

**Abschlußbericht zum Projekt 0312260:
Identifizierung von Apoptose-modifizierten Proteinen**

Projektleiter: Dr. Thomas Rudel

I.

1. Aufgabenstellung

Apoptose ist ein allen Zellen höherer Organismen innewohnendes Programm sich selbst zu zerstören. Die Forschung der letzten 10 Jahre hat gezeigt, dass Apoptose ein grundlegender Prozess der Entwicklung und Erhaltung mehrzelliger Lebewesen ist. Das besondere Interesse an der Erforschung der Apoptose erklärt sich aber vor allem durch in jüngster Zeit gewonnene Erkenntnisse, dass Apoptose bei zahlreichen Erkrankungen des Menschen eine wichtige Rolle spielt.

Die Übertragung von apoptotischen Signalen erfolgt zu einem großen Teil durch posttranslationale Modifikation von Proteinen. Ein zweiter wesentlicher Mechanismus liegt in der Neuverteilung von Proteinen innerhalb der zellulären Kompartimente. Beides, die Modifikation und die Neuverteilung, bieten die Chance, die an der apoptotischen Signalübertragung beteiligten Faktoren zu identifizieren: Proteine, die während der Apoptose modifiziert werden oder deren Lokalisierung innerhalb der Zelle sich ändert, können über Proteomanalyse identifiziert werden. Das Ziel des Projektes 0312260 war die proteomanalytische Identifizierung und teilweise Isolierung der an der apoptotischen Signalübertragung beteiligten Faktoren. Diese sollten patentiert und in einer eigens zu diesem Zweck zu gründenden Firma verwertet werden.

2. Voraussetzungen

Das BMBF und die MPG förderten das Projekt 0312260 für 2 Jahre mit jeweils 725.000 DM. In eigens für dieses Projekt gemieteten Räumen im Berliner DRK-Klinikum Westend wurde innerhalb des Förderzeitraums eine Forschergruppe mit 2 Wissenschaftlern, 1 Doktorand und 2 technischen Assistenten etabliert. Die für die Durchführung erforderlichen Geräte wurden entweder neu angeschafft oder am MPI für Infektionsbiologie genutzt.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt gliederte sich in zwei Teilprojekte:

1. Erfassung und Identifizierung von Apoptose-induziert modifizierten Proteinen
2. Isolierung der Gene von neuen, Apoptose-modifizierten Proteinen

Innerhalb des **ersten Teilprojektes** sollten im ersten Antragsjahr die während der Apoptose modifizierten Proteine im Gesamtlysat über 2-DE detektiert und massenspektrometrisch identifiziert werden. Im zweiten Antragsjahr war geplant, dieses Vorgehen mit veränderten Proteine aus den Kompartimenten Kern und Mitochondrien zu wiederholen. Von Anfang an sollte eine Datenbank der Faktoren erstellt und fortlaufend ergänzt werden. Des weiteren sah die Planung vor, noch während des laufenden Projektes die Ergebnisse zu patentieren.

Das **zweite Teilprojekt** hatte die Isolierung der Gene der identifizierten Faktoren zum Inhalt. Geplant war die Isolierung von insgesamt 15 Genen (10 mit bekannter und 5 mit unbekannter Gensequenz). Antiseren sollten generiert und getestet werden.

Bei erfolgreichem Verlauf des Projektes sollte eine Firma gegründet werden, um die patentierten Ergebnisse selbst zu vermarkten.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Zum Beginn des Projektes im Jahre 1999 waren die grundlegenden Prinzipien der apoptotischen Signaltransduktion bekannt. Eine neue Familie von Cysteinylnaspartasen (Caspasen), Proteasen, die Proteine nach Aspartat schneiden, waren als die wichtigsten Effektoren der apoptotischen Signaltransduktion erkannt und charakterisiert worden. Erhält eine Zelle ein apoptotisches Signal, aktiviert diese zuerst die Caspasen die daraufhin zelluläre Substrate an wenigen Stellen schneiden. Caspasen haben die Funktion eines Schalters auf das apoptotische Programm. Sie schneiden die Apoptoseregulatoren und aktivieren, inaktivieren, zerstören oder induzieren nur ihre Umverteilung in der Zelle. Als Konsequenz dieser Signalübertragung durch Proteolyse stirbt die Zelle durch Apoptose. Ungefähr 30 Substrate für Caspasen waren bekannt, nur von wenigen kannte man die Funktion für die Apoptose. Um den Prozess der Apoptose und insbesondere die modifizierten Regulatoren als Ganzes zu erfassen sollte eine Proteomanalyse apoptotischer Zellen durchgeführt werden.

Für die Proteomanalyse konnte auf die bewährte 2-DE Großeltechnik nach Klose (Klose and Kobalz, 1995) zurückgegriffen werden. Die Technik wurde zu Beginn des Projektes etabliert und für dessen Anforderungen standardisiert. Protokolle für die

Standardisierung der Apoptoseinduktion waren nicht vorhanden und mussten ebenfalls neu etabliert werden.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Zu Beginn des Projektes wurde eng mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jungblut am MPI für Infektionsbiologie, Berlin, zusammengearbeitet. Die Techniken der Proteomanalyse mittels der Großgeltechnik wurde in dieser Zeit von der AG Rudel übernommen und projektspezifisch modifiziert. Massenspektrometrische Messungen wurden am MPI für Infektionsbiologie und am Max-Delbrück Zentrum in Berlin durchgeführt.

II.

1. Ergebnisse

Zunächst wurde eine 2DE-Datenbank von Jurkat T-Zellen erstellt (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/>) (Thiede et al., 2000). Es wurden 95 Markerproteine identifiziert. Diese Proteine dienen zur Kalibrierung der Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte. Die gewonnenen Daten konnten genutzt werden um allgemeine Regeln für übersehene Spaltungen von Trypsin, Oxidation von Tryptophan und Pyroglutamat-Bildung von N-terminalen Glutaminsäuren zu erkennen (Thiede et al., 2000). Diese Regeln wurden in eine Software zur Identifizierung von Proteinen integriert (Parker, J. Am. Soc. Mass. Spectrom., 2002). Durch den Vergleich der 2DE-Muster von nicht-apoptotischen mit apoptotischen Jurkat T-Zellen nach Induktion der Apoptose über den Todesrezeptor Fas (CD95/Apo-1) wurden im Totallysat 20 unterschiedliche Spots von 11 verschiedenen Proteinen identifiziert. Zur weiteren Anreicherung der Proteine und zur Aufklärung von Translokationen wurden anschließend die Kompartimente per differentieller Zentrifugation in die Fraktionen Kern, Mitochondrion, Membranen und Cytosol aufgetrennt. Dabei wurden neben den bereits bekannten Spots aus dem Totallysat zusätzlich 165 Spots von 73 weiteren Proteinen identifiziert (Thiede et al., 2001; Thiede et al., Proteomics, in press).

Insgesamt wurden 104 Apoptose-assoziierte Proteine identifiziert, 78 davon waren bisher nicht in den Zusammenhang mit Apoptose gebracht worden. Auffällig war,

dass 40 % der modifizierten Proteine ein oder mehrere RNA-Bindungsmotive enthalten. Interessanterweise konnten 22 Oncogene bzw. Oncogen-interagierende Proteine identifiziert werden. Aufgrund der großen Fortschritte in der Sequenzierung des humanen Genoms, konnten alle Proteine durch Peptmassenfingerabdruck bei ausreichendem Signal zu Rauschen-Verhältnis der Massenspektren identifiziert werden. Dennoch wurden auch unbekannte Proteine ohne ersichtliche Homologie zu bekannten Proteinen identifiziert. Weiterhin wurde eine Fülle von Informationen über Caspase-Spaltungen und Translokationen erhalten. Die Caspase-Spaltung wurde für 33 Proteine nach *in vitro* Translation überprüft. Dabei wurde die Spaltung mit Caspase-3 für 23 Proteine verifiziert, die restlichen 10 Proteine enthielten keine Spaltstelle. Die Lokalisation der Caspaseschnittstellen wurde durch Mutationsexperimente bestimmt. Zur Vorhersage der putativen Spaltstellen wurden die Daten aus den 2DE-Mustern wie Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt sowie der Peptidmassenfingerabdruck genutzt, was zu einer starken Einschränkung der möglichen Schnittstellen führte. Es wurde keine einheitliche Regel für die RNA-Bindungsmotive bzgl. der Caspaseschnittstellen gefunden. Jedoch wurde für zwei Proteine mit RNA-Bindungsmotiv eine Abhängigkeit der Caspase-Spaltung von gebundener RNA bewiesen. Translokationen wurden ohne und mit Caspase-Spaltung beobachtet. In globaler Betrachtung wurde die Translokation von den Kernen und Membranen zu den Mitochondrien und das Cytosol nach Apoptoseinduktion beobachtet.

2. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse lassen sich sowohl **wissenschaftlich** als auch **wirtschaftlich** verwerten. Einige Daten des Proteomscreens wurden schon während der Laufzeit des Projektes in insgesamt 4 internationalen Publikationen veröffentlicht und damit anderen Wissenschaftlern zugänglich gemacht. Weitere Publikationen, die direkt mit dem Screen in Verbindung stehen, sind zur Zeit nicht geplant. Die Funktion der einzelnen Targets soll nun in der MediTarget GmbH über moderne Methoden der funktionellen Genomanalyse wie die RNA-Interferenz aufgeklärt, deren Einfluss auf Krankheitsprozesse detailliert untersucht werden. Diese so validierten Targets eignen sich für Wirkstoffsuchen aus denen sich in Kooperation mit Partnerfirmen neue Therapien entwickeln lassen.