

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin I

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gregor

**Untersuchung apoptotischer
Signaltransduktionswege in kernlosen
humanen Blutzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Andreas Hans Otto Rothbart

aus Böblingen

2007

Dekan: _____ Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: _____ Professor Dr. S. Wesselborg

2. Berichterstatter: _____ Professor Dr. M. Schwarz

INHALT

Inhalt	I
Abkürzungen	IV
1 Einleitung	1
1.1 Apoptose	1
1.2 Caspasen und ihre Substrate	4
1.3 Calpaine	8
1.4 Signalwege der Apoptose.....	10
1.4.1 Todesrezeptoren	11
1.4.2 Der mitochondriale Signalweg.....	12
1.5 Regulationsmechanismen der Apoptose	14
1.6 Kernlose humane Blutzellen	15
1.6.1 Erythrozyten	15
1.6.2 Thrombozyten	17
1.7 Fragestellung.....	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.1 Herstellerverzeichnis	19
2.1.2 Antikörper.....	21
2.2 Zellen und Zellkultur	22
2.2.1 Thrombozyten	22
2.2.2 Erythrozyten	23
2.2.3 Kultivierung von eukaryontischen Zellen	24
2.3 Zellstimulation, Caspaseaktivierung und Apoptoseinduktion.....	25
2.4 Methoden zum Nachweis von Apoptose bzw. Caspaseaktivierung... 26	
2.4.1 Messung der Caspaseaktivität mithilfe fluorometrischer Verfahren	26
2.4.2 In-vitro-Spaltung verschiedener Proteine mithilfe gereinigter Caspasen	28
2.4.3 In-vitro-Prozessierung von Caspasen und Spectrin	29
2.4.4 Präparation zellfreier Extrakte und Stimulation mit Zytochrom c	29

2.4.5	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials	31
2.4.6	Zellvitalitätsmessungen	31
2.4.6.1	Lactatdehydrogenase (LDH)-Freisetzung	31
2.4.6.2	Intrazellulärer ATP-Gehalt	31
2.4.7	Analyse von Proteinen	31
2.4.7.1	Kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	31
2.4.7.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.4.7.3	Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen	34
2.4.7.4	Silberfärbung von Proteingelen	34
2.4.7.5	Westernblot-Analyse	35
2.4.7.6	Westernblot-Analyse der Caspase- und Caspasesubstrat- Prozessierung	37
2.4.7.7	Gelfiltration (FPLC)	38
2.4.7.8	Immunopräzipitation	39
2.4.8	Zytometrie (FACS)	40
2.4.8.1	Zytofluorometrischer Nachweis der Zellschrumpfung	40
2.4.8.2	Zytofluorometrischer Nachweis Propidiumiodid-positiver Zellen	40
2.4.8.3	Zytofluorometrischer Nachweis von hypodiploiden Nuklei ...	41
2.4.8.4	Nachweis der Externalisierung von Phosphatidylserin	41
2.4.9	Morphologische Untersuchungen	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Untersuchungen zu Apoptosemechanismen in Erythrozyten	43
3.1.1	Erythrozyten enthalten Procaspase-8 und -3	43
3.1.2	Werden Caspasen in intakten Erythrozyten aktiviert?	44
3.1.3	In-vitro-Aktivierung erythrozytärer Caspasen	46
3.1.4	Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Erythrozyten führt zur Aktivierung von Calpainen, nicht von Caspasen	52
3.2	Untersuchungen zu Apoptosemechanismen in Thrombozyten	56

3.2.1	Thrombozyten enthalten Procaspase-9 und -3	56
3.2.2	Procaspase-3 in Thrombozytenlysaten wird in vitro durch exogene Caspase-8 in ihre aktiven Fragmente gespalten	57
3.2.3	Verschiedene klassische proapoptotische Stimuli können in Thrombozyten keine Caspasen aktivieren	58
3.2.4	Stimulation mit Tributylzinn führt in Thrombozyten zu einer sehr schnellen Aktivierung von Caspase-3 und -9	61
3.2.4.1	Nachweis der Caspasespaltung im Westernblot	61
3.2.4.2	Quantifizierung der enzymatischen Aktivität von Caspase-3 im Enzymaktivitätsassay.....	62
3.2.4.3	Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und Abnahme der Zellvitalität verlaufen parallel zur Caspaseaktivierung	63
3.2.4.4	Aktive Formen von Caspase-9 lassen sich nur außerhalb des hochmolekularen Komplexes des Apoptosoms nachweisen	65
4	Diskussion	69
4.1	Untersuchungen zu Apoptosemechanismen in Erythrozyten	69
4.1.1	Erythrozytäre Caspasen lassen sich nur in vitro aktivieren	70
4.1.2	Aktivierung von Calpainen führt in Erythrozyten zu Apoptose- ähnlichen morphologischen Veränderungen	72
4.2	Untersuchungen zu Apoptosemechanismen in Thrombozyten.....	75
4.2.1	Thrombozytäre Caspasen lassen sich durch klassische proapoptotische Stimuli nicht aktivieren	75
4.2.2	Tributylzinn (TBT) führt in Thrombozyten zu einer schnellen Aktivierung von Caspase-9 und -3	77
4.2.3	TBT-induzierte Aktivierung von Caspase-9 und -3 in Thrombozyten erfolgt außerhalb des Apoptosoms.....	77
5	Zusammenfassung	81
6	Literatur.....	83
	Danksagung	99
	Lebenslauf.....	101

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
aa	Aminosäure(n)
ACD	Zitratdextroselösung (sauer)
ActD	Actinomycin D
AMC	Aminomethylcumarin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i>
APO	<i>Apoptosis Antigen</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BA	<i>Bongkrekic Acid</i>
Bad	<i>Bcl-2 Antagonist of Cell Death</i>
Bak	<i>Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 Associated X Protein</i>
Bcl-2	<i>B Cell Lymphoma/Leukemia-2</i>
Bfl-1	<i>Bcl-2 Homologue Isolated from a Human Fetal Liver</i>
BH-Domäne	Bcl-2-Homologie-Domäne
Bid	<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>
Bik	<i>Bcl-2 Interacting Killer</i>
Bim	<i>Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death</i>
BIR	<i>Baculoviral IAP Repeat</i>
Blk	<i>Bik-Like Killer Protein</i>
Bok	<i>Bcl-2-Related Ovarian Killer</i>
Boo	<i>Bcl-2 Homologue of Ovary</i>
BrefA	Brefeldin A
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CAD	<i>Caspase-activated DNase</i>
CARD	<i>Caspase Activation and Recruitment Domain</i>
Casp	Caspase
Caspase	Cystein-Protease mit Aspartat-Spaltspezifität
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD95	APO-1, Fas
CD95L	CD95 Ligand
CED	<i>Cell Death Protein</i>
CHAPS	(3-([3-Cholamidopropyl]-dimethylammonium)-1-propansulfonat
CHX	Cycloheximid
clAP	<i>Cellular IAP</i>

CsA	Cyclosporin A
Da	Dalton
$\Delta\Psi_m$	Membranpotential (mitochondrial)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	Todesdomäne (<i>Death Domain</i>)
DED	Todeseffektordomäne (<i>Death Effector Domain</i>)
DEVD-AMC	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcumarin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DcR	<i>Decoy Receptor</i>
DIABLO	<i>Direct IAP Binding Protein with low pI</i>
DISC	Todessignal-Komplex (<i>Death Inducing Signaling Complex</i>)
Diva	<i>Death Inducer Binding to Bcl-2 and Apaf-1</i>
DMF	Dimethylformamid, N,N-Dimethylmethanamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonukleinsäure-Hydrolase
DP5	<i>Neuronal Death Protein 5</i>
DR	Todesrezeptor (<i>Death Receptor</i>)
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
Etopo	Etoposid
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FADD	<i>Fas-Associating Protein with Death Domain</i> (MORT1)
Fas	<i>Fibroblast Associated Antigen</i>
FcR	Rezeptor für den kristallisierbaren (<i>crystallizable</i>) Teil von Antikörpern
FCS	Fötale Kälberserum
FI	Fluoreszenzkanal
FLICE	<i>FADD-Like Ice</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FU	<i>Fluorescence Unit</i>
g	Erdbeschleunigung [m/s ²]
G	Guanin
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N2'-Ethansulfonsäure

Abkürzungen

Hrk	<i>Harakiri</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ICAD	<i>Inhibitor of CAD</i>
ICE	<i>Interleukin-1β-Converting Enzyme</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
m	Milli (10 ⁻³)
M	Molarität, molar
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
Mcl-1	<i>Myeloid Cell Leukemia Sequence 1</i>
min	Minute(n)
Mito	Mitomycin C
MORT1	<i>Mediator of Receptor Induced Toxicity 1</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Mtd	<i>Matador</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
Nbk	<i>Natural Born Killer</i>
NFAT(c, p, x)	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen (Isoformen c, p und x)
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NIAP	<i>Neuronal IAP</i>
NP-40	Nonidet P-40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAF	<i>Platelet-Activating Factor</i>
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbolmyristylacetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RLU	Relative Lumineszenzeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Smac	<i>Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
TBT	<i>Tributyltin</i> , Tributylzinn
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N', Tetramethylethylendiamin
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
TNF	Tumornekrose-Faktor
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis Inducing Factor</i>
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Polyethylenglycol-p- isooctylphenoether
TWEAK	<i>Ligand in the Tumor Necrosis Factor Family that weakly induces Apoptosis</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Enzymeinheit
U	Uracil
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEID-AMC	N-Acetyl-Val-Glu-Ile-Asp-Aminomethylcumarin
vol	Volumeneinheit
W	Watt
X-IAP	<i>X-Linked IAP</i>
zVAD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Alex-Asp-fluoromethylketon

1 EINLEITUNG

1.1 Apoptose

Apoptose (Kerr et al. 1972) beschreibt ein in eukaryontischen Zellen angelegtes Selbstmordprogramm, durch das in Metazoen (Vielzellern) einzelne Zellen ohne Belastung des Gesamtorganismus eliminiert werden.

Dieser programmierte Zelltod unterscheidet sich als aktive Form des Absterbens von der Nekrose als passiver Form des Zelltodes anhand morphologischer und biochemischer Kriterien (Kerr et al. 1972; Arends und Wyllie 1991; Farber 1994; Kanduc et al. 2002). Letztere wird meist durch schwere exogene Schädigungen der Zelle (wie z.B. Komplementlyse, Hypoxie, Hyperthermie) verursacht. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose die bei weitem häufigere und physiologischere Form des Zelltodes (Leist et al. 1997). Sie ist ein essentieller Mechanismus zur Zellbeseitigung in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen und dient u.a. der Rückbildung von Gewebe im Rahmen der embryonalen Morphogenese und dem Gewebeumbau im adulten Organismus. Als Gegenspieler der Proliferation dient sie der Zellzahlregulierung zur Aufrechterhaltung der Homöostase. Eine besondere Bedeutung kommt ihr bei der Regulation des Immunsystems zu, indem sie zur klonalen Deletion autoreaktiver Thymozyten beiträgt (Li und Page 2001; Bouillet et al. 2002) oder den aktivierungsinduzierten Zelltod vermittelt (Brunner et al. 1995; Dhein et al. 1995), der dem Abklingen der Immunantwort dient (Wesselborg et al. 1993). Eine ebenso wichtige Rolle spielt sie bei der Eliminierung von Tumorzellen (Duvall und Wyllie 1986). Eine zu geringe Apoptoserate wird daher mit der Entstehung von malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht. So zeigen verschiedene Tumoren ein erhöhtes Expressionsniveau der anti-apoptotischen oder ein reduziertes Expressionsniveau der pro-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie. Auch die Resistenz verschiedener Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika ist vermutlich auf die Überexpression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 oder Bcl-x_L zurückzuführen (Miyashita und Reed 1993; Bunz 2001; Reed 2002). Zellen bestimmter Tumoren wiederum scheinen sich vor Angriffen des

Immunsystems schützen zu können, indem sie mittels konstitutiv hoher Expression von CD95-Ligand und Kostimulatoren die zur Bekämpfung des Tumors aktivierten Lymphozyten eliminieren (Hahne et al. 1996; Strand et al. 1996; Dong et al. 2002).

Erhöhte Apoptoserate	Reduzierte Apoptoserate
Hepatobiliäre Erkrankungen	Maligne Erkrankungen
Primäre sklerosierende Cholangitis	Leukämien
Akutes Leberversagen	Lymphome
Morbus Wilson	Karzinome
Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	Autoimmunerkrankungen
Colitis ulcerosa	Lupus erythematodes
Morbus Crohn	Rheumatoide Arthritis
Neurodegenerative Erkrankungen	Latente virale Infektionen
Morbus Alzheimer	Herpesvirus-Infektionen
Morbus Parkinson	
Multiple Sklerose	
	Mangelnde Phagozytose apoptotischer Zellen
	Autoimmunerkrankungen
Hämatopoetische Erkrankungen	Lupus erythematodes
Myelodysplastisches Syndrom	Rheumatoide Arthritis
Aplastische Anämie	
Chronische Leukopenie	
Viruserkrankungen	
AIDS	
Virushepatitiden	

Tab. 1: Mögliche Zusammenhänge zwischen Apoptose und verschiedenen Krankheitsbildern:

Eine gestörte Regulation apoptotischer Mechanismen führt zu vermehrtem oder vermindertem Absterben von Zellen und kann damit Ursache vieler Erkrankungen sein (Hettis 1998; Fadeel et al. 1999). Eine pathologisch erhöhte Apoptoserate wird mit der Dezimierung verschiedener Zellpopulationen oder Gewebe in Verbindung gebracht. Beispiele hierfür sind die hepatobiliären Erkrankungen (Patel und Gores 1995; Galle und Krammer 1998; Miyoshi und Gores 1998; Patel et al. 1998; Kanzler und Galle 2000; Rust und Gores 2000), die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Berrebi et al. 1998; Beutler 2001) oder neurodegenerative Erscheinungen (Yuan und Yankner 2000). Auch der pathologische Untergang von Zellen des hämatopoetischen Systems (Dokal 1996; Kliche und Hoffken 1999; Palmblad et al. 2001; Rathmell und Thompson 2002) oder das virusinduzierte Absterben spezifischer Zellpopulationen, wie im Fall von AIDS oder der Virushepatitiden (Mercure und Wainberg 1994; Dhillon und Dusheiko 1995; Nasir et al. 2000; Cloyd et al. 2001; Corasaniti et al. 2001), wird zumindest teilweise auf eine zu hohe Apoptoserate zurückgeführt.

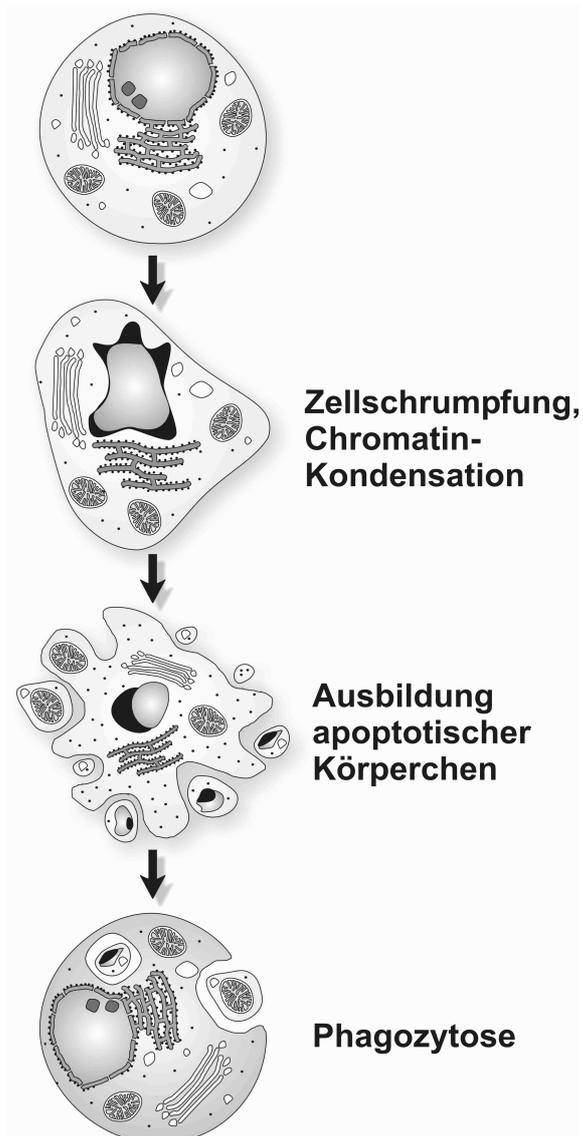


Abb. 1: Schematische Darstellung der morphologischen Veränderungen im Rahmen der Apoptose.

Während der Apoptose schrumpft die Zelle, Zytoplasma und Zellkern kondensieren. Anschließend wird der Zellkern fragmentiert und die Zelle zerfällt in kleine, membranumschlossene Partikel, die apoptotischen Körperchen.

Prozesses bleibt der Zellinhalt permanent von einer Membran umschlossen und wird im Gegensatz zur Nekrose nicht ins umliegende Gewebe freigesetzt. So kommt es bei der Apoptose normalerweise zu keiner Entzündungsreaktion. Die apoptotischen Körperchen werden von benachbarten Zellen oder spezialisierten Phagozyten erkannt, internalisiert und abgebaut (Duvall et al. 1985; Duvall und

Sind die Signale, die zur Apoptose führen auch höchst unterschiedlich, so sind doch die morphologischen Veränderungen der meisten apoptotischen Zellen sehr charakteristisch (Abb. 1) (Kerr et al. 1972; Arends und Wyllie 1991). Die Zelle schrumpft und löst sich von den benachbarten Zellen ab. An der Zellmembran finden sich Ausstülpungen (Zeiosis), Chromatin und Zytoplasma kondensieren, die Organellen, abgesehen vom Zellkern, bleiben jedoch intakt. Die genomische DNA wird zwischen den Nucleosomen gespalten, sodass DNA-Bruchstücke mit Vielfachen von 185 Basenpaaren entstehen (Arends et al. 1990), die im Agarosegel als „DNA-Leiter“ nachgewiesen werden können und ein klassisches Nachweisverfahren der Apoptose darstellen. Der Zellkern wird fragmentiert und die Zelle zerfällt schließlich in kleine, membranumschlossene Partikel, die sog. apoptotischen Körperchen, welche die Zellorganellen und Teile des Zellkerns enthalten. Während des gesamten

Wyllie 1986; Fadok et al. 1992; Savill und Fadok 2000; Lauber et al. 2004). Unterbleibt dies, so kommt es zur sekundären Nekrose. Die Membranintegrität der apoptotischen Körperchen geht verloren, der Zellinhalt tritt aus und verursacht die für Nekrose charakteristischen entzündlichen Reaktionen im Gewebe (Farber 1994; Wu et al. 2001; Lauber et al. 2004).

Große Teile des apoptotischen Programms sind im Laufe der Evolution weitgehend unverändert erhalten geblieben (Yuan et al. 1993; Hengartner und Horvitz 1994; Zou et al. 1997; Meier et al. 2000). Obwohl ursprünglich nur für Metazoen beschrieben, konnte inzwischen auch der Nachweis einer Zelltodform mit Apoptose-ähnlichen Charakteristika im Protozoon (Einzeller) *Saccharomyces cerevisiae* erbracht werden. Somit sind die zentralen Bestandteile des apoptotischen Apparates bereits in einzelligen Organismen angelegt (Stanger et al. 1995; Madeo et al. 1997; Madeo et al. 2002).

1.2 Caspasen und ihre Substrate

Die charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zelle im Rahmen der Apoptose, die in ihrer Desintegration und Eliminierung durch Phagozyten münden, repräsentieren nur das finale Stadium des apoptotischen Zelltodes. Der Weg dorthin ist gekennzeichnet durch eine zunehmende Protease- und Endonukleaseaktivität (Arends et al. 1990; Cohen 1997; Los et al. 1999; Rathmell und Thompson 1999). In dieser Vollstreckungsphase finden irreversible, posttranslationale Proteinmodifikationen statt; Ursache dieser Veränderungen sind eine proteolytische Prozessierung und Aktivierung von Caspasen (Thornberry und Lazebnik 1998; Budihardjo et al. 1999).

Caspasen sind eine Familie von im Laufe der Evolution in höchstem Maße konservierten Proteasen. Sie tragen einen Cysteinrest in ihrem aktiven Zentrum und spalten ihre Substrate spezifisch auf der Carboxylseite von Aspartatresten. Synthetisiert werden diese Cysteinproteasen zunächst als Zymogene mit nur sehr geringer enzymatischer Aktivität. Im Rahmen ihrer proteolytischen Aktivierung wird diese Proform in eine große (ca. 20 kDa) und eine kleine Untereinheit (ca. 10 kDa) gespalten und die N-terminale-Prodomäne entfernt. In

ihrer aktiven Form liegen Caspasen in der Regel als Heterotetramere vor, die aus je zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten bestehen (Abb. 2).

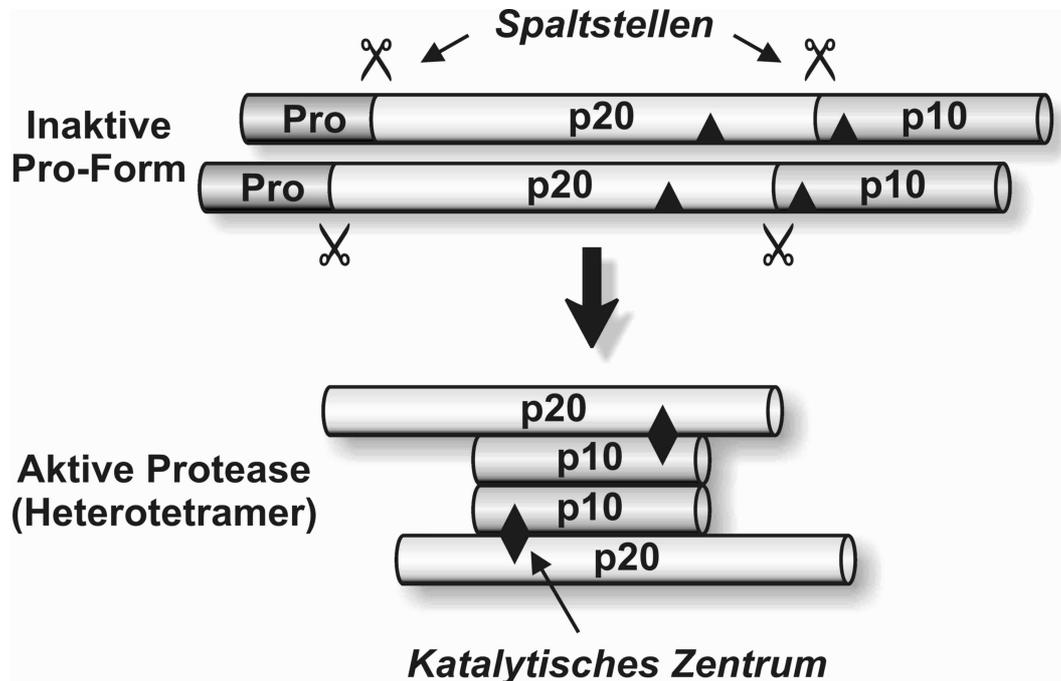


Abb. 2: Caspasen – der Mechanismus ihrer proteolytischen Aktivierung.

Proteolytische Aktivierung der Caspasen am Beispiel von Caspase-1. Die Spaltung der katalytisch inaktiven Procaspase-1 führt zum aktiven Heterotetramer, das aus je zwei p20- und p10-Untereinheiten besteht.

Phylogenetisch lassen sich die 10 bisher bekannten Mitglieder der humanen Caspasefamilie (von insgesamt 14 beschriebenen Caspasen bei Säugern) in zwei Subfamilien einteilen (Alnemri et al. 1996; Strasser et al. 2000) (Abb. 3). Die Mitglieder der einen tragen zur Reifung der Zytokine bei, die der anderen sind im Rahmen der Apoptose von Bedeutung. Diese zweite Gruppe der Apoptosecaspasen lässt sich weiter differenzieren in Apoptose-Initiatoren und Apoptose-Effektoren. Während die Initiatorcaspasen sehr lange Prodomänen besitzen, die durch die darin enthaltenen Adapterregionen essentiell für ihre Aktivierung sind, bestehen die Prodomänen der Effektorcaspasen oftmals nur aus wenigen Aminosäuren.

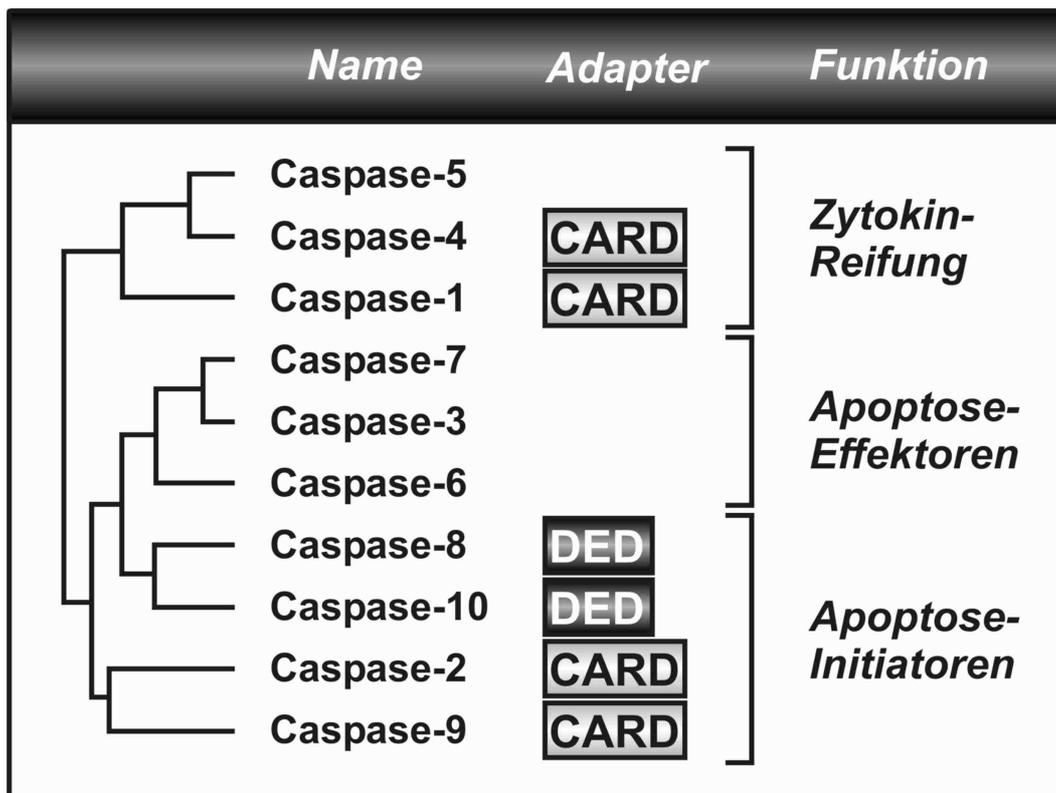


Abb. 3: Die humane Caspasefamilie:

Hinsichtlich ihrer Funktion unterscheidet man Caspasen, die an der Zytokinreifung beteiligt sind, von denjenigen, die im Rahmen der Apoptose eine Rolle spielen. Die Gruppe der Apoptosecaspasen lässt sich weiter unterteilen in Apoptose-Initiatoren und Apoptose-Effektoren. Während die Initiatorcaspasen alle eine große Prodomäne (>10 kDa) besitzen, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Adapterfunktion wichtig für die Aktivierung dieser Caspasen ist, besteht die Prodomäne der Effektorcaspasen oft nur aus wenigen Aminosäuren (<30 aa). Modifiziert nach Strasser et al. (Strasser et al. 2000).

Initiatorcaspasen besitzen eine Substratspezifität für die Aktivierungsspaltstellen der Effektorcaspasen (Thornberry et al. 1997). Ausgehend von dieser Beobachtung konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der Apoptose zunächst die Initiatorcaspasen und anschließend die Effektorcaspasen aktiviert werden, was zu eben dieser Namensgebung geführt hat. Vergleichbar mit der Blutgerinnung und dem Komplementsystem ist diese intrazelluläre Kaskade von proteolytischen Auto- und Transaktivierungen für die Schnelligkeit und Irreversibilität des apoptotischen Prozesses mitverantwortlich (Slee et al. 1999a).

Im Rahmen der Apoptose wird eine Reihe zellulärer Proteine caspaseabhängig gespalten, in den meisten Fällen durch Effektorcaspasen (Stroh und Schulze-Osthoff 1998). Durch die Vielzahl der Caspasesubstrate werden alle funktionellen Bereiche der Zelle erfasst. Dabei handelt es sich jedoch nicht um eine vollständige Degradation, sondern um eine gezielte, limitierte Proteolyse der betreffenden Proteine. Dazu zählt die Spaltung von Strukturproteinen wie z.B. Fodrin (Martin et al. 1995; Janicke et al. 1998) ebenso wie die proteolytische Aktivierung der Endonuklease CAD (Caspase-activated DNase) (Enari et al. 1998), von Zytokinen (z.B. pro-IL-1 β (Thornberry et al. 1992)) oder Proteinkinasen (Tyrosinkinasen und Serin-Threoninkinasen) (z.B. Proteinkinase C (Emoto et al. 1995; Datta et al. 1997)).

Nicht immer sind die funktionellen Effekte der proteolytischen Prozessierung der Zielproteine geklärt. In der Summe führen sie jedoch (i) zum Arrest des Zellzyklus, (ii) zum Verlust der Zell/Zell-Kontakte, (iii) zur Markierung der apoptotischen Zellen für die Phagozytose und (iv) zur Desintegration der Zelle. Eine Auswahl der bisher bekannten Caspasesubstrate ist in Tab. 2 dargestellt.

Regulatoren der Apoptose	
Apaf-1	Apoptosom-Komponente
Bad	Pro-apoptotisches Bcl-2-Familie-Mitglied
Bax	Pro-apoptotisches Bcl-2-Familie-Mitglied
Bid	Apoptose-Aktivator
Procaspasen	Initiator- und Effektor-Caspasen
Zelladhäsion	
β -Catenin	Zelladhäsionsprotein
Desmoglein-3	Haupttransmembrankomponente von Desmosomen
E-Cadherin	Calcium-abhängiges Zelladhäsionsprotein
FAK	Fokale Adhäsionskinase
Connexin 45.6	Bestandteil von <i>gap junctions</i>
Zytoskelett und Strukturproteine	
Actin	Zytoskelett
Fodrin	Kortikales Zytoskelett
Gelsolin	Actin-bindendes Protein
Keratin-18, -19	Intermediär-Filamente
Lamin A, B, C	Zytoskelett des Zellkerns
Zellzyklus	
Cyclin A	Mitose
Cyclin E	G1/S-Übergang
p21 Waf1	G1/S-Arrest
Rb	Zellzyklus-Regulator
DNA-Synthese, -Spaltung und -Reparatur	
ICAD	Inhibitor von CAD
CAD	Caspase-aktivierte DNase
PARP	DNA-Reparatur
Topoisomerase I	DNA-Superspiralisierung
Transkriptionsfaktoren	
CREB	cAMP-aktiverter Transkriptionsfaktor
GATA-1	Erythropoetischer Transkriptionsfaktor
STAT1	Interferon-aktiverter Transkriptionsfaktor
RNA-Synthese und -Splicing	
BTF3	Transkriptionsinitiationsfaktor

hnRNPs	Prä-mRNA-Splicing
Nucleolin	rRNA-Transkription und Ribosomenreifung
RHA	RNA-Helikase A
Proteintranslation	
eIF2 α	Translationsinitiationsfaktor
NAC α	Bindung der naszierenden Polypeptidkette
PABP4	Poly(A)-bindendes Protein
Zytokine	
Pro-IL-1 β	Inflammediator
Pro-IL-16	T-Zell-Chemotaxis
IL-18	Induktion der IFN γ -Produktion
Membranrezeptoren	
EGF-R	Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor EGF
Glutamat-Rezeptor	Neurotransmission
RET	Tyrosinkinase-Rezeptor
TNF-R1	Rezeptor für TNF
Proteinkinasen	
AKT/ Proteinkinase B	Kinase für "Überlebens"-Signale
MEK	MAP Kinase Kinase
PAK2	p21-aktivierte Kinase
PKC, verschiedene Isoformen	Calcium-abhängige Proteinkinase
PKR	Doppelstrang-RNA-abhängige Proteinkinase
ROCK I	Rho-assoziierte Kinase
G-Protein-Signalwege	
CDC42	Ras-verwandtes G-Protein
Rabaptin-5	Kleine GTPase bei der Membranfusion
Rac	Ras-verwandtes G-Protein
Ran-GAP1	Ran-GTPase-aktivierendes-Protein
Ras-GAP	Ras-GTPase-aktivierendes-Protein
Calcium-, cAMP-, cGMP-Signalwege	
IP ₃ -Rezeptor-1, -2	IP ₃ -abhängiger Calcium-Kanal
PDE, verschiedene Isoformen	cAMP- und cGMP-Phosphodiesterasen
PMCA	Plasmamembran Calcium-ATPase
PLC γ 1	Phospholipase C

Tab. 2: Caspasesubstrate (modifiziert nach Stroh und Schulze-Osthoff, 1998 (Stroh und Schulze-Osthoff 1998))

1.3 Calpaine

Obwohl den Caspasen bei der Ausführung der Apoptose eine Hauptrolle zufällt, gibt es Hinweise dafür, dass auch andere Proteasen wie z.B. Calpaine eine Rolle spielen. Calpaine sind heterodimere, Calcium-abhängige Cysteinproteasen, die, ähnlich wie Caspasen, als inaktive Proenzyme vorliegen (Sorimachi et al. 1997; Carafoli und Molinari 1998). Eine Zunahme der zytosolischen Calciumkonzentration führt zu einer Verlagerung von Calpain aus dem Zytosol an die Zellmembran, wo es autoproteolytisch aktiviert wird. Die Aktivität von Calpainen kann darüber hinaus von einem spezifischen endogenen Inhibitor, dem sog. Calpastatin, kontrolliert werden. Interessanterweise werden einige Caspasesubstrate auch von Calpainen gespalten. Dies betrifft bestimmte Strukturproteine, wie Spectrin, Keratine und Aktin, oder auch Proteine mit signaltransduktorischer Funktion, wie Bax und Proteinkinase C (Chan und

Mattson 1999; Wang 2000). Es wurde bereits gezeigt, dass Caspasen und Calpaine sich gegenseitig beeinflussen und aktivieren können (Waterhouse et al. 1998; Ruiz-Vela et al. 1999; Wood und Newcomb 1999). Es wird jedoch noch kontrovers beurteilt, ob Calpaine im Rahmen der Apoptose in der funktionellen Hierarchie über oder unter den Caspasen angesiedelt sind. Es konnte auch gezeigt werden, dass Calpaine Procaspasen so spalten, dass ein proteolytisch inaktives Caspasefragment entsteht (Wolf et al. 1999; Chua et al. 2000; Lankiewicz et al. 2000).

1.4 Signalwege der Apoptose

Ebenso wie die Zellproliferation, Differenzierung und Kontrolle der Genexpression ist auch die Apoptose eine Konsequenz inter- und intrazellulärer Kommunikation. Bis heute sind zwei Signalwege bekannt, über die der apoptotische Zelltod ausgelöst werden kann: der extrinsische Todesrezeptor-signalweg und der intrinsische, mitochondriale Signalweg (Abb. 4).

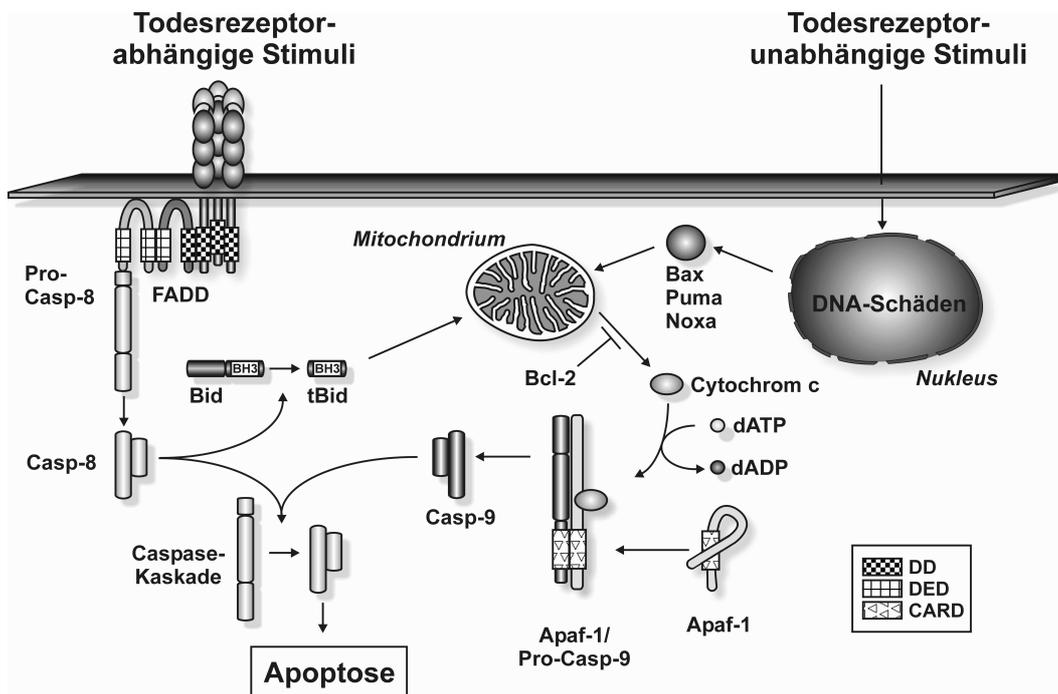


Abb. 4: Signalwege der Apoptose:

Der Todesrezeptorsignalweg ermöglicht über das Adapterprotein FADD die Rekrutierung von Procaspase-8 an den CD-95-Rezeptor-Ligand-Komplex (DISC, *death inducing signaling complex*). Dadurch wird Procaspase-8 autoproteolytisch aktiviert und kann die Caspasekaskade starten. Das initiale Ereignis im mitochondrialen Signalweg ist die Freisetzung von Zytrochrom c aus dem Mitochondrium. Im Zytosol löst Zytrochrom c die an die Hydrolyse von dATP gekoppelte Ausbildung des Apaf-1/Procaspase-9-Apoptosomkomplexes aus. Dadurch wird Procaspase-9 autoproteolytisch aktiviert und die Caspasekaskade eingeleitet. Die Freisetzung von Zytrochrom c aus dem Mitochondrium wird durch die Mitglieder der Bcl-2-Familie reguliert. So induzieren Todesrezeptor-unabhängige Apoptosestimuli, wie Zytostatika, die Synthese proapoptotischer Vertreter dieser Gruppe (Bax, Puma, Noxa), die an das Mitochondrium verlagert werden und dort die Freisetzung von Zytrochrom c vermitteln. Antiapoptotische Regulatorproteine, wie Bcl-2 oder Bcl-x_L, dagegen blockieren diese Freisetzung. Die beiden Signalwege sind verknüpft über das Bcl-2-Familienmitglied Bid, das von Caspase-8 gespalten werden kann und in seiner trunkierten Form in der Lage ist, die Zytrochrom-c-Freisetzung zu vermitteln. DD (Todesdomäne), DED (Todeseffektordomäne), CARD (Caspaserekrutierungsdomäne).

1.4.1 Todesrezeptoren

Der extrinsische Signalweg wird eingeleitet durch die sogenannten Todesrezeptoren, eine Subfamilie der TNF-Rezeptor-Superfamilie (Abb. 5). Bislang sind sechs Mitglieder der Todesrezeptorfamilie identifiziert worden (Schulze-Osthoff et al. 1998). Sie bestehen aus mehreren extrazellulären, Cystein-reichen Domänen, einer Transmembranregion und einer intrazellulären Todesdomäne (DD, *death domain*). Dieser intrazelluläre Bereich wird als Todesdomäne bezeichnet, weil er unabdingbar für die Transduktion des zytotoxischen Signals ist.

Ähnlich wie die Todesrezeptoren besitzen ihre Liganden (CD95L, TNF α , TRAIL, TWEAK und RANKL) untereinander eine strukturelle Homologie. Sie bestehen aus drei identischen Untereinheiten und aktivieren ihre Rezeptoren durch Oligomerisierung (Eck und Sprang 1989; Dhein et al. 1992; Jones et al. 1992; Banner et al. 1993; Beutler und van Huffel 1994; Wiley et al. 1995). Fast alle Todesliganden werden als Transmembranproteine synthetisiert, lösliche Formen können aber durch alternatives Spleißen oder durch spezifische Metalloproteasen erzeugt werden.

Exemplarisch soll die Signaltransduktion der durch Todesrezeptoren vermittelten Apoptose am CD95-Rezeptor/Ligand-System erklärt werden, für das sie bisher am besten untersucht ist: Die Stimulation des CD95-Rezeptors durch den CD95-Liganden führt zur Trimerisierung des Rezeptors und leitet damit die Bildung des Todessignalkomplexes ein (DISC, *death inducing signaling complex*). Hierbei bindet das Adapterprotein FADD (*Fas-associated death domain protein*) intrazellulär an den CD95-Rezeptor. Diese Bindung wird durch die homophile Interaktion der Todesdomänen (DD, *death domain*) von FADD und CD95 vermittelt. FADD verfügt über eine weitere Interaktionsdomäne, Todeseffektordomäne (DED, *death effector domain*) genannt, die Procaspase-8 über die Bindung an deren Todeseffektordomäne an den DISC rekrutiert (Kischkel et al. 1995; Boldin et al. 1996; Muzio et al. 1996; Srinivasula et al. 1996; Medema et al. 1997). Auf diese Weise werden mehrere Procaspase-8-Moleküle am DISC einander räumlich angenähert, sodass die, wenn auch nur geringe, katalytische Aktivität der Procaspase ausreichend für

deren autoproteolytische Prozessierung ist (Martin et al. 1998; Muzio et al. 1998; Srinivasula et al. 1998). Nach ihrer Aktivierung ist die Initiator-Caspase-8 dann in der Lage, die Caspasekaskade auszulösen und damit die Apoptose einzuleiten.

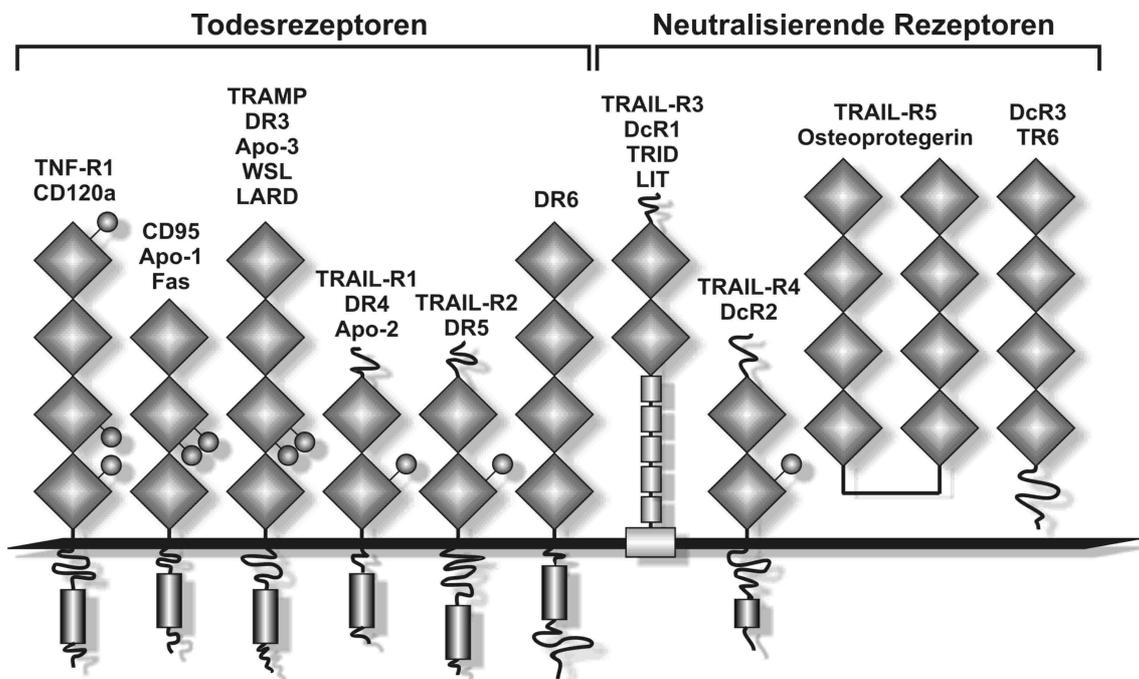


Abb. 5: Schematische Darstellung der Todesrezeptoren und der neutralisierenden Rezeptoren aus der TNF-Rezeptor-Superfamilie:

Allen Mitgliedern der Todesrezeptorfamilie gemeinsam sind mehrere extrazelluläre, Cystein-reiche Domänen, eine Transmembranregion und eine intrazelluläre Todesdomäne (DD, *death domain*). Im Gegensatz dazu besitzen die TRAIL-neutralisierenden Rezeptoren (DcR1 und DcR2) keine oder eine trunkierte, nicht funktionelle Todesdomäne. Osteoprotegerin und DcR3 werden sezerniert. (Modifiziert nach Schulze-Osthoff et al. (Schulze-Osthoff et al. 1998).)

1.4.2 Der mitochondriale Signalweg

Neben dem extrinsischen, Todesrezeptor-abhängigen Signalweg der Apoptose gibt es den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg. Ausgangspunkt dieses Signalweges ist das Mitochondrium, aus dem es zur Freisetzung von Zytocrom c kommt (Liu et al. 1996; Li et al. 1997). Ausgelöst wird diese durch unterschiedliche proapoptotische Stimuli wie Zytostatika, Staurosporin, Cycloheximid, UV- und γ -Strahlung (Ferrari et al. 1998; Bantel et al. 1999;

Wesselborg et al. 1999; Belka et al. 2000; Engels et al. 2000). Jedoch sind die genauen Mechanismen, die dabei eine Rolle spielen, noch nicht eindeutig geklärt (Robertson et al. 2000; Ott et al. 2002). Nach seiner Freisetzung aus dem Mitochondrium bindet Zytocrom c an das Adapterprotein Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und vermittelt dessen an die Hydrolyse von dATP gekoppelte Oligomerisierung (Zou et al. 1997; Saleh et al. 1999). Dieser Apaf-1-Komplex spielt nun als Aggregationszentrum für die zu aktivierende Caspase eine ähnliche Rolle wie der CD95-FADD-Komplex im Todesrezeptor-abhängigen Signalweg. Über die Wechselwirkung seiner CARD-Adapterdomäne (CARD, *caspase recruiting domain*) mit der CARD-Region von Procaspase-9 wird diese an den Apaf-1-Komplex angelagert und es entsteht das sogenannte Apoptosom, ein hochmolekularer Komplex von ca. 700 kDa Größe (Li et al. 1997; Adrain et al. 1999; Saleh et al. 1999; Zou et al. 1999; Cain et al. 2000; Shi 2001; Acehan et al. 2002; Cain et al. 2002; Ott et al. 2002). Nach dem Prinzip der induzierten Proximität wird Procaspase-9 autoproteolytisch prozessiert und damit aktiviert (Salvesen und Dixit 1999). Dabei ist der Apoptosomkomplex für die volle katalytische Aktivität von Caspase-9 unabdingbar (Rodriguez und Lazebnik 1999). Caspase-9 ist als Initiatorcaspase des mitochondrialen Signalweges in der Lage, die Caspasekaskade auszulösen und damit die Apoptose einzuleiten.

Wenn auch die genauen Mechanismen der Zytocrom-c-Freisetzung aus dem Mitochondrium noch nicht eindeutig geklärt sind, so ist zumindest bekannt, dass sie durch Mitglieder der Bcl-2-Familie kontrolliert wird (Kluck et al. 1997). Es gibt beispielsweise Anzeichen dafür, dass DNA-schädigende Substanzen, wie z.B. Zytostatika, die Synthese von proapoptotischen Vertretern der Bcl-2-Familie (Bax, Puma, Noxa) induzieren, die an das Mitochondrium verlagert werden und dort die Freisetzung von Zytocrom c initiieren können (Eskes et al. 1998; Oda et al. 2000; Jia et al. 2001; Nakano und Vousden 2001). Antiapoptotische Mitglieder dieser Familie, wie Bcl-2 oder Bcl-x_L, hingegen blockieren die Freisetzung von Zytocrom c aus dem Mitochondrium (Miyashita und Reed 1993; Strasser et al. 1995; Yang et al. 1997; Cosulich et al. 1999).

1.5 Regulationsmechanismen der Apoptose

Ob das endogene Selbstmordprogramm der Zelle ausgelöst wird, hängt allerdings nicht nur von der Expression der Todeseffektorproteine ab, sondern auch von den Resistenzmechanismen, welche das Apoptosesignal blockieren bzw. abschwächen können.

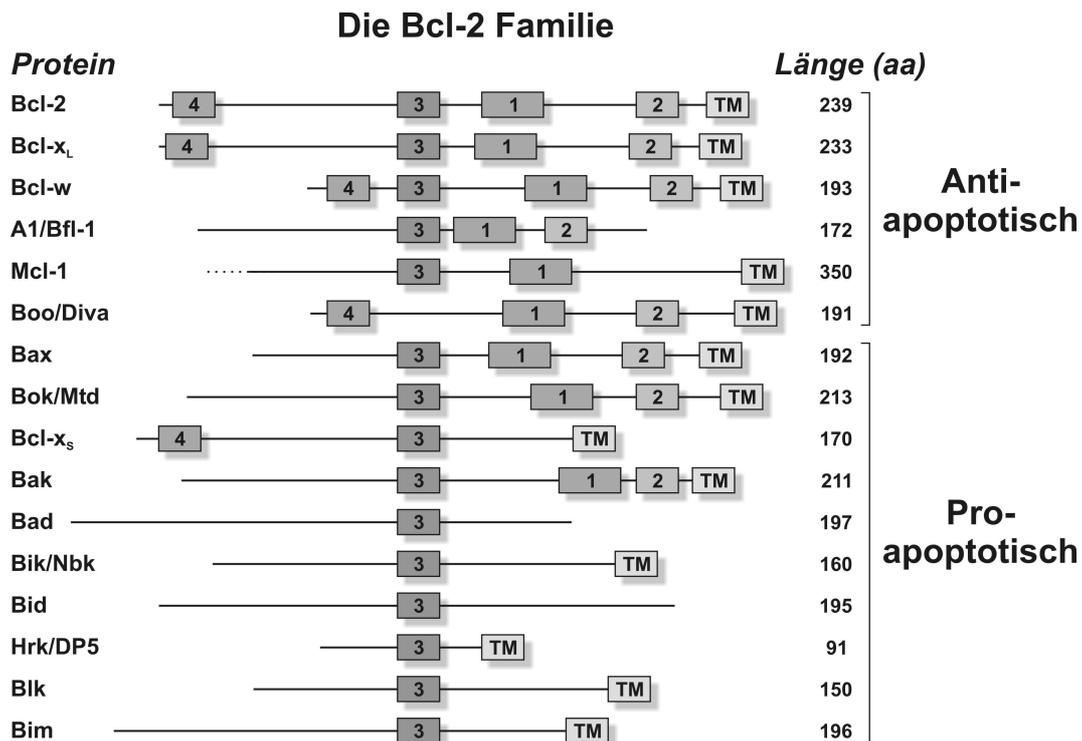


Abb. 6: Schematische Darstellung der pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Proteine:

Die Bcl-2-Familie teilt sich in pro- und antiapoptotische Mitglieder. Alle zeichnen sich durch den Besitz verschiedener Bcl-2-Homologie-Domänen (BH 1-4) aus. Ausgenommen A1/Bfl-1, Bid und Bad verfügen alle Mitglieder über eine C-terminale Transmembranregion (TM), die sie an der Kernhülle, dem endoplasmatischen Retikulum oder der äußeren Mitochondrienmembran verankert. (Modifiziert nach Strasser et al. (Strasser et al. 2000).)

Die schon erwähnten Mitglieder der Bcl-2-Familie gehören zu den zentralen Regulatoren der Apoptose. Diese Familie besteht aus den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1/Bfl-1, Boo/Diva, Mcl-1 und den proapoptotischen Proteinen Bax, Bad, Bak, Bcl-x_S, Bid, Bim, Bik/Nbk, Blk, Bok/Mtd und Hrk/DP5 (Reed et al. 1998; Cory et al. 2003). Die Mitglieder der Bcl-2-Familie sind durch den Besitz verschiedener Bcl-2-Homologie-Domänen

(BH, nummeriert von 1-4) gekennzeichnet (Abb. 6) und können durch ein komplexes Netzwerk von Homo- und Heterodimeren miteinander interagieren. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie entfalten ihre pro- oder antiapoptotischen Wirkungen v.a. am Mitochondrium (Green und Reed 1998; Gross et al. 1999; Wang 2001). Andere Untersuchungen haben eine physikalische Interaktion von Bcl-2 und Bcl-x_L mit Apaf-1 und Caspase-9 nachgewiesen, sodass eventuell auch die Ausbildung des Apoptosoms direkt durch die Bcl-2-Familie kontrolliert wird (Hu et al. 1998; Inohara et al. 1998; Pan et al. 1998).

1.6 Kernlose humane Blutzellen

Während belegt ist, dass die meisten kernhaltigen Zellen in der Lage sind, den Prozess Caspase-abhängiger Apoptose zu durchlaufen, ist die Rolle Apoptose-regulierender Moleküle und ihre möglichen Funktionen in kernlosen Zellen noch weitgehend unklar. Dass der Zellkern für den Ablauf des apoptotischen Programms entbehrlich ist, konnte bereits an künstlich enukleierten Zytoplasten gezeigt werden, in denen sich durch Staurosporin oder agonistische Antikörper gegen CD95 Apoptose auslösen ließ (Schulze-Osthoff et al. 1994; Jacobsen et al. 1996). Erythrozyten und Thrombozyten sind Repräsentanten kernloser Zellpopulationen des menschlichen Organismus, die im Zuge ihrer Reifung aus Vorläuferzellen zudem einen Großteil ihrer Zellorganellen verlieren.

1.6.1 Erythrozyten

Erythrozyten stellen den größten Anteil an den rund 44 Vol.-% zellulärer Bestandteile des menschlichen Blutes. Sie dienen hauptsächlich dem Gastransport im Blut und besitzen eine bikonkave Scheibchenform mit einem Durchmesser von ca. 7,5 µm und einer Dicke von max. 2 µm (Weiss und Jelkmann 1997). Erythrozyten verlieren im Rahmen ihrer Entstehung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen sämtliche Zellorganellen, wie Zellkern, Mitochondrien und Ribosomen. Gleichzeitig setzt im Stadium des Proerythroblasten die Biosynthese des mengenmäßig bedeutendsten Proteins des Erythrozyten, des Hämoglobins, ein. Dessen Funktionen sind Transport des Sauerstoffs im Blut, Beteiligung am Transport des Kohlendioxids im Blut und

Beteiligung am Puffersystem des Blutes. Weitere wichtige zytosolische Enzyme des Erythrozyten dienen der Energiegewinnung mittels Glykolyse oder Pentosephosphatweg und dem Zellschutz mittels Gluthationredoxsystem. Reife Erythrozyten sind nicht mehr zur Proteinbiosynthese in der Lage. Diese fehlende Proteinsynthese wird für die Aktivitätsminderung erythrozytärer Enzyme und damit u.a. für die beschränkte Lebensdauer menschlicher Erythrozyten von 110-130 Tagen verantwortlich gemacht, nach deren Ablauf sie aus dem Blutkreislauf entfernt werden (Petrides 1998). Während ihres Alterungsprozesses durchlaufen die roten Blutkörperchen typische morphologische Veränderungen, die ihre Erkennung und anschließende Entfernung durch Makrophagen ermöglichen. Zu diesen Veränderungen zählt die Schrumpfung der Zellen als Folge einer fortschreitenden Freisetzung von Mikrovesikeln aus der Zellmembran ebenso wie der Übergang von der ursprünglich diskoiden zu einer sphärozytären Form (Mohandas und Groner 1989; Waugh et al. 1992). Weitere Veränderungen sind der fortschreitende Verlust von Proteinen der äußeren Zellmembran wie Fodrin (Spectrin), aus dem das Zytoskelett der Erythrozyten besteht. Der Verlust der asymmetrischen Lipidverteilung im Bereich der Zellmembran führt zu einer Externalisierung von Phosphatidylserin (Connor et al. 1994; Boas et al. 1998; Bratosin et al. 1998). Die gleichen tiefgreifenden Veränderungen der Zellarchitektur lassen sich auch in kernhaltigen Zellen während des apoptotischen Zelltodes beobachten, was auf mögliche Parallelen zwischen der Alterung kernloser Erythrozyten und der Apoptose kernhaltiger Zellen hinweisen könnte.

Kürzlich erschienene Studien haben gezeigt, dass die Entwicklung und Differenzierung von erythrozytären Vorläuferzellen durch Caspase-abhängige Apoptose reguliert wird. Erythropoetin wirkt teilweise über Induktion der antiapoptotische Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L (Silva et al. 1996; Gregoli und Bondurant 1997; Gregoli und Bondurant 1999; Motoyama et al. 1999) und Todesrezeptoren (De Maria et al. 1999; Zamai et al. 2000; Secchiero et al. 2004). Bestimmte Transkriptionsfaktoren der Erythroblasten werden von Caspasen gespalten (Zeuner et al. 2003). Welche Teile des apoptotischen Apparates jedoch in reifen Erythrozyten noch enthalten sind und ob diese eine

funktionelle Rolle spielen, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit weitgehend unbekannt.

1.6.2 Thrombozyten

Thrombozyten sind im Blut gesunder Erwachsener in Konzentrationen von ca. $150-350 \times 10^6/\text{ml}$ zu finden. Ihre Membran- und Plasmabestandteile sind unverzichtbare Bestandteile der Blutstillung. Sie sind flach und unregelmäßig geformt, haben einen Längsdurchmesser von $1-4 \mu\text{m}$ und eine Dicke von $0,5-0,75 \mu\text{m}$ (durchschnittliches Volumen $7,1-7,5 \mu\text{m}^3$). Sie entstehen als Abschnürung des Zytoplasmas von Megakaryozyten des Knochenmarks und besitzen aus diesem Grund keinen eigenen Zellkern mehr. Sie verfügen jedoch noch über die zytosolischen Enzyme der Glykolyse und des Pentosephosphatwegs, sowie über Mitochondrien, die sie zur Ausführung der enzymatischen Schritte des Zitratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung befähigen. Sie besitzen auch noch (mitochondriale) DNA und stabile RNA, was ihnen in beschränktem Umfang eine Proteinbiosynthese erlaubt. Ihre Verweildauer im peripheren Blut beträgt 5-11 Tage; der anschließende Abbau der Thrombozyten erfolgt in Leber, Lunge und Milz (Evatt und Stein 1988; Weiss und Jelkmann 1997; Petrides 1998).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass menschliche Thrombozyten Procaspase-3 enthalten. Stimulation mittels Calciumionophor führt zu einer Abnahme der Proform von Caspase-3, weswegen eine Calciumionophor-induzierte Aktivierung von Caspase-3 angenommen wurde (Vanags et al. 1997; Shcherbina und Remold-O'Donnell 1999). Eine detailliertere Untersuchung von Wolf et al. konnte zeigen, dass menschliche Thrombozyten alle Bestandteile des mitochondrialen Signalweges der Apoptose, d.h. Apaf-1, Zytrochrom c, Caspase-9 und Caspase-3, enthalten und dass dieser Signalweg *in vitro* mittels Zytrochrom c und dATP aktiviert werden kann (Wolf et al. 1999). Weiterhin führt Calciumionophor zu apoptotischen Charakteristika wie Mikrovesikulation, Freilegung von Phosphatidylserin und Fragmentierung von Caspase-9, -3 und Gelsolin. Wolf et al. konnten interessanterweise zeigen, dass Calciumionophor nicht Caspasen, sondern Calpaine aktiviert (Wolf et al. 1999). Ferner stellten sie

fest, dass Calpaine Procaspase-3 und-9 *in vitro* und in ganzen Thrombozyten spalten können, was jedoch zu einer Inaktivierung der Caspasen führte. Nichtsdestotrotz weisen jüngere Untersuchungen auf eine entscheidende Rolle der Caspasen beim Untergang von Thrombozyten in bestimmten Fällen, wie bei durch Malariainfektion ausgelöster Thrombozytopenie im Mausmodell sowie bei Langzeitlagerung von Thrombozytenkonzentraten, hin (Li et al. 2000; Piguet et al. 2002). Auch im Rahmen der Thrombozytopoese konnte eine lokalisierte Aktivierung von Caspasen nachgewiesen werden, die nicht zum Tod des Megakaryozyten, sondern zur Ausbildung der sog. Prothrombozyten führt (De Botton et al. 2002).

1.7 Fragestellung

Im menschlichen Organismus existieren physiologischerweise zwei kernfreie „Minimalzellsysteme“ (Erythrozyten und Thrombozyten), von denen zumindest teilweise bekannt ist, dass sie bestimmte Teile des apoptotischen Apparates enthalten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Bestandteile des apoptotischen Apparates in diesen beiden Zellsystemen noch vorhanden sind und ob ihnen eine funktionelle Bedeutung, z.B. im Rahmen der Zellalterung, zukommt. Die entsprechenden Signalwege sollten näher untersucht und mit denen kernhaltiger Zellen verglichen werden. Hierbei sollten die folgenden Punkte eingehend untersucht werden:

1. Welche Caspasen und andere Bestandteile des apoptotischen Apparates sind in Erythrozyten bzw. Thrombozyten enthalten?
2. Sind diese ggf. durch proapoptotische Stimuli aktivierbar?
3. Erfolgt diese Aktivierung ggf. über denselben Mechanismus wie bei kernhaltigen Zellen?
4. Eignen sich Erythrozyten und Thrombozyten als Modellsysteme für kernunabhängige apoptotische Signaltransduktionswege, wie sie z.B. bei der durch Chemotherapeutika induzierten Apoptose beobachtet werden?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Herstellerverzeichnis

Abott GmbH, Wiesbaden

Blutentnahmesystem Venisystems Butterfly-21

Amersham Pharmacia, Freiburg

SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker ("Rainbow Coloured Protein"), SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker ("LMW"), PVDF-Membranen (Hybond^P-ECL-Membran), Westernblot-ECL-Detection-Kit

Apotheke des Universitätsklinikums Tübingen (UKT)

Daunorubicin, Mitomycin C

Bachem, Heidelberg

Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketon (zVAD-fmk)

BD Biosciences, Heidelberg

anti-Caspase-3-Antikörper, anti-Caspase-7-Antikörper, anti-Calceinurin-A-Antikörper

BioCHECK, Münster

Agonistischer anti-CD95-Antikörper, anti-Caspase-8-Antikörper

Biomol, Hamburg

Fluorogene Caspasesubstrate (DEVD-AMC, LEHD-AMC, VEID-AMC, IETD-AMC)

BioRad, München

Biotinylierter Molekulargewichtsmarker, Bradford-Reagens, Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L), Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Ziege-anti-Maus-IgG (H+L), Peroxidase-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Ziege-anti-Ratte-IgG (H+L)

Bio Vision, CA, USA

ApoSensor™ Cell Viability Kit,
LDH-Cytotoxicity Assay Kit

Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden

Etoposid, FK506 (Tacrolimus), Ionomycin, Thapsigargin

Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe

HEPES, Penicillin-Streptomycin, DMEM-Medium, RPMI-1640-Medium

Knoll AG, Ludwigshafen

TNF α

Milipore Corporation, Bedford, MA, USA

Millex-Sterilfilter mit 0,2-0,8 μ m Porengröße

MoBiTec, Göttingen

SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker ("BOA")

Molecular Probes, Eugene, OR, USA

Tetramethylrhodaminethylester (TMRE)

PAA Laboratories, Cölbe

Fötale Kälberserum (FCS)

Pierce, Rockford, IS (USA)

Peroxidase-konjugiertes Streptavidin

Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin, Staurosporin

Roth, Karlsruhe

Acrylamid/Bisacrylamid, Ammoniumperoxodisulfat (APS), Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA), Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA), Ethidiumbromid, Natriumdodecylsulfat (SDS), Rinderserumalbumin (BSA), Tetraethylmethylen-diamin (TEMED), Triton X-100

Sarstedt, Nümbrecht

S-Monovette (Zitrat) 10 ml/9NC

Sigma, Deisenhofen

Actinomycin D, Ampicillin, Brefeldin A, Cycloheximid, 2'-Desoxyadenosin 5'-triphosphat (dATP), Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol (DTT), Doxorubicin, Glycerin, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazolium-bromid (MTT), Morpholinpropansulfonsäure (MOPS), Natriumpyrophosphat, Nonidet P-40, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Phorbol-12-Myristyl-13-Acetat (PMA), Propidiumiodid (PI), α/β -Spectrin aus humanen Erythrozyten, Tween-20, Zitratdextroselösung

Alle übrigen Reagenzien wurden in reinster Form (p.a.), falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1.2 Antikörper

Name	Beschreibung	Hersteller
anti-CD95	Monoklonaler Maus-Antikörper, der den humanen CD95-Rezeptor erkennt und agonistisch Apoptose induziert	BioCHECK
anti-Caspase-3	Monoklonaler Maus-Antikörper, der die Vollängen-p32- und die prozessierte p20/p17-Form der humanen Caspase-3 erkennt (Immunogen: aa 25-145)	BD Biosciences

Name	Beschreibung	Hersteller
anti-Caspase-6	Monoklonaler Maus-Antikörper, der die Vollängen-p34- und die prozessierte p11-Form der humanen Caspase-6 erkennt (Immunogen: aa 271-285)	BD Pharmingen
anti-Caspase-7	Monoklonaler Maus-Antikörper, der die Vollängen-p35- und die prozessierte p20-Form der humanen Caspase-7 erkennt (Immunogen: aa 4-126)	BD Biosciences
anti-Caspase-8	Monoklonaler Maus-Antikörper, der die Vollängen-p55/p53- Form sowie die prozessierten p43/p41-Intermediärfragmente und p18-Form der humanen Caspase-8 erkennt	BioCHECK
anti-Caspase-9	Monoklonaler Maus-Antikörper, der die Vollängen-p46- und die prozessierte p37/35-Form der humanen Caspase-9 erkennt (Immunogen: aa 1-134)	Y. A. Lazebnik, Cold Spring Harbor Labs, USA
anti-Spectrin	Monoklonaler Maus-Antikörper, der sowohl die p240(α)- und p220(β)-Ketten des humanen erythrozytären Spectrin erkennt, als auch die Polypeptide p170, p150 p85 und p45, die bei dessen Spaltung entstehen	Sigma
anti-m-Calpain	Monoklonaler Maus-Antikörper, der die p80-Untereinheit von m-Calpain versch. Säugetierspezies erkennt (Immunogen: aa 502-699)	Alexis Biochemicals
anti- μ -Calpain	Monoklonaler Maus-Antikörper, der die p80-Untereinheit von μ -Calpain versch. Säugetierspezies erkennt (Immunogen: aa 245-265)	Alexis Biochemicals
anti-Apaf-1	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der die Vollängen-p130- und die p84-Form von humanem Apaf-1 erkennt (Immunogen: aa37-52)	Pharmingen
anti-Zytochrom-c	Monoklonaler Maus-Antikörper, der die denaturierte Form von Zytochrom c (p15) versch. Säugetierspezies erkennt (Immunogen: aa 93-104)	BD Pharmingen
anti-Bad	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der Bad (p23) unabhängig von dessen Phosphorylierungszustand erkennt (Immunogen: Abschnitt um Ser112)	New England Biolabs
anti-Phospho-Bad (Ser112)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der Bad ausschließlich bei phosphoryliertem Ser112 erkennt (Immunogen: Abschnitt um Phospho-Ser112)	New England Biolabs
anti-Phospho-Bad (Ser136)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der Bad ausschließlich bei phosphoryliertem Ser136 erkennt (Immunogen: Abschnitt um Phospho-Ser136)	New England Biolabs
anti-Bcl-2	Polyklonaler Ziege-Antikörper, der die p24-Form von Bcl-2 erkennt (Immunogen: Abschnitt am N-terminalen Ende)	Santa Cruz Biotechnology
anti-Bcl-x _L	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der die p26-Form von Bcl-x _L erkennt (Immunogen: aa 18-210)	Transduction Laboratories

2.2 Zellen und Zellkultur

2.2.1 Thrombozyten

Die Thrombozyten mussten vor jedem Versuch frisch gewonnen werden, da sie *in vitro* nur eine begrenzte Lebensdauer haben und als nicht mehr vermehrungsfähige Zellen auch nicht in Kultur gehalten werden können. Sie

wurden aus humanem Vollblut gesunder Spender isoliert oder stammten aus Thrombozytenkonzentraten der Blutbank des Universitätsklinikums Tübingen. Die Blutentnahme erfolgte mit handelsüblichen Blutentnahmesystemen des Typs „Butterfly“ in Sammelröhrchen mit Natriumcitrat (10 %). Nach einem ersten Zentrifugationsschritt (14 min bei 270 g) wurden die oberen zwei Drittel des Plasmaüberstandes vorsichtig abgenommen, um im weiteren Versuchsverlauf als relativ erythrozyten- und leukozytenarmes, thrombozytenreiches Plasma weiterverwendet zu werden. Die Thrombozytenkonzentration und der Anteil von Erythrozyten und Leukozyten des thrombozytenreichen Plasmas wurden jeweils mithilfe eines Zählautomaten (Typ *Beckman-COULTER*) bestimmt. Um eine Verklumpung der Thrombozyten zu vermeiden und im Versuchsansatz unerwünschte Plasmabestandteile zu entfernen, wurde das thrombozytenreiche Plasma in einem 50 ml „Falcon“-Röhrchen nochmals zentrifugiert (17 min bei 910 g), das Zellpellet mit 5 ml Thrombozytenwaschpuffer gewaschen und die Zellen nach abschließender Zentrifugation (10 min bei 910 g) in Thrombozytenpuffer aufgenommen und gut resuspendiert.

Das so erhaltene Thrombozytenkonzentrat enthielt durchschnittlich 50 Erythrozyten und 0,67 Leukozyten pro 1000 Thrombozyten.

Material

Thrombozytenpuffer	Tyrode-HEPES pH 7,4 134 mM NaCl 12 mM NaHCO ₃ 2,9 mM KCl 0,34 mM Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O 1 mM MgCl ₂ 5 mM Hepes 5 mM Glukose
Thrombozytenwaschpuffer	wie Thrombozytenpuffer, jedoch zusätzlich 1 mM EGTA, pH 5,6 zu Endvolumen Hinzugabe von 20 % (v/v) saurer Zitratdextroselösung (ACD)

2.2.2 Erythrozyten

Zur Isolierung von humanen Erythrozyten wurden humane Blutproben von gesunden Spendern in EDTA präpariert. Nach Zentrifugation zur Entfernung von Plasma, Leukozyten und den oberen 10 % der Erythrozyten wurden die

verbleibenden Erythrozyten zweimal in RPMI-1640 mit 0,4 mM CaCl₂ gewaschen und anschließend in Kulturmedium inkubiert.

2.2.3 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Material

RPMI-1640 Medium (Invitrogen Life Technologies)	
1x PBS-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
Penicillin-Streptomycin-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin Die Lösung wurde 1 %ig eingesetzt.
HEPES-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	1 M HEPES Die Lösung wurde 1 %ig eingesetzt.
Fötales Kälberserum (PAA Laboratories)	Vor Gebrauch wurde das Serum für 20 min bei 56 °C hitzeinaktiviert.

Die einzige in dieser Arbeit verwendete eukaryontische Zelllinie waren Jurkat-T-Zellen (J16 und J77), eine humane T-Zelllinie (Subklon 16 und 77), die in Suspension wächst. Zu ihrer Kultivierung wurde RPMI-1640-Medium mit Zusatz von 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 10 mM HEPES verwendet. Sie wurde in Kulturflaschen (50-800 ml) oder Mikrotiterplatten (6-, 12-, 24- oder 96-*well*-Format) bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ gezüchtet und alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:10 verdünnt und passagiert.

Die Kryokonservierung der Zellen wurde mit DMSO als Gefrierschutzmittel durchgeführt. DMSO unterdrückt die Ausbildung von Wasserkristallen während des Einfrierens und verhindert damit die Zerstörung der Zellmembran. Die Zellen wurden abzentrifugiert, das Zellsediment in Einfriermedium (90 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert (max. 20-30 x 10⁶ Zellen/ml) und in 1 ml großen Aliquots auf Kryoröhrchen verteilt. Danach wurden die Zellen zunächst für ca. 48 h bei -80 °C gelagert und anschließend in Flüssigstickstoff (-196 °C) überführt. Wegen der toxischen Wirkung von DMSO bei Raumtemperatur wurden alle Einfrierschritte rasch und auf Eis durchgeführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen schnell auf 37 °C erwärmt, einmal mit 20 ml Zellkulturmedium gewaschen und in Kultur genommen.

2.3 Zellstimulation, Caspaseaktivierung und Apoptoseinduktion

Die Zellstimulation mit dem Ziel der Caspaseaktivierung und Apoptoseinduktion erfolgte mittels verschiedener Stimuli.

Material

Zellkulturmedium (Invitrogen Life Technologies)	Supplementiert wie unter 2.2.3 angegeben
1x PBS-Lösung (Invitrogen Life Technologies)	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
Zytostatikum Daunorubicin (Apotheke UKT)	Stocklösung 1 mg/ml in 50 % MeOH Finalkonzentration 2-10 µg/ml
Zytostatikum Etoposid (Calbiochem)	Stocklösung 20 mg/ml in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 10-25 µg/ml 42,5 µM
Zytostatikum Mitomycin C (Apotheke UKT)	Stocklösung 1 mg/ml in H ₂ O bidest. Finalkonzentration 25 µg/ml
Kinaseinhibitor Staurosporin (Sigma)	Stocklösung 2,5 mM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 2,5-20 µM
Agonistischer anti-CD95-Antikörper (BioCHECK)	Stocklösung 330 µg/ml in PBS Finalkonzentration 1 µg/ml
Caspaseinhibitor zVAD-fmk (Bachem)	Stocklösung 20 mM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 50-100 µM
Calpaininhibitor I (Boehringer)	Stocklösung 10 mg/ml in DMF Finalkonzentration 68 µg/ml
Calpaininhibitor II (Boehringer)	Stocklösung 10 mg/ml in DMF Finalkonzentration 28 µg/ml
Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid (Sigma)	Stocklösung 1 mg/ml in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 10-30 µg/ml
Calcineurininhibitor FK506 (Calbiochem)	Stocklösung 1 mM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 200-500 nM
Calciumionophor Ionomycin (Calbiochem)	Stocklösung 2 mM in DMSO/Ethanol Finalkonzentration 4 µM
TNF α (Knoll AG)	Stocklösung 5 µg/20 µl in PBS Finalkonzentration 20 ng/ml
Tributylzinn (Merck-Schuchardt)	Stocklösung 1mM in DMSO Finalkonzentration 0,5-5 µM

Die Chemikalien wurden wie angegeben gelöst und die Stocklösungen bei -70 °C (TBT bei +4 °C) aufbewahrt.

Die Zellen wurden entweder in Mikrotiterplatten mit 6, 12, 24 oder 96 Vertiefungen oder in Eppendorf-Mikrogefäßen in ihrem jeweiligen Kulturmedium, dem der jeweilige Stimulus zugesetzt worden war, bei 37 °C inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Zellen (Thrombozyten 1 min bei 14000 g bzw. übrige bei 8000 g) abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, bei 4 °C nochmals auf gleiche Weise abzentrifugiert und das trockene Zellsediment dann bei -70 °C eingefroren.

2.4 Methoden zum Nachweis von Apoptose bzw.

Caspaseaktivierung

Apoptose bzw. Caspaseaktivierung lässt sich mittels verschiedener Methoden nachweisen. Für den Nachweis von Apoptose bzw. Apoptose-typischen Veränderungen wurden die Durchflusszytometrie mit dem Nachweis von Zellschrumpfung (Pallardy et al. 1999), hypodiploiden Nuklei (Nicoletti et al. 1991), Propidiumiodid-positiven Zellen und/oder dem Nachweis der Externalisierung von Phosphatidylserin eingesetzt. Der Nachweis einer Caspaseaktivierung erfolgte anhand typischer aktiver Spaltformen im Westernblot oder mittels fluorometrischer Verfahren.

2.4.1 Messung der Caspaseaktivität mithilfe fluorometrischer Verfahren

Die im Verlauf der Apoptose auftretende Caspaseaktivität wurde in der vorliegenden Arbeit fluorometrisch bestimmt. Grundlage dieses Tests sind fluorogene Tetrapeptidsubstrate, aus denen Caspase-vermittelt das Fluorophor Aminomethylcumarin (AMC) freigesetzt wird. Nur in seiner freien Form weist AMC die typischen Fluoreszenzeigenschaften auf. Über eine kinetische Aufzeichnung der Fluoreszenzzunahme während der Reaktion lässt sich die relative Caspaseaktivität aus der Anfangssteigung der Fluoreszenzkurve ermitteln. Der Einsatz verschiedener Tetrapeptidsubstrate ermöglicht eine bedingte Spezifizierung der Caspaseaktivität. Das Substrat Ac-DEVD-AMC wird bevorzugt von Caspase-3 gespalten, mit geringerer Spezifität jedoch auch

durch Caspase-8 und Caspase-7 (Thornberry et al. 1997); das Substrat Ac-VEID-AMC wiederum bevorzugt durch Caspase-6.

Material

Lysepuffer	20 mM HEPES 84 mM Kaliumchlorid 10 mM Magnesiumchlorid 200 µM EDTA 200 µM EGTA 0,5 % (v/v) NP-40 1 mM PMSF 1 mM DTT 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin 5 µg/ml Aprotinin
1x Reaktionspuffer	37,5 mM HEPES 75 mM Natriumchlorid 7,5 % (w/v) D(+)-Sucrose 0,075 % (w/v) CHAPS 1,5 mM Calciumchlorid 10 mM DTT 50 µM Ac-DEVD-AMC, Ac-VEID-AMC oder. Ac-IETD-AMC (Biomol) pH 7,4

Durchführung

Die jeweils angegebene Anzahl von Zellen pro Vertiefung wurde in 96-*well*-Platten mit den verschiedenen Apoptosestimuli wie unter 2.3 beschrieben für die angegebenen Zeiten behandelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt (Thrombozyten 1 min bei 14000 g bzw. übrige bei 8000 g) und das trockene Zellsediment für 10 min auf Eis in 50 µl Lysepuffer lysiert. Die Caspaseaktivität wurde in einem finalen Volumen von 200 µl 1x Reaktionspuffer bestimmt. Dazu wurde der Ansatz für die jeweils angegebenen Zeiten bei 37 °C inkubiert und die Freisetzung von AMC fluorometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm mithilfe des MicroTek FLI-Fluorometers (Bio-Tek Kontron Instruments) alle 2 min gemessen. Mit der geräteeigenen Software (KC4) wurde die Anfangssteigung der kinetischen Kurve als relatives Maß der Caspaseaktivität bestimmt.

Bei Verwendung des fluorogenen Substrats AFC wurde mit Wellenlängen von 400 (Exzitation) bzw. 505 nm (Emission) gearbeitet.

2.4.2 *In-vitro*-Spaltung verschiedener Proteine mithilfe gereinigter Caspasen

Mithilfe gereinigter rekombinanter Caspasen wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene gereinigte Proteine oder Zelllysate *in vitro* prozessiert.

Material

1x Reaktionspuffer	37,5 mM HEPES 75 mM Natriumchlorid 7,5 % (w/v) D(+)-Sucrose 0,075 % (w/v) CHAPS 1,5 mM Calciumchlorid 10 mM DTT 50 µM Ac-DEVD-AMC, Ac-VEID-AMC oder. Ac-IETD-AMC (Biomol) pH 7,4
zVAD-fmk	20 mM zVAD-fmk (Bachem) in DMSO/Ethanol
Gereinigte Caspasen	0,5-1 mg/ml
4x SDS-Auftragspuffer	250 mM Tris-Hydrochlorid 25,8 % (v/v) Glycerin 8,2 % (w/v) SDS 0,04 % (w/v) Bromphenolblau 4 % (v/v) β-Mercapto-Ethanol

Durchführung

Zelllysate von 2×10^6 Zellen wurden wie unter 2.4.1 angegeben hergestellt, und 200 µg Protein wurden mit je 2 µg der gereinigten Caspase in An- oder Abwesenheit von 100 µM zVAD-fmk in einem finalen Volumen von 50 µl 1x Reaktionspuffer für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1x SDS-Auftragspuffer gestoppt, das Gemisch dann für 5 min auf 95 °C erhitzt, auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und einer Westernblot-Analyse unterzogen.

Die Caspase-vermittelte Spaltung von gereinigten Proteinen wurde analog durchgeführt. Eingesetzt wurden je 1 µg des gereinigten Proteins und 1 µg der gereinigten Caspase in einem finalen Volumen von 50 µl 1x Reaktionspuffer mit oder ohne 100 µM zVAD-fmk.

2.4.3 *In-vitro*-Prozessierung von Caspasen und Spectrin

Zur Bestimmung der *In-vitro*-Spaltung von Caspasen und Spectrin wurden 50×10^6 Erythrozyten oder 2×10^6 Jurkat-T-Zellen in $60 \mu\text{l}$ Lysepuffer in Abwesenheit oder unter Zugabe von zVAD-fmk lysiert. Anschließend wurden $2 \mu\text{g}$ aktiver Caspase-3 oder Caspase-6 zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für drei Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt. Auf ähnliche Weise wurde die *In-vitro*-Spaltung von aufgereinigtem Spectrin durch Zugabe von $2 \mu\text{g}$ aufgereinigter Caspase-3 oder Caspase-6 zu $6 \mu\text{g}$ aufgereinigtem α/β -Spectrin durchgeführt. Die Spectrinspaltung wurde mittels Westernblot-Verfahren nachgewiesen.

2.4.4 *Präparation zellfreier Extrakte und Stimulation mit Zytochrom c*

Zur Untersuchung, ob Zytochrom c in der Lage ist, verschiedene Caspasen in zytosolischen Extrakten zu aktivieren, wurden die jeweiligen Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen, in Puffer A, bestehend aus 20 mM HEPES pH 7,4, 10 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA und 1 mM PMSF, resuspendiert und für 15 min. auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen in einem Douncer (Abb.7) mit 30 Stößen homogenisiert und bei 14000 g und 4 °C für 10 min. zentrifugiert. Dadurch erhielt man kern- und mitochondrienfreie Zytosolextrakte. Zur Lyse von

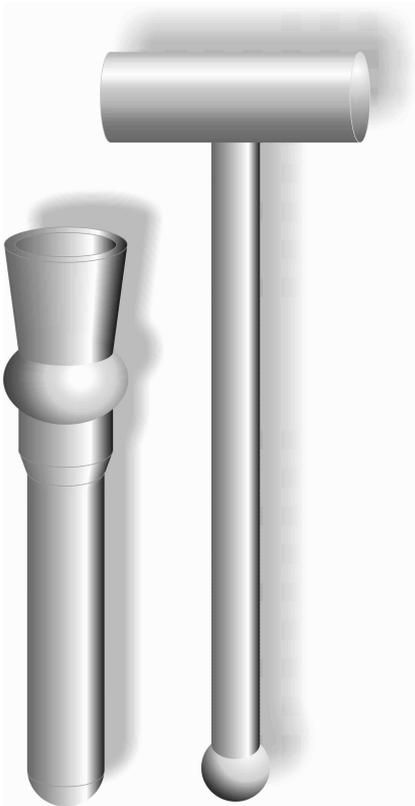


Abb. 7: Douncer:

Dieses Gerät zum Zellaufschluss besteht aus einem unteren Teil zur Aufnahme der Zellsuspension und einem oberen (Stößel), der mit seinem kugelförmigen Ende und der Innenwand des unteren Teils einen kapillaren Spalt (70 µm) bildet. Dieser Spalt ist so bemessen, dass die Zellen darin durch die entstehende Beschleunigung bei der Auf- und Abwärtsbewegung des Stößels zerrissen werden und damit die äußere Zellmembran zerstört wird. Die Zellorganellen werden dabei jedoch nicht eröffnet.

Thrombozyten waren 100 *Douncer*-Stöße nötig, um dabei ausreichende Proteinmengen zu erhalten, da Thrombozyten aufgrund ihrer geringeren Größe im Spalt des Douncers deutlich schlechter aufgeschlossen werden. Die thrombozytären S100-Extrakte erhielt man durch eine anschließende Zentrifugation bei 50000 g über 90 min. Zur Aktivierung der Caspasen wurden 1 mM DTT, 1,4 µM Zytochrom c aus Pferdeherz (Sigma) und 1 mM dATP zu den Überständen zugegeben und bei 37 °C für die Dauer der angegebenen Zeiten inkubiert. Die Reaktionsgemische wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und hinsichtlich ihrer Aktivierung von Caspase-8, Caspase-9 und Caspase-3 untersucht (2.4.7.6) bzw. in einer FPLC (2.4.7.7) zunächst nach Molekülgröße aufgetrennt.

2.4.5 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

Die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) wurde, wie bei Belka et al. beschrieben (Belka et al. 2000), unter Verwendung des fluoreszierenden $\Delta\psi_m$ -Indikators Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) und anschließender durchflusszytometrischer Messung bestimmt.

TMRE ist ein fluoreszierender Indikator, der sich in der inneren Mitochondrienmembran in Abhängigkeit vom mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\psi_m$) anreichert. Eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) kann nun mittels Durchflusszytometrie in Form reduzierter Fluoreszenz im FL-2 Modus gemessen werden. Die Darstellung erfolgte in einer logarithmischen Skala.

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 15 min mit 20 nM TMRE vorinkubiert und anschließend wie angegeben mit Tributylzinn (TBT) stimuliert.

2.4.6 Zellvitalitätsmessungen

2.4.6.1 Lactatdehydrogenase (LDH)-Freisetzung

Die Bestimmung der LDH-Freisetzung erfolgte mit dem *LDH-Cytotoxicity Assay Kit* der Firma Bio Vision, CA, USA und anschließender Messung im ELISA-Reader.

2.4.6.2 Intrazellulärer ATP-Gehalt

Die Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts erfolgte mit dem *ApoSensor™ Cell Viability Kit* der Firma Bio Vision, CA, USA und anschließender Messung im Luminometer.

2.4.7 Analyse von Proteinen

2.4.7.1 Kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe (z.B. um eine gleichmäßige Proteinmenge im Rahmen der SDS-PAGE, des Westernblots oder der FPLC und der Enzymaktivitätsmessung zu gewährleisten) wurde die

Methode nach Bradford eingesetzt (Bradford 1976). Bei diesem Test lagert sich der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine an, was eine Veränderung des Absorptionsverhaltens des Farbstoffs bewirkt.

Material

5x Bradford-Lösung (BioRad)	Vor Gebrauch wurde die Lösung 1:5 in H ₂ O bidest. verdünnt.
BSA-Eichgerade	50-400 µg/ml BSA (Roth) in PBS

Durchführung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde im Mikromaßstab in 96-*well*-Platten durchgeführt. 1-10 µl der zu untersuchenden Proteinlösung wurden mit 200 µl 1x Bradford-Reagens versetzt. Bei jeder Messung wurde eine Verdünnungsreihe von BSA (50 µg/ml bis 400 µg/ml) als interner Standard mitgeführt. Der Abgleich erfolgte gegen einen Reagenzienleerwert. Die Absorptionsmessung wurde im ELISA Reader (Dynatech MR5000) bei 630 nm (Referenzwellenlänge 405 nm) durchgeführt. Mithilfe der geräteeigenen Software wurden die Daten der BSA-Verdünnungsreihe ausgewertet und die Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt.

2.4.7.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Auftrennung von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli verwendet (Laemmli 1970). Hierbei werden die Proteine mithilfe von SDS denaturiert und Disulfidbrücken mit β-Mercapto-Ethanol reduziert. Die Anlagerung des anionischen Detergens SDS an die Polypeptidkette erfolgt proportional zum Molekulargewicht des Polypeptids. Da jedes angelagerte SDS-Molekül die Polypeptidkette mit einer negativen Ladung versieht, ergibt sich für alle Proteine ein nahezu konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis der SDS-Polypeptid-Aggregate, sodass die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel allein von der Größe des Polypeptids abhängig ist. Mithilfe geeigneter Molekulargewichtsmarker ist die Größe eines Polypeptids auf diese Weise leicht zu bestimmen.

Durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Gel- und Puffersystems mit Sammel- und Trenngel wird das Auflösungsvermögen der SDS-PAGE wesentlich erhöht (Laemmli 1970).

Material

Acrylamid-Lösung (Roth)	29,2 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid in H ₂ O bidest.
APS-Lösung	10 % (w/v) APS in H ₂ O bidest.
TEMED (Roth)	
Sammelgelpuffer	0,74 % (w/v) SDS 1 M Tris-Hydrochlorid pH 6,8
Trenngelpuffer	0,384 % (w/v) SDS 1,5 M Tris-Hydrochlorid pH 8,8
4x SDS-Auftragspuffer	250 mM Tris-Hydrochlorid 25,8 % (v/v) Glycerin 8,2 % (w/v) SDS (Roth) 0,04 % (w/v) Bromphenolblau 4 % (v/v) β-Mercapto-Ethanol
1x Elektrodenpuffer	0,1 % (w/v) SDS 1,9 M Glycin 250 mM Tris-Hydrochlorid

Durchführung

Aus den Stocklösungen wurden die Gelmischungen hergestellt. Sie enthielten:

Komponente	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/Bisacrylamid	5 % (w/v)	8-15 % (w/v)
Tris-Hydrochlorid pH 6,8	135 mM	-
Tris-Hydrochlorid pH 8,8	-	390 mM
SDS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
APS	0,1 % (w/v)	0,05 % (w/v)

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED gestartet und die polymerisierende Lösung sofort verwendet. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 60 min wurde der Alkohol durch Spülen mit H₂O bidest. entfernt und das Sammelgel gegossen.

Die zu testenden Proteinlösungen wurden mit 1x SDS-Auftragspuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese

wurde in 1x Elektrodenpuffer solange durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront die untere Gelkante erreicht hatte.

2.4.7.3 Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen

Für die Darstellung der Proteinbanden im Gel stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Die einfachste Methode ist die Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R250. Das Prinzip dieser Färbung ist identisch mit dem der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976). Die Nachweisgrenze dieser Färbung liegt bei ca. 100 ng Protein pro Bande.

Material

Coomassie-Färbelösung	0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 50 % (v/v) Methanol 7 % (v/v) Essigsäure in H ₂ O bidest.
Entfärbelösung	20 % (v/v) Methanol 7 % (v/v) Essigsäure in H ₂ O bidest.

Durchführung

Nach dem Lauf der SDS-PAGE wurde das Trenngel für 30 min in Coomassie-Färbelösung schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde das Gel in H₂O bidest. gespült und solange in der Entfärbelösung inkubiert, bis der Gelhintergrund farblos war. Danach wurde das Gel für 2 h mit 50 % (v/v) Methanollösung (Merck) behandelt und zwischen zwei Cellophanfolien (Roth) getrocknet.

2.4.7.4 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen wurde nach Rabilloud et al. (Rabilloud et al. 1988) durchgeführt. Sie zeichnet sich durch eine 100- bis 1000-fach größere Sensitivität im Vergleich zur Coomassie-Färbung aus (Nachweisgrenze 0,1-1 ng Protein pro Bande).

Material

Fixierlösung	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure 0,0185 % (v/v) Formaldehyd
Thiosulfatlösung	0,8 mM Natriumthiosulfat in H ₂ O bidest.
Imprägnierlösung	0,2 % (w/v) Silbernitrat 0,0278 % (v/v) Formaldehyd
Entwicklerlösung	6 % (w/v) Natriumcarbonat 16 µM Natriumthiosulfat 0,0185 % (v/v) Formaldehyd
Stopplösung	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure

Durchführung

Nach der SDS-PAGE wurde das Trenngel für die angegebenen Zeiten mit den verschiedenen Lösungen in einer Schwenkvorrichtung inkubiert:

Lösung	Zeit
Fixierlösung	60 min
Dreimal mit 50 % (v/v) Methanol in H ₂ O bidest. waschen, jeweils	20 min
Thiosulfatlösung	1 min
Dreimal mit H ₂ O bidest. waschen, jeweils	20 s
Imprägnierlösung	20 min
Zweimal mit H ₂ O bidest. waschen, jeweils	30 s
Entwicklerlösung	bis Banden sichtbar
Stopplösung	10 min
50 % (v/v) Methanol in H ₂ O bidest.	2 h

Anschließend wurde das Gel zwischen zwei Cellophanfolien (Roth) getrocknet.

2.4.7.5 Westernblot-Analyse

Dieses Verfahren dient dem selektiven Nachweis einzelner Polypeptide oder Proteine mittels spezifischer Antikörper. Hierfür müssen die im SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine zunächst auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert werden (Blotting). Der Nachweis erfolgt anschließend auf der Membran mithilfe spezifischer Primärantikörper und eines geeigneten Detektorsystems auf der Basis eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde im Nasstankverfahren durchgeführt und das peroxidasebasierte „Enhanced-Chemoluminescence“ (ECL)-Detektionssystem verwendet.

Material

PVDF-Membran "Hybond [®] -ECL" (Amersham-Pharmacia)	
Filterpapier (GB002; Schleicher und Schüll)	
Transferapparatur (BioRad)	
Transferpuffer	2,93 g/l Glycin 5,28 g/l Tris Base 20 % (v/v) Methanol
5 % Milchpulverlösung	5 % (v/v) fettarmes Milchpulver 10 mM Tris-Hydrochlorid 150 mM Natriumchlorid 0,02 % (v/v) Triton X-100 pH 8,0
1x TBS 0,02 % (v/v) Triton X-100	10 mM Tris-Hydrochlorid 150 mM Natriumchlorid 0,02 % (v/v) Triton X-100 pH 8,0
Primärantikörperlösung	0,5-2 µg/ml in 1x TBS 0,02 % (v/v) Triton X-100
Sekundärantikörperlösung	Sekundärantikörperstocklösung, Peroxidasegekoppelt (BioRad) 1:4000 verdünnt in 5 % Milchpulver
Westernblot-ECL-Detection-Kit (Amersham-Pharmacia)	
Hyperfilm-ECL (Amersham-Pharmacia)	

Durchführung

Der Zusammenbau des Blots erfolgte in kaltem Transferpuffer. Hierzu wurde die Transferkassette geöffnet und ein Transferschwamm auf die anodengerichtete Seite der Kassette gelegt. Darauf wurden ein Filterpapier, die PVDF-Membran, das Gel, zwei Lagen Filterpapier und der zweite Transferschwamm gelegt. Die Kassette wurde geschlossen, in den Transfertank überführt und dieser mit kaltem Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer wurde für 90-120 min bei 0,5 A und 4 °C durchgeführt. Im Anschluss wurden die unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membran durch einstündige Inkubation mit 5 %iger Milchpulverlösung bei Raumtemperatur blockiert und der Blot zweimal mit 1x TBS 0,02 % (v/v) Triton X-100 gewaschen. Die Inkubation mit der entsprechenden Primärantikörperlösung wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Danach wurde die Membran fünfmal für 3 min mit 1x TBS 0,02 % (v/v) Triton X-100 gewaschen und für 1 h mit der entsprechenden Sekundärantikörperlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde

der Blot weitere 6 mal für 10 min mit 1x TBS 0,02 % (v/v) Triton X-100 gewaschen. Zur Detektion wurden gleiche Volumina der Detektionsreagenzien A und B (Westernblot-ECL-Detection-Kit, Amersham-Pharmacia) gemischt, die Membran darin für 1 min inkubiert, in der Dunkelkammer ECL-Filme (Hyperfilm-ECL, Amersham-Pharmacia) für verschiedene Expositionszeiten aufgelegt und anschließend entwickelt.

2.4.7.6 Westernblot-Analyse der Caspase- und Caspasesubstrat-Prozessierung

Die proteolytische Prozessierung der Caspasen und Caspasesubstrate (z.B. Spectrin) wurde in der vorliegenden Arbeit durch Westernblot-Analyse nachgewiesen.

Material

PBS	10 mM Natriumphosphat 150 mM Natriumchlorid pH 7,4
Lysepuffer	50 mM Tris-Hydrochlorid 150 mM Natriumchlorid 200 µM EDTA 200 µM EGTA 20 mM Natriumpyrophosphat 10 mM Natriumfluorid 1 mM Natriumvanadat 3 µg/ml Pepstatin A 3 µg/ml Aprotinin 3 µg/ml Leupeptin 2 mM PMSF 1 % (v/v) Triton X-100
4x SDS-Auftragspuffer	250 mM Tris-Hydrochlorid 25,8 % (v/v) Glycerin 8,2 % (w/v) SDS 0,04 % (w/v) Bromphenolblau 4 % (v/v) β-Mercapto-Ethanol

Durchführung

Die jeweiligen Zellen wurden in den angegebenen Zellzahlen mit den verschiedenen Apoptosestimuli, wie unter 2.3 beschrieben, behandelt und für die angegebenen Zeiten im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt (Thrombozyten 1 min bei 14000 g bzw. übrige

bei 8000 g), in kaltem PBS gewaschen und bei -70 °C eingefroren. Zur Analyse wurden sie auf Eis für 10 min in 50 µl Lysepuffer lysiert. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 14000 g sedimentiert und der klare Überstand mit 1x SDS-Auftragspuffer versetzt. Die so präparierten Zellextrakte wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und auf ein 6-15 %iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen (siehe 2.4.7.2). Die Westernblot-Analyse (siehe 2.4.7.5) erfolgte mit den unter 2.1.2 angegebenen Primärantikörpern.

2.4.7.7 Gelfiltration (FPLC)

Die Gelfiltration oder Flüssigchromatographie (FPLC) ist eine Methode zur schonenden Auftrennung von Protein- oder sonstigen Makromolekülgemischen anhand ihres Molekulargewichts (Porath und Flodin 1959; Janson 1987; Hagel 1989). Dabei wird ein in speziellem Puffer gelöstes Molekülgemisch durch eine Säule gepresst, die mit einem Gel als chromatographischem Medium gefüllt ist. Ein Gel ist ein heterogenes System aus einer flüssigen (üblicherweise wässrigen) Phase, welche die Poren einer festen Phase, der Matrix, ausfüllt. Die Größe der Poren wird dabei entsprechend der Größe der zu trennenden Moleküle gewählt. Wichtige Eigenschaften der Matrix sind chemische und physikalische Stabilität sowie ihre Inertie, um die zu trennenden Moleküle weder zu verändern noch zu binden. Relativ kleine Moleküle können nun im Gegensatz zu größeren in die Poren des Gels diffundieren, weshalb sie vom Puffer nur langsamer wieder ausgewaschen werden und dementsprechend die Säule in Abhängigkeit von ihrer Größe später verlassen.

Die aufzutrennenden Proben (mitochondrienfreie S100-Extrakte aus unbehandelten Thrombozyten, S100-Extrakte aus mit 2 µM TBT für 10 min behandelten Thrombozyten oder mit 10 µM Zytocrom c und 1 mM dATP für 30 min behandelten S100-Extrakte aus unbehandelten Thrombozyten) enthielten jeweils 3,5 mg Protein in einem Volumen von 500 µl und wurden auf eine Superdex-200 HR 10/30-Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia Biotech) aufgebracht. Diese mit Puffer A äquilibrierte Säule wurde in einem Bio-Rad BioLogic FPLC-System bei einer Flussrate von 0,5 ml/min betrieben. Für die Kalibrierung der Säule wurde ein Molekulargewichtsstandard der Firma

Amersham Pharmacia Biotech verwendet (Thyroglobulin, $M_r = 667.000$; Ferritin, $M_r = 440.000$; Catalase, $M_r = 232.000$; Aldolase, $M_r = 150.000$; Immunglobulin). Fraktionen zu jeweils 500 μl wurden gesammelt und der weiteren Analyse mittels Westernblot oder Enzymaktivitätsassay zugeführt.

2.4.7.8 Immunopräzipitation

Zur Immunopräzipitation von Caspase-8 wurden 10^9 frisch präparierte Erythrozyten oder 10^7 Jurkat-T-Zellen in 100 μl Lysepuffer lysiert. Die Proben wurden wie angegeben mit 100 μM zVAD-fmk vorinkubiert, bevor 2 μg aufgereinigte Caspase-6 zugegeben wurden. Die Lysate wurden bei 37 $^\circ\text{C}$ für drei Stunden im Schüttelmixer inkubiert. Anschließend wurden 2 μg anti-Caspase-8 und 20 μl Protein-G-Sepharose (Amersham) zugegeben. Als Kontrolle wurden die Reaktionsmischungen in Abwesenheit zellulärer Lysate inkubiert. Die Immunopräzipitation wurde bei 4 $^\circ\text{C}$ über Nacht unter Schütteln durchgeführt. Das Präzipitat wurde anschließend dreimal in einem zweiten Puffer gewaschen. 15 μl des Präzipitats wurden wie unter 2.4.7.6 angegeben mittels Westernblot-Analyse auf Caspase-8-Prozessierung hin untersucht. 5 μl des Präzipitats wurden zur fluorometrischen Bestimmung der Caspaseaktivität eingesetzt.

Material

Lysepuffer	1 % NP-40 20 mM HEPES pH 7,4 84 mM KCl 10 mM MgCl_2 0,2 mM EDTA 0,2 mM EGTA 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin A
Waschpuffer	20 mM HEPES pH 7,4 150 mM NaCl 10 % Glycerol 0,01 % Triton X-100

2.4.8 Zytometrie (FACS)

Verwendetes Durchflusszytometer war ein FACScalibur der Firma Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg. Zur Analyse der Daten kam die CellQuest-Analyse-Software zur Anwendung.

2.4.8.1 Zytofluorometrischer Nachweis der Zellschrumpfung

Die Zellschrumpfung gilt sowohl als Phänomen der Apoptose, das zu deren Quantifizierung herangezogen werden kann, wie auch als typische Erscheinung des erythrozytären Alterungsprozesses.

Die Zellschrumpfung wurde mithilfe der Methode von Pallardy et al. (Pallardy et al. 1999) gemessen. Dabei analysiert man durchflusszytometrisch mittels *forward scatter* (FSC, 180°-Scatter) die in Richtung des Laserstrahls auftretende Streuung des Laserlichts als relatives Maß für die Zellgröße.

2.4.8.2 Zytofluorometrischer Nachweis Propidiumiodid-positiver Zellen

Der Nachweis der Zellmembranintegrität erfolgte mittels Propidiumiodidfärbung der Zellen. Tote Zellen weisen eine permeable Zellmembran auf, durch die Propidiumiodid in die Zelle eindringen und in die nukleäre DNA interkalieren kann. Die resultierende rote Fluoreszenz lässt sich durchflusszytometrisch nachweisen. Diese Methode lässt jedoch keine Unterscheidung zwischen Nekrose und der im Rahmen der Apoptose spät auftretenden sekundären Nekrose zu.

Material

Propidiumiodid-Färbelösung	5 µg/ml Propidiumiodid in 1x PBS
----------------------------	-------------------------------------

Durchführung

Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt (5 min, 200 g), in der Propidiumiodid-Färbelösung aufgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die rote Fluoreszenz im Durchflusszytometer (FACScalibur, BD Biosciences) bei 585 nm analysiert. Die Zellen mit gestörter Membranintegrität ließen sich im FL2-Histogramm als Population mit erhöhter

roter Fluoreszenz "rechts" der gesunden Kontrollpopulation prozentual erfassen.

2.4.8.3 Zytofluorometrischer Nachweis von hypodiploiden Nuklei

Während der Apoptose wird die zelluläre DNA durch DNAsen internukleosomal gespalten. Die entstehenden DNA-Fragmente können durch die Kernporen den Zellkern verlassen, sodass dieser sukzessive DNA verliert. Dieses Phänomen kann man als Messparameter der Apoptose heranziehen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Quantifizierung der Apoptose anhand der hypodiploiden Nuklei nach der Methode von Nicoletti et al. (Nicoletti et al. 1991). Hierbei werden die Nuklei durch hypotone Zellyse freigesetzt und die nukleäre DNA mit Propidiumiodid angefärbt. Die Quantifizierung der nukleären DNA-Menge erfolgt durchflusszytometrisch, und alle Zellkerne mit weniger als dem diploiden DNA-Gehalt (G_0/G_1 -DNA-Gehalt) werden als apoptotisch betrachtet.

Material

Hypotoner Lysepuffer	1 % (w/v) Natriumcitrat 0,1 % (v/v) Triton X-100 50 µg/ml Propidiumiodid in H ₂ O bidest.
----------------------	---

Durchführung

Jeweils $3-5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung wurden in 96-*well*-Platten (bzw. 2×10^6 Zellen pro Vertiefung in 6-*well*-Platten) für 18-24 h mit den angegebenen Apoptosestimuli behandelt. Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen in hypotonem Lysepuffer für 5 min lysiert. Anschließend wurde die rote Fluoreszenz der Zellkerne bei 585 nm im Durchflusszytometer (FACScalibur, BD Biosciences) analysiert. Die apoptotischen, hypodiploiden Zellkerne mit reduzierter roter Fluoreszenz ließen sich im FL2-Histogramm "links" der diploiden G_0/G_1 -Population prozentual erfassen.

2.4.8.4 Nachweis der Externalisierung von Phosphatidylserin

Frisch präparierte Erythrozyten (2×10^6 pro Probe) wurden über 2 h bei 37 °C in RPMI-1640 mit Zusatz von 0,4 mM CaCl₂ äquilibriert. Vor Stimulation mit 8 µM Ionomycin wurde ein Teil der Proben mit einer Mischung aus Calpaininhibitor I

(68 µg/ml) und II (28 µg/ml) vorinkubiert. Um die Externalisierung von Phosphatidylserin nachzuweisen, wurden die Zellen mit Annexin-V-FITC nach Herstelleranweisung (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch unter Verwendung des FL1-Profiles gemessen.

Material

RPMI-1640	suppl. mit 0,4 mM CaCl ₂
Ionomycin	8µM
Calpaininhibitor I	68 µg/l
Calpaininhibitor II	28 µg/l
Annexin-V-FITC	

2.4.9 Morphologische Untersuchungen

Frisch präparierte Erythrozyten (2×10^6 pro Probe) wurden über 2 h bei 37 °C in RPMI-1640 mit Zusatz von 0,4 mM CaCl₂ äquilibriert. Vor Stimulation mit 8 µM Ionomycin wurde ein Teil der Proben mit einer Mischung aus Calpaininhibitor I (68 µg/ml) und II (28 µg/ml) vorinkubiert. Für die Untersuchungen der Erythrozytenmorphologie kam ein Umkehrmikroskop vom Typ Axiovert 135 der Firma Zeiss zum Einsatz.

Material

wie unter 2.4.8.4 außer Annexin-V-FITC

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zu Apoptosemechanismen in Erythrozyten

3.1.1 Erythrozyten enthalten Procaspase-8 und -3

Um das Vorkommen von Caspasen und anderen Komponenten des apoptotischen Apparates in menschlichen roten Blutkörperchen zu untersuchen, wurden hochreine Erythrozytenfraktionen aus dem Vollblut gesunder Spender gesammelt und mittels Westernblot-Verfahren mit Antikörpern gegen verschiedene Proteine untersucht. Wie aus Abb. 8A ersichtlich, enthielten 10×10^6 Erythrozyten Caspase-3 in einer Menge, die 2×10^6 Jurkat-T-Zellen entsprach. Ebenfalls fanden sich entsprechende Mengen an Caspase-8 (Abb. 8B). Es gelang jedoch weder der Nachweis von Procaspase-2 und -6 (Daten nicht gezeigt), noch von Procaspase-7 und -9 (Abb. 8CD). Auch fehlten in den Erythrozyten Apaf-1 und Zytocrom c, die in kernhaltigen Zellen exprimiert werden (Abb. 8EF). Des weiteren fanden sich von den untersuchten Mitgliedern der Bcl-2-Familie weder Bcl-2, Bcl-x_L, noch Bad (Daten nicht gezeigt). Folglich verfügen Erythrozyten zwar über Caspase-8 und -3, jedoch über keine der Komponenten des mitochondrialen Apoptosoms.

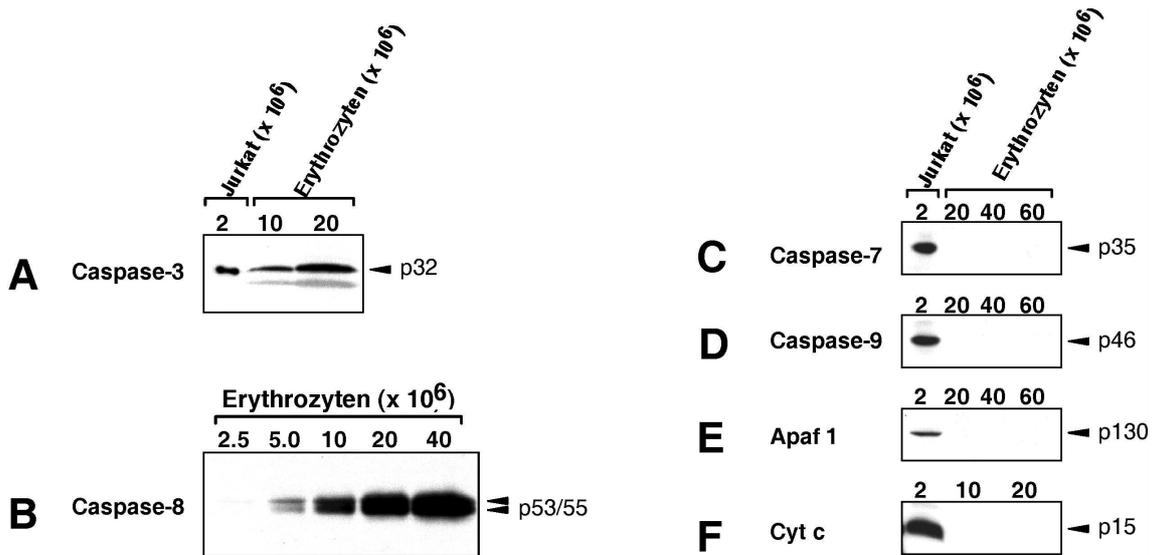


Abb. 8: Reife menschliche Erythrozyten enthielten Procaspase-3 und Procaspase-8.

Die Lysate wurden aus den jeweils angegebenen Zellzahlen frisch präparierter Erythrozyten oder Jurkat-T-Zellen hergestellt. Auftrennung mittels SDS-PAGE und Nachweis der Expression von Caspase-3 (A) bzw. Caspase-8 (B) durch Westernblot.

Zusätzlich wurden Erythrozyten auf die Expression von Caspase-7 (C), -9 (D), Apaf-1 (E) und Zytochrom c (F) hin untersucht. Im Gegensatz zu Procaspase-3 und -8 ließen sich diese Moleküle nur in Jurkat-T-Zellen, nicht jedoch in Erythrozyten nachweisen.

Bei der schwachen Proteinbande in (A) handelt es sich um ein unspezifisches Protein, das in der Gelelektrophorese zusammen mit Hämoglobin wanderte. Die Pfeile markieren die Position von Procaspase-3, den zwei verschiedenen Isoformen von Procaspase-8, Caspase-8/a und -8/b, und den anderen Proteinen.

3.1.2 Werden Caspasen in intakten Erythrozyten aktiviert?

Da Erythrozyten Caspasen enthalten, sollte zunächst untersucht werden, ob diese unter bestimmten Bedingungen aktiviert werden. Zuerst wurde dazu die Caspasespaltung in Abhängigkeit von der Zeit nach Gewinnung der Erythrozyten bestimmt. Jedoch ließen sich weder in frisch gewonnenen noch in 60 Tage oder länger aufbewahrten Erythrozyten messbare Quantitäten der aktiven Untereinheiten von Caspase-3 oder -8 nachweisen (Abb. 9A). Um zu untersuchen, ob sich Caspasen in intakten Erythrozyten überhaupt aktivieren lassen, wurden verschiedene bekannte Apoptosestimuli (Ojcius et al. 1991; Bertrand et al. 1994; Herr et al. 1997; Consoli et al. 1998; Goldkorn et al. 1998; Wesselborg et al. 1999) getestet. Keiner der von uns untersuchten

proapoptotischen Stimuli (agonistischer anti-CD95-Antikörper, alleine oder in Kombination mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid, Proteinkinaseinhibitor Staurosporin und onkologische Chemotherapeutika wie Etoposid und Mitomycin C) war in der Lage, die Aktivierung von Caspase-8 auszulösen (Abb. 9BC). Weiterhin gelang auch mit anderen proapoptotischen Agenzien, wie ionisierender Strahlung, Ceramiden, Oxidantien, TNF α oder Phorbol ester und Calciumionophoren, keine Aktivierung von Caspase-3 oder -8 in Erythrozyten (Tab. 3).

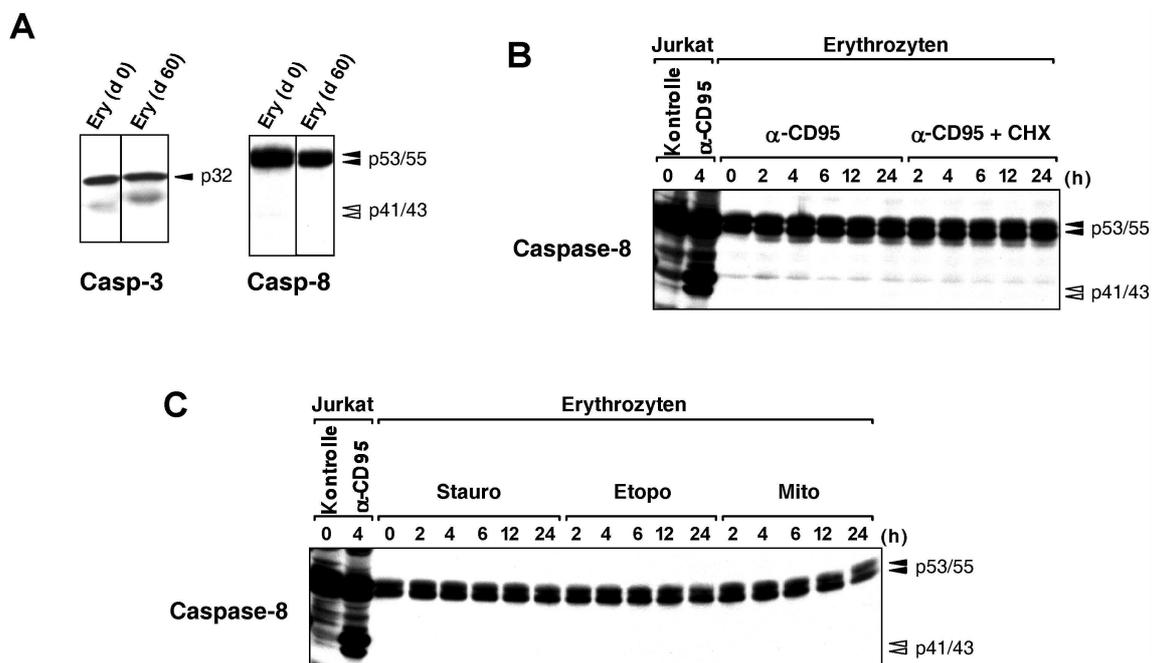


Abb. 9: Erythrozytäre Caspasen wurden weder durch lange Lagerung noch durch die verschiedensten proapoptotischen Stimuli aktiviert.

(A) Zelluläre Lysate aus frisch präparierten Erythrozyten (Ery) bzw. über einen Zeitraum von 60 Tagen (d) gelagerten Erythrozyten wurden mittels Westernblot auf Caspase-3 (links) und Caspase-8 (rechts) hin untersucht. In beiden Lysaten konnten nur die Proformen der jeweiligen Caspase nachgewiesen werden.

(B) Effekt von anti-CD95: Erythrozyten wurden mit anti-CD95 (α -CD95; 1 μ g/ml) alleine oder zusammen mit Cycloheximid (CHX; 10 μ g/ml) für die Dauer der angegebenen Zeiten stimuliert.

(C) Effekt von Staurosporin und onkologischen Chemotherapeutika: Erythrozyten wurden über die angegebenen Zeiten mit Staurosporin (Stauro; 2,5 μ M), Etoposid (Etopo; 25 μ g/ml) oder Mitomycin (Mito; 25 μ g/ml) behandelt. Als Positivkontrolle wurden Lysate aus unstimulierten (Kontrolle) und für 4 h mit anti-CD95 (α -CD95; 1 μ g/ml) stimulierten Jurkat-T-Zellen mitgeführt. Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE wurde die Spaltung von Caspase-8 im Westernblot nachgewiesen. Schwarze Pfeile (▲) markieren die ungespaltene, weiße (◁) die gespaltene Form von Caspase-8.

Tab. 3: Keine Caspaseaktivierung in Erythrozyten durch verschiedene proapoptotische Stimuli:

5 x 10⁶ Erythrozyten wurden mit den jeweiligen Stimuli während der angegebenen Zeiten inkubiert. Zur Kontrolle der Caspaseaktivierung wurde das Westernblot-Verfahren eingesetzt.

Stimulus	Konzentration	Dauer	Caspaseaktivierung
anti-CD95	1 µg/ml	2-24 h	keine
anti-CD95 + CHX	1 µg/ml 10 µg/ml	2-24 h	keine
TNFα	20 ng/ml	0,5-72 h	keine
PMA	1-8 µM	2-4 h	keine
Ionomycin	2-16 µM	2-4 h	keine
PMA + Ionomycin	1-8 µM 2-16 µM	2-4 h	keine
Etoposid	25 µg/ml	2-24 h	keine
Mitomycin C	25 µg/ml	2-24 h	keine
Fludarabin	1-1000 µM	2-24 h	keine
Staurosporin	2,5 µM	2-24 h	keine
γ-Strahlen	5-40 Gy	16-48 h	keine
Wasserstoffperoxid	0,5-1 mM	1-5 h	keine
C2-Ceramid	50 µM	4-12 h	keine

3.1.3 In-vitro-Aktivierung erythrozytärer Caspasen

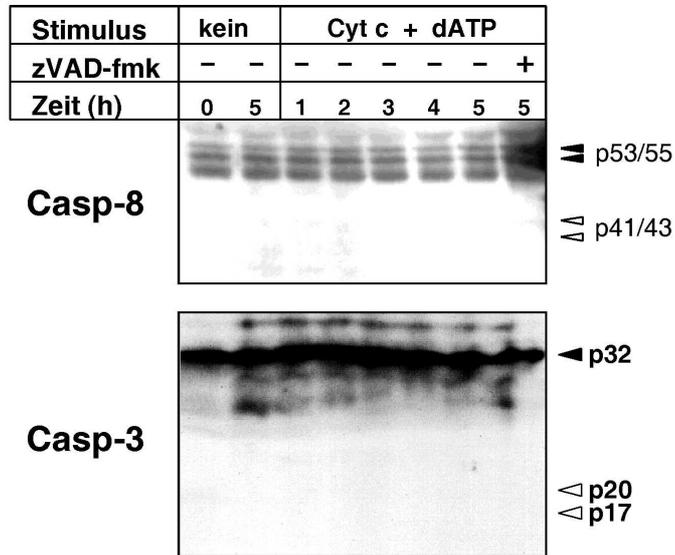
Da keiner der getesteten Stimuli zu einer Caspaseaktivierung führte, wurde untersucht, ob erythrozytäre Caspasen prinzipiell aktivierbar sind. Dazu wurden zytosolische Extrakte aus Erythrozyten und Jurkat-T-Zellen als Positivkontrolle mit Zytrochrom c und dATP inkubiert und die Caspaseumsetzung anschließend mit dem Westernblot-Verfahren dokumentiert. Wie in Abb. 10A gezeigt, führte die Zugabe von Zytrochrom c und dATP zu erythrozytären Lysaten nicht zur Umsetzung von Procaspase-3 und -8 in ihre proteolytisch aktiven Fragmente. Im Gegensatz dazu lösten Zytrochrom c und dATP in Lysaten aus Jurkat-T-Zellen eine schnelle Umsetzung beider Caspasen aus (Abb. 10B). Die zu

beobachtende Verzögerung der Spaltung von Caspase-8 im Vergleich zu Caspase-3 erklärt sich dadurch, dass bei Aktivierung der Caspasekaskade über den mitochondrialen Weg die Umsetzung von Caspase-8 erst nach der Aktivierung von Caspase-3 erfolgt.

Da die verschiedenen Caspasen zueinander in einem Verhältnis der gegenseitigen Aktivierung und Aktivierbarkeit stehen und somit vielfach untereinander verknüpft sind (Slee et al. 1999b; Van de Craen et al. 1999), stellte sich die Frage, ob in Erythrozyten der Signalweg zur Caspaseaktivierung an einer bestimmten Stelle unterbrochen ist oder die in Erythrozyten enthaltenen Caspasen gar prinzipiell nicht mehr aktivierbar sind. Um zu herauszufinden, ob erythrozytäre Caspasen grundsätzlich aktivierbar sind, wurde als Nächstes untersucht, ob die in erythrozytären Lysaten vorliegenden Procaspasen durch Zugabe einer exogenen Caspase gespalten werden können. Dazu wurde rekombinante Caspase-6 zu Lysaten aus Erythrozyten und Jurkat-T-Zellen hinzugefügt und anschließend die Umsetzung der endogenen Caspase mittels Westernblot-Verfahren untersucht. Wie aus Abb. 10C ersichtlich, war rekombinante Caspase-6 in der Lage, Procaspase-8 analog zu den Jurkat-T-Zellen auch in Erythrozyten in ihre typischen Zwischenspaltprodukte von 41 und 43 kDa Größe (Bahnen 3 und 6) zu überführen, die wiederum identisch waren mit jenen, die sich in ganzen Jurkat-T-Zellen nach Stimulation mit anti-CD95 beobachten lassen (Bahn 2). Auch Procaspase-3 aus Erythrozyten und Jurkat-T-Zellen wurde nach Inkubation mit exogener Caspase-6 gespalten, wie sich aus dem Verlust ihrer 32 kDa-Proform (Abb. 10D) erkennen ließ. Durch Zugabe des Breitband-Caspaseinhibitors zVAD-fmk wurde die Umsetzung der endogenen Procaspasen-3 und -8 in beiden Lysaten vollständig gehemmt.

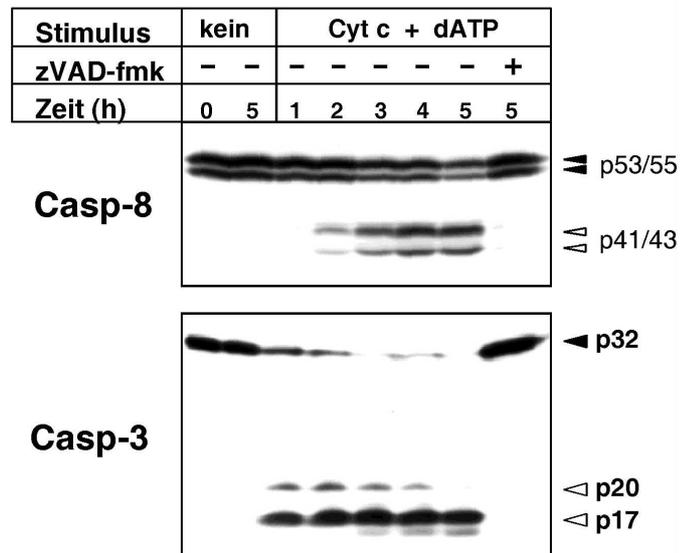
Abb. 10: *In-vitro*-Aktivierung erythrozytärer Caspasen:

A Erythrozyten

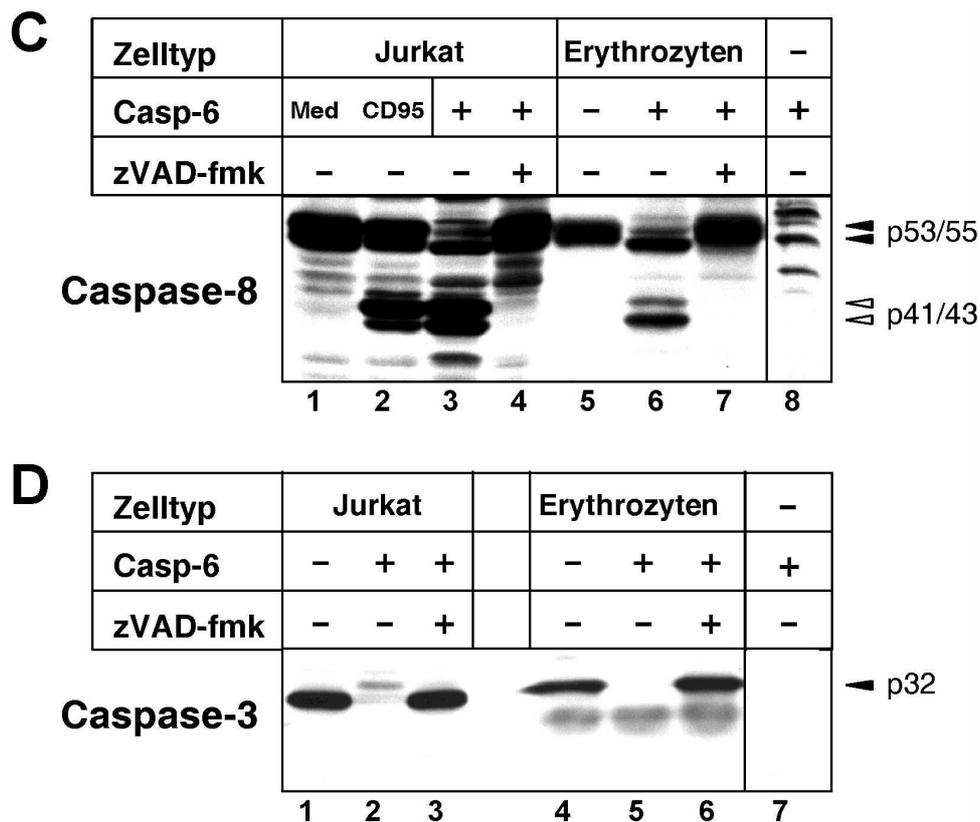


(A) Exogenes Cytochrom c und dATP konnten in zytosolischen Extrakten aus Erythrozyten keine Caspaseaktivierung auslösen. Erythrozytäre Extrakte wurden unstimuliert oder nach Stimulation mit Cytochrom c (Cyt c; 1 μ M) und dATP (1 mM), mit und ohne Zugabe von zVAD-fmk, nach den angegebenen Zeiten im Westernblot auf Umsetzung von Caspase-3 und -8 hin untersucht.

B Jurkat



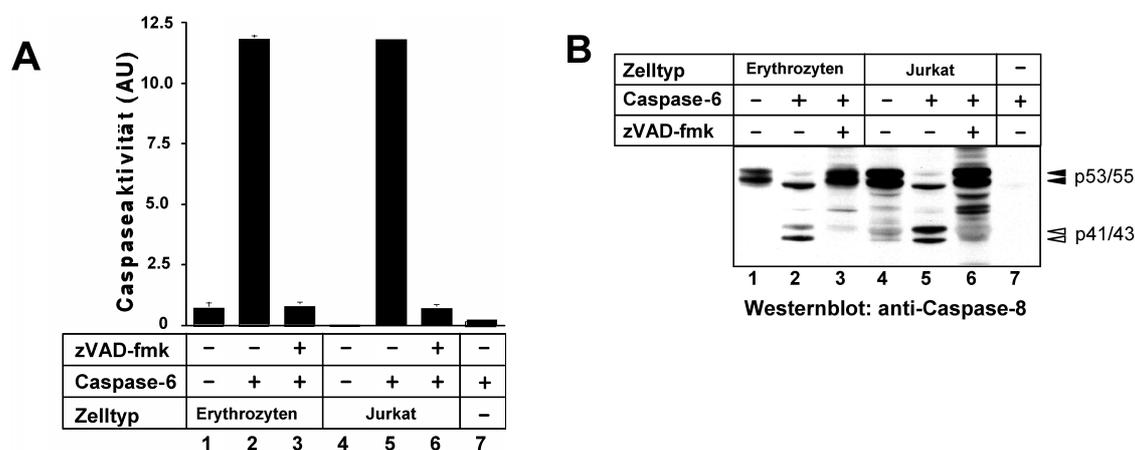
(B) Zytosolische Extrakte aus Jurkat-T-Zellen wurden auf die gleiche Art und Weise behandelt und dienten als Positivkontrolle.



(C) Exogene Caspase-6 spaltete erythrozytäre Procaspase-3 und -8 *in vitro*: 2 µg rekombinante Caspase-6 wurde zu 60 µl Lysaten aus Erythrozyten oder Jurkat-T-Zellen hinzugegeben und bei 37 °C für 3 h inkubiert. Wo angegeben, wurde der Caspaseinhibitor zVAD-fmk in einer Konzentration von 100 µM vor der Behandlung mit Caspase-6 hinzugefügt. Die zellulären Proteine wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und die Umsetzung von Procaspase-8 (**C**) bzw. Procaspase-3 (**D**) anschließend mittels Westernblot nachgewiesen. Als Kontrolle zeigt (**C**) Caspase-8-Spaltung in intakten Zellen. Hierfür wurden Jurkat-T-Zellen mit Medium (**C**, Bahn 1) oder 1 µg/ml anti-CD95 (**C**, Bahn 2) behandelt. Nach 3 h wurden die Zellen lysiert und unmittelbar per SDS-PAGE aufgetrennt. Um die Spezifität der verwendeten Antikörper zu belegen, wurde gereinigte Caspase-6 ohne Hinzugabe von zellulären Lysaten in der SDS-PAGE mitgeführt (**C**, Bahn 8; **D**, Bahn 7). Schwarze Pfeile (▲) markieren die ungespaltene, weiße (◁) die gespaltene Form der jeweiligen Caspase. (**C**) zeigt die ungespaltene Isoformen von Procaspase-8/a und -8/b (p53/p55) und ihre intermediären Spaltprodukte (p41/p42).

Zum weiteren Nachweis der Aktivierbarkeit erythrozytärer Caspasen *in vitro* wurde die katalytische Aktivität von Caspase-8, wie unter 2.4.1 angegeben, mittels des fluorogenen Substrats DEVD-AMC gemessen. Da das in erythrozytären Extrakten enthaltene Hämoglobin die Fluoreszenzsignale durch *quenching* auslöschte, wurde Caspase-8 nach Zugabe von Caspase-6 immunopräzipitiert und anschließend die katalytische Aktivität wie oben angegeben gemessen. Wie aus Abb. 11A (Bahnen 2 und 5) ersichtlich, stieg

die DEVDase-Aktivität in den Caspase-8-Immunopräzipitaten rasch an, nachdem die Lysate aus Erythrozyten und Jurkat-T-Zellen zuvor mit aktiver Caspase-6 inkubiert worden waren. In den Kontrollen und bei Zugabe des Caspaseinhibitors zVAD-fmk war keine Caspaseaktivität messbar. Zusätzlich wurde die Umsetzung von Caspase-8 mittels Westernblot-Verfahren überprüft und es konnte gezeigt werden, dass die gemessene DEVDase-Aktivität mit dem Nachweis charakteristischer Spaltprodukte einherging (Abb. 11B). Als weitere Kontrolle diente reine Caspase-6, die nicht mittels anti-Caspase-8-Antikörper präzipitiert wurde und daher auch nicht zur Spaltung von DEVD-AMC beitrug (Abb. 11B, Bahn 7).



(A) Die katalytische Aktivität präzipitierter Caspase-8 wurde mittels Spaltung des fluorogenen Substrates DEVD-AMC gemessen und in willkürlich gewählten Fluoreszenz-/Aktivitätseinheiten angegeben.

(B) Parallel dazu wurde die Umsetzung präzipitierter Caspase-8 per Westernblot nachgewiesen. Schwarze Pfeile (▲) markieren die ungespaltene, weiße (◁) die gespaltene Form von Caspase-8.

Abb. 11: Proteolytisch umgesetzte Procaspase-8 aus Erythrozyten wurde *in vitro* katalytisch aktiv:

Lysate aus Erythrozyten oder Jurkat-T-Zellen wurden für 3 h *in vitro* mit 2 µg rekombinanter Caspase-6 jeweils mit und ohne zVAD-fmk inkubiert; anschließend erfolgte Immunopräzipitation von Caspase-8. Als Spezifitätskontrolle wurde der Caspase-6 enthaltende Reaktionsansatz ohne zelluläre Lysate ebenfalls mit anti-Caspase-8 immunopräzipitiert (**A, B**; Bahn 7).

Um der Frage nachzugehen, ob Caspasen im Alterungsprozess von Erythrozyten eine Rolle spielen, sollte anschließend geklärt werden, ob Spectrin, ein Strukturprotein, das für die zelluläre Integrität roter Blutkörperchen

außerordentlich wichtig ist, als Caspasesubstrat gespalten wird. Es ist bekannt, dass Fodrin, ein nicht-erythrozytäres Spectrin, in kernhaltigen Zellen durch Caspase-3 gespalten wird (Janicke et al. 1998). Um zu untersuchen, ob auch erythrozytäres Spectrin gespalten werden kann, wurde neben erythrozytären Lysaten auch gereinigtes Spectrin mit exogener Caspase-3 inkubiert. Abb. 12 zeigt die Spaltung von aus erythrozytären Lysaten stammendem nativem Spectrin durch Caspase-3 in die typischen p120/150-Fragmente. Dieser Abbau ließ sich durch Zugabe des Breitband-Caspaseinhibitors zVAD-fmk hemmen (Abb. 12, Bahn 7). Ähnliche Spaltprodukte erhält man bei Verwendung gereinigten Spectrins. Das bereits in Proben ohne Caspase-3 im Westernblot nachweisbare, 120 kDa schwere Protein ist wahrscheinlich als Abbauprodukt anzusehen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Caspasen in Erythrozyten trotz Stimulation mit verschiedensten proapoptotischen Stimuli zwar inaktiv bleiben, die Inkubation erythrozytärer Lysate mit exogenen Caspasen *in vitro* jedoch sowohl zu einer Aktivierung von Caspase-3 und -8, als auch zu einer Substratspaltung (Spectrin) führt.

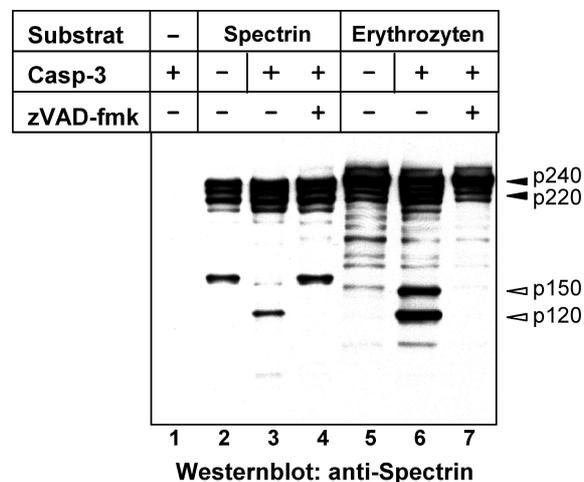


Abb. 12: Caspase-3 spaltete gereinigtes Spectrin und Spectrin in erythrozytären Lysaten:

Gereinigtes Spectrin (6 µg) oder vollständige Lysate aus Erythrozyten (10×10^6) wurden mit 2 µg rekombinanter Caspase-3 mit und ohne zVAD-fmk für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung per SDS-PAGE und der Nachweis der Spectrinspaltung mittels Westernblot. Schwarze Pfeile (◄) markieren die ungespaltenen, weiße (◄) die gespaltenen Form von Spectrin.

3.1.4 Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Erythrozyten führt zur Aktivierung von Calpainen, nicht von Caspasen

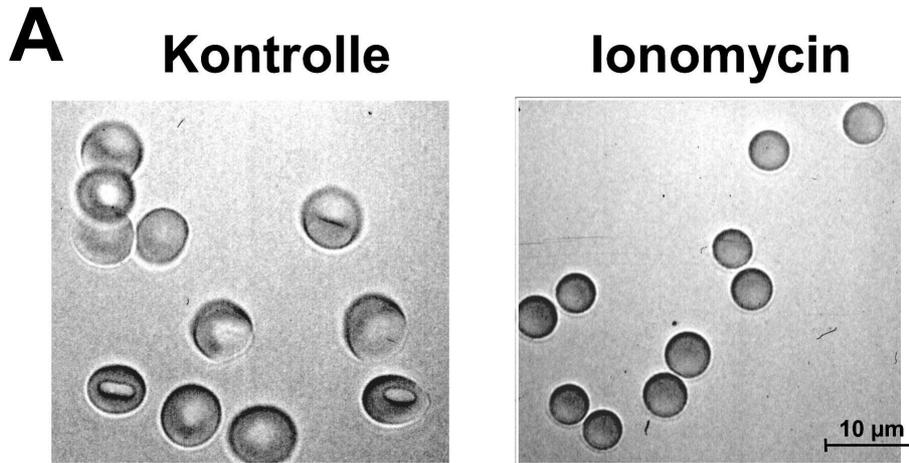
Da weder ein breites Spektrum proapoptotischer Stimuli noch lagerungsbedingte Alterung von Erythrozyten zu einer Aktivierung von Caspasen führten, sollten weitere Agenzien untersucht werden. An kernhaltigen Zellen wurde bereits gezeigt, dass ein Anstieg intrazellulären Calciums eine Caspaseaktivierung auslösen kann (Takadera und Ohyashiki 1997; Nakamura et al. 2000). Um einen Calciumeinstrom und damit einen Anstieg des intrazellulären Calciums in Erythrozyten herbeizuführen, wurden diese mit Ionomycin, einem Calciumionophor, inkubiert. Als Resultat ließ sich eine Zellschrumpfung sowie eine Änderung der Erythrozytenmorphologie mit Übergang von der normalen diskoiden in eine sphärozytäre Form beobachten (Abb. 13A). Darüber hinaus fand eine rasche Externalisierung von Phosphatidylserin statt, die mittels Annexin-V-FITC-Färbung und anschließender Messung im Durchflusszytometer nachgewiesen werden konnte (Abb. 13B). Diese Effekte traten innerhalb von weniger als 60 min auf, wohingegen sie in Jurkat-T-Zellen mehr als 5 h benötigten (Daten nicht gezeigt). Es kam jedoch zu keiner Umsetzung von Caspase-3 oder Caspase-8 (Abb. 14A) als Reaktion auf die Stimulation mit Ionomycin. Um die Ursache der beobachteten Änderungen zu klären, wurde daraufhin untersucht, ob die Calcium-abhängige Protease Calpain daran beteiligt ist. Im Westernblot ließ sich deren Aktivierung durch die proteolytische Spaltung von μ -Calpain nachweisen (Abb. 14A). Diese Spaltung von μ -Calpain in seine aktiven p78- und p76-Fragmente erfolgte bereits 10 min nach Stimulation und konnte durch Zugabe von Calpaininhibitoren vollständig gehemmt werden.

Die schnelle Aktivierung von μ -Calpain geht dem Abbau erythrozytären Spectrins voraus, der 40 min nach der Behandlung mit Calciumionophoren zu beobachten war und sich vollständig durch Calpaininhibitoren hemmen ließ (Abb. 14A). Um den Abbau erythrozytären Spectrins eindeutig Calpainen zuordnen zu können, wurde gereinigtes Spectrin aus Erythrozyten *in vitro* mit aktivem μ -Calpain inkubiert. Wie aus Abb. 14B ersichtlich, war μ -Calpain in der

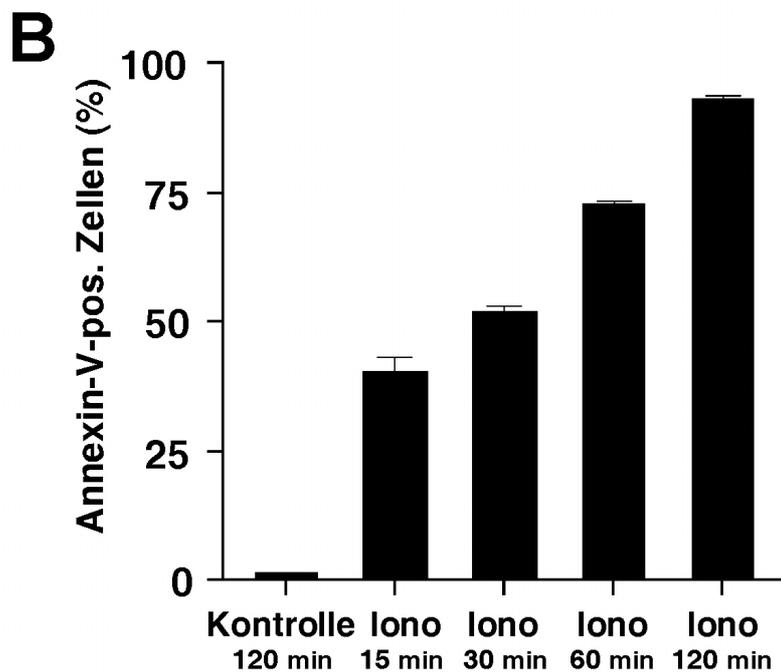
Lage, Spectrin in Abhängigkeit von Calcium zu spalten, ein Vorgang, der sich durch Calpaininhibitoren hemmen ließ. Neben dem Spectrinabbau verhinderten Calpaininhibitoren auch die Schrumpfung der Erythrozyten, während die Externalisierung von Phosphatidylserin nicht beeinflusst wurde (Abb. 14C).

Folglich wurden in Erythrozyten nach Stimulation mit Ionomycin unter Calciumeinfluss Calpaine aktiviert; diese Proteasen waren in der Lage, erythrozytäres Spectrin zu spalten. Wurden sie durch Calpaininhibitoren gehemmt, so kam es zu verringerter Spectrinspaltung und Erythrozytenschrumpfung. Eine Caspaseaktivierung ließ sich nach Stimulation mit Ionomycin nicht nachweisen.

Abb. 13: Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration in Erythrozyten führte zu ähnlichen morphologischen Veränderungen wie beim Alterungsprozess:

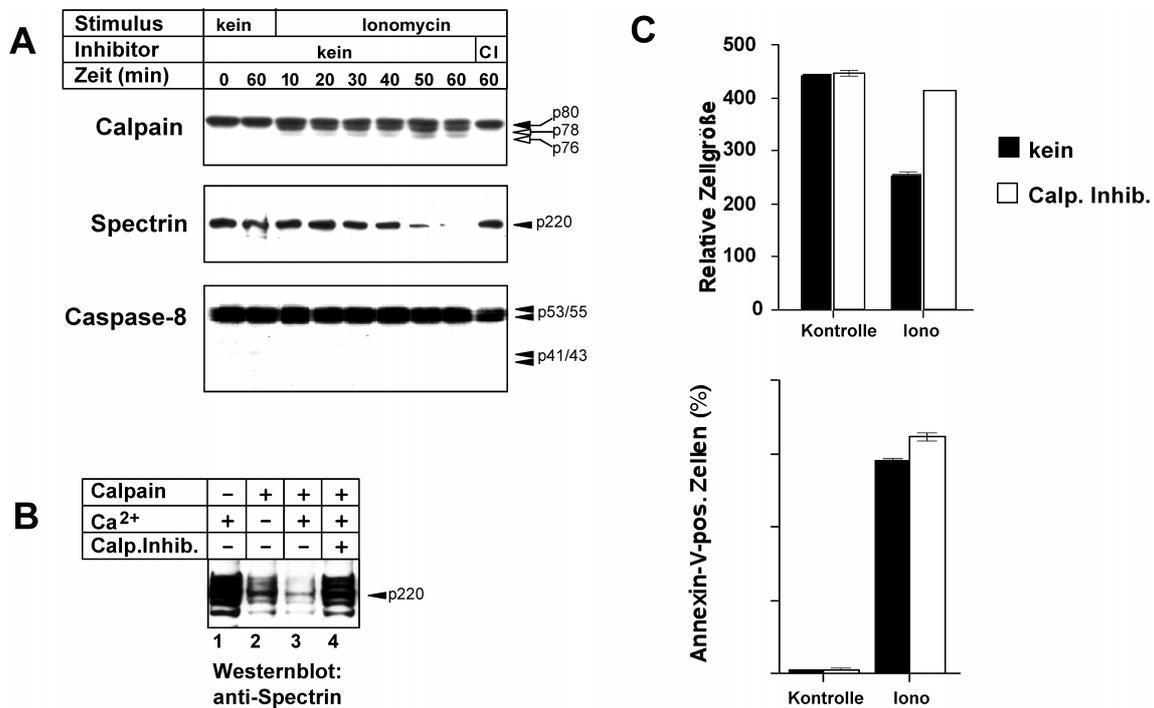


(A) Behandlung von Erythrozyten (2×10^6) mit Ionomycin führte zu einem Übergang der diskoiden in eine sphärozytäre Form. Unbehandelte Erythrozyten dienten als Kontrolle. Erythrozyten wurden mit $8 \mu\text{M}$ Ionomycin behandelt. Nach 1 h wurden die Zellen mikroskopisch auf morphologische Veränderungen hin untersucht. Nach Behandlung verloren Erythrozyten ihre typische diskoiden Form und ihr Durchmesser verringerte sich.



(B) Externalisierung von Phosphatidylserin: Erythrozyten wurden für die angegebenen Zeiten mit Ionomycin ($8 \mu\text{M}$) stimuliert und anschließend auf die Externalisierung von Phosphatidylserin hin mittels Annexin-V-FITC-Färbung und Durchflusszytometrie untersucht.

Abb. 14: Calpainaktivierung führte zu Spectrinabbau und Zellschrumpfung bei Erythrozyten.



(A) Auswirkungen von Ionomycin auf die Umsetzung von Calpain und Caspasen sowie auf Spectrinspaltung: Erythrozyten wurden für die angegebenen Zeiten ohne (Bahnen 1,2) oder mit Ionomycin (8 μ M) (Bahnen 3-9) inkubiert und nach Lyse mittels Westernblot analysiert. Wo angegeben wurden die Zellen für 30 min mit Calpaininhibitor (CI; einer Mischung aus 68 μ g/ml Calpaininhibitor I und 28 μ g/ml Calpaininhibitor II) vorinkubiert. Die obere Reihe zeigt die proteolytische Aktivierung von μ -Calpain, erkennbar an der Umsetzung der 80 kDa Proform (\blacktriangleleft) in die charakteristischen p78- und p76-Fragmente (\triangleleft). Die mittlere Reihe zeigt einen Abschnitt des Spectrin-Westernblots, auf dem der Abbau der p220-Form von Spectrin erkennbar ist. Hingegen führte Ionomycin zu keiner proteolytischen Umsetzung von Caspase-8 (untere Reihe).

(B) Spectrinabbau *in vitro*: Gereinigtes Erythrozytenspectrin (12 μ g pro Probe) wurde ohne (Bahn 1) und mit 2 μ g gereinigten μ -Calpains (Bahnen 2-4), jeweils mit oder ohne Calcium (1 mM) bzw. Calpaininhibitor (CI) inkubiert. Nach 1 h Inkubation bei 37 $^{\circ}$ C wurden Aliquots der Proben im Westernblot-Verfahren unter Verwendung von anti-Spectrin-Antikörpern analysiert.

(C) Calpain vermittelte die Verminderung der Zellgröße, nicht jedoch die Externalisierung von Phosphatidylserin bei Stimulation mit Ionomycin: Erythrozyten (2×10^6) wurden entweder unbehandelt (schwarze Balken) oder nach 30 min Vorbehandlung mit Calpaininhibitor (graue Balken) mit oder ohne Ionomycin (8 μ M) inkubiert. Nach 1 h wurde die relative Zellgröße durchflusszytometrisch unter Verwendung des FSC-Profiles und die Externalisierung von Phosphatidylserin nach Annexin-V-FITC-Färbung ebenfalls durchflusszytometrisch (FL1-Profil) gemessen.

3.2 Untersuchungen zu Apoptosemechanismen in Thrombozyten

Nachdem es nicht gelang, in Erythrozyten apoptotische Signaltransduktionswege zu aktivieren, obwohl erythrozytäre Caspasen prinzipiell aktivierbar sind, sollte dieser Fragestellung anhand des zweiten kernlosen Zellsystems, der Thrombozyten, weiter nachgegangen werden. Diese verfügen, im Gegensatz zu Erythrozyten, mit Mitochondrien über ein zusätzliches Zellorganell, das im Rahmen apoptotischer Signaltransduktionswege eine wesentliche Rolle spielt.

3.2.1 Thrombozyten enthalten Procaspase-9 und -3

Um das Arbeiten am System der Thrombozyten zu etablieren und zu überprüfen, ob die verwendeten Nachweismethoden geeignet sind, die in Thrombozyten enthaltenen Bestandteile des apoptotischen Apparates (Caspasen) nachzuweisen, wurden Thrombozyten wie unter 2.2.1 angegeben gewonnen und anschließend im Westernblot auf Caspasen und deren Spaltformen hin analysiert.

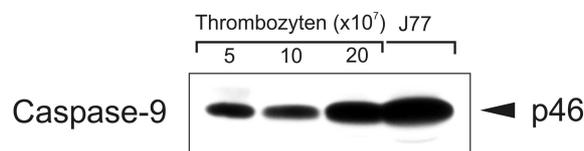


Abb. 15: Thrombozyten enthielten Procaspase-9:

Thrombozyten wurden wie unter 2.2.1 angegeben gewonnen und in verschiedenen Zellzahlen unstimuliert im Westernblot auf Expression von Procaspase-9 untersucht. Ein schwarzer Pfeil (◄) markiert die p46-Form von Caspase-9. Zellzahlen wie angegeben. Jurkat-J77-Zellen dienten als Positivkontrolle (2×10^6 Zellen).

Als erster Stimulus wurde das Calciumionophor Ionomycin verwendet, von dem bekannt ist, dass es einen Calciuminflux in das Zytosol und daraufhin eine Zytochrom-c-Freisetzung aus dem Mitochondrium bewirkt (Boehning et al. 2003). Da Thrombozyten Mitochondrien, Procaspase-9 und -3 enthalten, sollte überprüft werden, ob sich mit Ionomycin in Thrombozyten eine Caspaseaktivierung erzielen lässt. Thrombozyten wurden in einer Kinetik mit Ionomycin stimuliert und anschließend im Westernblot auf Prozessierung von Procaspase-3 hin untersucht. Es ließen sich, im Gegensatz zu analog

stimulierten Jurkat-J-77-Zellen, keine aktiven Spaltformen von Procaspase-3 nachweisen.

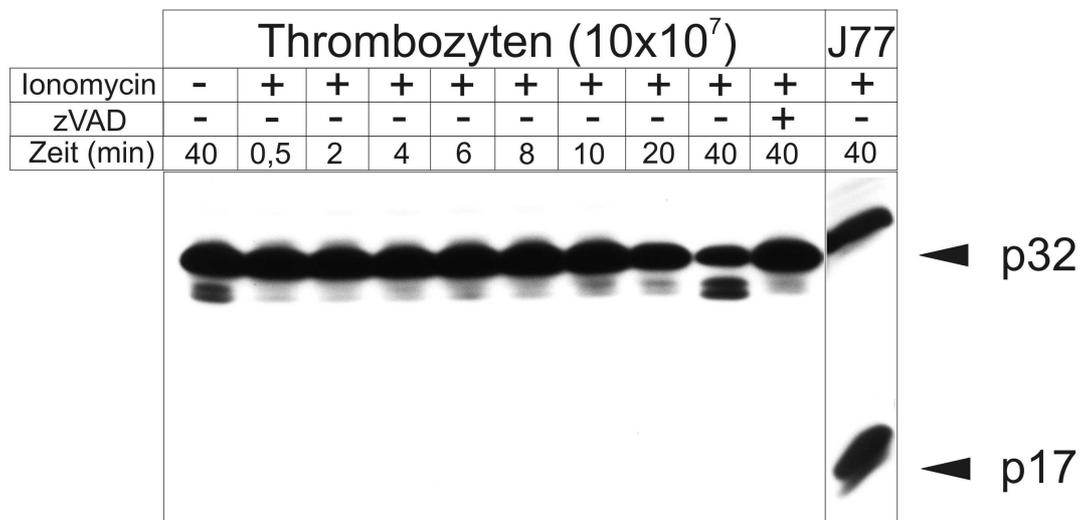


Abb. 16: Thrombozyten enthielten Procaspase-3, die sich jedoch nicht durch Ionomycinbehandlung der Thrombozyten aktivieren ließ:

Thrombozyten (100×10^6) wurden mit Ionomycin ($8 \mu\text{M}$) für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Anschließend Analyse im Westernblot auf Procaspase-3 und deren Spaltformen. Schwarzer Pfeil markiert die p32-Proform von Caspase-3. Jurkat-J77-Zellen dienten als Positivkontrolle (2×10^6 Zellen). Hier fand nach Ionomycinstimulierung eine Spaltung von Procaspase-3 in ihre p17-Form statt.

3.2.2 Procaspase-3 in Thrombozytenlysaten wird in vitro durch exogene Caspase-8 in ihre aktiven Fragmente gespalten

Es sollte überprüft werden, ob die in Thrombozyten enthaltene Procaspase-3 durch exogene Caspase-8 aktiviert werden kann. Als Spezifitätskontrolle wurden Thrombozytenlysate mit Calpain inkubiert, um eine Spaltung bzw. Aktivierung von Procaspase-3 durch Calpaine ausschließen zu können.

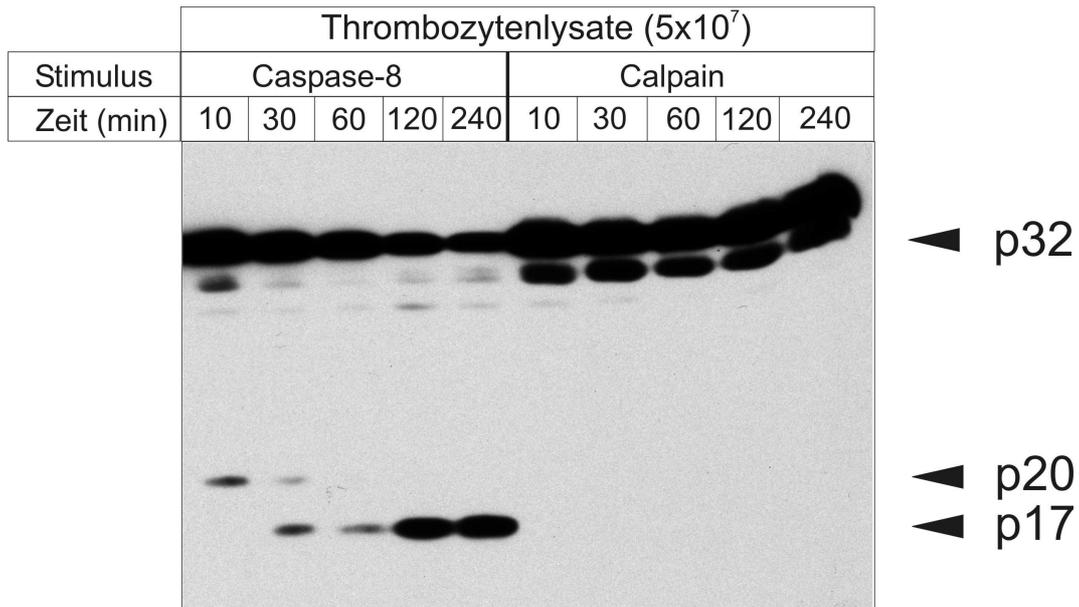


Abb. 17: Aktive Caspase-8 führte zu Prozessierung von Procaspase-3 aus Thrombozytenlysaten in ihre aktiven Fragmente p17 und p20:

50×10^6 Thrombozyten wurden lysiert und für die angegebenen Zeiten mit aktiver Caspase-8 bzw. Calpain inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS-Auftragspuffer gestoppt und die Lysate im Westernblot auf Prozessierung von Procaspase-3 untersucht. 10-30 min nach Inkubation mit Caspase-8 zeigte sich die p20-Form von Caspase-3. Nach 30 min bis 4 h war auch die aktive p17-Form erkennbar. Dabei nahm die Proform (p32) ab. Die als Spezifitätskontrolle durchgeführte Inkubation mit Calpain erbrachte keinen Nachweis entsprechender Fragmente.

Thrombozyten wurden lysiert und für die angegebenen Zeiten mit aktiver Caspase-8 bzw. Calpain inkubiert. 10-30 min nach Inkubation mit Caspase-8 war das Auftreten der p20-Form von Caspase-3 im Westernblot nachweisbar. Nach 30 min bis 4 h war auch die aktive p17-Form nachweisbar. Dabei nahm die Proform (p32) ab. Nach Inkubation mit Calpain war kein Nachweis der entsprechenden Fragmente möglich.

3.2.3 Verschiedene klassische proapoptotische Stimuli können in Thrombozyten keine Caspasen aktivieren

Nachdem in 3.2.2 gezeigt werden konnte, dass in Thrombozyten enthaltene Procaspase-3 prinzipiell aktivierbar ist, sollte untersucht werden, ob die aus Versuchen mit zahlreichen kernhaltigen Zellen als proapoptotisch bekannten Stimuli nach Zugabe zu intakten Thrombozyten zu einer Aktivierung von Caspasen in der Lage sind. Als Nachweis der Caspaseaktivierung diente der

Nachweis der aktiven Spaltformen im Westernblot nach entsprechender Inkubation der Thrombozyten mit den jeweiligen Stimuli.

Aus der Gruppe der Todesrezeptoragonisten wurde als erster Stimulus agonistischer anti-CD95-Antikörper verwendet. Nach Inkubation von Thrombozyten mit anti-CD95 über verschieden lange Zeiten ließen sich keine aktiven Spaltformen von Caspase-8 nachweisen, obwohl die Proform in Thrombozyten vorhanden ist.

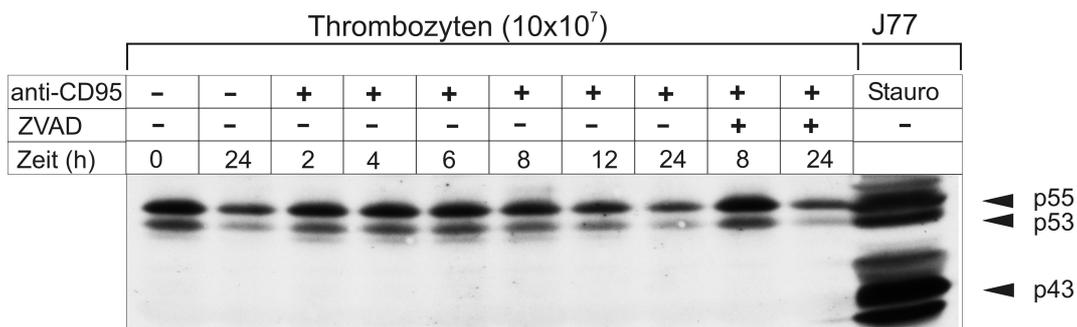


Abb. 18: Thrombozyten enthielten Procaspase-8, deren Aktivierung durch Stimulation der Thrombozyten mit anti-CD95 jedoch nicht möglich war.

Thrombozyten (10×10^7) wurden für die angegebenen Zeiten mit anti-CD95 behandelt, lysiert und im Westernblot auf Prozessierung von Procaspase-8 (p55/53) hin untersucht. Im Gegensatz zur Positivkontrolle (2×10^6 J77) war keine aktive Spaltform (p43) erkennbar. Schwarze Pfeile markieren die ungespaltene Proform von Caspase-8, weiße das p43-Fragment.

Auch die anderen getesteten Stimuli, die ihre Wirkung über den Todesrezeptorweg entwickeln, konnten in Thrombozyten keine Caspasen aktivieren (Daten nicht gezeigt).

Nachdem über den Todesrezeptorweg keine Aktivierung von thrombozytären Caspasen gelang, wurden verschiedene proapoptotische Stimuli untersucht, die ihre Wirkung unabhängig von DNA-Schädigung entfalten. Beispielhaft gezeigt wird hier das Ergebnis für Staurosporin.

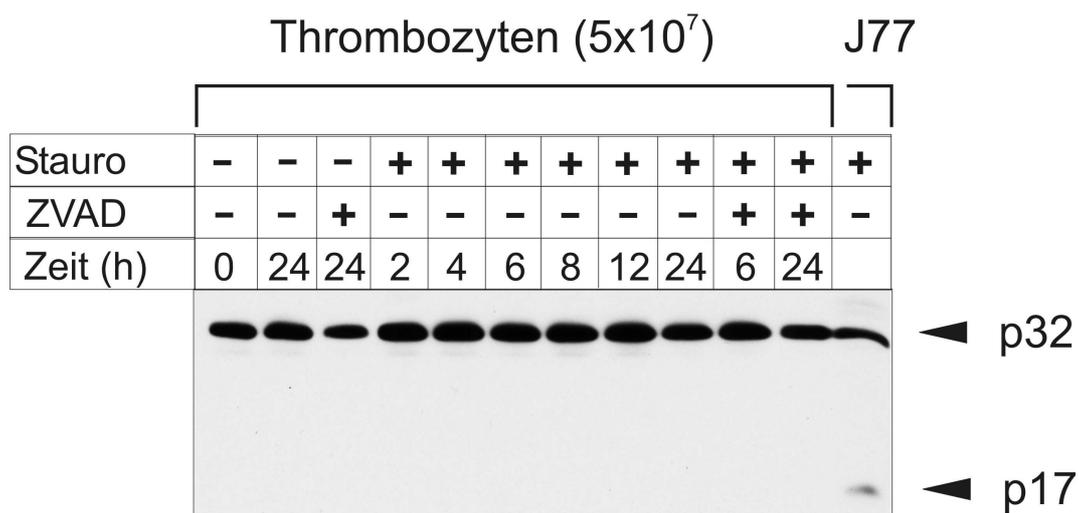


Abb. 19: Stimulation von Thrombozyten mit Staurosporin führte zu keiner Aktivierung von Caspase-3.

Thrombozyten (50×10^6) wurden für die angegebenen Zeiten mit Staurosporin inkubiert, anschließend lysiert und im Westernblot auf Prozessierung von Procaspase-3 hin untersucht. Auch nach maximaler Inkubationszeit (24 h) ließ sich kein Spaltprodukt von Caspase-3 nachweisen. Als Positivkontrolle dienten wiederum J77 (2×10^6). Hier ist das p17-Fragment von Caspase-3 deutlich erkennbar (◀).

Tab. 4: Keine Caspaseaktivierung in Thrombozyten durch verschiedene proapoptotische Stimuli.

5×10^7 Thrombozyten wurden mit den jeweiligen Stimuli während der angegebenen Zeiten inkubiert. Der Nachweis der Caspaseaktivierung erfolgte mittels Westernblot.

Stimulus	Konzentration	Dauer	Caspaseaktivierung
Cycloheximid (CHX)	10-30 $\mu\text{g/ml}$	4-24 h	keine
anti-CD95	1 $\mu\text{g/ml}$	2-24 h	keine
anti-CD95 + CHX	1 $\mu\text{g/ml}$ 10-30 $\mu\text{g/ml}$	24 h	keine
TNF α	20 ng/ml	2-24 h	keine
TNF α + CHX	20 ng/ml 10-30 $\mu\text{g/ml}$	24 h	keine
Staurosporin	2,5-20 μM	2-24 h	keine
Staurosporin + CHX	2,5-10 μM 10-30 $\mu\text{g/ml}$	24 h	keine
Ionomycin	4 μM	2-40 min	keine
Etoposid	25 $\mu\text{g/ml}$	8 h	keine
Mitomycin C	25 $\mu\text{g/ml}$	8 h	keine
Daunorubicin	2-10 $\mu\text{g/ml}$	4-24 h	keine

3.2.4 Stimulation mit Tributylzinn führt in Thrombozyten zu einer sehr schnellen Aktivierung von Caspase-3 und -9

Nachdem keiner der bisher getesteten Stimuli in der Lage war, in Thrombozyten Caspasen zu aktivieren, wurde mit Tributylzinn (TBT) ein weiteres Agens untersucht, von dem bekannt ist, dass es in Lymphozyten zu Caspaseaktivierung und Apoptose führt (Aw et al. 1990; Raffray und Cohen 1993; Stridh et al. 1998). Aufgrund seiner direkten Wirkungsweise am Mitochondrium, wo es zur Freisetzung von Zytocrom c führt (Stridh et al. 1999b; Nishikimi et al. 2001), sollte untersucht werden, ob TBT in Thrombozyten eine Aktivierung von Caspasen herbeiführen kann, nachdem sich sämtliche anderen Stimuli als ungeeignet erwiesen hatten.

3.2.4.1 Nachweis der Caspasespaltung im Westernblot

Um die TBT-vermittelte Caspaseumsetzung zu untersuchen, wurden Thrombozyten mit TBT in einer Konzentration von 2 μ M unterschiedlich lange stimuliert. Anschließend wurden die zellulären Proteine auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgebracht und mittels Westernblot die Spaltung der Initiator-Caspasen-8 und -9 und der Effektor-Caspase-3 überprüft. Stimulation mit TBT löste die proteolytische Spaltung von Procaspase-9 und -3 innerhalb der ersten zwei Minuten bzw. vier Minuten aus (Abb. 20). TBT führte zu einer Umsetzung von Procaspase-9 in die durch Caspase-3-vermittelte Spaltung entstehende 37 kDa-Form und in die autoproteolytisch entstehende p35-Form. Die 32 kDa-Proform von Caspase-3 wurde in die typischen p20- und p17-Fragmente gespalten. Die Proform der zwei Isoformen von Caspase-8 nahm unter Stimulation mit TBT leicht ab, die typischen p41/p43-Zwischenfragmente, wie bei mit Staurosporin stimulierten Jurkat-T-Zellen, ließen sich jedoch nicht nachweisen (Abb. 20). Die Zugabe des Breitband-Caspaseinhibitors zVAD-fmk verhinderte die proteolytische Spaltung von Procaspase-9 und -3.

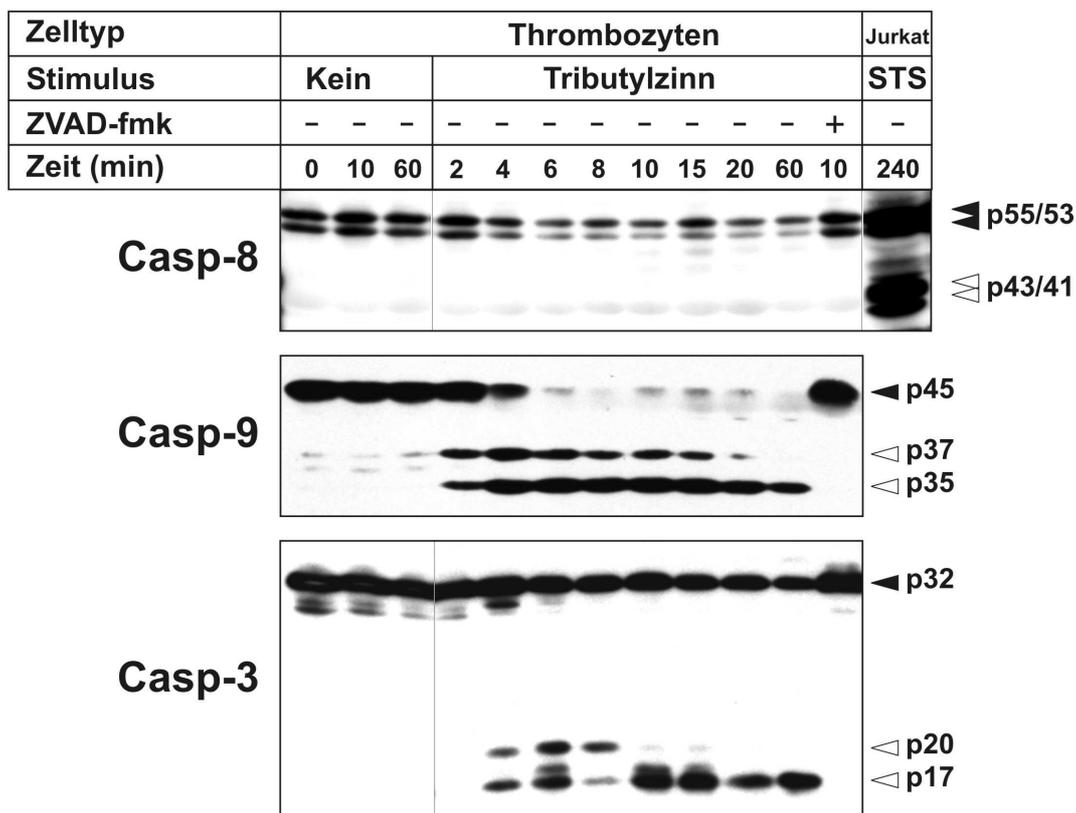


Abb. 20: Kinetische Analyse der TBT-vermittelten Caspaseumsetzung und der katalytischen Aktivität in Thrombozyten.

Eine Gesamtzellzahl von 5×10^9 Thrombozyten wurde mit $2 \mu\text{M}$ TBT für die angegebenen Zeiten stimuliert (jeweils mit und ohne Vorbehandlung mit $100 \mu\text{M}$ zVAD-fmk für 45 min). Anschließend wurden die zellulären Proteine nach Lysieren der Zellen per SDS-PAGE aufgetrennt und die proteolytische Umsetzung von Procaspase-9 und -3 im Westernblot nachgewiesen. Schwarze Pfeile (◄) bezeichnen die ungespaltene und weiße Pfeile (◁) die gespaltene Form des betreffenden Proteins.

3.2.4.2 Quantifizierung der enzymatischen Aktivität von Caspase-3 im Enzymaktivitätsassay

Da der Nachweis einer Caspasespaltung im Westernblot keine Information über die enzymatische Aktivität der Caspase liefert, wurde diese mittels Spaltung von DEVD-AMC, einem fluorogenen Substrat von Caspase-3, und anschließender fluorometrischer Messung bestimmt. Wie aus Abb. 21 ersichtlich ist, führte Stimulation mit TBT bereits nach 2 min zu einem Anstieg der Caspase-3-Aktivität und erreichte nach 4 min ein Maximum.

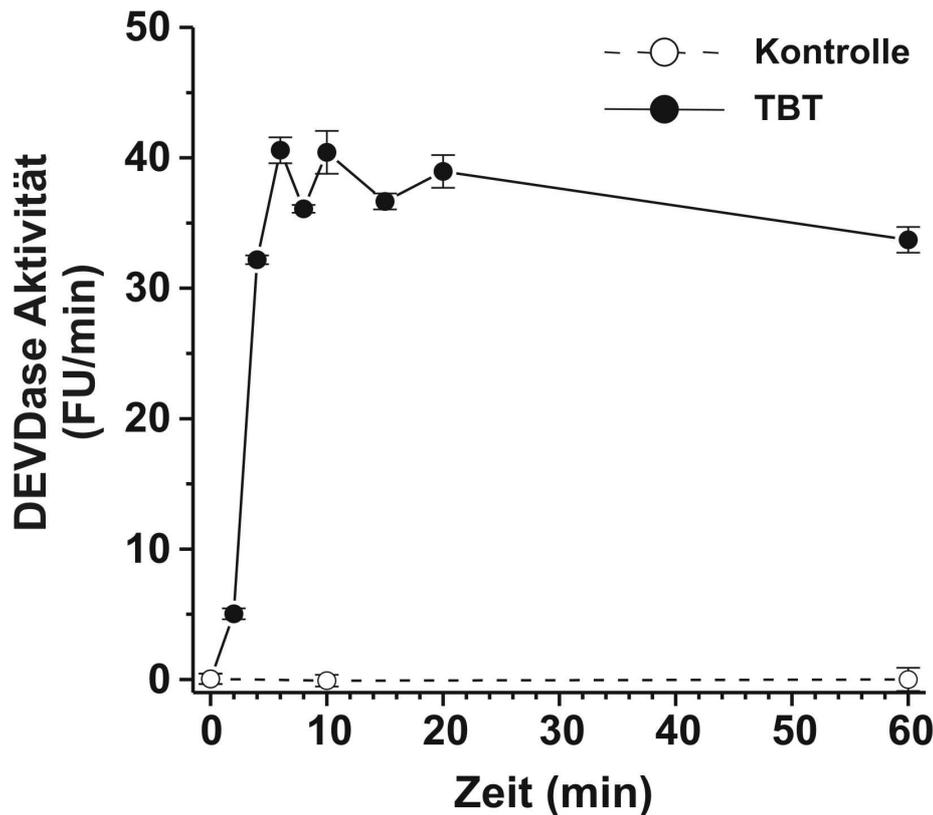


Abb. 21: Kinetische Analyse der TBT-vermittelten Caspaseumsetzung und der katalytischen Aktivität in Thrombozyten.

Eine Gesamtzellzahl von $1,7 \times 10^7$ Thrombozyten wurde mit Medium (—○—) oder $2 \mu\text{M}$ TBT (—●—) für die angegebenen Zeiten behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert, mit $50 \mu\text{M}$ des fluorogenen Substrats Ac-DEVD-AMC (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethyl-coumarin) inkubiert und im Fluorometer gemessen. Caspaseaktivität wurde definiert als Fluoreszenzzunahme im linear ansteigenden Teil der Kurve und ist in willkürlich gewählten Fluoreszenzeinheiten/min angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung von Dreifachbestimmungen.

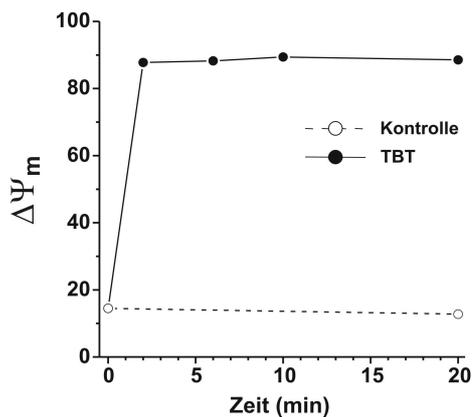
3.2.4.3 Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und Abnahme der Zellvitalität verlaufen parallel zur Caspaseaktivierung

Als Parameter der Wirkung am Mitochondrium wurde die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) gemessen. Die Abnahme der Zellvitalität nach Stimulation mit TBT wurde durch Messung der LDH-Freisetzung und der Abnahme intrazellulären ATPs untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die schnelle Aktivierung von Caspasen mit einer ebenso schnellen Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) nach 2 min

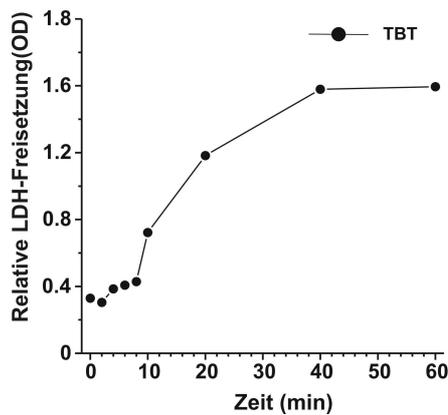
einherging (Abb. 22A). 10 min nach Stimulation der Thrombozyten mit TBT ließ sich die Abnahme der Zellvitalität nachweisen (Abb. 22BC).

Abb.22: Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und Abnahme der Zellvitalität begleiten die schnelle Caspaseaktivierung

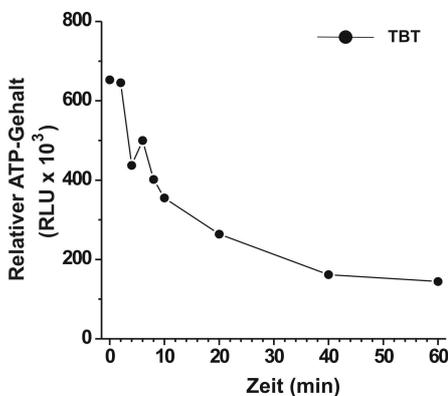
Kinetische Analyse der begleitenden Phänomene bei TBT-vermittelter Caspaseaktivierung in Thrombozyten. Eine Gesamtzellzahl von $1,7 \times 10^7$ Thrombozyten wurde mit Medium (—○—) oder 2 μ M TBT (—●—) für die angegebenen Zeiten behandelt.



(A) Der Verlust mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) wurde unter Verwendung des fluoreszierenden $\Delta\Psi_m$ -Indikators Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) und darauffolgender durchflusszytometrischer Analyse gemessen.



(B) Die Bestimmung der LDH-Freisetzung mittels LDH-Cytotoxicity Assay Kit und Messung im ELISA-Reader wie oben beschrieben diente als Vitalitätskriterium.



(C) Verlust intrazellulären ATPs als weiteres Vitalitätskriterium. Bestimmung erfolgte mittels ApoSensor™ Cell Viability Kit und Messung im Luminometer.

3.2.4.4 Aktive Formen von Caspase-9 lassen sich nur außerhalb des hochmolekularen Komplexes des Apoptosoms nachweisen

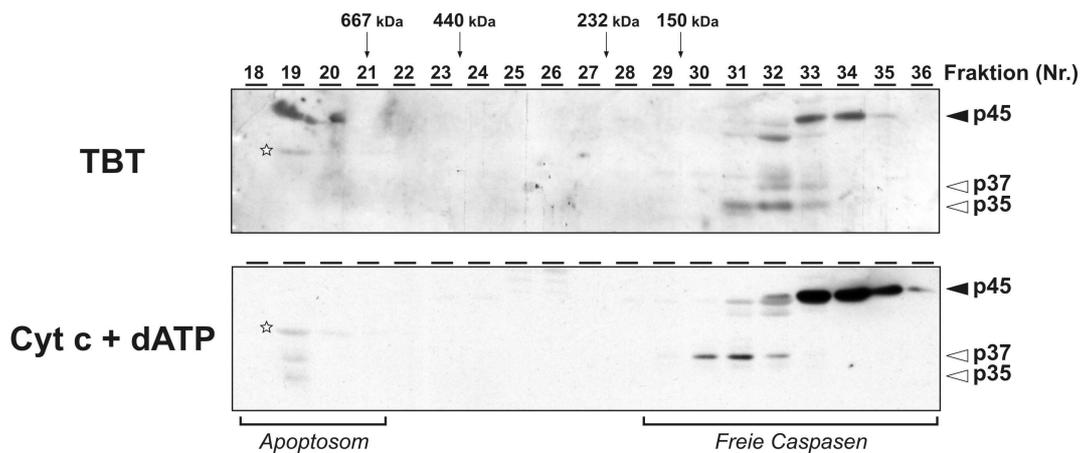
Da die Aktivierung von Caspase-3 und -9 in Thrombozyten bei Stimulation mit TBT um ein vielfaches schneller als bei kernhaltigen Jurkat-T-Zellen erfolgte, stellte sich die Frage, ob TBT die Aktivierung von Caspase-9 entsprechend bisheriger Modellvorstellungen innerhalb des hochmolekularen Apoptosomkomplexes induziert. Ob Caspase-9 in Thrombozyten nach Stimulation mit TBT in diesem hochmolekularen Komplex gebunden ist, sollte mittels gelfiltrationsvermittelter Auftrennung der zellulären Proteine nach ihrem Molekulargewicht untersucht werden.

Thrombozyten wurden für eine Dauer von 10 min mit 2 μ M TBT stimuliert. Anschließend wurden aus den stimulierten Zellen mitochondrienfreie S100-Extrakte hergestellt. Die darin enthaltenen zellulären Proteine und Eiweißkomplexe wurden in einer Superdex-200 Gelfiltrationssäule ihrem Molekulargewicht entsprechend in Fraktionen (1-40) aufgetrennt, wobei die Größe der in den Fraktionen enthaltenen Moleküle mit steigender Fraktionsnummer abnimmt. Mit dem Ziel, den Zytochrom c/Apaf-1-Signalweg zu aktivieren, wurden direkt zu S100-Extrakten unstimulierter Zellen 30 min vor Auftrag auf die Trennsäule jeweils 1 μ M dATP und 10 μ M Zytochrom c gegeben. Die Umsetzung von Procaspase-9 in den entsprechenden Fraktionen wurde mittels Westernblot nachgewiesen (Abb. 23A) und die katalytische Caspaseaktivität fluorometrisch anhand der Spaltung von DEVD-AMC gemessen (Abb. 23B). Die Zugabe von Zytochrom c und dATP zu zellulären Lysaten führte zu einer Abnahme der monomeren, ungespaltenen 45-kDa-Form von Procaspase-9 in den Fraktionen 33-35 und zu einer Zunahme der gespaltenen, aktiven Form von Caspase-9 in Fraktion 19. Dieser hochmolekulare Komplex enthielt sowohl die durch Spaltung mittels Caspase-3 entstandene p37-Form als auch die durch autoproteolytische Spaltung entstandene p35-Form von Caspase-9. Die p37-Form von Caspase-9 ließ sich jedoch auch außerhalb des hochmolekularen Komplexes in den Fraktionen 30-32 nachweisen. Im Gegensatz dazu wurde Caspase-9 auch in mit TBT behandelten Thrombozyten in die p35- und

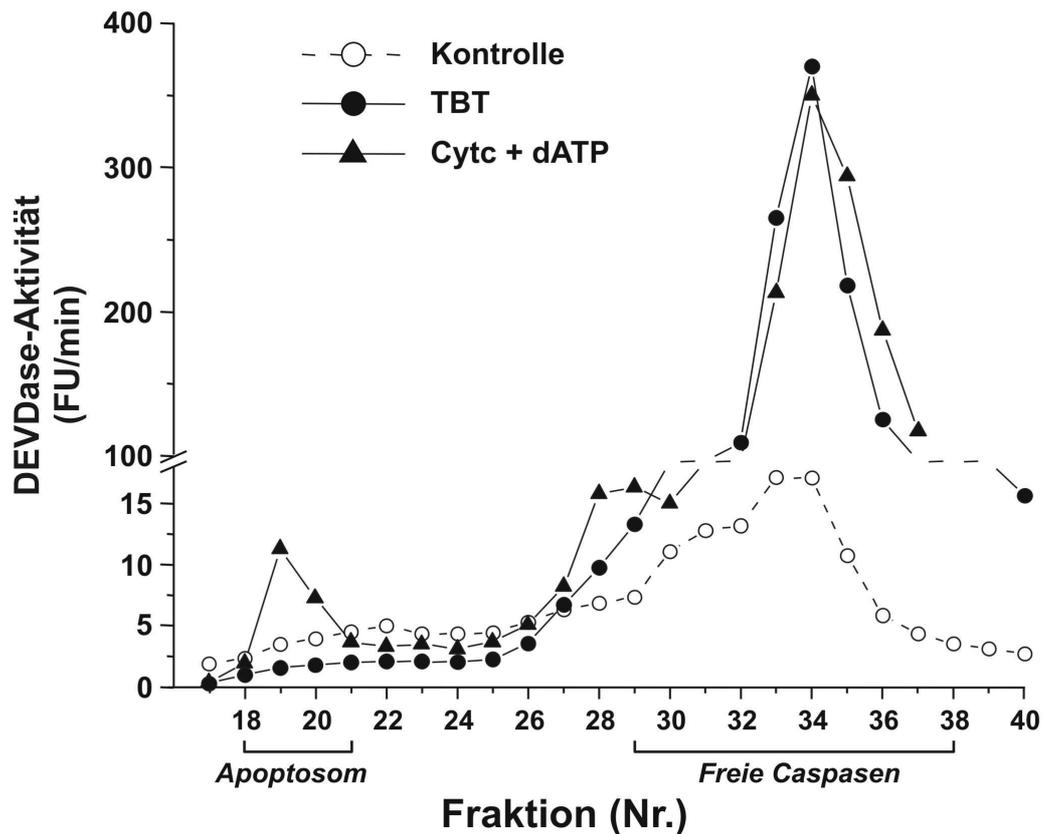
p37-Form gespalten; diese Bruchstücke ließen sich jedoch nur in den Fraktionen 31-33 und nicht in den hochmolekularen Fraktionen nachweisen (Abb. 23A). Bei der fluorometrischen Messung der DEVDase-Aktivität der einzelnen Fraktionen konnte ebenfalls keine Caspaseaktivität in den hochmolekularen Fraktionen der mit TBT behandelten Thrombozyten nachgewiesen werden, im Gegensatz zu mit Zytrochrom c und dATP behandelten Lysaten, bei denen in Fraktion 19 und 20 eine deutliche Aktivität messbar war. Die Aktivität freier Caspasen fand sich bei mit TBT behandelten Thrombozyten wie auch bei den mit Zytrochrom c und dATP behandelten Lysaten in den gleichen Fraktionen (32-36) (Abb. 23B).

Abb. 23: Nach Stimulation mit TBT fanden sich aktive Formen von Caspase-9 nur außerhalb des hochmolekularen Komplexes des Apoptosoms.

S100-Lysate von unbehandelten und mit 2 μ M TBT stimulierten sowie mit Zytrochrom c und dATP behandelte S100-Lysate unstimulierter Thrombozyten wurden mittels Gelfiltration aufgetrennt.



(A) Jeweils 100 μ l aus den betreffenden 500 μ l großen Fraktionen (18-36) wurden im Westernblot auf Caspase-9-Spaltung untersucht. Schwarze Pfeile (\blacktriangleleft) bezeichnen die ungespaltene und weiße Pfeile (\triangleleft) die gespaltene Form von Caspase-9. Die jeweiligen Fraktionen sind durch die Zahlen, die Position der Molekulargewichtsmarker durch die Pfeile (∇) über dem Blot gekennzeichnet. Die Position des Apoptosoms und der freien Caspasen sind durch eckige Klammern am unteren Rand markiert. Die Sterne (\star) bezeichnen unspezifische Banden in den Caspase-9-Blots.



(B) Jeweils 100 μ l aus den betreffenden Fraktionen (15-40) zu 500 μ l wurden im Caspaseaktivitätsassay wie oben beschrieben analysiert. Die Caspaseaktivität ist in willkürlich gewählten Fluoreszenzeinheiten/min angegeben. Gezeigt ist die DEVDase-Aktivität in S100-Lysaten unstimulierter Thrombozyten (—○—), in S100-Lysaten mit TBT stimulierter Thrombozyten (—●—) und in mit Zytrochrom c und dATP behandelten S100-Lysaten unbehaltener Thrombozyten. Das Molekulargewicht der in den Fraktionen enthaltenen Stoffe nimmt mit steigender Fraktionsnummer ab. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichung von Dreifachbestimmungen.

Anders als nach Stimulation mit dATP und Zytrochrom c ließen sich nach Stimulation mit TBT die aktiven Formen von Caspase-9 in Thrombozyten nur in den niedermolekularen Fraktionen nachweisen, sie lagen also nicht im Verbund eines hochmolekularen Komplexes wie dem Apoptosom vor.

4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war, das Vorkommen von Teilen des apoptotischen Apparates und deren mögliche funktionelle Bedeutung in zwei kernfreien Minimalzellsystemen des menschlichen Organismus zu untersuchen. Die beiden Hauptsignalwege der Apoptose sind an den Zellkern bzw. das Mitochondrium gebunden. Jedoch ist es auch schon gelungen, an entkernten Zellen Apoptose nachzuweisen (Schulze-Osthoff et al. 1994; Jacobsen et al. 1996). Thrombozyten, die noch über Mitochondrien, aber keinen Zellkern mehr verfügen, und sowohl kern- als auch mitochondrienfreie Erythrozyten schienen daher geeignete Zellen, um Teile der apoptotischen Signalwege in Abwesenheit bestimmter Organellen zu untersuchen.

4.1 Untersuchungen zu Apoptosemechanismen in Erythrozyten

An erythrozytären Vorläuferzellen war in anderen, kürzlich erschienenen Arbeiten bereits gezeigt worden, dass Apoptose einen Kontrollmechanismus im Rahmen der Erythropoese darstellt. Dieser Vorgang beinhaltet die Aktivierung von Todesrezeptoren, die im Anschluss daran zu einer Caspaseaktivierung und zum Tod der erythrozytären Vorläuferzellen führt (De Maria et al. 1999; Zamai et al. 2000). Des Weiteren hat Erythropoetin, ein essentieller Regulator der Erythropoese, die Eigenschaft, Erythroblasten in einem frühen und einem späten Stadium durch die Induktion von Bcl-x_L, einem Mitglied der anti-apoptotischen Bcl-2 Familie, vor Apoptose zu schützen (Mori et al. 2003). Diese Erkenntnisse lassen einen negativen Rückkopplungsmechanismus möglich erscheinen, bei dem reife Erythroblasten ihre unreiferen Vorläuferzellen dezimieren, solange nicht die Anwesenheit hoher Erythropoetinkonzentrationen das verhindert.

Im Gegensatz zu erythrozytären Vorläuferzellen war bei reifen Erythrozyten vollständig unbekannt, ob Apoptose eine Rolle für ihre Funktion oder Lebensdauer spielt und ob sie einen klassischen apoptotischen Apparat enthalten. Menschliche Erythrozyten stellen ein zelluläres Minimalsystem dar,

dem sämtliche Zellorganellen wie Kern, Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum fehlen. In kernhaltigen Zellen spielen diese Zellorganellen eine entscheidende Rolle bei der Induktion und Ausführung der Apoptose. Aus diesem Grund war es von Interesse zu untersuchen, ob reife Erythrozyten noch in der Lage sind, den apoptotischen Apparat in Gang zu setzen. Außerdem lassen sich während des erythrozytären Alterungsprozesses morphologische Veränderungen beobachten, die denen kernhaltiger Zellen im Rahmen der Apoptose ähneln (Kerr et al. 1972; Arends und Wyllie 1991). Als weiterer Aspekt wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Caspasen oder andere Cysteinproteasen wie Calpaine am Abbau des erythrozytären Zytoskeletts und anderen Veränderungen beteiligt sind und damit eine Rolle bei diesem Alterungsprozesses oder anderen Veränderungen von Erythrozyten spielen könnten.

4.1.1 Erythrozytäre Caspasen lassen sich nur in vitro aktivieren

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass reife menschliche Erythrozyten tatsächlich sowohl über Caspase-8, die zentrale Initiatorcaspase des Todesrezeptorsignalweges, als auch über Caspase-3, eine Caspase mit zentraler Rolle bei der Ausführung der Apoptose, verfügen. Im Gegensatz dazu fehlen ihnen jedoch sämtliche essentiellen Bestandteile des mitochondrialen Signalwegs, einschließlich Apaf-1, Zytrochrom c und Caspase-9 (Abb. 8DEF). Da Erythrozyten im Laufe ihrer Entwicklung Mitochondrien und andere Zellorganellen verlieren (Gronowicz et al. 1984; Chasis et al. 1989), verlieren sie im Zuge dessen möglicherweise auch mitochondrienassoziierte Bestandteile des apoptotischen Apparates.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Erythrozyten über Caspase-8 und -3 verfügen (Abb. 8AB), wurde untersucht, ob und auf welche Weise diese aktiviert werden können. Es gelang jedoch weder mithilfe einer Vielzahl proapoptischer Stimuli noch durch lange Lagerung der Erythrozyten eine Caspaseaktivierung (Abb. 9).

Erythrozytäre Vorläuferzellen exprimieren sowohl den CD95-Rezeptor als auch seinen Liganden. Jedoch löst schon bei reifen erythrozytären Vorläuferzellen

eine Bindung von CD95-Ligand an den Rezeptor keine Apoptose mehr aus (De Maria et al. 1999). Bei reifen Erythrozyten gelang, wie gezeigt, keine Caspaseaktivierung durch Stimulation mit anti-CD95 (Abb. 9), was durch den Verlust der Todesrezeptoren im Laufe der erythrozytären Entwicklung erklärt werden könnte. In der Tat fand sich keine Oberflächenexpression von CD95 bei reifen Erythrozyten (Daten nicht gezeigt).

In Hühnererythrozyten, die, anders als Erythrozyten von Säugetieren, noch einen Zellkern enthalten, gelingt es, mittels Staurosporin Zelltod auszulösen, der charakteristische Merkmale des apoptotischen Zelltodes aufweist (Weil et al. 1998). Doch nur in einer kleinen, weniger ausgereiften Teilpopulation wird Caspase-3 aktiviert und auch Caspaseinhibitoren haben keinerlei Einfluss auf den Zelluntergang, sodass Caspasen bei dieser Form des Zelltodes keine Rolle zu spielen scheinen. Möglicherweise verlieren auch Hühnererythrozyten im Laufe ihrer Reifung Caspasen und andere Bestandteile des apoptotischen Apparates.

Nachdem keiner der bekannten proapoptotischen Stimuli in der Lage war, in intakten humanen Erythrozyten Caspasen zu aktivieren, wurde untersucht, ob sich erythrozytäre Caspasen *in vitro* aktivieren lassen. Die Zugabe von Zytrochrom c und dATP, die in kernhaltigen Zellen zu einer Aktivierung von Caspasen führt, zeigte in Erythrozyten keinerlei Effekt (Abb. 10A). Das ist vermutlich auf das Fehlen von Caspase-9 und Apaf-1 zurückzuführen, da Zytochrom-c-vermittelte Caspaseaktivierung nur in Gegenwart von Apaf-1 und Caspase-9 möglich ist (Slee et al. 1999b). Dass die in Erythrozyten enthaltenen Caspasen prinzipiell funktionsfähig sind, konnte anschließend gezeigt werden, indem durch exogene Caspase-6 die Aktivierung von Caspasen gelang (Abb. 10C).

Die in Erythrozyten noch zu findenden Teile des apoptotischen Apparates (Caspase-8 und -3) scheinen folglich also lediglich Residuen aus Vorläuferzellen zu sein, die zwar isoliert noch voll funktionsfähig sind, aber in Erythrozyten keine funktionelle Bedeutung mehr haben. Dass im Gegensatz zu Caspase-8 und -3 andere „Apoptosemitspieler“ fehlen, mag an deren Bindung an bestimmte Organellen liegen, die im Laufe der erythrozytären Entwicklung

eliminiert werden (Gronowicz et al. 1984; Chasis et al. 1989). Das Fehlen dieser wesentlichen Bestandteile des apoptotischen Apparates scheint die Aktivierung der residuellen Caspasen in Erythrozyten mittels proapoptotischer Stimuli zu verhindern.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, enthalten menschliche Erythrozyten zwar noch intakte, aktivierbare Caspasen, jedoch anscheinend keinen funktionellen apoptotischen Apparat mehr. Demnach spielen Caspasen in ausgereiften Erythrozyten wahrscheinlich keine Rolle mehr, sondern sind nur noch als Residuen aus erythrozytären Vorläuferzellen zu betrachten. Da diese Vorläuferzellen der Zwischenstadien der Erythropoese zu Apoptose fähig sind, wäre es möglich, dass Caspasen bei der Entstehung von Erythrozyten aus ihren kernhaltigen Vorläuferzellen beteiligt sind. Es gibt Hinweise, dass Caspasen zur terminalen Differenzierung von Erythrozyten benötigt werden (Carlile et al. 2004; Testa 2004). Caspasen werden während der Differenzierung von Erythroblasten vorübergehend aktiviert und spalten ausgewählte Proteine, ohne dabei den Tod der Zellen zu verursachen, und scheinen bei der Chromatinkondensation und E nukleation eine Rolle zu spielen. Bestimmte Caspaseinhibitoren wiederum behindern diesen Schritt und damit die Reifung der Erythrozyten. Somit spielen Caspasen wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Rahmen der Erythropoese, indem sie zu deren Regulierung und zur Differenzierung der erythrozytären Vorläuferzellen beitragen. Im reifen Erythrozyten sind sie jedoch scheinbar nur noch Überreste ohne Funktion. Die Beobachtung, dass erythrozytäres Spectrin durch Caspase-3 gespalten werden kann, hat somit zumindest bei reifen Erythrozyten und deren endogenen Caspasen wahrscheinlich keine funktionelle Relevanz.

4.1.2 Aktivierung von Calpainen führt in Erythrozyten zu Apoptose-ähnlichen morphologischen Veränderungen

Auf der Suche nach einem proapoptotischen Stimulus wurden im Rahmen dieser Arbeit Erythrozyten auch mit Calciumionophoren inkubiert. Dabei traten verschiedene morphologische Veränderungen auf, die denen alternder

Erythrozyten gleichen und teilweise an solche im Rahmen der Apoptose erinnern.

Während ihres Alterungsprozesses zeigen Erythrozyten eine Abnahme des zellulären Volumens, einen Abbau des Zytoskeletts, Plasmamembranmikrovesikulierung und eine Externalisierung von Phosphatidylserin (Danon und Marikovsky 1988). Diese morphologischen Erscheinungen treten ebenfalls im Zusammenhang mit der Aktivierung von Caspasen in kernhaltigen Zellen auf. Wie auch bei anderen Zellen dient die Freilegung von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche als Signal zur Entfernung der Zellen aus dem Blutkreislauf durch Makrophagen (Connor et al. 1994; Bratosin et al. 1998).

In der Literatur gibt es vielfältige Hinweise darauf, dass die morphologischen Veränderungen alternder Erythrozyten durch eine veränderte Calciumhomöostase gesteuert werden (Allan und Thomas 1981b; Allan und Thomas 1981a; Shiga et al. 1985; Henseleit et al. 1990; Romero und Romero 1999). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, kommt es in mit Calciumionophoren behandelten Erythrozyten als Reaktion auf erhöhte Calciumkonzentrationen zwar zu keiner Caspaseaktivierung, jedoch zu einer umgehenden Aktivierung der Cysteinprotease Calpain (Abb. 14AB). Erst im Anschluss daran erfolgt der Abbau von Spectrin. Auch die Schrumpfung der Erythrozyten wird offensichtlich durch die Aktivierung der Calpaine bedingt. Diese Abnahme des Zellvolumens lässt sich, ähnlich der Spectrinspaltung, durch Calpaininhibitoren verhindern (Abb. 14C). Im Gegensatz dazu haben diese allerdings keinen Einfluss auf die Externalisierung von Phosphatidylserin (Abb. 14C), ein Vorgang, der in Erythrozyten vermutlich sowohl von Caspasen als auch Calpainen unabhängig abläuft. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die in Erythrozyten durch Veränderung der Calciumhomöostase und Alterung zu beobachtenden morphologischen Veränderungen möglicherweise im Zusammenhang mit einer Aktivierung von Calpainen stehen, Caspasen dabei jedoch keine Rolle spielen. Es ist bekannt, dass ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Thrombozyten und Erythrozyten ausreicht, durch Aktivierung einer Aminophospholipidscramblase und Inaktivierung einer Aminophospholipid-

translokase die asymmetrische Verteilung der Phospholipide in der Zellmembran zu stören (Dolis et al. 1997).

Spectrin kommt bei der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und diskozytären Form von Erythrozyten eine wichtige Funktion zu (Haest et al. 1978). Demzufolge wurde die Degradierung von Spectrin und anderen Proteinen des Zytoskeletts mit der Externalisierung von Phosphatidylserin, dem Abschnürung von Teilen der Zellmembran und der charakteristischen, sphärozytären Form alternder Erythrozyten in Verbindung gebracht.

Im Rahmen verschiedener pathologischer Zustände und in vielen Fällen von Zelltod, wie z.B. bei Apoptose von Hepatozyten als Reaktion auf Hypoxie und Bestrahlung, sowie bei durch Dexamethason ausgelöstem Absterben von Thymozyten, wurde unkontrollierte Calpainaktivität beobachtet (Bronk und Gores 1993; Squier et al. 1994). Darüber hinaus findet in Erythrozyten von Patienten mit essentieller arterieller Hypertension ein teilweiser Abbau des Calpaininhibitors Calpastatin statt, was zu einer erhöhten Calpainaktivität führt (Salamino et al. 1991; Glaser et al. 1994).

Interessanterweise bestehen mehrere potenzielle Verbindungen zwischen Calpain und Caspasen. So haben diese beiden Proteasen nicht nur verschiedene gemeinsame Substrate, sondern können sich auch gegenseitig in ihrer Aktivität beeinflussen. Eine Hypothese lautet, dass ein Anstieg der Calpainaktivität durch caspasevermittelten Abbau von Calpastatin verursacht sein könnte (Porn-Ares et al. 1998; Squier et al. 1999). Anhand anderer Modelle wurde gezeigt, dass es zur Aktivierung bestimmter Caspasen wie Caspase-7 einer vorgeschalteten Calpainaktivität bedarf (Waterhouse et al. 1998; Ruiz-Vela et al. 1999). Und schließlich zeigen aktuellere Untersuchungen, dass Calpaine auch direkt Caspasen spalten können, dabei aber proteolytisch inaktive Caspasefragmente zurücklassen (Wolf et al. 1999; Chua et al. 2000; Lankiewicz et al. 2000). In Erythrozyten jedoch gibt es bisher keine Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen Caspasen und Calpainen.

4.2 Untersuchungen zu Apoptosemechanismen in Thrombozyten

Im Gegensatz zu Erythrozyten enthalten Thrombozyten noch sowohl Mitochondrien und Teile des Endoplasmatischen Retikulums (Evatt und Stein 1988) als auch wesentliche Bestandteile des mitochondrialen Signalweges der Apoptose (Wolf et al. 1999). Jedoch besitzen auch sie keinen Zellkern mehr. Der apoptotische Apparat in Thrombozyten ist daher noch vollständiger erhalten als in Erythrozyten, wo wie oben gezeigt, nur einzelne, im Zytosol befindliche Caspasen vorhanden sind, die sich nicht mehr in ihrem ursprünglichen Funktionszusammenhang aktivieren lassen.

4.2.1 Thrombozytäre Caspasen lassen sich durch klassische proapoptotische Stimuli nicht aktivieren

Da bekannt ist, dass Thrombozyten über alle wesentlichen Bestandteile des mitochondrialen Signalweges verfügen, wurde zunächst versucht, diesen über einen direkt dort ansetzenden Mechanismus zu aktivieren. Calciumionophore wie Ionomycin bewirken einen Calciuminflux in das Zytosol und dadurch– vermutlich über Zwischenschritte– eine Zytochrom-c-Freisetzung aus dem Mitochondrium (Boehning et al. 2003). Es wurde erwartet, dass dies auch in Thrombozyten darauffolgend über Bindung von Zytochrom c an Apaf-1 zur Aktivierung von Caspase-9 und schließlich von Caspase-3 führt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass nach Stimulation von Thrombozyten mit Ionomycin über verschieden lange Zeiträume (Abb. 16) sich keine aktiven Spaltformen von Caspase-3 nachweisen lassen, was mit den Ergebnissen von Wolf et al. (Wolf et al. 1999) übereinstimmt.

Um festzustellen, ob die in Thrombozyten enthaltene Procaspase-3 überhaupt noch aktivierbar ist, wurden Thrombozytenlysate *in vitro* mittels exogen zugegebener aktiver Caspase-8 inkubiert, womit gezeigt werden konnte, dass sich thrombozytäre Procaspase-3 durchaus noch aktivieren lässt, d.h. in funktionsfähiger Form vorliegt (Abb. 17).

Mittels verschiedener proapoptotischer Stimuli wurde daraufhin untersucht, ob sich die in Thrombozyten enthaltenen Procaspasen auch *in vivo* aktivieren lassen:

Nach Stimulation mit agonistischen anti-CD95-Antikörpern ließ sich in kernhaltigen (z.B. Jurkat-T-)Zellen eine Spaltung von Procaspase-8 in ihre aktive Unterform p43 beobachten. Obwohl Thrombozyten über Caspase-8, die zentrale Initiatorcaspase des Todesrezeptorweges, verfügen (Li et al. 2000), gelang dieser Nachweis bei Thrombozyten nicht (Abb. 18). Caspase-8 kann also folglich in Thrombozyten nicht über den Todesrezeptor CD95 aktiviert werden. Dieser Umstand kann durch eine jüngere Untersuchung erklärt werden, die zeigt, dass in Thrombozyten weder CD95, noch TRAIL-R1 noch -R2 exprimiert wird (Plenchette et al. 2001).

Nachdem es nicht gelang, die thrombozytäre Caspasekaskade über Todesrezeptoren zu aktivieren, thrombozytäre Procaspase-3 jedoch wie oben gezeigt in einer aktivierbaren Form vorlag, wurden verschiedene proapoptotische Stimuli verwendet, um in intakten Thrombozyten eine Caspaseaktivierung zu erzielen. Es gelang jedoch mit keinem der getesteten, als proapoptotisch bekannten Stimuli, eine Aktivierung von Caspasen zu erreichen. Zu den getesteten Stimuli zählten u.a. der Kinaseinhibitor Staurosporin, von dem bekannt ist, dass er Apoptose sogar in vielen Zellen auslösen kann, die gegen andere proapoptotische Stimuli resistent sind (Stepczynska et al. 2001), da er den mitochondrialen Signalweg aktiviert, und zwar auf eine andere Art und Weise als DNA-schädigende Substanzen. Da er somit zellkernunabhängig agiert und sogar in der Lage ist, in enukleierten Zytoplasten Apoptose auszulösen (Jacobsen et al. 1996), wurde erwartet, dass er auch in Thrombozyten zu einer Caspaseaktivierung führt. Nach Stimulation mit Staurosporin gelang jedoch kein Nachweis von aktiver Caspase-3 (Abb. 19). Von dem ebenfalls getesteten Chemotherapeutikum Etoposid ist bekannt, dass es in einer Konzentration von 25 μM *in vitro* direkt zu einer Freisetzung von Zytrochrom c aus dem Mitochondrium führt (Robertson et al. 2000) und somit auch in Thrombozyten über nachfolgende Oligomerisierung von Apaf-1 und Caspase-9 zu einer Caspaseaktivierung führen sollte. Aber auch nach

Stimulation mit Etoposid ließ sich in Thrombozyten keine Caspaseaktivierung nachweisen.

4.2.2 Tributylzinn (TBT) führt in Thrombozyten zu einer schnellen Aktivierung von Caspase-9 und -3

Als weiterer Stimulus wurde Tributylzinn (TBT) eingesetzt, eine Organozinn-Verbindung, die v.a. für ihre Hemmung der mitochondrialen ATP-Produktion über die Inhibition der F₀F₁-ATP-Synthase bekannt ist (Aldridge und Cremer 1955; Aldridge und Street 1964; Selwyn et al. 1970). Jedoch weiß man von TBT auch, dass es über mitochondriale Schädigung Apoptose induzieren kann (Aw et al. 1990; Raffray und Cohen 1993; Stridh et al. 1998; Stridh et al. 1999a; Stridh et al. 1999c). Die Hauptwirkung von TBT am Mitochondrium scheint die Freisetzung von Zytocrom c und eine Erhöhung der Membrandurchlässigkeit über die Öffnung bestimmter Poren zu sein (Stridh et al. 1999b; Nishikimi et al. 2001). Außerdem kommt es zur einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Chow et al. 1992).

Da Thrombozyten über alle wesentlichen Bestandteile des mitochondrialen Signalweges der Apoptose verfügen, lag es nahe, dass ein Stimulus wie TBT, der unmittelbar am Mitochondrium angreift, auch thrombozytäre Caspasen aktivieren könnte.

Tatsächlich ließ sich in Thrombozyten nach Stimulation mit TBT eine Aktivierung von Caspase-9 und -3 mittels Westernblot nachweisen sowie die enzymatische Aktivität von Caspase-3 fluorometrisch bestimmen. Mit TBT konnte somit zum ersten Mal ein Stimulus gefunden werden, mit dem sich in intakten Thrombozyten Caspasen aktivieren lassen.

4.2.3 TBT-induzierte Aktivierung von Caspase-9 und -3 in Thrombozyten erfolgt außerhalb des Apoptosoms

Bemerkenswert war darüber hinaus die Geschwindigkeit, mit der die Caspaseprozessierung erfolgte. So war in Thrombozyten bereits nach 2 min eine Caspaseaktivierung zu beobachten, die nach 4 min ihr Maximum erreichte. Im Gegensatz dazu findet in Jurkat-T-Zellen eine vergleichbare

Aktivitätszunahme erst nach 30 min bis 2 h statt (Stridh et al. 1998; Stridh et al. 2001). Auch wenn der Mechanismus, über den TBT in kernhaltigen Zellen wie Jurkat-T-Zellen Caspasen aktiviert, noch nicht vollständig aufgeklärt ist, so wird doch davon ausgegangen, dass mitochondriales Zytochrom c nach seiner Freisetzung ins Zytosol dort in Verbindung mit dATP die Oligomerisierung von Apaf-1 und Procaspase-9 zum Apoptosom ermöglicht und die in diesem Komplex aktivierte Caspase-9 dann die Caspasekaskade initiiert (Stridh et al. 1998; Stridh et al. 1999c; Stridh et al. 2001; Gogvadze et al. 2002).

Der deutliche Geschwindigkeitsunterschied führte zu der Vermutung, dass TBT in Thrombozyten möglicherweise über einen anderen Mechanismus als der Apoptosombildung zur Caspaseaktivierung führt. In dieser Arbeit konnte mittels Gelchromatographie gezeigt werden, dass sich aktivierte Caspase-9 in Thrombozyten nach TBT-Stimulation in keinem hochmolekularen Komplex befindet. Die hohe Geschwindigkeit der TBT-vermittelten Spaltung von Caspase-9 in Thrombozyten führt im Zusammenhang mit der Beobachtung, dass sich Caspase-9 dabei nicht im Verbund eines hochmolekularen Komplexes befindet, zu der Schlussfolgerung, dass Caspase-9 in Thrombozyten nach TBT-Stimulation höchstwahrscheinlich außerhalb des Apoptosoms umgesetzt und aktiviert wird. Diese Daten stehen im Einklang mit Ergebnissen aus Versuchen mit menschlichen eosinophilen und neutrophilen Leukozyten, bei denen eine durch TBT ausgelöste, schnelle Aktivierung von Caspase-3 unabhängig von mitochondrialen Veränderungen beschrieben wurde (Nopp et al. 2002).

Wurden Thrombozyten mit exogenem Zytochrom c und dATP inkubiert, ließ sich aktivierte Caspase-9 sowie deren Lokalisierung in einem hochmolekularen Komplex nachweisen (Abb. 23). Damit ließen sich die Ergebnisse anderer Autoren bestätigen, die zeigen, dass sich in menschlichen Thrombozyten, die alle Bestandteile des mitochondrialen Signalwegs der Apoptose einschließlich Apaf-1, Zytochrom c, Caspase-9 und -3 enthalten, die Bildung eines Apoptosoms induzieren lässt (Wolf et al. 1999). Das Ausbleiben einer Apoptosombildung bei Stimulation mit TBT könnte erklären, warum die Überexpression von Bcl-2 und Bcl-x_L in Jurkat-T-Zellen diese nur bedingt vor

TBT-induzierter Apoptose schützt (Stridh et al. 1999a). Da die antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie die mitochondriale Freisetzung von Zytocrom c blockieren, ist es denkbar, dass die durch TBT ausgelöste Verlagerung von Zytocrom c in das Zytosol keine Voraussetzung für die Aktivierung von Caspase-9 ist. Darüber hinaus kann eine Rolle von Todesrezeptoren bei der TBT-induzierten Aktivierung von Procaspase-9 ausgeschlossen werden, da menschliche Thrombozyten nicht über Todesrezeptoren verfügen (Plenchette et al. 2001). Vereinbar damit ist, dass bei der Stimulation mit TBT keinerlei Umsetzung von Procaspase-8 festgestellt werden konnte. Die intrazelluläre Calciumkonzentration könnte ein Element der Caspaseaktivierung mittels TBT darstellen, da beobachtet wurde, dass sie unter dem Einfluss von TBT ansteigt (Chow et al. 1992). Chelierung von intra- oder extrazellulärem Calcium verhindert zwar weder die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials noch die Freisetzung von Zytocrom c, vermindert jedoch deutlich die DEVDase-Aktivität in Jurkat-T-Zellen (Stridh et al. 1999b). Auf welche Weise ein intrazellulärer Calciumanstieg jedoch zu einer Caspaseaktivierung führen könnte ist unklar. In diesem Zusammenhang könnte eine mögliche Rolle der Calcium-abhängigen Cysteinprotease Calpain diskutiert werden. Es wurde bereits gezeigt, das Calpain Procaspase-3 und -9 spaltet (Wolf et al. 1999; Chua et al. 2000). Da jedoch die Calpain-vermittelte Umsetzung zu anderen und inaktiven Spaltformen führt (Wolf et al. 1999), ist Calpain höchstwahrscheinlich nicht an der TBT-vermittelten Caspaseaktivierung beteiligt. Weitere theoretisch mögliche Signalwege wären die Freisetzung lysosomalen Cathepsins (Leist und Jaattela 2001) oder die Stressinduzierung im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums (ER) durch beispielsweise Thapsigargin (Nakagawa et al. 2000; Rao et al. 2002). Aus der Beobachtung, dass die Zugabe eines Cathepsininhibitors die TBT-induzierte DEVDase-Aktivität nur leicht verringerte und Thapsigargin keine Auswirkung auf die Caspaseaktivierung in menschlichen Thrombozyten hatte (Daten nicht gezeigt), kann der Schluss gezogen werden, dass Cathepsine oder ER-Stress keine zentralen Elemente der TBT-vermittelten Caspaseaktivierung sind. Ein anderer möglicher Signalmechanismus könnte der Akt/PKB-Weg sein, da beschrieben

wurde, dass Akt Caspase-9 phosphoryliert und deren Aktivierung beeinträchtigt (Cardone et al. 1998). Ein weiterer vom Apoptosom unabhängiger Signalweg wird von Marsden et al. diskutiert (Marsden et al. 2002). Weiterführende Untersuchungen müssen daher der Frage nachgehen, wie TBT Procaspase-9 ohne Bildung eines Apoptosoms aktiviert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob in kernlosen menschlichen Blutzellen wie Erythrozyten und Thrombozyten, die im Zuge ihrer Reifung aus Vorläuferzellen den Großteil ihrer Organellen verlieren, noch Teile des apoptotischen Apparates vorhanden sind und aktiviert werden können.

Reife Erythrozyten enthalten nicht zu vernachlässigende Mengen an Caspase-3 und -8, während essentielle Bestandteile des mitochondrialen Signalwegs der Apoptose wie Caspase-9, Apaf-1 und Zytocrom c vollständig fehlen. Erstaunlicherweise ließen sich die erythrozytären Caspasen, die sich *in vitro* als prinzipiell funktionsfähig erwiesen, in intakten Erythrozyten weder durch lange Lagerung noch durch verschiedene proapoptotische Stimuli aktivieren.

Bei Erhöhung des zytosolischen Calciums wurden in Erythrozyten nicht Caspasen, sondern die Cysteinprotease Calpain aktiviert. Diese führte zur Spaltung von Fodrin (Spectrin) und morphologischen Veränderungen wie Zellschrumpfung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Erythrozyten über keinen funktionellen apoptotischen Apparat mehr verfügen. Die im Rahmen ihrer Alterung zu beobachtenden morphologischen Veränderungen scheinen vielmehr auf die Calcium-abhängige Aktivierung der Protease Calpain zurückzuführen zu sein.

Obwohl Thrombozyten alle Elemente des mitochondrialen Signalweges der Apoptose enthalten, ließ sich mit den meisten bekannten proapoptotischen keine Caspaseaktivierung erzielen. Mit Tributylzinn (TBT) gelang es zum ersten Mal, eine Substanz zu finden, mit der sich Caspase-9 und Caspase-3 in Thrombozyten aktivieren lassen. Interessanterweise führte Tributylzinn (TBT) in Thrombozyten zu einer deutlich schnelleren Aktivierung von Caspase-9 als in kernhaltigen Jurkat-T-Zellen. Zusätzlich konnte mittels Gelfiltrationsanalysen gezeigt werden, dass diese Aktivierung von Caspase-9 ohne die Bildung eines Apoptosoms erfolgt. Diese Beobachtungen lassen sich mit Daten vereinbaren, die einen vom Mitochondrium unabhängigen Mechanismus der Apoptoseinduktion durch TBT in manchen Zellsystemen vermuten lassen (Nopp et al. 2002).

Da die meisten proapoptischen Stimuli in Thrombozyten zu keiner Caspaseaktivierung führen, sind die thrombozytären Caspasen anscheinend nicht über den bekannten mitochondrialen Signalweg aktivierbar, und Thrombozyten somit weder als Modellsystem zur weiteren Erforschung dieses Signalweges noch als Screeningsystem für neuartige Chemotherapeutika geeignet.

6 LITERATUR

- Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang und C. W. Akey (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." **Mol Cell** 9(2): 423-32.
- Adrain, C., E. A. Slee, M. T. Harte und S. J. Martin (1999). "Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region." **J. Biol. Chem.** 274: 20855-60.
- Aldridge, W. N. und J. E. Cremer (1955). "The biochemistry of organo-tin compounds; diethyltin dichloride and triethyltin sulphate." **Biochem J** 61(3): 406-18.
- Aldridge, W. N. und B. W. Street (1964). "Oxidative phosphorylation. Biochemical effects and properties of trialkyltins." **Biochem J** 91(2): 287-97.
- Allan, D. und P. Thomas (1981a). "Ca²⁺-induced biochemical changes in human erythrocytes and their relation to microvesiculation." **Biochem J** 198(3): 433-40.
- Allan, D. und P. Thomas (1981b). "The effects of Ca²⁺ and Sr²⁺ on Ca²⁺-sensitive biochemical changes in human erythrocytes and their membranes." **Biochem J** 198(3): 441-5.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong und J. Yuan (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." **Cell** 87(2): 171.
- Arends, M. J., R. G. Morris und A. H. Wyllie (1990). "Apoptosis. The role of the endonuclease." **Am J Pathol** 136(3): 593-608.
- Arends, M. J. und A. H. Wyllie (1991). "Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology." **Intern. Rev. Exp. Pathol.** 32: 223-254.
- Aw, T. Y., P. Nicotera, L. Manzo und S. Orrenius (1990). "Tributyltin stimulates apoptosis in rat thymocytes." **Arch Biochem Biophys** 283(1): 46-50.
- Banner, D. W., A. D'Arcy, W. Janes, R. Gentz, H. J. Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher und W. Lesslauer (1993). "Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF β complex: implications for TNF receptor activation." **Cell** 73: 431-445.
- Bantel, H., I. H. Engels, W. Voelter, K. Schulze-Osthoff und S. Wesselborg (1999). "Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis." **Cancer Res** 59(9): 2083-90.
- Belka, C., J. Rudner, S. Wesselborg, A. Stepczynska, P. Marini, A. Leppl-Wienhues, H. Faltin, M. Bamberg, W. Budach und K. Schulze-Osthoff (2000). "Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis." **Oncogene** 19(9): 1181-90.
- Berrebi, D., A. Sautet, J. F. Flejou, M. C. Dauge, M. Peuchmaur und F. Potet (1998). "Ticlopidine induced colitis: a histopathological study including apoptosis." **Mol Cell** 51: 280-3.

- Bertrand, R., E. Solary, P. O'Connor, K. W. Kohn und Y. Pommier (1994). "Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine." **Exp Cell Res** 211(2): 314-21.
- Beutler, B. (2001). "Autoimmunity and apoptosis: the Crohn's connection." **Immunity** 15(1): 5-14.
- Beutler, B. und C. van Huffel (1994). "Unraveling function in the TNF ligand and receptor families." **Science** 264: 667-668.
- Boas, F. E., L. Forman und E. Beutler (1998). "Phosphatidylserine exposure and red cell viability in red cell aging and in hemolytic anemia." **Proc Natl Acad Sci U S A** 95(6): 3077-81.
- Boehning, D., R. L. Patterson, L. Sedaghat, N. O. Glebova, T. Kurosaki und S. H. Snyder (2003). "Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis." **Nat Cell Biol** 5(12): 1051-61.
- Boldin, M. P., T. M. Goncharov, Y. V. Goltsev und D. Wallach (1996). "Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death." **Cell** 85(6): 803-15.
- Bouillet, P., J. F. Purton, D. I. Godfrey, L. C. Zhang, L. Coultas, H. Puthalakath, M. Pellegrini, S. Cory, J. M. Adams und A. Strasser (2002). "BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes." **Nature** 415(6874): 922-6.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." **Anal Biochem** 72: 248-54.
- Bratosin, D., J. Mazurier, J. P. Tissier, J. Estaquier, J. J. Huart, J. C. Ameisen, D. Aminoff und J. Montreuil (1998). "Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review." **Biochimie** 80(2): 173-95.
- Bronk, S. F. und G. J. Gores (1993). "pH-dependent nonlysosomal proteolysis contributes to lethal anoxic injury of rat hepatocytes." **Am J Physiol** 264(4 Pt 1): G744-51.
- Brunner, T., R. J. Mogil, D. LaFace, N. J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S. J. Martin, W. R. Force, D. H. Lynch, C. F. Ware und et al. (1995). "Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas." **Nature** 373(6513): 441-4.
- Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo und X. Wang (1999). "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 15: 269-90.
- Bunz, F. (2001). "Cell death and cancer therapy." **Curr Opin Pharmacol** 1(4): 337-41.
- Cain, K., S. B. Bratton und G. M. Cohen (2002). "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex." **Biochimie** 84(2-3): 203-14.
- Cain, K., S. B. Bratton, C. Langlais, G. Walker, D. G. Brown, X. M. Sun und G. M. Cohen (2000). "Apaf-1 oligomerizes into biologically active

- approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes." **J. Biol. Chem.** 275: 6067-6070.
- Carafoli, E. und M. Molinari (1998). "Calpain: a protease in search of a function?" **Biochem Biophys Res Commun** 247(2): 193-203.
- Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch und J. C. Reed (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." **Science** 282(5392): 1318-21.
- Carlile, G. W., D. H. Smith und M. Wiedmann (2004). "Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation." **Blood** 103(11): 4310-6.
- Chan, S. L. und M. P. Mattson (1999). "Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death." **J Neurosci Res** 58(1): 167-90.
- Chasis, J. A., M. Prenant, A. Leung und N. Mohandas (1989). "Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation." **Blood** 74(3): 1112-20.
- Chow, S. C., G. E. Kass, M. J. McCabe, Jr. und S. Orrenius (1992). "Tributyltin increases cytosolic free Ca²⁺ concentration in thymocytes by mobilizing intracellular Ca²⁺, activating a Ca²⁺ entry pathway, and inhibiting Ca²⁺ efflux." **Arch Biochem Biophys** 298(1): 143-9.
- Chua, B. T., K. Guo und P. Li (2000). "Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases." **J Biol Chem** 275(7): 5131-5.
- Cloyd, M. W., J. J. Chen, P. Adegboyega und L. Wang (2001). "How does HIV cause depletion of CD4 lymphocytes? A mechanism involving virus signaling through its cellular receptors." **Curr Mol Med** 1(5): 545-50.
- Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." **Biochem J** 326 (Pt 1): 1-16.
- Connor, J., C. C. Pak und A. J. Schroit (1994). "Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells." **J Biol Chem** 269(4): 2399-404.
- Consoli, U., I. El-Tounsi, A. Sandoval, V. Snell, H. D. Kleine, W. Brown, J. R. Robinson, F. DiRaimondo, W. Plunkett und M. Andreeff (1998). "Differential induction of apoptosis by fludarabine monophosphate in leukemic B and normal T cells in chronic lymphocytic leukemia." **Blood** 91(5): 1742-8.
- Corasaniti, M. T., R. Nistico, A. Costa, D. Rotiroti und G. Bagetta (2001). "The HIV-1 envelope protein, gp120, causes neuronal apoptosis in the neocortex of the adult rat: a useful experimental model to study neuroaids." **Funct Neurol** 16(Suppl 4): 31-8.
- Cory, S., D. C. Huang und J. M. Adams (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." **Oncogene** 22(53): 8590-607.
- Cosulich, S. C., P. J. Savory und P. R. Clarke (1999). "Bcl-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome c." **Curr. Biol.** 9: 147-50.

- Danon, D. und Y. Marikovsky (1988). "The aging of the red blood cell. A multifactor process." **Blood Cells** 14(1): 7-18.
- Datta, R., H. Kojima, K. Yoshida und D. Kufe (1997). "Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis." **J Biol Chem** 272(33): 20317-20.
- De Botton, S., S. Sabri, E. Daugas, Y. Zermati, J. E. Guidotti, O. Hermine, G. Kroemer, W. Vainchenker und N. Debili (2002). "Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes." **Blood** 100(4): 1310-7.
- De Maria, R., U. Testa, L. Luchetti, A. Zeuner, G. Stassi, E. Pelosi, R. Riccioni, N. Felli, P. Samoggia und C. Peschle (1999). "Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis." **Blood** 93(3): 796-803.
- Dhein, J., P. T. Daniel, B. C. Trauth, A. Oehm, P. Moeller und P. H. Krammer (1992). "Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens." **J. Immunol.** 149: 3166-3173.
- Dhein, J., H. Walczak, C. Baumler, K. M. Debatin und P. H. Krammer (1995). "Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95)." **Nature** 373(6513): 438-41.
- Dhillon, A. P. und G. M. Dusheiko (1995). "Pathology of hepatitis C virus infection." **Histopathology** 26(4): 297-309.
- Dokal, I. (1996). "Severe aplastic anemia including Fanconi's anemia and dyskeratosis congenita." **Curr Opin Hematol** 3(6): 453-60.
- Dolis, D., C. Moreau, A. Zachowski und P. F. Devaux (1997). "Aminophospholipid translocase and proteins involved in transmembrane phospholipid traffic." **Biophys Chem** 68(1-3): 221-31.
- Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis und L. Chen (2002). "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion." **Nat Med** 8(8): 793-800.
- Duvall, E. und A. H. Wyllie (1986). "Death and the cell." **Immunol. Today** 7: 115-119.
- Duvall, E., A. H. Wyllie und R. G. Morris (1985). "Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis)." **Immunology** 56(2): 351-8.
- Eck, M. J. und S. R. Sprang (1989). "The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding." **J. Biol. Chem.** 264: 17595-17605.
- Emoto, Y., Y. Manome, G. Meinhardt, H. Kasaki, S. Kharbanda, M. Robertson, T. Ghayur, W. W. Wong, R. Kamen und R. Weichselbaum (1995). "Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells." **EMBO J.** 14: 6148-56.
- Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu und S. Nagata (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." **Nature** 391: 43-50.

- Engels, I. H., A. Stepczynska, C. Stroh, K. Lauber, C. Berg, R. Schwenzler, H. Wajant, R. U. Janicke, A. G. Porter, C. Belka, M. Gregor, K. Schulze-Osthoff und S. Wesselborg (2000). "Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis." **Oncogene** 19(40): 4563-73.
- Eskes, R., B. Antonsson, A. Osen Sand, S. Montessuit, C. Richter, R. Sadoul, G. Mazzei, A. Nichols und J. C. Martinou (1998). "Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions." **J. Cell Biol.** 143: 217-24.
- Evatt, B. und S. Stein (1988). Platelet Structure and Function. **Platelets**. D. M. Smith und S. Summers. Arlington, American Association of Blood Banks: 1-14.
- Fadeel, B., S. Orrenius und B. Zhivotovsky (1999). "Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?" **Biochem Biophys Res Commun** 266(3): 699-717.
- Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton und P. M. Henson (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." **J Immunol** 148(7): 2207-16.
- Farber, E. (1994). "Programmed cell death: necrosis versus apoptosis." **Mod Pathol** 7(5): 605-9.
- Ferrari, D., A. Stepczynska, M. Los, S. Wesselborg und K. Schulze-Osthoff (1998). "Differential regulation and ATP requirement for caspase-8 and caspase-3 activation during CD95- and anticancer drug-induced apoptosis." **J Exp Med** 188(5): 979-84.
- Galle, P. R. und P. H. Krammer (1998). "CD95-induced apoptosis in human liver disease." **Semin Liver Dis** 18(2): 141-51.
- Glaser, T., N. Schwarz-Benmeir, S. Barnoy, S. Barak, Z. Eshhar und N. S. Kosower (1994). "Calpain (Ca²⁺-dependent thiol protease) in erythrocytes of young and old individuals." **Proc Natl Acad Sci U S A** 91(17): 7879-83.
- Gogvadze, V., H. Stridh, S. Orrenius und I. Cotgreave (2002). "Tributyltin causes cytochrome C release from isolated mitochondria by two discrete mechanisms." **Biochem Biophys Res Commun** 292(4): 904-8.
- Goldkorn, T., N. Balaban, M. Shannon, V. Chea, K. Matsukuma, D. Gilchrist, H. Wang und C. Chan (1998). "H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells." **J Cell Sci** 111 (Pt 21): 3209-20.
- Green, D. R. und J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." **Science** 281(5381): 1309-12.
- Gregoli, P. A. und M. C. Bondurant (1997). "The roles of Bcl-X(L) and apopain in the control of erythropoiesis by erythropoietin." **Blood** 90(2): 630-40.

- Gregoli, P. A. und M. C. Bondurant (1999). "Function of caspases in regulating apoptosis caused by erythropoietin deprivation in erythroid progenitors." **J Cell Physiol** 178(2): 133-43.
- Gronowicz, G., H. Swift und T. L. Steck (1984). "Maturation of the reticulocyte in vitro." **J Cell Sci** 71: 177-97.
- Gross, A., J. M. McDonnell und S. J. Korsmeyer (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." **Genes Dev** 13(15): 1899-911.
- Haest, C. W., G. Plasa, D. Kamp und B. Deuticke (1978). "Spectrin as a stabilizer of the phospholipid asymmetry in the human erythrocyte membrane." **Biochim Biophys Acta** 509(1): 21-32.
- Hagel, L. (1989). Gel filtration. **Protein Purification. Principles, high resolution methods, and applications.** J.-C. Janson und R. Rydén. New York, Weinheim, Cambridge, VCH Publishers Inc.: 63-106.
- Hahne, M., D. Rimoldi, M. Schroter, P. Romero, M. Schreier, L. E. French, P. Schneider, T. Bornand, A. Fontana, D. Lienard, J. Cerottini und J. Tschopp (1996). "Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape." **Science** 274(5291): 1363-6.
- Hengartner, M. O. und H. R. Horvitz (1994). "C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2." **Cell** 76(4): 665-76.
- Henseleit, U., G. Plasa und C. Haest (1990). "Effects of divalent cations on lipid flip-flop in the human erythrocyte membrane." **Biochim Biophys Acta** 1029(1): 127-35.
- Herr, I., D. Wilhelm, T. Bohler, P. Angel und K. M. Debatin (1997). "Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis." **Embo J** 16(20): 6200-8.
- Hetts, S. W. (1998). "To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease." **Jama** 279: 300-7.
- Hu, Y., M. A. Benedict, D. Wu, N. Inohara und G. Nunez (1998). "Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation." **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** 95: 4386-91.
- Inohara, N., T. S. Gourley, R. Carrio, M. Muniz, J. Merino, I. Garcia, T. Koseki, Y. Hu, S. Chen und G. Nunez (1998). "Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death." **J. Biol. Chem.** 273: 32479-86.
- Jacobsen, M. D., M. Weil und M. C. Raff (1996). "Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death." **J Cell Biol** 133(5): 1041-51.
- Janicke, R. U., P. Ng, M. L. Sprengart und A. G. Porter (1998). "Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis." **J Biol Chem** 273(25): 15540-5.
- Janson, J.-C. (1987). "On the history of the development of Sephadex." **Chromatographia** 23: 361-369.

- Jia, L., Y. Patwari, S. M. Srinivasula, A. C. Newland, T. Fernandes-Alnemri, E. S. Alnemri und S. M. Kelsey (2001). "Bax translocation is crucial for the sensitivity of leukaemic cells to etoposide-induced apoptosis." **Oncogene** 20(35): 4817-26.
- Jones, E. Y., D. I. Stuart und N. P. Walker (1992). "Crystal structure of TNF." **Immunol. Ser.** 56: 93-127.
- Kanduc, D., A. Mittelman, R. Serpico, E. Sinigaglia, A. A. Sinha, C. Natale, R. Santacroce, M. G. Di Corcia, A. Lucchese, L. Dini, P. Pani, S. Santacroce, S. Simone, R. Bucci und E. Farber (2002). "Cell death: apoptosis versus necrosis (review)." **Int J Oncol** 21(1): 165-70.
- Kanzler, S. und P. R. Galle (2000). "Apoptosis and the liver." **Semin Cancer Biol** 10(3): 173-84.
- Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie und A. R. Currie (1972). "Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics." **Br. J. Cancer** 26: 239-257.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer und M. E. Peter (1995). "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." **EMBO J.** 14: 5579-88.
- Kliche, K. O. und K. Hoffken (1999). "The role of apoptosis in hematologic malignancies and modulation of apoptosis as a new therapeutic approach." **J Cancer Res Clin Oncol** 125(3-4): 226-31.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzal, D. R. Green und D. D. Newmeyer (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." **Science** 275(5303): 1132-6.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." **Nature** 227(259): 680-5.
- Lankiewicz, S., C. Marc Luetjens, N. Truc Bui, A. J. Krohn, M. Poppe, G. M. Cole, T. C. Saido und J. H. Prehn (2000). "Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death." **J Biol Chem** 275(22): 17064-71.
- Lauber, K., S. G. Blumenthal, M. Waibel und S. Wesselborg (2004). "Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses." **Mol Cell** 14(3): 277-87.
- Leist, M. und M. Jaattela (2001). "Triggering of apoptosis by cathepsins." **Cell Death Differ** 8(4): 324-6.
- Leist, M., B. Single, A. F. Castoldi, S. Kuhnle und P. Nicotera (1997). "Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis." **J Exp Med** 185(8): 1481-6.
- Li, J., Y. Xia, A. M. Bertino, J. P. Coburn und D. J. Kuter (2000). "The mechanism of apoptosis in human platelets during storage." **Transfusion** 40(11): 1320-9.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri und X. Wang (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." **Cell** 91(4): 479-89.

- Li, R. und D. M. Page (2001). "Requirement for a complex array of costimulators in the negative selection of autoreactive thymocytes in vivo." **J Immunol** 166(10): 6050-6.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson und X. Wang (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." **Cell** 86(1): 147-57.
- Los, M., S. Wesselborg und K. Schulze-Osthoff (1999). "The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice." **Immunity** 10(6): 629-39.
- Madeo, F., E. Frohlich und K. U. Frohlich (1997). "A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis." **J Cell Biol** 139(3): 729-34.
- Madeo, F., E. Herker, C. Maldener, S. Wissing, S. Lachelt, M. Herlan, M. Fehr, K. Lauber, S. J. Sigrist, S. Wesselborg und K. U. Frohlich (2002). "A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast." **Mol Cell** 9(4): 911-7.
- Marsden, V. S., L. O'Connor, L. A. O'Reilly, J. Silke, D. Metcalf, P. G. Ekert, D. C. Huang, F. Cecconi, K. Kuida, K. J. Tomaselli, S. Roy, D. W. Nicholson, D. L. Vaux, P. Bouillet, J. M. Adams und A. Strasser (2002). "Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome." **Nature** 419(6907): 634-7.
- Martin, D. A., R. M. Siegel, L. Zheng und M. J. Lenardo (1998). "Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal." **J Biol Chem** 273(8): 4345-9.
- Martin, S. J., G. A. O'Brien, W. K. Nishioka, A. J. McGahon, A. Mahboubi, T. C. Saido und D. R. Green (1995). "Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis." **J Biol Chem** 270(12): 6425-8.
- Medema, J. P., C. Scaffidi, F. C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer und M. E. Peter (1997). "FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)." **EMBO J.** 16: 2794-804.
- Meier, P., A. Finch und G. Evan (2000). "Apoptosis in development." **Nature** 407(6805): 796-801.
- Mercure, L. und M. A. Wainberg (1994). "Direct involvement of extracellular HIV-1 virions in the apoptosis of CD8+ lymphocytes: a two-step model." **Med Hypotheses** 42(3): 159-68.
- Miyashita, T. und J. C. Reed (1993). "Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line." **Blood** 81: 151-7.
- Miyoshi, H. und G. J. Gores (1998). "Apoptosis and the liver: relevance for the hepato-biliary-pancreatic surgeon." **J Hepatobiliary Pancreat Surg** 5(4): 409-15.
- Mohandas, N. und W. Groner (1989). "Cell membrane and volume changes during red cell development and aging." **Ann N Y Acad Sci** 554: 217-24.

- Mori, M., M. Uchida, T. Watanabe, K. Kirito, K. Hatake, K. Ozawa und N. Komatsu (2003). "Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling." **J Cell Physiol** 195(2): 290-7.
- Motoyama, N., T. Kimura, T. Takahashi, T. Watanabe und T. Nakano (1999). "bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation." **J Exp Med** 189(11): 1691-8.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter und V. M. Dixit (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex." **Cell** 85(6): 817-27.
- Muzio, M., B. R. Stockwell, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen und V. M. Dixit (1998). "An induced proximity model for caspase-8 activation." **J Biol Chem** 273(5): 2926-30.
- Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner und J. Yuan (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." **Nature** 403(6765): 98-103.
- Nakamura, K., E. Bossy-Wetzel, K. Burns, M. P. Fadel, M. Lozyk, I. S. Goping, M. Opas, R. C. Bleackley, D. R. Green und M. Michalak (2000). "Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis." **J Cell Biol** 150(4): 731-40.
- Nakano, K. und K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." **Mol Cell** 7(3): 683-94.
- Nasir, A., H. S. Arora und H. E. Kaiser (2000). "Apoptosis and pathogenesis of viral hepatitis C--an update." **In Vivo** 14(1): 297-300.
- Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani und C. Riccardi (1991). "A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry." **J Immunol Methods** 139(2): 271-9.
- Nishikimi, A., Y. Kira, E. Kasahara, E. F. Sato, T. Kanno, K. Utsumi und M. Inoue (2001). "Tributyltin interacts with mitochondria and induces cytochrome c release." **Biochem J** 356(Pt 2): 621-6.
- Nopp, A., J. Lundahl und H. Stridh (2002). "Caspase activation in the absence of mitochondrial changes in granulocyte apoptosis." **Clin Exp Immunol** 128(2): 267-74.
- Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi und N. Tanaka (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." **Science** 288(5468): 1053-8.
- Ojcius, D. M., A. Zychlinsky, L. M. Zheng und J. D. Young (1991). "Ionophore-induced apoptosis: role of DNA fragmentation and calcium fluxes." **Exp Cell Res** 197(1): 43-9.

- Ott, M., J. D. Robertson, V. Gogvadze, B. Zhivotovsky und S. Orrenius (2002). "Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process." **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** 99(3): 1259-1263.
- Pallardy, M., A. Biola, H. Lebec und J. Breard (1999). "Assessment of apoptosis in xenobiotic-induced immunotoxicity." **Methods** 19(1): 36-47.
- Palmblad, J., H. A. Papadaki und G. Eliopoulos (2001). "Acute and chronic neutropenias. What is new?" **J Intern Med** 250(6): 476-91.
- Pan, G., K. O'Rourke und V. M. Dixit (1998). "Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex." **J. Biol. Chem.** 273: 5841-5.
- Patel, T. und G. J. Gores (1995). "Apoptosis and hepatobiliary disease." **Hepatology** 21(6): 1725-41.
- Patel, T., L. R. Roberts, B. A. Jones und G. J. Gores (1998). "Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview." **Semin Liver Dis** 18(2): 105-14.
- Petrides, P. E. (1998). Blut. **Biochemie und Pathobiochemie**. G. Löffler und P. E. Petrides. Berlin, Heidelberg, New York, Springer: 879-948.
- Piguet, P. F., C. D. Kan und C. Vesin (2002). "Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes." **Apoptosis** 7(2): 91-8.
- Plenchette, S., M. Moutet, M. Benguella, J. P. N'Gondara, F. Guigner, C. Coffe, L. Corcos, A. Bettaieb und E. Solary (2001). "Early increase in DcR2 expression and late activation of caspases in the platelet storage lesion." **Leukemia** 15(10): 1572-81.
- Porath, J. und P. Flodin (1959). "Gel filtration: A method for desalting and group separation." **Nature** 183: 1657-1659.
- Porn-Ares, M. I., A. Samali und S. Orrenius (1998). "Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis." **Cell Death Differ** 5(12): 1028-33.
- Rabilloud, T., G. Carpentier und P. Tarroux (1988). "Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite." **Electrophoresis** 9(6): 288-91.
- Raffray, M. und G. M. Cohen (1993). "Thymocyte apoptosis as a mechanism for tributyltin-induced thymic atrophy in vivo." **Arch Toxicol** 67(4): 231-6.
- Rao, R. V., S. Castro-Obregon, H. Frankowski, M. Schuler, V. Stoka, G. del Rio, D. E. Bredesen und H. M. Ellerby (2002). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway." **J Biol Chem** 277(24): 21836-42.
- Rathmell, J. C. und C. B. Thompson (1999). "The central effectors of cell death in the immune system." **Annu Rev Immunol** 17: 781-828.
- Rathmell, J. C. und C. B. Thompson (2002). "Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease." **Cell** 109(Suppl): S97-107.
- Reed, J. C. (2002). "Apoptosis-based therapies." **Nat Rev Drug Discov** 1(2): 111-21.

- Reed, J. C., J. M. Jurgensmeier und S. Matsuyama (1998). "Bcl-2 family proteins and mitochondria." **Biochim. Biophys. Acta** 1366: 127-37.
- Robertson, J. D., V. Gogvadze, B. Zhivotovsky und S. Orrenius (2000). "Distinct pathways for stimulation of cytochrome c release by etoposide." **J Biol Chem** 275(42): 32438-43.
- Rodriguez, J. und Y. Lazebnik (1999). "Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme." **Genes Dev.** 13: 3179-84.
- Romero, P. J. und E. A. Romero (1999). "Effect of cell ageing on Ca²⁺ influx into human red cells." **Cell Calcium** 26(3-4): 131-7.
- Ruiz-Vela, A., G. Gonzalez de Buitrago und A. C. Martinez (1999). "Implication of calpain in caspase activation during B cell clonal deletion." **Embo J** 18(18): 4988-98.
- Rust, C. und G. J. Gores (2000). "Apoptosis and liver disease." **Am J Med** 108(7): 567-74.
- Salamino, F., B. Sparatore, R. De Tullio, R. Pontremoli, E. Melloni und S. Pontremoli (1991). "The calpastatin defect in hypertension is possibly due to a specific degradation by calpain." **Biochim Biophys Acta** 1096(4): 265-9.
- Saleh, A., S. M. Srinivasula, S. Acharya, R. Fishel und E. S. Alnemri (1999). "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation." **J. Biol. Chem.** 274: 17941-5.
- Salvesen, G. S. und V. M. Dixit (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." **Proc Natl Acad Sci U S A** 96(20): 10964-7.
- Savill, J. und V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." **Nature** 407(6805): 784-8.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg und M. E. Peter (1998). "Apoptosis signaling by death receptors." **Eur J Biochem** 254(3): 439-59.
- Schulze-Osthoff, K., H. Walczak, W. Droge und P. H. Krammer (1994). "Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis." **J Cell Biol** 127(1): 15-20.
- Secchiero, P., E. Melloni, M. Heikinheimo, S. Mannisto, R. Di Pietro, A. Iacone und G. Zauli (2004). "TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway." **Blood** 103(2): 517-22.
- Selwyn, M. J., A. P. Dawson, M. Stockdale und N. Gains (1970). "Chloride-hydroxide exchange across mitochondrial, erythrocyte and artificial lipid membranes mediated by trialkyl- and triphenyltin compounds." **Eur J Biochem** 14(1): 120-6.
- Shcherbina, A. und E. Remold-O'Donnell (1999). "Role of caspase in a subset of human platelet activation responses." **Blood** 93(12): 4222-31.
- Shi, Y. (2001). "A structural view of mitochondria-mediated apoptosis." **Nat Struct Biol** 8(5): 394-401.
- Shiga, T., M. Sekiya, N. Maeda, K. Kon und M. Okazaki (1985). "Cell age-dependent changes in deformability and calcium accumulation of human erythrocytes." **Biochim Biophys Acta** 814(2): 289-99.

- Silva, M., D. Grillot, A. Benito, C. Richard, G. Nunez und J. L. Fernandez-Luna (1996). "Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2." **Blood** 88(5): 1576-82.
- Slee, E. A., C. Adrain und S. J. Martin (1999a). "Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis." **Cell Death Differ** 6(11): 1067-74.
- Slee, E. A., M. T. Harte, R. M. Kluck, B. B. Wolf, C. A. Casiano, D. D. Newmeyer, H. G. Wang, J. C. Reed, D. W. Nicholson, E. S. Alnemri, D. R. Green und S. J. Martin (1999b). "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner." **J Cell Biol** 144(2): 281-92.
- Sorimachi, H., S. Ishiura und K. Suzuki (1997). "Structure and physiological function of calpains." **Biochem J** 328 (Pt 3): 721-32.
- Squier, M. K., A. C. Miller, A. M. Malkinson und J. J. Cohen (1994). "Calpain activation in apoptosis." **J Cell Physiol** 159(2): 229-37.
- Squier, M. K., A. J. Sehnert, K. S. Sellins, A. M. Malkinson, E. Takano und J. J. Cohen (1999). "Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis." **J Cell Physiol** 178(3): 311-9.
- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri und E. S. Alnemri (1998). "Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization." **Mol Cell** 1(7): 949-57.
- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri, G. Litwack und E. S. Alnemri (1996). "Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases." **Proc Natl Acad Sci U S A** 93(25): 14486-91.
- Stanger, B. Z., P. Leder, T. H. Lee, E. Kim und B. Seed (1995). "RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death." **Cell** 81(4): 513-23.
- Stepczynska, A., K. Lauber, I. H. Engels, O. Janssen, D. Kabelitz, S. Wesselborg und K. Schulze-Osthoff (2001). "Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation." **Oncogene** 20(10): 1193-202.
- Strand, S., W. J. Hofmann, H. Hug, M. Muller, G. Otto, D. Strand, S. M. Mariani, W. Stremmel, P. H. Krammer und P. R. Galle (1996). "Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells-- a mechanism of immune evasion?" **Nat Med** 2(12): 1361-6.
- Strasser, A., A. W. Harris, D. C. Huang, P. H. Krammer und S. Cory (1995). "Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis." **Embo J** 14(24): 6136-47.
- Strasser, A., L. O'Connor und V. M. Dixit (2000). "Apoptosis signaling." **Annu. Rev. Biochem.** 69: 217-45.
- Stridh, H., I. Cotgreave, M. Muller, S. Orrenius und D. Gigliotti (2001). "Organotin-induced caspase activation and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes." **Chem Res Toxicol** 14(7): 791-8.

- Stridh, H., E. Fava, B. Single, P. Nicotera, S. Orrenius und M. Leist (1999a). "Tributyltin-induced apoptosis requires glycolytic adenosine triphosphate production." **Chem Res Toxicol** 12(10): 874-82.
- Stridh, H., D. Gigliotti, S. Orrenius und I. Cotgreave (1999b). "The role of calcium in pre- and postmitochondrial events in tributyltin-induced T-cell apoptosis." **Biochem Biophys Res Commun** 266(2): 460-5.
- Stridh, H., M. Kimland, D. P. Jones, S. Orrenius und M. B. Hampton (1998). "Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis." **FEBS Lett** 429(3): 351-5.
- Stridh, H., S. Orrenius und M. B. Hampton (1999c). "Caspase involvement in the induction of apoptosis by the environmental toxicants tributyltin and triphenyltin." **Toxicol Appl Pharmacol** 156(2): 141-6.
- Stroh, C. und K. Schulze-Osthoff (1998). "Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates." **Cell Death Differ** 5(12): 997-1000.
- Takadera, T. und T. Ohyashiki (1997). "Apoptotic cell death and caspase 3 (CPP32) activation induced by calcium ionophore at low concentrations and their prevention by nerve growth factor in PC12 cells." **Eur J Biochem** 249(1): 8-12.
- Testa, U. (2004). "Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis." **Leukemia** 18(7): 1176-99.
- Thornberry, N. A., H. G. Bull, J. R. Calaycay, K. T. Chapman, A. D. Howard, M. J. Kostura, D. K. Miller, S. M. Molineaux, J. R. Weidner, J. Aunins und et al. (1992). "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes." **Nature** 356(6372): 768-74.
- Thornberry, N. A. und Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." **Science** 281(5381): 1312-6.
- Thornberry, N. A., T. A. Rano, E. P. Peterson, D. M. Rasper, T. Timkey, M. Garcia-Calvo, V. M. Houtzager, P. A. Nordstrom, S. Roy, J. P. Vaillancourt, K. T. Chapman und D. W. Nicholson (1997). "A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis." **J Biol Chem** 272(29): 17907-11.
- Van de Craen, M., W. Declercq, I. Van den brande, W. Fiers und P. Vandenabeele (1999). "The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis." **Cell Death Differ** 6(11): 1117-24.
- Vanags, D. M., S. Orrenius und M. Aguilar-Santelises (1997). "Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis." **Br J Haematol** 99(4): 824-31.
- Wang, K. K. (2000). "Calpain and caspase: can you tell the difference?" **Trends Neurosci** 23(1): 20-6.
- Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." **Genes Dev** 15(22): 2922-33.
- Waterhouse, N. J., D. M. Finucane, D. R. Green, J. S. Elce, S. Kumar, E. S. Alnemri, G. Litwack, K. Khanna, M. F. Lavin und D. J. Watters (1998).

- "Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis." **Cell Death Differ** 5(12): 1051-61.
- Waugh, R. E., M. Narla, C. W. Jackson, T. J. Mueller, T. Suzuki und G. L. Dale (1992). "Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age." **Blood** 79(5): 1351-8.
- Weil, M., M. D. Jacobson und M. C. Raff (1998). "Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes." **J Cell Sci** 111 (Pt 18): 2707-15.
- Weiss, C. und W. Jelkmann (1997). Funktionen des Blutes. **Physiologie des Menschen**. R. Schmidt und G. Thews. Berlin, Heidelberg, New York, Springer: 411-447.
- Wesselborg, S., I. H. Engels, E. Rossmann, M. Los und K. Schulze-Osthoff (1999). "Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction." **Blood** 93(9): 3053-63.
- Wesselborg, S., O. Janssen und D. Kabelitz (1993). "Activation-driven death of human T lymphocytes: Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells." **J. Immunol.** 150: 4338-4345.
- Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch und C. A. Smith (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." **Immunity** 3: 673-682.
- Wolf, B. B., J. C. Goldstein, H. R. Stennicke, H. Beere, G. P. Amarante-Mendes, G. S. Salvesen und D. R. Green (1999). "Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation." **Blood** 94(5): 1683-92.
- Wood, D. E. und E. W. Newcomb (1999). "Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis." **J Biol Chem** 274(12): 8309-15.
- Wu, X., C. Molinaro, N. Johnson und C. A. Casiano (2001). "Secondary necrosis is a source of proteolytically modified forms of specific intracellular autoantigens: implications for systemic autoimmunity." **Arthritis Rheum.** 44(11): 2642-52.
- Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones und X. Wang (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." **Science** 275(5303): 1129-32.
- Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis und H. R. Horvitz (1993). "The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." **Cell** 75(4): 641-52.
- Yuan, J. und B. A. Yankner (2000). "Apoptosis in the nervous system." **Nature** 407(6805): 802-9.
- Zamai, L., P. Secchiero, S. Pierpaoli, A. Bassini, S. Papa, E. S. Alnemri, L. Guidotti, M. Vitale und G. Zauli (2000). "TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis." **Blood** 95(12): 3716-24.

-
- Zeuner, A., A. Eramo, U. Testa, N. Felli, E. Pelosi, G. Mariani, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. Condorelli, C. Peschle und R. De Maria (2003). "Control of erythroid cell production via caspase-mediated cleavage of transcription factor SCL/Tal-1." **Cell Death Differ** 10(8): 905-13.
- Zou, H., W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg und X. Wang (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3." **Cell** 90(3): 405-13.
- Zou, H., Y. Li, X. Liu und X. Wang (1999). "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." **J. Biol. Chem.** 274: 11549-56.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht:

- Berg, C. P., I. H. Engels, A. Rothbart, K. Lauber, A. Renz, S. F. Schlosser, K. Schulze-Osthoff und S. Wesselborg (2001). "Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis." **Cell Death Differ** 8(12): 1197-206.
- Berg, C. P., A. Rothbart, K. Lauber, G. M. Stein, I. H. Engels, C. Belka, R. U. Janicke, K. Schulze-Osthoff und S. Wesselborg (2003). "Tributyltin (TBT) induces ultra-rapid caspase activation independent of apoptosome formation in human platelets." **Oncogene** 22(5): 775-80.

DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich besonders folgenden Personen danken, die für das Entstehen und die Fertigstellung dieser Arbeit eine entscheidende Rolle gespielt haben:

Herrn Professor Dr. rer. nat. Sebastian Wesselborg für die Überlassung des Themas, sein persönliches Engagement und seine fortwährende Unterstützung der Arbeit.

Herrn Dr. med. Christoph Berg für die gute Betreuung im Labor, die mehrfache, gründliche und konstruktive Korrektur dieser Arbeit und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Dr. rer. nat. Kirsten Lauber für ihren hochgeschätzten Rat in vielen biochemischen und experimentellen Fragestellungen, insbesondere für die Unterstützung bei der Gelelektrophorese und den Enzymassays, sowie bei der Erstellungen einiger Abbildungen.

Herrn Dr. rer. nat. Ingo Engels für die Mitbetreuung des experimentellen Teils des Erythrozytenkapitels.

Fr. PD Dr. rer. nat. Gerburg Stein für die Unterstützung bei der Messung des mitochondrialen Membranpotentials sowie bei Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts und der LDH-Freisetzung.

Carlos, Christopher, Helga, Ingo, Kirsten, Markus, Stephan für die gute Zusammenarbeit und Atmosphäre im Labor.

Meiner Mutter, die sich mit scharfem Auge und spitzem Stift auf die Jagd nach Kommafehlern und Stilblüten gemacht hat.

Meiner Familie, die mir mein Studium ermöglicht und mich immer in jeder Form unterstützt hat.

Nicht zuletzt Katrin für die Motivation und den Ausgleich, die sie mir zu geben weiß.

LEBENS LAUF

Andreas Rothbart

		geb. am 29.12.1973 in Böblingen als Sohn von Heidrun Rothbart und Dr. med. Hans-Joachim Rothbart	
Schulbildung	1980-1984	Grundschule Hinterweil, Sindelfingen	
	1984-1993	Gymnasium Unterrieden, Sindelfingen	
	05/1993	Abiturprüfung	
Zivildienst	1993-1995	Pflegedienst, Kreiskrankenhaus Böblingen	
Studium		Eberhard-Karls-Universität Tübingen Université Victor Segalen Bordeaux (2000-2001)	
	1995-1996	Rechtswissenschaft	
	1996-1999	Diplom-Sportwissenschaft (Vordiplom 08/1998)	
	1996-2003	Humanmedizin	
	03/1998	Ärztliche Vorprüfung	
	03/1999	1. Teil der Ärztlichen Prüfung	
	03/2002	2. Teil der Ärztlichen Prüfung	
	13.05.2003	3. Teil der Ärztlichen Prüfung	
	Forschung	1999-2000	Abteilung für Molekulare Gastroenterologie, Innere Medizin I, Universitätsklinikum Tübingen Stipendiat des Graduiertenkollegs für Zellbiologie in der Medizin
		2003	Fertigstellung der Promotion
Ausland	2000-2001	Université Victor Segalen Bordeaux/Frankreich, Erasmus-Stipendium	
	04-08/2002	PJ-Tertial Chirurgie, Bordeaux/Frankreich	
	11/2002	Boston Medical Center, Boston University/USA, <i>rotation in diagnostic radiology</i>	
	12/02-01/2003	Universidad Nacional de San Antonio Abad, Cusco/Peru, Hospital de Apoyo, Innere Medizin	
Berufstätigkeit	04/-09/2004	Assistenzarzt, Chirurgie, Hôpital de la Providence, Neuchâtel/Schweiz	
	10/2004-03/2006	Assistenzarzt, Chirurgie, Hôpital Cadolles-Pourtalès, Neuchâtel/Schweiz	
