

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Der programmierte Zelltod	1
1.2 Caspasen	3
Familie der Caspasen	4
Struktur der Caspasen	5
Katalytische Aktivität der Caspasen	8
„ <i>In vivo</i> “-Substrate der Caspasen	12
„ <i>In vivo</i> “- Inhibitoren der Caspasen, CrmA, p35 und die IAPs	14
Initiale Aktivierung der Caspasen-Kaskade	15
Caspasen als Ziel therapeutischer Ansätze	16
1.3 Die Bcl-Familie	17
1.4 Die Kaskade des apoptotischen Signals	19
1.5 Das Zelltodmodell der AKR 2B-Mausfibroblasten	21
1.6 Die Zielsetzung	23
2 Material und Lösungen	24
2.1 Enzyme und Kits	24
2.1.1 Restriktionsendonukleasen	24
2.1.2 DNA- und RNA-modifizierende Enzyme und Kits	24
2.1.3 Weitere Enzyme	24
2.1.4 TOPO-Klonierungs Kits	25
2.1.5 Nuclease Protektions-Assay „Riboquant“	25
2.2 Plasmide	25
2.2.1 Plasmid-Konstrukte	26
2.3 Oligonukleotide	27
2.4 Antikörper	28
2.5 Inhibitoren und Substrate für Caspasen	29
2.6 Größenmarker	29
2.6.1 Größenmarker für Proteine	29
2.6.2 Größenmarker für DNA	30
2.7 Sequenzinformationen	30
2.8 Chemikalien	30
2.9 Geräte	33
2.10 Sonstiges Verbrauchsmaterial und Membranen	34
2.11 Radioaktiv markierte Nukleotide	34
3 Methoden	35
3.1 Methoden der Vertebraten-Zellkultur	35
3.1.1 Sterilisation von Geräten und Lösungen	35
3.1.2 Medien und Puffer der Zellkultur	35
3.1.3 Kultivierung von AKR-2B Mausfibroblasten	36
3.1.4 Kultivierung von Jurkat	36
3.1.5 Zellzahlbestimmung mit Casy1	36
3.1.6 Kryokonservierung	36
3.1.7 Serumentzug und Behandlung der Zellen mit Stimulantien	37
3.1.8 Elektroporation von AKR 2B-Mausfibroblasten	37

3.1.9	Fluoreszenzmikroskopie.....	38
3.1.1.1	Kultivierung von adhärenen Zellen unter dem Mikroskop	38
3.1.1.2	Färbung der Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie	38
3.1.10	Cytometrische Untersuchung von Zellen.....	39
3.1.10.1	Vorbereitung und Färben der Zellen.....	39
3.1.10.2	Messung.....	39
3.1.10.3	Auswertung.....	39
3.2	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	40
3.2.1	Der <i>E. coli</i> -Stamm JM109	40
3.2.2	Kultivierung der Bakterien	40
3.2.3	Anlegen von Bakteriendauerkulturen.....	41
3.2.4	Herstellung elektrokompenter <i>E.coli</i> -Zellen	41
3.2.5	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen durch Elektroporation	42
3.3	Proteinchemische Methoden	43
3.3.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	43
3.3.2	Proteinbestimmung nach Redingbaugh.....	43
3.3.3	Herstellen von Zellysaten aus Vertebratenzellkulturen nach Lämmli	44
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli.....	44
3.3.4.1	Minigele.....	44
3.3.4.2	Midigel für die 2D-Gelelektrophorese.....	45
3.3.5	2D-Gelelektrophorese	46
3.3.6	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger	47
3.3.7	Coomassiefärbung.....	48
3.3.8	Silberfärbung nach Blum.....	48
3.3.9	Western- und Affinitäts-Blot	49
3.3.10	Erstellen von cytosolischen Extrakten aus Vertebratenzellen	51
3.3.11	Aktivitätstests für Caspasen.....	52
3.3.11.1	Chromophorer Aktivitätstest.....	52
3.3.11.2	Fluorophorer Aktivitätstest	53
3.3.12	Chromatographische Verfahren	53
3.3.12.1	Anionenaustauschchromatographie.....	54
3.3.12.2	Chromatographie mit Hydroxylapatit.....	54
3.3.13	Bromcyanspaltung	55
3.3.14	TCA-Fällung von Proteinen.....	55
3.4	Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	56
3.4.1	Standardmethoden zur Reinigung von DNA	56
3.4.2	Plasmidschnellpräparation aus <i>E. coli</i> durch alkalische Lyse.....	57
3.4.3	Plasmidmidipräparation aus <i>E. coli</i> mit LiCl.....	57
3.4.4	Präparation von Gesamt-RNA aus Vertebratenzellen durch saure Phenolextraktion.....	58
3.4.5	Präparation von PolyA ⁺ -RNA aus Gesamt-RNA.....	59
3.4.6	Reinigung von DNA über „ <i>Spin Columns</i> “	59
3.5	Analyse von Nukleinsäuren	60
3.5.1	Auftrennen von DNA und RNA in Agarosegelen.....	60
3.5.2	Auftrennen von RNA in Formaldehydgelen.....	61
3.5.3	Auftrennen von DNA in Polyacrylamidgelen.....	62
3.5.4	DNA-Sequenzierung	63
3.5.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	63
3.5.6	Northern Blot.....	64
3.5.6.1	Transfer der RNA.....	64
3.5.6.2	Hybridisieren der RNA mit der Sonde.....	65
3.5.7	Riboquant-DNA-Protektionsassay.....	66
3.6	Amplifikation von DNA	66
3.6.1	Primer.....	66
3.6.2	Reverse Transkription	67
3.6.3	PCR (Standard-Protokoll)	67
3.6.4	RT-PCR.....	68
3.6.5	Klonierung von PCR-Produkten mittels des TOPO-Cloning Kits	68

3.7 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	69
3.7.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	69
3.7.2 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	69
3.7.3 5'-Dephosphorylierung von DNA.....	70
3.7.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	70
3.7.5 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch Random Priming.....	71
4 Ergebnisse	73
4.1 Beteiligung von Caspasen im Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten	73
4.1.1 Hemmung des Zelltods durch Caspaseinhibitoren.....	73
4.2. Enzymatische Aktivität von Caspasen in AKR 2B-Mausfibroblasten	74
4.2.1 Zeitlicher Verlauf der Caspaseaktivierung	74
4.2.2 Bestimmung von K_M -Werten für die eingesetzten Substrate.....	76
4.2.3 Bestimmung von IC_{50} - und K_I -Werten in der Kombination von Substraten und Inhibitoren.....	78
4.2.4 Konkurrenz der Substrate.....	81
4.2.5 Spaltung von Laminen während des Zelltods	82
4.3 Identifikation der Caspasen in AKR 2B-Mausfibroblasten	84
4.3.1 RT-PCR zum Nachweis von Caspasen-RNA	84
4.3.1.1 RT-PCR mit humanspezifischen Primern.....	84
4.3.1.2 RT-PCR mit mausspezifischen Primern	85
4.3.2 Northern Blot für Caspasen	86
4.3.3 Nuclease Protektionsassay (Riboquant)	87
4.3.3.1 Erstellen von Sonden zum Nuclease Protektionsassay	88
4.3.3.2 Detektion der Caspasen im Nuclease Protektionsassay	90
4.3.4 Untersuchung der Expression und Prozessierung von Caspasen	91
4.3.4.1 Überprüfen der Antikörper gegen die Caspasen-1, -2 und -3.....	92
4.3.4.2 Expression der Caspase-1 in Abhängigkeit des Serumentzugs	92
4.3.4.3 Expression der Caspase-2 in Abhängigkeit des Serumentzugs	93
4.3.4.4 Expression der Caspase-3 in Abhängigkeit des Serumentzugs	94
4.3.4.5 Expression der Caspase-6 in Abhängigkeit des Serumentzugs	95
4.4 Reinigung der Caspase-Aktivität	96
4.4.1 Affinitätsmarkierung der Caspase-Aktivität.....	96
4.4.1.1 Bestimmung der K_I -Werte biotinylierter Inhibitoren.....	96
4.4.1.2 Konzentrationsabhängige Markierung der Caspasen im Affinitäts Blot.....	97
4.4.1.3 Markierung der Caspasen in Abhängigkeit von der Dauer des Serumentzugs.....	98
4.4.1.4 2D-Gelelektrophorese von markierten cytosolischen Extrakten	99
4.4.2 Anionenaustausch-Chromatographie.....	100
4.4.2.1 Verteilung der Caspasen-Aktivität nach der Anionenaustausch-Chromatographie.....	101
4.4.2.2 Verteilung der Caspasen nach der Anionenaustausch-Chromatographie	102
4.4.2.3 2D-Gelelektrophorese von Fraktionen mit Caspase-Aktivität.....	104
4.4.3 Chromatographie mit Hydroxylapatit.....	106
4.5 Beteiligung von Signalwegen im Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten	108
4.5.1 Induktion des Zelltods durch Anisomycin.....	108
4.5.2 Einfluß des viralen Caspase-Inhibitors CrmA auf den Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten	110
4.5.2.1 Einfluß der Expression von CrmA während des Serumentzugs.....	110
4.5.2.2 Konstruktion eines crmA-GFP Fusionsexpressionsvektors	111
4.5.2.3 Einfluß der Expression des CrmA-GFP-Fusionsproduktes auf den Zelltod, mikroskopisch	112
4.5.2.4 Einfluß der Expression des CrmA-GFP-Fusionsproduktes auf den Zelltod, cytometrisch	114
4.5.3 Schutz vorm Zelltod durch Stimulation unterschiedlicher Signalwege	116
4.5.4 Beteiligung von Cytochrom c am Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten.....	117

5 Diskussion	118
5.1 AKR 2B-Mausfibroblasten als Zelltodmodell	118
5.2 Caspasen im Zelltodmodell der AKR 2B-Mausfibroblasten	118
5.2.1 Nachweis der Caspasen	118
5.2.2 Enzymatische Aktivität der Caspasen	120
5.3 Reinigung der Caspasenaktivität	126
5.4 Signalwege	132
5.5 Zusammenfassende Diskussion	134
6 Zusammenfassung	137
6 Summary	139
7 Literaturverzeichnis	140
8 Anhang	149
Abkürzungsverzeichnis	149
K _i -Wert-Bestimmung	150
Publikationen	151
Curriculum Vitae	152
Erklärung	153

Abbildungsverzeichnis

Abb.1. 1: Ursprung der Caspase-Nomenklatur.....	3
Abb.1. 2: Ordnung der Caspasen nach phylogenetischen Gesichtspunkten und ihrer Substratspezifität	4
Abb.1. 3: Schematische Organisation des Zymogens und der aktivierten Caspase. Durch proteolytische.....	6
Abb.1. 4: Schematische Darstellung muriner Caspasen.....	7
Abb.1. 5: Röntgenkristallstruktur der Caspase-3.....	8
Abb.1. 6: Der Katalyse-Mechanismus der Cys-Protease.....	9
Abb.1. 7: Koordination eines kompetitiven Inhibitors im aktiven Zentrum der Caspasen.....	11
Abb.1. 8: Die Bcl-2 Familie.....	17
Abb.1. 9: Signalwege der Apoptose.....	20
Abb.4. 1: Caspaseinhibitoren „in vivo“	73
Abb.4. 2: Zeitlicher Verlauf der Caspasenaktivität.....	75
Abb.4. 3: Bestimmung des K_M -Werts mit unterschiedlichen Caspasesubstraten.....	77
Abb.4. 4: K_I -Wert-Bestimmung für die DEVDase und 3 Inhibitoren.....	78
Abb.4. 5: Kompetitive Inhibition der Substrate.....	81
Abb.4. 6: Western Blot für Lamine in Abhängigkeit des Serumentzugs.....	82
Abb.4. 7: RT-PCR mit humanspezifischen Primern	85
Abb.4. 8: RT-PCR mit mausspezifischen Primern.....	85
Abb.4. 9: Northern Blot für Caspasen.....	87
Abb.4. 10: Schematische Darstellung der Sondenherstellung für den Nuclease-Protektionsassay.....	88
Abb.4. 11: Restriktion des Klonierungsproduktes mit EcoRI.....	89
Abb.4. 12: Nuclease Protektionsassay für murine Caspasen.....	90
Abb.4. 13: Test der Caspase-Antikörper durch BrCN-gespaltene Caspase.....	92
Abb.4. 14: Western Blot für die Casp-1 von apoptotischen AKR 2B-Mausfibroblasten.....	93
Abb.4. 15: Western Blot für Casp-2 _L	93
Abb.4. 16: Western Blot für Casp-3 von apoptotischen AKR 2B-Mausfibroblasten	94
Abb.4. 17: Western Blot für Casp-6 von apoptotischen AKR 2B-Mausfibroblasten	95
Abb.4. 18: K_I -Bestimmung für die Kombination aus bio-YVKD.aomk und drei Substraten	96
Abb.4. 19: Konzentrationsabhängige Markierung von Caspasen durch bio-DEVD.aomk.....	97
Abb.4. 20: Zeitabhängige Markierung von Caspasen durch bio-DEVD.aomk	98
Abb.4. 21: 2D-Gelelektrophorese markierter cytosolischer Extrakte.	100
Abb.4. 22: Protein- und Aktivitäts-Elutionsprofil einer Anionenaustausch-Chromatographie	101
Abb.4. 23: Detektion von Caspasen in den Fraktionen einer Anionenaustausch-Chrom. durch Western.....	103
Abb.4. 24: Affinitäts Blot und Western Blot für Casp-3 von Fraktionen einer Anionenaustausch-Chrom.....	104
Abb.4. 25: 2D-Gelelektrophorese markierter Fraktionen einer Anionenaustausch-Chromatographie	105
Abb.4. 26: Proteinelutions- und Aktivitäts-Elutionsprofil der Hydroxylapatit-Chromatographie	106
Abb.4. 27: SDS-Page von Fraktionen einer Hydroxylapatit-Chromatographie mit Coomassie-Färbung.....	107
Abb.4. 28: Affinitäts Blot von Anisomycin-stimulierten AKR 2B-Mausfibroblasten	109
Abb.4. 29: Einfluß des CrmA auf das Zellsterben in AKR 2B-Mausfibroblasten.....	110
Abb.4. 30: Konstruktionsschema für einen crmA-GFP-Fusionsexpressionsvektor.....	112
Abb.4. 31: Einfluß des CrmA-GFP-Fusionsprodukts auf den Zelltod, mikroskopisch	113
Abb.4. 32: Durchflußcytometrie apoptotischer AKR 2B-Mausfibroblasten, die CrmA-GFP transient exprimieren.....	114
Abb.4. 33: Auswertung der durchflußcytometrischen Analyse.....	114
Abb.4. 34: Aktivität der DEVDase und VEIDase nach Zugabe protektiver Substanzen.....	116
Abb.4. 35: Western Blot für Cytomchrom c von Cytosol und mitochondrialer Fraktion.....	117
Abb.Anhang: Schematische Darstellung zur graphischen Bestimmung von K_I -Werten nach Dixon.....	149

Tabellenverzeichnis

Tab.1. 1: K_M -Werte von rekombinanten Caspasen und fluorogenen Substraten aus Peptidbibliotheken.....	10
Tab.1. 2: K_I -Werte für die Kombination unterschiedlicher Peptidinhibitoren und rekombinanter Caspasen.....	11
Tab.1. 3: „In vivo“-Substrate der Caspasen.	12
Tab.1. 4: K_I -Werte für rekombinante Caspasen und den viralen Inhibitor CrmA.....	14
Tab.2. 1: Während der Arbeit verwendete Restriktionsenzyme.....	24
Tab.2. 2: Enzyme und Kits, zur Modifizierung von Nucleinsäuren	24
Tab.2. 3: Weitere eingesetzte Enzyme.	24
Tab.2. 4: Verwendete Oligonukleotide.....	28

<i>Tab.2. 6: Inhibitoren und Substrate für Caspasen</i>	<i>29</i>
<i>Tab.2. 7: Accessions-Nummern für Sequenzinformationen aus NCBI-Datenbanken.....</i>	<i>30</i>
<i>Tab.3. 1: Endkonzentration der eingesetzten Stimulantien.....</i>	<i>37</i>
<i>Tab.3. 2: Filterbeschreibung des Fluoreszenzmikroskops.....</i>	<i>38</i>
<i>Tab.3. 3: Pipettierschema SDS-PAGE</i>	<i>45</i>
<i>Tab.3. 4: Pipettierschema Schügger-Gel.....</i>	<i>47</i>
<i>Tab.4. 1: Vergleich der spezifischen Spaltaktivitäten bei unterschiedlichen Caspasesubstraten.....</i>	<i>75</i>
<i>Tab.4. 2: Gemittelte K_M-Werte mit unterschiedlichen Caspasesubstraten</i>	<i>77</i>
<i>Tab.4. 3: IC_{50}-Werte der Substrat-Inhibitor-Kombinationen.....</i>	<i>79</i>
<i>Tab.4. 4: K_i-Werte der Substrat-Inhibitor Kombinationen</i>	<i>80</i>
<i>Tab.5. 1: Vergleich von K_M-Werten von rekombinanten Caspasen und aus AKR 2B-Mausfibroblasten.....</i>	<i>123</i>
<i>Tab.5. 2: Vergleich der K_i-Werte aus AKR 2B-Mausfibroblasten und rekombinanten Caspasen.....</i>	<i>124</i>