

Max-Delbrück Centrum für Molekulare Medizin



[PDF-Version]

DISSERTATION

Identifikation molekularer Regulatoren der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin
Dipl. Biol. Anke Rickers

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. J.P. Rabe

Gutachter: 1. Prof. Dr. B. Dörken
 2. Prof. Dr. B. Wittmann-Liebold
 3. Prof. Dr. B. Friedrich

eingereicht: 27.10.1998

Datum der Promotion: 16. 02.1999

1 Einleitung

1.1 Apoptose: Ein Programm zellulärer Selbstzerstörung

Während der Entwicklung, Differenzierung und Homöostase von Geweben und Organismen unterliegen Zellen ständig dem Einfluß verschiedener äußerer und innerer Faktoren, die für die Erhaltung des Gleichgewichtes zwischen Proliferation und Apoptose verantwortlich sind (1). Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein aktiver biochemischer Prozeß, der nach einem genetisch festgelegten Programm abläuft und schließlich zum Tod der Zelle führt. Fast jede Zelle eines vielzelligen Organismus kann durch Apoptose sterben, wobei je nach Zelltyp, Differenzierungszustand der Zelle, sowie zellulärem Kontext unterschiedliche Signale Apoptose auslösen können (2).

Apoptose kann über Signale wie z.B. Röntgenstrahlen, Glucocorticoide und einige Zytostatika, die direkt im Zytoplasma wirken, oder über den Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden (3). Bei epithelialen Zellen kann der Verlust der Zelladhäsion zur Apoptose führen (4). Ebenso können Signale, die durch membranständige Rezeptoren vermittelt werden, wie z.B. Apo1/FAS, CD3, TNF bei T-Zellen oder IgM bei B-Zellen Apoptose induzieren (5).

Während der Differenzierung des Immunsystems ist Apoptose ein entscheidender Mechanismus zur Eliminierung nicht-funktioneller bzw. autoreaktiver Lymphozyten. Unreife T- und B-Zellen, die keinen funktionellen T- bzw. B-Zell-Antigenrezeptor exprimieren sterben durch Apoptose. In einer zweiten Selektionsrunde werden unreife B-Zellen, die mit körpereigenen Antigenen reagieren, ebenfalls durch Apoptose eliminiert. In diesem Differenzierungsschritt "erlernt" das Immunsystem die Toleranz gegenüber Autoantigenen. Diese Form der Apoptose wird als negative Selektion oder Aktivierungs-induzierter-Zelltod bezeichnet, da hier ein über den Antigenrezeptor vermitteltes Signal den programmierten Zelltod auslöst (6).

Viele Viren blockieren den Prozeß der Apoptose, der von den befallenen Zellen selbst oder durch das Immunsystem eingeleitet wird, durch die Expression von anti-apoptotischen Proteinen (7).

Apoptose ist durch morphologische Kriterien gekennzeichnet und kann so deutlich von der Nekrose unterschieden werden. Wichtige morphologische Kennzeichen sind: Chromatin-Kondensation, Kern- und DNA- Fragmentierung, charakterisiert durch das Auftreten der DNA-Leiter, "membrane-blebbing" und Änderungen der Membransymmetrie, Umstrukturierung des Cytoskeletts und Zellschrumpfung (2).

Im Körper werden apoptotische Zellen aufgrund von Membranänderungen schnell erkannt und phagozytiert, wodurch die Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile und damit Entzündungsreaktionen verhindert werden (8).

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Molekülen identifiziert, die an der Regulation des programmierten Zelltodes beteiligt sind. Dabei handelt es sich vor allem um pro- und anti-apoptotische Proteine der bcl-2 Familie, der immer größer werdenden Familie der Caspasen,

Apoptose-spezifische Proteasen und deren Substrate, sowie mit diesen Proteinen assoziierte und interagierende Moleküle (9).

Eine Fehlregulation der Expression dieser Proteine kann Ursache verschiedener Erkrankungen sein. In folliculären B-Zell Lymphomen führt eine chromosomale Translokation zur Überexpression von bcl-2, einem anti-apoptotischen Protein (10). Beim Mammakarzinom wird bax-alpha, ein pro-apoptotisches Protein nicht exprimiert (11). Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen, sowie HIV spielt die Fehlregulation der Apoptose eine wichtige Rolle (12). Interessanterweise sind Proteine der bcl-2 Familie, sowie der Caspasen evolutionär konserviert (Caenorhabditis elegans, Drosophila, Mensch). Damit bietet die Aufklärung der apoptotischen Prozesse Einblicke in das Verständnis allgemein gültiger molekularer Prinzipien der Apoptose, sowie Ansatzpunkte für mögliche Therapien von Krankheiten, deren Ursache auf die Fehlregulationen der Apoptose zurückzuführen sind (13).

1.2 Molekulare Regulatoren der Apoptose

Eine Schlüsselrolle bei der Identifizierung wichtiger Apoptoseregulatoren spielte der Nematode Caenorhabditis elegans. Genetische Studien führten zunächst zur Isolierung von drei Genen, deren Bedeutung für die Entwicklung des Wurms entscheidend ist. Die Aktivität der Gene ced-3 und ced-4 ist für den programmierten Zelltod von 131 somatischen Zellen im Verlaufe der Entwicklung des Nematoden verantwortlich (14). Ced-9 ist ced-3 und ced-4 übergeordnet und verhindert Apoptose, indem es die Aktivierung von ced-3 und ced-4 blockiert (15). Durch die Identifikation von bcl-2 als das humane Homologe von ced-9 wurde deutlich, daß es sich beim programmierten Zelltod um einen evolutionär konservierten Mechanismus handelt. Im humanen System zeichnet sich allerdings ein sehr viel komplexeres Bild ab. Es konnten mittlerweile ganze Genfamilien identifiziert werden, die den Prozeß der Apoptose steuern. Die wichtigsten regulatorischen Proteine der Apoptose und ihre Interaktionen werden in folgenden Kapiteln kurz vorgestellt (1.2.1-1.2.4).

1.2.1 Proteine der bcl-2 Familie

Bcl-2 wurde als erstes Mitglied einer Apoptose-regulierenden Genfamilie beim Menschen identifiziert. Bei folliculären B-Zell-Lymphomen wurde bcl-2 zuerst als Onkogen beschrieben. Hier führt eine chromosomale Translokation (t (14;18)) zu einer konstitutiven Überexpression von bcl-2, und die anti-apoptotische Wirkung führt zur Bildung von Lymphomen (10, 16). Darüber hinaus wurde von Vaux et al. beschrieben, das bcl-2 eine regulierende Rolle im programmierten Zelltod spielt (17). Die Transfektion und Expression von bcl-2 in IL3 abhängigen T-Zellen unterdrückt die Apoptose in Abwesenheit von IL3. Dieses Ergebnis wurde in anderen Zellen bestätigt und bewies die anti-apoptotische Wirkung von bcl-2. Bcl-2 Transfektanten werden Zytostatika resistent (18). In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte gezeigt werden, das eine bcl-2-antisense-Therapie humane Melanome in SCID Mäusen gegenüber Chemotherapie sensitiviert (19).

Weitere Mitglieder der bcl-2 Familie bzw. verwandte Proteine wurden durch Sequenzhomologien oder aufgrund ihrer Wechselwirkung mit dem bcl-2 Protein identifiziert (20). Dabei können die Mitglieder der bcl-2 Familie funktionell in zwei Gruppen unterteilt werden: in Antagonisten der

Apoptose (bcl-2, bcl-x_L, mcl-1, A1) und in Agonisten der Apoptose (bax, bak, bcl-x_S, bad, bok). Die Proteine der bcl-2 Familie sind durch die konservierten Regionen BH1-4 (bcl-2 homology region) charakterisiert, die für die biologische Aktivität, sowie die Dimerisierung und Heterodimerisierung wichtig sind (20-22).

Am Besten charakterisiert sind die Proteine bcl-x und bax. Bcl-x kann in zwei Splicevarianten nachgewiesen werden, wobei die lange Splicevariante bcl-x_L Zellen vor Wachstumsfaktorentzug induzierter Apoptose schützt. Die kurze Splicevariante bcl-x_S kann hingegen die bcl-2 Wirkung antagonisieren und somit proapoptotisch wirken. Bcl-x_S wird vor allem in Geweben mit hohem "Zell-Turnover" exprimiert, bcl-x_L dagegen hauptsächlich in langlebigen, postmitotischen Zellen (23). Die dreidimensionale Struktur von bcl-x_L gab Aufschluß über mögliche funktionelle Domänen des Proteins. Es besteht aus zwei zentralen, hydrophoben alpha-Helices, die von amphipatischen Helices umgeben sind. Ein 60 Aminosäure großer *loop* verbindet Helix alpha 1 und alpha 2. Die drei BH1-3 Domänen liegen eng beieinander und bilden eine hydrophobe Spalte, die evtl. für die Dimerisierung mit anderen Proteinen der bcl-2 Familie notwendig ist (24).

Bax kann ebenfalls in unterschiedlichen Splicevarianten vorkommen. Bax-alpha verstärkt die durch Wachstumsfaktor-Depletion induzierte Apoptose und kann die bcl-2 Wirkung wahrscheinlich über die Ausbildung von Heterodimeren (bcl-2/bax) antagonisieren (21, 25). Eine Heterodimerbildung wurde auch für bcl-x_L und bax beschrieben. Allerdings konnte gezeigt werden, daß für den antiapoptotischen Effekt von bcl-x_L eine Dimerbildung mit bax nicht notwendig ist (26). Neuere Daten aus transgenen Tiermodellen zeigen, daß bax-alpha und bcl-2 unabhängig voneinander anti- bzw. - proapoptotisch wirken können (27). So kann in bcl-2-knock-out-Mäusen eine Genkopie von bax-alpha Apoptose fördern. Ebenso kann in bax-knock-out-Mäusen die Überexpression von bcl-2 Apoptose blockieren (28). *In vivo* wird bax-alpha vor allem in Geweben exprimiert, in denen vermehrt Apoptose stattfinden kann, wie z.B. im Keimzentrum von Lymphfollikeln. In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte anhand von Deletionsmutanten im *yeast two-hybrid* System gezeigt werden, das die antiapoptotische Domäne und die für die Interaktion mit anderen Molekülen der bcl-2 Familie wichtige Region in der BH3 Domäne des bax Proteins liegt (29).

Entfernter verwandte Proteine (Blk, Bld, Bim, Bad) besitzen nur die BH3 Domäne. Mutagenese Studien an Bld und Bad zeigen, daß diese BH3 Domäne für die Bindung an bcl-2 und bcl-x_L sowie die proapoptotische Funktion notwendig ist (30).

1.2.2 Regulation und mögliche Funktionsweisen der Proteine der bcl-2 Genfamilie

Die Regulation und die Funktion der verschiedenen Proteine der bcl-2-Familie ist noch weitgehend ungeklärt und wird kontrovers diskutiert. Aus der Stukturaufklärung des bcl-x_L Proteins und seiner Homologie zu anderen Proteinen ergaben sich allerdings Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen und Funktionen (24).

Ein wichtiger Regulationsmechanismus scheint die bereits erwähnte Bildung von Homo- und Heterodimeren zu sein. In ersten Modellen ging man davon aus, das bcl-2 und bax sowohl

heterodimerisieren, als auch homodimerisieren können und das Verhältnis von bcl-2 und bax Molekülen über das Schicksal der Zelle entscheidet. Mittlerweile zeichnet sich ein viel komplexeres Bild ab (31). Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Befunde dargelegt.

Die Dimerisierung von bcl-2 mit sich selbst scheint für die anti-apoptotische Funktion des Proteins essentiell zu sein. Bcl-2 Mutanten, die nicht dimerisieren können, verlieren ihre anti-apoptotische Wirkung. Andere bcl-2 Familien Mitglieder können nur beschränkt heterodimerisieren. Bak z.B. bindet bcl-x_L, nicht aber bcl-2, bcl-x_S oder bax. Bad hingegen kann nicht homodimerisieren (22, 32, 33).

Andere bcl-2 verwandte Proteine werden gewebsspezifisch exprimiert, wie z.B. das Protein bok, das nur im reproduktiven Gewebe nachgewiesen wurde (34). Die meisten Mitglieder der bcl-2 Familie, werden allerdings ubiquitär exprimiert (35).

Mittlerweile sind mindestens elf weitere Proteine verschiedener Funktion identifiziert worden, die Proteine der bcl-2 Familie binden. Die Proteinkinase Raf1 bindet an die BH4 Domäne von bcl-2 und wird dann an die Mitochondrienmembran transportiert (36). Bag-1 ist mit dem HGF- (*hepatocyte growth factor*) Rezeptor assoziiert und ist somit vielleicht ein Adaptor-Molekül zwischen dem Tyrosin Kinase Rezeptor und der anti-apoptotischen Maschinerie (37).

Ein weiterer Regulationsmechanismus ist wahrscheinlich die posttranslationelle Phosphorylierung der *loop* Region von bcl-x_L und bcl-2. Die Bedeutung dieser Modifikation wird kontrovers diskutiert und einige Publikationen deuten auf eine Inaktivierung von bcl-2 durch die Phosphorylierung dieser Region hin. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß Deletionen der *loop* Struktur die anti-apoptotische Funktion von bcl-x_L und bcl-2 unterdrücken (38). Die *loop* Region wird wiederum zumindest *in vitro* durch Caspase 3, eine Apoptose-spezifische Protease, gespalten, wodurch ein proapoptisches Fragment entsteht. Dieses Ergebnis wurde auch durch die Expression des verkürzten Proteins, der Δ N34-bcl-2 Mutante bestätigt, die vermehrt zur Apoptose führt (39, 40).

Es gibt Hinweise dafür, daß bcl-2 als Anti-Oxidans wirken kann, die entsprechenden Befunde sind aber umstritten.

Die Aufklärung der Kristallstruktur von bcl-x_L zeigte strukturelle Homologien zu den Colicinen, bakteriellen Proteinen, die in der Lage sind, Poren auszubilden. In Experimenten mit rekombinanten Proteinen der bcl-2-Genfamilie und künstlichen Lipidmembranen konnten elektrophysiologisch Ionenströme gemessen werden, worauf für bcl-2 eine Funktion als Ionenkanal postuliert wurde (41). Unklar ist zur Zeit, ob diese Kanäle mit der Freisetzung mitochondrialer Proteine bei der Apoptose in Zusammenhang stehen, da bcl-2 und bcl-x_L unter anderem in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind (42).

Proteine der bcl-2 Familie interagieren über verschiedene Cofaktoren mit den Caspasen. Hier scheint ebenfalls ein wichtiger Mechanismus der Apoptose Regulation vorzuliegen. Er wird unter 1.2.4 erläutert.

1.1.3 Caspasen und Caspasen-Substrate

Die Klonierung des *ced-3*-Gens aus *Caenorhabditis elegans* zeigte eine Homologie zu dem humanen Protein ICE (*interleukin 1 converting enzyme*) auf, einer Cysteinprotease, die aus dem Vorläuferprotein pro-IL-1 β das biologisch aktive IL-1 β freisetzt. Damit war das erste Mitglied einer ständig wachsenden Familie von Proteasen definiert, die als Effektoren bei dem Prozeß der Apoptose wirken. Diese Klasse von Proteasen wird als Caspasen (*cysteine aspartate-specific proteases*) bezeichnet, da sie ein konserviertes Cystein enthalten und nach Aspartat in der Position P1 spalten (43). Sie werden als ca. 35 KDa große Proenzyme synthetisiert und sind in der aktiven Konformation heterotetramere Proteine aus zwei ca. 10 KDa und zwei ca. 20 KDa großen Untereinheiten (44). Neben der autokatalytischen Aktivierung scheinen die Proteasen sich zum Teil auch gegenseitig zu aktivieren. Inzwischen wurden mindestens 11 Mitglieder dieser Familie kloniert. Eine phylogenetische Analyse erlaubt eine Gruppierung in zwei Untergruppen. Dabei scheint die ICE-Untergruppe (Caspase-1, -4 und -5) überwiegend bei Entzündungsreaktionen eine Rolle zu spielen. Die *ced-3* Untergruppe (Caspase-2, -3, -6, -7, -9 und -10) ist für den Prozeß der Apoptose wichtig, was durch folgende Befunde belegt wird:

In *ced-3* ist die höchste Homologie zu der humanen Caspase 3 besitzt, für die Entwicklung des Nematoden notwendig (14). Caspase 3 knock-out-Mäuse zeigen schwere Defekte in der Hirnentwicklung, ein Prozeß bei dem extensiv Apoptose stattfindet (45). Viren hingegen haben Mechanismen entwickelt, um die von ihnen befallenen Zellen vor Apoptose zu schützen. Die dafür verantwortlichen viralen Proteine (z.B. CrmA, p35, IAPs) interagieren dabei spezifisch mit den Caspasen und blockieren sie (46).

Caspasen stellen somit eine neue Klasse von Proteasen dar, die während der Apoptose aktiviert werden und spezifisch spalten. Sie stellen damit wichtige Proteine in dem Signaltransduktionsweg der Apoptose dar. Neben den Caspasen selbst konnten in den letzten Jahren einige spezifische Substrate der Caspasen identifiziert werden, wie z.B. das 70 KDa U1 Ribonukleoprotein, Lamine, Proteinkinase-C Δ Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase, verschiedene Komponenten des Cytoskeletts, die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), pRB Tumorsuppressor und das Onkoprotein MDM2 (47-51). Welche Bedeutung die Spaltung dieser Proteine im Prozeß der Apoptose hat ist bisher weitgehend ungeklärt. Die Spaltung verschiedener Strukturproteine wie β -Aktin ist eventuell für die Umstrukturierung des Cytoskeletts wichtig (52). Die Spaltung des ICAD Proteins (λ), das aus Mauszellen isoliert wurde, hat die Freisetzung der Endonuclease CAD zur Folge, die wiederum für die charakteristische DNA Fragmentierung während der Apoptose verantwortlich ist. Aus dem Cytosol von HeLa Zellen wurde nun ein Faktor (DFF genannt) isoliert, der das humane Homologe zu ICAD darstellt (53-55). Die Aktivität der Caspasen scheint somit wichtig zu sein, um die notwendigen Apoptose-Effektoren einer Zelle zu aktivieren. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die Transfektion der Caspase 3 alleine nicht ausreicht, um Apoptose zu induzieren. Die zelltypspezifische Aktivierung verschiedener Caspasen und deren Substrate stellen aber noch weitgehend ungeklärte Signaltransduktionsnetzwerke der Apoptose dar. Die

Regulation der Caspasenaktivität unterliegen einer genauen Kontrolle. Die Aktivierungskaskade der Caspasen ist bisher am besten in der Apo1/FAS induzierten T-Zell Apoptose untersucht und wird unter 1.3.1 dargestellt. Publikationen des letzten Jahres konnten eine Verbindung zwischen den Caspasen und den Mitgliedern der bcl-2 Genfamilie aufzeigen (1.2.4).

1.1.4 Interaktion der Proteine der bcl-2 Genfamilie mit den Caspasen

Die biochemische Aufreinigung Apoptose-induzierender Faktoren aus dem Cytosol apoptotischer HeLa Zellen führte im letzten Jahr zur Identifikation der Proteine Apaf-1, Apaf-2 und Apaf-3 (). Apaf 3 konnte als Caspase-9 identifiziert werden und ist damit zu ced-3 homolog. Apaf-1 ist das lange gesuchte humane Homologe zu Ced-4 während Apaf-2 das Protein Cytochrom c ist.

Es konnte gezeigt werden, daß Ced-4 sowohl mit Ced-9 (homolog zu bcl-2) als auch mit Ced-3 (homolog zu Caspase 3) assoziieren kann und einen "Apoptosom" genannten Komplex bildet. Die Expression von Ced-4 in humanen Zellen konnte ebenso eine Assoziation mit bcl-2 und Caspase-9, d.h. einen trimolekularen Komplex herstellen. Interessanterweise kann bax-alpha diese Assoziation blockieren. Ced-4 und das humane Homologe Apaf-1 spielen somit eine zentrale Rolle im Signaltransduktionsweg der Apoptose, indem sie die Proteine der bcl-2 Familie und die Caspasen biochemisch verbinden (56, 57).

Cytochrom c scheint in humanen Zellen ein wichtiger Cofaktor für die Aktivierung der Caspase 9 zu sein. Bisher wurde angenommen, daß Cytochrom c über PT-Poren (*permeability transition*-Poren) aus den Mitochondrien freigesetzt wird (58-60). Neueste Ergebnisse zeigen, daß die Cytochrom c Freisetzung unabhängig von der mitochondrialen Depolarisation und zu einem früheren Zeitpunkt stattfindet (61). Ungeklärt bleibt, warum in Zellen, die bcl-2 oder bcl-x_L überexprimieren, und keine Anzeichen von Apoptose zeigen, die Cytochrom c Freisetzung blockiert ist. Das die antiapoptotische Wirkung von bcl-2 nicht alleine auf die Blockade der Cytochrom c Freisetzung zurückzuführen ist, zeigte die Injektion von Cytochrom c in bcl-2 überexprimierenden Transfektanten. Diese Transfektanten sind gegenüber nicht transfizierten Zellen nach Cytochrom c Injektion vermindert Apoptose sensitiv. Außerdem ist bcl-2 nicht nur in der Mitochondrienmembran, sondern auch im Endoplasmatischen Retikulum und der Kernmembran lokalisiert (62, 63). In einem zellfreien System kann Cytochrom c Apoptose-spezifische Veränderungen über die Aktivierung der Caspase 9 induzieren, die dann Caspase 3 aktiviert. Dieser Prozeß ist ebenfalls dATP abhängig (58). In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte hingegen *in vitro* gezeigt werden, daß die Caspase 9 Aktivierung auch unabhängig von Cytochrom c abläuft. Apaf-1 induziert die Oligomerisierung der Procaspase-9, was die autokatalytische Spaltung und Aktivierung der Caspase 9 zur Folge hat. Ebenso konnte gezeigt werden, das C-terminale Deletionsmutanten von Apaf-1 konstitutiv aktiv sind und Procaspase 9 unabhängig von Cytochrom c und dATP prozessieren und aktivieren können (64).

1.3 Apoptose im Immunsystem

Der programmierte Zelltod stellt einen wichtigen Mechanismus während der Differenzierung des

Immunsystems dar. Dabei spielt die Eliminierung von Immunzellen in verschiedenen Stadien der Reifung von T und B-Zellen eine wichtige Rolle (65).

Apoptose kann über Signale verschiedener Oberflächenmoleküle ausgelöst werden. In bestimmten Stadien der Entwicklung sind aber ebenso verschiedene Signale notwendig, um das Überleben der Zellen zu sichern und Apoptose zu unterdrücken. IL2 oder IL3 Mangel z.B. kann zur Apoptose von reifen T-Zellen führen. Unreife Thymocyten, die über ihren CD3/T-Zell-Rezeptor Komplex stimuliert werden, sterben durch Apoptose (negative Selektion). Ebenso werden Thymocyten, die Rezeptoren besitzen, die keine "Eigen"-MHC-Moleküle erkennen, eliminiert (positive Selektion). Ein direkt mit der Apoptose-assoziiertes Antigen bei T-Zellen ist der Apo1/FAS Rezeptor, der zur Familie der TNF-Rezeptoren gehört (66).

Ein dem T-Zell Modell analoges Prinzip der negativen Selektion führt zur Eliminierung autoreaktiver B-Zellen. Autoreaktive, unreife B-Zellen durchlaufen den Prozeß des *receptor editing*, wobei für den Rezeptor kodierende Genloci neu rearrangiert werden und die Zellen eine neue Spezifität erhalten, oder sie sterben durch Apoptose, wodurch ebenfalls Selbsttoleranz erreicht wird. Die Rezeptor-induzierte Apoptose führt somit zur Ausbildung eines spezifischen B- und T-Zell Repertoires (67-69).

Apoptose kann somit über verschiedene Stimuli ausgelöst werden, wobei die Signaltransduktion in die Zelle noch weitgehend ungeklärt ist. Die molekularen Mechanismen der Apoptose sind am besten in der Apo1/FAS induzierten T-Zell Apoptose untersucht worden. Die Signalkaskade wird unter 1.3.1 kurz dargestellt.

1.3.1 Apo1/FAS induzierte T-Zell Apoptose

Mit der Identifikation des Apo1/Fas Rezeptors und seines Liganden wurden wichtige Mediatoren der Apoptose identifiziert. Die Bedeutung des FAS/FAS-L Systems wurde zunächst in lpr Mäusen klar. Diese Mäuse besitzen einen Gendefekt im FAS Rezeptor und leiden unter lymphoproliferativer und systemischer Autoimmunität. Mäuse, die einen Gendefekt im Fas Liganden haben (gld-Mäuse), leiden ebenfalls unter Lymphadenopathie und Autoimmunität (70, 71). Der gegen den Apo1/FAS-Rezeptor gerichtete monoklonale Antikörper anti-Apo1/FAS oder der Apo1/FAS-Ligand führt zur Induktion von Apoptose bei einer Reihe von unterschiedlichen Zellen

Der Apo1/FAS-Rezeptor gehört zur Familie der TNF/NGF-Rezeptoren, die gekennzeichnet sind durch cysteinreiche, extrazelluläre Domänen sowie eine cytoplasmatische *death domain*. (72). In den letzten Jahren konnten Rezeptor-assoziierte Proteine identifiziert werden, die an der Signalweiterleitung in der Zelle beteiligt sind. Am Beispiel des Apo1/FAS-Rezeptors soll hier kurz die Aktivierungskaskade verschiedener Caspasen dargelegt werden. Eine ähnliche Reaktionskette konnte auch für den TNF-Rezeptor aufgeklärt werden.

Nach Trimerisierung des Apo1/FAS-Rezeptors durch den FAS-Liganden oder anti-FAS-Antikörper kommt es zur Assoziation des Adaptorproteins FADD (*FAS associated death domain* an den Rezeptor. Die Wechselwirkung kommt durch die in beiden Proteinen vorhandene *death domain*)

zustande. An FADD bindet dann pro-FLICE (FADD like-ICE), über die *death effector domain*, die sowohl in pro-FLICE als auch in FADD enthalten ist (73, 74). Nach Assoziation dieses DISC genannten Komplexes wird aus pro-FLICE die aktive Caspase FLICE (Caspase-8) durch proteolytische Spaltung freigesetzt. Diese wiederum kann weitere Caspasen, wie Caspase 3 aktivieren und so die proteolytischen Spaltungen, die zum Zelltod führen, auslösen (Abb. 1).

Neben den bereits erwähnten viralen Proteinen, die die Apo1/FAS-vermittelte Apoptose blockieren können, wurden inzwischen auch inhibitorische (dominant negative) Proteine aus Säugern kloniert. Die Proteine I-FLICE/FLAME können wie FLICE an FADD oder ähnliche Adaptormoleküle binden, sind aber im Gegensatz zu FLICE katalytisch inaktiv. Dies bedeutet, daß ihre Bindung an den aktivierten Apo1/FAS-Rezeptor die Signalweiterleitung terminiert, da keine aktive Caspase generiert werden kann (75, 76).

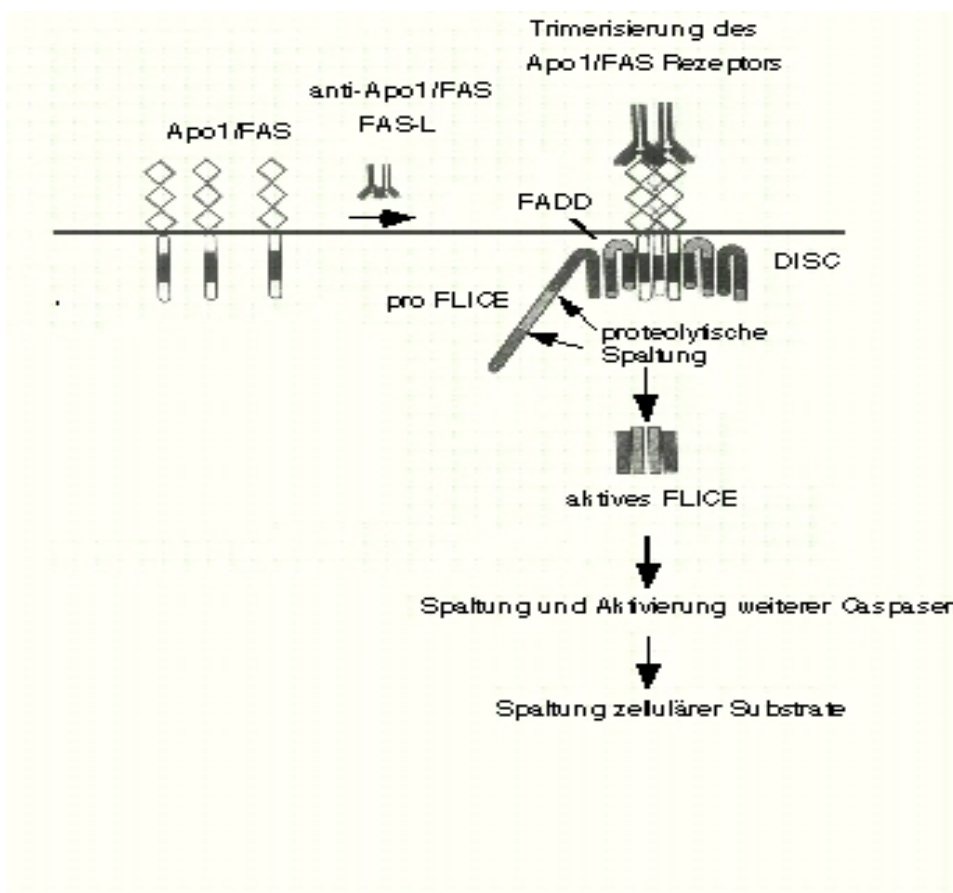


Abb. 1 Modell der Caspase-Aktivierung nach anti-FAS induzierter Apoptose Die Trimerisierung des FAS Rezeptors durch den FAS Liganden oder anti-FAS Antikörper führt zur Bindung von FADD über die death domain des Rezeptors. Pro-FLICE bindet dann über die death effector domain an FADD. Dieser Rezeptor-Komplex wird als DISC bezeichnet und führt durch

proteolytische Spaltung von Pro-FLICE zur aktiven Caspase FLICE. FLICE aktiviert weitere Caspasen, die wiederum zelluläre Substrate spalten.

1.3.2 B-Zelldifferenzierung und anti-IgM induzierte Apoptose

Die B-Zelldifferenzierung führt von der naiven Stammzelle zur reifen B-Zelle und schließlich zur Antikörper sezernierenden Plasmazelle oder zur Memory Zelle. Die einzelnen Differenzierungsschritte sind durch die aufeinanderfolgende Expression verschiedener Gene, Genrearrangements der Immunglobulinloci, der kontrollierten Expression der Recombinase-aktivierenden Gene (RAG1/RAG-2), sowie der Terminalen Transferase während der V-D-J Rearrangements gekennzeichnet (77). Die einzelnen Stadien der Reifung finden in verschiedenen Kompartimenten des Immunsystems statt und sind durch die Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle charakterisiert (Abb. 2) .

Bei der B-Zelldifferenzierung spielen Signale, die über den B-Zellrezeptor vermittelt werden eine entscheidende Rolle. Während der B-Zellentwicklung wird zunächst ein vorläufiger Rezeptor-Komplex exprimiert, der nach erfolgreichem Rearrangement der Gene, aus der schweren Kette des Immunglobulins besteht und in Assoziation mit einer Surrogat-Leicht-Kette (λ -5, VpreB) auf der Oberfläche der Pro-/Pre-B-Zellen exponiert wird (69). Mit diesem Oberflächen-Immunglobulin ist nichtkovalent ein signaltransduzierender Molekülkomplex assoziiert. Zu diesem Komplex gehören die Proteine Ig- α und Ig- β . Die erfolgreiche Expression dieses Pre-B-Zellrezeptor Komplexes führt über noch nicht verstandene Signaltransduktionsketten zum Rearrangement der leichten Ketten-Gene und damit zur Expression des reifen B-Zellrezeptors, der sich aus dem funktionellen Immunglobulin (IgM, IgD) und den beiden Ig- α und Ig- β Ketten zusammensetzt. Jede B-Zelle generiert eine schwere und eine leichte Kette, so daß jede reife Zelle nur Rezeptoren mit einzigartiger Spezifität exprimiert (*allelic exclusion*). Unreife B-Zellen exponieren zunächst nur IgM auf der Zelloberfläche, während reife B-Zellen IgM und IgD positiv sind. Nach der Reifung im Knochenmark wandern die B-Zellen zu den peripheren lymphoiden Organen. Antigenstimulation sowie Stimulation durch T-Helfer Zellen führt zur Bildung von Keimzentren, in der die B-Zellen proliferieren und zu Memory-B-Zellen oder Antikörper sezernierenden Plasmazellen differenzieren. Durch somatische Hypermutation wird eine weitere Diversifikation des sekundären Antikörper Repertoires erreicht (69, 78).

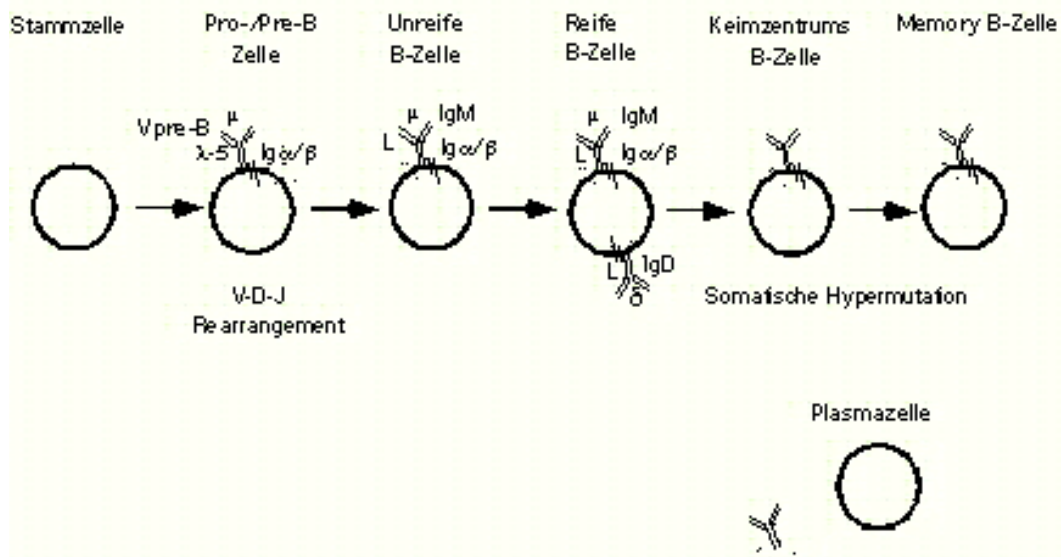


Abb. 2 Modell der B-Zelldifferenzierung

Nach Proliferation und Differenzierung der Stammzellen, sowie Rearrangement der Immunglobulingene werden die schwere Kette mit einer vorläufigen Surrogat-Leicht-Kette (lambda-5, Vpre-B) in Assoziation mit den Igalpha und Igβ-Ketten auf der Zelloberfläche der Pro-/Pre-B-Zelle exponiert. Nach erfolgtem Rearrangement der leichten Ketten exponiert die unreife B-Zelle das IgM auf der Zelloberfläche. Die reifen, IgM, IgD positiven B-Zellen können sich nach Antigenstimulation in Plasmazellen entwickeln, die kein membranständiges Immunglobulin mehr haben und Antikörper sezernieren, oder sie entwickeln sich nach Antigenstimulation in den Keimzentren zu Memory-B-Zellen.

Die Selektion autoreaktiver Zellen findet auf verschiedenen Stufen der B-Zell Differenzierung statt. Alle Zellen, in denen nicht funktionelle Rearrangements der Gene stattgefunden haben, sterben durch Apoptose. Ebenso werden unreife B-Zellen, die "Eigen"-Antigene über das membranständige IgM erkennen, durch Apoptose eliminiert. Reife B-Zellen (IgM, IgD positiv), die durch Autoantigene stimuliert werden, sterben ebenso durch Apoptose oder werden anergisiert (6). Die funktionelle Bedeutung des Wechsels vom IgM zum IgD während der B-Zell-Entwicklung ist unklar. Es konnte aber kürzlich gezeigt werden, dass IgM-*knock-out*-Mäuse eine normale B-Zellentwicklung haben, und dass membranständiges IgD die Funktion des IgM in der B-Zell-Entwicklung, Reifung und Funktion substituieren kann (79).

Die Signaltransduktion in die B-Zelle erfolgt über die Proteine Ig-alpha und Ig-beta. Diese besitzen eine ca. 26 Aminosäuren lange ITAM (*immunoreceptor tyrosin based activation motif*) genannte Sequenz, die durch Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) phosphoryliert werden kann. Mit dem B-Zell-Rezeptor assoziiert sind Proteinkinasen der Src-Familie (Lyn, Blk, Fyn) und die Kinasen Syk und Btk. Nach dem *cross-linking* des B-Zell-Rezeptors phosphorylieren Kinasen der Src-Familie zwei Tyrosine in der ITAM-Sequenz von Ig-alpha und Ig-beta. Diese doppelt phosphorylierten Sequenzen können dann die Kinase Syk über seine SH2-Domäne binden, die dann wahrscheinlich ebenfalls von Mitgliedern der Rezeptor assoziierten Src-Familie phosphoryliert und damit aktiviert werden. Weiterhin wird in diesem Komplex auch Btk aktiviert. Diese Src- und Btk-Kinasen können dann eine

Reihe von Signaltransduktionswegen aktivieren (80).

Der zuerst identifizierte Signalweg führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von Phospholipase C-gamma2 (PLC-gamma2), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) hydrolysiert. DAG aktiviert die meisten Isoformen der Proteinkinase C (PKC). Ein wichtiges Substrat der PKC in B-Zellen ist der Transkriptionsfaktor CREB. IP₃ führt zur cytoplasmatischen Freisetzung von Ca²⁺, was sowohl zur Aktivierung der Calcium-Calmodulin-abhängigen Protein-Kinase-II, als auch der Calmodulin-aktivierten Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin führt. Scott et al. konnte zeigen, daß die Calcium Mobilisierung und die Proteinkinase C-Aktivität nicht notwendig sind für die anti-IgM induzierte Apoptose (81, 82).

Ein anderer, wichtiger Signalweg ist die Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Weges, der über die Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren zur Expression der Gene c-fos und egr-1 führen kann. Die aktivierte Rezeptor-assoziierte Kinase Syk kann auch das Protoonkogenprodukt Vav phosphorylieren. Vav knock-out-Mäuse zeigen Defekte in der T- und B-Zellentwicklung und in der Signaltransduktion des Antigenrezeptors (83, 84).

Ein wichtiges Substrat der Kinasen in hämatopoetischen Zellen ist HS1. Es konnte gezeigt werden, daß HS1 mit der Proteinkinase Lyn assoziiert ist und nach Phosphorylierung an die SH2-Domänen der Src-Kinasen bindet. Da die *de novo* Synthese von Proteinen für die über das membranständige IgM-vermittelte Apoptose notwendig ist, stellt HS1 als potentieller Transkriptionsfaktor ein für diesen Prozeß möglicherweise wichtiges Protein dar (85).

Weitgehend ungeklärt ist zur Zeit, wie und in welchem Zusammenhang die oben skizzierten Signaltransduktionswege zu Apoptose, Proliferation oder Wachstumsstopp führen können. Eine wichtige Rolle spielt dabei, in welchem Kontext das Antigen der B-Zelle präsentiert wird, welches Differenzierungsstadium die B-Zelle besitzt, und welche mit dem B-Zell-Rezeptor assoziierten Moleküle beteiligt sind.

1.4 Regulation der Genexpression während der Apoptose

Die transkriptionelle Regulation verschiedener Gene spielt eine wichtige Rolle während der Differenzierung von B-Zellen. Die kontrollierte Expression der Rekombinase-aktivierenden Gene (RAG 1 und RAG 2), sowie B-Zell spezifischer Gene führt zur sequenziellen B-Zell Reifung (s. 1.3.2) (77). Ebenso gibt es Hinweise, das der Aktivierungs-induzierte Zelltod von der Genexpression, d.h. der Neusynthese von RNA bzw. Proteinen abhängig ist. Inhibitoren der Transkription (Actinomycin D) oder der Translation (Cycloheximid) blockieren die Apoptose in vielen Fällen, was z.B. für die CD3 induzierte T-Zell Apoptose gezeigt wurde. In den letzten Jahren wurden einige Gene identifiziert, deren Expression während der Apoptose reguliert wird. Hierbei konnten allerdings bisher keine "Zelltod spezifischen Gene" identifiziert werden, es kann hier vielmehr von "Induktions-spezifischen Zelltod assoziierten Genen" gesprochen werden.

Als Modell für die anti-IgM induzierte Apoptose dienten bisher vor allem zwei Mauszelllinien, die

WEHI-231 und die CH31 (86, 87). Beide Zelllinien exprimieren das membranständige IgM auf der Zelloberfläche und die anti-IgM Stimulation führt bei diesen Zellen zu einem Arrest des Zellzyklus in der frühen G1-Phase, d.h. die Zellen proliferieren nicht mehr und das Apoptose Programm wird ausgelöst (88). Dieser G1 Arrest scheint für die Apoptose Induktion essentiell zu sein. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Arrest durch Cycline und das Retinoblastom Protein reguliert wird. Die anti-IgM Stimulation verhindert die Phosphorylierung von dem Retinoblastom Protein in der G1 Phase des Zellzyklus, was den Übergang in die S-Phase blockiert (89). Es ist bisher nicht geklärt, was die Signaltransduktion vom membranständigen Immunglobulin bei Induktion der Proliferation, bzw. Apoptose unterscheidet. Es konnte aber gezeigt werden, das Ig-alpha nach anti-IgM Stimulation phosphoryliert wird, nach IgD Stimulation hingegen nicht (90). Die Regulation der Phosphorylierung des Immunglobulin assoziierten Igalpha könnte somit der erste Schalter in der Regulation zwischen Apoptose und Proliferation sein.

Für mehrere Transkriptionsfaktoren konnte eine Genregulation während der anti-IgM induzierten Apoptose gezeigt werden.

Egr-1 ist ein Zink Finger Transkriptionsfaktor, dessen Expression in humanen B-Zell Lymphomen bereits 30 Minuten nach anti-IgM induzierter Apoptose abgeschaltet wird. C-myc ist ein proliferationsabhängiger Transkriptionsfaktor. Die Regulation der c-myc Expression scheint für die Apoptose entscheidend zu sein, wobei die Ergebnisse hier sehr widersprüchlich sind. Fischer et al. konnte zeigen, daß die Injektion von antisense-c-myc-Oligonukleotiden Apoptose induziert. Andererseits konnte gezeigt werden, das die c-myc Transkription nach Apoptose Induktion schnell abgeschaltet wird und c-myc antisense-Oligonukleotide den anti-IgM induzierten Wachstumsarrest in der G1 Phase des Zellzyklus und die Apoptose hemmen (91). McCormack et al. konnten zeigen, daß die c-myc mRNA Menge in der murinen B-Zelllinie WEHI 231 in den ersten Stunden nach anti-IgM Stimulation stark zunimmt, nach 8 Stunden wieder abnimmt und nach 24 Stunden nicht mehr zu detektieren ist (92). Zielgene die durch den c-myc Transkriptionsfaktor reguliert werden, sind nicht bekannt. Wie die duale Funktion von c-myc während der Proliferation und Apoptose zu erklären ist, bleibt ebenfalls ungeklärt.

Ebenso wurde gezeigt, das NAK-1, ein Transkriptionsfaktor der Steroidrezeptorfamilie nach der anti-IgM induzierten Apoptose verstärkt exprimiert wird. Sowohl die mRNA Menge nimmt nach anti-IgM Induktion zu, als auch die spezifische DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors (93). Das NAK-1 homologe Protein Nur77 der Maus spielt in der CD3 vermittelten Apoptose von T-Zellen eine wichtige Rolle (94). Die Inhibition der Nur77 Aktivität durch antisense-Oligonukleotide, bzw. die Expression einer dominant-negativen Nur77 Mutante konnte die CD3 vermittelte Apoptose blockieren. Es ist bisher nicht bekannt, welche Gene durch den Transkriptionsfaktor Nur77 bzw. das humane Homologe Nak1 reguliert werden.

Für die Proteine der bcl-2 Familie wurde ebenfalls eine Apoptose-spezifische Genregulation gezeigt. Es konnte gezeigt werden, daß bax-alpha nach anti-IgM induzierter Apoptose der Burkitt

Lymphomzelllinie BL41-3s verstärkt exprimiert wird. Sowohl die Menge der mRNA, als auch die Proteinmenge nahm nach IgM Kreuzvernetzung deutlich zu. Die Expression von bcl-2 und bcl-x blieb hingegen nach anti-IgM Stimulation gleich (95).

Es bleibt also weitgehend ungeklärt, welche Gene die Apoptose regulieren, wobei die Genexpression ebenfalls Zelltyp-spezifisch und abhängig vom Stimulus zu sein scheint.

1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es Proteine und Gene zu identifizieren, die mit der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose-assoziiert sind und damit mögliche Regulatoren darstellen. Als Modell sollte eine Burkitt Lymphom Zelllinie dienen, die nach Quervernetzung ihres B-Zellrezeptors, des membranständigen IgM durch Apoptose stirbt. Dieser Mechanismus spiegelt den Prozeß der B-Zelldifferenzierung wieder, in dem unreife, potentiell autoreaktive Zellen im Knochenmark eliminiert werden, und ist ein wichtiger Schritt in dem das Immunsystem Toleranz gegenüber Autoantigenen erlernt.

Weitgehend ungeklärt ist bisher, wie diese Prozesse der Apoptose initiiert und reguliert werden, d.h. welche Proteine für den Ablauf der Apoptose verantwortlich sind und welche Gene diese Prozesse steuern.

Zunächst sollte ein Modellsystem etabliert werden, das den Vergleich möglichst reiner Fraktionen apoptotischer und nicht apoptotischer B Zellen nach hochauflösender zweidimensionaler Gelelektrophorese ermöglicht. Differentielle Proteinspots sollten mittels der Edman Sequenzierung und massenspektrometrischen Analyse in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. B. Wittman-Liebold identifiziert werden. Dabei können Proteine identifiziert werden, deren Expression sich während der anti-IgM induzierten Apoptose ändert, die modifiziert werden und dadurch eine veränderte Lage im Gel haben, sowie Proteine, die im Verlauf der Apoptose durch Caspasen gespalten werden. Die funktionelle Relevanz der identifizierten Proteine sollte dann in Bezug auf die Apoptose untersucht werden.

Im weiteren sollte die c-myc Transkription während der anti-IgM induzierten Apoptose untersucht werden, sowie Proteine, die im c-myc Promotor binden und möglicherweise an der transkriptionellen Regulation des c-myc Gens während der anti-IgM induzierten Apoptose beteiligt sind.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Gene identifiziert werden, deren Expression während der anti-IgM induzierten Apoptose verändert ist. Die Identifikation sollte über verschiedene Methoden der differentiellen Hybridisierung von lambda-Zap cDNA-Phagenbanken und subtraktiven Klonierung erfolgen. Dazu sollten im ersten Schritt lambda-Zap cDNA-Phagenbanken von anti-IgM stimulierten B-Zellen und unstimulierten B-Zellen hergestellt und differentiell hybridisiert werden. Um eine Anreicherung Apoptose-spezifischer Sequenzen zu erreichen, sollte eine subtraktive lambda-Zap cDNA-Phagenbank hergestellt werden, sowie eine subtrahierte Probe, die ebenfalls in die differentielle Hybridisierung eingesetzt werden sollten. Über eine weitere, klassische Methode der Hydroxyapatit Säulen Chromatographie sollten Apoptose-spezifische Sequenzen angereichert, direkt kloniert und sequenziert werden. Alle identifizierten, differentiellen Sequenzen sollten in der Slot Blot-, Run on- oder Northern Blot Analyse überprüft werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Carl Roth GmbH und Co bezogen. In der Regel wurden Chemikalien höchsten Reinheitsgrades (*pro analysi*) verwendet.

Acridinorange	Sigma
Acrylamid	Biorad
Agarose	Biozym
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma
Ampicillin	Sigma
Aprotinin	Sigma
alpha-Thioglycerol	Sigma
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Bacto-Yeast Extract	Difco
BCS (Bathocuproindisulfonsäure)	Sigma
<i>blocking reagent</i>	<i>Boehringer</i>
Casein	Gibco
Coomassie Brilliant Blue	Sigma
dNTP's	Boehringer
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma
FCS	Gibco
Hydroxyapatit	Biomed
Leupeptin	Sigma
Magermilchpulver	Extra
Maleinsäure	Merck
Ponceau-Rot	Sigma
RPMI 1640	Seromed
Tetracyclin	Clontech
Triton X 100	Sigma
Trypsin	Promega
Venimun	Behringwerke AG
X-Gal (5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid)	Sigma

2.2 Enzyme, Proteine und Peptide

Avidin-Alkalische Phosphatase	Biorad
T4-DNA-Ligase	Gibco BRL
RNasin	Promega
Restriktionsenzyme	MBI
T4-DNA-Polynukleotidkinase	USB
Taq Polymerase	Clontech
Klenow Fragment	MBI
Rekombinantes SP1	Promega
Rekombinante Caspase 1 und 3	Rudi Bayaert, Gent, Belgien
Rekombinante Caspase 6 und 7	Pharmingen
z-DEVD-fmk	Calbiochem
ac-YVAD-cmk	Calbiochem

2.3 Antikörper

Alle hier nicht aufgeführten Antikörper wurden von der Firma Santa Cruz bezogen.

anti-IgM F(ab) ₂ -Antikörper	Dianova
anti-FITC <i>microbeads</i>	Miltenyi
anti-hnRNP A1 Antikörper 4B10	Gideon Dreyfuss, Pennsylvania
anti-hnRNP K Antikörper 3C2	Gideon Dreyfuss, Pennsylvania
anti-hnRNP C1/C2 Antikörper 4F4	Gideon Dreyfuss, Pennsylvania
anti-CD5	Becton Dickinson
anti-CD10	Becton Dickinson
anti-CD19-FITC	Becton Dickinson
anti-CD20	Becton Dickinson
anti-CD21-FITC	Becton Dickinson
anti-CD38-FITC	Immunotech
anti-CD40	Pharmingen
anti-Apo-1/FAS-PE	Pharmingen
anti-IgD	Immunotech
anti-IgM	Becton Dickinson
Ziege anti-Maus-FITC	Jackson Immuno Research Lab.

2.4 Kits

PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	Clontech
Apo Alert™ CPP32 Assay Kit	Clontech
Advantage™ cDNA PCR KIT	Clontech
cDNA-Synthese Kit	Boehringer
High Prime	Boehringer
lambda-Zap II cDNA-Synthese Kit	Stratagene
pGEM-T Kloning-Kit	Promega
polyAtract mRNA Isolation Systems	Promega
TNT coupled Reticulocyte Lysate System	Promega
Riboprobe System	Promega
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Plasmid Mini-, Midi-, Maxi-Kit	QIAGEN
Oligotex mRNA Mini-Kit	QIAGEN
QIAEXII Gel Extraction Kit	QIAGEN
RNeasy Mini-, Midi-Kit	QIAGEN
Subtractor Kit	Invitrogen
Cycle Sequencing Kit	ABI

2.5 Membranen

Hybond N+	Amersham
Nitrocellulose Membran	Schleicher und Schüll
<i>Multiple tissue northern</i> Membranen	Clontech

2.6 Radioaktive Nukleotide

alpha ³² P-dCTP	NEN
gamma ³² P-dATP	NEN
³⁵ S-Methionin (1000 µCi/ml)	Amersham
³ H-Thymidin	Amersham

2.7 Zelllinien

BL41	erhalten von P. Falk, München
BL60	erhalten von P. Daniel, MDC, Berlin

2.8 Plasmide

pGEM-T	Promega
pGEM-T easy	Promega
Blueskript SK+/-	Stratagene
pQE 16, 17, 51	QIAGEN
lI1 β in pGEM11	R. Bayaert, Gent, Belgien
SP1 in Blueskript M13-SK+	J.T. Kadonaga, Berkeley, USA

2.9 Bakterienstämme

E.coli XL-1 blue

E.coli SOLR

E.coli JM 109

2.10 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in 5'-3' Orientierung angegeben

Linkeroligonukleotid 1:	AGCTAGAATTCGGTACCGTCGACC
Linkeroligonukleotid 2:	GGTCGACCCTACCCAATTCTAGCT
hnRNPA1 PCR Oligonukleotide:	ATCGGAGATCTAAATCTGCCACT GGTTCCAGATCTTCTAAGTCAGAGTCT
Oct-2 Bindungssequenz:	GATCCTATAGAATCGCTTATGCAA GGTTGCATAAGCGATTCTATAGGA
B8 PCR Oligonukleotide:	GCTAGAATTCGGTACCGTCG ATATCACTGGTGGACACGCC
B54 PCR Oligonukleotide:	CTGGACGATACACCGATGTTC GCATCGCCCTGCAAATAGAC
SP1 Bindungssequenz:	ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC GCTCGCCCCGCCCGATCGAAT
mutierte SP1 Bindungssequenz:	ATTCGATCGG <u>T</u> ICGGGGCGAGC GCTCGCCCCG <u>A</u> ACCGATCGAAT
c-myc PCR Oligonukleotide:	TTCGGGTAGTGGA ³ AAACCAG ACTCAGCCAAGGTTGTGAGG

(poly dT) ₁₅₋₁₈ Oligonukleotid:	Boehringer Mannheim
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG
KS	TCGAGGTCGACGGTATC
SK	CGCTCTAGAAGTGGATC

2.11 Medien und Puffer

LB-Medium	10 g	Bacto-Trypton
	5g	Hefe-Extrakt
	5 g	NaCl
	auf 1 l	H ₂ O
10 x PBS	8 mM	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	2 mM	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O
	140 mM	NaCl
20 x SSC	3,0 M	NaCl
	0,3 M	Tri-Natriumcitrat
5 x TBE	0,5 M	Tris-Base
	0,5 M	Borsäure
	12,5 mM	EDTA
SM Puffer	0,5%	(w/v) NaCl
	20 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 mM	MgSO ₄
	2 % (w/v)	Gelatine
10 x MOPS	0,2 M	MOPS (3-(N-Morpholin)Propansulfonsäure)
	0,05 M	Natriumacetat
	0,01 M	EDTA
	pH 5,5-7,0	

2.12 besondere Verbrauchsmaterialien

Nensorb Säulen	DUPONT
Talon Nickel <i>spin columns</i>	Clontech
Annexin-V/FITC	Bender Med System
Silikonisierte Eppendorfggefäße	Appligene
Sephadex <i>spin columns</i>	Pharmacia
Western blue substrate	Promega

for Alkaline Phosphatase

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 DNA Standardprozeduren

Alle Standardmethoden, wie Plasmidpräparationen, Restriktionsspaltungen, gelelektro-phoretische Trennungen, u.s.w. wurden nach Sambrock et al. (96) bzw. dem jeweiligen Protokoll des Herstellers durchgeführt. Alle für diese Arbeit relevanten, modifizierten Methoden werden hier aufgeführt.

3.1.2 Herstellung von lambda-Zap cDNA-Phagenbanken

Zur Herstellung von lambda-Zap cDNA-Phagenbanken wurde Gesamt-RNA von unstimulierten und stimulierten BL-41 Zellen (4h anti-IgM) nach der Methode von Kroczek et al. präpariert (3.1.8.1). Die Qualität der Gesamt-RNA wurde auf einem RNA Agarosegel überpüft (3.1.9.1). Die poly(A)⁺-mRNA wurde mit dem Oligotex mRNA Mini-Kit von QIAGEN präpariert. Die Konstruktion der lambda-Zap cDNA Phagenbanken erfolgte mit dem lambda-ZAPII cDNA-Synthese Kit von Stratagene. Die einzelnen Schritte werden hier kurz dargestellt:

5 µg poly(A)⁺-mRNA von stimulierten und nicht stimulierten BL41-3s Zellen wurden mit einem Oligo-(dT) Linker-Primer hybridisiert, der eine XhoI Restriktionsschnittstelle besitzt. Die RNA wurde durch Reverse Transkription in Einzelstrang cDNA konvertiert. Durch den Einsatz von 5'-Methyl dCTP in der Erststrangsynthese wurde die cDNA hemimethyliert, was interne XhoI Restriktionsschnittstellen schützt. In die RNA des RNA/DNA-Hybrids wurde durch die RNaseH Brüche eingeführt, so daß durch die Exo- und Endonukleaseaktivität der DNA-Polymerase I der Zweitstrang synthetisiert werden konnte. Ein Aliquot des Erst- und Zweitstrangsynthese-Ansatzes (1/10 V) wurde jeweils vor Beginn der Reaktion entnommen und mit radioaktiv markiertem alpha³²P-dATP versetzt. Diese radioaktiv markierte cDNA wurden auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Die Synthese einer Kontrolle bekannter Größe gab Aufschluß über die Größenverteilung der synthetisierten cDNAs (500 bp - 4 Kb) und damit über die Qualität der cDNA-Synthese.

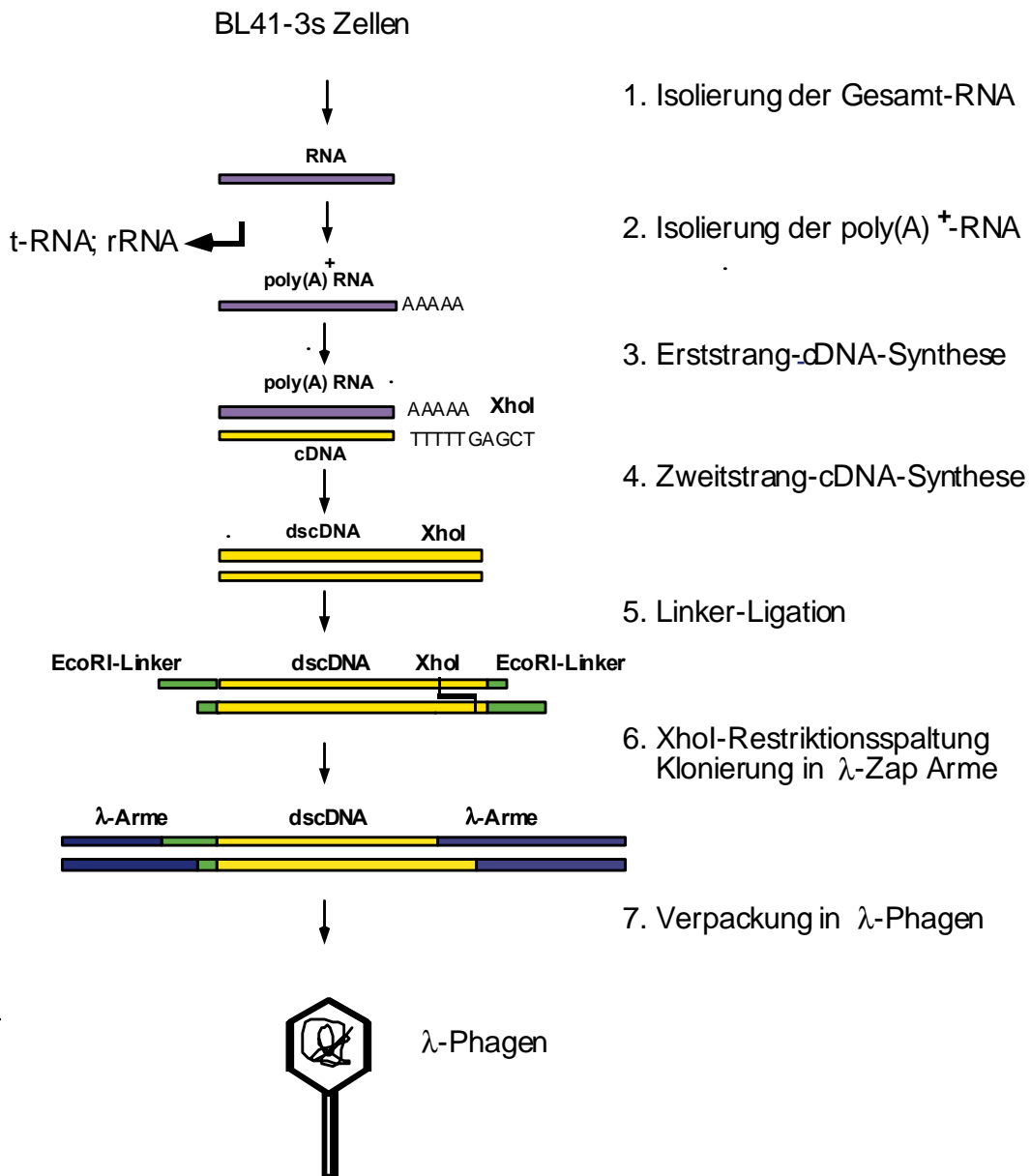


Abb. 3 Herstellung einer lambda-Zap cDNA-Phagenbank
 Die Gesamt-RNA von BL41-3s Zellen vor bzw. nach Apoptose Stimulation (4h anti-IgM) wurde präpariert. Die poly(A)⁺-RNA wurde isoliert und mit einem oligo(dT)-Linkeroligonukleotid als Primer in cDNA konvertiert. Die Enden der doppelsträngigen cDNA-Fragmente wurden aufgefüllt und an Linkerfragmente ligiert. Nach XhoI Spaltung wurde die cDNA gerichtet in lambda-Zap Vektor-Arme ligiert. Die lambda-DNA wurde in Phagen verpackt.

Die Enden der cDNA-Doppelstränge wurden durch die Pfu DNA-Polymerase mit dNTP's aufgefüllt und mit EcoRI-Linkern ligiert. Die Enden der cDNA-Linker-Fragmente wurden phosphoryliert und mit XhoI gespalten, wodurch asymmetrische EcoRI-XhoI doppelsträngige DNA-Fragmente entstanden. Über Sephacryl-Säulen (Sephacryl S-400 spin columns) wurden die entstandenen DNA-Fragmente der Größe nach getrennt und von nicht ligierten Linkern bzw. abgespaltenen Linkerfragmenten abgetrennt. 1/10 Volumen jeder Fraktion wurde auf einem 5%-igen

Polyacrylamidgel analysiert. Die Größenverteilung der cDNAs wurde für jede Fraktion nach Exposition des Autoradiogramms kontrolliert und ist ein Maß für die Qualität der cDNA-Synthese (Abb.4).

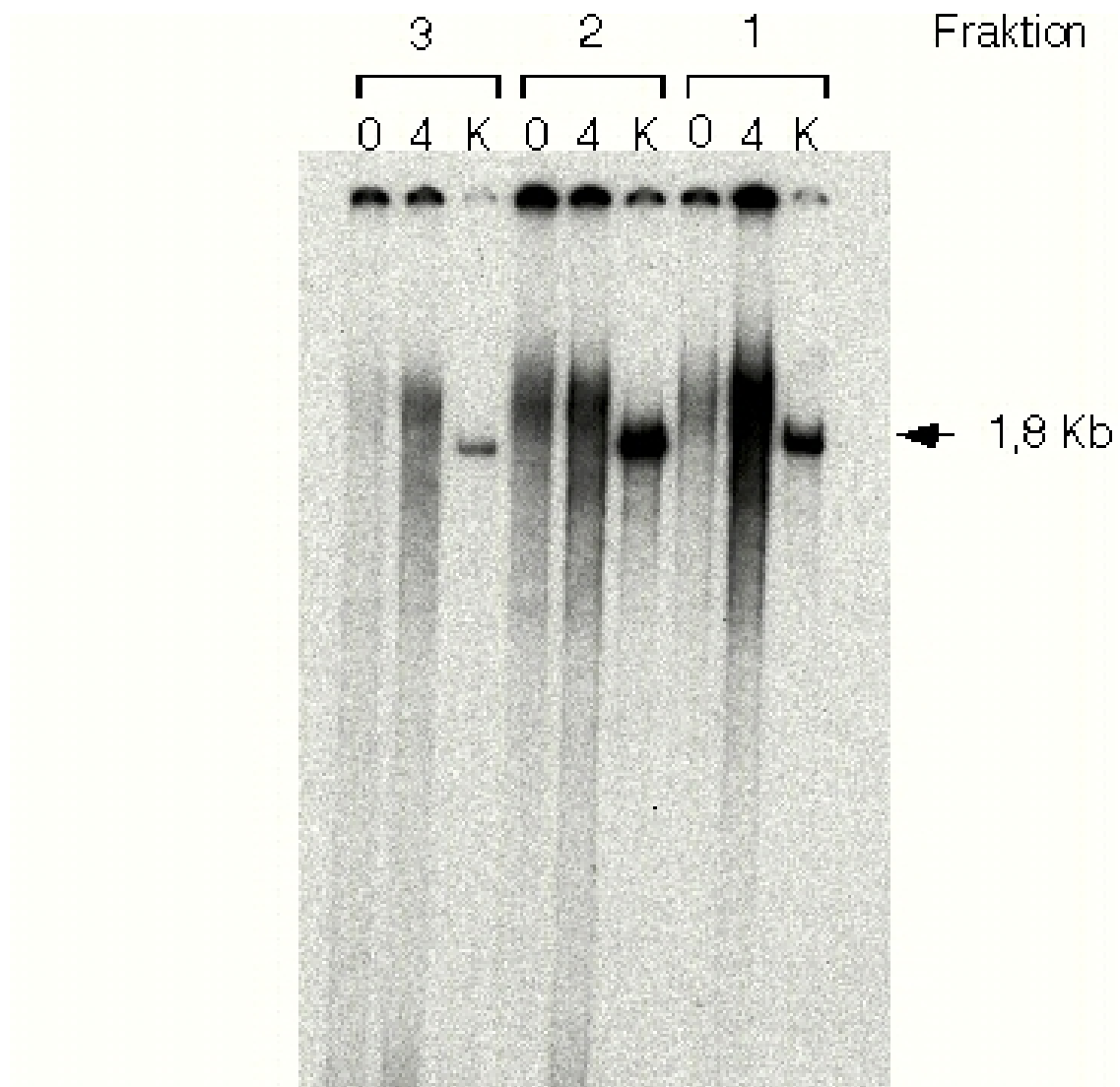


Abb. 4 Trennung der dscDNA nach Sephacryl-Säulenchromatographie
 In die Zweitstrangsynthese der cDNA stimulierter BL41-3s Zellen (4), sowie unstimulierter Zellen (0) wurde alpha-32P-dATP eingebaut. Über Sephacryl-Säulen wurden doppelsträngige cDNAs der Größe nach fraktioniert und von nicht-ligierten Linker, sowie abgespaltenen Linkerfragmenten abgetrennt. Die einzelnen Fraktionen der Chromatographie (Fraktion 1-3) wurden eluiert und 1/10 V auf einem 5 %-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Als Kontrolle (K) wurde eine RNA von 1,8 Kb Größe in die cDNA-Synthese eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie.

Im Vergleich zu einem pBR322 Standard wurden die Mengen der synthetisierten cDNA jeder Fraktion auf EtBr-Agrose-Platten quantifiziert. 100 ng der cDNA der Fraktion 1 und 2 wurde gerichtet (EcoRI/XhoI) in lambda-ZAP Vektor Arme, die ein internes Blueskript Plasmid enthalten, ligiert. Ca. 20 ng der Ligationsansätze wurde mit lambda-Zap-Verpackungsextrakt vermischt und auf dem *E.coli* Stamm XL1-blue MRF' ausplattiert. Kolonien, die kein Insert haben, wurden durch Blau-

weiß Selektion (IPTG/X-Gal) detektiert. Weniger als 0,02% der Kolonien waren ohne Insert.

Um einen stabilen Phagenstock mit hohem Titer zu erhalten, wurden die lambda-ZAP cDNA-Phagen auf *E.coli* ausplattiert. Um den Titer der cDNA-Phagenbanken zu bestimmen, wurden verschiedene Verdünnungen des Phagenstocks ausplattiert und Plaques gezählt (pfu = *plaque forming unit* pro ml Phagensuspension). Einzelne Phagenplaques wurden aus dem Agar ausgestochen und in SM Puffer eluiert. Die Größe der klonierten cDNA wurde nach *in vivo* Exzision (3.1.5) des Blueskript Plasmids, anschließender Mini-Präparation und Restriktionsspaltung (XhoI/EcoRI) bestimmt.

3.1.3 Herstellung einer subtraktiven lambda-Zap cDNA-Phagenbank

Um eine Anreicherung Apoptose-spezifischer Transkripte zu erreichen, wurde eine subtraktive lambda-Zap cDNA-Phagenbank hergestellt. Die Anreicherung erfolgte über eine subtraktive Hybridisierung komplementärer Sequenzen aus stimulierten und nicht stimulierten BL41 Zellen.

Die Gesamt-RNA von stimulierten (4 h anti-IgM) und unstimulierten BL41-3s Zellen wurde nach der Methode von Krozcek et al. präpariert, die poly(A)⁺-mRNA mit dem mRNA Isolation Kit von QIAGEN. Die Subtraktion erfolgte gemäß dem Protokoll des Subtractor Kits von Invitrogen. Die einzelnen Schritte werden in den folgenden Punkten 3.1.3.1-3.1.3.4 beschrieben. In Abb. 24 ist das Prinzip der Subtraktion dargestellt.

3.1.3.1 Photobiotinylierung von RNA

1 x Maleinsäurepuffer, pH7,5:

0,1 M Maleinsäure

0,15 M NaCl

0,3 % v/v Tween

10 µg der poly(A)⁺-RNA von nicht induzierten BL60-2 Zellen wurde in 30 µl Volumen photobiotinyliert (200 Watt, 20 Min bei 350-370 nm), wobei eine Biotinmarkierung an jeder fünfzigsten bis hundertsten Base erreicht werden sollte. Freies Biotin wurde mit Butanol ausgeschüttelt, bis die Butanol Phase klar war (ca. 6 x). Die Biotinylierung wurde durch die spezifische Bindung von Streptavidin gekoppelter alkalischer Phosphatase und der Umsetzung des Substrates NBT, X-Phosphat in einer Farbreaktion auf einer Nylon-Membran erreicht. Die Effizienz wurde anhand eines biotinylierten Standards überprüft, von dem verschiedene Mengen auf eine Nylonmembran gedotet wurden (0,5-100 ng). Ein Vergleich der Signalintensitäten, ergab eine Biotinylierung an jeder 50-100-sten Base. Die Farbreaktion auf der Membran verlief nach folgendem Schema:

Waschen	5 Min in Maleinsäurepuffer
Blocken	30 Min 10 % <i>blocking reagent</i> in Maleinsäurepuffer
Streptavidin-AP Bindung	30 Min 1:1000 Streptavidin-AP (10 % <i>blocking reagent</i> in Maleinsäurepuffer)

Waschen	2 x 15 Min Maleinsäurepuffer
Äquilibrieren	2 Min 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl ₂
Farbreaktion	15 Sek-5 Min Western blue substrate for AP (Promega)

3.1.3.2 *Subtraktive Hybridisierung von einzelsträngiger cDNA mit photobiotinylierter RNA*

1,5 µg mRNA der induzierten BL41 Zellen (4 h anti-IgM) sowie einer Kontrolle wurden durch Reverse Transkription in einzelsträngige cDNA konvertiert (cDNA Synthese Kit, Boehringer). 10 µg photobiotinylierter mRNA nicht induzierter BL41-3s Zellen wurde mit der einzelsträngigen cDNA gemischt und für 1 Min bei 95 °C denaturiert. Die DNA wurde gefällt und in 1 x Hybridisierungspuffer (Subtractor-Kit, Invitrogen) für 24 Stunden bei 68 °C inkubiert. Komplementäre Sequenzen bildeten ein hemibiotinyliertes Hybrid, daß durch Phenol/Chloroform-Extraktion abgetrennt wurde (s. Abb. 24).

3.1.3.3 *Herstellung von Linkeroligonukleotiden*

Zur Amplifikation der verbliebenen cDNA-Sequenzen (s. 3.1.3.2) und zur anschließenden Klonierung wurden Linkeroligonukleotide hergestellt. Dazu wurden komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, die eine interne EcoRI-Schnittstelle besitzen. Die Synthese erfolgte bei der Firma Biotex, Berlin-Buch.

Linkeroligonukleotid 1: 5´ GCTAGAATTCGGTACCGTCGACC 3´;

Linkeroligonukleotid 2: 5´ GGTCGACCCTACCCAATTCTAGCT 3´

Das Oligonukleotid 2 wurde kinasiert (s. 3.1.13). Je 10 µg Oligonukleotid 1 und 2 wurden gemischt und über Nacht hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in einem 50 µl Ansatz in 70 mM NaCl und 50 mM Tris-HCl, pH 8,0. Die Oligonukleotide wurden zunächst für 5 Min bei 95 °C denaturiert und ü.N. bei 56 °C hybridisiert. 2 µg des Hybridisierungsansatzes wurden auf einem 20 %-igen nicht denaturierendem Polyacrylamidgel getrennt. Dabei lassen sich doppelsträngige Hybride sowie die einzelsträngigen Linkeroligonukleotide nach Färbung des Gels mit EtBr unter UV-Licht nachweisen. Die nicht hybridisierenden Einzelstränge wurden über HPLC getrennt (Firma Biotex).

3.1.3.4 *Trennung der subtrahierten cDNAs und Klonierung in lambda-Zap DNA*

Nicht hybridisierte cDNAs sollten eine Anreicherung Apoptose-spezifischer Sequenzen aus BL60-2 anti-IgM induzierten Zellen sein. Diese einzelsträngigen cDNAs wurden nach dem Protokoll des Herstellers (Subtractor-Kit, Invitrogen) in doppelsträngige cDNA konvertiert, die Enden mit der Pfu-Polymerase aufgefüllt und phosphoryliert (s. 3.1.2). Die doppelsträngige cDNA wurde nach der Kinasierung Phenol/Chloroform extrahiert, gefällt und das Pellet für die Ligation der EcoRI-Linker an die glatten Enden der cDNA eingesetzt (s. 3.1.3.3).

Linker-Ligation:

dsDNA (ca. 3 µg)

6 µl Linker 500 ng/µl

1 µl 10 x Ligase Puffer

1 µl T4-DNA Ligase (4 U)

Die doppelsträngigen cDNA-Linker-Fragmente wurden in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit einem Linker spezifischen Primer (Linkeroligonukleotid 1) amplifiziert:

PCR-Reaktion:

10 µl	1/5 der synthetisierten cDNA
10 µl	10 x Taq Polymerase
2 µl	dNTPs (je 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
1 µl	Linkeroligonukleotid 1 (1 µg/µl)
1 µl	Taq Polymerase (5 U/µl)
5 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1 µl	alpha ³² P-dATP

auf 100 µl mit H₂O

Die DNA wurde 5 Min bei 95 °C denaturiert und unter folgenden Bedingungen amplifiziert

30 Zyklen: 30 Sek 95 °C, 1 Min 50 °C, 1 Min 72 °C

anschließender Elongationsschritt: 5 Min 72 °C

Chase -PCR:

100 µl PCR-Reaktion

30 µl 10 x PCR Puffer

6 µl dNTPs (je 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

1 µl Linkeroligonukleotid 1 (1 µg/µl)

3 µl Taq Polymerase (5 U/µl)

15 µl MgCl₂ (25 mM)

auf 300 µl mit H₂O

Die Chase -Reaktion wurde folgenden Bedingungen unterworfen:

3 Zyklen: 30 Sek 95 °C, 1 Min 50 °C, 2 Min 72 °C

4 Zyklen: 1 Min 50 °C, 5 Min 72 °C

5 µl der PCR-Reaktion wurden entnommen und auf einem 2 %-igen EtBr-Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Die Amplifikate wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und die Größe

abgeschätzt. Der Hauptanteil der Amplifikate lag zwischen 200 und 500 Bp. Die PCR-Fragmente wurden Phenol/Chloroform extrahiert, mit EcoRI gespalten und über Sephacryl S-400 *spin columns* fraktioniert (s. 3.1.2). Ein Aliquot (1/10 V) jeder Fraktion wurde auf Ethidiumbromidplatten quantifiziert. 100 ng DNA (50 ng Fraktion 2 und 50 ng Fraktion 3) wurden in EcoRI lambda-Zap DNA Phagen-Arme ligiert und in Phagen verpackt (s. 3.1.2). Die Phagen wurden amplifiziert und der Titer der cDNA Phagenbank wurde bestimmt. Die Insertgröße wurde über eine PCR-Amplifikation bestimmt. Dazu wurden 20 Plaques aus dem Agar ausgestochen und die Phagen in je 500 µl SM-Puffer über Nacht in einem Schüttelinkubator eluiert. 10 µl dieses Phageneluates wurde in einer PCR-Reaktion mit spezifischen Oligonukleotiden (T3 und T7) für das Blueskript-Plasmid unter Standardbedingungen amplifiziert und auf einem Agarosegel analysiert.

3.1.4 Screening der lambda-Zap cDNA-Phagenbanken

1×10^5 bis 1×10^6 pfu wurden auf XL1-blue *E.coli* Zellen ausplattiert (10^5 pfu pro 20 cm x 20 cm Platte) und auf Nylonmembranen transferiert. Die Filter wurden in 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH für 2 Min denaturiert, in 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl (pH 8,0) neutralisiert und in 0,2 M Tris-HCl (pH 7,5), 2 x SSC für 30 Sek geschwenkt. Die DNA wurde durch UV Licht (Stratalinker) auf der Membran fixiert.

3.1.4.1 Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde

Die spezifischen DNA-Fragmente wurden mit alpha- ^{32}P -dCTP radioaktiv markiert (s. 3.1.12) und in einer Konzentration von 10^6 cpm/ml für die Hybridisierungsreaktion eingesetzt. Die Membranen wurden über Nacht bei 47 °C hybridisiert und gewaschen (s. 3.1.9.3). Positiv hybridisierende Phagenplaques wurden durch Autoradiographie detektiert, und den entsprechenden Phagenplaques auf der Agarplatte zugeordnet, isoliert und in 500 µl SM Puffer eluiert (3.1.2). Die eluierten Phagen wurden erneut ausplattiert, auf eine Membran transferiert und mit derselben Sonde hybridisiert. Positiv hybridisierende Klone wurden durch *in vivo* Exzision in Blueskript-Plasmid konvertiert (3.1.5) und sequenziert.

3.1.4.2 Differentielle Hybridisierung

1×10^5 Phagen der subtraktiven und 1×10^6 Phagen von stimulierten BL41 Zellen generierten lambda-Zap cDNA-Phagenbank wurden ausplattiert (1×10^5 Phagen pro 20 x 20 cm Platte) und auf jeweils 2 Nylonmembranen transferiert. Die DNA wurde wie unter 3.1.4 beschrieben auf der Membran denaturiert und fixiert. Je eine Nylonmembran wurde mit ^{32}P -markierter Gesamt-cDNA aus unstimulierten und stimulierten BL41-3s Zellen, bzw. einer ^{32}P -markierten subtrahierten Probe hybridisiert. Hybridisierende Plaques konnten durch Autoradiographie detektiert werden. Die Autoradiogramme der beiden Filter wurden verglichen und differentiell hybridisierende Phagenpaques aus der Agarplatte isoliert, und die Phagen in SM Puffer eluiert (s. 3.1.2). Diese Phagen wurden in einer zweiten Runde ausplattiert, erneut hybridisiert und differentielle Klone isoliert (s. Abb. 25).

3.1.5 In vivo Exzision

Die lambda-Zap Vektoren erlauben eine *in vivo* Exzision des Blueskript-Plasmids, der das integrierte cDNA-Fragment enthält. Dazu wurde zunächst ein Plaque aus der Agarplatte ausgestochen und in 500 µl SM Puffer eluiert. Die klonierten cDNA-Fragmente konnten durch Doppelinfektion des *E. coli* Stammes XL1-blue MRF' durch lambda-Phagen und einen Helferphagen freigesetzt werden. Dabei wurde zunächst einzelsträngige Blueskript-DNA synthetisiert, die die klonierte cDNA enthält. Diese einzelsträngige DNA wird zirkularisiert und das Phagemid aus der Wirtszelle sekretiert. In einem zweiten Schritt wurde der *E.coli* Stamm SOLR mit dem sekretierten Phagemid transformiert und die transformierten Klone auf Ampicillin Platten selektioniert. Einzelne Bakterien Kolonien wurden gepickt und kultiviert. Die Plasmid DNA wurde nach dem Plasmid Mini-Kit von Qiagen präpariert. Durch einen Restriktionsverdau konnten die Insertgrößen analysiert werden.

3.1.6 Herstellung einer subtrahierten DNA-Probe

Zur differentiellen Hybridisierung der cDNA-Phagenbanken wurde eine subtrahierte Probe hergestellt. Diese Probe wurde mit dem PCR-Select™ cDNA Subtraction KIT, sowie dem Advantage™ cDNA PCR KIT von Clontech gemäß dem Protokoll des Herstellers präpariert. Eingesetzt wurde poly(A)⁺-RNA von unstimulierten und stimulierten (4 h anti-IgM) BL60-2 Zellen. Zur Überprüfung der Subtraktionseffizienz wurde je 1/10 V der PCR-Reaktion mit den angereicherten Sequenzen auf einem 2 %-igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt, das Gel wurde geblottet und mit einer ³²P-markierten β-Aktin spezifischen Sonde hybridisiert. Spezifische β-Aktin Signale wurden nach Autoradiographie sichtbar (Abb. 26).

3.1.7 Subtraktive Klonierung über Hydroxyapatit-Chromatographie

<u>5 x Hybridisierungspuffer:</u>	3 M	NaCl
	100 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	10 mM	EDTA

Apoptose-spezifische, differentiell exprimierte Sequenzen wurden durch zwei Hybridisierungen und anschließende Hydroxyapatit (HAP)-Säulenchromatographie abgetrennt. Hydroxyapatit ist eine kristalline Form des Calcium Phosphats, das DNA über die Interaktion der Phosphate des DNA-Rückrats bindet. Einzelsträngige und doppelsträngige DNA-Moleküle können durch verschiedene Pufferkonzentrationen voneinander getrennt werden. Die optimalen Hybridisierungsbedingungen müssen für jedes *batch* Hydroxyapatit neu ausgetestet werden. Um Apoptose-spezifische Sequenzen anzureichern, wurde zunächst Gesamt-RNA von unstimulierten BL60-2 Zellen und Zellen, die 4 Stunden mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten inkubiert wurden, über CsCl-Gradienten präpariert (s. 3.1.8.1). Die poly(A)⁺-RNA wurde mit dem RNeasy Midi- Kit von QIAGEN isoliert. Die isolierte poly(A)⁺-RNA wurde dann ein zweitesmal über die RNeasy Midi-Säulen aufgereinigt um hochreine poly(A)⁺-RNA zu erhalten. Für die Hybridisierungen wurden 5 µg poly(A)⁺-RNA aus stimulierten Zellen und 50 µg poly(A)⁺-RNA aus unstimulierten BL60-2 Zellen (subtraktive RNA) präpariert. Die poly(A)⁺-RNA aus stimulierten Zellen wurde in cDNA konvertiert und mit 25 µg poly(A)⁺-RNA aus unstimulierten Zellen hybridisiert (68 °C, 2 Tage). Die Hybridisierungsreaktion

wurden in 1 x Hybridisierungspuffer und 0,2 % SDS in 5 µg Reaktionsvolumen gemäß dem Protokoll des Subtractor Kits in siliconisierten Eppendorfgläsern durchgeführt. Nach der Hybridisierung wurden die Ansätze in 250 µg 0,12 M Phosphatpuffer aufgenommen und auf die Hydroxyapatit Säulen gegeben. Einzelsträngige, subtrahierte cDNA wurde in 6 ml 0,12 M Phosphatpuffer, pH 6,8 eluiert, doppelsträngige Hybride, in 0,3-0,4 M Phosphatpuffer. Die einzelsträngige, subtrahierte cDNA wurde dann über Nensorb Säulen, gemäß dem Protokoll des Herstellers konzentriert und in einem zweiten Hybridisierungsschritt mit 25 µg poly(A)⁺-RNA aus unstimulierten Zellen subtrahiert. Differenziell exprimierte Sequenzen wurden so von cDNA/mRNA Hybriden, die Sequenzen darstellen, die in beiden Zelltypen vorhanden sind, getrennt. In einer zweiten, positiven Selektion wurden die subtrahierten Sequenzen mit zweifachem Überschuß der poly(A)⁺-RNA von stimulierten BL60-2 Zellen (10 µg) hybridisiert. Die mRNA/cDNA Hybride wurden isoliert und in doppelsträngige DNA konvertiert. Die Enden wurden mit der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und kinasiert (s. 3.1.13). Die DNA wurde gefällt und an Linker ligiert (3.1.2). Die angereicherte DNA wurde in einer PCR, mit einem Linker spezifischen Oligonukleotid (Linkeroligonukleotid 1) amplifiziert. Zur Überprüfung der Subtraktionseffizienz wurde die Probe radioaktiv markiert (High Prime). Im Vergleich mit einer radioaktiv markierten Probe nicht stimulierter BL60-2 Zellen, wurde ein Slot Blot, auf dem zuvor spezifische DNAs gedotet worden war, hybridisiert. Beide Proben wurden auf 1,2 x 10⁵ cpm/ml Hybridisierungspuffer eingestellt und 2 Tage bei 47 °C, wie unter 3.1.9.3 beschrieben, mit den Slot Blots hybridisiert (Abb. 29).

3.1.8 RNA Präparation

3.1.8.1 Präparation von Gesamt-RNA

<u>GTC-Puffer:</u>	4 M	Guanidinium Isothiocyanat
	20 mM	Natrium Acetat, pH 5,2
	0,1 mM	DTT
	0,5 %	N-Lauryl-Sarcosine

Die Lösung wird mit DEPC Wasser angesetzt: pH 5,5-6,0

<u>CsCl Lösung:</u>	5,7 M	CsCl
	100 mM	EDTA pH 8,0

Die Lösung wird mit DEPC Wasser angesetzt und autoklaviert: pH 5,5-6,0

<u>TE Puffer:</u>	10 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	5 mM	EDTA

Für die RNA-Präparation nach Kroczek et al. (97) wurden ca. 10^7 Zellen in je 9,5 ml GTC-Lösung resuspendiert und lysiert. Die DNA wurde mit einer Kanüle (20g) auf Eis gescheert. 2,6 ml der CsCl Lösung wurden in ein Beckmann-Zentrifugationsröhrchen (15 ml) vorgelegt und mit der GTC-Zellsuspension überschichtet. Die RNA wurde dann bei 21 000 g in einer Ultrazentrifuge pelletiert (27 h, 18 °C). Das RNA-Pellet wurde in 200 µl TE-Puffer resuspendiert und zweimal mit Ethanol gefällt. Die Konzentration der RNA wurde bei einer OD_{260} in einem UV-Spektrophotometer gemessen.

3.1.8.2 Präparation von poly(A)⁺-RNA

Ca. 1,2 % der Gesamt RNA einer Zelle ist poly(A)⁺-RNA. Diese poly(A)⁺-RNA kann über Hybridisierungen des poly(A)⁺-Endes mit poly(dT) Matrizen isoliert werden. In dieser Arbeit wurde die polyA⁺-RNA mit Hilfe des Oligotex mRNA Mini-, Midi-Kits von QIAGEN oder des polyA-Tract mRNA Isolation System von Promega isoliert. Die Präparation erfolgte gemäß der Anleitung der Hersteller.

3.1.9 Northern Blot Analyse

Die Northern Blot Analyse dient dem Nachweis spezifischer RNA in einem heterogenen RNA-Gemisch z.B. aus Zellen oder Geweben. Die Northern Blot Analyse wurde in Anlehnung an das Protokoll von Kroczek et al. durchgeführt. Dazu wurde Gesamt-RNA isoliert. 10 µg jeder RNA-Probe wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt (3.1.9.1), auf eine Nylonmembranen transferiert, und UV fixiert. Die Membranen wurden nun mit einer spezifischen radioaktiv markierten DNA oder antisense-RNA Sonde hybridisiert, und die spezifisch hybridisierenden Signale konnten nach Autoradiographie detektiert werden.

3.1.9.1 RNA Agarose Gelelektrophorese

<u>RNA Gel:</u>	1,2 %	Agarose
	1,1 %	Formaldehyd
	1 x	MOPS
<u>Premix:</u>	1,3 x	MOPS
	3 M	Formaldehyd
	4 %	Formamid
<u>Ladepuffer:</u>	1 mM	EDTA, pH 8,0
	0,25 %	gesättigtes Bromphenol Blau
	0,25 %	gesättigtes Xylen Cyanol
	50 %	Glycerol

Die elektrophoretische Trennung der RNA erfolgte auf einem denaturierenden Agarosegel, was Sekundärstrukturen auflöst. 10 µg RNA (in 5,5 µl H₂O) wurden in 19,5 µl denaturierendem Premix und 5 µl Ladepuffer wie 1 µl EtBr (0,5 mg/ml) aufgenommen. Die Proben wurden bei 55 °C für 15 Min denaturiert und auf Eis gestellt. Sie wurden auf das Gel geladen und in 1 x MOPS Puffer bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Da die Ionenkapazität des Puffers sehr niedrig ist, wurde der Puffer ständig mit einer Pumpe umgewälzt. Die getrennte RNA konnte unter UV-Licht visualisiert werden und wurde mit einem Lineal als Größenstandard im Videoprinter von Appligene fotografiert. Die 28 S, 18 S und 5 S rRNA sind dabei als deutliche Banden bei 5,0; 1,87 und 0,16 Kb zu sehen.

3.1.9.2 Kapillartransfer von RNA

Das RNA-Gel wurde zunächst 10 Min in 20 x SSC äquilibriert und in einer Naßblotkammer ü.N. auf eine Nylonmembran transferiert. Die RNA wurde durch UV-crosslinking (Stratalinker) auf der Membran fixiert. Der Transfer der RNA wurde anhand der 28 S und 18 S rRNA Banden unter UV-Licht überprüft.

3.1.9.3 Northern Blot Hybridisierung

Prähybridisierungs-/Hybridisierungspuffer:

50 %	Formamid
0,25 M	NaCl
0,12 M	Natriumhydrogenphosphat, pH 7,2
7 %	SDS

Waschschritte für DNA und antisense-RNA-Sonden:

<u>Schritt</u>	<u>Waschlösung</u>		<u>DNA antisense-RNA</u>	
1. Schritt:	2 x SSC;	0,1 % SDS	RT	RT
2. Schritt	2 x SSC;	0,1 % SDS	50-60	60-68
3. Schritt	0,1 x SSC;	0,1 % SDS	50-60	60-68

Die Nylonmembran mit der transferierten RNA wurden für mindestens 1 Stunde bei 47 °C in Prähybridisierungspuffer inkubiert. Die spezifische, radioaktiv markierte, denaturierte DNA oder antisense-RNA Sonde wurde in einer Konz. von 1-3 x 10⁶ cpm/ml Hybridisierungspuffer eingesetzt und über Nacht, bzw. 48 Stunden (bei schwacher Expression) bei 47 °C (DNA Sonden) oder 68 °C (antisense-RNA Sonden) hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Nylonmembranen gewaschen (Schritt 1-3) und die spezifischen Signale nach Autoradiographie detektiert.

3.1.10 Run-on-Analyse

Die *Run on*-Analyse dient dem Nachweis von neu synthetisierter mRNA in Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die Analyse erfolgt in 4 Schritten:

<u>Lysepuffer:</u>	10 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	5 mM	MgCl ₂
	10 mM	KCl
	0,5 %	NP-40
<u>Einfrierpuffer:</u>	50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	5 mM	MgCl ₂
	40 %	Glycerin
	0,1 mM	EDTA
<u>2 x Transkriptionspuffer:</u>	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	5 mM	MgCl ₂
	0,3 M	KCl
	1 mM	NTP (jedes)
	5 mM	DTT
<u>HSB-Puffer:</u>	0,5 M	NaCl
	50 mM	MgCl ₂
	2 mM	CaCl ₂
	10 mM	Tris-HCl, pH 7,4

Alle Puffer wurden unter RNA-Bedingungen hergestellt und auf 4 °C vorgekühlt.

1.Präparation der Zellkerne:

0,5 - 1 x 10⁸ BL60-2 Zellen vor und nach anti-IgM Stimulation (4 h) wurden pelletiert (500 g, 10 Min, 4 °C), in 1 x PBS gewaschen, erneut pelletiert und vorsichtig in 10 ml Lysepuffer aufgenommen. Der Lyseansatz wurde 5 Min auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden erneut pelletiert (500 g, 10 Min, 4 °C), und mit einem Dounce Homogenisator (Typ B) aufgeschlossen, wobei die Zellkerne intakt blieben. Die Zellkerne wurden bei 2000 rpm für 10 Min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Kernpellets wurden in 200 µl Einfrierpuffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2. Radioaktive Markierung neu synthetisierter RNA

Die radioaktive Markierung neu synthetisierter RNA erfolgte bei 30 °C für 30 Min in 1 x Transkriptionspuffer. 200 µl Kerne wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 200 µl 2 x Transkriptionspuffer, sowie 10 µl alpha³²-UTP (760 Ci/mmol, 10 mCi/ml) versetzt.

3. Isolierung der radioaktiven RNA

Der Transkriptionsansatz wurde in 0,6 ml HSB-Puffer (versetzt mit 200 U RNase freie DNase I) aufgenommen und für 5 Min bei 30 °C inkubiert. In diesem Hochsalzpuffer lysieren die Kerne und die DNA wird durch die DNase I degradiert. Die RNA Präparation erfolgte nun über einen CsCl-Gradienten (s. 3.1.8.1) unter Zusatz von 100 µg t-RNA.

4. Hybridisierung der radioaktiven RNA mit gedotteten Plasmiden

Die Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgte wie unter 3.1.9.3, beschrieben bei 60 °C. 10⁵ cpm radioaktiv markierte RNA wurde pro ml Hybridisierungspuffer eingesetzt. Die zu analysierenden Plasmide wurden in einer Konz. von ca. 1-3 µg pro Slot mit einer Slot Blot Apparatur von Schleicher und Schüll auf eine Nylonmembran transferiert. Die DNA wurde auf der Membran denaturiert (s. 3.1.15) und UV-fixiert (Stratalinker). Nach der Hybridisierung wurde die Membran wie unter 3.1.9.3 beschrieben gewaschen. Die spezifischen Signale konnten durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

3.1.11 Southern Blot Analyse

Die Southern Blot Analyse dient dem Nachweis spezifischer DNA-Moleküle in einem heterogenen Gemisch von DNA. Die zu analysierende DNA wurde zunächst auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und im Gel denaturiert. Dazu wurde das Gel in 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl für 15 Min inkubiert und in 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl für 10 Min neutralisiert. Die so denaturierte DNA wurde durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran transferiert. Durch UV *crosslinking* (Stratalinker) wurde die DNA auf der Membran fixiert. Die so präparierte Membran wurde mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert. Die DNA-Sonde wurde in einer Endkonzentration von 10⁶ cpm/ml eingesetzt. Die Signale wurden durch Autoradiographie detektiert.

3.1.12 Radioaktive Markierung von DNA

Doppelsträngige DNA wurde nach der Methode von Feinberg und Vogelstein radioaktiv markiert (98). Dazu wurde die DNA denaturiert und mit einem Gemisch von Nonanukleotiden hybridisiert, die als Primer für die Synthese durch das Klenow Fragment der DNA-Polymerase in Gegenwart von alpha³²P-dCTP dienen.

25 ng DNA wurde in 21 µl H₂O denaturiert (5 Min, 95 °C), mit 4 µl High Prime-Mix (Boehringer) und 5 µl alpha³²P-dCTP bei 37 °C für 30 Min inkubiert. Nicht eingebaute, radioaktiv markierte Nukleotide

wurden über Sephadex *spin columns* (Pharmacia) abgetrennt. Die spezifische Aktivität dieser radioaktiv markierten DNA-Sonden lag zwischen bis $1-3 \times 10^9$ cpm/ μ g und wurde in einer Konzentration von $1-3 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungspuffer eingesetzt.

3.1.13 Endmarkierung von DNA mit der T4-Polynucleotidkinase

Zur radioaktiven Markierung kurzer Oligonukleotide kann das gamma-ständige Phosphat des gamma- ^{32}P -dATP auf die dephosphorylierte 5'-OH Gruppe des Oligonukleotides übertragen werden.

In einem 20 μ l Reaktionsansatz wurden 100 ng Oligonukleotid in 1 x Kinasepuffer (USB), mit 3 μ Ci gamma- ^{32}P -dATP und 10 U T4-Polynucleotidkinase (USB) für 30 Min bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebaute, radioaktive Nukleotide wurden über Sephadex *Spin columns* (Pharmacia) abgetrennt. Die spezifische Aktivität betrug $1-2 \times 10^9$ cpm/ μ g Oligonukleotid.

3.1.14 Herstellung von antisense-RNA Sonden

Für die Northern Blot Analysen wurden antisense-RNA Sonden hergestellt. Antisense-RNA Sonden bieten gegenüber radioaktiv markierten DNA-Sonden den Vorteil, dass nur der zur mRNA komplementäre Strang radioaktiv markiert wird, was unspezifische Bindungen reduziert. Da RNA/RNA Bindungen stärker sind als DNA/DNA Bindungen, kann außerdem eine Sensitivitätserhöhung erreicht werden.

Antisense-RNA Sonden wurden mit dem Riboprobe System von Promega mit der entsprechenden RNA-Polymerase (SP6, T3, T7) hergestellt. 1 μ g Plasmid DNA wurde mit 5 μ l alpha- ^{32}P -UTP und den Reagenzien gemäß dem Protokoll des Herstellers für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die synthetisierte antisense-RNA wurde 2 x mit Ethanol gefällt. Das trockene RNA-Pellet wurde in 10 μ l H₂O resuspendiert. Die spezifische Aktivität der antisense-Sonden lag bei $2 - 3 \times 10^8$ cpm/ μ g DNA.

3.1.15 Slot Blot Analyse

Zur Slot Blot Analyse wurden ca. 1 μ g der zu analysierenden DNA-Proben mit einer Slot Blot Apparatur von Schleicher und Schüll auf eine Nylonmembran transferiert. Die DNA wurde durch Inkubation der Membran in 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH für 2 Min denaturiert und in 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH8,0 für 5 Min neutralisiert. Die Membran wurde halbiert und je eine Hälfte mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde von unstimulierten BL60-2 Zellen, bzw. mit einer cDNA-Sonde von stimulierten BL60-2 Zellen oder einer subtrahierten Probe hybridisiert.

3.1.16 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten (99). In sich wiederholenden Zyklen der Denaturierung der DNA, der Hybridisierung sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer und der Synthese der DNA, wird der zwischen den Primern liegende Bereich amplifiziert. Die DNA-Synthese wurde durch die hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* ermöglicht und erfolgte bei 72 °C. Eine Standard-PCR Reaktion wurde für 25 bis 35 Zyklen in einem automatischen Thermocycler durchgeführt:

ca. 100 ng Erststrang-cDNA; 1 ng Plasmid DNA
1 x PCR Puffer
0,2 mM je Desoxynukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
0,2 mM pro Oligonukleotid-Primer
5 U Taq DNA-Polymerase
auf 100 µl mit H₂O

Die Reaktion erfolgte nach folgenden Bedingungen:

5 min Denaturierung bei 95 °C

dann 25-35 Zyklen:

1 min	Denaturierung bei 95 °C
1 min	Hybridisierung bei 50-60 °C
1 min	DNA-Synthese bei 72 °C

anschließend erfolgte ein 5-minütiger Polymerisierungsschritt bei 72 °C. Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem EtBr-haltigen Agarosegel elektrophoretisch getrennt, wobei 1/10 V des Reaktionsansatzes für ein analytisches Gel und der gesamte Ansatz für ein präparatives Gel aufgetragen wurde. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.1.17 Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten

Die Anwendung von thermostabilen Polymerasen ermöglicht in der DNA-Sequenzanalyse analog zur PCR die gleichzeitige Amplifikation und DNA-Sequenzierung. Dieses Verfahren wird Cycle Sequencing genannt. Dabei wird allerdings nur ein Primer eingesetzt. In einer Mixtur aus DNA-Plasmid, Primer, DNA-Polymerase, dNTP/ddNTP-Gemisch wird ein thermisches Profil, bestehend aus Denaturierung, Primerhybridisierung und DNA-Synthese ca. 30-mal durchlaufen. Sequenzreaktionen wurden mit dem Taq *Cycle Sequencing* Kit von Perkin Elmer vollzogen. Dabei wurden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide in die DNA eingebaut. Die Sequenz wurde nach gelelektrophoretischer Trennung und Analyse auf einem Sequenzer der Firma Perkin Elmer erhalten.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Subtraktive Proteinanalyse

Für den subtraktiven Vergleich der Proteinmuster wurden Proteine der BL60-2 Zellen vor und nach anti-IgM Stimulation und magnetischer Depletion bzw. Separation mittels der zweidimensionalen-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die differentiellen Proteinspots wurden isoliert, im Gel tryptisch verdaut, über die *Reversed-Phase*-HPLC aufgereinigt und über Edman Abbau oder MALDI-MS identifiziert.

3.2.1.1 Präparation der Protein-Proben

<u>Probenpuffer:</u>	20 mM	Tris-HCl, pH 7,1
	1 mM	KCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	PMSF
	1,4 µM	Pepstatin
	1 mM	Benzamidin
	2,1 µM	Leupeptin

BL60-2 Zellen wurden nach anti-IgM Stimulation und magnetischer Depletion bzw. Separation (3.3.6) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Zellpellets apoptotischer und nicht apoptotischer Zellen wurden auf Eis aufgetaut und direkt in einen Protease-Inhibitor-haltigen Puffer gemäß Klose und Kobalz (100) resuspendiert.

Anschließend wurden 9 M Urea, 70 mM DTT und Trägerampholyte (2 %) (Servalyt pH 2-4) hinzugegeben. Die Proteinkonzentration wurde mit einer Aminosäureanalyse bestimmt und betrug ca. 30-35 mg/ml. 60 µg dieser Proben wurden für ein analytisches Gel verwendet, 900 µg für ein präparatives Gel (101).

3.2.1.2 Zweidimensionale-Gelelektrophorese

Die Proteinproben wurden nach der zweidimensionalen-Gelelektrophorese in Anlehnung an Klose und Kobalz aufgetrennt (100). Die Gelkammer, sowie die Gellösungen wurden von der Firma WITA (Teltow, Deutschland) bezogen. In der ersten Dimension wurden isoelektrisch fokussierende Rundgele (Länge 20 cm, Durchmesser der analytischen Gele: 0,09 cm, präparative Gele: 0,25 cm) verwandt. In der zweiten Dimension der Gelelektrophorese wurden 30-cm Gele eingesetzt. Die analytischen Gele wurden silbergefärbt (100), die präparativen Gele Coomassie-Blau (102). Die Proteinmuster der silbergefärbten Gele von unstimulierten BL60-2 Zellen, sowie stimulierten BL60-2 Zellen wurden verglichen. Differentielle Spots wurden dem Coomassie gefärbten, präparativen Gel zugeordnet und ausgeschnitten.

3.2.1.3 Enzymatische In-Gel-Spaltung

Für die mikropräparativen Untersuchungen der differentiellen Proteinspots wurden isolierte Spots von bis zu 10 Coomassie gefärbten Gelen vereint und im Gel tryptisch gespalten. Die Peptide wurden aus dem Gel eluiert und entsalzt (103).

3.2.1.4 Reversed-Phase-HPLC und Edman Sequenzierung

Die Peptide wurden nach der tryptischen Spaltung auf einer µRPC C2/C18 SC2, 1/10 Säule (innerer Durchmesser: 2,1 mm; Länge: 10 cm ; Pharmacia-Biotech) auf einem Smart™-System getrennt. Die Trennung erfolgt durch einen Acetonitril Gradienten in 0,1 % v/v TFA und einer

Durchflußrate von 100 µl/min bei RT. Die Peptide wurden auf einem Polybren beschichteten Glassfilter sequenziert. (Perkin Elmer/Applied Biosystems).

3.2.1.5 MALDI-MS

Die Massenspektrometrie ermöglicht die Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Die zu analysierenden Peptide wurden mit der Matrix (gesättigte Lösung alpha-Cyano-4-Hydroxymethylsäure in 50 % Acetonitril und 0,1 % TFA) auf einem Probenteller kokristallisiert, mit einem Laser ionisiert und in einem Massenanalysator gemäß ihres Masse/Ladungs Quotienten aufgetrennt und detektiert. Die benötigte Proteinmenge lag im Pikomol Bereich. Die Massenspektrometrie wurde auf einem VG ToF Spec (Fisons) bei 24 KV und einem Nitrogen Laser (337 nm, Puls Dauer 4 ns) durchgeführt.

3.2.2 Protein Identifizierung mittels Datenbankvergleich

Die in der MALDI-Massenspektrometrie erhaltenen Peptid-Massen wurden mit den Daten der Swiss Prot- und EMBL-Datenbank verglichen. Dabei wurden die Peptid-Muster mit den Mustern bekannter Proteine, die sich nach hypothetischem Trypsin Verdau ergeben, verglichen. Dieser Vergleich ermöglicht die Identifizierung isolierter Proteinspots.

3.2.3 Western Blot Analyse

<u>Western Blot-Puffer:</u>	50 mM	Tris-HCl , pH 7,5
	150 mM	NaCl
	1 %	Triton X-100
	1 %	Trockenmilchpulver

<u>Lysepuffer:</u>	20 mM	Tris-Acetat, pH 7,0
	10 mM	Natriumglycerophosphat
	50 mM	Natriumfluorid
	5 mM	Natriumpyrophosphat
	1%	Triton X-100
	0,1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	0,2 mM	PMSF
	0,27 mM	Sucrose
	2 µg/ml	Leupeptin

BL60-2 Zellen wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiträumen mit anti-IgM pelletiert (250 g, 10 Min, 4 °C), und in 1 x PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden in Lysepuffer resuspendiert und

für 40 Min bei 4 °C inkubiert. Die Proteine (30 µg pro Spur) wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Membranen in Western Blot-Puffer für 30 Min bei RT geblockt und in demselben Puffer mit dem entsprechenden Antikörper (1:1000 Santa Cruz; 1: 500 hnRNP A1) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Membranen 2 x 15 Min in Western Blot-Puffer gewaschen und für 1 h mit einem HRP-konjugierten Zweitantikörper inkubiert (1:15000, Santa Cruz). Nach erneutem Waschen wurden die Membranen mit dem ECL System von (Amersham) entwickelt, und die Signale nach Autoradiographie detektiert.

3.2.4 Expression rekombinanter Proteine durch IPTG-Induktion

Die cDNA Sequenzen wurden zunächst in den entsprechenden pQE Expressionsvektor von QIAGEN kloniert. Diese Vektoren ermöglichen die Expression eines Fusionsproteins mit sechs aufeinander folgenden Histidinen. Die Klonierung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers, wobei die Restriktionsspaltungen und Ligationen nach den Standard Protokollen von Sambrook et al. erfolgten (96).

Die Plasmide wurden in den *E.coli* Bakterienstamm M15 transformiert und konnten auf Ampicillin/Kanamycin-Platten selektioniert werden. Die Induktion großer Proteinmengen erfolgte in 400 ml LB Medium (+ 100 µg/ml Ampicillin), das mit 0,4 ml einer Übernachtskultur angeimpft, und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert wurde. Durch die Zugabe von IPTG wurde die Proteinexpression induziert (1 mM IPTG, 4 h bei 37 °C). Die induzierten Bakterien wurden abzentrifugiert, in Harnstoff-haltigem Lysepuffer resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Durch die Fusion der sechs Histidine konnten die Proteine nun unter denaturierenden Bedingungen auf einer Nickelchelatsäule isoliert werden. Dabei wurden die positiv geladenen Histidine der Fusionsproteine an Nickel beladene Agarose gebunden und konnten so von den restlichen Proteinen isoliert werden.

3.2.5 In vitro Spaltung durch rekombinante Caspase

<u>2 x Reaktionspuffer:</u>	0,2 %	CHAPS
	100 mM	HEPES, pH 7,5
	2 mM	PMSF
	100 mM	Leupeptin
	40 µg	Aprotinin
	10 mM	DTT

Die *in vitro* Spaltung rekombinanter Proteine wurde in 20 µl Reaktionsvolumen angesetzt. 60 ng rekombinante Caspase 1, 3, 6 oder 7 wurden mit 1 µl rekombinantem SP1 Protein (1 footprint unit, Promega), bzw. 1 µg hnRNP A1 Protein in 1 x Reaktionspuffer bei 37 °C für 2 h mit oder ohne Caspase-Inhibitor, 200 µM z-DEVD-fmk oder ac-YVAD-cmk (Calbiochem) inkubiert. Die Reaktionen wurden auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt.

Für die Kontrollreaktionen der Caspase 1 wurden 5 µl eines *in vitro* Translationsansatzes (3.2.7), wie oben beschrieben, in die Spaltreaktion eingesetzt. Die Proben wurden auf einem 15-% igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde zur Signalverstärkung 10 Min in einer Amplifyer-Lösung (Amersham) inkubiert. Die ³⁵S-markierten Proteine wurden nach Autoradiographie detektiert.

3.2.6 In vitro Translation im TNT Retikulozyten Lysat

Pro-IL1β in pGEM11 wurde im TNT Retikulozyten Lysat nach dem Protokoll von Promega transkribiert und translatiert. Die Transkription erfolgte mit der SP6 Polymerase unter Zugabe von ³⁵S-Methionin (1000 µCi/ml) in einem 20 µl Reaktionsansatz bei 30 °C für 1 Stunde.

3.2.7 EMSA (elektro mobility shift assay)

Der EMSA dient dem Nachweis von DNA-Protein-Wechselwirkungen. Das Prinzip beruht darauf, daß Protein-DNA-Komplexe in einer elektrophoretischen Auftrennung langsamer laufen als freie DNA. Da die eingesetzten DNA-Bindungssequenzen zuvor radioaktiv markiert wurden, können diese Komplexe nach Autoradiographie detektiert werden.

2 x DNA- Bindungspuffer:

40 mM	HEPES, pH 7,9
120 mM	KCl
8 %	Ficoll G400
2 µg	poly(dIdC)
4 mM	DTT
4 µg	BSA

5 %-iges Gel zur DNA-Protein-Komplex Analyse:

20 %	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
50 mM	Borsäure
0,1 mM	EDTA

Kernextrakte von BL60-2 Zellen wurden mit anti-IgM über verschiedene Zeiträume stimuliert, und nach dem Protokoll von Schreiber et al. präpariert (104). 5 µg dieser Kernextrakte wurden mit Oligonukleotiden inkubiert, die eine SP1 Erkennungssequenz, eine mutierte SP1 Erkennungssequenz oder eine Oct-2 Erkennungssequenz darstellen. Diese Oligonukleotide waren zuvor mit der T4-Polynukleotidkinase und alpha³²P-dATP radioaktiv markiert worden (3.1.13). Sie wurden mit einer Aktivität von 5000 cpm pro Reaktion eingesetzt. Die DNA Bindungsreaktion wurde in 20 µl Reaktionsvolumen in 1 x DNA-Bindungspuffer angesetzt und für 30 Min bei 30 °C inkubiert. In einer *Supershift* Analyse wurde 15 Min nach Inkubation 0,5 µg eines SP1 spezifischen Antikörpers (Santa Cruz) zu dem Reaktionsansatz gegeben. In der Kontrollreaktion wurde die

Supershift Analyse mit einem Peptid kompetiert (0,1 µg PEP2 Santa Cruz), das 30 Min mit dem Antikörper vorinkubiert wurde. DNA-Protein-Komplexe wurden auf einem 4 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, und nach Autoradiographie detektiert.

3.2.8 Caspase 3 Aktivitätsmessung

1×10^6 Zellen der Burkitt Lymphom Zelllinie BL60-2 wurden über verschiedene Zeitintervalle mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten stimuliert. Die Zellen wurden pelletiert, in 1 x PBS gewaschen und gemäß dem Apo Alert™ CPP32 Assay Kit von Clontech lysiert. Die Zellysate wurden mit dem Substrat DEVD-p-Nitroanilid (DEVD-pNA) für 50 Min bei 37 °C inkubiert. Die Spaltung von DEVD-pNA führt zur Freisetzung des Chromophor pNA und konnte bei einer OD₄₀₀ im Spektrophotometer gemessen werden.

3.3 Methoden der Zellkultur

3.3.1 Kulturbedingungen für die Burkitt Lymphom Zelllinie

Medium zur Kultivierung der BL41, BL60-Zellen:

500 ml	RPMI 1640
10 %	FCS
2 mM	Glutamin
10 mM	HEPES pH 7,4
1 mM	Natrium-Pyruvat
20 nM	Bathocuproindisulfonsäure (BCS)
50 µM	alpha-thioglycerol
100 µg/ml	Ampicillin/Streptomycin

Die Zellen wurden bei 37 °C in einer 5 %-igen CO₂ Atmosphäre kultiviert. Die optimale Dichte betrug 0,2-1 x 10⁶ Zellen pro Milliliter Kulturmedium.

3.3.2 Subklonierung der BL60 Zellen

Um einen Klon der BL60 Zellen zu erhalten, der nach anti-IgM Inkubation Apoptose sensitiv ist, wurden die Zellen subkloniert. Dazu wurden die Zellen auf 1 Zelle pro Milliliter Kulturmedium eingestellt und in einer 96-well Flachbodenplatte ausgesät. In jedes well wurden 100 µl der verdünnten Zellsuspension gegeben, so daß statistisch in jedem 10-ten well eine Zelle vorhanden ist. Die 96-well Platten wurden für 2-3 Wochen im Brutschrank inkubiert und die herangewachsenen Klone in eine 24-well Platte transferiert und expandiert. Die einzelnen Klone wurden auf ihre Sensitivität gegenüber anti-IgM getestet.

3.3.3 Induktion der B-Zell Apoptose mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten

Zur Apoptose-Induktion wurden die BL60-2 Zellen auf eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen pro Milliliter Kulturmedium eingestellt. Anschließend wurden die Zellen mit 1,3 µg/ml anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten versetzt und für die gewünschte Zeitdauer bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.3.4 Inkubation der BL60 Zellen mit Caspase-Inhibitoren

BL60 Zellen wurden mit den zellpermeablen, irreversiblen Caspase-Inhibitoren z-DEVD-fmk oder ac-YVAD-cmk inkubiert, bevor die Zellen mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten stimuliert wurden. Die Inhibitoren wurden in 100 % DMSO gelöst (Stocklsg. 10 mM) und in einer Endkonzentration von 0,1 bis 200 µM zur Zellsuspension gegeben. Dabei durfte die DMSO-Konzentration die Endkonzentration von 1 % in der Zellkultur nicht übersteigen. Die Inhibitoren wurde 30 Min vor Zugabe der anti-IgM F(ab)₂-Fragmente zur Zellkultur gegeben.

3.3.5 Zellmarkierung mit Annexin-V/FITC

Phosphatidylserin (PS) ist ein Phospholipid, daß Bestandteil der inneren Zellmembran ist. Nach Apoptose Induktion wird PS in die äußere Membranschicht transloziert. Diese Translokation des PS ist ein frühes Merkmal für den Prozeß der Apoptose. Annexin-V bindet spezifisch an PS, so daß apoptotische Zellen mittels FITC gekoppeltem Annexin-V im *fluorescence activated cell sorter* (FACS) von nicht apoptotischen unterschieden werden können.

3.3.6 Magnetische Zellseparation und Depletion

Phosphatidylserin (PS) positive, apoptotische Zellen, die zuvor mit Annexin-V/FITC markiert wurden (s. 3.3.5) können in einem zweiten Schritt an anti-FITC magnetische *beads* gebunden werden und in einer magnetischen Separation bzw. Depletion von nicht apoptotischen Zellen getrennt werden.

Annexin-V/FITC Puffer:

10 mM	Hepes, pH 7,4
150 mM	NaCl
5 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂
1 mM	CaCl ₂

3.3.6.1 Magnetische Depletion

Bei der Kultivierung der BL60 Zellen sterben ca. 5 % der Zellen spontan durch Apoptose. Diese apoptotischen Zellen wurden durch magnetische Trennung von den restlichen, nicht apoptotischen Zellen abgetrennt.

Dazu wurden 2×10^8 Zellen BL60-2 Zellen für 10 Min bei 1200 rpm (400 g), bei 4 °C pelletiert, in 10 ml Annexin-V/FITC-Puffer gewaschen und erneut pelletiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml FITC-Puffer resuspendiert und mit 20 µl Annexin-V/FITC für 30 Min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in 50 ml Annexin-V/FITC-Puffer gewaschen, wodurch freies Annexin-V/FITC entfernt wurde. Das Zellpellet wurde erneut in 2 ml FITC-Puffer aufgenommen und mit 100 µl anti-FITC *microbeads* für 15 Min bei 4°C inkubiert. Die Separationssäule (Miltenyi, BS-Säule) wurde in 30 ml Annexin-V/FITC-Puffer äquilibriert, und mit weiteren mit 30 ml Annexin-V/FITC-Puffer gewaschen. Die Zellsuspension wurde auf die Säule gegeben und mit 2 x 3 ml Annexin-V/FITC-Puffer wurden die

depletierten Zellen aus der Säule eluiert. Die Zellen wurden pelletiert (400 g, 10 Min, RT) und in 1 x PBS gewaschen. Die trockenen Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.6.2 Magnetische Separation

Nach anti-IgM Induktion der BL60-2 Zellen sterben ca. 40-60 % durch Apoptose. Diese Zellen wurden durch Annexin-V/FITC Markierung und Inkubation mit anti-FITC *beads* in der magnetisierten Säule zurückgehalten und von den nicht bindenden, nicht apoptotischen Zellen getrennt.

10^8 Zellen wurden, wie unter 3.3.6.1 beschrieben, mit Annexin-V/FITC und anti-FITC-*beads* inkubiert. Die Separationssäule (Miltenyi, VS⁺ -Säule) wurde zuvor 3 mal mit 3 ml entgastem Annexin-V/FITC-Puffer äquilibriert, und die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 10 ml Puffer gespült. Die nicht apoptotischen Zellen wurden so eluiert, während die apoptotischen Zellen in der Säule zurückgehalten wurden. Die Säule wurde aus dem Magneten entfernt und die apoptotischen Zellen mit 6 ml Annexin-V/FITC-Puffer eluiert. Die Zellen wurden pelletiert (400g, 10 Min, RT) und in 2 ml 1 x PBS, 2 mM EDTA gewaschen, wodurch das gebundene Annexin-V/FITC entfernt wurde. Die trockenen Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

3.3.7 Acridinorange Färbung

Acridinorange (3,6-Bis-(dimethyl-amino)-Acridin) ist ein Farbstoff, der unspezifisch in DNA-Moleküle interkaliert. Diese Färbung kann unter UV-Licht visualisiert werden und diente der Quantifizierung apoptotischer Zellen, die durch ihre charakteristische Kernfragmentierung von nicht apoptotischen Zellen unterschieden wurden (Abb. 5).

3.3.8 Proliferationsassay

Durch den Einbau von Tritium-markiertem Thymidin in die neusynthetisierte DNA kann die Proliferation von Zellen bestimmt werden. Die Proliferation der BL60-2 Zellen wurde in Abhängigkeit vom anti-IgM Stimulus untersucht. Je 4×10^4 Zellen wurden in 200 μ l Kulturmedium in eine 96-*well* Flachbodenplatte gegeben und mit steigenden Konzentrationen (0 - 5,0 μ g/ml) Kulturmedium anti-IgM für 24 Stunden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5%-iger CO₂ Atmosphäre inkubiert. Dabei wurden alle Proben als Triplikate angesetzt. Nach 24 Stunden wurden 0,5 μ Ci ³H-Thymidin zugegeben und die Zellen für weitere 18 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf 96-*well* Filterplatten gesaugt, wobei freies ³H-Thymidin, das nicht in die DNA inkorporiert wurde, ausgewaschen wurde. Nach Zugabe von 50 μ l Szintillationsflüssigkeit wurde die Menge des eingebauten ³H-Thymidin in einem Szintillationszähler (Top count, Canberra Packard) gemessen.

3.3.9 FACS (fluorescence activated cell sorting)

Antikörper Verdünnungs (AKV)-Medium:

10 %	Venimun
0,1 %	NaN ₃
1 x	PBS

Die Analyse von Zellen in einem Durchflußzytometer bietet die Möglichkeit die Oberflächenmoleküle einzelner Zellen zu analysieren. Dazu werden Zellen mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und durch Licht zur Fluoreszenz angeregt. Die Fluoreszenzemission und Lichtstreuung wird registriert und daraus die Größe und Gestalt der Zelle errechnet. Da einzelne Zellen detektiert werden, können Zellpopulationen quantifiziert werden. Zur Charakterisierung der Oberflächenmoleküle der BL60-2 Zellen wurden 1×10^6 Zellen abzentrifugiert (400 g, 10 Min, 4 °C) und in 1 x PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µl AKV-Medium resuspendiert und auf eine Zellzahl von 5×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Die Zellen wurden in eine 96-*well* Platte pipettiert, 30 Min bei 4 °C inkubiert und 5 Min bei 400 g abzentrifugiert. Sie wurden erneut in 50 µl AKV-Medium aufgenommen, mit Primärantikörper versetzt (20 µg/ml) und für 20 Min bei 4 °C inkubiert. Jedes *well* wurde 2 x mit 150 µl 1 x PBS gewaschen. Danach wurden 50 µl FITC-, oder PE-gekoppelter Zweitantikörper (1:100 in AKV-Medium) in jedes *well* zugegeben und bei 4 °C für 20 Min inkubiert. Die Platte wurde erneut 2 x mit 1 x PBS gewaschen, und die resuspendierten Zellen in einem FACS-Scan (Becton Dickinson) analysiert.

Apoptotische Zellen wurden durch Annexin-V/FITC Färbung markiert und konnten so von nicht apoptotischen Zellen im FACS unterschieden werden. Ca. 10^6 Zellen wurden in 200 µl Annexin-V/FITC Puffer aufgenommen, mit 2 µl Annexin-V/FITC für 30 Min auf Eis inkubiert, erneut in Puffer gewaschen, und im Durchflußzytometer gemessen.

3.3.10 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der BL60-2 Zellen vor und nach anti-IgM induzierter Apoptose wurden von Dr. F. Vogel am MDC, Berlin erstellt.

4 Ergebnisse-Teil1

4.1 Etablierung eines B-Zell Modells zur Untersuchung der anti-IgM induzierten Apoptose

4.1.1 Subklonierung der Burkitt Lymphom Zelllinie BL60

Zur Identifizierung von Proteinen und Genen, die in der anti-IgM vermittelten Apoptose eine Rolle spielen wurde zunächst ein Modellsystem etabliert. Durch Subklonierung der Burkitt Lymphom Zelllinie BL60 konnte ein Klon selektioniert werden (BL60-2) der sensitiv auf den Stimulus ist. Die Zellen dieses Subklons sterben nach Quervernetzung des membranständigen IgM durch Apoptose, was dem Prozeß der Eliminierung potentiell autoreaktiver B-Zellen entspricht. In einem Proliferationsassay wurde gezeigt, daß die Zellen nach anti-IgM Stimulation in ihrem Wachstum gehemmt sind und nach 24 Stunden zeigen 40-60 Prozent der Zellen, die für die Apoptose typischen fragmentierten Kerne, was mittels des membranpermeablen DNA-Farbstoffs Acridinorange unter UV-Licht sichtbar gemacht wurde (Abb. 5).

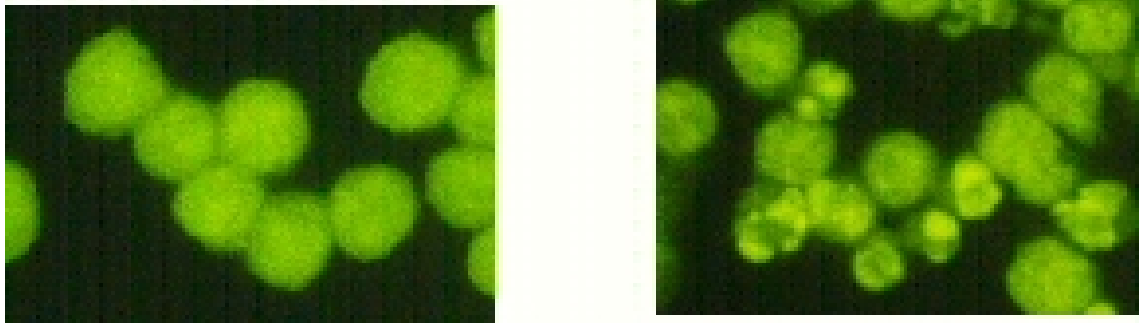


Abb. 5 Fluoreszenzaufnahme apoptotischer und nicht apoptotischer BL60-2 Zellen nach Acridinorangefärbung
 Stimulierte, apoptotische BL60-2 Zellen (24 Stunden anti-IgM F(ab)2) und nicht stimulierte Zellen wurden mit Acridinorange angefärbt und im UV-Licht visualisiert. Apoptotische Zellen zeigen deutlich fragmentierte Kerne (rechts), während nicht apoptotische Zellen einen intakten Zellkern haben (links).

Dieser Subklon wurde in einer FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) hinsichtlich seiner Oberflächenmoleküle charakterisiert. Der BL60-2 Subklon ist stark IgM, CD10, CD19, CD20, CD38, CD21 und Apo1/FAS positiv, schwach positiv für IgD, CD40 und CD5 negativ.

4.1.2 Morphologische Veränderungen während der Apoptose- Elektronenmikroskopische Charakterisierung

Apoptose ist durch folgende morphologische Veränderungen gekennzeichnet: Zellschrumpfung, Kern-Fragmentierung, "membrane blebbing", Chromatinkondensation, dem Verlust der Membransymmetrie, sowie der Umstrukturierung des Cytoskeletts. Einige Veränderungen können bereits 8 Stunden nach anti-IgM Stimulation in der Elektronenmikroskopie detektiert werden (Abb. 6).

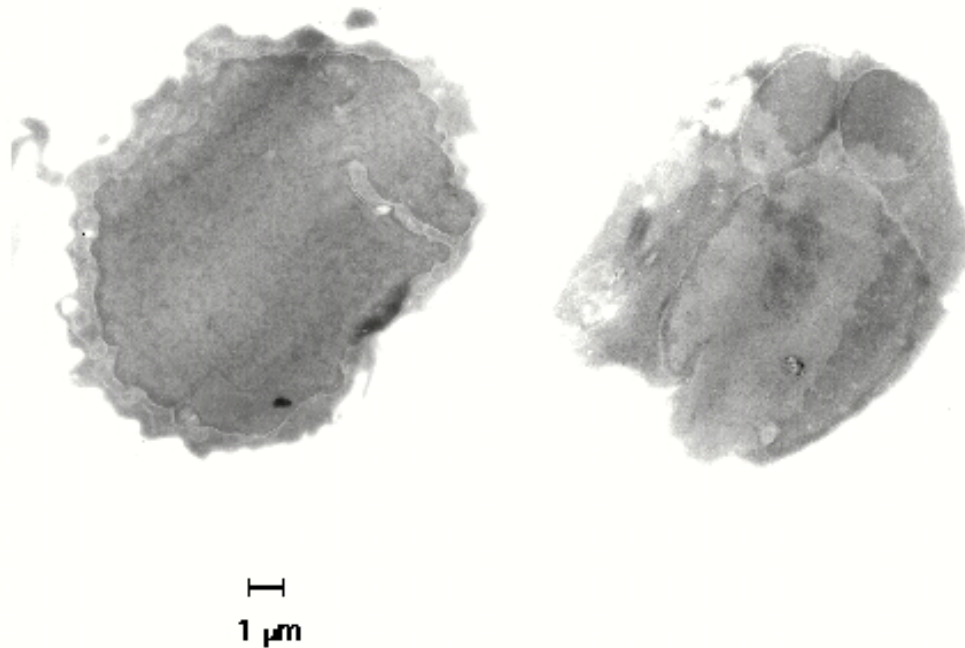


Abb. 6 Elektronenmikroskopische Aufnahme nach anti-IgM induzierter B-Zell Apoptose BL60-2 Zellen vor Stimulation (links) und nach 8 Stunden (rechts) anti-IgM induzierter Apoptose. Die apoptotische Zelle ist geschrumpft, zeigt ein kondensiertes Chromatin, Fragmentierung des Kernes sowie lappige Zellmembranwände.

Der Zellkern der BL60-2 Zellen ist 8 Stunden nach anti-IgM Stimulation deutlich fragmentiert. Die Zellen und Zellkerne haben ihre runde Form verloren, was auf die Umstrukturierung des Cytoskeletts hinweist. Die apoptotische Zelle ist geschrumpft und zeigt lappige Zellwände sowie ein stark kondensiertes Chromatin.

4.1.3 Magnetische Separation von apoptotischen und nicht apoptotischen BL60-2 Zellen

Für die Identifikation von Apoptose assoziierten Proteinen ist es vorteilhaft, möglichst reine Fraktionen apoptotischer und nicht apoptotischer Zellen einzusetzen. Da nach anti-IgM Stimulation nur ca. 40-60 % der Zellen apoptotisch sind, wurde zunächst eine Methode entwickelt, um die Zellpopulationen voneinander zu trennen (Abb. 7).

Zellen, die durch Apoptose sterben, verlieren innerhalb weniger Stunden ihre Membransymmetrie, wodurch es zur Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der äußeren Zellmembran kommt. Annexin-V/FITC bindet spezifisch an PS und ist somit ebenso, wie die durch Arcidinorange sichtbar gemachte Kernfragmentierung, eine zuverlässige Nachweismethode für die Apoptose. 24 Stunden nach anti-IgM Stimulation waren 45 Prozent der BL60-2 Zellen Annexin-V/FITC positiv, was in der

FACS-Analyse gemessen und quantifiziert wurde (Abb. 8 A).

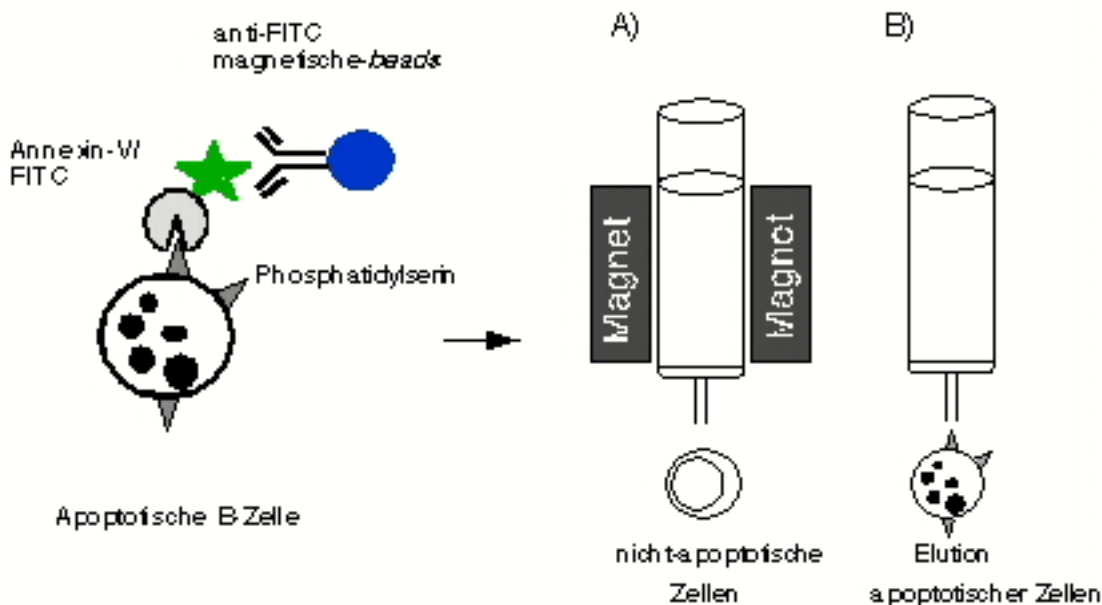


Abb 7 Magnetische Trennung apoptotischer und nicht-apoptotischer BL60-2 Zellen

Apoptotische Zellen exponieren Phosphatidylserin (PS) auf der äußeren Zellmembran. Annexin-V bindet spezifisch an PS, so daß apoptotische Zellen durch die Bindung von Annexin-V/FITC markiert werden können. Die Bindung an anti-FITC magnetische *beads* ermöglichte die Trennung über magnetische Säulen. Apoptotische Zellen binden an die Säule, solange diese im Magnetfeld steht (A), während nicht apoptotische Zellen sich im Durchlauf befinden. Die apoptotischen, PS positiven Zellen wurden durch Entnahme der Säulen aus dem Magneten eluiert (B).

Um apoptotische Zellen von nicht apoptotischen zu trennen, wurden BL60-2 Zellen 20 Stunden mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten stimuliert, Annexin-V/FITC markiert und an anti-FITC magnetische *beads* gebunden. Diese markierten, apoptotischen Zellen wurden dann in einer magnetischen Separation von nicht apoptotischen Zellen getrennt (Abb.7). Die Fraktionen wurden in einer FACS-Analyse auf ihre Reinheit überprüft (Abb. 8).

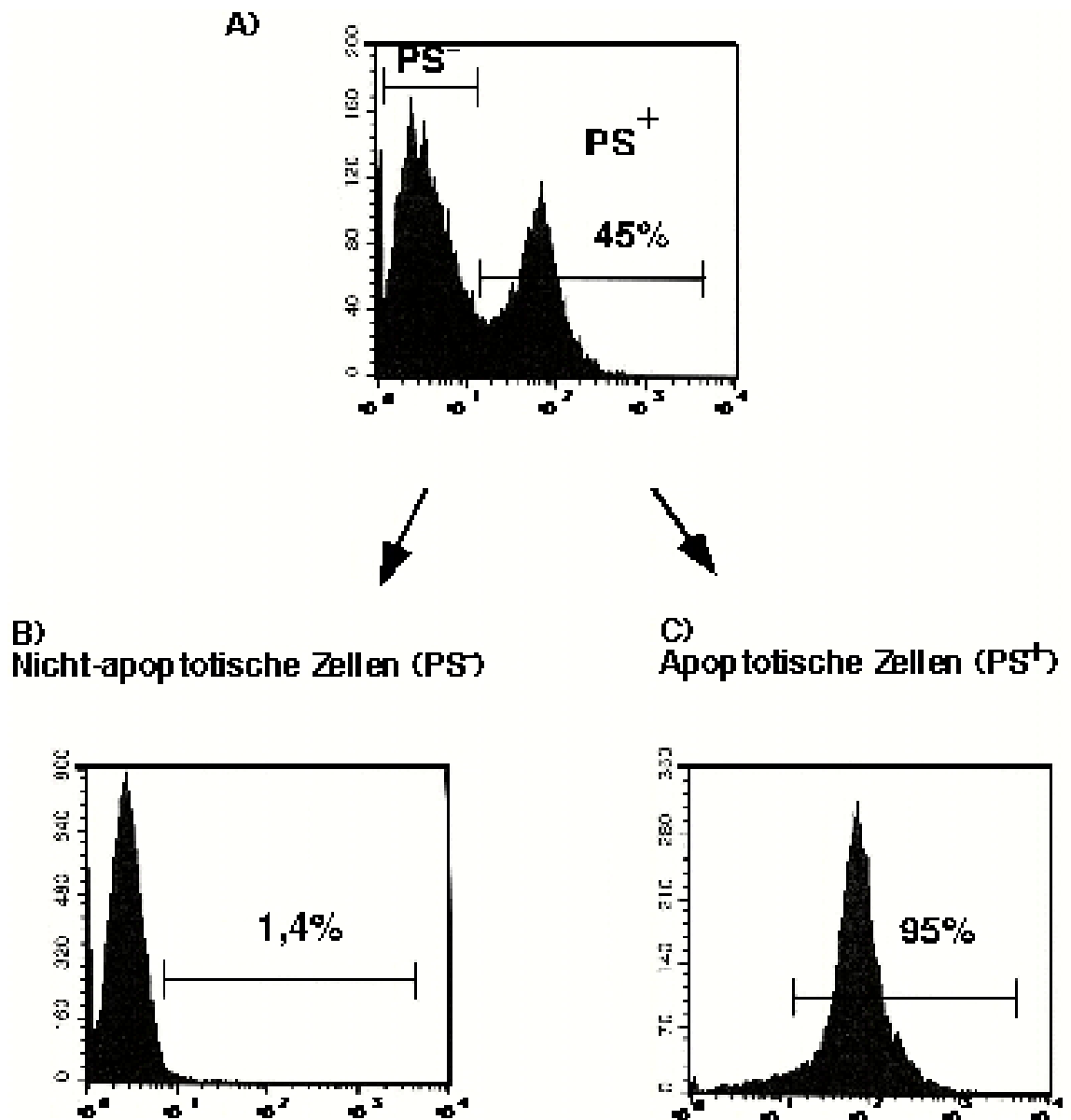


Abb. 8 FACS-Analyse apoptotischer BL60-2 Zellen nach Annexin-V/FITC Färbung und magnetischer Separation und Depletion
 BL60-2 Zellen wurden für 20 Stunden mit anti-IgM F(ab)2-Fragmenten inkubiert und mit dem Annexin-V/FITC Konjugat markiert. Apoptotische Zellen wurden nach Inkubation mit anti-FITC magnetischen beads über MACS-Säulen getrennt. Nicht apoptotische Zellen wurden von spontan apoptotischen Zellen depletiert. A) FACS-Analyse von anti-IgM stimulierten BL60-2 Zellen nach Annexin-V/FITC Färbung, vor der magnetischen Trennung. B) FACS-Analyse, nicht apoptotischer, PS negativer Zellen nach magnetischer Depletion. C) FACS-Analyse von apoptotischen, PS-positiven Zellen nach magnetischer Separation.

Nach magnetischer Separation konnte eine Reinheit von 95 Prozent apoptotischer, Annexin-V/FITC positiver Zellen erreicht werden (Abb. 8 C). Unstimulierte Zellen zeigen eine spontane Apoptoserate von 3-10 Prozent. Diese spontan-apoptotischen Zellen wurden von der Population nicht apoptotischer Zellen abgetrennt. Der Anteil apoptotischer Zellen betrug nach der Depletion nur noch 1,4 Prozent (Abb. 8 B).

Gesamtzellextrakte dieser aufgereinigten Fraktionen stimulierter und nicht stimulierter Zellen wurden mittels der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese analysiert, und in einem subtraktiven Vergleich wurden Veränderungen im Proteinmuster nach anti-IgM Stimulation analysiert.

4.2 Identifikation Apoptose-assoziiierter Proteine mittels der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese

4.2.1 Etablierung des hochauflösenden 2D-Gelelektrophoresesystems

Es ist bisher weitgehend ungeklärt, welche Proteine an dem Prozeß der anti-IgM induzierten Apoptose beteiligt sind. Anhand des Vergleichs der zweidimensionalen Gelmuster von Proteinen der BL60-2 Zellen vor und nach anti-IgM Stimulation, sollten Apoptose-assoziierte Proteine identifiziert werden. Dabei können Veränderungen wie Proteinmodifikationen, Phosphorylierungen oder enzymatische Spaltungen ebenso verfolgt werden, wie die Regulation der Proteinexpression. Voraussetzung für einen solchen Ansatz ist die Auftrennung möglichst aller Proteine einer Zelle in einem Trennvorgang. Die beste Auflösung in der 2D-Technik wird in dem von Klose ausgearbeiteten System erreicht, bei dem mehr als 5000 Proteine der Zellen ohne jede Vorfraktionierung aufgetrennt werden können. Mittels dieser hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese wurden Zellextrakte der BL60-2 Zelllinie nach magnetischer Aufreinigung der apoptotischen und nicht-apoptotischen Zellen aufgetrennt und die Proteinmuster nach Silberfärbung verglichen (Abb. 9).

Die Silberfärbung ist deutlich sensitiver, als die Coomassie-Färbung und eignet sich damit für analytische Gele. Die Nachweisgrenzen für Coomassie-Färbung liegt bei 100 ng - 1 µg Protein, bei der Silberfärbung hingegen im Subnanogramm Bereich, so daß nur ca. 60 µg Gesamtprotein einer Zelle für die Analyse von bis zu 5000 Proteinspots ausreichend ist. Die Silberfärbung modifiziert Proteine chemisch so, daß sie nicht in der Massenspektrometrie bzw. für den Edman Abbau eingesetzt werden können. Deshalb wurden Proteinspots, die nach Apoptose Induktion im silbergefärbten-Gel in Intensität oder Lage, im Vergleich zum silbergefärbten-Gel unstimulierter Zellen verändert waren, dem präparativen Coomassie gefärbten Gel zugeordnet. Präparative, Coomassie gefärbte Gele wurden mit ca. 30-facher Proteinmenge beladen, und differentielle Proteinspots wurden aus dem Coomassie gefärbten Gel isoliert und im Gel tryptisch verdaut.

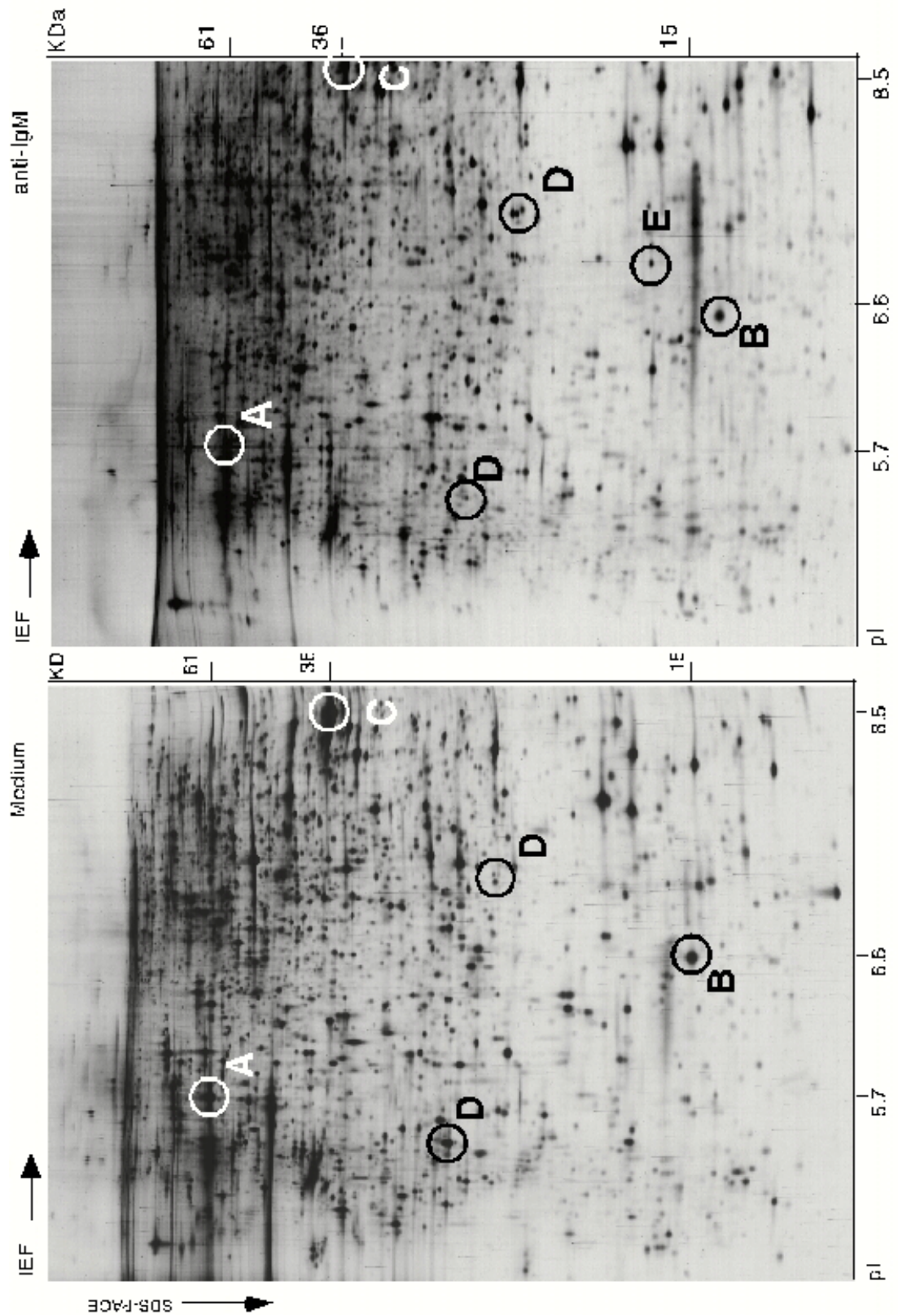


Abb. 9 2 D-Gele nicht apoptotischer- und apoptotischer-BL60-2 Zellen
 Silbergefärbte 2-D Gelmuster von Gesamtzellextrakten nicht stimulierter und anti-IgM stimulierter BL60-2 Zellen nach Separation über MACS-Säulen. Die isoelektrische Trennung in der ersten Dimension erfolgte mit Trägerampholyten im Bereich von pH 2-4 (pI = isoelektrischer Punkt), in der

zweiten Dimension auf einem 15 %-igen SDS-Polyacrylamidgel. Das Molekulargewicht und der pI wurden anhand von Referenzspots (A, B, C) kalibriert.

Diese so gewonnenen Peptide wurden in einer *Reversed-Phase*-HPLC getrennt und massenspektrometrisch analysiert. Sie konnten eindeutig zugeordnet werden, falls es sich um ein bekanntes Protein handelte, das schon in der Datenbank aufgeführt ist und der hypothetische Trypsin-Verdau der bekannten Proteine mit den analysierten Fragmenten der massenspektrometrischen Analyse übereinstimmt. Peptide, die so nicht identifiziert werden konnten, wurden mittels Edman-Abbau identifiziert (s. Tab. 1). Die Präparation der 2D-Gele, wie die Identifizierung differentieller Proteinspots erfolgte in der AG Proteinchemie am MDC, von Prof. B. Wittmann-Liebold.

Zunächst wurden drei Spots identifiziert, die vor und nach Apoptose Stimulation unverändert blieben, die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (36 KDa; pI 8,6; Spot C), das Fettsäure bindende Protein (15 KDa; pI 6,6; Spot B) und Mitochondrien Matrix Protein P1 (61 KDa; pI 5,7; Spot A). Diese Proteine, bekannter Masse und isoelektrischen Punktes (pI) dienten zur Kalibrierung auf den 2D-Gelen.

4.2.2 Identifikation differentieller Proteinspots nach anti-IgM induzierter Apoptose

Proteinspots, die nach anti-IgM induzierter B-Zell Apoptose eine veränderte Lage oder Intensität im silbergefärbten 2D-Gel zeigten und dem Comassie gefärbten Gel zugeordnet werden konnten, wurden isoliert und identifiziert. In Tab. 1 sind alle bisher identifizierten Proteine, bzw. deren Fragmente alphabetisch aufgelistet, die in Intensität nach anti-IgM Stimulation entweder abnahmen (-) oder zunahmen (+). Die nach Edmann Abbau erhaltenen Peptidsequenzen der entsprechenden Proteine und die Aminosäureposition sind ebenfalls aufgelistet. Einige der Proteine, wie z.B. Aktin, Lamin, hnRNPC1/C2 wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen im Zusammenhang mit der Apoptose beschrieben. Allerdings ist es bisher unklar, ob die Veränderungen nach anti-IgM induzierter Apoptose mit den bereits beschriebenen identisch sind. Die molekularen Mechanismen der Apoptose scheinen zwar evolutionär konserviert zu sein, allerdings gibt es zellspezifische Apoptosemechanismen, d.h. je nach Zelltyp und Apoptosestimulus werden verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert. Die Komplexität dieser Apoptose regulierenden Mechanismen ist aber noch nicht vollständig geklärt. Einige identifizierte Proteine sollten nun im funktionellen Zusammenhang der Apoptose näher charakterisiert werden.

Einige differentielle Proteine konnten nach massenspektrometrischer Analyse keinen bekannten Proteinen zugeordnet werden. Dabei handelt es sich eventuell um bisher unbekannte Proteine, die nicht in der Datenbank aufgeführt sind. Alle identifizierten Proteine der Burkitt Lymphom Zelllinie BL60 werden in einer 2D-Proteindatenbank im www aufgeführt, die momentan erstellt wird (In Kooperation mit der Gruppe Prof. B. Wittmann Liebold).

Tabelle 1

Datenbank Protein-Identifikation	Spot Intensität	AS-Position	Interne Sequenz
Aktin (Fragment)	+	96-103	VAPEEHPV
Aktin (Fragment)	+	292-303	DLYANTVLSGGT
D4-GDI	-	5-14	APEPHVEEDD
D4-GDI (Fragment)	+		
dUTPase	-	8-17	LSEHATAPTR
FBP	-	171-185	GRPAPGFHHGDGPGN
HHR23B	-	145-155	SEKPAEKPAET
hnRNP A1 (Fragment)	+	146-155	XFAFVTFDDH
hnRNP C1/C2	-	152-157	AVVPSK
hnRNP C1/C2 (Fragment)	+	43-50	IVGCSVHK
hnRNP C1/C2 (Fragment)	+	152-158	AVVPSKR
hnRNPK	-	68-79	XXTXYNASVSVP
HP1 alpha	+	132-144	XKDTDEADLVLAK
Lamin B1 (Fragment)	+	51-65	SLETENSALQLQVTE
LSP 1	-	143-157	EGPGPEDTVQDNLGA
Nucleolin (Fragment)	+	577-590	XLSEDTTEETLKES
Neutrales Calponin	-	215-227	CASQVGMTAPGTR
P0	-	267-276	XFLADPSAEV
P0 (Modifikation)	+	267-281	XFLADPSAEVAAAPV

Tab. 1 Liste der identifizierten, Apoptose-assoziierten Proteine
Proteine der BL60-2 Zellen, die im subtraktiven Vergleich der 2D-Proteinmuster eine Veränderung in der Intensität oder Lage zeigten, wurden isoliert und identifiziert. 15 Proteine konnten nach Peptidsequenzierung und/oder massenspektrometrischen Analyse schon bekannten Proteinen der Datenbank zugeordnet werden. Die Veränderung der Spotintensität nach anti-IgM Stimulation der BL60-2 Zellen wird für jedes Protein, bzw. deren Fragment angegeben. (-) = abnehmende Spotintensität nach anti-IgM Stimulation; (+) = zunehmende Spotintensität nach anti-IgM Stimulation. Wurden nach dem tryptischen-Verdau Peptide über Edman-Abbau sequenziert, sind die Aminosäuresequenzen angegeben.

4.3 D4-GDI als Protease-Substrat während der anti-IgM induzierten Apoptose

Im Vergleich der silbergefärbten, zweidimensionalen Proteinmuster von BL60-2 Zellen vor und nach anti-IgM Stimulation wurde zunächst ein Spot D identifiziert, der in Intensität nach Apoptose-Induktion stark abnimmt (Abb. 10). Der Spot wurde aus dem Coomassie gefärbten Gel isoliert und Trypsin verdaut. Nach Elution und *Reversed-Phase*-HPLC wurde die Aminosäuresequenz eines

Peptid Peaks durch Edman Abbau bestimmt (APEPHVEEDD). Sie ist identisch zur Aminosäuresequenz 5-14 des D4-GDI Proteins. Während der Identifikation weiterer differentieller Proteinspots wurde der Spot D' identifiziert, der nach MALDI-MS als ein Spaltprodukt des D4-GDI Proteins identifiziert werden konnte (Abb. 10). Dieser Spot nimmt nach anti-IgM Stimulation der BL60-2 Zellen in Intensität auf dem zweidimensionalen silbergefärbten-Gel stark zu. Die Identifikation der Spots D und D' ließ somit darauf schließen, daß das D4-GDI Protein während der anti-IgM induzierten Apoptose gespalten wird. D4-GDI ist ein GDP Dissoziations-Inhibitor für Rho GTPasen und wird stark im hematopoietischen System exprimiert.

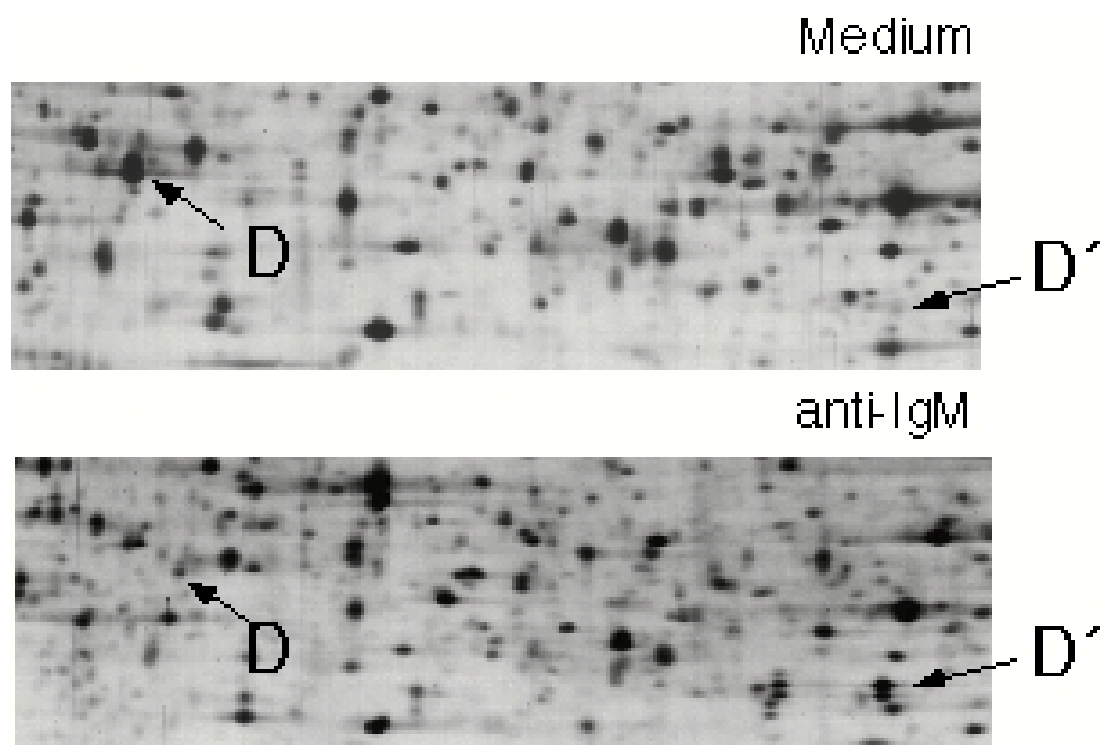


Abb. 10 Vergrößerter Ausschnitt der Region um Spot D und D' Spot D wurde nach Elution und Massenspektrometrischer Analyse als D4-GDI Protein identifiziert. Der Spot D nahm nach anti-IgM Inkubation der BL60-2 Zellen deutlich an Intensität ab. Spot D' konnte als Fragment des D4-GDI Proteins identifiziert werden. Die Intensität des Spots D' nahm nach Apoptose Induktion stark zu.

4.3.1 Zeitverlauf der D4-GDI Spaltung

In einer Western Blot Analyse wurde der zeitliche Verlauf der D4-GDI Spaltung während der anti-IgM induzierten Apoptose bestimmt. Dazu wurden zunächst BL60-2 Zellen über verschiedene Zeiträume mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten inkubiert. Gesamtzelllysate wurden auf einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran geblottet. Die Spaltung des D4-GDI Proteins wurde mit einem polyklonalen-Antiserum, das ein Epitop von Aminosäure 178-198 des Rho-GDI Proteins erkennt, detektiert (Abb.11). Da sich das Rho-GDI Protein im Bereich des

Epitops nur in 3 Aminosäuren vom D4-GDI unterscheidet, erkennt der verwendete Antikörper auch das D4-GDI Protein. Abb. 11 zeigt deutlich die Spaltung des 27 KDa großen D4-GDI Proteins in ein 23 KDa Fragment. Diese Spaltung erfolgt 8 Stunden nach anti-IgM Stimulation der BL60-2 Zellen. Das ungespaltene, 28 KDa große Rho-GDI erscheint im Western Blot mit dem D4-GDI als eine Bande, weshalb die Abnahme des 27 KDa D4-GDI-Proteins hier nicht zu sehen ist. Bei kurzer Exposition des Autoradiogramms können die beiden Banden jedoch visuell aufgelöst werden.

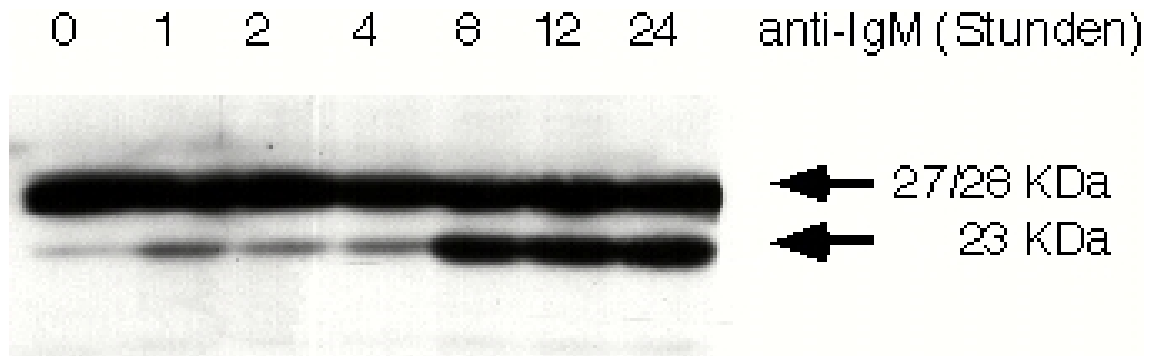


Abb. 11 Zeitverlauf der D4-GDI Spaltung während der anti-IgM induzierten Apoptose BL60-2 Zellen wurden für verschiedene Zeitintervalle mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten inkubiert. Gesamtzelllysate wurden, auf einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mit einem Rho-GDI spezifischen polyklonalen-Antiserum (kreuzreaktiv mit D4-GDI) im Western Blot analysiert. Die Pfeile weisen auf das 28 KDa Rho-GDI, das 27 KDa D4-GDI (eine Bande), sowie das 23 KDa große Spaltprodukt des D4-GDI hin. Die Detektion erfolgte mit dem ECL System nach Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper.

Die Größe des 23 KDa D4-GDI Spaltproduktes korrespondiert mit der erwarteten Größe, die sich aus der Spaltung des D4-GDI Proteins am Aspartat 19, einer Caspase 3 Konsensus-Spaltstelle (DDDELD¹⁹SKLN) ergibt. Diese Konsensus-Spaltstelle ist nicht im Rho-GDI vorhanden (ENEED²¹EHSVN). Das D4-GDI Protein besitzt ebenfalls eine spezifische Spaltstelle für ICE Proteasen, LLGD⁵⁵G. Eine Spaltung an dieser Stelle würde ein 17 KDa großes Spaltprodukt generieren, das nach anti-IgM induzierter Apoptose nicht detektiert werden konnte.

4.3.2 Hemmung der D4-GDI Spaltung durch z-DEVD-fmk

Die Größe des 23 KDa großen D4-GDI Spaltproduktes gab einen Hinweis darauf, daß dieses Fragment durch die Spaltung der Caspase 3, an der Konsensus-Spaltstelle Aspartat¹⁹, erfolgen könnte. Inhibitoren der Caspase 3 müßten also die D4-GDI Spaltung blockieren. Deshalb wurden BL60-2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen z-DEVD-fmk, einem spezifischen, irreversiblen, zellpermeablen Inhibitor für Proteasen der Caspase 3 Familie, bzw. ac-YVAD-cmk, einem spezifischen, irreversiblen Inhibitor für Proteasen der Caspase 1 Familie vor Stimulation mit anti-

IgM inkubiert. 24 Stunden nach anti-IgM Inkubation wurden die Zellen lysiert und die D4-GDI Spaltung im Western Blot analysiert (Abb. 12).

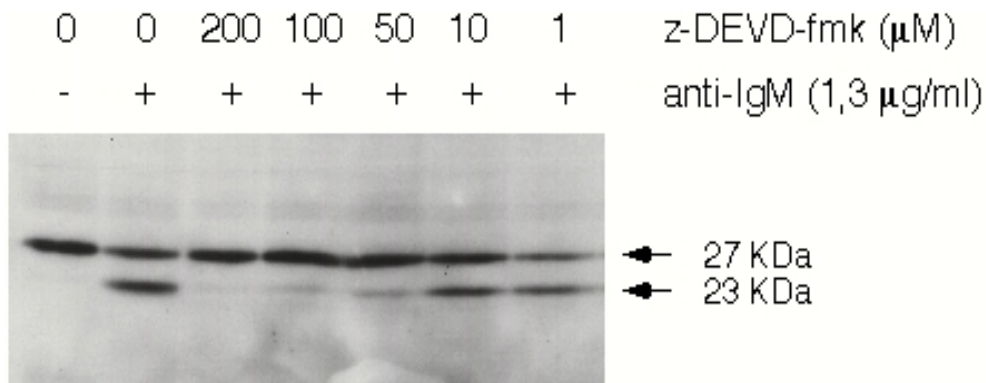


Abb.12 Dosisabhängige Hemmung der D4-GDI Spaltung durch z-DEVD-fmk BL60-2 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen z-DEVD-fmk kultiviert (0-200 μM) und mit oder ohne anti-IgM (1,3 $\mu\text{g/ml}$) für 24 Stunden inkubiert. Gesamtzelllysate wurden auf einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Die Spaltung des D4-GDI Proteins wurde im Western Blot mit einem D4-GDI spezifischen polyklonalen-Antiserum analysiert. Die D4-GDI Spaltung wurde durch steigende Konzentrationen z-DEVD-fmk gehemmt. Die Pfeile weisen auf das 27 KDa D4-GDI, sowie das 23 KDa große Spaltprodukt. Die Detektion erfolgte mit dem ECL System nach Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper.

Die Abb.12 zeigt die konzentrationsabhängige Hemmung der D4-GDI Spaltung durch die Zugabe von z-DEVD-fmk (0-200 μM) vor der anti-IgM Stimulation. Bei einer Konzentration von 200 μM dieses Inhibitors, der für Proteasen der Caspase 3 Familie spezifisch ist, ist die Spaltung nahezu komplett gehemmt, während ac-YVAD-cmk, ein Inhibitor für Proteasen der Caspase 1 Familie die Spaltung nicht blockiert. Diese Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß das D4-GDI Protein während der anti-IgM induzierten Apoptose durch eine Protease der Caspase 3 Familie in das 23 KDa große Fragment gespalten wird.

4.4 Heterogene nukleäre Ribonucleoproteine während der anti-IgM induzierten Apoptose

Heterogene nukleäre Ribonucleoproteine (hnRNP-Proteine) sind Bestandteil der Splicisomenkomplexe und an der Prozessierung von RNA Molekülen beteiligt. Sie spielen aber auch eine wichtige Rolle bei der Transkription und Translation.

Im Vergleich der Proteinmuster von BL60-2 Zellen vor und nach anti-IgM Stimulation wurden differentielle Proteinspots isoliert, die nach Edman Abbau als hnRNP Proteine identifiziert werden konnten (s. Tab. 1). Dabei handelt es sich um das hnRNP C1/C2, hnRNP K und hnRNP A1 Protein.

Das hnRNPK Protein wurde 24 Stunden nach anti-IgM induzierter Apoptose im silbergefärbten Gel nicht mehr detektiert, was auf eine transkriptionelle Regulation, eine Stabilitätsänderung der RNA

oder des Proteins, eine Degradierung oder Spaltung durch eine Caspase hinweist. In der Northern Blot Analyse konnte aber keine Abnahme der Transkriptmenge nach anti-IgM induzierter Apoptose detektiert werden, was auf eine Regulation auf Proteinebene hindeutete. Die Abnahme des hnRNP K spezifischen Signals nach anti-IgM induzierter Apoptose konnte in der eindimensionalen Western Blot-Analyse mit dem monoklonalen Antikörper bestätigt werden. Es konnte allerdings kein Spaltprodukt detektiert werden.

Im subtraktiven Vergleich der Proteinmuster wurden ebenfalls 6 Spots detektiert, die als hnRNP C1/C2 Proteine identifiziert wurden. Nach anti-IgM Induktion wurden im silbergefärbten Gel nur noch 4 Spots mit geringerer Masse detektiert. In einer eindimensionalen Western Blot Analyse mit dem monoklonalen Antikörper 4F4, sollte dieses Ergebnis verifiziert werden. Es wurden drei Spaltprodukte des hnRNP C1/C2 Proteins nach 24 Stunden anti-IgM induzierter Apoptose detektiert. Die 2D-Western Blot Analyse, mit dem spezifischen Antiserum, zeigte ebenfalls eine Änderung in der Lage dieser Proteine und damit des isoelektrischen Punktes. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß die hnRNP C1/C2 Proteine nach Apoptose Induktion gespalten und modifiziert werden. Die Spaltstellen sollen in weiteren Experimenten identifiziert werden.

Für das hnRNP A1 konnte ebenfalls eine Spaltung in drei spezifische Fragmente im Verlauf der anti-IgM induzierten Apoptose detektiert werden (4.4.1).

4.4.1 Spaltung von hnRNP A1 während der anti-IgM induzierten Apoptose

Im differentiellen Vergleich der Proteinmuster von BL60-2 Zellen vor und nach Stimulation mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten wurde ein 16 KDa großes Spaltprodukt des hnRNPA1 Proteins identifiziert (s. Tab.1). Dieses Spaltprodukt erschien nach Apoptose Stimulation mit zunehmender Intensität im 2D-Gel und konnte nach Isolation und tryptischen Verdau als Fragment des hnRNP A1 Proteins identifiziert werden. In einer eindimensionalen Western Blot Analyse mit einem monoklonalen Antikörper wurde der zeitliche Verlauf der Spaltung während der anti-IgM Stimulation bestimmt (Abb. 13).

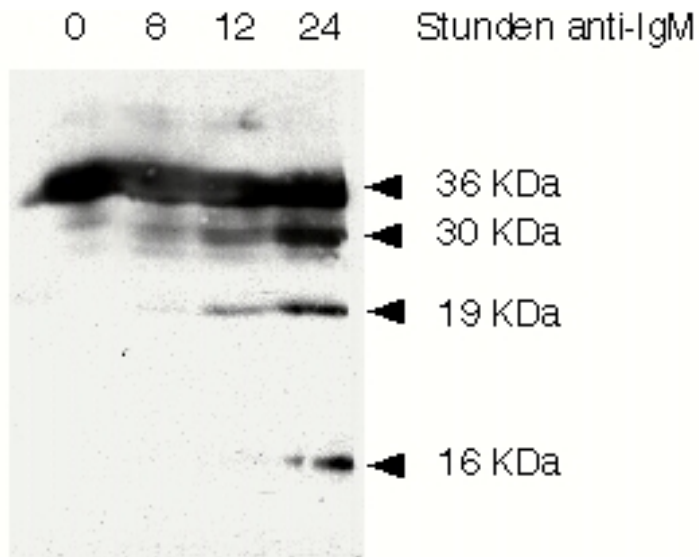


Abb. 13 Zeitverlauf der hnRNP A1-Spaltung während der anti-IgM induzierten Apoptose BL60-2 Zellen wurden für verschiedene Zeitintervalle mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten inkubiert. Gesamtzelllysate wurden auf einem 10 %-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Die Spaltung wurde nach Western Blot Analyse mit einem hnRNP A1 spezifischen, monoklonalen-Antikörper 4B10 detektiert. Die Pfeile deuten auf das 36 KDa hnRNP A1 Protein, bzw. die nach 8, 12 und 24 Stunden Apoptose-Induktion auftretenden Spaltprodukte mit einer Größe von 30 KDa, 19 KDa und 16 KDa. Die Detektion erfolgte mit dem ECL System nach Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper.

Das hnRNP A1 Protein wird während der anti-IgM induzierten Apoptose in 3 spezifische Fragmente gespalten. Ein ca. 30 KDa großes Fragment des hnRNP A1 Proteins erschien bereits 8 Stunden nach anti-IgM Stimulation, ein zweites, 19 KDa großes Fragment nach 12 Stunden und ein 16 KDa große Spaltprodukt, konnte nach 24 Stunden anti-IgM Stimulation detektiert werden.

4.4.2 Hemmung der hnRNP A1 Spaltung durch z-DEVD-fmk

Um zu prüfen, ob die spezifische Spaltung des hnRNP A1 Proteins während der anti-IgM induzierten Apoptose ebenfalls durch Proteasen der Caspase 3 Familie erfolgt, wurden BL60-2 Zellen vor der anti-IgM Stimulation mit 200 μ M z-DEVD-fmk, dem Inhibitor, der spezifisch für Proteasen der Caspase 3 Familie ist, inkubiert. Die Spaltung des hnRNP A1 Proteins wurde in einem Western Blot, mit einem spezifischen, monoklonalen Antiserum analysiert (Abb. 14). Alle 3 Spaltprodukte (30 KDa, 19 KDa, 16 KDa) des hnRNP A1 Proteins konnten nach Inkubation mit z-DEVD-fmk und anschließender anti-IgM Stimulation im Western Blot nicht mehr detektiert werden (Abb. 14 A und B). Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß das hnRNP A1 Protein während der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose ebenfalls durch eine Protease der Caspase 3 Familie gespalten wird.

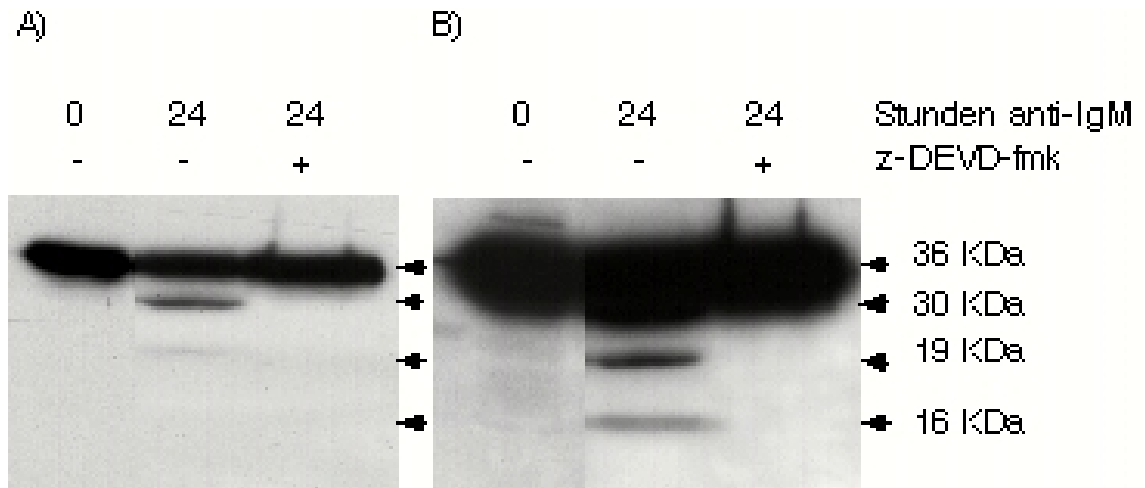


Abb. 14 Hemmung der hnRNP A1 Spaltung durch z-DEVD-fmk
 BL60-2 Zellen wurden mit z-DEVD-fmk vorinkubiert (200 μ M) und mit oder ohne anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten für 24 Stunden kultiviert. Gesamtzelllysate dieser Zellen wurden auf einem 15 %-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und in einem Western Blot mit einem monoklonalen hnRNP A1-Antikörper analysiert. Die hnRNPA1 Spaltung wurde durch z-DEVD-fmk blockiert, was durch kurze (A) und längere Exposition (B) des Autoradiographie Films analysiert wurde.

4.4.3 In vitro Spaltung von hnRNP A1 durch Caspase 3

Die spezifische Spaltung des hnRNP A1 Proteins während der anti-IgM induzierten Apoptose sowie die Hemmung der Spaltung durch z-DEVD-fmk, deutet darauf hin, daß diese Spaltung durch eine Protease der Caspase 3 Familie erfolgt. Der Vergleich der Aminosäuresequenz des hnRNP A1 Proteins mit den bekannten Konsensuspaltstellen gab hingegen keinen Hinweis auf eine potentielle Caspase Spaltstelle. Da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit nur die rekombinante Caspase 1 und Caspase 3 zur Verfügung stand, wurde überprüft, ob hnRNP A1 *in vitro* durch Caspase 1 oder Caspase 3 gespalten wird.

Für die *in vitro* Spaltung des hnRNP A1 Proteins wurde das Protein zunächst rekombinant exprimiert. Dazu wurde die cDNA zunächst mit spezifischen Oligonukleotiden in einer PCR-Reaktion amplifiziert und in den pQE16 Expressionsvektor kloniert. Das Plasmid wurde in den Bakterienstamm M15 transformiert und nach IPTG-Stimulation als DHFR-Fusionsprotein exprimiert. Da die pQE Vektoren für sechs Histidin-Sequenzen kodieren, die in Fusion mit dem Protein der klonierten Sequenz exprimiert werden, konnte das hnRNP A1 Protein über Nickelsäulenchromatographie unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) aufgereinigt werden. Zur Entfernung des Harnstoffs wurde das rekombinante Protein über eine *Reversed-Phase*-HPLC aufgereinigt.

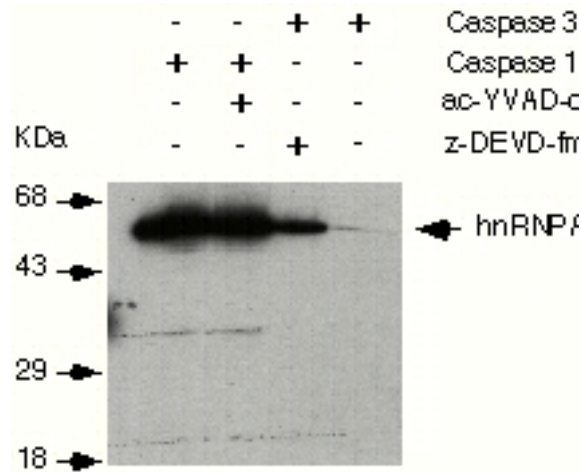


Abb. 15 In vitro Spaltung von hnRNP A1

Rekombinantes hnRNP A1-DHFR Fusionsprotein wurde mit rekombinanter, gereinigter Caspase 1 oder Caspase 3 (60 ng) für 1 Stunde mit oder ohne z-DEVD-fmk oder ac-YVAD-cmk inkubiert. Die Proben wurden auf einem 15 %-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und in einem Western Blot mit einem hnRNP A1 spezifischen, monoklonalen Antikörper 4B10 analysiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL System nach Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper.

Das rekombinante hnRNP A1-DHFR Fusionsprotein Protein (1 µg) wurde für 1 Stunde bei 37⁰C mit oder ohne Caspase 1 oder Caspase 3 inkubiert. Als Spezifitätskontrolle wurde jeder Ansatz auch mit dem entsprechenden Inhibitor (z-DEVD-fmk und ac-YVAD-cmk) versetzt. Die Proben wurden auf einem 10-%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und in einem Western Blot mit dem hnRNP A1 spezifischen Antiserum 4B10 analysiert. Das Fusionsprotein (60 KDa) konnte nach Inkubation mit Caspase 3 nicht mehr detektiert werden. Allerdings konnten die drei, nach anti-IgM Stimulation detektierten Spaltprodukte (30 KDa, 19 KDa, 16 KDa) ebenfalls nicht detektiert werden. Der Abbau des hnRNP A1 Proteins durch Caspase 3 wurde durch Zugabe von z-DEVD-fmk nahezu vollständig gehemmt (Abb. 15). Rekombinante Caspase 1 hingegen konnte das rekombinante hnRNP A1 Protein nicht abbauen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß das hnRNP A1 Protein durch Caspase 3 gespalten wird. Die Spaltprodukte sind in diesem *in vitro* Ansatz nicht stabil, was eventuell auf Verunreinigungen mit bakteriellen Proteasen zurückzuführen ist.

4.5 Hemmung der morphologischen und biochemischen Veränderungen während der anti-IgM induzierten Apoptose durch z-DEVD-fmk

Im folgenden Experiment sollte der Einfluß des Caspase 3 Inhibitors z-DEVD-fmk auf die anti-IgM induzierte B-Zell Apoptose, gemessen an den typischen morphologischen Veränderungen, untersucht werden. BL60-2 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Caspase 3 Inhibitors z-DEVD-fmk (0-200 µM) vorinkubiert und

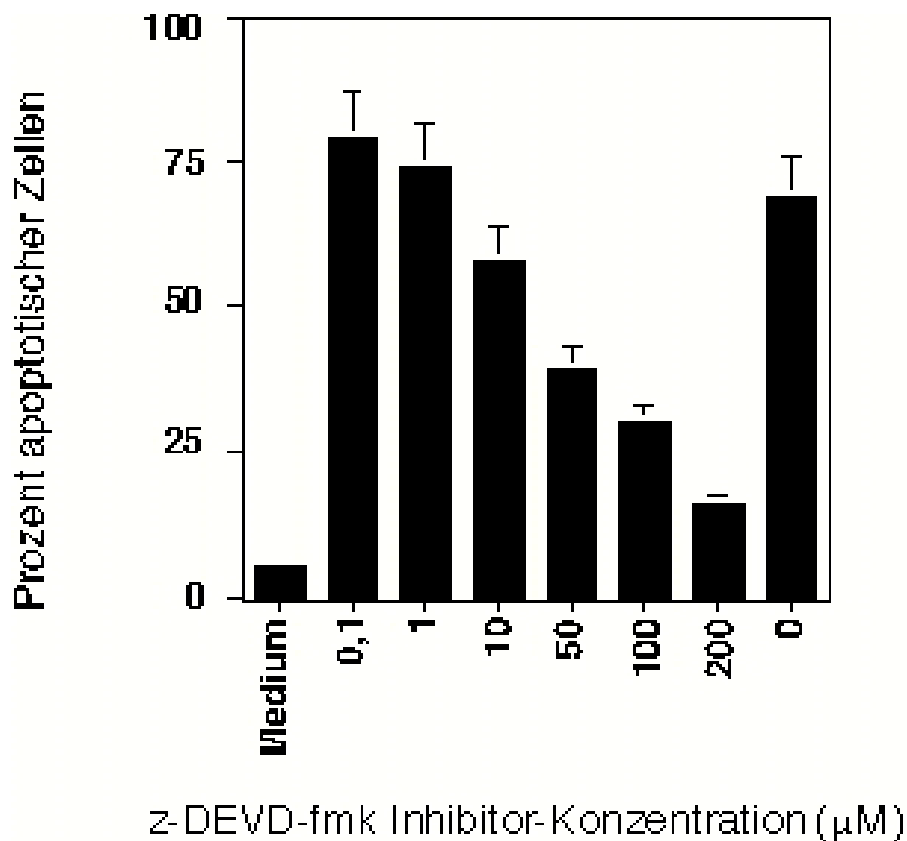


Abb. 16 Hemmung der anti-IgM induzierten Apoptose durch z-DEVD-fmk BL60-2 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen z-DEVD-fmk vorinkubiert, und 24 Stunden mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten kultiviert (1,3 µg/ml). Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen, mit charakteristischen fragmentierten Kernen, wurde durch Acridinorange-Färbung bestimmt.

24 Stunden mit anti-IgM stimuliert. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde anhand der fragmentierten Kerne durch Acridinorange Färbung bestimmt (Abb.16).

Der Anteil apoptotischer Zellen nahm mit zunehmender Konzentration des Inhibitors z-DEVD-fmk ab. Bei einer Konzentration von 200 µM z-DEVD-fmk ist die anti-IgM induzierte Apoptose fast vollständig gehemmt. Der Caspase 3 Inhibitor hemmt somit nicht nur die spezifische Spaltung des D4-GDI und hnRNPA1 Proteins, sondern auch die morphologischen Veränderungen während der anti-IgM induzierten Apoptose. Ac-YVAD-cmk hingegen konnte diese Veränderungen nicht hemmen. Die Blockade der morphologischen Veränderungen war auch nach 48 h z-DEVD-fmk und anti-IgM Inkubation noch zu beobachten.

In einem weiteren Experiment sollte überprüft werden, ob die Phosphatidylserintranslokation, eines der ersten charakteristischen Merkmale für apoptotische Zellen, ebenfalls durch z-DEVD-fmk gehemmt werden kann. Dazu wurden BL60-2 Zellen mit z-DEVD-fmk vorinkubiert, und dann über

verschiedene Zeitintervalle mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten stimuliert. Die Zellen, sowie unstimulierte und anti-IgM stimulierte Kontrollzellen, wurden mit Annexin-V/FITC inkubiert. Der prozentuale Anteil Phosphatidylserin (PS) positiver Zellen wurde in einer FACS-Analyse bestimmt (Abb. 17).

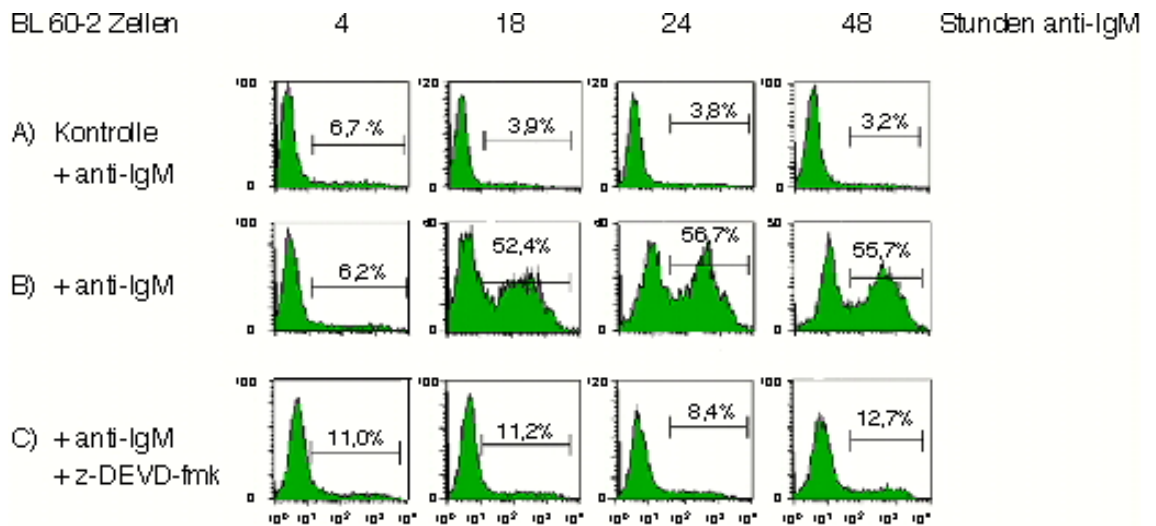


Abb. 17 Hemmung der Phosphatidylserintranslokation BL60-2 Zellen wurden über verschiedene Zeiträume (4 - 48 h) mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten inkubiert und mit Annexin-V/FITC markiert. Der Anteil Annexin-V/FITC positiver Zellen, der dem prozentualen Anteil apoptotischer Zellen entspricht, steigt während der anti-IgM induzierten Apoptose auf über 50 % (B). Wurden die Zellen mit z-DEVD-fmk vorinkubiert (200 µM) nahm der Anteil apoptotischer Zellen während der anti-IgM Inkubation nicht zu (C). Zur Kontrolle wurden BL60-2 Zellen ohne anti-IgM und z-DEVD-fmk inkubiert. Der Anteil spontan apoptotischer Zellen lag zwischen 3 und 7 Prozent (A).

Die FACS-Analyse zeigte, daß BL60-2 Zellen, die vor der anti-IgM Stimulation mit z-DEVD-fmk inkubiert wurden, nahezu keine Phosphatidyltranslokation auf die äußere Plasmamembran zeigen. Sogar 48 Stunden nach anti-IgM Stimulation ist die Translokation nahezu komplett geblockt (12,7 %), die Zellen bleiben Annexin-V/FITC negativ. Dieses Experiment läßt darauf schließen, daß die Phosphatidyltranslokation ebenfalls auf die Aktivität von Proteasen der Caspase 3 Familie zurückzuführen ist.

Die Hemmung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose, wie auch die Spaltung der Proteine D4-GDI und hnRNPA1 durch z-DEVD-fmk, bewies eine zentrale Rolle der Proteasen der Caspase 3 Familie in der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose. Mittels der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese sollte nun überprüft werden, ob bisher identifizierten Veränderungen im Proteinmuster (s. Tab.1) ebenfalls durch Zugabe des Caspase 3 Inhibitors z-DEVD-fmk blockiert werden können. Dazu wurde z-DEVD-fmk in einer Enkonzentration von 200 µM zu der BL60-2

Zellkultur gegeben bevor die Zellen für 24 Stunden mit anti-IgM stimuliert wurden. Gesamtzelllysate dieser Zellen wurden dann in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit den Proteinmustern von Zellen, die ebenfalls 24 Stunden mit anti-IgM stimuliert wurden, bzw. Proteinmustern von Zellen, die nicht stimuliert wurden, verglichen. Die zuvor beobachteten Veränderungen nach Apoptose Stimulation, wie die Spaltung der Proteine Aktin, hnRNP C1/C2, hnRNP A1, P0, Lamin B1 und Nucleolin, wurden durch Vorinkubation der Zellen mit z-DEVD-fmk gehemmt. Dieses Experiment ließ darauf schließen, daß die meisten Apoptose bedingten Proteinveränderungen, die im 2D-Gelmuster detektierbar sind, durch Proteasen der Caspase 3 Familie bedingt sind.

4.6 Untersuchungen des Transkriptionsfaktors SP1 während der anti-IgM induzierten Apoptose der Burkitt Lymphom Zelllinie BL60-2

4.6.1 Die Regulation der c-myc Transkription während der anti-IgM induzierten Apoptose

Der Transkriptionsfaktor c-myc spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation von Zellen, verschiedene Studien zeigen seine Bedeutung für die Apoptose. Allerdings sind die bisher veröffentlichten Ergebnisse hinsichtlich der transkriptionellen Regulation von c-myc widersprüchlich. McCormack et al. konnten zeigen, daß die c-myc Expression in der murinen B-Zelllinie WEHI 231 in den ersten 8 Stunden nach anti-IgM Stimulation zunächst stark zunimmt, nach 8 Stunden dann abnimmt und nach 24 Stunden nicht mehr zu detektieren ist. Die Regulation der c-myc Transkription, sowie die durch den Transkriptionsfaktor c-myc regulierten Gene, sind bisher weitgehend unbekannt.

Die Regulation der c-myc Transkription sollte nun in der humanen BL60-2 Zelllinie während der anti-IgM induzierten Apoptose in einer Northern Blot Analyse untersucht werden. Dazu wurde die RNA von BL60-2 Zellen ohne anti-IgM Induktion, bzw. nach 2 und 4 Stunden anti-IgM Stimulation über einen Cäsium-Clorid Gradienten präpariert. Die Gesamt RNA wurde auf einem Formamid-Agarose Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Der Blot wurde mit einer ³²P-markierten, c-myc spezifischen Sonde hybridisiert und die c-myc mRNA durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 18).

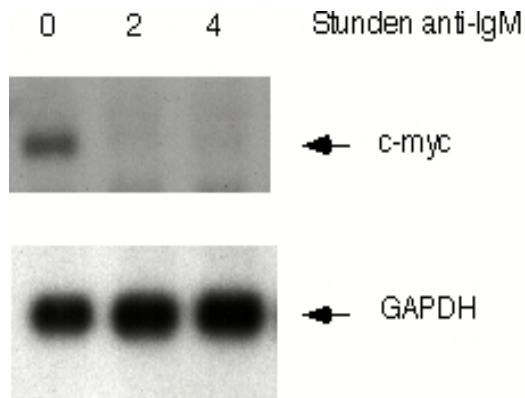


Abb. 18 Northern Blot Analyse der c-myc Expression während der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose
 BL60-2 Zellen wurden ohne, bzw. für 2 oder 4 Stunden mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten inkubiert. RNA dieser Zellen (10 µg Spur) wurde auf einem 1,2 %-igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit einer spezifischen, ³²P-markierten c-myc Sonde, bzw. GAPDH Sonde hybridisiert. Die c-myc spezifische mRNA konnte bereits 2 Stunden nach anti-IgM Stimulation nicht mehr detektiert werden. Die GAPDH mRNA blieb dagegen nach anti-IgM Stimulation konstant exprimiert.

Die c-myc mRNA konnte bereits 2 Stunden nach anti-IgM Stimulation im Northern Blot nicht mehr nachgewiesen werden, wobei die Kontrollhybridisierung mit der einer ³²P-markierten GAPDH Sonde eine gleichbleibende Expression zu den verschiedenen Zeitpunkten zeigte. Dieses Experiment zeigte, daß die c-myc Transkriptmenge nach anti-IgM Stimulation der humanen BL60-2 Zellen stark abnimmt.

4.6.2 SP1 Spaltung während der anti-IgM induzierten Apoptose

Um die Regulation der c-myc Transkription während der anti-IgM induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden verschiedene Proteine, die im c-myc Promotor binden, in einer Western Blot Analyse untersucht.

Aus den vorangegangenen Experimenten, dem subtraktiven Vergleich der 2D-Gelmuster vor und nach anti-IgM induzierter B-Zell Apoptose war bekannt, daß hnRNP K nach anti-IgM induzierter Apoptose auf Proteinebene nicht mehr zu detektieren ist. hnRNP K bindet u.a. im c-myc Promotor und ist somit evtl. für die c-myc Regulation verantwortlich. Andere Transkriptionsfaktoren die im c-myc Promotor binden können, wurden in einer Western Blot Analyse untersucht, und sowohl für E2F als auch für RB konnte keine veränderte Expression oder Spaltung während der anti-IgM induzierten Apoptose beobachtet werden. Mit einem spezifischen polyklonalem Antikörper für den Transkriptionsfaktor SP1 konnte jedoch gezeigt werden, daß der Transkriptionsfaktor SP1 während der anti-IgM induzierten Apoptose-spezifisch gespalten wird (Abb.19)

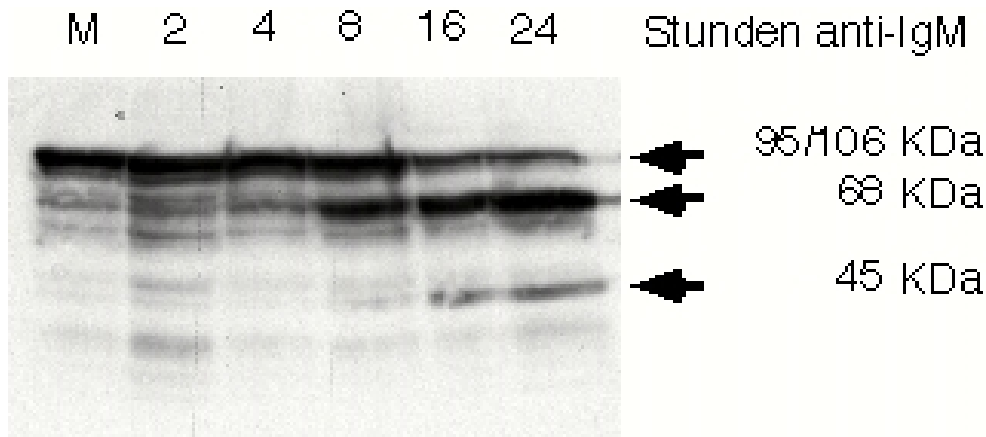


Abb. 19 Zeitverlauf der SP1-Spaltung während der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose BL60-2 Zellen wurden für verschiedene Zeitintervalle mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten inkubiert. Gesamtzellextrakte wurden auf einem 10 %-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. In einer Western Blot Analyse mit einem SP1-spezifischem polyklonalen Antikörper konnte die Spaltung während der anti-IgM induzierten Apoptose detektiert werden. Die Pfeile deuten auf das 95/105 kDa SP1 Protein, sowie die 68 KDa und 45 KDa großen Spaltprodukte hin. Die Detektion erfolgte mit dem ECL System nach Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper.

Das SP1 Protein hat eine Größe von 95 KDa (nicht glykosylierter Zustand), bzw. 105 KDa (glykosylierter Zustand). Die Intensität dieses, dem vollständigen SP1 Protein entsprechenden Signals nahm nach anti-IgM induzierter Apoptose stark ab und konnte nach 24 Stunden Stimulation nur noch schwach im Western Blot detektiert werden.

Der Transkriptionsfaktor SP1 wird 8 Stunden nach anti-IgM Stimulation in ein 68 KDa Fragment gespalten. 16 Stunden nach Stimulation konnte ein zweites, 45 KDa großes Spaltprodukt detektiert werden (Abb.19).

4.6.3 Hemmung der SP1 Spaltung durch z-DEVD-fmk

Da in vorherigen Experimenten schon gezeigt wurde, daß sowohl die Apoptose-spezifischen, morphologischen Veränderungen, wie auch die Spaltung der Proteine hnRNP A1 und D4-GDI während der anti-IgM induzierten Apoptose durch z-DEVD-fmk gehemmt werden können, lag die Vermutung nahe, daß auch die Spaltung des Transkriptionsfaktors SP1 durch den Caspase 3 Inhibitor z-DEVD-fmk blockiert werden kann. Abb. 20 zeigt die konzentrationsabhängige Hemmung der SP1 Spaltung durch z-DEVD-fmk in einer Western Blot Analyse mit einem SP1 spezifischen Antikörper.

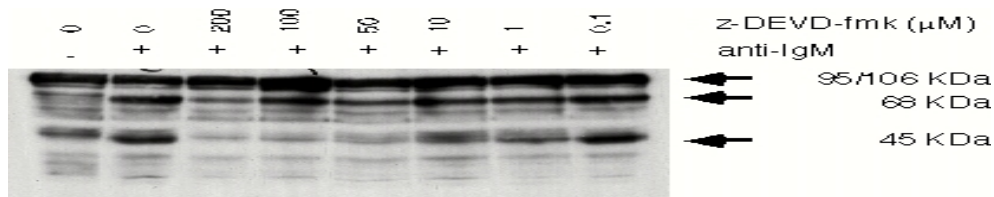


Abb. 20 Dosisabhängige Hemmung der SP1-Spaltung
 BL60-2 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen z-DEVD-fmk vorinkubiert (0-200 μM) und mit oder ohne anti-IgM F(ab)_2 -Fragmenten für 24 Stunden inkubiert. Die Hemmung der SP1 Spaltung wurde in einer Western Blot Analyse mit einem SP1 spezifischen polyklonalem-Antiserum detektiert. Die Pfeile weisen auf das 95/106 kDa Protein, sowie das 68 kDa und 45 kDa große Spaltprodukt. Die Detektion erfolgte mit dem ECL System nach Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper.

BL 60-2 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen z-DEVD-fmk (0-200 μM) vorinkubiert, bevor sie für 24 Stunden mit anti-IgM F(ab)_2 -Fragmenten stimuliert wurden. Die Hemmung der Spaltung ist dosisabhängig, und bei einer Konzentration von 200 μM ist die Spaltung fast vollständig gehemmt.

4.6.4 *In vitro* Spaltung von SP1 durch Proteasen der Caspase 3 Familie

Vorangegangene Experimente, wie die Hemmung der SP1 Spaltung durch z-DEVD-fmk, einem Inhibitor, spezifisch für Proteasen der Caspase 3 Familie, ließen darauf schließen, daß der Transkriptionsfaktor SP1 während der anti-IgM induzierten Apoptose durch eine Caspase gespalten wird. Die Aminosäuresequenz des Transkriptionsfaktors SP1 wurde mit der Konsensussequenz für die Caspase 3 und Caspase 7 Spaltstelle DXXD, wie der Caspase 6 Spaltstelle (IVL)XXD verglichen. Es gibt keine Homologie mit einer potentiellen Spaltstelle für Caspase 3, 6 oder 7 in der Aminosäuresequenz des SP1 Proteins. Es war also anzunehmen, das SP1 entweder durch eine andere, bisher nicht identifizierte Caspase gespalten wird, die ebenfalls durch z-DEVD-fmk hemmbar ist, oder das die bekannten Caspasen bisher nicht beschriebene Aminosäuremotive als Spaltstellen erkennen. Möglicherweise hemmt der Inhibitor aber auch eine Caspase, die in der Aktivierungskaskade erst durch eine Protease der Caspase 3 Familie gespalten und aktiviert wird.

In einem *in vitro* Assay sollte geprüft werden, durch welche Caspase SP1 gespalten wird. Rekombinantes SP1 (Promega) wurde mit rekombinanter Caspase 1, 3, 6 oder 7, mit oder ohne z-DEVD-fmk inkubiert. Die Ansätze wurden auf einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt, und die Spaltung des SP1 Proteins wurde im Western Blot analysiert (Abb. 21).

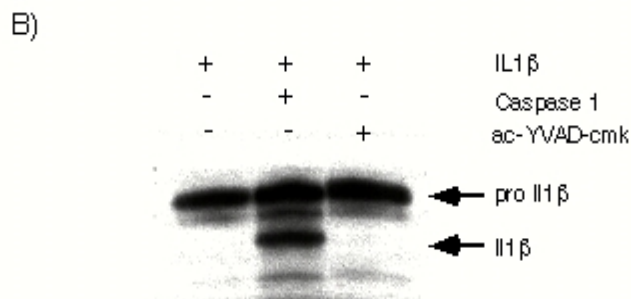
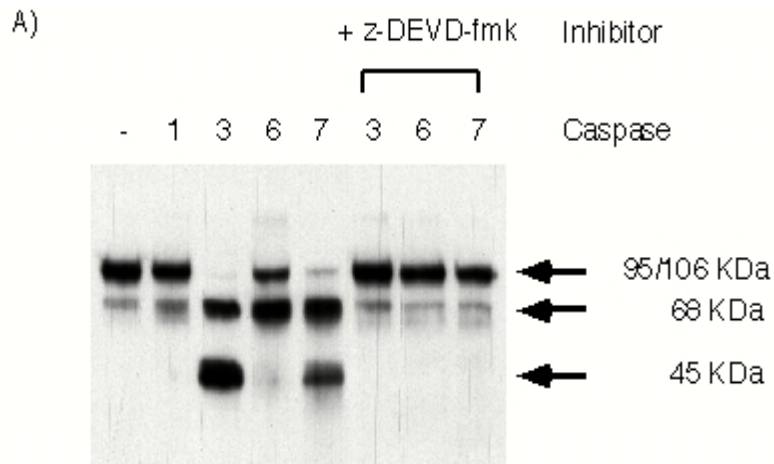


Abb. 21 *In vitro* Spaltung von SP1

A) Rekombinantes SP1 Protein (2 fpu, Promega) wurde mit rekombinanter, gereinigter Caspase 1, 3, 6 oder 7 (60 ng) für 2 Stunden, mit oder ohne z-DEVD-fmk (Caspase 3 Inhibitor) inkubiert. Die Proben wurden auf einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und in einem Western Blot mit einem SP1-spezifischen polyklonalen-Antikörper analysiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System nach Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper.

B) *In vitro* Spaltung von ³⁵S-markiertem proIL1 β in IL1 β durch rekombinante Caspase 1. ProIL1 β wurde *in vitro* translatiert und mit 60 ng rekombinanter Caspase 1 mit oder ohne ac-YVAD-cmk für 90 Min inkubiert. Die Proben wurden auf einem 10 %-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und nach Autoradiographie detektiert.

Die Western Blot Analyse zeigte, daß SP1 *in vitro* durch Caspase 3, 6 und 7 gespalten wird. Die Spaltung durch Caspase 6 und Caspase 7 führte zu Spaltprodukten gleicher Größe wie nach anti-IgM induzierter Apoptose der BL60-2 Zellen. Das 95/106 KDa SP1 Protein wurde in ein 68 und 45 KDa großes Fragment gespalten. Die Spaltung durch Caspase 6 führte hingegen nur zu einem 68 KDa großen Spaltprodukt. Z-DEVD-fmk hemmte die durch Caspase 3, 6 und 7 bedingte, spezifische Spaltung des SP1 Proteins vollständig. Rekombinante Caspase 1 konnte den Transkriptionsfaktor SP1 nicht spalten (Abb. 21 A). Zur Aktivitätskontrolle der rekombinanten

Caspase 1 wurde, S³⁵-markiertes proIL1 β im TNT System (Promega) *in vitro* translatiert und mit rekombinanter Caspase 1 inkubiert. ProIL1 β ist ein physiologisches Substrat für Caspase 1. Abb. 21 B zeigt die spezifische Spaltung in das physiologisch aktive IL1 β durch die rekombinante Caspase 1. Diese Spaltung konnte durch ac-YVAD-fmk, einem spezifischen Inhibitor für Proteasen der Caspase 1 Familie gehemmt werden.

4.6.5 Untersuchung der SP1/DNA-Bindungsaktivität während der Apoptose

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß der Transkriptionsfaktor SP1 nach anti-IgM induzierter Apoptose in ein 68 und 45 KDa großes Fragment gespalten wird. Dabei bleibt unklar, welche Domäne des Proteins abgespalten wird, und welche funktionellen Veränderungen die Spaltung des Proteins zur Folge hat. SP1 bindet über 3 Zink Finger Motive, die in den letzten 168 Aminosäuren C-terminal lokalisiert sind, an GC-Boxen verschiedener Promotoren. Die Transaktivierungsdomäne ist hingegen in den letzten 327 C-terminalen Aminosäuren lokalisiert. In einem *elektro mobility shift* assay (EMSA) wurde das DNA-Bindungsverhalten des Transkriptionsfaktors während der anti-IgM induzierten Apoptose untersucht (Abb. 22).

BL60-2 Zellen wurden für 0, 10, und 24 Stunden mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten kultiviert. Die Kernextrakte wurden mit einer ³²P-markierten SP1/DNA-Bindungssequenz inkubiert (Spur 1-9). Die spezifischen SP1 Protein/DNA Komplexe wurden auf einem 5 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Zur Qualitätskontrolle der Kernextrakte wurde ein ³²P-markiertes Oligonukleotid, das spezifisch ist für Oct-2, einen konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktor, eingesetzt (Abb. 22, Spur 13-15). Die Untersuchung der SP1 Bindungsaktivität zeigte drei spezifische SP1/DNA Komplexe (Klammer in Abb. 22). Die Intensität dieser SP1/DNA-Komplexe nahm während der anti-IgM Stimulation ab (Spur 1-3). Dieses Ergebnis wurde in einem *Supershift* mit einem spezifischen SP1 bindenden Antikörper bestätigt (SP1*, Spur 4-5). Die Spezifität des *Supershifts* wurde durch Competition mit einem Peptid, das ebenfalls von dem Antikörper erkannt wird bewiesen (SP1 *, Spur 7-9). Ein Signal, das auf einen kleineren DNA-Protein-Komplex hinwies, konnte 10 Stunden nach anti-IgM Inkubation detektiert werden und die Intensität dieses Komplexes nahm nach 24 Stunden stark zu (Spur 1-3). Dieser kleinere DNA-Protein-Komplex ließ auf die Bindung eines SP1 Spaltproduktes an die SP1 Bindesequenz schließen. Die Spezifität der SP1 Komplexe wurde mit einem mutierten Oligonukleotid überprüft, an das das SP1 Protein nicht binden kann (Spur 10-12).

Der EMSA zeigte, daß ein SP1 Spaltprodukt immer noch an die DNA bindet. Möglicherweise ist dieses Spaltprodukt funktionell inaktiv und wirkt dominant negativ.

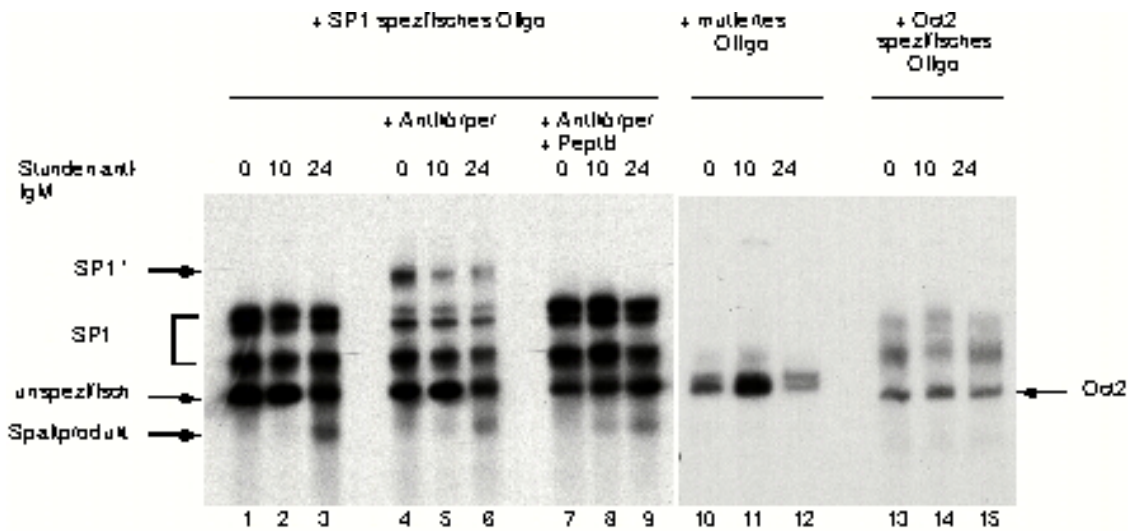


Abb. 22 SP1 Bindungs-Aktivität nach anti-IgM induzierter B-Zell Apoptose BL60-2 Zellen wurden über verschiedene Zeiträume mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten inkubiert. Die Kernextrakte dieser Zellen wurden mit ³²P-markierten SP1-spezifischen Oligonukleotiden (Spur 1-9), mutierten ³²P-markierten SP1 Oligonukleotiden (Spur 10-12) oder Oct-2 spezifischen Oligonukleotiden inkubiert (Spur 13-15). Drei spezifische SP1 Komplexe konnten detektiert werden, die in Intensität während der anti-IgM Inkubation abnahmen (Spur 1-3). Diese Intensitätsabnahme konnte im *Supershift* mit einem SP1-spezifischen Antikörper bestätigt werden (Spur 4-6). Die Spezifität des *Supershifts* wurde durch Peptid-Kompetitor überprüft (Spur 7-9). Ein kleinerer Komplex (SP1-Spaltprodukt) erschien nach 10 Stunden anti-IgM Inkubation und nahm an Intensität nach 24 Stunden stark zu. Die Bindung des konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktors Oct-2 an die spezifische Oligonukleotidsequenz wies auf gleiche Qualitäten der Kernextrakte zu verschiedenen Zeitpunkten der anti-IgM Stimulation hin (Spur 13-15).

4.6.6 Messung der Aktivität von Proteasen der Caspase 3 Familie während der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose

In einem kolorimetrischen Versuch konnte die Caspase 3 Aktivität während der anti-IgM induzierten Apoptose gemessen werden. BL60-2 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach anti-IgM Stimulation lysiert und mit dem Substrat DEVD-pNA (p-Nitroanilid) inkubiert. Die aktive Caspase 3 spaltet das Chromophor pNA vom Tetrapeptid DEVD, der Caspase 3 Erkennungssequenz ab. Die Freisetzung des Chromophors pNA kann dann im Photometer bei einer Wellenlänge von 400 nm gemessen werden und ist proportional zur Caspase 3 Aktivität. Abb. 23 zeigt den Anstieg der Caspase 3 Aktivität während der anti-IgM induzierten Apoptose.

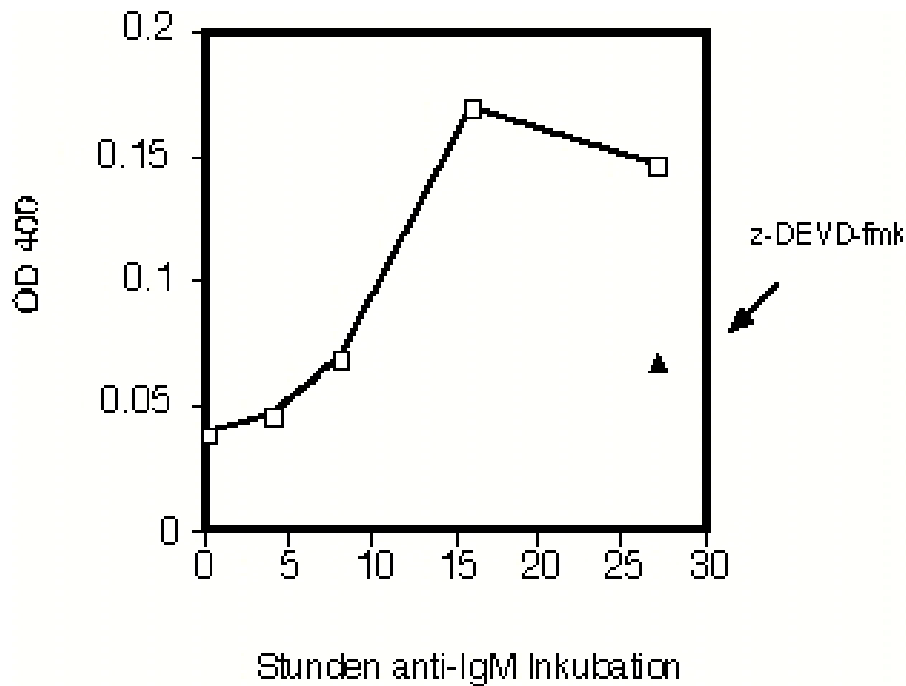


Abb. 23 Anstieg der Caspase 3-Aktivität nach anti-IgM induzierter Apoptose. Die Caspase 3 Aktivität wurde durch die Spaltung des Substrates DEVD-pNA bestimmt. 10^6 BL60-2 Zellen wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten anti-IgM-Stimulation lysiert und mit DEVD-pNA inkubiert. Die Freisetzung des Chromophors pNA wurde bei einer optischen Dichte von 400 nm gemessen. Lysate, die zuvor mit z-DEVD-fmk inkubiert wurden, zeigten eine starke Reduktion der Caspase 3-Aktivität (Pfeil).

Die Caspase 3 Aktivität nahm während der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose zunächst langsam zu, stieg nach 8 Stunden stark an und erreichte die maximale Aktivität nach 16 Stunden Induktion. Nach 27 Stunden anti-IgM Inkubation nahm die Caspase-Aktivität wieder leicht ab. Die pNA-Freisetzung konnte durch Vorinkubation mit z-DEVD-fmk ($5 \mu\text{M}$), dem spezifischen Inhibitor für Proteasen der Caspase 3 Familie, stark vermindert werden (Pfeil in Abb. 23). Die Caspase 3 Aktivitätskinetik korreliert mit den bisherigen Ergebnissen, der Spaltung der Proteine D4-GDI, hnRNP A1, SP1, wie der Phosphatidylserintranslokation.

5 Ergebnisse-Teil 2

5.1 Identifikation Apoptose-assoziiierter Gene

Aus vorangegangenen Experimenten wie aus der Literatur war bekannt, daß die *de novo* Synthese von RNA für die anti-IgM induzierte B-Zell Apoptose notwendig ist. Die Transkription verschiedener Gene wird während der anti-IgM induzierten Apoptose reguliert und scheint eine wichtige Bedeutung zu haben. In dieser Arbeit sollten Gene identifiziert werden, deren Transkription während der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose abgeschaltet oder angeschaltet wird.

Verschiedene Methoden ermöglichen die Isolierung Apoptose-regulierender Gene. Mittels der Differential Display-RT-PCR (DDRT-PCR) und subtraktiver Hybridisierungstechniken können Gene

identifiziert werden, die in der einen Zellpopulation exprimiert werden, in der anderen nicht.

Die Differential Display Methode beruht auf der Amplifikation exprimierter Sequenzen einer Zelle nach Reverser Transkription der mRNA. Die in einer Polymerase Kettenreaktion amplifizierten Sequenzen werden dann auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Expressionsunterschiede in den zu vergleichenden Zellpopulationen führen zu einem differentiellen Bandenmuster. Diese differentiellen Sequenzen können dann isoliert und sequenziert werden.

Differentielle Hybridisierungen von cDNA-Phagenbanken erlauben ebenso die Identifizierung unterschiedlich exprimierter Gene. Phagenbanken repräsentieren die Information der mRNA einer Zelle in λ -Vektoren. Die Hybridisierung einer cDNA-Phagenbank mit cDNA-Sonden aus zwei Zellpopulationen läßt die Identifizierung unterschiedlich stark hybridisierender Phagenplaques zu, was auf unterschiedliche Expression der mRNA hinweist.

Eine Anreicherung spezifischer Sequenzen kann durch eine Subtraktion erreicht werden. Dabei werden gemeinsame cDNA-Moleküle (oder mRNA-Moleküle) der ersten Zellpopulation durch Hybridisierung mit mRNA (oder cDNA) der zweiten Zellpopulation eliminiert (subtrahiert). Die nicht hybridisierenden Sequenzen sind spezifisch für eine der beiden Zellpopulationen und können dann zur subtraktiven Hybridisierung einer λ -Zap Phagenbank verwendet werden. Sie können aber auch in λ -Phagen verpackt (subtraktive λ -Zap cDNA-Phagenbanken) oder direkt in Plasmide kloniert werden (subtraktive Klonierung).

In dieser Arbeit wurden oben genannte Methoden der differentiellen Hybridisierung einer λ -Zap cDNA-Phagenbank, einer subtraktiven λ -Zap cDNA-Phagenbank, sowie der subtraktiven Klonierung angewandt, um Apoptose-spezifische Sequenzen zu identifizieren.

Unter 5.1.1 wird zunächst die Herstellung der λ -Zap cDNA-Phagenbanken vor und nach anti-IgM Stimulation der BL41-3s Zelllinie beschrieben, da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit der sensitivere und stabilere BL60-2 Klon noch nicht zur Verfügung stand.

Der BL60-2 Klon diente der Herstellung einer subtraktiven λ -Zap cDNA-Phagenbank, die unter 5.1.2 beschrieben wird.

In einem *Screening* wurde dann sowohl die λ -Zap cDNA-Phagenbank aus stimulierten B-Zellen, wie auch die subtraktive cDNA-Phagenbank auf differentiell exprimierte Gene durchmustert. Diese differentielle Hybridisierung erfolgte mit einer cDNA-Sonde aus B-Zellen, die zuvor 4 h mit anti-IgM induziert wurde im Vergleich zu einer cDNA-Sonde aus unstimulierten B-Zellen und wird unter 5.1.3 näher beschrieben. Die Herstellung einer subtraktiven Sonde, wie der differentielle *Screen* mit dieser Sonde wird unter 5.1.4 beschrieben. Zur Sensitivitätssteigerung wurde in einem zweiten Ansatz versucht, apoptotische Sequenzen über die klassische Hydroxyaptit-Matrix anzureichern (5.1.7).

5.1.1 Herstellung von lambda-Zap cDNA-Phagenbanken

Zur Herstellung der lambda-ZAP cDNA-Phagenbanken wurde mRNA aus stimulierten und nicht stimulierten BL41-3s Zellen isoliert und je eine cDNA-Phagenbank jeden RNA-Pools hergestellt. Die lambda-Zap cDNA-Phagenbank aus stimulierten BL41-3s Zellen sollte Apoptose-spezifische Sequenzen enthalten, die durch differentielle Hybridisierung der cDNA-Phagenbank identifiziert werden sollten.

Der BL41-3s Subklon ist sensitiv auf den anti-IgM Apoptose Stimulus. Nach 24 Stunden Induktion zeigen etwa 40 Prozent der Zellen fragmentierte Kerne, was dem Anteil apoptotischer Zellen entspricht (Färbung mit Acridinorange). Da die Regulation der Transkription eine sehr schnelle Antwort für die Zelle auf einen Stimulus sein kann, und bereits gezeigt wurde, daß nach 4 Stunden anti-IgM Induktion die Expression von c-myc, Nak-1 und bax-alpha stark verändert ist, wurde dieser Zeitpunkt für die Herstellung der lambda-Zap cDNA-Phagenbank gewählt.

Die Herstellung der lambda-Zap cDNA-Phagenbanken erfolgte nach dem Protokoll des "lambda Zap II cDNA cloning Kits" von Stratagene (s. 3.1.2 und Abb. 3). Der Titer der hergestellten cDNA-Phagenbank betrug $2,6 \times 10^{10}$ pfu für die cDNA-Phagenbank aus nicht stimulierten Zellen und 1×10^{10} pfu für die cDNA-Phagenbank aus stimulierten BL41-3s Zellen. Das lambda-Zap-System bietet den Vorteil, daß die cDNA-Sequenzen in einen Blueskript-Vektor kloniert werden, der mittels Helperphagen durch *in vivo* Exzision aus der lambda-DNA isoliert werden kann (3.1.5). Anhand der Größe der klonierten Inserts, sowie dem Anteil konstitutiv exprimierter und spezifisch exprimierter Gene wurde die Qualität der cDNA-Phagenbank überprüft.

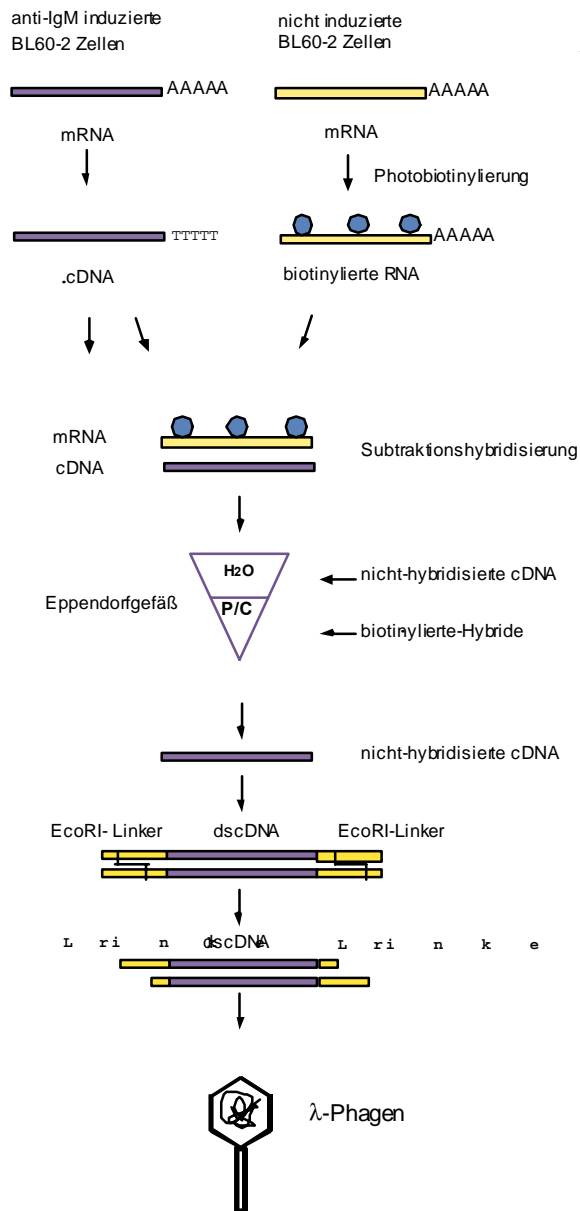
Eine gute cDNA-Phagenbank sollte viele lange Sequenzen enthalten, die Kopien der mRNA Population vollständiger Länge sind. Das erleichtert u.a. die Klonierung der kompletten kodierenden Sequenzen unbekannter Gene. Die Größe der klonierten Fragmente wurde nach *in vivo* Exzision des Blueskript Plasmids und anschließender EcoRI/XhoI Restriktionsspaltung bestimmt und lag zwischen 500 Bp und 4 Kb. Die meisten RNA-Moleküle liegen in ihrer Größe zwischen einigen hundert Basenpaaren und einigen Kilobasenpaaren. Die erstellten cDNA-Phagenbanken enthalten somit wahrscheinlich vollständige Kopien vieler RNA-Moleküle. Weniger als 0.02% der cDNA-Phagen waren ohne Insert, was ebenfalls auf eine gute Ligationseffizienz schließen ließ.

Die lambda-Zap cDNA-Phagenbank, hergestellt von unstimulierten bzw. anti-IgM stimulierten BL41-3s Zellen sollte nun die Sequenzen enthalten, die der mRNA der Zelle zum jeweiligen Zeitpunkt der RNA-Präparation entsprechen. Die cDNA-Phagenbank, die nach 4 Stunden anti-IgM Stimulation hergestellt wurde, konnte nun in einer differentiellen Hybridisierung auf spezifische Sequenzen, die nach anti-IgM Induktion exprimiert werden durchmustert werden (5.1.3).

5.1.2 Herstellung einer subtraktiven lambda-Zap cDNA-Phagenbank

Die Herstellung einer subtraktiven cDNA-Phagenbank erlaubt eine Anreicherung Apoptose-spezifischer Transkripte und erleichtert die Identifizierung Apoptose-spezifischer Sequenzen.

Zunächst wurde mRNA von unstimulierten und stimulierten (4 h anti-IgM) BL60-2 Zellen präpariert. Die RNA der stimulierten Zellen wurde in cDNA konvertiert und mit einem 10-fachen Überschuß an photobiotinylierter RNA unstimulierter Zellen hybridisiert. Sequenzen, die in beiden Zellpopulationen vorhanden sind hybridisieren, während Sequenzen, die nur in den stimulierten Zellen vorhanden sind nicht hybridisieren. Die RNA/cDNA Hybride wurden über Phenol/Chloroform Extraktion abgetrennt. Nicht hybridisierte cDNA-Sequenzen wurden in doppelsträngige cDNA konvertiert, die Enden wurden aufgefüllt und mit EcoRI-Linkern ligiert. Die Fragmente wurden in einer Polymerase Kettenreaktion amplifiziert, EcoRI gespalten, in lambda-Zap DNA kloniert und in Phagen verpackt (Abb. 24). Der Titer der subtraktiven cDNA-Phagenbank betrug 7.5×10^{10} pfu. Da der Klonierung eine PCR vorausgeht, konnten die doppelsträngigen Sequenzen nicht hemimethyliert, und interne EcoRI Schnittstellen nicht geschützt werden. Die klonierten Sequenzen sind somit verhältnismäßig klein, und die Klonierung kompletter cDNA-Sequenzen ist nicht zu erwarten. Die Größe der klonierten Inserts wurde durch PCR einzelner Phagen mit Blueskript spezifischen SP6 und T7 Primern überprüft und lag zwischen 200-600 Basenpaaren. Die Qualität der subtrahierten cDNA-Phagenbank wurde durch Hybridisierung mit einer Sonde, spezifisch für das konstitutiv exprimierte β -Aktin Gen, sowie einer Sonde für den Transkriptionsfaktor Nak-1, für den gezeigt wurde, daß die mRNA-Menge nach anti-IgM induzierter Apoptose zunimmt, überprüft. Dazu wurden 10^5 pfu auf XL1-blue Zellen ausplattiert und die Phagenplaques auf Nylon Filter transferiert. Die Filter wurden mit den entsprechenden, radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Die positiven β -Aktin Signale betragen weniger als 5 % in Bezug auf die Gesamtzahl der ausplattierten Phagenplaques. Dieses Ergebnis bewies eine Subtraktion konstitutiv exprimierter Gene. Die Hybridisierung von nur 10^5 Phagenplaques ergab ein positives NAK-1 Signal, was auf eine Anreicherung der Sequenz dieses schwach exprimierten Gens hinwies.



1. Präparation der poly(A)⁺-RNA
2. cDNA-Synthese und Photobiotinylierung der RNA
3. Subtraktionshybridisierung
4. Isolierung nicht-hybridisierter differentieller cDNA's
5. Zweitstrang cDNA-Synthese und Linker-Ligation
6. PCR, EcoRI Spaltung und Klonierung in λ-Zap Phagen

Abb. 24 Herstellung einer subtraktiven lambda-Zap cDNA-Phagenbank
 Aus stimulierten (4h anti-IgM F(ab)₂) und nicht stimulierten BL60-2 Zellen wurde die poly(A)⁺-RNA isoliert. Die RNA der nicht stimulierten Zellen wurde photobiotinyliert und mit der cDNA induzierter Zellen hybridisiert. Nicht hybridisierte cDNA wurde durch Phenol/Chloroform (P/C) Extraktion isoliert und in doppelstängige-cDNA konvertiert. Die Enden wurden aufgefüllt und mit spezifischen EcoRI-Linkern ligiert. Diese Fragmente wurden in einer PCR amplifiziert, EcoRI gespalten, in lambda-Zap-DNA kloniert und in Phagen verpackt.

5.1.3 Differentielle Hybridisierung von lambda-Zap cDNA-Phagenbanken

Um Gene zu identifizieren, die nach Apoptose-Induktion differentiell exprimiert werden, wurden die cDNA-Phagenbanken der stimulierten BL41-3s Zellen sowie die subtraktive lambda-Zap cDNA-Phagenbank ausplattiert und differentiell hybridisiert (Abb. 25).

Es wurden so viele Phagen ausplattiert, daß gewährleistet ist, daß alle Transkripte einer Zelle repräsentiert sind. Das entspricht ca. 10^6 pfu der stimulierten Phagenbank (4 h anti-IgM), bzw. bei einer 10-fachen Anreicherung ca. 10^5 pfu der subtraktiven cDNA-Phagenbank. Das Prinzip der differentiellen Hybridisierung ist in Abb. 25 dargestellt.

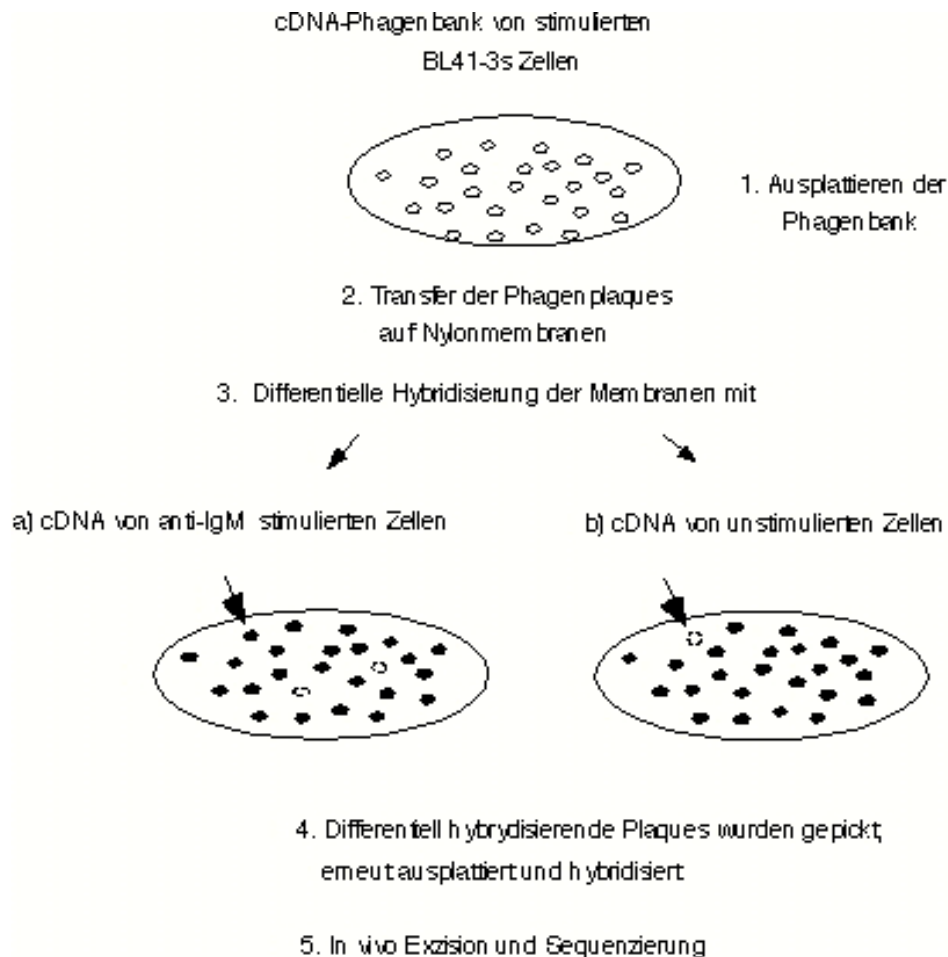


Abb. 25 Schematische Darstellung der differentiellen Hybridisierung von lambda-Zap cDNA-Phagenbanken

lambda-Zap cDNA-Phagenbanken, hergestellt von nicht stimulierten, und Apoptose induzierten BL41-3s Zellen (4 h anti-IgM F(ab)₂) wurden ausplattiert und die Phagenplaques auf je 2 Nylonmembranen transferiert. Je eine Membran wurde mit einer ³²P-markierten cDNA-Probe von nicht stimulierten BL41-3s Zellen, und mit einer ³²P-markierten cDNA-Probe von stimulierten BL41-3s Zellen hybridisiert. Differenziell hybridisierende Plaques wurden gepickt, erneut ausplattiert und hybridisiert. Klonierte Sequenzen wurden nach *in vivo excision* sequenziert.

5.1.4 Hybridisierung der lambda-Zap cDNA-Phagenbanken mit einer subtrahierten Probe

Zur Sensitivitätssteigerung sollte die lambda-Zap cDNA-Phagenbank ebenfalls mit einer

subtrahierten Probe im Vergleich zu einer cDNA-Sonde aus nicht stimulierten Zellen differentiell hybridisiert werden.

Die subtrahierte Sonde wurde mit dem "PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit" von Clontech hergestellt und diente ebenfalls der Anreicherung spezifischer Sequenzen, die nach anti-IgM induzierter Apoptose exprimiert werden (s. 3.1.6). Sequenzen, die in unstimulierten und anti-IgM stimulierten Zellen exprimiert werden, werden dabei über zwei Hybridisierungsschritte subtrahiert. Nicht hybridisierende Sequenzen wurden in einem anschließenden PCR-Schritt, sowie einer internen, *nested* PCR, amplifiziert. Diese amplifizierte Sonde wurde für die differentielle Hybridisierung der lambda-Zap cDNA-Phagenbanken eingesetzt.

Zunächst wurde die Anreicherungs-effizienz der subtrahierten Probe überprüft. Sequenzen konstitutiv exprimierter Struktur-gene wie z.B. β -Aktin sind im Vergleich zu vielen spezifisch exprimierten Genen in großen Mengen in einer Zelle vorhanden. Diese mRNA Sequenzen sollten durch die Subtraktion in Bezug auf die Gesamt RNA Menge deutlich vermindert werden. Um die Subtraktionseffizienz zu überprüfen wurden in einem Southern Blot gleiche Mengen des PCR-Ansatzes der subtrahierten Sonde, einer subtrahierten Kontrolle, und der entsprechenden nicht subtrahierten Proben mit einer radioaktiv markierten β -Aktin Sonde hybridisiert. Die Signale wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 26).

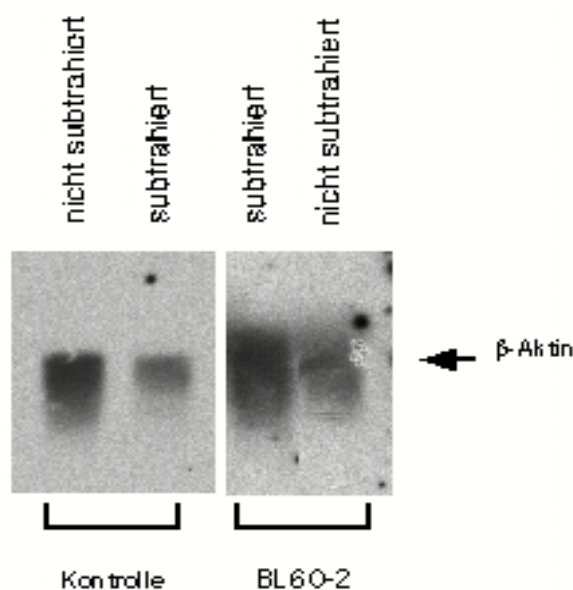


Abb. 26 Southern Blot Analyse der subtrahierten Probe mit einer β -Aktin Sonde. Die DNA von BL60-2 Zellen vor und nach Subtraktion Apoptose-spezifischer Sequenzen (PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit von Clontech), sowie einer Kontrolle wurden auf einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurden die Blots mit einer ^{32}P -markierten β -Aktin Sonde hybridisiert. Die deutliche Abnahme der β -Aktin Signale zeigt die erfolgreiche Subtraktion.

Die Hybridisierung zeigte, daß der Anteil an β -Aktin Sequenzen nach Subtraktion deutlich vermindert und eine Anreicherung Apoptose-spezifischer Sequenzen somit wahrscheinlich ist.

Diese subtrahierte Sonde wurde nun ebenfalls für den differentiellen *Screen* der cDNA-Phagenbanken eingesetzt. Dazu wurde die lambda-Zap cDNA-Phagenbank von stimulierten BL41-3s Zellen, bzw. die subtrahierte cDNA-Phagenbank ausplattiert, und wie unter 5.1.3 beschrieben mit einer radioaktiv markierten Sonde von cDNA nicht stimulierter BL41-3s Zellen im Vergleich mit der subtraktiven Sonde hybridisiert.

Die gepickten Klone wurden durch *in vivo* Exzision in das Blueskript Plasmid konvertiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden in einer Slot Blot Analyse auf ihre differentielle Expression hin überprüft und sind ebenfalls in Tab. 2 (s. Anhang) aufgelistet.

5.1.5 Slot Blot Analyse

Alle identifizierten, differentiell hybridisierenden Klone wurden nun in einer Slot Blot Analyse erneut hybridisiert. Da die Zahl der gepickten Klone sehr groß war, sollten falsch positiv gepickte Klone identifiziert werden, bevor sie in der vergleichsweise aufwendigen Northern Blot- und Run-on-Analyse auf ihre differentielle Expression überprüft werden.

Dazu wurde pro Klon ca. 1 μ g der Plasmid DNA mit einer Slot Blot Apparatur von Schleicher und Schüll auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde geteilt, so daß zwei identische Hälften entstanden. Eine Hälfte wurde mit einer 32 P-markierten cDNA-Sonde von stimulierten, oder einer subtrahierten Sonde, die andere Hälfte mit einer Sonde von nicht stimulierten BL60-2 Zellen hybridisiert. Das Ergebnis konnte durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden und ist für einige Plasmide in Abb. 27 dargestellt.

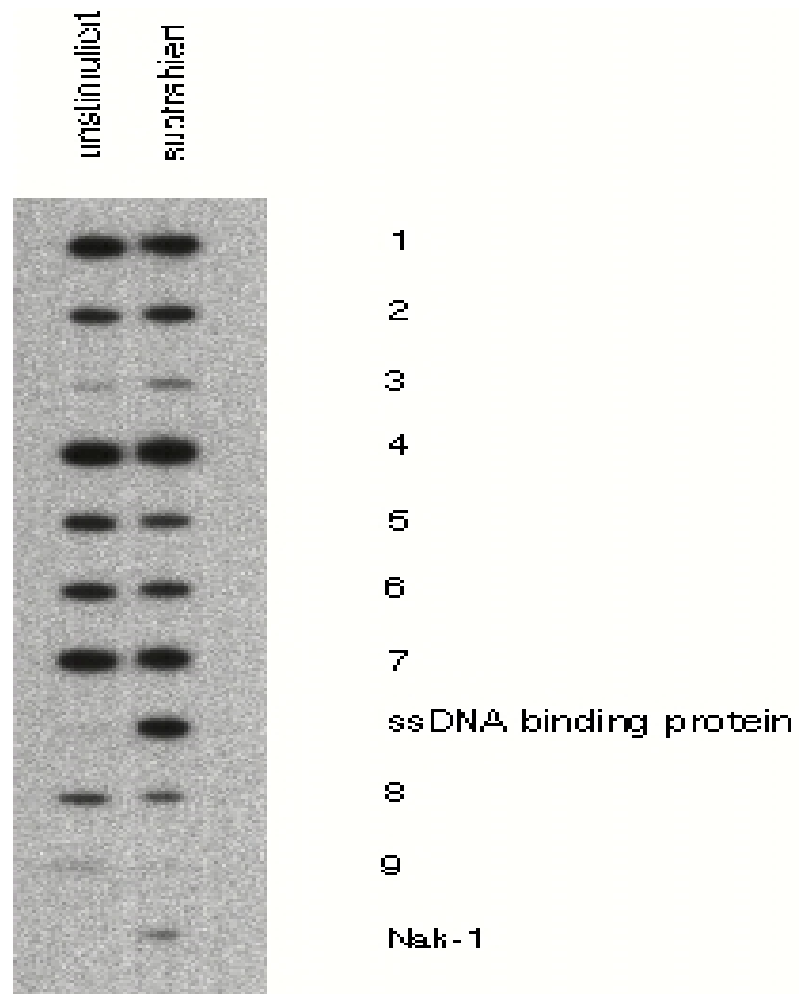


Abb. 27 Slot Blot Analyse gepickter Klone mit ^{32}P -markierten cDNA-Sonden. DNA verschiedener Klone wurde auf eine Nylonmembran transferiert und UV-fixiert. Die Membranen wurden halbiert und mit einer radioaktiv markierten cDNA nicht stimulierter BL60-2 Zellen bzw. einer subtrahierten Probe hybridisiert.

Klone, von denen bekannt war, daß die Expression während der anti-IgM induzierten Apoptose reguliert wird, dienten als Kontrolle. Für Nak-1 war bekannt, daß die Transkriptmenge stark zunimmt, und die DNA diente hier als Positiv-Kontrolle. Klone, die in der Slot Blot Analyse ebenfalls differentiell hybridisierten, wurden in einer Run-on-Analyse sowie einer Northern Blot Analyse untersucht.

5.1.6 Run-on-Analyse

Die Run-on-Analyse dient dem Nachweis neu synthetisierter RNA in Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt. Diese Methode bietet somit die Möglichkeit, nur die nach anti-IgM induzierter B-Zell Apoptose neu synthetisierte mRNA zu identifizieren, was eventuell einen Sensitivitätsvorteil gegenüber anderen Methoden bietet, die den "steady state level" in Zellen vergleichen.

Die differentielle Genexpression der zuvor identifizierten Klone sollte nun in der Run-on-Analyse

bestätigt werden. Dazu wurde die neu synthetisierte mRNA in isolierten Kernen von unstimulierten und stimulierten BL60-2 Zellen (4 h anti-IgM) durch Zugabe von $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP radioaktiv markiert. Mittels der Slot Blot Apparatur wurden die identifizierten Klone, sowie die Kontrollen (GAPDH, Nak1, Bak) auf Nylonmembranen transferiert. Zur Hybridisierung der Slot Blots wurde die radioaktiv markierte RNA präpariert. Je eine Membran wurde mit der RNA gleicher Zellzahl von stimulierten und nicht stimulierten BL60-2 Zellen hybridisiert. Nach Exposition konnten die Signale detektiert und verglichen werden (s. Abb. 28). Die Intensität der Signale entspricht der Menge neu synthetisierter RNA vor und nach 4 Stunden anti-IgM Stimulation.

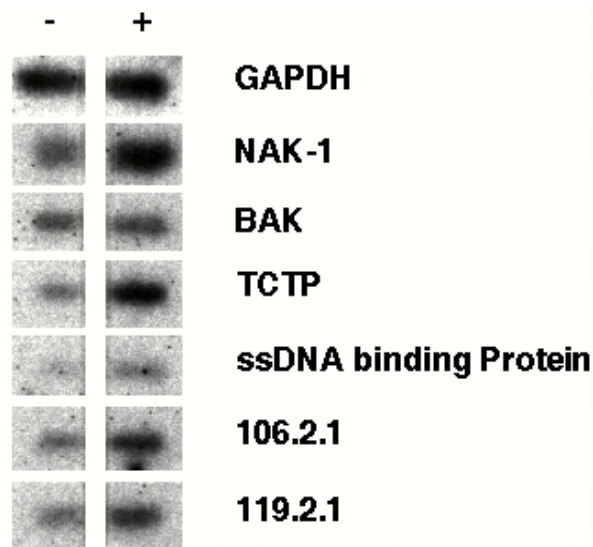


Abb. 28 Run-on-Analyse von **BL60-2 Zellen vor und nach anti-IgM induzierter Apoptose** BL60-2 Zellen wurden für 4 Stunden mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten (+) bzw. ohne (-) kultiviert. Die Kerne dieser Zellen wurden präpariert und die neu synthetisierte mRNA durch Zugabe von $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP radioaktiv markiert. DNA verschiedener Klone wurde in einer Slot Blot Apparatur auf eine Nylonmembran transferiert und mit der radioaktiv-markierten RNA von stimulierten (+), bzw. nicht stimulierten (-) BL60-2 Zellen hybridisiert. Die spezifischen Signale wurden mittels Autoradiographie detektiert.

Als Negativ-Kontrolle diente GAPDH, ein konstitutiv exprimiertes Gen, von dem bekannt war, daß es während der anti-IgM Apoptose transkriptionell nicht reguliert wird. Die Intensität der der GAPDH-Signale war vor und nach anti-IgM Stimulation fast identisch, was auf gleiche Mengen neu synthetisierter ^{32}P -markierter RNA hinwies. Die Intensität des NAK-1 Signals nahm nach anti-IgM Stimulation stark zu, was zeigt, daß NAK-1 transkriptionell reguliert wird. Dieses Ergebnis entspricht den bereits publizierten Ergebnissen, die zeigten, daß die Expression dieses Zink-Finger Transkriptionsfaktors nach anti-IgM induzierter Apoptose stark zunimmt. Die Intensität anderer Klone, die in der subtraktiven Hybridisierung der cDNA-Phagenbanken identifiziert wurden, hybridisierten in der Run-on-Analyse ebenfalls differentiell. Besonders stark nahm das Signal des

Translations kontrollierten Tumorproteins (TCTP) zu, wie das schon in der Slot Blot Analyse identifizierte "single strand DNA binding protein" (ssDNA binding protein). Die transkriptionelle Regulation dieser Klone während der anti-IgM induzierten Apoptose wurde in einer Northern Blot Analyse überprüft.

Die Northern Blot-Analyse ergab für alle bisher differentiell hybridisierenden Klone keine eindeutige Zunahme der mRNA Menge. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, daß sich die RNA-Menge während der anti-IgM Stimulation nicht ändert, bzw. in so geringem Maße, daß keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte. Die Northern Blot Analysen widersprechen den vorangegangenen Experimenten, der differentiellen Hybridisierungen der Phagenbanken, der Slot Blot Analyse und der Run-on-Analyse. Deshalb sollte die subtraktive Anreicherung über eine klassische Methode, in der einzelne Schritte verbessert wurden, erreicht werden.

5.1.7 Subtraktive Klonierung mittels Hydroxyapatit-Chromatographie

In diesem Experiment sollten ebenfalls Sequenzen, die nach anti-IgM induzierter Apoptose-spezifisch exprimiert werden, angereichert und direkt in pGEM-T Plasmide kloniert werden. Um eine höhere Subtraktionseffizienz zu erreichen, wurde differentielle DNA über Hydroxyapatit (HAP)-Säulen getrennt. Sowohl einzelsträngige, als auch doppelsträngige DNA oder DNA/RNA-Hybride binden an HAP und können durch verschiedene Phosphat-Pufferkonzentrationen voneinander getrennt werden.

Einzelsträngige, nicht hybridisierende cDNAs sollten spezifisch für Apoptose stimulierte Zellen sein und wurden in zwei Hybridisierungsschritten von cDNA/mRNA Hybriden, die Sequenzen darstellen, die in beiden Zellpopulationen vorhanden sind, getrennt (3.1.7).

Nach einer weiteren positiven Selektion wurden diese nicht hybridisierenden Sequenzen in doppelsträngige DNA umgeschrieben und in einer PCR amplifiziert. Zur Überprüfung der Subtraktionseffizienz wurde die Probe radioaktiv markiert und im Vergleich mit einer radioaktiv markierten Probe nicht stimulierter BL60-2 Zellen in einer Slot Blot Analyse getestet (Abb. 29). Die Autoradiographie der Slot Blots zeigte eine starke Anreicherung Apoptose-spezifischer Sequenzen, wie Nak-1, Bak und Bax-alpha während Sequenzen wie β -Aktin, deren Expression sich während der anti-IgM induzierten Apoptose nicht ändert, komplett subtrahiert wurden. Dieses Ergebnis deutete auf eine gute Anreicherung von Sequenzen, die nach anti-IgM Induktion exprimiert werden.

Die angereicherten Sequenzen wurden in pGEM-T Vektoren kloniert und sequenziert. Alle sequenzierten Klone sind in Tab. 3 (Anhang) aufgelistet. Dabei wurden die Insertgrößen und die nach Datenbankvergleich erhaltenen DNA- und Proteinhomologien angegeben.

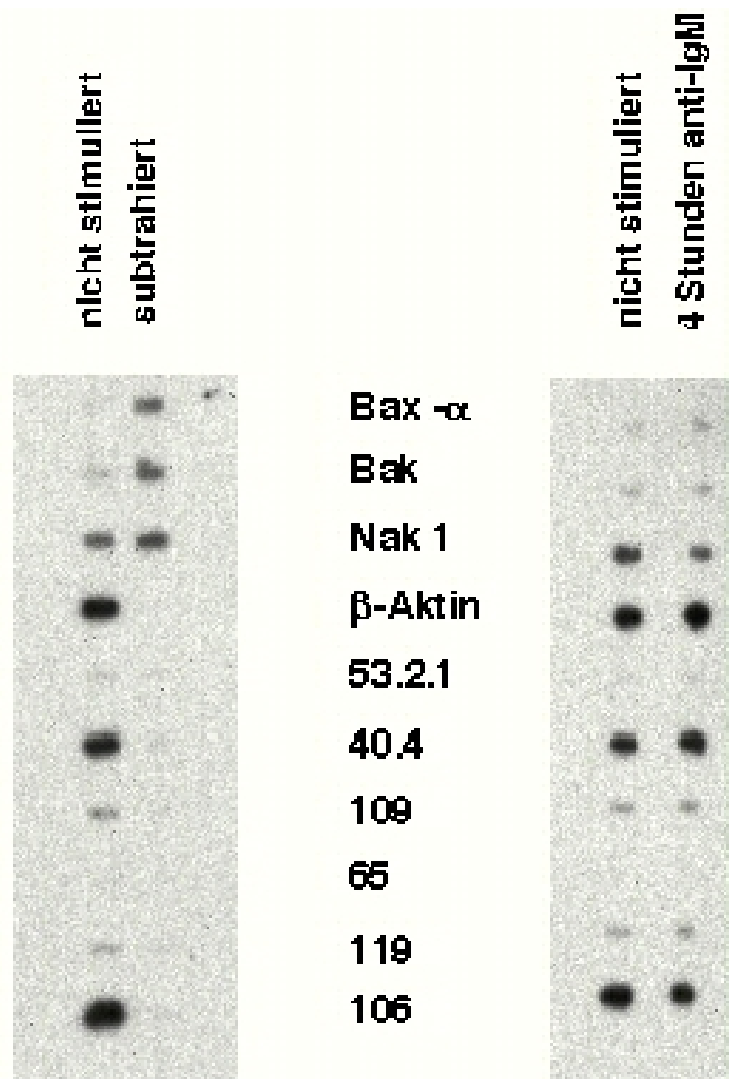


Abb. 29 Slot Blot Analyse der ³²P-markierten Probe nach Hydroxyapatit Anreicherung DNA verschiedener Klone wurde mit einer Slot Bot-Apparatur auf eine Nylonmembran transferiert und UV-fixiert. Die Membranen wurden halbiert und mit je einer radioaktiv markierten cDNA nicht stimulierter BL60-2 Zellen und radioaktiv markierten subtrahierten DNA-Sonde (oder von stimulierten Zellen) hybridisiert. Apoptose-spezifische Sequenzen (Nak-1, bax-alpha, bak) sind in der subtrahierten Probe angereichert.

Ca. 90 Prozent der identifizierten Sequenzen sind unbekannt, d.h. es gibt keine Homologien zu schon bekannten Sequenzen in der Datenbank. Der Klon B54 hingegen hat eine hohe Homologie zur DNA-Sequenz von Mex B, einem bakteriellen *Acridflavin resistance* Protein. Der Klon B8 hat keine DNA-Homologie zu schon bekannten Genen, ist aber auf Proteinebene ebenfalls homolog zu dem Mex B Protein. Beide Klone überlappen aber in ihrer DNA Sequenz nicht. Es ist bisher kein zu dem *Acridflavin resistance* Protein homologes humanes Protein bekannt. Die Klone B8 und B54 sind somit eventuell Sequenzen eines bisher unbekanntes, humanen Proteins, das nach anti-IgM induzierter Apoptose transkriptionell angeschaltet wird.

Die differentielle Expression des B54-Klons sollte in einer Northern Blot Analyse überprüft werden.

Dazu wurden je 10 µg RNA pro Spur von unstimulierten und stimulierten BL60-2 Zellen nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach anti-IgM Induktion aufgetrennt. Selbst nach zweiwöchiger Exposition des Autoradiogramms konnte kein Signal nachgewiesen werden.

Eine Sensitivitätserhöhung konnte hingegen durch die Hybridisierung eines *multiple tissue* Northern Blots von Clontech, mit jeweils 2 µg poly(A)⁺-mRNA verschiedener humaner Gewebe erreicht werden.

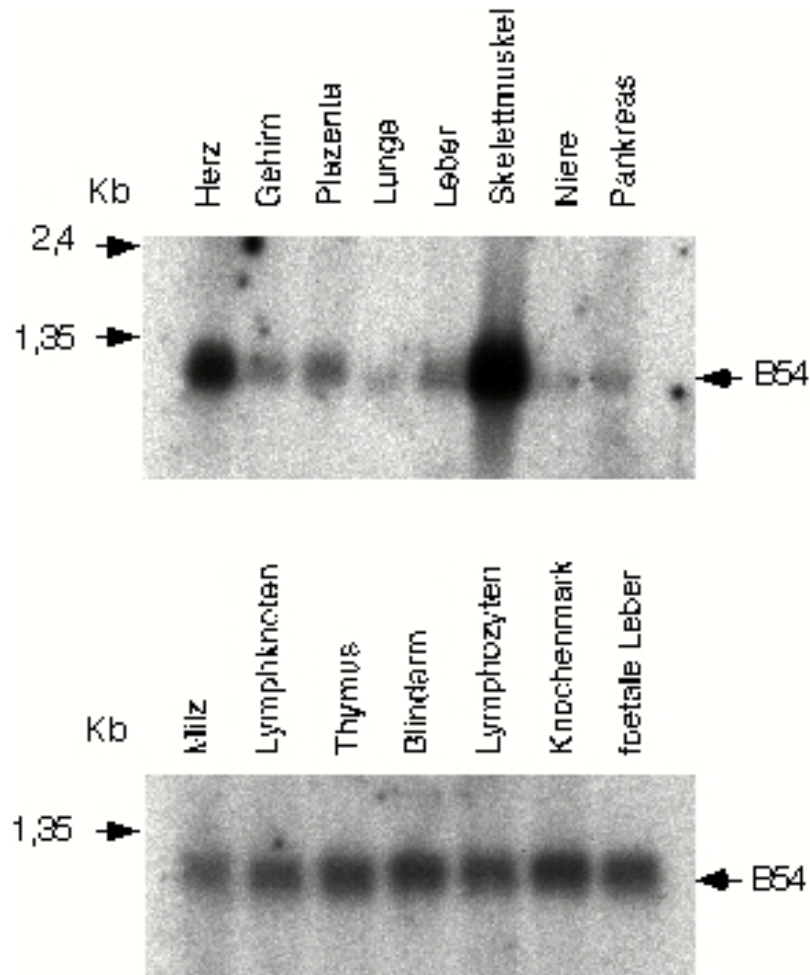


Abb. 30 Analyse der gewebsspezifischen Expression des Klons B54 *Multiple tissue* Northern Blots, die je 2 µg elektrophoretisch getrennter poly(A)⁺-RNA verschiedener Gewebe enthalten (Clontech). Diese Membranen wurden mit einer radioaktiv markierten DNA des identifizierten Klons B54 hybridisiert. Der Pfeil zeigt die B54-spezifischen Signale nach Autoradiographie.

Die Northern Blot Analyse zeigte eine gewebsspezifische Expression dieses bisher unbekanntes Gens. Eine starke Expression konnte in den unterschiedlichen Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden, sowie im Skelettmuskel und Herz (Abb. 30).

Die entsprechende komplette cDNA-Sequenz des Klons B54 soll nun durch Hybridisierung der

lambda-Zap cDNA-Phagenbank kloniert und die funktionelle Bedeutung in Bezug auf die anti-IgM induzierte Apoptose untersucht werden.

6 Diskussion

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein Modellsystem etabliert, daß zur Untersuchung der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose diente und die Identifikation Apoptose-assoziiierter Proteine, durch den subtraktiven Vergleich der zweidimensionalen Proteinmuster vor und nach Apoptose Stimulation ermöglichte. Im weiteren wurde die Bedeutung der identifizierten Proteine für die Apoptose untersucht. In diesem Zusammenhang konnte die zentrale Rolle der Caspase 3 für die anti-IgM induzierte Apoptose aufgezeigt werden, die hier im Zusammenhang mit einigen der identifizierten Proteinen diskutiert wird.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden über verschiedene Methoden der subtraktiven Klonierung und differentiellen Hybridisierung von lambda-Zap cDNA-Phagenbanken Apoptose spezifische Sequenzen angereichert. Es sollten Gene identifiziert werden, die während der anti-IgM induzierten Apoptose differentiell exprimiert werden und damit potentielle Regulatoren der Apoptose darstellen. Die verschiedenen Methoden und die Ergebnisse werden hier diskutiert.

Apoptose läuft nach einem genetischen Programm ab und ist durch charakteristische morphologische Merkmale gekennzeichnet (2). Die Regulatoren, die diese morphologischen und biochemischen Prozeß steuern, sind noch weitgehend unbekannt. Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits einige der pro- und anti-apoptotischen Proteine der bcl-2 Familie bekannt, deren Bedeutung in der Apoptose von besonderem Interesse war (105). In den letzten Jahren konnten weitere wichtige Regulatoren, die zum Zelltod führen, besonders durch Studien an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* identifiziert werden. Dazu gehören vor allem die Gene ced 3, ced 4, und ced 9, deren humane Homologe mittlerweile identifiziert wurden. Ced 9 ist das humane Homologe zu bcl-2 und ced-3 das humane Homologe zur Caspase 3 (14, 15). Das humane Homologe zu ced-4, Apaf 1 konnte ebenfalls kürzlich identifiziert werden und stellt ein Bindeglied zwischen der Familie der Caspasen und der bcl-2 Familie dar (56). Mechanismen der Apoptose sind evolutionär konserviert, aber auch Zelltyp-spezifisch und abhängig von dem Stimulus, der die Apoptose auslöst. Am besten aufgeklärt ist die Aktivierungskaskade die über das Apoptose-spezifische Antigen FAS ausgelöst wird (106). Ähnliche Kaskaden wurden für die TNF-Rezeptor induzierte Apoptose identifiziert. Im Gegensatz dazu ist die anti-IgM induzierte B-Zell Apoptose noch weitgehend unverstanden, was nicht zuletzt darauf zurückzuführen ist, daß es bisher kein sensitives Modellsystem gab. Als Modell für die bisherigen Studien diente im wesentlichen die Maus Zelllinie WEHI 231.

Die Identifikation neuer Proteine und Gene, die an der anti-IgM induzierten Apoptose beteiligt sind, bietet Einblick in das Verständnis der Apoptose Prozesse und damit eventuell Ansatzpunkte für Therapien verschiedener Krankheiten, die auf einer Fehlregulation Apoptose regulierender Proteine

beruhen.

6.1 Identifikation Apoptose-assoziiierter Proteine

Um Proteine identifizieren zu können, die in dem Prozeß der anti-IgM induzierten Apoptose eine wichtige Rolle spielen, wurde zunächst ein Modellsystem etabliert.

Durch extensive Subklonierung der humanen Burkitt Lymphom Zelllinie BL 60 wurde ein Subklon erhalten, der hoch sensitiv auf den Stimulus ist. Nach 24 Stunden anti-IgM Induktion sind 40-60 Prozent der Zellen apoptotisch (gemessen an der Anzahl fragmentierter Kerne nach Acridinorange-Färbung bzw. Annexin-V/FITC Markierung und anschließender FACS Analyse). Je höher der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen, desto leichter lassen sich Proteine in einem subtraktiven Vergleich identifizieren, die spezifisch für apoptotische Veränderungen sind.

Um die Sensitivität noch zu erhöhen, wurde eine Methode etabliert, durch die apoptotische von nicht apoptotischen Zellen getrennt werden können. Apoptotische Zellen sind durch die Translokation von Phosphatidylserin (PS) auf die Außenseite der Zelle gekennzeichnet (8). Annexin-V bindet spezifisch an PS, was die Markierung der apoptotischen Zellen mit Annexin-V/FITC ermöglichte (107). In einem zweiten Schritt wurden diese Zellen an anti-FITC magnetische *beads* gekoppelt und über eine Säule, die sich in einem Magnetfeld befindet, von nicht apoptotischen Zellen separiert. Die dabei erreichte Reinheit betrug 95 Prozent. Mit dieser Methode wurden auch spontan apoptotische Zellen, deren Anteil in einer unstimulierten Population BL60-2 Zellen ca. 3-10 Prozent ausmacht, abgetrennt. Die hochsensitive BL60-2 Zelllinie und die anschließende magnetische Separation erlaubte zum ersten mal den Vergleich apoptotischer und nicht apoptotischer Zellen mittels der 2D-Gelelektrophorese. Gesamtzelllysate der beiden Zellpopulationen wurden mit der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Im visuellen, subtraktiven Vergleich der silbergefärbten 2D-Gele konnten ca. 80 Proteinspots von insgesamt ca. 3300 identifiziert werden, die nach Apoptose-Induktion verändert waren. Veränderungen im Proteinmuster können dabei auf Proteine zurückzuführen sein, deren Expression sich während der Apoptose verändert, was zu einer Intensitätsänderung der Spots nach Apoptoseinduktion führt. Diese Regulation kann auf transkriptioneller oder auf translationeller Ebene erfolgen. Ebenso können Veränderungen detektiert werden, die auf die Modifikation von Proteinen zurückzuführen sind, falls damit eine Ladungsänderung des Proteins einhergeht. In der ersten Dimension der 2D-Gelelektrophorese, werden Proteine nach ihrer Ladung getrennt. Die Änderung des isoelektrischen Punktes eines Proteins hat somit eine Änderung der Lage des entsprechenden Proteins in der ersten Dimension zur Folge. 15 differentielle Proteinspots wurden bisher in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. B. Wittmann-Liebold durch Edman Abbau und Massenspektrometrie identifiziert (s. Tab. 1). Einige der identifizierten Proteine konnten Fragmenten schon bekannter Proteine zugeordnet werden. Dabei handelt es sich u.a. um Strukturproteine wie β -Aktin, Lamin, oder neutrales Calponin. In Publikationen der letzten Jahren wurde eine Spaltung von β -Aktin und Lamin während der Apoptose beschrieben, wobei angenommen wird, daß die Spaltung dieser Proteine mit der Umstrukturierung des Cytoskeletts während des Prozesses der Apoptose im

Zusammenhang steht (52, 108). Andere identifizierte Proteine gehören zur Familie der heterogenen nukleären Ribonucleoproteine, hnRNP1/C2, hnRNP1, hnRNPK, deren Bedeutung unter 6.1.3 diskutiert wird. Außerdem wurde der GTPase Inhibitor für Proteine der Rho Familie, das D4-GDI identifiziert, dessen Rolle unter 6.1.4 näher betrachtet wird. Weitere identifizierte Proteine sind das RAD 23 homologe Protein (HHR23B), ein DNA-Reparaturenzym, das 60 S ribosomale Protein P0, das dem Heterochromatin Protein 1 α homologe Protein (HP1 α), Nucleolin, Deoxyuridin 5'-triphosphat Nukleotidohydrolase (dUTPase) und das Lymphozyten spezifische Protein LSP1.

Die Veränderungen dieser Proteine wurden bisher noch nicht näher untersucht und werden hier nicht weiter diskutiert.

6.1.1 Die Rolle des D4-GDI Proteins während der anti-IgM induzierten Apoptose

Im subtraktiven Vergleich der 2D-Gele apoptotischer und nicht apoptotischer BL60-2 Zellen wurde das D4-GDI Protein identifiziert. D4-GDI ist ein Inhibitor für GTPasen der Rho Proteinfamilie. Das Protein wird spezifisch im hematopoietischen System exprimiert. Ein Proteinspot, der als D4-GDI identifiziert wurde, nahm nach anti-IgM induzierter Apoptose an Intensität im 2D-Gel stark ab (Abb 10, Spot D). Im weiteren Verlauf der Identifikation differentieller Proteinspots wurde ein Spot identifiziert, der nach Apoptose Stimulation stark zunahm. Dieser Spot wurde als ein Spaltprodukt des D4-GDI Proteins identifiziert (Abb. 10, Spot D'). In der eindimensionalen Western Blot Analyse konnte der Zeitverlauf der Spaltung des 27 KDa D4-GDI Proteins in das 23 KDa große Fragment nach 8 Stunden anti-IgM induzierter B-Zell Apoptose bestimmt werden (Abb. 11). Ein Sequenzvergleich der Aminosäuren des D4-GDI Proteins mit den Erkennungssequenzen für Caspasen, ergab eine Konsensussequenz (DXXD) spezifisch für Caspase 3 an der Position Aspartat¹⁹ des D4-GDI Proteins. Die Spaltung an dieser Stelle würde ein 23 KDa großes und ein 5 KDa großes Fragment generieren. Die Spaltung in ein 23 KDa großes Fragment entspricht dem Ergebnis der eindimensionalen Western Blot Analyse. Das 5 KDa Fragment konnte allerdings nicht detektiert werden, da es nicht vom Antikörper erkannt wird. Das D4-GDI Protein bindet an das C-terminale Ende von Rho-GTPasen, so daß diese nicht mehr mit anderen Proteinen interagieren können, und dadurch inaktiviert werden. Es konnte kürzlich gezeigt werden, daß der C-Terminus des D4-GDI Proteins für die Bindung an Rho Proteine und der N-terminus für den Nukleotid Austausch der GTPasen verantwortlich ist (109). Die Spaltung des D4-GDI Proteins in ein 5 KDa N-terminales Fragment und ein 23 KDa großes C-terminales Fragment muß somit Auswirkungen auf die inhibitorische Funktion des Proteins haben. In zukünftigen Experimenten ist die Überexpression der Spaltprodukte sowie die Expression nicht spaltbarer Mutanten geplant und soll Einblick in die Bedeutung des D4-GDI Proteins während der anti-IgM induzierten Apoptose geben. Rho GTPasen sind an der Regulation der Protein Kinase p38 und der c-jun-N-terminalen Kinase, sowie der Organisation des Aktin Cytoskeletts beteiligt (110, 111). Die Spaltung des D4-GDI ist somit eventuell auch für die morphologischen Veränderungen während der Apoptose verantwortlich. Danley et al. beschrieben ebenfalls die D4-GDI Spaltung in Jurkat T-Zellen nach FAS induzierter Apoptose (112). Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde die Spaltung in zwei

Fragmente beobachtet. Die Spaltung in ein 17 kDa großes Fragment erfolgt durch die Spaltung der Caspase 1 an der Position LLGD⁵⁵G. Dieses Spaltprodukt konnte nach anti-IgM induzierter Apoptose nicht detektiert werden. Die Spaltung in das 23 kDa große Fragment stimmt hingegen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein und ist durch die Caspase 3 bedingt. Da die Caspase 3 für die spezifische Spaltung verantwortlich ist, wurde durch die Zugabe des zellpermeablen, irreversiblen Inhibitors z-DEVD-fmk, der spezifisch für Proteasen der Caspase 3 Familie ist, überprüft. Die Zugabe dieses Inhibitors vor der Apoptose-Induktion mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten hemmt die Spaltung des D4-GDI Proteins dosisabhängig (s. Abb.12). Die Zugabe des Inhibitors ac-YVAD-fmk, einem Inhibitor für Proteasen der Caspase 1 Familie konnte die Spaltung hingegen nicht hemmen. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, das D4-GDI während der anti-IgM induzierten Apoptose durch Caspase 3, nicht aber durch Caspase 1 gespalten wird.

6.1.2 Heterogene nukleäre Ribonucleoproteine während der anti-IgM induzierten Apoptose

Heterogene nukleäre Ribonucleoproteine (hnRNPs) binden preRNAs und hnRNAs und sind an der Bildung der Ribonucleokomplexe und Splicisomenkomplexe. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Prozessierung von RNA sowie der Regulation der Transkription und Translation. Es sind ca. 40 verschiedene Ribonucleoproteine mit unterschiedlichen Funktionen bekannt. hnRNP Proteine haben auch strukturelle Funktion, wie die Verpackung von pre-mRNA-Molekülen. Für das hnRNP A1 wurde gezeigt, daß es an dem Export von RNA aus dem Zellkern beteiligt ist (113-115). Das hnRNP K Protein ist an der transkriptionellen Aktivierung verschiedener Gene beteiligt (116).

Die Komplexität dieser großen Proteinfamilie wird unter anderem durch alternatives Splicing der mRNA erreicht. So unterscheiden sich die hnRNP C1 und C2 Proteine durch eine 13 Aminosäure große Insertion, die durch Verwendung alternativer Splicesites in der RNA zustande kommt (117).

In dieser Arbeit wurden Spaltprodukte der hnRNP C1/C2 und hnRNP A1 Proteine identifiziert, die während der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose generiert wurden. Das hnRNP K Protein ist nach anti-IgM induzierter Apoptose im 2D-Gel nicht mehr zu detektieren. Für das hnRNP A1 Protein konnte in der eindimensionalen Western Blot Analyse gezeigt werden, daß 3 Spaltprodukte, der Größen 30 kDa, 19 kDa und 16 kDa sukzessiv, mit zunehmender Inkubationszeit der BL60-2 Zellen mit anti-IgM F(ab)₂-Fragmenten nach 8, 12 und 24 Stunden generiert werden (Abb. 13). Da das hnRNPA1 Protein während der anti-IgM induzierten Apoptose, spezifisch in 3 Fragmente gespalten wird, lag die Vermutung nahe, daß an dieser Spaltung ebenso Caspasen beteiligt sind. Diese Vermutung wurde durch ein Experiment bestätigt, in dem die Spaltung durch den Inhibitor für Proteasen der Caspase 3 Familie, z-DEVD-fmk blockiert wurde (Abb. 14). Ein Vergleich der hnRNP A1 Aminosäuresequenz mit der Konsensussequenz für Caspasen gab keinen Aufschluß über eine potentielle Spaltstelle. Ob Caspase 3 hnRNP A1 spaltet, sollte in einem *in vitro* Assay geklärt werden. Dazu wurde die hnRNP A1 cDNA kloniert und in *E.coli* Bakterien exprimiert. Das rekombinante, aufgereinigte Protein wurde mit rekombinanter Caspase 1 und Caspase 3, mit oder ohne entsprechendem Inhibitor ac-YVAD-fmk oder z-DEVD-fmk inkubiert und in einem Western

Blot analysiert. Nach Inkubation mit rekombinanter Caspase 3 war das hnRNPA1 Protein vollständig abgebaut. Die zuvor *in vivo*, nach anti-IgM induzierter Apoptose detektierten, spezifischen Spaltprodukte konnten aber nicht detektiert werden. Die Zugabe des Caspase 3 spezifischen Inhibitors konnte aber den Abbau durch Caspase 3 *in vitro* blockieren. Caspase 1 hingegen konnte rekombinantes hnRNP A1 nicht spalten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, das Caspase 3 hnRNP A1 spalten kann, wobei unklar bleibt, warum die Spaltprodukte nicht detektiert werden können. Möglicherweise sind die Spaltprodukte *in vitro* nicht stabil und degradieren. Ein weiterer Grund könnte die Verunreinigung der rekombinanten Caspase mit bakteriellen Proteasen sein, die die Spaltprodukte abbauen.

Bis vor wenigen Jahren nahm man an, daß hnRNP Proteine streng kernlokalisiert sind. Mittlerweile konnte hnRNP A1 als Protein identifiziert werden, das für den Transport der mRNA zwischen Kern und Cytoplasma verantwortlich ist (118). Welche Folgen die Spaltung des hnRNP A1 Proteins auf die Funktion des Proteins hat, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Es ist bisher kein hnRNP Protein identifiziert worden, das die Funktion dieses hnRNP A1 Proteins übernehmen könnte. In weiteren Publikationen konnte gezeigt werden, daß das hnRNP A1 Protein an AUUUA Sequenzen im 3'-untranslatierten Bereich verschiedener mRNAs bindet und somit auch eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression spielt. Damit ist hnRNP A1 am *turnover* von mRNA Molekülen beteiligt. Ebenso konnte gezeigt werden, das hnRNPA1 Proteine an der Wahl der 5'-Splicestellen beteiligt sind, wobei die relative Menge des Proteins im Verhältnis zu anderen Splicing Faktoren entscheidend ist, und hohe Mengen hnRNP A1 zum preferentiellen Splicing an 5'-distalen Splicesites führt (113).

Waterhouse et al. konnten kürzlich zeigen, daß in BL30 Zellen, einer Burkitt Lymphom Zelllinie, in denen Apoptose durch Etoposide, Bestrahlung, Ceramide oder EGTA ausgelöst wurde, hnRNPC1/C2 Proteine gespalten werden (117). Diese Spaltung führt sowohl zu einem verkürzten hnRNP C1, als auch hnRNP C2 Protein. Die gleichen Spaltprodukte wurden *in vitro* durch Caspase 3, Caspase 6 und Caspase 7 generiert. In der eindimensionalen Western Blot Analyse wurde gezeigt, daß die Spaltprodukte des hnRNP C1/C2 Proteins nach anti-IgM induzierter Apoptose nicht identisch sind mit den publizierten Fragmente. Die Spaltung von hnRNP C1/C2 Proteinen ist hier eventuell auf die Aktivität anderer Caspasen, die andere Spaltstellen erkennen, oder die Spaltung der gleichen Caspasen an anderen Stellen zurückzuführen. Die Spaltstellen sollen in weiteren Experimenten sequenziert und die Bedeutung der Spaltung während der anti-IgM induzierten Apoptose untersucht werden. Die zweidimensionale Western Blot Analyse, mit einem spezifischen Antiserum, zeigte für die hnRNP C1/C2 Proteine eine Änderung der Lage im 2-D Gel. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, das die hnRNP C1/C2 Proteine nach Apoptose-Induktion nicht nur gespalten, sondern auch modifiziert werden.

Die hnRNP K Proteine kommen in verschiedenen Isoformen vor, wobei die Funktion dieser Isoformen bisher ungeklärt ist. hnRNPK Proteine binden an CT- reiche Regionen der RNA, an doppelsträngiger DNA, aber bevorzugt an einzelsträngiger DNA. Es sind bisher nur wenige Gene

bekannt, die durch hnRNP K transkriptionell reguliert werden. Es wurde allerdings gezeigt, daß hnRNP K die CT-Reporter gesteuerte Gen-Expression von c-myc aktiviert und *in vivo* im Promotor von c-myc bindet (116). In dieser Arbeit konnten hnRNP K Proteine 24 Stunden nach anti-IgM induzierter Apoptose im silbergefärbten 2D-Gel nicht mehr detektiert werden, was durch eine starke Abnahme der Expression oder der Degradierung der mRNA als Folge der Apoptoseinduktion begründet sein kann. In einer Northern Blot Analyse konnte allerdings keine Abnahme der hnRNP K mRNA Menge beobachtet werden. Die Abnahme der hnRNP K Proteinmenge während der anti-IgM induzierten Apoptose ist somit auf eine Regulation der Translation, der Proteinstabilität oder ebenfalls durch eine Caspase Spaltung bedingt. Allerdings konnten in der eindimensionalen und der zweidimensionalen Western Blot Analyse keine Spaltprodukte des hnRNP K Proteins detektiert werden. Die funktionelle Rolle des hnRNP K Proteins während der anti-IgM induzierten Apoptose soll in weiteren Experimenten untersucht werden.

6.2 Der Transkriptionsfaktor SP1 während der anti-IgM induzierten Apoptose

Der humane Transkriptionsfaktor SP1 wird in fast allen humanen Zellen exprimiert, wobei die Expressionsstärke, abhängig vom Zelltyp variiert und sich mit dem Entwicklungszustand der Zelle ändert. SP1 bindet an Methyl-CG-Sequenzen verschiedene Promotoren, sowohl gewebsspezifischer, als auch ubiquitärer Gene über eine Zink-Finger-Domäne (119). Die verschiedenen Domänen des 95/105 KDa (nicht glycosylierte/glycosylierte Form) Proteins wurden von Kadonaga et al. sowohl biochemisch, als auch strukturell charakterisiert. N-terminale Deletionsmutanten zeigten, das die 168 C-terminalen Aminosäuren des Proteins die DNA-Bindungsdomäne enthalten. In diesem Bereich liegen die 3 Zink Finger Motive. Die transkriptionelle Aktivität des dieses Deletionsproteins nimmt deutlich ab. Die Transaktivierungsdomäne liegt somit N-terminal der DNA-Bindungsdomäne innerhalb der letzten 327 C-terminalen Aminosäuren (120, 121).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, das der Transkriptionsfaktor SP1 nach anti-IgM induzierter B-Zell Apoptose in ein 68 KDa und ein 45 KDa großes Fragment gespalten wird. Der Zeitpunkt der Spaltung wurde in einer eindimensionalen Western Blot Analyse bestimmt. Acht Stunden nach anti-IgM Induktion wurde zunächst das 68 KDa große Fragment, 16 Stunden nach Induktion das 45 KDa große Fragment detektiert. Das 95/105 KDa große Protein war nach 24 Stunden anti-IgM Induktion hingegen nur noch schwach zu detektieren. Die Spaltung des SP1 Proteins konnte wie zuvor für das hnRNPA1 und D4-GDI Protein gezeigt, durch die Zugabe des Caspase-Inhibitors z-DEVD-fmk gehemmt werden.

In einem *in vitro* Assay wurden die gleichen Spaltprodukte (68 KDa, 45 KDa), die zuvor *in vivo* nach anti-IgM Induktion detektiert wurden, generiert. In dieser Arbeit konnte somit ein weiteres Protease Substrat der Caspase 3 Familie identifiziert werden, dessen Bedeutung in der anti-IgM induzierten Apoptose in einem *electro mobility shift assay* näher untersucht wurde (Abb. 22). Die Intensität der drei SP1 spezifischen DNA-Komplexe (glycosylierte/nicht glycosylierte Form) nahm nach anti-IgM induzierter Apoptose ab. Nach 10 Stunden wurde ein kleinerer Komplex detektiert, der nach 24

Stunden in Intensität noch zunahm. Die Spezifität der SP1/DNA-Komplexe wurde mit einer mutierten SP1 Bindungssequenz betätigt. Dieser kleinere Komplex ließ darauf schließen, daß eines der beiden Spaltprodukte an die spezifische DNA-Bindungssequenz bindet. Da das 45 KDa große Spaltprodukt im Western Blot detektierbar ist und die Antikörper Bindungsstelle bekannt ist (Aminosäure 215-217 C-terminal) muß dem 45 KDa großen SP1 Spaltprodukt der N-Term fehlen, oder ein Teil des N-Terms und des C-Terms.

Die Spaltung führt möglicherweise zu einem nicht funktionellen Transkriptionsfaktor. Inwieweit die Transaktivierungsaktivität des Transkriptionsfaktors von der Spaltung betroffen ist, wird momentan in einem β -Galaktosidase Reporter Assay untersucht. Möglicherweise wird durch die Spaltung ein dominant negativ wirkender Transkriptionsfaktor generiert, der wiederum für die transkriptionelle Regulation anderer Gene verantwortlich ist.

6.3 Die Rolle der Caspasen während der anti-IgM induzierten Apoptose

Die Rolle der Caspasen, Apoptose-spezifischer Proteasen, während der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose war bisher völlig ungeklärt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Proteasen der Caspase 3 Familie eine zentrale Bedeutung in der anti-IgM induzierten Apoptose haben.

Im subtraktiven Vergleich der Proteinmuster apoptotischer und nicht apoptotischer BL60-2 Zellen wurden Proteinspots identifiziert, die nach Apoptose-Induktion differentiell erschienen. Durch Edman Abbau und/oder Massenspektrometrie wurden einige dieser Spots als Fragmente von verschiedenen Proteinen identifiziert. Die Spaltung in distinkte Fragmente im Verlauf der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose wurde in der eindimensionalen Western Blot Analyse bestimmt. Das D4-GDI Protein, hnRNP A1-, hnRNP C1/C2-, hnRNP K-Protein, sowie der humane Transkriptionsfaktor SP1 werden gespalten (6.1, 6.2). Da die molekularen Mechanismen der Apoptose evolutionär konserviert sind, und Moleküle der bcl-2 Familie und der Caspasen bereits in verschiedenen Zelltypen als Regulatoren der Apoptose beschrieben wurden, lag die Vermutung nahe, daß auch die Proteinspaltungen während der anti-IgM induzierten Apoptose durch Caspasen ausgelöst werden. Mit dem Tetrapeptid Inhibitor z-DEVD-fmk, der spezifisch für Proteasen der Caspase 3 Familie ist, konnte die Spaltung der Proteine nach anti-IgM Induktion der BL60-2 Zellen gehemmt werden. Dabei stellt DEVD die Erkennungssequenz für Proteasen der Caspase 3 Familie dar. Z-DEVD-fmk ist zellpermeabel und bindet irreversibel im aktiven Zentrum der Caspasen, wodurch diese inaktiviert werden. Der Tetrapeptid Inhibitor ist allerdings nicht nur für Caspase 3 spezifisch. Für Caspase 6 und Caspase 7 wurde ebenfalls eine Hemmung durch z-DEVD-fmk gezeigt (46). Für das D4-GDI wurde bereits gezeigt, daß es durch Caspase 3, *in vivo* und *in vitro* gespalten wird (122). Allerdings kann diese Spaltstelle auch von Caspase 7 erkannt werden. Die Spaltung des D4-GDI Proteins kann also eventuell durch Caspase 3 oder 7 erfolgen, die Spaltung von SP 1 durch Caspase 3, 6 oder 7, wobei Caspase 6 und 7 *in vitro* durch Caspase 3 aktiviert werden können. Welche Caspase nun für die Spaltung der einzelnen Proteine *in vivo* verantwortlich ist, läßt sich aufgrund der mangelnden Selektivität der Caspase-Inhibitoren zur Zeit nicht klären.

Für den humanen Transkriptionsfaktor SP1 konnte in dieser Arbeit *in vitro* gezeigt werden, daß

Caspase 3 und Caspase 7 die gleichen Fragmente generieren (68 und 45 KDa), die zuvor *in vivo* detektiert wurden. Caspase 7 hingegen spaltet rekombinantes SP1 hauptsächlich in ein 68 KDa großes Fragment (Abb. 21). Caspase 3 oder Caspase 7 sind somit wahrscheinlich auch *in vivo* für die SP1 Spaltung verantwortlich. Ob Caspase 3 dabei zuerst aktiviert wird und dann Caspase 7 aktiviert, bleibt unklar. Eine Kaskade ähnliche Aktivierung der Caspase wurde bisher für die Fas und TNF-Rezeptor induzierte Apoptose gezeigt. Es wurde bereits postuliert, daß Caspase 3 und 6 die wichtigsten Proteasen im Prozeß der Apoptose sind (123).

Die Spaltung der in dieser Arbeit identifizierten Proteine erfolgte also nicht durch unspezifische Proteolyse, sondern durch spezifische Spaltung der Caspasen, was die Befunde unterstreicht, das Apoptose ein hochregulierter Prozeß ist, der durch bestimmte biochemische Prozesse zu gerichteten morphologischen Änderungen der Zelle führt.

In einem colorimetrischen Assay wurde die Caspase Aktivität während der anti-IgM induzierten Apoptose bestimmt. Die Caspase Aktivität nahm bereits nach 2 Stunden anti-IgM Inkubation zu, steigt bis 8 Stunden stark an und erreichte ihr Maximum nach 16 Stunden. Nach 27 Stunden anti-IgM Induktion nimmt die Aktivität bereits langsam ab (Abb.23). Diese Befunde stimmen mit den Spaltkinetiken des D4-GDI, hnRNP A1 und SP1 Proteins überein. In der Western Blot Analyse konnten erste Spaltprodukte nach 8 Stunden anti-IgM induzierter Apoptose identifiziert werden. Nach 24 Stunden waren die Proteine beinahe vollständig gespalten.

Die zentrale Bedeutung der Proteasen der Caspase 3 Familie während der anti-IgM induzierten Apoptose wurde ebenfalls durch die z-DEVD-fmk bedingte Hemmung der Apoptose-spezifischen morphologischen Veränderungen belegt. Nicht nur die Spaltung bestimmter Proteine, sondern auch die Apoptose-spezifische Kernfragmentierung (Abb. 16), sowie die Translokation von Phosphatidylserin auf die Membranoberfläche konnten gehemmt werden (Abb. 17).

Ebenso wurde gezeigt, daß die meisten Änderungen auf Proteinebene die zuvor im 2D-Gel identifiziert wurden, durch den Caspase-Inhibitor z-DEVD-fmk gehemmt werden können. Ein Vergleich der 2D-Proteinmuster von BL60-2 Zellen, die vor der anti-IgM Induktion mit z-DEVD-fmk inkubiert wurden und unstimulierten Zellen zeigten auch für das P0, Lamin B1, Nucleolin und hnRNP C1/C2 eine Hemmung der anti-IgM induzierten Veränderungen (101). Es bleibt dabei zu klären, ob alle Veränderungen im Proteinmuster direkt auf die Spaltung durch Caspasen zurückzuführen sind.

Proteinspots, die in Intensität nach anti-IgM induzierter Apoptose abnehmen, wurden entweder direkt durch eine Caspase gespalten, oder die Transkription dieser Proteine wurde abgeschaltet. Die veränderte Transkription könnte wiederum durch die Spaltung von Transkriptionsfaktoren wie SP1 oder hnRNPK bedingt sein und wäre dann ebenfalls durch den Caspase-Inhibitor hemmbar. Außerdem können Proteine, die für die Stabilität von Transkripten (hnRNP Proteine) oder Proteinen verantwortlich sind, durch Caspasen gespalten werden, was dann ebenfalls zu einer Zu- oder Abnahme der Intensität des entsprechenden Proteinspots im 2D-Gel führen würde und durch z-

DEVD-fmk hemmbar wäre.

Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Proteasen der Caspase 3 Familie zentrale Regulatoren während der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose sind. Möglicherweise sind die Caspasen aber auch direkt im Apoptose-Signaltransduktionsweg, initiiert über das membranständige IgM beteiligt, ähnlich wie es für die Apo1/Fas oder TNF induzierte Apoptose gezeigt wurde. Die hier identifizierten Caspase Substrate stellen eventuell wichtige Effektoren im Verlauf der Apoptose dar, deren Spaltung für den weiteren Verlauf der Apoptose von entscheidender Bedeutung sein kann. In der folgenden Abbildung sind die wichtigsten molekularen Veränderungen und Effektoren der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose, die in dieser Arbeit identifiziert werden konnten, zusammenfassend dargestellt (Abb. 31).

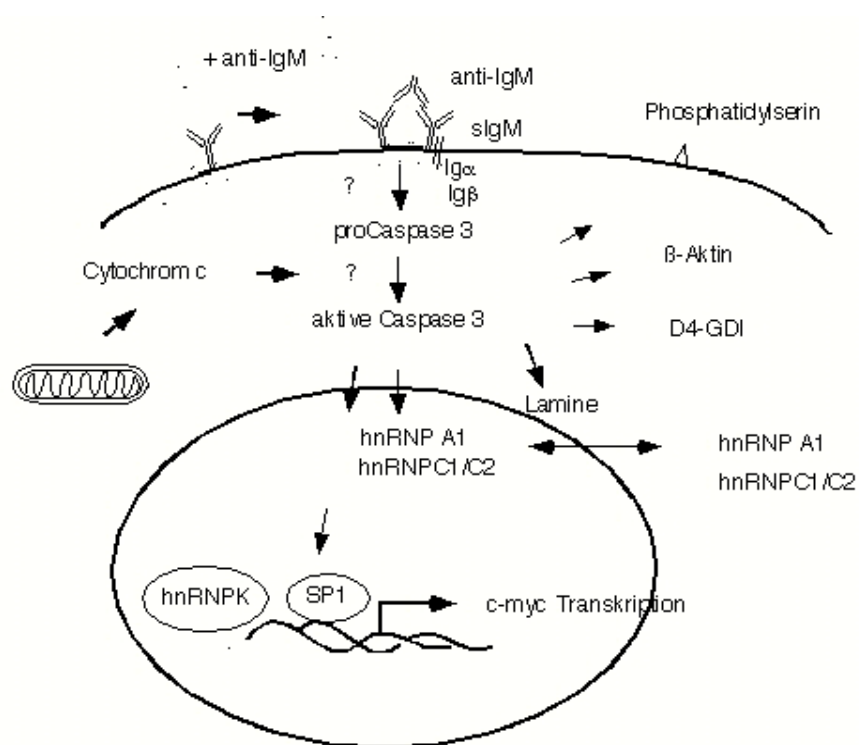


Abb. 31 Modell der molekularen-Prozesse während der anti-IgM induzierten B-Zell Apoptose Die Vernetzung der membranständigen Immunglobuline M durch anti-IgM F(ab)₂-Fragmente führt zur Apoptoseinduktion über die IgM assoziierten Moleküle IgaAlpha und Igβ. Dies hat die Aktivierung der Apoptose-spezifischen Caspase 3 durch proteolytische Spaltung der proCaspase 3 zur Folge. Die aktive Caspase 3 spaltet verschiedene Substrate eventuell über die Aktivierung weiterer Proteasen der Caspase 3 Familie. HnRNP A1, hnRNP C1/C2, β-Aktin, D4-GDI, Lamine, sowie SP1 werden nach anti-IgM Induktion der BL60-2 Zellen gespalten. Die hnRNP K Proteinmenge nimmt nach anti-IgM induzierter Apoptose stark ab. HnRNP K und SP1 sind somit eventuell für die transkriptionelle Regulation von Genen während der Apoptose verantwortlich. Die Aktivierung der Caspasen hat ebenfalls die Translokation von Phosphatidylserin auf die Zelloberfläche zur Folge.

6.4 Methoden zur Identifikation Apoptose-assoziiierter Gene

Im zweiten Teil der Arbeit sollten über die Methoden der differentiellen Hybridisierung und subtraktiven Klonierung Gene identifiziert werden, die während der anti-IgM induzierten B-Zell

Apoptose differentiell exprimiert werden.

Dazu wurden zunächst hochtitrige lambda-Zap cDNA-Phagenbanken von stimulierten und nicht stimulierten BL41-3s Zellen hergestellt. Ebenfalls wurde eine subtraktive lambda-Zap cDNA-Phagenbank hergestellt, in der Apoptose-spezifische Sequenzen angereichert wurden. Die lambda-Zap cDNA-Phagenbank der stimulierten Zellen und die subtraktive cDNA-Phagenbank wurden ausplattiert und auf differentiell exprimierte Gene durchmustert.

Differentielles Screening von lambda-Zap cDNA-Phagenbanken

Die differentielle Hybridisierung erfolgte mit einer cDNA-Sonde aus B-Zellen, die zuvor 4 h mit anti-IgM induziert wurden oder mit einer zuvor subtrahierten Probe im Vergleich zu einer cDNA-Sonde aus unstimulierten B-Zellen.

Um die große Zahl der gepickten Klone einzuengen und falsch positive Klone zu eliminieren, wurden sie erneut in einer Slot Blot Analyse differentiell hybridisiert. Klone, die in der Slot Blot Analyse ebenfalls differentiell hybridisierten, wurden in einer Run-on- und Northern Blot -Analyse auf ihre differentielle Expression überprüft.

Alle Hybridisierungsansätze, wie auch die Run-on-Analyse und die Northern Blot Analyse ließen keine eindeutige Identifikation Apoptose-spezifischer Sequenzen zu. Die differentielle Expression der in der Slot Blot Analyse und Run-on-Analyse identifizierten Klone konnte in der Northern Blot Analyse nicht bestätigt werden.

Ein möglicher Grund dafür ist die geringe Sensitivität der B-Zelllinie auf den anti-IgM Stimulus. Nur 40-60 Prozent der B Zellen sterben auf den Stimulus durch Apoptose, gemessen am prozentualen Anteil fragmentierter Kerne. Diese Zellen waren Ausgangsmaterial für die Herstellung einer lambda-Zap cDNA-Phagenbank nach 4 Stunden anti-IgM Stimulation, die auf Apoptose-spezifische Sequenzen durchmustert wurde. Somit sind nur ca. 50 Prozent der klonierten Sequenzen spezifisch für Zellen, in denen das Apoptose-Programm initiiert wurde.

Diese lambda-Zap cDNA-Phagenbanken wurden dann mit radioaktiv markierter cDNA von nicht stimulierten im Vergleich zu radioaktiv markierter cDNA von stimulierten Zellen hybridisiert, wobei ca. 3-10 Prozent der Burkitt-Lymphom Zellen der nicht stimulierten Population durch Spontanapoptose starben und ca. 50 Prozent der stimulierten Zellen nicht apoptotisch waren.

Eine weitere Fehlerquelle ist die Qualität der RNA apoptotischer und nicht apoptotischer Zellen, die als Ausgangsmaterial für die radioaktiven cDNA Sonden dienten. Sowohl die RNA Präparation, als auch die cDNA-Synthese müssen, ebenso wie die radioaktive Markierung, qualitativ absolut identisch sein, um die Hybridisierungen mit beiden Proben vergleichen zu können. Schon geringe Qualitätsunterschiede führen zu Hybridisierungsunterschieden und zur Isolierung falsch positiver Klone.

Ein weiteres Problem stellt die nicht synchronisierte Zellpopulation dar. Zum Zeitpunkt der anti-IgM

Stimulation befinden sich die Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus und reagieren somit mit zeitlicher Verzögerung auf den Stimulus. Es wurde bereits für die Mauszelllinie WEHI 231 gezeigt, daß die Zellen nach anti-IgM Stimulation zunächst in der G1 Phase im Zellzyklus arretieren, bevor das Apoptose Programm initiiert wird.

Die mangelnde Spezifität der lambda-Zap cDNA-Phagenbank und der Sonden ist somit Grund für die falsch positiven Hybridisierungsergebnisse des Screens der Phagenbanken, der Slot Blot- und Run-on-Analysen.

Subtraktive lambda-Zap cDNA-Phagenbank und subtraktive Proben

Häufig handelt es sich bei Genen, die nach Apoptose-Induktion spezifisch exprimiert werden um Gene, die im Verhältnis zu "house keeping" Genen einer Zelle in einer sehr geringen Kopienzahl vorliegen. Während "house keeping" Gene, wie z.B. β -Aktin, bis zu 10 Prozent der mRNA Moleküle einer Zelle repräsentieren, stellen Transkriptionsfaktoren wie Nak-1 ca. 0,1-0,01 Prozent der mRNA einer Zelle dar. Eine gute Subtraktion gemeinsamer Sequenzen ist somit wichtige Voraussetzung für die Isolierung spezifischer Sequenzen. Eine Erhöhung der Sensitivität sollte mit einer subtraktiven cDNA-Phagenbank und dem Screening mit einer subtrahierten Probe, in denen Apoptose-spezifische Sequenzen angereichert wurden, erreicht werden. Gemeinsame Sequenzen der stimulierten und nicht stimulierten Zellen wurden durch Hybridisierung abgetrennt und Apoptose-spezifische in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die Subtraktionseffizienz wurde anhand einer Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde für das konstitutiv exprimierte β -Aktin Gen überprüft. Die subtraktive cDNA-Phagenbank zeigte ca. 5 % positiv hybridisierende β -Aktin Sequenzen, was auf eine Reduzierung dieser Sequenzen hinwies. Eine Hybridisierung mit einer Sonde für das Gen Nak-1, für das bereits gezeigt wurde, daß es Apoptose-spezifisch exprimiert wird, bewies eine Anreicherung dieser differentiell exprimierten Sequenzen. Ein Southern Blot der subtrahierten Probe mit einer β -Aktin Sonde zeigte ebenfalls eine deutliche Abnahme dieser Sequenzen nach Subtraktion (s. Abb. 26).

Trotz einer Anreicherung Apoptose-spezifischer Sequenzen und der Reduktion gemeinsamer Sequenzen, stellte sich heraus, daß nach der differentiellen Hybridisierung der lambda-Zap cDNA-Phagenbanken ebenfalls keine Klone identifiziert werden konnten, deren differentielle Expression sich in der Northern Blot Analyse bestätigen ließ.

Mögliche Gründe werden kurz diskutiert:

Für die Subtraktion wurde ein 10-facher Überschuß nicht apoptotischer RNA-Sequenzen mit komplementären Sequenzen apoptotischen Zellen hybridisiert. Das Problem stellt auch hier der Anteil spontan apoptotischer Zellen in der unstimulierten Zellpopulation und die 50 Prozent der induzierten Zellen dar, die nicht sensitiv auf den Stimulus sind.

Bei der Herstellung der subtraktiven cDNA-Phagenbank, wie der subtrahierten Probe folgte im letzten Schritt die Amplifikation der angereicherten Sequenzen in einer Polymerase- Kettenreaktion.

Die Polymerasekettenreaktion ist eine exponentielle Reaktion und verläuft nur in den ersten Zyklen linear. Schlecht subtrahierte Sequenzen, ausgehend von der Anzahl der Moleküle in der Ausgangsreaktion, werden so mit unterschiedlicher Effizienz amplifiziert. Selbst wenn gemeinsame Sequenzen konstitutiv exprimierter Gene, die in verhältnismäßig großer Zahl in der Zelle vorhanden sind, zuvor stark dezimiert wurden, werden sie eventuell in der PCR Reaktion wieder vervielfältigt und angereichert. Die Amplifikation kann somit Verhältnisse zwischen differentiell exprimierten, die meist schwach exprimiert sind (Nak-1, bax-alpha) und den konstitutiv exprimierten Sequenzen verschieben.

Eine Sensitivitätserhöhung durch eine effizientere Subtraktion gemeinsamer Sequenzen apoptotischer und nicht apoptotischer Zellen sollte die differentielle Klonierung über die klassische Hydroxyapatit-Chromatographie bieten. Dabei wurde die poly(A)⁺-RNA zunächst in zwei hintereinandergeschalteten Hybridisierungsschritten aus dem Pool Gesamt-RNA isoliert. Dieser Schritt dezimiert t-RNA und r-RNA Sequenzen, die ca. 98 % der Gesamt-RNA einer Zelle ausmachen. Die cDNA apoptotischer Zellen wurde dann zweimal mit je 5-fachem Überschuß komplementärer poly(A)⁺-RNA nicht stimulierter Zellen hybridisiert. Nicht hybridisierende, einzelstängige Sequenzen sollten spezifisch für Apoptose stimulierte Zellen sein und wurden durch die Phosphat-Pufferkonzentration von cDNA/mRNA Hybriden auf Hydroxyapatit-Säulen getrennt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. In der anschließenden positiven Selektion sollten nur Apoptose-spezifische Sequenzen hybridisieren. Diese Sequenzen wurden isoliert und kloniert.

Die erfolgreiche Anreicherung spezifischer Sequenzen über die Hydroxyapatit-Chromatographie zeigte die Dot Blot Hybridisierung mit der radioaktiv markierten subtrahierten Probe im Vergleich zu einer cDNA aus unstimulierten BL60-2 Zellen (Abb. 29). Gene, für die bereits bekannt war, daß sie nach anti-IgM induzierter Apoptose verstärkt exprimiert werden, hybridisieren stark mit der subtrahierten Probe (bax-alpha, Nak 1, bak). Konstitutiv exprimierte Sequenzen, wie β -Aktin hybridisieren nicht, was auf eine fast vollständige Subtraktion dieser Sequenzen schließen läßt. Ein Nachteil dieser Methode ist, daß in der anschließenden PCR Reaktion die synthetisierte DNA nicht hemimethyliert werden kann. Die DNA kann so nicht vor Restriktionsschnitten geschützt werden. Durch die EcoRI Klonierung werden deshalb sehr kurze Sequenzen erhalten, die häufig keinen bekannten Sequenzen der Datenbank zugeordnet werden können (s. Tab. 3). Die meisten über diese Methode isolierten Sequenzen sind somit unbekannt, d.h. ein Sequenzvergleich mit schon bekannten Sequenzen von Genen in der DNA-Datenbank (NCBI) zeigte keine Homologie (ca. 90 Prozent der sequenzierten Klone). Da die cDNA Synthese durch den poly(dT) Primer initiiert wurde, befinden sich viele dieser sehr kurzen Sequenzen im 3'-untranslatierten Bereich, der für viele Gene nicht genau identifiziert ist. Die unbekannt Sequenzen sollen in weiteren Versuchen auf ihre differentielle Expression während der anti-IgM induzierten Apoptose untersucht werden. Es wurden zwei Klone identifiziert, die eine hohe Homologie zu einem bakteriellen *Acriflavin resistance* Protein, MexB besitzen. In einer Northern Blot Analyse sollte die differentielle Expression während der anti-IgM induzierten Apoptose überprüft werden. Es konnte aber keine spezifische Expression

nachgewiesen werden, was auf eine schwache Expression hinweist. Hingegen konnte die gewebsspezifische Expression in einer Northern Blot Analyse auf dem 2 µg poly(A)⁺-RNA verschiedener humaner Gewebe aufgetrennt werden, gezeigt werden (Abb. 30). Die spezifische Hybridisierung zeigte, daß ein humanes Homologes existiert. Die komplette cDNA-Sequenz soll in folgenden Experimenten kloniert werden. Außerdem soll die spezifische Expression in einem poly(A)⁺-RNA Blot während der anti-IgM Stimulation überprüft werden.

6.4.1 Vergleich proteinchemischer und molekularbiologischer Methoden

Die hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung der Proteine einer Zelle in immer wieder reproduzierbaren Mustern in zwei Dimensionen. So können differentielle Proteinspots apoptotischer und nicht apoptotischer Zellen leicht identifiziert werden. Allerdings sind die Färbemethoden limitierend. Bei der hochauflösenden gelelektrophoretischen Trennung aller Proteine einer Zelle können nur ca. 30 Prozent der Proteine nach Silberfärbung der Gele detektiert werden. Dabei sind Proteine wie Transkriptionsfaktoren oder andere wichtige regulatorische Proteine, die nur in geringer Kopienzahl im Vergleich zu Strukturproteinen in einer Zelle vorliegen, schwer zu detektieren.

Die Silberfärbung ist gegenüber der Coomassie Färbung eine sehr sensitive Methode. Silbergefärbte Proteine können aber aufgrund des Glutaraldehyds nicht für die Proteinsequenzierung und Massenspektrometrische Analyse eingesetzt werden und müssen dem Coomassie gefärbten 2D-Gel zugeordnet werden, was nicht immer möglich ist.

Eine wichtige Voraussetzung zur Sensitivitätserhöhung ist deshalb die Vorfraktionierung. Durch die Fraktionierung kann die Komplexität der Proteine reduziert und in größerer Menge auf dem Gel aufgetrennt werden. In dieser Arbeit konnte eine Sensitivitätserhöhung durch die magnetische Trennung apoptotischer von nicht apoptotischen Zellen erreicht werden. Um besonders regulatorische Proteine der Apoptose, die im Kern und den Mitochondrien lokalisiert sind, zu identifizieren, sollen in weiteren Versuchen diese Zellbestandteile zuvor fraktioniert und dann in der zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt werden.

DNA Methoden wie subtraktive Klonierungen oder differentielle Hybridisierungen bieten den Vorteil der höheren Sensitivität gegenüber proteinchemischen Methoden. Viele der in den letzten Jahren identifizierten Transkriptionsfaktoren, die in der Regulation zellulärer Differenzierung oder im Zusammenhang mit der Apoptose identifiziert wurden, wurden über differentielle Hybridisierungen (z.B. Nur 77, das murine Homologon zu Nak1), oder die Differential Display Methode identifiziert. Diese Transkriptionsfaktoren werden zu schwach exprimiert, um in der 2D-Gelelektrophorese mit Gesamtzellsatzen identifiziert werden zu können. Andere Proteine können aufgrund ihres extremen isoelektrischen Punktes oder ihrer sehr kleinen oder sehr großen Masse im 2D-Gel nicht identifiziert werden.

Die DNA Methoden bieten somit gegenüber proteinchemischen Methoden den Vorteil, daß selbst Transkripte, von denen nur wenige Kopien (n) pro Zelle vorliegen, in 30 Zyklen einer PCR n³⁰ mal

amplifiziert werden. Diese Amplifikation hat andererseits den Nachteil, daß sie nur in den ersten Zyklen linear ist und kurze Sequenzen preferentiell amplifiziert werden.

Die Anreicherung differentiell exprimierter Sequenzen über Subtraktionen bedingt eine Amplifikation der nicht hybridisierten Sequenzen, was bei schlechter Subtraktionseffizienz häufig zur Amplifikation konstitutiv exprimierter Sequenzen führt, die dann als falsch positive Sequenzen isoliert werden. Andererseits reichen kurze DNA Sequenzen eines differentiell exprimierten Gens aus, um über den Screen einer cDNA-Phagenbank oder in einer RACE-PCR das gesamte Gen zu identifizieren.

Phagenbanken können ebenfalls dazu verwendet werden, die entsprechenden kodierenden Gene der Proteinfragmente, die im subtraktiven Vergleich der Proteinmuster stimulierter und nicht stimulierter BL60-2 Zellen erhalten wurden und keiner bekannten Sequenz zugeordnet werden konnten, zu identifizieren. Dazu ist es nötig, möglichst lange Peptidsequenzen durch Edmann Abbau zu erhalten. Aufgrund dieser Aminosäuresequenzen können dann kurze Oligonukleotide hergestellt, und die spezifische DNA-Sequenz in einer Polymerase Kettenreaktion vervielfältigt werden. Diese spezifischen DNA-Fragmente werden radioaktiv markiert und können als Sonde für den spezifischen *Screen* einer cDNA-Phagenbank eingesetzt werden. Unbekannte Gene, die während der anti-IgM stimulierten Apoptose eine Rolle spielen, können so isoliert werden.

Die Kombination der Methoden bietet somit optimale Möglichkeiten, sowohl differentiell exprimierte Gene, als auch Proteine und ihre Modifikationen zu identifizieren.

Zusammenfassung

Apoptose spielt eine entscheidende Rolle bei der Generierung eines funktionellen Lymphozyten-repertoires. Die anti-IgM induzierte B-Zell Apoptose ist dabei ein wichtiger Mechanismus, bei dem autoreaktive Zellen eliminiert werden. Die molekularen Mechanismen der Apoptose sind aber weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit sollten Proteine und Gene identifiziert werden, die an der Apoptose beteiligt sind.

Etablierung eines B-Zell Modellsystems

Durch extensive Subklonierung wurde ein Subklon der humanen Burkitt Lymphom Zelllinie BL60 generiert, bei dem nach 24 Stunden anti-IgM Stimulation 40-60 Prozent der Zellen durch Apoptose sterben. Um reine Fraktionen für die folgenden Analysen zu erhalten, wurde eine Methode entwickelt, in der apoptotische, Phosphatidylserin positive Zellen, über eine magnetische Separation mit einer Reinheit von bis zu 99 Prozent angereichert werden können.

Identifikation Apoptose-assoziiierter Proteine

Die aufgereinigten Fraktionen wurden in der hochauflösenden 2D-Gelelektrophorese analysiert. In Kooperation mit der Gruppe von Prof. B. Wittman-Liebold am MDC Berlin, konnten im Vergleich apoptotischer und nicht apoptotischer 2D-Proteinmuster ca. 80 differentielle Spots identifiziert werden. Veränderungen im Proteinmuster können dabei auf Änderungen der Transkription, der Translation, aber auch auf Stabilitätsänderungen der mRNA oder Proteine, wie auf Modifikationen und Proteinspaltungen zurückzuführen sein. Durch massenspektrometrische Analysen und Edman Abbau konnten bisher 15 der 80 differentiellen Proteinspots identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die folgenden Proteine: Lamin B1, β -Aktin, neutrales Calponin, Nucleolin, einen Inhibitor für Rho-GTPasen, das D4-GDI, Proteine des Ribonukleokomplexes hnRNP A1, hnRNP C1/C2, hnRNP K, ein Lymphozyten spezifisches Protein LSP1, das DNA Reparatur Protein HHR23B, das FUSE binding Protein, dUTPase, das P0 ribosomale Protein, sowie ein Heterochromatin Protein (HP1 alpha). Die Proteine der hnRNP Familie und D4-GDI wurden näher untersucht.

In einer eindimensionalen Western Blot Analyse konnte die Spaltung des D4-GDI in ein 23 KDa großes Spaltprodukt nach 8 Stunden anti-IgM Induktion, sowie die Spaltung des hnRNP A1 Proteins in drei Fragmente, ein 30 KDa, ein 19 KDa und 16 KDa großes Fragment nach 8, 16 und 24 Stunden bestimmt werden. Daß es sich hierbei nicht um unspezifische Degradation handelt, konnte durch die Zugabe eines Tetrapeptidinhibitors z-DEVD-fmk, der Apoptose-spezifische Proteasen der Caspase 3 Familie hemmt, gezeigt werden. Diese Hemmung Apoptose-spezifischer Veränderungen wurde ebenfalls in der 2D-Gelelektrophorese für das β -Aktin, P0, Lamin B1, Nucleolin, hnRNP C1/C2 gezeigt.

Der Transkriptionsfaktor SP1 und die Rolle der Caspasen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Transkription des proliferationsabhängigen Transkriptionsfaktors c-myc während der anti-IgM induzierten Apoptose abgeschaltet wird. Um die Regulation des c-myc Gens zu untersuchen, wurden weitere, im Promotor bindende Proteine, im Western Blot analysiert. Dabei wurde die spezifische Spaltung des Transkriptionsfaktors SP1 in ein 68 KDa großes Spaltprodukt nach 8 Stunden anti-IgM induzierter Apoptose und in ein 45 KDa großes Spaltprodukt nach 16 Stunden anti-IgM induzierter Apoptose detektiert. Die Spaltung ließ sich durch Zugabe von z-DEVD-fmk hemmen. In einem *elektro mobility shift assay* wurde gezeigt, daß die Intensität des SP1/DNA-Komplexes nach Apoptose-Induktion stark abnimmt, hingegen ein kleinerer Komplex an Intensität stark zunimmt. Dieses Ergebnis zeigt die DNA-Bindung eines der Spaltprodukte, das möglicherweise nicht mehr transkriptionell aktiv ist. Ebenfalls wurde gezeigt, daß SP1 *in vitro* durch Caspase 3 und 7 in ein 68 und 45 KDa großes Fragment gespalten wird, Caspase 6 hingegen nur ein 68 KDa großes Spaltprodukt generiert.

Der Inhibitor z-DEVD-fmk konnte auch die für die Apoptose charakteristischen, morphologischen Veränderungen, wie Kernfragmentierung und Phosphatidylserintranslokation auf die Zelloberfläche hemmen. Damit wurden die Proteasen der Caspase 3 Familie erstmalig als zentrale Regulatoren während der anti-IgM induzierten Apoptose identifiziert.

Identifikation Apoptose-assoziiierter Gene

Über verschiedene Methoden der differentiellen Hybridisierung, wie der subtraktiven Klonierung sollten Gene identifiziert werden, die während der anti-IgM induzierten Apoptose differentiell exprimiert werden und damit potentielle Regulatoren der Apoptose darstellen. Dazu wurden zunächst lambda-Zap cDNA-Phagenbanken von nicht stimulierten und anti-IgM stimulierten BL41-3s Zellen hergestellt. Die cDNA-Phagenbank der stimulierten Zellen wurde ausplattiert und mit radioaktiv markierter Gesamt-cDNA nicht stimulierter, und stimulierter Zellen im Vergleich, bzw. einer subtrahierten Probe hybridisiert. Ebenso wurde eine subtraktive cDNA-Phagenbank erstellt und differentiell hybridisiert. Die identifizierten Klone wurden in einer Slot Blot Analyse, und in einer Run-on- und Northern Blot -Analyse auf ihre differentielle Expression überprüft. Über die differentiellen Hybridisierungen der cDNA-Phagenbanken wurden im wesentlichen Sequenzen bekannter Gene identifiziert, deren differentielle Expression aber in der Northern Blot Analyse nicht bestätigt werden konnte.

Über die klassische Hydroxyapatit-Methode wurden ebenfalls Apoptose-spezifische Sequenzen angereichert, kloniert und sequenziert. Diese Klone waren zum größten Teil unbekannt, zeigten aber teilweise Homologien auf Proteinebene. So konnte eine Sequenz identifiziert werden, die eine Homologie zu einem bakteriellen *Acriflavin resistance* Gen (MexB) hat. Diese DNA-Sequenz eines bisher unbekanntes humanen Gens hybridisiert im *multiple tissue* Northern und wird spezifisch in Zellen des humanen Immunsystems, im Skelettmuskel und Herz exprimiert.

Literatur

1. Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**: 347-354.
2. Ellis, R.E., J. Yuan, and H.R. Horvitz (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**: 663-698.
3. Yuan, J. (1997). Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 247-451.
4. Frisch, S.M., and H. Francis (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* **124**: 619-626.
5. Green, D.R., R.P. Bissonnette, J.M. Glynn, and Y. Shi (1992). Activation-induced apoptosis in lymphoid systems. *Semin Immunol* **4**: 379-388.
6. Melchers, F., A. Rolink, U. Grawunder, T.H. Winkler, H. Karasuyama, P. Ghia, and J. Andersson (1995). Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* **7**: 214-227.
7. Beidler, D.R., M. Tewari, P.D. Friesen, G. Poirier, and V.M. Dixit (1995). The baculovirus p35 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* **270**: 16526-16528.
8. Martin, S.J., C.P. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, S.R. van, D.M. LaFace, and D.R. Green (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* **182**: 1545-1556.
9. Chinnaiyan, A.M., and V.M. Dixit (1996). The cell-death machine. *Curr Biol* **6**: 555-562.
10. Tsujimoto, Y., L.R. Finger, J. Yunis, P.C. Nowell, and C.M. Croce (1984). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**: 1097-1099.
11. Bargou, R.C., C. Wagener, K. Bommert, M.Y. Mapara, P.T. Daniel, W. Arnold, M. Dietel, H. Guski, A. Feller, H.D. Royer, and B. Dorken (1996). Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice. *J Clin Invest* **97**: 2651-2659.
12. Ashwell, J.D., N.A. Berger, J.A. Cidlowski, D.P. Lane, and S.J. Korsmeyer (1994). Coming to terms with death: apoptosis in cancer and immune development. *Immunol Today* **15**: 147-151.
13. Holtzman, D.M., and M. Deshmukh (1997). Caspases: a treatment target for neurodegenerative disease. *Nat Med* **3**: 954-955.
14. Hengartner, M.O., and H.R. Horvitz (1994). Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* **4**: 581-586.
15. Chinnaiyan, A.M., K. O'Rourke, B.R. Lane, and V.M. Dixit (1997). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* **275**: 1122-1126.
16. Pegoraro, L., A. Palumbo, J. Erikson, M. Falda, B. Giovanazzo, B.S. Emanuel, G. Rovera, P.C. Nowell, and C.M. Croce (1984). A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 7166-7170.
17. Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**: 440-442.
18. Tsujimoto, Y., and C.M. Croce (1986). Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 5214-5218.
19. Jansen, B., W.H. Schlagbauer, B.D. Brown, R.N. Bryan, E.A. van, M. Muller, K. Wolff, H.G.

- Eichler, and H. Pehamberger (1998). bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat Med* **4**: 232-234.
20. Chao, D.T., and S.J. Korsmeyer (1998). BCL-2 FAMILY: Regulators of Cell Death. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 395-419.
 21. Korsmeyer, S.J., J.R. Shutter, D.J. Veis, D.E. Merry, and Z.N. Oltvai (1993). Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* **4**: 327-332.
 22. Yin, X.M., Z.N. Oltvai, and S.J. Korsmeyer (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax [see comments]. *Nature* **369**: 321-323.
 23. Boise, L.H., G.M. Gonzalez, C.E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L.A. Turka, X. Mao, G. Nunez, and C.B. Thompson (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**: 597-608.
 24. Muchmore, S.W., M. Sattler, H. Liang, R.P. Meadows, J.E. Harlan, H.S. Yoon, D. Nettlesheim, B.S. Chang, C.B. Thompson, S.L. Wong, S.L. Ng, and S.W. Fesik (1996). X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**: 335-341.
 25. Apte, S.S., M.G. Mattei, and B.R. Olsen (1995). Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics* **26**: 592-594.
 26. Cheng, E.H., B. Levine, L.H. Boise, C.B. Thompson, and J.M. Hardwick (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* **379**: 554-556.
 27. Knudson, C.M., and S.J. Korsmeyer (1997). Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat Genet* **16**: 358-363.
 28. Knudson, C.M., K.S. Tung, W.G. Tourtellotte, G.A. Brown, and S.J. Korsmeyer (1995). Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* **270**: 96-99.
 29. Simonen, M., H. Keller, and J. Heim (1997). The BH3 domain of Bax is sufficient for interaction of Bax with itself and with other family members and it is required for induction of apoptosis. *Eur J Biochem* **249**: 85-91.
 30. Srinivasula, S.M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri, and E.S. Alnemri (1998). Autoactivation of Procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerisation. *Molecular Cell*: 949-957.
 31. Oltvai, Z.N., C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**: 609-619.
 32. Zha, H., and J.C. Reed (1997). Heterodimerization-independent functions of cell death regulatory proteins Bax and Bcl-2 in yeast and mammalian cells. *J Biol Chem* **272**: 31482-31488.
 33. Sattler, M., H. Liang, D. Nettlesheim, R.P. Meadows, J.E. Harlan, M. Eberstadt, H.S. Yoon, S.B. Shuker, B.S. Chang, A.J. Minn, C.B. Thompson, and S.W. Fesik (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**: 983-986.
 34. Hsu, S.Y., A. Kaipia, E. McGee, M. Lomeli, and A.J. Hsueh (1997). Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 12401-12406.
 35. Krajewski, S., M. Krajewska, A. Shabaik, H.G. Wang, S. Irie, L. Fong, and J.C. Reed (1994). Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* **54**: 5501-5507.
 36. Blagosklonny, M.V., P. Giannakakou, D.W. el, D.G. Kingston, P.I. Higgs, L. Neckers, and T. Fojo (1997). Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death.

Cancer Res **57**: 130-135.

37. Bardelli, A., P. Longati, D. Albero, S. Goruppi, C. Schneider, C. Ponzetto, and P.M. Comoglio (1996). HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *Embo J* **15**: 6205-6212.
38. Chang, B.S., A.J. Minn, S.W. Muchmore, S.W. Fesik, and C.B. Thompson (1997). Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2. *Embo J* **16**: 968-977.
39. Clem, R.J., E.H. Cheng, C.L. Karp, D.G. Kirsch, K. Ueno, A. Takahashi, M.B. Kastan, D.E. Griffin, W.C. Earnshaw, M.A. Veluona, and J.M. Hardwick (1998). Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 554-559.
40. Cheng, E.H., D.G. Kirsch, R.J. Clem, R. Ravi, M.B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno, and J.M. Hardwick (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* **278**: 1966-1968.
41. Reed, J.C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* **387**: 773-776.
42. Hockenbery, D., G. Nunez, C. Millman, R.D. Schreiber, and S.J. Korsmeyer (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**: 334-336.
43. Alnemri, E.S. (1997). Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* **64**: 33-42.
44. Han, Z., E.A. Hendrickson, T.A. Bremner, and J.H. Wyche (1997). A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 in vitro. *J Biol Chem* **272**: 13432-13436.
45. Kuida, K., T.S. Zheng, S. Na, C. Kuan, D. Yang, H. Karasuyama, P. Rakic, and R.A. Flavell (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* **384**: 368-372.
46. Villa, P., S.H. Kaufmann, and W.C. Earnshaw (1997). Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* **22**: 388-393.
47. Casciola, R.L., D.W. Nicholson, T. Chong, K.R. Rowan, N.A. Thornberry, D.K. Miller, and A. Rosen (1996). Apopain/ CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* **183**: 1957-1964.
48. Casciola, R.L., G.J. Anhalt, and A. Rosen (1995). DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J Exp Med* **182**: 1625-1634.
49. Emoto, Y., Y. Manome, G. Meinhardt, H. Kisaki, S. Kharbanda, M. Robertson, T. Ghayur, W.W. Wong, R. Kamen, R. Weichselbaum (1995). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *Embo J* **14**: 6148-6156.
50. Erhardt, P., K.J. Tomaselli, and G.M. Cooper (1997). Identification of the MDM2 oncoprotein as a substrate for CPP32-like apoptotic proteases. *J Biol Chem* **272**: 15049-15052.
51. Janicke, R.U., P.A. Walker, X.Y. Lin, and A.G. Porter (1996). Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *Embo J* **15**: 6969-6978.
52. Mashima, T., M. Naito, K. Noguchi, D.K. Miller, D.W. Nicholson, and T.R.A. Tsuruo (1997). Actin cleavage by cpp 32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene*. Mar **14**: 1007-1012.
53. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**: 96-99.
54. Liu, X., H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**: 175-184.

55. Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**: 43-50.
56. Zou, H., W.J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg, and X. Wang (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 [see comments]. *Cell* **90**: 405-413.
57. Spector, M.S., S. Desnoyers, D.J. Hoepfner, and M.O. Hengartner (1997). Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4. *Nature* **385**: 653-656.
58. Liu, X., C.N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson, and X. Wang (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**: 147-157.
59. Kluck, R.M., W.E. Bossy, D.R. Green, and D.D. Newmeyer (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis [see comments]. *Science* **275**: 1132-1136.
60. Kluck, R.M., S.J. Martin, B.M. Hoffman, J.S. Zhou, D.R. Green, and D.D. Newmeyer (1997). Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *Embo J* **16**: 4639-4649.
61. Bossy, W.E., D.D. Newmeyer, and D.R. Green (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* **17**: 37-49.
62. Kim, C.N., X. Wang, Y. Huang, A.M. Ibrado, L. Liu, G. Fang, and K. Bhalla (1997). Overexpression of Bcl-X(L) inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res* **57**: 3115-3120.
63. Rosse, T., R. Olivier, L. Monney, M. Rager, S. Conus, I. Fellay, B. Jansen, and C. Borner (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* **391**: 496-499.
64. Hockenbery, D.M., Z.N. Oltvai, X.M. Yin, C.L. Millman, and S.J. Korsmeyer (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**: 241-251.
65. Krammer, P.H., I. Behrmann, P. Daniel, J. Dhein, and K.M. Debatin (1994). Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol* **6**: 279-289.
66. Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto, and S. Nagata (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**: 233-243.
67. Mayumi, M., V. Ohshima, D. Hata, K.M. Kim, T. Heike, K. Katamura, and K. Furusho (1995). Igm mediated b cell apoptosis. *Critical Reviews In Immunology* **15**: 255-269.
68. Melamed, D., R.J. Benschop, J.C. Cambier, and D. Nemazee (1998). Developmental regulation of B lymphocyte immune tolerance compartmentalizes clonal selection from receptor selection. *Cell* **92**: 173-182.
69. Melchers, F., H. Karasuyama, D. Haasner, S. Bauer, A. Kudo, N. Sakaguchi, B. Jameson, and A. Rolink (1993). The surrogate light chain in B cell development. *Immunol. Today* **14**: 60-68.
70. Ishida, Y., G. Ueda, K. Noguchi, R. Nagasawa, S. Hirose, H. Sato, and T. Shirai (1987). Unique cell surface phenotypes of proliferating lymphocytes in mice homozygous for *lpr* and *gld* mutations, defined by monoclonal antibodies to MRL/Mp-*lpr/lpr* T cells. *Cell Immunol* **105**: 136-416.
71. Roths, J.B., E.D. Murphy, and E.M. Eicher (1984). A new mutation, *gld*, that produces lymphoproliferation and autoimmunity in C3H/HeJ mice. *J Exp Med* **159**: 1-20.
72. Itoh, N., and S. Nagata (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* **268**: 10932-10937.

73. Chinnaiyan, A.M., K. O'Rourke, M. Tewari, and V.M. Dixit (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**: 505-512.
74. Boldin, M.P., T.M. Goncharov, Y.V. Goltsev, and D. Wallach (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**: 803-815.
75. Hu, S., C. Vincenz, J. Ni, R. Gentz, and V.M. Dixit (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* **272**: 17255-17257.
76. Irmiler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L.E. French, and J. Tschopp (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**: 190-195.
77. Opstelten, D. (1996). B lymphocyte development and transcription regulation in vivo. *Adv Immunol* **63**: 197-268.
78. Cambier, J.C., C.M. Pleiman, and M.R. Clark (1994). Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. *Annu Rev Immunol* **12**: 457-486.
79. Lutz, C., B. Ledermann, V.M. Kosco, A.F. Ochsenbein, R.M. Zinkernagel, G. Kohler, and F. Brombacher (1998). IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells. *Nature* **393**: 797-801.
80. Reth, M., and J. Wienands (1997). Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* **15**: 453-479.
81. DeFranco, A.L. (1997). The complexity of signaling pathways activated by the BCR. *Curr Opin Immunol* **9**: 296-08.
82. Scott, D.W., D. Livnat, J. Whitin, S.B. Dillon, R. Snyderman, and C.A. Pennell (1987). Lymphoma models for B cell activation and tolerance. V. Anti-Ig mediated growth inhibition is reversed by phorbol myristate acetate but does not involve changes in cytosolic free calcium. *J Mol Cell Immunol* **3**: 109-120.
83. Bonnefoy, B.N., A. Munshi, I. Yron, S. Wu, T.L. Collins, M. Deckert, B.T. Shalom, L. Giampa, E. Herbert, J. Hernandez, N. Meller, C. Couture, and A. Altman (1996). Vav: function and regulation in hematopoietic cell signaling. *Stem Cells* **14**: 250-268.
84. Bustelo, X.R., and M. Barbacid (1992). Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product in activated B cells. *Science* **256**: 1196-1199.
85. Yamanashi, Y., M. Okada, T. Semba, T. Yamori, H. Umemori, S. Tsunasawa, K. Toyoshima, D. Kitamura, T. Watanabe, and T. Yamamoto (1993). Identification of HS1 protein as a major substrate of protein-tyrosine kinase(s) upon B-cell antigen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3631-3635.
86. Benhamou, L.E., P.A. Cazenave, and P. Sarthou (1990). Anti-immunoglobulins induce death by apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells. *Eur J Immunol* **20**: 1405-1407.
87. LoCascio, N.J., G. Haughton, L.W. Arnold, and R.B. Corley (1984). Role of cell surface immunoglobulin in B-lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 2466-2469.
88. Scott, D.W., D. Livnat, C.A. Pennell, and P. Keng (1986). Lymphoma models for B cell activation and tolerance. III. Cell cycle dependence for negative signalling of WEHI-231 B lymphoma cells by anti-mu. *J Exp Med* **164**: 156-164.
89. Joseph, L.F., S. Ezhevsky, and D.W. Scott (1995). Lymphoma models for B-cell activation and tolerance: anti-immunoglobulin M treatment induces growth arrest by preventing the formation of an active kinase complex which phosphorylates retinoblastoma gene product in G1. *Cell Growth Differ* **6**: 51-57.
90. Ales, M.J., D.W. Scott, R.P. Phipps, J.E. Casnellie, G. Kroemer, C. Martinez, and L. Pezzi (1992). Cross-linking of surface IgM or IgD causes differential biological effects in spite of

overlap in tyrosine (de)phosphorylation profile. *Eur J Immunol* **22**: 845-850.

91. Fischer, G., S.C. Kent, L. Joseph, D.R. Green, and D.W. Scott (1994). Lymphoma models for B cell activation and tolerance. X. Anti-mu-mediated growth arrest and apoptosis of murine B cell lymphomas is prevented by the stabilization of myc. *J Exp Med* **179**: 221-228.
92. McCormack, J.E., V.H. Pepe, R.B. Kent, M. Dean, R.A. Marshak, and G.E. Sonenshein (1984). Specific regulation of c-myc oncogene expression in a murine B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 5546-5550.
93. Mapara, M.Y., P. Weinmann, K. Bommert, P.T. Daniel, R. Bargou, and B. Dörken (1995). Involvement of NAK-1, the human nur77 homologue, in surface IgM-mediated apoptosis in Burkitt lymphoma cell line BL41. *Eur J Immunol* **25**: 2506-2510.
94. Liu, Z.G., S.W. Smith, K.A. McLaughlin, L.M. Schwartz, and B.A. Osborne (1994). Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* **367**: 281-284.
95. Bargou, R.C., K. Bommert, P. Weinmann, P.T. Daniel, C. Wagener, M.Y. Mapara, and B. Dörken (1995). Induction of Bax-alpha precedes apoptosis in a human B lymphoma cell line: potential role of the bcl-2 gene family in surface IgM-mediated apoptosis. *Eur J Immunol* **25**: 770-775.
96. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press.
97. Kroczeck, R.A. (1993). Southern and northern analysis. *J Chromatogr* **618**: 133-145.
98. Feinberg, A.P., and B. Vogelstein (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". *Addendum. Anal Biochem* **137**: 266-267.
99. Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
100. Klose, J., and U. Kobalz (1995). Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* **16**: 1034-1059.
101. Brockstedt, E., A. Rickers, S. Kostka, A. Laubersheimer, B. Dörken, B. Wittmann-Liebold, K. Bommert, and A. Otto (1998). Identification of Apoptosis-associated Proteins in a Human Burkitt Lymphoma Cell Line. Cleavage of hnRNP A1 by Caspase 3. *J Biol Chem.* **273**: 28107.
102. Eckerskorn, C., P. Jungblut, W. Mewes, J. Klose, and F. Lottspeich (1988). Identification of mouse brain proteins after two-dimensional electrophoresis and electroblotting by microsequence analysis and amino acid composition analysis. *Electrophoresis* **9**: 830-838.
103. Otto, A., B. Thiede, E.C. Muller, C. Scheler, L.B. Wittmann, and P. Jungblut (1996). Identification of human myocardial proteins separated by two-dimensional electrophoresis using an effective sample preparation for mass spectrometry. *Electrophoresis* **17**: 1643-1650.
104. Schreiber, E., P. Matthias, M.M. Muller, and W. Schaffner (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* **17**: 6419.
105. Craig, R.W. (1995). The bcl-2 gene family. *Semin Cancer Biol* **6**: 35-43.
106. Nagata, S., and P. Golstein (1995). The Fas death factor. *Science* **267**: 1449-1456.
107. Koopman, G., C.P. Reutelingsperger, G.A. Kuijten, R.M. Keehnen, S.T. Pals, and M.H. van Oers (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**: 1415-1420.
108. Rao, L., D. Perez, and E. White (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during

- apoptosis. *J Cell Biol*: 1441-1455.
109. Gosser, Y.Q., T.K. Nomanbhoy, B. Aghazadeh, D. Manor, C. Combs, R.A. Cerione, and M.K. Rosen (1997). C-terminal binding domain of Rho GDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases. *Nature* **387**: 814-818.
 110. Zhang, S., J. Han, M.A. Sells, J. Chernoff, U.G. Knaus, R.J. Ulevitch, and G.M. Bokoch (1995). Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* **270**: 23934-23936.
 111. Coso, O.A., M. Chiariello, J.C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki, and J.S. Gutkind (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**: 1137-1146.
 112. Danley, D.E., T.H. Chuang, and G.M. Bokoch (1996). Defective Rho GTPase regulation by IL-1 beta-converting enzyme-mediated cleavage of D4 GDP dissociation inhibitor. *J Immunol* **157**: 500-503.
 113. Burd, C.G., and G. Dreyfuss (1994). RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *Embo J* **13**: 1197-04.
 114. Gorlach, M., C.G. Burd, D.S. Portman, and G. Dreyfuss (1993). The hnRNP proteins. *Mol Biol Rep* **18**: 73-78.
 115. Gorlach, M., C.G. Burd, and G. Dreyfuss (1994). The determinants of RNA-binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins. *J Biol Chem* **269**: 23074-23078.
 116. Takimoto, M., T. Tomonaga, M. Matunis, M. Avigan, H. Krutzsch, G. Dreyfuss, and D. Levens (1993). Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro. *J Biol Chem* **268**: 18249-18258.
 117. Waterhouse, N., S. Kumar, Q. Song, P. Strike, L. Sparrow, G. Dreyfuss, E.S. Alnemri, G. Litwack, M. Lavin, and D. Watters (1996). Heteronuclear ribonucleoproteins C1 and C2, components of the spliceosome, are specific targets of interleukin 1beta-converting enzyme-like proteases in apoptosis. *J Biol Chem* **271**: 29335-29341.
 118. Izaurralde, E., A. Jarmolowski, C. Beisel, I.W. Mattaj, G. Dreyfuss, and U. Fischer (1997). A role for the M9 transport signal of hnRNP A1 in mRNA nuclear export. *J Cell Biol* **137**: 27-35.
 119. Saffer, J.D., S.P. Jackson, and M.B. Annarella (1991). Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol* **11**: 2189-2199.
 120. Kadonaga, J.T., A.J. Courey, J. Ladika, and R. Tjian (1988). Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* **242**: 1566-1570.
 121. Kadonaga, J.T., K.R. Carner, F.R. Masiarz, and R. Tjian (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **51**: 1079-1090.
 122. Na, S., T.H. Chuang, A. Cunningham, T.G. Turi, J.H. Hanke, G.M. Bokoch, and D.E. Danley (1996). D4-GDI, a substrate of CPP32, is proteolyzed during Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* **271**: 11209-11313.
 123. Faleiro, L., R. Kobayashi, H. Fearnhead, and Y. Lazebnik (1997). Multiple species of CPP32 and Mch2 are the major active caspases present in apoptotic cells. *Embo J* **16**: 2271-2281.

Anhang

6.5 Listen der sequenzierten Klone

Tabelle 2

Klon Nr.:	100 %-ige Homologie
K15	Ubiquitin
K40	Translations kontrolliertes Tumor Protein
K52	ssDNA bindendes Protein
K53	GAPDH
K54	mitochondriales Gen für tRNAs
K57	mitochondriales Gen für tRNAs
K65	Initiations Faktor 4AII
K68.4	unbekannt
K68.5	β -Aktin
K79.2	Ribosomales Protein L38
K84.1	EST
K84.2	Lactat Dehydrogenase B
K85	EST2
K85.3	Human EST2
K106	PolyA bindendes ProteinII
K109	EST
K110	Rch1
K112	EST
K116	Histon H 3.3
K117	Transkriptionsfaktor CBFB
K118	mRNA für Ribosomales Protein L8
K119	Phosphatase-1
K121	Translations kontrolliertes Tumor Protein
K123	<i>signal recognition particle</i>
S2	NADH-Ubiquitin Oxidoreductase
S7.1	β -Aktin
S21.3	Ubiquitin-S2 Fusions Protein
S22.1	Ribosomales Protein L38

Tab. 2 Liste der identifizierten Sequenzen nach differentieller Hybridisierung der lambda-Zap cDNA-Phagenbanken Differentiell hybridisierende Sequenzen der lambda-Zap cDNA-Phagenplaques wurden in einer *in vivo* Exzision isoliert und sequenziert. Für jeden Klon ist die Bezeichnung des Klons, sowie die DNA Homologie angegeben (EST = Expressed sequence tag).

Tabelle 3

Klon Nr.:	Insert	DNA Homologie	Protein Homologie
B5	1-670	nein	
B7	1-98	nein	
B8	1-683	nein	<i>Acriflavin resistance protein</i>
B10	1-356	nein	
B11	1-95	nein	
B12	1-175	nein	
B13	1-162	nein	
B14	1-656	nein	
B15	1-215	nein	
B16	1-190	nein	
B18	1-83	nein	
B21	1-238	nein	
B23	1-422	nein	
B25	1-461	nein	
B38	1-596	nein	
B45	1-225	nein	
B50	1-200	nein	
B51	1-261	nein	
B54	1-233	<i>Acriflavin resistance protein</i>	
B59	1-345	nein	
B62	1-250	nein	

Tab. 3 Liste der sequenzierten Sequenzen nach Hydroxyapatit-Chromatographie
 Subtraktive Klone, die nach Hydroxyapatit-Chromatographie isoliert, kloniert und sequenziert wurden, sind aufgelistet. Für jeden Klon ist die Bezeichnung des Klons, die Länge der klonierten Sequenz, sowie die DNA oder Proteinhomologie angegeben.

Abkürzungen

A	Adenin, Adenosin
Abb.	Abbildung
anti-IgM	F(ab) ₂ -Fragment Ziege anti-human IgM
Bp	Basenpaar
BL	Burkitt Lymphom
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin, Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
cpm	Zerfälle pro Minute
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid 5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid 5'-triphosphat
ECL	Enhanced chemiluminescence
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EMSA</i>	<i>elektro mobility shift assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
G	Guanin, Guanosin
g	Gramm
Kb	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
IgM	Immunglobulin M
lambda	Lambda (-Phage)
<i>MALDI MS</i>	<i>matrix-assisted-laser dissorption ionisation-mass spectrometry</i>
μCi	Mikrocurie (1 Ci = 3.7 x 10 ¹⁰ Bq)
Min	Minute(n)
ml	Milliliter
μl	Mikroliter

mM	millimomolar
μM	mikromolar
mRNA	<i>messenger</i> RNA
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
<i>pfu</i>	<i>plaque forming unit</i>
pl	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylchlorid
poly (dIdC)	poly-Desoxyinositoldesoxydytidin
RNA	Ribonukleinsäure
PS	Phosphatidylserin
RT	Raumtemperatur
Sek	Sekunde(n)
T	Thymin, Thymidin
V	Volumen
v/v	Volumenprozent
v/w	Gewichtsprozent

Erklärung

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Anke Rickers

19.10.1998

Lebenslauf

Name: Anke Rickers

Geburtsdatum: 28.03.1968

Geburtsort: Thuine

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1974-1978 Besuch der Grundschule in Lingen

1978-1984 Besuch des Gymnasiums Leoninum in Handrup

1984-1987 Besuch des Gymnasiums Georgianum in Lingen Abschluß: Abitur

10/1987 Immatrikulation an der Georg-August Universität zu Göttingen

10/1989 Vordiplom an der Georg-August Universität zu Göttingen

6/1992 Diplomprüfung an der Georg-August Universität zu Göttingen

7/1992-11/1993 Diplomarbeit an dem Institut für Humangenetik in Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. W. Engel

12/1993-6/1994 Forschungsaufenthalt an den National Institutes of Health in Bethesda, MD, USA in der Forschungsgruppe von Dr. M. Bustin

10/1994-10/1998 Doktorarbeit am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin-Buch in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. B. Dörken

16.02.1999 Promotionsprüfung an der Humboldt Universität zu Berlin

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. B. Dörken, daß ich in seinem Labor am Max-Delbrück Centrum für molekulare Medizin unter hervorragenden wissenschaftlichen Bedingungen promovieren konnte.

Dr. Kurt Bommert danke ich für seine ständige Diskussionsbereitschaft und freundschaftliche Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke Frau Prof. B. Wittmann-Liebold, Eckehard Brockstedt und Albrecht Otto von der AG Proteinchemie am Max-Delbrück Centrum für die gute Kooperation.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dörken für die schöne Zeit am MDC bedanken.

Ute Nitschke gilt mein Dank für die technische Unterstützung.

Ich danke Frau Prof. B. Wittmann-Liebold, Frau Prof. B. Friedrich und Herrn Prof. B. Dörken für die Begutachtung der Arbeit und der DFG für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

Meinen Eltern sei liebevoll für die aufmunternden Worte auf dem langen Weg gedankt.

Publikationsliste

Rickers, A., Rininsland, F., Osborne, L., Reiss, J, (1994). Skipping of multiple CFTR exons is not a result of single exon omissions. Hum Genet **94**. 311-313

Trieschmann, L., Postnikov, Y.V., Rickers, A., Bustin, M., (1995). Modular structure of chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17: definition of a transcriptional enhancement domain distinct from the nucleosomal binding domain. Mol Cell Biol **15**. 6663-6669

Postnikov, Y.V., Trieschmann, L., Rickers, A., Bustin, M, (1995). Homodimers of chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17 in nucleosome cores. J Mol Biol **29**. 423-432

Rickers, A., Brockstedt, E., Mapara, M. Y., Otto, A., Dörken, B., Bommert, K., (1998). Inhibition of CPP32 blocks surface IgM-mediated apoptosis and D4-GDI cleavage in human BL60 Burkitt lymphoma cells. Eur J Immunol **28**. 296-304

Otto, A., Müller, E.C., Brockstedt, E., Schümann, M., Rickers, A., Bommert, K., Wittmann-Liebold, B., (1998). High Performance 2-DE and Nanospray Mass Spectrometry as powerful Tool to Study Apoptosis-associated Processes in Burkitt Lymphoma Cells. J. Protein Chem. **17**. 564-565

Brockstedt, E., Rickers, A., Kostka, S., Laubersheimer, A.; Dörken, B., Wittmann-Liebold, B., Bommert, K., Otto, A., (1998). Identification of Apoptosis-associated Proteins in a Human Burkitt Lymphoma Cell Line Cleavage of hnRNP A1 by Caspase 3. J Biol Chem. **273**. 28107-28064

Rickers, A., Beyaert, R., Vandenabeele, P., Dörken, B., Bommert, K., (1999). Cleavage of Transkription Factor SP1 by Caspases During Anti-IgM-Induced B Cell Apoptosis. Eur.J.Biochem. **261**. 269-274