

4 Ergebnisse

4.1 Beteiligung von Caspasen im Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten

4.1.1 Hemmung des Zelltods durch Caspase-Inhibitoren

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, daß durch Serumentzug der Zelltod in einer konfluenten Kultur von AKR 2B-Mausfibroblasten induziert werden kann [107]. Dieser Zelltod tritt mit einer Verzögerung von etwa 90min nach Serumentzug ein, betrifft nur etwa 50% der Zellen und ist nach rund 6 Stunden abgeschlossen. Die morphologischen Veränderungen, welche die sterbenden Zellen durchlaufen sind typisch für eine Apoptose. Die Beteiligung der für die Apoptose essentiellen Caspasen sollte durch den Einsatz von Inhibitoren für Caspasen während des Serumentzugs gezeigt werden.

Dazu wurden kovalent bindende Inhibitoren verwendet. Um die Aufnahme der Inhibitoren in die Zellen zu verbessern, wurden sie unter hypotonischen Bedingungen zu den Zellen gegeben. Unter diesen Bedingungen ist die Cytoplasmamembran durch das Anschwellen der Zellen destabilisiert und erleichtert das Eindringen der Inhibitoren. Konfluente AKR 2B-Mausfibroblasten wurden mit PBS gewaschen und für 3min mit den Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen in 1:8 mit sterilem Wasser verdünntem MCDB402-Medium, unter Kulturbedingungen inkubiert. Danach wurden wieder isotonische Bedingungen mit MCDB 402, angereichert mit den Inhibitoren, eingestellt und weiterinkubiert. Nach 6h wurde die Zahl vitaler Zellen bestimmt (Abb.: 4.1).

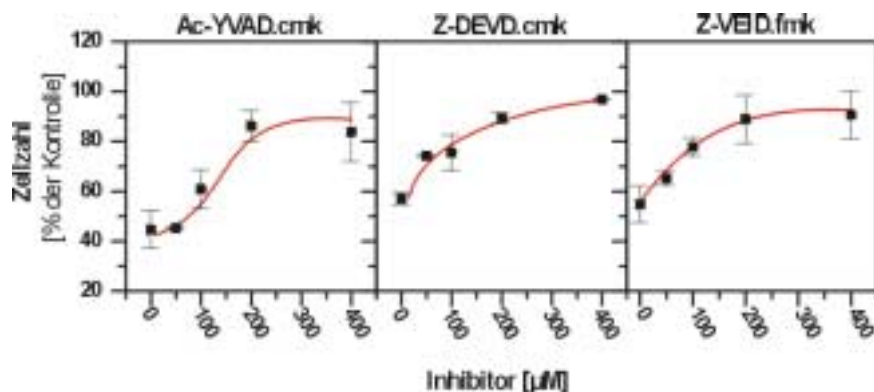


Abb.4. 1: Caspase-Inhibitoren „in vivo“ (Kontrolle = unbehandelte, lebende Zellen)

Die drei eingesetzten Inhibitoren berücksichtigen durch ihre Tetrapeptidsequenz die unterschiedlichen Substratspezifitäten der Gruppe I- und -III-Caspasen, im speziellen der Caspasen-1, -3 bzw. -7, (-6) und -2. Die Wirkung der Substanzen beruht im wesentlichen auf

der Peptidsequenz und nicht auf der kovalent bindenden cmk- (chlormethylketon) bzw. fmk- Gruppe (fluormethylketon), wie schon durch die Verwendung anderer Proteaseinhibitoren mit gleichender Struktur in dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte [107].

Die Verwendung dieser Inhibitoren in der höchsten eingesetzten Konzentration von 400 μ M führt zu einem fast vollständigen Zellschutz während des Serumentzugs. Der Inhibitor DEVD.cmk bot den potentesten Schutz bei rund 99% überlebender Zellen, gefolgt von VEID.fmk (87%) und zuletzt von YVAD.cmk (85%). Der ED₅₀-Wert konnte für alle drei Inhibitoren bei 100-150 μ M ermittelt werden.

4.2. Enzymatische Aktivität von Caspasen in AKR 2B-Mausfibroblasten

4.2.1 Zeitlicher Verlauf der Caspaseaktivierung

Die Beteiligung der Caspasen im Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten nach Serumentzug ist durch den Schutz, den die Caspase-Inhibitoren vermitteln, gezeigt. Nach dem Serumentzug wird vermutlich eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die zur Aktivierung der Caspasen führt. Dabei können Caspasen je nach ihrer Funktion früh, zur Initiation der Kaskade (30-60min) oder spät, in der Effektorphase der Kaskade (ab 2h), aktiviert werden [128]. Um den Zeitpunkt der maximalen Caspaseaktivität zu bestimmen, wurden Aktivitätstests mit Caspase-Substraten nach unterschiedlicher Dauer des Serumentzugs durchgeführt.

Nach 0-6h Entzug des Serums wurden cytosolische Extrakte erstellt. In 100 μ g Gesamtprotein der Extrakte wurde die spezifische Caspaseaktivität unter Verwendung von je 150 μ M der Substrate YVAD.amc und DEVD.pNa und 300 μ M an VEID.pNa und IETD.pNa bestimmt. Die eingesetzten Substrate berücksichtigen durch ihre Peptidsequenz die Substratpräferenz der Gruppe I, -II, bzw. -III Caspasen. Im speziellen wurden die Substrate für die Caspasen-1, -3 und -7, bzw. -6 hergestellt [39,129]. IETD.pNa stellt das Substrat der Caspase-3-Maturase dar.

Um die Spezifität des Substratabbaus zu zeigen wurde den Reaktionen in Parallelansätzen je 1 μ M des entsprechenden Caspase-Inhibitors zugesetzt.

Da die Identität der aktiven Caspasen in AKR 2B-Mausfibroblasten bislang noch nicht geklärt ist und um die Nomenklatur zu vereinfachen, werden fortan die enzymatischen Aktivitäten analog zu ihren Substraten als DEVDase, VEIDase, IETDase bzw. YVADase bezeichnet.

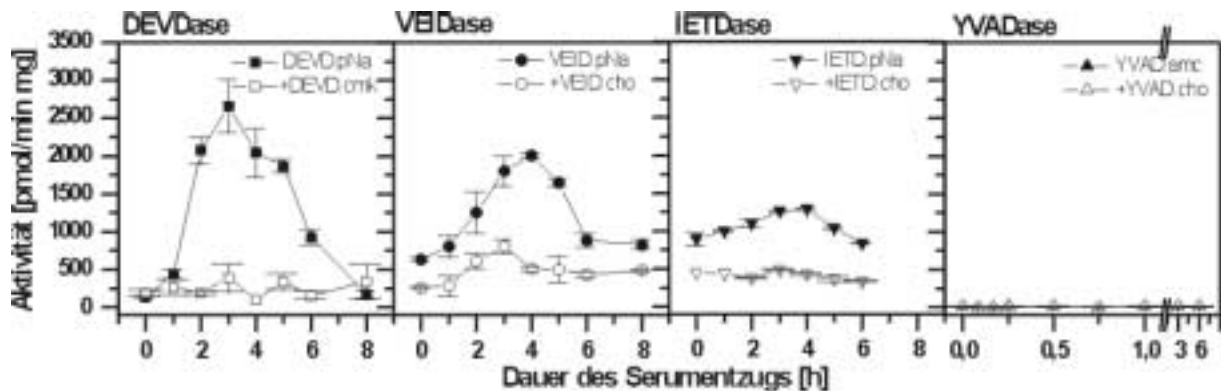


Abb.4. 2: Zeitlicher Verlauf der Caspasenaktivität

Wie in Abbildung 4.2 zu erkennen ist, wurden die Substrate DEVD.pNa, VEID.pNa und IETD.pNa nach 3 bis 4h maximal gespalten. Für das Substrat DEVD.pNa ließ sich eine maximale Aktivität von 2660 ± 351 pmol/min mg, für VEID.pNa von 2007 ± 35 pmol/min mg und für IETD.pNa von 1293 ± 16 pmol/min mg ermitteln.

Nach 3h des Serumentzugs nahm die Aktivität der Caspasen im Extrakt wieder ab. Apoptotische AKR 2B-Mausfibroblasten verlieren mit zunehmender Dauer die Integrität ihrer Cytoplasmamembran. Dadurch geht das Cytosol dieser Zellen beim Erstellen des Zellextraktes für die Aktivitätsbestimmung verloren. Eine Abnahme der Gesamtaktivität ist die Folge daraus. Für das Substrat der Gruppe I-Caspase (-1) (YVAD.pNa) konnte über den betrachteten Zeitraum keine Spaltaktivität gemessen werden.

Zur Ermittlung der jeweiligen spezifischen Aktivität wurde die Differenz aus den maximalen Aktivitäten ohne und mit Inhibitorzusatz errechnet (vgl. 3.3.11). Diese ist in Tabelle 4.2 aufgeführt.

pmol/min mg	DEVD.pNa	VEID.pNa	IETD.pNa	YVAD.amc
maximale spezifische Aktivität	2275	1500	805	nf
konstitutive spezifische Aktivität	keine	377	438	nf
Faktor des maximalen Anstiegs	16-19	2-3	0,5-0,7	nf
konstitutive Aktivität (ohne Abzug)	138	634	893	nf

Tab.4. 1: Vergleich der spezifischen Spaltaktivitäten bei unterschiedlichen Caspasesubstraten
nf: nicht feststellbar

Für das Substrat der Effektor-Caspasen, DEVD.pNa, konnte ein 16-facher Anstieg der Aktivität hin zum Maximum im Verlauf des Zelltods festgestellt werden. Im Gegensatz dazu werden die Substrate der GruppeIII-Caspasen, VEID.pNa und IETD.pNa, nur um das 2-fache bzw. 0,5-fache stärker gespalten. Für diese Substrate besteht konstitutiv eine Spaltaktivität in AKR 2B-Mausfibroblasten, d.h. auch ohne induzierten Zelltod werden diese Substrate spezifisch gespalten. Daß es sich hierbei um eine spezifische und nicht kontaminierende Spaltaktivität, z.B. durch andere Proteasen handelt, zeigt die durch die spezifischen Inhibitoren vermittelte Reduktion dieser Aktivität.

Um für weitere Untersuchungen der Enzymkinetik eine maximale Aktivität der Caspasen zu gewährleisten, wurde den Zellen für jeweils 3h das Serum entzogen. Der daraus erstellte cytosolische Extrakt wird im folgenden als apoptotischer Extrakt und die Zellen als apoptotische Fibroblasten bezeichnet.

4.2.2 Bestimmung von K_M -Werten für die eingesetzten Substrate

Ein charakteristisches Merkmal von Enzymen ist der K_M -Wert, den man beim Umsatz von Substraten ermitteln kann. Der K_M -Wert stellt die Substratkonzentration dar, bei der das Enzym die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht hat. Wird ein Substrat durch ein Enzym umgesetzt, so steigt die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Substratkonzentration nach der Michaelis-Menten-Gleichung in einem hyperbolischen Verlauf. Bei einer Mischung aus Substraten oder Enzymen folgt der Verlauf meist einer di- oder multihyperbolischen Funktion (s.Anhang).

Zur Bestimmung der K_M -Werte der eingesetzten Substrate, umgesetzt durch den cytosolischen Extrakt apoptotischer AKR 2B-Mausfibroblasten, wurde folgendes Experiment durchgeführt. In einem Aktivitätstest (s. 3.3.10) wurden die Konzentrationen der entsprechenden Substrate, wie in Abbildung 4.3 angezeigt, variiert.

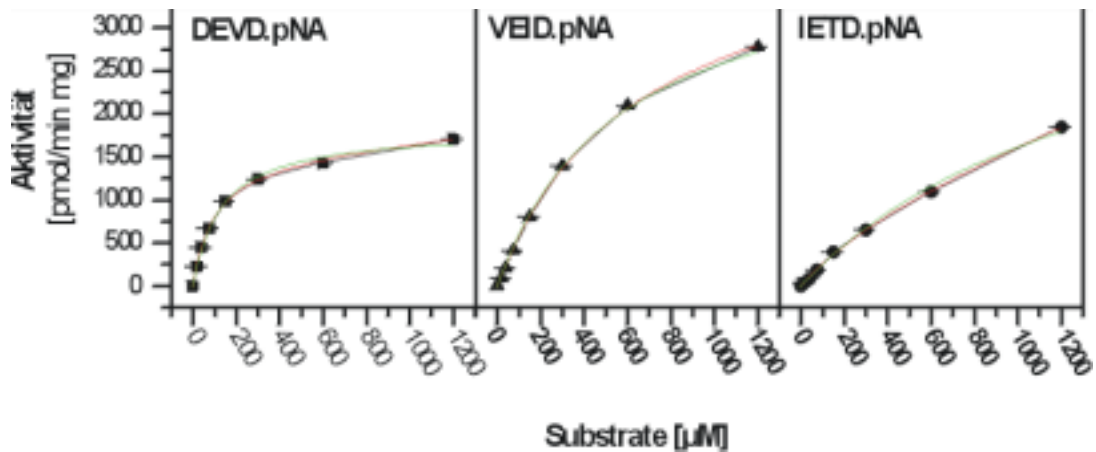


Abb.4. 3: Bestimmung des K_M -Werts mit unterschiedlichen Caspasesubstraten

Zur Auswertung wurde eine Regression mittels des Programms „Origin“ (Microcal) unter Berücksichtigung eines hyperbolischen 2Parametermodells (grüne Linie) und eines dihyperbolischen 4Parametermodells (rote Linie) berechnet. Die so festgestellten und gemittelten K_M -Werte und das Maß der Regression (χ^2) sind in Tabelle 4.3 zusammengefaßt.

		DEVD.pNa	VEID.pNa	IETD.pNa
hyperbolisch	K_M [μM]	132 ± 4	530 ± 140	1160 ± 412
	χ^2	1790	2200	1125
dihyperbolisch	K_M [μM]	79 ± 18	236 ± 78	509 ± 133
	χ^2	800	612	482

Tab.4. 2: Gemittelte K_M -Werte mit unterschiedlichen Caspasesubstraten

Die Affinität der Caspasen im cytosolischen Extrakt für die Substrate ist sehr unterschiedlich und nimmt von DEVD.pNa über VEID.pNa nach IETD.pNa stark ab, wie die Zunahme der K_M -Werte verdeutlicht. Die Annäherung der berechneten Regressionskurven verbessert sich bei der Verwendung des dihyperbolischen Modells gegenüber des hyperbolischen Modells, was sich in der Abnahme von χ^2 äußert. Vereinfacht kann man daraus ableiten, daß sich in dem cytosolischen Extrakt ein Gemisch aus Caspasen mit unterschiedlichen Affinitäten zu den Substraten befindet. Desweiteren könnten die Caspasen in einem multimeren Komplex eingebunden sein, welcher die Aktivität moduliert.

Ein Vergleich mit ermittelten K_M -Werten von rekombinanten Caspasen-3, -6 und -7 (s.Tab 1.1) zeigt [37,38], daß die in Tabelle 4.3 zusammengefaßten Werte für die Tetrapeptidsequenz

DEVD mehr als 6-8-fach höher sind, wohingegen für VEID vergleichbare K_M -Werte vorliegen. Für die Sequenz IETD sind keine vergleichbaren Daten publiziert.

In einem Kontrollexperiment, durchgeführt mit cytosolischem Extrakt aus mit $TNF\alpha$ stimulierten Jurkat-Zellen, läßt sich ein K_M -Wert für das Substrat DEVD.pNa von $11,5 \pm 2,2 \mu M$ mit dem hyperbolischen 2Parametermodell bestimmen. Dies liegt im Bereich der Literaturdaten.

Aus den hier bestimmten K_M -Werten läßt sich keine eindeutige Aussage über die Identität der Caspasen treffen.

4.2.3 Bestimmung von IC_{50} - und K_i -Werten in der Kombination von Substraten und Inhibitoren

Um neben den K_M -Werten weiter charakteristische Eigenschaften des möglichen Caspasegemisches in AKR 2B-Mausfibroblasten zu bestimmen, wurden die Affinitäten der unterschiedlichen Inhibitoren auf die Spaltaktivitäten ermittelt. Ein quantitatives Maß dieser Affinität stellt der IC_{50} -Wert dar, der die Inhibitorkonzentration angibt, bei der 50% der maximalen Inhibition erreicht ist. Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes ist abhängig von der verwendeten Substratkonzentration. Ein davon unabhängiger charakteristischer Wert der Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung ist der K_i -Wert, die sogenannte Hemmkonstante.

Zur Bestimmung beider Werte wurden kolorimetrische Aktivitätstests unter Verwendung von $150 \mu M$ der Substrate, $75 \mu g$ Gesamtprotein eines apoptotischen cytosolischen Extraktes und steigenden Inhibitorkonzentrationen, wie in Abbildung 4.4a-c dargestellt, durchgeführt.

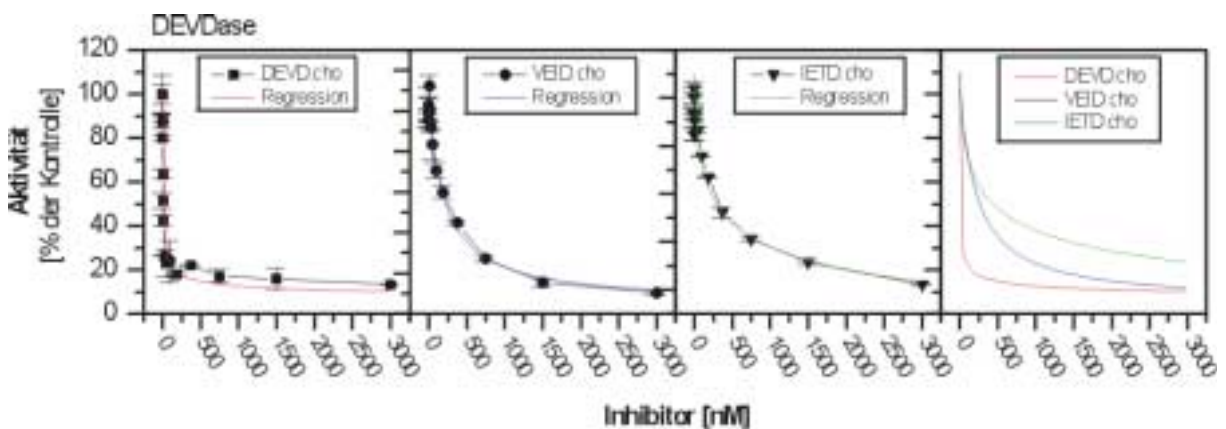


Abb.4. 4a: K_i -Wert-Bestimmung für die DEVDase und 3 Inhibitoren

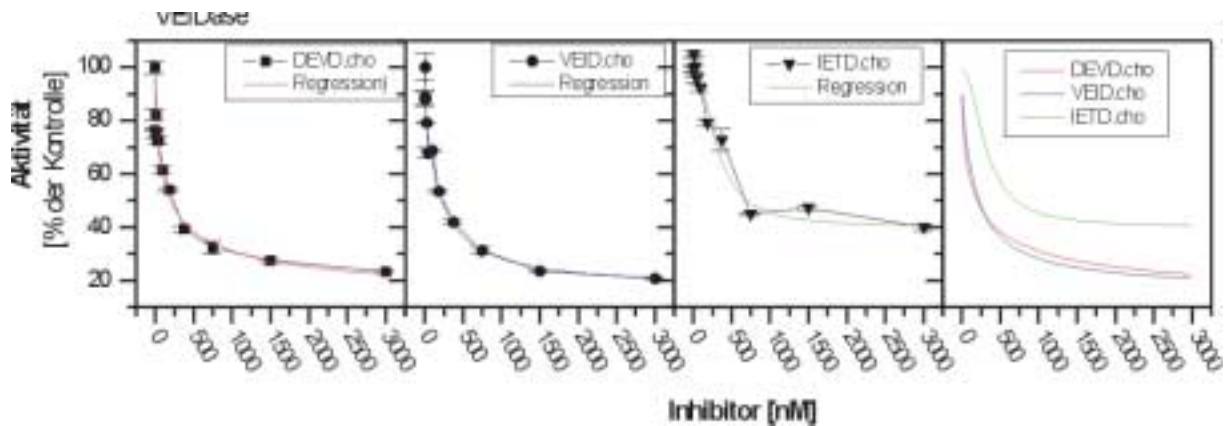


Abb.4.4b: K_i -Wert-Bestimmung für die VEIDase und 3 Inhibitoren

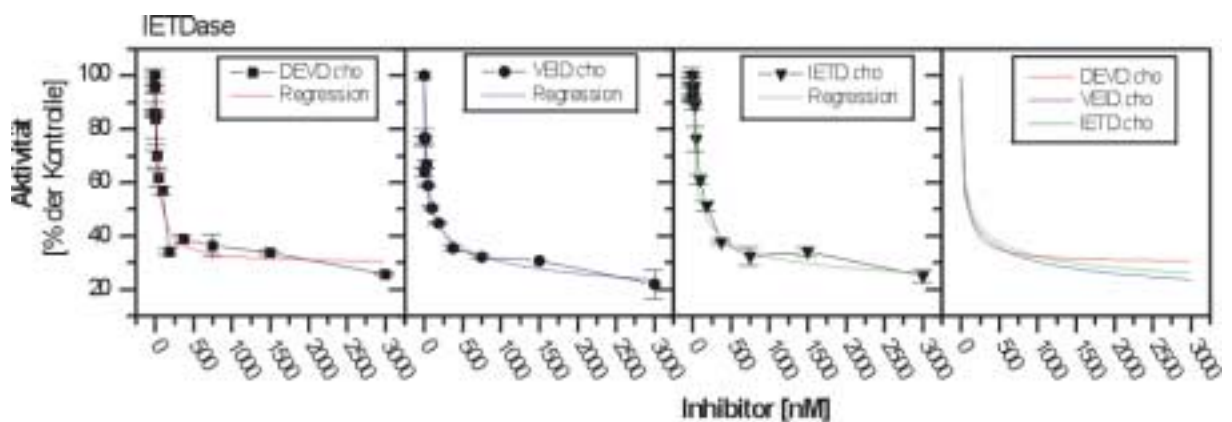


Abb.4.4c: K_i -Wert-Bestimmung für die IETDase und 3 Inhibitoren

Unter Verwendung des Programms „Origin“ (Microcal) wurde eine Regression extrapoliert, die einem nichtlinearen logistischen Modell zu Grunde liegt. Anhand dieser Regression kann der entsprechende IC_{50} -Wert bestimmt werden. χ^2 gibt das quantitative Maß für diese Annäherung an. In den Abbildungen 4.4a-c sind die angenäherten Kurvenverläufe farbiger aufgetragen und zum besseren Vergleich separat dargestellt. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

IC_{50} [nM] / χ^2	DEVD.cho	VEID.cho	IETD.cho
DEVD.pNa	$5 \pm 1,4 / 38$	$225 \pm 23 / 18$	$370 \pm 23 / 18$
VEID.pNa	$102,7 \pm 41 / 20$	$68,4 \pm 8,9 / 7$	$138,6 \pm 19,5 / 11$
IETD.pNa	$62,5 \pm 21,4 / 25$	$64 \pm 15 / 8$	$70 \pm 23 / 25$

Tab.4. 3: IC_{50} -Werte der Substrat-Inhibitor-Kombinationen

Aus den Aktivitäten und den ermittelten K_M -Werten (s. 4.2.3) lassen sich nach Dixon und Webb die entsprechenden K_i -Werte berechnen [130] (s.Anhang). Sie sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

K_i [nM]	DEVD.cho	VEID.cho	IETD.cho
DEVD.pNa	$1,7 \pm 0,5$	$76,6 \pm 15$	$125,8 \pm 5,6$
VEID.pNa	63 ± 25	$73,2 \pm 18,3$	243 ± 16
IETD.pNa	$48 \pm 7,2$	49 ± 11	54 ± 12

Tab.4. 4: K_i -Werte der Substrat-Inhibitor Kombinationen

Bei Inhibition der DEVDase, d.h. der GruppeII-Caspase, durch die drei Inhibitoren sind deutliche Unterschiede bei den Kurvenverläufen und somit bei den ermittelten IC_{50} - und K_i -Werten festzustellen. Die Spaltung des Substrats DEVD.pNa wird am besten durch den Inhibitor mit gleicher Peptidsequenz blockiert, schlechter durch VEID.cho und mit niedrigerer Effizienz durch IETD.cho.

Bei den anderen Substraten sind diese Unterschiede nicht so stark. Tendenz ist jedoch trotzdem, daß der Inhibitor DEVD.cho die Aktivitäten am effizientesten oder zumindest gleich gut hemmt.

Bis auf die Ausnahme der Hemmung der GruppeII-Caspasen durch DEVD.cho, und der Hemmung durch IETD.cho, liegen die K_i -Werte in gleichen Größenordnungen von 50-70nM vor.

Für die Hemmung der DEVDase wurde deutlich weniger an DEVD.cho benötigt als im Vergleich zur Inhibition der anderen Aktivitäten notwendig ist. Diese Ausnahme ist ein weiteres Indiz, daß sich im cytosolischen Extrakt ein Gemisch aus Caspasen mit unterschiedlicher Substrat- und Inhibitorspezifität befindet.

Eine Identifikation der Caspasen anhand von K_i -Werten aus Literaturstellen ist nur in Grenzen möglich. Die besten Übereinstimmungen sind für die Caspasen-3 und -9 mit den ermittelten K_i -Werten in AKR 2B-Mausfibroblasten zu finden.

4.2.4 Konkurrenz der Substrate

Neben der Kombination der unterschiedlichen Substrate mit den Inhibitoren stellt die Kombination zweier Substrate miteinander eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung des möglichen Enzymgemisches dar. Deshalb wurde die kompetitive Inhibition einer Spaltaktivität durch ein zweites Substrat untersucht. Hierbei sollte die Umsetzung des GruppeII-Substrats DEVD.x durch ein Substrat für GruppeIII-Caspasen, VEID.x, kompetiert werden und umgekehrt. Anhand der Reduzierung der Aktivität läßt sich nach Dixon [130] der K_i -Wert für diese Inhibition berechnen. Eine Konkurrenz sollte eintreten, wenn die beteiligten Enzyme keine absolute Substratspezifität besitzen.

Für diese Untersuchungen wurde ein chromogener Aktivitätstest mit $150\mu\text{M}$ DEVD.pNa bzw. $400\mu\text{M}$ VEID.pNa und $100\mu\text{g}$ cytosolischen Extraktes apoptotischer AKR 2B-Mausfibroblasten durchgeführt. Der Reaktion wurden fluorophore Substrate in den in Abbildung 4.5 angezeigten Konzentrationen zugesetzt und die Spaltung des chromogenen Substrates vermessen. Da die Peptide in DMSO angesetzt wurden, wurde in der Kontrollreaktion anstatt des kompetierenden Substrates die maximale vorherrschende Konzentration an DMSO eingestellt.

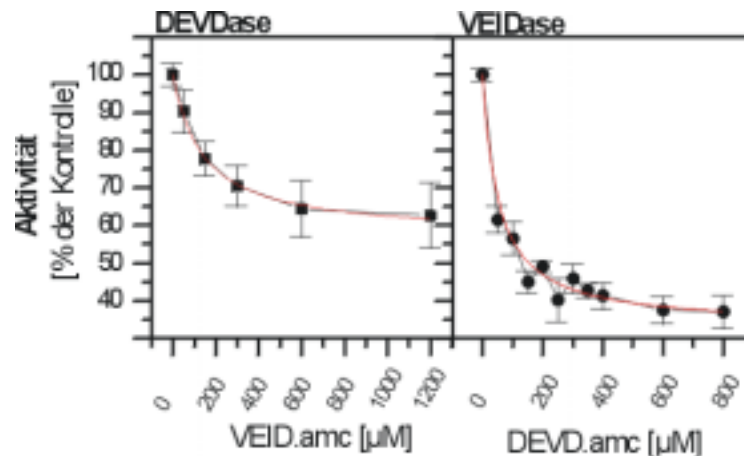


Abb.4. 5: Kompetitive Inhibition der Substrate

In beiden Kombinationen tritt eine kompetitive Inhibition der Aktivitäten auf. Für die DEVDase läßt sich ein K_i -Wert von $244\mu\text{M}$ VEID.amc und für die VEIDase ein K_i -Wert von $79\mu\text{M}$ an DEVD.amc bestimmen. Die durch die kompetierenden Substrate verursachte Inhibition ist nicht vollständig, d.h. bei steigenden Inhibitorkonzentrationen nähert sich die Aktivität der DEVDase asymptotisch an $\geq 50\%$ und die VEIDase an 35% ihrer Maximalaktivität an. Dagegen kam es bei einer Mischung von Substraten mit gleicher

Die beteiligten Enzyme sind demnach in der Lage beide Substrate zu spalten. Der K_i -Wert für DEVD.amc bzw. VEID.amc liegt im Bereich des K_M -Wertes des jeweiligen kolorimetrischen Substrats (vgl. 4.2.2).

4.2.5 Spaltung von Laminen während des Zelltods

Ein „*in vivo*“-Substrat der Caspasen, insbesondere der Caspase-6, sind Lamine. Wie durch *in vitro* Experimente gezeigt wurde, werden sie nach der Erkennungssequenz VEID bzw. VEVD durch die aktivierte Caspase-6 gespalten (s.Tab.1.3), nicht aber durch die Effektor-Caspasen-3 und -7 [22,23]. Lamine sind die Hauptstrukturproteine der Kernhülle. Sie bilden dort ein Netzwerk, das dem Kern Stabilität verleiht. Während der Apoptose kommt es zum geordneten Zerfall des Kerns, u.a. als Resultat einer begrenzten Proteolyse der Lamine durch Caspasen.

Der Abbau der Lamine-A, -C und -B während des Zelltods von AKR 2B-Mausfibroblasten sollte mittels Western Blot untersucht werden. Dazu wurde den Fibroblasten für die in Abbildung 4.6a angezeigte Dauer Serum entzogen und danach Lysate nach Lämmli (s. 3.3.3) erstellt. Durch einen Proteintest nach Redinbaugh wurde die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden durch SDS-PAGE in einem 10%igen Trenngel aufgetrennt und der Western Blot durchgeführt.

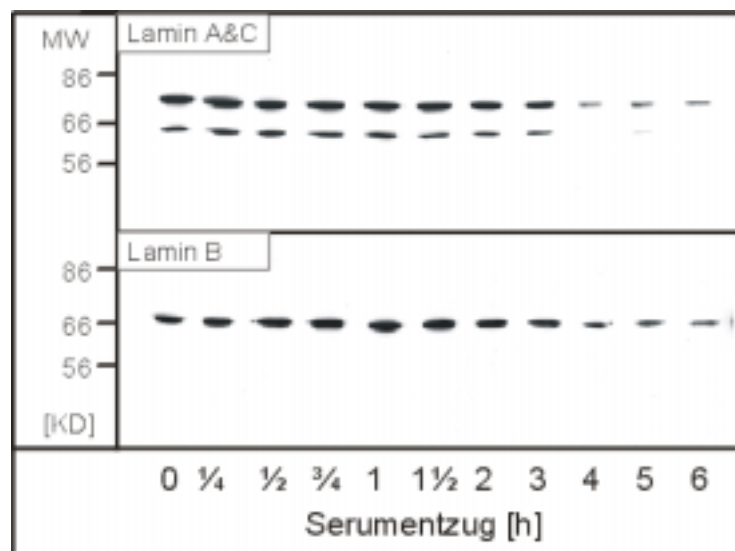


Abb.4. 6a: Western Blot für Lamine in Abhängigkeit des Serumentzugs
[MW: Molekulargewicht in kD]

Die verwendeten Antikörper detektieren die Lamine-A, -C und -B mit einem Molekulargewicht (MW) von rund 74kD, 65kD bzw. 67kD.

Die Lamine werden während des Zelltods in AKR 2B-Mausfibroblasten abgebaut, was sich im Western Blot der Abbildung 4.6a im Rückgang der Bandenintensität mit zunehmender Dauer des Serumentzugs zeigt. Der Abbau beginnt 3 Stunden nach der Induktion des Zelltods. Die Abbauprodukte konnten durch die verwendeten Antikörper nicht nachgewiesen werden. Daß dieser Abbau durch Caspasen vermittelt wird, läßt sich durch die Verwendung von Caspase-Inhibitoren zeigen. Entzieht man den AKR 2B-Mausfibroblasten unter Anwesenheit unterschiedlicher Mengen des Caspase-Inhibitors Z-VEID.fmk für 3h das Serum und führt den oben beschriebenen Western Blot für die Lamine-A und -C erneut durch, so ergibt sich das in Abbildung 4.6.b dargestellte Ergebnis. Als Kontrolle wurde ein Lysat aus AKR 2B-Mausfibroblasten, denen kein Serum entzogen wurde, mit aufgetragen.

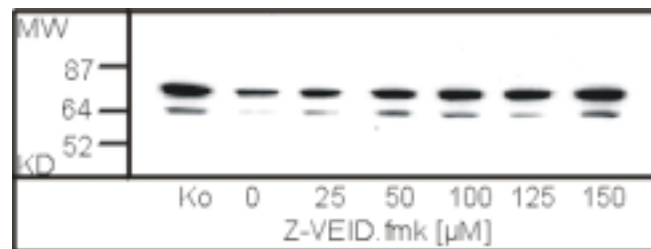


Abb.4.6b: Western Blot für Lamine-A, -C in Abhängigkeit des Caspase-Inhibitors (Ko = Kontrolle)

Der Abbau der Lamine-A und -C konnte konzentrationsabhängig durch den Caspase-Inhibitor Z-VEID.fmk reduziert werden. Bei 150 μ M des Inhibitors wurde ein vollständiger Schutz des Lamins vor der Proteolyse vermittelt. Das entspricht in etwa den ermittelten ED₅₀-Werten für Caspase-Inhibitoren beim Schutz der AKR 2B-Mausfibroblasten vor dem Zelltod nach Serumentzug (s. Kap.4.4.1).

4.3 Identifikation der Caspasen in AKR 2B-Mausfibroblasten

Nachdem die Beteiligung der Caspasen im Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten durch die eingesetzten Inhibitoren und die Charakterisierung der enzymatischen Aktivität nachgewiesen wurde, sollte nun untersucht werden, welche Caspasen in den Zellen exprimiert werden. Dazu wurden RT-PCR-, Northernblot- und Riboquant-DNA-Protektions-Untersuchungen zur Analyse der RNA-Spezies durchgeführt. Auch sollten Caspasen durch Western Blot nachgewiesen werden, soweit Antikörper verfügbar waren.

4.3.1 RT-PCR zum Nachweis von Caspasen-RNA

Da zum Zeitpunkt der Untersuchungen nur vereinzelt DNA-Sequenzen für Caspasen murinen Ursprungs vorlagen, wurden zur Konstruktion der Primer humane Caspasesequenzen herangezogen (s. Tab.2.4/ Material).

Zunächst wurde aus AKR 2B-Mausfibroblasten und zur Kontrolle aus Jurkat-Zellen polyA⁺-RNA gewonnen und durch eine Reverse-Transkriptions-Reaktion mittels des dT₁₈-Primers in DNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die PCR unter Verwendung der Caspasenspezifischen Primer.

4.3.1.1 RT-PCR mit humanspezifischen Primern

In Abbildung 4.7 sind die PCR-Produkte dargestellt, die aus einer RT-PCR resultieren, die mit den Primerpärchen CPP32, -32.1, mch-2a, -2b, mch-3a, -3b, mch-4a, -4b, mch-5a, -5b und mch-6a, 6b durchgeführt wurde. Die Primer wurden nach humanen Sequenzen der Caspasen-6, -7, -10, -8 bzw. -9 entworfen und sind nach der alten Caspasennomenklatur benannt. Das Primerpaar CPP32 wurde aus Hamstersequenzen für die Caspase-3 entwickelt. Für die RT-PCR wurde polyA⁺-RNA aus AKR 2B-Mausfibroblasten und Jurkat-Zellen eingesetzt. Zur Überprüfung der reversen-Transkription der AKR 2B-Mausfibroblasten-RNA wurde VEGF-DNA mittels der Primer VEGF-A1 und -3 in der PCR amplifiziert. Die erhaltene DNA und der Größenstandard „100bp-Leiter“ wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und in Abbildung 4.7 dargestellt.

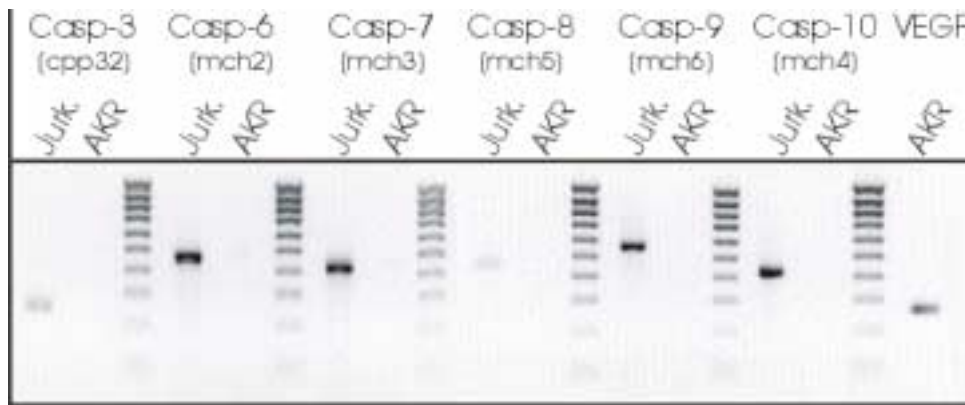


Abb.4. 7: RT-PCR mit humanspezifischen Primern

Für RNA aus AKR 2B-Mausfibroblasten konnten keine PCR-Produkte unter Verwendung der caspasespezifischen Primer gefunden werden. Im Kontrollansatz jedoch konnte VEGF-DNA aus dem RT-Ansatz der Fibroblasten amplifiziert werden. Bei Jurkat-RNA treten die Produkte in den erwarteten Größen auf. Diese RT-PCR-Produkte wurden unter Verwendung des TOPO-Cloning Kits amplifiziert, die Plasmide gereinigt (s.3.4.3) und mittels des Primers JH17 sequenziert.

Die Sequenzen entsprechen den bekannten humanen cDNA-Sequenzen der Caspasen-3, -6, -7, -8, -9 bzw. -10 (s.Accession-Nr. in Tabelle 2.4)

4.3.1.2 RT-PCR mit mausspezifischen Primern

Sequenzen der Primer, die für folgende RT-PCR-Untersuchungen herangezogen wurden, basieren auf bekannten murinen Caspase-cDNA-Sequenzen. Es sind dies die Primerpärchen casp-2a, -2b, casp-6a, -6b, m8, m8ps und casp-9c, -9d sie stehen für die Caspasen-2, -6, -1 bzw. -9. Die Primer für die Caspase-9 wurden nach Hakem [131] konstruiert. Die Ergebnisse der RT-PCR sind in Abbildung 4.8 gezeigt.

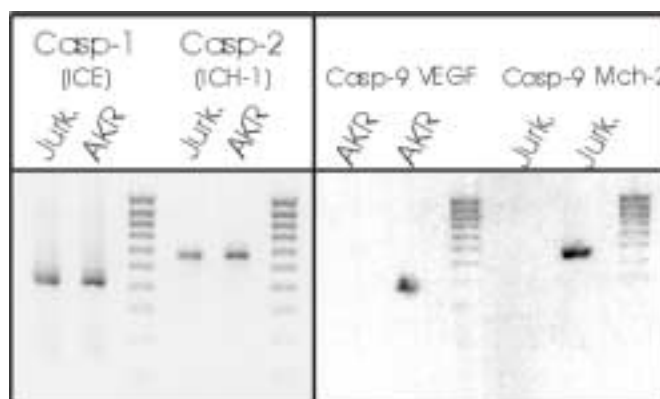


Abb.4. 8: RT-PCR mit mausspezifischen Primern

Sowohl für die humane als auch für die murine RNA konnten RT-PCR-Produkte für die Caspasen-1 und -2 erstellt werden. Die murinen Produkte wurden durch eine Klonierung mit dem TOPO-Klonierungs Kit amplifiziert, die erhaltenen Vektoren gereinigt und die darin eingefügten Produkte mit dem Primer JH17 sequenziert. Ein Vergleich in Datenbanken bestätigte die Caspasesequenzen (s. Accession-Nr. in Tab.2.4).

Durch eine RT-PCR mit den Primerpärchen zur Caspase-9 und -6 (hier nicht dargestellt) konnten keine Produkte gefunden werden. Der RT-Ansatz mit Maus-RNA wurde erfolgreich überprüft, indem VEGF-cDNA in einer, mit entsprechenden Primern durchgeführten, PCR amplifiziert wurde. Gleiches gilt für die Jurkat-RNA und die Amplifikation der humanen Caspase-6-cDNA in diesem Ansatz.

4.3.2 Northern Blot für Caspasen

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Caspase-Transkripten ist der Northern Blot.

Dazu wurde aus AKR 2B-Mausfibroblasten und zur Kontrolle aus Jurkat-Zellen polyA⁺-RNA isoliert und 2µg davon für den Northern Blot eingesetzt. Die geblottete Membran wurde mit Sonden für die Caspasen-1 bis -10 inkubiert. Diese verwendeten Sonden sind u.a. die humanen RT-PCR-Produkte der Caspasen-2, -3, -6, -7, -8, -9 und -10, die unter Kapitel 4.3.1.1 gezeigt sind. Ein Vergleich der DNA-Sequenzen dieser Produkte mit murinen Caspasesequenzen zeigt signifikante Homologien von etwa 85 - 95%. Dies sollte eine ausreichende Hybridisierung der Sonden mit der RNA zulassen. Außerdem werden Sonden aus Vektorkonstrukten verwendet, die von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt wurden. Aus diesen Vektoren wurde durch die Primer JH17 und JH18 mittels PCR DNA amplifiziert, die dann gereinigt im Northern Blot verwendet wurde. Es sind dies DNA der murinen Caspase-2, -4 und -5, die durch Sequenzierung überprüft wurden. Für die Caspase-1 fand das RT-PCR Produkt aus AKR 2B-Mausfibroblasten Verwendung, das unter 4.3.1.2 beschrieben ist. Die Ergebnisse der Northern Blots sind in Abbildung 4.9 zusammengefaßt.

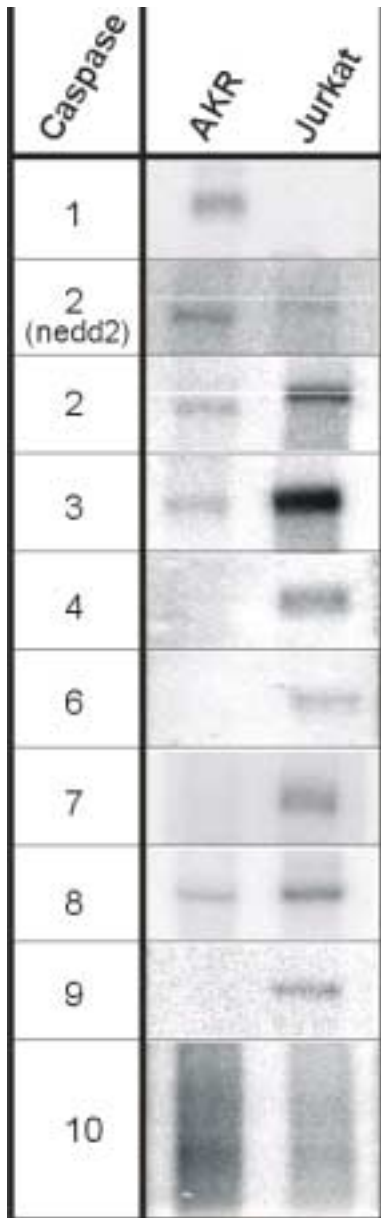


Abb.4. 9: Northern Blot für Caspasen

Für die Caspasen -1, -2, -3, -8 und -10 konnten in den AKR 2B-Mausfibroblasten Transkripte nachgewiesen werden. Bei fehlendem Nachweis von Transkripten konnten die Sonden erfolgreich durch die Jurkat-RNA überprüft werden. Bei der Verwendung von Sonden humanen Ursprungs ist die Intensität der Banden bei AKR 2B-Mausfibroblasten-RNA vergleichbar geringer als bei Jurkat-RNA. Durch die Lage der Signale relativ zur 18S- und 28S-rRNA und einem Vergleich mit Literaturangaben konnte die Spezifität bestätigt werden [175,162].

Die Caspase-10 wird in AKR 2B-Mausfibroblasten, wie durch Ng *et al.* [175] beschrieben, in unterschiedlichen Isoformen exprimiert.

4.3.3 Nuclease Protektionsassay (Riboquant)

Neben dem Northern Blot können mRNA-Spezies auch durch Hybridisierung mit einer Sonde durch den Nuclease Protektionsassay nachgewiesen werden. Nach Herstellerangaben bietet dieser Assay eine 10fach höhere Sensitivität im Vergleich zu anderen Methoden, wie z.B. ein Northern Blot. Zu diesem Assay kann man vorgefertigte Sondenmischungen beziehen. In der Mischung mApo-1 der Firma Pharmingen sind Sonden zu den murinen Caspasen-1, -2, -3, -6, -7, -8, -11, -12 und -14 enthalten. Das Sondengemisch soll auch zum Nachweis der durch alternatives Spleißen hervorgegangenen anti-apoptischen Form der Caspase-6 geeignet sein [24].

4.3.3.1 Erstellen von Sonden zum Nuclease Protektionsassay

Um RNA der Caspase-9, die in der Sondenmischung nicht enthalten ist, nachweisen zu können, mußte eine Sonde selbst hergestellt werden. Da die Caspase-14 hauptsächlich in embryonalem Gewebe bzw. Zellen, wie sie die AKR 2B-Mausfibroblasten darstellen, zu finden ist, sollte ihre Expression genauer untersucht werden [132,133]. Der Nachweis ihrer mRNA durch das Sondengemisch mApo1 konnte durch den Hersteller (Pharming) selbst nicht gezeigt werden. Auch konnte der Hersteller die Spezifität der Sonde erst bei Nachfragen bestimmen. So hat er sie im Datenblatt als Caspase-X bezeichnet. Um die RNA auch der Caspase-14 nachweisen zu können, sollte eine Sonde erstellt werden deren Sequenz bekannt ist und die länger ist, als die kommerziell erwerbbar. Dazu mußte geeignete cDNA in einen Expressionsvektor mit T7-Promotor so eingebracht werden, daß die nach der Transkription entstehende RNA komplementär zur mRNA der entsprechenden Caspase ist.

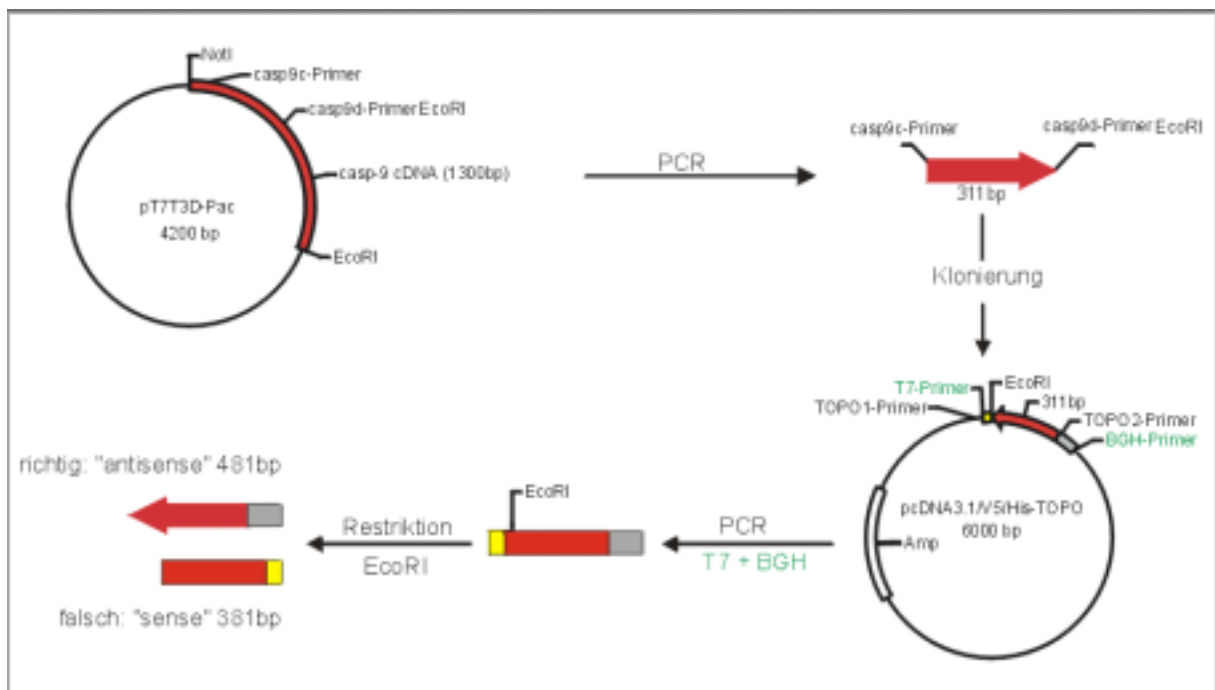


Abb.4. 10: Schematische Darstellung der Sondenherstellung für den Nuclease-Protektionsassay

Für die Caspase-9 wurde ein EST-Klon (Acc.: AI155222) aus einer cDNA-Bank erworben, der eine begrenzte cDNA-Sequenz der murinen Caspase-9 von ~1,3 kb enthält. Wie in der schematischen Darstellung (Abb.4.10) gezeigt, ist diese zwischen den Schnittstellen *NotI* und *EcoRI* des Vektors pT7T3 inseriert.

Mit den Primern Casp-9c und -9d wird ein 311bp großes Produkt durch PCR aus der Caspasen-cDNA gewonnen. Der reverse Primer Casp-9d enthält an seinem 5'-Ende eine

EcoRI-Schnittstelle. Das Produkt wurde in einem 2%igen Agarosegel von der Vektor-DNA getrennt, daraus ausgeschnitten und vom Gel gereinigt. Mittels des TOPO-Klonierung-Kits wurde das PCR-Produkt in den pcDNA3.1His-TOPO-Vektor inseriert und kloniert. Durch eine PCR mit einer Auswahl der gewachsenen Klone, wurde der Erfolg der Klonierung überprüft. Die hierbei verwendeten Primer T7 und BGH sind komplementär zur Vektor-DNA, die den Insertionsbereich flankiert.

Bei erfolgreicher Insertion der cDNA entsteht ein Produkt von 551bp. Um die Orientierung der cDNA im Vektor zu bestimmen, wurden diese PCR-Produkte durch das Enzym *EcoRI* geschnitten. Bei richtiger, d.h. komplementärer Orientierung, entstehen ein 481bp und ein 70bp großes Fragment, wie in Abbildung 4.11 dargestellt. Klone die diese Orientierung aufweisen wurden kultiviert, die Plasmide präpariert und mittels der Primer T7 und BGH sequenziert.

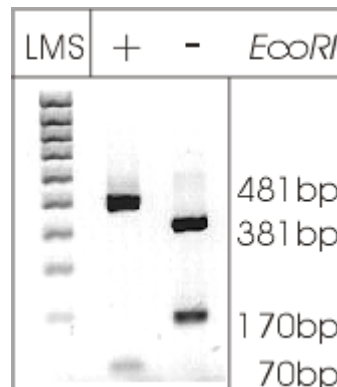


Abb.4. 11: Restriktion des Klonierungsproduktes mit *EcoRI* (+, - *EcoRI*, 100bp-Standard)

Zum Einsatz im Protektionsassay wurde aus diesen Klonen über PCR mit den Primern TOPO-1 und TOPO-2 DNA amplifiziert und gereinigt.

Für die Caspase-14 wurde dies analog von Frau Dr. Kagerhuber durchgeführt. Hierfür hat sie ein RT-PCR-Produkt der Caspase-14, das aus einer murinen embryonalen cDNA-Bank gewonnen wurde, verwendet. Bei der Trennung der radioaktiv markierten Sonden in einem Polyacrylamidgel ist eine Hauptbande in der erwarteten Größe von 311bp bzw. 400bp zu finden.

4.3.3.2 Detektion der Caspasen im Nuclease Protektionsassay durch Sonden des mApo1-Gemisches und eigene Sonden

Zum Nachweis der Caspasen-mRNA in konfluenten AKR 2B-Mausfibroblasten durch den Nuclease Protektionsassay wurden je 5µg Gesamt-RNA mit dem Sondengemisch mApo1, bzw. mit den eigenen Sonden zu den Caspasen-9 und -14 hybridisiert und nach Herstellerangaben behandelt. Das Hybridisierungsgemisch wurde nach Nucleasebehandlung und Fällung in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Standard wurden die radioaktiv markierten Sonden aufgetragen. Zum Vergleich wurde der Assay parallel mit dem Gemisch mApo1 und 5µg Gesamt-RNA aus Ba/F3, einer Mauszelllinie, und RNA aus Hefe durchgeführt.

In Abbildung 4.12 sind die entwickelten Radiographiefilme zusammengestellt.

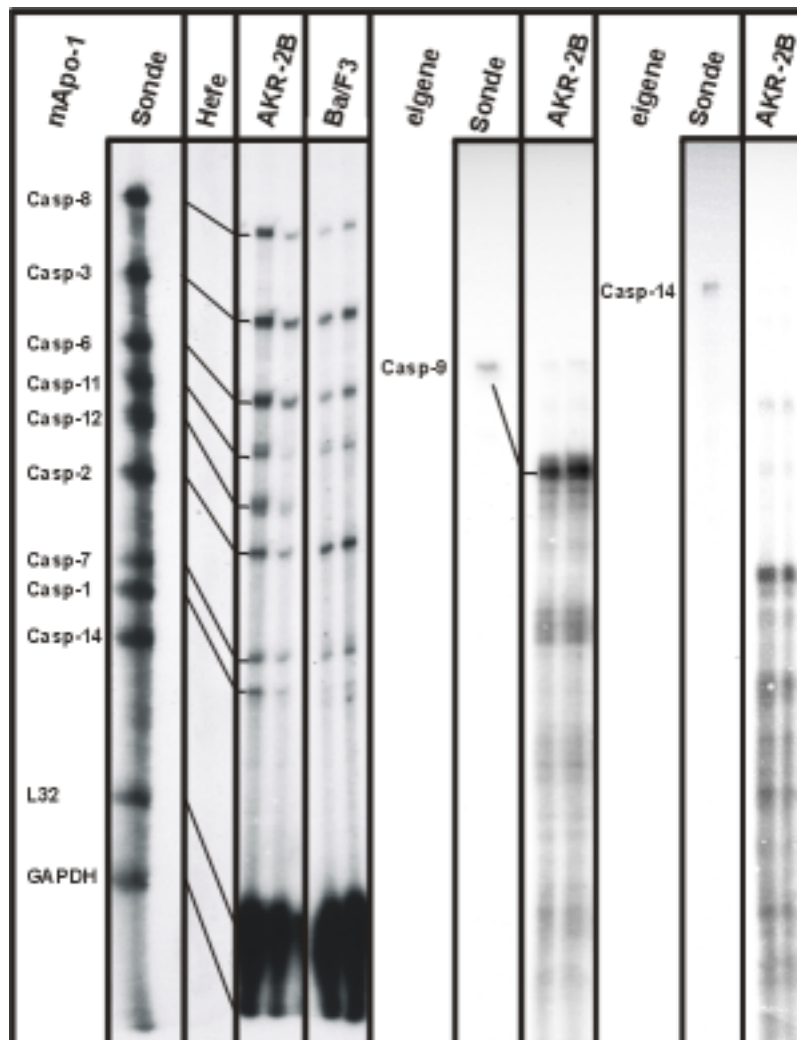


Abb.4. 12: Nuclease Protektionsassay für murine Caspasen

Durch die Nucleasebehandlung werden in den RNA-Hybriden einzelsträngige Nukleinsäuren

behandelten Sonden erscheinen im Gel schneller zu laufen, als ihre nicht behandelten Gegenstücke des Standards.

Wie erwartet konnten keine „Falschpositive“, also Hybridisierungen der Sonden mit der Hefe-RNA, nachgewiesen werden; Das gilt auch für die selbsthergestellten Sonden, ist aber hier nicht explizit dargestellt.

Bis auf die Caspase-14-mRNA und der Caspase-6s, die zwischen den Caspase-14- und L32-Hybriden zu suchen ist, sind alle untersuchten mRNA-Spezies in AKR 2B-Mausfibroblasten deutlich nachweisbar. In der zweiten erkennbaren Spur des mApo1-AKR-RNA-Ansatzes wurde nur halb so viel an Hybridansatz im Gel aufgetrennt. Dadurch sinkt die Signalintensität der einzelnen Banden teilweise unter einen Schwellenwert ab, so daß diese Hybride erst nach längerer Exposition des Films sichtbar werden.

In der Ba/F3-RNA sind nicht alle Caspase-Transkripte vorhanden. Es fehlen dort die Caspasen-1, -12 und -14.

Die Caspase-9 mRNA kann durch die selbsthergestellte Sonde in AKR 2B-Mausfibroblasten nachgewiesen werden. Unter der intensiven Bande im Hybridisierungsansatz sind schwächere diffuse Banden durch unspezifische Bindungen der Sonde oder aber auch durch den Abbau der Sonde während der Behandlung aufgetreten.

Für die Caspase-14 kann kein eindeutiger Nachweis erbracht werden. Zwar sind intensive Hybridisierungsprodukte zu finden, doch weisen sie eine zu niedrige Größe auf, was sich im zu großen Abstand zur Bande des Standards äußert. Die Intensität einer Bande mit der richtigen Größe ist vergleichbar schwach. Ihre Spezifität konnte aufgrund einer mangelnden Positivkontrolle nicht überprüft werden.

4.3.4 Untersuchung der Expression und Prozessierung von Caspasen

Untersuchungen der mRNA erlauben nur eine Aussage über die Expression von Caspase-Transkripten, nicht aber über die Expression von Caspasen als Protein. Wichtiger noch als der bloße Nachweis, ist die Möglichkeit, mittels Antikörpern auch die Prozessierung, also die Aktivierung, der Caspasen untersuchen zu können [134]. Die Auswahl an erhältlichen Antikörpern für murine Caspasen ist aber sehr eingeschränkt. So sind alle erfolgreich verwendeten Antikörper für Caspasen humanen Ursprungs spezifiziert.

Die Expression und Prozessierung der Caspasen-1, -2, -3 und -6 sollte durch Western Blots untersucht werden. Dazu wurden nach zunehmender Dauer an Serumentzug Lysate nach Lämmli aus AKR 2B-Mausfibroblasten erstellt und Aliquots mit gleichen Proteinnengen durch SDS-PAGE aufgetrennt.

4.3.4.1 Überprüfen der Antikörper gegen die Caspasen-1, -2 und -3

Um nachzuweisen, daß die Antikörper auch die Untereinheiten der murinen Caspasen detektieren können, wurden Caspase-haltige Fraktionen aus einer Anionenaustauschchromatographie (s.4.4.2), einer Bromcyan-Spaltung (BrCN) unterzogen. Die erhaltenen Fragmente wurden durch eine SDS-PAGE nach Schägger (s.3.3.5) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Anschließend wurde der Western Blot mit den Caspase-Antikörpern weiter durchgeführt.

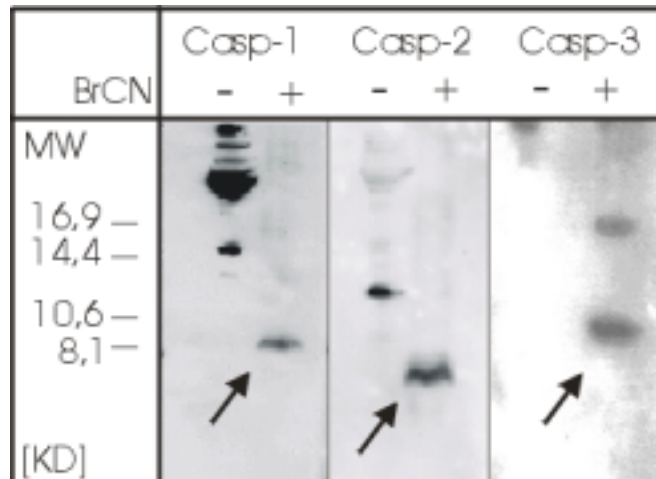


Abb.4. 13: Test der Caspase-Antikörper durch BrCN-gespaltene Caspasen. (→: Lage der gespaltenen Caspasen)

Wie in Abbildung 4.13 zu erkennen ist, traten nach der BrCN-Spaltung Fragmente mit den erwarteten Größen von etwa 7-10kD auf, die durch die entsprechenden Antikörper erkannt wurden. Da aber die zur BrCN-Spaltung eingesetzten Proben nicht frei von anderen Proteinen waren, ist nicht vollständig auszuschließen, daß durch die Spaltung neue Epitope entstanden, die durch die Antikörper erkannt werden konnten.

4.3.4.2 Expression der Caspase-1 in Abhängigkeit des Serumentzugs

Zur Detektion der Caspase-1 in AKR 2B-Mausfibroblasten wurde ein Antikörper verwendet, der die ungespaltenen Isoformen der Caspase und ihr großes Spaltprodukt, p21, erkennt. Neben den Lysaten aus AKR 2B-Mausfibroblasten wurde ein Lysat aus Jurkat-Zellen untersucht.

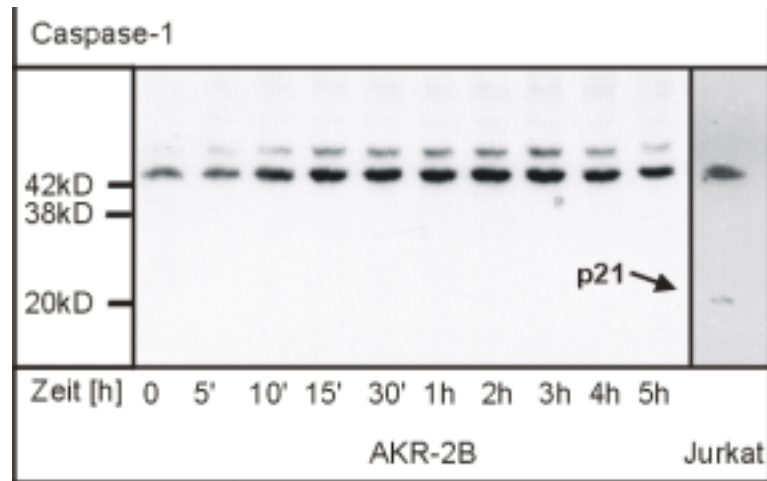


Abb.4. 14: Western Blot für die Casp-1 von apoptotischen AKR 2B-Mausfibroblasten.
Pfeile: Lage der großen Untereinheit (p21)

Die Abbildung 4.14 zeigt, daß zumindest eine Isoform der Caspase-1 in AKR 2B-Mausfibroblasten konstitutiv exprimiert wird. Das Molekulargewicht der stärkste Bande, bei 42kD, entspricht dem der Caspase-1a [135]. Während des fortschreitenden Serumentzugs kommt es zu keiner Prozessierung der Caspase in ihre aktive Untereinheit (p20), wie dies im Jurkat-Zellysate der Abbildung 4.14 zu erkennen ist.

4.3.4.3 Expression der Caspase-2 in Abhängigkeit des Serumentzugs

Der verwendete Antikörper zum Nachweis der Caspase-2 erkennt eine Untereinheit der aktivierten Caspase (p20 oder p12) und die zwei Isoformen des Proenzym: Die L- (p48) bzw. die kleinere S-Form (p38).

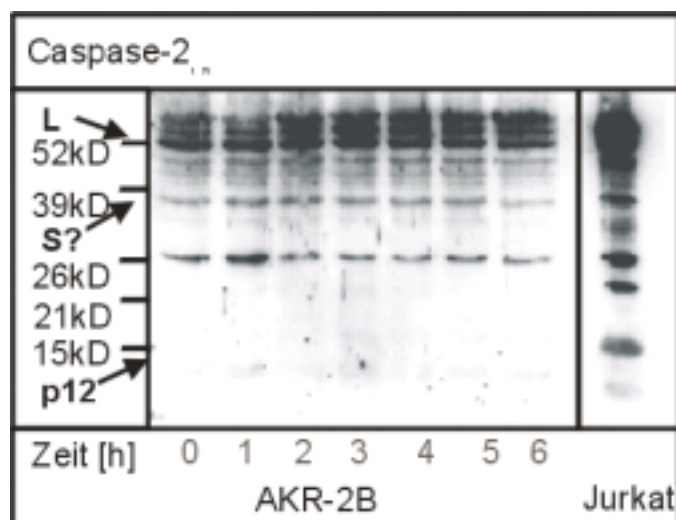


Abb.4. 15: Western Blot für Casp-2_L
L: langes Proenzym; S: kurzes Proenzym
→: Lage der Caspase

Während des Serumentzugs kommt es zu keiner Aktivierung der Caspase-2, d.h zu keinem Auftreten der Untereinheiten, wie in Abbildung 4.15 zu erkennen ist. Die Expression scheint mit zunehmender Dauer abzunehmen, jedoch konnte das bei weiteren Western Blot-Untersuchungen nicht bestätigt werden. Neben der großen Isoform der Caspase-2 (Abb.4.15), ist ein konstitutiv exprimiertes Protein mit niedrigerem Molekulargewicht (p38) in den Fibroblasten nachweisbar. Dies entspricht dem Molekulargewicht der durch alternatives Spleißen hervorgegangenen kleinen anti-apoptischen Form der murinen Caspase-2 [24,116].

4.3.4.4 Expression der Caspase-3 in Abhängigkeit des Serumentzugs

Wie durch Abbildung 4.16 gezeigt, wird die Caspase-3 in AKR 2B-Mausfibroblasten konstitutiv exprimiert, aber während des Serumentzugs nicht proteolytisch aktiviert. Der verwendete Antikörper erkennt, nach Herstellerangaben und durch die BrCN-Spaltung gezeigt, neben der ungeschnittenen p32-Form des Proenzym, auch (s.4.3.4.1) die p20-Untereinheit der Caspase.

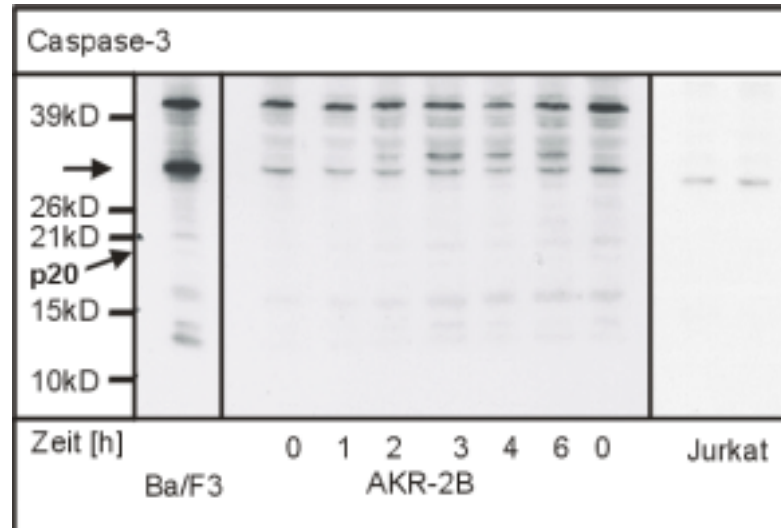


Abb.4. 16: Western Blot für Casp-3 von apoptotischen AKR 2B-Mausfibroblasten

4.3.4.5 Expression der Caspase-6 in Abhängigkeit des Serumentzugs

Das zur Detektion der Caspase-6 eingesetzte Antiserum ist gegen ein C-terminales Epitop der humanen Caspase entwickelt. Es erkennt dadurch neben den durch alternatives Spleißen hervorgegangenen Isoformen des Proenzym, p34 und p22, auch die kleine der aktiven Untereinheiten (p11).

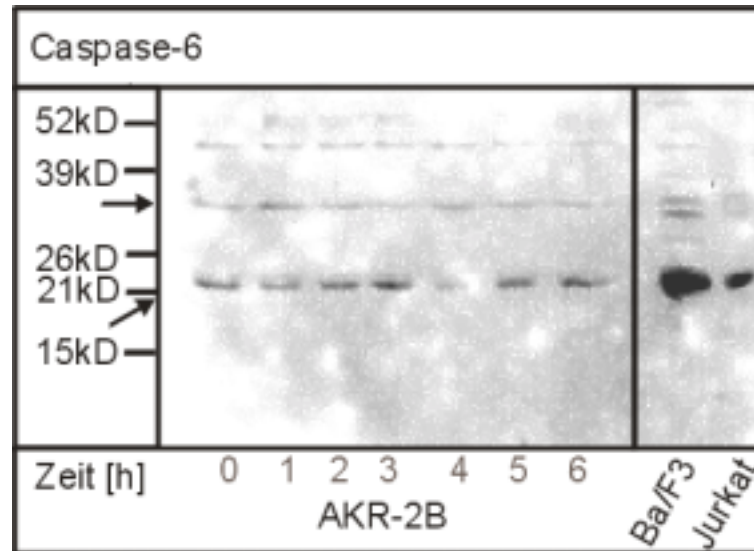


Abb.4. 17: Western Blot für Casp-6 von apoptotischen AKR 2B-Mausfibroblasten
 →: Lage der Caspasen

Wie in Abbildung 4.17 zu erkennen, werden beide Isoformen in AKR 2B-Mausfibroblasten konstitutiv exprimiert. Die kleinere hat ein deutlich stärkeres Expressionsniveau. Eine Aktivierung der großen Isoform durch Proteolyse ist nicht festzustellen.

Das Expressionsniveau der untersuchten Caspasen in AKR 2B-Mausfibroblasten ist im Vergleich von z.B. Ba/F3 Zellen, einer murinen B-Zelllinie, niedrig. Daraus resultiert die z.T. sehr schwache Bandenintensität. Durch Erhöhung der aufgetragenen Proteinmenge nahm die Intensität des Hintergrundes so stark zu, daß die Identifikation der spezifischen Banden unmöglich erschien.

4.4 Reinigung der Caspase-Aktivität

Die Untersuchungen zeigten, daß in AKR 2B-Mausfibroblasten Caspasen exprimiert und im Verlauf des Zelltods aktiviert werden [110]. Jedoch ist die Identität der aktivierten Caspasen bislang unklar. Um die Caspasen zu identifizieren und zu charakterisieren, sollte die vorgefundene Aktivität gereinigt werden.

4.4.1 Affinitätsmarkierung der Caspase-Aktivität

Kovalent bindende Tetrapeptidinhhibitoren für Caspasen bieten die Möglichkeit, die Aktivität gezielt zu markieren. Sind die Inhibitoren biotinyliert, so können die inhibierten Caspasen mittels Avidin sichtbar gemacht werden [136,137]. Auch können diese Inhibitoren zur Reinigung der Caspasen herangezogen werden [138]. Verwendet wurden bio-DEVD.aomk und bio-YVKD.aomk, Inhibitoren, die durch ihre Aryloxymethylketon-Gruppe (aomk), neben der Pseudosubstratsequenz für Caspasen, noch eine zusätzliche Selektivität für Cystein-Proteasen besitzen [39,137].

4.4.1.1 Bestimmung der K_i -Werte biotinylierter Inhibitoren

So wie unter Kapitel 4.2.3 beschrieben, wurden die IC_{50} - und K_i -Werte der Inhibitoren, bio-DEVD.aomk und bio-YVKD.aomk, in Kombination mit den drei Substraten, DEVD.pNa, VEID.pNa und IETD.pNa, ermittelt.

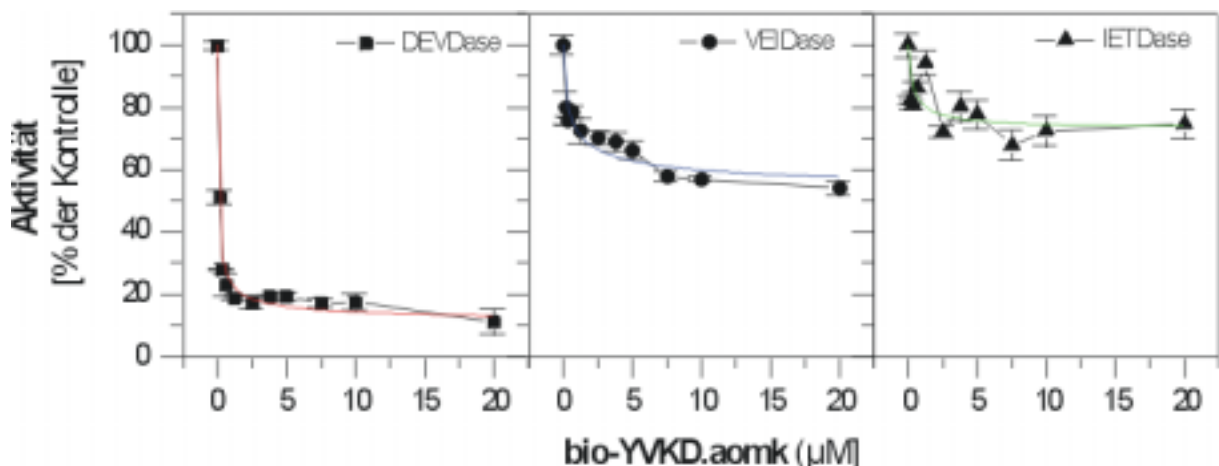


Abb.4. 18a: K_i -Bestimmung für die Kombination aus bio-YVKD.aomk und drei Substraten

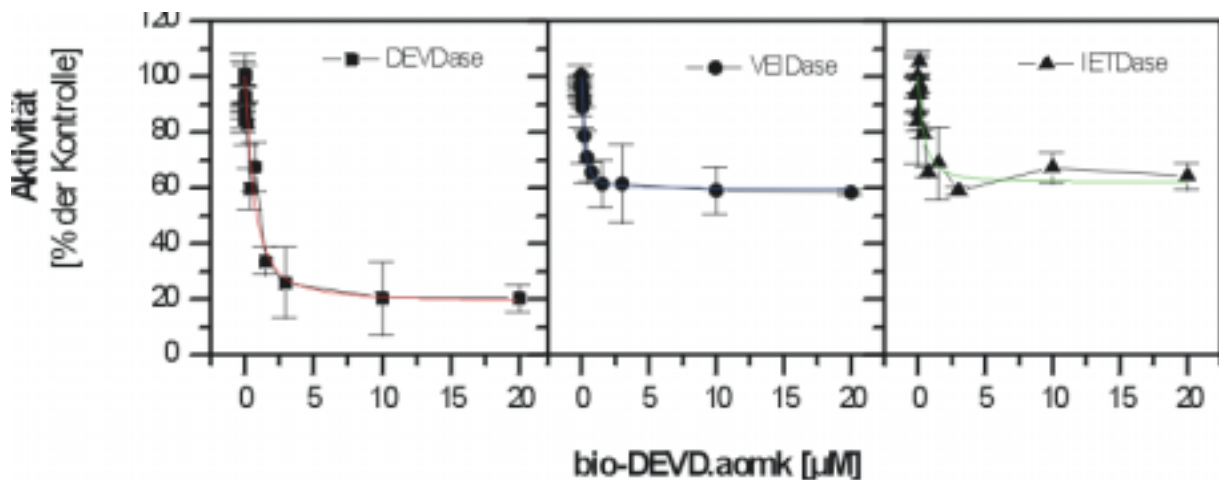


Abb.4.18b K_i -Bestimmung für die Kombination aus bio-DEVD.aomk und drei Substraten

Die DEVDase-Aktivität wurde durch beide Inhibitoren bei maximaler Konzentration um mehr als 80% inhibiert. Daraus resultieren K_i -Werte von 180nM und 170nM für YVKD.aomk bzw. DEVD.aomk.

Die Aktivitäten der VEIDase und IETDase wurden durch die Inhibitoren nur um maximal 20%-40% reduziert. Eine vollständige Inhibition kann nicht erreicht werden. Die K_i -Werte liegen hier um ein 10-faches höher, bei 10µM bzw. 20µM für bio-YVKD.aomk und 2µM bzw. 3µM für bio-DEVD.aomk.

4.4.1.2 Konzentrationsabhängige Markierung der Caspasen im Affinitäts Blot

Inhibierte und somit markierte Caspasen lassen sich in einem Affinitäts Blot sichtbar machen. Um den optimalen Konzentrationsbereich zur Markierung aktiver Caspasen bei AKR 2B-Mausfibroblasten zu ermitteln, wurden unterschiedliche Mengen der Inhibitoren mit 150µg an cytosolischem Extrakt aus apoptotischen AKR 2B-Mausfibroblasten versetzt. Daneben wurden, als Kontrolle der Spezifität der Bindung, Extrakte aus unbehandelten AKR 2B-Mausfibroblasten verwendet.

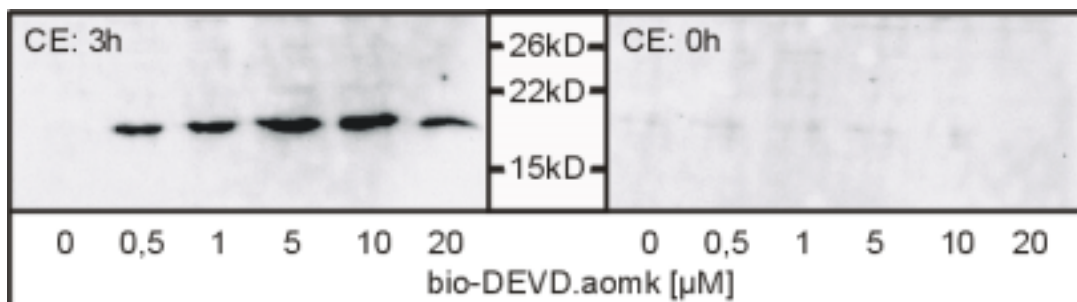


Abb.4. 19a: Konzentrationsabhängige Markierung von Caspasen durch bio-DEVD.aomk (CE: cytosolischer Extrakt, 0 bzw. 3h Serumentzug)

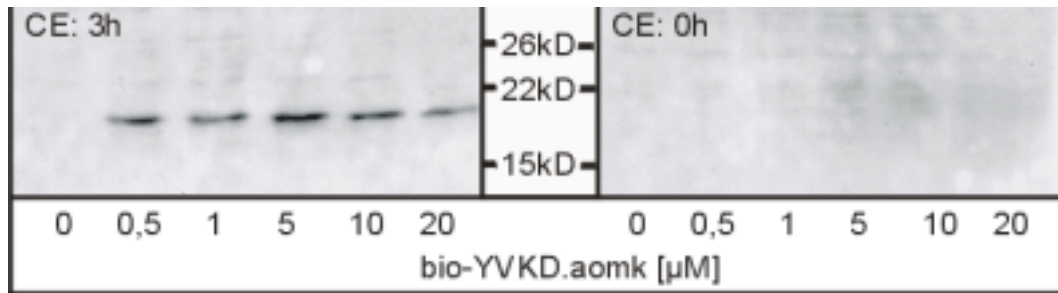


Abb.4.19b: Konzentrationsabhängige Markierung von Caspasen durch bio-YVKD.aomk (CE: cytosolischer Extrakt, 0 bzw. 3h Serumentzug)

Wie in den Abbildungen 4.19a und -b zu erkennen, tritt eine konzentrationsabhängige Markierung bei rund 18kD in apoptotischen Fibroblasten auf, nicht aber bei unbehandelten Zellen. Das entspricht in etwa dem Molekulargewicht der großen Untereinheit aktivierter Caspasen z.B. der Caspasen-2, -3, -6 und -8. Bei 5-10 μ M der Inhibitoren tritt eine maximale Markierung der Caspasen ein.

Unspezifische Markierungen sind nur bei einem Proteinen von über 68kD in allen Ansätzen aufgetreten (hier nicht gezeigt). Diese sind auf die Bindung des Streptavidins an die Proteine zurückzuführen und weniger auf die reaktive Gruppe (aomk) der Inhibitoren. Für Acyloxymethylketone ist beschrieben, daß eine Bindung erst in Kontakt mit Cystein-Proteasen zustande kommt [137].

4.4.1.3 Markierung der Caspasen in Abhängigkeit von der Dauer des Serumentzugs

Um eine Korrelation der Markierung mit dem Verlauf der Caspasenaktivität zu zeigen, wurden aus AKR 2B-Mausfibroblasten nach der unten angezeigten Dauer des Serumentzugs cytosolische Extrakte gewonnen, 150 μ g Protein daraus jeweils mit 10 μ M der Inhibitoren versetzt und in einem Affinitäts Blot untersucht.

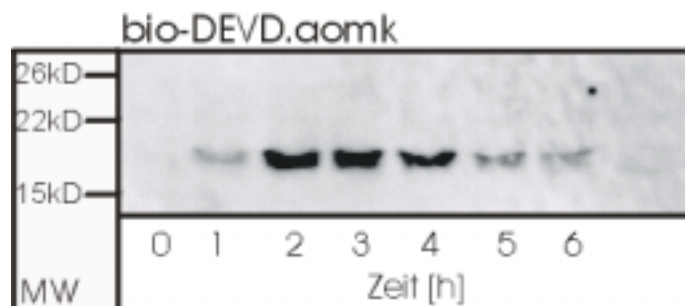


Abb.4. 20a: Zeitabhängige Markierung von Caspasen durch bio-DEVD.aomk

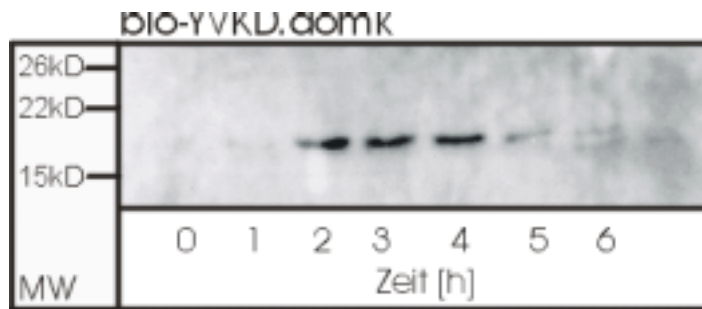


Abb.4.20b: Zeitabhängige Markierung von Caspasen durch bio-YVKD.aomk

In den Affinitäts Blots (Abbildungen 4.20a und -b) ist zu erkennen, daß sich die Markierungen mit zunehmender Dauer des Serumentzugs intensivieren. Eine maximale Markierung wurde nach 3h des Serumentzugs erreicht. Wie auch die Aktivität der Caspasen (s.4.2.1), nimmt die Intensität nach drei Stunden Serumentzug wieder ab.

4.4.1.4 2D-Gelelektrophorese von markierten cytosolischen Extrakten

Die Untereinheiten aktivierter, unterschiedlicher Caspasen unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht kaum. Aus diesem Grund würde sich in einer eindimensionalen SDS-PAGE keine klare Trennung der Banden erzielen lassen. Die Auftrennung nach Größe und isoelektrischem Punkt mittels 2D-Gelelektrophorese sollte hingegen in einer Trennung resultieren.

Um die markierten Caspasen voneinander zu trennen, wurde eine 2D-Gelelektrophorese mit je 150µg Gesamtprotein eines, mit 10µM biotinylierten Inhibitoren markierten, cytosolischen Extrakts aus apoptotischen und unbehandelten AKR 2B-Mausfibroblasten, durchgeführt. Anschließend wurden die Gele einem Affinitäts Blot unterzogen.

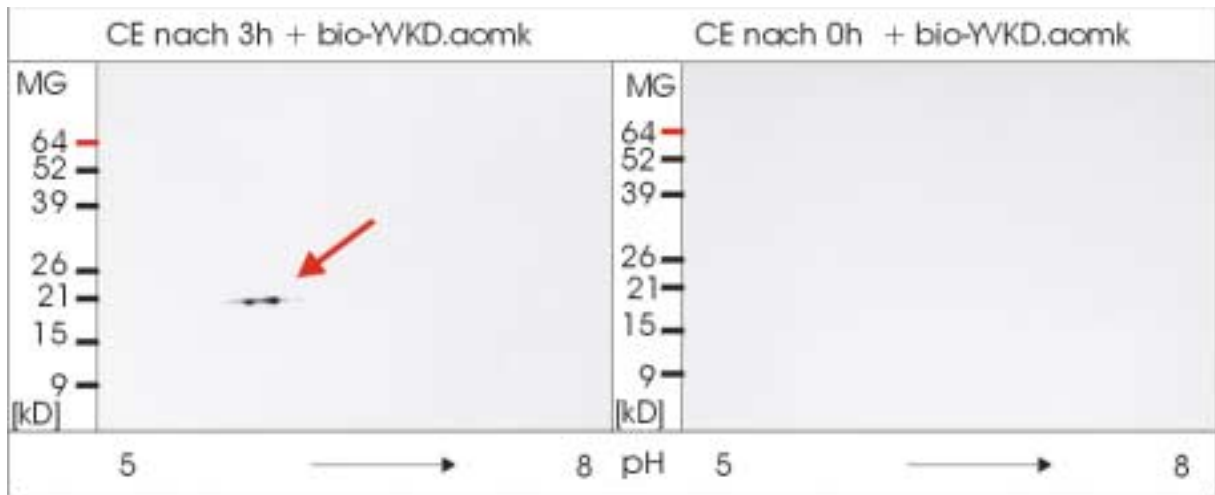


Abb.4. 21: 2D-Gelelektrophorese markierter cytosolischer Extrakte. CE: Cytosolischer Extrakt

In Abbildung 4.21 sind die Radiographiefilme der Affinitäts Blots mit bio-YVKD.aomk als Inhibitor dargestellt. Es ist zu erkennen, daß differentiell nur bei apoptotischen Zellen Signalpunkte mit einem Molekulargewicht bei ~18kD auftreten. Dabei handelt es sich um einen bis zwei Punkte in einem sehr engen pI-Bereich.

Das Markierungsmuster, hervorgerufen durch den Inhibitor bio-DEVD.aomk, unterscheidet sich nicht von dem hier gezeigten.

Bei einer stärkeren Beladung des Gels und bei einer längeren Exposition der Röntgenfilme treten zunehmend unspezifische Markierungen und Bindungen des Streptavidins auf (hier nicht gezeigt).

Im Vergleich zu den 6 Affinitätsmarkierungen, gezeigt von Faleiro *et al.* [137], ist das in AKR 2B-Mausfibroblasten gefundene Markierungsmuster mit 1-2 Punkten stark limitiert.

4.4.2 Anionenaustausch-Chromatographie

Den ersten Schritt zur Reinigung der Caspasenaktivität stellte eine Anionenaustausch-Chromatographie dar. Zunächst wurde diese Chromatographie in einem analytischen Maßstab durchgeführt. Es wurde einerseits die Verteilung der Caspaseaktivität durch Aktivitätstests und Affinitätsmarkierung, und andererseits die Verteilung der Caspasen durch Antikörper untersucht. Außerdem wurde die Ausbeute der Aktivität und der Reinigungsgrad nach der Trennung bestimmt.

4.4.2.1 Verteilung der Caspasen-Aktivität nach der Anionenaustausch-Chromatographie

9mg eines cytosolischen Extraktes aus apoptotischen AKR 2B-Mausfibroblasten wurden durch Anionenaustausch-Chromatographie in der Säule Superformance 75-5 aufgetrennt. Die aufgefangenen Fraktionen wurden auf ihre DEVDase-, VEIDase- und IETDase-Aktivität hin untersucht.

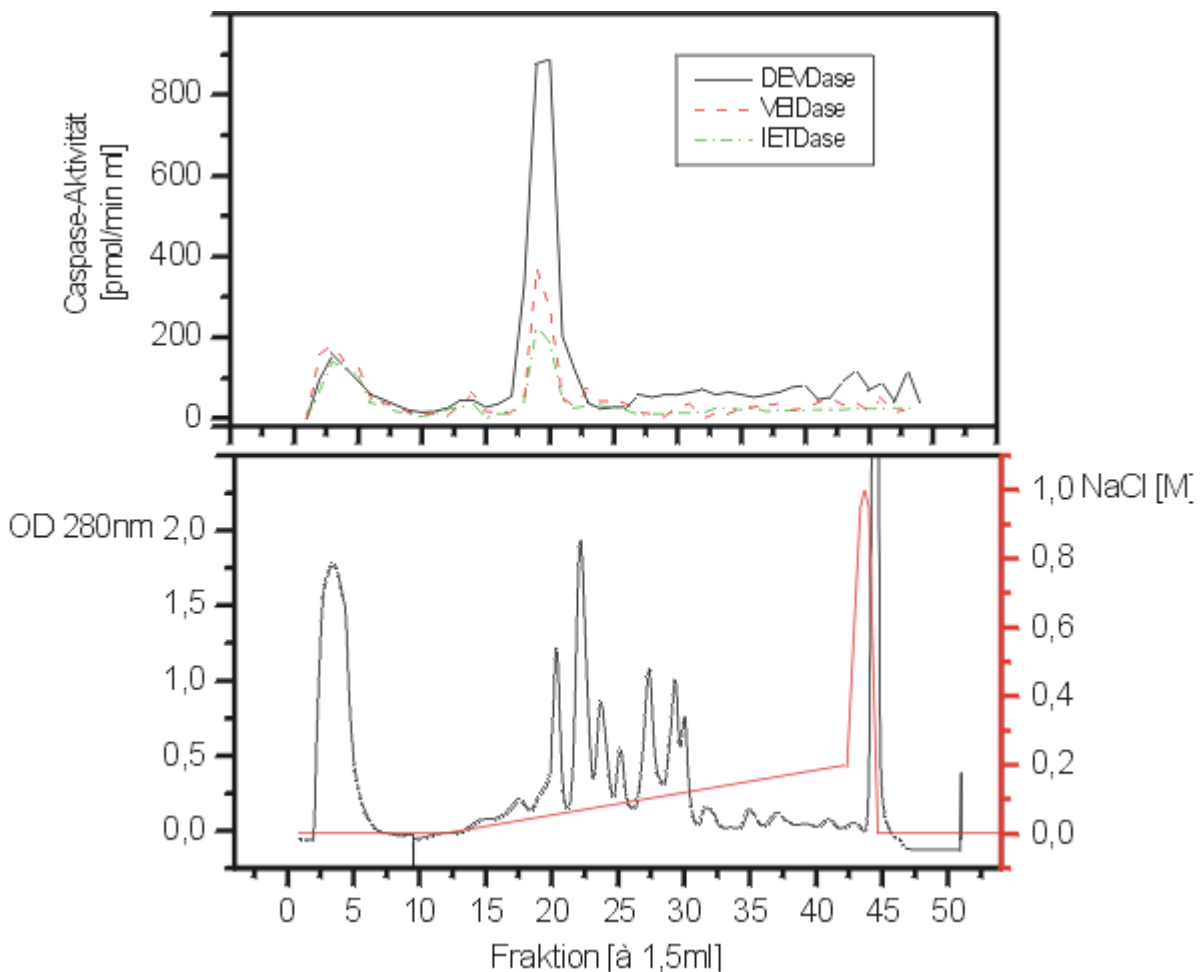


Abb.4. 22: Protein- und Aktivitäts-Elutionsprofil einer Anionenaustausch-Chromatographie

Abbildung 4.22 stellt zum einen die graphische Auftragung des Proteinelutionsprofils (untere Abb.), gemessen bei 280nm, und zum anderen die Auftragung der Aktivitäten dar (obere Abb.).

Caspase-Aktivitäten eluierten gemeinsam als Durchbruch und bei einem Salzgehalt von etwa 50mM NaCl vom Säulenmaterial. Letztere Fraktionen wiesen zusammen einen um 95% niedrigeren Proteingehalt auf als die aufgetragene Menge des cytosolischen Extraktes. Das entspricht einer Reinigung um einen Faktor von 28. Die DEVDase stellte die Hauptaktivität in diesen Fraktionen dar, die 3fach höher als die VEIDase- bzw. die IETDase-Aktivität war.

Gegenüber des cytosolischen Extraktes enthielten diesen Fraktionen noch $20\pm 5\%$ der DEVDase-Aktivität, wohingegen etwa $6,5\pm 0,3\%$ in den Fraktionen des Durchbruchs zu finden waren. Der Anteil der DEVDase, VEIDase und IETDase an der Gesamtaktivität im Durchbruch ist in etwa gleich.

Bei zunehmender Benutzungsdauer des Säulenmaterials kam es zu einer Verschiebung des Proteinelutionsprofils. Die Trennung der Proteine in den Fraktionen 20-30 verschlechterte sich, so daß sich der Proteingehalt in den Fraktionen mit Aktivität erhöhte und weniger DEVDase-Aktivität an das Material band. Dadurch erniedrigte sich zunehmend der Reinigungsfaktor auf rund 12 und die Ausbeute der DEVDase auf 10%.

Durch Kationaustauschmaterialien (Source S) konnte kein verbessertes Trennungsprofil erreicht werden. Das Verhältnis zwischen gebundener und ungebundener Aktivität betrug hierbei 50:50 (hier nicht gezeigt).

4.4.2.2 Verteilung der Caspasen nach der Anionenaustausch-Chromatographie

Um die Caspasen in den Fraktionen durch Western Blot und Affinitäts Blot zu bestimmen, wurden die Fraktionen einer Anionenaustausch-Chromatographie in einem Exsikkator vollständig eingengt und danach in Lämmli-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden dann durch Western Blot mit den Antikörpern für die Caspasen-1, -2, -3 und -9 analysiert.

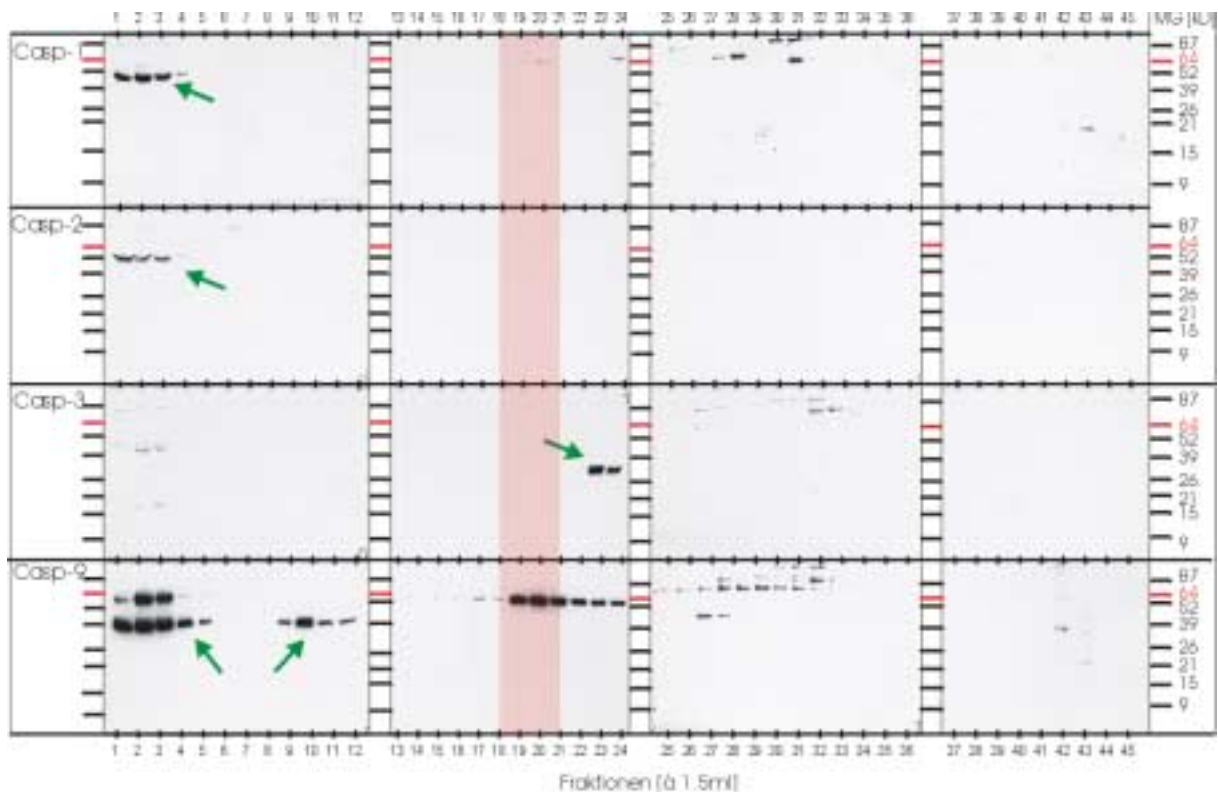


Abb.4. 23: Detektion von Caspasen in den Fraktionen einer Anionenaustausch-Chromatographie durch Western Blot. (Pfeile: Lage der Caspasen, hinterlegte Fläche: Fraktionen mit Caspase-Aktivität)

Die Proenzyme der Caspasen-1 und -2 binden nicht an das Anionenaustauschmaterial und waren nur in den Fraktionen des Durchbruchs zu finden. Die Caspase-3 wurde von diesen deutlich getrennt. Sie wurde in den Fraktionen 23 und 24 nachgewiesen und liegt somit auch um 2 Fraktionen von der Caspase-Aktivität (hinterlegte Fläche) getrennt.

Für das Proenzym der Caspase-9 konnte keine Bande dem errechneten Molekulargewicht von 49kD zugeordnet werden. Dagegen wurden aber Proteine mit dem Molekulargewicht der großen aktiven Untereinheit der murinen Caspase-9 (40kD) im Durchbruch sowie in den Fraktionen 9-12 durch den Antikörper gebunden. Alle anderen intensiven Banden beim Nachweis der Caspase-9 weisen ein falsches Molekulargewicht auf.

Mit Ausnahme der Caspase-9, konnten keine aktivierten Untereinheiten der Caspasen nachgewiesen werden. Die Spaltaktivitäten konnten somit keiner Caspase zugeordnet werden.

Fraktionen einer vergleichbaren Chromatographie wurden vor dem Einengen mit dem Inhibitor bio-YVKD.aomk behandelt und danach gleiche Volumina durch einen Affinitäts Blot und einen Western Blot für die Caspase-3 analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.24 dargestellt.

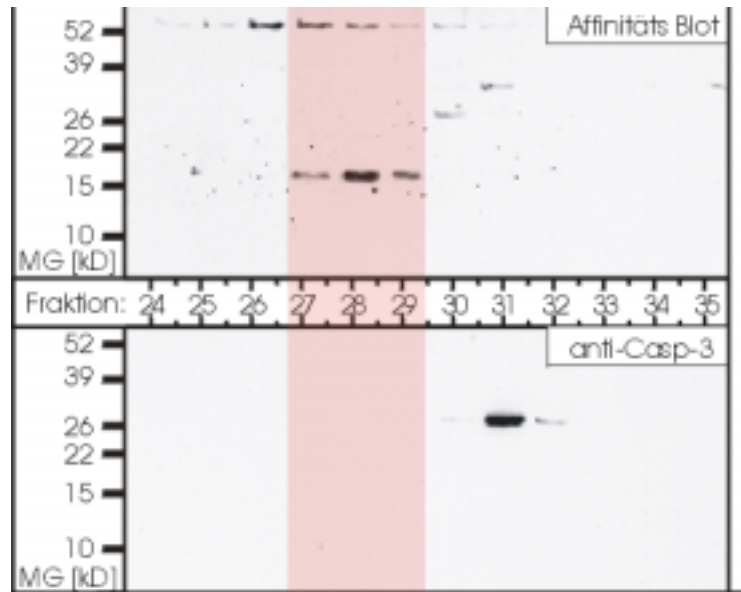


Abb.4. 24: Affinitäts Blot und Western Blot für Casp-3 von Fraktionen einer Anionenaustausch-Chromatographie (hinterlegte Fläche: Fraktionen mit gebundener Spaltaktivität)

Eine Markierung bei 18kD Molekulargewicht konnte nur in den Fraktionen mit Caspase-Aktivität gefunden werden, also auch leicht in den Fraktionen des Durchbruchs (hier nicht gezeigt). Durch den Anionenaustauscher gebundene Aktivitäten sind frei von der Caspase-3 und anderen durch Western Blot detektierbaren Caspasen (s.o.).

4.4.2.3 2D-Gelelektrophorese von Fraktionen mit Caspase-Aktivität

Die 2D-Gelelektrophorese kann nicht nur zur Analyse von Proteingemischen dienen, sondern kann auch zur Reinigung einzelner Proteine zur anschließenden Sequenzierung herangezogen werden.

Zu diesem Zweck wurden 240mg eines cytosolischen Extraktes apoptotischer AKR 2B-Mausfibroblasten durch eine Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt. Dazu wurde die Säule Superformance 10 mehrfach verwendet. Fraktionen mit Caspase-Aktivität wurden gesammelt, mit 10 μ M bio-YVKD.aomk behandelt und das Protein (\approx 10mg) darin mit TCA gefällt. Das Präzipitat wurde in 500 μ l Rehydratisierungspuffer aufgenommen und je 10 μ l bzw. 490 μ l davon durch die 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine beider Gele wurden auf PVDF-Membranen geblottet. Die Membran mit geringerer Beladung wurde einem Affinitäts Blot unterzogen. Die verbleibende Membran wurde mit Coomassie gefärbt.

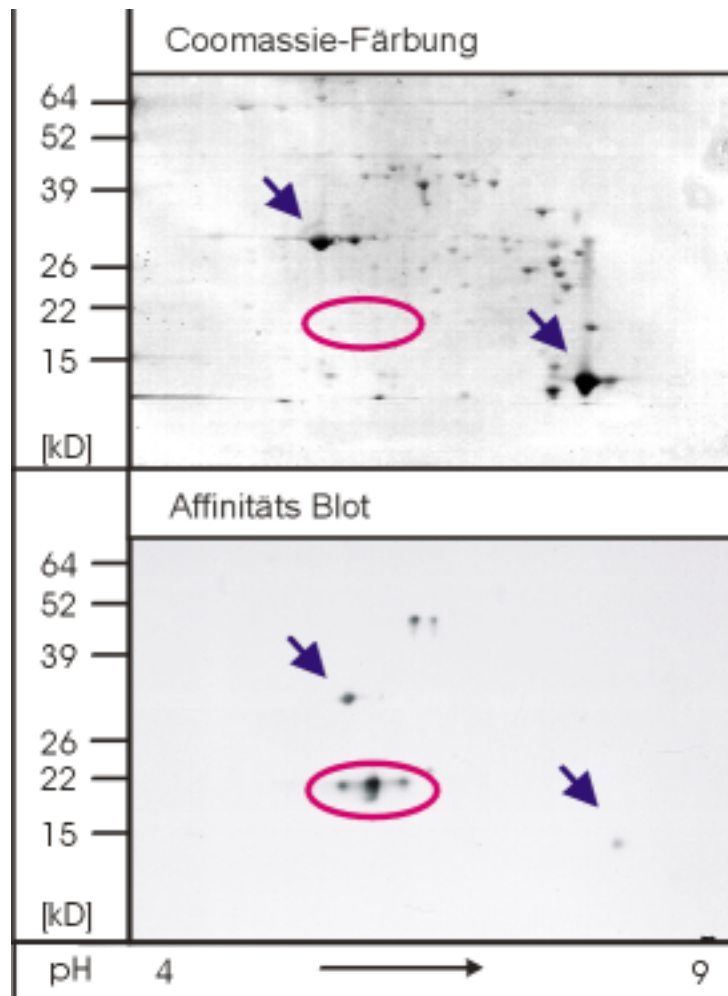


Abb.4. 25: 2D-Gelelektrophorese markierter Fraktionen einer Anionenaustausch-Chromatographie
(Pfeile: unspezifische Markierungen, Elipse: Caspase-Markierung)

Aufgrund der sehr starken Beladung beider Gele sind mehr unspezifische Markierungen im Affinitäts Blot in Abbildung 4.25 als in Abbildung 4.21 zu erkennen. Diesen Markierungen sind in der Regel deutliche Färbungen nach der Coomassie-Färbung zuzuordnen. Die Spreizung der gefärbten Proteinpunkte zeigt an, daß mit der Proteinbeladung die obere Kapazitätsgrenze des Gels erreicht ist.

Durch Vergleich des Affinitäts Blots mit der gefärbten Membran, wurde dort die Lage der spezifisch markierten Caspase ermittelt. In diesem Bereich wurde ein leicht gefärbter Punkt ausgeschnitten und einer Proteinsequenzierung durch Frau Dr. Hoppe unterzogen. Mangels ausreichender Mengen an gereinigtem Protein verlief die Sequenzierung weitgehend erfolglos. Die ermittelten Daten erlauben eigentlich keine Aussage über eine Proteinsequenz. Die trotz dieser Einschränkung bestimmte kurze Sequenz -PHVNFLDK- kann keinem bekannten Protein aus Vertebraten zugeordnet werden.

4.4.3 Chromatographie mit Hydroxylapatit

Um eine weitere Reinigungsstufe zwischen Anionenaustausch-Chromatographie und 2D-Gelelektrophorese zu bringen, wurde eine Chromatographie mit Hydroxylapatit etabliert. Hierzu wurden bis zu 2mg Gesamtprotein aus Fraktionen der Anionenaustausch-chromatographie, die die Caspase-Aktivität aufweisen, durch diese Chromatographie weiter aufgetrennt. Neben dem Proteinelutionsprofil wurde die Verteilung der Caspase-Aktivität in den aufgefangenen Fraktionen bestimmt und in Abbildung 4.26 zusammengefaßt dargestellt.

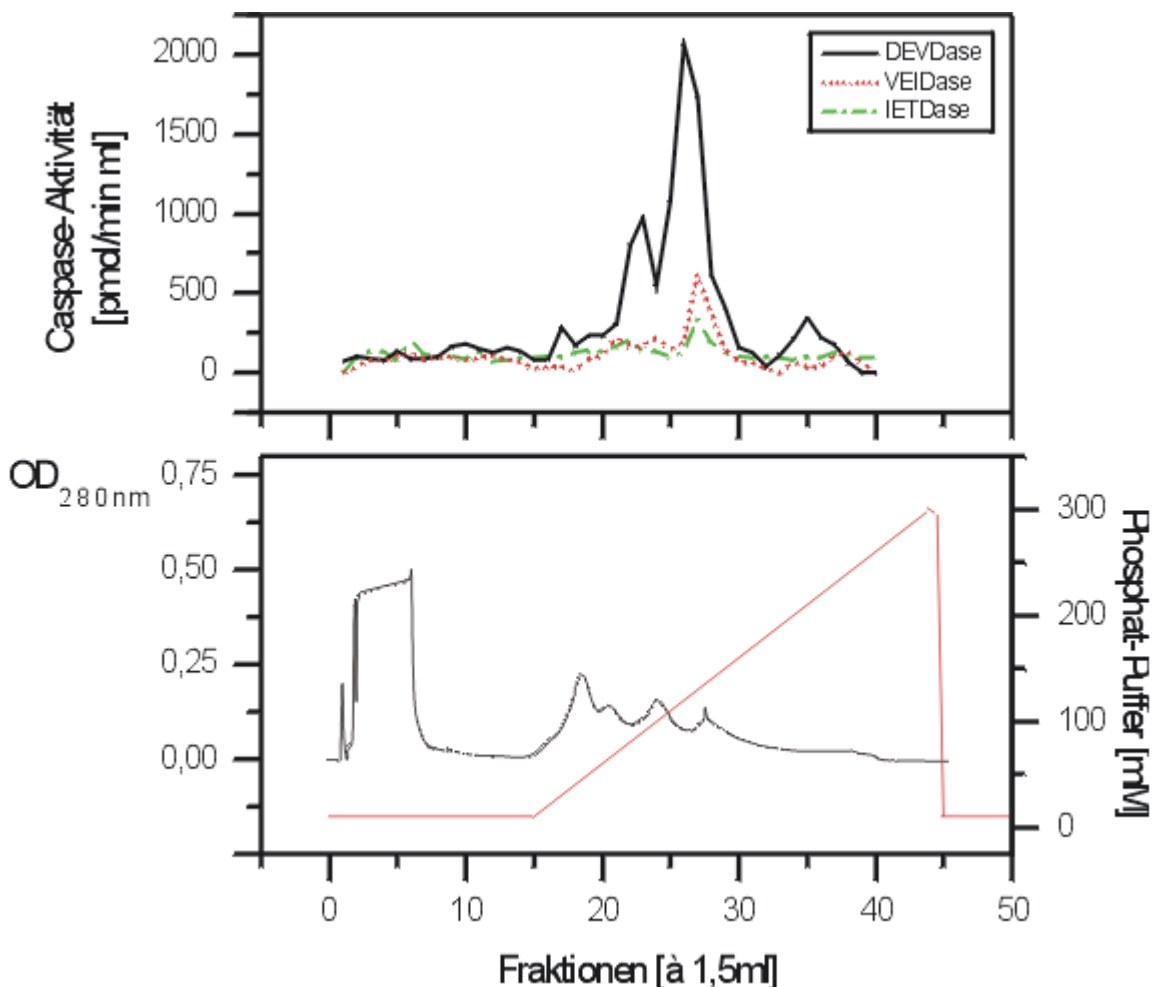


Abb.4. 26: Proteinelutions- und Aktivitäts-Elutionsprofil der Hydroxylapatit-Chromatographie

Ein Großteil des aufgetragenen Proteins band nicht an das Material, wohl aber die Caspasen, die die Spaltaktivitäten vermitteln. In diesen „aktiven“ Fraktionen befindet sich durchschnittlich $5 \pm 2\%$ der aufgetragenen Proteinmenge, das entspricht einer Reinigung um einen Faktor von 20. Die Ausbeute der DEVDase-Aktivität betrug durchschnittlich $90 \pm 8\%$.

Anteil an VEIDase und IETDase trat auf, der 17,5% bzw. 8% der DEVDase-Aktivität entspricht. Für diese Aktivität kommt es zu einer reproduzierbaren Zweiteilung. Auf zwei Fraktionen mit geringerer DEVDase-Aktivität von etwa 900pmol/min folgt mit einer Fraktion Abstand die Hauptaktivität in drei Fraktionen mit über 1500-2000 pmol/min.

Die Reinigung der Caspasen wird auch deutlich bei einer SDS-PAGE der Fraktionen mit anschließender Coomassie-Färbung des Gels. Hierzu wurden 200µl der ersten 24 Fraktionen vollständig in einem Exsikkator eingengt danach in 35µl Lämmli-Puffer aufgenommen und durch SDS-PAGE aufgetrennt. In diesem Fall befand sich die Caspase-Aktivität in den Fraktionen 16 bis 19 der Chromatographie. Bei dieser wurde mit der Zugabe von Phosphatpuffer unmittelbar nach Beenden des Auftrags begonnen. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie, wie in Abbildung 4.27 gezeigt, gefärbt.

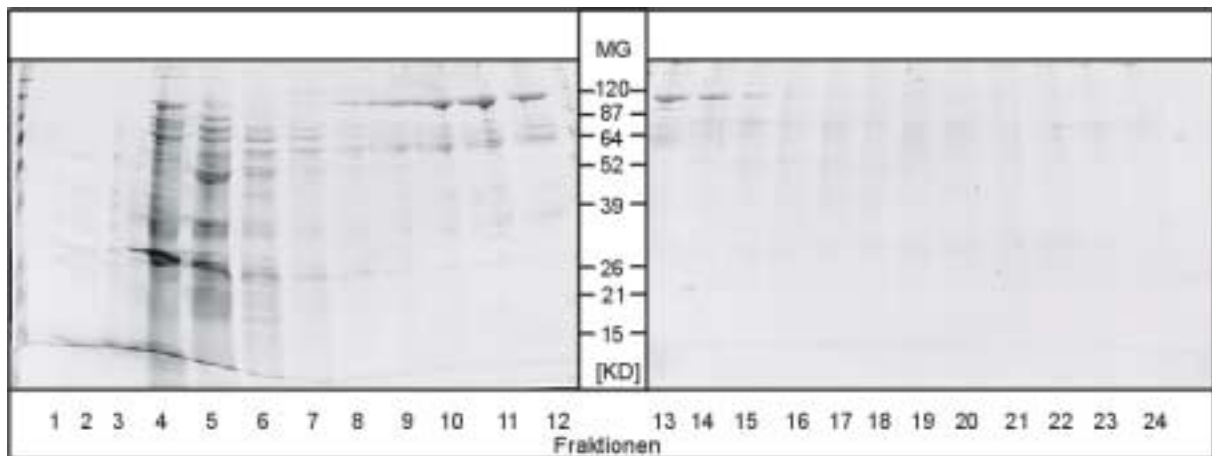


Abb.4. 27: SDS-PAGE von Fraktionen einer Hydroxylapatit-Chromatographie mit Coomassie-Färbung

In den „aktiven“ Fraktionen, 16-19, ist nur eine Färbung des Hintergrunds festzustellen. Die Fraktionen sind frei von störenden Proteinansammlungen, die sich durch Coomassie anfärben lassen.

Zusammengenommen mit der Anionenaustausch-Chromatographie betrug die Ausbeute an DEVDase, die um den Faktor von 300-1000 gereinigt wurde, 25-15%. Dies war abhängig vom Benutzungsgrad des Anionenaustauschers. Dadurch wurde eine geeignete Ausgangssituation für eine 2D-Gelelektrophorese und eine daran anschließende Sequenzierung der markierten Caspase geschaffen. Auch für weitere Enzym-Assays birgt dies für die Zukunft bessere Bedingungen.

4.5 Beteiligung von Signalwegen im Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten

Intrazelluläre Signalwege können sowohl pro-, als auch anti-apoptotische Signale vermitteln [139-142]. Noch ist unklar, welche Komponenten von Signalwegen in AKR 2B-Mausfibroblasten beim Serumentzug außer den Caspasen aktiviert oder inaktiviert werden. Auch bleibt die Frage noch offen, welches differentielle Ereignis dazu führt, daß 50% der Zellen den Serumentzug überleben. Doch konnte gezeigt werden, daß die Stimulation unterschiedlicher Signalwege während des Serumentzugs AKR 2B-Mausfibroblasten vor dem Zelltod bewahrt. Im speziellen schützen die Wege, die durch den PDGF-Rezeptor, die PKC, die G-Proteine und die Adenylatzyklase aktiviert werden. Daneben führt die Behandlung mit dem Phosphatase-Inhibitor Okadainsäure, mit Colchicin, und ATP sowie Adenosin zum Überleben der Fibroblasten [110].

Die folgenden Untersuchungen sollten Einblicke über die Weiterleitung des apoptotischen bzw. der schützenden Signale liefern.

4.5.1 Induktion des Zelltods durch Anisomycin

Anisomycin ist ein Proteinbiosynthese-Inhibitor. Eine Behandlung von Zellen mit dieser Substanz führt zu einem apoptotischen Zelltod. Anisomycin führt in AKR 2B-Mausfibroblasten zur Apoptose aller Zellen, die sich aber durch Caspase-Inhibitoren verhindern läßt [143].

Ein Vergleich des streßinduzierten Zelltods durch Serumentzug und durch Anisomycin sollte Hinweise über unterschiedliche Wege oder einen eventuell allgemeingültigen Weg zur Caspaseaktivierung in AKR 2B-Mausfibroblasten liefern.

Dazu wurden die Fibroblasten mit 10µM bzw. 50µM Anisomycin in MCDB 402-Medium für 3h behandelt und cytosolische Extrakte präpariert. Den Extrakten wurde 10µM bio-YVKD.aomk zugesetzt und die so markierten aktivierten Caspasen im Affinitäts Blot durch SDS-PAGE und 2D-Gelelektrophorese nachgewiesen.

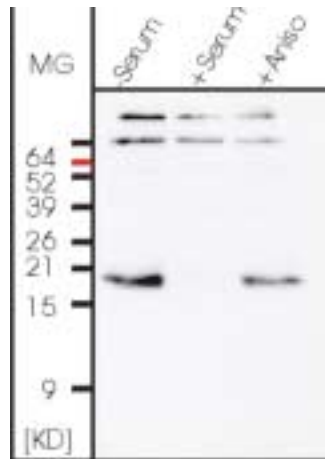


Abb.4. 28a: Affinitäts Blot von Anisomycin-stimulierten AKR 2B-Mausfibroblasten (Aniso: 3h Anisomycin)

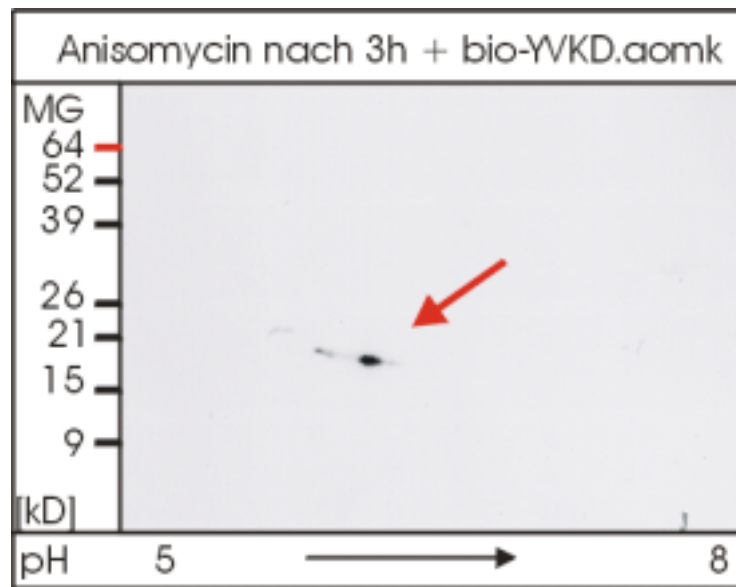


Abb.4.28b: 2D-Affinitäts Blot von Anisomycin-stimulierten AKR 2B-Mausfibroblasten

In den Abbildungen 4.28a und b ist das Markierungsmuster für eine 10 μ M Anisomycin-Stimulation gezeigt. Sowohl ein- als auch zweidimensional sind keine Unterschiede in den Markierungsmustern bei der Induktion des Zelltods durch Serumentzug bzw. Anisomycin zu erkennen. Bei einer 50 μ M Anisomycin-Stimulation tritt ebenfalls das gleiche Muster auf.

4.5.2 Einfluß des viralen Caspase-Inhibitors CrmA auf den Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten

Das Protein CrmA (*cytokine response modifier A*) aus Kuhpockenviren ist ein potenter Inhibitor der Gruppe-I und -III-Caspasen [59,60]. Eine entscheidende Beteiligung dieser Initiatorcaspasen am Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten sollte durch den Einsatz dieses selektiven Inhibitors untersucht werden. Dazu ist ein Expressionsvektor, der die vollständige cDNA des crmA-Gens enthält, durch Prof. Dr. Pickup zur Verfügung gestellt worden.

4.5.2.1 Einfluß der Expression von CrmA während des Serumentzugs

Um den Einfluß des Inhibitors auf das Zellsterben zu untersuchen, wurde die cDNA durch Frau Dr. Karbach in den Expressionsvektor pBk kloniert. Mit diesem Vektor wurden AKR 2B-Mausfibroblasten mittels Elektroporation transfiziert und das Protein transient exprimiert. Zur Kontrolle wurden Zellen mit dem Expressionsvektor pBk ohne crmA transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurde den Zellen für die in Abbildung 4.29 angegebene Dauer das Serum entzogen und die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt.

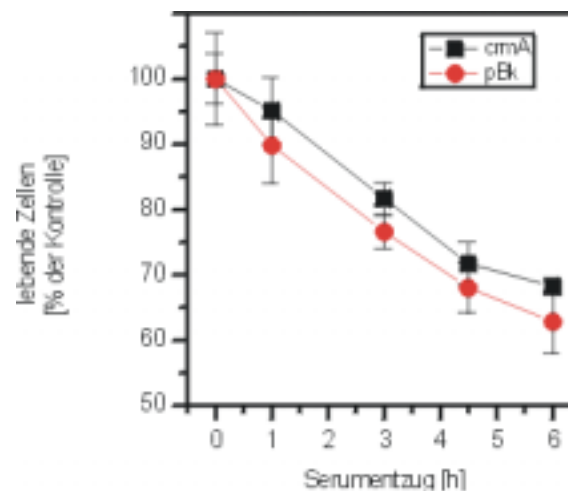


Abb.4. 29: Einfluß des CrmA auf das Zellsterben in AKR 2B-Mausfibroblasten

Wie in der Graphik zu erkennen ist, starben die Zellen nach Serumentzug unbeeinflusst durch die Expression des Inhibitors. Bei einer 20%igen Transfektionseffizienz (unabhängig durch eine X-Gal-Selektionierung gezeigt) ist der erwartete Effekt möglicherweise zu gering, um erkennbar zu sein. Eine Unterscheidung sterbender, transfizierter und nicht-transfizierter Zellen von den überlebenden ist so nicht möglich.

4.5.2.2 Konstruktion eines crmA-GFP Fusionsexpressionsvektors

Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte kein erkennbarer Effekt der Expression von CrmA in AKR 2B-Mausfibroblasten während des Serumentzugs gefunden werden. Dies könnte an dem geringen Anteil der transfizierten Zellen an der Gesamtpopulation liegen. Eine selektive Betrachtung dieser Teilpopulation sollte dieses Problem beseitigen. Eine Fusion des CrmA an das „grünfluoreszierende Protein“, GFP, bietet die Möglichkeit, allein die transfizierten Zellen durch die Fluoreszenz des GFP zu betrachten. Ihre Reaktion auf Serumentzug sollte mittels Mikroskopie und Durchflußcytometrie untersucht werden.

Zunächst sollte ein Vektor erstellt werden, der die Expression von CrmA und GFP als Fusionsprotein ermöglicht. Die Konstruktion des Vektors erfolgte nach einem Klonierungsschema, das in Abbildung 4.29 zusammengefaßt ist. CrmA wurde uns im Vektor pUC19 zur Verfügung gestellt. Es beinhaltet am 5'-Ende zwei *NcoI*-Schnittstellen, die außerhalb der kodierenden cDNA-Sequenz liegen.

Durch eine Restriktion mit den Enzymen *EcoRI* und *NotI* wurde das Gen für GFP aus dem Expressionsvektor pEGFP-N1 ausgeschnitten und in einem Agarosegel isoliert. Diese cDNA wurde an den gleichen Schnittstellen in den Vektor pBluescript II eingebracht.

Mittels PCR und den Primern RS1 und RS2 wurde ein cDNA-Fragment von crmA geschaffen das 5' eine weitere *NcoI*- und *HindIII*-Schnittstelle besitzt. Durch eine Restriktion dieses PCR-Fragments und der CrmA-cDNA mit den Enzymen *BSGI* und *HindIII* und einer anschließenden Ligation der gelgereinigten Fragmente wurde die *NcoI*-Schnittstelle am 5'-Ende der Gesamt-CrMA-cDNA eingefügt. Die so modifizierte CrmA-cDNA wurde mittels *NcoI* aus dem Vektor geschnitten, gereinigt und über diese Schnittstelle am 3'-Ende der GFP-cDNA in pBlue eingefügt. Anschließend wurde das gesamte Fusionskonstrukt über die Schnittstellen *EcoRI* und *NotI* in den ursprünglichen Expressionsvektor eingebracht. Die Orientierung und Sequenzidentität der CrmA-cDNA wurde durch Sequenzierung des Konstrukts erfolgreich überprüft.

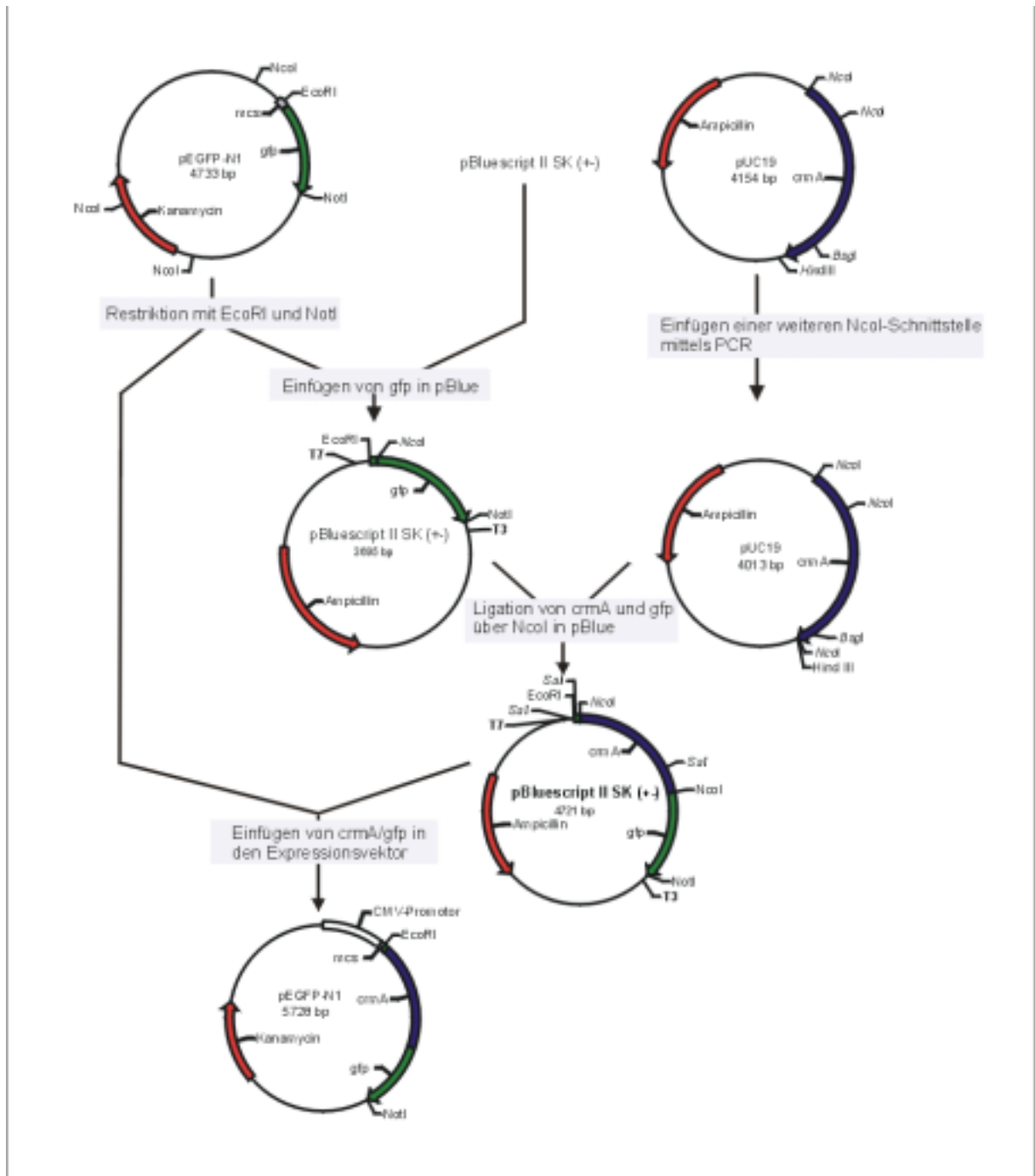


Abb.4. 30: Konstruktionsschema für einen crmA-GFP-Fusionsexpressionsvektor

4.5.2.3 Einfluß der Expression des CrmA-GFP-Fusionsproduktes auf den Zelltod, mikroskopisch

AKR 2B-Mausfibroblasten wurden durch Elektroporation mit dem Fusionsexpressionsvektor transfiziert und das Fusionsprodukt transient exprimiert. Während der Kultivierung unter einem Fluoreszenzmikroskop (s. 3.1.9) wurde der Zelltod durch Serumentzug unter Stimulation mit 10µM Anisomycin induziert. Zur gleichzeitigen Betrachtung der Kernkondensation während des Zelltods wurde dem Medium der Farbstoff Hoechst 33342

zugesetzt. Drei Bereiche des Zellrasens wurden alle 30 Minuten im Durchlicht, und die Fluoreszenzen des GFP und des Farbstoffs mit den Filtern A und N.21 von Leica digital fotografiert. In Abbildung 4.31 sind repräsentative Ausschnitte der Reihe gezeigt.

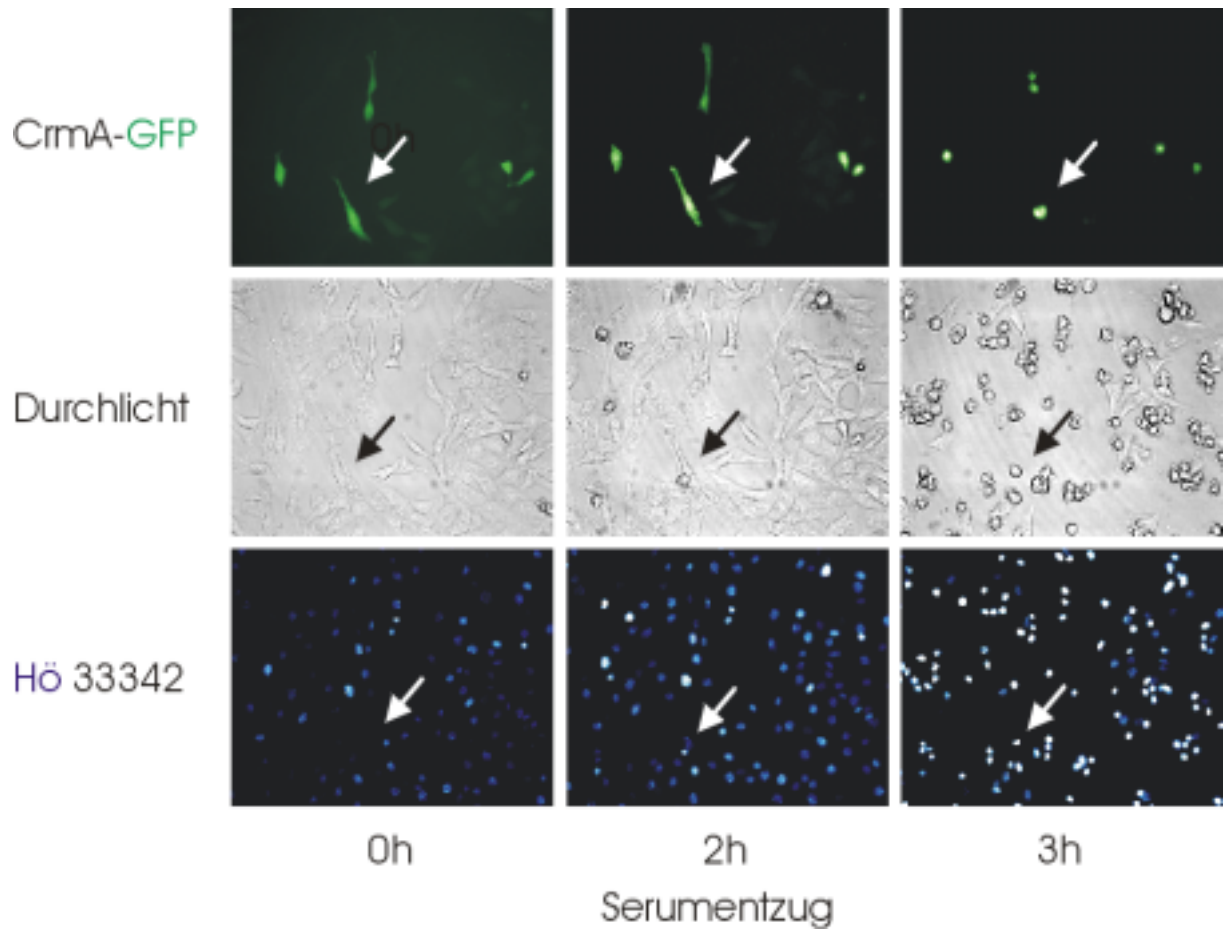


Abb.4. 31: Einfluß des CrmA-GFP-Fusionsprodukts auf den Zelltod, mikroskopisch

Nach drei Stunden sind die apoptotischen Zellen abgerundet und setzen sich vom Zellrasen ab. Das Chromatin ist kondensiert, so daß sich die Blaufluoreszenz des Hö33342 nach weiß verändert. All das ist auch bei den transfizierten grünen Zellen zu beobachten. Das Fusionsprotein vermittelt keinen sichtbaren Schutz vor dem Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten.

4.5.2.4 Einfluß der Expression des CrmA-GFP-Fusionsproduktes auf den Zelltod, cytometrisch

Eine quantitative Analyse des Einflusses des Fusionsproduktes auf das Zellsterben der AKR 2B-Mausfibroblasten bietet das Vermessen transfizierter Zellen im FACS.

Dazu wurden AKR 2B-Mausfibroblasten mit dem Fusionsvektor transfiziert und das Zellsterben 18h danach durch Serumentzug und gleichzeitige Stimulation mit 10µM Anisomycin induziert. Als Kontrolle wurde dies auch für pEGFP N1-transfizierte Zellen durchgeführt. Nach in Abbildung 4.33 angegebener Dauer wurden die Zellen geerntet und mit 7-Amino-ActinomycinD (7aad) zur Markierung toter sowie mit AnnexinV-PE, für apoptotische Zellen versetzt. In der durchflußcytometrischen Analyse wurden die Parameter Granularität und Größe der Zellen sowie die Fluoreszenzen von 7aad, AnnexinV-PE und GFP betrachtet.

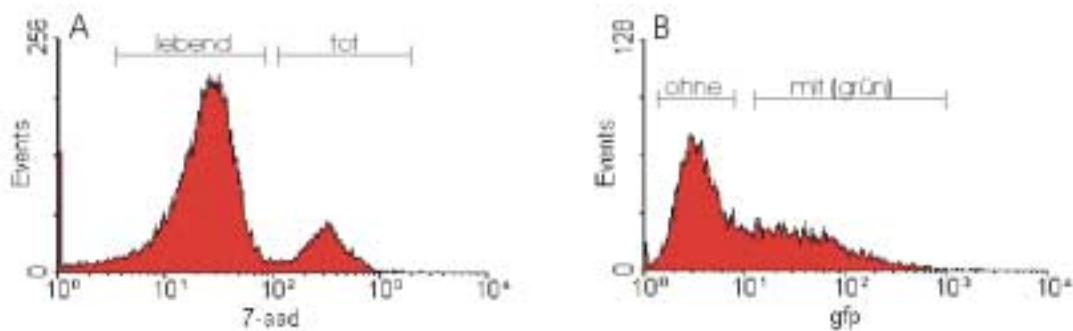


Abb.4. 32a: Durchflußcytometrie apoptotischer transfizierter AKR 2B-Mausfibroblasten. Exemplarische Auswertung der Messergebnisse nach 3h Serumentzug A) Selektion auf 7-aad Fluoreszenz B) anschließende Selektion auf GFP-Fluoreszenz (CrmA-GFP: Transfektion des Fusionsvektors, GFP: Transfektion des pEGFPN1, annexin: Fluoreszenz des AnnexinV-PE, 7-aad: Fluoreszenz des 7-aad)

Im ersten Schritt der Auswertung wurde anhand der Fluoreszenzen von 7aad und AnnexinV-PE zwischen lebenden, apoptotischen und toten Zellen diskriminiert (s. exemplarisch Abb. 4.32a). Dabei fiel auf, daß kaum ein Unterschied zwischen apoptotischen und toten Zellen festzustellen ist. Im nächsten Schritt wurde unter den lebenden Zellen die Population an erfolgreich transfizierten, d.h. die grün-fluoreszierenden Zellen, im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen betrachtet. Die zeitliche Veränderung des Quotienten, der sich aus dem Verhältnis von nicht-exprimierenden (ohne) zu exprimierenden Zellen (mit) ergibt, stellt ein quantitatives Maß für den Effekt der Expression auf das Zellsterben dar. Verbessert sich das Verhältnis zu Gunsten der exprimierenden Zellen fällt der Quotienten, d.h. die Fibroblasten werden durch die Expression vor dem Zelltod geschützt.

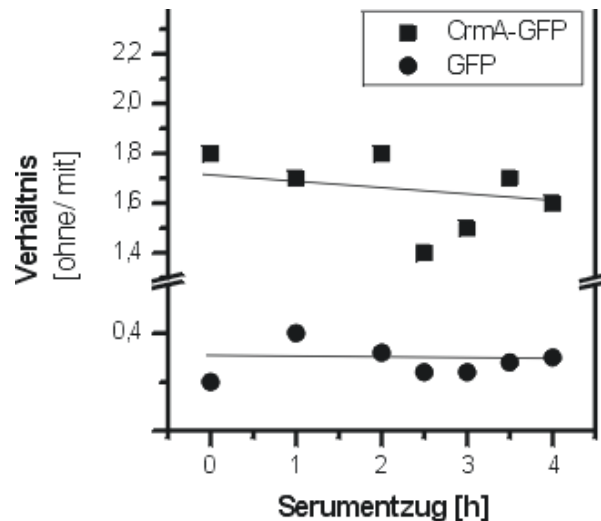


Abb.4. 33: Auswertung der durchflußcytometrischen Analyse unter Berücksichtigung des Verhältnisses von exprimierenden zu nicht-exprimierenden lebenden Zellen. (CrmA-GFP: exprimieren das Fusionsprotein, GFP: exprimieren GFP). Das Verhältnis stellt den Quotienten aus nicht-exprimierenden (ohne) zu exprimierenden (mit) der lebenden Population dar.

Bei der Auswertung fiel desweiteren auf, daß apoptotische bzw. tote Zellen nur noch in geringem Maß eine grün-Fluoreszenz aufweisen. Dies ist auf das Entweichen des cytosolischen GFPs aus den sterbenden Zellen, deren Cytoplasmamembran durch den apoptotischen Prozeß und weiter durch FACS-Analyse durchlässig wurde, zurückzuführen. Aus diesem Grund wurden nur lebende Zellen betrachtet. Die unterschiedliche Transfektionseffizienz von CrmA-GFP ($\approx 30\%$) und GFP ($\approx 65\%$) äußerte sich in der sehr unterschiedlichen Lage des Quotienten. Eine Veränderung dieser Quotienten konnte für GFP nicht und für CrmA-GFP nur in sehr geringem Maß ermittelt werden. Ein schützender Effekt, der durch CrmA vermittelt wird, konnte deshalb nicht festgestellt werden.

4.5.3 Schutz vorm Zelltod durch Stimulation unterschiedlicher Signalwege

Durch die Stimulation unterschiedlicher Signalwege in AKR 2B-Mausfibroblasten können diese vor der Apoptose durch Serumentzug bewahrt werden [110,113]. Die stimulierten Signalwege bedienen sich unterschiedlicher Mechanismen des Schutzes, was sich in ihrem unterschiedlichen Bedürfnis zur Proteinbiosynthese äußert [110]. Eine direkte Vernetzung der Signalwege, stimuliert durch PDGF-BB und cAMP, besteht in AKR 2B-Mausfibroblasten nicht. Trotzdem führen sie zum gleichen Erfolg, dem Überleben der Zellen.

Um die Lage eines möglichen Integrationspunktes der Signalwege einzugrenzen, sollte der Einfluß von Stimulantien auf die DEVDase-Aktivität hin untersucht werden. Eingesetzt wurden PDGF-BB, TPA (ein PKC-Aktivator), Forskolin (stimuliert die Adenylatzyklase), 8Br-cAMP (ein Strukturanalogon des cAMP), ATP, Adenosin, Okadainsäure (OA, ein Inhibitor von Ser/Thr-spezifischen Phosphatasen), und der Inhibitor der Tubulinpolymerisation, Colchicin. AKR 2B-Mausfibroblasten wurden mit den Substanzen unter Serumentzug für 3h behandelt. Nach Präparation des cytosolischen Extraktes wurde darin die DEVDase- und VEIDase-Aktivität durch einen chromophoren Aktivitätstest bestimmt. In Abbildung 4.34 sind die Aktivitäten in Prozent der Kontrolle, d.h. Serumentzug ohne Stimulation (MCDB), aufgetragen. Zum Vergleich wird die Aktivität in unbehandelten Fibroblasten (McCoy) mitbestimmt.

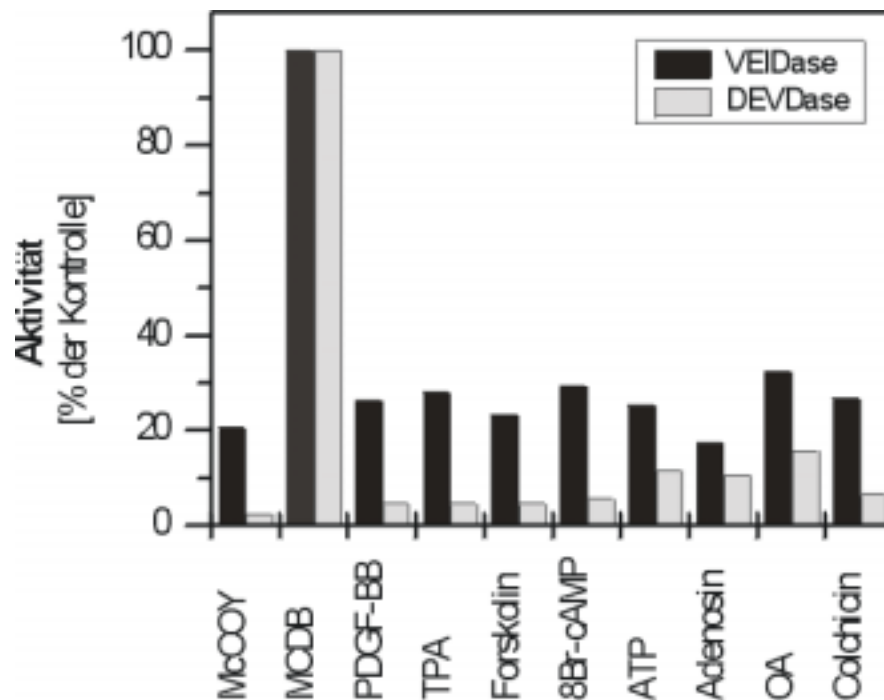


Abb.4. 34: Aktivität der DEVDase und VEIDase nach Zugabe protektiver Substanzen

Alle Substanzen, die vor dem Zelltod schützen, führen zur drastischen Reduktion der Caspaseaktivitäten. Diese liegen nicht mehr als 15% über ihrem jeweiligen Basalwert (McCoy). Die konstitutive Aktivität der VEIDase (McCoy) ließ sich durch die Stimulantien nicht weiter reduzieren. Ein möglicher Konvergenzpunkt der protektiven Signalwege oder der Wirkung der Substanzen ist demnach über oder bei der Caspaseaktivierung zu suchen.

4.5.4 Beteiligung von Cytochrom c am Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten

Bei unterschiedlichsten Zelllinien wurden zwei Hauptsignalwege zur Apoptose gefunden: den Rezeptor- und den mitochondrial-vermittelten Weg. Der Efflux von Cytochrom c aus dem Intermembranbereich der Mitochondrien konnte bei einer Vielzahl von apoptotischen Zellen beobachtet werden, denen Wachstumsfaktoren entzogen oder die mit Chemotherapeutika behandelt wurden [99,144].

Die Beteiligung der Mitochondrien am Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten nach Serumentzug sollte durch den Nachweis von Cytochrom c im Cytosol untersucht werden. Den Fibroblasten wurde für die in Abbildung 4.35 angezeigte Dauer Serum entzogen. Danach wurden die Zellen aufgeschlossen, die Kerne bei 100x g sedimentiert und aus dem Überstand durch Zentrifugation bei 100000x g ein cytosolischer Extrakt (CE) und eine leichte partikuläre Fraktion (LP) gewonnen. Aus diesen wurden gleiche Proteinmengen durch einen Western Blot auf ihren Gehalt an Cytochrom c hin untersucht.

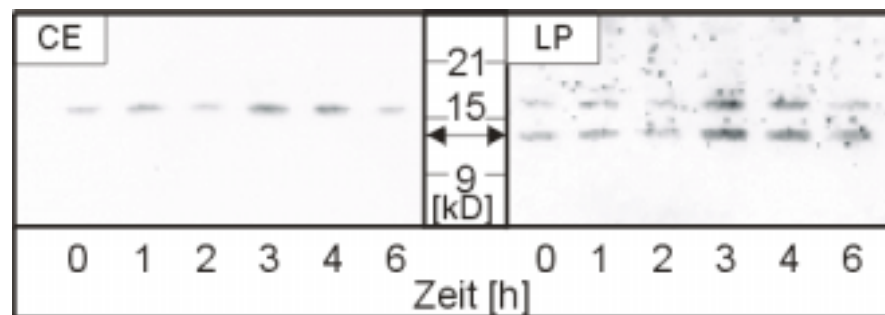


Abb.4. 35: Western Blot für Cytochrom c von Cytosol und mitochondrialer Fraktion
CE: Cytosolischer Extrakt, LP: Leichte partikuläre Fraktion, Mitochondrien,
Pfeil: Lage des Cytochrom c

In der mitochondrienhaltigen partikulären Fraktion ist über den beobachteten Zeitraum Cytochrom c mit einem Molekulargewicht von 14kD nachweisbar. Im Western Blot des cytosolischen Extraktes fehlt diese entsprechende 14kD Bande. Ein Efflux des Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytosol ist in AKR 2B-Mausfibroblasten nach Serumentzug nicht nachweisbar.

