Untersuchung des TGF-β-induzierten Zelltods in oligodendroglialen Kulturen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät
der GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT zu Göttingen

vorgelegt von
Ramona Schulz
aus
Frankfurt (Oder)

2007

D7

Referent: Prof. Dr. T. Pieler

Korreferent: Prof. Dr. E.-A. Wimmer

Tag der mündlichen Prüfungen: 1.11.2007

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. K. Krieglstein für die Ermöglichung dieser Dissertation und für ihre freundliche Unterstützung bedanken.
Für die Übernahme des Referats und des Korreferats bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. T. Pieler und Prof. Dr. E.-A. Wimmer.

Eine Danksagung gilt Frau Dr. T. Vogel für die Unterstützung während weiten Teilen dieser Doktorarbeit. Meinen Arbeitskollegen bin ich für die Hilfsbereitschaft zu Dank verpflichtet. Auf ihre Hilfe und Unterstützung konnte man sich immer verlassen.

Auch meine Familie und Freunde hatten stets Anteilnahme an meiner Doktorabeit und sorgten für die manchmal notwendige Aufheiterung.

Referenzen

Schulz, R., Vogel, T., Kratzin, H., Mashima, T., Tsuruo, T. and Krieglstein, K. (2007), Cleaved actin mediates regulation of Bcl-xl protein in TGF-β-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation* (in Revision)

Schulz, R., Vogel, T., Dressel, R. and Krieglstein, K. (2007), ActivinA induces apoptotic AIF translocation in a neural system. (in Arbeit)

Diese Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2004 bis September 2007 in der Abteilung Neuroanatomie des Zentrums für Anatomie der GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT zu Göttingen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. K. Krieglstein angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung 1
Referenzen 1
Inhaltsverzeichnis 1
Abbildungsverzeichnis 6
I.Zusammenfassung / Abstract 8
II.Einleitung 13
1.Die TGF-β Superfamilie 13
1.1. Die TGF-β Familie und ihre Signalweiterleitung 14
1.2. TGF-βs während der ontogenetischen Entwicklung im ZNS 15
1.3. Die Activin Familie und ihre Signalweiterleitung 17
1.4. Die Activine im sich entwickelnden und adulten Organismus im ZNS 18
2.Der programmierte Zelltod 18
2.1. Morphologische Formen des programmierten Zelltods 19
2.2. Wichtige apoptotische Proteinfamilien in der TGF-β- und Activin-induzierten Apoptose 20
2.2.1. Die extrinsische und intrinsische Signalinduktion 20
2.2.2. Die Caspasenfamilie 21
2.2.3. Die Bcl-2 Familie 23
2.2.4. Die Calpainfamilie 26
2.2.5. Der murine apoptose-induzierende Faktor (AIF) 28
2.2.6. Der Raf/MEK Signalweg und die MAP-Kinasefamilie 29
2.2.7. Komponenten des Zytoskeletts 30
3.TGF-β-induzierte Apoptose im Nervensystem 31
3.1. Koorperative und TGF-β-involvierte Effekte im neuralen System 32
3.2. TGF-β1-induzierte Apoptose in Oli-neu Zellen 32
3.3. Übersicht über TGF-β-induzierte Signalwege im Zell-unabhängigen Kontext 33
4.Activin-induzierte Apoptose 34
5.Zielsetzung 35
III. Material und Methoden 37

1.Material 37

1.1. Chemikalien, Medien und Zusätze 37

1.2. Gebrauchsmaterialien 37

1.3. Stämme, Plasmide und Oligonukleotide 37

1.4. Antikörper, Substrate und Inhibitoren 40

1.5. Geräte 43

2.Methoden 44

2.1. Molekulare Klonierungstechniken 44

2.1.1. Kultivierung des Mikroorganismus *E. coli* 44

2.1.2. Präparation von kompetenten *E. coli* Zellen 44

2.1.3. Transformation von *E. coli* Zellen 44

2.1.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch alkalische Lyse 45

2.1.5. Plasmid-DNA Midi-Präparation aus *E. coli* 45

2.1.6. Aufreinigung von DNA mittels Phenol/Chloroform 46

2.1.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 46

2.1.8. Agarose-Gelelektrophorese 47

2.1.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose mit Glasmilch 47

2.1.10. Restriktion von DNA 47

2.1.11. Ligation von DNA-Fragmenten 47

2.1.12. DNA-Sequenzierung 47

2.2. Kultivierung von Säugerzelllinien 48

2.2.1. Kultivierung der murinen Zelllinie Oli-neu 48

2.2.2. Transfektion der Zelllinie Oli-neu 49

2.2.3. Präparation von oligodendroglialen Primärkulturen 49

2.2.4. Kultivierung der RamosB Zelllinie 50

2.3. Analyse von RNA-Mengen in Säugerzellen 50

2.3.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen 51

2.3.2. Reverse Transkriptase (RT)-PCR 51

2.3.3. Luciferasemessungen 52

2.4. Analyse der Expression von Proteinen in Säugerzellen 53

2.4.1. Proteinisolierung aus kultivierten Säugerzellen 53

2.4.2. Messung der Proteinkonzentration nach Bradford 53

2.4.3. Proteinisolierung nach Zellkompartimenten 54

2.4.4. Western Blot 54

2.5. Analysen von Modifikationen und Translokationen von Proteinen 56
2.5.1. Immunzytochemie 56
2.5.2. Luciferasemessung nach PathDetect® 57
2.5.3. PAI-Luciferase-Assay 57
2.5.4. Fluorometrische Messung aktivierter Proteine durch Substrate 58
2.6. Analyse von Proteininteraktionen 59
2.6.1. Herstellung von GST-Bcl-xl Fusionsprotein 59
2.6.2. GST-Pulldown 60
2.6.3. Fixierung von SDS Gelen 61
2.6.4. Proteinsequenzierung mittels MALDI-TOF-MS[92] 61
2.6.5. Immunpräzipitation (IP) 62
2.7. Apoptoseuntersuchungen 63
2.7.1. Detektion von Apoptose nach der TUNEL-Technologie 63
2.7.2. Propidiumiodid Zellkern-Analyse mittels Durchflusszytometrie (PI-FACS-Analyse) 63
IV. Ergebnisse 65
1.Das Aktinfragment Fraktin und nicht die BH3-only Proteine vermitteln eine Regulation des Bcl-xl Proteins in der TGF-β1-induzierten Apoptose 65
1.1. Analyse von Bcl-2 Familienmitgliedern für die Regulation von Bcl-xl 65
1.1.1. mRNA Expression bekannter BH3-only Gene in Oli-neu Zellen 65
1.1.2. Kein untersuchtes BH3-only Gen wird auf transkriptioneller Ebene durch TGF-β reguliert 67
1.1.3. Untersuchung von Proteinexpression und Modifikationen post-translationell regulierter BH3-only Mitglieder in Oli-neu Zellen 69
1.2. Das Aktinfragment Fraktin bindet Caspasen-abhängig an das anti-apoptotische Bcl-xl Protein 71
1.2.1. Komponenten des Aktin-Myosin-Zytoskeletts interagieren mit dem Bcl-xl Protein 71
1.2.2. Eine Hemmung der Aktinfunktion reduziert die TGF-β-induzierte Apoptose 73
1.2.3. Das Bcl-xl Protein assoziiert mit dem abgespaltenen Aktinfragment Fraktin 76
1.2.4. Die Aktinfragmentierung in Fraktin erscheint vor dem Verlust des Bcl-xl Proteins 78
1.2.5. Die Aktinfragmentierung ist abhängig von Caspasen und funktionstüchtigem Aktin 78

1.2.6. Die Caspase-2 und -8 sind an der Aktinfragmentierung und an dem Verlust des basalen Bcl-xl Proteins beteiligt 79
1.2.7. Die Fraktin-Bcl-xl Bindung ist abhängig von Caspasen und einem funktionstüchtigen Aktinskelett 82
1.3. Der Mechanismus der Aktinfragmentierung und Fraktin-Bcl-xl Bindung ist spezifisch für neurale Zellen 84
1.3.1. Untersuchungen an lymphozytären RamosB Zellen 84
1.3.2. Untersuchungen an primären Oligodendrozytenkulturen 86
1.4. Fraktin als Regulator der basalen Bcl-xl Proteinmengen 88
1.4.1. Überexprimiertes Fraktin kolokalisiert mit Bcl-xl in Abhängigkeit von TGF-β 88
1.4.2. Überexprimiertes Fraktin kann allein keine Apoptose induzieren 89
1.4.3. Eine Überexpression von Fraktin führt zum Verlust des Bcl-xl Proteins 91
2.TGF-β1 und ActivinA induzieren im gleichen Zellsystem auf zwei verschiedenen Signalwegen Apoptose 92
2.1. ActivinA induziert eigenständig Apoptose in einem neuralen System 92
2.1.1. Eine ActivinA Behandlung führt zur DNA-Fragmentierung in der oligodendroglialen Zelllinie Oli-neu 92
2.1.2. ActivinA induziert keine TGF-β Freisetzung 95
2.1.3. Der Alk4/5/7 Rezeptorinhibitor blockiert sowohl die ActA- als auch die TGF-β-induzierte Apoptose 96
2.2. Die ActA-induzierte Aktivierung von R-Smads 97
2.3. Regulationen von Mitgliedern der Bcl-2 Familie wurden vorerst in der ActA-induzierten Apoptose ausgeschlossen 100
2.3.1. Die Bcl-xl Proteinexpression wird nicht durch ActivinA reguliert 100
2.3.2. Expressionsanalyse weiterer Mitglieder der Bcl-2 Familie 101
2.4. Die MAP-Kinasen p38, JNK und ERK sind nicht in den ActA-induzierten Signalwegen involviert 104
2.5. Die Caspasen 107
2.5.1. Die Caspasen sind in der ActA-induzierten Apoptose involviert 107
2.5.2. In der ActA-induzierten Apoptose sind ausschließlich die Initiatorcaspasen-2 und -8 beteiligt 108
2.6. Der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) ist in der ActA-induzierten Apoptose involviert 110
2.6.1. AIF wandert ActA-vermittelt in den Zellkern 110

2.6.2. Eine Hemmung der AIF Funktion verringert die ActA-induzierte Apoptose 113
2.7. Calpaine sind nicht in der ActA-induzierten Apoptose beteiligt 115
V.Diskussion 117
1.Die TGF-β-induzierte Apoptose 117
1.1. TGF-β und die Bcl-2 Familie 117
1.2. TGF-β und das Zytoskelett 118
1.2.1. Die Fraktin-Bcl-xl-Bindung als neuer Mechanismus in der Regulation von Bcl-2 Familienmitgliedern 119
1.2.2. Die Caspase-vermittelte Aktinfragmentierung in Fraktin in der TGF-β-induzierten Apoptose 120
1.2.3. Fraktin als neuer Regulator für Bcl-xl 122
1.2.4. Das Zusammenspiel der Bcl-xl Proteindegradation und der Bcl-xl mRNA Repression 124
1.2.5. Der zelluläre Kontext der Fraktin-vermittelten Bcl-xl Regulation 126
1.2.6. Probleme in der Wahl TGF-β-responsiver neuronaler Zellmodelle für die Molekularbiologie 126
1.3. Charakterisierung des kontextuellen Umfelds von TGF-β 127
1.3.1. ActivinA als Apoptose-auslösender Faktor im neuralen System 128
1.3.2. Rezeptor-/Ligandenbindungen und die Smad-vermittelten Signale 129
1.3.3. Untersuchungen an klassischen Apoptose-induzierenden Faktoren 130
1.3.4. Activin aktiviert den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) 131
1.4. Die Relevanz der TGF-β- und der ActA-vermittelten Apoptose 133
1.4.1. Apoptotische Wege in Abhängigkeit des Zellstadiums 134
1.4.2. TGF-β und die Alzheimer Erkrankung 135
VI. Literaturverzeichnis 137
VII. Abkürzungen 144
VIII. Lebenslauf 149

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kombinationen der sieben verschiedenen TypI und fünf TypII Rezeptoren der TGF-β Superfamilie[5].

Abbildung 2: Überblick über den Smad-abhängigen und die Smad-unabhängigen Signalwege[5].

Abbildung 3: Die Caspasen-Kaskade[36].

Abbildung 4: Schematischer Überblick über die Bcl-2 Familie mit ihren drei Subfamilien [38].

Abbildung 5: Überblick über die Regulation der Bcl-2 Familie[43]

Abbildung 6: Überblick über Calpain-abhängige Signalwege und involvierte Protein-gruppen[55].

Abbildung 7: Übersicht über die zelluläre AIF Lokalisierung[59].

Abbildung 8: Übersicht über die Kinasenkaskade der MAPK Familie.

Abbildung 9: Überblick über TGF-β1-abhängige Signalwege in Oli-neu Zellen.

Abbildung 10: Überblick über Zelltyp-unabhängige Signalwege und Interaktionen zwischen extrinsischen und intrinsischen TGF-β-induzierten Regulationen[24].

Abbildung 11: Genexpressionsmuster verschiedener Bcl-2 Familiengene in der oligodendroglialen Vorläuferzelllinie Oli-neu.

Abbildung 12: Semi-quantitative RT-PCRs der exprimierten BH3-only Gene in TGF-β1-behandelten Oli-neu Zellen.

Abbildung 13: Western Blot Experimente post-translationell regulierter BH3-only Proteine in Oli neu Zellen nach TGF-β1 Behandlung.

Abbildung 14: GST-Pulldown Experimente und massenspektrometrische Analyse mit rekombinanten Bcl-xl Protein in Abhängigkeit von TGF-β1.

Abbildung 15: Messungen apoptotischer Zellzahlen von TGF-β1-behandelten und STS-behandelten Oli-neu Zellen in Abhängigkeit von funktionstüchtigem Zytoskelett.

Abbildung 16: Immunpräzipitationen (IPs) identifizieren das 32kDa Fraktinfragment als Bcl-xl Protein Interaktionspartner.

Abbildung 17: Überprüfung der Kinetik der Bcl-xl Degradation und der Aktinfragmentierung.

Abbildung 18: Die TGF-β1-induzierte Aktinfragmentierung ist abhängig von Caspasen und dem Aktinremodelling.

Abbildung 19: Die TGF-β1-induzierte Aktinfragmentierung und Bcl-xl Proteinabnahme sind abhängig von der Caspase-2 und der Caspase-8.

Abbildung 20: Die Interaktion von Fraktin und Bcl-xl ist abhängig von Caspasen und funktionstüchtigem Aktin.

Abbildung 21: Untersuchungen an RamosB Zellen.

Abbildung 22: Untersuchungen an primären oligodendrozytären Kulturen.

Abbildung 23: Überexprimiertes Fraktin kolokalisiert TGF-β1-abhängig mit dem Bcl-xl Protein.

Abbildung 24: Immunzytochemische Experimente mit überexprimierten HA-Fraktin und HA-tAktin.

Abbildung 25: Überexprimiertes Fraktin führt zu einem Verlust der basalen Bcl-xl Proteinmengen.

Abbildung 26: ActA-induzierte DNA-Fragmentierung in der Oli-neu Zelllinie.

Abbildung 27: Eine ActA Behandlung führt nicht zur Freisetzung von TGF-β.

Abbildung 28: Der Alk4/5/7 Rezeptorinhibitor SB431542 verhindert sowohl die ActA-induzierte als auch die TGF-β-induzierte Apoptose.

Abbildung 29: Aktivierung des Smad-Signalweges nach ActA Behandlung in Oli-neu Zellen.

Abbildung 30: Untersuchungen an Mitgliedern der Bcl-2 Familie.

Abbildung 31: In ActA-behandelten Zellen sind die MAPK p38, JNK, ERK und der Transkriptionsfaktor NFκB nicht reguliert.

Abbildung 32: Der pan-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK reduziert die ActA-induzierte Apoptose.

Abbildung 33: Messungen verschiedener Caspaseaktivitäten mittels Substratumsetzungen.

Abbildung 34: ActA-induzierte AIF Translokalisierung vom Mitochondrium in den Zellkern.

Abbildung 35: Die AIF-Abhängigkeit in der ActA-vermittelten Apoptose.

Abbildung 36: Calpaine spielen keine Rolle in der ActA-vermittelten Apoptose.

Abbildung 37: Überblick über TGF-β-induzierte apoptotische Prozesse.

Abbildung 38: Überblick über die TGF-β-vermittelte Apoptose in der Zelllinie Oli-neu.

Abbildung 39: Vergleich der TGF-β-vermittelten und ActA-vermittelten Apoptose in der Zelllinie Oli-neu.

I. Zusammenfassung / Abstract

Die Apoptose wird durch multiple Signale, integriert in komplexe Netzwerke, kontrolliert. Dabei treten verschiedene Interaktionen zwischen vielfältigen, intrazellulären Signalwegen in Bezug zu extrazellulären Reizen oder intrazellulären Beschädigungen auf. In diesem komplexen System kann der transformierende Wachstumsfaktor (engl.: **t**ransforming **g**rowth **f**actor, TGF)-β in verschiedene Signalwege integriert sein und zeigt dabei seine starke Abhängigkeit vom Zelltyp, dem Zellkontext und weiteren umgebenden Faktoren. Das Wirkungsspektrum der TGF-βs, nicht nur in der Apoptose sondern auch im Zellwachstum, in der Migration, in der Differenzierung und Proliferation von Zellen, spiegelt die multifunktionelle Rolle dieser Zytokine wieder. Die TGF-β-induzierte Apoptose tritt sowohl in der Entwicklung als auch im adulten Organismus in vielen Organen auf, etwa zur Erhaltung der Gewebshomeostase oder zur Entsorgung geschädigter, alter und überflüssiger Zellen. Fehlfunktionen können zu schweren Erkrankungen oder Fehlbildungen führen. In neuralen Systemen spielen TGF-βs vor allem in den ontogenetischen Zelltodphasen eine wichtige Rolle. Die Identifizierung der TGF-β-involvierten Signalwege auf molekularbiologischer Ebene ist ein wichtiger Schritt zur Aufklärung dieser fundamentalen Vorgänge in einer Zelle.

An dem murinen, neuralen Modellsystem, die oligodendrogliale Vorläuferzelllinie Oli-neu, wurde gezeigt, dass die TGF-β-induzierte Apoptose über den Smad-Signalweg und die Caspase-8, -9 und -3 geregelt wird. Des Weiteren wird die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedes Bcl-xl verringert. Eine Behandlung der Oli-neu Zellen mit TGF-β und dem Tumornekrose Faktor (TNF)-α führt zu einer Verstärkung der apoptotischen Signalwege. Weitere Signalwege oder TGF-β-vermittelte Regulationen sind nicht bekannt.

Die zwei Schwerpunkte dieser Doktorarbeit waren einerseits Untersuchung zum Bcl-2 Familienmitglied Bcl-xl und dessen TGF-β-induzierte Regulation, und andererseits Analysen zur Kontextabhängigkeit von TGF-β im Bezug zu anderen Faktoren.

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurden die häufigsten pro-apoptotischen Antagonisten des Bcl-xl Proteins untersucht, die BH3-only Proteine. Die Untersuchungen ergaben jedoch für keines der bekannten BH3-only Proteine eine Regulation für Bcl-xl in der TGF-β-induzierten

Apoptose in Oli-neu Zellen. Daher wurde in einer Interactomstudie, über einen GST-Pulldown, nach möglichen neuen Interaktionspartnern von Bcl-xl gesucht. Massenspektrometrische Analysen TGF-β-regulierter Kandidaten brachten Komponenten des Zytoskeletts als Bcl-xl Interaktionspartner zum Vorschein. Genauere Untersuchungen mittels Immunpräzipitationen zeigten eine Bindung des geschnittenen N-terminalen 32kDa Aktinfragments Fraktin an Bcl-xl auf. Die TGF-β-vermittelte Fragmentierung von Aktin in Fraktin war dabei abhängig von den Caspasen-2 und -8 und einem funktionstüchtigen Aktinzytoskelett. Die Fragmentierung in Fraktin war zudem eine Grundvorrausetzung für die Bindung von Fraktin an Bcl-xl. Somit ist die Fraktin-Bcl-xl Bindung ebenfalls abhängig von den Caspase-2 und -8 und dem Aktinzytoskelett. CytochalasinD, ein Inhibitor vieler Funktionen des Aktinzytoskeletts, konnte dabei die TGF-β-induzierte Apoptose in Oli-neu Zellen reduzieren. Überexpressionsexperimente mit Bcl-xl und Fraktin zeigten eine eindeutige Kolokalisierung beider Faktoren in Folge einer TGF-β Behandlung in immunzytochemischen Experimenten an. Dabei konnte eine Überexpression von Fraktin alleine keine Apoptose in den Oli-neu Zellen auslösen, bewirkte aber die Reduzierung der basalen Bcl-xl Proteinmengen und sorgte so für ein Ungleichgewicht anti-apoptotischer und pro-apoptotischer Faktoren am Mitochondrium. Dieser bisher unbeschriebene Mechanismus der TGF-β-induzierten Aktinfragmentierung und der regulierenden Fraktin-Bcl-xl Bindung konnte an primären Oligodendrozytenkulturen bestätigt werden. Versuche an der lymphozytären Zelllinie RamosB zeigten diese TGF-β-vermittelten Regulationen nicht. Auch der allgemeine Apoptose-induzierende Faktor Staurosporin konnte nicht die Bindung von Fraktin an Bcl-xl in Oli-neu Zellen vermitteln. CytochalasinD war ebenfalls nicht in der Lage die STS-induzierte Apoptose in Oli-neu Zellen zu verringern. Somit ist die Bcl-xl regulierende Bindung von Fraktin abhängig vom Zelltyp und dem Signal. Letztendlich stellt die Fraktin-Bcl-xl Bindung eine wichtige und neue Regulation des Bcl-2 Familienmitgliedes Bcl-xl in apoptotischen Vorgängen dar.

Der zweite Schwerpunkt dieser Doktorarbeit waren Untersuchungen zur Kontextabhängigkeit von TGF-β. D.h. es wurden Faktoren gesucht, die neben TGF-β Apoptose in den Oli-neu Zellen auslösen können. Dabei wurde ActivinA (ActA), ein weiteres Mitglied der TGF-β Superfamilie, als Apoptose-auslösendes Zytokin ermittelt. Die apoptotische Funktion von ActA in einem neuralen Modell war bis jetzt (Stand: September 2007) nicht bekannt und erweitert die apoptotische Funktionen von Activinen. Weitere Untersuchungen ergaben, dass ActA keine Kooperation mit TGF-β eingeht. Die ActA/TGF-β-vermittelten Apoptose zeigte

keine Erhöhung der Anzahl fragmentierter Zellkerne im Vergleich zu allein mit TGF-β oder ActA behandelten Zellen. Die ActA Behandlung führte auch nicht zu einer TGF-β Freisetzung. Daher wurde der ActA-vermittelte Signalweg vergleichend zum TGF-β-vermittelten Signalweg weiter untersucht. Die Analysen ergaben eine für die TGF-β Superfamilie typische Smad-Aktivierung nach ActA Behandlung. Erste Unterschiede zeigten sich bei der Überprüfung der Bcl-2 Familie und den Caspasen. Eine Involvierung der Bcl-2 Familie in der ActA-induzierten Apoptose konnte vorerst ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zum TGF-vermittelten Zelltod waren im ActA-induzierten Zelltod allein die Initiatorcaspasen-2 und -8 signifikant aktiv. Effektorcaspasen wie die im TGF-β Signalweg relevanten Caspasen-3 und -9 spielten keine weiterleitende Rolle. Für die Kondensierung und Fragmentierung der DNA in der ActA-induzierten Apoptose konnte der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) verantwortlich gemacht werden. Eine Hemmung der Caspasen verhinderte den ActA-vermittelten und AIF-involvierenden Zelltod und bestätigt damit neuere Studien, in denen AIF in Abhängigkeit von der Caspaseaktivität freigesetzt werden kann. Diese Summierung der Unterschiede in den ActA-vermittelten und TGF-β-vermittelten Signalwegen zeigte eindeutig die unterschiedlichen Signalweiterleitungen auf, in denen zusätzlich zwei neue Prozesse in Bezug zur ActA-induzierten Apoptose auftraten. Einerseits wurde erstmals eine apoptotische Funktion von ActA im Nervensystem gezeigt und andererseits eine ActA-vermittelte AIF Aktivierung.

Abstract

Apoptosis is controlled by complex networks with various interactions between different signalling pathways regarding to extracellular as well as intracellular signals. Thereby, the transforming growth factor (TGF)-β is integrated in diverse apoptotic signalling pathways dependent of the cell type, the cell context as well as the extracellular matrix. The multifunctional TGF-βs are also involved in cell migration, differentiation, proliferation and even in apoptosis. The TGF-β-induced apoptosis occurs in the development as well as in the adult organism in diverse tissues and organs. In the nervous system, TGF-βs have a critical role during the ontogenetic cell death. Therefore, the identification of TGF-β signalling pathways is an important exigence to clarify essential processes in the cell.

Experiments with the murine, oligodendroglial cell line Oli-neu showed that TGF-β-induced apoptosis involves Smad activation and the activation of initiator as well as effector caspases, especially the caspase-8, -9 and -3, in this neural system. Further, the protein expression of the anti-apoptotic Bcl-2 family member Bcl-xl is reduced. In cooperation with TNF-α, the TGF-β-mediated apoptotic signalling cascade is increased. Further TGF-β-induced regulations are unknown in the oligodendroglial cell model Oli-neu.

In this dissertation, main focuses were, on the one hand, specified analysis of the TGF-β-mediated Bcl-xl regulation and, on the other hand, analysis of the context dependence of TGF-β regarding to other cytokines.

For the first main focus, we investigated in the most important antagonists of Bcl-xl, the BH3-only proteins via protein interaction analysis and expression analysis. However, the results excluded a classical regulation of BH3-only protein studied in TGF-β-induced apoptosis in Oli-neu cells. Therefore, we started interactome studies to search for new interaction partners of Bcl-xl. Mass spectrometric analysis revealed components of the cytoskeleton as possible Bcl-xl binding partners. Specified experiments identified that the 32kDa actin fragment namely Fractin bound to Bcl-xl. Caspase-2 as well as caspase-8 activation was involved in actin fragmentation into Fractin and was a prerequisite of Fractin-Bcl-xl binding. Further, the functionality of the cytoskeleton was essential in this novel regulatory mechanism shown by the actin function inhibitor cytochalasinD. Additionally, immunocytochemistry

overexpression experiments with Bcl-xl and Fractin showed a clear colocalisation only in TGF-β-treated cells. Thereby, an overexpression of Fractin induced a decrease in Bcl-xl protein amounts but unaffected the apoptosis per se in Oli-neu cells. Such decrease in Bcl-xl protein amounts may lead to an imbalance of anti-apoptotic and pro-apoptotic factors on the mitochondria. The mechanism of the TGF-β-mediated actin fragmentation to regulate the Fractin-Bcl-xl interaction was undescribed until now and was also confirmed in primary oligodendroglial cultures in these studies. Further, this novel mechanism was dependent of the cell type and the apoptotic signal showing in TGF-β-treated lymphoma RamosB cells and with the general apoptosis inducer staurosprorine.

The second project focussed the contextuality of TGF-β regarding to other cytokines involved in ontogenetic processes and apoptosis. In this dissertation, ActivinA, a member of the TGF-β superfamily, was discovered to initiate apoptosis in Oli-neu cells beside TGF-β. Further, apoptotic function of ActivinA in a neural system was undescribed until now (time: September 2007). In contrast to TNF-α, ActivinA did not cooperate with TGF-β in Oli-neu cells. A TGF-β release by ActivinA, and subsequent only a TGF-β-induced apoptosis, was also excluded and revealed two independent apoptotic pathways either by ActivinA or by TGF-β. Thus, the ActivinA-induced pathway was compared with the TGF-β-induced pathway to discover possible differences in these two apoptotic cascades. A first difference was showed in the regulation of the Bcl-2 family member Bcl-xl which protein amounts were unaltered by ActivinA treatment. In contrast to TGF-β, the classical caspase cascade was excluded since only initiator caspases such as caspase-2 and caspase-8 were activated in ActivinA-mediated apoptosis whereas effector caspase activation failed to appear. In ActivinA-mediated apoptosis, the apoptosis-specific DNA fragmentation occurred by the activation and translocation of the apoptosis inducing factor (AIF). The summation of differences between TGF-β-induced apoptosis and ActivinA-induced apoptosis confirmed the independence of these two pathways. Additionally, novel processes in ActivinA-mediated apoptosis were discovered concerning the apoptotic function of ActivinA in a neural system and the involvement of AIF in ActivinA-mediated processes.

II. Einleitung

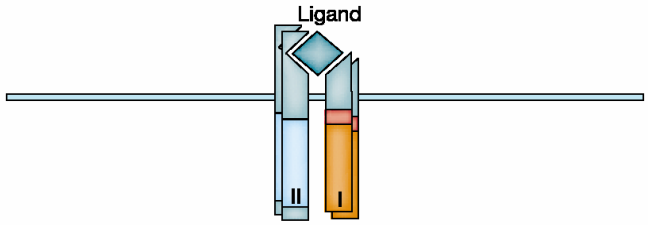
1. Die TGF-β Superfamilie

Die Superfamilie der transformierenden Wachstumsfaktoren-β (TGF-β) verdankt ihren Namen dem ersten entdeckten Mitglied und der ersten zugeschriebenen Funktion, das Wachstum zu fördern[1]. Mittlerweile wurden viele weitere Funktionen dieser Zytokine entdeckt, mit einer Vielzahl an Mitgliedern. Die Funktionen umfassen Aufgaben im Immunsystem, der Karzinogenese, Ontogenese, Gewebsbildung und -differenzierung durch Effekte auf die Proliferation, Differenzierung, Migration und auch Apoptose von Zellen. Dabei sind diese unterschiedlichen Funktionen überaus stark kontextabhängig. D.h., in einem Zelltyp kann das gleiche Zytokin Zelltod auslösen und in einem anderen Zelltyp das Überleben der Population fördern. Die Ursache dafür ist die funktionelle Abhängigkeit dieser Zytokine von der Zellumgebung und dem Zusammenspiel mit anderen Faktoren[2].

Die Mitglieder der TGF-β Superfamilie sind in vier Familien aufgeteilt: (1) die TGF-β Familie, (2) die Activin Familie, (3) die decapentaplegic (Dpp) Gruppe und (4) die vegetal-1 (Vgl-1)-angehörige Gruppe, wobei die Gruppen (3) und (4) zur DVR Familie oder auch BMP Familie zusammengefasst wird. In den folgenden Beschreibungen wird genauer auf die TGF-β Familie und die Activin Familie eingegangen, da diese Zytokine für diese Arbeit von Bedeutung sind[2].

Die generellen Interaktionen der Rezeptoren der TGF-β und Activin Familie sind sehr ähnlich. Der funktionelle Rezeptorkomplex besteht aus zwei TypII (R-II) und zwei TypI (R-I) transmembranen Serin/Threonin Kinaserezeptoren, welche für die Signalweiterleitung nötig sind. Die inaktiven Rezeptoren liegen als Homodimere auf der Zelloberfläche vor. In Folge von Signalinduktionen binden die Liganden zuerst an den homodimeren TypII Rezeptor. Diese Verbindung führt zur Rekrutierung des TypI Rezeptordimers, welcher dann durch den TypII Rezeptor an einer Serin- und Threonin-reichen Region phosphoryliert und aktiviert wird. Daraufhin kann der TypI Rezeptor die Signalkaskade durch weitere Phosphorylierungen mittels seiner Kinase in Gang setzten. In Säugern wurden bisher fünf TypII und sieben TypI Rezeptoren gefunden (Abbildung 1)[3]. Durch verschiedene Kombinationen der tetrameren Rezeptor-Komplexbildungen können 29 Liganden aktivierend wirken. Dabei kann eine Rezeptorkombination durch mehrere Liganden aktiviert werden oder die Kombination gibt den zu bindenden Liganden vor. Der TypI Rezeptor benötigt jedoch oft den TypII Rezeptor zur Ligandenbindung und der TypII Rezeptor kann nicht ohne den TypI Rezeptor zur

Signalweiterleitung beitragen. Es gibt Ausnahmen, bei denen Liganden, wie die der BMP Familie, zuerst den TypI Rezeptor zur Ligandenbindung benötigen, oder auch den ganzen tetrameren Rezeptorkomplex, wie TGF-β2. Die Activine sind in der Lage nur den TypII Rezeptoren zu binden, benötigen jedoch den TypI Rezeptor, um die Signalkaskade in Gang zu setzen[2-4].



Type II	Type I	R-Smad
BMPRII	ALK-2 (ActRI) ALK-3 (BMP-RIA) ALK-6 (BMP-RIB)	Smad1, Smad5, Smad8
ActRII, ActRIIB	ALK-4 (ActRIB)	Smad2
ActRIIB	ALK-7	Smad2
TβRII	ALK-5 (TβRI) ALK-1 ALK-2	Smad2, Smad3 Smad1, Smad5
AMHR	ALK-3 ALK-2 ALK-6	Smad1, Smad5

Abbildung 1: Kombinationen der sieben verschiedenen TypI und fünf TypII Rezeptoren der TGF-β Superfamilie[3]. (Derynck und Zhang, 2003)
Die TypI Rezeptoren werden auch in Alk-1 bis Alk-7 eingeteilt. Als Beispiel der verschiedenen Kombinationen können die TypII Rezeptoren der Activin Familie (ActRII und ActRIIB) sowohl mit den TypI Rezeptor ActRIB/Alk-4 oder Alk-5 Signale von Activin weiterleiten. Der TypII Rezeptoren der TGF-β Familie kann verschiedene TypI Rezeptoren rekrutieren. Durch unterschiedliche Rezeptor-kombinationen werden als Konsequenz unterschiedliche R-Smads aktiviert.

1.1. Die TGF-β Familie und ihre Signalweiterleitung

Die TGF-β Familie besteht aus fünf Proteinen, TGF-β1 bis TGF-β5. TGF-β1 bis TGF-β3 kommen in Säugetieren vor. TGF-β4 ist das TGF-β1-Homolog in *Gallus gallus*, während TGF-β5 das TGF-β1-Homolog in Amphibien ist. TGF-βs sind in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, wie in verschiedenen Mesenchymen, Bindegeweben, Endothelien, in Zellen des Blutes sowie des Immunsystems, wobei die TGF-β Isoformen sich Organ-abhängig in ihrer Lokalisierung unterscheiden[5]. Die Funktionen der TGF-βs sind zahlreich und abhängig von (1) der TGF-β Isoform, (2) dem Zellstadium und Zelltyp, (3) der Struktur des Rezeptors und Dauer der Rezeptorbindung, (4) der Lokalisierung des Proteins und (5) dem Einwirken anderer Faktoren und Zytokinen. Neben Funktionen im Zellzyklus, in der Differenzierung und Proliferation, in der extrazellulären Matrixbildung und Migration, gehören auch apoptotische Prozesse, gerade in der ontogenetischen Entwicklung, zum Aufgabenbereich[2].
Die Bindung des aktiven TGF-β Moleküls an den Rezeptorkomplex führt hauptsächlich zur Signalweiterleitung über die Smad Familie, die in Vertebraten acht Mitglieder beinhaltet,

Smad1 bis Smad8. Dabei unterscheidet man drei Gruppen in Abhängigkeit ihrer Funktion: (1) Rezeptor-aktivierte Smads (R-Smads), (2) das gemeinschaftliche Smad (Smad-4) und (3) inhibitorische Smads (anti-Smads). Dabei phosphoryliert die Kinase des aktivierten TβRI ein R-Smad, das dimerisiert mit einem zweiten aktivierten R-Smad und formt zusammen mit Smad-4 einen Komplex, welcher durch Smad-4 fähig ist, in den Zellkern zu translokalisieren (Abbildung 2). Dieser Smad-Komplex aktiviert und inhibiert die Expression vieler Zielgene. In Abbildung 1 sind die unterschiedlichen Möglichkeiten von aktivierten R-Smads durch Kombination der TypI und TypII Rezeptoren zu sehen. Die anti-Smads inhibieren die Translokalisierung des Smad-Komplexes in den Kern, indem sie die Bindung der R-Smads an den TypI Rezeptor verhindern[3].

Neben den Smad-vermittelten transkriptionellen Regulationen gibt es andere Smad-unabhängige Signalwege die durch TGF-βs aktiviert werden können (Abbildung 2). Dazu gehören die MAPK Signalwege (siehe 2.2.6.) mit den dazugehörigen JNK-, p38- und ERK-MAP Kinasefamilien. Die Erk MAP-Kinasen werden dabei größtenteils über Ras aktiviert, während die JNK- und p38 MAP-Kinase durch verschiedene MAPKKK stimuliert werden können [3].

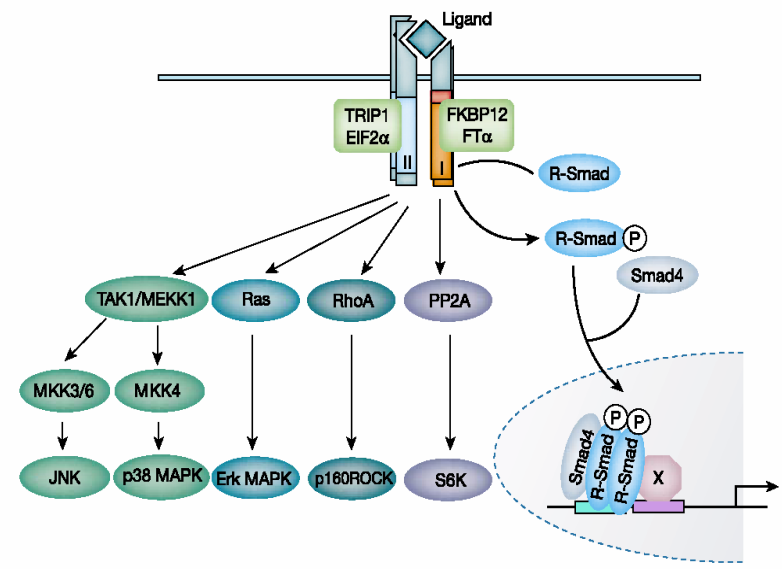


Abbildung 2: Überblick über den Smad-abhängigen und die Smad-unabhängigen Signalwege[3]. (Derynck und Zhang, 2003)
Die TGF-β Signalweiterleitung kann einmal durch die Aktivierung der R-Smads und der folgenden Komplexbildung mit dem Smad-4 auf transkriptioneller Ebene durch den Smad-Komplex weitergeleitet werden. Dabei translokalisiert der Smad-Komplex in den Zellkern und führt so zur Expression oder Inhibierung verschiedener Smad-Zielgene. Die Signalweiterleitung durch MAP Kinasen, wie JNKs, p38 und ERKs, verläuft weitestgehend Smad-unabhängig.

1.2. TGF-βs während der ontogenetischen Entwicklung im ZNS

Während der ontogenetischen Entwicklung sind die TGF-βs stark exprimiert. Die mRNA von TGF-β1 konnte kurz nach der Befruchtung nachgewiesen werden. Dabei erscheinen alle drei Isoformen sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten Geweben. Im adulten Organismus sind die TGF-βs in Mesenchymzellen, im Knochen, in Muskeln, in

Fortpflanzungsorganen, in Endothelien und Epithelien, in der Leber, in der Lunge u.s.w. anzutreffen[5]. Im folgenden Absatz wird der Schwerpunkt, im Hinblick auf die Zielsetzung dieser Arbeit, auf neurale Entwicklungsprozesse gelegt.

Während TGF-β2 und TGF-β3, die neuralen TGF-β Isoformen, in allen Bereichen des adulten zentralen und peripheren Nervensystems vorkommen und dort oft kolokalisiert sind, tritt TGF-β1 im Plexus choroideus und den Hirnhäuten auf[2,6]. Während der Entwicklung des Nervensystems erscheinen die TGF-β2 und-3 Isoformen ab dem murinen Embryonaltag 12,5[6].ebenfalls die neuralen TGF-β2 und TGF-β3 Isoformen. Darüber hinaus lässt sich eine Expression des nicht-neuralen TGF-β1 eindeutig in *in vitro* Systemen wie kultivierte Neuronen und Gliazellen nachweisen[7], welches die Kontextabhängigkeit auch in der Expression dieser Zytokine verdeutlicht.

Das neurale Expressionsmuster der TGF-β Rezeptoren ist nicht eindeutig dokumentiert. Es kann jedoch mit Sicherheit gesagt werden, dass sowohl der TβRI als auch der TβRII im adulten Nervensystem weit verbreitet sind[2,6]. Die mRNA der Rezeptoren findet sich im cerebralen Kortex, Mittelhirn, Kleinhirn, Hirnstamm und im Hippocampus, in Neuronen und glialen Zellen wieder. In verschiedenen neuralen Primärkulturen konnten die Rezeptoren ebenfalls nachgewiesen werden[7].

Die neuralen TGF-βs agieren stark kontextabhängig. In den Körnerzellen des Kleinhirns und in Zellen der Nebennierenrinde wirken sie als Regulatoren der Zellteilung anti-mitotisch, d.h. sie wirken der Zellproliferation entgegen. So fördern sie die Differenzierung und Migration der Zellen, wobei Signale von Zielgeweben eine kritische Rolle spielen.

Zudem besitzen die TGF-βs in vielen Zellsystemen eine überlebensfördernde Funktion und können als Neurotrophine, im Zusammenspiel mit anderen neurotrophen Faktoren, bezeichnet werden[8,9]. D.h., sie wirken mit einigen neurotrophen Faktoren wie GDNF, NGF, CNTF oder FGF-2 synergistisch, so dass diese Faktoren ohne die Anwesenheit der TGF-βs nicht ihre volle Wirkung erzielen[10].

Neben Neuronen zählen auch Astrozyten und Gliazellen, die wichtige Interaktionen und Funktionen mit den Neuronen für das Überleben eingehen, zu den Zielzellen der TGF-βs. Astrozyten exprimieren beide neurale TGF-β Isoformen und reagieren auch selbst auf ein TGF-β-Signal[2]. In glialen Vorläuferzellen, den 02A-Zellen, konnte ebenfalls die Expression der TGF-βs gezeigt werden. Die Vorläuferzellen differenzieren sich zudem zu gereiften Oligodendrozyten in Folge von TGF-β-Signalen[2].

Während Selektions- und Differenzierungsprozesse in den ontogenetischen Zelltodphasen regulieren die TGF-βs das Gleichgewicht zwischen Überleben und Tod der Zellen. Durch ein

Wegfall der Zytokine wird ein verminderter Zelltod festgestellt, welches fatale Folgen für die weitere Entwicklung des Organismus hat[11]. Das weite Spektrum an Funktionen allein während ontogenetischer Entwicklungprozesse in Abhängigkeit des Zelltyps, dem Zellstadium und agierenden Ko-Faktoren, machen die TGF-βs zu bedeutenden, aber auch sehr komplexen Zytokinen. Ihre grundlegende Rolle scheint dabei in der Migration, Differenzierung und Apoptose der neuralen Zellen zu liegen.

1.3. Die Activin Familie und ihre Signalweiterleitung

Die Familie der Activine, die auch die antagonistisch wirkenden Inhibine beinhaltet, teilt sich eine gemeinsame β-Untereinheit. Durch Kombination von bis zu vier β-Untereinheiten (βA, βB, βC und βE) können mehrere homodimere Activine entstehen. Die Dimere der murinen Activine, ActivinA (βAβA), ActivinB (βBβB) und ActivinAB (βAβB) sind über eine einzelne kovalente Disulfidbrücke miteinander verbunden. Verbindet sich eine β-Untereinheit mit einer strukturell verwandten α-Untereinheit entstehen die heterodimeren Inhibine. Sowohl die α- als auch die β-Untereinheiten werden als inaktive Vorläuferproteine synthetisiert.

Die Funktionen der Activine sind genauso vielfältig wie die der TGF-βs, weisen aber auch Unterschiede auf. Während der Gewebsbildung wirkt Activin auf die Proliferation und Differenzierung, aber nicht auf die Apoptose. Als Tumorsupressoren haben Activine neben der Proliferation und Differenzierung auch auf apoptotische Mechanismen Einfluss. Weitere Aufgabenbereiche der Activine finden sich in verschiedenen metabolistischen Wegen, in der Immunantworten, in der Wundheilung, in der extrazellulären Matrixbildung und in der Angiogenese wieder[12]. Zudem spielen die Activine sehr früh in der Embryogenese eine bedeutende Rolle und sind wichtige Regulatoren in der Formation des Mesoderms. Die Expression der verschiedenen Activinformen konnte in Abhängigkeit vom Zelltyp in vielen Geweben nachgewiesen werden.

Obwohl die Activine und die TGF-βs verschiedene Rollen bei der Bildung von Geweben spielen, teilen sie sich viele Gemeinsamkeiten in der Signalweiterleitung, da der Signaltransduktionsweg der TGF-β Superfamilie hoch konserviert ist (siehe 1. mit Abbildung 1 und 1.1. mit Abbildung 2)[12]. Auch Activine können ihre Signale Smad-abhängig und Smad-unabhängig weiterleiten. Welche Rezeptorkombination für welche Smad-Aktivierung nötig ist, kann Abbildung 1 entnommen werden. Die TypII Activin Rezeptoren, ActR-II und ActR-IIB, können zudem zusammen mit den BMP TypI Rezeptoren auch die BMPs binden[13].

1.4. Die Activine im sich entwickelnden und adulten Organismus im ZNS

Im adulten Organismus treten die Activine und ihre Rezeptoren in vielen Organen auf, wie in Fortpflanzungsorganen, im Knochenmark, in Augenepithelien, in Drüsengeweben, im Pankreas, im Nervensystem, im Herz, in der Lunge, in Muskeln, in der Leber und in der Niere[14,15].

Activine und ihre Rezeptoren sind durch ihre Funktion, die Mesodermformation zu regulieren, sehr früh in der Embryogenese exprimiert. Während der Organogenese und Differenzierung im mittleren Entwicklungsstadium der murinen Embryogenese erscheinen die TypI Rezeptoren ab dem Embryonaltag 7. Die β-Untereiheiten und der TypII Rezeptor wurden kurz nach der Einnistung der Blastozyste nachgewiesen[16,17]. Dabei haben die Activinformen und Rezeptoren verschiedene Funktionen in der Organogenese in Abhängigkeit der Rezeptor/Liganden-Kombinationen. Im mittleren, murinen Entwicklungstadium sind im Hirn alle Activinrezeptoren und die Activin βB-Untereinheiten expremiert. Im Auge erscheinen der ActR-IB, der TypII Rezeptor und die βA- und βB-Untereinheiten. So können verschiedene Kombinationen und somit Funktionen bzw. Signalweiterleitungen für die Ganglien, die Wirbelsäule, die Lungen, das Herz, für Darmabschnitte, u.s.w. zugeordnet werden[15]. Im sich entwickelnden Nervensystem sind beide TypI Rezeptoren in weiten Teilen vertreten[15]. Die Zellspezifität ist jedoch früh ausgeprägt und vermittelt den Activinen, auch im Nervensystem, eine wichtige Rolle in der Entwicklung durch Funktionen in der Differenzierung, sowie der Migration von Zellen in Geweben[15]. Funktionen in den ontogenetischen Zelltodphasen wurden bis jetzt für Activine nicht gezeigt.

Im adulten System wirken Activine im Nervensystem vor allem als Neuroprotektoren. D.h., in verschiedenen neuralen Systemen fördern Activine das Überleben von Neuronenpopulationen in Folge von Schädigungen durch Ischämien, Hypoxien oder exzitotoxische Signale[18,19]. In adulten neuronalen Zellsystemen ist ActivinA ein wirkungsvoller Regulator der neuronalen Differenzierung[20] und Neuroprotektion[21]. Neurale apoptotische Funktionen von Activinen sind unbekannt[12,14,22].

2. Der programmierte Zelltod

In einem sich entwickelnden und in lebenden Organismen werden Zellen im Überfluss gebildet und viele von ihnen durch Selektions- und Differenzierungsprozesse wieder zerstört. Das Programm zur Zerstörung einzelner Zellen, der programmierte Zelltod, ist ein aktiv regulierter, zelleigener Prozess und wird durch den Stoffwechsel weitergeleitet. Die natürliche und kontinuierliche Zellneubildung sowie der Zelluntergang finden im lebenden Organismus

in vielen Zelltypen zur Regenerierung von Organen und zur Erhaltung der Gewebshomeostase statt. Der gesunde Organismus kann sich mit diesem Programm kranker und schadhafter Zellen entledigen. Dabei handelt es sich sowohl um alternde Zellen oder Zellen mit irreparablen Defekten, zum Beispiel im Genom, als auch um entartete Zellen. Ausfälle im Zelltodprogramm können unter anderem zu Krebs und unkontrolliertem Zellwachstum führen oder Autoimmunerkrankungen hervorrufen.

Im sich entwickelnden Organismus ist der programmierte Zelltod fest im ontogenetischen Entwicklungsprogramm verankert und stellt eine massive Form des Zelltods dar. Defekte oder Fehler im Zelltodprogramm führen zum Abbruch der Embryogenese oder zu fatalen Fehlbildungen im Organismus.

Der molekularbiologische Selbstmordprozess während der Ontogenese und während der Gewebshomeostase wird durch viele morphologische Veränderungen begleitet. Die Zellen runden sich ab und treten aus dem Zellverband aus. Im Zellkern verdichtet sich das Chromatin, die Zelle und ihre Organellen werden in Einzelteile zerlegt und durch Vesikelabschnürungen in mehrere membranumschlossene Körperchen verpackt. Die Abbauprodukte werden letztendlich von den benachbarten Zellen phagozytiert, wodurch es bei dieser Art des Abbaus zu keiner Freisetzung von schädlichen Inhaltsstoffen kommt und Entzündungsreaktionen ausbleiben.

Die Aktivierung des programmierten Zelltods wird durch eine Vielzahl verschiedener Signale, u.a. auch durch Activine und die TGF-βs, ausgelöst. Während ontogenetischer Entwicklungsprozesse können Veränderungen von Wachstumsfaktoren oder Hormonen tödliche Signale sein. Im gesunden Organismus führen, neben diesen Signalen, auch DNA-Schäden oder ein Mangel an Nährstoffen zum aktiven Zelltod. Für die TGF-βs wurden sowohl in den ontogenetischen Zelltodphasen als auch im adulten Organismus eine apoptotische Rolle in verschiedenen Systemen, auch dem Nervensystem, gezeigt[2,6,23,24]. Die Activine dagegen wirken eher im adulten, nicht-neuralen Systemen apoptotisch [12,14].

2.1. Morphologische Formen des programmierten Zelltods

Der programmierte Zelltod, aus dem englischen „Programmed Cell Death“ als PCD abgekürzt, wird aufgrund verschiedener morphologischer Veränderungen in drei Arten unterschieden. Bei allen Formen verdichten sich das Cytoplasma und das Chromatin im Zellkern, jedoch in unterschiedlicher Abfolge. Bei der ersten Form des PCD (TypI PCD), oder auch Apoptose genannt, erscheint die Kondensierung vorherrschend. Hier verdichtet sich neben dem Cytoplasma das Chromatin relativ früh und wird systematisch fragmentiert, d.h. in

nucleosomale Fragmente zerlegt. Die Zelle und ihre noch intakten Organellen werden in apoptotische Vesikelkörperchen verpackt, wodurch apoptotische Zellen kontinuierlich schrumpfen. Diese Vesikel werden von den Nachbarzellen aufgenommen und degradiert. Das Erscheinen von autophagozytierenden Vakuolen, auch Lysosomen genannt, spielt keine herausragende Rolle in der Apoptose und tritt sehr spät im Programm auf[25-27]. Im Gegensatz dazu ist der TypII PCD, auch autophagozytierender Zelltod genannt, durch ein sehr frühes und starkes Auftreten von Lysosomen charakterisiert[28,29]. Das Chromatin des Zellkerns verdichtet sich ebenfalls, aber fragmentiert nicht. Somit erscheint der Zellkern im TypII PCD pyknotisch[30]. Letzendlich werden die Zellüberbleibsel auch hier von benachbarten Zellen phagozytiert. Im TypIII PCD wird die Zelle ebenfalls in Fragmente aufgelöst, jedoch ohne Beteiligung von autophagozytierenden Vakuolen oder einer vorherrschenden Kondensierung der Zellinhalte. Im Weiteren werden grundlegende Mechanismen im Bezug auf die Apoptose beschrieben.

2.2. Wichtige apoptotische Proteinfamilien in der TGF-β- und Activin-induzierten Apoptose

Im folgenden Abschnitt wird auf die in der TGF-β-induzierten und Activin-induzierten Apoptose auftretenden Proteinfamilien eingegangen, da aufgrund der Komplexität von apoptotischen Regulationen nicht alle apoptotischen Proteingruppen beschrieben werden können. Dabei werden die apoptotischen Signalwege in einem zellunabhängigen Kontext als ein Überblick über apoptotische Mechanismen erläutert.

2.2.1. Die extrinsische und intrinsische Signalinduktion

Die Übertragung von apoptotischen Signalen in die Zelle kann auf zwei Hauptwegen geschehen. Einerseits werden Signale extrinsisch über so genannte „Todesrezeptoren“ wie der Fas Rezeptor, der TNF Rezeptor oder der p75 Rezeptor in die Zelle geleitet. Extrinsische Apoptosesignale wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Hormone führen zur Aktivierung der Rezeptoren und initiieren so intrazelluläre Signalwege.

Andererseits kann Apoptose durch intrinsische Signale ausgelöst werden, wie zum Beispiel durch Stress oder DNA-Schäden. Dieser Weg wird auch als „mitochondrialer“ oder „Bcl-2-regulierter“ Signalweg bezeichnet, da der intrinsische Signalweg mit der Aktivierung und Regulation der mitochondrial lokalisierten Bcl-2 Familie einhergeht[31]. Dabei spielen Regulationen am Mitochondrium eine hervorgehobene Rolle. Die intrinsische Induktion der Apoptose fängt mit der Aktivierung oder auch Inhibierung verschiedenster intrazellulärer Protagonisten an. Da eine korrekte Kontrolle der Apoptose für den Organismus

überlebenswichtig ist, liegen ihr zahlreiche, molekulare Regulierungen zugrunde und viele Proteingruppen sind an der Weiterleitung apoptotischer Signale beteiligt, wie zum Beispiel die Caspasenfamilie, die Bcl-2 Familie, Calpaine, MAPK Kinasen und andere modifizierende, enzymatische Protein.

2.2.2. Die Caspasenfamilie

Die Caspasen-vermittelte Apoptose wird oft als klassische Apoptose betitelt und beschreibt damit gleich ihre Wichtigkeit. Die Familie der Caspasen ist sowohl an der Weiterleitung intrinsischer als auch extrinsischer Signale beteiligt und führt zur Einleitung der DNA- und Zellfragmentierung. Die Caspasen als spaltende Cysteinproteasen werden in zwei funktionelle Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe wird als einleitende oder initiierende Caspasen bezeichnet und verbindet erste induzierende Signale mit nachfolgenden Schritten in Signalwegen durch aktivierende proteolytische Spaltungen von Proteinen oder anderer Caspasen. Daher wird die Weiterleitung auch als Caspasen-Kaskade bezeichnet, wobei aus einer inaktiven Procaspase eine aktive Caspase gespalten wird. Die zweite Gruppe wird als ausführende Caspasen oder Effektorcaspasen bezeichnet. Diese Gruppe führt das Zelltodprogramm irreversibel weiter, indem vielfache zelluläre Substrate gespalten und somit aktiviert oder inaktiviert werden. Zu den Substraten gehören: (1) Proteine die direkt in die Apoptose involviert sind, wie zum Beispiel die Bcl-2 Familie oder andere Caspasen (2) Proteine die Signaltransduktionen regulieren wie die ERK, JNK oder p38 Kinasen, (3) essentielle Proteine, (4) Proteine die den Zellzyklus regulieren oder (5) Proteine die für die DNA Reparatur verantwortlich sind[32].

Von elf murinen Caspasen zählen die Caspasen-3, -6 und -7 zu den substratspaltenden Effektorcaspasen. Den restlichen acht Initiatorcaspasen können bestimmte Funktionen in den intrinsischen oder extrinsischen Weiterleitungen zugeordnet werden. Dabei wird die Caspase-8 durch eine Komplexbildung mit der Todesdomäne der Todesrezeptoren aktiviert[23] und stellt eine zentrale Komponente des extrinsischen Wegs dar (Abbildung 3). Die Caspase-8 aktiviert in den meisten Fällen durch proteolytischer Spaltung die Effektorcaspasen-3/-6 und -7, aber auch andere apoptotische Proteine wie das Bcl-2 Familienmitglied Bid.

Die post-mitochondriale Initiatorcaspase-9 wird durch Regulationen am Mitochondrium aktiviert und ist somit Bestandteil des intrinsischen Signalwegs (Abbildung 3). Am Mitochondrium entstehen durch apoptotische Signale Poren in der Membran, aus denen viele verschiedene Moleküle freigesetzt werden wie unter anderem CytC. Die CytC Freisetzung induziert die Formation des so genannten Apoptosoms, das sieben Dimere der Caspase-9

beinhaltet[23]. Somit wird die Caspase-9 als einzige Caspase nicht durch proteolytische Spaltung aktiviert. Das Apoptosom aktiviert ebenfalls die Effektorcaspasen-3/-6 und -7.

Die Caspasen-1, -5 und-11 stellen eine separate Gruppe von Initiatorcaspasen dar, die neben der Apoptose vorwiegend Entzündungsreaktionen weiterleiten. Die Caspase-12 steht eng mit Regulationen der Bcl-2 Familie am endoplasmatischen Retikulum in Verbindung und leitet somit intrinsische Signale weiter[33]. Die Caspase-2 hat den strukturellen Aufbau einer Initiatorcaspase. Sie kann früh durch eine Vielzahl apoptotischer Signale als eine Initiatorcaspase aktiviert werden[34] oder aber auch spät im Signalweg als Effektorcaspase agieren, da sie in der Lage ist, eine Vielzahl von Substraten zu spalten[32].

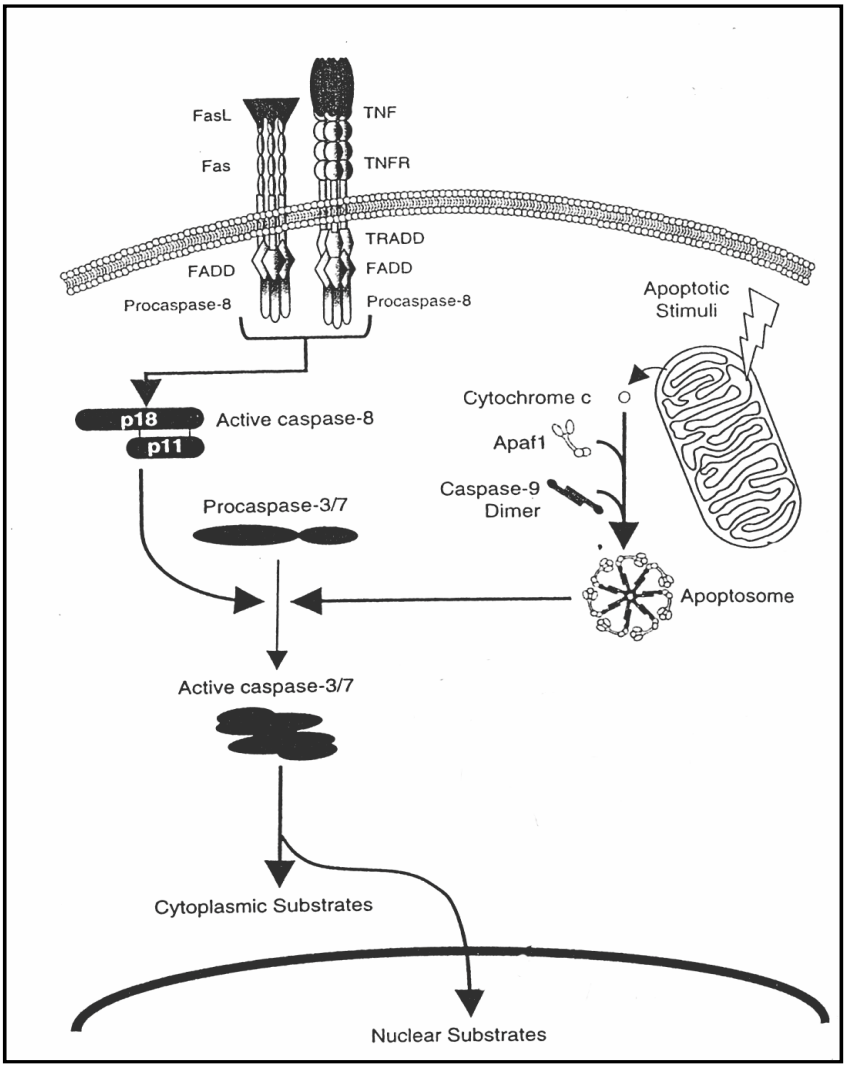


Abbildung 3: Die Caspasen-Kaskade[35]. (Gross *et al.*, 1999)
Die vereinfachte Darstellung zeigt einen Überblick über die Caspasen-Kaskade. Dabei werden die inaktiven Procaspasen durch proteolytische Spaltung aktiviert und spalten ihrerseits wieder in der Signalkaskade nachstehende Proteine oder auch Effektorcaspasen. Dabei kann die Caspase-8 dem extrinsischen Weg und die Caspase-9 dem intrinsischen oder auch mitochondrialen Weg zugeordnet werden. Die Regulationen führen alle zur Aktivierung von Effektorcaspasen, wie die Caspase-3 und-7 und somit zur Spaltung vieler Substrate.

Hervorhebend muss darauf hingewiesen werden, dass die Aktivierung der einzelnen Caspasen keinem strikten Ablauf folgt. D.h. die Caspasen und verschiedenste mitwirkende Proteine können Quervernetzungen und Interaktionen zwischen den einzelnen Signalwegen herstellen.

2.2.3. Die Bcl-2 Familie

Die Proteine der Bcl-2 Familie sind wichtige Regulatoren der Apoptose. Sie regulieren die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran, hauptsächlich über Protein-Protein Interaktionen untereinander, und sind so verantwortlich für die Freisetzung verschiedenster Faktoren aus dem Mitochondrium[36]. Dabei agieren sie in Abhängigkeit von Zelltyp, Zellstadium und apoptotischen Signalen.

Die Bcl-2 Familie wird in drei Gruppen nach ihrer Funktion und ihrem Aufbau eingeteilt (Abbildung 4). Dabei enthalten sie bis zu vier Bcl-2 homologe (BH) Domänen, BH1 bis BH4, die charakteristisch für diese Familie sind. Einige Mitglieder weisen weiterhin eine Transmembran (TM) Domäne auf. Die Proteine der anti-apoptotischen „Bcl-2 Subfamilie“ mit den Mitgliedern Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, A1 und Mcl-1 besitzen mindestens drei BH Domänen und eine TM Domäne zur Lokalisierung an äußeren Membranen von Zellorganellen[37]. Die hoch konservierten BH Domänen (BH1-BH4) formen eine hydrophobe Grube für Protein-Protein Interaktionen mit anderen Mitgliedern[37-40].

Mitglieder der pro-apoptotischen „Bax Subfamilie“, wie Bax, Bak und Bok, besitzen einheitlich drei der hochkonservierten BH Domänen (BH1-BH3) und formen ebenfalls wie die Domänen der „Bcl-2 Subfamilie“, eine hydrophobe Grube für Protein-Protein Interaktionen[37-40]. Durch ihre TM Domänen können auch sie an das Mitochondrium oder an das endoplasmatischen Retikulum (ER) binden.

Die pro-apoptotische „BH3-only Subfamilie“ mit den Mitgliedern Bik/Nbk/Blk, Hrk/DP5, BNip3, BNip3L, Bcl-xs, Bim, Noxa, Bad, Puma/Bbc3, Bmf und Bid besitzt nur die BH3 Domäne, eine hoch konservierte und kurze Domäne (9-16aa), und können selber keine Grube bilden. Durch die BH3 Domäne können die BH3-only Proteine Interaktion mit der hydrophoben Grube der „Bax Subfamilie“ und der „Bcl-2 Subfamilie“ eingehen und somit die anti-apoptotische Funktion der „Bcl-2 Subfamilie“ neutralisieren oder eine aktivierende Konformationsänderung der Proteine der „Bax Subfamilie“ induzieren. Durch die Konformationsänderung trägt die „Bax Subfamilie“ zur Porenformation am Mitochondrium bei.

Die „Bax Subfamilie“ und die „Bcl-2 Subfamilie“ werden basal exprimiert. Post-translationelle Modifikationen dienen ihrer Lokalisierung in der Zelle[41]. Ihre Aktivierung (Bax Subfamilie) und Deaktivierung (Bcl-2 Subfamilie) erfolgt durch die Interaktionen mit anderen Mitgliedern der Familie, hauptsächlich durch BH3-only Proteine. In Folge apoptotischer Signale wird zudem ihre basale Expression verhindert oder gesteigert.

Eine Aktivierung der BH3-only Proteine erfolgt über vielfältig Regulationen[31]. In Folge apoptotischer Signale werden die meisten BH3-only Proteine durch die transkriptionelle Induktion aktiviert. Einige BH3-only Proteine sind ebenfalls basal exprimiert und werden in Folge apoptotischer Signale durch post-translationelle Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Spaltungen aktiviert.

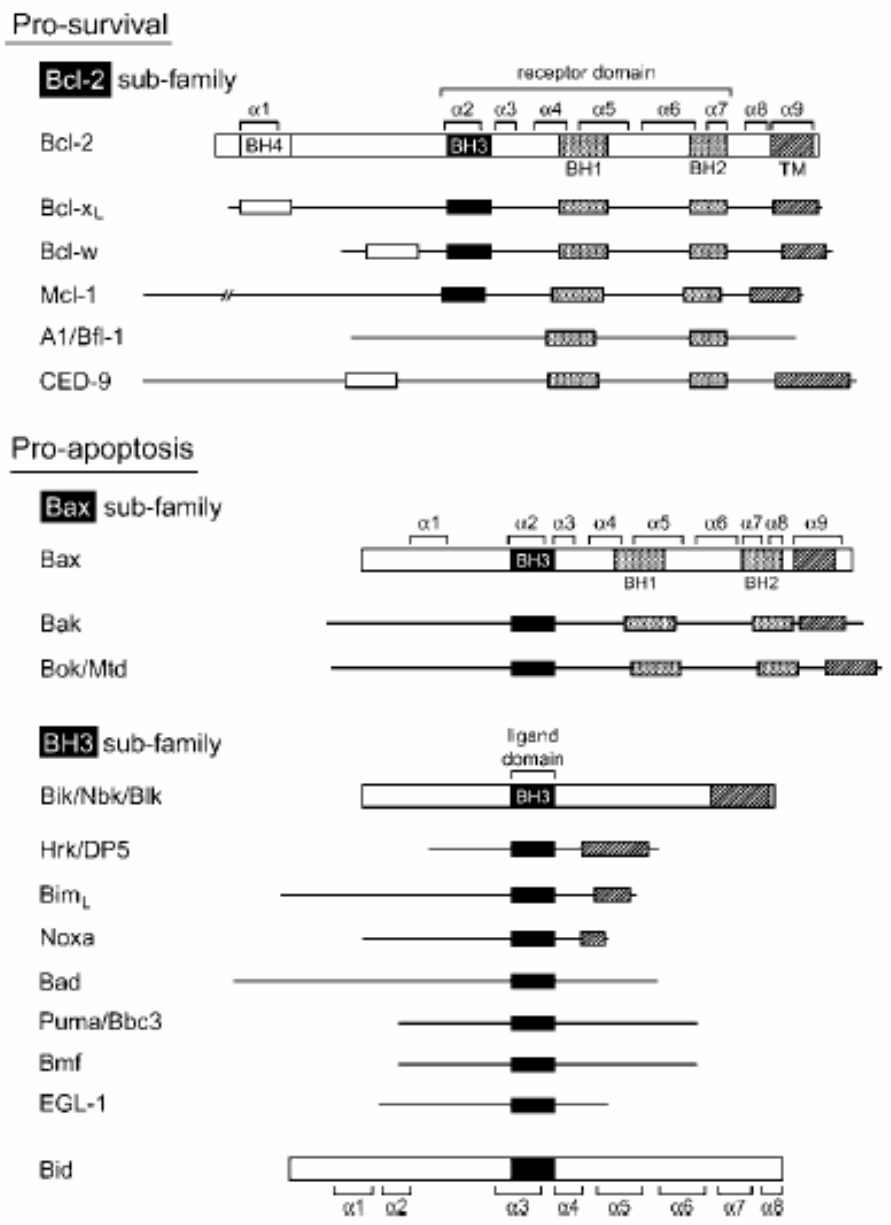


Abbildung 4: Schematischer Überblick über die Bcl-2 Familie mit ihren drei Subfamilien [37]. (Gross *et al.*, 1999)

Dazu gehören die Bcl-2 Subfamilie, die Bax Subfamilie und die BH3-only Subfamilie, welche aufgrund ihres Aufbaus der BH-Domänen und ihrer Funktion gegliedert sind. Zudem besitzen einige von ihnen eine Transmembran-Domäne zur Lokalisierung an Membranen von Organellen.

Durch die Interaktion von aktivierten BH3-only Proteinen mit den Bax-ähnlichen Proteinen werden die Bax-ähnlichen Proteine in ihrer Konformation geändert, oligomerisieren und translokalisieren an die äußere, mitochondriale Membran (Abbildung 5). Dort tragen sie zur Porenbildung bei und führen zur Freisetzung von mitochondrialen Faktoren wie CytC oder AIF.

Die anti-apoptotische „Bcl-2 Subfamilie“ bindet unter nicht-apopototischen Bedingungen Mitglieder der „Bax Subfamilie“ und verhindert dadurch deren pro-apoptotisches Wirken. Interaktionen mit aktivierten BH3-only Proteinen führen zur Neutralisierung der anti-apoptotische Funktion der „Bcl-2 Subfamilie“. Somit werden Bax-ähnlichen Proteine frei gelassen und oligomerisieren. Dabei kommt es vor, dass das gleiche BH3-only Protein in einem Zelltyp an Bcl-2-ähnliche und in einem anderen Zelltyp an Bax-ähnliche Proteine bindet.

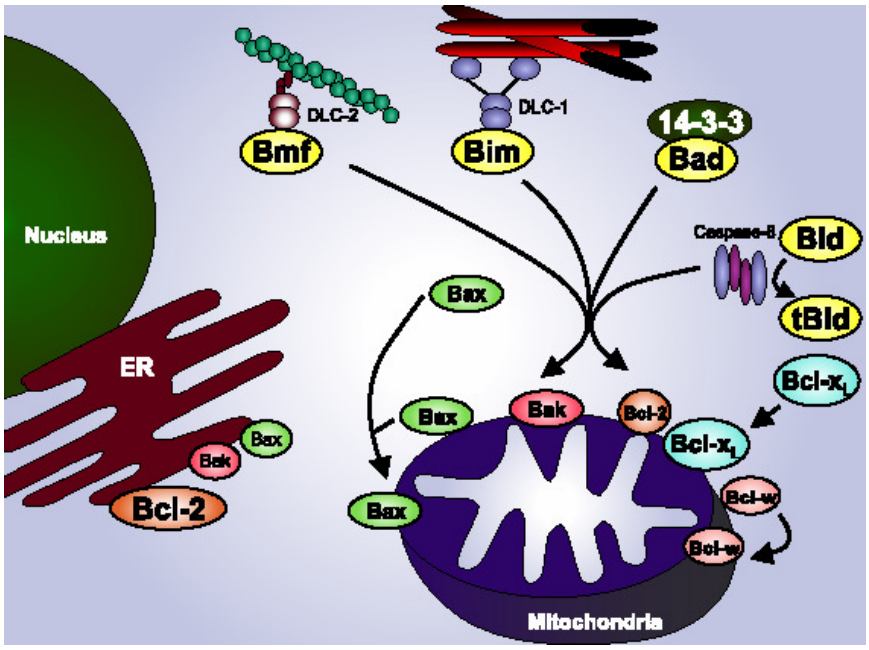


Abbildung 5: Überblick über die Regulation der Bcl-2 Familie[42]. (Schinzel *et al.*, 2004)
In gelb dargestellte Proteine der BH3-only Subfamilie werden aufgrund apoptotischer Signale aktiviert und führen durch Interaktionen mit den Mitgliedern der Bax Subfamilie (rot/grün) zu deren Oligomerisierung und dadurch zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran. Die anti-apoptotische Funktion der Bcl-2 Subfamilie (blau/braun) wird durch die BH3-only Proteine neutralisiert. Dadurch kommt es ebenfalls zur Porenbildung an der mitochondrialen Membran und zur Freisetzung verschiedenster Moleküle und Proteine zur Weiterleitung der Apoptosekaskade.

Die Aktivierung der verschiedenen BH3-only Proteine (Abbildung 5) ist abhängig vom Zelltyp und dem apoptotischen Signal. Die meisten Proteine werden über ihre Expression aktiviert, wie Puma/Bbc3, BNip3, BNip3L, DP5/Hrk, Noxa, Bim, Bcl-xs[43-47]. Bim kann auch über einen zweiten Weg, der Translokalisierung, reguliert werden. In nicht-apoptotischen Zellen wird das Protein inaktiv an einer Komponente des Zytoskeletts, der leichten Kette des Dyneins (DLC1), festgehalten. Durch Phosphorylierung dissoziiert es ab und translokalisiert

in einer aktiven Form zu seinem Zielort[48]. Eine ähnliche Regulation weist das BH3-only Protein Bmf auf[49]. In einem anderen Zellmodell werden Bim und Bmf hauptsächlich über ihre Transkription reguliert, unabhängig von post-translationellen Modifikationen[50]. Das BH3-only Protein Bid wird durch die Caspase-8 gespalten, aktiviert und interagiert so mit anderen Mitgliedern der Familie[51]. Dadurch stellt es eine Verbindung zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Signalweg her. Bad ist unter nicht-apoptotischen Bedingungen an zwei Serinen phosphoryliert und kann so durch das 14-3-3 Protein inaktiv festgehalten werden. Durch Dehosphorylierung dissoziiert Bad ab und geht Interaktionen mit Proteinen der anderen Subfamilien ein[52].

Letztendlich dienen post-translationelle Regulationen von Bcl-2 Familienmitgliedern ihrer Lokalisierung in der Zelle sowie ihrer Aktivierung. Zusätzlich werden die post-translationell-aktivierten Proteine auf transkriptioneller Ebene reguliert[23,31,53]. Das gilt sowohl für die basal exprimierte, anti-apoptotische „Bcl-2 Subfamilie“ als auch für die basal exprimierte, pro-apoptotische „Bax-Subfamilie“, in denen auch die Proteine Bcl-xl, Bcl-2 oder Bax responsiv für transkriptionelle Regulationen sein können[23,31,41,53].

Die Bcl-2 Familie spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Apoptose, indem sie die Zellen durch ihre anti-apoptotischen Mitglieder vor apoptotischen Signalen schützt oder die Apoptose auslöst. Dabei agieren die Mitglieder an verschiedenen intrazellulären Orten wie im Cytosol, am ER und hauptsächlich am Mitochondrium.

2.2.4. Die Calpainfamilie

Neben den Caspasen als wichtigste Proteasen innerhalb apoptotischer Signalwege, gibt es regulatorische Wege die unabhängig von Caspasen agieren können. Ein Weg geht über die Familie der Calpaine, als kalzium-abhängige, nicht-lysosomale Cysteinproteasen. Die beiden am besten untersuchten heterodimeren Calpaine, Calpain 1 und 2 (oder auch µ-Calpain und m-Calpain genannt) besitzen eine kleine regulatorische 30kDa und eine große katalytische 80kDa Untereinheit. Neben Funktionen in der Apoptose sind Calpaine in verschiedenen Prozessen in der Zelle beteiligt. Die Proteasen werden dabei durch veränderte Kalziumkonzentrationen aktiviert. Im Vergleich zur niedrigen Kalziumkonzentration im Zytosol (<0.1 µMol), sind die extrazellulären und intermembranen Konzentrationen der Zellorganellen um ein vielfaches höher (>2 mMol). Bei der Aktivierung von Kalziumkanälen durch Ligandenbindungen oder durch Depolarisierung der Membranen erfolgt ein starker Kalziumeinfluss in das Cytosol, wodurch die zytosolisch lokalisierten Calpaine aktiviert werden. Dabei sprechen die einzelnen Calpaine auf unterschiedliche Kalziumkonzentrationen an. Die regulatorischen Mechanismen der Calpaine sind genauso vielfältig wie die der

Caspasen oder der Bcl-2 Familie. Viele Signalgruppen stehen miteinander in Verbindung, so dass hier nicht auf alle Regulationen durch Calpaine eingegangen werden. Die wichtigsten Regulationen in Bezug zu dieser Arbeit sind im Folgenden kurz dargestellt.

Durch diese Proteasenfamilie werden verschiedene Mitglieder der Bcl-2 Familie, der p53 Familie und auch Caspasen reguliert[54] (Abbildung 6). Im Zusammenhang mit der Bcl-2 Familie können Calpaine durch Spaltung von Bax und Bid zu deren Aktivierung und letztendlich zur CytochromC Freisetzung beitragen[55,56]. Das anti-apoptotische Protein Bcl-xl wird auf verschiedenen Wegen reguliert, indem es einmal direkt durch Calpaine inaktiviert wird oder durch das zuvor durch Calpaine gespaltene p53 Protein in seiner Funktion neutralisiert wird[57]. Die Aktivierung der Bcl-2 Familienmitglieder führt wiederum zur mitochondrialen Porenbildung und Freilassung apoptotischer Faktoren wie CytC oder AIF. AIF kann abhängig und unabhängig von der Bcl-2 Familie durch Calpaine aus dem Mitochondrium entlassen werden (siehe Abschnitt 2.2.5.).

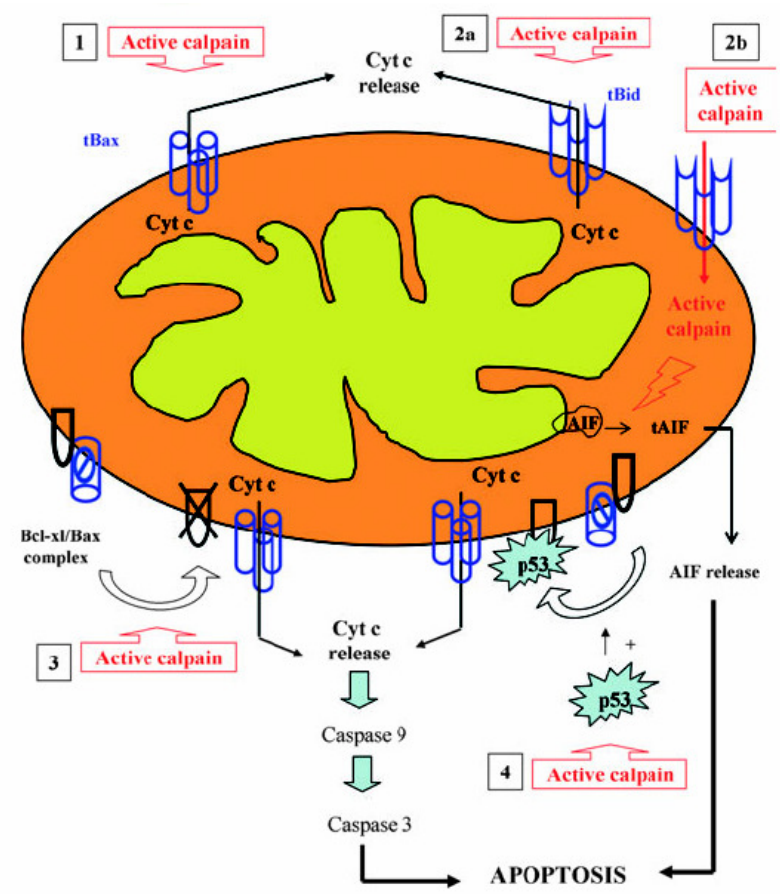


Abbildung 6: Überblick über Calpain-abhängige Signalwege und involvierte Protein-gruppen[54]. (Raynaud et al., 2006)

In (1) und (2a) wird die Calpain-abhängige Spaltung von Bax und Bid und die damit verbundene CytC Freisetzung dargestellt. Die anti-apoptotische Funktion von Bcl-xl kann direkt (3) oder auch indirekt über p53 (4) durch Calpain inaktiviert werden. Diese Inaktivierung führt zur Frei-setzung von verschiedenen Molekülen aus dem Mtc. Über Calpain wird AIF in einer gespaltenen Form aus dem Intrazellularraum des Mtc's entlassen (2b) und führt zur Apoptose.

2.2.5. Der murine apoptose-induzierende Faktor (AIF)

Mitochondriale Intermembran-Proteine sind oft in Caspase-unabhängigen, apoptotischen Regulationswegen involviert. In den letzten Jahren ist dabei ein mitochondriales Flavoprotein, das in gesunden Zellen seine Funktion im Redoxmetabolismus des Mitochondriums hat, als apoptotischer Faktor immer mehr in Erscheinung getreten. Der murine Apoptose-induzierende Faktor, kurz AIF, ist als NADH Oxidase eine Komponente der Atmungskette, die essentiell für die optimale oxidative Phosphorylierung und somit für einen effizienten anti-oxidativen Schutz ist[58]. In einem Mausstamm, namens Harlequin (Hq) Maus, wurde die AIF Expression auf 10 bis 20% reduziert, wobei u.a. neurodegenerativen Erkrankungen und Blindheit auftraten[59].

AIF beihaltet drei strukturelle Domänen: eine N-terminale mitochondriale Lokalisierungsequenz (MLS), eine Spacersequenz und eine C-terminale Oxidoreduktase Domäne[60]. Dabei ist die C-terminale Domäne auch für die apoptotische Funktion von AIF verantwortlich[61]. D.h. während AIF eine lebenswichtige Rolle in der Atmungskette spielt, erscheint der Faktor durch Translokalisierung in den Zellkern als ein apoptotisches Protein, der dort die Chromatinkondensierung und DNA-Fragmentierung mit anderen Ko-Faktoren einleitet[58,62]. Die Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium ist hauptsächlich ein Caspase-unabhängiger Prozess, der aber oft die Bcl-2 Familie involviert und abhängig von Zelltyp sowie dem apoptotischen Signal ist. Es gibt zwei Wege auf denen AIF aus dem Mitochondrium entlassen werden kann. Die Unterschiede basieren auf verschiedene Modifikationen des AIF-Vorläuferproteins (67kDa) während der post-translationellen Modifikation im Mitochondrium zu einem gereiften Protein. Dabei scheinen diese Unterschiede wieder abhängig vom Zelltyp zu sein. Im ersten Weg werden dem Vorläuferprotein die ersten einhundert AS abgespalten und ein 57kDa lösliches Intermembran-Protein entsteht. Diese Form kann durch apoptotisch geöffnete Poren in der Membran freigesetzt werden. Im zweiten Weg werden nur 52 N-terminale AS (62kDa) abgeschnitten und AIF translokalisiert durch seine Transmembran-Domäne (TM) an die innere mitochondriale Membran. Durch apoptotische Signale wird das gereifte AIF durch Proteasen von der TM gespalten und wandert durch Poren aus dem Mitochondrium[58] (siehe Abbildung 7). Dabei können die Calpaine, aber nicht die Caspasen, AIF zwischen den AS 102 und 103 schneiden[63] (Abbildung 6). Zusammen mit verschiedenen Ko-Faktoren, wie Endonucleasen, wandert AIF in den Kern, um dort die DNA-Kondensierung einzuleiten. AIF selber besitzt keine DNase Aktivität, kann aber mit der DNA direkt interagieren[61,64]. Somit

stellt das murine AIF Protein einen weiteren wichtigen Modulator der Apoptose dar, der durch verschiedene Proteinfamilien reguliert werden kann.

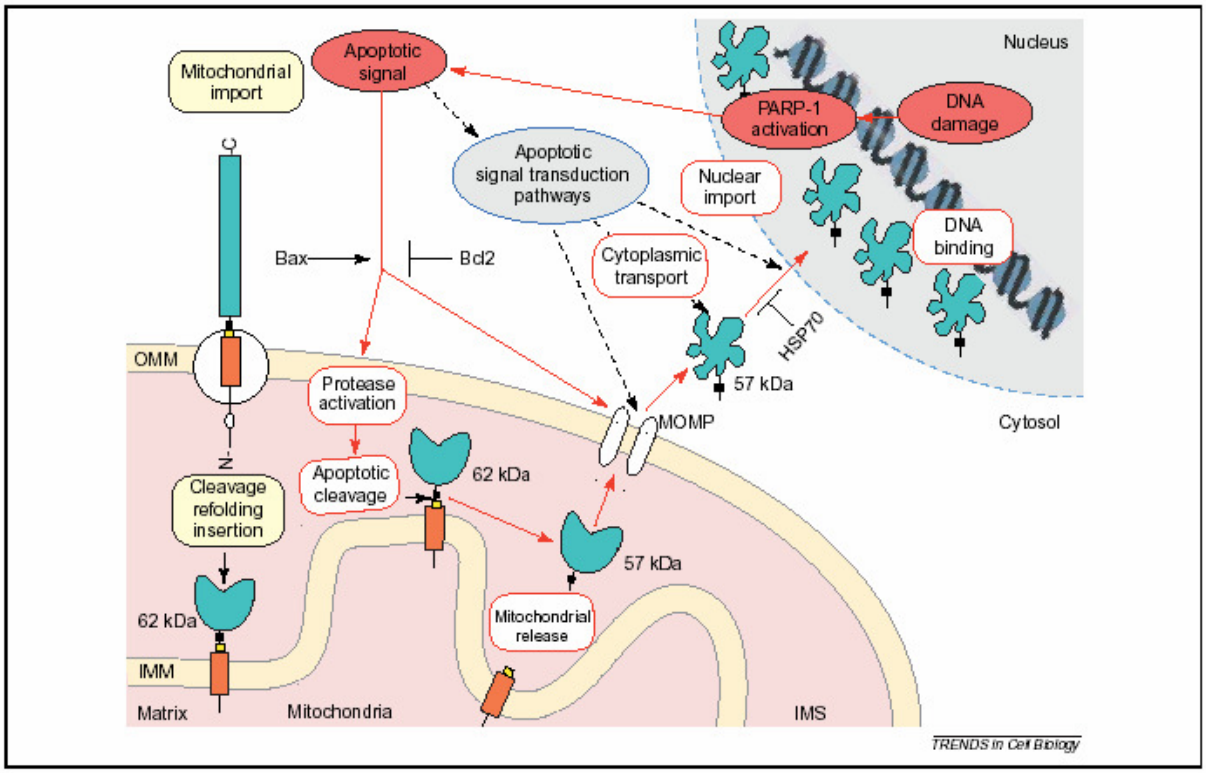


Abbildung 7: Übersicht über die zelluläre AIF Lokalisierung[58]. (Modjtahedi *et al.*, 2006)

Das unreife 67kDa AIF Protein wird über seine MLS zum Mtc transportiert. Nach der Abspaltung der N-terminalen MLS wird das gereifte 62kDa AIF über seine TM in die innere mitochondriale Membran integriert. Im intermembranen Spalt geht AIF seiner Funktion in der Atmungskette nach. In Folge apoptotischer Signale wird das gereifte AIF von seiner TM durch Proteasen gespalten und wandert durch Membranporen ins Zytosol und dann in den Zellkern. Proteine der Bcl-2 Familie oder die Calpaine können den Prozess der AIF Freilassung steuern. Nach der Wanderung in den Nucleus bindet AIF an das Chromatin und induziert mit anderern Ko-Faktoren die DNA-Kondensierung.

2.2.6. Der Raf/MEK Signalweg und die MAP-Kinasefamilie

Der extrinsische Raf/MEK/ERK Signalweg ist ein komplexer und zentraler MAP-Kinase Signaltransduktionsweg der Zelle. Dabei steht MAP-Kinase (MAPK) für mitogen-aktivierte Proteinkinase und zeigt, dass der Signalweg über Mitogene, Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert werden kann. Signale werden von Rezeptoren über die MAPK an Transkriptionsfaktoren geleitet, um im Zellkern transkriptionell regulierte Gene zu aktivieren. Gerade der Raf/MEK/MAPK Signalweg kann viele Verbindungen und Interaktionen zu anderen Proteinfamilien und Signalwegen herstellen. Daher kann hier nur ein grober Einblick in die Signalkaskade gegeben werden.

Über eine Rezeptor-Liganden-Bindung wird das GTP-bindene Protein Ras aktiviert und die Translokalisierung von Raf (MAPKKK) oder anderen Mitgliedern der MAPKKK Familie an

die Membran stimuliert. Raf aktiviert dann seine vorrangigen Zielproteine, die MEK-Kinasen (MAPKK), neben anderen Zielproteinen in Abhängigkeit der induzierenden Signale. Die MEK Familien Gene besitzen eine regulatorische und eine MAPK-bindene Domäne zur Aktivierung der MAPK Familie, oder auch ERK Familie genannt. Die MAPK Familie besteht aus vier verschiedenen Gruppen von Kinasen: (1) ERK mit ERK1 und ERK2, (2) Jun amino-terminale Kinasen mit JNK1 bis JNK3, (3) Protein 38 (p38) mit p38α, β, γ und (4) ERK5 [65]. Die Aktivierung von Mitgliedern der ersten Gruppe, der ERK MAPK Kinasen, führt dabei zur Erhaltung des Zellwachstums, während die Aktivierung der zweiten und dritten Gruppe, der JNK und p38 MAPK Kinasen, zum Zelltod führt. Dabei wandert jede Kinase als aktiviertes Heterodimer in den Kern, um ihren eigenen Transkriptionsfaktor zur Expression verschiedener Zielgene zu aktivieren, die sowohl anti- als auch pro-apoptotisch wirken können. In der Abbildung 8 ist ein schematischer Überblick über die Signalweiterleitung des Weges über die verschiedenen Kinasen dargestellt.

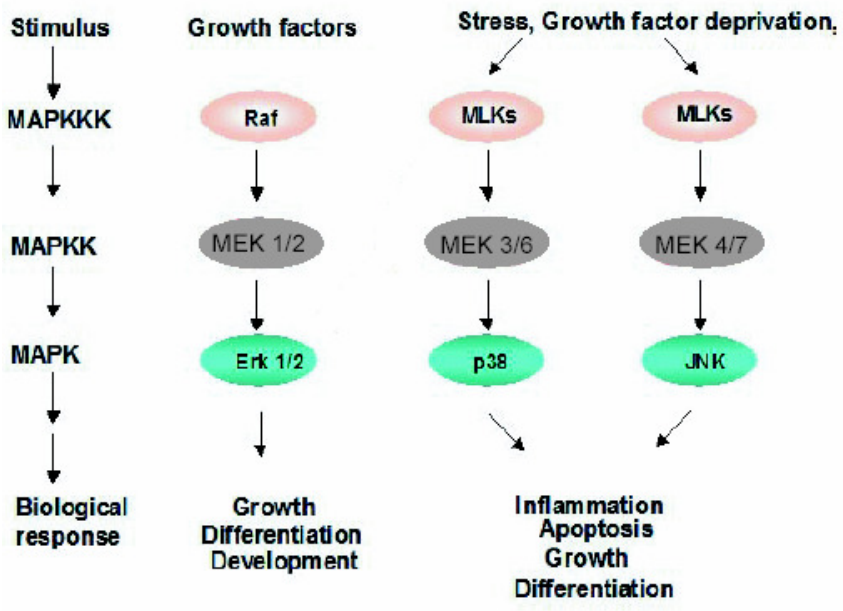


Abbildung 8: Übersicht über die Kinasenkaskade der MAPK Familie.
Die Signalweiterleitung folgt immer dem Prinzip, dass eine Kinase des Signalweges die nächste Kinase aktiviert, bis letztendlich der Transkriptions-faktor phosphoryliert wird. Ein Transkriptionsfaktor und die Kinasen dazwischen können auf viele unterschiedliche Wege aktiviert werden, in Abhängigkeit des Zelltyps, dem Signal und deren Weiterleitung.

2.2.7. Komponenten des Zytoskeletts

Neben Veränderungen der DNA und Zellmembranen während apoptotischen Prozessen, spielt auch die Reorganisation des Zytoskeletts eine kritische Rolle. Aktin ist in gesunden Zellen eine der Hauptkomponenten im Zytoskelett. Die Isoformen beta- (β-) und gamma- (γ-) Aktin, auch als zytosolische Aktine bekannt, sind hauptsächlich in nicht-muskulären Zellen exprimiert und kontrollieren die Struktur sowie die Motilität der Zelle. Bei Eingriffen durch

apoptotische Signale in die modulierenden und organisatorischen Funktionen des Zytoskeletts, etwa durch bestimmte chemische Stoffe, werden apoptotische Wege in Gang gesetzt, die Caspasen und Mitglieder der Bcl-2 Familie involvieren[66].

Durch apoptotische Signale wird Aktin an einer hoch konservierten Schnittstelle durch Effektorcaspasen gespalten. Es entstehen dadurch zwei Fragmente, einmal das 32kDa Fragment von Aktin (Fraktin) und das geschnittene 15kDa Fragment tAktin[67-69]. tAktin vermittelt morphologische Veränderungen in der Zelle, die der Apoptosemorphologie gleichen. Dabei translokalisiert tAktin an das Mitochondrium[69,70]. Das N-terminale 32kDa Fraktin gilt als ein charakteristisches Merkmal für Apoptose in neuralen Systemen[71-74], wobei Funktionen für Fraktin bisher nicht bekannt sind.

Durch Regulationen des Aktins werden viele Poren- und Kanalöffnungen gesteuert. Reduktionen der dynamischen Funktion von Aktin führen zu mitochondrialen Porenöffnungen an spannungsabhängigen, anionischen Kanälen (VDAC)[75] und es kommt zur Freisetzung von Faktoren. Auch Kalziumkanäle werden durch Polymerisierungen und Depolymerisierungen des F-Aktins reguliert. Dies führt u. a. zu einem Kalziumeinfluss in das Zytosol und kann Kalzium-abhängige Proteasen aktivieren, wie zum Beispiel die Calpaine[76].

Unter 2.2.3. wurden Funktionen des Zytoskeletts in Bezug auf die inaktivierende Funktion von BH3-only Proteinen besprochen. Die Proteine Bim und Bmf werden in einem inaktiv Zustand durch eine Bindung an Dyneinketten vom Mitochondrium ferngehalten[48,49]. Somit kann das Zytoskelett eine wichtige Komponente in apoptotischen Signalwegen darstellen.

3. TGF-β-induzierte Apoptose im Nervensystem

In der ontogenetischen Entwicklung des Nervensystems und später im adulten Organismus muss das Zusammenspiel von Überleben und Tod funktionieren, um schwere Schäden und Erkrankungen zu vermeiden. Die wichtige neuronale Rolle der TGF-β Familie zeigte sich erstmals in Arbeiten an postnatalen Körnerzellen des Kleinhirns, welche unter veränderten physiologischen Salzkonzentrationen und in Anwesenheit von verschiedenen TGF-β Isoformen in Apoptose gingen[77]. Dabei zeigen die Körnerzellen unter normalen physiologischen Bedingungen keinen Effekt auf TGF-β. Diese Ergebnisse suggerieren eine apoptotische Funktion in Hinblick auf das Zellmilieu von Neuronen.

Die Wichtigkeit von TGF-βs während den ontogenetischen Zelltodphasen zeigten Experimente im sich entwickelnden Nervensystem in *Gallus gallus*. Hier wird der ontogenetische Zelltod im Ciliarganglion, in Spinalganglien und Motorneurone der Wirbelsäule durch neutralisierende Antikörper gegen endogenes TGF-β reduziert[78]. In der

Retina wird Apoptose über die aktivierte JNK MAP Kinase und das anti-apototische Protein Bcl-xl reguliert[79,80].

Die murine *TGF-β2-/-TGF-β3-/-* Doppelmutante suggeriert für TGF-β eine essentielle Rolle in der Entwicklung der Mausretina[81]. In *in vitro* Experimente mit kultivierten, murinen Retinazellen wurde dem anti-apoptotischen Bcl-2 Protein und den Caspasen eine regulatorische Funktion in der Retinaentwicklung zugeordnet[82].

Für Gliazellen stellt TGF-β ebenfalls ein wichtiges regulatorisches Zytokin dar. In der T24 Gliomazelllinie inhibiert TGF-β die Proliferation und führt die Zellen in den Zellzyklusarrest, welcher wiederum früher oder später den Zelltod bedeutet[83].

3.1. Koorperative und TGF-β-involvierte Effekte im neuralen System

Die Multifunktionalität und die starke Kontextabhängigkeit von TGF-β wird im Zusammenhang mit anderen synergistisch oder kooperativ wirkenden Faktoren nochmals unterstützt. Die Funktion und Wirkungsweise des neurotrophen Faktors GDNF wird durch TGF-β beeinflusst und trägt zum Überleben von peripheren und zentralen dopaminergen Neuronen bei[10]. TGF-β und TNF-α wiederum wirken zusammen apoptotisch in Zellen des peripheren Nervensystems, den Schwannzellen[84]. In den oligodendroglialen Oli-neu Zellen führt diese Koorperation ebenfalls zur Verstärkung des TGF-induzierten Zelltods[85]. Synergistische Effekte von TGF-β mit TNF-α konnten auch in interstitialen Zellen oder in Fibroblasten gezeigt werden. Mitglieder der TGF-β Superfamilie, die BMPs, kooperieren mit TGF-β2 über den Smad-Signalweg und führen zur einer verstärkten Apoptose in retinalen Zellen[86].

3.2. TGF-β1-induzierte Apoptose in Oli-neu Zellen

In TGF-β1-behandelten Oli-neu Zellen verläuft der induzierte Zelltod über die Caspasen und das Bcl-xl Protein. Sowohl die Bcl-xl mRNA als auch das Bcl-xl Proteinlevel sind in Folge einer TGF-β1 Behandlung reduziert[87]. Die Regulationen des mitochondrial-lokalisierten Bcl-xl Proteins und die TGF-β1-induzierte CytC Freisetzung lässt stark auf Regulationen am Mitochondrium, auch durch BH3-only Proteine, schließen[85]. In dem Oli-neu Modell sind Initiatorcaspasen der extrinsischen als auch intrinsischen Signalweiterleitung involviert. Die Aktivierung der Effektorcaspase-3 ist dabei von der Caspase-9 und Caspase-8 abhängig. Zudem konnte eine Inhibition der ERK MAP-Kinasen festgestellt werden[87]. Im Zusammenspiel mit TNF-α wird die TGF-induzierte Smad-Aktivierung und die Apoptose verstärkt[85].

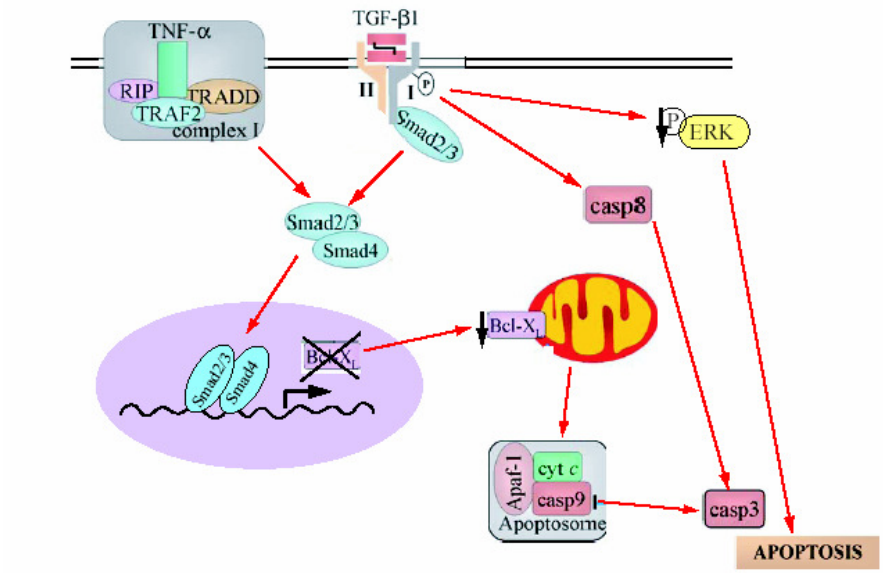


Abbildung 9: Überblick über TGF-β1-abhängige Signalwege in Oli-neu Zellen. (modifiziert nach Sanchez-Capelo, 2005)

TGF-β führt zur Aktivierung der Smad-Proteine und zu einer Herunterregulation der Bcl-xl Expression. Die TGF-β-induzierte Caspase-3 Aktivierung ist abhängig von den Caspasen-8 und -9. Die Aktivität der ERK MAP Kinase wird reduziert. Im Zusammenspiel mit TNF-α erfolgt eine Verstärkung des Signalweges.

3.3. Übersicht über TGF-β-induzierte Signalwege im Zell-unabhängigen Kontext

TGF-βs induzieren abhängig vom Zelltyp, Zellstadium, der Umgebung und im Zusammenspiel mit anderen Faktoren auf mehreren regulatorischen Signalwegen Apoptose. In der Abbildung 10 sind alle bekannten pro-apoptotischen, TGF-β-induzierten Regulationen in einem Schaubild für alle Zelltypen zusammengefasst. Dabei interagiert TGF-β mit extrinsischen und intrinsischen Signalwegen, die zur Aktivierung der Smad Familie und MAP Kinasen, Regulierung der Bcl-2 Familie, Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFκB und verschiedenen signalweiterleitendenen Kinasen führen[23]. In Bezug auf die Bcl-2 Familie konnten bisher TGF-β1-vermittelte Regulationen von anti-apoptotischen Mitgliedern wie Bcl-xl, Bcl-2 und Mcl-1, und pro-apoptotischen Mitgliedern wie Bax, Bid, Bmf und Bim ermittelt werden[23,50].

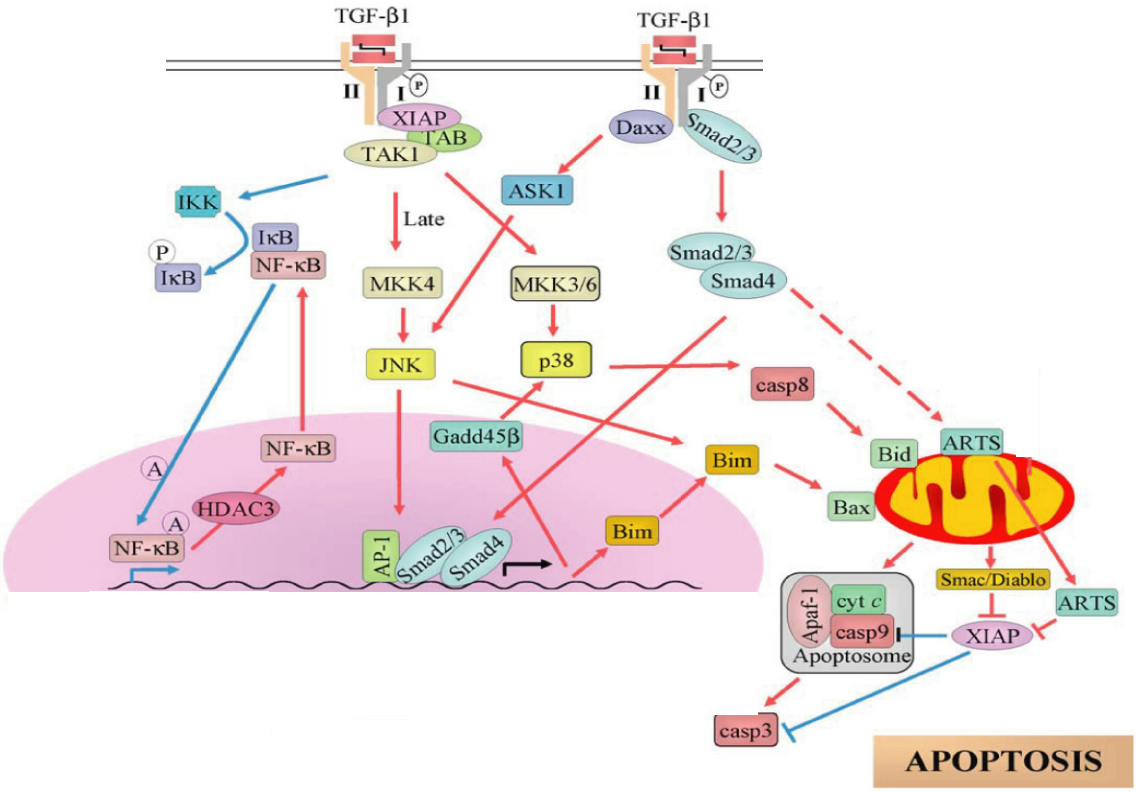


Abbildung 10: Überblick über Zelltyp-unabhängige Signalwege und Interaktionen zwischen extrinsischen und intrinsischen TGF-β-induzierten Regulationen[23]. (Sanchez-Capelo, 2005)

Dieser Überblick fast alle bekannten TGF-β-induzierten Regulationen in allen Zelltypen zusammen. Rote Linien stehen für Apoptosewege und blaue Linien für nicht-apoptotische Wege.

4. Activin-induzierte Apoptose

Die Activin-induzierte Apoptose ist hauptsächlich in der Karzinogenese, während immunreaktiven Prozessen und in der Leberhomeostase beschrieben. Apoptotische neurale Funktionen während der Entwicklung und im adulten Organismus sind nicht bekannt. Activine sind früh und stark im Gehirn exprimiert, jedoch dort für das Überleben und die Differenzierung zuständig[12,14,19,20]. Regulatorische Signalwege in der Activin-induzierten Apoptose gleichen denen der TGF-β Familie, da die Signaltransduktionen der TGF-β Superfamilie stark konserviert sind. Die Wege der Apoptose hängen hauptsächlich von dem umgebenen Milieu und Expressionsmuster der Zytokine und deren Rezeptoren ab.

In der Hepatozyten-Zelllinie HepG2 verläuft die Apoptose über die rezeptorvermittelte Smad-Aktivierung und involviert den Transkriptionsfaktor p53[22,88]. In HepG3 Leberzellen wird dabei Bcl-xl herunterreguliert. In der humanen LNCaP Prostatazelllinie sind ebenfalls das p53 Protein und Mitglieder der Bcl-2 Familie während Apoptose-induzierenden Prozessen reguliert[89]. In B-Zell-Hybridomazellen neutralisiert das pro-apoptotische BH3-only Protein Bcl-xs durch seine verstärkte Expression die anti-apoptotische Funktion von Bcl-2 und Bcl-xl.

Eine Bcl-2 Überexpression oder Inhibition der Bcl-xs Expression kann den Activin-induzierten Zelltod verhindern[90]. In blutbildenen Zellen verhindert die Activin-vermittelte SHIP Expression die Aktivität der anti-apoptotischen Akt Kinase[91]. Zusammenfassend ist die Activin-induzierte Apoptose in verschiedenen Organen und Geweben beschrieben, jedoch nicht für neurale und ontogenetische Prozesse.

5. Zielsetzung

Apoptotische Vorgänge während der Ontogenese sind ein fest verankertes und überlebensnotwendiges Programm, das eine korrekte und funktionstüchtige Entwicklung eines Organismus garantiert. Den TGF-βs konnte dabei in vielen Organen und Geweben eine wichtige, apoptotische Funktion in den ontogenetischen Zelltodphasen zugeordnet werden. In der ontogenetischen Entwicklung führen Defekte dieser Faktoren und deren Rezeptoren zu Fehlern im Aufbau und Funktionen von Organen. Des Weiteren spielt der TGF-β-induzierte Zelltod im adulten Organismus in der Karzinogenese und in neuralen Krankheitsbildern eine immer bedeutendere Rolle. Somit ist es von großer Wichtigkeit molekularbiologische Prozesse der TGF-β-induzierten Apoptose aufzuklären, um krankhafte Fehler in diesen Wegen beheben zu können. Dabei muss stets die Kontextabhängigkeit in Form des Zelltyps, der Zellumgebung und anderer Faktoren berücksichtigt werden.

Für die Aufklärung molekularbiologischer Vorgänge der TGF-β-induzierten Apoptose in einem neuralen System wurde die oligodendrogliale Vorläuferzelllinie Oli-neu ausgewählt. Primäre oligodendrogliale Zellkulturen sollten in späteren Versuchsstadien erworbene Ergebnisse bestätigen.

Bisherige Arbeiten an der Zelllinie Oli-neu zeigten eine TGF-β-induzierte Apoptose in Folge einer Herunterregulation des anti-apoptotischen Bcl-xl Proteins, einer Involvierung der Caspasen-8, -9 und -3 und einer Deaktivierung des ERK Signalweges. Dabei war der TGF-β-spezifische Smad-Signalweg angeschaltet. In Kooperation mit TNF-α wird die TGF-β-induzierte Apoptose verstärkt. Weitere Kenntnisse über den zeitlichen Ablauf und weitere involvierte Faktoren sind bisher ungeklärt.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit sollte auf die Regulation des Bcl-2 Familienmitgliedes Bcl-xl gelegt werden. Es sollte zunächst überprüft werden, ob pro-apoptotische Proteine wie die Mitglieder der BH3-only Proteine als Regulatoren für Bcl-xl in Frage kommen. Durch den Ausschluss dieser Proteinfamilie sollte im Verlauf dieser Doktorarbeit über Interactomstudien mögliche neue Interaktionspartner von Bcl-xl identifiziert werden. Dabei sollten Untersuchungen zwischen Protein-Protein Interaktionen mit einem GST-Pulldown und

anschließender Überprüfung interessanter Kandidaten in der Massenspektrometrie unternommen werden. Im Anschluss daran sollten identifizierte Interaktionspartner im Kontext der TGF-β-induzierten Apoptose weiter untersucht werden.

Die zweite Fragestellung umfasste die Kontextabhängigkeit von TGF-β-vermittelten Prozessen. D.h. es sollte untersucht werden, ob ein weiterer Faktor in der oligodendroglialen Zelllinie Oli-neu Apoptose auslösen kann und dieser mit TGF-β kooperiert. Im Verlauf dieser Doktorarbeit sollten die regulatorischen Sinalwege identifiziert werden, die die Faktoren im Zusammenspiel oder auch einzeln auslösen.

Letztendlich sollen die erworbenen Ergebnisse helfen, die TGF-β-vermittelte Apoptose, auch in Abhängigkeit des Umfelds, besser zu verstehen.

III. Material und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien, Medien und Zusätze

Chemikalien zur Herstellung von Lösungen, Puffern und Medien wurden von den Firmen INVITROGEN GMBH (Karlsruhe, D), Carl ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, D) und SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (München, D) bezogen.
Sämtliche Medien und Zusätze für die Kultivierung von Säugerzellen wurden bei GIBCO (Karlsruhe, D) bezogen.

1.2. Gebrauchsmaterialien

Gebrauchswaren für den allgemeinen Laborbedarf wie 1,5ml Reaktionsgefäße, 2ml Safelook Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen u.a. wurden von den Firmen EPPENDORF (Hamburg, D) und SARSTEDT (Nürnbrecht, D) erworben.
Für die Kultivierung von Säugerzellen wurden ausschließlich Verbauchsmaterialien von NUNC™ Brand Products (Roskilde, Dänemark) und Falcon Utensilien von BECKTON DICKENSON (Heidelberg, D) verwendet.

1.3. Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

Für Klonierungen wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm DH5α [*F´,φ80dlacZΔM15, Δ(lacZY A-argF), U169, deo*R, *rec*A1, *end*A1, *hsd*R17, (r_K^-, m_K^+), *sup*E44, *λ-, thi-1, gyr*A96, *rel*A1] (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA) verwendet.

Die murine, oligodendrogliale Vorläuferzelllinie Oli-neu (Jung *et al*., 1995) wurde von Frau Professorin Jaqueline Trotter aus der Mainzer Universität zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie wurde durch die stabil ins Genom eingebaute *neu-Tyrosin* Kinase immortalisiert.

Die humane, lymphozytäre Zelllinie RamosB stammt von einem kaukasischem Burkitt-Lymphom (BL) ab. Die Zellen besitzen B-lymphozytären Zellcharakter und dienen als B-Lymphozyten Modell und Apoptosemodell.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und Plasmide sind in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet.

Synthetische Oligonukleotide wurden von INVITROGEN GMBH (Karlsruhe, D) bezogen.

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide

Name	Primer vorwärts 5'-3'	Primer rückwärts 5'-3'
Bcl-xl	ATGTCTCAGAGCAACCG	CCGACTGAAGAGTGAGCC
Bcl-2	AGGATGGCGCAAGXCC	TCACTTGTGGCCCAGGTATG
Gapdh	CATCACCATCTTCCAGGAGC	ATGACCTTGCCCACAGCCTT
Bad	ATGGGAACCCCAAAGCAG	AGCCTCCTTTGCCCAAGT
Bak	ATGGCATCTGGACAAGGA	TGATCTGAAGAATCTGTG
Bax	GTGATGGACGGGTCCG	TCAGCCCATCTTCTTCCAGAT
Bid	ACTCTGAGGTCAGCAACGGTTC	TCAGTCCATCTCGTTTCTAACCA
Blk	ATGTCGGAGGCGAGACTTATG	CTGAAGCTGCAAATACCAGG
Bim	ATGGCCAAGCAACCTTCTGAT	ATGCCTTCTCCATACCAGACG
Bmf	CGGGCGTATTTTGGAAACAA	ACCCCTTCCCTGTTTTCTTGT
BNip3	CAGGGCTCCTGGGTAGAACT	GCAGATGAGACAGTAACAGAG
BNip3L	TCTCCAGACCATGTCTCACTT	GTAGGTGCTGGCAGAAGGTGT
Hrk	AGACCCAGCCCGGACCGAGCAA	ATAGCACTGGGGTGGCTCTC
Noxa	GTTTCTGAGATGCCCGGGA	GGTTACTAAATTGAAGAGCTTGGA
Puma	GAGTGGGCCCGGGAGATC	TGTAGGCACCTAGTTGGGCT
GST-Bcl-xl	TCCCCGGGAAAAATGTCTCAGAGCAACCG	ATGAATTCCCTTCCGACTGAAGAGTGAGCC

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmide	Beschreibung	Referenz
pSUPER.neo	RNAi Expressionsvektor, *bla, neo*, Poly-III H1-RNA Promotor	OLIGOENGINE™ (Seattle, USA)
pAIF1-RNAi	RNAi von AIF, *bla, neo*	diese Arbeit
pAIF2-RNAi	RNAi von AIF, *bla, neo*	diese Arbeit
pAIF3-RNAi	RNAi von AIF, *bla, neo*	diese Arbeit
pGex-2T	*GST*-Fusionssequenz, tac_{prom}, *bla*	GE HEALTHCARE

		(München, D)
pGST-Bcl-xl	*GST-Bcl-xl*-Fusionssequenz, tac_{prom}, *bla*	diese Arbeit
pFR-Luc	Pathdetect® Reporterplasmid, *GAL4* Bindungsdomäne, *Luc*, *bla*	STRATAGENE (La Colla, CA)
Plasmide	**Beschreibung**	**Referenz**
pFA-Elk1	Pathdetect® trans-Aktivatorplasmid mit Elk1-Aktivierungsdomäne (aa307-428), *bla*	STRATAGENE (La Colla, CA)
pFA-c-Jun	Pathdetect® trans-Aktivatorplasmid mit c-Jun-Aktivierungsdomäne (aa1-246), *bla*	STRATAGENE (La Colla, CA
pFA-ATF2	Pathdetect® trans-Aktivatorplasmid mit ATF2-Aktivierungsdomäne (aa1.96), *bla*	STRATAGENE (La Colla, CA
pGL3-HIV-LTR	NFκB Response-Element, LTR von HIV-120/+83, *bla*	Jakob Troppmair, Würzburg, D
pGL3-SBE	Smad Response-Element, *Luc, bla*	Jonk *et al*., 1998
pCMV-β-Gal	CMV_{Prom}, β-Galaktosidase , *bla*	Humangenetik, Göttingen, D
pGL3-Bcl-xl	$Bcl\text{-}xl_{prom}$, *Luc, bla*	Bender et al., 2004
pGL3-Bcl-2	$Bcl\text{-}2_{prom}$, *Luc, bla*	Linda M. Boxer Stanford University, USA
pGL3-Bax	Bax_{prom}, *Luc, bla*	Björn Spittau Neuroanatomie, Universität Göttingen, D
pcDNA3-HA	HA Fusionssequenz, CMV_{Prom}, *bla, neo*, BGH PolyA	Tetsuo Mashima, Cancer Research, Tokyo, Japan
pHA-Fraktin	Fraktin-HA Fusionssequenz, CMV_{Prom}, *bla, neo*, BGH PolyA	Tetsuo Mashima, Cancer Research, Tokyo, Japan
pHA-tAktin	tAktin-HA Fusionssequenz, CMV_{Prom}, *bla, neo*, BGH PolyA	Tetsuo Mashima, Cancer Research, Tokyo, Japan
pFlag-CMV2	*Flag*-Fusionssequenz, CMV_{Prom}, *bla*	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (München, D)
pFlag-Bcl-xl	*Flag-Bcl-xl* Fusionssequenz, CMV_{Prom}, *bla*	Björn Spittau Neuroanatomie, Universität Göttingen, D
pEGFP-C1	*GFP* Fusionssequenz, CMV_{Prom}, Kozak initiation site, SV40 PolyA, *neo*	CLONTECH-TAKARA BIO EUROPE (France)

pGFP-Fraktin	*GFP-Fraktin* Fusionssequenz, CMV_{Prom}, Kozak initiation site, SV40 PolyA, *neo*	diese Arbeit

1.4. Antikörper, Substrate und Inhibitoren

Die verwendeten Antikörper, Substrate und Inhibitoren sind in den Tabellen 3, 4 und 5 detailliert mit Angaben zur Anwendung und mit Informationen zum Hersteller aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

			Anwendung		
Antikörper mit Katalognummer	**Spezies**	**Firma**	**WB**	**IC**	**IP**
Aktin Ab5 (DLN-07273)	Maus	DIANOVA GMBH (Hamburg,D)	1:1000		1:100
AIF (AB16501)	Kaninchen	CHEMICON INTERNATIONAL INC. (Hampshire, UK)	1:2000	1:1000	
phospho-Bad Ser122 (5284)	Kaninchen	NEW ENGLAND BIOLABS GMBH (FFM, D)	1:1000		
Bcl-xl (2764)	Kaninchen	NEW ENGLAND BIOLABS GMBH (FFM, D)	1:2000		1:100
Bid (2003)	Kaninchen	NEW ENGLAND BIOLABS GMBH (FFM, D)	1:1000		1:100
Bik (4592)	Kaninchen	NEW ENGLAND BIOLABS GMBH (FFM, D)	1:1000		1:100
Bim (4582)	Kaninchen	NEW ENGLAND BIOLABS GMBH (FFM, D)	1:1000		1:100
Bmf (4692)	Kaninchen	NEW ENGLAND BIOLABS GMBH (FFM, D)	1:1000		1:100
Caspase-2 (DLN-13733)	Kaninchen	DIANOVA GMBH (Hamburg,D)	1:1000		
active-Caspase-3 (AB3623)	Kaninchen	CHEMICON INTERNATIONAL INC. (Hampshire, UK)	1:500		
Caspase-8 (DLN-12126)	Kaninchen	DIANOVA GMBH (Hamburg,D)	1:2000		

Cox IV (4844)	Kaninchen	NEW ENGLAND BIOLABS GMBH (FFM, D)	1:1000		
ERK1/2 (sc-93)	Kaninchen	SANTA CRUZ (Santa Cruz, CA, USA)	1:1000		
Flag (F7425)	Kaninchen	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (München, D)	1:5000	1:500	
Fraktin (Chemicon AB3150)	Kaninchen	Fusheng Yang & Greg Cole (Sepulveda Medical Center, North Hills, CA, USA)	1:500		
Gapdh (ab8245)	Maus	ACRIS (Hiddenhausen, D)	1:10.000		
GST (27-4577)	Ziege	AMERSHAM BIOSCIENCES EUROPE GMBH (Freiburg, D)	1:3000		
HA (2367)	Maus	NEW ENGLAND BIOLABS GMBH (FFM, D)	1:1000	1:100	
Histon 1 (4112)	Kaninchen	Prof. Doenecke (Göttingen)	1:2500		
anti-Ziege IgG (305-065-045)	Kaninchen	DIANOVA GMBH (Hamburg,D)			1:100
non muscle Myosin (BT-561)	Kaninchen	BIOMEDICAL TECHNOLOGIES INC. (Stoughton, MA)	1:500		1:100
Smad1/2/3 H2 (sc-7960)	Maus	SANTA CRUZ (Santa Cruz, CA, USA)		1:100	
α-TGF-β1/2/3 (MAB1835)		R&D SYSTEMS (MN, USA)	10µg/ml		
α-mouse-Cy3 (715-165-151)	Esel	DIANOVA GMBH (Hamburg,D)		1:600	
α-rabbit-Cy3 (711-165-152)	Esel	DIANOVA GMBH (Hamburg,D)		1:600	
α-Kaninchen-HRP (111-035-003)	Ziege	DIANOVA GMBH (Hamburg,D)	1:10.000		
α-Maus-HRP (115-035-003)	Ziege	DIANOVA GMBH (Hamburg,D)	1:10.000		

Tabelle 4: Verwendete Substrate

Substrat (Katalognummer)	Firma
Caspase 2 Substrate I (218740)	CALBIOCHEM/ MERCK BIOSCIENCES (Schwalbach, D)
Caspase 3 Substrate (556449)	BD BIOSCIENCES (Heidelberg, D)
Caspase 8 Substrate (556552)	BD BIOSCIENCES (Heidelberg, D)
Caspase 9 Substrate I (218765)	CALBIOCHEM/ MERCK BIOSCIENCES (Schwalbach, D)
Calpain Substrate II (208731)	CALBIOCHEM/ MERCK BIOSCIENCES (Schwalbach, D)

Tabelle 5: Verwendete Inhibitoren

Inhibitor (Katalognummer)	Firma	Anwendung
Alk 4,5,7 Inhibitor/SB 431542 (1614)	TOCRIS (London, UK)	10µM
Blebbistatin (203390)	CALBIOCHEM/ MERCK BIOSCIENCES (Schwalbach, D)BIOSCIENCES	50µM
CalpainIV Inhibitor (208745)	CALBIOCHEM/ MERCK BIOSCIENCES (Schwalbach, D)BIOSCIENCES	100nM
pan-Caspase Inhibitor I (627610)	CALBIOCHEM/ MERCK BIOSCIENCES (Schwalbach, D)	50µM
Caspase-2 Inhibitor (K108-7-25)	BIOCAT (Heidelberg, D)	20µM
Caspase-8 Inhibitor (K108-7-25)	BIOCAT (Heidelberg, D)	20µM
Caspase-3 Inhibitor (K108-7-25)	BIOCAT (Heidelberg, D)	20µM
CytochalasinD (250255)	CALBIOCHEM/ MERCK BIOSCIENCES (Schwalbach, D)	1µM

1.5. Geräte

Gerät	Typ	Firma
Tischzentrifuge I	Heraeus Biofuge *pico* (Mikroliterrotor 24x2ml PP)	KENDRO LABORATORY GMBH (Langenselbold, D)
Tischzentrifuge II	Centrifuge5415D	EPPENDORF (Hamburg, D)
Kühlzentrifuge	Centrifuge5417 (Rotor FA 45-24-11)	EPPENDORF (Hamburg, D)
Sorvall Zentrifuge	Sorvall EvolutionRC HighSpeed Rotor Sorvall SLA-1500 SuperLite	KENDRO LABORATORY GMBH (Langenselbold, D)
Schwingzentrifuge	Centrifuge 5702 (Rotor R-A-4-38, max. 4400rpm)	EPPENDORF (Hamburg, D)
Vortexer	VORTEX Genie2 G560	SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC. (Bohemia, NY, USA)
Magnet-Rührer	RET basic	SCHÜTT LABORTECHNIK (Göttingen, D)
Rundschüttler	KS 250 basic	IKA LABORTECHNIK (SCHÜTT LABORTECHNIK [Göttingen, D])
Rollschüttler	CAT RM5	NEOLAB (Heidelberg, D)
Brutschrank	Biometra OV5	BIOMETRA (Göttingen, D)
Heizblock	HLC HeizThermoMixer HTMR133	HEAP LABOR CONSULT (Bovenden)
Wärme-Rotationsschüttler	Unitron	INFORS AG, (Bottmingen, D)
PCR Cycler	Mastercycler	EPPENDORF (Hamburg, D)
	Gradientencycler	EPPENDORF (Hamburg, D)
Pipetten	GILSON PIPETMAN®P Set P10 (0,5-10µl) P20 (2-20µl) P200 (20-200µl) und P1000 (200-1000µl)	GILSON (Middleton, WI, USA)
Sterilbank	Heraeus Hera*Safe*	KENDRO LABORATORY GMBH (Langenselbold, D)
Ultraschallbad	ElmaSonic Elma®	ROTH (Karlsruhe, D)
Photometer	BIOPhotometer	EPPENDORF (Hamburg, D)
pH Meter	pH526 Multical®	WTW (Weilheim, D)

Präzitionswaage	Sartorius 1602MP	SARTORIUS (Göttingen, D)
Feinwaage	Sartorius 3716MP	SARTORIUS (Göttingen, D)
Autoklav	Systec ELV 5050	SYSTEC GMBH(Wettenberg, D)

2. Methoden

2.1. Molekulare Klonierungstechniken

Zur Herstellung und Vermehrung von Konstrukten und Plasmiden wurde der Modellorganismus *Escherichia coli* (*E. coli*) benutzt.

Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme, Polymerasen und der RNase Inhibitor wurden von MBI FERMENTAS (St.Leon-Rot, D) erworben. Als DNA-Größenstandard wurden die 1 kb und die 100bp DNA-Leiter (Hyperladder I und II) von BIOLINE GMBH (Luckenwalde, D) verwendet.

2.1.1. Kultivierung des Mikroorganismus *E. coli*

Die Zellen wurden in Luria-Bertani-Medium (LB: 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl) bei 37°C kultiviert. Für Stämme mit dem Ampicillin-Resistenzmarker wurde dem Medium 50mg/l Ampicillin zugegeben. Für Stämme mit einer Kanamycinresistenz wurde 80mg/l Kanamycin verwendet. Die Bakterien wurden bei 160rpm in einen Wärme-Rotationsschüttler bei 37°C wachsen gelassen.

2.1.2. Präparation von kompetenten *E. coli* Zellen

In einem 1l Kolben wurden 250ml SOB Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10nM NaCl, 2,5mM KCl, 1nM $MgCl_2$, 10nM $MgSO_4$) mit einigen Zellen angeimpft und bei 18°C mit 200 U/min für mindestens 24h bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 Zellen/ml inkubiert. Zum Ernten der Zellen wurden diese für 10min auf Eis gekühlt und bei 2500xg für 10min bei 4°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 80ml TB-Puffer (10nM HEPES, 15nM $CaCl*H_2O$, 250nM KCl, 55nM $MnCl_2*H_2O$, pH6,7) resuspendiert, für 10min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 20ml TE-Puffer aufgenommen und vorsichtig mit 1,3ml DMSO vermischt. Der Ansatz wurde erneut 10min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1ml Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.1.3. Transformation von *E. coli* Zellen

Zu 1-10µg ligierter DNA wurden 200µl kompetente Zellen gegeben und 30min auf Eis inkubiert. Nach 30s Hitzeschock bei 42°C wurde der Ansatz auf Eis abgeschreckt, mit 800µl

SOC-Medium (SOB [2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10nM NaCl, 2,5mM KCl, 1nM $MgCl_2$, 10nM $MgSO_4$], inkl. 20mM Glukose) versetzt und 1h bei 37°C geschüttelt. Verschiedene Mengen (10–900µl) der Zellkultur wurden auf festem LB-Selektivmedium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1%Agar, supplementiert mit 50µg/ml Ampicillin oder 80µg/ml Kanamycin) ausplattiert und schließlich die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden einzelne Klone mit 1,5ml LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl) und den entsprechenden Antibiotika in Glasröhrchen (SCHÜTT LABORTECHNIK, Göttingen, D) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Unitron Wärmeschüttler wachsen gelassen. Letztendlich konnte aus diesen angeimpften Klonen die Plasmid-DNA isoliert werden.

2.1.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch alkalische Lyse

Die Zellen aus einer 1.5ml Übernacht-Kultur wurden durch Zentrifugation geerntet und in 150µl Resuspensionspuffer (50mM Tris-HCL pH8.0, 10mM EDTA, 100µg/ml RNaseA) aufgenommen. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 150µl Lysispuffer (200mM NaOH, 1% SDS) und einer Inkubationszeit von 3 Minuten bei RT. Gestoppt wurde die Lyse durch Zugabe von 200µl Neutralisationspuffer (3.0M NaOAc, pH 5.5) Die dadurch entstandenen Zelltrümmer wurden durch eine 10 minütige Zentrifugation verdichtet und der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde 1ml Ethanol zu dem Überstand hinzugegeben und bei -20°C für mindestens eine Stunde inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde das Sediment mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50µl sterilen bidestillierten Wasser aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde bei –20°C aufbewahrt.

2.1.5. Plasmid-DNA Midi-Präparation aus *E. coli*

Zur Isolierung größerer Mengen DNA wurden *E. coli* Kulturen über Nacht bei 37°C in 50ml LB-Selektivmedium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1%Agar, supplementiert mit 50µg/ml Ampicillin oder 80µg/ml Kanamycin) in 500ml Rundkolben (SCHÜTT LABORTECHNIK, Göttingen, D) auf einem Wärme-Rotationsschüttler kultiviert. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit der Firma MACHEREY-NAGEL GMBH & CO. KG (Düren, D). Die Resuspendierung des getrockneten DNA-Pellets erfolgte mit entsprechender Menge sterilen bidestillierten Wasser. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.1.6. Aufreinigung von DNA mittels Phenol/Chloroform

Da für einige Anwendungen DNA, bzw. Plasmid-DNA, einen hohen Reinheitsgrad aufweisen muss, wurden einige Nukleinsäuren zusätzlich aufgereinigt. D.h. noch enthaltende Proteinverunreinigungen wurden denaturiert und verworfen. Dazu wurde die DNA-Lösung 1:1 mit Roti-Phenol (Carl ROTH GMBH & CO KG, Karlsruhe, D) gründlich vermischt und für 1min geschüttelt. Durch eine Zentrifugation für 2min bei 12.000rpm in einer Tischzentrifuge erfolgte die Trennung des Phenols von der wässrigen Phase. In der Phenolphase waren die denaturierten Proteine, während die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Diese wurde erneut 1:1 mit Chloroform pur vermischt und durch eine Zentrifugation die Phasentrennung erreicht. Nach Abnahme der wässrigen, oberen DNA-Phase wurde zu der DNA-Lösung 3M Natriumacetatlösung im Verhältnis 1:10 und 100%iges EtOH mit 2fachem Volumenanteil gegeben und die DNA bei -20°C für mindestens 1h gefällt. Danach folgte die Pelletierung der DNA bei 4°C bei 12.000rpm für 10min. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igen EtOH gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Resuspendierung der DNA erfolgte in H_2O_{bidest} in einem adäquaten Volumen.

2.1.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktionen mit dem thermostabilen Enzym *Taq*-Polymerase (MBI FERMENTAS) in dem MasterCycler durchgeführt. Üblicherweise wurden die Ansätze in 0,2ml PCR Softtubes (BIOZYM SCIENTIFIC GMBH, Hess. Oldendorf, D) durchgeführt. Jeweils 5-50nmol Primer-Oligonukleotid und 10-100ng DNA bzw. cDNA als Matrize wurden in 20-50µl Reaktionspuffer entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

Ansatz für eine 20µl Reaktion:	2µl	10xPCR Puffer
	1,2µl	20mM $MgCl_2$
	je 4µl	10pmol Primer vorwärts/rückwärts
	1µl	40mM dNTPs
	0,35µl	*Taq*-Polymerase (0,35U)
	10-100ng	DNA
	xµl	H_20_{bidest}

Es wurden jeweils 35 Zyklen des folgenden Temperaturprofils durchlaufen: Denaturierung bei 95°C für 30s, Hybridisierung bei spezifischer Anlagerungstemperatur für 30sec und pro kb DNA 1min Synthese bei 72°C für die *Taq*-DNA-Polymerase. Die PCR-Zyklen wurden durch einen 2-minütigen Denaturierungsschritt eingeleitet und durch einen finalen Syntheseschritt von 5min abgeschlossen.

2.1.8. Agarose-Gelelektrophorese

Zu DNA-Ansätzen wurde 6xOrangeG-Loading DNA-Dye (50% Sukrose, 1% SDS, 0,2% OrangeG) gegeben, um die DNA-Fragmente in einem 1% bis 2%igen Agarosegel in TAE-Puffer (40mM Tris-Acetat, 20mM NaOAc, 2mM EDTA, pH 8,3) in Gegenwart von 0,5µg/ml Ethidiumbromid zu laden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit maximal 100V Laufgeschwindigkeit ebenfalls in TAE-Puffer in einer horizontalen Elektrophoresekammer. DNA-Banden wurden mittels eines UV Transilluminators (254nm) detektiert.

2.1.9. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose mit Glasmilch

Um DNA-Fragmente aus dem Agarosegel zu isolieren, wurde das Geneclean Kit der Firma QBIOGENE (Heidelberg, D) gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers verwendet. Hierbei wurden zunächst die DNA-Fragmente aus dem Gel herausgeschnitten und gewogen. Es wurde 3 Volumen NaI Solution hinzugegeben und für 10min bei 50°C in einem Heizblock inkubiert. Sobald sich das Gelfragment vollständig gelöst hat, wurde die DNA an die Glasmilch gebunden und abzentrifugiert. Nach mehreren Waschschritten mit 70% EtOH wurde die DNA mit bidestillierten Wasser eluiert.

2.1.10. Restriktion von DNA

Für analytische Restriktionsreaktionen wurden ca. 0,5µg bis 2µg DNA mit 1-2 Units Restriktionsenzym (MBI FERMENTAS) in einem Volumen von 20µl bei angegebener Temperatur für 2-3h inkubiert. Reaktionspuffer wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.1.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Lineare DNA-Fragmente mit kohäsiven oder glatten Enden wurden in einem Reaktionsgemisch gemäß Herstellerangaben in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit Ligationspuffer (20mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM DTT, 0,6mM ATP, pH 7,6) und 5 Units T4-DNA-Ligase (MBI FERMENTAS) über Nacht bei 15°C oder für 5h bei RT ligiert. Die Konzentration an DNA betrug zwischen 1 und 10µg/ml, das molare Verhältnis Vektor/Insert-DNA lag zwischen 1:5 und 1:10. Im Anschluss an die Ligationsreaktion wurde die DNA ohne weitere Reinigung zur Transformation eingesetzt.

2.1.12. DNA-Sequenzierung

Bei der Sequenzierung werden aus doppelsträngiger DNA komplementäre einzelsträngige Kopien mittels einer PCR-Reaktion synthetisiert. Neben den unmarkierten dNTPs enthält ein Sequenzansatz wenige markierte Didesoxynucleotide (ddNTPs), denen die 3´-Hydroxygruppe

(3'-OH) fehlt. Dadurch wird die Elongation der Nucleotide am 3´-OH Ende gestoppt, sobald eines der fluoreszenzmarkierten ddNTPs eingebaut wird. Durch den zufälligen Einbau der ddNTPs werden unterschiedlich lange Kopien hergestellt. Jedes der vier verschiedenen ddNTPs ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (6-Carboxyrhodamin [A]; Rhodamin 110 [C]; N,N,N´,N´,-tetramethyl- 5-carboxyrhodamin [G]; 5-Carboxy-Xrhodamin [T]). Somit weisen alle Kopien eine unterschiedliche Länge mit unterschiedlicher Markierung auf. Für einen 10µl PCR-Ansatz pro Probe wurden 4µl des vorgefertigten 2,5xMastermixes „DYEnamic ET Primer DNA Sequencing Reagent" (Thermo Sequenase DNA Polymerase, Reaktionspuffer [260mM Tris, 32,5mM MgCl2, pH 9,5], Loading Solution [70% Formamide, 1mM EDTA], dNTPs, ddNTPs), 50-100ng DNA, xµl H_2O_{bidest} und 1µl 100pmol Primer verwendet. Die Vervielfältigung der DNA erfolgte mit 25 Zyklen mit einer Denaturierung: 96°C/10sec, Primeranlagerung 45°C bis 60°C/10sec und einer Synthesephase: 60°C/4min. Alle DNA Sequenzierungen wurden am Institut für Humangenetik an der Universität Göttingen mit dem MegaBACE Gerät (APPLIED BIOSYSTEMS) durchgeführt

2.2. Kultivierung von Säugerzelllinien

2.2.1. Kultivierung der murinen Zelllinie Oli-neu

Die oligodendroglialen Vorläuferzellen wurden in DMEM Medium nach Sato mit 1% Pferdeserum und N2-Supplement kultiviert. Dazu wurde dem Nährmedium zusätzlich 340ng/ml Tri-Iodo-L-Thyronin und 400ng/ml L-Thyroxin zugegeben. Die Zellen wurde in poly-L-Lysin-beschichteten Kulturflaschen (Easy Flask 75 Filt, NUNC™, Roskilde, Dänemark) gezogen, unter Berücksichtigung der jeweiligen Passagen. Die Inkubation erfolgte unter physiologischen Bedingungen in einen Brutschrank Heraeus Instruments Hera*Cell* (KENDRO LABORATORY PRODUCTS, Hanau, D) bei 37°C, 5% CO2 und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Vor dem Passagieren oder Aussäen der Zellen wurden alle Medien in einem Wasserbad erwärmt. Dann wurden die Zellen in D-PBS gewaschen und für 4min in 2ml Trypsin-EDTA bei RT abgelöst. Das Stoppen der Trypsinierung erfolgte mit 5ml Stopmedium (10%Pferdeserum/DMEM). Nach dem Abspülen der Zellen vom Flaschenboden wurden sie in ein 15ml Falcon Röhrchen überführt. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte in einer Schwingzentrifuge bei 1000rpm und RT. Das Stopmedium wurde abgezogen und das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen. Das Zellpellet einer voll bewachsenden Kulturflasche wurde im Verhältnis 1:3 bis 1:4 geteilt. Für die Experimente wurden Passagen zwischen 35 und 55 verwendet. Dabei musste auf eine Konfluenz von maximal 90% geachtet werden, da die Zellen sonst abstarben. Wenn kultivierte Zellen mit Inhibitoren oder Faktoren

behandelt wurden, wurde das Medium auf 0,2% Pferdeserum reduziert und kein Antibiotikum oder Zusätze zugegeben. Die Reagenzien wurden direkt zum serumreduzierten Medium supplementiert.

2.2.2. Transfektion der Zelllinie Oli-neu

Das Einbringen der DNA in die Zellen erfolgte durch kathionische Lipide, der Lipofektion. Hier bilden Lipide im wässrigen Medium Mizellen oder Liposomen, die mit der DNA komplexiert und so durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Mit einer Konfluenz von 40-60% wurden die Oli-neu Zellen gemäß den Angaben des Herstellers mit dem Fugene6 Transfektionsreagenz (ROCHE, Mannheim, D) in einem Verhältnis 3:3 transformiert. Dabei erfolgte kein Mediumwechsel. Nach einer Inkubationsphase der transgenen Veränderung von 1 bis 2 Tagen wurden die Zellen entsprechend weiterbehandelt.

2.2.3. Präparation von oligodendroglialen Primärkulturen

Für die Präparation wurde der NMRI Mausstamm ausgewählt. Drei Tage alten Mäusen wurde das Gehirn entnommen und die Meningen entfernt. Die Gehirne wurden mit einer Rasierklinge zerkleinert und in 23ml HBSS (für 10 Gehirne) auf Eis gesammelt. Die Präparationszeit der Gehirne sollte eine Stunde nicht überschreiten. Zu dem Ansatz wurde 1ml DNase-Lösung (Endkonzentration: 0,05%) und 1ml Trypsin-Lösung (Endkonzentration: 0,1%) gegeben, und alles zweimal mit einer blauen 1ml Spitze auf einer 10ml Pipette trituiert. Es folgte eine 7 minütige Inkubationsphase im 37°C Wasserbad. Danach wurde der Ansatz erneut zweimal trituiert, mit einer gelben Spitze. Dabei sollten Luftblasen vermieden werden. Die Inkubationsphase im 37°C Wasserbad wurde für 10 Minuten wiederholt. Danach wurde zu dem Ansatz 10ml Primärkulturmedium (DMEM+10%HS+ 1xPennecillin/Streptomycin-Lösung) gegeben und die Zellsuspension durch ein 40µm Netz gefiltert. Die Zellen wurden für 7 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet auf 2x30ml HBSS verteilt und gewaschen. Die erneute Zentrifugation der Zellen erfolgte bei 1500rpm für 7 Minuten. Die Pellets wurden in 30ml Primärkulturmedium aufgenommen und auf zwei poly-L-Lysin-beschichteten Kulturflaschen (Easy Flask 75 Filt, NUNC™, Roskilde, Dänemark) verteilt. Die Inkubation erfolgte unter physiologischen Bedingungen in einen Brutschrank Heraeus Instruments Hera*Cell* (KENDRO LABORATORY PRODUCTS, Hanau, D) bei 37°C, 5% CO2 und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Am DIV1 und DIV5 erfolgte ein Mediumwechsel. Am DIV 8 wurde der Zellansatz weiter bearbeitet. Dazu wurden die Zellkulturflaschen mit Parafilm umwickelt und die Flaschen für 3 Stunden bei 200rpm in einem 37°C Wärme-Rotationsschüttler Unitron INFORS AG, (Bottmingen, D) geschüttelt, um

alle losen Zellen von der adhärenten Zellschicht zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 10ml frischen Kulturmedium für 1 Stunde im Brutschrank Heraeus Instruments Hera*Cell* (KENDRO LABORATORY PRODUCTS, Hanau, D) inkubiert. Danach erfolgte ein Schütteln für 2 Stunden bei 220rpm und für 1 Stunde bei 250rpm, um die auf der adhärenten Zellschicht sitzenden oligodendroglialen Zellen zu entfernen. Das Medium aus den Flaschen wurde abgenommen und für 10 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml Kulturmedium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen für die entsprechenden weiteren Versuche in poly-L-Lysin-beschichteten Gefäßen für 3 bis 4 Tage kultiviert. Wenn kultivierte Zellen mit Inhibitoren oder Faktoren behandelt wurden, wurde das Medium auf 1% Pferdeserum reduziert und kein Antibiotikum zugegeben. Die Reagenzien wurden direkt zum serumreduzierten Medium supplementiert.

2.2.4. Kultivierung der RamosB Zelllinie

Die lymphozytären RamosB Zellen wurden in RPMI Medium mit 10% Kälberserum kultiviert. Die Zellen wurden in Kulturflaschen (Easy Flask 75 Filt, NUNC™, Roskilde, Dänemark) gezogen unter Berücksichtigung der jeweiligen Passagen. Die Inkubation erfolgte unter physiologischen Bedingungen in einen Brutschrank Heraeus Instruments Hera*Cell* (KENDRO LABORATORY PRODUCTS, Hanau, D) bei 37°C, 5% CO2 und einer Luftfeuchtigkeit von 95%. Vor dem Passagieren oder Aussäen der Zellen wurden alle Medien in einem Wasserbad erwärmt. Das Medium mit den darin enthaltenen Suspensionszellen wurde in 15ml Falcon Röhrchen überführt und die Zellen in einer Schwingzentrifuge bei 1000rpm und RT abzentrigugiert. Das Medium wurde abgezogen, das Zellpellet einmal in D-PBS gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen. Eine voll bewachsende Flasche wurde im Verhältnis 1:7 bis 1:8 für die Weiterkultivierung geteilt. Wenn kultivierte Zellen mit Inhibitoren oder Faktoren behandelt wurden, wurde das Medium auf 1% Kälberserum reduziert und kein Antibiotikum oder Zusätze zugegeben. Die Reagenzien wurden direkt zum serumreduzierten Medium supplementiert.

2.3. Analyse von RNA-Mengen in Säugerzellen

Die Analyse der RNA-Mengen erfolgte sowohl über die Bestimmung der RNA-Mengen mittels RT-PCR, als auch über die Expression von Reportergenen, wie die der Luciferase, vorgeschaltet vor bestimmten Promotoren.

2.3.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

$6x10^5$ Zellen wurden in 3,5cm EasyGrip™ Tissue Culture Falcon Schälchen ausgesät. Nach Behandlung der Kulturen wurde die RNA mit dem Trizol® Reagenz (INVITROGEN GMBH, Karlsruhe, D) laut Herstellerangaben isoliert. Die Resuspendierung der RNA-Pellets erfolgte mit DEPC-behandeltem bidestillierten Wasser bei 65°C. Die RNA-Konzentration wurde durch Messung der Extinktion bei 260nm in einer Quarzküvette bestimmt, wobei eine Extinktion von 1 einer Konzentration von 40µg/ml entspricht. Die Lagerung der RNA erfolgte bei –20°C.

2.3.2. Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Zur Quantifizierung der RNA-Expressionen in Zellen wurde aus der mRNA eine komplementäre DNA (cDNA) Kopie generiert. Das erfolgte mit Hilfe der RevertAid™ M-MuLV Reverse Transkriptase von MBI FERMENTAS nach Angaben des Herstellers. Zuerst wurden pro Ansatz 1,5µg mRNA als Template und die entsprechende Menge DEPC-H_2O_{bidest} für 5min bei 70°C erhitzt, um eine bessere Löslichkeit der mRNA zu erreichen. Dann wurden die restlichen Komponenten dazu pipettiert. Als Synthesestart dienten Oligo$(dT)_{12-18}$ Primer (INVITROGEN GMBH) mit einer Anlagerungstemperatur von 37°C für 5min. Die Synthese erfolgte bei 42°C für 1h.

Ansatz für eine 30µl Reaktion:

1,5µg mRNA
xµl DEPC-H_2O_{bidest} (Endvolumen: 20µl)
→ Erhitzung 70°C für 5min
6µl 5xReaktionspuffer
1µl 0,5µg/µl Oligo$(dT)_{12-18}$
2µl 40mM dNTPs
0,5µl RNase Inhibitor (40U/µl)
1µl RevertAid™ Reverse Transkriptase (200U/µl)
→ Hybridisierung 37°C für 5min
Synthese 42°C für 1h

Nach Beendigung der cDNA Synthese wurden die Proben bei -20°C gelagert oder direkt für eine PCR Reaktion.

Die PCR (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.1.7.) erfolgte unter Berücksichtigung der individuellen Zyklenzahl und der Anlagerungstemperatur der jeweiligen zu amplifizierenden DNA. Als Template wurde jeweils 1µl cDNA eingesetzt. Die Zyklenzahlen mit den Anlagerungstemperaturen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Zyklenzahl der jeweils zu amplifizierenden DNA

Genname	Zyklenzahl	Anlagerungstemperatur [°C]
GAPDH	22	56
Bcl-xL	28	56
Bad	30	56
Genname	**Zyklenzahl**	**Anlagerungstemperatur [°C]**
Bid	bis 35	53
Blk	bis 35	53
Bim	28	56
Bmf	bis 35	53
BNip3	24	56
BNip3L	30	53
Hrk	26	56
Noxa	bis 35	56
Puma	28	56

2.3.3. Luciferasemessungen

$3x10^4$ Zellen wurden in einer 48well Platte (NUNC™) kultiviert und für 24h wachsen gelassen. Dann erfolgte die Transfektion (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.2.2.) mit je 100ng Plasmid-DNA, zusammen mit 50ng pCMV-β-Gal Plasmid-DNA als Kontrolle der Transfektionseffizienz und für den späteren Abgleich der gemessenen Aktivitäten. Nach einer 24 stündigen Inkubation wurden die transfizierten Zellen mit den entsprechenden Faktoren behandelt. Die Lyse der Zellen und die Messung der β-Galaktosidase erfolgten mit dem Tropix Assay Kit der Firma INC. NALGENE® (Bedford, MA, USA) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben. Die Komponenten für die Luciferasemessung wurden selbst hergestellt. Dazu wurde die Luciferinstocklösung (1mg/ml D-Luciferin [PKJ, Kleinbittersfeld, D], 55mg DTT, 37,5ml 25mM Gycylglycinpuffer pH7.8) bei -70°C lichtgeschützt gelagert. Der Glycylglycinpuffer (25mM Glycylglycin, 15mM $MgSO_4$, 4mM EGTA, pH7.8) wurde bei 4°C aufbewahrt.

Die Zellen wurden mit 70µl Tropix Lysispuffer für 20min bei RT auf einen Rundschüttler aufgebrochen. Für die Luciferasemessung wurde pro Probe 200µl frisch angesetzter Luciferase-Reaktionspuffer (25mM Glycylglycinpuffer pH7.8, 100mM Kaliumphosphat pH7.8, 500mM DTT, 200mM ATP, frisch hergestellt) in ein 75x12mm PS Röhrchen (SARSTEDT AG & CO., Sarstedt, D) vorgelegt und 30µl Zelllysat hinzu pipettiert. Der Luminat

LB9507 (BERTHOLD TECHNOLOGIES GMBH & COKG, Bad Wildbad, D) wurde wie folgt eingestellt: Vorlaufzeit 20sec und Messzeit 20sec. Die Luciferin-Injektionslösung (1ml Luciferinstocklösung, 4ml 25mM Glycylglycinpuffer, 80µl 500mM DTT, frisch hergestellt) wurde mit einem Injektionsvolumen von 100µl pro Probe über den Luminat LB9507 hinzugeführt. Die Proben wurden nacheinander durchgemessen.

Zur Quantifizierung der Proben wurde die β-Galaktosidase nach Angaben des Herstellers gemessen. Dazu wurde das Tropix „Galacto-Light™“ Substrat und der Tropix Galacto-Light™“ Reaktionspuffer in einem Verhältnis von 1:100 gemischt und 70µl pro Probe in ein PS Röhrchen vorgelegt. In einem Abstand von 20sec wurden jeweils 10µl Zelllysat nacheinander dazupipettiert. Diese Zeitspanne entspricht der Messzeit des Luminat LB9707 für die Messung der β-Galaktosidaseaktivität, da eine gleiche Spanne der Inkubationszeit für diese Messung gewährleistet werden musste. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei RT in Dunkelheit. Die Tropix „Light Emission“ Injektionslösung wurde mit einem Injektionsvolumen von 80µl pro Probe eingestellt. Nach Beendigung der Messungen (Vorlaufzeit: 10sec, Messzeit: 10sec) wurden die Luciferasewerte von den β-Galaktosidasewerten abgezogen und die Ergebnisse gemittelt.

2.4. Analyse der Expression von Proteinen in Säugerzellen

2.4.1. Proteinisolierung aus kultivierten Säugerzellen

Für die Isolierung des Gesamtzellextraktes wurden $8x10^5$ Zellen in beschichteten 6cm EasyGrip™ Tissue Culture Falcon Schalen ausgesät. Nach Behandlung mit den entsprechenden Faktoren wurden die Zellen vorsichtig mit kalter phosphatgepufferter Kochsalzlösung, PBS, (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,8mM KH_2PO_4, 10mM $Na_2HPO_4x2H_2O$, pH7.4) gewaschen und anschließend in 50-150µl NP40 Puffer (10mM Tris-HCl, 1,5mM MgCl2, 0,5% Nonident P40 Substitent) lysiert. Als Proteaseinhibitor wurde der *Complete*™ Cocktail von ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim, D) verwendet. Danach wurde der Zellextrakt in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit Ultraschall behandelt (3x1min in Eiswasser). Entstandene Zelltrümmer wurden bei einer Geschwindigkeit von 12.000rpm und bei einer Temperatur von 4°C für 5min in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.4.2. Messung der Proteinkonzentration nach Bradford

Nach der Isolierung wurden die Proteine nach der Bradford Methode gemessen. Diese Methode basiert auf die proportionale Bindung von Coomassie an das Protein. Als Parameter

für die Proteinmengen wurde eine Standardkurve (BSA in PBS [140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,8mM KH_2PO_4, 10mM $Na_2HPO_4x2H_2O$, pH7.4]) in einer bekannten BSA-Konzentrationsreihe (0.25mg/ml, 0.5mg/ml, 1mg/ml, 2.5mg/ml, 5mg/ml, 7.5mg/ml und 10mg/ml) erstellt. Zur Messung wurden Einmalküvetten (BRAND GMBH & COKG, Wertheim, D) verwendet. Die Zellextrakte sowie die BSA-Konzentrationsreihe wurden mit einer Verdünnung von 1:50 (mit einem Endvolumen von 100µl) in Wasser aufgenommen und anschließend mit 400µl 1xBradfordreagenz (Carl ROTH GMBH) vermischt. Durch die Wahl der gleichen Verdünnungen für die Proben und der BSA-Konzentrationsreihe war keine Umrechnung der Verdünnung mehr nötig. Die Proben wurden für 10min bei RT inkubiert und letztendlich mit dem *BIO*Photometer von EPPENDORF (Hamburg, D) bei einer Absorption von 595nm gemessen.

2.4.3. Proteinisolierung nach Zellkompartimenten

Zur Isolierung von Proteinen aus den einzelnen Zellkompartimenten einer Zelle wurde das ProteoExtract®Subcellular Proteome Extraction Kit von CALBIOCHEM, MERCK BIOSCIENCES (Schwalbach, D) verwendet. Die Isolierung erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation in Abhängigkeit der verschiedenen Schweren der einzelnen Kompartimente. Dabei kann zwischen einer löslich-zytosolischen (Puffer I), einer mitochondrialen/membran-enthaltenen (Puffer II), einer Kern- (Puffer III) und zytoskeletalen (Puffer IV) Phase unterschieden werden. Dazu wurden $8x10^5$ Zellen in einer 6cm EasyGrip™ Tissue Culture Falcon Schale ausgesät und über Nacht wachsen gelassen. Nach Behandlung wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers weiter aufbereitet. Für diese Zellmengen wurden 150µl Puffer I, 150µl Puffer II, 80µl Puffer III und 80µl Puffer IV für die Lyse verwendet. Abschließend wurden die Proteinmengen nach Bradford gemessen und bei -20°C gelagert.

2.4.4. Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots kann die Expression von Proteinen quantitativ bestimmt werden. Dazu wurden gleiche Proteinmengen mit 4xNuPage® LDS Sample Puffer (INVITROGEN GMBH, Karlsruhe, D) und 50mM DTT für 10min bei 70°C für eine bessere Denaturierung der Proteine aufgekocht und anschließend für 2min auf Eis abgekühlt. Danach wurden die Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Größe der Proteine bestimmte dabei die Dichte des Polyacrylamid-Trenngeles. Standardisiert wurden 15%ige SDS-Acrylamidgele mit ELPHO-Puffer als Laufpuffer (25mM Tris-HCl, 250mM Glycin, 1% SDS, pH8.3).

Tabelle 7: Übersicht über verschiedene Dichten von SDS-Polyacryamidgelen

	Trenngel			
Sammelgel		**10%ig**	**12%ig**	**15%ig**
650µl	30%iges Acrylamid	5ml	6ml	7,5ml
3ml	H_2O_{bidest}	6,25ml	5,25ml	3,75
1,25ml	4xSammel-/Trenngelpuffer	3,75ml	3,75ml	3,75ml
50µl	10%APS	50µl	50µl	50µl
20µl	TEMED	20µl	20µl	20µl

4xSammelgelpuffer: 0,5M Tris-Hcl pH6.8, 8mM EDTA, 0,4% SDS
Trenngelpuffer: 1,5M Tris-Hcl pH8.8, 8mM EDTA, 0,4% SDS

Als Elektrophoreseapparatur diente die vertikale Mini-PROTEAN® Elektrophorese Zelle von BIORAD mit dem dazugehörigen Zubehör. Die Proteine wurden mit 100V laufen gelassen bis das Farbband des Sample Puffers aus dem Gel heraus lief. Als Proteinleiter wurde der SeeBlue Plus2 Pre-stained Marker (INVITROGEN GMBH) verwendet.
Nach der Auftrennung wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 45µm (BIORAD) mittels einer Semidry Blotting Apparatur (HARNISCHMACHER LABOR & KUNSTSTOFFTECHNIK, Kassel, D) mit 180mA Spannung/Membran für 2h bei RT übertragen. Dazu wurden zwei zugeschnittene Whatman-Papiere (SCHLEICHER & SCHUELL BIOSCIENCE GMBH, Whatman Group, Dassel, D) und die Membran mit Blotting-Transferpuffer (250mM Tris-HCl, 190mM Glycin, 2%SDS, pH8.4; 10% Methanol frisch) getränkt und das SDS-Acrylamidgel und die Nitrocellulosemembran zwischen die Whatman-Papiere gelegt.
Die Membran wurde anschließend in 5%iger fettfreier Milch in TBST (150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH7.4, 0,5% Tween-20) für 2h bei RT abgeblockt. Nach dem Blocken erfolgte die Inkubation des Erstantikörpers nach Angaben der jeweiligen Hersteller (Tabelle 3) in TBST über Nacht bei 4°C in einem 50ml Falcon-Röhrchen als Hybridisierungsröhre. Nach

mehrmaligen Waschschritten mit TBST wurde die Membran mit dem jeweiligen HRP-konjugierten Zweitantikörper (Tabelle 3) mit einer Verdünnung von 1:10.000 in TBST für 1h bei RT inkubiert. Die Widergabe des Antikörpersignals erfolgte mittels Substratumsetzung in Licht durch die Merretich-Peroxidase (HRP). Als Substrat wurde die Western Lighting Chemielumineszenz Lösung (MILLIPORE, Billerica, MA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Exponierung des Lichtsignals erfolgte mittels Kodak BiomaxLight Röntgenfilm (AMERSHAM BIOSCIENCES EUROPE GMBH, Freiburg, D). Dabei richtete sich die Belichtungszeit in einer Röntgenkassette nach der Intensität des Lichtsignals. Der Röntgenfilm wurde abschließend in Adefo Entwicklerlösung entwickelt, kurz in Wasser gewaschen und für 2min in Adefo Fixierlösung (ADEFO CHEMIE GMBH, Nürnberg, D) fixiert.

2.5. Analysen von Modifikationen und Translokationen von Proteinen

2.5.1. Immunzytochemie

Für die Bestimmung von Proteinlokalisierungen wurden $5x10^4$ Zellen auf beschichteten 12mm Deckgläschen (MENZEL GMBH + CO.KG, Braunschweig, D) in 24well Platten (NUNC™) ausgesät und für 24h inkubiert. Nach der Behandlung mit den entsprechenden Faktoren wurden die Zellen in der Platte mit PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,8mM KH_2PO_4, 10mM $Na_2HPO_4x2H_2O$, pH7.4) gewaschen und für 10 bis 20min in 4%igem PFA/PBS bei RT fixiert. Danach folgten drei Waschschritte mit PBS und die Permeabilisierung mit 0,05%igen TritonX-100 /PBS für 10min bei RT. Für das Blocken der Proben und für die Antikörperinkubationen wurde eine Feuchtkammer mit Parafilm'M'® LaboratoryFilm (AMERICAN NATIONAL CAN, Chicago, IL, USA) ausgelegt. Die Deckgläschen wurden aus der Platte geholt und mit der Zellseite nach unten auf einen Tropfen (50-100µl) Serumlösung (10% Ziegenserum/PBS) für mindestens 1h bei RT geblockt. Danach folgten zwei Waschschritte mit PBS. Die Erstantikörper wurden in der jeweiligen Verdünnung (Tabelle 3) in Antikörperlösung (5% Ziegenserum/PBS + 0,05% TritonX-100) aufgenommen und die Proben auf einen Tropfen (100µl) Antikörperlösung gelegt. Die Inkubation der Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in der Feuchtkammer. Die Zweitantikörper (Tabelle 3) wurden in 1% Ziegenserum/PBS für 1h bei RT in der Feuchtkammer inkubiert. Zwischen den Antikörperinkubationen erfolgten jeweils drei Waschschritte mit PBS. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI-Stocklösung (1mg/ml DAPI in PBS) im Verhältnis 1:1000 in Fluoromount-G™ Eindeckmedium (SOUTHERN BIOTECHNOLOGY ASSOCIATES, INC., Birmingham, AL, USA) verdünnt. Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten in ca.10µl DAPI-Fluoromount Medium eingedeckt und kurz bei 4°C getrocknet. Die

fluorometrische Analyse und Bilderfassung erfolgte mit einem Nikon Eclipse E600 Mikroskop und einer AxioCamMR Kamera (CARL ZEISS AG, Jena, D) oder mit dem Leica DM IRE2 konfokalen Laserstrahlenmikroskop (LEICA MICROSYSTEMS, Wetzlar, D) bei einer Wellenlänge für FITC bei 488/546nm, Cy3 bei 552/570nm und für den DAPI-DNA-Komplex bei 364/454nm.

2.5.2. Luciferasemessung nach PathDetect®

Mit Hilfe des ‚Stratagene's PathDetect® (STRATAGENE, LaColla, CA, USA) in vivo Signal Transduktion Pathway System' kann man die in vivo Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch eine Phosphorylierung und somit die Weiterleitung des entsprechenden Signalweges über das Reportergen Luciferase messen. Dazu enthält das trans-Aktivatorplasmid des Systems die Aktivierungdomäne des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors fusioniert mit der *GAL4* DNA-Bindungsdomäne (DBD). Zusätzlich enthält das Plasmid den CMV Promotor zur Überexpression des Fusionsproteines. Wird die Domäne des Transkriptionsfaktors durch ein Signal aktiviert, bindet sie mit Hilfe der *GAL4*-DBD an die *GAL4*-UAS des zweiten Plasmides, des Reporterplasmides, und führt zur Expression des *Luc* Genes. Diese Expression entspricht der Intensität der Aktivierung des Signalweges und wird über die Luciferasemessung bestimmt.

Zuerst wurden $3x10^4$ Zellen in einer 48well Platte (NUNC™) kultiviert und für 24h wachsen gelassen. Dann erfolgte die Transfektion wie unter 2.2.2. beschrieben mit je 100ng Plasmid-DNA eines trans-Aktivatorplasmides und des Reporterplasmides pFR-Luc, zusammen mit 50ng pCMV-β-Gal Plasmid-DNA. Nach erneuter 24h Inkubation im Brutschrank wurden die transfizierten Zellen mit den entsprechenden Faktoren behandelt. Die Lyse der Zellen, die Messung der β-Galaktosidase und die Luciferasemessungen sind in Absatz 2.3.3. beschrieben.

2.5.3. PAI-Luciferase-Assay

Um Mengen an TGF-β in Kulturüberständen bzw. Lösungen quantifizieren zu können, wurde der PAI-Luciferase-Assay verwendet. D.h., HCl-aktiviertes, reifes TGF-β in Überständen wird indirekt durch TGF-β-induzierte Luciferaseexpression gemessen. Die Luciferaseexpression wird durch ein Konstrukt, stabil transfiziert in die MLEC Zelllinie, mit einem TGF-β Responselement (PAI Promotor-kontrolliertes Reportergen) vorgeschaltet vor dem Luciferasegen erreicht.

Zuerst wurden PAI-MLEC Zellen über Nacht in Kultur gebracht. Nach der Vorkultivierung der PAI-MLEC Zellen wurde der zu untersuchende Überstand über Nacht vollständig auf die

PAI-MLEC Zellen gegeben. In dieser Zeit induziert TGF-β-beinhaltender Überstand die Expression des Luciferasegens in den PAI-MLEC Zellen. Am nächsten Tag wurden die PAI-MLEC Zellen geerntet, gewaschen und für die Messung der Luciferaseexpression lysiert. Die Messung der Luciferaseexpression erfolgte wie in Absatz 2.3.3. beschrieben.

Der Messwert in RLU eines Experiments reflektiert indirekt die Menge von exogenem oder freigesetzten TGF-β in dem Kulturüberstand.

2.5.4. Fluorometrische Messung aktivierter Proteine durch Substrate

Die Aktivierung spaltender Proteinen wurde mittels Substratumsetzungen gemessen. D.h. die Peptidsequenz der Spaltstelle eines Zielproteins ist an ein Molekül gekoppelt, welches im entlassenen Zustand fluoreszieren kann. D.H., durch die Aktivität des zu untersuchenden Proteins wird die Zielpeptidsequenz gespalten und die Fluoreszenz des entkoppelten, fluoreszierenden Moleküls kann gemessen.

Nach Behandlung der Zellen wurden die Proben in kaltem PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,8mM KH_2PO_4, 10mM $Na_2HPO_4x2H_2O$, pH7.4) gewaschen und mit Substrat-Lysispuffer (10mM Tris-HCl, 10mM $NaH_2PO_4/NaHPO_4$ pH7.5, 130mM NaCl, 1% TritonX-100) bei 4°C auf einen Rundschüttler für 15min aufgebrochen. Die Proteinmengen wurden nach Bradford (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.4.2.) bestimmt. Die Messungen der Substratumsetzung wurden nach Herstellerangaben (siehe Tabelle 4 und 8) durchgeführt. Dabei wurden 90µl der jeweiligen Reaktionspuffer mit den entsprechenden Substratkonzentrationen (Tabelle 8) in einer blickdichten 96well FluoTrac200 Platte (GREINER LABORTECHNIK GMBH, Frickenhausen, D) vorgelegt und 20µg Proteinlysat dazu gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4h wurde die erste Messung mit dem Microplate Fluorescence Reader FL_X800 (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC., Bad Friedrichshall, D) durchgeführt. Die Messungen konnten unter Berücksichtigung der einzelnen Substrate bis hin zu einer 16stündigen Inkubationszeit wiederholt werden. Die einzelnen Wellenlängen der fluoreszierenden Moleküle sind ebenfalls in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Herstellerangaben der verwendeten Substrate

Substrat (Katalognummer)	Reaktionspuffer	Substrat-menge	Exitation/Emission in nm
Caspase 2 Substrate I (218740)	100mM HEPES pH7.5 10% Sukrose 10mM DTT	20µM	400/480

	0.5mM EDTA		
Caspase 3 Substrate (556449)	20mM HEPES pH7.5 10% Glycerol 2mM DTT	20µM	380/460
Caspase 8 Substrate (556552)	20mM PIPES 100mM NaCl 10mM DTT 1mM EDTA 10% Sukrose pH7.2	15µM	400/480
Caspase 9 Substrate I (218765)	100mM HEPES pH7.5 20% Glycerol 5mM DTT 0,5mM EDTA	40µM	400/480
Calpain Substrate II (208731)	10mM HEPES pH7.4 1% TritonX-100	40µM	380/460

2.6. Analyse von Proteininteraktionen

2.6.1. Herstellung von GST-Bcl-xl Fusionsprotein

Für Analysen von Proteininteraktionen werden Proteine mit einem spezifischen Anhang in Überexpression hergestellt und aufgereinigt werden und damit eindeutiger untersucht werden. Ein etablierter Anhang ist die Glutathione-S-Transferase (GST) mit den dazugehörigen Fusionsvektoren pGEX System (AMERSHAM BIOSCIENCES EUROPE GMBH, Freiburg, D).

Vorab wurde mit den beschriebenen Klonierungstechniken ein Konstrukt für ein GST-Fusionsprotein kloniert. Dazu wurde mit den in Tabelle 1 aufgeführten Primerpaar GST-Bcl-xL von muriner cDNA ein Insert mit den Schnittstellen *Sma*I und *EcoR*I amplifiziert. Der Vektor pGEX-2T, mit dem enthaltenen GST-Anhang, sowie das Insert wurden mit den Enzymen *Sma*I und *EcoR*I durch einen Restriktionsverdau geschnitten. Dann wurden beide Komponenten ligiert, in *E. co*li transformiert und die Plasmide der entstandenen Klone isoliert. Mit der Plasmid-DNA wurden ein Restriktionsverdau und eine Sequenzierung zur Überprüfung der Klone durchgeführt. Über einen positiv geprüften Klon wurde das GST-Bcl-xl Fusionsprotein in *E.coli* hergestellt.

Dazu wurde 5ml einer LB-Übernachtungskultur in 100 ml YTA-Selektionsmedium (16g Trypton, 10g Hefeextrakt, 5g NaCl, mit H_2O_{bidest} auf 1l auffüllen, pH7.0 mit NaOH, 100µg/ml Ampicillin) in einem 500ml Rundkolben überführt und bei 37°C und 160rpm angezogen. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer OD von 0,6 bis 0,8 für ca. 2 bis 3h inkubiert und anschließend die Expression des Fusionsproteins über den *tac*-Promotor mit 100mM IPTG für 3h induziert. Für die Zellernte wurden die Bakterien bei 6000rpm in der Sorvall Zentrifuge für 10min bei 4°C sedimentiert und zweimal mit kalten PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,8mM KH_2PO_4, 10mM $Na_2HPO_4x2H_2O$, pH7.4) gewaschen. Nach Aufnahme der Zellen in 5ml PBS + Proteaseinhibitor Complete™ Cocktail (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) wurden die Zellen durch die Zugabe von 500µl 10% TritonX-100 lysiert. Durch Ultraschalbehandlung für 3x1min und einer Inkubationsphase für 10min bei RT auf dem Rundschüttler wurden die Zellen zusätzlich aufgebrochen. Der Proteinüberstand wurde durch Zentrifugation bei 8000rpm in der Sorvall Zentrifuge für 20min bei 4°C geklärt. Die Aufreinigung des Fusionsproteins aus dem Gesamtproteinlysat erfolgte mit Hilfe von Glutathion-Sepharose Beads (AMERSHAM BIOSCIENCES EUROPE GMBH, Freiburg, D), die eine Starke Affinität zu GST aufweisen. Die Aufbereitung der Beads erfolgte nach Herstellerangaben. 100µl der aufbereiteten Sepharose Beads wurden zu dem Proteinlysat gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert. Nach der Bindung des Fusionsproteins an die Beads wurde der Komplex bei 5000rpm und 4°C abzentrifugiert und zweimal in PBS + Proteaseinhibitor gewaschen. Der pelletierte Komplex wurde abschließend in 150µl PBS + Proteaseinhibitor aufgenommen und bei 4°C für maximal 6 Wochen gelagert.

2.6.2. GST-Pulldown

Mittels GST-Pulldown können Interaktionen von Proteinen gezielt überprüft werden.

Für die Untersuchung von Bindungspartnern an das Fusionsprotein GST-Bcl-XL wurden 4Mio Zellen in eine 10cm EasyGrip™ Tissue Culture Falcon Schale ausgesät. Nach der Behandlung mit bestimmten Faktoren wurden die Zellen in kaltem PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,8mM KH_2PO_4, 10mM $Na_2HPO_4x2H_2O$, pH7.4) gewaschen, in 1ml kaltem NP40 Puffer (10mM Tris-HCl pH7.5, 1,5mM $MgCl_2$, 0,5% Nonident P40) mit Proteaseinhibitor aufgenommen und über eine Ultraschallbehandlung im Eisbad für 3x30sec lysiert. Der Gesamtproteinextrakt wurde in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 12.000rpm für 10min geklärt. Die Proteine wurden mit 100µl aufbereiteten Glutathion-Sepharose Beads (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.6.1.) für 1h bei 4°C auf dem Rundschüttler präinkubiert, um unspezifische Bindungen an die Sepharose wegzufangen. Der Proteinüberstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt (*Material und Methoden*, Abschnitt

2.4.2.). Die Bindung möglicher Kandidatenproteine mit dem GST-Bcl-xl Komplex erfolgte im Bindepuffer (50mM K-Phosphatpuffer pH7.5, 100mM KCl, 10% Glycerol, 0,1% TritonX-100). D.h. 2xBindepuffer wurde mit 800µg bis 1,5mg induzierten Gesamtproteinextrakt (mit einer maximalen Proteinkonzentration von 1mg/ml) in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Von dem GST-Bcl-xl Komplex (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.6.1.) wurden 50µl zu dem Ansatz zugegeben und bei 4°C über Nacht auf einen Rollschüttler inkubiert. Die Reaktion wurde in einem 2ml Reaktionsgefäß in möglichst kleinen Volumina durchgeführt. Nach der Bindungsreaktion wurde der Komplex für 5 Minuten bei 6000rpm und 4°C pellettiert. Das Pellet wurde dreimal im Bindepuffer gewaschen und in einem Endvolumen von 30µl aufgenommen. Dann wurden die Komplexe mit 4xNuPage® LDS Sample Puffer (INVITROGEN GMBH, Karlsruhe, D) und 50mM DTT für 10min bei 70°C denaturiert und anschließend für 2min auf Eis abgekühlt. Danach wurden die Proteine mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe auf einem 10%-20%igen Gradientengel (INVITROGEN GMBH) aufgetrennt (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.4.4.).

2.6.3. Fixierung von SDS Gelen

Für die Sequenzierung von Kandidatenproteinen aus SDS-Gelen wurden die Gele fixiert und mit Colloidal Coomassie gefärbt. Dazu wurde das Gel für eine Stunde in Fixierlösung (40% Ethanol, 10% Essigsäure) auf dem Rundschüttler bei 100rpm und RT inkubiert und anschließend zweimal für 10min mit H_2O_{bidest} gewaschen. Die Färbung erfolgte mit Colloidal Coomassie Färbelösung (0,1% Coomassie Brilliant Blue G250, 2% ortho-Phosporsäure, 10% Ammoniumsulfat, 20% Methanol) über Nacht, wieder bei RT auf einen Rundschüttler bei 100rpm. Nach der Färbereaktion wurde das Gel solange mit Waschpuffer gewaschen (1% Essigsäure in H_2O_{bidest}) bis der Gelhintergrund völlig klar war.

2.6.4. Proteinsequenzierung mittels MALDI-TOF-MS[92]

Der Peptidverdau und die Sequenzierung der zu untersuchenden Proteine wurden von der Proteomics Gruppe am MPI für experimentelle Medizin in Göttingen vorgenommen. Dazu wurden Kandidatenproteine mit einer 2mm Stanze aus dem Gel gestochen und in MicroAmp® 8StripReaction Tubes (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, Ca, USA) überführt.

Die Proteinstücke wurden automatisch mit dem Liquid Handling „Genesis ProTeam 150 Advanced Digest“ Roboter System von Tecan (TECAN TRADING AG, Schweiz) tryptisch verdaut, mit vorheriger reduzierender Carboxyamidomethylisierung der Proteine. Dann wurden die verdauten Proteine auf eine speziell für die MALDI-TOF-MS vorgefertigte AnChorChip Sample Platte (BRUKER DALTONICS, Bremen, D) aufgetragen. Mit dem Ultraflex

I MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer (BRUKER DALTONICS, Bremen, D) wurden die Proteinsequenzen automatisch erfasst. Die Datenbanksuche erfolgte wie unter Jahn, Hesse et al. 2006 beschrieben. Bei schwierigen Proteinsequenzen, etwa bei posttranslationell modifizierten Proteinen, kleinen Proteinen oder Proteingemische, musste die Datensuche bestätigt werden. Dazu arbeitete das Massenspektrometer im MS/MS Betriebsmodus, d.h. in einer automatisierten Analysenschleife mit bis zu vier ausgewählten Vorläuferionen. Die Datenbanksuche mit Swiss-Prot (www.expasy.org/sprot) oder der NCBInr Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez.fcgi) unter Berücksichtigung der Mus musculus Taxonomy wurde unter Benutzung der Mascot Software 2.0 (Matrix Science) vorgenommen. Es wurden nur diejenigen Proteine positiv analysiert, die über den signifikanten Schwellenwert lagen und wenigsten vier Ionen im Peptidmassen Fingerprint aufwiesen.

2.6.5. Immunpräzipitation (IP)

Mit der Immunpräzipitation wird *in vitro* mit Hilfe eines Antikörpers sein bestimmtes Protein samt seiner Interaktionspartner heraus präzipitiert. Im Gegensatz zur Aufreinigung von Fusionsproteinen in *E.coli* sind hier alle Proteine im modifizierten Zustand einer bestimmten Zellbedingung.

Für die Präzipitierung wurden $8x10^5$ Zellen in 6cm EasyGrip™ Tissue Culture Falcon Schalen ausgesät und nach 24stündiger Kultivierung mit den entsprechenden Faktoren behandelt. Die Zellen wurden in kaltem PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,8mM KH_2PO_4, 10mM $Na_2HPO_4x2H_2O$, pH7.4) gewaschen. Zur Isolierung der Proteine wurde 300µl IP-Lysispuffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 500mM NaCl, 1% Nonident p40) auf die Zellen gegeben, die Zellen von der Schale gekratzt und in ein 1,5ml Reaktiongefäß überführt. Die Isolierung wurde mit einer Ultraschalbehandlung im Eisbad für 3x30sec verstärkt. Das Lysat wurde in einer Kühlzentrifuge für 15min bei 4°C und 12.000rpm geklärt. Es folgte eine Vorreinigung des Proteinlysats mit 50µl einer 50%igen Protein A Sepharose Lösung, um unspezifischen Bindungen an die Sepharose vorzubeugen. Das Pre-clearing erfolgte auf einem Rollschüttler für 1h bei 4°C. Die Proben wurden wiederum für 30sec zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Messen der Proteinmengen erfolgte nach Bradford wie in *Material und Methoden*, Abschnitt 2.4.2. beschrieben. Gleiche Proteinmengen von etwa 500µg und die entsprechenden Antikörper (Tabelle 3) wurden für die Antigen-Antikörper Kopplung zusammen in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einen Rollschüttler. Dann wurden die Antikörper mit 20µl 50%iger Protein A Sepharose Lösung präzipitiert, für 2h bei 4°C auf einem Rollschüttler. Nach der Bindung wurden die Komplexe für 30sec bei 4°C und 12.000rpm

sedimentiert und zweimal mit IP-Lysispuffer gewaschen. Das Pellet wurde in 30µl 2xNuPage® LDS Sample Puffer (INVITROGEN GMBH, Karlsruhe, D) und 50mM DTT aufgenommen und für 10min bei 70°C aufgekocht. Anschließend wurden die Proben für 2min auf Eis abgekühlt. Die Pelletierung der abgekochten Sepharose erfolgte bei 12.000rpm für 2min. Danach wurden der Proteinüberstand mittels SDS-PAGE auf einem 15%igen SDS Gel aufgetrennt und die Proteinbanden über einen Western Blot detektiert (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.4.4.).

2.7. Apoptoseuntersuchungen

2.7.1. Detektion von Apoptose nach der TUNEL-Technologie

Mit dieser Methode werden fragmentierte DNA Überhänge am 3'-OH Terminus mit fluoreszierenden Nukleotiden durch eine enzymatische Reaktion gelabelt.

$5x10^4$ Zellen wurden auf beschichteten Deckgläschen (MENZEL GMBH + CO.KG, Braunschweig, D) in einer 24well Platten (NUNC™) ausgesät und für 24h inkubiert. Nach der Behandlung mit den entsprechenden Faktoren wurden die Zellen in der Platte mit PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,8mM KH_2PO_4, 10mM $Na_2HPO_4x2H_2O$, pH7.4) gewaschen und für 45min in 4%igem PFA/PBS bei RT fixiert. Danach wurden die Proben mit PBS gewaschen und für 2min auf Eis mit der Permeabilisierungslösung (0,1% TritonX-100 in 0,1%Natriumcitrat) inkubiert. Die Labelingreaktion mit dem in situ „Cell Death Detection TMR red" Kit (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH, Mannheim, D) erfolgte nach Herstellerangaben. Dazu wurden die Proben mit je 50µl Labelinglösung für 1h bei 37°C inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten in ca. 10µl Fluoromount-G™ Eindeckmedium (SOUTHERN BIOTECHNOLOGY ASSOCIATES, INC., Birmingham, AL, USA) eingedeckt und kurz bei 4°C getrocknet. Die fluorometrische Analyse und Bilderfassung erfolgte mit einem Nikon Eclipse E600 Mikroskop und einer AxioCamMR Kamera (CARL ZEISS AG, Jena, D) bei einer Wellenlänge von 540/580nm.

2.7.2. Propidiumiodid Zellkern-Analyse mittels Durchflusszytometrie (PI-FACS-Analyse)

Mit dieser Methode können apoptotische Kerne über die Phasen des Zellzykluses ermittelt und gezählt werden. D.h., fixierte Zellen werden mit einem DNA-interkalierenden Stoff angefärbt und die Intensität der DNA-Färbung gemessen. Dabei entspricht 2n der G1-Phase im Zellzyklus, 2n > 4n entspricht der S-Phase, 4n entspricht der G2-Phase und <2n entspricht der Sub-G1 Phase und steht für Kerne die apoptotisch sind, also weniger DNA aufweisen als Zellen in der G1-Phase.

In einer 12well Platte (NUNC™) wurden $1,5x10^5$ Zellen ausgesät, über Nacht kultiviert und mit den entsprechenden Faktoren behandelt. Nach der Behandlung wurde der Überstand der Proben in 2ml SafeLook Reaktionsefäßen gesammelt. Dann wurden die Zellen mit PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,8mM KH_2PO_4, 10mM $Na_2HPO_4x2H_2O$, pH7.4) gewaschen und das PBS danach ebenfalls in das zur Probe gehörende SafeLook Reaktionsgefäß getan. Die Trypsinierung der Zellen erfolgte mit 200µl Trypsin-EDTA und das Stoppen der Reaktion mit 500µl Stopmedium, wobei die Proben wieder in den SafeLook Reaktionsgefäßen gesammelt wurden. Dann wurden die Zellen bei 4°C und 1000g für 10min in der Kühlzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen die pelletierten Zellen mit kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Proben wurden in 300µl PBS vorsichtig durch Schütteln resuspendiert. Dann wurde 700µl kaltes 100%iges EtOH tropfenweise zugegeben und die Zellen wenigsten für 2h bei -20°C fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen wie gehabt abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Proben wurden in PI-FACS-Lösung (100µg/ml Propidiumiodid, 10µg/ml RNase, in PBS, pH7.4) aufgenommen, in Round Buttom FACS-Röhrchen (BD FALCON, Heidelberg, D)) überführt und für 30min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Analyse apoptotischer Kerne durch Ermittlung des Sub-G1-Peaks erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACScan Cell Quest Software (Becton Dickinson, Heidelberg, D). Für die statistischen Auswertungen wurden Messungen aus jeweils drei unabhängigen Experimenten herangezogen.

IV. Ergebnisse

1. Das Aktinfragment Fraktin und nicht die BH3-only Proteine vermitteln eine Regulation des Bcl-xl Proteins in der TGF-β1-induzierten Apoptose

In der oligodendroglialen Vorläuferzelllinie Oli-neu wird in Folge TGF-β-induzierter Apoptose das anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglied Bcl-xl herunterreguliert[87]. Andere Zellmodelle zeigen, dass Mitglieder der unterschiedlichen Bcl-2 Subfamilien oft über Protein-Protein-Interaktionen miteinander kommunizieren[31]. Die vielseitig regulierten Mitglieder der pro-apoptotischen BH3-only Subfamilie sind die wichtigsten Antagonisten von Bcl-xl und seiner Regulation (*Einleitung*; Abschnitt 2.2.3.). Somit wurden bekannte BH3-only Proteine in Bezug auf eine Regulation nach TGF-β1 Behandlung überprüft. Da keines der untersuchten BH3-only Proteine unter TGF-β1 reguliert wurde, sollte über eine Interactomstudie ein anderer möglicher Bcl-xl Bindungspartner gefunden werden. In den letzten Jahren sind verschiedene Interaktionen für Bcl-2 Familienmitglieder mit Proteinen aus unterschiedlichen Proteingruppen identifiziert worden. Dabei gewinnt das Zytoskelett als apoptotischer Regulator immer mehr an Bedeutung[66].

1.1. Analyse von Bcl-2 Familienmitgliedern für die Regulation von Bcl-xl

Die möglichen Aktivierungen von Mitgliedern der Bcl-2 Familie für die Regulation apoptotischer Prozesse am Mitochondrium und anderen Organellen ist vielfältig. Dabei werden Mitglieder der BH3-only Subfamilie durch ein apoptotisches Signal über ihre Expression und/oder post-translationelle Modifikationen wie Phosphorylierungen, Translokalisierungen oder enzymatische Spaltungen aktiviert. Post-translationelle Modifikationen basaler Bcl-2 Familienmitglieder dienen dabei nicht nur der Aktivierung, sondern auch der Lokalisierung in der Zelle, wobei auch zusätzlich transkriptionelle Regulationen möglich sind[23,31,36,41,50].

1.1.1. mRNA Expression bekannter BH3-only Gene in Oli-neu Zellen

Um zu analysieren, welche BH3-only Gene in Oli-neu Zellen auf mRNA Ebene exprimiert werden und daher eine Funktion in diesem Zellmodel haben können, wurde ein Genexpressionsmuster erstellt. Dazu wurde die Gesamt-RNA von TGF-β1-behandelten (5ng/ml) und unbehandelten Zellen isoliert. Die TGF-β Behandlung erfolgte für 6 Stunden, da

das Bcl-xl Transkripts nach 6 Stunden auf dem niedrigsten Niveau erscheint (Abbildung 11*A*). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass auch mögliche Induktionen von BH3-only Genen nach 6 Stunden erfolgen können. Nach dem Umschreiben der mRNA in cDNA wurden beide Bedingungen gemischt, um mit den folgenden PCR Reaktionen neben basalen Expressionen auch transkriptionell induzierte BH3-only Gene identifizieren zu können. Die verwendeten Primerpaare für die PCR-Amplifikate der unterschiedlichen BH3-only Transkripte sind in der Tabelle 1 im *Material- und Methodenteil* zusammengefasst. In der Abbildung 11*B* wurden die untersuchten zehn BH3-only Gene mit *Bad* (598bp), *Bid* (584bp), *Bim-EL* (591bp), Bim-*L* (423), Bim-*S* (333), *Blk* (450bp), *Bmf* (793bp), *BNip3* (575bp), *BNip3L* (650bp), *Hrk* (200bp), *Noxa* (318bp), *Puma-α* (144bp) und *Puma-β* (198bp) aufgezeigt. Die Basenpaaranzahl steht für die Transkriptlänge des RT-PCR Produkts und nicht für die Größe der BH3-only Gene. Als Standard wurde *Gapdh* verwendet. Sechs von zehn bekannten BH3-only Genen wurden in der Oli-neu Zelllinie transkribiert und könnten somit eine Regulation von Bcl-xl bewirken. Dabei sind die stärker exprimierten Gene wie *Bim-EL* (engl.: extra long), *Bim-L* (engl.: long), *Bim-S* (engl.: short), *BNip3, BNip3L, Hrk* und *Puma* hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene reguliert, während das schwächer exprimierte *Bad* durch eine Dephosphorylierung aktiviert werden muss[31,41,53]. Für die Gene von *Blk, Bid, Bmf* und *Noxa* konnte in unserem Modell kein Transkript ermittelt werden.

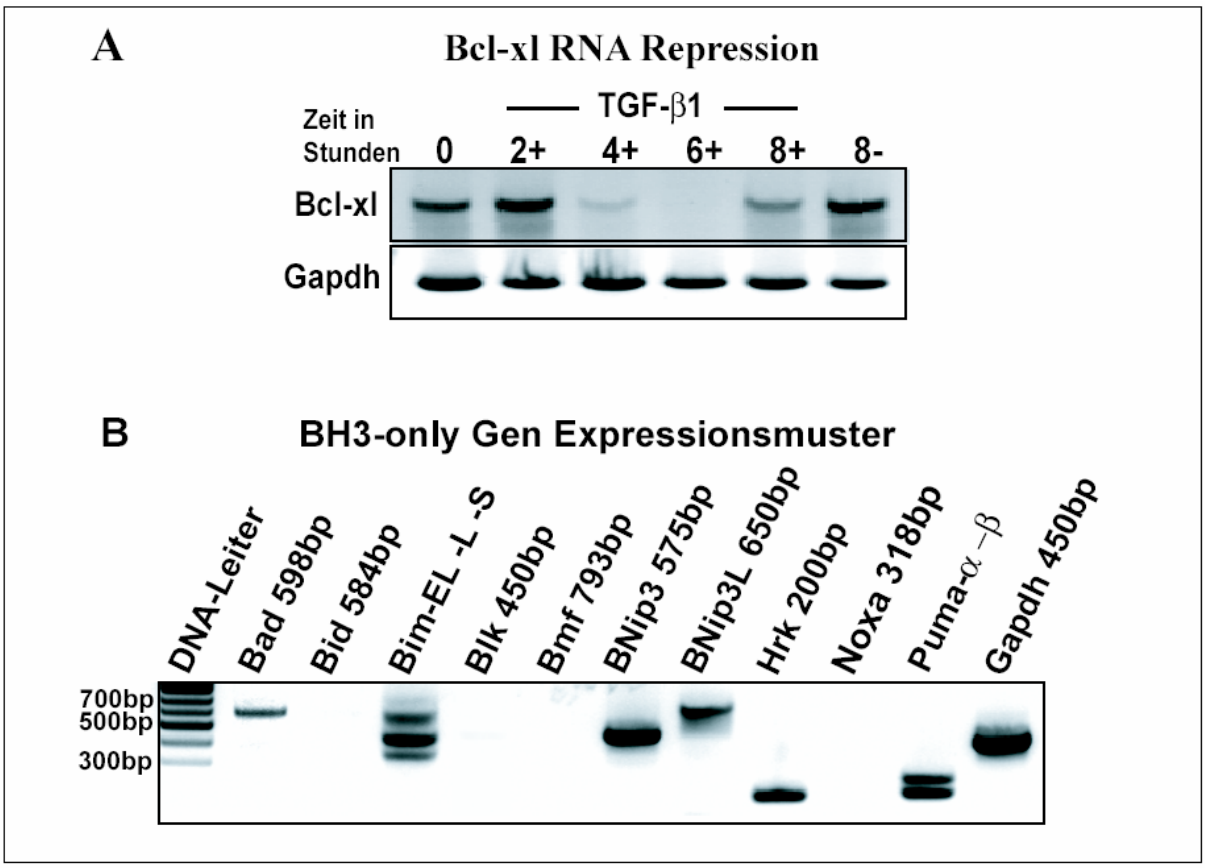


Abbildung 11: Genexpressionsmuster verschiedener Bcl-2 Familiengene in der oligodendroglialen Vorläuferzelllinie Oli-neu.

(A) TGF-β1-induzierte Bcl-xl mRNA Repression an verschiedenen Zeitpunkten. Die mRNAs von TGF-β1-behandelten (5ng/ml) und unbehandelten Zellen wurden isoliert und äquivalente Mengen für eine RT-Reaktion eingesetzt. Mit dem in der Tabelle 1 *(Material und Methoden*) angebenen Bcl-xl Primerpaar wurde eine semi-quantitative PCR durchgeführt. *Gapdh* diente als Standard.

(B) Genexpressionsmuster bekannter BH3-only Gene. Oli-neu Zellen wurden für 6 Stunden mit 5ng/ml TGF-β1 behandelt oder wurden nicht behandelt. Nach der mRNA Isolierung und der RT-Reaktion wurden die cDNAs gemixt und für eine PCR Reaktion (35 Zyklen) mit den in der Tabelle 1 (*Material und Methoden*) aufgeführten Primerpaaren für *Bad, Bid, Blk, Bim, Bmf, BNip3, BNip3L, Hrk, Noxa* und *Puma* eingesetzt. Die Anlagerungstemperaturen der jeweiligen Primer sind in der Tabelle 6 (*Material und Methoden*) zusammengefasst. *Gapdh* diente als Standard. PCR Transkriptprodukte waren: *Bad* (598bp), *Bim-EL* (591bp), *Bim-L* (423bp), *Bim-S* (333bp), *BNip3* (575bp), *BNip3L* (650bp), *Hrk* (200bp), *Puma-α* (144bp) und *Puma-β* (198bp). Die Basenpaaranzahl steht für die Transkriptlänge des RT-PCR Produkts und nicht für die Größe der BH3-only Gene. Marker: 100bp DNA-Leiter. Im Gegensatz dazu konnte für *Blk* (450bp), *Bid* (584bp), *Bmf* (793bp) and *Noxa* (318bp) kein Transkript detektiert werden.

1.1.2. Kein untersuchtes BH3-only Gen wird auf transkriptioneller Ebene durch TGF-β reguliert

Die exprimierten BH3-only Gene wurden in Bezug zu TGF-β1 auf eine mögliche transkriptionelle Regulation hin untersucht, da fünf von den sechs Genen über eine Induktion aktiviert werden[31,53]. Dazu wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit 5ng/ml TGF-β1 behandelt und die Gesamt-RNA isoliert. Die verwendeten Primerpaare für die anschließenden RT-PCRs sind in Tabelle 1 (*Material und Methoden*) zu sehen. Dabei sind die individuellen Zyklenzahlen und Anlagerungstemperaturen für die jeweiligen Primerpaare in Tabelle 6 (*Material und Methoden*) aufgelistet, in Bezug auf die zuvor ermittelten logarithmischen Anstiegsphasen der jeweiligen PCR-Reaktionen. In Abbildung 12 sind die semi-quantitativen RT-PCRs der BH3-only Gene gezeigt und die densitometrische Auswertung dazu dargestellt. Alle BH3-only Gene konnten erneut detektiert werden, jedoch ohne eine Änderung in ihrer Expression nach einer TGF-β1 Behandlung. Als Kontrolle der TGF-β1 Behandlung wurde die *Bcl-xl* mRNA Genexpression als RT-PCR mit durchgeführt. Als interner Standard diente das *Gapdh* Gen. Keines, der in Oli-neu Zellen exprimierten BH3-only Gene, wurde auf transkriptioneller Ebene reguliert. Die ausschließlich auf transkriptioneller Ebene regulierten BH3-only Gene *BNip3L, BNip3, Hrk* und *Puma* konnten an dieser Stelle für eine mögliche TGF-β-vermittelte Regulation ausgeschlossen werden[31,41,53]. Im Vergleich zu *BNip3, BNip3L, Hrk* und *Puma* werden *Bad* und *Bim* auch oder vorwiegend durch Phosphorylierung/Dephosphorylierungen auf der Proteinebene reguliert, und mussten somit gesondert untersucht werden.

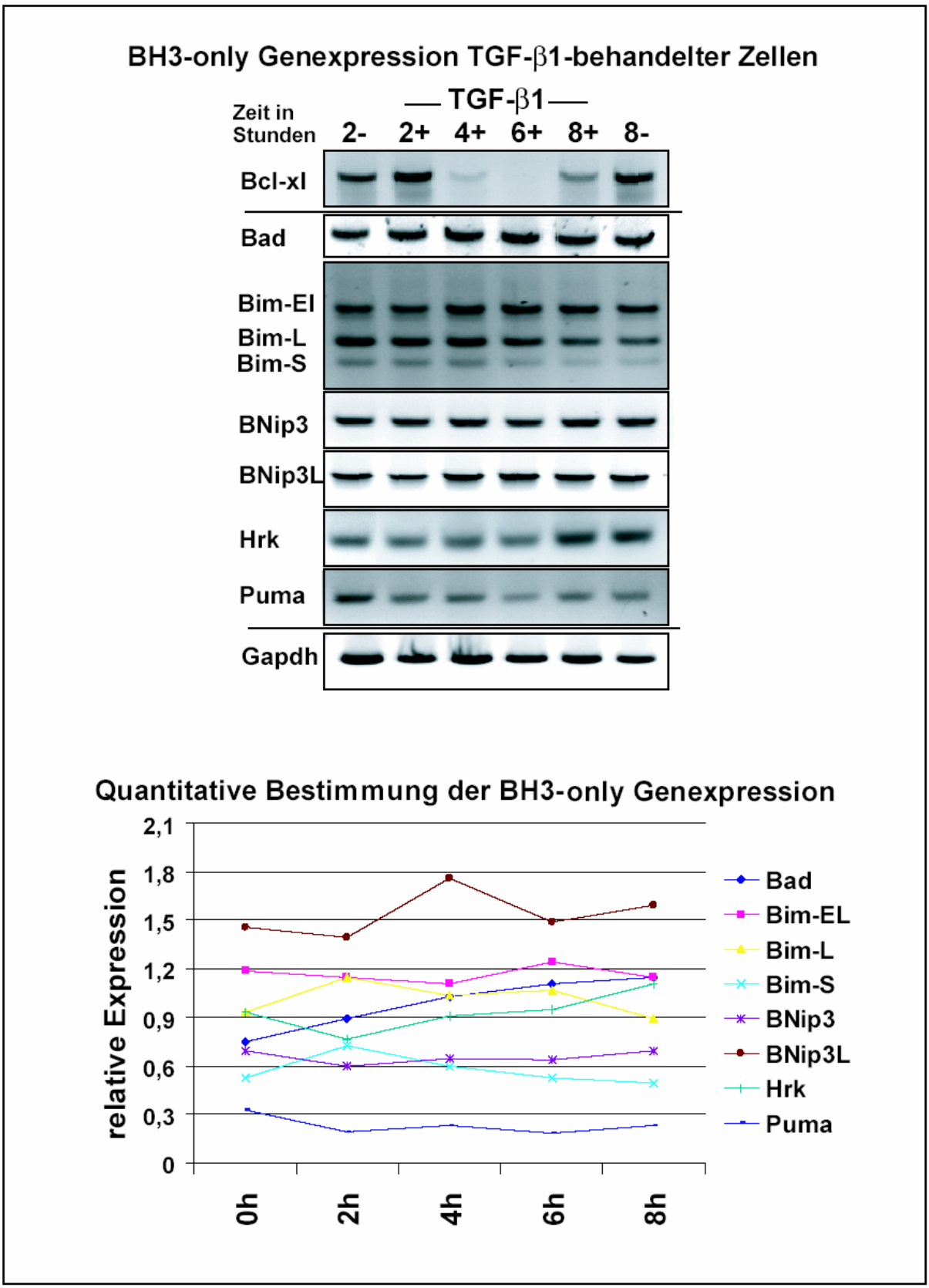


Abbildung 12: Semi-quantitative RT-PCRs der exprimierten BH3-only Gene in TGF-β1-behandelten Oli-neu Zellen.

Die Total-mRNAs von zu verschiedenen Zeitpunkten mit TGF-β1-behandelten (5ng/ml) Zellen und unbehandelten Zellen wurden isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit den in Tabelle 1 aufgeführten Primern

für *Bad, Bim, BNip3, BNip3L, Hrk* und *Puma* wurden semi-quantitative PCRs mit den in Tabelle 6 aufgelisteten Bedingungen durchgeführt. *Gapdh* diente als interner Standard, während die *Bcl-xl* Repression als Kontrolle der TGF-β1 Behandlung mitgeführt wurde. Das Diagramm gibt die densitometrischen Auswertungen der analysierten BH3-only Gene an. Dabei bezieht sich die Auswertung auf die Messung von einer repräsentativen semi-quantitativen RT-PCR von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Alle untersuchten BH3-only Gene wurden detektiert, jedoch ohne signifikante Veränderung in ihrer Expression.

1.1.3. Untersuchung von Proteinexpression und Modifikationen post-translationell regulierter BH3-only Mitglieder in Oli-neu Zellen

Einige BH3-only Proteine wie Bad, Bid, Blk, Bim und Bmf werden hauptsächlich oder gleichbedeutend über post-translationelle Modifikationen reguliert. Ihre basalen Proteinmengen liegen dabei inaktiv in der Zelle vor. Proteinmodifikationen bewirken deren Aktivierung, aber auch deren Lokalisierung an bestimmten Orten in der Zelle[31,53]. Dabei können die basalen mRNA Transkripte so gering sein, dass sie nicht im mRNA Expressionsmuster in Abbildung 11b detektierbar waren. Daher wurden die post-translationell regulierten BH3-only Proteine auf der Proteinebene weitergehend untersucht. Einerseits wurde untersucht, ob die BH3-only Mitglieder Blk, Bid und Bmf im Gegensatz zur Transkription auf Proteinebene zu detektieren sind (siehe Abbildung 11*B*), und andererseits, ob die BH3-only Mitglieder Bad und Bim durch TGF-β1-vermittelte Modifikationen auf der Proteinebene reguliert werden.

In nicht-apoptotischen Zellen liegt Bad, über zwei Phosphatstellen an das 14-3-3 Protein gebunden, inaktiv im Zytoplasma vor. Über ein apoptotisches Signal kommt es zur aktivierenden Dephosphorylierung von Bad und dessen Translokalisierung zu seinen Zielorten. Um zu überprüfen, ob das exprimierte Bad Protein in den Zellen aktiviert wird, wurde ein Western Blot mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Bad (p-Bad) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit 5ng/ml TGF-β1 behandelt und der Gesamt-Proteinextrakt für einen Western Blot isoliert. Der p-Bad Antikörper detektiert die Phosphatgruppe an Serin112. Als Ladekontrolle wurde Gapdh verwendet, während die Detektion von Bcl-xl als Kontrolle der TGF-β1 Behandlung diente. Nach einer TGF-β Behandlung veränderte sich die Intensität von phosphorylierten Bad nicht, d.h. die Phosphatgruppe blieb erhalten (Abbildung 1*3A*). Bad wurde nicht aktiviert und wird somit nicht über TGF-β1 reguliert.

Mit Hilfe von Western Blot Experimenten wurde zusätzlich eine Expression der Proteine Bid und Blk ermittelt (Abbildung 13*B*). Für das Bmf Protein wurde trotz Auftragen hoher Proteinmengen (siehe Gapdh als Ladekontrolle) keine Expression festgestellt. Da die BH3-

only Proteine Blk, Bim und Bid auf Proteinebene nachweisbar waren, wurden sie auf mögliche TGF-β-induzierte Modifikationen weitergehend untersucht.

Aus dem Protein Bid wird durch enzymatische Spaltung das apoptotische 15kDa tBid Fragment gewonnen, während Blk und Bim durch aktivierende Phosphorylierungen eine Translokalisierung zu ihren Zielorten erfahren. Um die mögliche Aktivierung dieser Proteine zu untersuchen, wurden Zellen mit 5ng/ml TGF-β1 behandelt und der Gesamt -Proteinextrakt für Western Blot Experimente eingesetzt. Der eingesetzte Antikörper für die Bid Detektion erkennt dabei sowohl das Gesamt-Protein als auch das geschnittene 15kDa Fragment. Mögliche Phosphorylierungen von Bim und Blk werden durch auftretende Doppelbanden angezeigt. Abbildung 13*B* zeigt, dass keines der untersuchten BH3-only Proteine eine Modifikation nach einer TGF-β Behandlung erfahren hat.

Die Nichtregulation der exprimierten BH3-only Gene wies vorerst auf einen BH3-only Protein unabhängigen Mechanismus hin. Um Bindungspartner für Bcl-xl und damit Hinweise auf seine Regulation zu finden, wurde eine neue Strategie entwickelt.

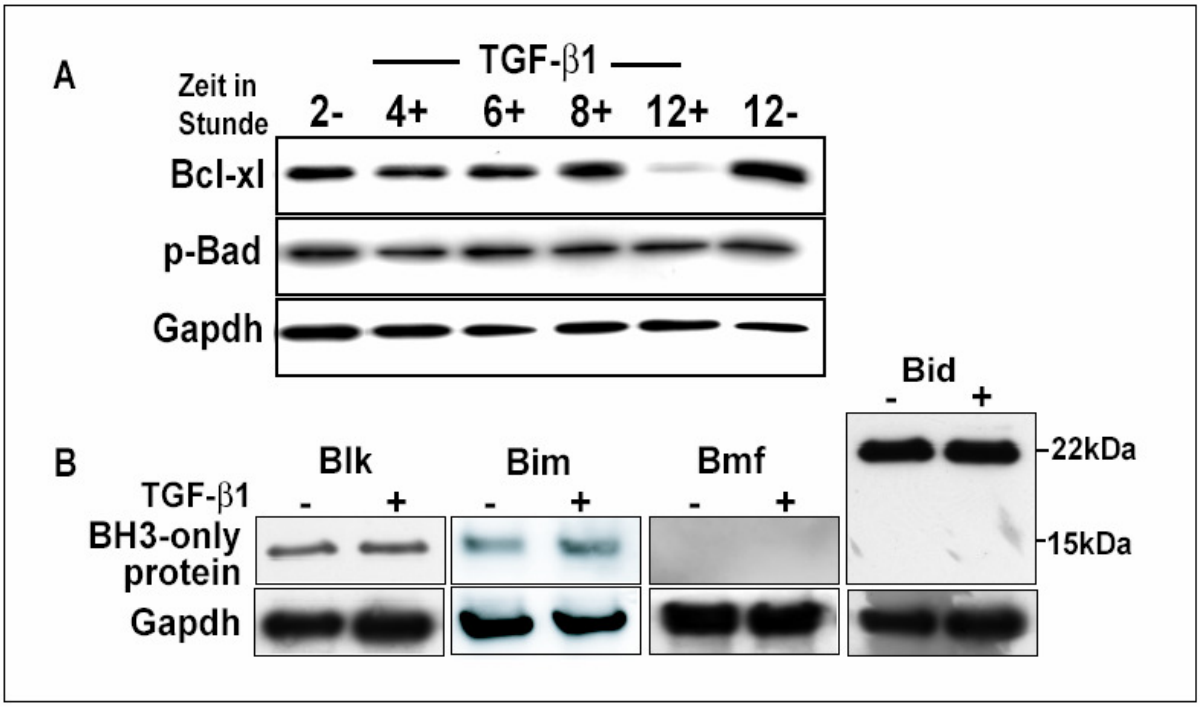


Abbildung 13: Western Blot Experimente post-translationell regulierter BH3-only Proteine in Oli neu Zellen nach TGF-β1 Behandlung.

(A) Bad Phosphorylierung in TGF-β1-induzierten Oli-neu Zellen. Oli-neu Zellen wurden mit 5ng/ml TGF-β1 an verschiedenen Zeitpunkten behandelt und äquivalente Mengen des Gesamt-Proteinextrakts für einen Western Blot eingesetzt. Als Kontrolle wurden zwei unbehandelte Proben (2- und 12-) mitgeführt. Die Phosphorylierung von Bad wurde über das Serin 112 detektiert. Gapdh diente als Ladekontrolle und die Detektion vom Bcl-xl

Protein als Kontrolle der TGF-β1 Behandlung. Die Western Blot Experimente zeigten keine Veränderung in der Bad Phosphorylierung und somit keine Aktivierung des Bad Proteins.

(B) Überprüfung der BH3-only Proteine Blk, Bim, Bmf und Bid auf ihre Expression und möglichen TGF-β1-vermittelten, post-translationellen Modifikationen. Oli-neu Zellen wurden mit 5ng/ml TGF-β1 behandelt und äquivalente Mengen des Gesamt-Proteinextraktes für Western Blots eingesetzt. Gapdh diente als Ladekontrolle. Der Bid Antikörper erkennt sowohl das Gesamt-Protein als auch das geschnittene 15kDa tBid Fragment. Die Ergebnisse zeigten kein geschnittenes Bid Fragment und keine Doppelbande für Blk und Bim, welche eine Phosphorylierung oder andere Modifikation anzeigen würde. Für Bmf wurde trotz hoher Proteinmengen keine Expression ermittelt.

1.2. Das Aktinfragment Fraktin bindet Caspasen-abhängig an das anti-apoptotische Bcl-xl Protein

Da keines der bekannten BH3-only Proteine eine Regulation durch TGF-β erfahren hatte, wurde eine Strategie zur Identifizierung neuer Bcl-xl Interaktionspartner entwickelt. Es wurde das GST-Pulldown Verfahren ausgewählt, da hier Signal-abhängig mit größeren Proteinmengen gearbeitet werden kann. Dabei wurde eine Bindung von Komponenten des Zytoskeletts ermittelt. Regulationen am und durch das Zytoskelett erscheinen immer wichtiger für apoptotische Vorgänge. Ein typisches Beispiel stellt eine hoch konservierte Schnittstelle für Caspasen am Gesamt-Aktinfragment dar. Eine Spaltung durch Effektorcaspasen teilt das 42kDa Gesamt-Aktin in ein N-terminales 32kDa Aktinfragment namens Fraktin und ein C-terminales 15kDa Aktinfragment namens tAktin[67-69]. tAktin induziert weitere morphologische Veränderungen des Zytoskeletts und spielt eine möglichen Rolle in apoptotischen Prozessen mit noch unbekannten Regulationen am Mitochondrium[69,70]. Fraktin konnte noch keine Funktion zugeordnet werden.

1.2.1. Komponenten des Aktin-Myosin-Zytoskeletts interagieren mit dem Bcl-xl Protein

Zur Identifizierung neuer Bcl-xl Interaktionspartner wurden GST-Pulldown Experimente durchgeführt, für die ein GST-Bcl-xl Fusionsproteins und ein GST-Protein überexprimiert wurden (*Material und Methodenteil*, Abschnitt 2.6.1.).

Oli-neu Zellen wurden mit TGF-β1 (5ng/ml) für 8 Stunden behandelt und anschließend die Proteine isoliert. Das Zeitfenster von 8 Stunden wurde aufgrund des Expressionsmusters des Bcl-xl Proteins gewählt (Abbildung 13*A*), da das Bcl-xl Protein nach 8 Stunden in TGF-β1-behandelten Zellen noch vorhanden ist und Induktionen möglicher Interaktionspartner für Bcl-xl abgeschlossenen sein können (Abbildung 11*A*). Um unspezifische Bindungen an GST

auszuschließen, wurden behandelter und unbehandelter Proteinextrakt in gleichen Mengenanteilen gemixt und mit dem GST-Protein inkubiert (GST-Kontrolle).

Für die Untersuchungen der möglichen Bcl-xl Bindungspartner wurde das GST-Bcl-xl Fusionsprotein zu gleichen Mengen entweder mit TGF-β1-behandeltem oder unbehandeltem Proteinextrakt über Nacht bei 4°C inkubiert (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.6.2). Nach der Bindungsreaktion wurden die Komplexe sedimentiert, gewaschen, über ein 10-20%iges SDS-Gradientengel separiert, das SDS-Gel fixiert und die Proteinbanden mit Colloidal Coomassie gefärbt. Proteinbanden möglicher Kandidaten, die nicht unspezifisch im Vergleich zur GST-Kontrolle gebunden wurden, wurden mit einer 2mm Stanze ausgestochen, mittels Massenspektrometrie sequenziert und analysiert. Die Sequenzierung der Proteinproben und die Analyse erfolgten von der Proteomics Gruppe des Max Planck-Institutes für experimentelle Medizin in Göttingen unter Anleitung von Herrn Professor Hartmut Kratzin.

Neben der als GST-Bcl-xl Fusionsprotein identifizierten 55kDa Proteinbande, konnten zwei zusätzliche Banden mit einer Größe von 42kDa und 220kDa in den unbehandelten als auch in den TGF-β1-behandelten Proben präzipitiert werden (Abbildung 14). Diese Banden waren nicht in der GST-Kontrolle identifizierbar und wiesen somit auf eine spezifische Bindung am GST-Bcl-xl Fusionsprotein hin. Die zusätzlichen Banden wurden als zytosolisches Aktin (42kDa) und nicht-muskuläres Myosin (220kDa) analysiert. Dabei erscheint für die TGF-β1-behandelte Probe eine leichte Steigerung in der Bandenintensität von Aktin als auch von Myosin im Vergleich zur unbehandelten Probe.

Diese neuen Erkenntnisse gaben erste Anhaltspunkte für die weitere Analyse von Bcl-xl Interaktionspartnern und suggerierten für das Zytoskelett eine Rolle in der TGF-β1-induzierten Apoptose in Oligodendrozyten.

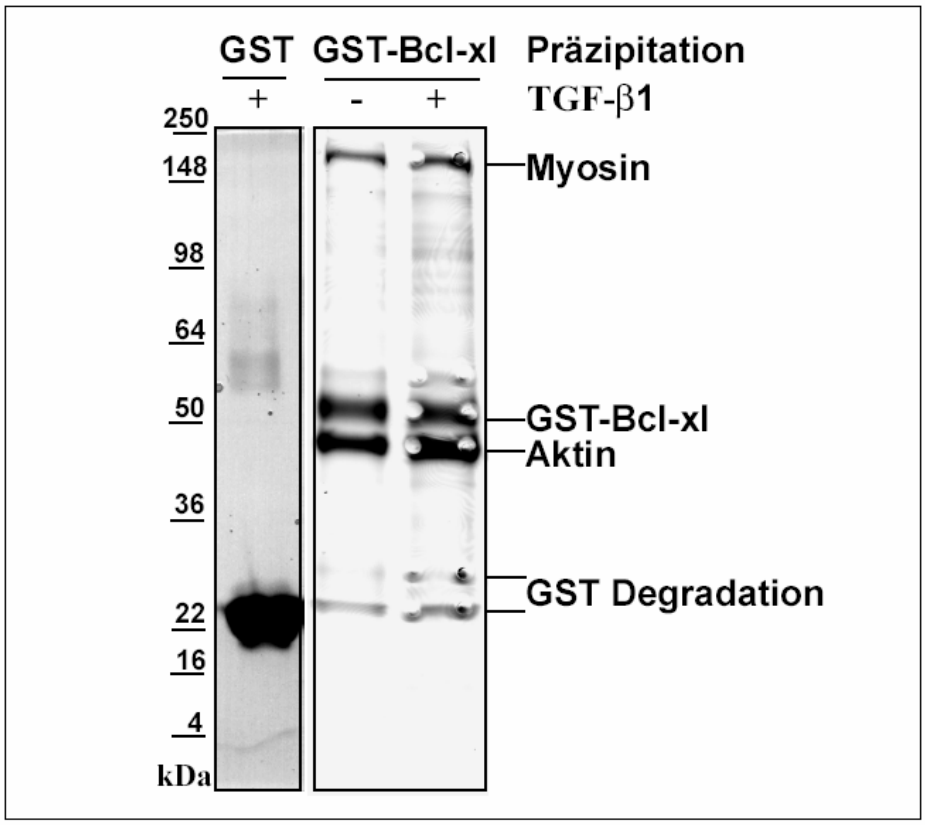


Abbildung 14: GST-Pulldown Experimente und massenspektrometrische Analyse mit rekombinanten Bcl-xl Protein in Abhängigkeit von TGF-β1.

Der Gesamt-Proteinextrakt von TGF-β1-behandelten (5ng/ml für 8 Stunden) und unbehandelten Zellen wurde isoliert und äquivalente Mengen (800µg) zusammen mit an Sepharose-gebundenen GST-Bcl-xl Fusionsprotein inkubiert. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen von Proteinen an die Sepharose oder das GST Protein wurden TGF-β1-behandelte Proben zusammen mit dem rekombinanten GST Protein inkubiert. Die Proteinpellets wurden über eine SDS-Gel-Elektrophorese separiert, das Gel fixiert und mit Colloidal Coomassie Lösung gefärbt. Von ausgewählten Proteinbanden wurden Proteinproben für die Massenspektrometrie entnommen. Die Punkte im Gelbild weisen auf die ausgestanzten Gelstücke hin. *Bahn 1*, rekombinantes GST Protein als Kontrolle für unspezifische Bindungen an die Sepharose oder das GST Protein; *Bahn 2*, GST-Bcl-xl Fusionprotein inkubiert mit unbehandelten Proben; *Bahn 3*, GST-Bcl-xl Fusionprotein mit TGF-β-induzierten Proben für 8 Stunden. Die 55kDa Bande wurde mittels Massenspektometrie als das GST-Bcl-xl Fusionsprotein sequenziert. Die zusätzliche 42kDa Bande und 220kDa Bande konnten als zytosolisches Aktin und nicht-muskuläres Myosin identifiziert werden. In TGF-β-induzierten Proben wurde ein leichter Anstieg der Bcl-xl-Aktin-Myosin Bindung im Vergleich zur unbehandelten Probe detektiert. Die GST-Kontrolle zeigte keine unspezifische Bindung des Bcl-xl-Aktin-Myosin Komplexes auf.

1.2.2. Eine Hemmung der Aktinfunktion reduziert die TGF-β-induzierte Apoptose

Um eine Funktion des Aktin-Myosin-Zytoskeletts in der TGF-β-induzierten Apoptose zu bestätigen, wurden verschiedene Agenzien zur Inhibition von Funktionen des Zytoskeletts eingesetzt und anschließend die Apoptoserate mittels PI-FACS-Analysen ermittelt, indem die

DNA-Fragmentierung des Zellkerns gemessen wurde. Zusätzlich wurde Staurosporin (STS) als allgemeiner Apoptose-induzierender Faktor eingesetzt, da ermittelt werden sollte, ob die Prozesse am Zytoskelett vom Apoptosesignal abhängig sind.

Zur Inhibition der Aktinfunktionen wurde CytochalasinD (CytoD) verwendet. Dieser Inhibitor hemmt die weitere Polymerisation der Mikrofilamente und verkürzt so die F-Aktinstruktur. Durch die Verkürzung der Polymere inhibiert CytoD weite Teile der Aktinfunktion. Als Inhibitor der Myosinfunktion diente Blebbistatin (Bleb), welcher die Funktion der Myosin ATPase stört, wodurch Myosin nicht mehr als Transportmolekül wirken kann.

Oli-neu Zellen wurden nach einer zweistündigen Vorbehandlung mit CytoD (1µM) oder Blebbistatin (50µM) entweder mit 5ng/ml TGF-β1 für 20 Stunden oder mit 1µM STS für 6 Stunden behandelt. Nach der Induktion der Apoptose wurden die Zellen in Ethanol fixiert und der Zellkern mit Propidiumjodid angefärbt. Mittels Durchflusszytometrie konnte die Leuchtintensität der gefärbten Zellkerne gemessen und die entsprechende Zellzyklusphase analysiert werden. Dabei entspricht der sub-G1 Peak (DNA<2n) einem fragmentierten und somit apoptotischen Zellkern. Die Funktionalität der Inhibitoren konnte mit dem Messen des G2-Peaks (DNA=4n) überprüft werden, da die Zellen aufgrund der Inhibition der Zytoskelettfunktionen nicht mehr in der Lage sind sich zu teilen und am Ende der Replikationsphase (DNA=4n) stecken bleiben.

In Abbildung 15*A* sind die PI-FACS-Analysen der TGF-β1-behandelten Proben (Dreifachbestimmung) dargestellt. Die Wirksamkeit der Inhibitoren ist durch die Arretierung im G2-Zyklus überprüft worden. Die Inhibitoren wirkten alleine nach 20 stündiger Behandlung leicht apoptotisch auf die Zellen. Vergleichend zur Grundapoptose der Kontrollzellen von 8%, stieg die Apoptoserate auf knapp 18% bei Blebbistatin und 15% bei CytoD an. Im Vergleich zur TGF-β1-induzierten Apoptoserate von 43% konnte man diese leichte Steigung der Inhibitor-induzierten Apoptose jedoch vernachlässigen. Eine Ko-Behandlung mit CytoD und TGF-β1 reduzierte die Anzahl apoptotischer Zellen signifikant auf 28%, während Blebbistatin keinen signifikanten Einfluss auf die TGF-β1-induzierte Apoptose hatte.

Im Vergleich dazu kann keiner der beiden Inhibitoren die ca. 60%ige STS-induzierte Apoptoserate in den Oli-neu Zellen (Dreifachbestimmung) verhindern (Abbildung 15*B*).

Somit scheint ein funktionstüchtiges Aktinskelett wichtig für den TGF-β-induzierten Zelltod zu sein, während eine Assoziation zwischen der Myosinfunktion und TGF-β nicht gezeigt wurde.

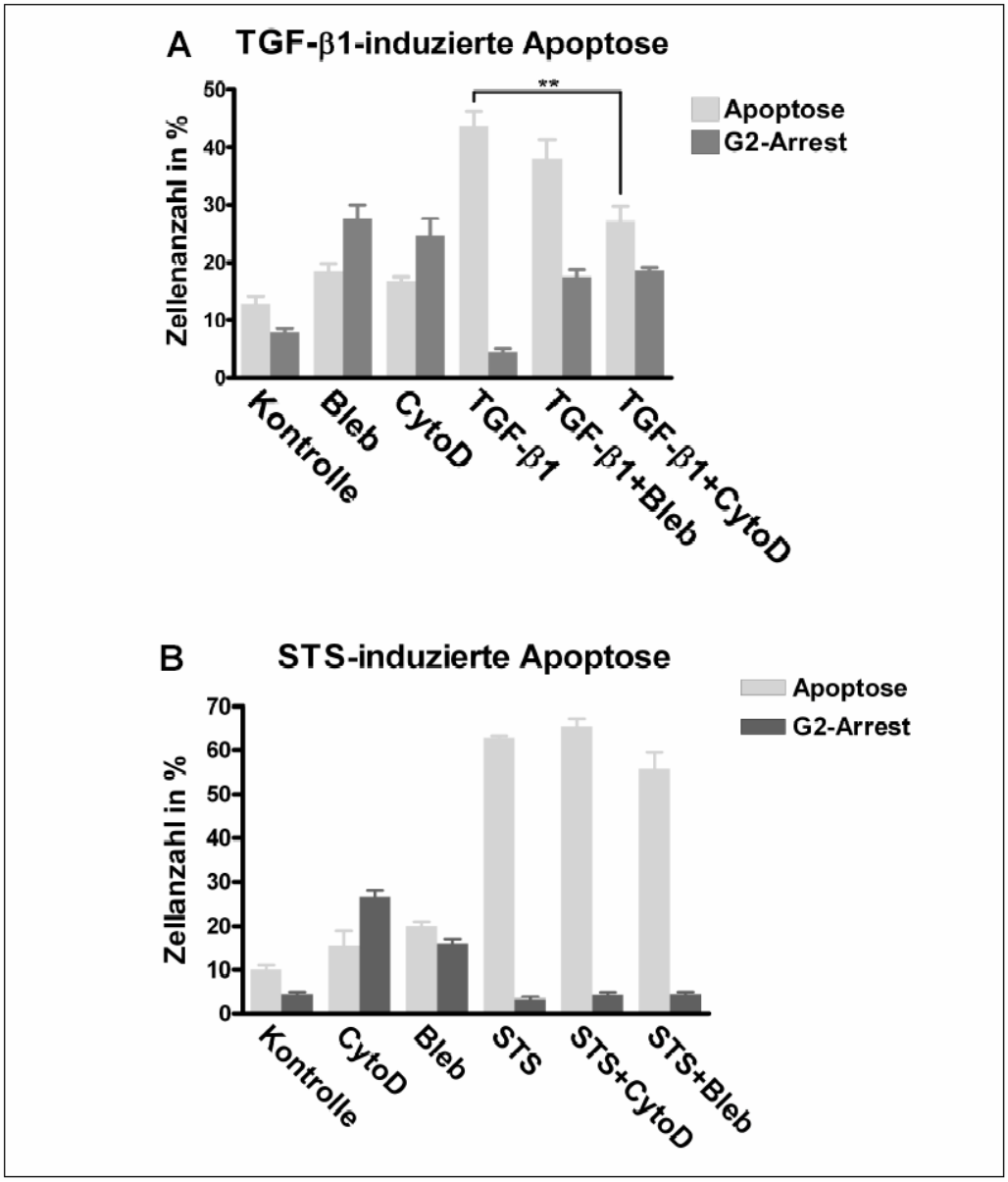


Abbildung 15: Messungen apoptotischer Zellzahlen von TGF-β1-behandelten und STS-behandelten Oli-neu Zellen in Abhängigkeit von funktionstüchtigem Zytoskelett.

Für die Bestimmung der Zellzahlen in bestimmten Zellzyklusabschnitten wurden die Proben geerntet, fixiert und die Zellkerne mit Propidiumjodid (PI) angefärbt. Mit einem Durchflusszytometer konnten die gefärbten Kerne gezählt werden, wobei die Intensität der Kernfärbung das Zellzyklusstadium angab. DNA-Leuchtintensitäten von weniger als 2n geben apoptotische, fragmentierte Kerne an und 4n steht für die G2-Phase des Zellzykluses. Der G2-Arrest (DNA=4n) steht für die Wirksamkeit der Inhibitoren. Oli-neu Zellen wurden mit den Inhibitoren CytochalasinD (CytoD) (1µM) und Blebbistatin (Bleb) (50µM) für 2 Stunden vorbehandelt.

(A) Nach der Vorbehandlung mit den Inhibitoren erfolgte eine Zugabe von 5ng/ml TGF-β1 für 20 Stunden. Durchflusszytometrische Analysen ergaben einen Anstieg apoptotischer Zellen auf 43% nach TGF-β1 Behandlung. Dieser Anstieg konnte nur durch die CytoD Applikation gesenkt werden. Blebbistatin hatte keinen Einfluss auf die TGF-β1-induzierte Apoptose.

(B) Nach der Vorbehandlung mit den Inhibitoren erfolgte eine Zugabe von 1µM STS für 6 Stunden. Folgende PI-FACS-Analysen ergaben weder für CytoD noch für Blebbistatin einen Einfluss auf die STS-induzierte Apoptoserate von ca. 60%.

Die angegebenen Standardabweichungen stehen für ±SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Mit $^{**}P<0.01$ ist die statistische Signifikanz angegeben (Student´s *t*-test).

1.2.3. Das Bcl-xl Protein assoziiert mit dem abgespaltenen Aktinfragment Fraktin

Da die Ergebnisse im GST-Pulldown und in den FACS-Analysen eine Beteiligung des Aktinzytoskeletts in der TGF-β1-induzierten Apoptose anzeigten und verschiedene Arbeiten eine Assoziierung des Zytoskeletts mit der Bcl-2 Familie suggerieren[48,49], lag es nahe anzunehmen, dass anstelle der BH3-only Proteine Aktin eine Bcl-xl Regulation vermitteln kann.

Um die Vermutungen zu verifizieren, wurden Immunpräzipitationen für zytosolisches Aktin, nicht-muskuläres Myosin und dem Bcl-xl Protein durchgeführt. Für die Immunpräzipitation wurden Zellen mit 5ng/ml TGF-β1 für 8 Stunden behandelt oder unbehandelt eingesetzt. Äquivalente Mengen an Gesamt-Proteinextrakt wurden jeweils mit den Antikörpern gegen Aktin, Myosin oder Bcl-xl über Nacht inkubiert, um die jeweiligen Proteine mitsamt ihren Bindungspartner präzipitieren zu können. Die genauen Angaben über die Arbeitskonzentrationen der Antikörper sind in der Tabelle 3 (*Material und Methoden*) beschrieben. Der Aktin-Antikörper bindet dabei neben dem gesamten Aktinfragment auch das geschnittene N-terminale 32kDa Fraktin. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde eine IgG-Antikörperkontrolle mitgeführt. Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden über Western Blots und den Einsatz der Aktin-, Myosin- und Bcl-xl-Antikörper analysiert. Dabei wurde eine Bindung von Bcl-xl an Fraktin identifiziert (Abbildung 16). Der Anstieg dieser Bindung erschien nur in TGF-β1-behandelten Proben, sowohl in den Bcl-xl-präzipitierten und mit Aktin detektierten als auch in den Aktin-präzipitierten und mit Bcl-xl detektierten Proben. In den Banden der Aktin-Präzipitationskontrolle konnte ebenfalls ein Anstieg der Fraktinbande in TGF-β1-behandelten Zellen ermittelt werden. Dieser Anstieg korrespondiert mit der zunehmenden Fragmentierung von Aktin zu Fraktin während apoptotischer Prozesse[67,68]. Die IgG-Antikörperkontrolle zeigte keine unspezifische Bindung von Fraktin an die Antikörperketten. Da die Bindung von Bcl-xl an Fraktin nicht im GST-Pulldown mit unmodifiziertem, rekombinanten Bcl-xl Fusionsproteins angezeigt wurde, könnte die Assoziation in der Immunpräzipitation auf eine für die Bindung notwendige Modifikation von Bcl-xl hinweisen,.

Für das gesamte 42kDa Aktinfragment wurde in der Immunpräzipitation eine unspezifische Bindung durch die IgG-Antikörperkontrolle detektiert. Auch konnte kein Anstieg der Bandenintensität in TGF-β1-behandelten Proben im Vergleich zu unbehandelten Proben

ermittelt werden. Im Gegensatz dazu wurde im GST-Pulldown eine Unspezifität der Aktin Bindung an Bcl-xl durch die GST-Kontrolle ausgeschlossen (Abbildung 14).

Myosin erschien nicht mehr als Bindungspartner von Bcl-xl (Daten nicht gezeigt) und konnte somit als falsch-positiver Kandidat im GST-Pulldown angesehen werden. Dieses Ergebnis stimmte mit den Ergebnissen der PI-FACS-Analysen überein.

Diese neuen Erkenntnisse suggerieren neben dem 15kDa tAktin[69,70] nun auch für das N-terminale 32kDa Fraktinfragment eine regulatorische Rolle in apoptotischen Prozessen, insbesondere im Hinblick auf die Bcl-xl Regulation in der TGF-β1-induzierten Apoptose.

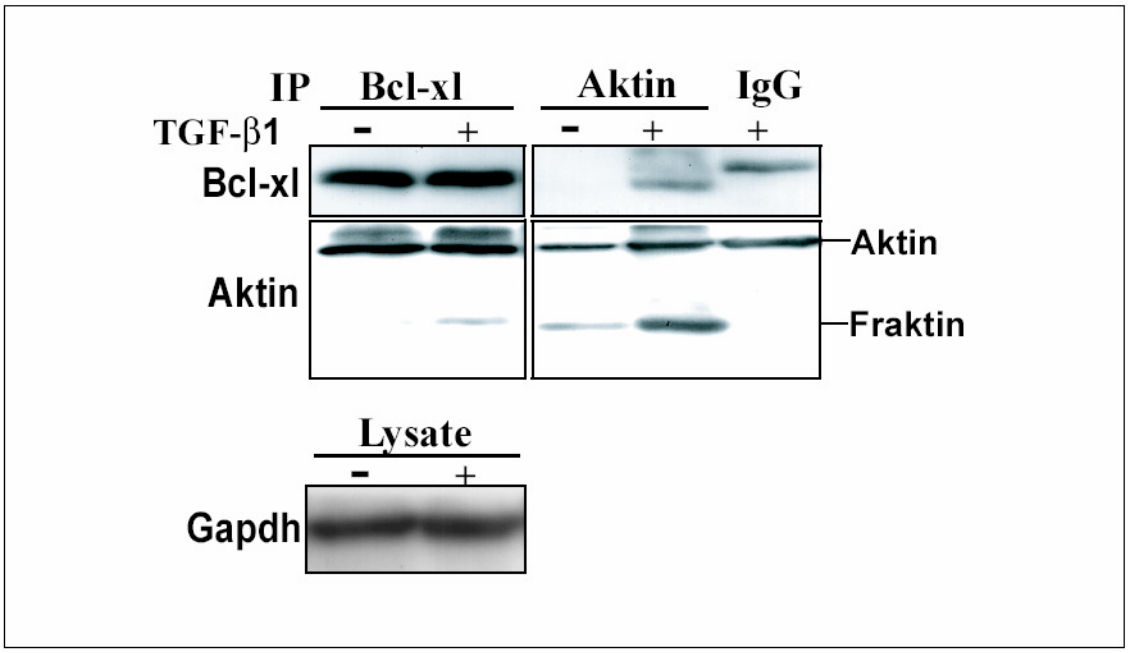


Abbildung 16: Immunpräzipitationen (IPs) identifizieren das 32kDa Fraktinfragment als Bcl-xl Protein Interaktionspartner.

Äquivalente Proteinmengen (500µg) von TGF-β1-behandelten (5ng/ml) und unbehandelten Proben wurden für die IPs eingesetzt. Die Bindung der Proteinkomplexe in der IP und die Analyse der Bindungsreaktion im Western Blot erfolgten mit dem Bcl-xl-Antikörper und dem Aktin-Antikörper. Der Aktin-Antikörper bindet neben dem Gesamt-Aktinprotein auch das N-terminale 32kDa Fraktinfragment. Die Gapdh-Ladekontrolle diente zur Überprüfung der eingesetzten äquivalenten Proteinmengen in der IP Reaktion. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen an die schweren und leichten Ketten der Antikörper wurde ein Mix aus Maus-IgG und Kaninchen-IgG Antikörper verwendet. Die Präzipitationen der einzelnen Proteine durch ihren eigenen Antikörper wurden mit der Detektion von Bcl-xl-präzipitierten Proben mit dem Bcl-xl-Antikörper und von Aktin-präzipitierten Proben mit dem Aktin-Antikörper überprüft.

Nach der Behandlung mit TGF-β1 wurde eine deutliche Zunahme der Bcl-xl-Fraktin Interaktion identifiziert. Im Vergleich zur IgG-Kontrolle waren die Bindungen für Bcl-xl und Fraktin spezifisch. Aktin wurde als unspezifischer Bindungspartner an die IgG-Kontrolle ermittelt.

1.2.4. Die Aktinfragmentierung in Fraktin erscheint vor dem Verlust des Bcl-xl Proteins

Um die Fragmentierung in das 32kDa Fraktin zu bekräftigen, wurden Western Blot Experimente mit einem Antikörper, der spezifisch für Fraktin ist[73], durchgeführt. Die Behandlung der Zellen mit 5ng/ml TGF-β1 zu verschiedenen Zeitpunkten sollte zusätzlich die Kinetik der Aktinfragmentierung ermitteln.

Nach 8 stündiger TGF-β1 Behandlung wurde eine deutliche Zunahme der Fragmentierung mit dem Fraktin-Antikörper sichtbar (Abbildung 17). Nach 14 Stunden war keine Fragmentierung mehr detektierbar.

Im Gegensatz dazu waren die Bcl-xl Proteinmengen im Western Blot nach 8 stündiger TGF-β1 Behandlung noch auf dem Level der unbehandelten Proben. Erst ab etwa 14 Stunden nahm auch hier die basale Bcl-xl Proteinmenge signifikant nach der Aktinfragmentierung ab.

Somit wurde das Zeitfenster für die Interactomstudien und den Immunpräzipitationen, sowie Fraktin als Spaltprodukt noch einmal bestätigt. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Verlust des basalen Bcl-xl Proteins nach der Aktinfragmentierung auftritt.

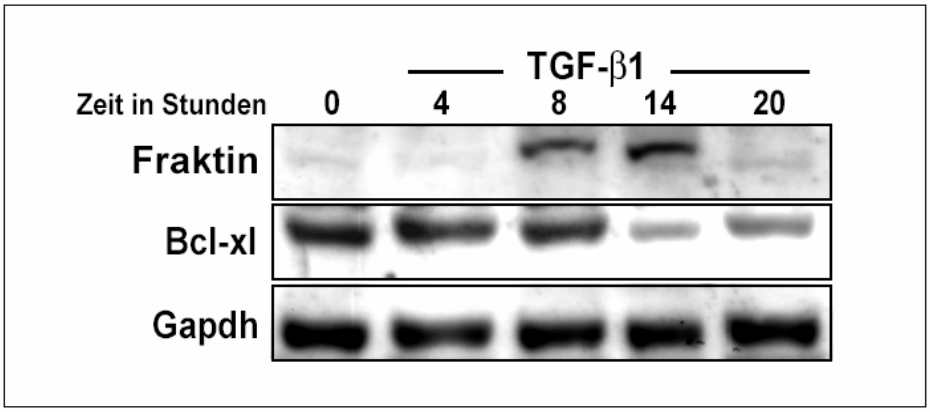


Abbildung 17: Überprüfung der Kinetik der Bcl-xl Degradation und der Aktinfragmentierung Für Western Blot Experimente wurden Oli-neu Zellen mit 5ng/ml TGF-β1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten behandelt und die Fragmentierung in Fraktin mit dem Fraktin-spezifischen Antikörper und die basale Expression von Bcl-xl mit dem Bcl-xl Antikörper überprüft. Gapdh diente als Ladekontrolle. Es wurde gezeigt, dass die Fragmentierung in Fraktin nach 8 Stunden einsetzte und vor dem Verlust des basalen Bcl-xl Proteins ab 14 Stunden auftrat.

1.2.5. Die Aktinfragmentierung ist abhängig von Caspasen und funktionstüchtigem Aktin

Die Fragmentierung von Aktin in 32kDa Fraktin und 15kDa tAktin erfolgt an einer konservierten Schnittstelle durch Caspasen[67,68,93]. Um in den Oli-neu Zellen diese Erkenntnis zu bestätigen, wurde ein pan-Caspase Inhibitor verwendet. Zusätzlich sollte ermittelt werden, ob CytoD als Inhibitor der Aktinfunktionen auch der Aktinfragmentierung entgegen wirken kann.

Zur Inhibition aller Caspasen und zum Blockieren der Aktinfunktion wurden Zellen mit 5ng/ml TGF-β1 und mit 50µM pan-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK (panCas) oder 1µM CytoD für 14 Stunden ko-inkubiert. Nach der Proteinisolierung wurden die Proben mit dem Fraktin-spezifischen Antikörper per Western Blot auf eine Aktinfragmentierung untersucht. Sowohl der pan-Caspase Inhibitor als auch CytoD konnten vergleichend zu der mit TGF-β1 allein behandelten Probe die Fragmentierung verhindern (Abbildung 18).

Somit wurde die Caspasen-abhängige Aktinfragmentierung bestätigt und die Bedeutung von funktionstüchtigem Aktin im Fragmentierungsprozess gezeigt.

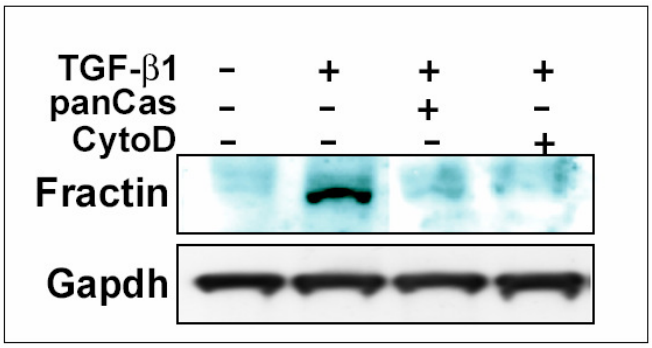


Abbildung 18: Die TGF-β1-induzierte Aktinfragmentierung ist abhängig von Caspasen und dem Aktinremodelling.
Für Western Blot Experimente wurden Oli-neu Zellen mit 50µM pan-Caspase Inhibitor (panCas) oder 1µM CytoD für 2 Stunden vorbehandelt. Die TGF-β1 (5ng/ml) Zugabe erfolgte für 14 Stunden. Äquivalente Mengen (30µg) des Gesamt-Proteinextraktes wurden für eine SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Aktinfragmentierung wurde mit dem Fraktin-spezifischen Antikörper überprüft. Sowohl der pan-Caspase Inhibitor als auch CytoD reduzierten die TGF-β1-induzierte Aktinfragmentierung.

1.2.6. Die Caspase-2 und -8 sind an der Aktinfragmentierung und an dem Verlust des basalen Bcl-xl Proteins beteiligt

Um zu untersuchen, welche Caspasen in dem Fragmentierungsprozess involviert sind, wurde zunächst bestimmt, welche Caspasen in der TGF-β1-induzierten Apoptose aktiv sind.

Die Aktivität verschiedener Caspasen wurde mittels Substratumsetzung entsprechender Caspase-spezifischer, fluorogener Substrate gemessen (*Materialen und Methoden*, Abschnitt 2.5.4.) und zusätzlich mit Western Blot Experimenten untersucht. Für die Messungen der Caspasen-abhängigen Substratumsetzungen wurden behandelte Oli-neu Zellen (5ng/ml TGF-β1 für 8 Stunden und 14 Stunden) lysiert und die Konzentration des isolierten Gesamt-Proteinextraktes bestimmt. Äquivalente Proteinmengen wurden für eine Doppelmessung der Caspase-abhängigen Substratumsetzung der Caspase-2, Caspase-3 und Caspase-8 eingesetzt. Dabei diente die Messung der Caspase-3 und Caspase-8 Aktivität als Kontrolle der TGF-β1 Behandlung[87]. Alle untersuchten Caspasen waren in den Substratmessungen in unserem Zellmodell nach 8 stündiger und 14 stündiger TGF-β1 Behandlung signifikant aktiv (Abbildung 19*A*).

Zusätzlich wurden Western Blot Experimente zur Bestimmung der Caspaseaktivität durchgeführt. Dazu wurden Antikörper eingesetzt, die sowohl die Procaspase als auch die geschnittene, aktivierte Caspase (Caspase-8 und Caspase-2 Antikörper) oder nur die aktivierte Caspase (Caspase-3 Antikörper) erkennen. Die Behandlung der Zellen erfolgte ebenfalls für 8 bzw. 14 Stunden mit 5ng/ml TGF-β1. Aus Abbildung 19*B* geht hervor, dass die Caspasen-2 und-8 zu den Zeitpunkten 8 Stunden und 14 Stunden aktiv sind, entsprechend den Experimenten der Substratumsetzungen. Eine Aktivierung der Caspase-3 konnte in Western Blot Experimenten nur nach 14 Stunden detektiert werden. Die Aktivierung der Caspase-3 in den Substratumsetzungen nach 8 Stunden wurde hier nicht bestätigt.

Weitergehend wurden Zellen mit dem Caspase-2 Inhibitor (Cas2i), dem Caspase-3 Inhibitor (Cas3i) und dem Caspase-8 Inhibitor (Cas8i) für die Bestimmung der Aktinfragmentierung für 2 Stunden vorbehandelt. Nach einer 14 stündigen TGF-β1 Behandlung (5ng/ml) wurde der Gesamt-Proteinextrakt isoliert und äquivalente Proteinmengen in einem Western Blot eingesetzt. Mit dem spezifischen Fraktin Antikörper wurde die Aktinfragmentierung und mit dem Bcl-xl Antikörper die basale Bcl-xl Proteinmenge bestimmt. Gapdh diente als Ladekontrolle. Die Fragmentierung lief über die Caspase-8 und Caspase-2 (Abbildung 19*C*), da beide Inhibitoren eine zunehmende Fragmentierung vergleichend zur Kontrolle verhinderten. Vergleichend zu TGF-β1 allein behandelten Zellen und den Kontrollzellen stoppte der Caspase-3 Inhibitor die Fragmentierung nicht. CytoD-behandelte Zellen wurde ebenfalls noch einmal mitgeführt und zeigten erneut, dass die Aktinfragmentierung von einem funktionstüchtigen Aktinskelett abhängig ist. In der Abbildung 19*D* ist die densitometrische Auswertung der Caspase-abhängigen Aktinfragmentierung dargestellt.

Im Gegensatz zur Caspase-3 Inhibition und den TGF-β1 allein behandelten Proben konnten die Inhibitoren der Caspase-2 und Caspase-8 den Verlust des basalen Bcl-xl Proteins reduzieren und deuten auf eine Caspase-abhängige Bcl-xl Proteinabnahme hin (Abbildung 19*C*).

Sowohl die Aktinfragmentierung als auch die Bcl-xl Proteinabnahme verlaufen in den Oli-neu Zellen über Caspasen, wobei speziell die Caspase-2 und Caspase-8 diese Prozesse begünstigen. Die Caspaseaktivierung ist somit eine Grundvorraussetzung für die Aktinfragmentierung und die Bcl-xl Regulation.

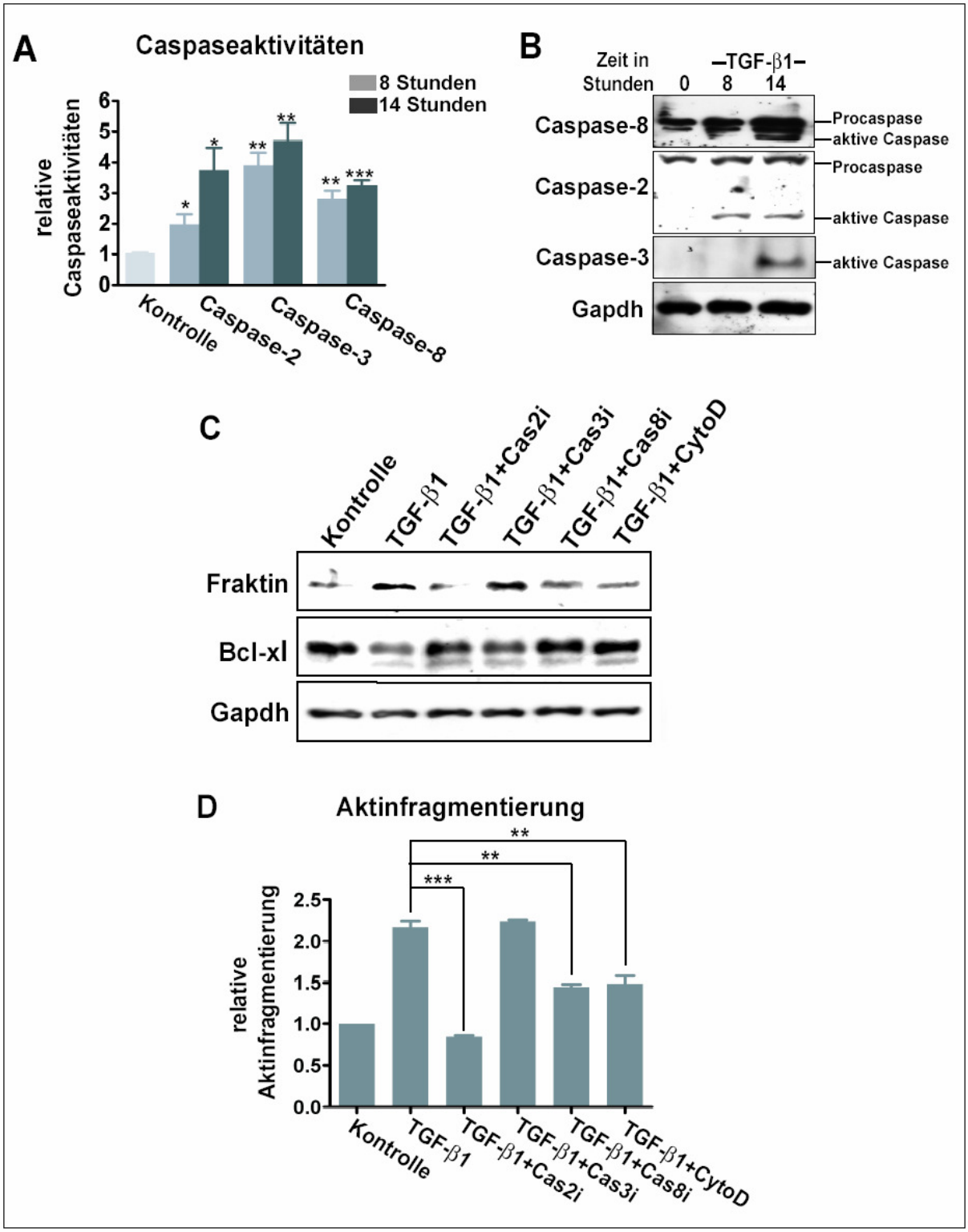


Abbildung 19: Die TGF-β1-induzierte Aktinfragmentierung und Bcl-xl Proteinabnahme sind abhängig von der Caspase-2 und der Caspase-8.

(A) Die Messungen der Caspaseaktivitäten mittels Caspase-spezifischer, fluorogener Substratumsetzung erfolgten mit für 8 Stunden und für 14 Stunden TGF-β1-behandelten und unbehandelten Proben. Lysierte, äquivalenten Proteinmengen wurden, wie unter *Materialen und Methoden*, Abschnitt 2.5.4. beschrieben, analysiert. Neben der Caspase-3 waren die Caspase-2 und Caspase-8 sowohl nach 8 Stunden als auch nach 14 Stunden aktiv.

(B) Western Blot Experimente zur Bestimmung der Caspaseaktivität wurden mit Antikörpern durchgeführt, die die geschnittenen und somit aktivierten Caspasen erkennen. Dazu wurden Oli-neu Zellen mit 5ng/ml TGF-β1 für 8 und 14 Stunden behandelt und äquivalente Proteinmengen in einem Western Blot eingesetzt. Die Antikörper der Caspasen-2 und -8 detektierten schon nach 8 stündiger Behandlung die aktivierten Caspasen, wohingegen die Caspase-3 erst nach 14 Stunden Behandlung als geschnittene Untereinheit angezeigt wurde.

(C) Western Blot Experimente mit dem Caspase-2 Inhibitor (Cas2i), dem Caspase-3 Inhibitor (Cas3i), dem Caspase-8 Inhibitor (Cas8i) und CytoD wurden mit TGF-β1-behandelten (5ng/ml für 14 Stunden) und unbehandelten Proben durchgeführt. Dabei erfolgte die TGF-β1 Zugabe 2 Stunden nach der Behandlung mit den entsprechenden Inhibitoren. Gapdh diente als Ladekontrolle. Die Aktinfragmentierung wurde mit dem Fraktin-spezifischen Antikörper und die Bestimmung der basalen Bcl-xl Proteinemenge mit dem Bcl-xl Antikörper überprüft. Vergleichend zur Caspase-3-inhibierten Probe und allein mit TGF-β1-behandelten Proben konnten der Caspase-8 Inhibitor und der Caspase-2 Inhibitor die Aktinfragmentierung reduzieren und der Bcl-xl Proteinabnahme entgegenwirken.

(D) Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung zu dem unter *(C)* durchgeführten Western Blot.

Die angegebenen Standardabweichungen stehen für ±SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Mit $*P<0.05$, $**P<0.01$ und $***P<0.001$ sind die statistischen Signifikanzen angegeben, die über den Student´s *t*-test ermittelt wurden. Dabei wurden die behandelten Proben jeweils mit der Kontrollprobe verglichen.

1.2.7. Die Fraktin-Bcl-xl Bindung ist abhängig von Caspasen und einem funktionstüchtigen Aktinskelett

Da die Fragmentierung abhängig von Caspasen und der Aktinfunktion war, sollte deren Wirkung auf die Fraktin-Bcl-xl Bindung untersucht werden. Dazu wurden Immunpräzipitationen mit 5ng/ml TGF-β1-behandelten Zellen und ko-behandelten Zellen mit 50µM pan-Caspase Inhibitor (panCas) oder 1µM CytoD durchgeführt. Mit den Antikörpern gegen Aktin und Bcl-xl (Tabelle 3, *Material und Methoden*) wurden die Proteine über Nacht präzipitiert. Der Aktin-Antikörper bindet neben dem gesamten Aktinfragment auch das geschnittene N-terminale 32kDa Fraktin. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde eine IgG-Antikörperkontrolle mitgeführt. Nach der Aufreinigung der Proteinkomplexe wurden diese über einen Western Blot und dem Aktin- und Bcl-xl-Antikörper untersucht. Gapdh diente der Überprüfung äquivalent eingesetzter Proteinmengen in der Präzipitation. Die ansteigende, spezifische Bindung von Bcl-xl an Fraktin wurde erneut in den TGF-β1-behandelten Zellen vergleichend zu den Kontrollzellen festgestellt (Abbildung 20), sowohl in den Bcl-xl-präzipitierten und mit Aktin detektierten als auch in den Aktin-präzipitierten und mit Bcl-xl detektierten Proben. In den Aktin-präzipitierten Kontrollbanden wurde der Anstieg der Fraktinbande in TGF-β1-behandelten Zellen gezeigt, wobei auch hier der Anstieg mit der zunehmenden Fragmentierung von Aktin zu Fraktin während apoptotischer Prozesse einhergeht[69]. Sowohl der pan-Caspase Inhibitor als auch CytoD verhindern die Bindung von Bcl-xl an Fraktin vergleichend zu der Kontrolle und TGF-β1 allein behandelten Proben. Dies

korreliert erneut mit der abnehmenden Fragmentierung im Vergleich zu den Aktin-präzipitierten Kontrollbanden.

Die Ergebnisse bestätigten, dass eine intakte Aktinfunktion und die Aktivierung von Caspasen eine Grundvoraussetzung für die Aktinfragmentierung und anschließende Bindung von Fraktin an Bcl-xl sind.

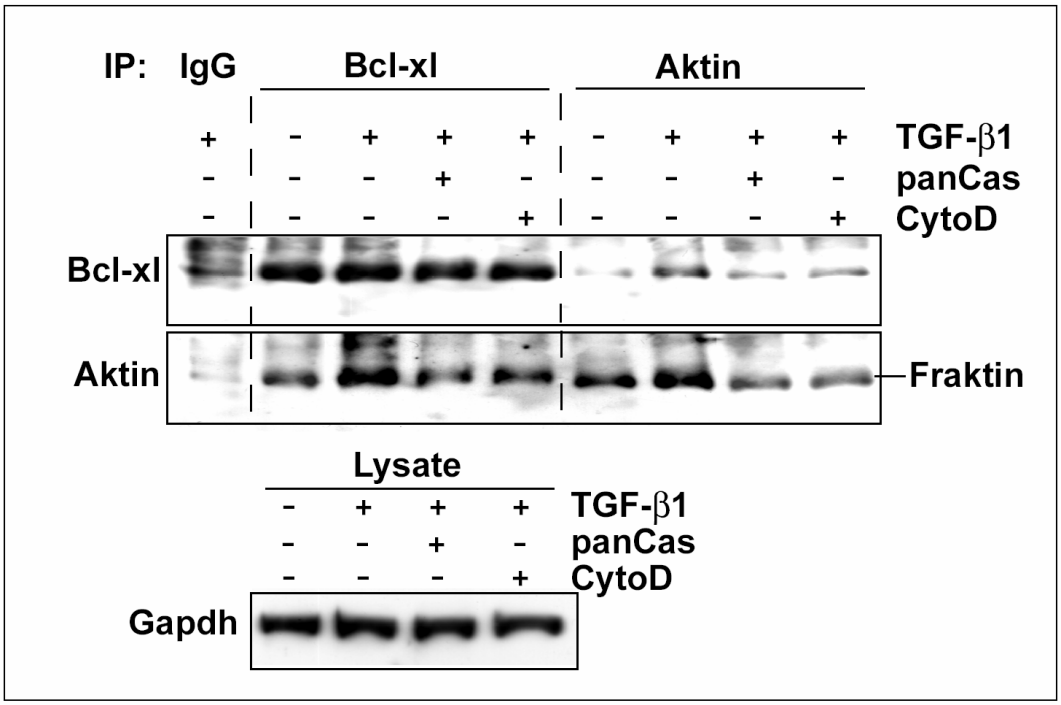


Abbildung 20: Die Interaktion von Fraktin und Bcl-xl ist abhängig von Caspasen und funktionstüchtigem Aktin.

Für Immunpräzipitationen (IP) wurden Oli-neu Zellen mit 50µM pan-Caspase Inhibitor (panCas) oder 1µM CytoD für 2 Stunden vorbehandelt. Die TGF-β1 (5ng/ml) Zugabe erfolgte für 8 Stunden. Äquivalente Mengen (500µg) des Gesamt-Proteinextraktes wurden für die Bindung an den Bcl-xl-Antikörper und dem Aktin-Antikörper eingesetzt und mittels Western Blot analysiert. Der Aktin-Antikörper bindet neben dem Gesamt-Aktinprotein auch das N-terminale 32kDa Fraktinfragment. Gapdh diente als Kontrolle äquivalent eingesetzter Proteinmengen in der IP. Die Präzipitationen der einzelnen Proteine durch ihren eigenen Antikörper wurden mit der Detektion von Bcl-xl-präzipitierten Proben mit dem Bcl-xl-Antikörper und von Aktin-präzipitierten Proben mit dem Aktin-Antikörper überprüft.

Die IgG-Kontrolle zeigte für das Bcl-xl Protein und für Fraktin eine spezifisch Bindung an die jeweiligen Antikörper an. Vergleichend zur Kontrollprobe und allein mit TGF-β1-behandelten Proben verringerte sowohl der pan-Caspase Inhibitor als auch CytoD die Bindung von Fraktin an Bcl-xl.

1.3. Der Mechanismus der Aktinfragmentierung und Fraktin-Bcl-xl Bindung ist spezifisch für neurale Zellen

Bei Untersuchungen an einer immortalisierten Zelllinie ist es wichtig, Ergebnisse an primären Kulturen zu bestätigen. Des Weiteren sollten neue Mechanismen mit unabhängigen Zellmodellen überprüft werden, um zu ermitteln, in welchen Zelltypen diese Regulationen zutreffen. In primären oligodendroglialen Kulturen wurde die TGF-β-induzierte Apoptose bereits bestätigt[87], jedoch ohne Analyse der Signalwege. Als unabhängiges Zellmodell wurden die B-lymphozytären RamosB Zellen ausgesucht, welche eine TGF-β1-induzierte Bcl-xl Herunterregulation und Caspase-3 Aktivierung aufzeigen[94]. Als zu untersuchende Schlüsselexperimente wurden (i) Western Blot Experimente zur Bestätigung der Aktinfragmentierung, (ii) Immunpräzipitationen zur Untersuchung der Fraktin-Bcl-xl Bindung und (iii) DNA Fragmentierungsexperimente zur Untersuchung des CytoD Effekts ausgesucht.

1.3.1. Untersuchungen an lymphozytären RamosB Zellen

Zur Überprüfung der Aktinfragmentierung wurden RamosB Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit 10ng/ml TGF-β1 behandelt. Nach der Lyse der Zellen wurden äquivalente Mengen an Proteinextrakt in Western Blot Experimenten eingesetzt. Mit dem spezifischen Fraktin Antikörper wurde ein sehr leichter Anstieg der Aktinfragmentierung in RamosB Zellen ermittelt (Abbildung 21*A*). Dabei erschien zum Zeitpunkt 14 Stunden eine Doppelbande. Die Herunterregulation von Bcl-xl wurde in diesen Zellen bestätigt und diente als Kontrolle der TGF-β Behandlung.

In den anschließenden Immunpräzipitationen zur Überprüfung einer möglichen TGF-β-induzierten Fraktin-Bcl-xl Bindung wurden erneut der Aktin-Antikörper und der Bcl-xl-Antikörper verwendet. Aus Abbildung 21*B* geht hervor, dass keine Bindung von Fraktin an Bcl-xl detektiert wurde. Ein Funktionsfehler in der Präzipitation wurde durch die jeweiligen Präzipitationskontrollen ausgeschlossen. Zudem wurden die Immunpräzipitationen für verschiedene Zeitpunkte und veränderten Bindungsbedingungen wiederholt, um eine mögliche Fraktin-Bcl-xl Binding wirklich auszuschließen.

Die folgenden PI-FACS-Analysen zur Überprüfung des CytoD Effekts in der TGF-β1-induzierten Apoptose in RamosB Zellen bestätigten die Ergebnisse der IPs. Für die PI-FACS-Analysen wurden RamosB Zellen für 2 Stunden mit 1µM CytoD vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine 20 stündige Behandlung mit 10ng/ml TGF-β1. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach der Fixierung der Zellproben und dem Anfärben der Zellkerne mit

Propidiumjodid wurden apoptotisch fragmentierte Kerne (DNA<2n) in einem Durchflusszytometer gezählt. In Abbildung 21*C* ist gezeigt, dass CytoD nicht die TGF-β1-induzierte Apoptose in RamosB Zellen verhindern kann.

Mit diesem Ergebnis wurde gezeigt, das die Involvierung der Aktinfragmentierung mit der anschließenden Fraktin-Bcl-xl Bindung in apoptotischen Mechanismen abhängig vom Zelltyp ist.

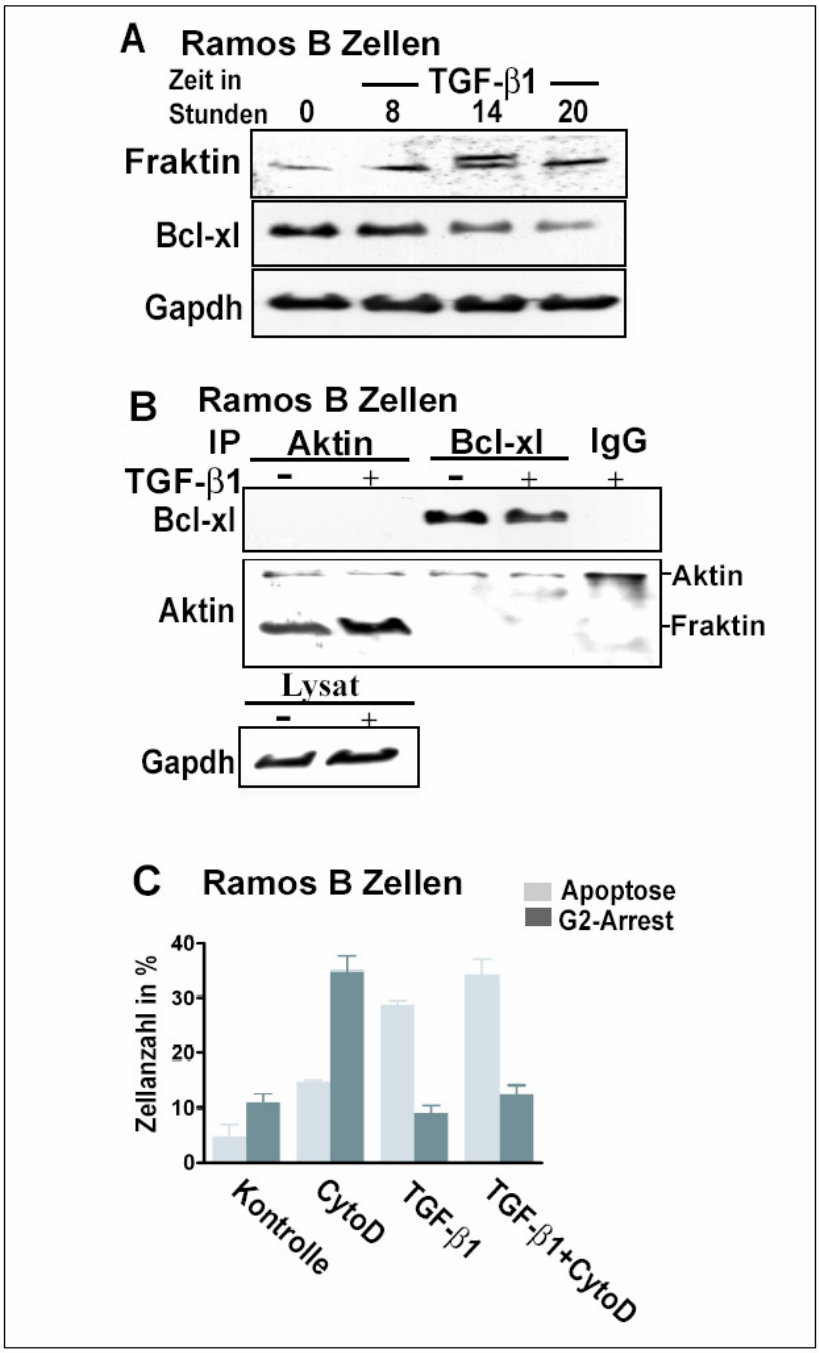


Abbildung 21: Untersuchung an RamosB Zellen.

(A) Western Blot Experimente zur Überprüfung der Aktin-fragmentierung in RamosB Zellen. RamosB Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit 10ng/ml TGF-β1 behandelt und äquivalente Mengen von lysierten Proteinextrakt für Western Blots eingesetzt. Der Fraktin-Antikörper detektierte einen leichten Anstieg der Aktin-fragmentierung nach TGF-β1 Behandlung. Die Bcl-xl Menge zeigte die funktionierende TGF-β Behandlung an.

(B) IPs TGF-β1-behandelter RamosB Zellen. RamosB Zellen wurden für 14 Stunden mit 10ng/ml TGF-β1 behandelt oder nicht behandelt. Für die folgenden IPs und späteren WBs wurden der Aktin-Antikörper und der Bcl-xl-Antikörper eingesetzt. Zur Kontrolle der Bindungsspezifitäten der Antikörper wurde eine IgG-Kontrolle mitgeführt. Gapdh zeigte die äquivalenten Proteinmengen an. In RamosB Zellen konnte keine Bindung von Fraktin an Bcl-xl nachgewiesen werden.

(C) Untersuchungen des CytoD Effekts mittels PI-FACS-Analysen. RamosB Zellen wurden für 2 Stunden mit 1µM CytoD vorbehandelt und mit 10ng/ml TGF-β1 für 20 Stunden weiterbehandelt. Nach dem Fixieren der

Proben erfolgte eine PI-Färbung der Zellkerne mit anschließendem Zählen apoptotischer Zellen in einem Durchflußzytometer. CytoD verhinderte die TGF-β1-induzierte Apoptose in RamosB Zellen nicht.

1.3.2. Untersuchungen an primären Oligodendrozytenkulturen

Die oben durchgeführten Experimente wurden an oligodendroglialen Primärkulturen wiederholt, um den Mechanismus der Aktinfragmentierung und Fraktin-Bcl-xl Bindung an einem anderen oligodendrozytären Zellmodell zu bestätigen. Daher wurden primäre Oligodendrozyten zu verschiedenen Zeitpunkten mit 10ng/ml TGF-β1 behandelt. Nach der Lyse der Zellen wurden äquivalente Mengen an Proteinextrakt in Western Blot Experimenten eingesetzt. Es wurde ein signifikanter Anstieg der Aktinfragmentierung in der Primärkultur mit dem spezifischen Fraktin Antikörpers ermittelt (Abbildung 22*A*). Die Fraktinbande wurde jedoch nur zum Zeitpunkt 8 Stunden detektiert, im Gegensatz zu den Oli-neu Zellen, wo eine Fragmentierung nach 8 und 14 Stunden gezeigt wurde (Abbildung 17).

Daher wurden die Immunpräzipitationen an der Primärkultur am Zeitpunkt 8 Stunden durchgeführt. Primäre Oligodendrozyten wurden mit 10ng/ml TGF-β1 behandelt und äquivalente Proteinmengen für die Bindungsreaktion (siehe Gapdh) eingesetzt. Im Gegensatz zu den RamosB Zellen und in Übereinstimmung mit den Oli-neu Zellen wurde in den anschließenden IPs eine deutliche TGF-β-induzierte Fraktin-Bcl-xl Bindung gezeigt (Abbildung 22*B*).

Zur Überprüfung des CytoD Effekts in der TGF-β1-induzierten Apoptose in den Primärkulturen wurde zur Ermittlung apoptotischer Zellkerne die TUNEL Technologie verwendet. Primäre Oligodendrozyten wurden auf 10mm Deckgläschen ausgesät und für 2 Stunden mit 1µM CytoD vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine 20 stündige Behandlung mit 10ng/ml TGF-β1. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach der Fixierung der Zellproben mit 4%igen PFA und dem enzymatischen Anfärben apoptotischer Zellkerne nach der TUNEL Technologie wurden fragmentierte Kerne unter einem Fluoreszenzmikroskop vergleichend zur DAPI-gefärbten Gesamt-Zellzahl gezählt. In Abbildung 22*C* ist die Zählung graphisch dargestellt und zeigt, dass CytoD die TGF-β1-induzierte Apoptose in primären Oligodendrozyten verhindern konnte. Somit wurden die mit den Oli-neu Zellen erzielten Ergebnisse in einer oligodendrozytären Primärkultur bestätigt.

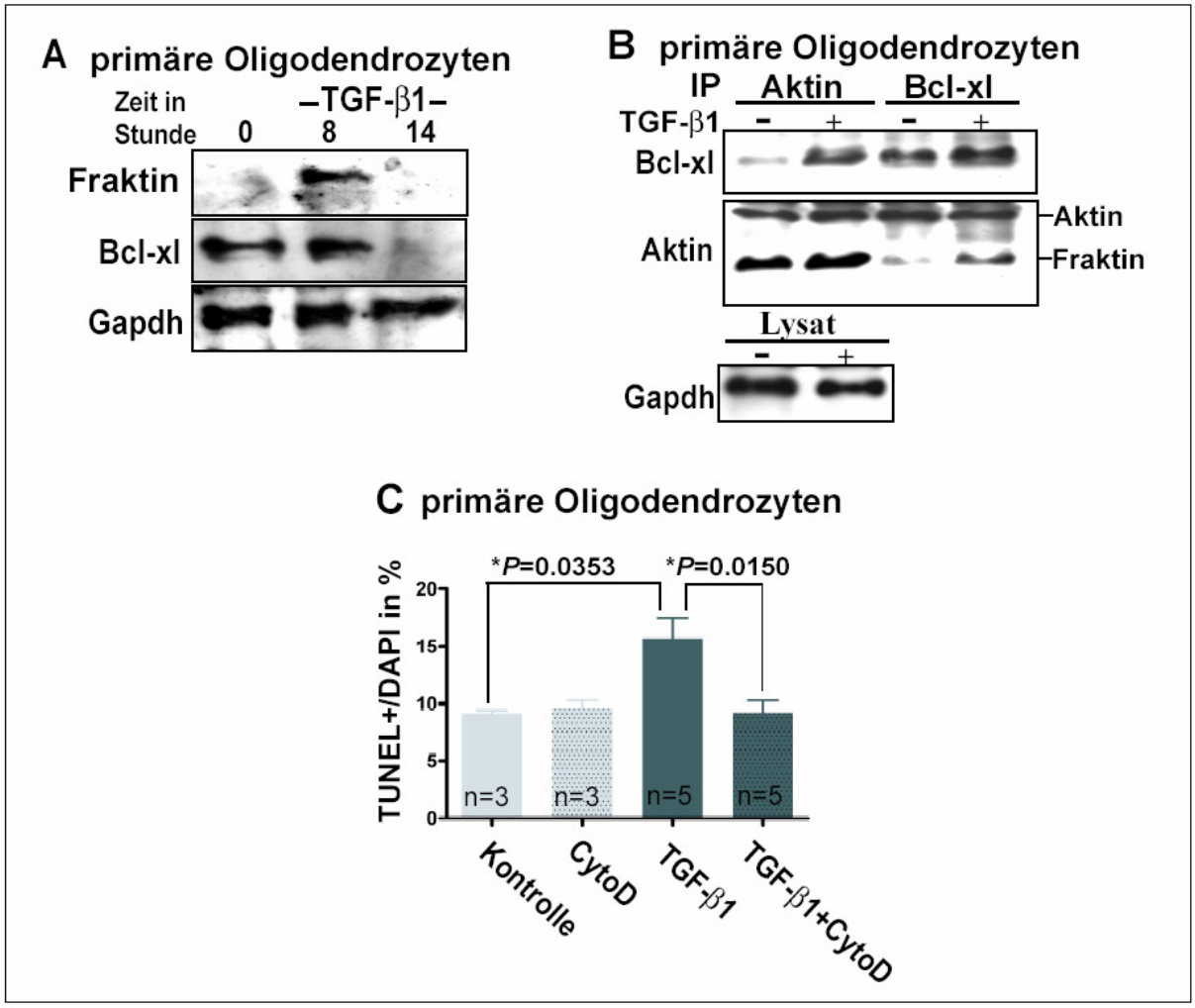


Abbildung 22: Untersuchungen an primären oligodendrozytären Kulturen.

(A) WB Experimente zur Überprüfung der Aktinfragmentierung in primären Oligodendrozyten. Zellen einer Primärkultur wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit 10ng/ml TGF-β1 behandelt und äquivalente Mengen von lysierten Proteinextrakt für Western Blots eingesetzt. Der Fraktin-Antikörper zeigte einen starken Anstieg der Aktinfragmentierung zum Zeitpunkt 8 Stunden nach einer TGF-β1 Behandlung.

(B) IPs TGF-β1-behandelter primärer Oligodendrozyten. Primäre Zellen wurden für 8 Stunden mit 10ng/ml TGF-β1 behandelt oder nicht behandelt. Für die folgenden IPs und späteren Immunblots wurden der Aktin-Antikörper und der Bcl-xl-Antikörper eingesetzt. Gapdh zeigte die äquivalenten Proteinmengen an. In primären Oligodendrozyten fand eine verstärkte Bindung von Fraktin an Bcl-xl nach einer TGF-β1 Behandlung statt.

(C) Untersuchungen des CytoD Effekts auf die Apoptoserate mit der TUNEL Technologie. Primäre Zellen wurden auf 10mm Deckglässchen ausgesät und für 2 Stunden mit 1µM CytoD vorbehandelt. Die Weiterbehandlung erfolgte mit 10ng/ml TGF-β1 für 20 Stunden. Mit einem Fluoreszenzmikroskop wurden apoptotische Kerne vergleichend zur Gesamt-Zellzahl (DAPI-Färbung) gezählt. CytoD verhinderte die TGF-β1-induzierte Apoptose in primären Oligodendrozyten signifikant.

1.4. Fraktin als Regulator der basalen Bcl-xl Proteinmengen

Nachdem die TGF-β1-induzierte Bindung von Fraktin an Bcl-xl Zelltyp-spezifisch bestätigt wurde, sollte überprüft werden, welche Funktion diese Bindung übernehmen könnte. In der Bcl-2 Familie binden pro-apoptotische Faktoren an anti-apoptotische Protein, um diese zu inaktivieren und festzuhalten. Somit können Proteine wie Bcl-xl nicht mehr ihrer anti-apoptotischen Funktion nachgehen. Letztendlich sorgen diese Interaktionen für ein Ungleichgewicht pro-apoptotischer und anti-apoptotischer Faktoren an Zellorganellen und initiieren so weitere apoptotische Vorgänge wie Porenbildungen in der Mitochondrienmembran[31,53].

1.4.1. Überexprimiertes Fraktin kolokalisiert mit Bcl-xl in Abhängigkeit von TGF-β

Da eine Interaktion zwischen Fraktin und Bcl-xl in Abhängigkeit von TGF-β1 in Immunpräzipitationen gezeigt wurde, sollte nun untersucht werden, ob diese Interaktion als Kolokalisierung in der Zelle nachweisbar ist. Neben Fraktin wurde zudem auch tAktin auf seine Lokalisierung hin überprüft, da tAktin eine mögliche apoptotische Funktion zugeordnet wurde[69]. Zur Überprüfung von Lokalisierungen wurden immunzytochemische Experimente durchgeführt. Dazu wurden Zellen mit dem Flag-getaggten Bcl-xl Plasmid zusammen mit dem HA-getaggten Fraktin Plasmid oder dem HA-getaggten tAktin Plasmid ko-transfiziert. Nach einer 24 stündigen Transfektionsphase wurden die transfizierten Zellen mit 5ng/ml TGF-β1 für 8 Stunden behandelt. Als Kontrolle dienten transfizierte, unbehandelte Zellen. Die immunzytochemische Färbung erfolgte mit einem Maus-monoklonalen HA-Antikörper und Kaninchen-polyklonalen Flag-Antikörper, und der anschließenden Detektion der Primärantikörper mit den entsprechenden FITC oder Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern. Die Proben wurden mit einem konfokalen Laserstrahlenmikroskop analysiert, wobei ein aussagekräftiger, gescannter Stapel für die Bilddokumentation ausgewählt wurde (Abbildung 23I-XII).

In unbehandelten Zellen erschien das transfizierte HA-Fraktin diffus im Zytosol und kolokalisierte nur partiell mit dem überexprimierten Flag-Bcl-xl Protein (Abbildung 23I-III). Eine Behandlung mit TGF-β1 führte zu einer vollständigen und granulär erscheinenden Kolokalisierung zwischen überexprimierten HA-Fraktin und Flag-Bcl-xl (Abbildung 23IV-VI).

Im Gegensatz dazu erschien das transfizierte HA-tAktin unabhängig von TGF-β1 granulär und kolokalisiert mit Flag-Bcl-xl (Abbildung 13VII-XII). Diese Verbreitung stimmt mit der

Lokalisierung sowohl von Bcl-xl als auch für tAktin am Mitochondrium überein[36,70] und spiegelt die auf die Zellorganelle bezogene Lokalisierung wieder.

Somit bekräftigen diese Ergebnisse die TGF-β1-abhängige Interaktion von Bcl-xl und Fraktin und bestätigen eine mögliche neue Funktion von Fraktin in Bezug auf eine Bcl-xl Regulation.

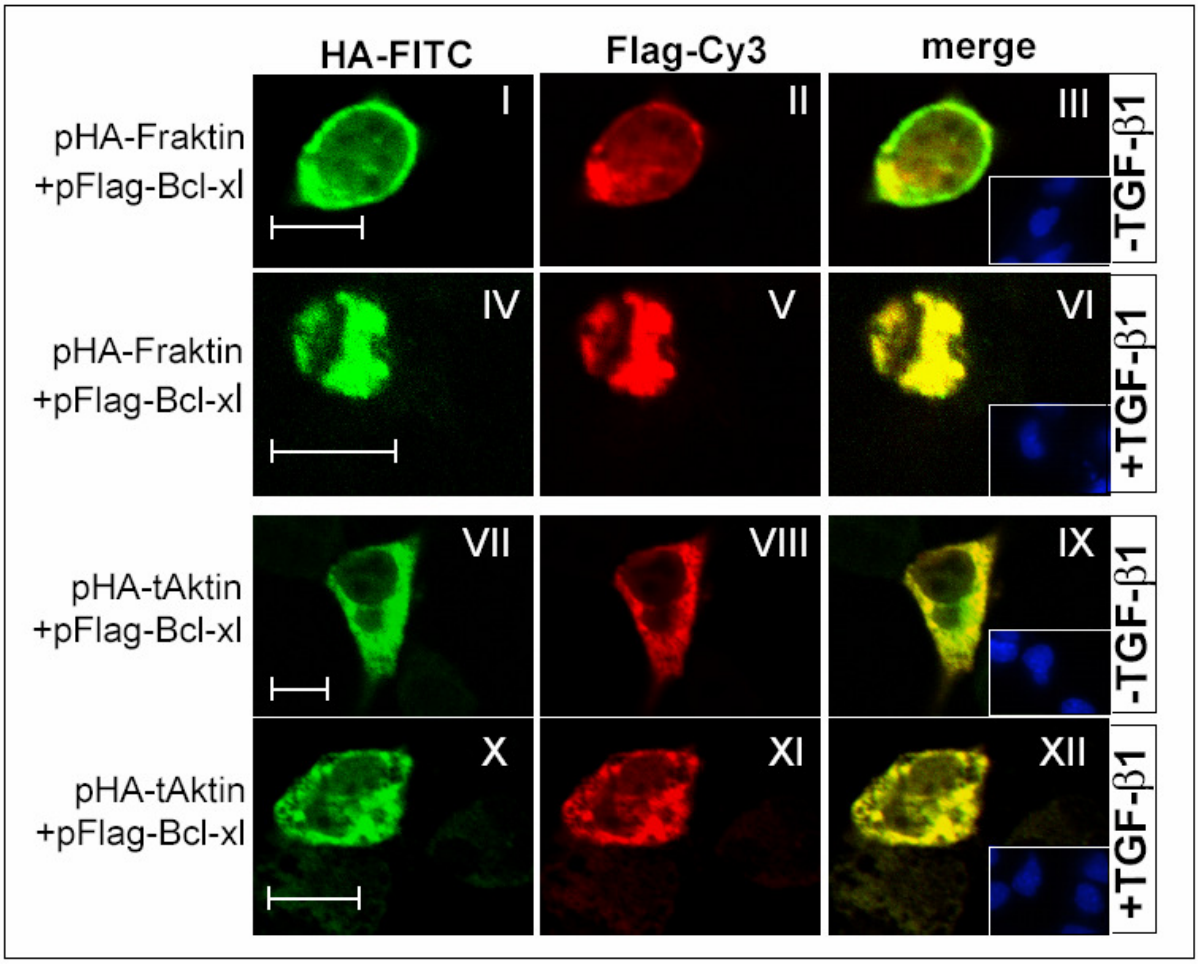


Abbildung 23: Überexprimiertes Fraktin kolokalisiert TGF-β1-abhängig mit dem Bcl-xl Protein.

Die zelluläre Lokalisierung von HA-getaggtem Fraktin oder HA-getaggtem tAktin wurden zusammen mit Flag-getaggtem Bcl-xl immunzytochemisch analysiert. Dazu wurde das pFlag-Bcl-xl Plasmid zusammen mit dem pHA-Fraktin oder pHA-tAktin Plasmid in die Oli-neu Zellen gebracht und die Zellen mit 5ng/ml TGF-β1 für 8 Stunden behandelt. Als Kontrolle dienten transfizierte, unbehandelte Zellen. Die Proben wurden mit einem konfokalen Laserstrahlenmikroskop analysiert, wobei ein aussagekräftiger, gescannter Stapel für die Bilddokumentation ausgewählt wurde (I-XII). In nicht-behandelten Proben erschien das überexprimierte HA-Fraktin diffus im Zytosol (I-III). In Abhängigkeit von TGF-β1 kolokalisierte HA-Fraktin komplett mit dem überexprimierten Bcl-xl Protein (IV-VI). Im Gegensatz dazu wurde transfiziertes HA-tAktin unabhängig von einer TGF-β1 Behandlung granulär im Zytosol detektiert (VII-XII). Die Maßeinteilung gibt 8µm an.

1.4.2. Überexprimiertes Fraktin kann allein keine Apoptose induzieren

Um die Rolle von Fraktin weiter zu untersuchen, wurde geschaut, ob überexprimiertes Fraktin und auch tAktin allein in der Lage sind, Apoptose auszulösen. Zellen mit dem HA-getaggten Fraktin oder dem HA-getaggten tAktin wurden nach einer 24 stündigen Transfektions- und

Überexpressionsphase fixiert. Die immunzytochemische Färbung erfolgte mit dem Maus-monoklonalen HA-Antikörper und der anschließenden Detektion des Primärantikörpers mit dem entsprechenden FITC-gelabelten Sekundärantikörper. Für die Detektion apoptotisch fragmentierter Zellkerne wurde einerseits eine DAPI Färbung (Abbildung 24a-f) und zum anderen eine TUNEL Färbung (Daten nicht gezeigt) durchgeführt. Weder überexprimiertes und zytosolisch lokalisiertes Fraktin (Abbildung 24a-c) noch überexprimiertes und granulär erscheinendes tAktin (Abbildung 24d-f) führten zum Zelltod in der oligodendroglialen Zellinie Oli-neu. Die DAPI-gefärbten Zellkerne zeigten in den transfizierten Zellen eine normale, nicht-apoptotische Morphologie (Abbildung 24) und auch die TUNEL Färbung war in transfizierten Zellen negativ (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Aktinfragmente alleine nicht in der Lage sind Apoptose auszulösen. Die Caspase-abhängige Aktinfragmentierung und ein intaktes Aktinzytoskelett sind jedoch zwingend notwendig für die TGF-β1-induzierte Apoptose.

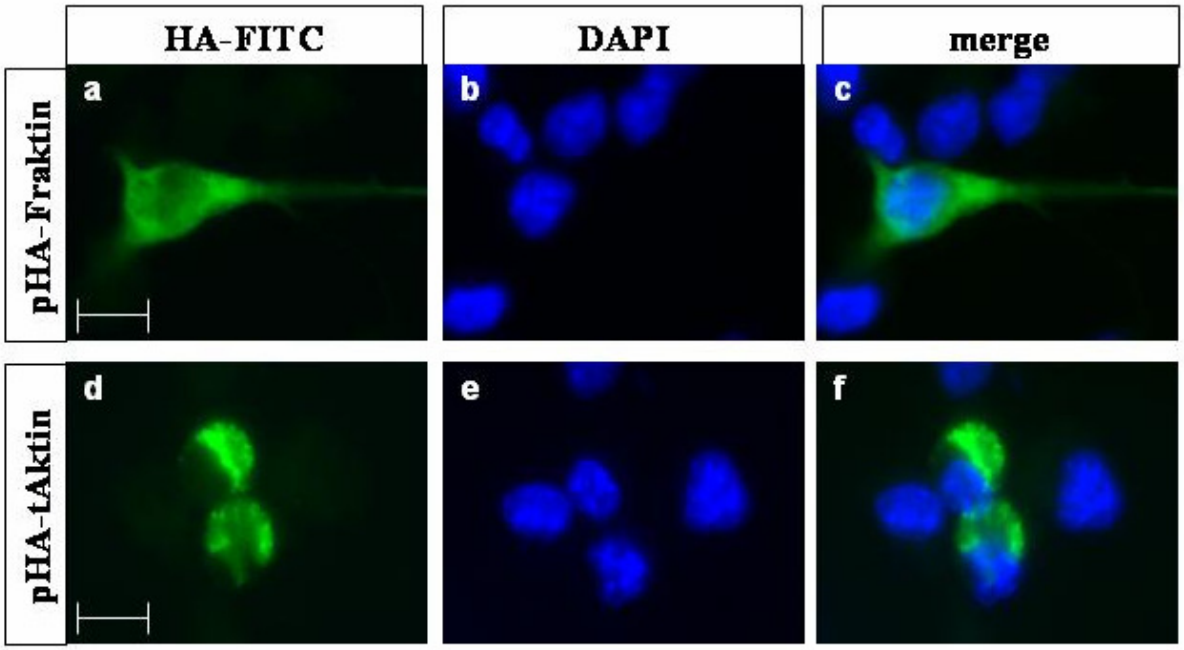


Abbildung 24: Immunzytochemische Experimente mit überexprimierten HA-Fraktin und HA-tAktin. Oli-neu Zellen wurden mit den Plasmiden für HA-Fraktin oder HA-tAktin transfiziert, immunzytochemisch behandelt und mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Transfektionsdauer betrug 24 Stunden. Die Morphologie der Zellkerne wurde mittels DAPI Färbung überprüft. Weder überexprimiertes Fraktin noch tAktin konnten in den Oli-neu Zellen einen apoptotisch fragmentierten Zellkern und somit Apoptose auslösen. Die Maßeinteilung gibt 8µm an.

1.4.3. Eine Überexpression von Fraktin führt zum Verlust des Bcl-xl Proteins

Da überexprimiertes Fraktin allein nicht in der Lage war Apoptose zu induzieren, sollte geprüft werden, ob eine Überexpression von Fraktin auf die basale Bcl-xl Proteinmenge wirkt. Dazu wurde ein GFP-getaggtes Fraktin Konstrukt kloniert und transfizierte Zellen mittels FACS sortiert. Die Anreicherung an transfizierte Zellen war nötig, da die normalen Transfektionseffizienzen in Oli-neu Zellen zu gering für eine derartige Untersuchung waren. Die GFP-positiv gesammelten Zellen wurden lysiert und in Western Blots eingesetzt. Mit dem GFP-Antikörper wurde die Überexpression des Fusionsproteins überprüft und zeigte eine Bande von ca. 58kDa auf. Das GFP Protein allein ist dagegen ca. 25kDa groß (Abbildung 25). In dem Western Blot für Bcl-xl wurde eine deutliche Abnahme des Bcl-xl Proteins in Folge einer Fraktin Überexpression vergleichend zum GFP Protein detektiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Aktinfragmentierung mit der anschließenden Bindung von Fraktin an Bcl-xl zu einer Reduktion der basalen Bcl-xl Proteinmengen in der Zelle führten. Diese Reduktion kann zu einem Ungleichgewicht anti-apoptotischer und pro-apoptotischer Proteine am Mitochondrium führen und verursacht so weitere apoptotische Vorgänge.

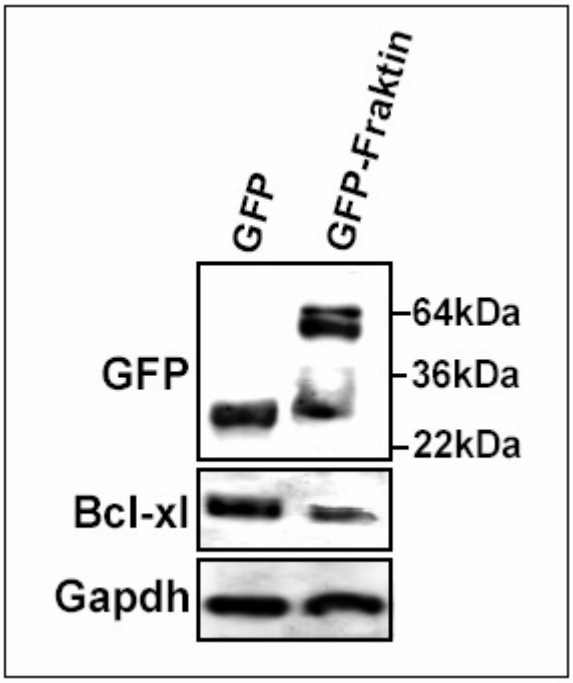


Abbildung 25: Überexprimiertes Fraktin führt zu einem Verlust der basalen Bcl-xl Proteinmengen.
Oli-neu Zellen wurden mit einem GFP-Fraktin Konstrukt für 24 Stunden transfiziert. Nach der Inkubation wurden GFP-positive Zellen in einem FACS-Gerät gesortet und anschließend lysiert. Die Proteinextrakte wurden für einen Bcl-xl Western Blot eingesetzt. Mit der Überprüfung des GFP-Tags wurde die Überexpression kontrolliert. Dabei hat das GFP-Fraktin Fusionsprotein eine Größe von ca. 58 kDa. Diese Überexpression führte zu einem signifikanten Verlust der Bcl-xl Proteinmengen in der Zelle.

2. TGF-β1 und ActivinA induzieren im gleichen Zellsystem auf zwei verschiedenen Signalwegen Apoptose

Die meisten Signaltransduktionen der TGF-β Superfamilie laufen über Regulationen der Smad Familie[2]. In vergangenen Studien wurde an der oligodendroglialen Vorläuferzelllinie Oli-neu im Zusammenspiel mit dem TNF-α eine Verstärkung des TGF-β1-induzierten Zelltods über die Smad-Proteine, Bcl-xl und den Caspasen-3, -8 und -9 gezeigt, obgleich TNF-α nicht zur TGF-β Superfamilie gehört[24,80,85,87]. In Assoziation mit den TGF-β Superfamilienmitgliedern BMPs kooperiert TGF-β2 für eine Verstärkung des Smad-involvierten Zelltods[86]. In der TGF-β Superfamilie sind molekulare Signalwege hoch konserviert. Unterschiede in der Ausführung apoptotischer Vorgänge sind hauptsächlich abhängig von Rezeptor/Liganden Kombinationen und anderen Ko-Faktoren und von der Extrazellulärmatrix.

In diesem Projekt sollte ermittelt werden, ob ein weiteres Zytokine der TGF-β Superfamilie über den Smad-Signalweg Apoptose in unserem Zellsystem auslösen kann, um die Kontextabhängigkeit von TGF-β weiter zu untersuchen. Dabei stellte sich die Frage, ob alle Apoptosewege über die gleichen Smad-Signale in den gleichen Signalweg laufen oder ob es regulatorische Unterschiede geben könnte. Das Hauptaugenmerk wurde auf die wichtigsten apoptotischen Regulatoren wie die Smad-Proteine, die Caspasen, die Bcl-2 Familie und verschiedene MAPK Kinasen gelegt.

2.1. ActivinA induziert eigenständig Apoptose in einem neuralen System

Für TGF-β1 wurde eine apoptotische Funktion in der oligodendroglialen Vorläuferzelllinie Oli-neu ermittelt. Der TGF-β1-induzierte Zelltod trat ebenfalls in unreifen Oligodendrozyten einer Primärkultur auf[87]. Um weitere Zelltod-induzierende Zytokine zu ermitteln, wurde ActA auf eine mögliche apoptotische Funktion vergleichend zu TGF-β untersucht. Im Gegensatz zu den TGF-βs mit deren vielfältigen, apoptotischen Funktionen in neuralen Systemen[2,6], wurden für Activine noch keine apoptotischen Funktionen im Nervensystem gezeigt[12,14].

2.1.1. Eine ActivinA Behandlung führt zur DNA-Fragmentierung in der oligodendroglialen Zelllinie Oli-neu

Zur Überprüfung einer möglichen apoptotischen Funktion von ActA in den Oli-neu Zellen wurde eine PI-FACS-Analyse zur Ermittlung fragmentierter Zellkerne vergleichend zu TGF-β1-behandelten Zellen durchgeführt.

Nach der Behandlung der Oli-neu Zellen mit verschiedenen ActA Konzentrationen oder 5ng/ml TGF-β1 als Positivkontrolle wurden die Zellen in Ethanol fixiert und der Zellkern mit

Propidiumjodid angefärbt. Mittels der Durchflusszytometrie wurden die Leuchtintensität des gefärbten Zellkerns gemessen und die entsprechende Zellzyklusphase analysiert. Dabei entspricht der sub-G1 Peak (DNA<2n) einem fragmentierten und somit apoptotischen Zellkern. In Abbildung 26*A* ist die Anzahl apoptotischer Zellen in Prozent dargestellt. In allen eingesetzten Konzentrationen induzierte ActA Apoptose in einem konzentrations-abhängigen Prozess. Die optimale Behandlungsdosis lag bei einer Konzentration von 50ng/ml ActA, bei der eine Apoptoserate von durchschnittlich 32% ermittelt wurde. Diese Konzentration wurde in allen weiteren Experimenten verwendet. In den unbehandelten Proben erschien eine Grundapoptose von 10%. Für die Positivkontrolle (TGF-β1 Behandlung) wurde eine Apoptoserate von ca. 38% gezählt. Bei einer Behandlung der Zellen mit beiden Zytokinen gleichzeitig (ActA 50ng/ml+TGF-β1 5ng/ml), wurde keine Verstärkung der Apoptoserate gemessen (Abbildung 26A).

Als weitere Methode zur Bestimmung der DNA-Fragmentierung wurde die TUNEL Färbung eingesetzt. Eine Behandlung der Zellen mit 50ng/ml ActA führte auch hier zu einem Anstieg apoptotischer Zellen vergleichend zu den Kontrollzellen (Abbildung 26*B*). TGF-β1-behandelte Kontrollzellen zeigten erneut eine höhere Apoptoserate als ActA-behandelte Proben.

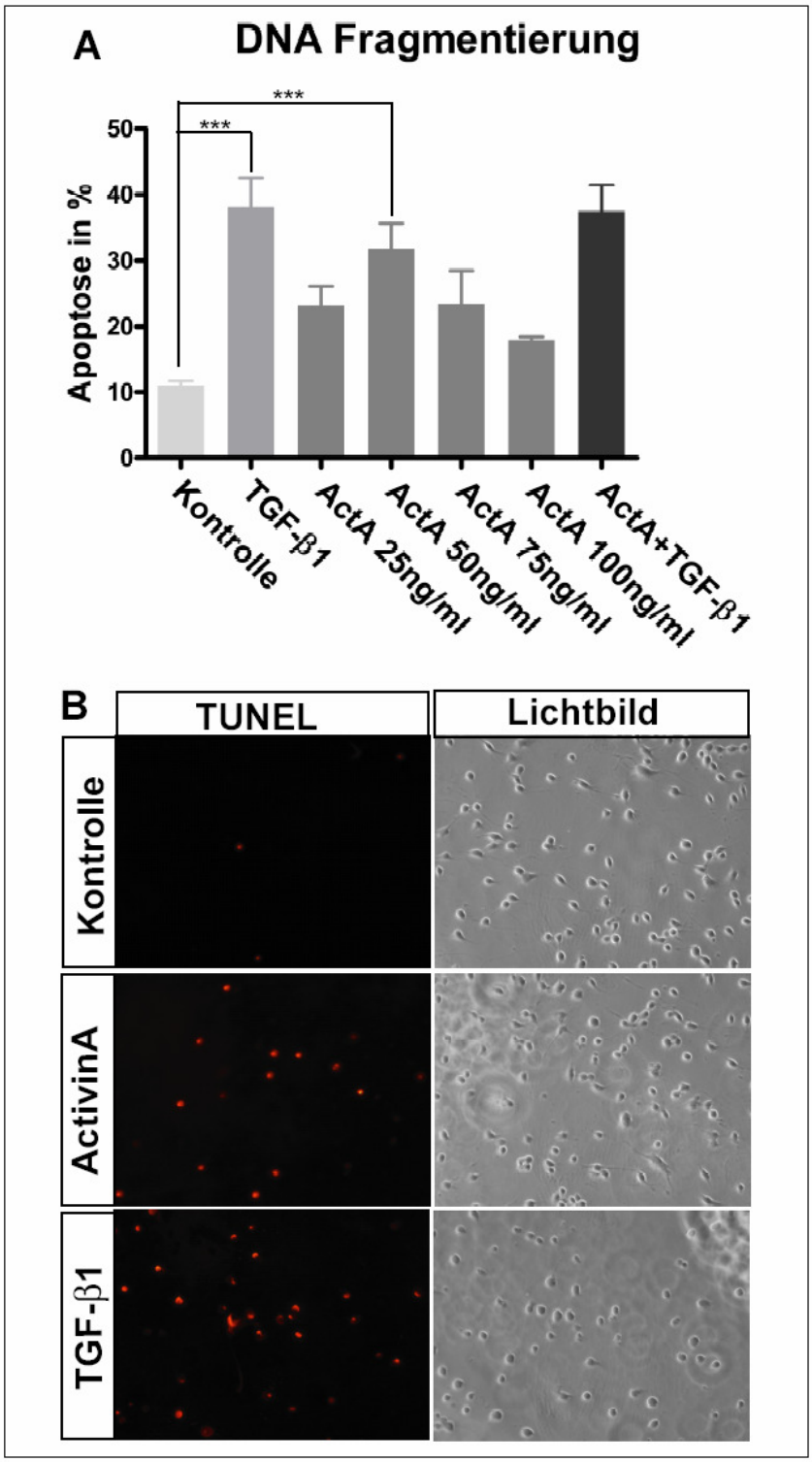


Abbildung 26: ActA-induzierte DNA-Fragmentierung in der Oli-neu Zelllinie.

(A) PI-FACS-Analyse von ActA- und TGF-β1-behandelten Oli-neu Zellen zur Bestimmung der apoptotischen Zellzahlen in Abhängigkeit der Zytokinkonzentration. Die Zugabe von 25-100ng/ml ActA oder 5ng/ml TGF-β1 erfolgte für 20 Stunden. Die behandelten Proben wurden geerntet, fixiert und die Zellkerne mit Propidiumjodid angefärbt. Mit einem Durchflusszytometer wurde die Intensität der gefärbten Kerne gemessen (Vierfachbestimmung) und die Zellzahlen gezählt. DNA-Leuchtintensitäten von weniger als 2n geben apoptotische, fragmentierte Kerne an. Die durchflusszytometrischen Messungen ergaben einen Anstieg apoptotischer Zellen in Abhängigkeit der ActA-Konzentration. Dabei stieg die maximale Apoptoserate bei

50ng/ml ActA Zugabe auf 32% an. TGF-β-Proben dienten als Positivkontrolle. Eine Behandlung der Zellen mit ActA und TGF-β1 gleichzeitig führte zu keiner Verstärkung der Apoptoserate.

(B) TUNEL Färbung von ActA-behandelten (50ng/ml für 20 Stunden) Oli-neu Zellen. Die TGF-β1-Proben dienten als apoptotische Positivkontrolle. Die TUNEL-gefärbten, fluorometrischen Proben wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 540/590nm analysiert. Es wurde eine deutliche Zunahme der Apoptose in Folge einer ActA Behandlung im Vergleich zur Kontrollprobe ermittelt.

2.1.2. ActivinA induziert keine TGF-β Freisetzung

Da TGF-β in den Oli-neu Zellen Apoptose induzieren kann, musste ausgeschlossen werden, dass die ActivinA Behandlung nicht zu einer TGF-β Freisetzung und somit letztendlich wieder zum TGF-β-induzierten Zelltod führt. Um dies zu überprüfen, wurde ein PAI-Luciferase Assay zur Messung von exogenem TGF-β im Kulturmedium durchgeführt. Dazu wurden Zellen mit ActA behandelt oder unbehandelt im reduzierten Kulturmedium angezogen. Nach 20 stündiger Inkubation wurden die Kulturüberstände mit all den darin enthaltenen Faktoren abgenommen und in den PAI-Luciferase Assay (*Material und Methode*n, Abschnitt 2.5.3) mit einer Dreifachbestimmung eingesetzt (Abbildung 27*A*). Die ActA-behandelten Proben zeigten keine vermehrte TGF-β Ausschüttung im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Um den TGF-β-involvierten Zelltod weiter auszuschließen, wurde der anti-TGF-β1/2/3 Antikörper eingesetzt. Dieser Antikörper kann alle TGF-β Isoformen im Kulturmedium weg fangen, blockt so exogenes oder freigesetztes TGF-β und verhindert eine TGF-β Signaltransduktion. ActA-induzierte Zellen wurden dazu zusätzlich mit 10µg/ml anti-TGF-β1/2/3 Antikörper behandelt und anschließend mittels PI-FACS-Analyse die Anzahl apoptotischer Zellen bestimmt. Die Apoptose in ActA-behandelten Zellen stieg im Vergleich zu der Kontrolle um 55 % an (Abbildung 27*B*). Der ActA-induzierte Zelltod wurde nicht mit dem anti-TGF-β1/2/3 Antikörper verhindert. Somit führte eine ActA Behandlung nicht zur Ausschüttung von TGF-β aus den Zellen.

Mit diesen Ergebnissen wurde eine ActA-vermittelte Apoptose neben der TGF-β-vermittelten Apoptose in den Oli-neu Zellen gezeigt. Des Weiteren konnte mit diesem Ergebnis erstmals für Activine eine apoptotische Funktion im Nervensystem bestimmt werden.

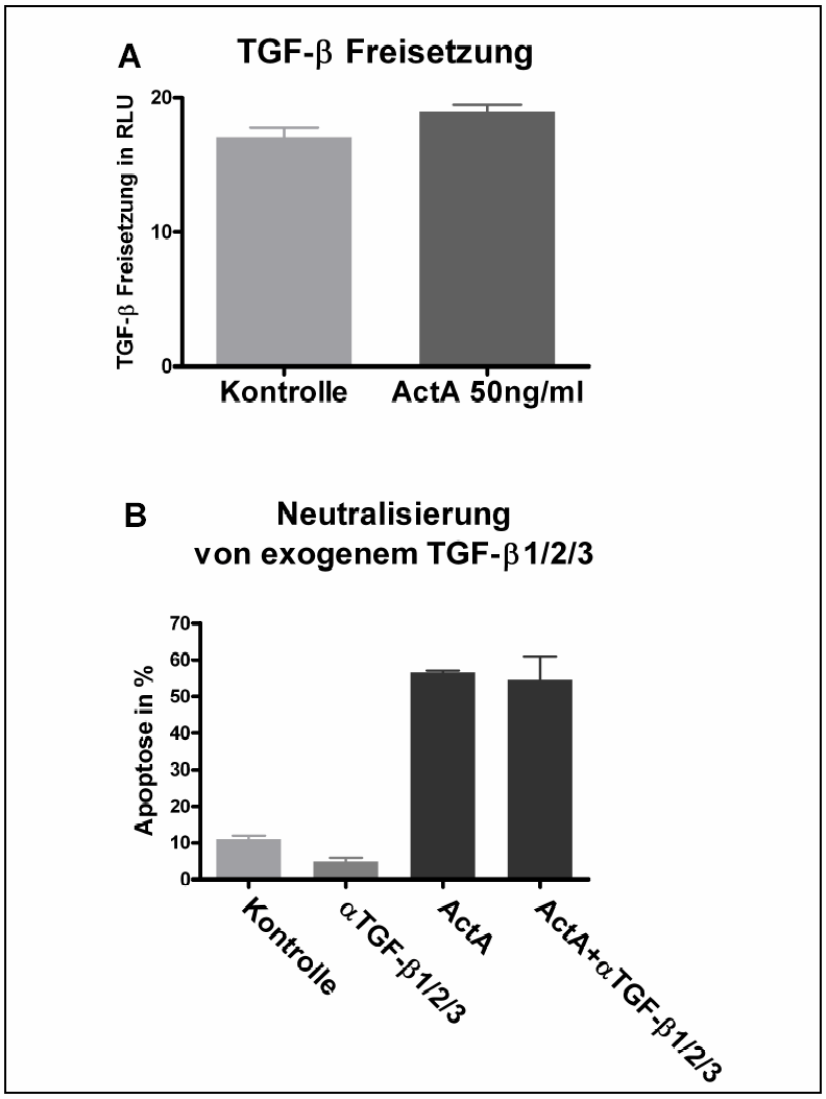


Abbildung 27: Eine ActA Behandlung führt nicht zur Freisetzung von TGF-β.
(A) Mit ActA-behandelten Proben (50ng/ml für 20 Stunden) wurde ein PAI-Luciferase-Assay durchgeführt. Als Reportersignal diente die Messung der Luciferaseaktivität in RLU. Vergleichend zu den unbehandelten Kontrollproben führte eine ActA Behandlung nicht zu einer Erhöhung des exogenen TGF-β Spiegels im Kulturüberstand und somit zu keiner vermehrten TGF-β Freisetzung.
(B) Mit Hilfe des anti-TGF-β1/2/3 Antikörpers wurde exogenes TGF-β im Kulturmedium blockiert und so eine TGF-β Signaltransduktion verhindert. Oli-neu Zellen wurden mit 10µg/ml TGF-β1/2/3 Antikörper für 2 Stunden vorbehandelt und anschließend 50ng/ml ActA zugegeben. Mit einer PI-FACS-Analyse wurde gemessen, ob ActA im Beisein des Antikörpers Apoptose auslösen kann. Im Vergleich zu den Kontrollen führte eine alleinige ActA Behandlung zu einer 55%igen Apoptoserate. Ein Verhindern der TGF-β Signalweiterleitung durch den Antikörper hatte keinen Einfluss auf die ActA-induzierte Apoptose.

2.1.3. Der Alk4/5/7 Rezeptorinhibitor blockiert sowohl die ActA- als auch die TGF-β-induzierte Apoptose

Die Induktion des Zelltods auf der Ebene der Rezeptoren wurde mit dem Alk-4/5/7 Inhibitor SB431542 überprüft. Der Inhibitor blockiert sowohl die Activin TypI Rezeptoren Alk-4 und Alk-7, als auch den TGF-β TypI Rezeptor Alk-5, wodurch der Inhibitor nicht zwischen den jeweiligen Zytokinen unterscheiden kann. Zudem wirkt dieser Inhibitor leicht apoptotisch auf die Zellen (Abbildung 28). Die Proben wurden mit 10µM Alk-4/5/7 Inhibitor für 2 Stunden vorbehandelt und für PI-FACS-Analysen mit ActA (50ng/ml) oder TGF-β1 (5ng/ml) für 20 Stunden weiterbehandelt. Der Alk4/5/7 Inhibitor reduzierte sowohl die TGF-β1-induzierte Apoptose als auch die ActA-induzierte Apoptose auf das Level der Kontrollzellen (Abbildung

28). Durch die fehlende Spezifität des Inhibitors wurde jedoch nur ermittelt, dass die TGF-β-induzierte Apoptose über den Alk-5 Rezeptor und die ActA-induzierte Apoptose über den Alk-4/7 Rezeptor laufen kann. Ob TGF-β1 auch an die Rezeptoren von Activin bindet und umgekehrt, wurde nicht geklärt.

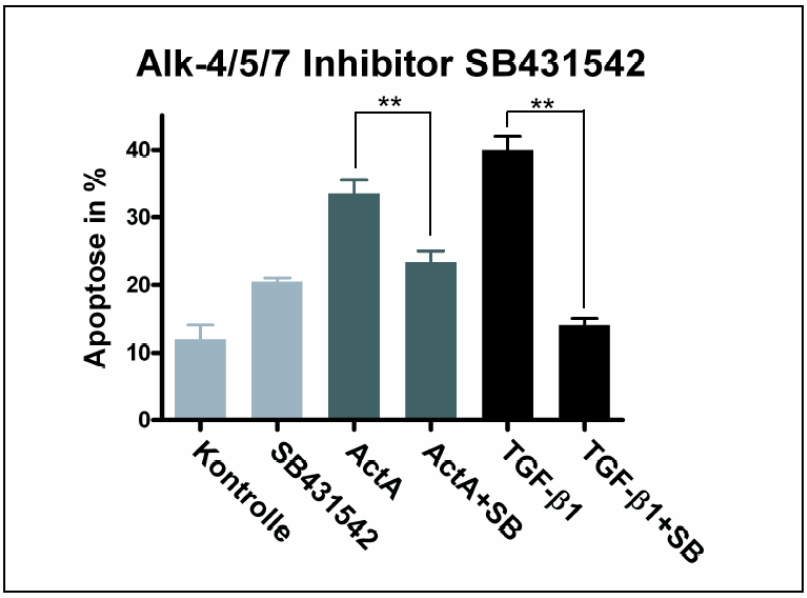


Abbildung 28: Der Alk4/5/7 Rezeptorinhibitor SB431542 verhindert sowohl die ActA-induzierte als auch die TGF-β-induzierte Apoptose.
Oli-neu Zellen wurden zusammen mit dem Alk4/5/7 Inhibitor SB431542 und 50ng/ml ActA oder 5ng/ml TGF-β1 für 20 Stunden ko-inkubiert oder alleine mit den Zytokinen behandelt. Mit der PI-FACS-Analyse wurde die Anzahl apoptotischer Zellen nach der jeweiligen Behandlungen bestimmt. SB431542 reduziert die ActA-induzierte Apoptose und die TGF-β1-induzierte Apoptose signifikant auf das Level der Kontrollprobe.

2.2. Die ActA-induzierte Aktivierung von R-Smads

Die Signalwege der TGF-β Superfamilie laufen größtenteils über die verschiedenen rezeptor-vermittelten Smads (R-Smads). Durch die Aktivierung des Smad-Signalweges translokalisieren die R-Smads mit Hilfe des Smad-4 vom Zytosol in den Zellkern. Im Zellkern kann der Smad-Komplex an Smad-bindene Elemente (SBEs) in Promotorregionen binden und so die Genexpression regulieren. In Oli-neu Zellen ist bereits eine Involvierung des Smad-Signalweges gezeigt worden[85,87].Um zu überprüfen, ob der Smad-Signalweg auch in der ActA-induzierten Apoptose in Oli-neu Zellen involviert ist, wurden Experimente zur Ermittlung einer allgemeinen Smad-Aktivierung durchgeführt.
Die allgemeine Aktivierung der Smads sollte mit Translokalisierungsexperimenten und über Smad-bindene Elemente (SBE) vor einem Luciferase-Reportergen bewiesen werden.
Für die Bestimmung der ActA-induzierten Smad-Bindung an SBEs wurden Zellen mit dem Luciferase-Reporterplasmid pGL3-SBE und mit dem pCMV-β-Gal Plasmid für die Kontrolle der Transfektionseffizienz transfiziert. Nach 20 stündiger Inkubation mit den Konstrukten wurden die Zellen für 6 Stunden mit 50ng/ml ActA behandelt. Nach der Zelllyse erfolgte die Messung der Luciferaseaktivierung und der β-Galaktosidaseexpression (*Material und*

Methoden, Abschnitt 2.3.3.). Die relative Smad-Aktivierung in RLU (Luciferaseaktivität /Galaktosidaseexpression) zeigte das Maß der Bindung der Smads an die SBEs (Abbildung 29*A*). Es wurde eine deutliche Bindung des Smad-Komplexes an die SBEs durch die Luciferasemessung in ActA-behandelten Zellen bestimmt. Diese Smad-Aktivierung wurde durch eine Ko-Behandlung mit dem SB431542 Inhibitor vollständig aufgehoben.

In immunzytochemischen Experimenten mit dem Smad-1/2/3-Antikörper gegen die R-Smads wurde die Translokalisierung regulatorischer Smads in den Kern dargestellt (Abbildung 29*B*). Dazu wurden die Zellen für 2 Stunden mit 50ng/ml ActA oder 5ng/ml TGF-β1 als Positivkontrolle behandelt. Die Smad-Translokalisierung in den Kern war sowohl in der TGF-β1 Positivkontrolle als auch in den ActA-behandelten Zellen detektierbar und zeigte eine Involvierung des Smad-Signalweges in ActA-induzierten Zellen an.

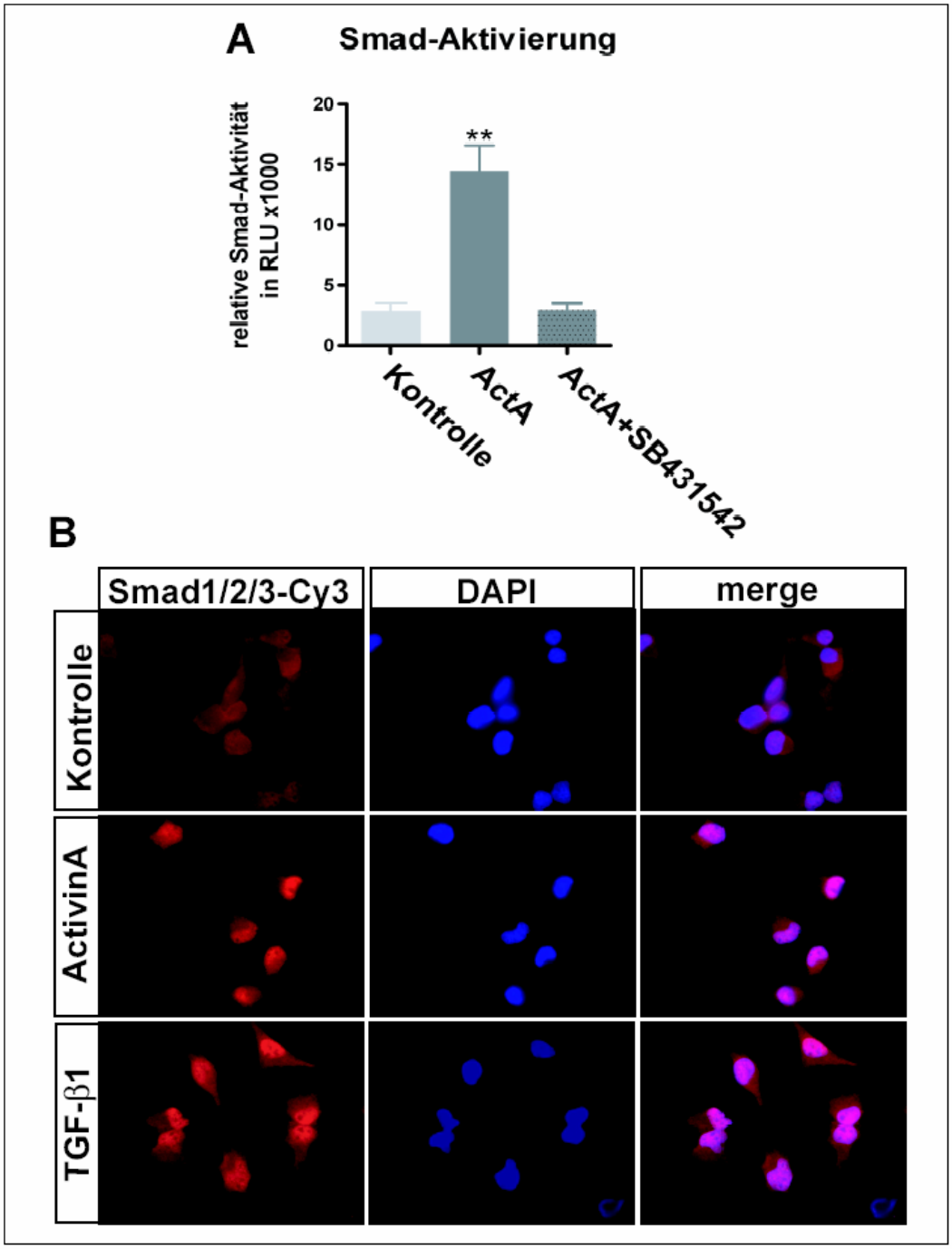


Abbildung 29: Aktivierung des Smad-Signalweges nach ActA Behandlung in Oli-neu Zellen.

(A) Analyse der Smad-Aktivierung über Smad-bindene Elemente (SBE) vor einem Luciferase-Reportergen. Für die Bestimmung der Bindung der Smad-Proteine an die SBEs wurden Zellen mit dem Luciferase-Reporterplasmid pGL3-SBE und mit dem pCMV-β-Gal Plasmid für die Kontrolle der Transfektionseffizienz transfiziert. Nach einer 20 stündigen Inkubation mit den Konstrukten wurden die Zellen für 6 Stunden mit 50ng/ml ActA behandelt oder mit dem SB431542 Inhibitor ko-behandelt. Nach der Zelllyse erfolgte die Messung der Luciferase und der β-Galaktosidaseexpression (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.3.3.). Eine 5fache Erhöhung der relativen Smad-Aktivität bzw. Bindung der Smads an SBEs in RLU

(Luciferaseaktivität/Galaktosidaseexpression) erfolgte signifikant nach ActA Behandlung vergleichend zur Kontrollprobe. Der SB431542 Inhibitor hob die starke Smad-Aktivierung komplett auf.

(B) Immunzytochemische Analyse der zellulären Lokalisierung von Smad1/2/3. Dazu wurden Oli-neu Zellen mit 50ng/ml ActA oder 5ng/ml TGF-β1 als Positivkontrolle für 2 Stunden behandelt. Nach der immunzytochemischen Weiterbehandlung der Proben mit dem Antikörper gegen die R-Smads Smad1/2/3 wurden die Zellkerne mittels DAPI-Lösung gefärbt und die Proben fluorometrisch visualisiert. Die Abbildungen zeigen, dass eine Behandlung der Oli-neu Zellen mit ActA zu einer Translokalisierung von R-Smads in den Kern führte. Im Vergleich dazu wiesen die Kontrollproben eine diffuse, zytosolische Smad-Färbung auf.

2.3. Regulationen von Mitgliedern der Bcl-2 Familie wurden vorerst in der ActA-induzierten Apoptose ausgeschlossen

In dem TGF-β1 Apoptosemodell Oli-neu konnte eine Verminderung der Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedes Bcl-xl gezeigt werden[85,87]. Die Abnahme von Bcl-xl erfolgte sowohl auf dem Level der RNA als auch auf Proteinebene. Dabei konnte die Herunterregulation des Bcl-xl Proteins nicht nur auf dem Level der Expression, sondern auch durch die Degradation der basalen Bcl-xl Proteinmengen ermittelt werden (diese Arbeit). Die Verminderung der Bcl-xl mRNA und ihrer Expression kann dabei unabhängig von der Bcl-xl Proteindegradation laufen (*Ergebnisse*, Abschnitt 1).

2.3.1. Die Bcl-xl Proteinexpression wird nicht durch ActivinA reguliert

Es wurde zunächst geprüft, ob das Bcl-xl Protein auch in den ActA-induzierten Apoptosemechanismen reguliert wird. Für Western Blot Experimente mit dem Bcl-xl Antikörper wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit 5ng/ml TGF-β1 oder 50ng/ml ActA behandelt und der Gesamt-Proteinextrakt isoliert. Als Ladekontrolle wurde Gapdh verwendet. In der Abbildung 30*A* ist dargestellt, dass eine ActA Behandlung nicht zur Reduktion des basalen Bcl-xl Proteins führte. Die Bandenintensitäten blieben zu allen Zeitpunkten unverändert hoch. Im Vergleich dazu erfolgte die TGF-β1-induzierte Herunterregulation des Bcl-xl Proteins.

Da die transkriptionelle Regulation der Expression unabhängig von der Bcl-xl Proteindegradation verlaufen kann, wurde die *Bcl-xl* mRNA Expression in ActA-behandelten Proben überprüft. Dazu wurden Oli-neu Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit ActA behandelt und die Gesamt-RNA isoliert. Die verwendeten Primer für die anschließende RT-PCR sind in Tabelle 1 (*Material und* Methoden) aufgeführt. Die individuelle Zyklenzahl und Anlagerungstemperatur für das Bcl-xl Primerpaar ist in Tabelle 6 (*Material und Methoden*) aufgelistet. In Abbildung 30*B* ist die semi-quantitative *Bcl-xl* RT-PCR gezeigt. Zu keinem Zeitpunkt wurde eine Abnahme des *Bcl-xl* Transkripts ermittelt.

Eine weitere Analyse der *Bcl-xl* mRNA Expression wurde mittels Luciferaseexperimenten durchgeführt, da der Ausschluss einer Herunteregulation der Bcl-xl Expression bekräftigt werden sollte. Für die Bestimmung der *Bcl-xl* Promotoraktivität wurden Zellen mit dem Luciferase-Reporterplasmid pGL3-Bcl-xl und mit dem pCMV-β-Gal Plasmid für die Kontrolle der Transfektionseffizienz transfiziert. Nach einer 2 stündigen Inkubation mit den Konstrukten wurden die Zellen für 14 Stunden mit 50ng/ml ActA behandelt. Nach der Zelllyse erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität und der β-Galaktosidaseexpression (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.3.3.). Die relative mRNA Expression bzw. *Bcl-xl* Promotoraktivität in RLU (Luciferaseaktivität/Galaktosidaseexpression) ist in Abbildung 30*D* dargestellt. In den *Bcl-xl* Promotorexperimenten konnte ebenfalls keine verminderte *Bcl-xl* Expression in Bezug auf eine ActA Behandlung bestimmt werden.

2.3.2. Expressionsanalyse weiterer Mitglieder der Bcl-2 Familie

In Bezug auf eine mögliche ActA-induzierte Regulation anderer Bcl-2 Familienmitglieder wurde das Hauptaugenmerk auf Proteine der anti-apoptotischen „Bcl-2 Subfamilie“ und pro-apoptotischen „Bax Subfamilie“ gelegt, da diese beiden Subfamilien maßgeblich an mitochondrialen Veränderung beteiligt sind[41]. Mit Hilfe einer Expressionsanalyse sollten erste Hinweise oder Ausschlüsse getroffen werden.

Daher wurden Oli-neu Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit ActA behandelt. Nach der Isolierung der Gesamt-RNA und dem Umschreiben der mRNA in cDNA wurden für die Gene *Bcl-2, Bak* und *Bax* Expressionsanalysen mittels RT-PCRs durchgeführt. Die verwendeten Primer für die semi-quantitativen RT-PCRs und die individuelle Zyklenzahlen und Anlagerungstemperaturen der Primerpaare sind in Tabelle 1 und Tabelle 6 (*Material und* Methoden) aufgelistet. Zu keinem Zeitpunkt wurde eine transkriptionelle Regulation der Expressionen von *Bcl-2, Bak* oder *Bax* ermittelt (Abbildung 30*B*).

Die densitometrischen Auswertungen der semi-quantitativen RT-PCRs von *Bcl-xl, Bcl-2, Bak* und *Bax* sind in Abbildung 30C graphisch wiedergegeben. Dabei beziehen sich die Messungen nur auf eine repräsentative RT-PCR von insgesamt zwei unabhängig durchgeführten Versuchen mit jeweils zwei durchgeführten semi-quantitativen RT-PCRs.

Zur weiteren Analyse der *Bcl-2* mRNA Expression wurden Luciferaseexperimente herangezogen. Für die Bestimmung der *Bcl-2* Promotoraktivität wurde das Reporterplasmid pGL3-Bcl-2 und das pCMV-β-Gal Plasmid als Kontrolle der Transfektionseffizienz in die Oli-neu Zellen eingebracht. Nach einer 2 stündigen Inkubation mit den Konstrukten erfolgte eine 14 stündige ActA (50ng/ml) Behandlung. Nach der Zelllyse wurden die Luciferaseaktivität und die β-Galaktosidaseexpression (*Material und Methoden*, Abschnitt

2.3.3.) gemessen. Die relative mRNA Expression bzw. *Bcl-2* Promotoraktivität in RLU (Luciferaseaktivität/Galaktosidaseexpression) ist in Abbildung 30*E* zu sehen. Die Bcl-2-Promotorexperimente zeigten keine verminderte *Bcl-2* Expression in Bezug auf eine ActA Behandlung.

Da die Expressionsanalyse in ActA-behandelten Proben den Ausschluss von Hauptregulatoren der Bcl-2 Familie wie Bcl-xl, Bcl-2, Bak und Bax aufzeigte, wurden mögliche ActA-induzierte Regulationen der Bcl-2 Familie vorerst nicht mehr in Erwägung gezogen und vorläufig nicht mehr weiter untersucht. Letztendlich stellte diese Erkenntnis einen Unterschied zur TGF-β1-induzierten Apoptose dar, in der eine Herunterregulation der Bcl-xl Proteinmengen erfolgte.

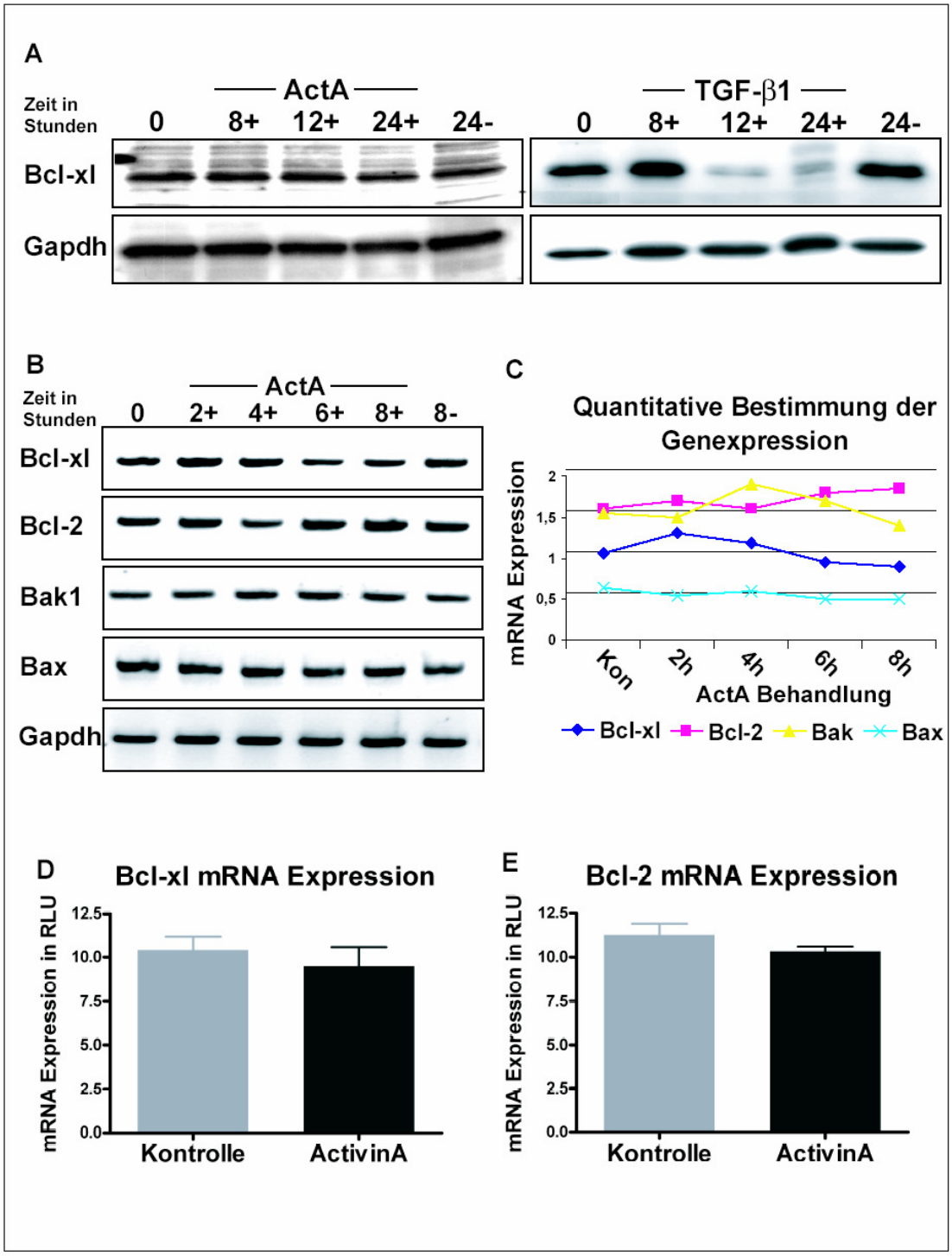


Abbildung 30: Untersuchungen an Mitgliedern der Bcl-2 Familie.

(A) Western Blot Experimente mit ActA-behandelten Oli-neu Zellen. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeiten mit 50ng/ml ActA behandelt und der Gesamt-Proteinextrakt für die Analyse der basalen Bcl-xl Proteinmengen im Western Blot eingesetzt. TGF-β1-behandelte Proben dienten als Positivkontrolle. Gapdh wurde zur Kontrolle der äquivalent eingesetzten Proteinmengen detektiert. Im Vergleich zu der TGF-β1-induzierten Reduzierung des Bcl-xl Proteins, wurde für ActA keine Abnahme der basalen Bcl-xl Proteinmengen ermittelt.

(B) Semi-quantitative RT-PCRs für *Bcl-xl, Bcl-2, Bak* und *Bax* von ActA-behandelten Proben. Die mRNAs von zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit ActA-behandelten (50ng/ml) und unbehandelten Oli-neu Zellen wurden isoliert und äquivalente Mengen für eine RT-Reaktion eingesetzt. Mit den in der Tabelle 1 angegebenen Primerpaaren wurden semi-quantitative PCR für *Bcl-xl, Bcl-2, Bak* und *Bax* durchgeführt. *Gapdh* diente als interner Standard. Die Anlagerungstemperaturen der jeweiligen Primer und unterschiedlichen Zyklenanzahlen der PCR-Amplifikationen sind in der Tabelle 6 (*Material und* Methoden) zusammen gefasst. In ActA-behandelten Proben wurde für keines der untersuchten Bcl-2 Familienmitglieder eine Änderung der mRNA Expression gezeigt.

(C) Quantitative Bestimmung der semi-quantitativen RT-PCRs von *Bcl-xl, Bcl-2, Bak* und *Bax* in ActA-behandelten Proben. Die graphische Darstellung gibt die densitometrischen Auswertungen der analysierten Bcl-2 Genexpressionen an. Dabei bezieht sich die Auswertung auf die Messung von einer von zwei durchgeführten semi-quantitativen PCR-Reaktionen aus zwei unabhängigen Experimenten.

(D), (E) Bestimmung der mRNA Expression bzw. Promotoraktivität von *Bcl-xl* und *Bcl-2* mittels Luciferaseexperimenten. Oli-neu Zellen wurden mit dem pGL3-Bcl-xl bzw. pGL3-Bcl-2 Luciferase-Reporterplasmid und dem pCMV-β-Gal Plasmid als Kontrolle der Transfektionseffizienz transfiziert. Nach einer Inkubationsphase von 2 Stunden wurden die Proben für 14 Stunden mit ActA (50ng/ml) behandelt. Der Gesamt-Proteinextrakt wurde für Luciferasemessungen weiter verwendet. Die relative mRNA Expression bzw. Promotoraktivität in RLU (Luciferaseaktivität/Galaktosidaseexpression) zeigten keine Veränderung der *Bcl-xl* oder *Bcl-2* Expression nach einer ActA Behandlung an.

Die angegebenen Standardabweichungen stehen für ±SEM von jeweils zwei unabhängigen Experimenten mit Doppelmessungen.

2.4. Die MAP-Kinasen p38, JNK und ERK sind nicht in den ActA-induzierten Signalwegen involviert

Da vorerst eine ActA-induzierte Regulation von Hauptmodulatoren der Bcl-2 Familie ausgeschlossen wurde, sollte untersucht werden, ob MAP-Kinasen in den ActivinA-regulierten Signalwegen beteiligt sind. In vielen Zellmodellen verlaufen Regulationen der TGF-β Superfamilie zusätzlich oder ausschließlich über Smad-unabhängige MAPK-Signale[3,23,24]. Daher wurden einerseits die pro-apoptotischen MAP-Kinasen JNK und p38 und die anti-apoptotische MAP-Kinase ERK untersucht, und andererseits der Transkriptionsfaktor NFκB.

Zur Überprüfung der Aktivierung und Signalweiterleitung von MAP-Kinasewegen wurde das 'Stratagene® PathDetect in vivo Signal Transduction Pathway System' eingesetzt. Mit diesem Vektorsystem kann die Phosphorylierung und somit Aktivierung/Deaktivierung von Transkriptionsfaktoren durch ihre entsprechenden aktiven Kinasen gemessen werden (siehe *Material und Methoden*, Abschnitt 2.5.2.). Dazu wurden Oli-neu Zellen mit dem trans-Aktivatorplasmiden pFA-Elk1-*GAL4*-DBD (Transkriptionsfaktor der ERK Kinase), pFA-ATF2-*GAL4*-DBD (Transkriptionsfaktor der p38 Kinasen) oder pFA-c-Jun-*GAL4*-DBD

(Transkriptionsfaktor der JNK Kinasen) und dem Reporterplasmid pFR-*GAL4*-UAS-Luc transfiziert. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde zusätzlich das pCMV-β-Gal Plasmid in die Zellen gebracht. Nach einer 24 stündigen Inkubation mit dem Vektorsystem wurden die Zellen für 12 Stunden mit 50ng/ml ActA oder 5ng/ml TGF-β1 behandelt. Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität und der β-Galaktosidaseexpression (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.3.3.). Die relative Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren durch ihre Kinasen in RLU (Luciferaseaktivität/Galaktosidaseexpression) ist in Abbildung 31*A*-*C* dargestellt. Weder der p38 Signalweg noch der JNK Signalweg wurde durch ActivinA oder durch TGF-β1 reguliert. Eine Abnahme der Elk1 Phosphorylierung und somit eine Abnahme der Aktivierung des ERK Signalweges wurde nur, wie schon beschrieben, in TGF-β1-behandelten Proben gemessen[85,87]. Eine Änderung der Elk1-Phosphorylierung unter ActA Bedingungen wurde nicht ermittelt.

Da in den Oli-neu Zellen eine TGF-β1-vermittelte Involvierung des ERK Signalweges[85,87] gezeigt wurde, sollte der Ausschluss dieses Weges in der ActA-induzierten Apoptose bekräftigt werden. Dazu wurden ActA-behandelte Proteinproben nach ihren Zellkompartimenten aufgetrennt und die zytosolische Phase und die Kernphase mittels Western Blot auf eine ERK Translokalisierung und Stärke des Signals untersucht. Dabei erkennt der benutzte Antikörper die Isoformen ERK1 und ERK2. Gapdh diente als Ladekontrolle und Reinheit der zytosolischen Phase und H1 als Ladekontrolle und Reinheit der Kernphase. TGF-β1-behandelte Proben dienten als Positivkontrolle. In den TGF-β1-behandelten Positivkontrollen ist eine Abnahme der ERK1 und ERK2 Kinase aus der Kernphase detektiert worden. Eine leichte Abnahme der Expression der Kinase ist ebenfalls in der zytosolischen Phase zu erkennen. Im Gegensatz dazu wurde unter ActA Bedingungen keine Regulation der ERK Kinasen ermittelt (Abbildung 31*E*).

Um die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB in ActA-behandelten Oli-neu Zellen zu untersuchen, wurde das Plasmid pGL3-HIV-LTR in die Zellen gebracht. Das Plasmid besitzt das NFκB Responseelement HIV-LTR, vorgeschaltet vor dem Luciferasegen. Somit kann über die Luciferase als Reportergen auch hier die Aktivierung von NFκB als Transkriptionsfaktor bzw. die Bindung von NFκB an Zielgene gemessen werden. Nach der Transfektion und Behandlung der Zellen mit 50ng/ml ActA für 12 Stunden oder in Ko-Behandlung mit dem Alk4/5/7 Rezeptorinhibitor wurden die Proben lysiert und die Luciferaseexpression und Galaktosidasexpression (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.3.3.) bestimmt. Die relative Bindung des Transkriptionsfaktors an das Responseelement HIV-LTR

in RLU (Luciferaseaktivität/Galaktosidaseexpression) ist in Abbildung 31*D* dargestellt. Eine ActA Behandlung führte in Oli-neu Zellen nicht zu einer Regulation von NFκB.

Diese Ergebnisse wiesen erneut einen Unterschied zwischen dem apoptotischen TGF-β1 Signalweg und dem ActA Signalweg auf, da im TGF-β1 Signalweg eine Deaktivierung der anti-apoptotischen ERK Kinase erfolgt[85,87].

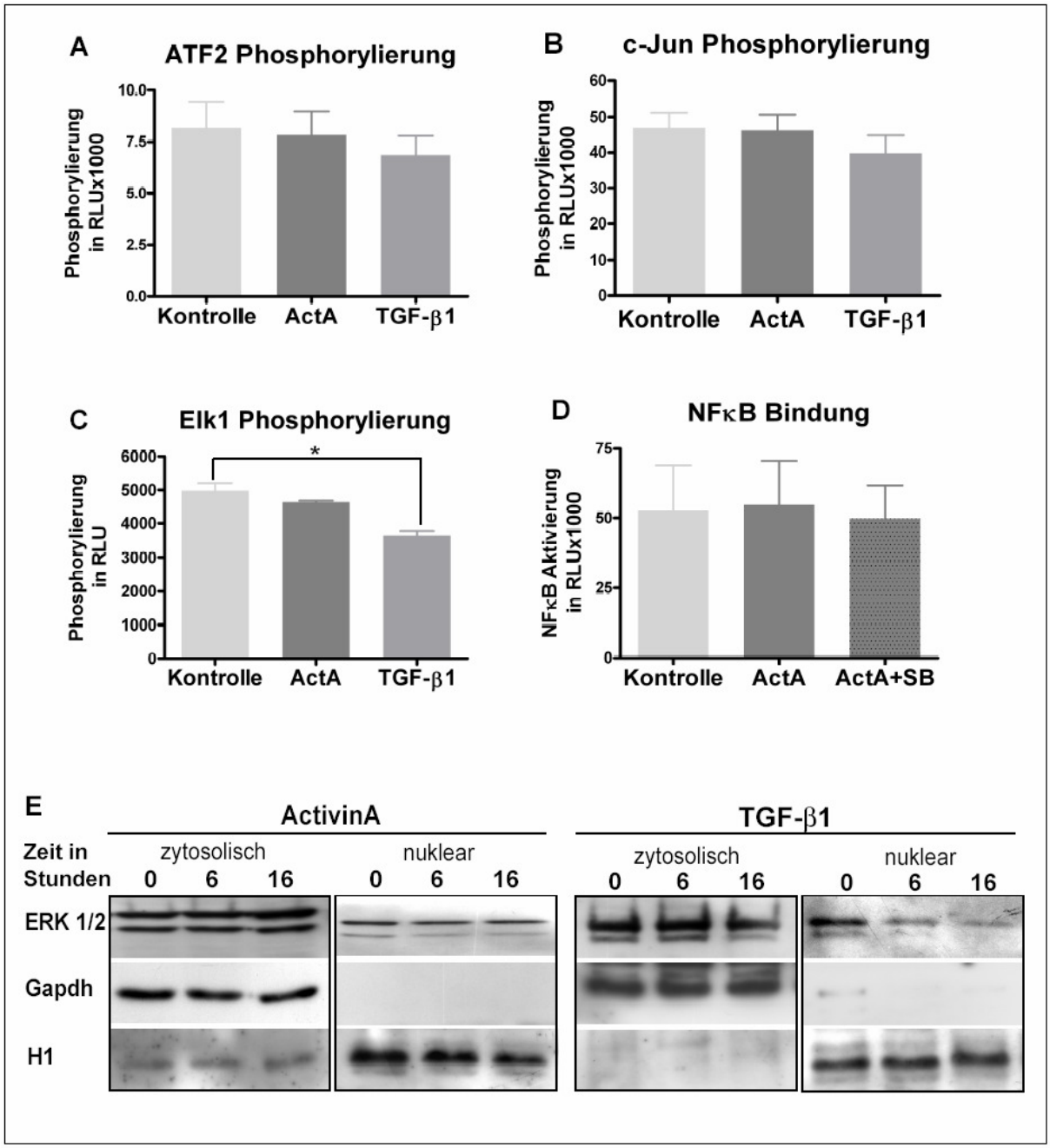


Abbildung 31: In ActA-behandelten Zellen sind die MAPK p38, JNK, ERK und der Transkriptionsfaktor NFκB nicht reguliert.

(A)-(C) Bestimmung der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren ATF2, c-Jun und Elk1 mittels 'Stratagene® PathDetect in vivo Signal Transduction Pathway System'. Oli-neu Zellen wurden mit den trans-Aktivatorplasmiden pFA-Elk1-*GAL4*-DBD-Luc, pFA-ATF2-*GAL4*-DBD-Luc oder pFA-c-Jun-*GAL4*-DBD-Luc und dem Reporterplasmid pFR-*GAL4*-UAS-Luc ko-transfiziert. Für die spätere Bestimmung einer äquivalenten

Expressionsrate des Reportergens Luciferase wurde zusätzlich das pCMV-β-GAL Plasmid in die Zellen gebracht. Das Vektorsystem wurde für 24 Stunden inkubiert und die Zellen für 12 Stunden mit 50ng/ml ActA oder 5ng/ml TGF-β1 behandelt. Nach der Zelllyse erfolgte die Messung der Luciferaseaktivität und der β-Galaktosidaseexpression in RLU (Luciferaseaktivität/Galaktosidaseexpression) (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.3.3.). Die relative Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren ATF2 und c-Jun durch ihre Kinasen p38 und JNK zeigten weder für den p38 Signalweg noch für den JNK Signalweg eine Aktivierung unter den Zytokinen an. Für den ERK Signalweg wurde nur nach einer TGF-β1 Behandlung eine signifikante Runterregulation der Elk1 Phosphorylierung gemessen.

(D) Das Plasmid pGL3-HIV-LTR mit einem NFκB Responseelement (HIV-LTR) vor dem Luciferasegen wurde in die Zellen gebracht. Nach einer 12 stündigen Behandlung der Proben mit ActA oder mit ActA und dem Alk4/5/7 Rezeptorinhibitor wurde die Aktivierung von NFκB als Transkriptionsfaktor bzw. die Bindung von NFκB an Zielgene (in RLU) über die Luciferase gemessen. pCMV-β-Gal Plasmid diente als Abgleich der äquivalenten Expressionsraten. In ActA-behandelten Proben wurde kein Anstieg der NFκB Bindung an sein Responseelement ermittelt.

(E) Überprüfung der Translokalisierung der ERK1/2 Kinasen durch Zellkompartimentierung und anschließender Western Blot Analyse. Oli-neu Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit 50ng/ml ActA oder 5ng/ml TGF-β1 behandelt und die Proteine nach ihren Zellkompartimenten aufgetrennt. Die zytosolische und die nukleäre Phase wurden über einen Western Blot auf eine mögliche Translokalisierung von ERK1/2 zwischen dem Zytosol (inaktiv) und dem Kern (aktiv) untersucht. Als Ladekontrolle und zur Überprüfung der Reinheit der einzelnen Phasen wurde für das Zytosol Gapdh und für die Kernphase das H1 Protein gewählt. Im Gegensatz zu TGF-β1-behandelten Proben führt eine ActA Behandlung nicht zu einer Verringerung von ERK1/2 aus dem Kern und somit nicht zu einer Abschwächung des ERK Signalweges.

Die angegebenen Standardabweichungen stehen für ±SEM von jeweils zwei unabhängigen Experimenten mit Doppelmessungen. Mit $*P<0.05$ ist die statistische Signifikanz angegeben, die über den Student´s t-test ermittelt wurde.

2.5. Die Caspasen

Die Caspasen sind eine wichtige regulatorische Hauptgruppe apoptotischer Signalwege und an unzähligen apoptotischen Signalweiterleitungen in den verschiedensten Apoptosemodellen, unter anderen auch in der TGF-β1-induzierten Apoptose[85,87], beteiligt. Dabei werden frühe Apoptose-einleitende Caspasen wie die Caspase-2, und -8 und später im Netzwerk vorkommende Apoptose-ausführende Caspasen wie die Caspase-9 und -3 unterschieden.

2.5.1. Die Caspasen sind in der ActA-induzierten Apoptose involviert

Um die Relevanz der Caspasen in unserem Modell unter ActivinA Bedingungen überprüfen zu können, wurden Oli-neu Zellen mit einem pan-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK (panCas) für 2 Stunden vorbehandelt und die Anzahl apoptotischer Zellen nach 20 stündiger Behandlung mit 50ng/ml ActA bestimmt. Die PI-FACS-Analyse zeigte, dass die Caspasen

generell eine Rolle in der ActA-induzierten Apoptose spielten (Abbildung 32). Eine Ko-Behandlung der Zellen mit dem pan-Caspase Inhibitor und ActA führte zu einer deutlichen Reduktion des Zelltods auf 25% im Vergleich zu allein mit ActA behandelten Proben mit knapp 50%. Als Kontrolle der Funktionalität des pan-Caspasen Inhibitors dienten TGF-β1-behandelte Proben.

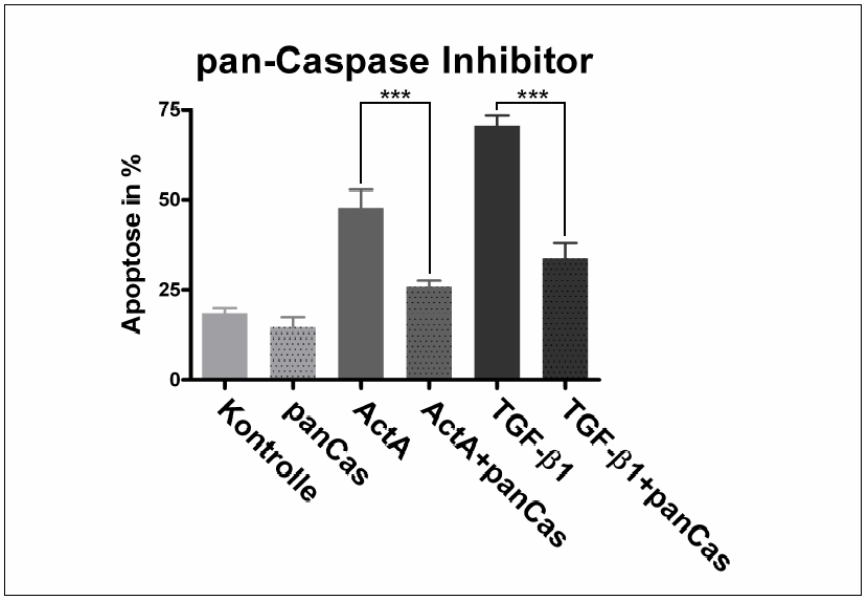


Abbildung 32: Der pan-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK reduziert die ActA-induzierte Apoptose.
Oli-neu Zellen wurden für 20 Stunden mit 50ng/ml ActA oder mit ActA und dem pan-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK (50µM mit 2 Stunden Vorbehandlung) behandelt und mittels PI-FACS-Analysen die fragmentierten/ kondensierten Zellkerne gezählt. TGF-β1-behandelte Proben dienten als Positivkontrolle. ActA-behandelte Proben zeigten eine deutliche und hoch signifikante Abnahme der Apoptose um 25% durch den pan-Caspase Inhibitor.
Die angegebenen Standardabweichungen stehen für ±SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Mit ***$P<0.001$ ist die statistische Signifikanz angegeben, die über den Student´s *t*-test ermittelt wurde.

2.5.2. In der ActA-induzierten Apoptose sind ausschließlich die Initiatorcaspasen-2 und -8 beteiligt

Nach der Bestätigung der Caspasenbeteiligung in den ActA-induzierten Apoptosewegen durch die PI-FACS-Analysen, sollten die einzelnen involvierten Caspasen identifiziert werden. Zur Überprüfung der Caspasenspezifität wurde die Aktivierung spaltender Caspasen mittels Substratumsetzung gemessen (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.5.4.). Dazu wurden Caspase-2,- Caspase-8,- Caspase-9,- und Caspase-3-spezifische Substrate eingesetzt. Nach der Behandlung der Oli-neu Zellen mit 50ng/ml ActA oder 5ng/ml TGF-β1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-Proteinmengen bestimmt. Äquivalente Mengen wurden für die fluorometrischen Messungen als Doppelbestimmung eingesetzt. Dabei wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. In der Abbildung 33 sind die Caspaseaktivitäten in Diagrammen dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Student's *t*-test. Während die Caspase-2 und Caspase-8 sowohl in ActA-behandelten als auch TGF-β1-behandelten Proben deutlich und signifikant aktiviert

wurden (Abbildung 33*A,B*), konnten die späten, post-mitochondrial aktivierten Caspasen-3 und -9 nur in den TGF-β1-behandelten Proben (Abbildung 33*C,D*) gemessen werden.

Die Caspase-8 war bei beiden Zytokinen nach einer 8 stündigen Behandlung gleich stark und früh (2fach) aktiviert. Die Aktivierung der Caspase-2 konnte generell in den TGF-β1-behandelten Proben stärker gemessen werden als in den ActA-behandelten Proben (Abbildung 33*A*). Für die Caspase-3 wurde in den TGF-β1 Kontrollproben eine dreifache und hoch signifikante Aktivität bestimmt. Im Gegensatz dazu stieg die Caspase-3 Aktivität in ActA-behandelten Proben um das 1,5fache an. Für diesen Anstieg wurde nach 14 stündiger Behandlung eine geringe Signifikanz berechnet (Abbildung 33*C*). Die Caspase-9 war ab einer 14 stündigen TGF-β1 Behandlung aktiv. Im Gegensatz dazu wurde für ActA Proben keine signifikante Caspase-9 Aktivität ermittelt (Abbildung 33*D*).

Die unterschiedlichen Aktivierungen der Caspasen war erneut ein Beleg für den unterschiedlichen Ablauf in den ActA-induzierten und TGF-β1-induzierten Signalwegen.

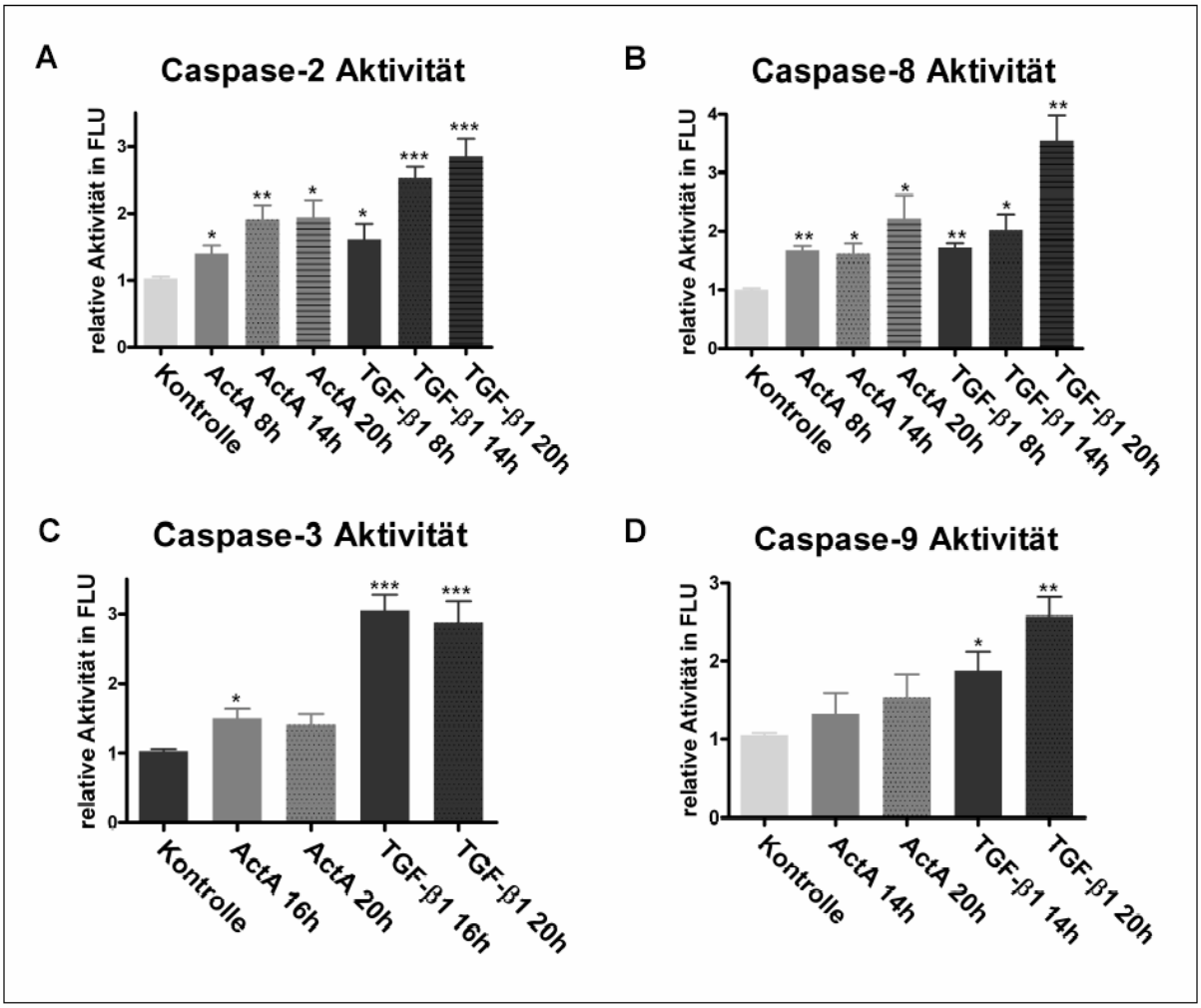


Abbildung 33: Messungen verschiedener Caspaseaktivitäten mittels Substratumsetzungen.

Oli-neu Zellen wurden mit 50ng/ml ActA zu verschiedenen Zeitpunkten behandelt. Als Kontrolle der Caspase-Aktivitätsmessungen dienten TGF-β1-behandelte Proben. Nach der Lyse der Zellen wurde die Konzentration des

Gesamt-Proteinextrakts bestimmt und äquivalente Mengen für die fluorometrischen Substratumsetzungen eingesetzt. Die angegebenen Standardabweichungen stehen für ±SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten mit Doppelmessungen. Die unbehandelte Kontrolle wurde gleich eins gesetzt und mit den jeweiligen behandelten Proben verglichen. Mit $*P<0.05$, $**P<0.01$ und $***P<0.001$ ist die statistische Signifikanz angegeben, die über den Student´s *t*-test ermittelt wurde.

(A) Die Caspase-2 Messungen zeigten sowohl für ActA-behandelte Proben als auch für TGF-β1-behandelte Proben eine Zunahme der Aktivität.

(B) Für die Caspase-8 wurde eine signifikante Erhöhung nach einer 8 stündigen ActA Behandlung bestimmt. Dabei war die Caspase-8 Aktivität in TGF-β1 Proben generell etwas höher.

(C) Die Caspase-3 war in TGF-β1-behandelten Proben stark und signifikant erhöht. Für eine ActA Behandlung wurde nach 14 Stunden eine schwache Aktivität der Caspase-3 gemessen.

(D) Die Caspase-9 Messungen ermittelten ausschließlich für TGF-β-behandelte Proben eine Aktivität.

2.6. Der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) ist in der ActA-induzierten Apoptose involviert

Während AIF eine lebenswichtige Rolle in der Atmungskette spielt, erscheint der Faktor durch Translokalisierung in den Zellkern als ein apoptotisches Protein. Der Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium in den Kern folgt eine DNA-Fragmentierung durch AIF und verschiedenen Ko-Faktoren[58]. Die AIF-Aktivierung verläuft dabei unabhängig von Effektorcaspasen.

Da in den Oli-neu Zellen die Effektorcaspasen-9 und -3 gar nicht bzw. sehr gering in den ActA Signalwegen aktiv waren, wurde nach Faktoren gesucht, die unabhängig von Effektorcaspasen eine DNA-Fragmentierung einleiten können. Das Hauptaugenmerk wurde daher auf AIF gelegt, da dieser apoptotische Faktor fast ausschließlich an Caspase-unabhängigen Signalwegen beteiligt ist[95].

2.6.1. AIF wandert ActA-vermittelt in den Zellkern

Für die Überprüfung der AIF Translokalisierung in den Zellkern bzw. der AIF Aktivierung wurden ActA-behandelte Proteinproben nach ihren Zellkompartimenten getrennt. Zum Vergleich zur TGF-β1-vermittelten Apoptose wurden TGF-β1-behandelte Proben mitgeführt. Dabei wurden verschiedene Zeitpunkte (16 Stunden und 24 Stunden) für die Behandlung mit den Zytokinen gewählt. Die mitochondrialen, zytosolischen und nukleären Proteinphasen wurden über einen Western Blot mit einem Antikörper gegen AIF untersucht, da das mitochondriale Protein im aktiven, apoptotischen Zustand über das Zytosol in den Kern translokalisiert. Zur Überprüfung der Ladung und Reinheit der verschiedenen Phasen wurde für die mitochondriale Phase ein CoxIV Antikörper, für die zytosolische Phase der Gapdh Antikörper und für die Kernphase der H1 Antikörper gewählt. In den TGF-β1-behandelten

Proben wurde keine vermehrte AIF Translokalisierung in den Zellkern detektiert. Jedoch wurden geringe AIF Proteinmengen in unbehandelten Proben in der Kernphase gezeigt (Abbildung 34*B*). Dieses Grundlevel an AIF Protein geht mit der Grundapoptose der Oli-neu Zellen in Kulturbedingungen einher. Im Gegensatz dazu erschien eine 2,5facheVerstärkung der AIF Translokalisierung in den Kern in ActA-behandelten Proben (Abbildung 34*A*). Eine AIF Zunahme im Zytosol wurde weder für ActA noch für TGF-β1 detektiert, wobei die späten Zeitpunkte eine Erklärung dafür sind.

Für die Bestätigung der AIF Translokalisierung in den Kern unter ActA Bedingungen wurden immunzytochemische Translokalisierungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden ActA-behandelte Zellen (50ng/ml für 16 Stunden) mit einem Antikörper gegen das AIF Protein immunzytochemisch behandelt und der AIF-Antikörper mit einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt. Die Analyse erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen wurde eine deutliche Kern-Lokalisierung von AIF in ActA-behandelten Proben gezeigt. Während in den Kontrollzellen das AIF Protein zytosolisch und granulär detektiert wurde, erschien AIF in ActA-behandelten Proben vermehrt im Zellkern (Abbildung 34*C*). Zudem wiesen Zellkerne, in denen AIF nach einer ActA Behandlung detektiert wurde, eine kondensierte und fragmentierte Morphologie auf.

Somit stellt die ActA-vermittelte Translokalisierung von AIF in den Kern einen prägnanten Unterschied zum TGF-β1-induzierten Signalweg dar. Gleichzeitig wurde erstmals eine Involvierung von AIF in apoptotischen ActA-vermittelten Signalwegen gezeigt[12,58,95].

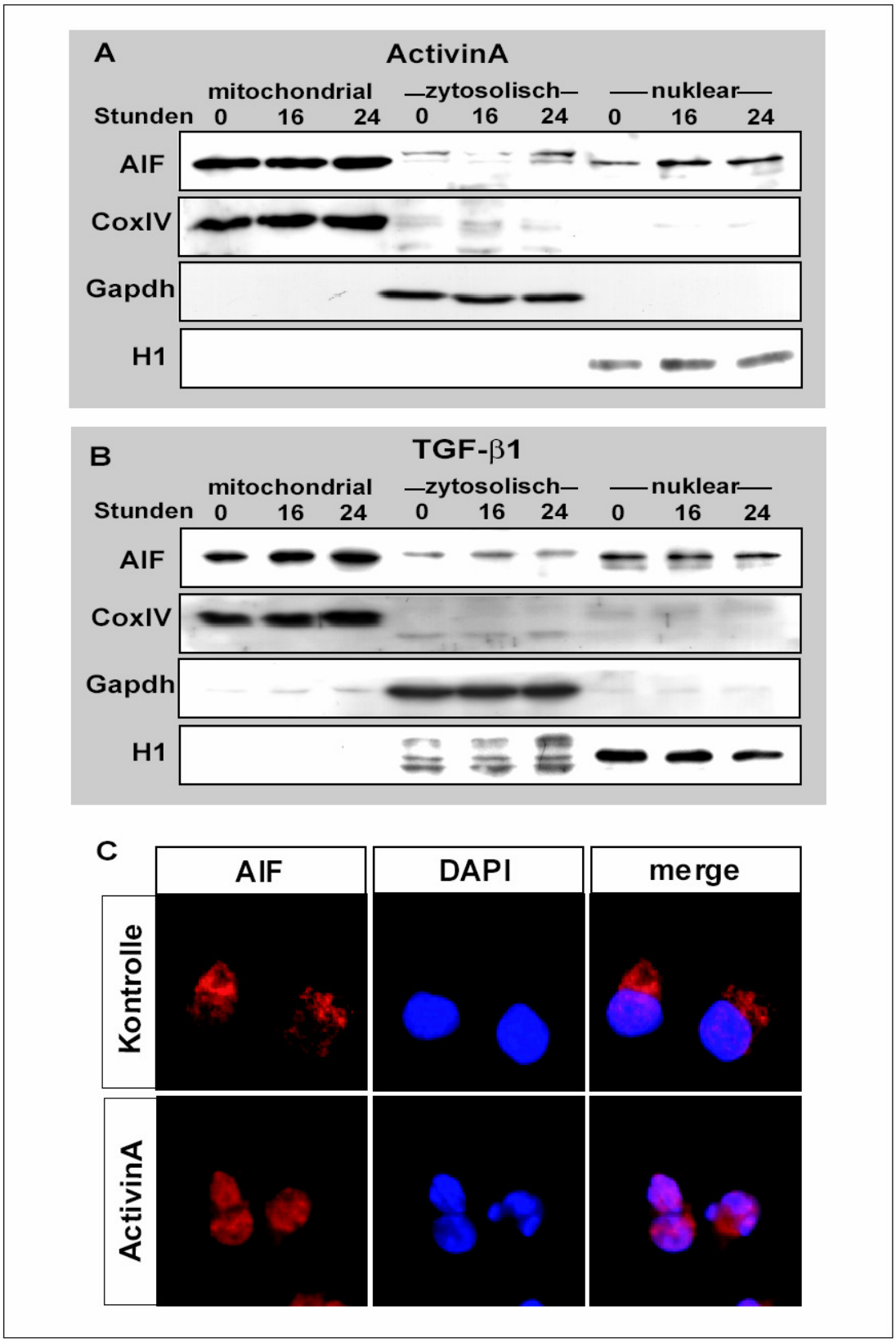


Abbildung 34: ActA-induzierte AIF Translokalisierung vom Mitochondrium in den Zellkern.

(A), (B) Überprüfung der Translokalisierung von AIF in den Kern durch Proteinfraktionierung und anschließender Western Blot Analyse. Oli-neu Zellen wurden für 16 und 24 Stunden mit 50ng/ml ActA oder 5ng/ml TGF-β1 behandelt und die Proteine nach ihren Zellkompartimenten aufgetrennt. Die zytosolische, mitochondriale und die nukleäre Phase wurden mit einen Western Blot auf eine mögliche Translokalisierung von

AIF vom Mitochondrium, über das Zytosol in den Kern untersucht. Als Ladekontrolle und zur Überprüfung der Reinheit der einzelnen Phasen wurde für das Zytosol Gapdh, für die mitochondriale Fraktion CoxIV und für die Kernphase das H1 Protein gewählt. Im Gegensatz zu TGF-β1-behandelten Proben führte eine ActA Behandlung zur Translokalisierung von AIF in den Kern und somit zu einer Aktivierung des apoptotischen AIF Proteins.
(C) Immunzytochemische Analyse der AIF Translokalisierung in den Zellkern. Nach einer Zugabe von 50ng/ml ActA für 16 Stunden wurden die Oli-neu Zellen für immunzytochemische Untersuchungen mit dem AIF Antikörper weiterbehandelt. Der Zellkern wurde mit einer DAPI-Färbung sichtbar gemacht und die Proben fluorometrisch analysiert. Nach der Behandlung der Zellen mit ActA wurde eine deutliche Zunahme von AIF im Zellkern ermittelt. Im Vergleich zu der ActA-vermittelten AIF-Kernfärbung erschien das AIF Protein in unbehandelten Proben granulär und zytosolisch.

2.6.2. Eine Hemmung der AIF Funktion verringert die ActA-induzierte Apoptose

Da die Involvierung von AIF in der ActA-vermittelten Apoptose eindeutig gezeigt wurde, sollte weitergehend analysiert werden, ob eine Verringerung der AIF Proteinmengen bzw. eine Blockierung der AIF Funktion auf die ActA-induzierte DNA Fragmentierung einwirken kann.

Für die Hemmung der AIF Funktion wurden verschiedene GFP-gekoppelte siRNA antisense-Sequenzen gegen das AIF Transkript (siAIF1, siAIF2 und siAIF3) gewählt.

Um die Reduktion der basalen AIF Proteinmengen durch die GFP-gekoppelten siRNAs (siAIF1 bis siAIF3) zu überprüfen, wurden Oli-neu Zellen mit den verschiedenen siRNAs gegen AIF transfiziert. Nach einer 2 tägigen Inkubationsphase der siAIFs wurden die Zellen trypsiniert und für eine Zellsortierung vorbereitet. Das Sortieren der transfizierten Zellen war notwendig, da Oli-neu Zellen nur eine geringe Transfektionseffizienz von 10% aufweisen und diese Effizienz nicht ausreicht, um eine reale Reduktion des AIF Proteins in einzelnen, transfizierten Zellen zu ermitteln. Nach der Zellsortierung von GFP-transfizierten Zellen wurden die Proben lysiert und mit dem Gesamt-Proteinextrakt ein Western Blot gegen das AIF Protein durchgeführt. In Abbildung 35*A* ist dargestellt, das die siRNA gegen das AIF1 Transkript mit einer 0,31 fachen Reduktion des AIF Proteins am besten zu funktionieren schien. Im Vergleich dazu wird in der AIF knock-down Harlequin-Maus das AIF Protein auf das maximal 0,2fache gesenkt[58]. Ein vollständiges Blockieren des AIF Proteins würde in den Zellen zur Lethalität führen[58].

Um die Auswirkungen des AIF knock-downs in ActA-behandelten Oli-neu Zellen zu untersuchen, wurden Zellen mit der siAIF1 oder einer non-sense siRNA als Kontrollprobe für 2 Tage transfiziert. Nach einer 20 stündigen Behandlung mit ActA oder TGF-β1 wurden die Zellen fixiert. Nach der Fixierung erfolgte eine TUNEL Färbung zur Ermittlung fragmentierter und somit apoptotischer Zellen. Für die Auswertungen wurden GFP positive

Zellen gezählt (Abbildung 35*C*). In Abbildung 35*B* ist die Zählung graphisch dargestellt und zeigt, dass ein AIF knock-down die ActA-vermittelte Apoptose reduzierte. Im Vergleich dazu hatte der AIF knock-down keine Auswirkungen auf die TGF-β-vermittelte Apoptose. Mit diesen Ergebnissen wurde die Involvierung von AIF in der ActA-induzierten Apoptose bestätigt und gleichzeitig die AIF-Abhängigkeit des apoptotischen ActivinA Signalweges gezeigt.

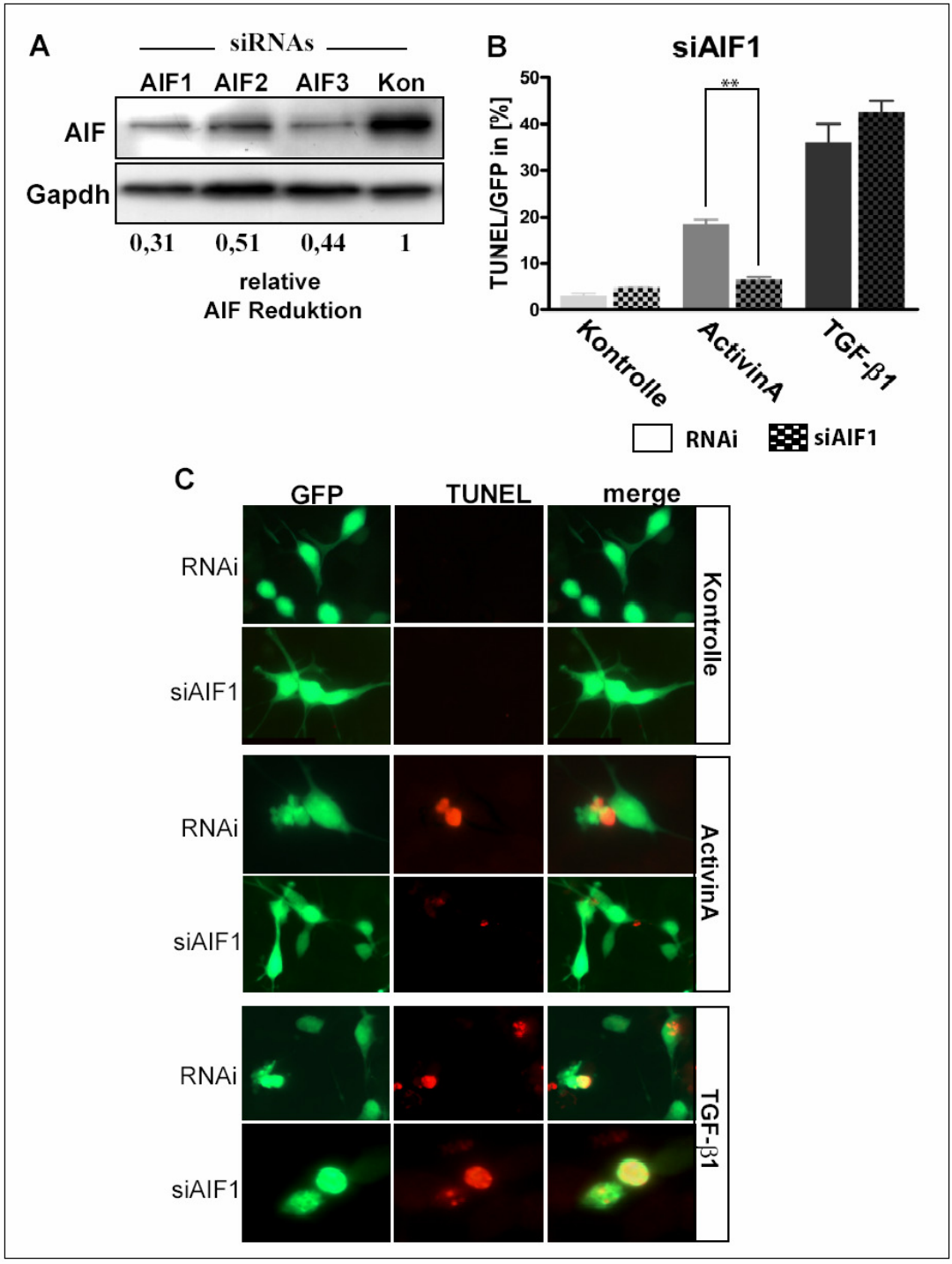


Abbildung 35: Die AIF-Abhängigkeit in der ActA-vermittelten Apoptose.

(A) Überprüfung der Funktionalität verschiedener siRNA Transkripte gegen AIF. Verschiedene GFP-gekoppelten siRNA antisense-Sequenzen gegen das AIF Transkript (siAIF1, siAIF2 und siAIF3) wurden in Oli-

neu Zellen transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Nach der Sortierung von GFP-positiven Zellen wurden diese lysiert und Gesamt-Proteinextrakt für einen WB mit einem AIF-Antikörper gewonnen. Gapdh diente als Ladekontrolle.

(B) Graphische Darstellung der immunzytochemischen Analyse apoptotischer Zellen mit anschließender Zählung *(C)*. Mit $^{**}P<0.01$ ist die statistische Signifikanz angegeben, die über den Student´s *t*-test ermittelt wurde. Die angegebenen Standardabweichungen stehen für ±SEM jeweils zwei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmungen.

(C) Immunzytochemische Analyse apoptotischer Zellen mittels TUNEL Technologie. Oli-neu Zellen wurden mit dem siAIF1 Transkript und einem non-sense Transkript als Kontrolle für 2 Tage transfiziert. Die anschließende Behandlung mit 50ng/ml ActA oder 5ng/ml TGF-β1 erfolgte für 20 Stunden. Nach der Fixierung der Proben wurde eine enzymatische TUNEL Färbung durchgeführt. Für die Auswertung wurden GFP positive Zellen gezählt. Im Gegensatz zu TGF-β-behandelten Proben wurde die ActA-induzierte Apoptose durch den AIF knock-down reduziert.

2.7. Calpaine sind nicht in der ActA-induzierten Apoptose beteiligt

Eine Regulation des AIF Proteins wird oft in Verbindung mit Mitgliedern der Bcl-2 Familie gebracht, da AIF aktiv aus dem Mitochondrium entlassen werden muss. Des Weiteren spielen Calpaine eine bedeutende Rolle bei der AIF-Freilassung aus dem Mitochondrium[58,95]. Eine Involvierung der Bcl-2 Familie wurde vorerst in der ActA-induzierten Apoptose ausgeschlossen und somit richteten sich die nächsten Versuche auf eine mögliche Aktivierung der Calpaine. Zudem ist die Calpain-vermittelte AIF-Freisetzung ein Caspase-unabhängiger Prozess[54,58,96] und verstärkte damit die Möglichkeit einer Calpain-involvierten Apoptose durch ActinvinA, da hier die Aktivierung von Effektorcaspasen ausblieb. In der TGF-β-induzierten Apoptose wurde keine Calpainaktivierung ermittelt[87], welches ein weiteres Argument auf eine mögliche Calpain-Involvierung im ActA Signalweg als Unterschied in den Signalweiterleitungen bedeutete. Letztendlich stellen die Calpaine ein Möglichkeit in der AIF-Freisetzung aus dem Mitochondrium dar.

Um die Relevanz der Calpainaktivierung in der ActA-induzierten und TGF-β1-induzierten DNA-Fragmentierung zu untersuchen, wurden Oli-neu Zellen mit einem Calpain Inhibitor für 2 Stunden vorbehandelt. Die Zugabe von 50ng/ml ActA oder 5ng/ml TGF-β1 als Vergleichsprobe erfolgte für 20 Stunden. Mit der PI-FACS-Analyse wurde die Anzahl apoptotischer Kerne in ko-behandelten Proben vergleichend zu allein mit den Zytokinen behandelten Proben gemessen. Die Abbildung 36*B* zeigt, dass der Calpain Inhibitor nicht die ActA-induzierte Apoptose verhinderte.

Zur Bestimmung der Calpainaktivität in ActA-behandelten Proben wurde die Aktivierung dieser spaltenden Proteasen mittels Substratumsetzung gemessen (*Material und Methoden*, Abschnitt 2.5.4.). Dazu wurde ein Calpain-spezifisches Substrat mit den dazugehörigen in

Tabelle 8 (*Material und* Methoden) angegebenen Puffer eingesetzt. Aus Abbildung 36*B* geht hervor, dass keine Aktivierung der Calpaine in der ActA-vermittelten Apoptose auftrat. TGF-β Proben wurden zum Vergleich mitgeführt. Mit NGF-behandelte PC12 Zellen und mit STS-behandelte Oli-neu Zellen dienten als Positivkontrolle der Calpainaktivitätsmessungen.
Diese Ergebnisse zeigten keine Involvierung der Calpaine in den ActA-vermittelten Signalwegen auf.

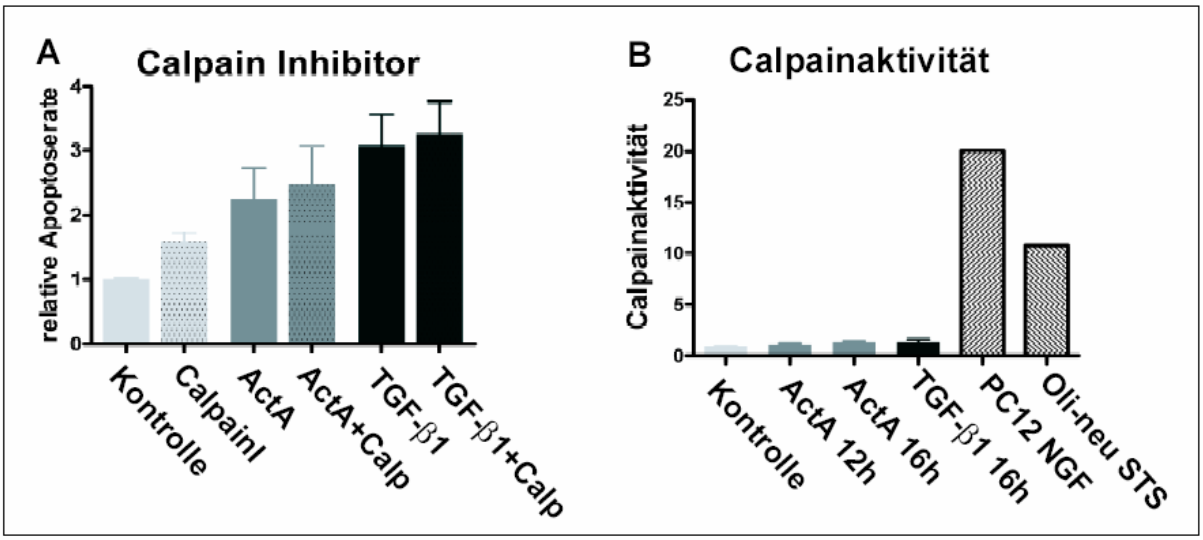


Abbildung 36: Calpaine spielen keine Rolle in der ActA-vermittelten Apoptose.

(A) PI-FACS-Analysen mit einem Calpain Inhibitor in der ActA-induzierten Apoptose. Oli-neu Zellen wurden für 2 Stunden mit einem Calpain Inhibitor vorbehandelt. Die Zugabe von 50ng/ml ActA oder 5ng/ml TGF-β1 erfolgte für 20 Stunden. Die Proben wurden geerntet, fixiert und die Zellkerne mit Propidiumjodid (PI) angefärbt. Durchflusszytometrischen Messungen ergaben keine Reduzierung apoptotischer Zellen durch den Calpain Inhibitor in der ActA-induzierten Apoptose. TGF-β-Proben dienten als Vergleichsprobe.

(B) Substratmessungen zur Bestimmung der Calpainaktivität nach einer ActA Behandlung. Oli-neu Zellen wurden mit 50ng/ml ActA zu verschiedenen Zeitpunkten behandelt. Zum Vergleich wurden TGF-β1-behandelte Proben mitgeführt. Als Positivkontrolle der Calpainaktivierung dienten NGF-behandelte PC12 Zellen und STS-behandelte Oli-neu Zellen. Nach der Lyse der Zellen wurde die Konzentration des Gesamt-Proteinextrakts bestimmt und äquivalente Mengen für die fluorometrischen Substratumsetzungen eingesetzt. Die angegebenen Standardabweichungen stehen für ±SEM von jeweils zwei unabhängigen Experimenten mit Doppelmessungen. Die unbehandelte Kontrolle wurde gleich eins gesetzt und mit den jeweiligen behandelten Proben verglichen.

V. Diskussion

1. Die TGF-β-induzierte Apoptose

Während der Ontogenese eines vielzelligen Organismus werden viel mehr Zellen produziert als später für die Funktion der Organe benötigt werden. Im Verlauf der Entwicklung wird daher die Zellzahl über den fest verankerten programmierten Zelltod, auch Apoptose genannt, auf das richtige Maß korrigiert. Neuronale und gliale Zellen werden ebenfalls während der Ontogenese in Überzahl produziert, um anschließend teilweise wieder abgebaut zu werden. Fehler in dem ontogenetischen Zelltodsystem führen zu fatalen und auch lethalen Fehlbildungen eines Organismus. Die multifunktionellen, stark kontext-abhängigen TGF-βs sind während den ontogenetischen Zelltodphasen in vielen Neuronenpopulationen exprimiert[8,10] und spielt in den apoptotischen Prozessen während der ontogenetischen Entwicklung eine bedeutende Rolle[78]. Hinweise darauf geben vor allem Untersuchungen an der sich entwickelnden Retina von *Mus musculus* und *Gallus gallus*[79-82]. Molekulare Einblicke in die TGF-β-induzierte Apoptose in neuralen Zellpopulationen gibt die oligodendrogliale Vorläuferzelllinie Oli-neu. In Folge einer TGF-β Behandlung gehen die Oli-neu Zellen, genau wie primäre, unreife Oligodendrozyten, in den G1-Arrest und später in Apoptose. Dabei werden die TGF-β-spezifischen Smad-Signalproteine verstärkt aktiviert und die Expression des anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitgliedes *Bcl-xl* herunterreguliert. Die Caspase-3 Aktivierung ist dabei abhängig von der Aktivierung der Caspase-8 und Caspase-9. Die Aktivität der anti-apoptotischen ERK Kaskade wird TGF-β-vermittelt verringert[85,87] (*Einleitung*, Abschnitt 3.2.).

1.1. TGF-β und die Bcl-2 Familie

Eine TGF-β Behandlung von Oli-neu Zellen sowie in der Retina von *Gallus gallus* führt zu einer verminderten Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedes *Bcl-xl*[80,87]. TGF-β-vermittelte Regulationen von verschiedenen Mitgliedern der Bcl-2 Familie, sowohl der anti-apoptotischen „Bcl-2 Subfamilie“ als auch der pro-apoptotischen „Bax Subfamilie“, sind in nicht-neuronalen Zellmodellen hinreichend bekannt[23,24] (*Einleitung*, Abschnitt 3.3.). Dabei sind Mitglieder der pro-apoptotischen „BH3-only Subfamilie“ Antagonisten für Bcl-xl und bewirken eine Neutralisierung der anti-apoptotischen Bcl-xl Funktion. Die Hemmung der Funktion führt zu einem Ungleichgewicht von anti- und pro-apoptotischen Regulatoren am Mitochondrium und damit zu Porenbildungen in der Membran[31,53]. Einige BH3-only Proteine

sind in nicht-neuralen Zellmodellen durch TGF-β reguliert, wie Bid, Bim, und Bmf[23,50]. Daher wurde im Zuge dieser Doktorarbeit verstärkt nach einer möglichen TGF-β-induzierten Aktivierung bekannter BH3-only Proteine in der Oli-neu Zelllinie gesucht, die eine Bcl-xl Regulation bewirken könnten. Dabei wurde gezeigt, dass die BH3-only Proteine *Bad, Bid, Blk, Bim, Hrk, BNip3, BNip3L* und *Puma* in unserem neuralen Vorläufermodell exprimiert wurden. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen an oligodendroglialen Ratten-Primärkulturen überein. Hier wurden ebenfalls die mRNAs der BH3-only Mitglieder *Bad, Bid, Blk, Bim, Hrk, BNip3, BNip3L* und *Puma* im Vorläuferstadium exprimiert[97]. Weitere Untersuchungen der BH3-only mRNAs in den Oli-neu Zellen brachten keine TGF-β-vermittelten Induktionen zum Vorschein. Über weiterführende Analysen der BH3-only Proteinexpressionen und Proteinmodifikationen wurde eine Beteiligung bekannter BH3-only Proteine in der TGF-β-induzierten Apoptose in unserem Modell ausgeschlossen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass ein noch nicht identifiziertes BH3-only Protein eine Funktion in der TGF-β-vermittelten Bcl-xl Regulation in unserem Zellmodell ausüben kann. Des Weiteren können Faktoren unabhängig von der Bcl-2 Familie in der TGF-vermittelten Apoptose eine Rolle spielen. Somit wurde nach Interaktionspartnern von Bcl-xl in Bezug zu TGF-β gesucht.

Viele Mitglieder der Bcl-2 Familie wurden über Yeast-Two-Hybrid Systeme entdeckt. Der Nachteil daran ist jedoch die Signalunspezifität. D.h. man kann hier zwar nach Interaktionspartnern von einem gewünschten Zielprotein suchen, nicht aber unter Bedingungen von bestimmten Signalfaktoren. Interactomstudien im Kontext einer bestimmten Signalabhängigkeit wird durch das Einsetzen von behandeltem Gesamt-Proteinextrakt erreicht, welcher in Pulldown-Verfahren mit getaggten Zielproteinen eingesetzt wird. Eine Identifizierung von bindenden Kandidaten ist meist nur durch massenspektrometrische Analysen möglich.

1.2. TGF-β und das Zytoskelett

Nachdem eine Involvierung bekannter BH3-only Proteine in der TGF-β-vermittelten Apoptose in den Oli-neu Zellen ausgeschlossen wurde, sollte nach neuen Interaktionspartnern von Bcl-xl mittels GST-Pulldown und anschließender massenspektrometrischer Sequenzierung in Abhängigkeit des TGF-β Signals gesucht werden. Die Untersuchungen brachten Komponenten des Zytoskeletts, nämlich nicht-muskuläres Myosin und zytosolisches Aktin, zum Vorschein. Viele Veröffentlichungen (Review von Gourley and Ayscough[66]) haben in den letzten Jahren gezeigt, dass Regulationen am und durch das Zytoskelett eine

bedeutende Rolle in apoptotischen Vorgängen spielen. Dabei aktivieren dynamische Veränderungen in den intrazellulären Skelettstrukturen sowie extrazelluläre Signale apoptotische Wege (*Einleitung*, Abschnitt 2.2.7.). Des Weiteren sind regulatorische Funktionen der Zytoskelettstrukturen in Bezug zu BH3-only Protein nachgewiesen. Die BH3-only Proteine Bim und Bmf werden inaktiv an den Dyneinketten festgehalten und können so nicht an ihre Wirkungsorte gelangen[48,49]. Auch der Transport neurotropher Faktoren an ihre Bestimmungsorte ist abhängig von dem Aktin-Myosin-Skelett[98].

Aufgrund der erzielten Hinweise des GST-Pulldowns und der Bedeutung des Zytoskeletts in der Apoptose[66] wurde Bcl-xl und die möglichen Interaktionspartner Aktin und Myosin weiter untersucht. PI-FACS-Analysen mit Inhibitoren der Myosin- und Aktinfunktion in Bezug auf die TGF-β-induzierte Apoptose zeigten allein für das Aktinskelett eine mögliche Funktion, da der Aktin Inhibitor CytochalasinD die TGF-β-induzierte Apoptose verringerte. Der Myosin Inhibitor Blebbistatin verhinderte die TGF-β-vermittelte Apoptose nicht.

Die Ergebnisse des GST-Pulldowns waren erste Vorergebnisse, die neue Hinweise lieferten. Um diese Hinweise zu bekräftigen, wurden immunpräzipitationen mit Antikörpern gegen zytosolisches Aktin und nicht-muskuläres Myosin bezüglich einer möglichen TGF-β-induzierten Bcl-xl Interaktion durchgeführt. Immunpräzipitationen sind spezifischer und genauer als ein GST-Pulldown. Hier werden die Proteine direkt über ihren Antikörper mitsamt ihren Interaktionspartnern präzipitiert werden. In Pulldown-Verfahren besitzen die Zielproteine einen langen Protein-Tagg, der oft unspezifische Bindungen und unnatürliche Konformationsänderungen des Fusionsproteins mit sich bringt. In den Immunpräzipitationen wurde erneut Myosin als eine TGF-β-regulierte Komponente ausgeschlossen, in Übereinstimmung mit den PI-FACS-Analysen. Somit war Myosin lediglich ein falsch positiver Interaktionspartner im GST-Pulldown, in Bezug auf den Myosin-Aktin-Komplex als eine Funktionseinheit. Für die Funktion von Aktin stellte sich über die immunpräzipitationen ein neuer Mechanismus in der Bcl-xl Regulation heraus.

1.2.1. Die Fraktin-Bcl-xl-Bindung als neuer Mechanismus in der Regulation von Bcl-2 Familienmitgliedern

Analysen mittels immunpräzipitationen zeigten eine TGF-β-vermittelte Bindung von Bcl-xl an das gespaltene Aktinfragment Fraktin in unserem oligodendroglialen Zellmodell Oli-neu. Diese Bindung der Zytoskelettkomponente Fraktin an ein Bcl-2 Familienmitglied oder anderen apoptotischen Faktoren wurde bis heute (Stand: September 2007) noch nicht gezeigt.

Das Auftreten des N-terminalen 32kDa Fraktins gilt jedoch als ein charakteristisches Merkmal für Apoptose in einigen neuralen Systemen[74]. In Hiranokörperchen,

stäbchenförmigen Einschlüssen, die überwiegend in neuralen pathologischen Prozessen im Hippocampus während Alterserscheinungen und auch in der Alzheimer Erkrankung (AD, engl: Alzheimer diesease) vorkommen, zeigen eine starke immunreaktivität gegen Fraktin[73]. In dopaminergen Neuronen tritt in verschiedenen Apoptosemodellen Signal-abhängig eine Aktinfragmentierung in Fraktin auf und unterstreicht damit die Involvierung von Fraktin als pathologischen Faktor in neuralen Erkrankungen[72]. Eine weitere Rolle für Fraktin in apoptotischen Vorgängen erscheinen in der Retina der Ratte. Hier führt die Glutamat-induzierte Apoptose zu einer Caspase-3-vermittelten Fragmentierung von Aktin in Fraktin[71]. Dabei konnte Fraktin noch keine Funktion in diesen Modellen zugeordnet werden. Unsere Ergebnisse weisen auf eine mögliche Funktion in der Bcl-xl Regulation durch die Fraktin-Bcl-xl Bindung in neuralen, apoptotischen Prozessen hin, allerdings in Abhängigkeit eines apoptotisch-wirkenden Zytokins und nicht in Bezug zu neuralen pathologischen Erkrankungen.

Allerdings wird der Zusammenhang zwischen neurodegenerativen Erkrankungen wie die Alzheimer Erkrankung (AD) und apoptotischen Vorgängen immer besser dokumentiert. Einerseits wird das Amyloid Vorläuferprotein (APP) durch Caspasen in das AD-spezifische Spaltprodukt Amyloid-β (Aβ) geschnitten und andererseits löst Aβ alleine Apoptose aus[99]. Der murine Caspase-3 knock-out Mausstamm ist zudem resistenter gegen neurodegenerativen Erkrankungen als der Wildtypstamm[100]. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der neurodegenerativen Erkrankung AD und dem apoptotischen TGF-β Modell wird detailliert im Abschnitt 1.4.2. diskutiert.

1.2.2. Die Caspase-vermittelte Aktinfragmentierung in Fraktin in der TGF-β-induzierten Apoptose

Tsuruo und Mitarbeiter konnten in voran gegangenen Studien zeigen, dass die Zytoskelettkomponente Aktin (42kDa) in Folge apoptotischer Prozesse zu den Aktinfragmenten Fraktin (32kDa) und tAktin (15kDa) geschnitten wird. Diese Spaltung findet durch Effektorcaspasen wie die Caspase-3 an einer hoch konservierten Schnittstelle für Caspasen statt[67,68,101] und ist durch die Caspasenabhängigkeit ein Charakteristikum der Apoptose. Dabei induziert das C-terminale 15kDa tAktin morphologische Veränderungen und ist am Mitochondrium lokalisiert[69,70]. Weitere regulatorische oder sogar apoptotische Funktionen von tAktin und Fraktin sind bis heute nicht bekannt.

Untersuchungen der Aktinfragmentierung zu Fraktin mit einem Fraktin-spezifischen Antikörper zeigten auch in unserem Zellmodell eine Abhängigkeit von den Caspasen. Allerdings schien die Caspase-3 keinen Einfluss auf die Aktinfragmentierung zu haben. Hier

fielen eher die Caspase-2 und Caspase-8 ins Gewicht. Die Caspase-2 kann sowohl als Substrat-spaltende Effektorcaspase als auch als Initiatorcaspase auftreten, während die Caspase-8 üblicherweise eine Initiatorcaspase ist und damit eher indirekt zur Aktinspaltung beitragen kann. In einem anderen Zellmodel ist neben der Caspase-3 auch die Caspase-1 in der Aktinfragmentierung involviert[93]. Unsere Untersuchungen mit Caspase-spezifische Inhibitoren zeigten, dass die Aktivierung der Caspase-2 und Caspase-8 eine Grundvorrausetzung für die Aktinfragmentierung mit anschließender Fraktin-Bcl-xl Bindung in den Oli-neu Zellen ist.

Mit dem Inhibitor CytochalasinD wurde gezeigt, dass ein funktionstüchtiges Zytoskelett unabdingbar für eine Aktinfragmentierung und die spätere Bindung von Fraktin an Bcl-xl ist. Der depolymerisierend wirkende Inhibitor der Aktinfunktion CytochalasinD (CytoD) wirkt vor allem an den schnellwachsenden Plus-Enden von F-Aktin und hemmt dadurch die weitere Polymerisation der Mikrofilamente. Am entgegengesetzten Ende erfolgt die Dissoziation von G-Monomeren und es erscheint eine Verkürzung des Polymers. Dadurch reduziert CytoD signifikant den F-Aktin-Gehalt und zerteilt Aktin in kürzere Abschnitte[102]. Durch diese Reduktion der Aktinfragmente kann durch eine Spaltung der Caspasen kein funktionstüchtiges Fraktin mehr entstehen. Die Funktionsweise von CytoD weist auf die Abhängigkeit der Funktionalität von Fraktin in dem Interaktionsprozess hin.

In dieser Doktorarbeit wurde zudem die zeitliche Abfolge der *Bcl-xl* Expression bzw. Repression untersucht. In Studien zum zeitlichen Ablauf der Aktinfragmentierung (8-14 Stunden) vergleichend zum Verlust der basalen Bcl-xl Proteinmengen (ab 12 Stunden) wurde aufgedeckt, dass die Aktinfragmentierung vor dem Verlust des Bcl-xl Proteins auftritt (siehe Abbildung 37).

Die Verringerung der *Bcl-xl* mRNA erschien nach 6 Stunden am stärksten und war nach 10 Stunden immer noch detektierbar. Die Proteinmengen von Bcl-xl reduzierten sich dagegen nach 12 Stunden in einem erheblichen Maße (Abbildung 37). In Anbetracht, dass das anti-apoptotisch wirkende Bcl-xl Protein in gesunden Zellen ein stark basal exprimiertes Protein ist und eine Halbwertzeit von weitaus mehr als 6 Stunden besitzt, kann man davon ausgehen, dass die Herunterregulation der *Bcl-xl* mRNA nicht der alleinige Grund der reduzierten Bcl-xl Proteinmengen nach einer TGF-β Behandlung ist. Daher wird angenommen, dass neben der Regulation der *Bcl-xl* Expression noch ein anderer Prozess zur Verminderung der Bcl-xl Proteinmengen beiträgt. So ein Prozess könnte eine Fraktin-induzierte Bcl-xl Proteindegradation sein, da auffällig ist, da der Beginn der Aktinfragmentierung und die Fraktin-Bcl-xl Bindung auf einen Zeitpunkt fallen, nämlich 8 Stunden.

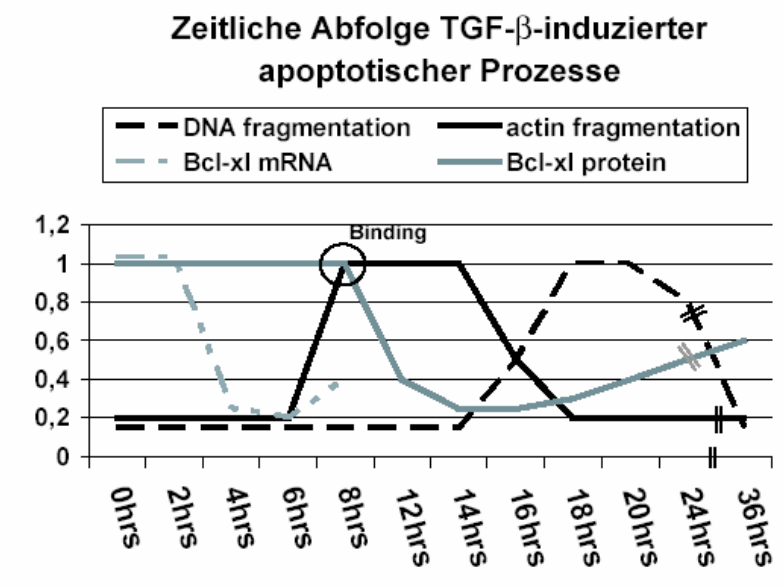


Abbildung 37: Überblick über TGF-β-induzierte apoptotische Prozesse.
Die Verringerung der Bcl-xl mRNA Expression erreicht ein Maximum nach 6 Stunden. Die Proteinmengen von Bcl-xl sind nach 12 Stunden reduziert. Die Aktinfragmentierung startet nach 8 Stunden. Zum gleichen Zeitpunkt erscheint die Fraktin-Bcl-xl Bindung Die Apoptose-spezische DNA-Fragmentierung ist der späteste Vorgang und beginnt nach 16 Stunden mit einem Maximum zwischen 18 und 22 Stunden. Nach 36 Stunden wird kein fragmentierter Zellkern mehr beobachtet.

1.2.3. Fraktin als neuer Regulator für Bcl-xl

Da in den Immunpräzipitationen eine TGF-β-abhängige Bindung von Fraktin an Bcl-xl gezeigt wurde, stellte sich die Frage, welche Funktion diese Bindung hat. Der gleiche Zeitpunkt des Beginns der Aktinfragmentierung und der Fraktin-Bcl-xl Bindung lässt auf eine mögliche Funktion von Fraktin in der Bcl-xl Regulation schließen. In der Bcl-2 Familie binden pro-apoptotische Proteine an anti-apoptotische Interaktionspartner um sie festzuhalten und abzuschirmen, und im Endeffekt deren Funktion zu neutralisieren[31]. Damit war die erste Funktion der Bindung von Bcl-xl an Fraktin vorgegeben. Allein dieser Prozess erklärte jedoch noch nicht die signifikante Reduktion der Bcl-xl Proteinmengen.

Analysen mit überexprimierten Fraktin und überexprimierten Bcl-xl in Oli-neu Zellen zeigten in Lokalisierungsexperimenten eine deutliche Kolokalisierung in Abhängigkeit von TGF-β. Diese Kolokalisierung erschien nicht in unbehandelten Proben und schloss eine zufällige Interaktion zwischen Fraktin und Bcl-xl als ein Epiphänomen aus. Im Kontrast dazu kolokalisierte überexprimiertes tAktin TGF-β-unabhängig mit Bcl-xl. Diese Kolokalisierung kann eher eine Folge der generell gleichen Lokalisierung von Bcl-xl und tAktin am Mitochondrium sein[70].

Eine Überexpression von Fraktin induzierte alleine keine Apoptose in der oligodendroglialen Vorläuferzelllinie Oli-neu. Stattdessen induzierte Fraktin eine Herunterregulation des Bcl-xl Proteins in Western Blot Experimenten. Diese Fraktin-induzierte Verringerung des Bcl-xl Proteins wies damit auf Fraktin als Degradationssignal für Bcl-xl hin und erklärte die starke

Abnahme der basalen Bcl-xl Proteinmengen nach 12 stündiger TGF-β Behandlung. Letztendlich verursacht eine Reduktion von basalen Bcl-xl Protein gekoppelt mit der Bcl-xl Repression ein Ungleichgewicht anti-apoptotischer und pro-apoptotischer Proteine am Mitochondrium und es kommt zu Porenbildungen an der mitochondrialen Membran. Dadurch werden Faktoren in das Zytosol entlassen, die wiederum weitere apoptotische Vorgänge in der Zelle einleiten[31,53].

Zusammenfassend kann mit den in dieser Doktorarbeit ermittelten molekularbiologischen Vorgängen in der TGF-β-induzierten Apoptose das Schema von Abbildung 9 „Überblick über TGF-β-abhängige Signalwege in Oli-neu Zellen“ erweitert werden. Wie in der Abbildung 38 dargestellt, sind in der TGF-β-induzierten Apoptose zwei Wege maßgeblich an der Reduktion des Bcl-xl Proteins beteiligt. Einerseits führt TGF-β zur Caspasen-abhängigen Aktinfragmentierung mit anschließender Fraktin-Bcl-xl Bindung und somit zur Bcl-xl Proteindegradation. Andererseits induziert TGF-β eine *Bcl-xl* mRNA Repression, wahrscheinlich über den Smad-Signalweg. Nicht veröffentliche Studien zeigten, dass die TGF-β-induzierte Apoptose abhängig von den Smad-Signalen verläuft (Krieglstein, persönliche Mitteilung). Letztendlich führen beide Prozesse, die *Bcl-xl* mRNA Repression und die Bcl-xl Proteindegradation, zum Verlust der basalen Bcl-xl Proteinmengen am Mitochondrium und damit zu weiterführenden apoptotischen Prozessen wie der Aktivierung der Caspase-9 und -3.

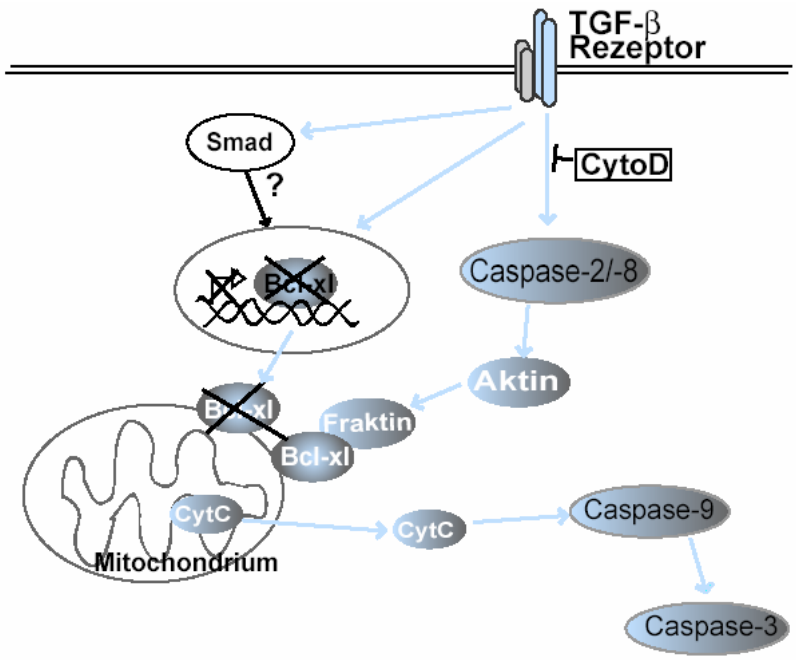


Abbildung 38: Überblick über die TGF-β-vermittelte Apoptose in der Zelllinie Oli-neu.

Eine TGF Behandlung führt zu mindestens zwei regulatorischen Mechanismen: (i) eine Caspase-2 und Caspase-8 abhängige Aktinfragmentierung mit anschließender Fraktin-Bcl-xl Bindung und (ii) einer *Bcl-xl* mRNA Repression. Die Fraktin-Bcl-xl Bindung inaktiviert die anti-apoptotische Bcl-xl Funktion und initiiert eine Bcl-xl Degradation. Die TGF-β-induzierte *Bcl-xl* mRNA Repression kann ein unabhängiger Prozess zur Bcl-xl Degradation sein. Beide Mechanismen führen zu einem Ungleichgewicht anti-apoptotischer und pro-apoptotischer Faktoren am Mitochondrium und es kommt zur CytC Freisetzung, welche zur Aktivierung der Caspase-9 und Caspase-3 führt.

1.2.4. Das Zusammenspiel der Bcl-xl Proteindegradation und der Bcl-xl mRNA Repression

Die Unabhängigkeit der beiden regulatorischen Prozesse der Bcl-xl Degradation und Bcl-xl Repression müsste im Zuge weiterführender Studien genauer untersucht werden. Des Weiteren müsste ermittelt werden, ob beide Prozesse eine kooperative Funktion haben oder ob eine alleinige Hemmung eines Prozesses zur Apoptose führen kann. Zurzeit deuten einige Hinweise auf ein Zusammenspiel der beiden Prozesse hin. Einerseits ist Fraktin allein nicht in der Lage Apoptose in den Oli-neu Zellen auszulösen. Somit deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die *Bcl-xl* mRNA Repression benötigt wird, um ein ausreichendes, apoptotisches Ungleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Faktoren am Mitochondrium zu erreichen. Um dies zu überprüfen, muss die transkriptionelle Regulation der *Bcl-xl* Repression gehemmt werden, ohne auf die basale Bcl-xl Proteinmenge einzuwirken. Mit siRNAs ist dies zum Beispiel nicht möglich, da hier der Effekt auch auf die basalen Bcl-xl Mengen wirken würde. Ein Inhibitor der Transkription wie Cycloheximid erscheint ebenfalls nicht sinnvoll, da viele andere Prozesse in den Zellen durch diese Inhibition gestört werden. Eine Überexpression von Bcl-xl wirkt ebenfalls wieder auf die basalen Proteinmengen.

Die Untersuchung der transkriptionell regulierten *Bcl-xl* mRNA Repression ist ein kritischer Punkt. In Untersuchungen der *Bcl-xl* Repression können die Smad-Signale mit einzogen werden. Eine Aktivierung des Smad-Signalweges führt immer zu transkriptionellen Regulationen im Zellkern, über die Aktivierung oder Repression verschiedener Zielgene[3]. Somit müsste zunächst geklärt werden, ob eine Hemmung des Smad-Signalweges zu einer Bcl-xl Degradation und/oder Bcl-x Repression führt. Kann eine Bcl-xl Degradation über den Smad-Signalweg ausgeschlossen werden, wäre die Inhibition des Smad-Signalweges eine alleinige indirekte Inhibition der transkriptionell regulierten Bcl-xl Repression. Erste Versuche mit eine viralen siRNA gegen Smad4 scheiterten jedoch. Weiterführenden Studien mit einer Hemmung der R-Smads wie Smad-2 oder Smad-3 könnten für eine sensitivere Reduzierung des Smad-Signalweges unternommen werden.

Die Überprüfung der Abhängigkeit der TGF-β-induzierten Apoptose von der Bcl-xl Degradation kann über CytochalasinD (CytoD), dem Inhibitor der Aktinfunktion möglich sein. Es wurde gezeigt, dass CytoD zu einer Verringerung der Bcl-xl Proteindegradation führt. Eine CytoD-vermittelte Inhibition der Aktinfunktion wirkte nicht auf die TGF-β-vermittelte Smad-Aktivierung (Daten nicht gezeigt). Damit wurde einerseits bewiesen, dass CytoD eine TGF-β Signaltransduktion in die Zelle zulässt und der TGF-β Signalweg über die Rezeptoren nicht gestört ist. Andererseits wurde demonstriert, dass der vorwiegend transkriptionell regulierende Smad-Signalweg nicht durch CytoD gehemmt ist. Das lässt darauf schließen, dass die *Bcl-xl* mRNA Repression ebenfalls nicht durch CytoD blockiert wird. Ein entsprechendes Experiment zur Ermittlung der *Bcl-xl* mRNA Expression nach einer CytoD Behandlung muss allerdings noch unternommen werden.

Letztendlich scheint eine alleinige Bcl-xl Degradation nicht zum Zelltod zu führen, da Fraktin allein keine Apoptose induziert. Allerdings ist es auch möglich, dass Bcl-xl eine TGF-β-induzierte Modifikation für eine Bindung an Fraktin benötigt, die in den Fraktin-Überexpressionsexperimenten nicht gegeben ist. Einen Anhaltspunkt dafür lieferte schon zuvor der GST-Pulldown im Vergleich zur Immunpräzipitation vom Fraktin-Bcl-xl Komplex. Im GST-Pulldown mit rekombinanten, unmodifizierten Bcl-xl Fusionsprotein konnte die Fraktinbindung nicht gezeigt werden. Allerdings hemmte CytoD nur zum Teil die TGF-β-induzierte Apoptose. Die Notwendigkeit bzw. eine Verstärkung der Apoptose durch die *Bcl-xl* Repression scheint damit wahrscheinlich zu sein.

Untersuchungen der Caspasen in der TGF-β-vermittelten *Bcl-xl* mRNA Repression müssen ebenfalls noch folgen. Eine offene Frage ist, ob die *Bcl-xl* mRNA Repression von Caspasen abhängig ist oder nicht. Wichtig wären hier vor allem Untersuchungen der Rezeptor-vermittelten Initiatorcaspase-8. Erste Ansätze, die Caspase-8 Expression in Oli-neu Zellen über eine virale siRNA zu blockieren, scheiterten jedoch. Hinweise auf eine Involvierung der Caspase-8 in den Prozessen der TGF-β-vermittelten *Bcl-xl* mRNA Repression und der Bcl-xl Proteindegradation gaben PI-FACS-Analysen mit einem Caspase-8 Inhibitor. Hier wurde die TGF-β-induzierte Apoptose vollständig mit dem Caspase-8 Inhibitor blockiert. Versuche mit einem Caspase-2 Inhibitor verringerte die TGF-β-vermittelte Apoptose nur. Somit kann spekuliert werden, dass die Caspase-8 an beiden Prozessen der *Bcl-xl* mRNA Repression und der Bcl-xl Proteindegradation beteiligt ist, während die Caspase-2 nur auf einen Prozess wirkt.

1.2.5. Der zelluläre Kontext der Fraktin-vermittelten Bcl-xl Regulation

Da die Untersuchungen der regulatorischen Prozesse an Bcl-xl in einer immortalisierten Zelllinie durchgeführt wurde, mussten die Ergebnisse an oligodendroglialen Primärkulturen bestätigt werden. Die durchgeführten Schlüsselexperimente, d.h. die Aktinfragmentierung, die Fraktin-Bcl-xl Bindung und der CytoD Effekt, zeigten eine eindeutige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Oli-neu Zelllinie.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Fraktin-induzierte Bcl-xl Regulation in einer lymphozytären Zelllinie, den RamosB Zellen[94], nicht statt findet. Hier konnte weder die Bindung von Fraktin an Bcl-xl noch der CytoD Effekt auf die TGF-vermittelte Apoptose bestätigt werden. Diese Ergebnisse weisen stark auf eine neurale Abhängigkeit der Fraktin-vermittelten Bcl-xl Degradation hin. Die Relevanz von Fraktin als neuraler apoptotischer Marker bekräftigt diese Hypothese (*Diskussion*, Abschnitt 1.2.1.). Untersuchungen an weiteren Zellmodellen, neural und nicht-neuraler Zellen, sollten jedoch folgen. Ein Problem stellt dabei die Auswahl an neuralen TGF-β-responsiven Zellmodellen dar (*Diskussion*, Abschnitt 1.2.6.).

Untersuchungen der Aktinfragmentierung und Fraktin-Bcl-xl Bindung in der Oli-neu Zelllinie in Bezug zu anderen apoptotischen Stimuli wurden mit dem allgemeinen apoptotischen Faktor Staurosporin unternommen. Auch in diesem Versuchansatz wurde kein CytoD Effekt in der TGF-β-vermittelten Apoptose gezeigt.

Zusammenfassend vermitteln die Untersuchungen in oligodendroglialen Oli-neu Zellen und in den primären Oligodendrozytenkulturen eine erste Abhängigkeit der Fraktin-Bcl-xl Regulation vom neuralen System.

1.2.6. Probleme in der Wahl TGF-β-responsiver neuronaler Zellmodelle für die Molekularbiologie

Molekularbiologische Untersuchungen lassen sich am besten in Zelllinien durchführen, da diese leicht zu handhaben sind und hohe Zellausbeuten zustande kommen. Dabei gibt es viele etablierte Linien aus allen Organen und Geweben eines Organismus. Einige Zelllinien müssen dabei nicht immortalisiert werden, da ihr Ursprungsgewebe stark proliferierend ist. Neuronale Zellen sind nicht mehr in der Lage zu proliferieren und so werden Zelllinien immortalisiert. Oft geschieht das im Zusammenhang mit spontan entstandenen Neuroblastomzellen eines Organismus, damit die spätere Zelllinie ihre Überlebensfähigkeit behält. Allerdings weisen Blastome bzw. embryonale Tumore starke Veränderungen in den zellulären Signalwegen auf, die oft auch Eingriffe in den Smad-Signalweg bedeuten. Daher ist es bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht gelungen, eine neuronale Zelllinie zu finden, die apoptotisch auf TGF-β

reagiert. Im Gegensatz dazu wurde in *in vivo* Experimenten der TGF-β-induzierte Zelltod während neuronalen ontogenetischen Entwicklungsphasen schon gezeigt (*Einleitung*, Anschnitt 3.1 und 3.2.). Die einzige neurale Zelllinie, in der Apoptose durch TGF-β induziert wird, ist die Oli-neu Zelllinie. Ihre Immortalisierung basiert auf die Überexpression der *neu*-Kinase und scheint nicht in die TGF-β Signalwege einzugreifen[103]. Allerdings ist diese Zelllinie oligodendroglialen Ursprungs und somit auch kein neuronales Modell.

Ein anderer, für molekularbiologische Experimente schwierigerer Weg, sind neuronale Primärkulturen. Aber auch hier gibt es Probleme in denen sich die starke Kontextabhängigkeit von TGF-β widerspiegelt. Neuronenpopulationen in denen *in vivo* eine TGF-β-abhängige Apoptose gezeigt wurde, sprechen im dissoziierten Zustand nicht mehr auf TGF-β an. Eine Lösung zur Erhaltung der Zellumgebung könnten Schnittkulturen sein. Der Umgang mit ihnen muss jedoch noch besser etabliert werden, da diese Art der Kultivierungen auch Schwierigkeiten mit sich bringt. Zudem sind die Zellausbeuten von Schnittkulturen wesentlich geringer im Vergleich zu einer Zelllinie.

Ein etabliertes, neuronales Primärmodell ist die sich entwickelnde Retina der Maus. Doch auch hier sind Zellausbeuten sehr gering. Zudem führt eine TGF-β Behandlung zu einer geringen Steigerung der Apoptose von 2-3%[79,81,82,86]. Um wirkliche Effekte identifizieren zu können, müssen deutlich höhere Apoptoseraten entstehen.

Somit bietet die Oli-neu Zelllinie im Moment die einzige praktikable Möglichkeit die TGF-β-vermittelte Apoptose in einem neuralen Kontext mit molekularbiologischen Methoden untersuchen zu können.

1.3. Charakterisierung des kontextuellen Umfelds von TGF-β

Die Funktion von TGF-β ist stark kontextabhängig. Dabei entscheiden der Zelltyp, das Zellstadium und die Umgebung, ob TGF-β das Überleben einer Zelle fördert, Differenzierungsprogramme in Gang setzt oder apoptotische Prozesse induziert. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Kontextualität des TGF-β-vermittelten Zelltods in Bezug zu kooperativ wirkenden, weiteren Faktoren untersucht. Für TNF-α wurde ein kontextueller Zusammenhang zu TGF-β gezeigt. Hier führt eine Behandlung der Oli-neu Zellen mit beiden Faktoren zu einer Verstärkung der TGF-β-vermittelten Zelltodkaskade[85]. Im Zusammenspiel mit den BMPs lassen sich ebenfalls kooperative Effekte von TGF-β in neuronalen Modellen zeigen[86]. Darüber hinaus sind kooperativ oder synergistisch wirkende Effekte vieler anderer Faktoren mit TGF-β in nicht-neuralen und auch nicht-apoptotischen Modellen bekannt[4,23,24,104].

1.3.1. ActivinA als Apoptose-auslösender Faktor im neuralen System

ActivinA (ActA) wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit als ein weiteres Apoptose-auslösendes Zytokin in der oligodendroglialen Vorläuferzelllinie Oli-neu identifiziert. Eine apoptotische Funktion von Activinen im neuralen System wurde bis jetzt (Stand: September 2007) noch nicht gezeigt.

Die apoptotische Funktion von Activinen ist bisher allein in nicht-neuralen Systemen beschrieben worden, wie im Fortpflanzungssystem, im Immunsystem, in der Leberhomeostase und vor allem in der Tumorgenese. Im neuralen System fördert ActA das Überleben von Neuronenpopulationen in Folge von Schädigungen durch Ischämien, Hypoxien oder exzitotoxische Signale[18,19]. In der Retina von *Gallus gallus* ist ActA ein wirkungsvoller Regulator der neuronalen Differenzierung[20]. In einer humanen Neuroblastom-Zelllinie und in einer Phäochromozytom-Zelllinie wirken Activine wiederum neuroprotektiv[21]. Neurale apoptotische Funktionen von ActA waren bis jetzt unbekannt[12,14,22]. Damit zeigen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit erstmals eine Relevanz der ActA-induzierten Apoptose in einem neuralen Modell.

In unseren oligodendroglialen Vorläuferzellen induzierte ActA eigenständig Apoptose ohne dabei eine TGF-β Freisetzung zu vermitteln, die letztendlich zur TGF-β-induzierten Apoptose geführt hätte. Der ActRI (Alk4/7) Inhibitor SB431542 blockierte die ActA-induzierte Apoptose. Die Ergebnisse der Nicht-Freisetzung von TGF-β durch ActA und die Ergebnisse des ActRI Inhibitors bestätigten die eigenständige, apoptotische Induktion von ActA in unserem neuralen Modell. Nachteil des SB431542 Inhibitors ist, dass er auch den TβRI (Alk-5) inhibiert. Spezifischere Inhibitoren, die die verschiedenen TypI Rezeptoren selektiv blockieren, existieren nicht. Für weiterführende Studien wäre es wichtig die einzelnen Rezeptoren etwa über siRNAs zu blockieren.

Arbeiten an einem nicht-apoptotischen, neuronalen Modell zeigen, dass auch Activine synergistische oder kooperative Zusammenspiele wie TGF-βs eingehen. In primären Neuronenpopulationen wirkt ActA zusammen mit bFGF synergistisch auf die Entwicklung von Tyronsinhydroxylase-positive Neurone[105]. Kooperative Effekte von ActA im Zusammenspiel mit TGF-β blieben in unserem apoptotischen Zellmodell Oli-neu aus. Eine Ko-Behandlung der Oli-neu Zellen mit ActA und TGF-β zeigte lediglich die Apoptoserate von allein mit TGF-β behandelten Zellen auf. Somit stellte sich die Frage in welchen Signalwegen sich die ActA-induzierte und TGF-β-induzierte Apoptose unterscheiden und ob sich die Signalwege gegenseitig inhibieren können. Daher wurden nach der Identifikation von

ActA als extrinsischer Apoptose-auslösender Faktor in einem neuralen System die zell-intrinsischen Signalwege von ActA im Vergleich zu TGF-β untersucht.
In der Thymozytenselektion agieren TGF-βs und Activine in derselben Zellpopulation in Abhängigkeit des Zellstadiums[106]. Oli-neu Zellen sind in Kultur nicht zu 100% homolog, d.h. während der Kultivierung liegen verschiedene Vorläuferstadien vor. Die Oli-neu Zelllinie wurde mit den Markern NG2 und A2B5 für oligodendrogliale Vorläufer, S100 für gliale Vorläufer, GFAP für Astrozyten, O4 für Oligodendroblasten und Rip für post-mitotische Oligodendrozyten in Vorversuchen charakterisiert[87]. GFAP-positive Zellen wurden komplett ausgeschlossen. Zu einer sehr geringen Prozentzahl von unter 5% wurden Rip-positive Zellen gezählt und O4-positive Oligodendroblasten wurden mit einem ca. 20%igen Anteil ermittelt. Die größte Zellanzahl (über 70%) liegt bei den A2B5-positiven und S100-positiven Zellen[107]. NG2-positive Zellen wurden mit ca. 30%igen Anteil gezählt. Der Unterschied von NG2-positiven zu A2B5-positiven und O4-positiven Zellen zeigt klar, dass sich die Zellen in der Vorläuferzelllinie Oli-neu in verschiedenen Vorläuferstadien befinden. Morphologisch ist dies auch sichtbar. Bipolare O-2A Vorläuferzeller treten am häufigsten auf. Zellen mit drei bis vier kurzen Ausläufern und einige vereinzelte späteren Oligodendroblastenstadien sind in der Minderzahl vertreten. Daher ist ein interessanter Aspekt für weiterführende Studien zur Klärung des kontextuellen Zusammenhangs von ActivinA und TGF-β eine Untersuchung der Apoptose in Bezug auf die Vorläuferstadien der Oli-neu Zellen. Zudem kann die verstärkte Differenzierung der Oli-neu Zellen in Richtung der Oligodendroblasten induziert werden. Daher wären Untersuchungen der TGF-β- und ActA-vermittelten Apoptose im Hinblick auf überwiegend spätere Zellstadien interessant.

1.3.2. Rezeptor-/Ligandenbindungen und die Smad-vermittelten Signale

Obwohl ActA und TGF-β sehr verschiedene Funktionen in der Entwicklung eines Organismus übernehmen, sind ihre Signalwege aufgrund der gleichen Familienangehörigkeit sehr ähnlich. Der Smad-Signalweg war in ActA-behandelten Oli-neu Zellen deutlich aktiviert. Diese Aktivierung wurde durch den ActRI Inhibitor aufgehoben. Damit zeigt sich ebenfalls in unserem neuralen Zellmodell die starke Konservierung der Signalwege innerhalb der Mitglieder der TGF-β Superfamilie[14]. Eine detaillierte Untersuchung in Bezug zu den verschiedenen regulatorischen Smad-Proteine blieb bis jetzt aus. Die Rezeptor-/Ligandenbindung kann jedoch auch in unserem Modell schon Unterschiede in der ActA-vergleichend zur TGF-vermittelten Apoptose induzieren. Die ActA- und die TGF-β-vermittelte Apoptose kann durch mehreren R-Smads in Abhängigkeit der Rezeptortypen gesteuert werden[3,12]. Des Weiteren wären Rezeptorblockierungen durch siRNAs gegen die

Activin Rezeptoren, sowie gegen die TGF-β Rezeptoren auch im Hinblick auf Untersuchungen an den R-Smads sinnvoll. Genauere Rezeptor-Expressionsanalysen der verschiedenen Rezeptortypen in Oli-neu Zellen wären vor der Herstellung solcher siRNA Zellkulturen wichtig.

Derynck und Zhang[3] verweisen auf die Unterschiede in der Signalweiterleitung in Abhängigkeit von der Rezeptor-/Ligandenbindung und den nachfolgenden R-Smad Regulationen innerhalb der TGF-β Superfamilie. Kombinatorische Interaktionen der tetrameren Rezeptorkomplexe erlauben dabei verschiedene Ligandenbindungen oder verschiedene Signalwege durch den gleichen Liganden. Diese Diversität kommt jedoch verstärkt bei den Rezeptoren der ‚BMP Subfamilie' vor. Die typischen Activin Komplexe ActRIIB-Alk-4, ActRIIB-Alk-7, ActRII-Alk-4 und der klassische TGF-β Komplex TβRII-Alk-5 binden dabei nur ihre eigenen Zytokine. Allerdings binden die Activine auch ohne die TypI Rezeptoren an den ActRII oder den ActRII. In dieser Doktorarbeit wurde nicht auf die Komplexität der Rezeptor-/Ligandenbindung und deren Signalweiterleitungen eingegangen. Auch wurden keine Studien zu regulierenden Rezeptor-assoziierten Proteinen durchgeführt. Genauere Untersuchungen der verschiedenen Bindungen könnten jedoch mit der FRET-Technik unternommen werden, um regulatorische Unterschiede der ActA-induzierten im Vergleich zur TGF-β-induzierten Apoptose aufzudecken.

1.3.3. Untersuchungen an klassischen Apoptose-induzierenden Faktoren

In der TGF-β-vermittelten Apoptose wird das Bcl-xl Protein auf transkriptioneller[87] und post-translationeller Ebene (diese Arbeit) reguliert. Daher wurde Bcl-xl als anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie genauer auf seine mRNA Expression und auf Proteinebene in ActA-behandelten Oli-neu Zellen untersucht. Transkriptionelle Regulationen an *Bcl-xl* durch ActA konnten jedoch in unserem Modell ausgeschlossen werden. Auch erfolgte keine Verminderung der Bcl-xl Proteinmengen. Weitere Untersuchungen der mRNA Expression von Bcl-2 Familienmitgliedern wie *Bcl-2, Bax* und *Bak* brachten ebenfalls keine transkriptionellen Regulationen zum Vorschein. Allerdings sollten diese wichtigen anti- und pro-apoptotischen Faktoren sowohl auf der Ebene der Proteinexpression als auch auf post-translationeller Ebene zum endgültigen Ausschluss analysiert werden, da diese Mitglieder neben transkriptionellen Regulationen sehr stark post-translationell reguliert sind[31,41,53]. Zudem sind Regulationen von Bcl-2 Familienmitgliedern durch ActA in nicht-neuralen Zellmodellen hinreichend bekannt[12]. Letztendlich bedeutete der Ausschluss der transkriptionellen *Bcl-xl* Repression und die gleich bleibenden Bcl-xl Proteinmengen in der

ActA-induzierten Apoptose einen ersten Unterschied zur TGF-β-induzierten Apoptose in unserem Zellmodell.

Die Caspasenfamilie ist in der TGF-β-vermittelten Apoptose mit den Caspasen-8, -9 und -3[24,80,85,87] und der Caspase-2 (diese Arbeit) stark involviert. In der ActA-vermittelten Apoptose wurde nur eine Aktivierung der Initiatorcaspase-2 und -8 ermittelt. Signifikante Aktivierungen der Effektorcaspase-3 und -9 blieben aus. Die Nicht-Aktivierung der post-mitochondrialen Effektorcaspase-9 korreliert jedoch mit der Nicht-Regulation von Bcl-2 Familienmitgliedern wie Bcl-xl (*Einleitung*, Abschnitt 2.2.2. und 2.2.3.). Welchen Funktionen die Caspase-2 und Caspase-8 in der ActA-vermittelten Apoptose nachgehen, ist noch nicht geklärt. Es ist ebenfalls noch nicht untersucht, ob eine Hemmung der einzelnen Caspasen vor einer ActA-vermittelten Apoptose schützen kann. Die Inhibition aller Caspasen mit dem pan-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK verhinderte jedoch in unserem Modell den ActA-induzierten Zelltod.

Da in der ActA-induzierten Apoptose im Gegensatz zur TGF-β-induzierten Apoptose keine Effektorcaspasen zur Initiierung der bestätigten DNA-Kondensation bzw. Fragmentierung aktiv waren, musste ein anderer Faktor für die Einleitung der DNA-Degradation innerhalb apoptotischer Prozesse verantwortlich sein.

1.3.4. Activin aktiviert den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF)

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Involvierung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) in der ActA-vermittelten Apoptose aufgedeckt. Im Gegensatz dazu blieb die AIF Aktivierung in der TGF-β-vermittelten Apoptose aus und belegt die unterschiedlichen intrazellulären Signalweiterleitungen in der ActA-induzierten und TGF-β-induzierten Apoptose. Diese Ergebnisse zeigten zudem erstmals eine AIF Involvierung in der Activin-vermittelten Apoptose. Eine Aktivierung von AIF durch Activine wurde bis jetzt (Stand: September 2007) in keinen Zellsystem dokumentiert[12].

Die AIF-involvierende Apoptose wird oft als Apoptose-ähnlicher, weil Caspase-unabhängiger, Weg bezeichnet, da die meisten Studien beschreiben, dass eine AIF Freisetzung keine Caspaseaktivität benötigt[95]. Neuere Studien belegen jedoch eine Involvierung von frühen Caspasen wie die der Caspase-2[108,109]. Auch in unserem Modell wurde über PI-FACS-Analysen und dem pan-Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK gezeigt, dass die ActA-induzierte Apoptose Caspasen-abhängig ist. Allerdings wurde die Caspasenabhängigkeit noch nicht im direkten Zusammenhang über die AIF Translokalisierung in den Kern gezeigt. Dieses Experiment ist allerdings notwendig um die Caspasen eindeutig in die ActA-vermittelte AIF Regulation zu integrieren. Ein viel

versprechendes Indiz dafür ist die Caspase-2 Aktivität in der ActA-vermittelten und AIF-involvierenden Apoptose in unserem Zellmodell.

Für den eingesetzten pan-Caspase Inhibitor ist gezeigt worden, dass er auch die Calpaine inhibiert und daher oft eine falsche „Caspasenabhängigkeit“ suggeriert[58,95]. Deshalb müssen die Involvierung der Caspasen mit spezifischen Inhibitoren gegen die einzelnen Caspasen, siRNA gegen Caspasen oder aber die Calpaine gesondert untersucht werden.

Die Oli-neu Zellen wurden wegen zwei Aspekte auf eine Calpainaktivität überprüft. Einerseits erfolgte die Untersuchung wegen der obigen angesprochenen Unspezifität des Z-VAD-FMK Inhibitors und zum anderen wegen der möglichen AIF Spaltung durch Calpaine (*Einleitung*, Abschnitt 2.2.4.). Da in unseren ActA-induzierten Oli-neu Zellen keine Regulation der porenbildenen Bcl-2 Familie auftrat, stellte sich die Frage, wie AIF aus dem Mitochondrium entlassen werden kann. Für die Calpaine ist eine Funktion in der AIF Freisetzung aus dem Mitochondrium gezeigt worden[54]. PI-FACS-Analysen mit einem Calpaininhibitor und Messungen der Calpainaktivität mittels Substratmessungen schlossen jedoch eine Involvierung der Calpaine in der ActA-vermittelten Apoptose in unserem Zellmodell aus. Daher blieb die Frage bestehen, wie AIF in der ActA-vermittelten Apoptose aus dem Mitochondrium entlassen wird. Da Mitglieder der Bcl-2 Familie immer wieder im Zusammenhang mit der mitochondrialen Porenbildung zur Freisetzung von AIF in Erscheinung treten[95], sollte diese Familie nochmals genauer im Hinblick auf ActA untersucht werden (*Diskussion*, Abschnitt 1.3.3.).

Die Frage der Caspasenabhängigkeit durch den Z-VAD-FMK Inhibitor wurde durch die Untersuchung an den Calpainen geklärt. Da Calpaine in der ActA-vermittelten Apoptose nicht aktiv sind, kann von einer Caspasen-abhängigen ActA-induzierten Apoptose ausgegangen werden. Bestätigende Experimente wie oben beschrieben sind aber zusätzlich nötig. Diese Ergebnisse bestätigen neueste Studien, in denen AIF abhängig von Initiatorcaspasen aktiviert wird[58,108,109].

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen, dass die ActA- und TGF-β-vermittelte Apoptose über zwei verschiedene Signalwege gesteuert wird (Abbildung 39). Die Hauptfrage, durch welche Signale eine Trennung der ActA-induzierten Apoptose von der TGF-β-induzierten Apoptose zustande kommt, wurde bis jetzt nicht geklärt. Die vielfältigen, apoptotischen Regulationen lassen noch viele Möglichkeiten für weitere Untersuchungen zu, durch die geklärt werden kann, warum Oli-neu Zellen zwei verschiedene apoptotische Regulationswege benötigen.

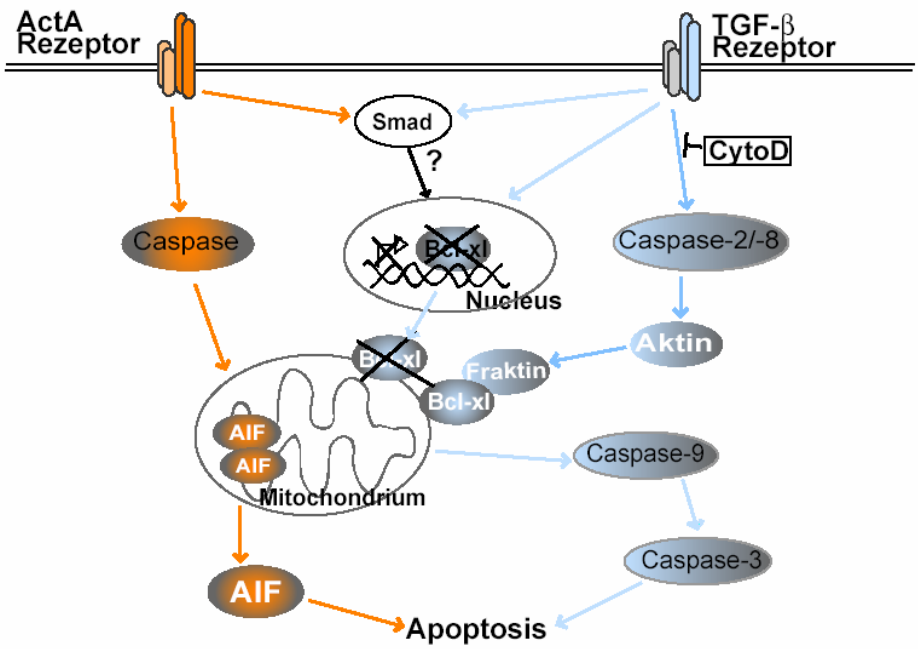


Abbildung 39: Vergleich der TGF-β-vermittelten und ActA-vermittelten Apoptose in der Zelllinie Oli-neu.

Eine TGF Behandlung führt zur Caspasen-abhängigen Aktinfragmentierung mit anschließender Fraktin-Bcl-xl Bindung, welche die anti-apoptotische Bcl-xl Funktion inaktiviert und eine Bcl-xl Degradation initiiert. Gleichzeitig wird die *Bcl-xl* mRNA reprimiert und der Smad-Signalweg aktiviert. Die Fraktin-Bcl-xl Bindung und die *Bcl-xl* mRNA Repression führen zusammen zu einem Ungleichgewicht anti-apoptotischer und pro-apoptotischer Faktoren am Mitochondrium und es kommt somit zur Aktivierung der Caspase-9 und Caspase-3. Die ActA-induzierte Apoptose ist ebenfalls abhängig von den Caspasen, den Initiatorcaspasen. In der ActA-vermittelten Apoptose kommt es anstatt zur Caspase-3 Aktivität zu einer Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium. Mitglieder der Bcl-2 Familie sind nicht in der AIF Freisetzung involviert.

1.4. Die Relevanz der TGF-β- und der ActA-vermittelten Apoptose

Für die Fragestellung, warum die Zellen zwei Apoptosewege benötigen, wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt: (i) kooperierende und Apoptose-verstärkende Effekte, (ii) Kompensierung von Fehlern in den Apoptosewegen und (iii) Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Oli-neu Zellen.

Die erste Möglichkeit eines verstärkenden Effekts von ActA und TGF-β wurden durch unsere Ergebnisse ausgeschlossen, obwohl beide Zytokine dafür bekannt sind, stark kontextabhängig mit anderen Faktoren zu kooperieren[2,10,11,24,104].

Die nächste Möglichkeit ist die gegenseitige Kompensierung bei Fehlern oder Ausfällen in den apoptotischen Signalwegen. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssen zunächst die TGF-β-vermittelten und die ActA-vermittelten Apoptosewege geklärt werden. Vorallem

sollten die regulatorischen Unterschiede bzw. der Trennungspunkt der Signalweiterleitungen gesucht werden. Falls der Trennungspunkt schon auf der Ebene der Rezeptor-/Ligandenbindungen und den Smad-vermittelten Signalen liegt, wäre diese Untersuchung vorab am sinnvollsten, da hier sehr frühe, regulatorischen Entscheidungen getroffen werden[3]. Eine Bindung von Activin an die TGF-β Rezeptoren und umgekehrt wurde bis heute in der Activin Subfamilie und der TGF-β Subfamilie nicht gezeigt und läßt mögliche Kreuzbindungen der Liganden an die Rezeptoren als unwahrscheinlich erscheinen[3].

1.4.1. Apoptotische Wege in Abhängigkeit des Zellstadiums

Eine weitere Hypothese, warum die Oli-neu Zellen zwei verschiedene apoptotische Wege über zwei verschiedene Liganden benötigt, ist die Abhängigkeit der apoptotischen Signale vom Entwicklungsstadium der Zelle. Die Abhängigkeit vom Zellstadium wäre die am besten zu untersuchende Hypothese. Wie schon in der Diskussion (Abschnitt 1.3.1.) beschrieben, sollte die ActA- und TGF-β-vermittelte Apoptose in Abhängigkeit des oligodendroglialen Zellstadiums der Oli-neu Zellen untersucht werden, da in den Oli-neu Kulturen verschiedene oligodendrogliale Vorläuferstadien auftreten.

Gerade in der Ontogenese treten Faktoren abhängig von anderen Faktoren, Zell-Zell-Kontakten, ihrer Extrazellulärmatrix und dem Entwicklungsstadium der Zellen selbst auf oder verschwinden. Dabei kann die Funktionstüchtigkeit der Zytokine innerhalb weniger Stunden durch eine veränderte Zellumgebung verloren gehen oder aktiviert werden. Daher ist es möglich, dass die Oli-neu Zellen zu völlig unterschiedlichen Zeitpunkten in ihrer Entwicklung von unterschiedlichen Apoptosewegen, wie den TGF-β-vermittelten Weg oder dem ActA-vermittelten Weg Gebrauch machen. Solche scharfen und punktgenauen Regulationen sind in der ontogenetischen Entwicklung, wo der gesamte Gen-Schatz und seine Auswirkungen in wenigen Tagen in *Mus musculus* abgerufen werden, unumgänglich für die Entwicklung zu einem gesunden Organismus. Ein Hinweis darauf können die unterschiedlichen Zeitpunkte der ActR- und TβR-Expressionen und ihrer Liganden sein. Die Activin TypII Rezeptoren (ActRII und ActRIIB) erscheinen schon kurz nach der Einnistung der Blastozyste[15]. Die β-Untereinheiten für die Bildung der späteren Liganden (Activin) liegen ebenfalls schon im sehr frühen Entwicklungsstadium der Blastozyste vor[17]. Für die Aktivierung der intrazellulären Signalwege benötigen die Activine jedoch auch ihre TypI Rezeptoren (Alk-4 und Alk-7), die ab den murinen Embryonaltagen 7-9 schwach exprimiert werden. Beide Activin TypI Rezeptoren sind am murinen Embryonaltag 12 in weiten Teilen des sich entwickelnden Nervensystem vertreten[15]. Eine Activin-Signalvermittlung kann damit frühestens ab dem Embryonaltag 6 und spätestens ab dem Embryonaltag 12 auftreten. Für den TGF-β Signalweg

kann frühestens ab dem murinen Embryonaltag 12,5 eine Aktivierung im sich entwickelnden Nervensystem stattfinden, da die neuralen TGF-β2 und-3 Isoformen erst ab diesem Entwicklungsstadium in neuralen Zellen exprimiert werden[6]. Die TGF-β Rezeptoren erscheinen früher als die Liganden in der murinen Entwicklung[2,6,104]. Damit weisen die unterschiedlichen Expressionsmuster für die Activin- und TGF-β-Signalweiterleitungen im Nervensystem auf eine Abhängigkeit der Signalwege vom Zellstadium hin.

1.4.2. TGF-β und die Alzheimer Erkrankung

Wie in der Diskussion (Abschnitt 1.2.1.) schon beschrieben, wird das in der TGF-β-vermittelten Apoptose produzierte Fraktin als Marker für neurale, pathologische Erkrankungen, unter anderem auch in der Alzheimer Erkrankung (AD)[73], gezeigt. TGF-β wird ebenfalls im Zusammenhang mit der Alzheimer Erkrankung gebracht. Ein charakteristischer, pathologischer Prozess in der AD ist die Spaltung des Amyloid Vorläuferproteins (APP) in das pathologische Amyloid-β (Aβ) Spaltprodukt und die Ablagerung und Anreicherung des Spaltproduktes in sogenannte Amyloidplaques. In der familiengebundene bzw. genetisch veranlagten AD (FAD) begünstigen Mutationen im APP die Spaltung in Aβ[99,110]. Neuere Studien belegen immer stärker eine nicht-genetische Komponente für die Spaltung von APP in Aβ durch apoptotische Prozesse[110] (*Diskussion*, Abschnitt 1.2.1.). Untersuchungen an AD Erkrankungen zeigen eine erhöhte Expression der TGF-β Rezeptoren im Gehirn und eine erhöhte Immunreaktivität in neuralen und glialen Zellen gegen TGF-βs in den Amyloidplaques[111]. Des Weiteren führt eine Überexpression von APP in einem APP-überexprimierenden Mausstamm zu einer erhöhten TGF-β Produktion in astroglialen Zellen. Die TGF-β Überproduktion führt wiederum zu einer Vermehrung des Aβ Spaltproduktes in Astrozyten, während eine Überexpression von APP und TGF-β zusammen eine Verstärkung der APP Spaltung in Aβ induziert[112,113]. Im Gegensatz dazu zeigen andere Studien in Astrozyten eine verstärkte APP Expression in Folge einer TGF-β Überexpression[111]. Der Zusammenhang zwischen TGF-β und der Alzheimer Erkrankung wird mit diesen Studien immer deutlicher.

Ein weiterer Zusammenhang zwischen TGF-β-vermittelten Regulationen, unserem Zellmodell und der AD kann über Bcl-xl gezogen werden. In AD-erkrankten Patienten wurde eine Regulation der *Bcl-xl* Expression gezeigt[114]. In den Oli-neu Zellen wird das Bcl-xl Protein über die TGF-β-induzierte Aktinfragmentierung in Fraktin reguliert (diese Arbeit), wobei Fraktin ebenfalls in AD Erkrankungen als eine Ablagerung in den Plaques auftritt[73].

Die Amyloidplaques treten vorwiegend in Neuronen und Astrozyten auf[99,110-113]. Einige Studien zeigen, dass sowohl verschiedene Isoformen von APP als auch das Aβ Spaltprodukt

in Oligodendrozyten exprimiert werden[115,116]. Dabei erfolgt die Expression auch unter definierten *in vitro* Kulturbedingungen[117]. Des Weiteren sind die Oli-neu Zellen O2A Vorläuferzellen und besitzen die genetische Veranlagung sich sowohl zu Oligodendrozyten als auch zu Typ II Astrozyten differenzieren zu können. TypII Astrozyten treten hauptsächlich in der grauen Hirnsubstanz auf, wo auch die Amyloidplaques im Vergleich zur weißen Substanz stärker vorkommen[116].

In unserem Oli-neu Zellmodell treten somit mehrere Komponenten auf, die auf apoptotischer Ebene in der Alzheimer Erkrankung beschrieben sind: (i) TGF-β, (ii) Fraktin und (iii) Bcl-xl. Ein direkter Zusammenhang zwischen der TGF-β-induzierten Apoptose und AD-spezifischen Prozessen in unserem Zellmodell Oli-neu wurde nicht gezeigt. Es könnte untersucht werden, ob eine TGF-β Behandlung auch eine APP Expression[118,119] in den Oli-neu Zellen induziert, um erste Anhaltspunkte für eine AD-bezogene Relevanz in unserem Zellmodell zu erzielen. Treten Zusammenhänge auf, wären auch die Oli-neu Zellen ein Zellmodell für die Auklärung AD-bezogener apoptotischer Prozesse innerhalb der TGF-β Signalwege.

VI. Literaturverzeichnis

1. Roberts, AB, Anzano, MA, Lamb, LC, Smith, JM and Sporn, MB, (1981) New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from nonneoplastic tissues. Proc Natl Acad Sci USA 78: 5339-5343.
2. Böttner, M, Krieglstein, K and Unsicker, K, (2000) The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. J Neurochem 75: 2227-40.
3. Derynck, R and Zhang, YE, (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature 425: 577-84.
4. Massague, J, (1998) TGF-beta signal transduction. Annu Rev Biochem 67: 753-791.
5. Roberts, AB and Sporn, MB, (1990) The transforming growth factor betas. in Handbook of Experimental Pharmacology 95: pp. 419-472, Springer Verlag, Heidelberg
6. Unsicker, K and Strelau, J, (2000) Functions of transforming growth factor-beta isoforms in the nervous system. Cues based on localization and experimental in vitro and in vivo evidence. Eur J Biochem 267: 6972-5.
7. Aigner, L, Winkler, J and Bogdahn, U, (2007) Schutz oder Neuaufbau: Neuroprotektive Effekte des Transforming Growth Factor-beta1 auf Kosten einer reduzierten Neurogenese? . Neuroforum 1: 4-12.
8. Krieglstein, K, Farkas, L and Unsicker, K, (1998) TGF-beta regulates the survival of ciliary ganglionics neurons synergistically with ciliary neurotrphic factors and neurotrophins. J Neurobiol 37: 563-572.
9. Krieglstein, K and Unsicker, K, (1996) Distinct modulatory actions of TGF-betas and LIF on neurotrophin-mediated survival of developing sensory neurons. Neurochem Res 21: 849-856.
10. Krieglstein, K, Henheik, P, Farkas, L, Jaszai, J, Galter, D, Krohn, K et al., (1998) GDNF requires TGF-beta for exerting its full neurotrophic potential on periphal and CNS neurons. J Neurosci 18: 9822-9834.
11. Krieglstein, K, (2006) Cell death in the nervous system. Adv Exp Med Biol 557: 1-10.
12. Chen, YG, Wang, Q, Lin, SL, Chang, CD, Chuang, J and Ying, SY, (2006) Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. Exp Biol Med (Maywood) 231: 534-44.
13. Liu, F, Ventura, F, Doody, J and Massague, J, (1995) Human typeII receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs Mol Cell Biol 15: 3479-3486.
14. Chen, YG, Lui, HM, Lin, SL, Lee, JM and Ying, SY, (2002) Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. Exp Biol Med (Maywood) 227: 75-87.
15. Verschueren, K, Dewulf, N, Goumans, MJ, Lonnoy, O, Feijen, A, Grimsby, S et al., (1995) Expression of type I and type IB receptors for activin in midgestation mouse embryos suggests distinct functions in organogenesis. Mech Dev 52: 109-23.
16. Feijen, A, Goumans, MJ and van den Eijnden-van Raaij, AJM, (1994) Expression of activin subunits, activin receptors and follistatin in postimplantation mouse embryos suggests specific develpoment functions for different activins. Development 120: 3621-3637.

17. Yoshioka, K, Takata, M, Taniguchi, T, Yamanaka, H and Sekikawa, K, (1998) Differential expression of activin subunits, activin receptors and follistatin genes in bovine oocytes and preimplantation embryos. . Reprod Fertil Dev 10: 293-298.
18. Mukerji, SS, Katsman, EA, Wilber, C, Haner, NA, Selman, WR and Hall, AK, (2006) Activin is a neuronal survival factor that is rapidly increased after transient cerebral ischemia and hypoxia in mice. Journal of Cerebr Blood F Met 27: 1161-1172.
19. Müller, MR, Zheng, F, Werner, S and Alzheimer, C, (2006) Transgenic mice expressing dominant-negative activin receptor IB in forebrain neurons reveal novel functions of activin at glutamatergic synapses. J Biol Chem 281: 29076-29084.
20. Moreira, EF and Adler, R, (2006) Effects of follistatin overexpression on cell differentiation in the chick retina. Developmental Biology 298: 272-284.
21. Kupershmidt, L, Amit, T, Bar-Am, O, Youdim, MBH and Blumenfeld, Z, (2007) The neuroprotective effect of Activin A und B: implication for neurodegenerativ diseases. J Neurochem.
22. Chen, W, Woodruff, TK and Mayo, KE, (2000) Activin A-induced HepG2 liver cell apoptosis: involvement of activin receptors and smad proteins. Endocrinology 141: 1263-1272.
23. Sanchez-Capelo, A, (2005) Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. Cytokine Growth Factor Rev 16: 15-34.
24. Schuster, N and Krieglstein, K, (2002) Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. Cell Tissue Res 307: 1-14.
25. Bursch, W, Taper, HS, Lauer, B and Schulte-Hermann, (1985) Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stage of apotosis (controlled cell death) during regression of rat liver hyperplasmie. Virchows Archiv Abt B Zellpathol 50: 153-166.
26. Kerr, JFR, Wyllie, AH and Currie, AR, (1972) Apoptosis: a basis biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26: 239-257.
27. Wyllie, AH, Kerr, JFR and Currie, AR, (1980) Cell Death: the significance of apoptosis. Internat Rev Cytol 68: 251-300.
28. Clarke, PGH, (1990) Developmental cell death morphological diversity and multiple mechanisms. Anat Embryol 181: 195-213.
29. Schweichel, JU and Merker, HJ, (1973) The morphology of variuos types of cell death in prenatal tissues. Teratology 7: 253-266.
30. Bursch, W, Ellinger, A, Gerner, C, Frohwein, U and Schulte-Hermann, R, (2000) Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? Ann N Y Acad Sci 926: 1-12.
31. Bouillet, P and Strasser, A, (2002) BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. J Cell Sci 115: 1567-74.
32. Degterev, A, Boyce, M and Yuan, J, (2003) A decade of caspases. Oncogene 22: 8543-67.
33. Nakagawa, T, Zhu, H, Morishima, N, Li, E, Xu, F, Yankner, Yuang, J, (2000) Caspase-12 mediates ER-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-plaques. Nature 403: 98-103.
34. Harvey, NL, Butt, AJ and Kumar, S, (1997) Functional activation of Nedd2/ICH-1 (caspase-2) is an early process in apoptosis. J Biol Chem 272: 13134-13139.
35. Liston, P, Fong, WG and Korneluk, RG, (2003) The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. Oncogene 22: 8568-80.
36. Orrenius, S, (2004) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. Toxicol Lett 149: 19-23.

37. Cory, S, Huang, DC and Adams, JM, (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. Oncogene 22: 8590-607.
38. Muchmore, SW, Sattler, M, Liang, H, Meadows, RP, Harlan, JE, Yoon, HS, Nettesheim, D, Chang, BS, Thompson, CB, Wong, SL, Ng, SL, Fesik, SW, (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xl, an inhibitor of programmed cell death. Nature 381: 335-341.
39. Petros, AM, Medek, A, Nettesheim, D, Kim, DH, Yoon, HS, Swift, K, Matayoshi, ED, Oltersdorf, T, Fesik, SW, (2001) Solution structure of the anti-apoptotic Protein Bcl-2. Proc Natl Acad Sci USA 98: 3012-3017.
40. Suzuki, M, Youle, RJ and Tjandra, N, (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. Cell 103: 645-654.
41. Gross, A, McDonnell, JM and Korsmeyer, SJ, (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev 13: 1899-911.
42. Schinzel, A, Kaufmann, T and Borner, C, (2004) Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. Biochim Biophys Acta 1644: 95-105.
43. Bruick, RK, (2000) Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 9082-7.
44. Han, J, Flemington, C, Houghton, AB, Gu, Z, Zambetti, GP, Lutz, RJ et al., (2001) Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 11318-23.
45. Imaizumi, K, Tsuda, M, Imai, Y, Wanaka, A, Takagi, T and Tohyama, M, (1997) Molecular cloning of a novel polypeptide, DP5, induced during programmed neuronal death. J Biol Chem 272: 18842-8.
46. Oda, E, Ohki, R, Murasawa, H, Nemoto, J, Shibue, T, Yamashita, T et al., (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. Science 288: 1053-8.
47. Putcha, GV, Moulder, KL, Golden, JP, Bouillet, P, Adams, JA, Strasser, A et al., (2001) Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. Neuron 29: 615-28.
48. Puthalakath, H, Huang, DC, O'Reilly, LA, King, SM and Strasser, A, (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. Mol Cell 3: 287-96.
49. Puthalakath, H, Villunger, A, O'Reilly, LA, Beaumont, JG, Coultas, L, Cheney, RE et al., (2001) Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. Science 293: 1829-32.
50. Ramjaun, AR, Tomlinson, S, Eddaoudi, A and Downward, J, (2007) Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGFß-induced apoptosis. oncogene 26: 970-981.
51. Luo, X, Budihardjo, I, Zou, H, Slaughter, C and Wang, X, (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. Cell 94: 481-90.
52. Zha, J, Harada, H, Osipov, K, Jockel, J, Waksman, G and Korsmeyer, SJ, (1997) BH3 domain of Bad is required for heterodimerization with Bcl-xl and proapoptotic activity. J Biol Chem 271: 24101-24104.
53. Puthalakath, H and Strasser, A, (2002) Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. Cell Death Differ 9: 505-512.
54. Raynaud, F and Marcilhac, A, (2006) Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regulation of Alzheimer's disease. Febs J 273: 3437-43.

55. Chen, M, He, H, Zhan, S, Krajewski, S, Reed, JC and Gottlieb, RA, (2001) Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardinal ischemia/reperfusion. J Biol Chem 276: 30724-30728.
56. Gao, G and Dou, QP, (2000) N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. J Cell Biochem 80: 53-72.
57. Gil-Parrado, S, Fernandez-Montalvan, A, Assfalg-Machleidt, I, Popp, O, Bestvater, F, Holloschi, A et al., (2002) Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probably role for Bcl-2 family members. J Biol Chem 277.
58. Modjtahedi, N, Giordanetto, F, Madeo, F and Kroemer, G, (2006) Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. Trends Cell Biol 16: 264-72.
59. Klein, JA, (2002) The harlequin mouse mutation downregulates apoposis-inducing factor. Nature 419: 441-446.
60. Mate, MJ, Ortiz-Lombardia, M and Boitel, B, (2002) The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. Nat Struct Biol 9: 442-446.
61. Susin, SA, Lorenzo, HK and Zamzami, N, (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 397: 441-446.
62. Hail, N, Jr., Carter, BZ, Konopleva, M and Andreeff, M, (2006) Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. Apoptosis 11: 889-904.
63. Zhu, C, (2003) Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. J Neurochem 86: 306-317.
64. Ye, H, Cande, C, Stephanou, NC, Jiang, S, Gurbuxani, S, Larochette, N et al., (2002) DNA binding as a structural requirement for the apoptogenic activation of apoptosis inducing factor. Nat Struct Biol 9: 680-684.
65. Steelman, LS, Pohnert, SC, Shelton, JG, Franklin, RA, Bertrand, FE and McCubrey, JA, (2004) Jak/Stat, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. Leukemia 18: 189-218.
66. Gourlay, CW and Ayscough, KR, (2005) The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? Nat Rev Mol Cell Biol 6: 583-9.
67. Mashima, T, Naito, M, Fujita, N, Noguchi, K and Tsuruo, T, (1995) Identification of actin as a substrate of ICE and ICE-like proteases and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 217: 1185-1192.
68. Mashima, T, Naito, M, Noguchi, K, Miller, DK, Nicholson, DW and Tsuruo, T, (1997) Actin cleavage by CPP-32/apoppain during the development of apoptosis. Oncogene 14: 1007-1012.
69. Mashima, T, Naito, M and Tsuruo, T, (1999) Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. Oncogene 18: 2423-30.
70. Utsumi, T, Sakurai, N, Nakano, K and Ishisaka, R, (2003) C-terminal 15 kDa fragment of cytoskeletal actin is posttranslationally N-myristoylated upon caspase-mediated cleavage and targeted to mitochondria. FEBS Lett 539: 37-44.
71. Chen, TA, Yang, F, Cole, GM and Chan, SO, (2001) Inhibition of Caspase-3-like activity reduces glutamate induced cell death in adult retina. Brain Res 904: 177-188.
72. Oo, TF, Siman, R and Burke, RE, (2002) Distinct nuclear and cytoplasmatic localization of caspase cleavage products in two model systems of induced apoptotic death in dopamine neurons of the substantia nigra. Exp Neurol 175: 1-9.
73. Rossiter, JP, Anderson, LL, Srinivasan, A, Yang, F and Cole, GM, (2000) Caspase-cleaved actin (fractin) immunolabeling of Hirano bodies. Neuropathology and Appl. *Neurobiology* 26: 342-346.

74. Yang, F, Sun, X, Beech, W, Teter, B, Wu, S, Sigel, J et al., (1998) Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's diseases. Am J Pathol 152: 379-389.
75. Tsujimoto, Y and Shimizu, S, (2002) The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. Biochimie 84: 187-93.
76. Rosenmund, C and Westbrook, GL, (1993) Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity. Neuron 10: 805-14.
77. de Luca, A, Weller, M and Fontana, A, (1996) TGF-beta-induced apoptosis of cerebellar granule neurons is prevented by depolarization. J Neurosci 16: 4174-85.
78. Krieglstein, K, Richter, S, Farkas, L, Schuster, N, Dunker, N, Oppenheim, RW et al., (2000) Reduction of endogenous transforming growth factors beta prevents ontogenetic neuron death. Nat Neurosci 3: 1085-90.
79. Duenker, N, Schuster, N and Krieglstein, K, (2001) TGF-beta modulates programmed cell death in the retina of the developing chick embryo. Development 128: 1933-42.
80. Schuster, N, Dunker, N and Krieglstein, K, (2002) Transforming growth factor-beta induced cell death in the developing chick retina is mediated via activation of c-jun N-terminal kinase and downregulation of the anti-apoptotic protein Bcl-X(L). Neurosci Lett 330: 239-42.
81. Duenker, N and Krieglstein, K, (2003) Reduced programmed cell death in the retina and defects in lens and cornea of Tgfbeta2(-/-) Tgfbeta3(-/-) double-deficient mice. Cell Tissue Res 313: 1-10.
82. Duenker, N, Valenciano, AI, Franke, A, Hernandez-Sanchez, C, Dressel, R, Behrendt, M et al., (2005) Balance of pro-apoptotic transforming growth factor-beta and anti-apoptotic insulin effects in the control of cell death in the postnatal mouse retina. Eur J Neurosci 22: 28-38.
83. Marushige, K and Marushige, Y, (1994) Induction of apoptosis by transforming growth factor-beta 1 in glioma and trigeminal neurinoma cells. Anticancer Res 14: 2419-2424.
84. Skoff, AM, Lisak, RP, Bealmear, B and Benjamins, JA, (1998) TNF-alpha and TGF-beta act synergistically to kill Schwann cells. J Neurosci Res 53: 747-756.
85. Schuster, N, Bender, H, Rossler, OG, Philippi, A, Dunker, N, Thiel, G et al., (2003) Transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha cooperate to induce apoptosis in the oligodendroglial cell line OLI-neu. J Neurosci Res 73: 324-33.
86. Franke, AG, Gubbe, C, Beier, M and Duenker, N, (2006) Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic proteins: cooperative players in chick and murine programmed retinal cell death. J Comp Neurol 495: 263-78.
87. Schuster, N, Bender, H, Philippi, A, Subramaniam, S, Strelau, J, Wang, Z et al., (2002) TGF-beta induces cell death in the oligodendroglial cell line OLI-neu. Glia 40: 95-108.
88. Zaubermann, A, Oren, M and Zipori, D, (1997) Involvement of p21 (Waf1/Cip1) CDK4 and Rb in activin A-mediated signaling leading to hepatoma cell growth inhibition. Oncogene 15: 1705-1711.
89. Ying, SY, Zhang, Z, Batres, Y, Zhao, Y, Lin, SL and Li, G, (1997) p53 is involved in the inhibition of cell proliferation mediated by activin A in cultured human prostate cancer LNCaP cells. Int J Oncol 11: 591-595.
90. Koseki, T, Yamato, K, Ishisaki, A, Hashimoto, O, Sugino, H and Nishihara, T, (1998) Correlation between Bcl-xl expression and B-cell hybridoma apoptosis induced by activin A. Cell Signal 10: 517-521.
91. Valderrama-Carvajal, H, Cocolakis, E, Lacerte, A, Lee, EH, Krystal, G, Ali, S et al., (2002) Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. Nat Cell Biol 4: 963-9.

92. Jahn, O, Hesse, D, Reinelt, M and Kratzin, HD, (2006) Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 386: 92-103.
93. Maravei, DV, Trbovich, AM, Perez, GI, Tilly, KI, Banach, D, Talanian, RV et al., (1997) Cleavage of cytoskeletal proteins by caspases during ovarian cell death: evidence that cell-free systems do not always mimic apoptotic events in intact cells. Cell Death Differ 4: 707-12.
94. Saltzman, A, Munro, R, Searfoss, G, Franks, C, Jaye, M and Ivashchenko, Y, (1998) Transforming growth factor-beta-mediated apoptosis in the Ramos B-Lymphoma cell line is accompanied by caspase activation and Bcl-xl downregulation. Exp Cell Res 242: 244-254.
95. Krantic, S, Mechawar, N, Reix, S and Quirion, R, (2007) Apoptosis-inducing factor: A matter of neuron life and death. Neurobiology 81: 179-199.
96. Fan, TJ, Han, LH, Cong, RS and Liang, J, (2005) Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 37: 719-27.
97. Itoh, T, Itoh, A and Pleasure, D, (2003) Bcl-2-related protein family gene expression during oligodendroglial differentiation. J Neurochem 85: 1500-12.
98. Jung, C, Chylinski, TM, Pimenta, A, Ortiz, D and Shea, TB, (2004) Neurofilament transport is dependent on actin and myosin. J Neurosci 24: 9486-96.
99. LeBlanc, AC, (2005) The role of apoptotic pathways in Alzheimer disease neurodegeneration and cell death. Curr Alzheimer Res 2: 389-402.
100. Takuma, H, Tomiyama, T, Kuida, K and Mori, H, (2004) Amyloid beta-peptide-induced cerebral neuronal loss is mediated by caspase-3 in vivo. J Neuropathol Exp Neurol 63: 255-261.
101. Chen, Z, Naito, M, Mashima, T and Tsuruo, T, (1996) Activation of Actin-cleavable Interleukin 1beta-converting Enzyme (ICE) Family Protease CPP-32 during Chemotherapeutic Agent-induced Apoptsis in Ovarian Carcinoma Cells. Cancer Research 56: 5224-5229.
102. Cooper, JA, (1987) Effects of cytochalasinD und phalloidin on actin. J Cell Biol 105: 1473-1478.
103. Jung, M, Kramer, E, Grzenkowski, M, Tang, K, Blakemore, W, Aguzzi, A et al., (1995) Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo. Eur J Neurosci 7: 1245-65.
104. Krieglstein, K, Rufer, M, Suter-Crazzolara, C and Unsicker, K, (1995) Neural functions of the transforming growth factors beta. Int J Dev Neurosci 13: 301-15.
105. Bao, YL, Tsuchida, K, Liu, B, Kurisaka, A, Matsuzaki, T and Sugino, H, (2005) Synergistic activity of activin A and basic fibroblast growth factor on tyrosin hydroxylase expression through Smad3 and ERK1/ErK2 MAPK signaling pathways. J Endocrinol 184: 493-504.
106. Rosendahl, A, Speletas, M, Leandersson, K, Ivars, F and Sideras, P, (2003) Transforming growth factor-beta- and Activin-Smad signaling pathways are activated at distinct maturation stages of the thymopoeisis. Internat Immunol 15: 1401-1414.
107. Richter-Landsberg, C and Heinrich, M, (1995) S-100 immunoreactivity in rat brain glial cultures is associated with both astrocytes and oligodendrocytes. J Neurosci Res 42: 657-665.
108. Seth, R, Yang, C, Kaushal, V, Shah, SV and Kaushal, GP, (2005) p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury. J Biol Chem 280: 31230-9.

109. Arnould, D, Gaume, B, Karbowski, M, Sharpe, JC, Cecconi, F and Youle, RJ, (2003) Mitochonrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. EMBO J 22: 4385-4399.
110. Selkoe, DJ and Schenk, D, (2003) Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. Annu Rev Pharmacol Toxicol 43: 545-584.
111. Vivien, D and Ali, C, (2005) Transforming growth factor beta signalling in brain disorders. Cytokine Growth Factor 17: 121-128.
112. Apelt, J and Schliebs, R, (2001) Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with alzheimer plaque pathology. . Brain Res 894: 21-30.
113. Wyss-Coray, T, Masliah, E and Mallory, M, (1997) Amyloidogenic role of cytokine TGF-beta1 in transgenic mice and in alzheimer's disease. Nature 389: 603-606.
114. Kitamura, Y, Shimohama, S, Kamoshima, W, Ota, T, Matsuoka, Y, Nomura, Y et al., (1998) Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CCP32, in Alzheimer's disease. Brain Res 780: 260-269.
115. Jellinger, KA and Stadelmann, C, (2001) Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's disease. J Alzheimer Disease 3: 31-40.
116. Kurt, MA, Davies, DC, Kidd, M, Duff, K, Rolph, SC, Jennings, KH et al., (2001) Neurodegenerative changes associated with beta-amyloid deposition in the brain of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. Exp Neurol 171: 59-71.
117. Garcia-Ladona, FJ, Huss, Y, Frey, P and Ghandour, MS, (1997) Oligodendrocytes express different isoforms of beta-amyloid precursor protein in chemically defined cell culture conditionc: In situ hybridization and immunocytochemical detection. J Neurosci Res 50: 50-61.
118. Gray, CW and Patel, AJ, (1993) Regulation of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs by TGF-beta1 and IL-1 in astrocytes. Brain Res Mol Brain Res 19: 251-256.
119. Lesne, S, Docagne, F, Gabriel, C, Liot, G, Lahiri, DK, Bueé, L et al., (2003) TGF-beta1 potentiates amyloid-beta generation in astrocytes and in transgenic mice. J Biol Chem 278: 18408-18418.

VII. Abkürzungen

Abkürzungen allgemein

APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-tri-phosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Rinderserum
C-terminal	carboxy-terminal
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
DAPI	4’,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DIV	engl: day *in vitro*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
(d)NTP	(Desoxy)Nukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
GST	Glutathione S-Transferase
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic Säure
HRP	Merretich-Peroxidase
IC	Immunzytochemie
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktoside
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kb	Luria-Bertani
M	Molar
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisierung in Verbindung mit der Flugzeitmassenspektrometrie
MCS	Multiple Klonierungsstelle

min	Minuten
ml	Milliliter
MLEC	engl: mink-lung-epithelial cells
MLS	mitochondriale Lokalisierungssequenz
mRNA	Boten-RNA
Mtc	Mitochondrium
N-terminal	amino-terminal
NaCl	Natriumchlorid
NaI	Natriumiodid
NaOAc	Natriumacetat
NLS	Kernlokalisierungssequenz
OD	Optische Dichte
OH	Hydroxy
ORF	offener Leserahmen
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PIPES	1,4-Piperazinediethanesulfonic Säure
RLU	relative Licht Units
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-Reaktion	reverse Transkriptase-Reaktion
RT-PCR	engl: reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	*N*,*N*,*N'*,*N'*-Tetramethylethylenediamine
TM	Transmembrandomäne
TUNEL	engl.: TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UAS	upstream activitiy sequence
V	Volt
WB	Western Blot
ZNS	zentrales Nervensystem

Abkürzungen für Gennamen

tActin	engl: truncated actin
Aβ	Amyloid-β
A1	engl: Bcl-2-related protein A1
AD	engl: alzheimer disease
AIF	Apoptose-induzierenden Faktor
Akt	RAC-alpha Serine/Threonine-Protein Kinase
Alk	ALK (engl: receptor-like kinase) Tyrosine Kinase Rezeptor
Apaf-1	engl: apoptosis protease activating factor-1
APP	engl: amyloid precursor protein
ASK1	engl: apoptosis signal-regulating kinase-1
Bad	engl: Bcl2 antagonist of cell death
bFGF	engl: basic fibroblast growth factor
Bak	engl: Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	engl: B-cell lymphoma 2-associated protein X
Bbc3	engl: Bcl-2-binding component 3
Bcl-2	engl: B-Cell Lymphoma 2
Bcl-w	engl: B-Cell Lymphoma …
Bcl-xl	engl: B-Cell Lymphoma extra long
Bcl-xs	engl: B-Cell Lymphoma extra small
Bid	engl: Bcl-2 like inducer of death
Bik/Nbk	engl: Bcl-2 interacting killer bzw. Natural born killer
Bim/Bok	engl: Bcl-2-interacting mediator of cell death bzw. Bcl-2-related ovarian death gene
Blk	engl: Bik-like killer protein
Bmf	engl: Bcl-2-modifying factor
BMP	engl.: bone morphogenetic proteins
Bok	engl: Bcl-2-related ovarian killer protein
Caspasen	Cysteinyl-Aspartat-spezifische Protease
CNTF	engl: ciliary neurotrophic factor
CytC	CytochromC
Daxx	engl: death-associated protein
DIABLO	engl: direct IAP-binding protein with low pI
DP5	engl: Neuronal death protein 5

EndoG	EndonucleaseG
ERK	engl: extracellular signal-regulated kinase
FasL	Synonym: TNFL6 (engl: Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6) bzw. Fas Ligand
Fas/CD95/Apo-1:	TNF receptor superfamily member: Fibroblasten assoziierter Rezeptor bzw. CD95-Rezeptor bzw. Apoptoserezeptor-1
FGF	engl: Fibroblast growth factor
GDNF	engl: Glial cell line-derived neurotrophic factor
Hrk	engl: Harakiri
IkB	engl: inhibitor of NF-kB
IKK	engl: IkB kinase
JNK	engl: Jun-N-terminal kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mcl-1	engl: Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1 homolog
MEK	MAPK-ERK Kinase (MAPKK)
MKK	MAPK Kinase (MAPKK)
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (das H steht für Wasserstoff); systematischer Name: Coenzym Q Oxidoreduktase
NF-kB	engl: nuclear factor-kappaB
NGF	engl: nerve growth factor
Noxa	engl: mediator of hypoxic cell death
p75	Synonym: NGFR (engl: nerve growth factor receptor = TNFR superfamily member 16)
PDK	engl: phosphoinositid-dependent kinase
PI	Propidiumiodid
PI3K	engl: Phosphatidylinositol-3-kinase
PKB	ProteinkinaseB
PKC	ProteinkinaseC
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
Puma	engl: p53 up-regulated modulator of apoptosis
Ras	engl: Rat sarcoma

Raf	engl: Ras-activated factor bzw. engl: rapidly accelerated fibrosarcoma
SHIP	engl: SH2-containing inositol 5-phosphatase
Smac	engl: second-mitochondrial-derived activator of caspases
TAB	engl: TAK1-binding protein
TAK1	engl: TGFβ-activated kinase 1
TGF-β	engl: transforming growth factor-β
TNF	engl: tumor necrosis factor
VDAC	engl: voltage-dependent anion channel
XIAP	engl: X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein

VIII. Lebenslauf

Dipl.-Biologin Ramona Schulz

Persönliche Daten

Wohnort:	Am Fahnenweg 14, 37115 Duderstadt
Geburtstag und –ort:	geboren am 24.12.1978 in Frankfurt (Oder)
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung

1985-1990	5. Polytechnische Oberschule Frankfurt (Oder)
1990-1992	2. Realschule Frankfurt (Oder)
1992-1998	Friedrichsgymnasium Frankfurt (Oder)

Hochschulausbildung

10/1998-11/2003	Biologiestudium mit Abschluss Diplom an der GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT zu Göttingen
01/2004-11/2007	Promotion zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematischen und Naturwissenschaftlichen Fakultät an der GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT zu Göttingen