Untersuchung von Proteinen des Cytoskeletts während der Apoptose

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität Bochum

> angefertigt im Lehrstuhl für Anatomie und Embryologie der medizinischen Fakultät

vorgelegt von Kristin Hengstenberg aus Denver/Colorado/USA

Bochum, Oktober 1999

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1995 bis Dezember 1998 am Lehrstuhl für Anatomie und Embryologie der medizinischen Fakultät unter der Leitung von Prof. Dr. H.G. Mannherz angefertigt.

Eingereicht am:27. Oktober 1999Tag der mündlichen Prüfung:21. Dezember 1999Referent:Herr Prof. Dr. M. HauserKoreferent:Frau Prof. Dr. P. Wahle

Danksagung:

Ich danke allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere

Herrn Prof. Dr. HG Mannherz für die Bereitstellung des Themas,

den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe,

Frau Dr. Edda Ballweber für die Einarbeitung in das Thema Aktin und die Aktinpräparationen,

Frau Eva-Maria Konieczny und Frau Swantje Wulf für die Unterstützung in der Zellkultur,

Frau Dr. Silvia Zanotti und Herrn Dipl. Biol. Markus Napirei für die gute Zusammenarbeit im Labor,

Herrn Prof. Dr. P. Krammer und Herrn Dr. M. Peters für die gute Kooperation im FLICE-Projekt und für die Überlassung des α -Fas-Antikörpers,

Herrn Prof. Dr. K-P. Hoffmann, Herrn Prof. Dr. M. Hauser und Frau Prof Dr. P. Wahle für die Ermöglichung zur Beendigung dieser Dissertation,

Herrn Prof. Dr. A. Wegner für die Einführung in den Themenbereich Gelsolin,

Eun Hwa,

meinen Vater für seine Diskussionsbereitschaft,

meinen Bruder Andreas für die Durchsicht dieses Manuskripts,

meiner Mutter Hanna und Schwester Carola,

und Andreas.

MEINEM GROSSVATER

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Was ist Apoptose ?	1
1.1.1. Apoptose versus Nekrose	1
1.1.2. Die Bedeutung der Apoptose im Organismus	2
1.1.3. Die Rolle der Apoptose bei verschiedenen Krankheiten	3
1.1.4. Signalwege der Apoptose	3
1.1.5. Biochemische Abläufe während der Apoptose	6
1.2. Die Caspase-Familie	7
1.2.1. Charakterisierung und Aktivierung der Caspasen	
während der Apoptose	7
1.2.2 Substratspezifität der Caspasen	9
1.3. Aktin	10
1.3.1. Aktin-Isoformen	10
1.3.2. Struktur und Charakterisierung des Aktins	11
1.3.3. Mechanismen der Polymerisation	13
1.3.4. Aktin und Apoptose	15
1.4. Aktinbindende Proteine	15
1.4.1. DNase I	15
1.4.2. Gelsolin	17
1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	18
2. Material und Methoden	20
2.1. Chemikalien und Laborgeräte	20
2.2. Zellkultur	22
2.2.1. Verwendete Zellinien	22
2.2.2. Allgemeine Methoden der Zellkultur	22
2.2.3. Induktion der Apoptose in den einzelnen Zellsystemen	23
2.2.4. Inkubation der Zellen mit Proteaseinhibitoren	23

2.3. Präparationsmethoden		24
2.3.1. Präparation von Zellextrakten		24
2.3.2. Präparation der α -Aktin-Isoform aus der		
Skelettmuskulatur des Kaninchens		25
2.3.2.1. Markierung des Skelettmuskel-Aktins		
mit Biotin		26
2.3.2.2. Markierung des Skelettmuskel-Aktins		
mit 1,5-IAEDANS am Cys 374		27
2.3.2.3. Fluoreszenzmarkierung von Skelettmuskel-		
Aktin am Glu 41 mit Dansylcadaverin		28
2.3.2.4. Herstellung von Gelsolin/Aktin-Komplexen		29
2.3.2.4. Herstellung von DNase I/Aktin-Komplex		30
2.4. Grundlegende proteinanalytische Methoden		31
2.4.1. Proteinbestimmung nach Bradford		31
2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese		31
2.4.3. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese		33
2.4.3.1. Native Gelektrophorese nach Safer		34
2.4.4. Färbung von Proteingelen mit Coomassie		34
2.5. Immunologische Methoden		35
2.5.1. Westernblot-Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose		35
2.5.2. Markieren und Anfärben von Proteinen mit Hilfe		
spezifischer Antikörper		36
2.6. Spezielle Untersuchungsmethoden für einzelne Proteine		38
2.6.1. Fragmentierungsassay		38
2.6.2. Sedimentationsexperimente		39
2.6.3. Nachweis von Nukleaseaktivität		39
2.6.3.1. SDS-Zymogrammtechnik		39
2.6.3.2. BN-Zymogrammtechnik		
(native Zymogrammtechnik)		40
2.6.3.3. Messung von Nukleaseaktivität nach Kunitz		43
2.6.3.4. Nachweis einer DNA-Leiter		44
2.6.3.5. Plasmidverdau-Assay		45
2.6.4. Nachweis von Caspase-3-Aktivität mittels DEVD-AMC		46
2.7. Zellmorphologische Untersuchungsmethoden		47
2.7.1. Fixierung von Zellmaterial		47
2.7.2. Nachweis von F-Aktin mittels TRITC		
markiertem Phalloidin		48
2.7.3. Hoechst 33258-Fluorchromierung		48
2.7.4. Nachweis von G-Aktin mit FITC markierter DNase I		49
2.7.5. Herstellung von Mowiol	50	

3. Ergebnisse	51
3.1. Aufreinigung von a -Aktin aus der Skelettmuskulatur	
des Kaninchens und dessen Markierung	51
3.1.1. Isolierung von α -Aktin aus Kaninchenmuskulatur	51
3.1.2. Markierung von α -Aktin mit NHS-LC-Biotin	51
3.1.3. Markierung von α -Aktin mit IAEDANS und	
Dansylcadaverin	52
3.2. Herstellung von cytosolischen Extrakten aus unterschiedlich	
behandelten Zellen	52
3.3. Induktion der Apoptose	53
3.4. Nachweis der Aktinfragmentierung in apoptotischen Zellen	55
3.4.1. Charakterisierung der apoptotischen Aktinfragmente	56
3.4.2. Visualisierung aller Fragmente mit biotinyliertem α -Aktin	57
3.4.3. Bestimmung der einzelnen Aktinfragmente und deren	
Lage mit selektiv markierten Aktinen und sequenz-	
spezifischen Antikörpern	57
3.4.4. Untersuchung welche Form des Aktins während	50
apoptotischer Prozesse geschnitten wird	59
5.4.5. Verlust von F-Akun in der Zeile wahrend apop-	60
346 Finordnung der Aktinfragmentierung in den zeit-	00
lichen Ablauf der Apontose	62
3.4.7. Sedimentationsexperimente zur Überprüfung der	02
Funktionalität der Aktinfragmente	63
3.5. Charakterisierung und Identifizierung der aktinfrag-	
mentierenden Protease	66
3.5.1. Identifizierung der aktinfragmentierenden Protease mit	
Hilfe unterschiedlicher Proteaseinhibitoren	66
3.5.2. Fluoreszenzphotometrische Messung der Caspase-3	
Aktivität mit DEVD-AMC	71
3.6. Überprüfung ob Calpain bei der Aktinfragmentierung	
während apoptotischer Prozesse eine Rolle spielt	73
3.7. Schneidet FLICE Aktin ?	75
3.8. Spielen Proteasen aus der Caspase-Familie eine Rolle bei	
der F-Aktindepolymerisierung ?	77
3.9. Untersuchung ob Gelsolin, ein aktinsequestrierendes Enzym, eine Rolle beim F-Aktinabbau in Lymphblastemzellinien spielt	79

3.10. Korrelation zwischen Caspase-3-Aktivität, Aktinfragment- ierung und F-Aktinverlust		81
3.11. Untersuchung von Aktin, vorliegend in Komplexen mit		
aktinbindenden Proteinen während apoptotischer Prozesse		82
3.11.1. Aktin/DNase I-Komplex		82
3.11.1.1. Herstellung und Überprüfung von Aktin/		
DNase I-Komplex		82
3.11.1.2. Überprüfung der Endonuklease-Aktivität		
in SKW-Zellen		83
3.11.1.3. Untersuchungen, ob Aktin/DNase I-		
Komplexe durch Zellextrakte apoptotischer		
SKW-Zellen beeinflußt werden		85
3.11.2. Untersuchung von Aktin, welches komplexiert mit		
Gelsolin vorliegt, während apoptotischer Prozesse		87
3.11.2.1. Herstellung von Aktin/Gelsolin-Komplexen	87	
3.11.2.2. Untersuchungen, ob einzelne Komponenten		
des G/A-Komplexes während apoptotischer		
Prozesse modifiziert werden	88	

4. Diskussion

5 Zugammanfaggung	08

6. Literaturverzeichnis

90

100

Abkürzungen

А	Apoptose
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AK	Antikörper
AMC	7-amino-4-methyl-coumarin
Ara C	Arabinosylcytosin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphoshat
bA	biotinyliertes Aktin
bcl-2	B-Zell Lymphom Gen 2
BN	Blue Native
BSA	Rinderseum Albumin
Cal	Calpain
Caspase	Cystein aktivierte Aspase
ced	Caenorhabditis elegans deathrelated
CHX	Cycloheximid
Cys	Cystein
DAB	3,3 ⁻ Diaminobenzidin
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DTE	Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
F	Anti-Fas
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FADD	Fas Associated Death Domain
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLICE	FADD Like Caspase
g	Erdbeschleunigung
G	Gelsolin
G/2A	Gelsolin/2 Aktin-Komplex
G/A	Gelsolin/Aktin-Komplex
G-Aktin	Globuläres Aktin
Glu	Glutamat
Gln	Glutamin
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
ICE	Interleukin Converting Enzyme

IP	Isoelektrischer Punkt
К	Kontrolle
kD	Kilodalton
LM	Low Range Marker
Μ	Marker in SDS-PA-Gelen
М	molare Lösung
mk	monoklonal
p.a.	pro analysi
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phoshat gepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pk	polyklonal
РО	Merrettichperoxidase
PP	Probenpuffer
PS	Phosphadidylserin
PSN	Penicillin, Streptomycin, Neomycin
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Staurosporin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRED	Single Radial Enzyme Diffusion
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N`,N´-Tetramethylendiamin
TLCK	L-1-Chloro-3-(4-tosylamido)-7-amino-2-heptanon
ТРСК	L-1-Chloro-3-(4-tosylamido)-4-phenyl-2-butanon
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TRITC	Trimethylrhodamin-Isothiocyanat
Tween 20	Polyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit
unbeh.	unbehandelt
UV	Ultraviolett
ZE	Zellextrakt

1. Einleitung

Die Erforschung der Apoptose hat in den letzten 10 Jahren starken Aufwind erhalten. Neben der Rolle bei der Balance zwischen Zellneubildung und kontrolliertem Absterben von alten, funktionslosen oder fehlerhaften Zellen ist der programmierte Zelltod immer mehr in das Zentrum der medizinischen Forschung gerückt. Bei vielen Krankheiten spielt das gestörte Verhältnis zwischen Proliferation und Apoptose eine wichtige Rolle. Durch die Aufklärung der Mechanismen des physiologischen Zelltodes erhoffen sich die Wissenschaftler, ein Werkzeug in die Hand zu bekommen, welches bei der Steuerung und Heilung von der Erkrankungen wie Aids oder Krebs hilfreich sein könnte.

1.1. Was ist Apoptose?

Das Phänomen des programmierten Zelltodes wurde erstmals von Lockstein and Williams (1964) beschrieben. Das Wort Apoptose wurde im Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod, von Kerr et al 1972 und Wyllie 1980 erwähnt. Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen und steht für das Fallen des Laubes im Herbst. Die Apoptose ist ein genetisch determiniertes Programm, welches Zellen nach bestimmten endogenen oder exogenen Reizen dazu bringt sich selbst zu eliminieren.

Morphologische Kennzeichen dieses Prozesses sind Schrumpfung der Zelle, die randständige Kondensation des Chromatins an der Kernmembran und die Abschnürung membranumschlossener Vesikel, sogenannter apoptotischer Körperchen, die neben den intakten Zellorganellen auch Kernfragmente enthalten können. Die apoptotischen Körperchen werden dann von Nachbarzellen und Makrophagen phagozytiert. Da während dieses ganzen Prozesses kein Cytoplasma freigesetzt wird, bleibt eine Immunantwort in Form einer Entzündungsreaktion aus. Dies unterscheidet die Apoptose von der Nekrose, der zweiten Form des Zelltodes

1.1.1. Apoptose versus Nekrose

Die Nekrose wird meist durch pathogene Stimuli (z.B. Verletzungen) ausgelöst. Im Gegensatz zur Apoptose, wo meist nur einzelne Zellen betroffen sind, sind bei der Nekrose meist eine Vielzahl von Zellen betroffen. Die Zellen verlieren im Gegensatz zum physiologischen Zelltod erst sehr spät

den Kontakt zu den Nachbarzellen. Während die apoptotische Zelle schrumpft, eine DNA-Kondensation stattfindet und die Organellen erhalten bleiben, schwillt die nekrotische Zelle an, die Organellen werden geschädigt, das Chromatin wird abgebaut und der Zellkern löst sich auf. Im Endstadium der Nekrose wird die Zelle lysiert und das Cytoplasma freigesetzt, welches Freßzellen des Immunsystems herbeilockt und so eine entzündliche Reaktion auslöst. Die hier beschriebenen Vorgänge, die während der Apoptose und Nekrose ablaufen, sind in Abb. 1.1. gegenüber gestellt.



Abb. 1.1 : Gegenüberstellung der Charakteristika von Nekrose und Apoptose (entnommen aus: Wyllie et al 1998, Apoptosis and Cell Proliferation)

1.1.2. Die Bedeutung der Apoptose im Organismus

Die Wichtigkeit der Apoptose für den Organismus liegt auf der Hand. Jedes Gewebe besteht aus einer bestimmten Anzahl von Zellen, die annähernd konstant gehalten werden muß. Dementsprechend müssen ebenso viele Zellen, wie sie durch die Proliferation entstehen, auf der anderen Seite wieder eliminiert werden. Dieses Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und kontrolliertem Absterben wird Homöostase genannt. Somit hat die Apoptose den gleichen Stellenwert im Organismus wie die Proliferation. Wichtige Beispiele der Gewebshomöostase, wo Apoptose eine Rolle spielt, ist die T-Zell-Reifung im Immunsystem (Krammer et al 1994) und in hochproliferativen Epithelien, wie im Dünndarm, Hoden , Prostata (Kyprianou et al 1988), Ovarien, Haut und Haare. In vielen Fällen stehen Proliferation und Apoptose unter einer hormonellen Regulation. So ist die Bildung von Epithelzellen während der Lactation der Mamma abhängig von Östrogenen. Bei Entzug dieser Hormone nach Beendigung der Lactation bildet sich die Brust binnen weniger Tage, durch Apoptose der Epithelzellen, zurück (Stephan et al 1996).

Die Apoptose tritt immer dort auf, wo Zellen kontinuierlich absterben wie zum Beispiel während der Embryogenese bei der Differenzierung der Gliedmaßen (die Auflösung der Interdigitalhäute zwischen den einzelnen Finger beruht zum Beispiel auf apoptotischen Prozessen (Van den Eijnde et al, personal communication).

1.1.3. Die Rolle der Apoptose bei verschiedenen Krankheiten

In den letzten 10 Jahren ist die Apoptose immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung getreten, insbesondere bei der Untersuchung von bestimmten Krankheitsbildern, die in der Sterbestatistik eine wesentliche Rolle einnehmen.

So sind viele Tumorerkrankungen (Tsujimoto et al 1985) auf eine Reduktion der Apoptoserate zurückzuführen. Hierzu gehören z. B. Carcinomas mit p53-Defekten und hormonabhängige Tumore in Brust und Prostata.

Ebenso auf eine Verminderung der Apoptose zurückzuführen sind Autoimmunerkrankungen, bei denen die Eliminierung von autoreaktiven Thymozyten nicht mehr gewährleistet ist. Ein weiteres Beispiel für gesundheitliche Störungen, bei denen die Verminderung des programmierten Zelltodes eine Rolle spielt, sind Viruserkrankungen wie zum Beispiel Herpesinfektionen.

Krankheiten bei denen erhöhte Apoptoseraten eine Rolle spielen sind AIDS (Ameison et al 1991, selektive Eliminierung der T4-Helferzellen) und Morbus Alzheimer (Yang et al 1998).

Diese Beispiele zeigen, daß die Erforschung der Apoptose nicht nur von theoretischem sondern auch von klinischem Interesse ist.

1.1.4. Signalwege der Apoptose

Der programmierte Zelltod kann durch eine Vielzahl von endogenen und exogenen Faktoren ausgelöst werden.

Ein endogener Signalweg, der sehr gut untersucht ist, ist die Aktivierung des Genes p53 durch DNA-Strangbrüche (Lowe et al 1993).

Ein Beispiel für einen exogen ausgelösten Signalweg ist die Aktivierung der Apoptosekaskade über den CD95-Rezeptor und der Ausbildung des DISC (Death inducing signalling complex) wie er von Muzio et al 1996 beschrieben wird. Die Aktivierung des CD95-Rezeptors (auch Fas-Rezeptor oder APO-1-Rezeptor genannt) erfolgt durch den Fas-Liganden, der in gebundener als auch in freier Form im Organismus vorliegen kann und eine Trimerisierung des genannten Rezeptors bewirkt. An der cytosolischen Seite der Zellmembran bildet sich dann ein Komplex (DISC), bestehend aus denen ins Cytosol ragenden Anteilen der CD95-Rezeptoren, dem Intermediärprotein FADD (Fas Associated Death Domain) und des Proenzyms der Caspase-8 (Cysteine activated Aspases. Genauere Beschreibung dieser Proteasen siehe Abschnitt 1.2.), welche im N-terminalen Bereich Bindungsstellen für die Todesdomäne des FADD besitzt, während im C-terminalen Teil des Proenzyms der Caspaseanteil verschlüsselt ist. Diese Besonderheit schlägt sich auch im Trivialnamen dieser Caspase nieder: FLICE (FADD-like-ICE-Protease). Die Zusammenlagerung der einzelnen Komponenten zum DISC löst eine Autoprozessierung der Caspase-8-Vorstufe aus, die dann aktive Caspase-8 ins Cytosol freisetzt (Enari et al 1995, Muzio et al 1996). Die durch den Fas-Liganden ausgelöste Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei vielen Abläufen im Immunsystem (Krammer et al 1994). Der weitere Kaskadenverlauf und auch andere wichtige Signalwege wie die hormonelle Auslösung der Apoptose über den Glukocorticoid-Rezeptor (Kiefer et al 1995, Rauch et 1997) oder die Granzym B Aktivierung (Irmler et al 1995) sind in der Abbildung 1.2. graphisch dargestellt:



Abb. 1.2: Schematische Darstellung der wichtigsten Signalwege und biochemischen Abläufe der Apoptose (entnommen aus Whyllie et al, Apoptotic pathways, Boehringer Mannheim).

Wie unter anderem aus dem Schema ersichtlich, kann die Apoptose in drei verschiedene, zeitlich nacheinander ablaufende, Phasen eingeteilt werden:

1. die Initialisierungsphase. Dazu gehören Ereignisse wie die Rezeptoraktivierung und die Bildung des DISC. Die Aktivierung der sogenannten "Upstream"-Caspasen (z.B. Caspase-8), die für die Weiterleitung des Signals innerhalb der Zelle verantwortlich sind, werden auch dieser Phase zugeordnet. In diesem Stadium der Apoptose ist auch der sogenannte "point of no return" angesiedelt.

 2. die Exekutionsphase. Sie ist gekennzeichnet durch die Aktivierung der "Downstream"-Caspasen (z.B. Caspase-3), DNA-Fragmentierung, Bildung von apoptotischen Körperchen und Spaltung von Proteinen durch Caspasen.

3. Tod der Zelle durch Apoptose. In diesem letzten Abschnitt der Apoptose erfolgt die Phagozytierung der Zellfragmente durch Nachbarzellen und Makrophagen (Mills et al 1998).

Der programmierte Zelltod lässt sich auch über eine Vielzahl von Substanzen exogen auslösen, von denen viele als Chemotherapeutika in der Tumorbehandlung eingesetzt werden, wie zum Beispiel Staurosporin, Etoposid, Strahlung, anti-CD95-Antikörper, Ara C und Cycloheximid.

Neben den Apoptoseinduktoren sind inzwischen diverse Substanzen und Proteine beschrieben mit denen man den programmierten Zelltod unterbinden kann. Die Apoptoseinhibitoren greifen an unterschiedlichen Stellen in den Mechanismus der Zelleliminierung ein. CrmA, ein Gen aus dem Kuhpockenvirus (Tewari and Dixit 1995), und die Tetrapeptid-Inhibitoren YVAD-cho und DEVD-cho hemmen selektiv Caspasen.

Die Proteine der Bcl-2-Familie sind an verschiedenen Stellen innerhalb der Zelle lokalisiert wie Zellmembran, Mitochondrienmembran und endoplasmatisches Retikulum. Sie haben unterschiedliche Angriffspunkte wie zum Beispiel die Unterdrückung von p-53-abhängigen Apoptosemechanismen und der Cytochrom C-Freisetzung aus den Mito-chondrien (Oltvai et al 1994, Wright et al 1998). Weitere Angriffspunkte Bcl-2-Familie und weitere anti-Apoptose-Gene sind in Abb.1.2. dargestellt

1.1.5. Biochemische Abläufe während der Apoptose

Neben den morphologischen Veränderungen ist die Apoptose durch eine Vielzahl biochemischer Ereignisse charakterisiert, die in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung waren. Die wichtigsten biochemischen Ereignisse sind nachfolgend kurz dargestellt:

DNA-Fragmentierung

Während des programmierten Zelltodes wird die genomische DNA in hochmolekulare Bruchstücke zerlegt wie auch in Stücke fragmentiert, die eine Länge von ca. 180 bp haben oder ein Vielfaches davon. Trennt man DNA aus apoptotischen Zellen in einem Agarosegel auf so erhält man ein Leitermuster, welches auch apoptotische Leiter genannt wird (siehe Abb. 1.3.). Die Länge der einzelnen Fragmente lässt auf eine internukleosomale Spaltung der DNA schließen. Die Endonuklease, die für die Leiterbildung verantwortlich ist, zeigt nur Aktivität in Anwesenheit von Mg²⁺ und Ca²⁺. Aufgrund dieser Gegebenheiten vermuten Mannherz et al 1995 und Peitsch et al 1993, daß die apoptotische Endonuklease identisch mit der DNase I ist.

Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran

In den frühen Stadien der Apoptose finden Veränderungen auf der Oberfläche der Zellmembran statt. So findet eine Translokation von Phosphatidylserin (PS), eines Phospholipids, von der Innenseite auf die Außenseite der Plasmamembran statt. Es wird vermutet, daß für die Aufhebung der PS-Asymmetrie der Membran der Zusammenbruch der Flipaseaktivität ist. Dieses Enzym hält unter anderem durch den aktiven Transport von PS von der Außenseite auf die Innenseite der Zellmembran die Asymmetrie der Zellmembran aufrecht. Arbeiten von Fadok et al 1992 zeigen, daß diese Umverteilung von Phospholipiden eine Rolle bei der Erkennung apoptotischer Zellen durch Makrophagen spielt. Studien von Martin et al 1996 zeigen, daß die Aktivierung bestimmter Proteasen eine wichtige Rolle bei der PS-Exposition der Zelle während der Apoptose zukommt.



Abb. 1.3: Ablauf der DNA-Fragmentierung während der Apoptose und die Darstellung der DNA-Leiter im Agarose-Gel.

1.2. Die Caspase-Familie

In den letzten 5 Jahren hat sich die Apoptoseforschung von der endonukleolytischen Spaltung der DNA immer mehr auf eine bestimmte Protease-Familie verlagert. Die Aktivierung einer speziellen Protease-Kaskade scheint eine Schlüsselrolle bei den biochemischen Abläufen während des programmierten Zelltodes inne zu haben. Die Aktvierung dieser Kaskade kann auch als "point of no return" des apoptotischen Signalweges bezeichnet werden.

1.2.1. Charakterisierung und Aktivierung der Caspasen während der Apoptose

Mit den Caspasen ist eine neue Familie der Cysteinproteasen entdeckt worden, die nur während apoptotischer Prozesse aktiviert wird. Erste Anzeichen, daß Proteasen eine Schlüsselrolle während der Apoptose spielen könnten, kamen von Shi et al 1992. Der endgültige Durchbruch kam mit der Identifizierung des ced-3-Genes aus dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*, welches während des Zelltodes in der Entwicklung benötigt wird. Miura et al (1993) zeigten, daß

eine große Homologie, struktureller und funktioneller Art, zu ICE (interleukin-1 β -converting enzyme) besteht, welches ein Mitglied der Caspase-Familie ist.

Alle Mitglieder dieser neuen Familie haben die folgenden Charakteristika:

-Sie besitzen einen Cysteinrest im aktiven Zentrum (QACRG) welches komplett auf der p20-Untereinheit liegt. Die Stabilisierung des Substrats im aktiven Zentrum wird von Aminosäureresten die auf beiden Untereinheiten lokalisiert sind, bewerkstelligt.

-Sie schneiden C-terminal nach Aspartatresten.

-Sie liegen der Zelle als inaktives Proenzym vor, bestehend aus einer N-terminalen Prodomäne und zwei Untereinheiten, die durch ein Linkerpeptid getrennt sein können. Sie werden durch Spaltung, je nach Caspase, hinter spezifischen Aspartatresten aktiviert. Das aktive Enzym ist ein Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten p10 und p20. In der Zelle liegen sie meist als Tetramere bestehend aus 2 Heterodimeren vor.

Diese Charakteristika erhöhen die Möglichkeit der Autoprozessierung und Transaktivierung durch andere Caspasen (Nicholson et al 1995) und somit die Ausbildung einer Enzymkaskade.

Die Untersuchung der Verwandtschaft der einzelnen Mitglieder der Caspase-Familie ergab einen Stammbaum der sich in zwei Subfamilien unterteilen lässt (Thornberry 1996).



Abb.1.4: Graphische Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft zwischen den einzelnen Caspase-Familie-Mitgliedern. Die Proteasen sind in 2 Subfamilien unterteilt, basierend auf ihren Sequenzhomologien zu ICE (Caspase-1) und dem Ced-3 Gen. In Klammern sind die existierenden Synonyme der einzelnen Proteasen aufgeführt.

Besonders gut untersucht sind ICE aus der ICE-Subfamilie und CPP32/Apopain aus der Ced-3-Subfamilie. Von beiden Proteinen existieren 3D-Strukturen mit einer Auflösung von 2.5 Ångström (ICE: Walker et al 1994; CPP32/Apopain: Rotonda et al 1996). Diese weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf. Nur die Umgebung des aktiven Zentrums, besonders im Bereich der Substrat bindenden Tasche zeigt starke Unterschiede. Wie Abb. 1.5. verdeutlicht, demonstrieren die bis jetzt gelösten dreidimensionalen Strukturen von Mitgliedern der Caspase-Familie, daß es sich um α/β -Proteine bestehend aus einer Domäne handelt. Der Enzymkern besteht aus 6 β -Faltblättern (5 parallel,1 anti-parallel) umgeben von 6 α -Helices die ungefähr parallel zu den β -Faltblättern verlaufen.



Abb. 1.5: Räumliche Struktur der Caspase-3/CPP32/Yama/Apopain. Die β -Faltblätter sind gelb dargestellt, die α -Helices rot und Schleifen sind blau markiert. Gezeigt ist ein Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten p10 und p20. (dieses Bild wurde erstellt mit dem Programm Rasmol, basierend auf dem Atomkoordinatensatz 1PAU der Brookhaven Protein Data Bank).

1.2.2. Substratspezifität der Caspasen

Inzwischen sind einige natürliche Substrate der Caspasen identifiziert worden wie zum Beispiel:

- -PARP (Poly(ADP-ribose) Polymerase (Kaufmann et al 1993, Lazebnik et al 1994): Ein
- Protein, was vermutlich eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden spielt.
- -Das U1-70 kD Protein, eine Komponente des splicing-Systems (Casciola-Rosen et al 1994)

-Lamin A und B (Weaver et al 1996)

Desweiteren werden zahlreiche cytoskeletale Proteine gespalten, von denen vermutetet wird, daß sie eine wesentliche Rolle bei der dramatischen Veränderung der Zellgestalt spielen wie z.B. β -Aktin, Gas-2, Gelsolin, β -Catenin, Fodrin, PAK-2 (Brancolini et al 1995, Cryns et al 1996, Kayalar et al 1996, Martin et al 1995, Mashima et al 1995, Rudel and Bokoch 1997). Einzelne

cytoskeletale Proteine, die eine relevante Rolle in dieser Arbeit spielen, werden im Verlauf dieser Einleitung noch genauer beschrieben (siehe Abschnitte 1.3. und 1.4 der Einleitung)

1.3. Aktin

Alle eukaryontischen Zellen enthalten Aktin. In Nichtmuskelzellen kann dieses Cytoskelettprotein über 5 % des Gesamtproteins ausmachen. In Muskelzellen hingegen kann der Anteil des Aktins am Gesamtprotein sogar über 20 % betragen. Entdeckt wurde das Protein im Jahre 1942 von Bruno Straub, einem ungarischem Biochemiker, und ist seitdem Gegenstand vieler Untersuchungen. Bedeutende Ergebnisse der Aktinforschung sind die Entwicklung der Gleitfilamenttheorie durch Huxley and Niederkerke 1954 und Hanson und Huxley 1954 die als Grundlage für den Ablauf der Muskelkontraktion gilt. Die Entdeckung, daß Aktin in nichtmuskulären Zellen ein Bestandteil des Cytoskeletts ist, welches die Form der Zelle, Vesikeltransport, Gestaltsänderung sowie auch die Wanderung von Zellen beeinflußt (Hatano und Oosawa 1966), hat die Aktinforschung nochmals intensiviert. Die Bestimmung der Aminosäuresequenz durch Elzinga et al 1973 belegt die fundamentale Bedeutung dieses Proteins. In den 80-iger Jahren gelang die Aufklärung und Charakterisierung grundlegender Prozesse, an denen das Aktin beteiligt ist, wie die Aktinpolymerisation zur Ausbildung dynamischer Filamente und die Interaktion von Aktinfilamenten und -monomeren mit anderen Proteinen. Inzwischen sind über 60 aktinbindende Proteine identifiziert worden (Pollard 1993).

Die Kristallisation des Aktins komplexiert mit DNase I ermöglichte die Aufklärung der molekularen Struktur des Aktins mit Hilfe der Röntgenkristallographie (Kabsch et al 1990). Dies schaffte die Vorraussetzungen für die Entwicklung eines atomaren Aktinfilament-Modells (Holmes et al 1990). Inzwischen konnten die Strukturen weiterer Aktinkomplexe aufgeklärt werden wie z. B. Aktin/Gelsolin-Segment 1(McLaughlin et al 1993) und Aktin/Profilin (Schutt et al 1993).

1.3.1. Aktin-Isoformen

Aktin kommt in allen eukaryotischen Geweben vor. Je nach Funktion des betreffenden Gewebes liegt Aktin in unterschiedlichen Isoformen vor.

Die bis jetzt bekannten Aktinformen besitzen identische Molekulargewichte und eine stark konservierte Aminosäuresequenz, welche sich nur durch Unterschiede hauptsächlich im N-terminalen Bereich, voneinander abheben. Die Aufteilung in α -, β - und γ -Isoformen beruht auf

den unterschiedlichen Anteil an sauren Aminosäuren im N-terminalen Bereich, welches sich in unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (IP) der einzelnen Isoformen (IP's von 5.4 bis 5.9, Zechel and Weber 1978) niederschlägt. Eine weitere Differenzierung der einzelnen Isoformen erfolgt gewebsspezifisch:

α -Aktine:	Es werden 3 Isoformen unterschieden: In Skelettmuskulatur, in
	Herzmuskulatur und in glatter Muskulatur.
β-Aktin:	Diese nicht muskuläre Isoform ist Hauptbestandteil des Cytoskeletts.
γ-Aktine:	Hier werden zwei Isoformen unterschieden: eine in der glatten Muskulatur
	vorkommende und eine nicht muskuläre Form.

Der Austausch von einzelnen Aminosäuren in den unterschiedlichen Isoformen außerhalb des Nterminalen Bereiches, sind meist in Regionen angesiedelt, die bei der Interaktion mit aktinbindenden Proteinen eine Rolle spielen (Kabsch and Vandekerckhove 1992). Alle Isoformen haben ein annähernd gleiches Polymerisationsverhalten. Nur in der Fähigkeit mit aktinbindenden Proteinen zu interagieren sind Unterschiede erkennbar (De la Cruz and Pollard 1996, Segura and Lindberg 1984). Die einzelnen Isoformen können in ein und derselben Zelle koexistieren. Eine Austauschbarkeit der einzelnen Isoformen untereinander ist nicht möglich (Chaponnier et al 1995).

1.3.2. Struktur und Charakterisierung des Aktins

Es wird zwischen der globulären (G-Aktin) und der filamentären Form (F-Aktin) des Aktins unterschieden. Filamentäres Aktin besteht aus einer Vielzahl globulärer Aktinmoleküle, die in polymerisierter Form vorliegen.

Das G-Aktin-Molekül besteht aus einer einzigen Aminosäurenkette mit einer Länge von 375 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 42 kD. Die native Form des Aktins hat eine Nukleotidbindestelle, an die unter physiologischen Bedingungen je nach Zustand ADP oder ATP gebunden ist. In der Nähe der Nukleotidbindestelle befindet sich eine starke Bindungsstelle für zweiwertige Ionen wie Mg²⁺. Es existieren weitere schwach ausgeprägte Bindungsstellen für einund zweiwertige Ionen.

Da G-Aktin unter gewöhnlichen Kristallisationsbedingungen polymerisiert, wurde es für Strukturanalysen mit DNase I komplexiert. Die gelöste Röntgenstrukturanalyse zeigt ein Molekül bestehend aus zwei Domänen, die durch einen tiefen Spalt voneinander getrennt sind. In diesem Spalt befindet sich die Nukleotidbindestelle und die Bindungsstelle für ein divalentes Kation. Die beiden Domänen untergliedern sich nochmals in jeweils 2 Subdomänen. Das N- und C-terminale Ende liegen sehr nah beieinander und sind in der Subdomäne 1 lokalisiert (siehe Abb. 1.6.).



Abb: 1.6: Atomare Struktur des Aktin-DNase I-Komplexes. In Blau dargestellt ist Aktin. Das gebundene Nukleotid ist in rot gezeigt. In Subdomäne 1 sind N- und C-Terminus rot markiert. Im Bereich der Subdomäne 2 interagiert die DNase I (grün) mit dem Aktin. In gelber Farbe ist die Zuckerkette der DNase I dargestellt (die Erstellung des Bildes erfolgte mit Rasmol und dem Koordinatensatz 1ATN der Brookhaven Protein Data Bank).

Wie schon erwähnt besitzt Aktin die Fähigkeit, unter physiologischen Bedingungen langkettige Polymere zu bilden. Aktinfilamente bestehen aus etwa 500-1000 monomeren Aktinmolekülen, die durch nichtkovalente Bindungen, wie Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Es kommt zur Ausbildung einer helikalen Struktur bestehend aus 2 Ketten, die ähnlich wie eine DNA-Helix miteinander verdreht sind. Das "DNA-Helix-Modell" beschreibt die intermolekularen Kontakte zwischen zweier sich umwindender Ketten. Bei diesen Typ werden die hydrophoben Schleifen, mit denen die Aktinmoleküle aus den unterschiedlichen Ketten **untereinander** in Kontakt treten besonders hervorgehoben.

Das "long pitch helical" Modell hingegen beschreibt die Kontakte der Aktinmoleküle untereinander die entlang **einer** Kette liegen (Holmes et al 1990). In der Abbildung 1.7. werden beide Modelltypen, die bei der Ausbildung eines Aktinfilaments eine Rolle spielen, veranschaulicht.



Abb. 1.7: Darstellung eines Aktinfilaments aus einzelnen Aktinmonomeren. Rechts im Bild gezeigt ist ein einzelnes Aktinmolekül, auf dem farblich die Bereiche markiert sind mit denen es mit den benachbarten Aktinmolekülen interagiert (entnommen aus: Izrailev et al 1999). Die hydrophobe Schleife ist in diesem Bild lila-türkis beim Aktinmonomer markiert. In der Darstellung des Filaments erkennt man die hydrophobe Schleife, wie sie in den Spalt zwischen 2 gegenüber liegenden Aktinmoleküle hineinragt. Grün und Braun gekennzeichnet sind die Areale des Aktinmonomers, die eine Rolle bei der Ausbildung einer Kette (long-pitch-helikales Modell) spielen.

Aufgrund der Asymmetrie des Aktinmonomers sind Aktinfilamente gerichtet. Am Minusende (ADP-Ende, langsam wachsendes Ende) liegen die Subdomänen 2 und 4 frei, während am Plusende (ATP-Ende, schnell wachsendes Ende) die Subdomänen 1 und 3 frei vorliegen. Die Enden des Aktinfilaments weisen unterschiedliche Polymerisationsraten auf.

1.3.4. Mechanismen der Polymerisation

Die Ausbildung von Aktinfilamenten setzt die Polymerisation von Aktinmonomeren voraus. Unter den in der Zelle vorliegenden Ionenbedingungen wird eine Polymerisation von freien G-Aktin begünstigt. Die Kinetik der Polymerisierung wird im Wesentlichen durch 2 Faktoren bestimmt:

1. die Asymmetrie der Aktinfilamente

2. die Hydrolyse von ATP die die Aktinpolymerisation begleitet.

Die Bildung eines Filamentes kann in drei Phasen unterteilt werden:

- 1. die Verzögerungsphase
- 2. die Wachstumsphase
- 3. die Gleichgewichtsphase

Die Verzögerungsphase entsteht durch eine kinetische Barriere zu Beginn der Polymerisation. Sie setzt sich im Prinzip aus 2 Reaktionen zusammen: Die Aktivierung von Aktinmonomeren und durch den relativ langsamen Aufbau einer Ausgangsstruktur für ein Aktinfilament, der Nukleation dreier aktivierter Aktinmoleküle (ATP-Aktin). Aufgrund ihrer ungünstigen Thermodynamik ist sie die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion der Polymerbildung (Tobacman and Korn 1883).

Das weitere Wachstum eines Filamentes geschieht durch die Anlagerung weiterer aktivierter Monomere an beide Filamentenden.

Die Gleichgewichtsphase ist erreicht, wenn das Wachstum des Polymers sich durch die Anlagerung und den Verlust einzelner Monomere genau die Waage hält.

Bei der Anlagerung von Aktinmonomeren wird das ATP zu ADP + Pi kurz nach dem Einbau in das Filament hydrolisiert und somit die Energie bereitgestellt, die für den Prozeß der Filamentbildung benötigt wird.

Die Hydrolyse der Nukleotide, die sich im Zusammenhang mit der Polymerisation abspielen haben zur Folge, daß sich die kritische Konzentration (Gleichgewichtskonstanten) an beiden Enden des Polymers ändert. Wenn beide Enden des Polymers frei liegen, setzt sich die Polymerisation so lange fort bis die Konzentration der Monomere einen Wert erreicht, der höher als die Gleichgewichtskonstante für das Plusende aber niedriger als für das Minusende ist. In diesem Gleichgewichtszustand werden am Plusende Monomere angefügt und am Minusende abgelöst. Somit bleibt die Länge des Polymers gleich; aber die einzelnen Monomere wandern von einem Ende zum Anderen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Tretmühlmechanismus (Wegner 1976). Die erwähnte Gleichgewichtskonstante wird als die kritische Konzentration der freien Aktinmonomere bezeichnet. Sie liegt zwischen 0.1 und 0.7 μ M und kann in Anwesenheit bestimmter aktinbindender Proteine und Ionenkonzentrationen stark variieren (Wegner und Isenberg 1983).

In Anwesenheit von Cappingproteinen richtet sich die kritische Konzentration nach dem frei vorliegenden Polymerende.

1.3.5. Aktin und Apoptose

Aufgrund der drastischen morphologischen Zellveränderungen wie sie in Abschnitt 1.1.1. und 1.1.2. beschrieben worden sind, liegt die Vermutung nahe, daß die Modifizierung eines der Hauptproteine des Cytoskeletts während der Apoptose eventuell eine maßgebliche Rolle spielt. Die Beteiligung und Modifikation des Aktins während des programmierten Zelltodes wird von Forschungsgruppen sehr kontrovers diskutiert (Mashima et al 1995, Naora and Naora 1995, Levee et al 1996, van England et al 1997, Maravei et al 1997, Song et al 1997). Die Meinungen reichen von der proteolytischen Spaltung des Aktins bis zu keiner Beeinflussung dieses Proteines im Rahmen der Apoptose. Andere Autoren gehen davon aus, daß nur Proteine gespalten werden, die eine Rolle bei der Verknüpfung des Cytoskeletts mit der Plasmamembran spielen, wie zum Beispiel β -Catenin und Gas2 (Brancolini et al, 1997 und 1995).

1.4. Aktinbindende Proteine

In jeder Zelle gibt es sehr viele unterschiedliche Strukturen, an denen Aktin beteiligt ist. Da die Grundstruktur des Aktinmoleküls immer "gleich" bleibt, ergeben sich die Unterschiede in Länge der Filamente, Stabilität, Zahl und Verteilung durch die Interaktion des Aktins mit verschiedenen aktinbindenden Proteinen. Inzwischen sind über 60 dieser Proteine identifiziert worden (Pollard 1993). Die aktinbindenden Proteine werden aufgrund ihrer "Funktion" in 7 verschiedene Klassen eingeteilt (Pollard and Cooper 1986). Einzelne Proteine können mehrere Funktionen haben und sind somit gleichzeitig unterschiedlichen Klassen zugeordnet sein:

1. Proteine, die an G-Aktin binden, wie DNase I, Vitamin D bindendes Protein, Profilin.

2. Proteine, die an ein Filamentende binden ("capping proteins") wie Gelsolin, Fragmin und Villin.

3. Proteine, die Aktinfilamente in Monomere "spalten" können und an Aktinmonomere binden, wie Gelsolin, Villin und Fragmin.

4. Proteine die an die Seiten von Aktinfilamenten binden aber keine Quervernetzung bewirken. Dazu gehören Tropomyosin, Cofilin und das Peptid Phalloidin.

5. Proteine die Aktinfilamente quervernetzen: Villin, α -Actinin, Fimbrin.

6. Proteine, die an das Ende von Aktinfilamenten binden und diese mit der Plasmamembran verbinden wie Talin und Spectrin.

7. Motorproteine, die an die Seite von Aktinfilamenten binden können und bei Zellbewegungen eine Rolle spielen: Myosine.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei dieser aktinbindenden Proteine und deren Rolle während der Apoptose genauer betrachtet.

1.4.1. DNase I

Die DNase I ist ein ca. 30 kD schweres Glykoprotein bestehend aus einer Kette mit 257 Aminosäureresten. Als sekretorisches Verdauungsenzym ist es hauptsächlich in Parotis und Pankreas nachzuweisen. Aber auch in anderen Geweben wie Leber, Niere, Dünndarm, keratinisierenden Epithelien, Geschlechtsorganen, Thymus, Gehirn und Herz ist die DNase I exprimiert. Dies lässt die Vermutung zu, daß diese Endonuklease noch eine andere Funktion neben der des Verdauungsenzymes inne haben könnte. Mannherz et al 1995 und Kayalar et al 1996 postulieren, daß die DNase I eventuell identisch mit der fragmentierenden Endonuklease während der Apoptose sein könnte.

Wie Abb. 1.6. ersichtlich, bildet die DNase I einen Komplex mit G-Aktin im stöchiometrischen Verhältnis 1:1. Die Gleichgewichtskonstante dieses Komplexes liegt bei ca. 1 nM (Mannherz et al 1980). Die Bindestelle der DNase I befindet sich auf der Subdomäne 2 des Aktins. Aufgrund seiner Eigenschaft monomeres G-Aktin zu binden greift die DNase I in das G-F-Aktingleichgewicht ein, indem es freies G-Aktin aus diesem Gleichgewichtsverhältnis entfernt. Aus diesem Grunde inhibiert die DNase I die Aktinpolymerisation (Mannherz et al 1975). Dieser Mechanismus könnte eventuell bei den Umbauten des Cytoskeletts während apoptotischer Prozesse eine Rolle spielen.

Die DNase I verliert ihre DNA-fragmentierende Aktivität, wenn sie mit Aktin komplexiert vorliegt (Lazarides and Lindberg 1974). Dies ist ein weiteres Indiz für die Hypothese, daß die DNase I eine Rolle im apoptotischen Zellgeschehen spielen könnte. Durch Spaltung von G-Aktin könnte die Aktivität der DNase I während des programmierten Zelltodes ansteigen (Kayalar et al 1996, Mashima et al 1995) und so für die charakteristische DNA-Leiterbildung sorgen. Weitere Anzeichen, die für die DNase I als apoptotische Endo-nuklease sprechen sind, daß das Protein während apoptotischer Prozesse nicht hochreguliert wird. Der posttranslationale Aktivierungsmechanismus kommt dieser Hypothese zu Gute. Die perinukleare Ansammlung dieses Enzyms während der Apoptose ist als weiteres Argument anzusehen (Untersuchungen aus dem Labor Mannherz).

Gegen die Involvierung der DNase I in apoptotischen Prozessen sprechen folgende Beobachtungen:

In Zellsystemen ohne DNase I kann Apoptose ablaufen. Das Zellsterben erfolgt mit unspezifischen DNA-Abbau. Nur mykoplasmeninfizierte Zellen zeigten die typische Leiter-bildung nach Apoptoseinduktion. Mykoplasmen exprimieren ihre eigene DNasen, die dann für die Ausbildung einer DNA-Leiter nach Apoptoseinduktion verantwortlich sind (Paddenberg et al 1996).

Diese kontroversen Meinungen über die Rolle der DNase I während des programmierten Zelltodes zeigen einen Klärungsbedarf und macht sie so zu einem interessanten Untersuchungsobjekt.

1.4.2. Gelsolin

Ein weiteres aktinbindendes Protein, welches eine Rolle in der Apoptose spielen könnte, ist das Gelsolin. Es gehört zu den am besten untersuchten aktinbindenden Proteinen. Es kann die Aktinpolymerisation auf verschiedenen Wegen beeinflussen. Seine Fähigkeit, Aktinfilamente in einem nichtproteolytischen Vorgang zu brechen, macht Gelsolin zu einem Hauptakteur, wenn es um Zellbewegung und Differenzierung geht. Neben der Fähigkeit Aktinfilamente zu brechen kann es an Filamentenden binden und somit die Polymerisation des Aktins beeinflussen. Desweiteren kann es den Prozeß der Aktinnukleation unterstützen (Wegner et al 1994). Dieses 87 kD schwere Protein kommt sowohl in cytoplasmatischer als auch in sekretorischer Form vor. Die hauptsächlich im Blutplasma vorkommende sekretorische Form sorgt dafür, das durch Zelltod freigesetztes F-Aktin abgebaut wird und es so nicht zu einer Erhöhung der Viskosität des Blutes kommt.

Das Gelsolin ist aus etwa 6 gleich großen Segmenten aufgebaut. Die Domänen 1 und 4 haben Bindungsstellen für monomeres G-Aktin. Das Segment 2 hingegen stellt die F-Aktin bindende Domäne dar. Die meisten Gelsolin/Aktin-Interaktionen werden durch die sekundären Botenstoffe Ca²⁺ und Phosphatidyl-Inositol-Phosphat (PIP) geregelt.

In Anwesenheit von physiologischen Ca²⁺-Konzentrationen in der Zelle liegt das Gelsolin komplexiert mit 2 G-Aktinen vor (G/2A-Komplex). Bei Entzug von Ca²⁺-Ionen dissoziiert ein Aktinmolekül, so daß es zur Ausbildung eines Gelsolin-Aktin-Komplexes im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 kommt (G/A-Komplex). Gelsolin, welches im Komplex mit nonomeren Aktin vorliegt, verliert seine Fähigkeit an Aktinfilamente zu binden und sie so zu zerbrechen. Trotz Verlust der Bindefähigkeit für F-Aktin beeinflussen G/A-Komplexe die Polymerisation da sie freies G-Aktin aus dem Aktingleichgewicht entfernen.

Kristallographische Untersuchungen an Komplexen bestehend aus Gelsolinfragmenten und Aktin ergaben ein sehr genaues Bild über die Wechselwirkung der beiden Proteine (Pollard et al 1994). So kann Segment 1 monomeres Aktin calciumunabhängig in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 binden. Diese Aktinbindestelle befindet sich am C-terminalen Ende des Proteines. Bei der Ausbildung von G/2A-Komplexen im nativen Protein bindet das zweite Aktinmolekül in der Nähe des N-terminalen Ende des Gelsolins. Bei Entzug von Ca²⁺ durch EGTA ist diese Bindungstelle verantwortlich für die Ausbildung des EGTA-stabilen G/A-Komplexes.

Die kleinste Einheit des Gelsolins, die Aktinfilamente zu schneiden vermag, besteht aus den Segmenten 1 & 2.

Wie schon bei der DNase I wird auch bei Gelsolin vermutet, daß es eine wesentliche Rolle bei apoptotischen Prozessen inne haben könnte. Die Beteiligung dieses Proteins an der Apoptose wird wie bei der DNase I sehr kontrovers diskutiert (Kothakota et al 1997, Othsu et al 1997).

1.5. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Der Schwerpunkt dieser Doktorarbeit soll auf der Untersuchung der Veränderungen von Aktin und aktinbindender Proteine während der Apoptose liegen.

Dabei sollen folgende Fragestellungen, aufgrund der Kontroversen in der Literatur, bearbeitet werden:

Wird Aktin während apoptotischer Prozesse prozessiert? Wenn ja, gibt es Unterschiede zwischen dem Aktin, welches in der Zelle vorhanden ist und exogen hinzugefügtem Aktin?

Für den Fall, daß eine Prozessierung des Aktins während des programmierten Zelltodes nachgewiesen werden kann, soll versucht werden, die entstandenen Aktinfragmente durch Bestimmung ihrer Größe und deren Lage zueinander zu charakterisieren.

Ein weiterer Teilaspekt, der in der Literatur divergent diskutiert wird, ist, welche Form des Aktins (die globuläre oder die filamentäre Form) modifiziert wird.

Neben der Charakterisierung der Aktinfragmente soll versucht werden, die für diesen Prozeß verantwortlichen Enzyme und Faktoren zu identifizieren.

Neben der Charakterisierung der Aktinbruchstücke und der verantwortlichen Enzyme sind Untersuchungen von aktinbindenden Proteinen, insbesondere Gelsolin und DNase I ein Bestandteil dieser Arbeit. Beiden Proteinen wird eine maßgebliche Beteiligung an apoptotischen Prozessen zugeschrieben. DNase I steht im Verdacht, identisch mit der apoptotischen Endonuklease zu sein (Mannherz et al 1995). Bei Gelsolin hingegen vermutet man eine Beteiligung an der Aktinfilamentzerstückelung während der Apoptose (Kothakota et al 1997). Neben der Analyse der Funktionalität und Beteiligung an Prozessen des physiologischen Zelltodes von Gelsolin und DNase I, soll überprüft werden, ob Aktin vorliegend im Komplex mit den genannten Proteinen, vor apoptotischen Prozessen geschützt wird.

Zur Klärung dieser Fragen sollen für die Durchführung der Experimente, hauptsächlich zellbiologische und biochemische Methoden verwendet werden:

Die Arbeiten sollen mit den Zellkulturlinien SKW 6.4 und Jurkat durchgeführt werden, die aus Lymphblastemen isoliert wurden. In diesen Testsystemen lässt sich die Apoptose über unterschiedliche Signalwege auslösen. Somit kann gewährleistet werden, daß es sich bei den resultierenden Ergebnissen um allgemeine Abläufe während der Apoptose handelt oder um Vorgänge, die abhängig sind vom jeweiligen Signalweg der Apoptoseauslösung.

Die Identifizierung der aktinprozessierenden Enzyme soll mit Hilfe verschiedener spezifisch wirkender Proteaseinhibitoren geklärt werden wie sie auch von anderen Forschungsgruppen für andere Substrate der Caspasen erfolgreich verwendet wurden (Casciola-Rosen et al 1994, Nicholson et al 1995).

Für die Bestimmung der Größe der Aktinfragmente sollen gelelektrophoretische und immunochemische Methoden verwendet werden. Zur Einordnung der Lage der einzelnen Aktinfragmente sollen "in vitro"-Experimente mit selektiv markierten Aktinen und sequenzspezifischen Antikörpern durchgeführt werden. Die markierten Aktine werden wahrscheinlich neben Sedimentationsexperimenten auch bei der Klärung der Frage helfen, welche Form des Aktins während des programmierten Zelltodes modifiziert wird.

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Apoptose-modifizierten Aktin und aktinbindenden Enzymen sollen neben elektrophoretischen und immunologischen Untersuchungsmethoden auch die Anwendung spezifischer Aktivitätstests und DNA-darstellender Verfahren verwendet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Laborgeräte

Substanzen zur Apoptoseinduktion

Staurosporin	Sigma, Deisenhofen
Cycloheximid	ICN
CD 95-Antikörper	AG Krammer, DKFZ Heidelberg
Ara C	Fluka, Buchs CH

Proteaseinhibitoren

Jodacetamid	Sigma, Deisenhofen
N-Ethylmaleimid	Sigma, Deisenhofen
Pefabloc	Boehringer, Mannheim
DEVD-cho	Calbiochem, Bad Soden
YVAD-cho	Bachem, CH
Calpain-Inhibitor II	Calbiochem, Bad Soden
ТРСК	Sigma, Deisenhofen
TLCK	Sigma, Deisenhofen

Antikörper

α -Gelsolin monoklonal	Sigma, Deisenhofen
α -Gelsolin polyklonal	AG Mannherz, Bochum
α -CPP 32 polyklonal	Santa Cruz, USA
α-CPP 32 polyklonal	Dako, Hamburg
α -Aktin C-terminus, monoklonal	Sigma, Deisenhofen
α - α -Aktin monoklonal	Sigma, Deisenhofen
α - α -Aktin polyklonal	AG Mannherz, Bochum
α - β -Aktin monoklonal	Sigma, Deisenhofen
Affe α -Hase biotinyliert	Amersham Buchler, Braunschweig
Schaf α -Maus biotinyliert	Amersham Buchler, Braunschweig
Streptavidin/Peroxidase Komplex	Amersham Buchler, Braunschweig

Zellkultur

RPMI	Gibco BRL, Eggenstein
DMEM	Gibco BRL, Eggenstein
Seren	Seromed Berlin
Ciprofloxacin	Miles Inc., USA
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Penicillin	Sigma, Deisenhofen
Protein A	Sigma Deisenhofen

Proteine

Gelsolin human, rekombinant	AG Mannherz, Bochum
Gelsolin Segment 1 human,	
rekombinant	AG Mannherz, Bochum
DNase I, Rinderpankreas	Worthington, USA
Transglutaminase,	
Meerschweinchen	Sigma, Deisenhofen

Weitere Substanzen

Dansylcadaverin	Sigma, Deisenhofen
I-AEDANS	Sigma, Deisenhofen
Sulfo-NHS-LC Biotin	Pierce, USA
DAB	Sigma, Deisenhofen
ATP	Pharma, Waldorf
mantATP	AG Goody, MPI Dortmund
Acrylamid 29:1, premix	Biotec Fisher
Acrylamid 2x	Serva, Heidelberg
Marker für die	Sigma, Deisenhofen und
Elektrophorese	BioRad

Weitere verwendete Chemikalien wurden bezogen von:

Merck, Darmstadt Serva, Heidelberg Roth, Karlsruhe Sigma, Deisenhofen Riedel-de Haen T.J. Baker

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.A.

Die benutzten Laborgeräte und deren Herkunft werden in der Beschreibung der einzelnen Methoden vermerkt.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Verwendete Zellinien

Für die Versuche wurden folgende etablierte Zelllinien verwendet:

-Die humane B-Lymphblastem Zellinie SKW 6.4 (eine freundliche Gabe von P. Krammer, DKFZ Heidelberg).

-Die humane T-Lymphblastem Zellinie Jurkat bezogen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig

-Die Brustkrebs Zellinie MCF-7 (eine freundliche Gabe von G. Leqclerq, Institute Jules Bordet in Brüssel, Belgien)

Die verwendeten Zellinien wurden regelmäßig auf ihre Mykoplasmenfreiheit mit Hilfe der Zymogrammtechnik überprüft (siehe 2.6.4.1.).

2.2.2. Allgemeine Methoden der Zellkultur

Alle Zellen wurden in einem Inkubator, Modell IR Autoflow der Firma Nuaire, bei 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Alle Grundmedien stammen von der Fa. Gibco und wurden über die AG Falkenberg Ruhr-Universität Bochum, fertig angesetzt und sterilfiltriert bezogen. Für alle Zellen wurden Zellkulturflaschen mit Filterkappe (Porengröße 0.2 µm) der Fa. Falcon verwendet. Die Zellinien Jurkat und SKW 6.4 wurden als Suspensionskulturen gehalten in RPMI 1640 Medium, 10 % hitzinaktiviertes fetales Kälberserum (Hybridomaserum von Seromed, Berlin), 2 mM L-Glutamin und PSN. Die Zellen wurden 2 x in der Woche mit frischem Medium versorgt und gesplittet (SKW 1:50, Jurkat 1:30).

Die Zellinie MCF-7 sind adhärent wachsende Zellen. Sie wurden in DMEM, 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum, 2 mM Glutamin und PSN gehalten.

Hierzu wurden sie 2 x in der Woche mit 0.025 % Trypsin, 1 mM EDTA in PBS trypsiniert, 1:20 verdünnt und erneut in Flaschen ausgesät. Bei dieser Verdünnung waren die MCF-7-Zellen innerhalb von ca. 3 Tagen konfluent.

Die MCF-7-Zellen wurden für zellmorphologische Experimente auch auf sterilen Deckgläschen mit 10 mm Durchmesser nach den hier beschriebenen Methoden angezogen.

2.2.3. Induktion von Apoptose in den einzelnen Zellsystemen

Die Induktion von Apoptose erfolgte in den einzelnen Zellsystemen unterschiedlich:

In SKW 6.4 Zellen wurde über den Oberflächenrezeptor CD 95 mit Hilfe des spez. monoklonalen Antikörpers Fas/APO-1 der programmierte Zelltod induziert.

Hierzu wurden die Zellen mit 200 ng APO-1/ml Suspensionskultur versetzt. Zur Unterstützung der Trimerisierung des Antikörpers wurden 20 ng Protein A/ml Zellsuspension hinzugefügt. Die Zellen wurden nach unterschiedlichen Induktionszeiten weiterverarbeitet.

Bei der Ziellinie Jurkat wurde der physiologische Zelltod mit Hilfe des Kinase-Inhibitors Staurosporin ausgelöst. Die Zellen wurden entweder für 5 h mit 1 μ M Staurosporin, oder für 24 h mit 0.1 μ M Staurosporin behandelt.

In MCF-7 Zellen wurden als Apoptoseinduktoren die Substanzen Cycloheximid (10 μ g/ml für 20 h) und Staurosporin (1 μ M für 24 h) verwendet.

2.2.4. Inkubation der Zellen mit Proteaseinhibitoren

Zur Überprüfung der Wirksamkeit einzelner Proteaseinhibitoren "in vivo" wurden die Zellen mit dem zu testenden Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen und variablen Zeiten vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Apoptoseinduktion und Aufarbeitung der Zellen wie in den Abschnitten 2.2.3. und 2.3.1 beschrieben.

Die getesteten Inhibitoren wurden in folgenden Konzentrationsbereichen und Zeiträumen eingesetzt:

Inhibitor	Konzentration	Zeit
Jodacetamid	50 µM - 5 mM	4 -24 h
N-Ethylmaleimid	1 mM - 10 mM	4 -24 h
Pefabloc/ H ₂ O	0.4 mM - 4 mM	4 -24 h
DEVD-cho/DMSO	1 nM - 20 µM	4-24 h
YVAD-cho/DMSO	1 nM - 20 µM	4-24 h
Cal-Inhibitor II/DMSO	2.5 μM - 50 μM	4-24 h
TPCK/H ₂ O	10 μM - 200 μM	4-24 h
TLCK/H ₂ O	10 µM -1 mM	4-24 h
Pepstatin A	1 μΜ - 5 μΜ	4-24 h
Kontrollen:		
DMSO	1 µl/ml Zellsuspension	4-24 h
Ethanol	1 µl/ml Zellsuspension	4-24 h
H ₂ O	1 µl/ml Zellsuspension	4-24 h

Die jeweilig verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiten sind im Ergebnisteil vermerkt.

2.3. Präparationsmethoden

2.3.1. Präparation von Zellextrakten

Die Präparation der Zellextrakte wird nach der Methode von Mashima et al 1995 durchgeführt. Hierfür werden folgende Lösungen benötigt:

Zellextraktionspuffer:	10 mM Tris-HCl pH 8.1 5 mM DTT
PBS:	8 g NaCl 0.2 g KCl 1.14 g Na ₂ HPO ₄ 0.24 g KH ₂ PO ₄ ad H ₂ O 1000 ml pH 7.4 mit HCl einstellen

Durchführung:

Die Zellen aus 30 ml Suspensionskultur werden in einer Zentrifuge (Sigma 2KD) mit Ausschwingrotor bei 1500 rpm für 5 min sedimentiert. Das Zellpellet wird in PBS aufgenommen und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (Größe: 2 ml) überführt. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min in einer Tischzentrifuge (Heraeus biofuge pico). Die so gewaschenen Zellen werden in 300 µl Zellextraktionspuffer aufgenommen. Das Pellet wird durch intensives Schütteln mit Hilfe eines Vortex gelöst. Die Lyse der Zellen erfolgt durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen. Im Anschluß erfolgt eine Zentrifugation bei 100 000 g für 20 min bei 4 °C (Ultrazentrifuge Beckman Optima TL mit den Rotoren TLA 100 und TLA 100.4). Das Pellet wird verworfen der Überstand, der die cytoplasmatischen Proteine enthält, wird als Ausgangsmaterial für weitere Experimente verwendet. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Methode von Bradford (siehe2.4.1.).

2.3.2. Präparation der **a**-Aktin-Isoform aus der Skelettmuskulatur des Kaninchens

Die Präparation der α-Aktin Isoform erfolgte nach der Methode von Pardee und Spudich 1982. Folgende Lösungen sind für die Präparation notwendig:

Puffer A:	100 mM KCl 150 mM KH ₂ PO ₄
Lösung B:	50 mM Na HCO ₃
Lösung C:	1 mM EDTA pH 7.0
	Aceton p.A
G-Aktin-Puffer:	2 mM Tris-HCl pH 8.0 0.2 mM CaCb 0.2 mM ATP 0.5 mM DTE 1 mM NaN ₃
Stammlösungen:	3 M KCl 100 mM ATP 1 M MgCh

Durchführung:

Die Präparation erfolgte, soweit nicht anders angegeben, bei 4 °C.

Herstellung von Acetonpulver als Zwischenstufe zur Aufbewahrung:

250 g Muskelfleisch vom Kaninchen werden zerkleinert (Fleischwolf) und anschließend 10 min in 1 l Lösung B extrahiert. Der Ansatz wird durch ein engmaschiges Sieb filtriert. Es erfolgt eine weitere Extraktion des Rückstandes in 2 l Lösung B. Nach 10 min wird der Ansatz erneut filtriert und für weitere 10 min in Lösung C gerührt. Der nach einer weiteren Filtration abgetrennte Rückstand wird für 5 min mit Aqua bidest gewaschen und anschließend 5 mal für ca. 15 min mit kaltem Aceton extrahiert und filtriert, bis das Filtrat fettfrei erscheint. Die Trocknung des Acetonpulvers findet bei Raumtemperatur statt. Die Aufbewahrung dieser Zwischenstufe bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei -20 °C.

Isolierung von Aktin aus Acetonpulver:

10 g Acetonpulver werden in 200 ml Puffer D gelöst und 30 min bei 0 °C gerührt. Dieser Ansatz wird durch ein Filterpapier gesaugt. Das Filtrat wird für 45 min bei 15 000 g zentrifugiert. Das im Überstand enthaltene Aktin wird zur Polymerisation gebracht, indem man den Ansatz unter der Verwendung der Stammlösungen auf 50 mM KCl, 2 mM MgCh und 1 mM ATP - Endkonzentration bringt. Nach 90 min Inkubation bei Raumtemperatur ist der Polymerisationsvorgang abgeschlossen. Der Ansatz wird auf 0.6 M KCl-Endkonzentration eingestellt, 15 min gerührt und anschließend bei 150 000 g für 90 min in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Pellet, indem sich das filamentäre F-Aktin befindet, wird in ca. 12 ml Puffer D aufgenommen und in einem Glaspotter nach Dounce homogenisiert. Um globuläres G-Aktin zu erhalten wird der Ansatz für 48 h gegen Puffer D dialysiert. Eine erneute Zentrifugation bei 150 000 g für 90 min trennt verbliebenes F-Aktin und denaturierte Proteine (Pellet) vom G-Aktin (Überstand). Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford. Monomeres G-Aktin kann für ca. 14 Tage in Eis aufbewahrt werden ohne seine Aktivität einzubüßen.

2.3.2.1. Markierung des Skelettmuskel-Aktins mit Biotin

Die Markierung des Skelettmuskel-Aktins wurde nach der Methode von Mashima et al 1995 mit Modifikationen nach Pierce (Produktinformationsblatt: NHS-LC-Biotin von Pierce) durchgeführt. NHS-LC-Biotin bindet kovalent an Lysinreste des zu markierenden Proteins. Bei der hier beschriebenen Methode binden ca. 3-5 Biotine pro Molekül Aktin.

Standardpuffer:	5 mM HEPES pH 7.4
	0.1 mM CaCh
	0.2 mM ATP

Skelettmuskel-Aktin

NHS-LC-Biotin

Durchführung:

Frisch isoliertes Skelettmuskel-Aktin wird mit Standardpuffer auf eine Konzentration von 2 mg/ml eingestellt. Nach Zugabe von 0.5 mg/ml NHS-LC-Biotin (Endkonzentration) wird der Reaktionsansatz für 2h auf Eis inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem Markierungsreagenz wird das makierte Aktin über Nacht bei 4 °C gegen Standardpuffer dialysiert. Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte nach der Methode von Bradford.

Um das biotinmarkierte Aktin über einen längeren Zeitraum aufbewahren zu können, wurde es mit Hilfe einer Pasteurpipette in flüssigen Stickstoff, der sich in einem Uhrmacherglas befand,
geträufelt. Die gefrorenen Proteinkügelchen wurden in ein Eppendorfgefäß mit Schraubdeckel uns Dichtung überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

Die Visualisierung des biotinylierten Aktins erfolgte wie in 2.6.1. beschrieben

2.3.2.2. Markierung des Skelettmuskel-Aktins mit 1,5-IAEDANS am Cys 374

Die Synthese dieses Aktin-Derivats erfolgt nach der Methode von Takashi 1979. Folgende Lösungen sind zur Durchführung dieser Methode nötig:

7.5

Stammpuffer:	100 mM HEPES
	200 mM KCl
	10 mM MgCb
	4 mM EGTA
	1 mM Pefabloc
Dialysepuffer:	5 mM Tris-HCl pH
	0.2 mM ATP
G-Aktin-Puffer	(siehe 2.3.2.)
1,5-IAEDANS	

Durchführung:

100 mM DTE

Alle hier beschriebenen Arbeitsschritte geschehen, soweit nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur.

Es wird ein 10-facher molarer Überschuß (bezogen auf das zu markierende Aktin) an 1,5-IAEDANS in Stammpuffer gelöst. Die IAEDANS-Stammlösung wird im Verhältnis 1:1 mit frisch präparierten Skelettmuskel-Aktin vermischt. Es erfolgt eine 50 minütige Inkubation unter Rühren und Lichtausschluß. Die Reaktion wird mit einem 100-fachen molaren Überschuß an DTE gestoppt. Durch eine Ultrazentrifugation bei 160 000 g für 1 h wird der nicht gebundene Farbstoff entfernt und das markierte F-Aktin sedimentiert. Das F-Aktin-Pellet wird in wenig G-Aktin-Puffer aufgenommen und in einem Glaspotter nach Dounce homogenisiert. Es erfolgt eine 48stündige Dialyse gegen Dialysepuffer bei 4 °C. Das resultierende markierte G-Aktin wird nochmals bei 160 000 g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert um Aggregate und Schwebstoffe zu beseitigen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt nach Bradford. Das IAEDANS-Aktin wird wie unter 2.3.2.1. beschrieben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C verwahrt.

Die Visualisierung des Cys-374-Aktins erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators.

2.3.2.3. Fluoreszenzmarkierung von Skelettmuskel-Aktin am Glu41 mit Dansylcadaverin

Die Präparation erfolgt in Anlehnung an die Methode von Takashi 1988. Bei dieser Markierung wird die enzymatische Verknüpfung von Dansylcadaverin, einem Substrat der Transglutaminase, an das frei liegende Glu 41 des Aktins genutzt. Durch die Transaminierungsreaktion wird das Glu in der Position 41 zu einem Gln umgewandelt und mit dem Cadaverin kovalent gekoppelt. Zur Durchführung der Methode werden folgende Lösungen benötigt:

Reaktionspuffer:	5 mM Tris-HCl pH 8.0 1 mM CaCb 1 mM DTT 0.4 mM ATP 1 mM NaN ₃
Desorptionspuffer:	25 mM Tris-HCl pH 7.5 2 mM MgCl ₂ 0.5 mM DTT 10 % Dimethylformamid
Depolymerisationspuffer:	2 mM Tris-HCl pH 8.0 0.2 mM ATP 0.2 mM CaCh 0.25 mM DTT
Stammlösungen:	1 M NaCl 200 mM EGTA 200 mM MgC <u>b</u>
Transglutaminase Dansylcadaverin	

Durchführung:

G-Aktin-Puffer

Die hier beschriebenen Arbeitsschritte werden, soweit nicht anders erwähnt bei 4 °C durchgeführt.

siehe 2.3.2.

50 μM Skelettmuskel-Aktin wird mit einem dreifachen molaren Überschuß an Dansylcadaverin in Reaktionspuffer gemischt. Unter Rühren wird 1 U Transglutaminase hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 20 h bei 4 °C wird die Reaktion durch die Zugabe von 50 mM NaCl, 1 mM EGTA und 2 mM MgCl₂ gestoppt. Zur Entfernung von überschüssigem Farbstoff und der Transglutaminase wird das sich im Reaktionsansatz befindliche Aktin polymerisiert. Nach 2 h Polymerisationszeit bei Raumtemperatur wird der Reaktionsansatz bei 160 000 g für 1 h zentrifugiert. Das markierte F-Aktin-Pellet wird in wenig G-Aktin-Puffer aufgenommen, in einem Glaspotter nach Dounce homogenisiert und 20 h bei 4 °C gegen Desorptionspuffer dialysiert. Die Probe wird erneut bei 160 000 g für 1h sedimentiert und homogenisiert und anschließend für 48 h gegen Depolymerisationspuffer dialysiert. Es erfolgt eine weiteren Zentrifugation der Lösung bei 160000 g für 1 h. Das im Überstand verbleibende Aktinderivat wird wie unter 2.3.2.1 beschrieben eingefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80 °C.

Die Visualisierung des Gln-41-Aktins geschieht mit Hilfe eines UV-Transilluminators.

2.3.2.4 Herstellung von Gelsolin/Aktin-Komplexen

In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem überprüft, ob Aktin von Zellextrakten, apoptotischer Zellen auch dann noch fragmentiert wird, wenn es im Komplex mit aktinbindenden Proteinen vorlag. Im Rahmen dieser Arbeit waren Komplexe aus Aktin und Gelsolin, einem Protein welches Aktinfilamente zerhackt, von besonderem Interesse.

Herstellung von Gelsolin/2Aktin-Komplex:

Benötigte Lösungen und Substanzen:

natives Gelsolin α-Aktin aus Kaninchenmuskel (siehe 2.3.2.) G-Aktinpuffer (siehe 2.3.2.)

Durchführung:

Aktin und Gelsolin werden im molaren Verhältnis 2:1 vermengt. Zur Komplexierung wird der Reaktionsansatz 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Komplexe in einem nativen Safergel (siehe 2.4.3.1.) überprüft.

Herstellung von Gelsolin/1Aktin-Komplex:

Die Herstellung von Gelsolin/1Aktin-Komplexen erfolgt aus Gelsolin/2Aktin-Komplexen. Durch Entzug von Freien Ca²⁺-Ionen im Reaktionsansatz dissoziiert ein Aktinmolekül vom Ausgangskomplex.

Benötigte Lösungen und Substanzen:

Gelsolin/2Aktin-Komplex (siehe oben) 200 mM EGTA-Stammlösung G-Aktin-Puffer (siehe 2.3.2.)

Durchführung:

Zur Eliminierung der Ca²⁺-Ionen wird ein 10-facher Überschuß an EGTA zum Reaktionsansatz, der den Gelsolin/2Aktin-Komplex enthält gegeben (G-Aktinpuffer enthält 0.2 mM Ca²⁺. Daraus resultiert eine Zugabe von 2 mM EGTA). Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde der Komplex im nativen Safergel (siehe 2.4.3.1.) überprüft.

2.3.2.5. Herstellung von DNase I/Aktin-Komplex

Ein weiteres aktinbindendes Protein, welches bei apoptotischen Prozessen eine Rolle spielen könnte, ist die DNase I, deren Aktivität durch G-Aktin gehemmt wird. Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen DNase I und Aktin während apoptotischer Prozesse wurden DNase I/Aktin- Komplexe im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 verwendet.

Benötigte Lösungen und Substanzen zur Herstellung von D/A-Komplexen:

gereinigte DNase I α -Aktin aus Kaninchenmuskel. Es wurden teilweise auch markierte Aktine verwendet (siehe 2.3.2.) G-Aktin-Puffer (siehe 2.3.2.)

Durchführung:

Die Komplexierungspartner Aktin und DNase I wurden im molaren Verhältnis 1:1 vermischt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Überprüfung der Komplexe erfolgte in nativen Safergelen (siehe 2.4.3.1) oder mit Hilfe des DNase I-Inhibitiontestes (siehe 2.6.4.3.).

2.4. Grundlegende proteinanalytische Methoden

2.4.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Alle in dieser Arbeit ausgeführten Proteinkonzentrationsbestimmungen erfolgten nach der Methode von Bradford.

Die von Bradford 1976 entwickelte Methode beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine. Im sauren Milieu bewirkt der gebundene Farbstoff eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm.

Zur Durchführung der Proteinbestimmung werden folgende Lösungen benötigt:

"Protein-Assay"-Reagenzlösung (Fa. BioRad, München) BSA-Stammlösung 1 mg/ml

Durchführung:

100 µl "Protein-Assay"-Reagenzlösung werden mit 400 µl H₂0 versetzt. Es werden 5 µl der zu untersuchenden Proteinlösung hinzugefügt. Parallel zu den Proben wird eine Eichgerade von 0-10 µg BSA angesetzt. Als Leerwert dient das verdünnte Reagenz ohne Protein. Nach einer gründlichen Durchmischung und 10 minütiger Inkubationszeit wird die Extinktion der Reaktionsansätze bei 595 nm in einem Beckman Spektrophotometer DJ 640 gemessen.

Die Auswertung erfolgt durch Vergleich der gemessenen Extinktionen der Proben, mit unbekanntem Proteingehalt, mit der Eichgerade, die die Extinktion in Abhängigkeit der Proteinkonzentration darstellt.

2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese

Nach der Methode von Laemmli 1970 können Proteingemische unter denaturierenden Bedingungen in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die zu trennenden Proteine durchwandern eine Gelmatrix bestehend aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Abhängigkeit der zu analysierenden Proteinlösungen SDS-Gele mit unterschiedlichem Polyacrylamidgehalt (10%, 12%) verwendet. Zur Herstellung dieser Gele werden folgende Substanzen benötigt:

Trenngel:	variable Anteile an Acrylamid/N,N'- Methylenbisacrylamid (Verhältnis 29:1) 375 mM Tris-HCl pH 8.8 0.1% SDS 0.2% TEMED 0.05% APS
Sammelgel:	 4% Acrylamid/ N,N´-Methylenbisacrylamid (Verhältnis 29:1) 125 mM Tris-HCl pH 6.8 0.1% SDS 0.25% TEMED 0.05% APS
Probenpuffer 5x:	 160 mM Tris-HCl pH 8.8 4 mM EDTA 800 mM Saccharose 5 % SDS etwas Bromphenolblau DTE (je nach Anwendung)
Laufpuffer:	25 mM Tris 0.2% SDS 192 mM Glycin

Durchführung:

Soweit nicht anders erwähnt, wurde eine Elektrophoreseapparatur des Typs "Mini-Protean II" der Fa. BioRad (München) verwendet. Pro Gel werden ca. 5 ml der Trenngellösung angesetzt, wobei APS und TEMED als letztes hinzugefügt werden, da sie als Starter der Polymerisation fungieren. Die Trenngellösung wird in die zuvor zusammengebaute Gelkammer gegossen so das ca. ³/₄ der Kammer gefüllt sind. Für einen glatten Abschluß wurde über die Trenngellösung eines jeden Gels ca. 60 µl Ethanol pipettiert. Nach Beendigung der Polymerisationsvorganges wird das Trenngel mit ca. 2.5 ml Sammelgellösung überschichtet und ein Kamm, der Vertiefungen zum Auftragen der Proben bewirkt, eingesetzt. Nach Beendigung der Polymerisation wird der Kamm entfernt und die entstandenen Taschen mit Laufpuffer gespült, um Gelreste zu entfernen.

Die zu analysierenden Proben (ca. 5-100 µg Protein pro Tasche) werden im Verhältnis 4:1 mit Probenpuffer gemischt und anschließend für 3 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben werden mit Hilfe einer Hamiltonspritze in die Taschen eingebracht. Die Elektrophoreseapparatur wird mit Laufpuffer gefüllt. Bei Raumtemperatur wird für das Durchlaufen der Proben durch das Sammelgel eine Spannung von 100 V angelegt, die beim Erreichen des Trenngels auf 150 V erhöht wird. Der Abbruch der Trennung erfolgt je nach Laufhöhe der vorgefärbten Marker.

Proteinmarker:

Es wurden verschiedene vorgefärbte Molekulargewichtstandards zur Bestimmung des Molekulargewichtes verwendet:

Marker (Sigma, Deisenhofen)	
α_2 -Macroglobulin (humanes Plasma)	180 kD
β-Galactosidase (E.coli)	116 kD
Fructose-6-Phosphat Kinase (Kaninchenmuskulatur)	84 kD
Pyruvat Kinase (Hühnermuskulatur)	58 kD
Fumarase (Schweineherz)	48.5 kD
Laktat Dehydrogenase (Kaninchenmuskulatur)	36.5 kD
Triosephosphat Isomerase (Kaninchenmuskulatur)	26.6 kD
Low Range Marker (Sigma, Deisenhofen)	
Ovalbumin (Hühnereiweis)	45 kD
Carbon Anhydrase (Rind, Erythrozyten)	29 kD
Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	20.1 kD
α-Lactalbumin (Kuhmilch) 14.2 k	
Aprotinin (Rinderlunge)	6.5 kD
Kaleidoskop Polypeptid Marker (Bio Rad, München)	
Carbon Anhydrase (Rind)	37.2 kD
Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	26.5 kD
Lysozym	15.4 kD
Aprotinin 8.3 k	
Insulin	3.3 kD

Anmerkung: Die Molekulargewichte der einzelnen Markerkomponenten können je nach Charge leicht variieren.

2.4.3. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Im Unterschied zur SDS-Gelelektrophorese werden bei der nativen Gelelektrophorese Trennbedingungen gewählt, die die Stabilität und Struktur der Proteine bzw. von Proteinkomplexen erhalten. So lassen sich z.B. Proteinkomplexe durch die Bandenverschiebung gegenüber der freien Komponenten nachweisen.

2.4.3.1. Native Gelelektrophorese nach Safer

Die von Safer 1989 beschriebene Methode der nativen Elektrophorese eignet sich besonders gut für die Analyse von Aktin und seinen Komplexen. Für die Durchführung dieser Methode werden folgende Lösungen verwendet:

Gelmatrix:	25 mM Tris
	194 mM Glycin
	7.5 % Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid
	(Verhältnis: 29:1)
	0.03 % TEMED
	0.2 % APS
	0.2 mM ATP
	0.03 mM MgCl ₂
	0.1 mM CaCh
Loufouffor	25 mM Tric
Laupunei.	25 milli milli 104 mM Glucin
	0.2 mM ATP
	0.1 mM MgCh
	0.1 mM CaCh
Probenpuffer 5x:	2.5 mM HEPES pH 7.4
	40 % Glycerin
	0.1 mM MgCl ₂
	0.2 mM ATP
	Bromphenolblau

Durchführung:

Die Vorgehensweise erfolgt analog der Beschreibung für SDS-Polyacrylamid Gele (2.4.2.) mit folgenden Unterschieden:

Das Trenngel und das Sammelgel werden in einem Stück gegossen.

Die Proben werden vor dem Auftragen auf das Gel nicht durch Hitze denaturiert.

Es wird eine durchgehende Spannung von 70 Volt angelegt.

Die Gelelektrophorese wird gestoppt, nachdem wiederholt aufgetragener Probenpuffer die Trennstrecke ca. 1,5-2-fach durchlaufen hat.

2.4.4. Färbung von Proteingelen mit Coomassie

Der einfachste Nachweis von Proteinen in SDS-PAGE- und nativen Gelen ist die Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue G 250. Für diese Methode werden folgende Lösungen benötigt:

Färbelösung:	40 % Methanol 10 % Essigsäure 0.5 % Coomassie Brilliant Blue G 250
Entfärber:	12 % Isopropanol 10 % Essigsäure

Durchführung:

Nach Beendigung der Gelelektrophorese, Gele aus der Kammer nehmen und vorsichtig von den Glasplatten lösen. Das Gel ca. 20-30 min in Färbelösung schütteln. Anschließend das Gel kurz mit Wasser abspülen und unter mehrmaligem Wechsel der Entfärberlösung entfärben. Dieser Vorgang kann mehrere Stunden in Anspruch nehmen. Anschließend können die Gele dokumentiert und getrocknet werden.

Die Färbelösung kann mehrfach verwendet werden.

Der Entfärber kann mit Hilfe grober Aktivkohle mehrfach regeneriert und verwendet werden.

2.5. Immunologische Methoden

2.5.1. Westernblot-Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose

Für den Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper werden die im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mittels der Westernblottechnik, in Anlehnung an die Methode von Towbin et al 1979, auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell 0.4 μ m Porengröße) transferiert. Für den Transfer wurde eine Semi-Dry-Blotkammer (Modell TE 70, Pharmacia) verwendet. Die Vorgehensweise erfolgte in Anlehnung an die Geräteanleitung.

Transferpuffer:	125 mM Tris
	1.3 mM SDS
	192 mM Glycin
	15 % Methanol

Der pH des Transferpuffers braucht normalerweise nicht eingestellt werden. Er sollte bei ca. pH 8.3 ± 0.1 liegen. Bei Zusammenbau der Kammer und dem Zuschneiden der Membran sollten Handschuhe getragen werden um falschpositive Ergebnisse zu vermeiden.

Für den Transfer von Aktin und dessen Fragmente aus einem Minigel der Größe 8 cm x 10 cm betrug die Blotzeit 50 min bei einer Stromstärke von 80 mA (1 mA/cm² Gelfläche). Die Transferzeit kann je nach Proteingröße und Löslichkeit unterschiedlich sein.

Elektrophoretisch getrennte Proteine die für eine Ansequenzierung nach der Edman-Methode bestimmt waren, wurden auf Immobilon PSQ-Membran (Millipore) mit folgenden Transferpuffer ohne Glycin geblottet:

Transferpuffer:	6 g Tris
	3.1 g Borsäure
	100 ml Methanol
	ad H ₂ O 1000 ml

Der Puffer wurde anschließend entgast und filtriert. Da die PSQ-Membran sehr hydrophob ist, muß sie erst einige Zeit in reinem Methanol eingeweicht werden, bevor sie mit dem Transferpuffer equilibriert werden kann.

2.5.2. Markieren und Anfärben von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper

Das folgende Markierungsverfahren wurde zur Detektion der einzelnen Aktin-Isoformen und -Fragmente, Gelsolin und Caspase-3 verwendet. Es wurden komerziell erhältliche monoklonale und polyklonale Antikörper und folgende Lösungen und Substanzen verwendet:

PBS	siehe 2.3.1.
TPBS	0.1 % Tween 20 in PBS
Blotto	10 % Magermilchpulver in PBS
Erstantikörper:	C-terminus Aktin 1:500 in PBS (mk) N-terminus β -Aktin 1:5000 in PBS (mk) N-terminus α -Aktin 1:500 in PBS (mk) CPP 32 1:1000 in PBS (pk) Gelsolin 1:1000 in PBS (mk)
Zweitantikörper:	Schaf α -Maus biotinyliert 1:500 in PBS Affe α -Hase biotinyliert 1:500 in PBS

Strept/PO-Komplex:	1:500 in PBS
Entwickler:	20 mg Diaminobenzidin Na-Salz 400 μl 100 mM CoCh ad 30 ml PBS 20 μl H ₂ O ₂ (30 %) diese Lösung immer kurz vor Gebrauch ansetzen

Durchführung:

Alle Arbeitsschritte werden, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Nitrocellulose-Membran wird direkt nach dem Proteintransfer (siehe 2.5.1.) 1 h in Blotto leicht geschüttelt. Nach dreimaligem 5-minütigen Waschen in TPBS wird die Membran mit dem Erstantikörper in der entsprechenden Verdünnung über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung des ungebundenen Erstantikörpers erfolgen drei Waschschritte mit TPBS. Es folgt die Inkubation des Zweitantikörpers für 1 h. Die Membran wird wiederholt gewaschen und 1 h mit Streptavidin/Meerrettich-Peroxidase-Komplex inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgt die Anfärbung mit Hilfe der Entwicklerlösung. Um den Färbeprozeß zu beenden, wird die Membran für mindestens 15 min unter fließendem Wasser gespült. Die Immunoblots werden im Dunkeln getrocknet und anschließend fotografiert.

2.6. Spezielle Untersuchungsmethoden für einzelne Proteine

2.6.1. Fragmentierungsassay

Die Durchführung des Fragmentierungsassays erfolgte in Anlehnung an die Methode von Mashima et al 1995. Folgende Lösung, die aufgrund der geringen Halbwertszeit des DTT immer frisch angesetzt werden muß, wird für diese Methode benötigt:

Assaypuffer:

20 mM HEPES pH 7.5 2 mM DTT 10 % Glycerin

Zellextrakte aus induzierten und nicht induzierten Zellen (siehe 2.3.1.)

optional: exogenes Aktin, mit und ohne Markierungen (siehe 2.3.2.) Protease-Inhibitoren.

Durchführung:

Pro Ansatz werden 5-100 µg Zellextrakt mit dem Assaypuffer vermengt. Für in vitro Spaltungsnachweise können markierte Aktine und Protease-Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen zu den Reaktionsansätzen hinzugefügt werden.

Die Ansätze werden für 2 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln in einem Thermomixer (Modell 5436 von Eppendorf) inkubiert.

Für die Analyse der Spaltprodukte und einzelnen Proteinen wurden die Reaktionsansätze nach der Inkubation mit 5 x Probenpuffer (siehe 2.4.2.) versetzt, 3 min gekocht und mittels Gelelektrophorese in 12 %-igen PAA-Gelen aufgetrennt. Die Gele wurden je nach Nachweismethode, weiterverwendet:

Fluoreszenzmarkierte Aktine: Nachweis mit Hilfe einer UV-Lampe (siehe 2.3.2.2. und 2.3.2.3).

biotinyliertes Aktin: Transfer der Proteine auf Nitrocellulose mit Hilfe der Westernblot-Technik (siehe 2.5.1.). Nachweis mit Hilfe von Streptavidin/Meerrettichperoxidase-Komplex und DAB (siehe 2.3.2.1.)

Nachweis von Proteinen mittels Antikörper (siehe 2.5.2.)

2.6.2. Sedimentationsexperimente

Sedimentationsversuche sind eine Möglichkeit zum Nachweis von filamentärem F-Aktin. Desweiteren bietet sich diese Methode in leicht abgewandelter Form dazu an, Aussagen über den Zustand der Spaltprodukte zu treffen. Es werden folgende Lösungen benötigt.

1 M KCl 200 mM MgCl₂

Durchführung:

In den zu untersuchenden Proben wird die Polymerisation ausgelöst durch die Zugabe von 100 mM KCl und 2 mM MgCh (Endkonzentration). Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Ansätze 1 h bei 100 000 g zentrifugiert, um das F-Aktin, welches sedimentierbar ist, vom G-Aktin, das sich im Überstand befindet, zu trennen. Die so gewonnenen Proteinfraktionen können anschließend im SDS-PAGE und mit immunologischen Methoden analysiert werden.

Zur Untersuchung ob Spaltprodukte denaturiert sind, wird die oben beschriebene Methode leicht abgewandelt. Die Proben werden nur einer Ultrazentrifugation unterzogen ohne vorheriger Polymerisationsauslösung durch Erhöhung der Ionenkonzentration.

2.6.3. Nachweis von Nukleaseaktivität

Für den Nachweis von Endonuklease-Aktivität in Zellextrakten und Gewebehomogenaten sind in der Arbeitsgruppe Mannherz verschiedene Methoden etabliert worden.

2.6.3.1. SDS-Zymogrammtechnik

Die hier vorgestellte Methode ist eine Abwandlung der von Laemmli 1950 beschriebenen diskontinuierlichen Gel-Elektrophorese (siehe 2.4.2.). Die wesentliche Modifikation wurde von Lacks 1981 vorgeschlagen. Neben dem Nachweis von Endonuklease-Aktivität wurde diese Methode dazu benutzt, um sicher zu stellen, daß die verwendeten Zellen mykoplasmenfrei sind. Mykoplasmen exprimieren eigene Endonukleasen, die ein anderes Molekulargewicht haben als zelleigene DNA schneidende Enzyme.

Zusätzlich zu den in 2.4.2. aufgeführten Lösungen werden für die Zymogramm-Methode folgende Lösungen und Substanzen benötigt:

Kalbsthymus DNA	2 mg/ml (beim Ansetzen nicht schütteln sondern nur vorsichtig invertieren. Die Lösung muß viskos bleiben).
Reaktivierungspuffer	20 mM Tris-HCl pH 7.3 5 mM CaCb 5 mM MgCb
Magermilchpulver	
Ethidiumbromid	10 mg/ml

Durchführung:

Die SDS-Gelelektrophorese wird in Anwesenheit von 0.1 % SDS und 0.01 mg/ml Kalbsthymus-DNA und 12 % PAA im Trenngel, durchgeführt.

Für die Präparation der einzelnen Proben wurden zwei unterschiedliche Probenpuffer verwendet, jeweils mit und ohne reduzierende Substanzen wie DTE. Die Proben wurden für 3 min bei 95 °C erhitzt. Als Referenzprobe wurden gereinigte Rindpankreas-DNase von Worthington oder Zellkulturüberstände von Mykoplasmen infizierten Zellen aufgetragen.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden die Gele über Nacht bei 4 °C in Reaktivierungspuffer mit 5 % Milchpulver geschüttelt, um das denaturierende SDS zu entfernen und die Proteine zu reaktivieren. Nach mehrmaligem Spülen mit Reaktivierungspuffer werden die Gele mit 5 μ g/ml Ethidiumbromid in Reaktivierungspuffer inkubiert. Die Endonuklease-Aktivität lässt sich als dunkle Bande gegen einen fluoreszierenden Hintergrund auf einem UV-Transilluminator darstellen. Das Ergebnis wurde mit Hilfe eines Videodokumentationssystems (Intas, Göttingen) archiviert.

2.6.3.2. BN-Zymogrammtechnik (native Zymogrammtechnik)

Neben der SDS-Zymogrammtechnik (siehe 2.6.3.1.) wurde zum Nachweis von Endonukleasen die Blue Native Geltechnik gekoppelt mit SRED (Single Radiation Enzyme Diffusion-Assay) verwendet. Der Vorteil dieser Methode ist die höhere Empfindlichkeit gegenüber der SDS-Zymogramm-Technik und die Möglichkeit der Darstellung des nativen Proteins. Nachteilig ist der höhere Arbeitsaufwand und Technik.

Im Gegensatz zur SDS-Zymogrammtechnik werden hier die Proteine unter nativen Bedingungen getrennt. Schägger und von Jagov 1991 haben eine Methode veröffentlicht, die es ermöglicht, native Proteine nach ihrem Molekulargewicht geordnet zu trennen. Sie verwenden hierfür Coomassie Brilliant Blue G 250, einen negativ geladenen Farbstoff, der an Proteine bindet. Je

größer ein Molekül ist, um so größer ist die Beladung des Proteins mit diesem Farbstoff und die daraus resultierende negative Ladung. Diese negative Ladung bestimmt das Wanderverhalten im elektrischen Feld.

Für die Methode werden folgende Lösungen und Substanzen benötigt:

BN-PAGE:

	3 x Gelpuffer	150 mM Bistris-HCl pH 7.0 1.5 M α-Aminocapronsäure
	48 % PAA-Lösung	24 g Acrylamid 0.75 g N,N´-Methylenbisacrylamid ad H ₂ O 50 ml Lösung filtrieren
	Kathodenpuffer	50 mM Tricin 15 mM Bistris-HCl pH 7.0 0.0001 % Coomassie Blue G 250
	Anodenpuffer	50 mM Bistris-HCl pH 7.0
	TEMED	
	10 % APS- Stammlösung	
	2 x BN-Probenpuffer	250 mM α-Aminocapronsäure 50 mM Bistris-HCl pH 7.0 0.01 % Coomassie Blue G 250 20 % Glycerin
SRED	-Gele:	
	2 x SRED-Puffer	200 mM Na-Kakodylat pH 7.3 40 mM MgCh 4 mM CaCh
	Agarose	
	Ethidiumbromid 10 mg/ml	
	Kalbsthymus-DNA 2 mg/ml	
	Reaktivierungspuffer	20 mM Tris-HCl pH 7.3 5 mM MgC <u>b</u> 5 mM CaC <u>b</u>

Durchführung:

Zum Gießen des BN-Gels wird eine Gelelektrophoresapparatur zusammengebaut. Da das Trenngel einen kontinuierlichen PAA-Gradienten aufweist, wird ein Gradientenmischer benötigt. Die Trenngellösungen werden bis auf APS und TEMED nach dem folgendem Pipettierschema zusammengemischt und in den Gradientenmischer eingefüllt dessen Hähne geschlossen sind (20 % Trenngellösung in die Kammer am Auslauf).

	Sammelgel	5% Trenngel	20% Trenngel	
Wasser	1147	1289	222	
48% PAA	167	230	843	
3x Gelpuffer	667	767	767	
Glycerin	ilycerin -		460	
TEMED	1.7	1.3	0.8	
10% APS	17	12.8	7.7	

Pipettierschema für ein 5-20 % BN-Gel (BioRad Mini Protean II Kammer, Angaben in µl)

Als Letztes erfolgt die Zugabe von APS und TEMED, um die Polymerisierung des Gels zu starten. Nachdem die Lösungen gut gemischt sind, werden die Hähne geöffnet und die Gellösung zwischen die Glasplatten eingefüllt. Das fertige Trenngel wird vorsichtig mit etwas Wasser überschichtet.

Das Gießen des Sammelgels erfolgt wie in 2.4.2. beschrieben.

Die Proben werden 1:1 mit dem Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Es wird eine elektrische Spannung von ca. 100 V angelegt bis die blaue Lauffront kurz vor dem unteren Ende der Glasplatten angelangt ist.

Herstellung des SRED-Gels:

Für 4 Gele benötigt man:

Eine Glasplatte von der Größe des BN-Gels wird auf einer Heizplatte auf 50 °C angewärmt.

25 ml 2 x SRED-Puffer 5 ml Kalbsthymus-DNA 0.5 g Agarose 4 Tropfen Ethidiumbromid 20 ml H₂O

Das Gemisch wird in der Mikrowelle aufgeschmolzen und auf einem Rührer etwas herunterkühlt, und anschließend luftblasenfrei auf die vorgewärmten Glasplatten gegossen. Das SRED-Gel wird mit dem vorschriftsmäßig gelaufenen BN-Gel bedeckt. Dieser Sandwich wird in einer feuchten Kammer über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach dem Entfernen des BN-Gels wird das SRED-Gel in für 1h in Reaktivierungspuffer gelegt.

Die Detektion der Nukleaseaktivität erfolgt auf einem UV-Transilluminator (dunkle Flecken auf hellem Hintergrund). Die Dokumentation erfolgt mit Hilfe der Video-Dokumentations-Anlage.

2.6.3.3. Messung von Nukleasenaktivität nach Kunitz

Eine weitere Methode der Endonuklease-Detektion ist die Messung des Abbaus von intakter und fragmentierter DNA bei 260 nm im UV-Spektrometer (Hyperchromizität). Die Durchführung lehnt an die Methode von Kunitz 1950 an. Dieser Test kann unter anderem Aufschluß darüber geben, wie stark Zellextrakte aus apoptotischen und unbehandelten Zellen die Aktivität von vorgelegter DNase I Aktivität inhibieren. Es können so Rückschlüsse über die Menge des aktiven monomeren G-Aktin gezogen werden.

Für diesen Test werden folgende Lösungen benötigt:

Reaktionspuffer

10 mM Tris pH 7.6 1 mM MgCl₂ 1 mM CaCl₂ 100 μg/ml Kalbsthymus DNA

Zellextrakte (siehe 2.3.1.)

gereinigte Rindpankreas-DNase I

 α -Aktin in globulärer und filamentärer Form

Durchführung:

Zur Gewährleistung eines maximal nutzbaren Messbereiches wird vor jeder Messreihe die geeignete DNase I-Konzentration ermittelt.

Hierzu wird DNase I in eine Quarzküvette eingebracht und mit Reaktionspuffer auf 500 μ l aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wird sofort mit Hilfe des Kinetikprogramms im Beckman Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm über einen Zeitraum von 5 min gemessen.

Durch die graphische Auswertung des linearen Teils der Kinetikkurven kann die DNase I-Aktivität in "Kunitz-Units" berechnet werden. Ein "Kunitz-Unit" entspricht einer Veränderung der optischen Dichte um 0.001 OD/min bei 260 nm.

2.6.3.4. Nachweis einer DNA-Leiter

Ein klassischer Nachweis von Apoptose wie er in der Literatur beschrieben wird, ist die Darstellung des DNA-Abbaus in ca. 180-200 bp lange Fragmente. Hierfür wird die DNA aus apoptotischen Zellen isoliert und in einem Agarosegel aufgetrennt. Für den Nachweis einer DNA-Leiter wurde die Methode verwendet, wie sie in der Arbeitsgruppe Krammer am DKFZ Heidelberg üblich ist.

Folgende Lösungen werden für diesen Versuch benötigt:

siehe 2.3.1
0,5 x TBE 0,25 % (v/v) NP-40
(DNase-frei)
0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylen Cyanol FF 30 % Glycerin in H ₂ O
90 mM Tris-HCl pH 7.8 90 mM Borat 2 mM EDTA

Versuchsdurchführung:

SKW-Zellen

Je 2.5×10^6 SKW-Zellen werden für 0, 30, 60 und 90 min mit 1 µg α -Fas/ml Zellsuspension inkubiert. Nach der jeweiligen Induktionszeit werden die Zellen abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Die Zellen werden in je 120 µl Lysispuffer aufgenommen und für 10 min lysiert. Es erfolgt eine 30 minütige Inkubation mit 20 µg/ml RNase H bei 37 °C um störende RNA zu entfernen. Im Anschluß werden die Proben für 30 min bei 37 °C mit 1 mg/ml Proteinase K behandelt. Aliquots dieser Ansätze werden mit 5-fach DNA-Puffer versetzt und in einem 1.2 %igen TBE/Agarosegel bei ca. 70 V Spannung aufgetrennt.

2.6.3.5. Plasmidverdau-Assay

Eine weitere Methode zum Nachweis von Endonuklease-Aktivität sind Verdauansätze mit Plasmid-DNA als Substrat. Mit diesem Test kann neben dem Gesamt-Abbau der Plasmid-DNA auch die Fähigkeit zur Einzelstrangbruch-(nick)-Aktivität beurteilt werden.

Nachfolgend aufgelistete Lösungen und Substanzen werden für diesen Versuch benötigt:

10 x Plasmidverdaupuffer	200 mM Tris/Acetat pH 7.3 50 mM CaCb 50 mM MgCb 0.1 μg/ml Plasmid-DNA	
Zellextraktionspuffer:	10 mM Tris-HCl pH 8.0 5 mM Octyl-β-D-Glucopyranosid 1 mM EDTA	
5-fach DNA-Probenpuffer		
TBE	(siehe 2.6.3.4.)	
Ethidiumbromid-Stammlösung 10 mg/ml		
Agarose		
PBS		

Durchführung:

Die Zellen abzentrifugieren und mit PBS waschen. Im Anschluß werden die Zellen in Zellextraktionspuffer aufgenommen und für 30 min auf Eis gestellt. Um die Zellmembranen und die DNA zu brechen, werden die Zellen mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut und zwischendurch gevortext. Es erfolgt eine Zentrifugation, um die groben Bestandteile zu pelletieren. Vom Überstand wird der Proteingehalt bestimmt. Aliquots der so gewonnenen Zellhomogenate werden 1:10 mit dem Plasmidverdaupuffer vermischt und mehrere Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Proben werden mit 5-fach DNA-Probenpuffer vermischt und in einem 0.7 %igen Agarose/TBE-Gel bei einer Spannung von ca. 70 V aufgetrennt.

Die DNA wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators dargestellt.

unbehandelte und apoptoseinduzierte Zellen

2.6.4. Nachweis von Caspase-3 Aktivität mittels DEVD-AMC

Der Caspase-3 Assay ist eine einfache und zeitsparende Methode um in Zellextrakten die Caspase-3 Aktivität zu bestimmen. Diese Methode weist die Verschiebung der Fluoreszenzemission nach, wenn das synthetische Substrat DEVD-AMC (7-Amino-4-methyl-coumarin) durch CPP 32 oder andere Proteasen der Caspase-3 Familie gespalten wird. Zur Durchführung der Methode werden folgende Lösungen benötigt:

Assaypuffer	20 mM HEPES pH 7.5 5 mM DTT 10 % Glycerin
10 mM DEVD-AMC	(Substrat, gelöst in DMSO)
1 mM AMC	(freies Fluorogen, gelöst in DMSO)
1 mM DEVD-cho	(Inhibitor, gelöst in DMSO)

Zellextrakte induziert und nicht induziert (siehe 2.3.1.)

Durchführung:

Pro Ansatz werden 1 ml Assaypuffer und 50 μ g Zellextrakt pipettiert. Die Reaktion wird mit 50 μ M DEVD-AMC gestartet. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C werden die Proben in einem Spektralfluorophotometer (RF 5001 PC, Fa. Shimadzu, Duisburg) gemessen. Es wird die relative Fluoreszenz bei einer Exitation von 380 nm und Emmision von 460 nm gemessen. Die Spaltbreite betrug 1.5 nm.

Zur Quantifizierung der Caspase-3 Aktivität wird eine Eichgerade benötigt. Hierzu werden unterschiedliche Konzentrationen des freien Fluorochrom AMC gemessen. Die einzelnen Messpunkte betrugen 0, 1, 3, 5, 7 und 10 nmol AMC. Zur Berechnung der Caspase-3-Aktivität wird mit Hilfe linearer Regression eine Eichgerade ermittelt und deren Steigung berechnet. Die Units CPP32 werden dann nach der folgenden Formel berechnet:

Units CPP 32 = (**D** FU/h) x (Steigung Eichgerade)⁻¹ x (nmol AMC/FU)

 Δ FU/h = Änderung der rel. Fluoreszenz zwischen T₀ und T₁ (Länge der Inkubationszeit)

2.7. Zellmorphologische Untersuchungsmethoden

2.7.1. Fixierung von Zellmaterial

Für mikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen behandelt, wie in den Abschnitten 2.2.2., 2.2.3 und 2.2.4. beschrieben. Für die Fixierung wurden, je nach Beschaffenheit der Zellinie und Art der Färbung, unterschiedliche Methoden verwendet.

Benötigte Substanzen und Lösungen:

PBS (siehe 2.3.1.)
4 % Paraformaldehyd in PBS
25 % Paraformaldehyd in PBS
10 % Triton X-100 in H₂O

Durchführung:

a) Fixierung von adhärenten Zellen

Die auf sterilen Deckgläschen angezogenen MCF-7 Zellen werden dreimal unter leichtem Schütteln für 3 min gewaschen. Anschließend erfolgt die Fixierung mit 4 %-igem Paraformaldehyd in PBS für 20 min bei Raumtemperatur. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wird nach 10 min Fixierungszeit 0.2 % Triton X-100 (Endkonzentration) hinzugefügt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die fixierten Zellen mehrfach mit PBS gewaschen. Die Zellen können in PBS bei 4 °C aufbewahrt oder sofort weiterverwendet werden.

b) Fixierung von Zellen aus Zellsuspensionskulturen

Wenn nicht anders erwähnt, erfolgen alle Schritte in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen und bei Raumtemperatur. Die Zellen aus 1.5 ml Suspensionskultur werden bei 2000 rpm in einer Tischzentrifuge (Heräus Biofuge pico) für 3 min sedimentiert. Das Zellpellet wird mit PBS gewaschen. Das gereinigte Zellpellet wird mit einer möglichst kleinen Menge PBS vorsichtig aufgeschüttelt und mit 25 %-iger Paraformaldehydlösung auf eine Endkonzentration von 4 % gebracht. Nach 10 min Einwirkzeit erfolgt die Zugabe von 0.2 % Triton X-100 (Endkonzentration). Nach weiteren 10 min Inkubationszeit wird das Reaktionsgefäß mit PBS aufgefüllt. Es erfolgt eine Sedimentierung der Zellen bei 2000 rpm für 3 min. Das Pellet wird in wenig PBS aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung können die fixierten Zellen für einige Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.7.2. Nachweis von F-Aktin mittels TRITC markiertem Phalloidin

Phalloidin, ein Toxin des Knollenblätterpilzes, lagert sich eng an die Seiten der Aktin-Filamente und verhindert so eine Depolymerisation solcher Filamente. Phalloidin bindet **nicht** an die globuläre Form des Aktins. Gekoppelt mit dem Fluorochrom TRITC eignet sich diese Substanz aufgrund der beschriebenen Eigenschaften sehr gut als Nachweisreagenz für filamentäres Aktin. Benötigte Substanzen und Lösungen:

> Fixierte Zellen (siehe 2.7.1.) Phalloidin/TRITC 1 mg/ml (Molecular Probes Europe BV) PBS (siehe 2.3.1.) Mowiol (siehe 2.7.5.) zum Eindeckeln

Durchführung:

Die gewaschenen und fixierten Zellen werden in einer Phalloidin/TRITC-Lösung mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen um überschüssiges Phalloidin zu entfernen. Anschließend können die Zellen mit Mowiol eingedeckelt werden oder weiteren Färbeschritten unterzogen werden. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss Axiophot) gekoppelt mit einer Videodokumenta-tionsanlage (Chromaphor Duisburg). Die markierten Aktinfilamente fluoreszieren bei Grünanregung rot.

2.7.3. Hoechst 33258-Fluorchromierung

Mit Hilfe des Farbstoffes Hoechst 33258 können Zellen bezüglich ihres DNA-Zustandes einfach beurteilt werden. Der Farbstoff färbt Kerne vitaler Zellen nur schwach an, bei zunehmender DNA-Fragmentierung wird diese Färbung intensiver. Benötigte Substanzen und Lösungen:

> fixierte Zellen oder vitale Zellen PBS (siehe 2.3.1.) Hoechst-Stammlösung 1 mg/ml gelöst in H₂O Mowiol (siehe 2.7.5.) zum Eindeckeln

Durchführung:

Für die Kernfärbung werden die Zellen in einer Farbstofflösung mit einer Endkonzentration von 1 μ g Hoechst/ml für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt ein mehrfaches Spülen mit PBS, um nicht gebundene Farbstoffreste zu entfernen.

Zur Detektion werden die Zellen mit Mowiol eingedeckelt. Die Visualisierung erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes. Die gefärbten Kerne erscheinen bei heller Blauanregung strahlend blau.

2.7.4. Nachweis von G-Aktin mit FITC markierter DNase I

Für den spezifischen Nachweis von globulären Aktin kann DNase I genutzt werden, ein natürlicher Bindungspartner des G-Aktins. Für die Darstellung des G-Aktins in Zellen verwendet man FITC markierte DNase I (Molecular Probes Europe BV) die mit einer Affinität von 5 x 10^8 M⁻¹ an globuläres Aktin bindet.

Folgende Substanzen und Lösungen werden benötigt:

PBS (siehe 2.3.1.) + 50 % Glyzerin

DNase-Puffer

20 mM Tris-HCl pH 7.6 50 mM NaCl 1 mM DTT 0.1 mg/ml BSA 50 % Glycerin

FITC markierte DNase I

Durchführung:

Die Zellen werden fixiert, wie in Abschnitt 2.7.1. beschrieben. Anschließend werden die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Es erfolgt die Färbereaktion mit 0.3 μ M FITC-markierter DNase I in DNase-Puffer für 10 min unter Lichtausschluß. Anschließend werden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und mit Mowiol (siehe 2.7.5.) eingedeckelt. Optional können die Zellen mit Hoechstfarbstoff (siehe 2.7.3) und/oder TRITC markiertem Phalloidin (siehe 2.7.2.) gegengefärbt werden.

2.7.5. Herstellung von Mowiol

Mowiol ist ein Kunstharz, das mit Glyzerin und Puffer angesetzt wird. Durch die Pufferung des pH-Wertes und die Wasserlöslichkeit eignet es sich besonders als Einschlußmittel für Immunfluoreszenzen.

Herstellung von Mowiol:

1. Mischung herstellen aus

Mowiol (Hoechst)	2.4 g
Glyzerin	6.0 g
H_2O	6.0 ml

2. Mischung mind. 2 h bei Raumtemperatur stehen lassen.

3. Zugabe von

Tris-HCl 0.2 M pH 8.5 12 ml

- 4. 10 min bei 50 °C inkubieren.
- 5. 15 min bei 5000 g abzentrifugieren

6. Aliquots können bis zu 1 Jahr bei -20 °C aufbewahrt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Aufreinigung von **a**-Aktin aus Skelettmuskulatur des Kaninchens und die Herstellung von Aktinderivaten

Zur Durchführung vieler der hier beschriebenen Experimente wurde α -Aktin und dessen Derivate verwendet. Da isoliertes Aktin nur eine bestimmte Zeit physiologisch aktiv ist, wurde es in einem ca. 14-tägigen Rhythmus isoliert.

3.1.1. Isolierung von a-Aktin aus Kaninchenmuskulatur

Im Material- und Methodenteil wird unter 2.3.1. die Herstellung der Zwischenstufe "Acetonpulver" und die Isolierung des Aktins aus dieser Zwischenstufe beschrieben.

Aus 8 bis 10 g Acetonpulver werden zwischen 80 und 120 mg reines Aktin gewonnen. Die Reinheit des so gewonnenen Proteins kann zum Beispiel aus der Abb. 3.32 entnommen werden.

3.1.2. Markierung von a-Aktin mit NHS-LC-Biotin

Zur Identifizierung von Aktinbruchstücken und zur Überprüfung der Apoptoseinduktion wurde biotinyliertes Aktin verwendet. Bei der in 2.3.2.1. beschriebenen Methode der Markierung wurden je 3-5 Moleküle Biotin je Aktin gebunden. Die Überprüfung der gebundenen Biotinmoleküle erfolgte mit Hilfe des HABA-Testes von Pierce, der nach der firmeneigenen Anleitung durchgeführt wurde.

Für die Visualisierung im Westernblot hat sich eine Menge von $0.5 \ \mu g$ bis 2 μg biotinyliertem Aktin pro Spur bewährt.

Sedimentationsexperimente, deren Durchführung unter 2.6.2. beschrieben ist, zeigen, daß das biotinmarkierte Aktin die gleichen polymerisierenden Eigenschaften zeigt wie unmarkiertes Aktin. Mit Hilfe des Kunitztestes (2.6.4.3.) wurden die hemmenden Eigenschaften von biotinyliertem Aktin auf die DNase I überprüft. Es konnten keine Unterschiede in der Inhibition von DNase I bei der Verwendung von unmarkiertem als auch von biotinmarkierten Aktin festgestellt werden.

3.1.3. Markierung von **a**-Aktin mit I-AEDANS und Dansylcadaverin

Um die Lage der einzelnen Fragmente zueinander bestimmen zu können, wurde Aktin mit selektiv reagierenden Fluorochromen kovalent gekoppelt.

Die Synthese von I-AEDANS-Aktin und dessen Darstellung erfolgte nach der unter 2.3.2.2. beschriebenen Methode. Das Reagenz reagiert mit dem Cys 374 des Aktins, welches in der Subdomäne 1 lokalisiert ist und sich am C-terminalen Ende des Proteins befindet. Für die Darstellung in 12 %igen Polyacrylamidgelen hat sich eine Menge von 0.5 bis 2 µg pro Spur bewährt.

Die Herstellung des Dansylcadeverin-Aktin-Derivates erfolgte nach der in 2.3.2.3. beschriebenen Methode. Die Reaktion des Aktins mit dem Fluorochrom findet am Glu 41 statt, welche sich in der DNase I-Bindungsschleife, die in der Subdomäne 2 des Aktins lokalisiert ist, befindet. Wie schon für das I-AEDANS-markierte Aktin beschrieben, hat sich für die Darstellung in Polyacrylamidgelen eine Menge von 0.5 bis 2 µg pro Spur bewährt.

Beide Aktinderivate wurden auf ihre polymerisierenden und DNase I hemmenden Eigenschaften hin untersucht. Es zeigten sich, wie schon beim biotinyliertem Aktin, keine Unterschiede im Vergleich zum unmarkierten α -Aktin.

3.2. Herstellung von cytosolischen Extrakten aus unterschiedlich behandelten Zellen

Die Herstellung von Zellextrakten erfolgte nach der von Mashima et al 1995 B beschriebenen Vorgehensweise, die unter 2.3.1. dargestellt ist.

Die verwendete Methode der Aufarbeitung wurde aufgrund ihrer sehr kurzen Präparationszeit und dem Fehlen von Proteaseinhibitoren in den Präparationspuffern verwendet.

Westernblotanalysen der einzelnen Präparationsschritte ergaben, daß bei der hier verwendeten Aufarbeitungsmethode die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine fast vollständig extrahiert werden.

3.3. Induktion von Apoptose

Die Induktion von Apoptose erfolgte mit Hilfe unterschiedlicher Substanzen spezifisch für jedes verwendete Zellsystem (siehe 2.2.3.):

Der monoklonale Antikörper Fas/Apo 1 löst, über eine Trimerisierung des Oberflächenrezeptors CD 95 bei SKW-Zellen und Aktivierung des DISC, Apoptose aus. In Jurkatzellen erfolgte die Induktion des programmierten Zelltodes über die Hemmung der Phosphokinase C durch Staurosporin.

Die Substanz Cycloheximid löst durch die Hemmung der Protein- und RNA-Synthese den programmierten Zelltod in verschiedenen Zellsystemen aus (Martin et al 1990).

Ara C ist ein Basenanalogon und übt somit seine apoptoseinduzierende Wirkung auf der DNA-Ebene aus.

Die jeweils verwendeten Induktoren sind jeweils bei den einzelnen Experimenten erwähnt.

Für den Nachweis der Apoptose werden veschiedene Methoden verwendet.

Die Anfärbung der apoptotischen Zellen mit FITC gekoppelten Annexin V beruht auf der Tatsache, daß dieses Protein spezifisch an das Lipid Phosphatidylserin bindet. Während der Apoptose ändert sich das Verhältnis der Lipidzusammensetzung zwischen der Innen- und Außenseite der Zellmembran. Phosphatidylserin ist normalerweise nur auf der zum Cytosol gerichteten Seite der Membran zu finden. Bei apoptotischen Prozessen hingegen ist PS auch auf der extracellulären Seite der Zellmembran exponiert. Annexin V bindet nur an das extracellulär exponierte Phosphadidylserin, da es aufgrund seiner Größe nicht durch die intakte Zellmembran dringen kann wie sie beim programmierten Zelltod vorhanden ist. Um Apoptose von der Nekrose unterscheiden zu können, wird die Annexin V Färbung mit zusammen mit dem Farbstoff Propodiumjodid durchgeführt. Dieser kernfärbende Farbstoff kann nur in die Zelle eindringen, wenn die Zellmembran, wie bei der Nekrose, zerstört ist.



Abb. 3.1: Doppelfärbung von SKW-Zellen mit FITC markierten Annexin V (grün) und Propodiumjodid (rot). Das Bild K zeigt Kontrollzellen, die von keinen der beiden eingesetzten Substanzen eingefärbt wird, aufgrund fehlender PS-Exposition an der Außenseite und der intakten Zellmembran. Das Bild A zeigt Zellen 50 min nach Apoptosestimulation mit 200 ng/ml α -Fas. Die Zellen reagieren mit dem FITC markierten Annexin V jedoch nicht mit dem Propodiumjodid. Dies ist ein Hinweis auf eine intakte Zellmembran, wie sie bei der Apoptose zu erwarten ist.

Ein alternativer Nachweis der Apoptose ist die morphologische Beurteilung der Kerne. Beim programmierten Zelltod treten drastische Veränderungen im Kernbereich ein. Mit Hilfe der Hoechst 33258-Fluorochromierung (siehe 2.7.3.) lässt sich eine Beurteilung des Kernzustandes sehr einfach durchführen. Der verwendete Farbstoff färbt vitale Zellen relativ schwach an, bei zunehmender DNA-Fragmentierung wird diese Färbung stärker.

Veränderungen wie Kernfragmentierung und -schrumpfung lassen sich ebenfalls gut mit dieser Färbung darstellen.



Abb. 3.2: Hoechstfluorochromierung (blau) von SKW-und Jurkatzellen. Die Pfeile weisen auf typische apoptotische Kernmorphologie, die durch Chromatinkondensierung, Kernfragmentierung und Schrumpfung der Zellkerne gekennzeichnet ist, hin.

SK: Kontrollzellen SKW;

JK: Kontrollzellen Jurkat;

SA: SKW-Zellen stimuliert mit 200 ng/ml α -Fas für 120 min

JS: Jurkatzellen stimuliert mit 1 μM Staurosporin für 240 min.

Die in den Abb. 3.1 und 3.2 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß in den verwendeten Zellsystemen mit Hilfe der ausgewählten Induktoren Apoptose ausgelöst werden kann. Die sichere Induktion von Apoptose ist die Voraussetzung für die im folgenden beschriebenen Experimente.

3.4. Nachweis der Aktinfragmentierung in apoptotischen Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde besonders intensiv das Aktin und dessen Veränderungen während apoptotischer Prozesse untersucht. Mit Hilfe des Fragmentierungsassays (2.6.1.), gelelektrophoretischer Methoden (siehe 2.4.2.), Immunoblotting (2.5.1. und 2.5.2.) und dem Einsatz markierter Aktinderivate konnte in Zellextrakten, hergestellt aus apoptotischen Zellen, Aktinbruchstücke dargestellt werden. In den folgenden Abbildungen ist die Fragmentierung von endogenem und exogenem Aktin, verursacht durch die Apoptoseinduktion, in unterschiedlichen Zellsystemen dargestellt.



Abb.3.3: Nachweis von endogenem β -Aktin-Fragmenten während der Apoptose in SKW-Zellen mit Hilfe zweier spezifischer Antikörper. SKW-Zellen wurden für 2 h mit 200 ng/ml α -Fas stimuliert, zu Zellextrakten aufgearbeitet und dem Fragmentierungsassay für 2 h unterzogen. Die Auftrennung erfolgte in 12 %igen SDS-PA-Gelen. Anschließend erfolgte ein Westernblot-Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran Mit dem Antikörper gegen den C-terminus des Aktins sind neben der Hauptbande (ca. 41.5 kD) drei Fragmente (*) erkennbar. Mit dem N-terminalen Antikörper lassen sich neben der abnehmenden Hauptbande 1 Bruchstück (*) detektieren. Für dieses Experiment wurde 25 µg Gesamtprotein je Spur eingesetzt.

Bei der Fragmentierung von exogenem α -Aktin durch apoptotische Zellextrakte wurde das gleiche Schnittmuster gefunden wie bei dem in den Zellextrakten vorhandene, endogene β -Aktin. Bei der Verwendung des biotinylierten Aktinderivates (siehe Abb.3.4) konnte eine zusätzliche Bande detektiert werden. Dieser Unterschied kann eventuell durch die Bindungsstellen der hier verwendeten Antikörper (N-terminus und C-terminus) erklärt werden. Das zusätzliche Fragment besitzt wahrscheinlich keine der beiden Antikörper-Bindungstellen.



Abb.3.4: Nachweis von exogenem α -Aktin und seinen Fragmenten (*), welches zusammen mit Zellextrakten verschiedener Zelltypen (SKW- und Jurkatzellen) inkubiert wurde. Die Zellen sind zuvor mit unterschiedlichen apoptoseauslösenden Substanzen behandelt worden. Trotz Auslösung von Apoptose auf verschiedenen Induktionswegen ist das selbe Fragmentierungsmuster des Aktins erkennbar. Für dieses Experiment werden jeweils 20 µg Zellextrakt mit 0.1 µg biotinyliertem Aktin dem Fragmentierungsassay unterzogen (siehe 2.6.1.). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung in 12%igen SDS-PA-Gelen wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach einer Inkubation mit Streptavidin/Peroxidase-Komplex erfolgte die Anfärbung der Banden mit Diaminobenzidin verstärkt mit CoCl₂.

3.4.1. Charakterisierung der apoptotischen Aktinfragmente

Um die Lage der einzelnen Aktinfragmente zueinander zu bestimmen, wurden folgende Methoden eingesetzt:

Die Verwendung sequenzspezifscher Antikörper (C-terminaler AK: reagiert mit allen Aktin-Isoformen da das C-terminale Ende der Aminosäuresequenz des Aktins bei allen Aktinen gleich ist. Die N-terminalen AK's: reagieren spezifisch mit den Aktin-Isoformen, da in diesen Sequenzbereich die einzelnen Isoformen determiniert sind (siehe 2.5.2.).

Der Einsatz verschiedener Aktinderivate, wie biotinyliertes Aktin zur Bestimmung der Gesamtanzahl der Fragmente und Aktinen, die mit Fluorochromen markiert wurden die Aminosäurespezifisch binden (siehe 2.3.2.1., 2.3.2.2. 2.3.2.3. und 2.6.1.).

Die Auftrennung der einzelnen Fragmente erfolgte mit Hilfe gelelektrophoretischer Methoden (siehe 2.4.2.). Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurden vorgefärbte Molekulargewichtstandards verwendet.

Eine Ansequenzierung der einzelnen Fragmente konnte nicht durchgeführt werden, da sich die einzelnen Fragmente sich in einem Proteingemisch befanden.

3.4.2. Visualisierung aller Fragmente mit biotinyliertem **a**-Aktin

Zur Darstellung aller Aktinfragmente wurde biotinyliertes Aktin verwendet. Hierzu wurden pro Reaktionsansatz 0.1 μ g biotinyliertes Aktin mit Zellextrakten aus α -Fas stimulierten SKW-Zellen (20 μ g Proteingehalt) für 2h dem Fragmentierungsassay unterzogen. Nach der gelelektrophoretischen Trennung, Westernblot-Transfer und Darstellung der einzelnen Banden wurde das Molekulargewicht der einzelnen Fragmente bestimmt. (siehe Abb. 3.4)

Mit Hilfe dieser Technik konnten neben der Aktinhauptbande fünf weitere Fragmente identifiziert werden:

ca. 41.5 kD	Aktinhauptbande
ca. 40.0 kD	Fragment 1
ca. 34.0 kD	Fragment 2
ca. 32.0 kD	Fragment 3
ca. 28.0 kD	Fragment 4
ca. 11.0 kD	Fragment 5

Wie in Abbildung 3.4. gezeigt, kann bei der Inkubation von apoptotischen Zellextrakten mit dem biotinylierten Aktinderivat ein zusätzliches Fragment detektiert werden. Es ist identisch mit dem 28 kD schweren Fragment 4.

3.4.3. Bestimmung der einzelnen Aktinfragmente und deren Lage zueinander mit selektiv markierten Aktinen und sequenzspezifischen Antikörpern

Zur Bestimmung der Lage der Fragmente zueinander wurden unter anderem sequenzspezifische Antikörper eingesetzt. Hierzu wurden Zellextrakt-Aliquots von je 20 µg Protein, gewonnen aus apoptotischen SKW-Zellen dem Fragmentierungsassay unterzogen. Nach gelelektrophoretischer

Auftrennung der Proteine und Immunoblotting wurde die Größe der vorhandenen Aktinbruchstücke mittels der mit aufgetragenen Molekular-gewichtstandards ermittelt.

Es erfolgt eine Auflistung der Fragmente, die man mit einem Antikörper gegen das C-terminale Ende des Aktins detektieren kann (siehe Abbildung 3.3 C als Beispiel). Die Benennung der einzelnen Fragmente erfolgte nach der Bestimmung aller Fragmente durch das biotinylierte Aktin:

ca. 41.5 kD	Aktinhauptbande
ca. 40.0 kD	Fragment 1
ca. 28.0 kD	Fragment 4
ca. 11.0 kD	Fragment 5

Die folgenden Fragmente, welche man mit einem Antikörper gegen das N-terminale Ende des Aktins detektieren kann (siehe Abb. 3.3 N als Beispiel) sind nachstehend aufgelistet:

ca. 41.5 kD	Aktinhauptbande
ca. 34.0 kD	Fragment 2

Unter der Verwendung von exogen hinzugefügtem Gln 41 bzw. Cys 374 markiertem Aktin (0.5 μ g pro Ansatz und Spur) wurden folgende Fragmente direkt nach Fragmentierungsassay und Auftrennung in 12 %igen SDS-PA-Gelen mit Hilfe eines UV-Transilluminators detektiert (Abb. 3.5).



CA 0.5 μg Cys 374-Aktin
CK 20 μg Kontroll-Zellextrakt + CA
CF 20 μg apoptotischer Zellextrakt + CA
GK 20 μg Kontroll-Zellextrakt + GA
GF 20 μg apoptotischer Zellextrakt + GA
GF 0.5 μg Gln 41 Aktin
M Marker

Abb.3.5: Nachweis von Aktinfragmenten (*) mit Hilfe fluoreszenzmarkierten Aktine. Die Visualisierung erfolgte nach dem Fragmentierungsassay und der SDS-Gelelektrophorese mit Hilfe eines UV-Transilluminators.

In der folgenden Aufstellung sind alle Fragmente, die mit den Fluorochrom markierten Aktinderivaten detektiert werden konnten, aufgelistet. Wie schon in den vorhergehenden Aufstellungen sind die einzelnen Fragmente nach den Fragmenten, die mit Hilfe des biotinylierten Aktins detektiert werden konnten, benannt:

Cys-374-Aktin	Gln-41-Aktin	
ca.41.5 kD	ca. 41.5 kD	Hauptbande Aktin
	ca. 40.0 kD	Fragment 1
	ca. 34.0 kD	Fragment 2
	ca. 32.0 kD	Fragment 3
ca. 11.0 kD		Fragment 5

In der darauffolgenden Graphik sind alle Fragmente ihrer Lage entsprechend zugeordnet dargestellt:



Abb.3.6: Graphische Darstellung der Lage der einzelnen Aktinfragmente erzeugt durch apoptotische Zellextrakte. Wie aus der Zeichnung ersichtlich, sind zwei eindeutige Schnittstellen vorhanden: 11 kD und 40 kD vom C-terminalen Ende aus betrachtet. Eine weitere Schnittstelle wird bei ca. 28 kD (in Klammern) vermutet. Hierzu konnte das N-terminale "Gegenstück" mit den vorhandenen Mitteln nicht detektiert werden.

3.4.4. Untersuchung welche Form des Aktins (globulär oder filamentär) während apoptotischer Prozesse geschnitten wird

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem untersucht, welche Form des Aktins, die globuläre oder die filamentäre Form, während apoptotischer Prozesse prozessiert wird. Hierzu wurden Zellextrakt-Aliquots mit jeweils 1 μ g exogenem α -Aktin in der polymerisierten oder der monomeren Form versetzt (Abb. 3.7 A). Nach Durchführung des Fragmentierungsassays und elektrophoretischer Auftrennung der Proben erfolgte die Detektion des exogen hinzugefügten Aktins mit Hilfe eines anti- α -Aktin-Antikörpers. In Abb. 3.7. B wurde filamentäres Aktin eingesetzt, welches zuvor mit Phalloidin stabilisiert worden ist.

Die gezeigten Immunoblots zeigen, daß nur G-Aktin während apoptotischer Prozesse geschnitten wird.



Abb. 3.7: Immunoblots zum Nachweis das während apoptotischer Prozesse G-Aktin geschnitten wird. Zur Durchführung dieses Experiments wurden 20 μ g Zellextrakt aus SKW-Zellen mit 1 μ g exogenem α -Aktin einem Fragmentierungsassay unterzogen. Nach der Proteinauftrennung erfolgte eine spezifische Anfärbung des hinzugefügten α -Aktins mit Hilfe eines Antikörpers. In A wurde Aktin verwendet, welches durch 2 mM MgCl₂ und 0.1 M KCl zur Polymerisation gebracht wurde. In Spur 3 (G-Aktin) ist eine Verminderung der Aktinhauptbande (*) erkennbar.. In B wurde F-Aktin verwendet, welches durch Phalloidin stabilisiert ist.. Nur in Spur 3 wo G-Aktin eingesetzt wurde, ist Aktinabbau (**) erkennbar.

A:	1	α-Aktin	B:	1 Kontroll-Extrakt	+
phallA	Aktin				
	2	Kontroll-Extrakt + G-Aktin	2	α -Fas-Extrakt + phallAktin	
	3	Kontroll-Extrakt + F-Aktin	3	α -Fas-Extrakt + G-Aktin	
	4	α -Fas-Extrakt + G-Aktin	М	Marker	
	5	α -Fas-Extrakt + F-Aktin			

3.4.5. Verlust von F-Aktin in der Zelle während

apoptotischer Prozesse

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wird während apoptotischer Prozesse nur G-Aktin geschnitten, während die filamentäre Form hingegen nicht fragmentiert werden kann. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, daß F-Aktin durch die Apoptose vermehrt zu G-Aktin abgebaut wird und somit das in der Zelle vorliegende Gleichgewicht, wie in der Einleitung beschrieben, zwischen Aktinmonomeren und -filamenten gestört ist. In einem weiteren Experiment wurde die F-Aktinverteilung innerhalb der Zelle im Verlauf apoptotischer Prozesse untersucht. Hierzu wurden Jurkat- und SKW-Zellen mit und ohne Induktion des programmierten Zelltodes mit Paraformaldehyd fixiert und F-Aktin mit Hilfe TRITC-markiertem Phalloidin spezifisch dargestellt.

Um die Kernmorphologie der einzelnen Zellkerne beurteilen zu können wurden die Zellen mit Hoechstfarbstoff (siehe 2.7.3.) gegengefärbt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes welches mit einer hochauflösenden Videokamera gekoppelt ist. Die einzelnen Aufnahmen erfolgten unter den gleichen Einstellungen des verwendeten Systems.

Wie aus Abb. 3.8. ersichtlich, sind Kontrollzellen mit einen einem deutlichen F-Aktinring umgeben. In Zellen die sich im Stadium des programmierten Zelltodes befinden, ist zum Teil überhaupt kein F-Aktin mit der hier angewendeten Methode mehr nachweisbar. Der Verlust des nachweisbaren F-Aktin-Systems könnte zum Teil die drastischen morphologischen Änderungen erklären denen apoptotische Zellen unterliegen.



Abb. 3.8: Darstellung von F-Aktin mit Hilfe von TRITC-Phalloidin (rot) und der Kernmorphologie mit Hoechstfarbstoff (blau) in unterschiedlichen Zellsystemen (J = Jurkat; S = SKW). Die Induktion von Apoptose erfolgte in den SKW-Zellen mit 200 ng α -Fas/ml Zellsuspension (A) und in den Jurkatzellen mit 1 μ M Staurosporin (S). Während bei den Zellen ohne Behandlung (SK und JK) deutliche F-Aktinringe zu sehen sind, sind bei den apoptotischen Zellen (SA und JS) nach 150 min Induktionszeit diese Ringe völlig verschwunden bzw. nur noch bruchstückhaft vorhanden

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse wurde versucht, das G-Aktin mit FITC-markierter DNase I in den Zellen zu markieren. Diese Methode erbrachte keine eindeutigen Ergebnisse.

3.4.6. Einordnung der Aktinfragmentierung in den zeitlichen Ablauf der Apoptose

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Aktinfragmentierung während des programmierten Zelltodes ist die zeitliche Einordnung dieses Vorganges im gesamten Prozeß. Wie in der Einleitung dargestellt wird der physiologische Zelltod in drei Phasen eingeteilt:

die Signalphase: Beinhaltet die Auslösung der Apoptose durch verschiedene Stimuli. Bei der Induktion des programmierten Zelltodes durch Fas ist diese Phase nur einige Minuten lang (Aktivierung des DISC).

die latente Phase: Sie ist gekennzeichnet durch die Aktivierung apoptosespezifischer Enzyme. Sie dauert bei der Fas-induzierten Apoptose ca. 10-15 min.

die Exekutionsphase: Sie ist charakterisiert durch den enzymatischen Abbau apoptosespezifischer Substrate wie PARP, Lamine, Catenine... und Phagozytierung der Zellreste

Aufgrund des relativ späten Nachweises der ersten Aktinfragmente nach 30 min des Induktionsbeginns in SKW-Zellen, die mit anti-Fas stimuliert wurden, kann man davon ausgehen, daß die Aktinfragmentierung in der letzten der drei Phasen, wie sie von Sammejima et al 1998 A beschrieben wurden, angesiedelt ist. Wie aus verschiedenen Ergebnissen ersichtlich, liegt der Höhepunkt der Aktinfragmentierung bei SKW-Zellen ca. 90 min nach Induktionsbeginn (siehe Abb. 3.9). Der Nachweis von Aktinfragmenten fällt zudem mit Beginn der größten morphologischen Veränderung zusammen (siehe Abb. 3.10)



Abb. 3.9: Westernblot zur zeitlichen Verfolgung der Aktinfragmentbildung in Zellextrakten aus apoptoseinduzierten SKW-Zellen. Über den Spuren steht der jeweilige Zeitpunkt der Induktion. Die ersten Spaltprodukte (dicker Pfeil) werden ca. 30-50 min nach Einleitung der Apoptose-induktion durch 200 ng α -Fas/ml Zellsuspension sichtbar. Des weiteren wird deutlich, daß nicht das gesamte Aktin abgebaut wird. Pro Spur wurden 20 µg Protein aufgetragen. Die spezifische Markier-ung des endogen vorkommenden Aktins erfolgte mit Hilfe eines Antikörpers gegen das C-terminale Ende des Aktins. Die Aktinhaupbande ist durch den dünnen Pfeil markiert.
Wie aus Abb. 3.9. und der folgenden Abb.3.10 ersichtlich, fällt der Zeitpunkt der Aktinfragmentierung mit dem Verlust des F-Aktins zusammen.

Ein weiteres Argument für die hier vorgenommene zeitliche Einordnung der Aktinfragmentierung sind neben den Westernblot-Analysen auch die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Maximum der Caspase-3 Aktivität in SKW-Zellen (siehe Abb. 3.17).



Abb. 3.10: Darstellung des zeitlichen Ablaufes der morphologischen Veränderungen in SKW-Zellen nach Behandlung mit 200 ng α -Fas/ml Zellsuspension. Die Zellen wurden fixiert nach der angegebenen Dauer der Inkubation mit dem Apoptosestimulanz. Nach der Färbung mit TRITC-Phalloidin (rot, F-Aktin) und Hoechstfarbstoff (blau, Zellkerne) wurden die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes dargestellt. Deutlich erkennbar sind die ersten morphologischen Veränderungen nach ca.30-45 min die mit der Darstellung der Aktinfragmente im Westernblot (siehe Abb.3.9) korrelieren.

3.4.7. Sedimentationsexperimente zur Überprüfung der Funktionalität der Aktinfragmente

Wie bei Kiessling et al (1995) beschrieben können Aktinfragmente die von Substilisin, einer aktinfragmentierenden Protease, geschnitten worden sind immer noch "zusammenkleben" und sogenannte Cores bilden die physiologisch aktiv sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob das durch apoptotische Prozesse fragmentierte Aktin auch zu einer solchen Corebildung neigt. Die Aktivität des durch apoptotische Prozesse gespaltenen Aktins wurde mit Hilfe sogenannter Sedimentationsexperimente (siehe 2.6.2.) überprüft. Diese Versuche basieren auf der Tatsache,

daß nur Aktin polymerisieren kann, welches das Nukleotid ATP binden kann. Die Polymerisation kann durch Gabe von KCl und MgCh und einer Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur initialisiert werden. Mit einer Ultrazentrifugation können dann G-Aktin und F-Aktin voneinander separiert werden. Desweiteren können sich im F-Aktinpellet auch Proteine und Aktinfragmente befinden, die denaturiert sind und somit ausfallen (siehe Abb. 3.11)

Wie aus Abb. 3.11 ersichtlich befinden sich die apoptotischen Aktinspaltprodukte im F-Aktin-Pellet. Der endgültige Nachweis, daß das fragmentierte Aktin denaturiert und somit nicht mehr physiologisch aktiv sein kann, wurde mit Hilfe einer Ultrazentrifugation ohne vorheriger Polymerisation erbracht (siehe Abb.3.12).



Abb. 3.11: Sedimentationsexperiment zur weiteren Charakterisierung der Aktinfragmente. Pro Ansatz wurden Zellextrakte (20 µg Protein) aus unbehandelten (K) und apoptotischen (A) SKW-Zellen mit 0.5 µg fluoreszenzmarkierten Aktin (G = Gln-41-Aktin, C = Cys-374-Aktin) vermischt. Nach dem zweistündigen Fragmentierungsassay wurde durch Zugabe von 0.1 M KCl und 2mM MgCl₂ die Polymerisation eingeleitet. Nach einer Ultrazentrifugation wurden der G-Aktin-haltige Überstand (Ü) und das Pellet (P), indem sich das F-Aktin befindet, getrennt auf ein 12% iges SDS-PA-Gel aufgetragen. Überraschenderweise wurden die Fragmente (*) im Pellet gefunden, was auf Denaturierung der Bruchstücke hinweist. Im Überstand hingegen ist kaum G-Aktin zu finden, welches die Ergebnisse aus Abschnitt 3.4.4. nochmals bestätigen.



Abb. 3.12: Nachweis, daß die Aktinbruchstücke denaturiert sind. Jeweils 15 µg Extrakt aus SKW-Zellen wurden nach dem Fragmentierungsassay ohne vorherige Polymerisation einer Ultrazentrifugation unterzogen. Nach der Auftrennung der Proteine aus Pellet und Überstand und dem Transfer auf Nitrocellulose erfolgte die spezifische Markierung des endogenen Aktins mit einem Antikörper, der mit dem C-terminalen Ende reagiert. Wie ersichtlich sind alle Fragmente pelletierbar und somit denaturiert.

3.5. Charakterisierung und Identifizierung der Aktinfragmentierenden Protease

In vorhergehenden Abschnitt 3.4 dieser Arbeit wurde dargestellt, daß Aktin während der Apoptose in den Lymphblastem-Zellinien SKW 6.4 und Jurkat nach Auslösung des programmierten Zelltodes fragmentiert wird. Das Fragmentierungsmuster ist trotz Auslösung über unterschiedliche Signalwege und Verwendung verschiedener Zellinien, identisch. Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, daß es sich bei der Aktinfragmentierung während des physiologischen Zelltodes um einen universellen Prozeß handelt, der in allen apoptotischen Zellen abläuft.

In einem weiteren Schritt wurde nun versucht, die fragmentierende Protease zu identifizieren und zu charakterisieren.

Schon zu Beginn der Untersuchungen wurde vermutet, daß die gesuchte Protease ein Mitglied der Caspase-Familie ist. Arbeiten von Casciola-Rosen et al 1994 und Mashima et al 1995 über andere Substrate der Caspasen während der Apoptose unterstützen die Hypothese.

3.5.1. Identifizierung der Aktin fragmentierenden Protease mit Hilfe unterschiedlicher Proteaseinhibitoren

Um die apoptotische Aktin schneidende Protease zu identifizieren, wurden unter-schiedliche Proteaseinhibitoren verwendet. Hierfür wurden folgende Inhibitoren aufgrund ihrer Eigenschaften gewählt:

TPCK: Irreversibler Hemmstoff für Chymotrypsin. Desweiteren hemmt TPCK eineVielzahlweiterer Serin- und Cysteinproteasen. Dieser Inhibitor wurde aufgrundseinerEigenschaften, Cysteinproteasen zu hemmen, zu denen auch die Caspasenzählen, ausgewählt.TLCK: Es hat ein ähnliches Wirkungsspektrum wie TPCK. Nur kann es Chymotrypsin

nicht hemmen, hemmt aber dafür Trypsin. TLCK wurde aufgrund der selben Kriterien wie für das TPCK, für die hier durchgeführten Inhibitionsexperimente ausgewählt. Iodoacetamid: Diese Substanz modifiziert Cysteinreste irreversibel. Dieser Hemmstoff

wurde ausgewählt, da im aktiven Zentrum der Caspasen ein Cysteinrest vorhanden ist, der für die Funktionalität des Enzyms eine große Rolle spielt.

N-Ethylmaleimide: modifiziert ebenfalls Cysteinreste irreversibel. Diese Substanz wurde aufgrund der selben Kriterien, wie sie für das Iodoacetamid beschrieben sind, ausgewählt.

Pefabloc: Ist ein Breitbandinhibitor für Serinproteasen, der eine minimale Einwirkung auf das Zellwachstum hat. Dieser Inhibitor wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

- Pepstatin: Inhibiert Aspartatproteasen, wie zum Beispiel Pepsin, Renin, Cathepsin D und Chymosin. Dieser Inhibitor wurde deswegen gewählt, da er Proteasen hemmt die hinter Aspartatresten schneidet, wie es die Caspasen tun.
- YVAD-cho: Ist ein Tetrapeptid-Derivat, welches spezifisch die Aktivität von Proteasen der Caspase-1-Familie hemmt.
- DEVD-cho: Ist ein Tetrapeptid-Derivat, welches spezifisch die Aktivität von Proteasen der Caspase-3-Familie hemmt.

Die aufgelisteten Proteaseinhibitoren wurden auf zwei unterschiedliche Weisen, wie in 2.2.4. beschrieben, eingesetzt:

- "in vivo" der zu testende Inhibitor wurde mit den Zellen vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Apoptoseinduktion, die Aufarbeitung zu Zellextrakten, der Fragmentierungsassay mit oder ohne Zugabe von exogenem Aktin und der Nachweis der Aktinfragmente.
- "in vitro" der zu testende Inhibitor wurde zusammen mit Zellextrakten und exogen hinzugefügtem Aktin dem Fragmentierungsassay unterzogen. Nachfolgend wurden die Reaktionsansätze auf Aktinbruchstücke hin untersucht.

Die oben erwähnten Versuche wurden jeweils mit allen Inhibitoren und jeweils mit den SKWund Jurkatzellen unter Verwendung verschiedener Apoptoseinduktoren durchgeführt. Die genaue Versuchskonstellation ist bei den jeweiligen Abbildungen mit angegeben. Im Folgenden werden nur ausgewählte Ergebnisse dargestellt.

Die in Abb. 3.13 und Abb.3.14 dargestellten Hemmschemata weisen auf eine Beteiligung von Proteasen der Caspase-Familie bei der Aktinfragmentierung hin. Sie stimmen außerdem mit den Arbeiten von Casciola-Rosen et al 1994, Nicholson et al 1995, Fearnhead et al 1995, Mashima et al 1995 B und Darmon et al 1995 überein, die ähnliche Experimente mit anderen Caspase-Substraten wie PARP und U1-70 kD Protein, und in anderen Zellinien (HeLa, Osteosarcoma-Zellen, U 937-Zellen und Cos-Zellen) durchgeführt haben.

Diese Ergebnisse deuten auf ein universelles Schema der Apoptose hin.

Ergebnisse



Abb. 3.13:. Inhibitionsexperiment mit TPCK, TLCK und Iodoacetamid. SKW-Zellen wurden mit den genannten Substanzen für 5 h vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine 2-stündige Induktion von Apoptose mit 200 ng α -Fas /ml Zellsuspension ("in vivo"-Versuch). Nach der Aufarbeitung zu Zellextrakten wurden Aliquots mit 0.3 µg α -Aktin für 2 h einem Fragmentierungsassay unterzogen. Je 20 µg Protein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und auf Aktinbruchstücke hin mit Hilfe eines C-terminalen α -Aktin-Antikörpers untersucht. Wie aus der Abb. ersichtlich, haben die Substanzen TPCK, TLCK und Iodoacetamid hemmende Eigenschaften. Das in Spur 8 & 9 mit aufgetragene Ethanol diente als Lösungsmittel für die einzelnen Inhibitoren. Es zeigt keinerlei hemmende Effekte auf die Aktinfragmentierung (*) während apoptotischer Prozesse.



Abb. 3.14: Inhibitionsexperiment mit N-Ethylmaleimide, Pepstatin A und Pefabloc. Die Reaktionsansätze bestanden aus 20 μ g Zellextrakt gewonnen aus SKW-Zellen, dem jeweiligen Proteaseinhibitor und 0.3 μ g α -Aktin ("in vitro"-Versuch). Nach dem Fragmentierungsassay, SDS-PAGE und Westernblotting erfolgte der Nachweis der Aktinfragmente (*) mit einem polyclonalen Antikörper, der mit dem C-terminalen Ende des Aktins reagiert.

Die hier eingesetzten Proteaseinhibitoren zeigen keinerlei Wirkung auf die Aktinfragmentierung während der Apoptose. Crossreaktionen des verwendeten Antikörpers sind mit + gekennzeichnet.

Durch den Einsatz spezifisch hemmender Tetrapeptid-Inhibitoren konnte die genaue Familienzugehörigkeit der aktinfragmentierenden Protease bestimmt werden. Da sich die Aktivität durch DEVD-cho unterbinden lässt, ist die apoptotische Aktin fragmentierende Protease ein Mitglied der Caspase-3-Familie (siehe Abb. 3.15 Spur 8).

Eine Zugehörigkeit zur Caspase-1-Familie konnte ausgeschlossen werden, da der selektiv hemmende Inhibitor YVAD-cho keinerlei hemmende Wirkung auf die aktinschneidende Protease zeigte (siehe Abb. 3.15 Spur 6).



Abb. 3.15: Inhibitionsexperimente zum Nachweis, der Zugehörigkeit der aktinfragmentierenden Protease zur Caspase-3-Familie. Hierzu wurden SKW-Zellen für 4 h mit den Inhibitoren DEVDcho und YVAD-cho vorinkubiert ("in vivo"-Experiment). Anschließend wurde mit 200 ng α -Fas/ml Zellsuspension Apoptose ausgelöst. Nach 2 h Inkubationszeit wurden die Zellen zu Extrakten aufgearbeitet. Aliquots dieser Zellextrakte (20 µg Protein pro Spur) wurden dem Fragmentierungsassay unterzogen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine und Westernblot-Transfer erfolgte die spezifische Anfärbung des Aktins und seiner Bruchstücke (*) mit Hilfe eines anti-Aktin-Antikörper, der mit dem C-terminalen Ende reagiert. Das in Spur 1 & 2 hinzugefügte DMSO diente als Lösungsmittel für die hier verwendeten Inhibitoren. Es hat in den eingesetzten Konzentrationen keine Wirkung auf den Verlauf des Experimentes.

Tabellarisch zusammengefaßt hatten die eingesetzten Proteaseinhibitoren folgende Wirkung auf die Aktinfragmentierung während apoptotischer Prozesse:

Inhibitor	Wirkung
ТРСК	hemmend
TLCK	hemmend
Iodoacetamid	hemmend
N-Ethylmaleimide	keine
Pepstatin A	keine
Pefabloc	keine
YVAD-cho	keine
DEVD-cho	hemmend

Um völlige Sicherheit darüber zu haben, daß die apoptotische aktinfragmentierende Protease ausschließlich die Caspase-3 (auch CPP-32 bzw. Apopain genannt) ist, wurde ein Kontrollexperiment mit MCF-7-Zellen, die aus einem Mammakarzinom isoliert worden sind, durchgeführt. Diese Zellen haben eine Deletion im Caspase-3 Gen und können somit keine aktive Caspase-3 ausbilden (Jänicke et al 1998). Wie aus Abb.3.16 ersichtlich, konnte in diesen Zelle keine Aktinfragmentierende Aktivität trotz Apoptoseinduktion nachgewiesen werden.



Abb. 3.16: Kontrollexperiment mit MCF-7-Zellen. Die konfluent wachsenden Zellen wurden mit den Apoptoseinduktoren CHX (10 μ g/ml), und Staurosporin (1 μ M) für jeweils 5 h behandelt und anschließend zu Zellextrakten aufgearbeitet. In Immunoblot A wurde Aktin (*) mit einem Antikörper, der gegen das C-terminale Ende gerichtet ist, angefärbt. Es konnten keine Bruchstücke trotz durchgeführtem Fragmentierungsassay nachgewiesen werden. In Immunoblot B wurde ein polyklonaler Antikörper gegen CPP 32 verwendet. Es konnte kein CPP-32, weder die inaktive Proform noch die geschnittene aktive Form, nachgewiesen werden. Pro Spur wurden jeweils 20 μ g Protein aufgetragen. Die mit + gekennzeichneten Banden sind Crossreaktionen des 2. Antikörpers.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit deutlich gezeigt werden, daß die Aktinfragmentierung im Rahmen der Apoptose, in den Lymphblastemzellinien SKW 6.4 und Jurkat durch ein Mitglied der Caspase-3-Familie, wahrscheinlich von CPP 32/Apopain/Yama bewerkstelligt wird.

3.5.2. Fluoreszenzphotometrische Messung der Caspase-3 Aktivität mit DEVD-AMC, einem synthetischem Casspase-3-Substrat.

Mit Hilfe des Substrates DEVD-AMC lässt sich die Aktivität von Proteasen der Caspase-3-Familie sehr gut verfolgen. Zum einem lässt sich der zeitliche Ablauf der Aktivierung darstellen und zum anderen kann sie als Methode zum Vergleich der einzelnen Caspase-3-Aktivitäten in verschiedenen Zellinien verwendet werden.

Die Durchführung dieses Versuches erfolgte nach der in 2.6.4. beschriebenen Methode mit frisch präparierten Zellextrakten.

Wie in den Abb. 3.17 und 3.18 erkennbar, sind in SKW- und Jurkatzellen unterschiedliche Aktivitäten nachweisbar. In Jurkatzellen ist die Aktivität um ca. 27% geringer als in SKW-Zellen. Desweiteren werden zum Erreichen der maximalen Aktivität, verschiedene Zeit-räume benötigt (SKW: ca. 100 min; Jurkat: ca. 200 min).

Dieser Unterschied in Erreichen der maximalen Aktivität lässt sich auf die Verwendung unterschiedlicher Signalwege zur Auslösung der Apoptose zurückführen, die bis zur Aktivierung von Proteasen der Caspase-3-Familie verschieden lange Zeiträume brauchen. Während die Induktion von Apoptose über den Fas-Rezeptor in SKW-Zellen ein sehr schneller und direkter Weg ist (siehe Abb. 1.2), ist es möglich, daß bei der Induktion des physiologischen Zelltodes mit Staurosporin in Jurkatzellen, weitere Schritte in der Signalkaskade zwischengeschaltet sind. Der zum Durchlaufen dieser Signalkette größere Zeitaufwand führt zu einer Aktivierung der Proteasen der Caspase-3-Familie zu einem späterem Zeitpunkt.

Der geringere Anteil an aktiven Proteasen der Caspase-3-Familie in Jurkatzellen, lässt sich auf eine wahrscheinlich geringere Exprimierung von Caspase-3-Proenzym zurückführen.



Abb.3.17: Nachweis der Caspase-3-Aktivität in SKW-Zellen. Gemessen wurde der Umsatz des synthetischen Substrates DEVD-AMC in zeitlicher Abhängigkeit der Apoptoseinduktion durch 200 ng α -Fas/ ml Zellsuspension. Wie aus der Grafik ersichtlich, ist nach 30 min der erste Nachweis von Caspase-3-Aktivität möglich. Nach ca. 100 min tritt eine Sättigung der Aktivität ein.zeigt Eine Eichgerade, die mit dem freien Fluorochrom AMC erstellt wurde hatte eine Steigung von 56.87. Dieser Wert wird zur Berechnung der Aktivität in Units (nmol SU/h = nmol Substratumsatz pro h) benötigt.



Abb. 3.18: Nachweis der Caspase-3-Aktivität in Jurkatzellen. Gemessen wurde der Umsatz des Substrates DEVD-AMC in zeitlicher Abhängigkeit der Apoptoseinduktion durch 1 μ M Staurosporin. Im Vergleich mit der Aktivität bei SKW-Zellen sind erste Substratumsätze wesentlich später meßbar (nach ca. 60 min). Auch wird das Aktivitätsmaximum erst nach ca. 200 min erreicht. Dies ist vermutlich auf die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege durch verschiedene Induktoren zurückzuführen (α -Fas: Aktivierung über den DISC; Staurosporin: Auslösung von Apoptose durch Hemmung der Phosphokinase C). Auch ist die maximal erreichte Aktivität um ca. 27 % geringer als bei SKW-Zellen.Die Steigung der Eichgerade, die dem freien Fluorochrom AMC erstellt worden ist, beträgt 56.58 und wurde für die Berechung der Units benötigt (nmol SU/h = nmol Substratumsatz pro h).

3.6. Versuch zur Überprüfung, ob Calpain bei der Aktinfragmentierung während apoptotischer Prozesse eine Rolle spielt

In der Arbeit von Villa et al 1998 wird in neuronalen Zellen aus Ratte und Huhn nachgewiesen, daß Calpain, eine Aktin schneidende Protease, und nicht CPP 32/Apopain für die Aktinfragmentierung während des programmierten Zelltodes verantwortlich ist. Es wird vermutet, daß Calpain durch Ca²⁺-Einstrom in die Zelle, wie für die Apoptose beschrieben, aktiviert werden kann (siehe Abb.1.2). Als Schnittstelle wurde die DNase I bindende Schleife beschrieben, die in der Subdomäne 2 des Aktins lokalisiert ist. Neben der Aktinfragmentierung wird vermutet, daß das Calpain eine Rolle bei der Caspase-Aktivierung über den Weg der Transglutaminasen eine Rolle spielt (siehe Abb. 1.2.).

Villa et al 1998 fanden zudem eine Korrelation zwischen dem DNA-Abbau und dem Aktinabbau. Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob Calpain einen Einfluß auf das Aktin und auf die Aktivierung der Caspasen während apoptotischer Prozesse hat. Hierzu wurden Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Calpain-Inhibitor II für 24 h vorbehandelt und anschließend einem apoptoseauslösenden Reiz ausgesetzt. Nach der Aufarbeitung der Zellen zu Extrakten und dem Fragmentierungsassay wurden die einzelnen Reaktionsansätze auf Aktinfragmente und aktives CPP 32/Apopain hin untersucht.

Wie in Abb. 3.19 und 3.20 gezeigt wird, hat in SKW-Zellen der verwendete Calpain-Inhibitor II keinerlei Wirkung auf das Fragmentierungsmuster von Aktin während der Apoptose. Ebenso konnte dargestellt werden, daß der verwendete Inhibitor keinen Effekt auf die Ausbildung aktiver CPP 32/Apopain hat. Desweiteren wurden mit diesem Experiment nochmals die Ergebnisse aus Abschnitt 3.5.1.bestätigt. Der Aktinabbau läßt sich nur selektiv mit dem Caspase-3-Inhibitor DEVD-cho hemmen.

In Jurkatzellen wurde nach Staurosporininduktion das gleiche Resultat erzielt (Daten sind hier nicht dargestellt).

Aufgrund der hier durchgeführten Experimente kann vermutet werden, daß Calpain keine Rolle bei der Apoptose in Lymphblastem-Zellinien spielt.



Abb. 3.19: Überprüfung des Einflusses von Calpain auf den Aktinabbau während des programmierten Zelltodes in SKW-Zellen (F = Zellextrakte aus α -Fas induzierten SKW-Zellen). Der Calpain-Inhibitor II (Cal II) zeigte keinerlei Wirkung auf die Bildung von Aktinbruchstücken (*). Nach Vorbehandlung der SKW-Zellen mit Cal II, Apoptoseinduktion, Gewinnung von Zellextrakten, Fragmentierungsassay erfolgte die Darstellung der Fragmente im Westernblot mit Hilfe verschiedener Aktin-Antikörper. DEVD-cho, ein spezifischer Caspase-3-Familie-Inhibitor, hingegen zeigt eine stark unterdrückende Wirkung auf die Aktinfragmentierung. Pro Spur wurden jeweils 20 μ g Protein eingesetzt. Der Nachweis der endogenen Aktinfragmente erfolgte mit den folgenden Antikörpern:

A) gegen das C-terminale Ende von Aktin und B) gegen das N-terminale Ende des β -Aktins.



Abb. 3.20: Überprüfung des Einflusses von Calpain auf die Ausbildung aktiver CPP32/Apopain während der Apoptose hat. Für diesen Versuch wurden SKW-Zellen mit den Inhibitoren für 24 h vorinkubiert, mit 200 ng α -Fas/ ml Zellsuspension für 2 h induziert und zu Extrakten aufgearbeitet. Jeweils 20 µg Protein wurden aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Anfärbung erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper, mit dem die Proform (*) <u>und</u> die aktive Form (Doppelpfeilspitze) von CPP 32/Apopain erkannt werden kann. Wie ersichtlich zeigt der Inhibitor Cal II keinerlei Effekt auf die Ausbildung aktiver CPP32/Apopain.DEVD-cho hingegen hemmt die aktive Form (siehe Abb. 3.19 Spur 2A und 2B) und nicht die Bildung von aktivem CPP 32/Apopain aus der Proform.

(F = Zellextrakte hergestellt aus α -Fas behandelten SKW-Zellen)

3.7. Schneidet FLICE Aktin?

In Zusammenarbeit mit der AG Krammer DKFZ Heidelberg, wurden folgende Experimente durchgeführt.

FLICE (FADD-Homologous ICE/CED-3-like Protease) ist die erste aktive Caspase, wenn die Apoptose via den Fas-Rezeptor und den DISC (death inducing signalling complex) ausgelöst wird (Muzio et al 1996). Die inaktive Proform des FLICE ist Bestandteil des DISC, der desweiteren aus den cytosolischen Anteilen des Fas-Rezeptors, FADD und CAP 3 besteht. Im aktivierten DISC wird FLICE durch Proteolyse aktiviert und freigesetzt. In den hier dargestellten Versuchen wurde überprüft, ob FLICE, ein Mitglied der Caspase-3-Familie und erste aktive Caspase in der Fas-Signalkette in der Lage ist, Aktin zu schneiden.

Hierzu wurde biotinyliertes Aktin mit gereinigten und aktivierten DISC zusammen für mindestens 24 h unter leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Überprüfung des Aktins auf Fragmentierung hin.

Der gereinigte DISC aus SKW-Zellen wurde im Labor der AG Krammer folgendermaßen hergestellt (Die genaue Aufarbeitung ist in Muzio et al 1996 beschrieben):

Pro Ansatz werden ca. 1.4 x 10¹⁰-Zellen benötigt. Die SKW-Zellen werden mit α -Fas (DISC+) bzw. einem an den CD 95 bindenden aber nicht induzierenden Antikörper (DISC-) behandelt. Nach 10 min Inkubation mit den Antikörpern wurden die Zellen lysiert. Es erfolgte die Präzipation des DISC mit Protein A Sepharose-Beads. Nach mehrmaligem Waschen wurde der an die Beads gebundene DISC mit 0.1 µg biotinyliertem Aktin für 24 h unter leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Als interne Kontrolle, ob der DISC einwandfrei funktioniert, wurde je ein Ansatz mit ³⁵S-markiertem ProFLICE inkubiert. Die Ausbildung von aktivem FLICE im DISC+-Ansatz zeigt, daß die Signalkette fehlerlos funktioniert. Der Versuch wurde mit biotinyliertem Aktin durchgeführt. Vorversuche haben ergeben , daß aufgrund der Induktion ein hoher Gehalt an Antikörpern (anti-Fas- und Kontrollantikörper) Probleme bereitet beim immunologischen Nachweis von Skelettmuskel-Aktin.



Abb.3.21: FLICE-Assay mit jeweils 0.1 µg biotinyliertem Aktin. Die Präparation der Versuchsansätze erfolgte nach der im Text beschriebenen Methode. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des Überstandes der einzelnen Reaktionsansätze und Westernblotting wurde die Membran mit Streptavidin/Peroxidase-Komplex inkubiert und mit DAB angefärbt. Die Aktinbande im DISC+-Ansatz (Spur 4) erscheint breiter und etwas tiefer zu liegen als die Bande in den Negativkontrollen. Wie aus Abb. 3.21 ersichtlich, wurde vermutet daß Aktin durch FLICE, der ersten aktiven Protease der Fas-Signalkette, eventuell prozessiert wird. Aufgrund dieses Ergebnis wurde versucht, mit Hilfe von Mirkrosequenziermethoden die möglicherweise vorhandenen Bruchstücke anzusequenzieren. Die Ansequenzierung wurde in Zusammenarbeit mit dem proteinanalytischen Labor der medizinischen Fakultät unter der Leitung von Prof. Meyer an der Ruhr-Universität-Bochum durchgeführt.

Hierzu wurde ein FLICE-Assay mit 1 µg biotinyliertem Aktin durchgeführt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine unter Verwendung eines glycinfreien und entgasten Blotpuffer auf eine stark hydrophobe Millipore PDVF-Membran transferiert (siehe 2.5.1.). Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Amidoschwarz. Die betreffende Bande wurde ausgeschnitten, die Proteine eluiert und auf den Microsequenzer gegeben. Mehrere Analysen dieser Art erbrachten keine FLICE-typischen Aspartat-Schnittstellen. Aufgrund der gefundenen Ergebnisse kann man davon ausgehen, daß Aktin kein natürliches Substrat von FLICE während apoptotischer Prozesse ist.

- 1 DEDETTALV CDNGSGLVK AGFAGDDAPR AVFPSIVGRP
- 40 RHQGVMVGMG QKDSYVG**DEA Q**SKRGIL**TLK YPIEHGI**ITN
- 80 WDDMEKIWHH TFYNELRVAP EEHPTLLTEA PLNPKANREK
- 120 MTQIMFETFN VPAMYVAIQA VLSLYASGRT TGIVLDSGDG
- 160 VTHNVPIYEG YALPHAIMRL DLAGRDLTDY LMKILTERGY
- 200 SFVTTAEREI VRDIKEKLCY VALDFENEMA TAASSSSLEK
- 240 SYELPDGQVI TIGNERFRCP ETLFQPSFIG MESAGIHETT
- 280 YNSIMKCDID IRKDLYANNV MSGGTTMYPG IADRMQKEIT
- 320 ALAPSTMKIK IIAPPERKYS VWIGGSILAS LSTFQQMWIT
- 360 KQEYDEAGPS IVHRKCF

Abb. 3.22: Darstellung der Aminosäuresequenz von α -Aktin aus der Skelettmuskulatur des Kaninchens. In Rot hervorgehoben, ein Beispiel der durch die Ansequenzierung gefundenen Bruchstücke. Trotz mehrerer Versuche konnten keine eindeutigen Schnittstellen hinter Aspartatresten (D) detektiert werden.

3.8. Spielen Proteasen aus der Caspase-Familie eine Rolle bei der F-Aktindepolymerisierung ?

Nachdem nachgewiesen wurde, daß G-Aktin durch CPP 32/Apopain während apoptotischer Prozesse geschnitten wird (siehe Abschnitt 3.5.1.) und F-Aktin während des programmierten Zelltodes in G-Aktin abgebaut wird (siehe Abschnitt 3.4.5.), wurde als Nächstes untersucht, ob

eventuell Proteasen der Caspase-3 und Caspase-1-Familie eine Rolle bei der F-Aktinpolymerisierung spielen.

Hierzu wurden Zellen mit den Protease-Inhibitoren 4h mit jeweils 1 μ M YVAD-cho und DEVDcho vorinkubiert. Nach erfolgter Induzierung der Apoptose, wurden die Zellen nach der Fixierung mit Hilfe von TRITC markiertem Phalloidin auf ihren F-Aktin-Gehalt hin untersucht. Eine Gegenfärbung mit Hoechst 33258 erlaubte eine Beurteilung der Kernmorphologie und somit den Nachweis von Apoptose.

Wie aus den Abbildungen 3.24 und 3.25 ersichtlich, scheinen Proteasen aus der Caspase-1 und Caspase-3-Familie keine Rolle bei der F-Aktinumwandlung zu G-Aktin zu spielen. Desweiteren ist sehr deutlich zu sehen, daß die hier verwendeten Caspase-Inhibitoren ebenfalls keinen Einfluß auf die Kernfragmentierung haben. Auch eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen F-Aktin und G-Aktin aufgrund des G-Aktinabbaus durch CPP32/Apopain (siehe Abb. 3.15 Spur 8, Hemmung der Aktinfragmentierung während der Apoptose durch DEVD-cho) kann mit diesem Experiment ausgeschlossen werden. Ein weiteres Ergebnis welches diese Hypothese unterstützt, daß der Verlust des F-Aktins in der apoptotischen Zelle nur geringfügig durch die G-Aktinfragmentierung beeinflußt wird, ist die nur partielle Proteolyse des G-Aktins, wie sie auch von Mashima et al 1999 beschrieben wird (siehe Abb.3.3.).



Abb. 3.23: Nachweis von F-Aktin (rot) und Darstellung der Kerne (blau) in SKW-Zellen. In SK sind unbehandelte Zellen dargestellt, bei denen der F-Aktinring ausgeprägt ist. Apoptotische Zellen, wie in SA dargestellt, zeigen deutlich fragmentierte Kerne und den Verlust des F-Aktins. Zellen die vor der Apoptoseinduktion (α -Fas) mit den Caspase-Inhibitoren YVAD-cho (SY) und DEVD-cho (SD) vorinkubiert worden sind, zeigen die gleichen morphologischen Merkmale wie apoptotische Zellen (SA).



Abb. 3.24: Nachweis von F-Aktin (rot) und Darstellung der Kerne (blau) in Jurkatzellen. Während unbehandelte Zellen (JK) einen ausgeprägten F-Aktinring zeigen, haben Zellen, bei denen mit 1 μ M Staurosporin Apoptose ausgelöst wurde, diesen Ring verloren. Auch Zellen die vor der Apoptoseinduktion mit den Caspasehemmern YVAD-cho (JY) und DEVD-cho (JD) behandelt wurden, zeigen eine typische apoptotische Morphologie.

3.9.Untersuchung ob Gelsolin, ein aktinsequestrierendes Enzym, eine Rolle beim F-Aktinabbau in Lymphblastemzellinien spielt

Gelsolin ist ein aktinbindendes Protein, welches in cytoplasmatischer und in sekretorischer Form im Blutplasma nachgewiesen wurde (Yin et al 1981, Lind et al 1982). Die physiologische Funktion der plasmatischen Form dieses Proteins wird darin gesehen, das zirkulierende F-Aktin, welches z.B. bei Zellschädigung freigesetzt wird, zu fragmentieren und damit die Viskosität des Blutes herabzusetzen.

Kothakota et al 1997 stellen anhand ihrer Untersuchungsergebnisse die Hypothese auf, daß Gelsolin auch eine Rolle bei den morphologischen Veränderungen in neutrophilen Blutzellen während der Apoptose spielt. Die Autoren zeigen in ihrer Arbeit, daß Gelsolin, ein Enzym welches die Depolymerisation von Aktinfilamenten Ca^{2+} -abhängig unterstützt, während apoptotischer Prozesse geschnitten wird. Das N-terminale Bruchstück, indem die Segmente 1 &

2 enthalten sind, zeigt depolymerisierende Eigenschaften die Ca²⁺-unabhängig sind. Diese Hypothese ist im Rahmen dieser Arbeit von Interesse da, wie im Abschnitt 3.8 beschrieben der Verlust von F-Aktin ein Prozeß ist, der ohne Beteiligung von Proteasen der Caspase-3-Familie abzulaufen scheint.

Die aufgrund dieser Theorie durchgeführten Versuche zeigten ein relativ überraschendes Ergebnis. Es konnte kein Gelsolin, weder sekretorisches noch cytoplasmatisches (siehe Abb.3.25) in den Lymphblastemzellinien Jurkat und SKW festgestellt werden. Somit kann ausgeschlossen werden, daß in den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellinien. das Gelsolin eine wesentliche Rolle bei den morphologischen Veränderungen während der Apoptose spielt.



Abb. 3.25: Nachweis von cytoplasmatischem Gelsolin in SKW-Zellen im Westernblot mit einem monoklonalem Antikörper gegen das C-terminale Ende des Gelsolin. Es wurden verschiedene Konzentrationen an Zellextrakt aufgetragen (10, 20, 50 und 100 μ g Protein pro Spur). Als Referenz diente 1 μ g gereinigtes natives Gelsolin (G). Es konnte trotz der hohen aufgetragenen Protein-konzentrationen kein Gelsolin in unbehandelten (K) und apoptoseinduzierten (A) Zellen nachgewiesen werden. Der Pfeil markiert eine Bande, die durch die Cross-Reaktion des verwendeten zweiten Antikörpers verursacht wurde.

3.10. Korrelation zwischen Caspase-3 Aktivität, Aktinfragmentierung und F-Aktinverlust

In diesen Kapitel werden die Ergebnisse aus den Abschnitten beginnend bei Kapitel 3.1. für das bessere Verständnis untereinander in Bezug gebracht und teilweise mit weiteren noch nicht dargestellten Untersuchungsergebnissen ergänzt.

In SKW und Jurkatzellen konnte eine Fragmentierung des Aktins während apoptotischer Prozesse mit Hilfe der Westernblottechnik unter der Verwendung spezifischer Antikörper dargestellt werden. Als weitere Methode zur Darstellung der Bruchstücke wurden verschiedene Aktinderivate verwendet.

Es konnten insgesamt drei eindeutige Fragmente identifiziert werden. Ein weiteres Fragment von ca. 28 kD tritt nicht immer auf.

Die während der Apoptose generierten Aktinbruchstücke sind denaturiert. Dies konnte mit Hilfe von Sedimentationsexperimenten geklärt werden.

Nur G-Aktin wird während der Apoptose geschnitten. F-Aktin scheint kein Substrat für die apoptotische aktinschneidende Protease zu sein.

Mit Hilfe von Inhibitionsexperimenten konnte als aktinschneidende Protease das CPP32/Apopain identifiziert werden. Es lassen sich Korrelationen zwischen der Caspase 3-Aktivität und der Aktinfragmentierung nachweisen.

In MCF-7-Zellen, die einen Defekt im CPP32/Apopain-Gen aufweisen, ist keine Aktinfragmentierung, trotz Gabe von Induktoren der Apoptose, nachweisbar.

Das aktinschneidende Enzym Calpain spielt keine Rolle bei der im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Aktinfragmentierung.

Trotz unterschiedlicher Signalwege und Induktionszeiten scheint der Mechanismus der Aktinfragmentierung in zwei verschiedenen Zellsystemen der Selbe zu sein.

Während der Apoptose verlieren die Zellen F-Aktin. Dieser Prozeß ist Caspase-3- und Gelsolin-

unabhängig. Auch Proteasen aus der Caspase-1-Familie spielen keine Rolle bei diesen Prozessen.

3.11. Untersuchung von Aktin-Komplexen während apoptotischer Prozesse

In der Literatur gibt es viele Hinweise darauf, daß Aktin bindende Proteine eine tragende Rolle bei den morphologischen Prozessen spielen, wie sie für apoptotische Prozesse in der Literatur beschrieben werden (siehe Einleitung). So vermuten die Autoren Mannherz et al 1995, Kayalar et al 1996, Madaio et al 1996 und Villa et al 1998, daß die DNase I, identisch mit der Endonuklease ist, die für die DNA-Fragmentierung während der Apoptose verantwortlich ist. Da die DNase I-Aktivität durch monomeres Aktin gehemmt wird, liegt die Vermutung nahe, daß die Aktinfragmentierung während der Apoptose einen Einfluß auf die DNase I-Aktivität hat.

Als zweites aktinbindendes Protein wurde das Gelsolin untersucht. Trotz der in Kapitel 3.9. vorgestellten Versuchsergebnisse, die eine Beteiligung von Gelsolin an der Apoptose in Lymphblastemzellen ausschließen, wurden Versuche mit exogen hinzugefügten Protein durchgeführt. Die vorhandenen gelsolinfreien Testsysteme, indem man definiert Apoptose auslösen kann, eröffnen die Möglichkeit, Aufschluß über eventuelle Gelsolin-Aktin-Interaktionen während des programmierten Zelltodes zu gewinnen.

3.11.1. Aktin/DNase I-Komplex

Die hier vorgestellten Experimente zum Thema DNase I und Aktin/DNase I-Komplexe wurden mit beiden zur Verfügung stehenden Zellinien SKW 6.4 und Jurkat durchgeführt. Aufgrund der besseren Übersicht werden hier hauptsächlich die Ergebnisse dargestellt, die mit den SKW-Zellen durchgeführt wurden. In Jurkatzellen wurden die gleichen Ergebnisse gefunden wie in SKW-Zellen.

3.11.1.1. Herstellung und Überprüfung von Aktin/DNase I-Komplex

Die Herstellung von Aktin/DNase I-Komplex erfolgte im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 wie unter 2.3.2.5. beschrieben. Die Überprüfung des Komplexes geschah mit Hilfe des Kunitztestes (2.6.3.3.), mit dem die Inhibition der DNase I-Aktivität durch das G-Aktin gemessen werden kann.

Die Hemmung der DNase I durch monomeres Aktin betrug im Durchschnitt ca. 85 %. Dieses Ergebnis stimmt, mit den in der Literatur gefundenen, Werten überein (Mannherz et al 1975 und

1980). Dieselbe Hemmrate von ca. 85 % wurde auch bei der Komplexbildung mit dem biotinyliertem Aktin erreicht.

3.11.1.2. Überprüfung der Endonuklease-Aktivität in SKW-Zellen

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das verwendete Zellsystem Endonuklease-Aktivität aufweist und ob diese Aktivität durch die DNase I hervorgerufen wird. Eine wichtige Voraussetzung für diese Experimente ist die Mykoplasmenfreiheit der verwendeten Zellen. Zur Überprüfung der Mykoplasmenfreiheit und Endonuklease-Aktivität der Zellen wurde die SDS-Zymogrammtechnik eingesetzt, wie sie unter 2.6.3.1. beschrieben wird. Für das Gelingen dieser Methode ist es wichtig, daß die Proben DTE-frei sind, da diese Substanz die eventuell vorhandene Endonuklease-Aktivität unterbinden kann.

Wie in Abb. 3.27. erkennbar, konnte in SKW-Zellextrakten keine Endonuklease-Aktivität mit Hilfe der SDS-Zymogramm-Methode nachgewiesen werden.



Abb.3.27: SDS-Zymogramm zur Detektion möglicher Endonukleasen in Extrakten aus unbehandelten und apoptoseinduzierten Zellen. Proben mit unterschiedlichem Proteingehalt (20, 50 und 100 µg Protein pro Spur) wurden mit DTE-freien Probenpuffer 1:5 vermischt und direkt auf ein 12 %iges SDS-PA-Gel welches intakte Kalbsthymus-DNA enthält, aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das SDS mit einem Reaktivierungspuffer/Milchpulver-Gemisch herausgewaschen. Nach der Anfärbung der DNA im Gel mit Ethidiumbromid konnte die Endonuklease-Aktivität ("schwarze DNA-Löcher") mit einem UV-Transilluminator detektiert werden. Als Positivkontrollen wurden Zellkulturüberstände (ZKÜ) von mykoplasmeninfizierten Zellen, die Endonukleasen enthalten, eingesetzt. Selbst mit der weitaus empfindlicheren BN-Zymogrammtechnik (siehe 2.6.3.2.), die unter nativen Bedingungen durchgeführt wird, konnte keine Endonuklease-Aktivität in unbehandelten und apoptoseinduzierten SKW-Zellen nachgewiesen werden.



Abb. 3.28: Shägger-Gel zum Nachweis evtl. vorhandener Endonukleasen in Extrakten aus SKW-Zellen. Als Positivkontrolle wurden 20 pg gereinigte DNase I aufgetragen. Es wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen an Extrakten von unbehandelten und induzierten Zellen aufgetragen.

Die in den Abb. 3.27 und 3.28 dargestellten Ergebnisse stimmen auch mit dem Sachverhalt überein, daß in Fas-induzierten, mykoplasmenfreien SKW-Zellen keine DNA-Leiter nachgewiesen werden konnte (Methode siehe 2.6.3.4. und Ergebnis siehe Abb.3.29). Nur mykoplasmeninfizierte SKW-Zellen, die mykoplasmeneigene DNasen exprimieren, sind in der Lage eine DNA-Leiter auszubilden, nachdem ein Apoptosestimulanz gegeben wurde.

Diese Ergebnisse werden durch laboreigene Untersuchungen an verschiedenen Zellsystemen unterstützt (Paddenberg et al 1996).



- MBI-Marker
- SKW Kontrolle
- SKW+Fas 30 min
- SKW+Fas 90 min
- SKWmyc Kontrolle
- SKWmyc Fas 90 min
- SKW+Fas 120 min

Abb.3.29: 1.2 %iges Agarosegel, wie sie zum Nachweis von DNA-Leitern verwendet werden. Wie ersichtlich konnte in mykoplasmenfreien anti-Fas induzierten SKW-Zellen (1 µg anti-Fas/ml Zellsuspension) keine DNA-Leiter nachgewiesen werden (Spuren 3,4 und 7). In Mykoplasmen infizierten, Fas induzierten Zellen (Spur 6) hingegen konnte eine DNA-Leiter dargestellt werden. Der Plasmidverdau (siehe 2.6.3.5), der Plasmid-DNA als Substrat verwendet, ist eine weitere sehr sensitive Methode zum Nachweis von Endonuklease-Aktivität. Selbst dieser Test erbrachte keinen Unterschied zwischen unbehandelten und apoptoseinduzierten SKW-Zellen. Dies stimmt mit den in den Abbildungen 3.27-3.29 dargestellten Ergebnissen überein, die das Fehlen aktiver Endonukleasen in SKW-Zellen zeigen.



Abb. 3.30: Plasmidverdau mit unbehandelten und apoptoseinduzierten cytosolischen Extrakten aus Jurkat und SKW-Zellen. Jeweils 10 μ g Extrakt wurden mit 1 μ g Plasmid-DNA versetzt und in Plasmidverdaupuffer, der Ca²⁺ und Mg²⁺ enthält, für 4 h inkubiert. Zu den Proben 7-12 wurde jeweils 2.5 ng gereinigte DNase I hinzugefügt. Die Versuchsansätze ohne DNase I zeigen keinen DNA-Abbau, während die DNase I versetzen Proben das Plasmid völlig verdauen. Es sind keine Unterschiede zwischen induzierten und unbehandelten Zellen zu erkennen. In SKW-Zellen wird die Plasmid-DNA wahrscheinlich einmal geschnitten und damit von der "supercoiled"- in die "coiled" Form überführt.

3.11.1.3. Untersuchungen, ob DNase I/Aktinkomplexe durch Zellextrakte apoptotischer SKW-Zellen beeinflußt werden

Die Entdeckung, daß in DNase I-freien Zellsystemen Apoptose ausgelöst werden kann, ermöglichte die Untersuchung von DNase I/Aktin-Komplexen mit der Fragestellung ob Extrakte aus apoptotischen Zellen in der Lage sind, den Komplex bzw. einzelne Komponenten zu modifizieren. Es wurde unter anderem überprüft, ob Aktin, vorliegend im Komplex, durch die DNase I vor der Fragmentierung geschützt wird. Hierzu wurden Komplexe hergestellt, die aus DNase I und biotinyliertem Aktin bestanden. Dies erleichterte den Nachweis von Aktin und Aktinfragmenten erheblich. Die Verwendung von biotinyliertem Aktin zur Komplexbildung war unbedenklich, da wie unter 3.11.1.1. beschrieben, da es im Kunitztest genauso gute Inhibitionseigenschaften zeigte, wie das nicht modifizierte Aktin (siehe Kapitel 3.1.2.). Das im Komplex gebundene biotinmarkierte Aktin wurde mit Hilfe des Streptavidin/Peroxidase-Komplexes und einer anschließender Färbereaktion mit DAB dargestellt.

Abb. 3.31 zeigt deutlich, daß das im Komplex gebundene Aktin nicht durch die DNase I vor der Fragmentierung geschützt wird.



Abb. 3.31: Nachweis, daß biotinyliertes Aktin, welches im Komplex mit DNase I vorliegt, nicht vor der Fragmentierung während apoptotischer Prozesse geschützt wird. Je 20 µg Zellextrakt aus SKW-Zellen wurden mit DNase I/bAktin-Komplex (Menge des biotinylierten Aktins pro Spur: 0.1 µg) dem Fragmentierungsassay unterzogen. Nach Auftrennung der Proteine und Westernblotting und Inkubation mit Streptavidin/Peroxidase-Komplex wurden die Fragmente mit DAB angefärbt.

Eine Beurteilung im Immunoblot, wie es bei Aktin durchgeführt wurde, ob DNase I von apoptotischen Zellextrakten prozessiert wird, war nicht durchführbar, da kein westernblottauglicher Antikörper gegen die DNase I zur Verfügung stand. Auch eine Darstellung des DNase I/Aktin-Komplexes mit Hilfe der nativen Zymogrammtechnik schlug fehl, da der zu untersuchende Komplex durch die gelelektrophoretische Auftrennung mit Coomassie zerstört wurde.

Die hier gewählte Vorgehensweise zur Darstellung der DNase I während apoptotischer Prozesse ist die Messung ihrer Endonuklease-Aktivität mit Hilfe der Kunitzmethode. Es wurden verschiedene Mischungsverhältnisse zwischen Zellextrakten und gereinigter DNase I bzw. DNase I/Aktin-Komplex ausgetestet. Die Auswertung der Messungen ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten und den apoptoseinduzierten SKW-Zellen. Dieses Ergebnis unterstützt die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Resultate, daß die DNase I keine Rolle bei der apoptotischen DNA-Fragmentierung in SKW-Zellen spielt.

3.11.2. Untersuchung von Aktin, welches komplexiert mit Gelsolin vorliegt, während apoptotischer Prozesse

Wie schon in Abschnitt 3.9 beschrieben, ist in den Lymphblastemzellinien Jurkat und SKW 6.4. weder sekretorisches und cytoplasmatisches Gelsolin mit denen im Labor vorhandenen Möglichkeiten nachweisbar. Wie schon bei der DNase I eignen sich diese Testsysteme aufgrund ihrer nachgewiesenen Gelsolinfreiheit zur Untersuchung von Veränderungen exogen hinzugefügten Gelsolins und seiner Komplexe mit Aktin während apoptotischer Prozesse.

3.11.2.1. Herstellung von Gelsolin/Aktin-Komplexen.

Für die folgenden Untersuchungen wurden Gelsolin/Aktin-Komplexe in den stöchiometrischen Verhältnissen 1:1 und 1:2 aus nativem gereinigten Gelsolin und α -Aktin (teilweise biotinyliert) wie unter 2.3.2.4. beschrieben, hergestellt. Die Charakterisierung der Komplexe erfolgte mit Hilfe von Safergelen, einer speziellen Nativgeltechnik für Aktin und aktinbindende Proteine (siehe 2.4.3.1.).



- A $5 \mu g \alpha$ -Aktin
- G 5 µg Gelsolin
- G/2A 5 µg Gelsolin/2Aktin-Komplex
- G/A 5µg Gelsolin/Aktin-Komplex

Abb.3.32: Natives Safergel zur Überprüfung der hergestellten Gelsolin/Aktin-Komplexe. In der Spur G/A ist deutlich zu sehen wie ein Aktinmolekül aus dem G/2A-Komplex herausgelöst worden ist.

3.11.2.2. Untersuchungen, ob einzelne Komponenten des Gelsolin/Aktin-Komplexes während apoptotischer Prozesse modifiziert werden

In einem weiteren Schritt, wie schon bei den DNase I/Aktin-Komplexen, wurde untersucht, ob die einzelnen Komponenten der Gelsolin/Aktin-Komplexe durch Homogenate aus apoptotischen Zellen modifiziert werden. Hierzu wurden immunologische Methoden und Aktinderivate verwendet. Wie in Abb. 3.33 erkennbar, wird das mit Gelsolin im Komplex vorliegende Aktin vor der Fragmentierung bei apoptotischen Prozessen geschützt. In G/A₂-Komplexen (Spur 4) ist das komplexgebundene Aktin komplett gegen die Fragmentierung durch Zellextrakte apoptotischer Zellen geschützt. In G/A-Komplexen (Spur 6) wird etwas Aktin gespalten. Dies ist vermutlich das dissoziierte Aktinmolekül welches bei der Herstellung von G/A-Komplexen im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 anfällt und aus den Reaktionsansätzen nicht vollständig entfernt werden kann.



Abb.3.33: Nachweis des mit Gelsolin/Aktin-Komplex gebundenen Aktins. Für dieses Experiment wurde biotinyliertes Aktin für die Komplexherstellung verwendet. In Spur 4 ist zu sehen, daß Aktin gebunden im G/2A-Komplex vor der Fragmentierung durch apoptotische Zellextrakte geschützt ist. Bei der Inkubation mit G/A-Komplex ist eine schwache Fragmentierung zu sehen (Spur 6). Dies ist wahrscheinlich auf das freigesetzte Aktin welches bei der Bildung von G/A aus G/2A anfällt,

zurückzuführen. Für diesen Versuch wurden jeweils 20 µg Zellextrakt und 0.1 µg biotinyliertes Aktin, vorliegend im Komplex, pro Spur eingesetzt. Alle Reaktionsansätze wurden einem 2stündigen Fragmentierungsassay, einer gelelektrophoretischen Auftrennung und dem Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran unterzogen. Die Anfärbung des Aktins erfolgte mit Strept/PO-Komplex und DAB: Für dieses Experiment wurden SKW-Zellen verwendet.

In Abb. 3.34. wird gezeigt, daß das Gelsolin vorliegend im Komplex durch Zellextrakte apoptotischer Zellen nicht modifiziert wird.



Abb.3.34: Nachweis, daß Gelsolin gebunden im Gelsolin/2Aktin-Komplex durch Extrakte apoptotischer Zellen nicht geschnitten wird. Für diesen Immunoblot wurden pro Spur jeweils 20 µg Protein und 1µg G/2A-Komplex einem Fragmentierungsassay unterzogen und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion des Gelsolins erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das Gelsolin.

Endogenes β -Aktin wird in den G/2A-Komplex-Ansätzen mit apoptotischen Zellextrakten genauso geschnitten wie in diesem Ergebnisteil schon mehrfach dargestellt (siehe Abb. 3.3. und Abb. 3.9). Auch die Inkubation von nativem Gelsolin alleine mit Homogenaten aus induzierten Zellen erbrachte ebenfalls keine Anzeichen dafür, daß Gelsolin ein Substrat für Proteasen die im Rahmen des programmierten Zelltodes aktiviert werden, darstellt.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Informationen über das Aktin und seine Rolle während apoptotischer Prozesse gewonnen werden.

Die Apoptose wird von morphologischen Kennzeichen wie Kernveränderungen und Abschnürung sogenannter apoptotischer Körperchen begleitet. Diese Veränderungen der Zellgestalt beruhen unter anderem auf einer dramatischen Reorganisation des Cytoskeletts. Neben einer Vielzahl anderer Proteine stellt das Aktin den Hauptanteil dieses Cytoskeletts. Aufgrund seiner hohen Konzentration in der Zelle wurde vermutet, daß Modifikationen des Aktins eine Rolle bei den morphologischen Veränderungen, wie sie während des physiologischen Zelltodes auftreten, eine Rolle spielen könnten.

Die Möglichkeit der Aktinfragmentierung wurden zum Anfang dieser Arbeit in der Literatur sehr kontrovers diskutiert.

Für eine Aktinfragmentierung während der Apoptose sprechen folgende Argumente:

- Aktin ist das am häufigsten vorkommende Protein des Cytoskeletts

 Aktin kann mit vielen anderen Proteinen Wechselwirkungen eingehen. Eine Modifikation dieses Proteins könnte aufgrund seiner "Vielseitigkeit"

weitreichende Folgen haben.

 -Veränderungen des Aktins könnten eine sofortige Wirkung auf die Polymerisationseigenschaften dieses Proteins haben und somit zu Veränderung der Zellform führen Diese Hypothesen werden von den Autoren Mashima et al 1995B und 1999, Kayalar et al 1996 und Levee et al 1996 unterstützt.

Gegen eine Aktinfragmentierung werden in der Literatur folgende Argumente angeführt:

Eine Modifikation des Aktins um Veränderungen des Cytoskeletts zu erreichen, ist viel zu aufwendig. Um Effekte zu er erzielen, müßte ein Großteil des Aktins prozessiert werden. Einfacher hingegen wäre es Proteine zu verändern, die wichtig für Zell-Zell-Kontakte oder für die Anheftung des Cytoskeletts an die Plasmamembran wären.

Song et al 1997 behaupten, das Aktinfragmentierung nicht "in vivo" abläuft, sondern nur in "in vitro"-Experimenten mit unter der Verwendung gereinigter Proteine nachgewiesen werden kann. Brancolini et al 1995/1997 zeigen, das während apoptotischer Prozesse ß-Catenin und Gas2 fragmentiert werden, zwei Proteine, die an Schlüsselpositionen des Mikrofilamentsystems lokalisiert sind. Eine Aktinfragmentierung konnten diese Autoren nicht nachweisen.

Die durchgeführten Experimente bestätigen eine Aktinfragmentierung, die während der Apoptose stattfindet, auch wenn diese nicht vollständig ist. Das Molekulargewicht und die Lage der dargestellten Aktinfragmente (siehe Abb. 3.6.) stimmt mit den, in der Literatur beschriebenen, Fragmenten überein. Die nachgewiesenen Fragmente mit den Molekulargewichten 41,5 kD, 32 kD und 15 kD werden auch von Kayalar et al 1995, Mashima et al 1997 und Yang et al 1998 beschrieben. Leichte Abweichungen der gefundenen Molekulargewichte und der in der Literatur beschrieben Fragmentgrößen, sind wahrscheinlich auf die Verwendung verschiedener Molekulargewichtstandards zurückzuführen. "In vitro"-Experimente mit isolierten Proteinen, erlaubte den genannten Autoren eine Ansequenzierung dieser Fragmente zur genauen Identifizierung der Schnittstellen: Asp 11 und Asp 244. Diese Schnittstellen sind charakteristisch für Caspasen, die während apoptotischer Prozesse aktiviert werden wie sie in der Einleitung unter Abschnitt 1.2. beschrieben sind.

Eine Ansequenzierung der Bruchstücke konnte nicht durchgeführt werden, da alle Fragmentierungsexperimente mit cytosolischen Rohextrakten, einem Proteingemisch aus apoptotischen Zellen, durchgeführt wurden. Eine Überprüfung der Aktinfragmentierung durch "in vitro"-Experimente mit gereinigten Proteinen waren nicht möglich, da keine gereinigten Caspasen zur Verfügung standen.

Neben den oben genannten Aktinspaltprodukten konnte ein weiteres Fragment dargestellt werden. Dieses Bruchstück weist ein molekulares Gewicht von ca. 28 kD auf und beinhaltet das C-terminale Ende. Dieses Fragment konnte mit Hilfe des biotinyliertem Aktin und dem C-terminal reagierenden Antikörper gegen das Aktin detektiert werden (siehe 3.4.2. und 3.4.3.). Dieses Fragment wurde ebenfalls von Kayalar et al 1995 nachgewiesen und als "minor Fragment" bezeichnet. Als Schnittstelle für dieses Fragment geben die Autoren das Glu 107 an,

Die Schnittstelle des Glu 107 ist keine typische Schnittstelle für Proteasen der Caspase-Familie. Vielleicht spielen epitopspezifische Gegebenheiten oder die Nähe zur Asp 11-Schnittstelle eine Rolle, daß Glu 107 als Substrat der Caspasen erkannt wird.

Möglicherweise spielt auch eine weitere Protease eine Rolle, die nicht der Caspase-Familie angehört und bis jetzt noch nicht identifiziert werden konnte.

Eine weiteres Erklärungsmodell für diese untypische Schnittstelle ist eine Modifikation des Glu 107 durch Transglutaminasen wie z.B. für das Glu 41 im Aktin während apoptotischer Prozesse beschrieben ist (Nemes et al 1997). Dies könnte zur Folge haben, daß das Glu 107 nach dieser Modifikation als Schnittstelle von einer Protease erkannt wird.



Abb.4.1: Lage der von Kayalar et al 1995 und Mashima et al 1997 identifizierten Schnittstellen im Aktinmolekül (blau). Die Schnittstellen (in grau und rot dargestellt) Asp11 und Glu107 liegen beide in der Subdomäne 1 in der Nähe der ATP- Bindungsstelle (ATP = rot). Die Schnittstelle Asp244 befindet sich in Subdomäne 4. In grün dargestellt: DNase I. Die Abb. wurde mit Hilfe des Programmes Rasmol erstellt. Die verwendeten Atomkoordinaten stammen aus der Brookhaven Protein Databank (1atn).

Wie schon erwähnt und aus den Abb. 3.3, 3.4 und 3.5 im Ergebnisteil deutlich hervorgehend, wird während apoptotischer Prozesse nur ein geringer Anteil des Gesamtaktins der Zelle gespalten. Für die mögliche Interpretation für dieses Phänomen könnten folgende Erklärungen hilfreich sein :

Es wird nur ein geringer Anteil des Aktins gespalten, da ein Fragment bzw. die Fragmente eine Signalfunktion haben könnten, um weitere apoptosespezifische Prozesse auslösen. Diese Hypothese wird auch von Mashima et al 1999 unterstützt. Eine komplette Spaltung des zellulären Aktins und dem damit verbundenen Verlust der Polymerisationsfähigkeit könnte zum totalen Zusammenbruch des Cytoskeletts führen. Ein geordneter Ablauf der Apoptose mit all seinen morphologischen Charakteristika wäre wahrscheinlich nicht mehr möglich. Eine weitere Vermutung ist die, daß nur zuvor modifiziertes Aktin einer Fragmentierung während des physiologischen Zelltodes unterzogen wird. Eine solche Ver-änderung des Aktins könnte z. B. durch Transglutaminase-Aktivitäten wie sie für die Apoptose beschrieben worden sind bewerkstelligt werden (Nemes et al 1997).

Die erzielten Daten legen die Vermutung nahe, daß die Aktinfragmentierung nicht alleine verantwortlich ist für die drastischen morphologischen Veränderungen während der Apoptose. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, daß die Spaltung einer Vielzahl von Proteinen die beobachteten Veränderungen, wie sie während des programmierten Zelltodes auftreten, ausmachen. Neben dem Aktin werden weitere cytoskeletale Proteine geschnitten wie zum Beispiel:

- Gas2, welches eine wichtige Rolle bei Rearrangierung des Cytoskeletts inne hat (Brancolini et al 1995).

 β-Catenin, ein Protein welches bei der Verknüpfung des Mikrofilamentsystems mit der Plasmamembran von Bedeutung ist (Brancolini et al 1997).

- Lamine, die für den Erhalt der Form des Zellkernes von Bedeutung ist (Lazebnik et al 1995).

Wie aus den Ergebnissen der durchgeführten Untersuchungen ersichtlich (siehe Abb.3.9 und Abschnitt 3.5.2.), scheint die Aktinfragmentierung ein spätes Ereignis im Ablauf des physiologischen Zelltodes zu sein. Eine frühe proteolytische Spaltung des Aktins und den damit verbundenen Veränderungen des Cytoskeletts könnten einen nekrotischen Verlauf des Zelltodes (siehe 1.1.1.) mit einhergehender Lyse zur Folge haben.

Der gefundene späte Zeitpunkt der Aktinfragmentierung während der Apoptose wird auch durch Arbeiten von Mashima et al 1999, Kayalar et al 1996, Yang et al 1998 und van Engeland et al 1997 unterstützt.

Ein Ergebnis, welches im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurde und gegen eine Aktinfragmentierung während der Apoptose sprechen könnte, ist der Sachverhalt, daß nach der Aufarbeitung der Zellen zu Cytosolextrakten im Rahmen des Fragmentierungsassays eine relativ lange Nachinkubation durchgeführt werden muß, um endogene Aktinbruchstücke detektieren zu können. Für diese Besonderheit könnten folgende Fakten eine Rolle spielen:

- Es wird nur eine sehr geringe Menge an Aktinfragmenten gebildet, so daß die Konzentration der Bruchstücke sich unter der Nachweisgrenze der hier verwendeten Detektionsmethoden befindet. - Durch die Aufarbeitung der Zellen zu Zellextrakten kann es zur Zerstörung möglicher Kompartimente kommen, die Enzym und Substrat unter physiologischen Bedingungen evtl. voneinander separieren. So werden bei der verwendeten Präparationsmethode apoptotische Körperchen und der restliche Zellkörper nicht getrennt voneinander aufgearbeitet.

Die Möglichkeit, daß es sich bei der Bildung von Aktinspaltprodukten während des physiologischen Zelltodes um eine Artefaktreaktion handelt, die während der Zelleliminierung auftritt, konnte nahezu ausgeschlossen werden da nach Induktion von Nekrose mit H_2O_2 , im Gegensatz zur Apoptose, keine eindeutigen Fragmente detektiert werden konnten.

Wie im Abschnitt 3.5 des Ergebnisteiles gezeigt, ist für die Aktinfragmentierung das CPP32/Apopain, ein Mitglied der Caspase-3-Familie verantwortlich. Sämtliche durchgeführten Versuche sind mit der Beobachtung der proteolytischen Spaltung des Aktins korrelierbar. Die Beteiligung der CPP32/Apopain an der Aktinspaltung wird auch durch die Arbeiten von Mashima et al 1997 und 1999 bestätigt. Es konnte gezeigt werden, daß trotz der Apoptoseinduktion über unterschiedliche Signalwege der gleiche Mechanismus der Aktinfragmentierung ausgelöst wird (Fas-Rezeptor, Phosphokinase C). Die Aktinfragmentierung nach anti-Fas und Staurosporininduktion der Apoptose ist bis jetzt in der Literatur noch nicht beschrieben. Auch konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Aktinfragmentierung in den Lymphblastemzellinien SKW 6.4 und Jurkat nachgewiesen werden (Leukämiezellen U937: Mashima et al; Neuroblastemzellen SYSY: Yang et al 1998, Rat-1-Zellen: Kayalar et al 1996).

In verschiedenen Zellsystemen konnten unterschiedlich hohe Aktivitäten der Caspase-3-Familie gemessen werden (siehe Abb.3. 17 und Abb. 3.18). Diese Aktivitätsschwankungen korrelieren mit den Ergebnissen der Aktinfragmentierung. Je weniger Aktivität gemessen werden konnte, um so geringer war die Konzentration der Aktinbruchstücke.

Eine Beteiligung von Proteasen aus der Caspase-1-Familie wie sie von Kayalar et al 1996 und Maravei et al 1997 vermutet werden, konnte im Verlauf der experimentellen Arbeiten nicht bestätigt werden (siehe Abb.3.15). Die Ergebnisse sprechen für keine Beteiligung von Mitgliedern der ICE-Familie bei den untersuchten Abläufen der Apoptose.

Villa et al 1998 stellen die Hypothese auf, daß Calpain und nicht Proteasen der Caspase-3-Familie an der Aktinfragmentierung maßgeblich beteiligt sind. Als mögliche Schnittstelle wurde die DNase I bindende Schleife des Aktins, welche in der Subdomäne 2 lokalisiert ist, angegeben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Inhibitionsexperimente nachgewiesen werden, daß in Lymphblastemzellinien die Aktinfragmentierung durch Calpain keine Rolle spielt sondern nur die Spaltung durch CPP32/Apopain (siehe Abb. 3.19). Auch konnte die beschriebene Aktivierung von CPP32/Apopain durch Calpain mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht bestätigt werden (siehe Abb. 3.20).

In einem weiteren Schritt wurde gezeigt, daß Aktin im Komplex mit anderen Proteinen, während apoptotischer Prozesse genauso gespalten wird wie wenn es in freier Form vor-liegen würde.

Wie aus dem Ergebnisteil dieser Dissertation zu entnehmen ist, sind bei der Komplexierung mit DNase I keine Unterschiede zwischen frei vorliegendem G-Aktin und dem komplexierten Aktin feststellbar (siehe Abb. 3.31). Wie in der Abb. 4.1. erkennbar, ist keine der apoptotischen Spaltstellen des Aktins bei der Komplexbildung mit der DNase I involviert (die Hauptbindestelle des Aktins für die DNase I liegt auf einem stark exponierten Loop in der Subdomäne 2). Ausgehend von der räumlichen Struktur des Komplexes und der dargestellten Ergebnisse, haben sterische Behinderungen durch die DNase I anscheinend keinen Einfluß auf die Aktinfragmentierung während der Apoptose.

Ein weiterer Aspekt, welche eine genauere Untersuchung der DNase I und deren Komplexe im Zusammenhang mit dem physiologischen Zelltod interessant macht, ist die von Peitsch et al 1993 und Mannherz et al 1995 aufgestellte Hypothese. Die Autoren mutmaßen, das die DNase I die Rolle der apoptotischen Endonuklease inne hat, welche für die, während apoptotischer Prozesse, typische DNA-Fragmentierung verantwortlich ist (siehe Abb. 1.3). Fakten, wie etwa die Ca²⁺ und die Mg²⁺-Abhängigkeit des DNA-Abbaus unterstützen diese Vermutung. Die von Kayalar et al 1996 aufgestellte Hypothese über den Regelmechanismus der DNase I-Aktivität (Aktivierung der DNase I mittels Spaltung des natürlichen Inhibitors Aktin durch Caspasen) unterstützen diese Ansicht.

Resultate dieser Arbeit weisen darauf hin, daß die DNase I nicht identisch mit der apoptotischen Endonuklease ist. Für dieses Ergebnis spricht auch die Tatsache, daß in vielen Zellsystemen überhaupt keine DNase I mehr exprimiert wird. Sie ist unter Zellkulturbedingungen für das Überleben der Zelle nicht mehr notwendig. In der Arbeitsgruppe Mannherz durchgeführten Versuche zeigten, daß nur mykoplasmeninfizierte Zellen nach Apoptoseinduktion in der Lage sind, eine DNA-Leiter zu bilden (Paddenberg et al 1996). Auch mit Hilfe des Kunitztestes konnten keine Unterschiede in der Nukleaseaktivität in Extrakten aus Kontroll- und Apoptose induzierten Zellen gemessen werden. Die beobachtete hochmolekulare Spaltung der DNA (siehe Abb. 3.29) während der Apoptose beruht wahrscheinlich auf der Aktivierung einer anderen Endonuklease, die unter ähnlichen Bedingungen aktiv ist wie die DNase I. Inzwischen haben japanische Arbeitsgruppen eine neue Hypothese für die DNA-Fragmentierung während des physiologischen Zelltodes aufgestellt. Enari et al 1998 und Sakahira et al 1998 beschreiben in Mauszellen eine neue Endonuklease, CAD (Caspase-activated- DNase), die im inaktiven Zustand im Komplex mit ICAD (Inhibitor von CAD) vorliegt. Die Proteasen der Caspase-3Familie, die während apoptotischer Prozesse aktiviert werden, sind in der Lage den ICAD zu schneiden. Das gespaltene ICAD dissoziiert von CAD, welche dann aktiv wird und aus dem Cytosol in den Kern transloziert werden kann, um DNA zu degradieren. Inzwischen wurde ein System, welches nach dem gleichen Prinzip funktioniert, auch in menschlichen Zellen nachgewiesen (Halenbeck et al 1998 und Liu et al 1998).

Neben der Analyse des Aktins selbst, wurden auch die Wechselwirkungen zwischen Aktin und Aktin bindenden Proteinen während der Apoptose untersucht.

Aktin, welches komplexiert mit Gelsolin vorliegt, wird vor der Fragmentierung durch Caspasen während des physiologischen Zelltodes geschützt (siehe Abb. 3.34). Die Kontaktstellen am Aktin werden durch 2 Helices (AS 137-144 und AS 339-348) und 2 Schleifen (AS 144-150 uns AS 166-180) die sich zwischen Subdomäne 1 und 3 befinden, verkörpert (entnommen aus der Dissertation Edda Ballweber). Da keine der Spaltstellen (Asp 11, Asp 244 und Glu 107) direkt an den Wechselwirkungen mit dem Gelsolin

beteiligt sind, spielen wahrscheinlich sterische Hinderungen durch die Komplexbildung eine Rolle.

Dieses Ergebnis wird durch die Arbeiten von Ohtsu et al 1997 unterstützt, der eine Inhibierung apoptotischer Prozesse durch die Überexprimierung von Gelsolin in Jurkatzellen beschreibt. Auch Kayalar et al 1996 vermutet einen Schutz gegen die Aktinfragmentierung durch das Gelsolin, da gelsolinkomplexiertes Aktin nach Inkubation mit apoptotischen Zellextrakten noch in der Lage ist die DNase I zu hemmen. Eventuell wirkt sich die Hemmung der Aktinfragmentierung durch Gelsolin sich auf die Weiterleitung apoptoserelevanter Signale aus. Mashima et al 1999 mutmaßen, daß Aktinfragmente als Signal-boten der Apoptose fungieren könnten. Da in vielen Zellinien kein Gelsolin oder nur sehr wenig Gelsolin nachgewiesen werden kann (eigene Ergebnisse siehe Abb. 3.25), kann dem hier dargestellten Regelmechanismus eine eher untergeordnete Rolle zugeschrieben werden.

Wie im Abb. 3.7 dargestellt, wird nur die globuläre Form des Aktins während apoptotischer Prozesse gespalten. Filamentäres Aktin hingegen scheint resistent gegen die Fragmentierung zu sein. Trotz Resistenz gegenüber der Spaltung durch Caspasen, unterliegt das filamentäre Aktinsystem der Zelle einem drastischen Wandel während der Apoptose. Wie aus der Abb. 3.8 zu entnehmen, verliert die Zelle einen Großteil ihres F-Aktins während der Apoptose. Dieser Prozeß scheint unabhängig von Proteasen der Caspase-1 und Caspase-3-Familien zu sein, wie die Ergebnisse, die in den Abb. 3.23 und Abb. 3.24 dargestellt sind, zeigen. Dieses Ergebnis wird durch Arbeiten von Levee et al 1996 unterstützt. Somit kann auch eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen G- und F-Aktin durch die Fragmentierung von G-Aktin durch CPP32 ausgeschlossen werden.

Ebenso konnte eine Beteiligung von Gelsolin bei der apoptotischen F-Aktinzerstückelung, wie sie von Kothakota et al 1997 postuliert wird, nicht überprüft werden, da kein Gelsolin, oder nur sehr wenig, in den verwendeten Zellsystemen nachgewiesen werden konnte. Diese Vermutung wird durch die Arbeiten von Mashima et al 1999 unterstützt (siehe Abb. 3.25).

Eine weitere Hypothese von Kayalar et al 1995, die den Verlust von F-Aktin während des physiologischen Zelltodes betreffen, konnte im Rahmen dieser Arbeit widerlegt werden. Kayalar vermutet, daß die durch die Aktinfragmentierung freigesetzte nicht mehr gehemmte DNase I die F-Aktindepolymerisation bewirkt. Da in den Zellinien, die während dieser Arbeit verwendet wurden, keine DNase I nachgewiesen werden konnte, spielt dieser Mechanismus bei den dargestellten Ergebnissen keine Rolle.

Eine mögliche Funktion des F-Aktins während der Apoptose wird von Metcalfe et al 1999 vermutet. Sie zeigen in ihrer Arbeit, daß das Tumorsupressorprotein p53 calciumabhängig an F-Aktin binden kann. Eine Zerstörung von F-Aktin würde zu einer Aktivierung des p53 führen. Durch die Erkennung von DNA-Strangbrüchen könnte es seine Funktion der Zellzyklusarretierung und DNA-Reparatur oder auch Auslösung von Apoptose ausüben.

Bis jetzt ist der Mechanismus und die Rolle des F-Aktinabbaus während des physiologischen Zelltodes noch nicht eindeutig erklärbar. Eventuell spielen Caspasen aus anderen Familien eine Rolle bei den hier beobachteten Prozessen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, gewähren einen kleinen Einblick in das hochinteressante Forschungsgebiet der Apoptose. Bis jetzt sind viele Abläufe des programmierten Zelltodes noch nicht eindeutig aufgeklärt. Das Entschlüsseln der Mechanismen der Apoptose wird neben der Befriedigung der wissenschaftlichen Neugier auch Impulse geben für die Entwicklung neuer Medikamente zur Bekämpfung von Krankheiten wie Krebs, Aids und Alzheimer.

5. Zusammenfassung

Mit den, im Rahmen dieser Doktorarbeit, durchgeführten Untersuchungen sollten Informationen über Aktin und Aktin bindende Proteine und deren Involvierung während apoptotischer Prozesse gesammelt werden.

Zu Beginn der Arbeit 1995 wurde die Beteiligung und Modifizierung des Aktins während des physiologischen Zelltodes noch sehr kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Literatur bestand keine eindeutige Klarheit darüber, ob und in welcher Form Aktin während der Apoptose eine Rolle spielt.

Im Verlauf dieser Dissertation konnte gezeigt werden, daß Aktin in den Lymphblastemzellinien SKW 6.4 und Jurkat, eindeutig während apoptotischer Prozesse partiell fragmentiert wird. Mit Hilfe gelelektrophoretischer Methoden und Proteinmarkierungstechniken konnte die Größe und Lage der einzelnen Aktinfragmente festgelegt werden. Sedimentationsexperimente weisen darauf hin, daß nur globuläres und kein filamentäres Aktin gespalten wird. Auch konnte dargestellt werden, daß das fragmentierte Aktin keine physiologische Aktivität mehr hat.

Mit Hilfe verschiedener Proteaseinhibitoren und immunochemischen Methoden konnte die fragmentierende Protease als CPP32/Apopain, ein Mitglied der Caspase-3-Familie identifiziert werden. Es konnte ausgeschlossen werden, daß in den SKW- und Jurkat-Lymphblastemzellinien Calpain, ein aktinspaltendes Enzym, an der Aktinfragmentierung während der Apoptose beteiligt ist.

Durch die Wahl der Zellinien und Induktion der Apoptose über verschiedene Signalwege konnte gezeigt werden, daß die Aktinfragmentierung unabhängig vom Induktionsweg (Fas-Rezeptor, Hemmung von Phosphokinasen) während apoptotischer Prozesse abläuft, sobald CPP32/Apopain aktiviert wird.

Mittels zellmorphologischer Untersuchungsmethoden konnte der Verlust von filamentären F-Aktin innerhalb der Zelle während des physiologischen Zelltodes gezeigt werden. Eine Hemmung der Caspase-3-Familie, zeigte keinerlei Effekte auf den Verlust des F-Aktins, so das davon ausgegangen werden kann, daß Aktinfragmentierung und F-Aktinverlust während der Apoptose unabhängige Prozesse sind. Da in den verwendeten Zellsystemen SKW und Jurkat kein Gelsolin nachweisbar ist, kann eine Beteiligung dieses filamentschneidenden Enzyms beim Verlust des F-Aktins ausgeschlossen werden.

Die Untersuchung von aktinbindenden Proteinen und deren Funktion während der Apoptose konzentrierten sich neben dem Gelsolin auch auf die DNase I. Zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit wurde vermutet, daß die DNase I identisch ist mit der apoptotischen Endonuklease. Als
Mechanismus der DNase I-Aktivierung wurde die Spaltung von G-Aktin vermutet, welches der physiologische Inhibitor ist. Diese Hypothese konnte experimentell nicht bestätigt werden, da in den verwendeten Zellsystemen keine DNase I nachgewiesen werden konnte. Trotz Abwesenheit von DNase I fand in den untersuchten Zellsystemen Apoptose statt. Dies kann als ein Indiz dafür gewertet werden, daß die DNase I nicht die gesuchte apoptotische Endonuklease ist.

Untersuchungen mit komplexiertem Aktin zeigten, das Aktin gebunden im Gelsolin-2Aktin-Komplex vor Aktinfragmentierung während der Apoptose geschützt wird. Aktin, welches komplexiert mit DNase I vorliegt, zeigt das gleiche Fragmentierungsmuster wie frei vorliegendes G-Aktin.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen deutlich, daß Aktin und Aktin bindende Proteine während apoptotischer Prozesse verändert werden und eine wichtige Rolle bei den morphologischen Veränderungen während des programmierten Zelltodes spielen.

6. Literaturverzeichnis

Ameison J and Capron A 1991

Cell Dysfunction and Depletion in AIDS: the Programmed Cell Death Hypothesis *Immunol. Today*, <u>12</u>, pp 102-105

ApoAlert TM CPP32 Protease Assay Kits User Manual (PT3083-1)

Clonetech Laboratories Inc.

Ballweber Edda 1995

Untersuchung zur Polymerisation des Aktins aus dem Komplex mit β -Thymosinen und zur Interaktion des Aktin-Thymosin β 4-Komplexes mit Aktin bindenden Proteinen Dissertation angefertigt im Fachbereich Chemie der Ruhr-Universität-Bochum

Bradford M. M. 1976

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, <u>106</u>, pp 248-254

Brancolini C, Benedetti M and Schneider C 1995

Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases *EMBO Journal*, <u>14, No 21</u>, pp 5179-5190

Brancolini C, Lazarevic D, Rodriguez J and Schneider C 1997

Dismantling Cell-Cell Contacts during Apoptosis Is Coupled to a Caspase-dependent Proteoytic Cleavage of β-Catenin *Journal of Cell Biology*, <u>139</u>, <u>No 3</u>, pp 759-771

Casciola-Rosen LA, Miller DK, Anhalt GJ and Rosen A 1994

Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death *J Biol. Chem.*, <u>269</u>, pp 30757-30760

Chaponnier C, Goethals M, Janmey P, Gabbiani F, Gabbiani G, and Vandekerckhove J. 1995

The specific NH₂-terminal Ac-EEED sequence of alpha smooth actin plays a role in polymerization *J Cell Biol.* <u>130</u>, *pp* 887-895.

Cole GM 1998

Antibody to Caspase-Cleaved Actin Detects Apoptosis in Differentiated Neuroblastoma and Plaque-Associated Neurons and Microglia in Alzheimer's Disease *Am J Pathol*, <u>152 No 2</u>, pp 379-389

Darmon AJ, Nicholson DW and Bleackley RC 1995

Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B *Nature*, <u>377</u>, pp 446-448

De La Cruz E and Pollard TD 1994

Transient kinetic analysis of rhodamine phalloidin binding to actin filaments *Biochemistry*, <u>33</u>, pp 14387-14392.

Elzinga M, Collins JH, Kuehl WM and Adelstein RS 1973

Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, <u>70</u>, pp 2687-2691

Enari M, Hug H and Nagata S 1995

Involvement of ICE-like proteases in Fas-mediated apoptosis *Nature*, <u>375</u>, *pp* 78-81

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A and Nagata S 1998

A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD *Nature*, <u>391</u>, pp 43-50

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL and Henson PM 1992

Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages *J. Immunol.*, <u>148 No 7</u>, pp 2207-2216

Fearnhead HO, Dinsdale D and Cohen GM 1995

An interleukin-1 beta-converting enzyme-like protease is a common mediator of apoptosis in thymocytes *FEBS Lett*, *375(3)*, *pp* 283-288

Green D and Kroemer G 1998

The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends in cell biology*, <u>8</u>, *pp* 267-271

Halenbeck R, McDonald H, Roulston A, Chen TT Conroy L and Williams LT 1998

CPAN, a human nuclease regulated by the caspase-sensitive inhibitor DFF-45 *Curr. Biol.*, <u>8</u>, pp 537-540

Hatano S and Oosava F 1966

Isolation and characterisation of plasmodium actin *Biochim. Biophys. Acta*, <u>127</u>, pp 488-498

Holmes KC, Popp D, Gebhard W and Kabsch W 1990

Atomic model of the actin filament *Nature*, <u>347</u>, *pp* 44-49

Huxley HF and Hanson J 1954

Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation *Nature*, <u>173</u>, *pp* 973-976 **Huxley HE, Hanson J and Niederkerke R 1954** Interference microscopy of living muscle fibers *Nature*, <u>173</u>, *pp* 971-973

Irmler M, Hertig S, McDonald HR, Sadoul R, Becherer JD, Proudfoot A, Solari R and Tschopp J 1995

Granzyme A is an interleukin 1-converting enzyme J. Exp. Med., <u>181</u>, pp 1917-1922

Izrailev S, Stepaniants S, Isralewitz B, Kosztin D, Lu H, Molnar F, Wriggers W and Schulten K 1999

Steered molecular dynamics.

In P. Deuflhard, J. Hermans, B. Leimkuhler, A. E. Mark, S. Reich, and R. D. Skeel, editors, Computational Molecular Dynamics: Challenges, Methods, Ideas, Lecture Notes in Computational Science and Engineering. Springer-Verlag, 1999.

Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR and Porter AG 1998

Caspase-3 Is Required for DNA-Fragmentation and Morphological Changes Associated with Apoptosis *J. Biol. Chem.*, 273, pp 9357-9360

Kabsch W and Vankerckhove J 1992

Structure and function of actin Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. <u>21</u>, pp 49-76

Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC 1990

Atomic structure of actin:DNase I complex *Nature*, <u>347</u>, pp 37-44

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE and Poirier GG 1993

Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis *Cancer Res*, *53:17*, *pp 3976-3985*

Kayalar C, Örd T, Testa MP, Zhong L-T, and Bredesen DE 1996

Cleavage of actin by interleukin 1- β -converting enzyme to reverse DNase I inhibition *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, <u>93</u>, pp 2234-2238

Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR 1972

Apoptosis: a basic biological phenomenom with wide-ranging implications in tissue kinetics *Br J Cancer*, <u>26</u>, *pp* 239-257

Kiefer J, Okret S, Jondal M and McConkey DJ 1995

Functional glucocorticoid receptor expression is required for cAMP-mediated apoptosis in a human leukemic T cell line *J Immunol*, <u>155:10</u>, pp 4525-4528

Kiessling P, Jahn P, Maier G, Polzar B and Mannherz HG 1995

Purification and Characterisation of Substilisin Cleaved Actin Lacking the Segment of Residues 43-47 in the DNase I Binding Loop *Biochemistry*, <u>34, No.45, pp 14834-14842</u>

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH and Peter ME 1995

Cytotoxity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor *EMBO Journal*, <u>14 No 22</u>, pp 5579-5588

Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW Koths, Kwiatkowsky and Williams LT 1997

Caspase-3 Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis *Science*, <u>278</u>, pp 294-298

Krammer PH, Dhein J, Walczak H, Behrmann I, Mariani S, Matiba B, Fath M, Daniel PT, Knipping E, Westendorp MO, Stricker K, Bäumler C, Hellbardt S, Germer M, Peter ME and Debatin K-M 1994

The Role of APO-1 Mediated Apoptosis in the Immune System Immunological Reviews, <u>142</u>, pp 175-191

Kyprianou N and Isaacs JT 1988

Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration *Endocrinology*, <u>122</u>, *pp* 552-562

Lacks SA 1981

Desoxyribonuclease I in mammalian tissues. Specifity of inhibition by actin *J. Biol. Chem.*, <u>256</u>, *pp* 2644-2648

Laemmli U.K. 1970

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature*, <u>227</u>, *pp* 680-685

Lazarides E and Lindberg U 1974

Actin is the naturally occuring inhibitor of desoxyribonuclease I *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, <u>71</u>, pp 4742-4746

Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG and Earnshaw WC1994 Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE *Nature*, <u>371</u>, pp 346-347

Lazebnik YA, Takahashi A, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG Kaufmann SH and Earnshaw WC 1995

Studies of the lamin proteinase reveal multiple biochemical pathways during apoptotic execution *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, <u>92</u>, pp 9042-9046

Levee MG, Dabrowska MI, Lelli JL Jr and Hinshaw DB 1996

Actin polymerisation and depolymerisation during apoptosis in HL-60 cells *Am J Physiol*, <u>271:6 Pt 1</u>, pp C 1981-1992

Lind SE, Yin HL and Stossel TP 1982

A regulator of actin filament length J. Clin. Invest., <u>69</u>, pp 1384-1387

Liu X, Zou H, Slaughter C and Wang X 1997

DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis *Cell*, <u>89</u>, *pp* 175-184

Lockshin RA and Williams CM 1965

Programmed cell death. IV. The influence of drugs on the breakdown of the insegmental muscles of silkmoths

J Insect Physiol, 11(6), pp 803-809

Lockshin RA and Williams CM 1965

Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths

J Insect Physiol, <u>11(7)</u>, pp 831-844

Lowe SW, Ruley HE, Jacks T and Housman DE 1993

p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxity of anticancer agents *Cell*, <u>74:6</u>, *pp* 957-967

Madaio MP, Fabbi M, Tiso M, Daga A and Pucetti A 1996

Spontaneously produced anti-DNA/DNase I autoantibodies modulate nuclear apoptosis in living cells

Eur. J. Immunol., <u>26</u>, pp 3035-3041

Mannherz HG, Barrington Leigh J, Leberman R and Pfrang H 1975

A specific 1:1 G-actin:DNase I complex formed by the action of DNase I to F-actin *FEBS Lett.*, <u>60</u>, pp 34-38

Mannherz HG, Goody RS, Konrad M and Nowak E 1980

The interaction of bovine pancreatic desoxyribonuclease and skeletal muscle actin *Eur. J. Biochem.*, <u>60</u>, pp 109-116

Mannherz HG, Peitsch MC, Zanotti S, Paddenberg R, Polzar B 1995

A New Function for an old Enzyme: The Role of DNase I in Apoptosis Current Topics in Microbiology and Immunology, <u>Vol. 198:</u> Pathways of Cytolysis, pp 161-174

Maravei DV, Trbovich AM, Perez GI, Tilly KI, Banach D, Talanian RV, Wong WW and Tilly JL 1997

Cleavage of cytoskeletal proteins by caspases during ovarian cell death:evidence that cell-free systems do not always mimic apoptotic events in intact cells *Cell Death and Differentiation*, <u>4</u>, pp 707-712

Martin SJ, Lennon SV, Bonham AM and Cotter TG 1990

Induction of Apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA- or protein synthesis *J. Immunol.*, <u>145</u>, pp 1859-1867

Martin SJ 1993

Apoptosis: suicide, execution or murder? Trends in Cell Biology, <u>3</u>, pp 141-144

Martin SJ, OBrien GA, Nishioka WK, McGahon AJ, Mahboubi A Saido TC and Green DR 1995

Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis J Biol Chem, <u>270:12</u>, pp 6425-6428

Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA and Green DR 1996

Phosphatidylserine Externalization during CD95-induced Apoptosis of Cells and Cytoplasts Requires ICE/CED-3 Protease Aktivity *J. Biol. Chem.*, 271 No 46, pp 28753-28756

Mashima T, Naito M, Fujita N, Noguchi K und Tsuruo 1995

Aspartate-Based Inhibitor of Interleukin-1β-Converting Enzyme Prevents Antitumor Agents-Induced Apoptosis in Human Myeloid Leukemia U937 cells *Biochem Biophys Res Comm*, <u>209 No. 3</u>, pp 907-915

Mashima T, Naito M, Fujita N, Noguchi K und Tsuruo T 1995 B

Identification of Actin as a Substrate of ICE and ICE-like Protease and Involvement of an ICE-like Protease but not ICE in VP-16-induced U937 Apoptosis *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, <u>217 No. 3</u>, pp 1185-1192

Mashima T, Naito M, Noguchi K, Miller DK und Nicholson DW 1997

Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis *Oncogene*, <u>14</u>, *pp* 1007-1012

Mashima T, Naito M and Tsuruo T 1999

Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis *Oncogene*, <u>18</u>, pp 2423-2430

McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz HG and Weeds AG 1993

Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing *Nature*, <u>364</u>, pp 685-692

Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH and Peter ME 1997

FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC) *EMBO Journal*, <u>16 No. 10</u>, pp 2794-2804

Metcalfe S, Weeds A, Okorokov AL, Milner J, Cockman M and Pope B 1999

Wild-type p53 protein shows calcium-dependent binding to F-actin *Oncogene*, <u>18</u>, p 2351-2355

Mills JC, Stone NL, Erhardt and Pittman RN 1998

Apoptotic Membran Blebbing Is Regulated by Myosin Light Chain Phosphorylation *J. Cell Biol.*, <u>140</u>, pp 627-637

Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweig EA and Yuan J 1993

Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the C-elegans cell death gene ced-3 *Cell*, <u>75</u>, *pp* 653-660

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel F, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME and Dixit VM 1996

FLICE, A Novel FADD-Homologous ICE/DED-3-like Protease, Is Recruited to the CD95 (Fas/APO-1) Death-Inducing Signaling Complex *Cell*, *85*, *pp* 817-827

Muzio M, Salvesen GS and Dixit VM 1997

FLICE Induced Apoptosis in a Cell-free System J. of Biol. Chem., <u>272, No. 5</u>, pp 2952-2956

Naora H and Naora H 1995

Differential expression patterns of β-actin mRNA in cells undergoing apoptosis *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, <u>211 No 2</u>, pp 491-496

Nemes Z Jr., Adány R, Balázs M, Boross P and Fésüs P 1997

Identification of cytoplasmatic actin as an abudant glutaminyl substrate for tissue transglutaminase in HL-60 and U937 cells undergoing apoptosis *J. Biol. Chem.*, <u>272 No 33</u>, pp 20577-20583

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK. Gallant M, Gareau Y, Griffin PR and Labelle M 1995

Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease nessesary for mammalian apoptosis *Nature*, <u>376</u>, *pp* 37-43

Ohtsu M, Sakai N, Fujita H, Kashiwagi M, Gasa S, Shimizu S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Sakiyama Y,Kobayashi and Kuzumaki N 1997

Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin *EMBO*, <u>16 No 15</u>, pp 4650-4656

Oltvai ZN and Korsmeyer SJ 1994

Checkpoints of Dueling Dimers Foil Death Wishes *Cell*, <u>79</u>, pp 189-192

Paddenberg R, Wulf S, Weber A, Heimann P, Beck LA and Mannherz HG 1996

Internucleosomal DNA fragmentation in cultured cells under conditions reported to induce apoptosis may be caused by mycoplasma endonucleases *EJCB*, 69, *pp* 105-119

Pardee J.D. und Spudich J.A 1982

Purification of muscle actin Methods Enzymol, <u>85</u>, pp 164-181

Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG and Tschopp J 1993

Characterization of the endogenous desoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death) *EMBO Journal*, <u>12 No.1</u>, pp 371-377

Peitsch MC and Tschopp J 1994

Granozyme B Methods Enzymol, <u>244</u>, pp 80-87

Pollard TD 1993

Actin and Actin binding proteins In Guidebook of the cytoskeletal and motor proteins, ed Kreis T, Vale R 3-11. Oxford, New York, Tokio: Oxford Univ. Press, pp 276 ff

Pollard TD and Cooper JA 1986

Actin and actin binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions *Ann. Rev. Biochem.* <u>55</u>, pp 987-1035

Pollard TD 1986

Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol.*, <u>103</u>, pp 2747-2754.

Pollard TD, Almo S, Quirk S Vinson V and Lattman EE 1994

Structure of actinbinding proteins: Insights about function at atomic resolution Annu. Rev. Cell. Biol. <u>10</u>, pp 207-249

Rauch F, Polzar B, Stephan H, Zanotti S, Paddenberg R and Mannherz HG 1997

Androgen Ablation Leads to an Upregulation and Intranuclear Accumulation of Desoxyribonuclease I in Rat Prostate Epithelial Cells Paralleling Thair Apoptotic Elimination *Journal of Cell Biology*, <u>137 No 4</u>, pp 909-923

Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA and Becker JW 1996

The Three-Dimensional Structure of Apopain/Cpp32, a Key Mediator of Apoptosis. *Nat.Struct.Biol.*, <u>3</u>, pp 619

Rudel T and Bokoch GM 1997

Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2 *Science*, <u>276</u>, *pp* 1571-1574

Safer D. 1989

An electrophoretic procedure for detecting proteins that binds actin monomers *Anal. Biochem.*, <u>178</u>, pp 32-37

Sakahira H, Enari M and Nagata S 1998

Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis *Nature*, <u>391</u>, pp 96-99

Samejima K, Tone S, Kottke TJ, Enari M, Sakahira H, Cooke CH, Durrieu F, Martins LM, Nagata, S Kaufmann SH and Earnshaw WC 1998

Transition from caspase-dependent to caspase-independent mechanisms at the onset of apoptotic execution LC LD LA2(1) = 225,220

J Cell Biol, <u>143(1)</u>, pp 225-239

Samejima K and Earnshaw WC 1998

ICAD/DFF regulator of apoptotic nuclease is nuclear *Experimental Cell Research*, <u>243</u>, pp 453-459

Schägger H und von Jagov G 1991

Blue native electrophoresis for isolation of membrane proteine complexes in enzymatically active form *Anal. Biochem.*, <u>199</u>, pp 223-231

Schutt CE, Myslik JC, Royzicki MD, Goonesekere NCW and Lindberg U 1993

The structure of crystalline profilin- β -actin *Nature*, <u>365</u>, pp 810-816

Segura M, and Lindberg U 1984.

Separation of non-muscle isoactins in the free form or as profilactin complexes. *J Biol Chem.* <u>259</u>, *pp* 3949-3954

Shi L, Kam CM, Powers JC, Aebersold R and Greenberg AH 1992

Purification of the three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate an target cell interactions *J Exp Med*, <u>176:6</u>, *pp* 1521-1529

Song Q, Wei T, Lees-Miller S, Alnemri E, Watters D and Lavin MF 1997

Resistance of actin to cleavage during apoptosis Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>94</u>, pp 157-162

Stephan H 1995

Nebenfachpraktikum Zellbiologie: Apoptosis und DNase I, Methoden zur Untersuchung der Beteiligung von Endonucleasen am Programmierten Zelltod Institut für klinische Cytobiologie und Cytopathologie der Philipps-Universität Marburg AG Prof. Dr. HG Mannherz

Stephan H, Polzar B, Rauch F, Zanotti S Ulke C and Mannherz HG 1996 Distribution of the desoxyribonuclease I (DNase I) and p53 in rat testis and their correlation with apoptosis *Histochem Cell Biol*, <u>106(4)</u>, pp 383-893

Straub FB 1942 Actin *Stud. Szeged. <u>2</u>, pp 3-15.*

Takashi R 1979

Fluorescence Energy Transfer Between Subfragment-1 and Actin Points in the Rigor Complex of Actosubfragment-1 Biochemistry, <u>18:23</u>, pp 5164-5169

Takashi R 1988

A Novel Actin Label: A Fluorescent Probe at Glutamine-41 and Its Consequences *Biochemistry*, <u>27</u>, pp 938-943

Tewari M and Dixit VM 1995

Fas- and Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis Is Inhibited by the Poxvirus crmA Gene Product *J. Biol. Chem.*, <u>270</u>, pp 3255-3260

Thornberry NA 1996

The caspase family of cystein proteases British Medical Bulletin, <u>53 No 3</u>, pp 478-490

Tobacman LS and Korn ED 1983

The kinetics of actin nucleation and polymerization *J. Biol. Chem.*, <u>258</u>, *pp* 3207-3214.

Towbin H, Staehlin T und Gordon J 1979

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applikations *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, <u>76</u>, pp 4350-4354

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E and Croce CM 1985

Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma *Science*, <u>228</u>, *pp* 1440-1443

Van Engeland M, Kuijpers HJH, Ramaekers FCS, Reutelingsperger CPM and Schutte B 1997

Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in Apoptosis *Exp. Cell Res.*, <u>235</u>, *pp* 421-430

Villa PG, Henzel WJ, Sensenbrenner M, Henderson CE and Pettmann B 1998

Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis

J. of Cell Science, <u>111</u>, pp 713-722

Walker NPC, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, Herzog L, Hugunin M, Houy W, Mankovich JA, McGuiness L, Orlewicz E, Paskind M, Pratt CA, Reis P, Summani A, Terranova M, Welch JP, Xiong L, Möller A, Tracey DE, Kamen R and Wong WW 1994

Crystal Structure of the Cysteine Protease Interleukin-1 β -Converting Enzyme: A (p20/p10)₂ Homodimer

Cell, <u>78</u>, pp 343-352

Weaver VM, Carson CE, Walker PR, Chaly N, Lach B, Raymond Y, Brown DL and Sikorska M 1996

Degradation of nuclear matrix and DNA cleavage in apoptotic thymocytes *J Cell Sci*, <u>109 Pt 1</u>, pp 45-56

Wegner A 1976

Head to tail polymerization of actin J Mol Biol., <u>108</u>, pp 139-150.

Wegner A and Isenberg G 1983

12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiologicalsalt conditions

Proc Natl Acad Sci U S A, <u>80</u>, pp 4922-4925.

Wegner A, Aktories K, Ditsch A, Just I, Schoepper B, Selve N and Wille M 1994

Actin-Gelsolin interaction

Actin: Biophysics, Biochemistry, and Cell Biology ed. by Estes JE and Higgins PJ, Plenum Press New York 1994, pp 97-104

Wyllie AH , Donahue V, Fischer B, Keesey J and Manzow S 1998

Apoptosis and Cell Proliferation 2nd Edition 1998 Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica

Wyllie AH 1980

Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation *Nature*, <u>284</u>, *pp* 555-556

Wright SC, Wang H, Wei QS, Kinder DH and Larrick JW 1998

Bcl-2-mediated Resistance to Apoptosis Is Associated with Glutthione-induced Inhibition of AP24 Activation of Nuclear DNA Fragmentation *Cancer Research*, <u>58</u>, pp 5570-5576

Yang F, Sun X, Beech W, Teter B, Wu S, Sigel J, Vinters HV, Frautschy SA and Yin HL, Albrecht JHand Fattoum A 1981

Identification of gelsolin, a Ca^{2+} -dependent regulatory protein of actin gel-sol transformation, and its intracellular distribution in a variety of cells and tissues *J. Cell Biol.*, <u>91</u>, pp 901-906

Yang F, Sun X, Beech W, Teter B, Wu S, Sigel J, Vinters HV, Frautschy SA and Cole GM 1998

Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaqueassociated neurons and microglia in Alzheimer's disease *American Journal of Pathology*, <u>152 No 2</u>, pp 379-389

Zechel K and Weber K 1978

Actins from mammals, bird, fish and slime mold characterized by isoelectric focusing in polyacrylamide gels *Eur. J. Biochem.*, <u>89</u>, pp 105-112

Lebenslauf

Name: Anschrift:	Kristin Hengstenberg Molenarkweg 16
Geburtsdatum	44588 Dorumund 12 Dezember 1967
Geburtsort:	Denver/Colorado/USA
Familienstand:	verheiratet
Schule	
1974-1978	Rudolf-Steiner-Schule in Mannheim
1978-1984	Rudolf-Steiner-Schule in Bochum
1983-1984	University High School in San Diego, USA
1984-1988	Gymnasium im Schulzentrum Hattingen
Juni 1988	Abitur
Universität	
1988-1994	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
November 1993-November 1994	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Bioenenergetik an der medizinischen Fakultät mit dem Thema: "Expression von P450-Isoenzymen in Leber und Darm der Ratte"
Februar 1995-Dezember 1998	Promotion am Lehrstuhl für Anatomie und Embryologie der medizinischen Fakultät über das Thema: "Untersuchung von Proteinen des Cytoskeletts während der Apoptose"