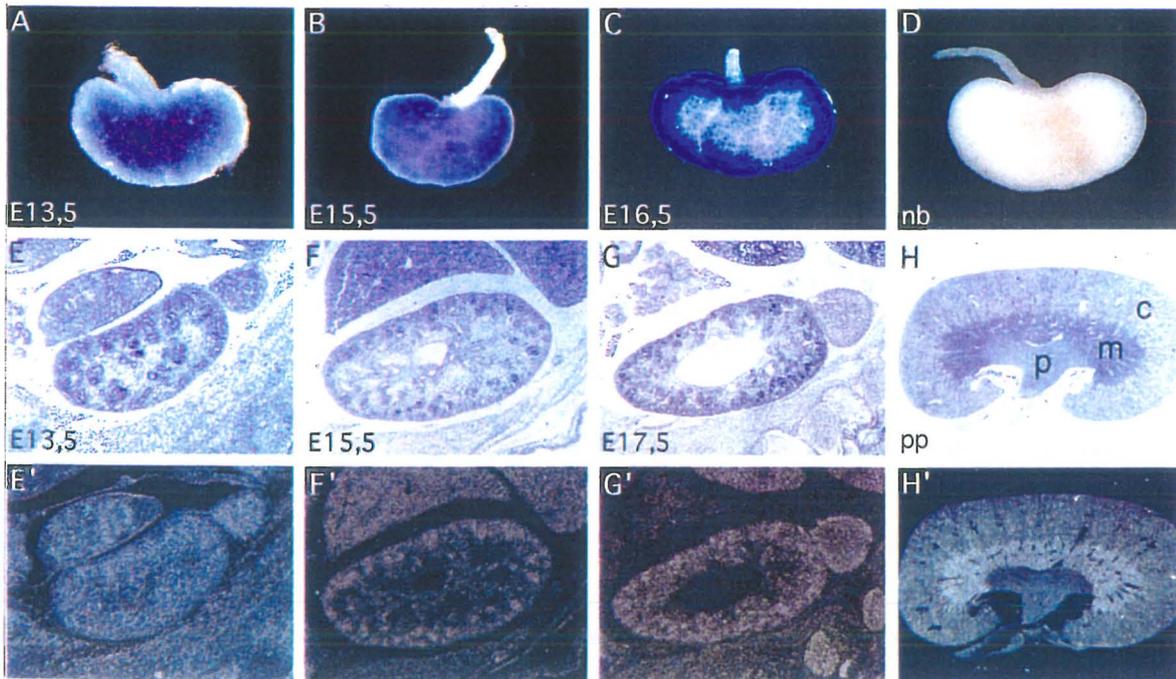


Abb. 10: Expression der Bag-1 mRNA während der Nierenentwicklung. Das räumliche und zeitliche Expressionsmuster der Bag-1 mRNA während der Entwicklung der Niere ist durch *In situ* Hybridisierungen dargestellt. A-D: Ganzpräparat-Hybridisierungen von isolierten Nieren verschiedener Embryonalstadien. E-H': Radioaktive Hybridisierungen an Sagittalschnitten von Nieren verschiedener Entwicklungsstadien. E-H: Hellfeldaufnahmen; E'-H': entsprechende Dunkelfeldaufnahmen. c = Cortex; E = Embryonalstadium in Tagen post coitum; m = Medulla; nb = neugeboren; p = Papille; pp = 12 Wochen post partum.

Um zu bestimmen, welche Bag-1 Proteine die Signale der *In situ* Hybridisierungen ergaben, wurde eine immunhistochemische Analyse mit den Antikörpern C16 und N15 an histologischen Schnitten von Nieren verschiedener Entwicklungsstadien vorgenommen. Ausschließlich mit dem C16 Antikörper konnten Bag-1 Proteine in der Niere detektiert werden (Abb. 11 als Beispiel für E16,5). Daraus läßt sich, zusammen mit den Ergebnissen der *Western blot* Analyse adulter Organe (siehe Abb. 8, Spur 2), schließen, daß in der Niere ausschließlich Proteine von 44 kDa und 46 kDa gebildet werden, jedoch nicht die Bag-1 Isoformen von 50 kDa und 32 kDa.

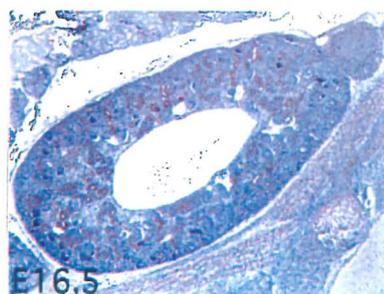


Abb. 11: Immunhistochemische Analyse an Gewebeschnitten der embryonalen Niere. Als primärer Antikörper wurde der C16 Antikörper eingesetzt. Schnittenebene: sagittal. E = Embryonalstadium in Tagen post coitum.

Während der Nierenentwicklung tritt Apoptose in der nephrogenen Zone, der medullären Papille und besonders in den Sammelkanälen und im Epithel der distalen Tubuli auf. Im zeitlichen Verlauf zeigt sich eine erhöhte Apoptoserate in den Embryonalstadien E14,5 bis E16,5. Von E16,5 bis zur Geburt hin sinkt die Apoptoserate stetig (Moser et al., 1997a).

Aus den vorgelegten Daten zur Expression von Bag-1 während der Entwicklung der Niere geht hervor, daß das Expressionsmuster von Bag-1 nicht mit dem bekannten Muster der Apoptose zu korrelieren scheint. Sollte Bag-1 bei der Entwicklung der Niere eine antiapoptotische Funktion ausüben, würde man eine erhöhte Expression in späteren Embryonalstadien und um den Zeitpunkt der Geburt erwarten. Tatsächlich wurde jedoch im Gegenteil eine Abnahme der Expression in den späteren Entwicklungsstadien nachgewiesen.

Der Schutz vor Apoptose könnte allerdings in einem sehr engen Zeitfenster erfolgen. So sinkt die Apoptoserate in der Niere ab Tag 16 der Embryonalentwicklung drastisch. Da der Verlust der Bag-1 Expression erst circa 1,5 Tage später, d.h. nach Tag 17,5 p.c. einsetzt, kann eine antiapoptotische Funktion von Bag-1 in der Niere nicht ausgeschlossen werden.

Mit AP-2 β -defizienten Mäusen steht ein System zur Verfügung, bei dem die Apoptoserate in der Niere drastisch erhöht und auch zeitlich verlängert ist. Deshalb wurde dieses System hinsichtlich einer inversen Korrelation der Expression von Bag-1 mit Apoptose untersucht.

4.6.2. Bag-1 Expression in der Niere AP-2 β -defizienter Tiere

AP-2 ist eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die aus drei Mitgliedern besteht: AP-2 (AP-2 α), AP-2 β und AP-2 γ (AP-2.2; Williams et al., 1988; Moser et al., 1995; Oulad-Abdelghani et al., 1996). Die Proteine dieser Familie spielen insbesondere bei der Gehirnentwicklung eine Rolle (Mitchell et al., 1991; Chazaud et al., 1996; Moser et al., 1997b). AP-2 β -defiziente Tiere zeigen jedoch ausschließlich einen Nierenphänotyp. Die Nieren der AP-2 β ^{-/-} Tiere haben im Vergleich zum Wildtyp eine etwas geringere Größe und sind polycystisch (Moser et al., 1997a). Um den Zeitpunkt der Geburt ist die Apoptoserate in den Sammelrohren und im Epithel der distalen Tubuli drastisch erhöht (Moser et al., 1997a).

An Gewebeschnitten von Nieren 9 Tage alter AP-2 β -defizienter Tiere wurde die Expression von Bag-1 mRNA im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Nieren von Tieren desselben Wurfes durch radioaktive *In situ* Hybridisierung untersucht.

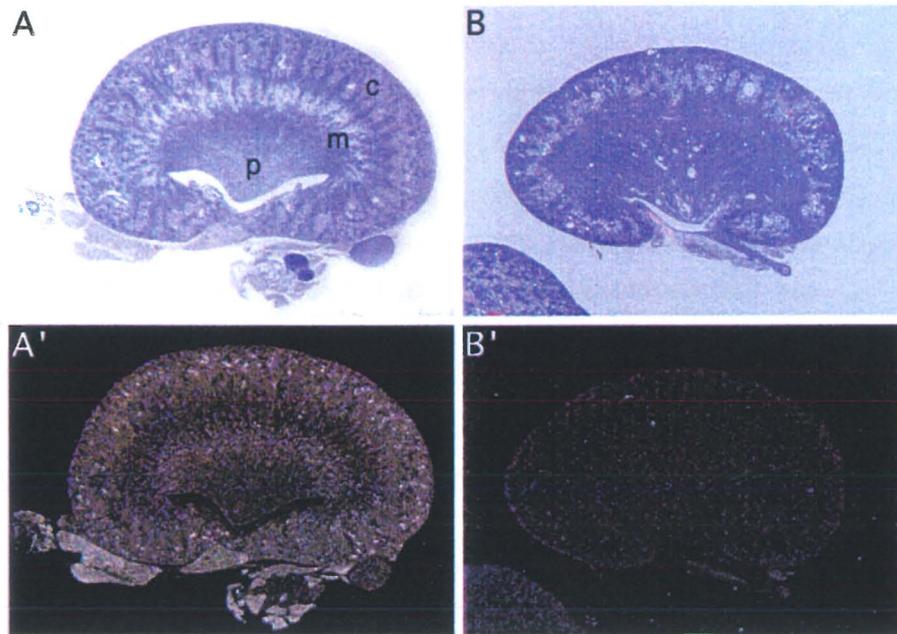


Abb. 12: Verlust der Bag-1 mRNA Expression in der Niere AP-2 β defizienter Tiere. Dargestellt ist die Expression der Bag-1 mRNA mittels radioaktiver *In situ* Hybridisierung an Sagittalschnitten der Niere. A, A' zeigt die Expression der Bag-1 Transkripte in der Niere eines 10 Tage alten Tieres (Wildtyp Wurfkontrolle); B, B' zeigt den Verlust der Bag-1 Expression in der Niere eines 10 Tage alten AP-2 β defizienten Tieres. A und B Hellfeldaufnahmen, A' und B' korrespondierende Dunkelfeldaufnahmen. c = Cortex; m = Medulla; p = Papilla.

Im Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen zeigen die Nieren der Wildtyp-Tiere ein etwas verändertes Expressionsmuster für Bag-1 für den Zeitpunkt nach der Geburt (Abb. 12 A, A'; siehe auch 4.6.1.). Bag-1 ist besonders stark in der Medulla exprimiert, etwas schwächer in der Papille. Der Cortex zeigt im Vergleich zu den Ergebnissen aus 4.6.1. stärkere Signale. Der Grund hierfür ist nicht bekannt; jedoch könnten die beobachteten Unterschiede in der Expression von Bag-1 auf die unterschiedlichen genetischen Hintergründe der verwendeten Mausstämme zurückzuführen sein. In den Glomeruli und den Sammelrohren konnte keine Bag-1 mRNA nachgewiesen werden. In den AP-2 β -defizienten Tieren hingegen war keine Expression von Bag-1 in der Niere nachweisbar (Abb. 12 B, B'). Diese eindeutige Veränderung im Vergleich zu Nieren von Wildtyp-Tieren ist mit der Hypothese einer antiapoptotischen Wirkung von Bag-1 *in vivo* vereinbar.

AP-2 β ist offensichtlich für die Expression von Bag-1 erforderlich. Eine direkte Kontrolle der Bag-1 Expression durch AP-2 β ist unwahrscheinlich, da die Expressionsorte von Bag-1 und AP-2 β in der Niere nicht identisch sind. Bag-1 ist mit Ausnahme der Sammelrohre und Glomeruli ubiquitär in tubulären Strukturen exprimiert, AP-2 β hingegen ausschließlich im Epithel der distalen Tubuli (Moser et al., 1997a, 1997b). Die Verminderung der Expression von Bag-1 in der Niere AP-2 β -defizienter Tiere ist daher eine indirekte Wirkung von AP-2 β . Dennoch könnte die erhöhte Apoptoserate in den Nieren der AP-2 β -defizienten Mäuse durch ein Fehlen der Bag-1 Expression vermittelt werden.

4.7. Bag-1 und Extremitätenentwicklung

4.7.1. Expression von Bag-1 mRNA während der Entwicklung der Extremitäten

Bei der Entwicklung der Extremitäten spielt Apoptose eine besonders prominente und kritische Rolle. Hierbei führt die Kontrolle über die Menge mesodermalen Gewebes zur allgemeinen Formgebung und zur Ausbildung der Finger bzw. Zehen (Saunders und Gasseling, 1962; Hinchliffe und Ede, 1973; Lee et al., 1993; Garcia-Martinez et al., 1993; Zakeri und Ahuja, 1994; Zakeri et al., 1994; Hurler et al., 1996; Chen und Zhao, 1998; Ferrari et al., 1998).

Um die Frage einer möglichen antiapoptotischen Funktion von Bag-1 *in vivo* zu untersuchen wurde daher, wie im Falle der Niere, zunächst die Expression der Bag-1 mRNA während der Extremitätenentwicklung bestimmt, um zu klären ob die Expression von Bag-1 invers mit Apoptose korreliert. Ganzpräparat-Hybridisierungen an isolierten Extremitäten der Embryonalstadien E10,5, E11,5, E12,5, E13,5, E14,5, E15,5, E16,5, E17,5 und E18,5 sowie von Neugeborenen wurden durchgeführt.

In den undifferenzierten Extremitätenknospen der Stadien E10,5 und E11,5 war eine gleichmäßige Expression von Bag-1 Transkripten im gesamten mesenchymalen Gewebe nachzuweisen (Abb. 13 A und B); im Epithel hingegen konnte keine Bag-1 Expression detektiert werden (siehe Pfeil in Abb. 13 B). Am Tag 12,5 p.c. war die Bag-1 Expression auf das interdigitale Gewebe beschränkt, die Knorpelblasteme, wie auch das Epithel zeigten hingegen keine Expression (Abb. 13 C). Am Tag 13,5 p.c. wurde die Expression auf die peridigitalen Bereiche begrenzt; im übrigen interdigitalen Gewebe war keine Bag-1 Expression nachweisbar (Abb. 13 D). Im Stadium E14,5 sind die Finger bereits ausgebildet, und die Ossifikation der Knorpelprimordien setzt ein. Der Prozeß der Apoptose des interdigitalen Gewebes ist annähernd vollständig abgeschlossen, d.h. der Großteil des interdigitalen Gewebes wurde durch Apoptose bereits eliminiert. In diesem Entwicklungsstadium konnten Bag-1 Transkripte ausschließlich in dem die Finger bzw. Zehen umgebenden Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 13 E). Im Embryonalstadium E15,5 ist der Prozeß der Separation der Finger bzw. Zehen abgeschlossen. Die grundlegende Form der Hand bzw. des Fußes ist gebildet; es erfolgt nurmehr Wachstum der Strukturen. In diesem und allen untersuchten späteren Entwicklungsstadien konnte keine Bag-1 Expression mehr nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Im Verlauf der Extremitätenentwicklung erfolgte demnach ein schrittweiser, gewebespezifischer Verlust der Expression von Bag-1 mRNA.

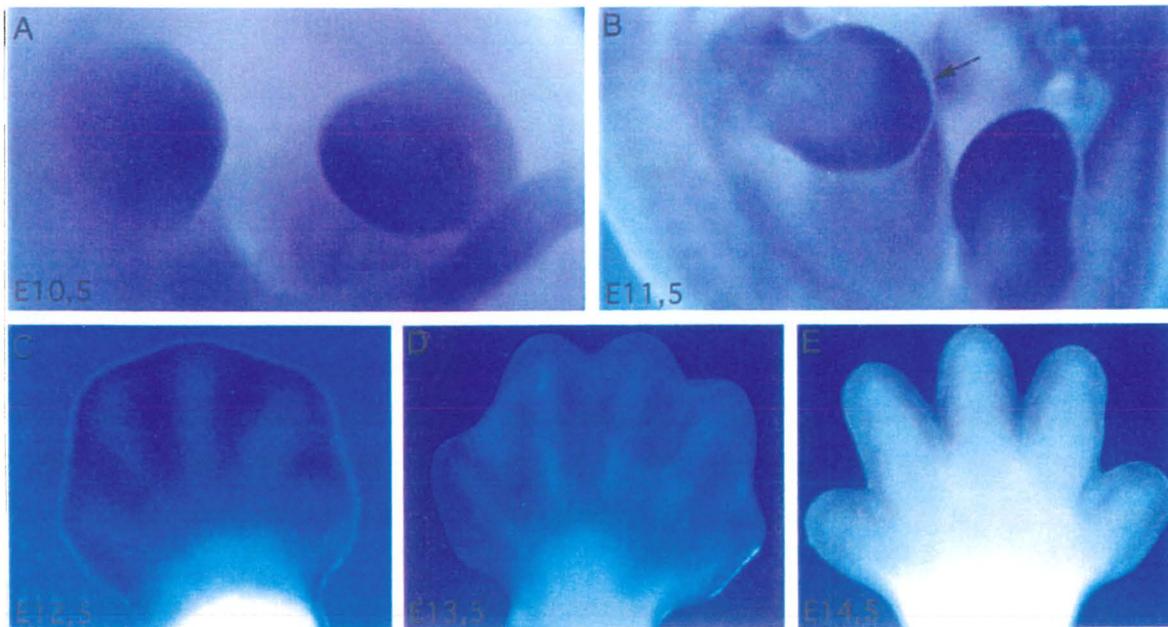


Abb. 13: Expression von Bag-1 mRNA während der Entwicklung der Extremitäten. Das räumliche und zeitliche Expressionsmuster der Bag-1 mRNA während der Entwicklung der Extremitäten ist durch *In situ* Hybridisierungen dargestellt. In den undifferenzierten Extremitätenknospen der Embryonalstadien E10,5 (A) und E11,5 (B) ist die Bag-1 mRNA uniform im gesamten mesenchymalen Gewebe exprimiert; das Epithel zeigt keine Expression von Bag-1 Transkripten (Pfeil in B). Am Tag 12,5 post coitum (C) ist die Bag-1 Expression auf das interdigitale Gewebe beschränkt. In den Stadien E13,5 (D) und E14,5 (E) sind Bag-1 Transkripte ausschließlich in den peridigitalen Bereichen nachweisbar. A und B: Ganzpräparat-Hybridisierungen isolierter Embryonen der Embryonalstadien E10,5 und E11,5. C-E: Ganzpräparat-Hybridisierungen isolierter Extremitäten der Stadien E12,5 bis E14,5. E = Embryonalstadium in Tagen post coitum.

Im Vergleich zu den Ergebnissen bei der sich entwickelnden Niere scheint bei der Extremitätenentwicklung eine eindeutigere inverse Korrelation der Bag-1 Expression mit Apoptose vorzuliegen. Um diese Korrelation eindeutig zu bestätigen, war es erforderlich zu zeigen, daß zum Zeitpunkt der Verminderung der Bag-1 Expression im Interdigitalgewebe Apoptose in diesem Gewebe auftritt. Daher wurden apoptotische Zellen in dieser Region der sich entwickelnden Extremitäten mit der TUNEL-Methode nachgewiesen (TUNEL, engl. für *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labelling*).

4.7.2. Apoptose während der Extremitätenentwicklung

Der Nachweis apoptotischer Zellen im Interdigitalgewebe erfolgte an Gewebeschnitten isolierter Extremitäten durch das Verfahren der "Terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase-vermittelten dUTP-Biotin Markierung freier 3'OH-Enden" (TUNEL). Diese Methode beruht auf dem spezifischen Nachweis der bei der Apoptose durch internukleosomale Restriktion entstandenen DNA-Fragmente bzw. deren freier 3'OH-Enden. Bei Inkubation der Schnitte mit Terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase werden Digoxigenin-markierte Nukleotide an

freie 3'OH-Enden gehängt und können durch Bindung eines mit Peroxidase gekoppelten Antikörpers gegen Digoxigenin nachgewiesen werden. Die Visualisierung erfolgte durch eine Farbreaktion mit dem Substrat DAB (Diaminobenzidin, anti-Digoxigenin Peroxidase Konjugat) und lieferte braune Signale.



Abb. 14: Nachweis apoptotischer Zellen im Interdigitalgewebe der Extremitäten mittels *In situ* Markierung freier 3'-Enden. Apoptotische Zellen wurden mittels "Terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase-vermittelter dUTP-Biotin Markierung freier 3'OH-Enden fragmentierter DNA" (TUNEL) nachgewiesen. Apoptotische Zellen sind durch eine spezifische rotbraune Färbung im Vergleich zu blaugefärbten nicht-apoptotischen Zellen bzw. Zellkernen zu erkennen. Dargestellt sind exemplarisch die Extremitäten zweier Embryonalstadien. Am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung (A) tritt noch keine Apoptose in der Gliedmaße auf. Im Embryonalstadium E14,5 (B und C) hingegen konnte massive Apoptose im Interdigitalgewebe nachgewiesen werden. C ist eine Ausschnittsvergrößerung von interdigitalem Gewebe aus B. E = Embryonalstadium in Tagen post coitum.

Am Tag 10,5 p.c. ist Bag-1 in der gesamten Extremitätenknospe gleichmäßig stark exprimiert (Abb. 13 A). In diesem Stadium konnten keine apoptotischen Zellen in der Extremitätenknospe nachgewiesen werden (Abb. 14 A), wohl aber in anderen Geweben wie z.B. der ventralen Gabelung des Vorderdarms, dem zukünftigen Divertikulum der Luftröhre (Laryngotracheale Furche, Ergebnisse nicht gezeigt). An den Tagen 13,5 p.c. und 14, 5 p.c. ist die Expression von Bag-1 im interdigitalen Gewebe nicht mehr vorhanden (Abb. 13 D und E). In diesem Embryonalstadium war nunmehr massive Apoptose im interdigitalen Gewebe nachzuweisen (Abb. 14 B und C). Abb. 14 C zeigt eine höhere Vergrößerung der Apoptose im Interdigitalgewebe.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß Bag-1 analog zu den Ergebnissen der Überexpressionsanalysen (Takayama et al., 1995; Bardelli et al., 1996; Clevenger et al., 1997; Kullmann et al., 1998) möglicherweise auch *in vivo* im Autopodium vor apoptotischem Zelltod schützt.

Der interdigitale Zelltod in den sich entwickelnden Extremitätenknospen ist ein einzigartiges System, um die Kontrolle des Zelltodes zu untersuchen, da dieser Prozeß durch Applikation von Retinsäure reguliert werden kann. Es ist bekannt, daß Retinsäureapplikation zu erhöhter

bzw. verfrühter Apoptose im Interdigitalgewebe führt (Jiang und Kochhar, 1992; Kochhar et al., 1993; Rodriguez-Leon et al., 1999; Dupé et al., 1999). Einen komplementären Ansatz bieten RAR β -doppeltdefiziente Tiere mit verminderter Apoptose im Interdigitalgewebe der Extremitäten. Diese Tiere zeigen phänotypisch persistierendes interdigitales Mesenchym ("Schwimmhäute") aufgrund verminderter interdigitaler Apoptose (Ghyselinck et al., 1997; Dupé et al., 1999). Da diese beiden Systeme eine veränderte Apoptoserate aufweisen, wurden sie benutzt, um Veränderungen in der Expression von Bag-1 zu bestimmen.

4.7.3. Verminderung der Bag-1 mRNA Expression im Interdigital-gewebe der Extremitäten nach Retinsäurebehandlung schwangerer Mäuse

Da Retinsäure die Apoptoserate im Interdigitalgewebe erhöht, wurde diese eingesetzt, um ihre Wirkung auf die Expression von Bag-1 zu bestimmen.

Schwangeren Mäusen wurde oral 50 mg/kg Körpergewicht all-trans Retinsäure verabreicht. Um die Resorption der Retinsäure zu erleichtern, wurden die Tiere 12 Stunden vor oraler Verabreichung ohne Futter gehalten. Da die Ausformung der Finger während eines sehr engen Zeitfensters erfolgt, wurden für diese Versuche Embryonen verwendet, deren Embryonalstadien auf +/- 45 min genau bestimmt wurde (engl.: *timed matings*). Die Applikation der Retinsäure erfolgte am Tag 12,0 p.c.; nach sechs bzw. acht Stunden wurden die Muttertiere getötet, die Embryonen isoliert und deren Extremitäten präpariert. Der Nachweis endogener Bag-1 mRNA erfolgte durch *In situ* Hybridisierung am Ganzpräparat der isolierten Extremitäten.

Nach sechsständiger Retinsäurebehandlung setzt die Wirkung der Retinsäure auf die Expression der Bag-1 mRNA gerade ein. Nur eine minimale Verminderung der Expression der Bag-1 Transkripte ist im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren zu erkennen (Abb. 15 A und B, beachte Pfeile in B). Nach acht Stunden Retinsäurebehandlung hingegen ist die Expression von Bag-1 im interdigitalen Mesenchym eindeutig vermindert (Abb. 15 E, F). Überreste von Bag-1 Signalen waren ausschließlich im Bereich um die Finger herum lokalisiert. Die Finger selbst zeigen keinerlei Bag-1 Signale. Da es sich bei den Extremitäten um dreidimensionale Objekte handelt, die im Gegensatz zu histologischen Schnitten nicht über ihren gesamten Bereich im Fokus fotografiert werden können, kann wie z.B. in Abb. 15 F fälschlicherweise der Eindruck eines Signales im Finger entstehen.

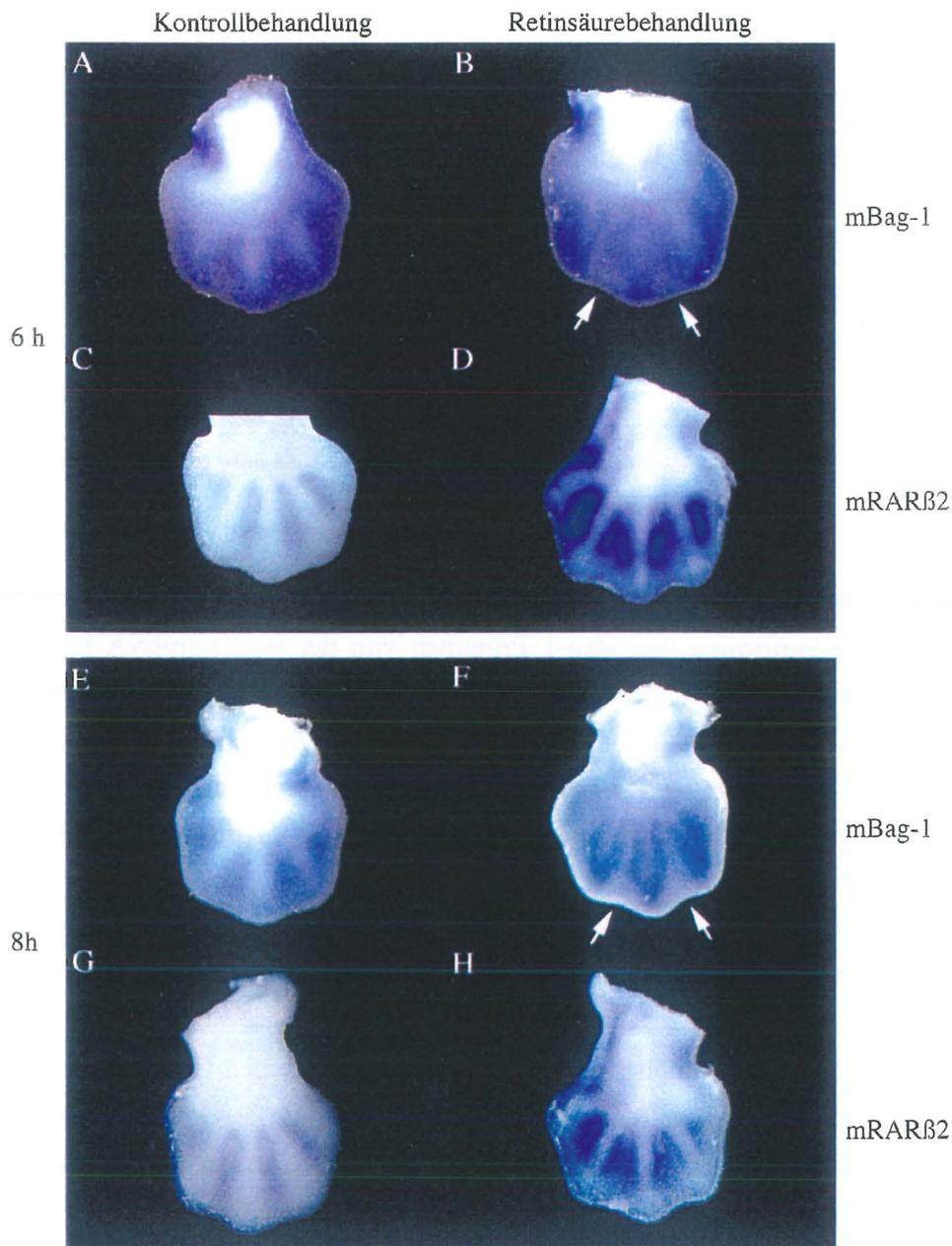


Abb. 15: Verminderung der Bag-1 mRNA Expression im Interdigitalgewebe der Extremitäten nach Retinsäurebehandlung schwangerer Mäuse. Dargestellt ist die Verminderung der Bag-1 Transkripte im Interdigitalgewebe retinsäurebehandelter Embryonen. Schwangeren Mäusen wurde am Tag 12,0 post coitum 50 mg all-trans Retinsäure pro kg Körpergewicht oral verabreicht. Die Embryonen wurden nach sechs bzw. acht Stunden isoliert. Die Detektion der Transkripte von Bag-1 und RAR β 2 erfolgte durch *In situ* Hybridisierungen an isolierten Extremitäten. Hierbei war die Dauer der enzymatischen Farbreaktion der alkalischen Phosphatase nach Substratzugabe (BM-Purple) für den Nachweis der Bag-1 bzw. RAR β 2 Transkripte für die retinsäurebehandelten und die kontrollbehandelten Ansätze exakt gleich lang. Nach sechs Stunden Retinsäurebehandlung ist nur eine minimale Verringerung der Bag-1 mRNA Expression im Interdigitalgewebe im Vergleich zur Kontrollbehandlung nachzuweisen (vergleiche A und B, beachte Pfeile in B). Nach acht Stunden Behandlung mit Retinsäure hingegen konnte eine ausgeprägte Verminderung der Expression von Bag-1 Transkripten im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren im interdigitalen Gewebe nachgewiesen werden (vergleiche E und F, beachte Pfeile in F). C und D bzw. G und H zeigen Kontrollen, die den Erfolg der Retinsäurebehandlung demonstrieren. Bereits nach sechs Stunden (C und D) und auch nach acht Stunden (G und H) ist eine drastische Erhöhung der Expression von RAR β 2 mRNA nach Retinsäurebehandlung (D und H) im Vergleich zur Kontrollbehandlung (C und G) im Interdigitalgewebe detektierbar.

Um den Erfolg der Retinsäureverabreichung zu überprüfen, wurde als Kontrolle eine Sonde für den Retinsäurerezeptor $\beta 2$ (RAR $\beta 2$) verwendet. Der RAR $\beta 2$ ist im Interdigitalgewebe exprimiert (Dollé et al., 1989; Ruberte et al., 1991; Ghyselinck et al., 1997; Mollard et al., 2000) und seine Expression wird durch Retinsäure verstärkt (DeThé et al., 1989; Leroy et al., 1991; Zelent et al., 1991). Während die Expression von Bag-1 nur nach acht Stunden Retinsäurebehandlung eindeutig vermindert ist, zeigt sich bei der Kontrolle der Retinsäurebehandlung eine drastische Verstärkung der RAR $\beta 2$ Expression bereits nach 6 und nach 8 Stunden (Abb. 15 C, D, G, H). Daraus läßt sich schließen, daß die Behandlung der Tiere mit Retinsäure wirksam war, der Effekt auf die Expression der Bag-1 mRNA nach sechs Stunden jedoch sehr schwach ist.

Da verschiedene Isoformen von Bag-1 Proteinen von der Bag-1 mRNA kodiert werden, wurde immunhistochemisch untersucht, welche der Isoformen auf die Behandlung mit Retinsäure reagiert. Hierzu wurden die beiden isoformspezifischen Antikörper C16 (der in Geweben Bag-1 Isoformen mit Ausnahme von Bag-1L erkennt) und N15 (der ausschließlich Bag-1L erkennt) verwendet. Dadurch konnte die isoformspezifische Verteilung der Bag-1 Proteinprodukte in den Extremitäten ermittelt werden. Darüberhinaus konnte die Verminderung der Bag-1 Expression nach Retinsäurebehandlung auf Proteinebene bestätigt werden.

Mit dem C16 Antikörper konnten in den immunhistochemischen Experimenten nur äußerst schwache Signale detektiert werden, die nach Gegenfärbung des Gewebes mit Hämatoxylin nicht mehr zu erkennen waren. Proteinprodukte, die vom C16 Antikörper erkannt werden, sind in der gesamten Gliedmaße uniform, jedoch auf extrem niedrigem Niveau exprimiert.

Mit dem Bag-1L spezifischen N15 Antikörper konnte Bag-1 Proteinprodukt auf hohem Expressionsniveau in den Extremitäten detektiert werden (rote Zellen in Abb. 16 A, B). Bag-1L ist im Interdigitalgewebe nachweisbar. Die achtstündige Retinsäurebehandlung führt zu einer Verminderung der Bag-1 Expression im Interdigitalgewebe (Abb. 16 A und C). Deutlich ist die Zahl der eindeutig Bag-1L-negativen (blauen) Zellen nach Retinsäurebehandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung erhöht (Abb. 16, vergleiche A mit B).

Somit wurde in den sich entwickelnden Extremitäten so gut wie ausschließlich Bag-1L nachgewiesen. Darüberhinaus konnte bestätigt werden, daß Retinsäurebehandlung die Bag-1 Expression sowohl auf der Ebene der mRNA als auch auf Proteinebene vermindert.

Bei der Verminderung der Bag-1 Expression wurde eine zeitliche Verzögerung von etwa zwei Stunden im Vergleich zur durch Retinsäure vermittelten Transaktivierung des RAR β 2 beobachtet. Wenn die erniedrigte Expression von Bag-1 der Grund für die auftretende Apoptose ist, müsste diese mit der gleichen Verzögerung auftreten. Daher wurde die Apoptoserate im interdigitalen Mesenchym nach Retinsäurebehandlung untersucht.

4.7.4. Erhöhte Apoptose im Interdigitalgewebe der Extremitäten nach Retinsäurebehandlung schwangerer Mäuse

An histologischen Schnitten isolierter Extremitäten von retinsäure- und kontrollbehandelten Tieren wurden apoptotische Zellen mittels TUNEL-Methode nachgewiesen.

Nach sechs Stunden Retinsäurebehandlung war kein Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen im Interdigitalgewebe im Vergleich zur Kontrollbehandlung nachzuweisen.

Die Behandlung mit Retinsäure für acht Stunden hingegen führte zu einer drastischen Erhöhung der Apoptoserate im Interdigitalgewebe im Vergleich zur Kontrollbehandlung (Abb. 16, vergleiche B mit C). Die Quantifizierung der apoptotischen (braunen) Zellen im interdigitalen Mesenchym von Kontrollbehandlung und Retinsäurebehandlung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung durch Auszählen identischer Flächeneinheiten (Abb. 16 E). Für die Kontrollbehandlung ergaben sich 34 % apoptotische Zellen pro Flächeneinheit, für die Retinsäurebehandlung hingegen 54 % apoptotische Zellen pro Flächeneinheit (Abb. 16 F). Die Retinsäurebehandlung führte demnach zu einer Erhöhung der Apoptoserate um 20 % im Vergleich zur Kontrollbehandlung.

Retinsäure induziert somit eine Verminderung der Bag-1 Expression und eine Erhöhung der Apoptoserate im Interdigitalgewebe und zwar mit gleichem Zeitverlauf. Dies unterstützt die Hypothese einer antiapoptotischen Funktion von Bag-1 *in vivo*.

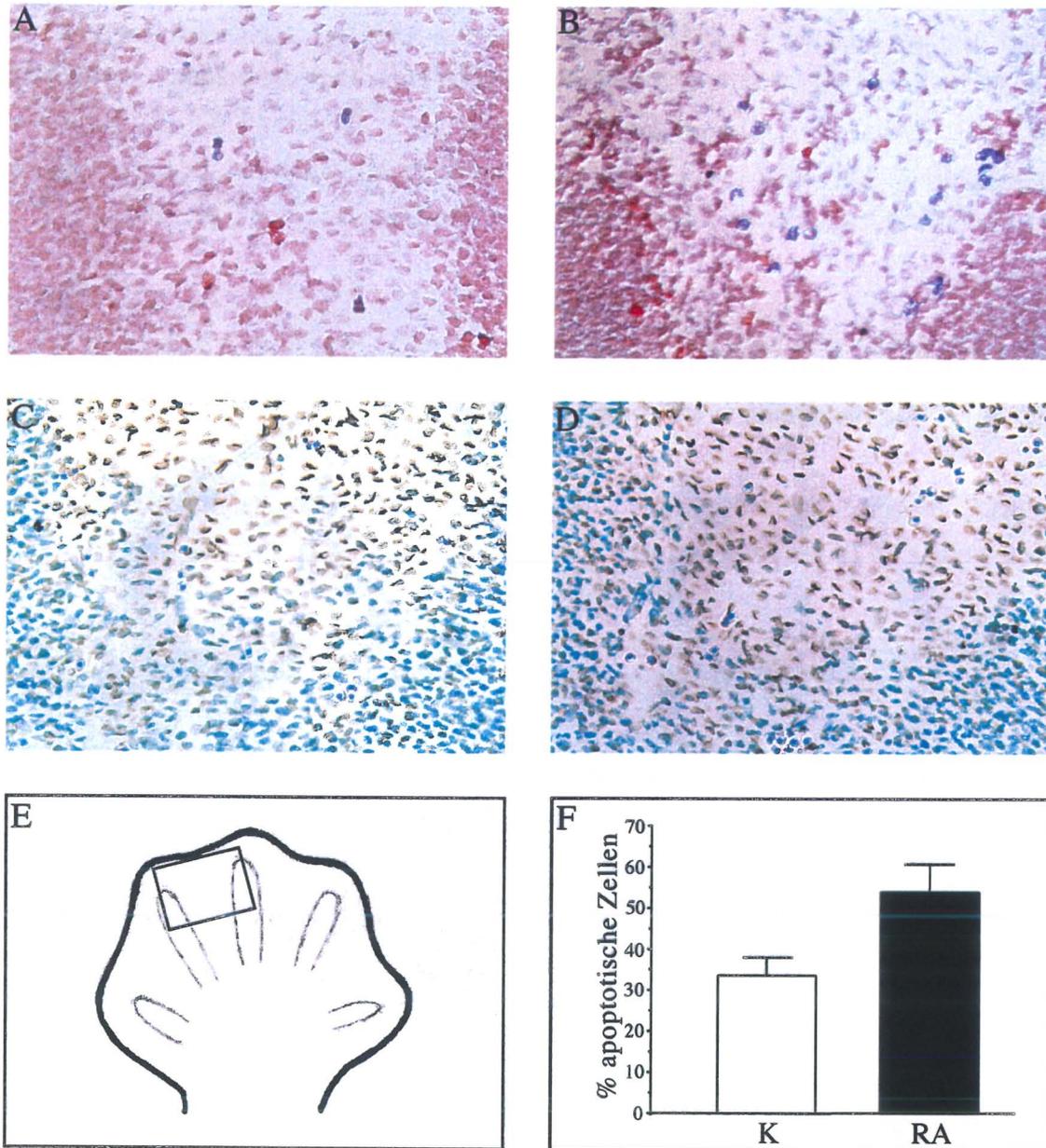


Abb. 16: Verminderung von Bag-1L Protein und Erhöhung der Apoptoserate im Interdigitalgewebe nach Retinsäurebehandlung schwangerer Mäuse. Am Tag 12,0 der Embryonalentwicklung wurden jeweils zwei schwangere Mäuse retinsäure- bzw. kontrollbehandelt. Nach acht Stunden wurden die Embryonen isoliert und die Extremitäten präpariert. Dargestellt ist die Verminderung von Bag-1L Protein im Interdigitalgewebe nach Retinsäurebehandlung (B) im Vergleich zur Kontrollbehandlung (A). In D dargestellt ist die Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen nach Retinsäurebehandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung (C). Die in F dargestellte Quantifizierung erfolgte wie nachfolgend beschrieben. Von Gewebeschnitten mit vergleichbarer Schnittebene wurde bei 400-facher Vergrößerung der in Abb. 16 C angegebene Ausschnitt mit einer Digitalkamera (ProgRes 3012, Jenoptik, Jena) photographiert. Auf diese Aufnahmen wurde jeweils eine identische Flächeneinheit an den jeweils entsprechenden Stellen projiziert. Innerhalb dieser Flächeneinheit wurden jeweils eindeutig apoptotische (braune) Zellen und die Gesamtzahl der Zellen ausgezählt. Für die Kontrollbehandlung wurden jeweils 2 histologische Schnitte von 4 Extremitäten untersucht (n = 8); für die Retinsäurebehandlung wurden jeweils 2 histologische Schnitte von 6 isolierten Extremitäten untersucht (n = 12). Für die graphische Darstellung in Abb. 16 D wurden die Werte für die apoptotischen Zellen in Prozent der entsprechenden Gesamtzahl umgerechnet, der arithmetische Mittelwert errechnet und die Standardabweichung ermittelt. Der Mittelwert und die Standardabweichung für die Kontrollbehandlung betragen 33,7 und 4,4 für die Retinsäurebehandlung 54,1 und 6,8. Es ergibt sich eine 20%ige Erhöhung der Apoptoserate nach Retinsäurebehandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung.

4.7.5. Expression von Bag-1 mRNA in RAR $\beta\gamma$ -doppeltdefizienten Mäusen

Wenn der zur Apoptose führende Signalweg durch eine Verminderung der Bag-1 Expression vermittelt wird, dann sollte in einem System mit verminderter Apoptoserate die Expression von Bag-1 erhöht sein.

Die Generierung von Mäusen, die eine verminderte interdigitale Apoptoserate aufweisen wurde durch Mausmutanten ermöglicht, bei denen durch homologe Rekombination die Gene für die Retinsäurerezeptoren β und γ (RAR β und RAR γ) deletiert wurden. Mäuse der Genotypen RAR $\beta^{-/-}$ / RAR $\gamma^{-/-}$ und RAR $\beta^{+/-}$ / RAR $\gamma^{-/-}$ zeigen phänotypisch "Schwimmhäute" aufgrund persistierenden interdigitalen Mesenchyms (Ghyselinck et al., 1997; Dupé et al., 1999). In diesem Tiermodell wurde überprüft, ob die interdigitale Expression von Bag-1 erhalten bleibt wenn Apoptose inhibiert ist.

Tiere des RAR $\beta^{-/-}$ / RAR $\gamma^{-/-}$ -Genotyps sind perinatal letal (Ghyselinck et al., 1997). Die Generierung der RAR $\beta\gamma$ -doppeltdefizienten Embryonen erfolgte daher in drei Schritten (Tab. 1). Die von Pierre Chambon (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, Frankreich) zur Verfügung gestellten Tiere (zwei adulte männliche, homozygot RAR β -defiziente und zwei adulte weibliche, heterozygot RAR γ -defiziente Mäuse) dienten zum Aufbau einer Zuchtpopulation RAR $\beta^{+/-}$ bzw. RAR $\gamma^{+/-}$ heterozygot defizienter Tiere (Schritt 1). Diese wurden untereinander gekreuzt, so daß u.a. RAR $\beta^{+/-}$ / RAR $\gamma^{+/-}$ -heterozygot doppeldefiziente Tiere geboren wurden (Schritt 2). Diese wurden dann im dritten Schritt untereinander gekreuzt, so daß u.a. die zur Analyse erforderlichen Embryonen der Genotypen RAR $\beta^{+/-}$ / RAR $\gamma^{-/-}$ und RAR $\beta^{-/-}$ / RAR $\gamma^{-/-}$ gewonnen werden konnten.

Zusammen wurden in allen drei Schritten insgesamt 800 Tiere generiert. Die notwendigen Genotypisierungen erfolgten mittels PCR aus genomischer Schwanz-DNA der Tiere (Abb. 17). Die Untersuchung des RAR β -Genotyps erfolgte unter Verwendung von Wildtyp-Allel-spezifischen Primern und solchen Primern, die sequenzspezifisch für das mutierte Allel sind. Auf Agarosegelen wurden die amplifizierten 275 bp-Fragmente des Wildtyp-Allels und 300 bp-Fragmente des mutierten Allels nachgewiesen (Abb. 17 A). Die Untersuchung des RAR γ Genotyps erfolgte durch Amplifikation von 1195 bp-Fragmenten des Wildtyp-Allels und 1238 bp-Fragmenten des mutierten Allels, die auf Agarosegelen nachgewiesen wurden (Abb. 17 B).

Schritt 1:			
RAR β ^{-/-} X C57BL/6	⇒	RAR β ^{+/-}	(1)
RAR γ ^{+/-} X C57BL/6	⇒	RAR γ ^{+/-}	(1/2)
		RAR γ ^{+/+}	(1/2)
Schritt 2:			
RAR β ^{+/-} X RAR γ ^{+/-}	⇒	RAR β ^{+/+} / RAR γ ^{+/+}	(1/4)
		RAR β ^{+/+} / RAR γ ^{+/-}	(1/4)
		RAR β ^{+/-} / RAR γ ^{+/+}	(1/4)
		RAR β ^{+/-} / RAR γ ^{+/-}	(1/4)
Schritt 3:			
RAR β ^{+/-} / RAR γ ^{+/-} X RAR β ^{+/-} / RAR γ ^{+/-}	⇒	RAR β ^{+/+} / RAR γ ^{-/-}	(1/16)
		RAR β ^{+/+} / RAR γ ^{+/-}	(2/16)
		RAR β ^{+/+} / RAR γ ^{+/+}	(1/16)
		RAR β ^{+/-} / RAR γ ^{+/+}	(2/16)
		RAR β ^{+/-} / RAR γ ^{+/-}	(4/16)
		RAR β ^{+/-} / RAR γ ^{-/-}	(2/16)
		RAR β ^{-/-} / RAR γ ^{+/+}	(1/16)
		RAR β ^{-/-} / RAR γ ^{+/-}	(2/16)
		RAR β ^{-/-} / RAR γ ^{-/-}	(1/16)

Tab. 1: Kreuzungsschema. Dargestellt sind Verpaarungen und die hieraus resultierenden Genotypen. Die in Klammern angegebenen Zahlen geben die Anzahl eines bestimmten Genotyps in Relation zur Gesamtzahl der verschiedenen Genotypen an.

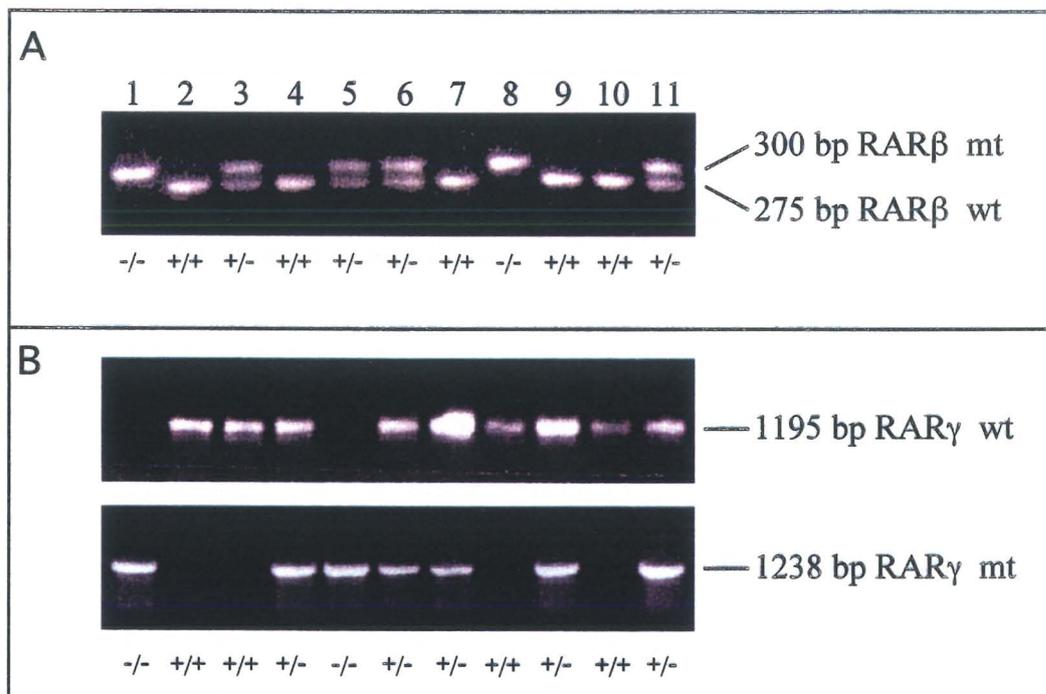


Abb. 17: Genotypisierung von RAR β γ -doppeltdefizienten Mausembryonen mittels PCR. Dargestellt ist die beispielhafte Genotypisierung von 11 Embryonen. In A ist die Amplifikation der Wildtyp-Allele bzw. mutierten Allele des RAR β -Locus dargestellt, in B die des RAR γ -Locus.

In nachfolgender Tabelle ist die Anzahl der aus Schritt drei der Verpaarungen erhaltenen Embryonen verschiedener Embryonalstadien und deren Genotypen aufgelistet. Diese Tiere bzw. deren Vorderextremitäten wurden dem Experiment zugeführt.

	$RAR\beta^{-/-} / RAR\gamma^{-/-}$	$RAR\beta^{+/-} / RAR\gamma^{-/-}$	$RAR\beta^{+/+} / RAR\gamma^{+/+}$
E12,5	5	7	5
E13,5	3	11	3
E14,5	5	7	4

Tab. 2: Auflistung von Embryonen, deren Embryonalstadien und Phänotypen. Die Zahlen geben die Anzahl der Embryonen eines bestimmten Embryonalstadiums und Genotyps an.

An den Vorderextremitäten der in Tabelle 2 aufgeführten Embryonen der entsprechenden Embryonalstadien und Genotypen wurden Ganzpräparat *In situ* Hybridisierungen durchgeführt, um die Expression endogener Bag-1 mRNA nachzuweisen. Die Ergebnisse für die Extremitäten des Genotyps $RAR\beta^{-/-} / RAR\gamma^{-/-}$ unterschieden sich nicht von denen des Genotyps $RAR\beta^{+/-} / RAR\gamma^{-/-}$. Sämtliche untersuchten Extremitäten mit Ausnahme des Wildtyps zeigten identische Ergebnisse. Eine repräsentative Auswahl ist in Abb. 17 dargestellt.

Die Ergebnisse dieses Experiments (Abb. 18) zeigten, daß am Tag 12,5 p.c. Bag-1 im Interdigitalgewebe der Extremitäten nachzuweisen war. In diesem Embryonalstadium war noch kein Unterschied zwischen Extremitäten vom Wildtyp und $RAR\beta\gamma$ -doppeldefizienten Embryonen festzustellen (Abb. 18 A und B). Im Embryonalstadium E13,5 war die Bag-1 Expression im Interdigitalgewebe beim Wildtyp vermindert. Die Expression erstreckte sich hauptsächlich auf die peridigitalen Bereiche (Abb. 18 C). Beim Genotyp $RAR\beta^{-/-} / RAR\gamma^{-/-}$ hingegen war keine Verminderung der Bag-1 Expression im Interdigitalgewebe nachzuweisen (Abb. 18 D). Am Tag 14,5 p.c. waren beim Wildtyp die Finger ausgebildet und Bag-1 Transkripte wurden ausschließlich in den die Finger umgebenden Bereichen nachgewiesen (Abb. 18 E). Beim Genotyp $RAR\beta^{-/-} / RAR\gamma^{-/-}$ waren keine fertig ausgebildeten Finger zu erkennen, obwohl durch das Wachstum der ossifizierenden Knorpelprimordien Finger angedeutet waren. Eine starke Expression von Bag-1 mRNA wurde interdigital und peridigital nachgewiesen; die stärkste Expression erschien distal (Abb. 18 F).

Im experimentellen System mit verminderter Apoptoserate konnte somit gezeigt werden, daß im persistierenden Mesenchym die Expression von Bag-1 erhalten bleibt.

Sowohl in Systemen mit verminderter Apoptoserate wie auch in Systemen mit erhöhter Apoptoserate läßt sich während der Extremitätenentwicklung eindeutig eine inverse Korrelation der Bag-1 Expression mit Apoptose feststellen.

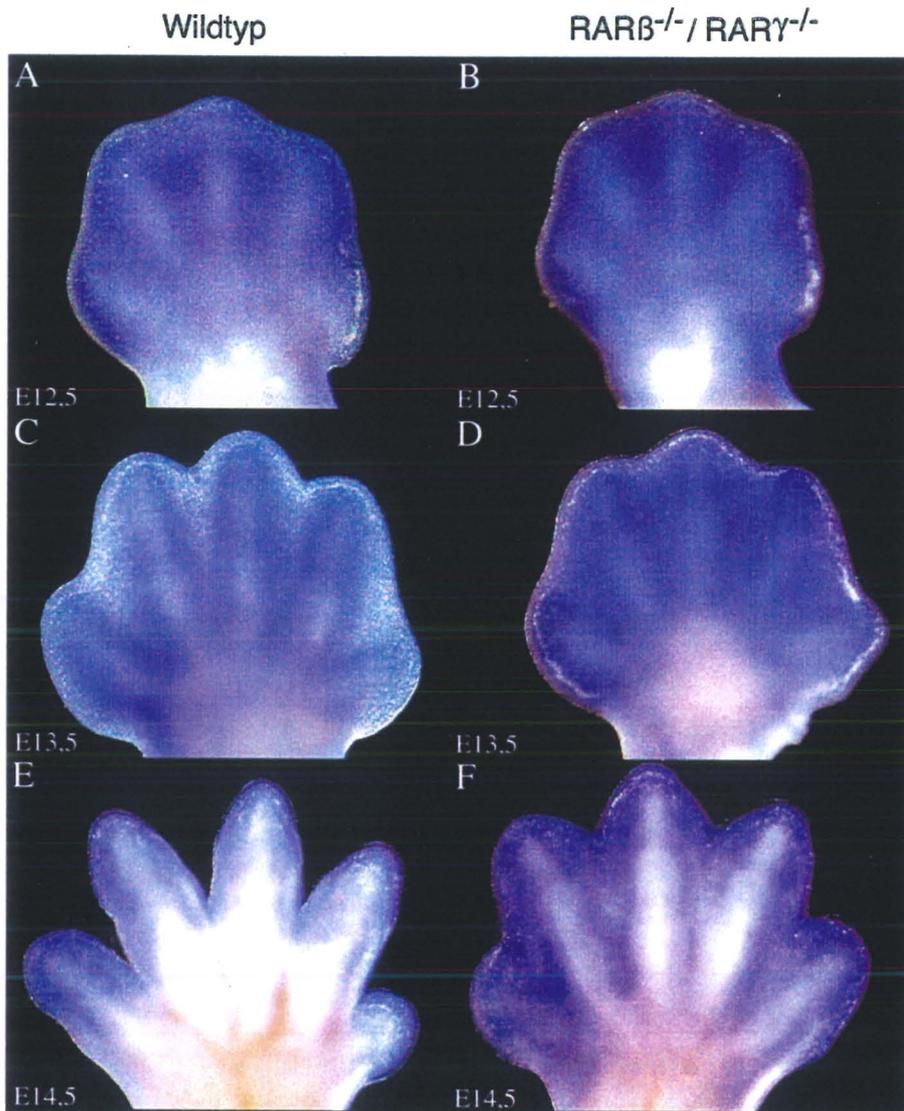


Abb. 18: Erhalt der Bag-1 mRNA Expression im Interdigitalgewebe der Extremitäten von $RAR\beta$ -doppeltdefizienten Embryonen. An isolierten Extremitäten von Embryonen der angegebenen Genotypen und Entwicklungsstadien wurden Ganzpräparat-*In situ* Hybridisierungen zum Nachweis der endogenen Bag-1 mRNA durchgeführt. Deutlich ist in den Embryonalstadien E13,5 und E14,5 der Erhalt der Expression der Bag-1 mRNA im Interdigitalgewebe der Extremitäten von $RAR\beta$ -doppeltdefizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zu erkennen.

5. Diskussion

Bag-1 ist eine Familie von Proteinen, die beim Menschen aus mindestens vier, bei der Maus aus mindestens zwei Polypeptiden besteht, die jeweils von einer mRNA translatiert werden (Takayama et al., 1995; Zeiner und Gehring, 1995; Bardelli et al., 1996; Packham et al., 1997; Yang et al., 1998; Takayama et al., 1998). Weitere mit Bag-1 verwandte Proteine entstehen vermutlich durch alternatives Spleißen (Takayama et al., 1999). Die Bag-1 Isoformen sind multifunktionelle Proteine, die durch eine gemeinsame carboxyterminale Aminosäuresequenz charakterisiert werden. Über diesen Carboxyterminus binden Bag-1 Proteine an Hsp70/Hsc70 und modulieren dessen Wirkung als molekulares Chaperon (Höhfeld et al., 1995; Wang et al., 1996b; Höhfeld und Jentsch, 1997; Takayama et al., 1997; Zeiner et al., 1997; Gebauer et al., 1997, 1998; Matsuzawa et al., 1998; Bimston et al., 1998; Kanelakis et al., 1999; Höhfeld, 1998; Stuart et al., 1998; Nollen et al., 2000; Lüders et al., 2000). Ursprünglich identifiziert aufgrund seiner Fähigkeit das antiapoptotische Protein Bcl-2 zu binden (Takayama et al., 1995), vermag Bag-1 mit einer ganzen Reihe zellulärer Faktoren zu interagieren, einschließlich des Oncoproteins Raf-1 (Wang et al., 1996b, 1998) und einer Reihe nukleärer Rezeptoren (Zeiner und Gehring, 1995; Liu et al., 1998; Froesch et al., 1998). Verschiedene *in vitro* Funktionen von Bag-1 wurden mittlerweile beschrieben, wie Hemmung des programmierten Zelltods (Takayama et al., 1995; Bardelli et al., 1996; Clevenger et al., 1997; Liu et al., 1998; Kullmann et al., 1998; Yang et al., 1999b) und Modulation der Wirkung von Steroidhormonrezeptoren (Liu et al., 1998; Froesch et al., 1998; Kullmann et al., 1998; Schneikert et al., 1999).

Ziel dieser Arbeit war es, durch Bestimmung des isoformspezifischen Expressionsmusters von Bag-1 während der Embryonalentwicklung der Maus, Hinweise auf eine mögliche antiapoptotische Funktion von Bag-1 *in vivo* zu erhalten. Insbesondere bei den sich entwickelnden Extremitäten wurde die Rolle von Bag-1 bei der Kontrolle des interdigitalen Zelltods näher untersucht.

5.1. Expressionsmuster von Bag-1

In der vorliegenden Arbeit wurde die isoformspezifische Expression von Bag-1 in der Maus während der Embryonalentwicklung und in einigen ausgewählten Geweben im adulten Tier untersucht. Im großen und ganzen wurde eine annähernd ubiquitäre Expression von Bag-1 nachgewiesen, besonders in den adulten Geweben. Bislang wurden von nur zwei weiteren Arbeitsgruppen Daten zur Expression von Bag-1 publiziert, allerdings ausschließlich auf adulte Gewebe bzw. Organe beschränkt (Zeiner und Gehring, 1995; Takayama et al., 1998).

Beide Arbeitsgruppen zeigten mittels *Northern blot* Analyse eine ubiquitäre Expression von Bag-1 in einigen wenigen adulten Geweben der Maus (Zeiner und Gehring, 1995; Takayama et al., 1998). Mittels Immunhistochemie untersuchten Takayama et al. (1998) auch eine ganze Reihe muriner wie humaner Gewebe und wiesen ebenfalls eine ubiquitäre Expression von Bag-1 nach. Allerdings wurden in der von Takayama et al. (1998) durchgeführten immunhistochemischen Analyse ausschließlich Antikörper verwendet, die alle Bag-1 Isoformen detektieren. Die in dieser Arbeit nachgewiesene annähernd ubiquitäre Expression von Bag-1 befindet sich somit im Wesentlichen in Übereinstimmung mit von anderen Arbeitsgruppen publizierten Daten. Dies trifft zumindest für den adulten Organismus zu. Während der Embryonalentwicklung gilt dies mit Einschränkung, da die durchgeführte Expressionsanalyse für den zeitlichen Verlauf während der Embryogenese leicht abweichende Ergebnisse erbrachte. Hieraus ergab sich, daß Bag-1 zwar annähernd ubiquitär exprimiert ist, daß allerdings in einigen Geweben bzw. Organen die anfängliche Expression von Bag-1 im Verlauf der embryonalen Entwicklung verlorenght. Der Verlust der anfänglichen Expression wurde beispielsweise in folgenden Organen nachgewiesen: Hoden, Niere, Meckelscher Knorpel, Anus und Extremitäten. Da Bag-1 *in vitro* als antiapoptotisches Protein beschrieben wurde, ergab sich hieraus ein erster Hinweis auf eine mögliche antiapoptotische Funktion von Bag-1 *in vivo*. In diesen Organen spielt Apoptose während der Embryonalentwicklung eine bedeutende Rolle und die Expression eines antiapoptotischen Proteins wie Bag-1 sollte daher zum Zeitpunkt des Auftretens von Apoptose vermindert sein. In allen untersuchten späteren embryonalen Entwicklungsstadien dieser Gewebe bzw. Organe konnte keine Expression von Bag-1 nachgewiesen werden. Möglicherweise tritt in einigen dieser Gewebe bzw. Organe im adulten Organismus erneut eine Expression von Bag-1 auf, wie es zum Beispiel für die Niere gezeigt wurde.

5.2. Bag-1 Isoformen

Da von Bag-1 mehrere Isoformen existieren stellt sich die Frage, wie die Synthese der unterschiedlichen Proteine in verschiedenen Geweben und Organen reguliert wird. In dieser Arbeit wurde unter Verwendung isoformspezifischer Antikörper gezeigt, daß sowohl während der Embryogenese als auch im adulten Organismus vorwiegend zwei Proteine von 44 kDa und 46 kDa auftreten, deren Entstehung bei der Maus bislang nicht geklärt ist. Die bislang beschriebenen murinen Bag-1 Isoformen von 50 kDa und 32 kDa werden von einer mRNA translatiert. Da für die Proteine von 44 kDa und 46 kDa in der murinen Bag-1 cDNA keine potentiellen Translationsstartstellen vorhanden sind, bleibt unklar, ob es sich bei diesen Proteinen um Mitglieder der Bag-1 Familie handelt oder um Mitglieder der Familie der mit Bag-1 verwandten Proteine. Möglicherweise existieren doch mehrere Bag-1 mRNAs, die mit den bisherigen Methoden jedoch nicht entdeckt wurden. Es könnten durchaus auch

Isoformen existieren, die durch alternatives Spleißen gebildet werden. Dafür könnte das Ergebnis der *Western blot* Analyse verschiedener adulter Gewebe sprechen. Im adulten Gehirn wurden zwei weitere Bag-1 Proteinprodukte von 55 kDa und 58 kDa nachgewiesen, deren Identität nicht geklärt ist. Daß 5' von der Translationsstartstelle für das 50 kDa Protein Bag-1L kein Stopcodon des 5' vom Bag-1 Locus gelegenen Gens vorhanden ist, spricht dafür, daß die Bag-1 cDNA im 5'-Bereich noch immer unvollständig ist und möglicherweise ein offenes Leseraster enthält. Die beiden 55 kDa und 58 kDa Proteine des adulten Gehirns könnten somit einerseits von der Bag-1 mRNA durch alternativen Translationsstart generiert werden oder durch alternatives Spleißen. Für einen alternativen Translationsstart spricht vor allem die Existenz des 55 kDa Proteins, das von beiden Antikörpern, C16 und N15, erkannt wurde und somit einerseits den Carboxyterminus der Bag-1 Proteine aber auch N-terminale Sequenzen von Bag-1L besitzt. Da beide Proteine vom C16 Antikörper detektiert werden, könnten diese auch zur Familie der verwandten Proteine gehören, die ebenfalls das Epitop besitzen, welches vom C16 Antikörper erkannt wird (Takayama et al., 1999).

Mindestens zwei Bag-1 Isoformen von 32 kDa (Bag-1) und 50 kDa (Bag-1L) entstehen bei der Maus von einer mRNA durch Nutzung alternativer Translationsstartstellen (Packham et al., 1997; Takayama et al., 1998). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß diese Isoformen in unterschiedlichen Geweben gebildet werden. Unter Verwendung spezifischer Antikörper wurde nachgewiesen, daß die Isoform Bag-1L im Vergleich zu anderen Bag-1 Proteinen wesentlich restriktiver synthetisiert wird. So ist beispielsweise im Thymus, im Vorderhirn, in der Leber und der Lunge ausschließlich die Isoform Bag-1L vorhanden, wohingegen in anderen Geweben bzw. Organen wie Herz, Rückenmark und Meckelscher Knorpel andere Bag-1 Proteine gebildet werden, was auf eine organspezifische Synthese schließen läßt.

Eine sorgfältige Sequenzanalyse ergab, daß der Translationsstart der Isoform Bag-1L nicht wie üblicherweise von einem ATG-Startcodon aus erfolgt, sondern von einem CTG-Codon aus (Packham et al., 1997; Takayama et al., 1998; Yang et al., 1998). Die Nutzung von CTG-Tripletts als Translationsstartstelle ist ungewöhnlich, und nur wenige Beispiele sind bekannt, bei denen eine zweite Isoform durch Nutzung einer solchen alternativen Translationsstartstelle entsteht (Grünert und Jackson, 1994). Bei den Genen *int-2* und *hck* werden durch Nutzung eines CTG-Startcodons größere Isoformen gebildet (Acland et al., 1990; Lock et al., 1991). Weitere Beispiele für das Vorhandensein solcher alternativer Startstellen für die Generierung einer zweiten Isoform sind *c-myc* und *FGF* (Hann et al., 1988; Vagner et al., 1996). Im Falle von *FGF* wird die Nutzung des CTG-Codons als alternative Translationsstartstelle durch Hitzeschock oder oxidativen Streß induziert (Vagner et al., 1996).

Bei Bag-1 ist vollkommen ungeklärt wie die Generierung der verschiedenen Isoformen reguliert wird. Allerdings wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß Bag-1L ausschließlich embryonal gebildet wird und im adulten Organismus nicht auftritt. Vorversuche haben

ergeben, daß Bag-1L in Metastasen von Prostatacarcinomen gebildet wird (Ergebnisse nicht gezeigt). Weitere Experimente sind erforderlich um zu bestimmen, wie die Regulation der Synthese der verschiedenen Bag-1 Isoformen erfolgt.

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten die subzelluläre Verteilung der Bag-1 Isoformen und zeigten, daß ausschließlich die Isoform Bag-1L im Zellkern lokalisiert ist, wohingegen die anderen Bag-1 Isoformen im Cytoplasma auftreten (Packham et al., 1997; Takayama et al., 1998; Yang et al., 1998). Die Sequenzanalyse von Bag-1 ergab, daß im größten Proteinprodukt Bag-1L ein Kernlokalisierungssignal vorhanden ist. Die von Takayama et al. (1998) durchgeführte immunhistochemische Analyse mit Antikörpern, die alle Bag-1 Isoformen erkennen, umfaßte auch Angaben über die subzelluläre Lokalisation. Da ausschließlich Bag-1L im Zellkern auftritt, lassen sich hieraus indirekt Rückschlüsse auf die Isoformen ziehen. Die publizierten Daten über die nukleäre Lokalisation von Bag-1 (Takayama et al., 1998) stimmen im großen und ganzen mit den in dieser Arbeit unter Verwendung des Bag-1L-spezifischen N15 Antikörpers erhaltenen Ergebnissen überein.

In der erwähnten Studie wurde im Cerebellum ebenfalls ausschließlich in Purkinjezellen Bag-1 nachgewiesen (Takayama et al., 1998). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigten eindeutig, daß im Kleinhirn die Isoform Bag-1L nicht synthetisiert wird. Mittels des N15 Antikörpers, der gegen ein Epitop im N-Terminus von Bag-1L gerichtet ist, wurde hingegen ein Protein von 58 kDa nachgewiesen, in dem vermutlich das Kernlokalisierungssignal vorhanden ist.

Widersprüchliche Daten liegen bezüglich der folgenden Organe vor: Prostata, Thymus, Herz und Chondrocyten. In der Prostata wurde ausschließlich eine nukleäre Lokalisation nachgewiesen (Takayama et al., 1998). In der Maus differenziert sich die Prostata erst postnatal aus Epithelknospen der Harnröhre, woraus sich erklärt, daß embryonal in dieser Region kein Bag-1L detektiert wurde. Allerdings wurde bei der vorläufigen Analyse verschiedener Stadien von Prostatatumoren und Kontrollgeweben in dieser Arbeit Bag-1L ausschließlich in metastasierendem Gewebe nachgewiesen, weder in früheren Tumorstadien noch in Kontrollgewebe. Dieser Widerspruch bleibt ungeklärt.

Im Thymus wurde in dieser Arbeit ausschließlich Bag-1L nachgewiesen, in der Studie von Takayama et al. (1998) jedoch keine nukleäre Lokalisation. Eine umgekehrte Situation liegt beim Herz vor. In dieser Arbeit wurde Bag-1L lediglich im Embryonalstadium E10,5 detektiert, nicht jedoch in späteren Stadien, in denen andere Bag-1 Proteine auftraten; Takayama et al. (1998) zeigten hingegen eine ausschließlich nukleäre Lokalisation.

In Chondrocyten wurde von Takayama et al. (1998) ebenfalls nur nukleär lokalisiertes Bag-1 nachgewiesen; in dieser Arbeit hingegen wurden sowohl mit dem C16 als auch mit dem N15 Antikörper Bag-1 Proteine in Chondrocyten detektiert, was für eine cytoplasmatische und eine nukleäre Lokalisation spricht.

Möglicherweise ist Bag-1L doch nicht die einzige Isoform von Bag-1 die nukleär auftritt. So wurde gezeigt, daß der Glucocorticoidrezeptor (GR) Bag-1M in den Zellkern zu rekrutieren

vermag (Schneikert et al., 1999). Insbesondere der Widerspruch bezüglich der Chondrocyten ließe sich möglicherweise durch diesen Befund auflösen, da der GR in Chondrocyten exprimiert wird und eine Rolle bei der Osteogenese spielt (Tuckermann et al., 1999).

Alle diese Unterschiede verdeutlichen wie wichtig es ist, isoformspezifische Antikörper wie den in dieser Arbeit verwendeten, einzusetzen, um klare Ergebnisse über die Expression der Bag-1 Proteine zu erhalten.

5.3. Bag-1 und Nierenentwicklung

Aus den vorgelegten Daten zur transkriptionellen Expression von Bag-1 in der Niere geht hervor, daß im zeitlichen Verlauf die Expression von Bag-1 nicht mit dem bekannten Muster der Apoptose in diesem Organ zu korrelieren scheint. In der Niere tritt Apoptose zwischen den Tagen 13 und 16 der Embryonalentwicklung auf und nimmt dann im weiteren Verlauf der Entwicklung bis zur Geburt hin stetig ab (Moser et al., 1997a). Sollte Bag-1 hierbei eine antiapoptotische Funktion ausüben, würde man eine erhöhte Expression in den späteren Embryonalstadien und um den Zeitpunkt der Geburt erwarten. Tatsächlich wurde jedoch im Gegenteil eine Abnahme der Expression in den späteren Entwicklungsstadien gezeigt.

Im Vergleich zu den sich entwickelnden Extremitäten ist Apoptose in der Niere weniger prominent. Die Regulation der Apoptose erfolgt in der Niere vermutlich ebenso wie in den Extremitäten innerhalb eines sehr engen Zeitfensters. So sinkt die Apoptoserate in der Niere ab Tag 16 der Embryonalentwicklung drastisch. Da der Verlust der Bag-1 Expression erst circa 1,5 Tage später, d.h. nach Tag 17,5 *post coitum* einsetzt, kann eine antiapoptotische Funktion von Bag-1 in der Niere nicht ausgeschlossen werden.

Interessanterweise konnte bei der Analyse der Niere AP-2 β -defizienter Tiere keine Expression von Bag-1 nachgewiesen werden, was eine Regulation der Aktivität von Bag-1 durch AP-2 β nahelegt. Bei der offensichtlichen Kontrolle der Bag-1 Expression durch AP-2 β muß es sich jedoch um eine indirekte Wirkung handeln, da beide Gene mit Ausnahme der distalen Tubuli in unterschiedlichen Zellen exprimiert werden. Für eine indirekte Wirkung spricht auch, daß im bislang klonierten Bag-1 Promotor keine AP-2 β -Bindestellen liegen (Yang et al., 1999c). Möglicherweise löst AP-2 β eine Kaskade aus, die die Expression von Bag-1 beeinflusst. Die Analyse der antiapoptotischen Gene *bcl-X_L*, *bcl-w* und *bcl-2* in Nieren AP-2 β -defizienter Tiere ergab eine drastisch verminderte Expression derselben, wohingegen die Expression der proapoptotischen Gene *fas*, *bad*, *bax* und *myc* unverändert war (Moser et al., 1997a). Der Verlust der Bag-1 Expression in AP-2 β -defizienten Tieren geht somit mit der generellen Verminderung der Expression antiapoptotischer Gene einher. Ob allerdings Bag-1 *in vivo* in der Niere bei der Regulation von Apoptose tatsächlich eine Rolle spielt ist nicht geklärt.

5.4. Bag-1 und Extremitätenentwicklung

Im Vergleich zur Niere korreliert im Interdigitalgewebe der sich entwickelnden Extremitäten die Verminderung der Bag-1 Expression eindeutig mit dem Prozeß der Apoptose. Durch zwei unabhängige Experimente wurde unter Verwendung von Systemen mit veränderter Apoptoserate diese Korrelation bestätigt. Die Behandlung sich entwickelnder Extremitäten mit Retinsäure ist ein gut etabliertes System zur Erhöhung der Apoptoserate im Interdigitalgewebe (Jiang und Kochhar, 1992; Kochhar et al., 1993; Rodriguez-Leon et al., 1999; Dupé et al., 1999). Die Applikation von Retinsäure an schwangere Mäuse führte zur Verminderung der Expression von Bag-1 in den sich entwickelnden Extremitäten der Embryonen. Das zur Erhöhung der Apoptoserate durch Retinsäureapplikation komplementäre System stellen RAR β -doppeltdefiziente Mausembryonen dar, die persistierendes interdigitales Mesenchym aufgrund einer erniedrigten Apoptoserate aufweisen (Ghyselinck et al., 1997; Dupé et al., 1999). In diesem System konnte der Erhalt der Bag-1 Expression im Interdigitalgewebe der sich entwickelnden Extremitäten nachgewiesen werden.

Auf Proteinebene wurde die Isoform Bag-1L in den sich entwickelnden Extremitäten nachgewiesen und durch Retinsäureapplikation dessen verminderte Synthese im Interdigitalgewebe mit Apoptose korreliert. Im Verlauf der Extremitätenentwicklung scheint somit Bag-1L eine antiapoptotische Funktion innezuhaben. Die starke Korrelation von Bag-1L und Apoptose steht in Übereinstimmung mit Zellkulturexperimenten, in denen gezeigt wurde, daß Bag-1L Zelltod verhindert (Yang et al., 1999b). Bisher wurde allerdings kein direkter Vergleich der Isoformen in Bezug auf deren Fähigkeit Apoptose zu inhibieren durchgeführt. Da die Untersuchungen der Extremitäten hingegen eindeutig eine inverse Korrelation der Expression von Bag-1 mit Apoptose ergaben, und zwar für die Isoform Bag-1L, legt dies die Vermutung nahe, daß die Isoform Bag-1L *in vivo* eine antiapoptotische Funktion ausübt.

Für kein anderes pro- oder antiapoptotisches Protein konnte bisher eine Beteiligung an der Extremitätenentwicklung nachgewiesen werden. So ist beispielsweise Bcl-2 nicht im Interdigitalgewebe sondern in den Fingern bzw. Zehen exprimiert. Darüberhinaus zeigt die Analyse der RAR β -doppeltdefizienten Mausembryonen keine Veränderung der Expression von Bcl-2 im Vergleich zum Wildtyp (Novack und Korsmeyer, 1994; Dupé et al., 1999). Das proapoptotische Bax wiederum ist zwar komplementär zu Bcl-2 und ebenso wie Bag-1 im Interdigitalgewebe exprimiert, doch zeigte sich bei der Analyse der RAR β -doppeltdefizienten Mausembryonen keine Veränderung der Expression von Bcl-2 im Vergleich zum Wildtyp (Dupé et al., 1999).

Im Gegensatz zur Niere, bei der das Fehlen des Transkriptionsfaktors AP-2 β zu einer Verminderung der Bag-1 Expression führte, hatte in den Extremitäten das Fehlen der

Transkriptionsfaktoren RAR β und RAR γ eine vermehrte Expression von Bag-1 zur Folge. Allerdings ist im Vergleich zur Niere einer dieser Transkriptionsfaktoren, RAR β , im Interdigitalgewebe mit Bag-1L koexprimiert. Zusammen mit den Experimenten der Retinsäureapplikation, die zu einer Aktivierung des RAR β und zur Verminderung der Bag-1 Expression führte, läßt sich schließen, daß der RAR β an der Regulation der Bag-1 Expression beteiligt ist.

Die Verminderung der Expression von Bag-1 im Interdigitalgewebe im Verlauf der Extremitätenentwicklung könnte auf transkriptioneller Ebene erfolgen. Hierfür sprechen verschiedene, eigene Vorversuche. Eine *Northern blot* Analyse mit P19 Zellen ergab eine Verminderung der Bag-1 Expression nach Retinsäurebehandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung (Ergebnisse nicht gezeigt). Darüberhinaus ergab eine vorläufige Promotoranalyse des Bag-1 Promotors (Yang et al., 1999c) sowohl in den beiden transfizierten Brustkrebszelllinien MCF-7 und T47D als auch in transfizierten P19 Zellen eine Hemmung von etwa 40 % durch Retinsäurebehandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Umgekehrt wurde gezeigt, daß Bag-1 an den RAR bindet und die DNA-Bindung von RAR:RXR-Heterodimeren inhibiert und somit die durch Retinsäure induzierte Transaktivierungsfunktion von RARs durch verschiedene Retinsäureantwort-elemente (RAREs; engl.: *retinoic acid response elements*) supprimiert (Liu et al., 1998). Möglicherweise wird hierdurch ein Rückkoppelungsmechanismus etabliert, durch den die transkriptionelle Regulation von Bag-1 gesteuert wird.

Obwohl Retinsäure die Expression von Bag-1 vermindert, ist der Mechanismus dieser Regulation nicht bekannt. Im humanen Bag-1 Promotorfragment von ca. 1kb (Position -893 bis +1) wurden bislang keine RAREs bestimmt (Yang et al., 1999c).

Im Bag-1 Promotor liegt jedoch eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 (Yang et al., 1999c). Da AP-1 und RAR über Proteininteraktion eine negative Interferenz in der Transaktivierungskontrolle zeigen (Schüle et al., 1990; Nicholson et al., 1990; Pfahl, 1993), könnte die Verminderung der transkriptionellen Bag-1 Expression durch die AP-1 Bindestelle vermittelt werden.

In der Promotorregion von Bag-1 sind weitere Elemente vorhanden, darunter eine Bindestelle für p53. Allerdings ist die Expression von p53 in RAR $\beta\gamma$ -doppeltdefizienten Tieren nicht verändert (Dupé et al., 1999) und p53 führt zu einer Erhöhung der Bag-1 Transkription (Yang et al., 1999c). Da p53 und homologe Proteine wie p63 in der apikalen ektodermalen Leiste sich entwickelnder Extremitätenknospen exprimiert werden und bei Epithel-Mesenchym Interaktionen eine Rolle spielen und darüberhinaus p63 Deletionsmutanten durch ein Fehlen der Extremitäten gekennzeichnet sind (Millis et al., 1999; Yang et al., 1999d), spielen p53 und Homologe eher beim Auswachsen der Extremitätenknospe eine Rolle und nicht bei der Regulation von Bag-1 im Interdigitalgewebe.

Dagegen sind an der Ausbildung der Zonen interdigitalen Zelltods die Mitglieder der TGF β -Familie Bmp-2, Bmp-4 und Bmp-7 beteiligt. Alle drei dieser sekretierten Faktoren werden im Interdigitalgewebe vor und während des Auftretens von Apoptose exprimiert (Chen und Zhao, 1998; Merino et al., 1999; Dupé et al., 1999). Im Bag-1 Promotor befindet sich ein TGF β -sensitives Regulationselement (Yang et al., 1999c); allerdings ist nicht geklärt, ob dieses an der Regulation der Bag-1 Expression beteiligt ist. Kulturversuche mit in das Interdigitalgewebe implantierten Depots von Bmp-2, Bmp-4 und Bmp-7 ergaben, daß alle drei Apoptose im Interdigitalgewebe verstärken (Ganan et al., 1996; Yokouchi et al., 1996; Zou und Niswander, 1996; Macias et al., 1997). Kulturversuche mit implantierten Retinsäuredepots im Interdigitalgewebe von Extremitätenknospen ergaben eine verstärkte Expression von Bmp-7 und Bmp-4 (Rodriguez-Leon et al., 1999). Die kombinierte Applikation von Retinsäure und den Bmp-Antagonisten Noggin und Gremlin inhibierte die durch Retinsäure induzierte Apoptose (Rodriguez-Leon et al., 1999). Darüberhinaus verhindern Retinsäureinhibitoren zwar das Auftreten des physiologischen Zelltods jedoch nicht die durch Bmp-Applikation induzierte Apoptose (Capdevila und Johnson, 1998; Rodriguez-Leon et al., 1999). Aus diesen Experimenten läßt sich schließen, daß Retinsäure Apoptose stromaufwärts der Bmp-Familie reguliert. Im Widerspruch hierzu ergab allerdings die Analyse der RAR $\beta^{-/-}$ / RAR $\gamma^{-/-}$ -Mutanten eine unveränderte Expression von Bmp-2, Bmp-4 und Bmp-7 (Dupé et al., 1999). Durch zukünftige Experimente muß geklärt werden, inwieweit das TGF- β -Regulationselement im Bag-1 Promotor von Relevanz ist, und ob Bmps die Expression von Bag-1 modulieren.

Die Homeoboxgene Msx-1 und Msx-2 sind ebenfalls im Interdigitalgewebe exprimiert und spielen eine Rolle bei der Kontrolle des Zelltods in diesem Gewebe (Chen und Zhao, 1998; Ferrari et al., 1998). Doch auch hier liegen in der Literatur ungeklärte Widersprüche vor, daß nämlich einerseits implantierte Retinsäuredepots zu einer Verstärkung der Expression dieser Gene führen, andererseits die Analyse der RAR β -doppeltdefizienten Mausmutanten eine unveränderte Expression ergab (Dupé et al., 1999).

Ähnliche Widersprüche liegen für weitere an der Ausbildung des interdigitalen Zelltods beteiligter Gene vor, wie zum Beispiel die Hox-Gene Hoxa-13, Hoxd-13 und Hoxd-11 (Tabin, 1991; Dollé et al., 1993; Morgan und Tabin, 1993; Fromental-Ramain et al., 1996; Dupé et al., 1999).

Der Mechanismus der negativen Regulation der Bag-1 Expression durch Retinsäure ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt. Retinsäure könnte Apoptose über Mitglieder der Bmp Familie regulieren, die wiederum auf unbekanntem Weg die Expression von Bag-1 vermindern. Alternativ hierzu könnten RARs durch die Interaktion mit AP-1 direkt die Bag-1 Expression vermindern. Zur Klärung dieser Regulation sind weitere Untersuchungen notwendig.

5.5. Ausblick

Obwohl die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente eine starke Korrelation von Bag-1 mit einer antiapoptotischen Funktion im Interdigitalgewebe der sich entwickelnden Extremitäten ergaben, wäre der definitive Beweis die gewebespezifische Überexpression von Bag-1 in der Maus. Mit Hilfe des RAR β -Promotors ließe sich Bag-1 gezielt im Interdigitalgewebe überexprimieren und darüberhinaus die Expression durch all-trans Retinsäure induzieren. Wenn Bag-1 die durch Retinsäure induzierte Apoptose hemmt, dann sollte die Analyse solcherart generierter Mausembryonen, analog zu den RAR $\beta\gamma$ -doppeltdefizienten Mausembryonen, persistierendes interdigitales Mesenchym aufgrund einer verminderten Apoptoserate in diesem Gewebe ergeben.

Eine Alternative wäre die Generierung von Mausmutanten, bei denen Bag-1 durch homologe Rekombination deletiert ist. Da allerdings Bag-1 ein multifunktionelles Protein ist, könnte es durchaus sein, daß die erhaltenen Mäuse embryonal letal sind. Möglicherweise träte die Letalität so früh in der Embryogenese auf, daß keine Extremitätenanomalien zu untersuchen wären.

Die vorgelegten Ergebnisse sprechen jedoch auch dafür, daß zumindest in den Extremitäten die Isoform Bag-1L eine antiapoptotische Funktion ausübt. Da Bag-1L in der Embryogenese im Vergleich zu den kleineren Isoformen wesentlich restriktiver exprimiert wird, bietet sich auch die Möglichkeit, ausschließlich Bag-1L in der Maus zu deletieren. Möglicherweise könnten in diesen Mäusen eventuell auftretende Letalitätsprobleme vermieden werden und ein Extremitätenphänotyp analysiert werden.

6. Literatur

- Acland, P., Dixon, M., Peters, G. und Dickson, C. (1990). Subcellular fate of the Int-2 oncoprotein is determined by choice of initiation codon. *Nature* **343**, 662-665.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. und Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171.
- Ashkenazi, A. und Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signalling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.
- Bakhshi, A., Jensen, J. P., Goldman, P., Wright, J. J., McBride, O. W., Epstein, A. L. und Korsmeyer, S. J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **41**, 899-906.
- Bardelli, A., Longati, P., Albero, D., Goruppi, S., Schneider, C., Ponzetto, C. und Comoglio, P. M. (1996). HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *EMBO J* **15**, 6205-6212.
- Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M. und Green, D. R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* **2**, 469-475.
- Belo J. A., Bouwmeester T., Leyns L., Kertesz N., Gallo M., Follettie M. und De Robertis E. M. (1997). Cerberus like is a secreted factor with neutralizing activity expressed in the anterior primitive endoderm of the mouse gastrula. *Mech Dev* **68**, 45-57.
- Bimston, D., Song, J., Winchester, D., Takayama, S., Reed, J. C. und Morimoto, R. I. (1998). BAG-1, a negative regulator of Hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release. *EMBO J* **17**, 6871-6878.
- Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G. und Thompson, C. B. (1993). Bcl-X, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**, 597-608.
- Boise, L. H., Gottschalk, A. R., Quintans, J. und Thompson, C. B. (1995). Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* **200**, 107-121.
- Capdevila, J. und Johnson, R. L. (1998). Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning. *Dev Biol* **197**, 205-217.
- Chazaud, C. M., Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Decimo, D., Chambon, P. und Dolle, P. (1996). AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis. *Mech Dev* **54**, 83-94.
- Chen, Y. und Zhao, X. (1998). Shaping limbs by apoptosis. *J Exp Zool* **282**, 691-702.
- Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A. B., Ebb, R. G., Gallo, G. J., Elangovan, B., Chinnadurai, G. und Lutz, R. J. (1995). A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J* **14**, 5589-5596.

Cleary, M. L., Smith, S. D. und Sklar, J. (1986). Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* **47**, 19-28.

Clevenger, C. V., Thickman, K., Ngo, W., Chang, W.-P., Takayama, S. und Reed, J. C. (1997). Role of Bag-1 in the survival and proliferation of the cytokine-dependent lymphocyte lines, Ba/F3 and Nb2. *Mol Endocrinol* **11**, 608-618.

Cohen, G. M., Sun, X. M., Snowden, R. T., Dinsdale, D. und Skilleter, D. N. (1992). Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* **286**, 331-334.

Cohen, J. J. (1993). Apoptosis. *Immunol Today* **14**, 126-130.

Compton, M. M. (1992). A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev* **11**, 105-119.

Conradt, B. und Horvitz, H. R. (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* **93**, 519-529.

Creagh, E. M., Carmody, R. J. und Cotter, T. G. (2000). Heat shock protein 70 inhibits caspase-dependent and -independent apoptosis in Jurkat T cells. *Exp Cell Res* **257**, 58-66.

Crocoll, A., Blum, M. und Cato, A. C. B. (2000). Isoform-specific expression of BAG-1 in mouse development. *Mech Dev* **91**, 355-359.

DeJong, D., Prins, F. A., Mason, D. Y., Reed, J. C., van Ommen, G. B. und Kluin, P. M. (1994). Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res* **54**, 256-260.

Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. und Martinou, J. C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* **144**, 891-901.

Dollé, P., Dierich, A., Le Meur, M., Schimmang, T., Schuhbauer, B., Chambon, P. und Duboule, D. (1993). Disruption of the Hoxd-13 gene induces localized heterochrony leading to mice with neotenic limbs. *Cell* **75**, 431-441.

Dollé, P., Ruberte, E., Kastner, P., Petkovich, M., Stoner, C. M., Gudas, L. J. und Chambon, P. (1989). Differential expression of genes encoding α , β and γ retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse. *Nature* **342**, 702-705.

Drews U. und Dietrich H. J. (1978). Cell death in the mosaic epididymis of sex reversed mice, heterozygous for testicular feminization. *Anat Embryol* **152**, 193-203.

Dupé, V., Ghyselinck, N. B., Thomazy, V., Nagy, L., Davies, P. J. A., Chambon, P. und Mark, M. (1999). Essential roles of retinoic acid signalling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Dev Biol* **208**, 30-43.

Eischen, C. M., Dick, C. J. und Leibson, P. J. (1994). Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J Immunol* **153**, 1947-1954.

Ellis, H. M. und Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817-829.

Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A. und Martinou, J. C. (1998). Bax-induced cytochrome c release from

mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg^{2+} ions. *J Cell Biol* **143**, 217-224.

Ferrari, D., Lichtler, A. C., Pan, Z. Z., Dealy, C. N., Upholt, W. B. und Kosher, R. A. (1998). Ectopic expression of Msx-2 in posterior limb bud mesoderm impairs limb morphogenesis while inducing BMP-4 expression, inhibiting cell proliferation, and promoting cell death. *Dev Biol* **197**, 12-24.

Fesus, L., Tarcsa, E., Kedei, N., Autuori, F. und Piacentini, M. (1991). Degradation of cells dying by apoptosis leads to accumulation of epsilon(gamma-glutamyl)lysine isodipeptide in culture fluid and blood. *FEBS Lett* **284**, 109-112.

Fesus, L., Thomazy, V., Autuori, F., Ceru, M. P., Tarcsa, E. und Piacentini, M. (1989). Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett* **245**, 150-154.

Fesus, L., Thomazy, V. und Falus, A. (1987). Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* **224**, 104-108.

Finucane, D. M., Bossy-Wetzel, E., Waterhouse, N. J., Cotter, T. G. und Green, D. R. (1999). Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-X_L. *J Biol Chem* **274**, 2225-2233.

Froesch, B. A., Takayama, S. und Reed, J. C. (1998). BAG-1L protein enhances androgen receptor function. *J Biol Chem* **273**, 11660-11666.

Fromental-Ramain, C., Warot, X., Messadecq, N., Le Meur, M., Dollé, P. und Chambon P. (1996). Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development* **122**, 2997-3011.

Ganan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M. A. und Hurle, J. M. (1996). Role of TGF β s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development* **122**, 2349-2357.

Garcia, I., Martinou, I., Tsujimoto, Y. und Martinou, J. C. (1992). Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* **258**, 302-304.

Garcia-Martinez, V., Macias, D., Ganan, Y., Garcia-Lobo, J. M., Francia, M. V., Fernandez-Teran, M. A. und Hurle, J. M. (1993). Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick leg bud. *J Cell Science* **106**, 201-208.

Gebauer, M., Zeiner, M. und Gehring, U. (1997). Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects on refolding activity. *FEBS Letters* **417**, 109-113.

Gebauer, M., Zeiner, M. und Gehring, U. (1998). Interference between proteins Hap46 and Hop/p60, which bind to different domains of the molecular chaperone hsp70/hsc70. *Mol Cell Biol* **18**, 6238-6244.

Gentile, V., Thomazy, V., Piacentini, M., Fesus, L. und Davies, P. J. (1992). Expression of tissue transglutaminase in Balb-C 3T3 fibroblasts: effects on cellular morphology and adhesion. *J Cell Biol* **119**, 463-474.

Gerschenson, L. E. und Rotello, R. J. (1992). Apoptosis: a different type of cell death. *Faseb J* **6**, 2450-2455.

- Ghyselinck, N. B., Dupé, V., Dierich, A., Messaddeq, N., Garnier, J.-M., Rochette-Egly, C., Chambon, P. und Mark, M. (1997). Role of the retinoic acid receptor beta (RAR β) during mouse development. *Int J Dev Biol* **41**, 425-447.
- Goping, I. S., Gross, A., Lavoie, J. N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S. J. und Shore, G. C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* **143**, 207-215.
- Graham, R. und Van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of the human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-467.
- Green, D. und Kroemer, G. (1998). The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* **8**, 267-271.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C. und Korsmeyer, S. J. (1998). Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* **17**, 3878-3885.
- Gross, A., McDonnell, J. M. und Korsmeyer, S. J. (1999b). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899-1911.
- Gross, A., Yin, X. M., Wang, K., Wei, M. C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. und Korsmeyer, S. J. (1999a). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-X_L prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* **274**, 1156-1163.
- Grünert, S. und Jackson, R. J. (1994). The immediate downstream codon strongly influences the efficiency of utilization of eukaryotic translation initiation codons. *EMBO J* **13**, 3618-3630.
- Hale, A. J., Smith, C. A., Sutherland, L. C., Stoneman, V. E., Longthorne, V. L., Culhane, A. C. und Williams, G. T. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* **236**, 1-26.
- Hammar S. P. und Mottet N. K. (1971). Tetrazolium salt and electron-microscopic studies of the cellular degeneration and necrosis in the interdigital areas of the developing chick limb bud. *J Cell Sci* **8**, 229-251.
- Han, Z., Bhalla, K., Pantazis, P., Hendrickson, E. A. und Wyche, J. H. (1999). Cif (Cytochrome c efflux-inducing factor) activity is regulated by Bcl-2 and caspases and correlates with the activation of Bid. *Mol Cell Biol* **19**, 1381-1389.
- Hanahan, D. (1986). Techniques for the transformation of E. coli. In DNA cloning. (D. M. Glover, Ed.) IRL Press, Oxford, **1**, 109-135.
- Hann, S. R., King, M. W., Bentley, D. L., Anderson, C. W. und Eisenman, N. (1988). A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell* **52**, 185-195.
- Hengartner, M. O., Ellis, R. E. und Horvitz, H. R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* **356**, 494-499.
- Hinchliffe, J. R. und Ede, D. A. (1973). Cell death and the development of limb form and skeletal pattern in normal and wingless (ws) chick embryos. *J Embryol Exp Morph* **30**, 753-772.

- Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R. D. und Korsmeyer, S. J. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**, 334-336.
- Höhfeld, J. (1998). Regulation of the heat shock conjugate Hsc70 in the mammalian cell: the characterization of the anti-apoptotic protein BAG-1 provides novel insights. *Biol Chem* **379**, 269-274.
- Höhfeld, J., Minami, Y. und Hartl, F. U. (1995). Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**, 589-598.
- Höhfeld, J. und Jentsch, S. (1997). GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J* **16**, 6209-6216.
- Hsu, Y. T., Wolter, K. G. und Youle, R. J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 3668-3672.
- Hsu, Y. T. und Youle, R. J. (1997). Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* **272**, 13829-13834.
- Huang, D. C., Adams, J. M. und Cory, S. (1998). The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J* **17**, 1029-1039.
- Hurle, J. M., Ros, M. A., Climent, V. und Garcia-Martinez, V. (1996). Morphology and significance of programmed cell death in the developing limb bud of the vertebrate embryo. *Microscop Res Tech* **34**, 236-246.
- Inohara, N., Gourley, T. S., Carrio, R., Muniz, M., Merino, J., Garcia, I., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. und Nunez, G. (1998). Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem* **273**, 32479-32486.
- Jacobson, M. D., Burne, J. F. und Raff, M. C. (1994). Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J* **13**, 1899-1910.
- Jäger, R., Herzer, U., Schenkel, J. und Weiher, H. (1997). Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene* **15**, 1787-1795.
- Jäättelä, M. und Wissing, D. (1993). Heat shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J Exp Med* **177**, 231-236.
- Jäättelä, M., Wissing, D., Bauer, P. A., und Li, G. C. (1992). Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *EMBO J* **11**, 3507-3512.
- Jäättelä, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T. und Egeblad, M. (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J* **17**, 6124-6134.
- Jiang, H. und Kochhar, D. M. (1992). Induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoic acid in the limb bud. *Teratology* **46**, 333-340.
- Jost, A. (1971). Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Phil Trans R Soc B* **259**, 119-130.
- Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. und Reed, J. C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4997-5002.

- Kamada, S., Shimono, A., Shinto, Y., Tsujimura, T., Takahashi, T., Noda, T., Kitamura, Y., Kondoh, H. und Tsujimoto, Y. (1995). Bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. *Cancer Res* **55**, 354-359.
- Kanelakis, K. C., Morishima, Y., Dittmar, K. D., Galigniana, M. D., Takayama, S., Reed, J. C. und Pratt, W. B. (1999). Differential effects of the hsp70-binding Protein BAG-1 on glucocorticoid receptor folding by the hsp90-based chaperone machinery. *J Biol Chem* **274**, 34134-34140.
- Karlseder, J., Wissing, D., Holzer, G., Orel, L., Sliutz, G., Auer, H., Jäätelä, M. und Simon, M. M. (1996). Hsp70 overexpression mediates the escape of doxorubicin induced G2 cell cycle arrest. *Biochem Biophys Res Commun* **220**, 153-159.
- Kelekar, A., Chang, B. S., Harlan, J. E., Fesik, S. W. und Thompson, C. B. (1997). Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-X_L. *Mol Cell Biol* **17**, 7040-7046.
- Kelekar, A. und Thompson, C. B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* **8**, 324-330.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.
- Kiefer, M. C., Brauer, M. J., Powers, V. C., Wu, J. J., Umansky, S. R., Tomei, L. D. und Barr, P. J. (1995). Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* **374**, 736-739.
- Kochhar, D. M., Jiang, H., Harnish, D. C. und Soprano, D. R. (1993). Evidence that retinoic acid-induced apoptosis in the mouse limb bud core mesenchymal cells is gene-mediated. *Prog Clin Biol Res* **383**, 815-825.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W. und Reed, J. C. (1993). Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* **53**, 4701-4714.
- Kroemer, G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* **3**, 614-620.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J. L. und Mignotte, B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J* **9**, 1277-1287.
- Kullmann, M., Schneikert, J., Moll, J., Heck, S., Zeiner, M., Gehring, U. und Cato, A. C. (1998). RAP46 is a negative regulator of glucocorticoid receptor action and hormone-induced apoptosis. *J Biol Chem* **273**, 14620-14625.
- Kumar, S. und Colussi, P. A. (1999). Prodomain – adaptors – oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem Sci* **24**, 1-4.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. und Earnshaw, W. C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346-347.

Lee, K. K. H., Chan, W. Y. und Sze, L. Y. (1993). Histogenic potential of rat hind-limb interdigital tissues prior to and during the onset of programmed cell death. *The Anatomical Record* **236**, 568-572.

Leroy, P., Krust, A., Zelent, A., Mendelsohn, C., Garnier, J.-P., Kastner, P., Dierich, A. und Chambon, P. (1991). Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor alpha are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid. *EMBO J* **10**, 59-69.

Li, C. Y., Lee, J. S., Ko, Y. G., Kim, J. I. und Seo, J. S. (2000). Hsp70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* **275**, 25665-25671.

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. und Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. und Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489.

Liu, Q. A. und Hengartner, M. O. (1999). The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci* **887**, 92-104.

Liu, R., Takayama, S., Zheng, Y., Froesch, B., Chen, G. Q., Zhang, X., Reed, J. C. und Zhang, X. K. (1998). Interaction of BAG-1 with retinoic acid receptor and its inhibition of retinoic acid-induced apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem* **273**, 16985-16992.

Lock, P., Ralph, S., Stanley, E., Boulet, I., Ramsay, R. und Dunn, A. R. (1991). Two isoforms of murine hck, generated by utilization of alternative translational initiation codons, exhibit different patterns of subcellular localization. *Mol Cell Biol* **11**, 4363-4370.

Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A. und Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.

Lüders, J., Demand, J. und Höhfeld, J. (2000). The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem* **275**, 4613-4617.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. und Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490.

Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A. und Hurle, J. M. (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* **124**, 1109-1117.

Matsuzawa, S., Takayama, S., Froesch, B. A., Zapata, J. M. und Reed, J. C. (1998). p53-inducible human homologue of *Drosophila* seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1. *EMBO J* **17**, 2736-2747.

McCarthy, N. J., Whyte, M. K., Gilbert, C. S. und Evan, G. I. (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* **136**, 215-227.

Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H. und Peter, M. E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* **16**, 2794-2804.

- Melino, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Piredda, L., Candi, E., Gentile, V., Davies, P. J. und Piacentini, M. (1994). Tissue transglutaminase and apoptosis: sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol* **14**, 6584-6596.
- Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Rodriguez-León, J. und Hurler J. M. (1999). Bone morphogenetic proteins regulate interdigital cell death in the avian embryo. *Ann N Y Acad Sci* **887**, 120-132.
- Millis, A. A., Zheng, B., Wang, X.-J., Vogel, H., Roop, D. R. und Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**, 708-713.
- Mitchell, P. J., Timmons, P. M., Hebert, J. M., Ribby, P. W. und Tjian, R. (1991). Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest lineages during mouse embryogenesis. *Genes & Dev* **5**, 105-119.
- Mollard, R., Viville, S., Ward, S. J., Décimo, D., Chambon, P. und Dollé, P. (2000). Tissue-specific expression of retinoic acid receptor isoform transcripts in the mouse embryo. *Mech Dev* **94**, 223-232.
- Morgan, B. A. und Tabin, C. J. (1993). The role of homeobox genes in limb development. *Current Opinion in Genetics and Development* **3**, 668-674.
- Mori, C., Nakamura, N., Kimura, S., Irie, H., Takigawa, T. und Shiota, K. (1995). Programmed cell death in the interdigital tissue of the fetal mouse limb is apoptosis with DNA fragmentation. *The Anatomical Record* **242**, 103-110.
- Moser, M. A., Pscherer, A., Imhof, A., Bauer, R., Kerscher, M., Amselgruber, W., Sinowatz, F., Hofstaeder, F., Schüle, R. und Buettner R. (1995). Molecular cloning and characterization of a second AP-2 transcription activator gene, AP-2 β . *Development* **121**, 2779-2788.
- Moser, M., Pscherer, A., Roth, C., Becker, J., Mücher, G., Zerres, K., Dixkens, C., Weis, J., Guay-Woodford, L., Buettner, R. und Fässler, R. (1997a). Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2 β . *Genes Dev* **11**, 1938-1948.
- Moser, M., Rüschof, J. und Buettner, R. (1997b). Comparative analysis of AP-2 α and AP-2 β gene expression during mouse embryogenesis. *Dev Dynam* **208**, 115-124.
- Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Denis-Larose, C. und Massie, B (1997). Role of human heat shock protein hsp70 in the protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **17**, 5317-5327.
- Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L. und Fesik, S. W. (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-X_L, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**, 335-341.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365.
- Nagata, S. und Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456.
- Nicholson, R. C., Mader, S., Sunil, N., Leid, M., Rochette-Egly, C. und Chambon, P. (1990). Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP-1 binding site. *EMBO J* **9**, 4443-4454.
- Nollen, E. A., Brunsting, J. F., Song, J., Kampinga, H. H. und Morimoto, R. I. (2000). Bag-1 functions in vivo as a negative regulator of Hsp70 chaperone activity. *Mol Cell Biol* **20**, 1083-1088.

- Novack, D. V. und Korsmeyer, S. J. (1994). Bcl-2 protein expression during murine development. *Am J Pathol* **145**, 61-73.
- Nunez, G., Benedict, M. A., Hu, Y. und Inohara, N. (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17**, 3237-3245.
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. und Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.
- Oppenheim, R. W. (1989). The neurotrophic theory and naturally occurring motoneuron death. *Trends Neurosci* **12**, 252-255.
- Orth, K., Chinnaiyan, A. M., Garg, M., Froelich, C. J. und Dixit, V. M. (1996). The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem* **271**, 16443-16446.
- Ottillie, S., Diaz, J. L., Horne, W., Chang, J., Wang, Y., Wilson, G., Chang, S., Weeks, S., Fritz, L. C. und Oltersdorf, T. (1997). Dimerization properties of human BAD. Identification of a BH-3 domain and analysis of its binding to mutant BCL-2 and BCL-X_L proteins. *J Biol Chem* **272**, 30866-30872.
- Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Chazaud, C., Dollé, P. und Chambon, P. (1996). AP-2.2: A novel AP-2 related transcription factor induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res* **225**, 338-347.
- Packham, G., Brimmell, M. und Cleveland, J. L. (1997). Mammalian cells express two differently localized Bag-1 isoforms generated by alternative translation initiation. *Biochem J* **328**, 807-813.
- Pan, G., O'Rourke, K. und Dixit, V. M. (1998). Caspase-9, Bcl-X_L, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* **273**, 5841-5845.
- Pastorino, J. G., Chen, S. T., Tafani, M., Snyder, J. W. und Farber, J. L. (1998). The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* **273**, 7770-7775.
- Pellegrini, M. und Strasser, A. (1999). A portrait of the Bcl-2 protein family: life, death, and the whole picture. *J Clin Immunol* **19**, 365-377.
- Pfahl, M. (1993). Signal transduction by retinoid receptors. *Skin Pharmacol* **6**, 8-16.
- Piacentini, M., Fesus, L., Farrace, M. G., Ghibelli, L., Piredda, L. und Melino, G. (1991). The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis). *Eur J Cell Biol* **54**, 246-254.
- Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M. und Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* **3**, 287-296.
- Rao, L., Perez, D. und White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* **135**, 1441-1455.
- Reed, J. C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* **124**, 1-6.
- Rich, T., Watson, C. J. und Wyllie, A. (1999). Apoptosis: the germs of death. *Nat Cell Biol* **1**, E69-71.

Rodriguez, I., Araki, K., Khatib, K., Martinou, J. C. und Vassalli, P. (1997). Mouse vaginal opening is an apoptosis-dependent process which can be prevented by the overexpression of Bcl-2. *Dev Biol* **184**, 115-121.

Rodriguez-Leon, J., Merino, R., Macias, D., Ganan, Y., Santesteban, E. und Hurle, J. M. (1999). Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nat Cell Biol* **1**, 125-126.

Ruberte, E., Kastner, P., Dollé, P., Krust, A., Leroy, P., Mendelsohn, C., Zelent, A. und Chambon, P. (1991). Retinoic acid receptors in the embryo. *Seminars in Developmental Biology* **2**, 153-159.

Saleh, A., Srinivasa, M., Srinivasula, M., Balkir, L., Robbins, P. D. und Alnemri, E. S. (2000). Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by HSP70. *Nat Cell Biol* **2**, 476-483.

Sanders, E. J. und Wride, M. A. (1995). Programmed cell death in development. *Int Rev Cytol* **163**, 105-173.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B. und Fesik, S. W. (1997). Structure of Bcl-X_L-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**, 983-986.

Saunders, J. W. und Gasseling, M. T. (1962). Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Dev Biol* **5**, 147-178.

Schneikert, J., Hübner, S., Martin, E. und Cato, A. C. (1999). A nuclear action of the eukaryotic cochaperone RAP46 in downregulation of glucocorticoid receptor activity. *J Cell Biol* **146**, 929-940.

Schüle, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I. M. und Evans, R. M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* **62**, 1217-1226.

Schulze-Osthoff, K., Walczak, H., Droge, W. und Krammer, P. H. (1994). Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol* **127**, 15-20.

Schwartzman, R. A. und Cidlowski, J. A. (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* **14**, 133-151.

Simon, M. M., Krone, C., Schwarz, A., Luger, T. A., Jäättelä, M. und Schwarz, T. (1995). Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest* **95**, 926-933.

Song, Q., Kuang, Y., Dixit, V. M. und Vincenz, C. (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J* **18**, 167-178.

Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445-1449.

Stuart, J. K., Myszka, D. G., Joss, L., Mitchell, R. S., McDonald, S. M., Xie, Z., Takayama, S., Reed, J. C. und Ely, K. R. (1998). Characterization of interactions between the anti-apoptotic protein BAG-1 and Hsc70 molecular chaperones. *J Biol Chem* **273**, 22506-22514.

- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M. und Kroemer, G. (1999a). Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* **189**, 381-394.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. und Kroemer, G. (1999b). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.
- Tabin, C. J. (1991). Retinoids, homeoboxes, and growth factors: Towards molecular models for limb development. *Cell* **66**, 199-217.
- Takayama, S., Bimston, D. N., Matsuzawa, S., Freeman, B. C., Aime-Sempe, C., Xie, Z., Morimoto, R. I. und Reed, J. C. (1997). BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J* **16**, 4887-4896.
- Takayama, S., Kochel, K., Irie, S., Inazawa, J., Abe, T., Sato, T., Druck, T., Huebner, K. und Reed, J. C. (1996). Cloning of cDNAs encoding the human BAG1 protein and localization of the human BAG1 gene to chromosome 9p12. *Genomics* **35**, 494-498.
- Takayama, S., Krajewski, S., Krajewska, M., Kitada, S., Zapata, J. M., Kochel, K., Knee, D., Scudiero, D., Tudor, G., Miller, G. J., Miyashita, T., Yamada, M. und Reed, J. C. (1998). Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res* **58**, 3116-3131.
- Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J. A. und Reed, J. C. (1995). Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* **80**, 279-284.
- Takayama, S., Xie, Z. und Reed, J. C. (1999). An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem* **274**, 781-786.
- Thé de, H., Marchio, A., Tiollais, P. und Dejean, A. (1989). Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor α and β genes. *EMBO J* **8**, 429-533.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.
- Thornberry, N. A. und Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Trichilis, A. und Wroblewski, J. (1997). Expression of p53 and hsp70 in relation to apoptosis during Meckel's cartilage development in the mouse. *Anat Embryol* **196**, 107-113.
- Tsujimoto, Y. und Croce, C. M. (1986). Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 5214-5218.
- Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E. und Croce, C. M. (1985). The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* **229**, 1390-1393.
- Tsujimoto, Y. und Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* **466**, 6-10.
- Tuckermann, J. P. G. (1999). In vivo Modulation des Transkriptionsfaktors AP-1 durch Glucocorticoide. Dissertation an der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften. Universität

Karlsruhe, Karlsruhe. Forschungszentrum Karlsruhe Technik und Umwelt.
Wissenschaftliche Berichte FZKA 6342.

Vagner, S., Touriol, C., Galy, B., Audigier, S., Gensac, M.-C., Amalric, F., Bayard, F., Prats, H. und Prats, A.-C. (1996). Translation of CUG- but not AUG-initiated forms of human fibroblast growth factor 2 is activated in transformed and stressed cells. *J Cell Biol* **135**, 1391-1402.

Vaux, D. L. und Korsmeyer, S. J. (1999). Cell death in development. *Cell* **96**, 245-254.

Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R. und Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* **75**, 229-240.

Wallach, D., Kovalenko, A. V., Varfolomeev, E. E. und Boldin, M. P. (1998). Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr Opin Immunol* **10**, 279-288.

Wang, H.-G., Miyashita, T., Takayama, S., Sato, T., Torigoe, T., Krajewski, S., Tanaka, S., Hovey, L., Troppmair, J., Rapp, U. R. und Reed, J. C. (1994). Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* **9**, 2751-2756.

Wang, H. G., Rapp, U. R. und Reed, J. C. (1996a). Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* **87**, 629-638.

Wang, H.-G., Takayama, S., Rapp, U. R. und Reed, J. C. (1996b). Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7063-7068.

Wang, H.-G. und Reed, J. C. (1998). Bcl-2, Raf-1 and mitochondrial regulation of apoptosis. *BioFactors* **8**, 13-16.

Wilkinson, D. G. und Green, J. (1990). In situ hybridisation and the three-dimensional reconstruction of serial sections. In: *Postimplantation Mammalian Embryos. A practical approach.* (Copp, A. J., Cockroft, D. L., Eds.) IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, 155-171.

Williams, T., Admon, A., Lüscher, B. und Tjian, R. (1998). Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev* **2**, 1557-1569.

Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G. und Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* **139**, 1281-1292.

Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-556.

Xiang, J., Chao, D. T. und Korsmeyer, S. J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 14559-14563.

Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C. und McKeon, F. (1999d). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714-718.

Yang, E. und Korsmeyer, S. J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* **88**, 386-401.

- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B. und Korsmeyer, S. J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-X_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285-291.
- Yang, X., Chernenko, G., Hao, Y., Ding, Z., Pater, M. M., Pater, A. und Tang, S. C. (1998). Human BAG-1/RAP46 protein is generated as four isoforms by alternative translation initiation and overexpressed in cancer cells. *Oncogene* **17**, 981-989.
- Yang, X., Hao, Y., Ding, Z., Pater, A. und Tang, S. C. (1999a). Differential expression of antiapoptotic gene BAG-1 in human breast normal and cancer cell lines and tissues. *Clin Cancer Res* **5**, 1816-1822.
- Yang, X., Hao, Y., Ferenczy, A., Tang, S. C. und Pater, A. (1999b). Overexpression of antiapoptotic gene BAG-1 in human cervical cancer. *Exp Cell Res* **247**, 200-207.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y. und Baltimore, D. (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* **89**, 1067-1076.
- Yang, X., Pater, A. und Tang, S. C. (1999c). Cloning and characterization of the human BAG-1 gene promoter: upregulation by tumor-derived p53 mutants. *Oncogene* **18**, 4546-4553.
- Yin, X. M., Oltvai, Z. N. und Korsmeyer, S. J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* **369**, 321-323.
- Yokouchi, Y., Sakiyama, J., Kameda, T., Iba, H., Suzuki, A., Ueno, N. und Kuroiwa, A. (1996). BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development* **122**, 3725-3734.
- Yoshida, H., Kong, Y.-Y., Yoshida, R., Elia, A. J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J. M. und Mak, T. W. (1998). Apaf-1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* **94**, 739-750.
- Yuan, J. (1995). Molecular control of life and death. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 211-214.
- Yuan, J. und Horvitz, H. R. (1992). The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* **116**, 309-320.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. und Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641-652.
- Yuan, J. Y. und Horvitz, H. R. (1990). The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev Biol* **138**, 33-41.
- Yunis, J. J., Oken, M. M., Kaplan, M. E., Ensrud, K. M., Howe, R. R. und Theologides, A. (1982). Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* **307**, 1231-1236.
- Zakeri, Z. F. und Ahuja, H. S. (1994). Apoptotic cell death in the limb and its relationship to pattern formation. *Biochem Cell Biol* **72**, 603-613.
- Zakeri, Z., Quaglino, D. und Ahuja, H. S. (1994). Apoptotic cell death in the mouse limb and its suppression in the hammetoe mutant. *Dev Biol* **165**, 294-297.
- Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A. und Kroemer, G. (1998). Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* **16**, 2265-2282.

Zeiner, M., Gebauer, M. und Gehring, U. (1997). Mammalian protein RAP46: an interaction partner and modulator of 70 kDa heat shock proteins. *EMBO J* **16**, 5483-5490.

Zeiner, M. und Gehring, U. (1995). A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 11465-11469.

Zelent, A., Mendelsohn, C., Kastner, P., Krust, A., Garnier, J.-M., Ruffenach, F., Leroy, P. und Chambon, P. (1991). Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor β are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J* **10**, 71-81.

Zha, J., Harada, H., Osipov, K., Jockel, J., Waksman, G. und Korsmeyer, S. J. (1997). BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-X_L and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem* **272**, 24101-24104.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. und Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619-628.

Zhu, W., Cowie, A., Wasfy, G. W., Penn, L. Z., Leber, B. und Andrews, D. W. (1996). Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J* **15**, 4130-4141.

Zoratti, M. und Szabo, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* **1241**, 139-176.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A. und Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**, 405-413.

Zou, H. und Niswander, L. (1996). Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* **272**, 738-741.