



Dissertation der Fakultät für Biologie  
Ludwig-Maximilians-Universität, München

3.7.2003

---

**Evolution des programmierten Zelltods:  
Biochemische und immunhistochemische  
Untersuchungen an Caspasen in Hydra**

---

**Nikola Schmidt**

Department Biologie II

Institut für Zoologie

Abt. Zell- und Entwicklungsbiologie

eingereicht am: 3.7.2003

Tag der mündlichen Prüfung: 8.8.2003

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Charles N. David

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

MEINEN ELTERN UND MEINER GROßTANTE IN LIEBE UND DANKBARKEIT

---

**Erklärung:**

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

München, Juli 2003

Nikola Schmidt

---

## Abkürzungen

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1	Definition und Funktion des programmierten Zelltods und seine Steuerung durch Caspasen .....	7
1.2	Hydra: Programmierter Zelltod und Caspasen im einfachen Vielzeller .....	10
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
2.1	Molekularbiologische Materialien .....	14
2.1.1	<i>E. coli</i> -Stämme .....	14
2.1.2	Plasmide .....	14
2.1.3	Inserts .....	14
2.1.4	Primer .....	15
2.1.5	Klonierungsprodukte .....	16
2.1.6	Enzyme .....	17
2.1.7	DNA-Marker .....	17
2.1.8	Kits .....	17
2.2	Materialien zur Proteincharakterisierung .....	18
2.2.1	Antikörper .....	18
2.2.2	Caspase-Substrate .....	18
2.2.3	Inhibitoren .....	19
2.2.4	Protein-Marker .....	19
2.2.5	Sonstige Materialien .....	19
2.3	Lösungen und Puffer .....	20
2.3.1	Medien .....	20
2.3.2	Gele .....	21

---

<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.4.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	26
2.4.2	DNA-Präparation.....	27
2.4.3	PCR .....	27
2.4.4	Restriktionsspaltung und DNA-Ligation.....	28
2.4.5	Transformation.....	29
2.4.6	Mutation des aktiven Zentrums der rekombinanten Caspasen 3A, 3B und 3B* .....	30
2.4.7	Screen von präparierter cDNA .....	31
<b>2.5</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>32</b>
2.5.1	SDS-PAGE und Western-Blot .....	32
2.5.2	Proteinmengenbestimmung mit Amidoschwarz.....	33
2.5.3	Coomassie-Färbung von Proteingelen.....	33
2.5.4	Expression der rekombinanten Caspasen.....	34
2.5.5	Reinigung rekombinanter Caspasen .....	34
2.5.6	Herstellung der Antikörper anti-3A und anti-3B.....	35
2.5.7	Sequenzierung.....	36
2.5.8	GST-Pulldown.....	37
2.5.9	Aktivitätsassays .....	38
2.5.10	Immunfluoreszenz .....	40
<b>2.6</b>	<b>Experimente an Hydra .....</b>	<b>42</b>
2.6.1	Induktion von Apoptose mit Colchizin.....	42
2.6.2	Herstellung von Hydraextrakt durch Zerspritzen, Einfrieren und Sonifizieren.....	42
2.6.3	Zellfraktionierung von Hydra .....	42
2.6.4	Inkubation der rekombinanter Caspasen 3B, 3B <sup>M</sup> und 3B* in apoptotischen Hydraextrakt .....	44
2.6.5	Affinitätsreinigung von Caspase 3B* .....	44

---

### **3. ERGEBNISSE 45**

<b>3.1</b>	<b>Rekombinante Hydra-Caspasen 3A, 3B und 3B* .....</b>	<b>45</b>
3.1.1	Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen Caspase 3A und 3B.....	45
3.1.2	Enzymatische Eigenschaften von Caspase 3A in <i>E. coli</i> .....	50
3.1.2.1	Autokatalyse von rekombinanter Caspase 3A.....	50
3.1.2.2	Enzymatische Aktivität von rekombinanter Caspase 3A .....	54
3.1.2.3	Prozessierung und Aktivität von Caspase 3A ohne Prodomäne.....	58
3.1.3	Enzymatische Eigenschaften der Caspasen 3B und 3B* in <i>E. coli</i> .....	60
3.1.3.1	Eine neue DNA-Sequenz für Caspase 3B: Caspase 3B*.....	60
3.1.3.2	Expression der Caspasen 3B und 3B* in <i>E. coli</i> .....	62
3.1.3.3	Enzymatische Aktivität der rekombinanten Caspasen 3B und 3B* .....	65
3.1.3.4	Prozessierung der rekombinanten Caspasen 3B und 3B* in apoptotischen Hydra-Extrakt.....	70
3.1.4	Interaktion zwischen den rekombinanten Caspasen 3A und 3B.....	75
<b>3.2</b>	<b>Hydra-Caspasen 3A und 3B* in vivo .....</b>	<b>78</b>
3.2.1	Caspase 3A in vivo.....	78
3.2.1.1	Lokalisation und Aktivität von Caspase 3A .....	78
3.2.1.2	Lokalisation und Aktivität von Caspase 3A in apoptotischen Hydren .....	86

3.2.2	Caspase 3B* in vivo.....	89
3.2.2.1	Apoptose-induzierte Caspase-Aktivität in Hydra-Cytoplasma .....	89
3.2.2.2	Active-site-Markierung der Caspase im Cytoplasma von apoptotischen Hydren.....	92
3.2.2.3	Affinitätsreinigung von Caspase 3B* .....	96
3.2.2.4	Lokalisation von Caspase 3B* in vivo .....	99
3.2.2.5	Aktivierung und Translokation von Caspase 3B* bei Apoptose .....	103
 <b>4. DISKUSSION</b>		<b>107</b>
<hr/>		
<b>4.1</b>	<b>Die Mitochondriale Lokalisation von Caspasen .....</b>	<b>107</b>
4.1.1	Die mitochondriale Lokalisation der Hydra-Caspasen.....	107
4.1.2	Die mitochondriale Lokalisation anderer Caspasen .....	109
<b>4.2</b>	<b>Die Rolle der Caspase-Prodomäne.....</b>	<b>111</b>
4.2.1	Keine Prozessierung der Hydra-Caspasen zwischen Prodomäne und großer Untereinheit .....	111
4.2.2	Die Funktion der Caspase-Prodomäne.....	113
<b>4.3</b>	<b>Translokation und Aktivierung von Caspase 3B* bei Apoptose.....</b>	<b>115</b>
<b>4.4</b>	<b>Die Evolution von Caspasen als mitochondriale Enzyme.....</b>	<b>117</b>
 <b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>		<b>119</b>
<hr/>		

**6. LITERATUR 122**

---

**7. ANHANG 127**

---

**7.1 DNA-Sequenzen.....127**

**7.2 Aminosäuresequenzen.....128**

**Lebenslauf**

**Danksagung**

## ABKÜRZUNGEN

<b>AcDEVD-amc</b>	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-amido-4-methylkumarin
<b>AcDEVD-CHO</b>	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aldehyd
<b>amp</b>	Ampicillin
<b>Aps</b>	Ammoniumpersulfat
<b>AS</b>	Aminosäuren
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>Caspase 3A<sup>M</sup></b>	rekombinante <i>Hydra vulgaris</i> Caspase 3A Mutante (Cys211->Ser211)
<b>Caspase 3B<sup>M</sup> bzw. 3B*<sup>M</sup></b>	rekombinante <i>Hydra vulgaris</i> Caspase 3B bzw. 3B* Mutante (Cys201->Ser201)
<b>Chaps</b>	3-((3-Chloramidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DANN</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
<b>DTT</b>	Dithiotreitol
<b>ECL</b>	Enhanced Chemiluminiszenz
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylen-Diamin-Tetraacetat Dinatriumsalz
<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid
<b>FITC-VAD-fmk</b>	Fluorescein Isothiocyanat-Val-Ala-Asp-Fluoromethylketon
<b>GST-</b>	aminoterimanler Glutathion-S-Transferase-Tag
<b>kDa bzw. kD</b>	kilo Dalton
<b>L</b>	large subunit, große Untereinheit
<b>-myc-(His)<sub>6</sub></b>	carboxyterminaler Myc-sechsfacher Histidin-Tag
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>P oder PD</b>	Prodomäne
<b>PAA</b>	Polyacrylamid
<b>ΔPDCasp3A-myc</b>	myc-(His) <sub>6</sub> -getaggte Caspase 3A ohne Prodomäne, expr. in <i>E. coli</i>
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>Upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>S</b>	small unit, kleine Untereinheit
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>TAE</b>	Tris-Acetat EDTA
<b>TBS</b>	Tris Buffered Saline
<b>Temed</b>	Tetramethyldiamin
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>ÜK</b>	Übernachtkultur
<b>zVAD-fmk</b>	N-Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketon

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Definition und Funktion des programmierten Zelltods und seine Steuerung durch Caspasen

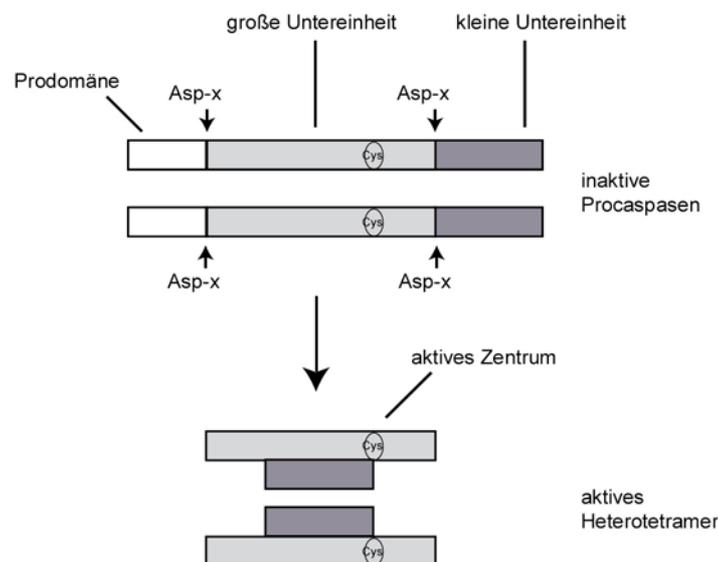
Der programmierte Zelltod oder Apoptose beschreibt ein Programm, das aktiv durch zelluläre Faktoren geregelt und gesteuert wird und letzten Endes zum Absterben der Zelle führt. Es wurde gezeigt, dass Apoptose eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung spielt. Das Programm ist dabei an Formen bestimmter Körperstrukturen und am Entfernen überflüssiger Zellen beteiligt (Jacobson *et al.*, 1997). Im adulten Organismus wirkt der programmierte Zelltod an der Regulation der Zellzahl mit und steuert außerdem die Entfernung von geschädigten oder fehlerhaften Zellen.

Eine sterbende Zelle zeigt charakteristische, morphologische Merkmale: Dazu gehören die Kondensation der DNA, der Kernzerfall und das Abschnüren von Zellmembranbläschen. Dabei entstehen sogenannte apoptotische Körperchen (Kerr *et al.*, 1974, Martin *et al.*, 1994, Wyllie *et al.*, 1980). Im Endstadium werden die Körperchen von Nachbarzellen phagozytiert.

Es gibt eine Gruppe von Enzymen, die bei Kontrolle und Steuerung des Zelltodprogramms eine Schlüsselrolle einnehmen: Caspasen. Es handelt sich um **Cystein-Proteasen**, die ihr Substrat spezifisch nach einem **Aspartatrest** schneiden. Caspasen wurden sowohl in Hydra, als auch in *C. elegans*, Drosophila und Säugern identifiziert (Meier *et al.*, 2000, Nicholson und Thornberry, 1997). Im Menschen sind bis jetzt 11 Caspasen bekannt (Denault und Salvesen, 2002).

Caspasen werden als inaktive Proenzyme exprimiert, die sich aus einer N-terminalen Prodomäne, einer großen und einer kleinen Untereinheit zusammensetzen. Im folgenden wird die Prodomäne oft als „P“, die große Untereinheit als „L“ (large subunit) und die kleine Untereinheit als „S“ (small subunit) bezeichnet. Das Proenzym wird „PLS“ genannt. Die meisten Procaspasen befinden sich im Cytoplasma. Es wurde jedoch gezeigt, dass auch einige Caspasen in den Mitochondrien lokalisiert sind (u.a.: Costantini *et al.*, 2002, Krebs *et al.*, 2000, Mancini *et al.*, 1998, Qin *et al.*, 2001, Samali *et al.*, 1998, Susin *et al.*, 1999).

Bei Apoptose wird das Proenzym durch Selbstprozessierung oder durch andere Caspasen aktiviert. Dabei wird die Prodomäne proteolytisch abgespalten und große und kleine Untereinheit werden getrennt (Abb. 1).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Aufbaus und der Aktivierung von Procaspasen (nach: Thornberry und Lazebnik, 1998)

Die Prozessierung erfolgt in beiden Fällen an spezifischen, konservierten Schnittstellen. Diese setzen sich aus vier Aminosäuren an der aminoterminalen Seite der Schnittstelle zusammen, wobei die Aminosäure unmittelbar vor der Schnittstelle immer ein Aspartatrest ist

(Nicholson und Thornberry, 1997). Aktive Caspasen bilden ein Heterotetramer aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten. Das aktive, substratbindende Zentrum besteht aus zwei kurzen, konservierten Aminosäuresequenzen, die sich in der großen Untereinheit befinden. Das Caspase-Substrat wird dabei vorübergehend kovalent an einen Cysteinrest innerhalb dieses Zentrums gebunden. Darüber hinaus tragen ein Histidin- und ein Glycinrest zur Stabilisierung der Substratbindung bei (Nicholson und Thornberry, 1997).

In der Literatur werden Caspasen in verschiedene Gruppen eingeteilt: Initiator- und Effektor-Caspasen und Cytokin-Aktivatoren (Denault und Salvesen, 2002). Die Initiator-Caspasen (z. B. humane Caspase-8, -9, -10) sind an der Initiation des Zelltodprogramms beteiligt und werden durch extrazelluläre Signale oder zellulären Stress aktiviert. Sie kontrollieren und regulieren den Beginn der Apoptose und werden autokatalytisch aktiviert. Die bevorzugte Schnittstelle dieser Caspasen ist (I/VL)ExD. Die lange Prodomäne von Initiator-Caspasen enthält bestimmte Domänen, die eine Interaktion mit Rezeptoren, Kofaktoren oder anderen „downstream“ Caspasen ermöglichen. Die Prodomäne von Caspase-9 besitzt zum Beispiel eine CARD-Domäne, die mit dem Kofaktor Apaf-1 interagiert und so zur Aktivierung von Caspase-9 führt.

Effektor-Caspasen (z. B. humane Caspase-3, -7) haben eine kurze oder keine Prodomäne. Sie werden meist durch Initiator-Caspasen während einer späteren Phase der Apoptose aktiviert. Deren Aktivität führt zum typischen, apoptotischen Phänotyp. Substrate dieser Caspasen sind zelluläre Proteine, die an der Regulation des Zellzyklus, an der DNA-Reparatur oder am Erhalt der Zellstruktur beteiligt sind (Nicholson und Thornberry, 1997). Effektor-Caspasen schneiden spezifisch nach DExD.

Die Caspasen der dritten Gruppe, die Cytokin-Aktivatoren (z. B. humane Caspase-1, -4, -5) spielen während Apoptose keine wesentliche Rolle und sind hauptsächlich an Entzündungsprozessen beteiligt.

## 1.2 Hydra: Programmierter Zelltod und Caspasen im einfachen Vielzeller

Hydren aus dem Stamm der Cnidarier stehen als einfache Vielzeller an der phylogenetischen Basis der Metazoa. Die Zellen dieser Tiere schließen sich zu zwei Epithelschichten zusammen: Ekto- und Endoderm. Hinzu kommen pluripotente Stammzellen, welche proliferieren, sich vielfältig differenzieren und miteinander kommunizieren können. Hydren gehören damit in phylogenetischer Hinsicht zu den ersten gewebbildenden Vielzellern und bilden daher ein einfaches Modell, um Ursprung, Funktion und Regulation von Apoptose in Metazoa zu untersuchen. Auch Hydrzellen besitzen ein Zelltodprogramm. Apoptose wird bei der Wachstumsregulation, und der Oogenese in Hydra, sowie der Metamorphose von Hydractinia-Larven eingesetzt (Bosch und David, 1984, Honegger *et al.*, 1989, Seipp *et al.*, 2001). So zeigten Bosch und David, dass die Epithelzellzahl von Hydren bei Nahrungsmangel nicht zunimmt, die Proliferationsrate jedoch gleich bleibt. Überschüssige Zellen werden durch Apoptose entfernt und von Nachbarzellen phagozytiert. Die Zellzahl wird also in Hydra nicht nur durch Proliferationskontrolle, sondern auch durch die Regulation des Zelltodprogramms gesteuert.

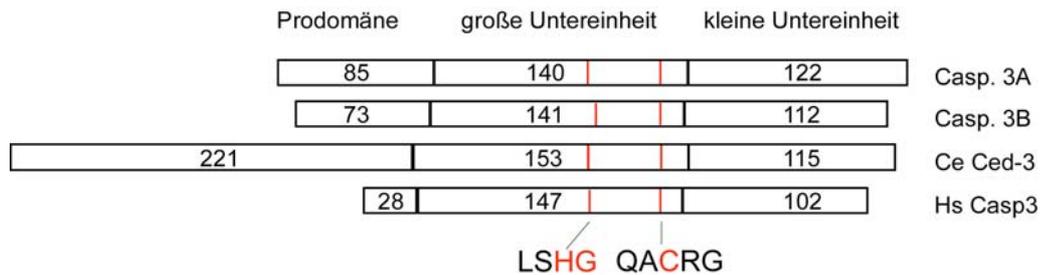
Die charakteristische Morphologie apoptotischer Zellen lässt sich auch in Hydra nachweisen (Cikala *et al.*, 1999). Durch Hitzeschock lässt sich in der Temperatur-sensitiven Mutante sf-1 Apoptose induzieren (Sugiyama und Fujisawa, 1978), was zum vermehrten Absterben der interstitiellen Zellen führt (Terada *et al.*, 1988).

Cikala et al. wiesen mit DNA-bindenden Farbstoff DAPI die typisch kondensierten und fragmentierten Zellkerne nach (Cikala et al., 1999). Apoptose lässt sich in Hydra auch durch die Behandlung mit Colchizin induzieren. Cikala et al. zeigten die Apoptose-typische DNA-Degradierung in Einzelfragmente bei Colchizin-behandelten Hydren auf einem Agarosegel (DNA-Leiter).

Nach heutigen Erkenntnissen scheint sich der programmierte Zelltod jedoch nicht zwangsläufig mit der Vielzelligkeit entwickelt zu haben. So existieren auch bei den Einzellern, Hefe und Dictyostelium apoptose-artige Mechanismen. Bei dem einzelligen Eukaryont *Leishmania major* wurde zum Beispiel nach Induktion von Apoptose mit Staurosporin morphologische Merkmale von Apoptose wie Zell-Schrumpfung oder DNA-Fragmentierung nachgewiesen (Arnoult et al., 2002). Ein Abbau von Chromatin wurde auch in Hefe nach Apoptose-Induktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gezeigt (Madeo et al., 2002). Selbst Bakterienzellen sollen bei bestimmten Bedingungen wie zum Beispiel bei viraler Infektion Selbstmord begehen (Ameisen, 1996). Der biochemische Mechanismus von Apoptose bei Bakterien, Einzellern, Hefe oder Schleimpilz unterscheidet sich jedoch von dem des programmierten Zelltods bei Vielzellern, da wesentliche, molekulare Elemente der Zelltodmaschinerie fehlen. So besitzt zum Beispiel keiner dieser Organismen Caspasen. Es wurden jedoch sogenannte Paracaspasen in Schleimpilzen und Metacaspasen in Protozoen und Pilzen identifiziert, deren Funktion noch unklar ist (Uren et al., 2000). Für *L. major* wurde die Aktivität einer Cystein-Protease während Apoptose nachgewiesen (Arnoult et al., 2002). Diese Proteasen werden jedoch als Caspase-Vorläufer betrachtet. Echte Caspasen sind erst mit der Vielzelligkeit entstanden. So wurden zwei Caspasen im Schwamm, der noch keine echte Gewebsbildung aufweist und somit zu den ursprünglichsten Vielzellern

zählt, identifiziert (Wiens *et al.*, 2003). Auch in Hydra gibt es zwei Caspase-Gene: Caspase 3A und 3B (Cikala *et al.*, 1999).

Caspasen 3A und 3B wurden durch PCR-Screen mit degenerierten Primern, die konservierte Stellen aus humaner Caspase-3 und der *C. elegans* Caspase Ced-3 enthielten, isoliert.



**Abb. 2:** Vergleich der Hydra-Caspasen 3A und 3B mit Ced-3 aus *C. elegans* und humaner Caspase-3 (Cikala *et al.*, 1999)

Analysiert man die Aminosäuresequenzen der Hydra-Caspasen anhand der konservierten Schnittstellen nach Aspartat stellt man fest, dass sie wie alle Caspasen aus einer N-terminalen Prodomäne, einer großen und einer kleinen Untereinheit bestehen (Abb. 2). Ebenso besitzen sie die konservierten Reste Cystein, Histidin und Glycin in der großen Untereinheit, welche zum aktiven Zentrum gehören (Cikala *et al.*, 1999). Im Zellextrakt von Hydra wurde außerdem nach Induktion von Apoptose Caspase-Aktivität nachgewiesen (Cikala *et al.*, 1999). Diese Aktivität ist spezifisch für DEVD und lässt sich mit Caspase-3-Inhibitor DEVD-CHO und dem universellen Caspase-Inhibitor zVAD-fmk hemmen.

Da Hydra der erste gewebbildende Vielzeller ist, in dem Caspasen identifiziert wurden, besteht nun die Möglichkeit bei Hydra den phylogenetischen Ursprung, die ursprüngliche Funktion und Aktivität von Caspasen zu untersuchen. Besteht ursprünglich ein Zusammenhang zwischen Apoptose und Caspasen? Wo sind diese Enzyme lokalisiert und wann werden sie aktiviert? Gibt es Ähnlichkeiten zu höher

entwickelten Vielzellern? Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte versucht werden, einige dieser Fragen zu klären.

Dafür wurden zunächst Antikörper gegen rekombinante Caspasen 3A und 3B hergestellt und die Aktivität und Spezifität der rekombinanten Caspasen untersucht.

Mit Hilfe der Antikörper wurde die Lokalisation der Caspasen in vivo geklärt. Außerdem wurde ein unterschiedliches Verhalten der Caspasen nach Induktion von Apoptose festgestellt und die Identität der von Cikala et al. gemessenen Caspase-Aktivität geklärt.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Molekularbiologische Materialien

#### 2.1.1 *E. coli*-Stämme

Als Ausgangsstamm diente der Stamm XL 1 blue MRF. Dieser enthielt das Plasmid pBluescript II SK (-) mit den inserierten Genen von Caspase 3A bzw. 3B bzw. 3B\*. Für alle folgenden Klonierungen und Versuche wurde der Stamm Electrocomp™ Top 10 von Invitrogen verwendet.

#### 2.1.2 Plasmide

##### **pBluescript II SK (-)**

M. Cikala et al. hatte die Gene von Caspasen 3A, 3B und 3B\* in den Vektor pBluescript II SK (-) kloniert

(Stratagene: [www.stratagene.com/vectors/selection/plasmid1.htm](http://www.stratagene.com/vectors/selection/plasmid1.htm)) (Cikala *et al.*, 1999).

##### **pTrcHis 2C**

Für die Expression von Caspasen mit C-terminalem myc-(His)6-Tag wurden die Caspasen mittels PCR mit den entsprechenden Primern aus dem Vektor pBluescript II SK (-) amplifiziert und über die Schnittstellen Nco I (5´) und EcoR I (3´) in den Vektor pTrcHis 2C kloniert

(Invitrogen: [www.invitrogen.com:80/content/sfs/vectors/ptrchis2\\_map.pdf](http://www.invitrogen.com:80/content/sfs/vectors/ptrchis2_map.pdf)).

##### **TopoTA und pGex1 T**

Für die Expression von Caspasen mit N-terminalem GST-Tag wurden die Caspasen mittels PCR mit den entsprechenden Primern aus dem Vektor pTrcHis 2C amplifiziert und zunächst in den TopoTA-Vektor (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen) kloniert. Von dort wurden sie mit BamH I (5´) und EcoR I (3´) ausgeschnitten und in pGex1T (Amersham) kloniert.

#### 2.1.3 Inserts

In die Vektoren wurden die Gene der Caspasen 3A bzw. 3B bzw. 3B\* Wildtyp bzw. Mutanten bzw. 3A ohne Prodomäne inseriert (Klonierungsprodukte siehe 2.1.5).

### 2.1.4 Primer

Name	Nukleotidsequenz
36exp3'	CATAGAATTCAAATCACCTTTAATTAGTAAC
36exp5'	GTAATACCATGGCAATGTCTAATGTTAATATTTATG
36mutsense	CCTAAAGTTTTTATTGTACAGGCATCCAGAGGGGAAAAAGATG
36mutantisense	CATCTTTTTCCCCTCTGGATGCCTGTACAATAAAAACTTTAGG
24exp3'	CATAGAATTCTACGGATTCCATAGGTTTCATC
24exp5'	GTAATACCATGGCAATGAATGAGGATGGGGTTTC
24mutsense	CCAAAATTATTTTTAATTCAAGCATCTCGAGGAACAGAATACATGG
24mutantisense	CCATGTATTCTGTTCTCGAGATGCTTGAATTAATAAATTTTGG
3' Casp24b_EcoRI	CCGGAATTCGGATTCCATAGGTTTCATC
5' Casp24b_NcoI	GTAATACCATGGCAAACCTTTTATGATACTAACACTTTTC
3' 24bmut	CCATGTATTTTGTTCCTCGAGATGCTTGAATTAATAAATTTTGG
5' 24bmut	CCAAAATTATTTTTAATTCAAGCATCTCGAGGAACAAAATACATGG
36expLS5'	GTAATACCATGGCATTATTATTACACATTAAGTACTGG
5' Bam3A pTrcHis	CGGGATCCATGTCTAATGTTAATATTTATG
5' Bam3B pTrcHis	CGGGATCCATGAATGAGGATGGGGTTTCC
3' XbaI 3A+B pTrcHis	GCTCTAGACGGCGCTATTCAGATCCTC

### 2.1.5 Klonierungsprodukte

Name	Vektor	5' Primer	3' Primer	5' cut	3' cut	Template
3A-myc	pTrcHis c	36exp5'	36exp3'	Nco I	EcoR I	3A in pBluescript II SK (-)
3A <sup>M</sup> -myc	pTrcHis c			Nco I	EcoR I	ger. Mutation von 3A-myc zu 3AC211S (Primer: 36mutsense + 36mutantisense)
3B-myc	pTrcHis c	24exp5'	24exp3'	Nco I	EcoR I	3B in pBluescript II SK (-)
3B <sup>M</sup> -myc	pTrcHis c			Nco I	EcoR I	ger. Mutation von 3B-myc zu 3BC201S (Primer: 24mutsense + 24mutantisense)
3B*-myc	pTrcHis c	24bexp5'	24bexp3'	Nco I	EcoR I	3B* in pBluescript II SK (-)
3B* <sup>M</sup> -myc	pTrcHis c			Nco I	EcoR I	ger. Mutation von 3B*-myc zu 3B*C201S (Primer: 3'24bmut + 5'24bmut)
ΔPDCasp3A-myc	pTrcHis c	36explS5'	36exp3'	Nco I	EcoR I	3A-myc
GST-3A	pGex1	5' Bam3A pTrcHis	36exp3'	Bam H I	EcoR I	3A-myc, Klonierung in Topo-Vektor mit 5' Bam3ApTrcHis + 3' XbaI 3A+B pTrcHisEcoR I
GST-3A <sup>M</sup>	pGex1	5' Bam3A pTrcHis	36exp3'	Bam H I	EcoR I	3A-myc, Klonierung in Topo-Vektor mit mit 5' Bam3ApTrcHis + 3' XbaI 3A+B pTrcHis Auschn. mit Bam H I+EcoR I
GST-3B	pGex1	5' Bam3B pTrcHis	36exp3'	Bam H I	EcoR I	3B-myc, Klonierung in Topo-Vektor mit 5' Bam3ApTrcHis + 3' XbaI 3A+B pTrcHis Auschn. mit Bam H I+EcoR I
GST-3B <sup>M</sup>	pGex1	5' Bam3A pTrcHis	36exp3'	Bam H I	EcoR I	3B-myc, Klonierung in Topo-Vektor mit 5' Bam3ApTrcHis + 3' XbaI 3A+B pTrcHis Auschn. mit Bam H I+EcoR I

## 2.1.6 Enzyme

### Restriktionsenzyme:

BamH I	New England Biolabs
EcoR I	New England Biolabs
Nco I	New England Biolabs
Xba I	New England Biolabs

### Sonstige:

Dpn I	Stratagene
PfuTurbo DNA-Polymerase	Stratagene
Taq DNA-Polymerase	Peqlab
T4 DNA-Ligase	Gibco BRL

## 2.1.7 DNA-Marker

Ladder Mix	MBI-Fermentas
------------	---------------

## 2.1.8 Kits

Plasmid Miniprep Kit	Peqlab
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen
Quik Change Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen

## 2.2 Materialien zur Proteincharakterisierung

### 2.2.1 Antikörper

#### Erstantikörper

Antikörper	Firma	Wirt	polykl./ monokl.	Verdünnung
anti-AAC	Dr. J. Herrmann, Adolf-Butenandt- Institut, München	Kaninchen	polyklonales Serum	1:100
anti-3A	Davids	Huhn	polyklonales Serum	1:500 (Immunf.) 1:5000 (Western Blot)
anti-3A	pab productions	Kaninchen	polyklonales Serum + gereinigte IgG)	1:100
anti-3B	pab productions	Kaninchen	polyklonales Serum + gereinigte IgG	1:1000
anti-FITC	M. Burghardt, Universität Potsdam	Maus	monoklonal	1:500
anti-GST	C. Smith, Dundee	Kaninchen	polyklonal	1:10.000
anti-myc	Invitrogen	Maus	monoklonal	1:5000

#### Zweitantikörper

Antikörper	Konjugat	Firma	Verdünnung
anti-Huhn	FITC	Sigma	1:160
anti-Huhn	Peroxidase	Sigma	1:15.000
anti-Kaninchen	Cy3	Amersham	1:500
anti-Kaninchen	FITC	Sigma	1:100
anti-Kaninchen	Peroxidase	Amersham	1:4000
anti-Maus	Peroxidase	Amersham	1:3000

### 2.2.2 Caspase-Substrate

AcDEVD-amc	10 mM in DMSO	Alexis
FITC-VAD-fmk	5 mM in DMSO	Promega
zEK(bio)D-aomc	100 µM in DMSO	Peptides International

### 2.2.3 Inhibitoren

#### Protease-Inhibitoren

Antipain	5 mg/ml in H <sub>2</sub> O	Roche
Calpain Inhibitor II	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O	Roche
Cocktail (Pepstatin A, Aprotinin, Leupeptin)	je 1 mg/ml in H <sub>2</sub> O	Sigma
Pefabloc SC	400 mM in DMSO	Roche

#### Caspase-Inhibitoren

AcDEVD-CHO	50 mM in DMSO	Alexis
AcYVAD-CHO	10 mM in DMSO	Alexis
zVAD-fmk	10 mM in DMSO	Alexis

### 2.2.4 Protein-Marker

SDS-PAGE Standard Marker, Low Range	Bio Rad
SDS-PAGE Standard Marker, Broad Range	Bio Rad

### 2.2.5 Sonstige Materialien

DEAE-Anionen-Austauscher-Säule	Amersham/Pharmacia
ECL Western blotting detection reagents	Amersham/Pharmacia
Glutathione Sepharose 4B	Pharmacia Biotech
Hybond ECL Nitrocellulose Membran	Amersham/Pharmacia
Hyperfilm ECL	Amersham/Pharmacia
Centricon YM 3	Milipore
SERVAPOR, Dialyse-Schlauch, 16 mm	SERVA
Sequi-Blot PVDF Membran (0,2 µm)	Bio Rad
Hiload 16/60 Superdex 200 Säule	Amersham/Pharmacia
Streptavidin	Molecular Probes
Streptavidin-Säule	Amersham/Pharmacia
Xpress System, Protein Purification Kit	Invitrogen

## 2.3 Lösungen und Puffer

### 2.3.1 Medien

Medium	Zusammensetzung
Hydra-Medium	0,1 mM KCl 1 mM NaCl 0,1 mM MgSO <sub>4</sub> 1 mM Tris 1 mM CaCl <sub>2</sub>
LB-Medium	10 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Trypton mit H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen, autoklavieren
LB <sub>amp</sub> -Medium	LB-Medium autoklavieren, steriles Ampicillin (100 µg/ml) zugeben
LB Agar	LB Medium mit 20 g/l Agar autoklavieren
NZY Medium	5 g NaCl 2g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 5 g Hefeextrakt 10 g Trypton/Pepton aus Casein mit H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen pH 7,5, autoklavieren

### 2.3.2 Gele

<b>Gel</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Agarosegel (1 %)	1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer
SDS-Sammelgel	3,17 ml H <sub>2</sub> O 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 50 µl 10 % (w/v) SDS 0,5 ml Acrylamid/Bis (40 % Stock) 25 µl 10 % Aps 5 µl Temed ergibt 5 ml für 2 Gele
SDS-Trenngel (12 % PAA)	4,35 ml H <sub>2</sub> O 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 100 µl 10 % (w/v) SDS 3 ml Acrylamid/Bis 50 µl 10 % Aps 5 µl Temed ergibt 10 ml für 2 Gele
SDS-Trenngel (15 % PAA)	3,6 ml H <sub>2</sub> O 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 100 µl 10 % (w/v) SDS 3,75 ml Acrylamid/Bis 50 µl 10 % Aps 5 µl Temed ergibt 10 ml für 2 Gele

**Puffer**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Amidoschwarzlösung	25 mg/100 ml Amidoschwarz 90 % Methanol 10 % Essigsäure
Amidoschwarz-Waschlösung	90 % Methanol 10 % Essigsäure
Assaypuffer (10x)	250 mM HEPES, pH 7,5 1 % (w/v) Chaps 100 mM DTT 10 % (v/v) Inhibitor-Cocktail 10 % (v/v) Pefabloc
Blocklösung (Immunfärbung)	0,5% Triton/PBS
Blockpuffer (GST-Pulldown)	20 mM HEPES, pH 7,4 100 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 % Nonidet-P-40 1-10 mM DTT
Blockpuffer (Western-Blot)	5 % Milchpulver in TBS-Tween
Blottingpuffer (10x)	30 g Tris 144 g Glycin auf 1 l H <sub>2</sub> O auffüllen
Blottingpuffer (1x)	100 ml Blotting-Puffer (10x) 200 ml Methanol auf 1 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Caspasepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,5 mM EGTA 0,5 mM Saccharose 10 mM DTT 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 % (v/v) Inhibitor-Cocktail 1 % (v/v) Pefabloc
Coomassie-Entfärbelösung	100 ml Essigsäure 75 ml Methanol 825 ml H <sub>2</sub> O
Coomassie-Färbelösung	0,5 g Coomassie Blue R250 25 ml Essigsäure 125 ml Methanol

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Coomassie-Fixierlösung	100 ml Essigsäure 500 ml Methanol 400 ml H <sub>2</sub> O
Cytoplasmapuffer	25 mM HEPES, pH 7,5 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EGTA 10 mM DTT 1 % (v/v) Inhibitor-Cocktail 1 % (v/v) Pefabloc
Denat. Bindungspuffer	8 M Harnstoff 20 mM NaPO <sub>4</sub> 500 mM NaCl pH 7,8, steril filtrieren
Denat. Elutionspuffer	8 M Harnstoff 20 mM NaPO <sub>4</sub> 500 mM NaCl pH 4,0, steril filtrieren
Denat. Waschpuffer	8 M Harnstoff 20 mM NaPO <sub>4</sub> 500 mM NaCl pH 6,0 und pH 5,3, steril filtrieren
Dialysepuffer	0,5 M NaCl 20 mM NaPO <sub>4</sub> Harnstoff: 5 M, 3 M, 1 M, 0,5 M, 0 M
Dissoziationsmedium	3,6 mM KCl 6 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 1,2 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 6 mM NaCitrat x 2 H <sub>2</sub> O 6 mM Natriumpyruvat 6 mM Glucose 12,5 mM TES ad 800 ml H <sub>2</sub> O pH 6,9
DNA-Auftragungspuffer	30 % (v/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylenblau
Ethidiumbromid-Färbelösung	1 µg/ml EthBr in TAE-Puffer
Fixierlösung (Immunfärbungen)	2 % Paraformaldehyd in 1 x PBS für Immunfärbung

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
FPLC-Elutionspuffer für GST-Fusionsproteine	10 mM reduziertes Glutathion 50 mM Tris-HCl pH 8,0
FPLC-Startpuffer für GST-Fusionsproteine	1 x PBS: 2,7 mM KCl 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 140 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,3
FPLC-Elutionspuffer für His-Fusionsproteine	500 mM Imidazol 500 mM NaCl 20 mM NaPO <sub>4</sub> pH 7,4
FPLC-Startpuffer für His-Fusionsproteine	500 mM NaCl 20 mM NaPO <sub>4</sub> pH 7,4
Guanidinium Lysis Puffer	6 M Guanidinium Hydrochlorid 20 mM NaPO <sub>4</sub> 500 mM NaCl
Kernaufschlußpuffer	50 mM Tris-Hcl 5 mM EGTA 0,5 M NaCl 1 % NP 40
Mitochondrienpuffer	1 mM EGTA 250 mM Saccharose 5 mM Tris, pH 7,4 1 % (v/v) Inhibitor-Cocktail 1 % (v/v) Pefabloc
25 x PBS für Immunfärbungen	3 M NaCl 1,25 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,3 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O in 1 l H <sub>2</sub> O pH 7,4
PBS für GST-Pulldown	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Permeabilisierungslösung (Immunfärbung)	0,5% Triton/PBS
Proteinauftragspuffer (2x)	40 µl 500 mM EDTA 1 ml β-Mercaptoethanol 2 ml Glycerol 1,75 ml dest. H <sub>2</sub> O 4 ml 10 % SDS 1,25 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8 einige Körnchen Bromphenolblau
Proteinauftragspuffer (4x)	1,6 ml β-Mercaptoethanol 3,2 ml Glycerol 120 µl H <sub>2</sub> O 2,56 ml 25% SDS 1 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8 320 µl 5% Bromphenolblaulösung
PVDF-Proteinauftragspuffer (5x)	0,5 M Saccharose 15 % SDS 312,5 mM Tris 10 mM Na <sub>2</sub> EDTA zum Lösen leicht erhitzen, pH 6,9 mit HCl
PVDF-Proteinauftragspuffer (2x)	zu 1 ml PVDF-Proteinauftragspuffer (5x): 1,5 ml H <sub>2</sub> O 50 µl β-Mercaptoethanol einige Körnchen Bromphenolblau
PVDF-Coomassie-Färbelösung	0,025 % Coomassie Blau in 40 % Methanol
PVDF-Coomassie- Entfärbelösung	50 % Methanol
SDS PAGE-Laufpuffer (5x)	9 g Tris-Base 43,2 g Glycin 3 g SDS zu 600 ml deion H <sub>2</sub> O pH 8,3
TAE-Puffer	40 mM Tris/Acetat, pH 8,3 1 mM EDTA
1xTBS	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
1xTBS-Tween	0,05 % Tween 20 in 1xTBS
Transformationspuffer I	30 mM Kaliumacetat 100 mM RbCl <sub>2</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin 50 mM MnCl <sub>2</sub> pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure auf 100 ml auffüllen, steril filtrieren
Transformationspuffer II	10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin pH 6,5 mit NaOH, steril filtrieren

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Kultivierung von *E. coli*

#### Kultivierung

*E. coli*-Stämme wurden entweder auf LBamp-Platten unter aeroben Bedingungen bei 37 °C oder als Schüttelkulturen bei 37 °C, 200 Upm kultiviert. Übernachtskulturen wurden aus bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen bzw. direkt von Transformationsplatten angeimpft.

#### Herstellung von Glycerinkulturen

- Bakterienkolonie von Transformationsplatte picken
- in 3 ml LBamp-Medium animpfen und ü. N. bei 37 °C schütteln
- mit 50 µl der Übernachtskultur 1 ml frisches LBamp-Medium beimpfen und 6 h bei 37 °C schütteln
- 500 µl 45 % (v/v) Glycerin zugeben und mischen
- Glycerinkulturen bei -80 °C lagern

## 2.4.2 DNA-Präparation

### Präparation von Plasmid-DNA und Konzentrationsbestimmung

Mini-Präparationen von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mit einem Kit (Peqlab) nach Protokoll durchgeführt. Die Konzentration von DNA wurde in einem DNA-Kalkulator (Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

### Agarose-Gelelektrophorese

- 0,8 –1 % Agarosegel gießen
- zu 10 µl DNA-Probe 2 µl DNA-Auftragspuffer
- Gel in Gelkammer, TAE-Puffer als Laufpuffer einfüllen
- Marker (2,5 µl) und Proben auftragen
- ca. 60 min bei 60 V laufen lassen
- Gel 15 min färben in EthBr-Färbelösung
- 5 min mit Wasser waschen
- unter UV-Licht fotografieren

### DNA-Fällung für Sequenzierung

- Salzkonzentration von 1-2 µg DNA mit 1/2 Vol Ammoniumacetat (7,5 M) auf 2-2,5 M Endkonzentration angleichen
- Zugabe von 0,6-0,7 Vol Isopropanol (RT) und mischen
- 5 min bei RT inkubieren
- 15-30 min bei 10.000-15.000 g, 4 °C zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen
- DNA Pellet mit 1-10 ml 70 % Ethanol (RT) waschen
- 5-15 min bei 10.000-15.000 g, 4 °C zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen
- Pellet 5-20 min lufttrocknen

## 2.4.3 PCR

Ein typischer Ansatz (50 µl) setzt sich wie folgt zusammen:

0,1-1 µg/100 µl	DNA-Template
5 µl	10 x Taq PCR Puffer
1 µl	dNTP-Mix (jeweils 10 mM)
5 µl	3´ Primer
5 µl	5´ Primer
31,7 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub>
0,3 µl	Taq-Polymerase (5 U/ µl)

**PCR-Bedingungen**

1. Denaturierung	5 min	95 °C	1x
Denaturierung	1 min	95 °C	25-30x
Hybridisierung	1 min	48-65 °C	
Elongation	1-3 min	72 °C	
letzte Elongation	5 min	72 °C	1x

Das PCR-Produkt wurde anschließend in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Sollten die PCR-Fragmente anschließend weiter verwendet werden, so wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt, die betreffende Bande ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) isoliert.

**2.4.4 Restriktionsspaltung und DNA-Ligation****Restriktionsspaltung**

Ein typischer Restriktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

- 1 µg DNA
- 1-2 Units Restriktionsenzym/µg DNA
- auf 10 bzw. 20 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> auffüllen
- Ansatz für mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubieren

**DNA-Ligation**

Für die Ligation von Vektor und Insert wurde folgendes Protokoll verwendet:

- 40 ng Vektor
- achtfache molare Menge an DNA-Insert
- 0,005-1 Unit T4 DNA-Ligase
- 1/10 Vol 10x Ligations-Puffer
- auf 20 µl oder 50 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> auffüllen
- über Nacht bei 16 °C inkubieren
- zur Kontrolle einen Ansatz ohne Insert pipettieren

## **Transformation**

### **Erzeugung transformationskompetenter Bakterien mit Rubidiumchlorid**

- Animpfen einer ÜN-Kultur von Top 10 in 10 ml LBamp-Medium
- bei 37 °C über Nacht schütteln
- 5 ml der ÜN-Kultur auf 100 ml LBamp-Medium
- schütteln bei 37 °C bis eine OD<sub>550</sub> von 0,5 erreicht ist
- Zellen 5 min auf Eis inkubieren
- Zellen 5 min bei 6000 Upm, 4 °C pelletieren
- in 2/5 Vol Transformationspuffer (eiskalt) resuspendieren (ca. 40 ml)
- Zellen 5 min auf Eis inkubieren
- Zellen 5 min bei 6000 Upm, 4 °C pelletieren
- in 1/25 Vol Transformationspuffer II (eiskalt) resuspendieren (ca. 4 ml)
- Zellen 15 min auf Eis inkubieren
- in 100 µl Portionen in vorgekühlten Eppis sofort bei -80 °C einfrieren

### **Transformation eines Vektors**

- 100 µl kompetente Zellen auf 12 ng DNA bzw. H<sub>2</sub>O (Kontrolle)
- 30 min auf Eis
- 1,5 min Hitzeschock im 42 °C Wasserbad
- 5 min auf Eis
- 0,8 ml LB-Medium dazu
- 30 min bei 37 °C schütteln
- auf LBamp-Platten ausplattieren, je unterschiedliche Mengen, z. B. 50 µl und 200 µl
- über Nacht bei 37 °C inkubieren
- Auswertung: Klone zählen, neue ÜN-Kultur der Klone, Minipräparation, Restriktionsverdau der präparierten Plasmide, Kontrolle der Fragmentgrößen im Agarosegel

## 2.4.5 Mutation des aktiven Zentrums der rekombinanten Caspasen 3A, 3B und 3B\*

Die Mutanten 3A<sup>M</sup>-myc, 3B<sup>M</sup>-myc und 3B<sup>\*M</sup>-myc wurden mit Hilfe des Kits QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (Quiagen) hergestellt. Dabei wird der im aktiven Zentrum befindliche Cysteinrest 211 von 3A bzw. 201 von 3B und 3B\* zu Serin mutiert. Die einzelnen Arbeitsschritte waren folgende:

### PCR

	3A <sup>M</sup> -myc	3B <sup>M</sup> -myc	3B <sup>*M</sup> -myc
DNA-Template	0,4 µl	1 µl	1 µl
10x Puffer	5 µl	5 µl	5 µl
dNTPs	1 µl	1 µl	1 µl
Primer: 36mutsense	2 µl		
Primer: 36mutantisense	2 µl		
Primer: 24mutsense		1,8 µl	
Primer: 24mutantisense		1,8 µl	
Primer: 3'24bmut			1,8 µl
Primer: 5'24bmut			1,8 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub>	38,6 µl	38,4 µl	38,4 µl
PfuTurbo Polymerase	1 µl	1 µl	1 µl

Dabei:

- DNA-Template aus Miniprep von 3A-myc bzw. 3B-myc bzw. 3B\*-myc, erforderliche Konzentration: 5-50 ng
- 1 µl PfuTurbo DNA-Polymerase entspricht 2,5 U
- erforderliche Primermenge: 125 ng

### PCR-Bedingungen

1. Denaturierung	30 sec	95 °C	1x
Denaturierung	30 sec	95 °C	
Hybridisierung	1 min	55 °C	12x
Elongation	11 min	68 °C	

### **Verdau des DNA-Templates**

- 1 µl Dpn I Restriktionsenzym (10 U/µl) zu jedem Reaktionsansatz
- vorsichtig mischen, in einer Mikrozentrifuge für 1 min abzentrifugieren
- sofort für 1 h bei 37 °C inkubieren
- Transformation des mutierten Plasmids
- 50 µl kompetente Top 10 Bakterien in vorgekühltes Falcon-Tube
- 1 ml der Dpn I behandelten DNA zu den Zellen, vorsichtig mischen
- 30 min auf Eis inkubieren
- 45 sec bei 42 °C erhitzen
- auf Eis für 2 min
- Zugabe von 42 °C warmen NZY\* und Inkubation der Transformationsreaktion bei 225-250 Upm, 37 °C für 1 h
- je 50 µl und 200 µl auf LBamp-Platten ausplattieren
- über Nacht bei 37 °C inkubieren

Die N-terminal GST-getaggten Mutanten GST-3A und GST-3B wurden durch Umklonierung des mutierten Inserts 3A<sup>M</sup> bzw. 3B<sup>M</sup> aus dem Vektor pTrcHis c in den Vektor pGex 1 T hergestellt.

### **2.4.6 Screen von präparierter cDNA**

Der Screen von präparierter cDNA, der zum Auffinden des Gens von Caspase 3B\* führte, wurde freundlicherweise von Frau Beate Stiening nach dem üblichen Protokoll durchgeführt.

## 2.5 Biochemische Methoden

### 2.5.1 SDS-PAGE und Western-Blot

#### SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

- Proteinprobe 1:1 in Proteinauftragspuffer (2x) lösen, Zellpellets von 1 ml Kultur in 100 µl Proteinauftragspuffer (2x) lösen
- Gelkammer zusammenbauen
- Trenngel gießen (12 % oder 15 %), mit Isopropanol überschichten, ca. 20 min polymerisieren lassen, Isopropanol abgießen
- Sammelgel gießen, Kamm einsetzen, polymerisieren lassen, Kämme ziehen und Taschen ausspülen
- Gelkammern mit 1xSDS-PAGE-Laufpuffer füllen
- Proteinproben vor dem Auftragen 4 min bei 99 °C kochen
- Proben auftragen: 3 µl Protein-Marker, 10-20 µl Probe
- Auftrennung bei 60-140 V

#### Western-Blot

- Es wurde mit der Mini-PROTEAN II Cell-System von BIO-RAD gearbeitet.
- 4 Whatman-Papiere und 1 Membran auf eine Größe von ca. 6 x 9 cm zuschneiden
- Whatman-Papiere und Schwämmchen in Blottingpuffer (1x) tränken
- in folgender Reihenfolge auf schwarze Hälfte der Blot-Klemme legen:
  - Schwämmchen
  - 2 Whatman-Papiere
  - Gel
  - Nitrocellulose-Membran
  - 2 Whatman-Papiere
  - Schwämmchen
- Luftblasen mit Glaspipette ausrollen
- geschlossene Klemme in Halter und diesen in Blotting-Kammer einhängen (Membran Richtung Pluspol)
- Kammer mit Blottingpuffer füllen
- Transfer erfolgt bei 60 mA über Nacht

### **Proteinnachweis mit Antikörpern**

- Membran entnehmen und mit Ponceau-Rot färben, Qualität des Blots kontrollieren
- Ponceau mit Wasser abwaschen
- Membran für 1 h in Blockpuffer schütteln
- Membran für 1 h mit Erstantikörper verdünnt in Blockpuffer inkubieren
- 3 x 10 min in TBS-T waschen
- Membran für 1 h mit Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper, verdünnt in Blockpuffer inkubieren
- 3 x 10 min in TBS-T waschen
- 1 x 10 min in TBS waschen
- Membran in Schälchen: je 2 ml ECL 1- und ECL 2-Lösung auf Blot und 1 min wirken lassen
- Membran in Klarsichthülle, Film auflegen, beides in Filmkassette und 10 sec-1h bei Dunkelheit belichten
- Film in Entwicklermaschine entwickeln

### **2.5.2 Proteinmengenbestimmung mit Amidoschwarz**

- BSA-Verdünnungen (2,5 µg/µl – 100 µg/µl) für Eichkurve erstellen
- je 10 µl Proteinprobe (unverdünnt und 1:10) bzw. BSA-Verdünnung mit 500 µl Amidoschwarz mischen
- 5 min bei RT inkubieren
- 4 min bei RT, 14.000 Upm zentrifugieren
- 2-3 x Pellet mit 1 ml Amidoschwarz-Waschlösung waschen (vortexen, zentrifugieren, Überstand verwerfen)
- Pellet in 1 ml 0,1 M NaOH lösen
- Je 300 µl/Probe in Mikrotiterplatte
- OD messen bei 630 nm

### **2.5.3 Coomassie-Färbung von Proteingelen**

- SDS-Proben auftragen und SDS-Gelelektrophorese durchführen
- SDS-Gel 5 min in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> waschen
- 30 min in Coomassie-Färbelösung schütteln
- 10 min in Coomassie-Fixierlösung schütteln
- Gel in Coomassie-Entfärbelösung schütteln bis Banden gut sichtbar, Lösung dabei mehrmals wechseln
- Gel im Geltrockner bei 80 °C für 2 h trocknen

### 2.5.4 Expression der rekombinanten Caspasen

- Animpfen einer ÜN-Kultur einer einzelnen Top 10 E. coli Kolonie in 3-60 ml LBamp
- bei 37 °C über Nacht schütteln (200 Upm)
- am nächsten Tag 0,2 ml bzw. 60 ml der ÜN-Kultur auf 10 ml bzw. 2 l LBamp
- Kultur bei 37 °C, 200 Upm wachsen lassen, bis eine OD<sub>550</sub> von 0,5 erreicht ist
- 1 ml-Aliquot als t<sub>0</sub>-Wert abnehmen, 30 sec zentrifugieren, Überstand verwerfen und Pellet bei -20 °C einfrieren
- zur restlichen Kultur IPTG zugeben (Endkonzentration: 1 mM IPTG)
- Kultur 4 h bei 18 °C schütteln
- 1 ml-Aliquot als t<sub>4</sub>-Wert abnehmen
- Bakterien bei 4000 Upm für 15 min abzentrifugieren, bis zur Lyse bei -80 °C lagern

### 2.5.5 Reinigung rekombinanter Caspasen

#### Lyse der Bakterien

- Expression von myc-(His)<sub>6</sub>- oder GST-getaggtter Wildtyp Caspase bzw. Mutante Caspase 3A oder 3B oder 3B\* in 2 l Bakterienkultur
- Bakterienpellet in 10-30 ml Caspasepuffer ohne EGTA und DTT für myc-(His)<sub>6</sub>-getaggte Proteine bzw. in 10 -30 ml FPLC-Startpuffer für GST-Fusionsproteine suspendieren
- Bakterien mit French Press lysieren und bei 15.000 g für 15 min zentrifugieren
- Überstand abnehmen und Caspase unter nativen Bedingungen reinigen
- Pellet in 10 ml Guanidinium-Lysis-Puffer ohne EGTA und DTT für myc-(His)<sub>6</sub>-getaggte Proteine bzw. in 10 ml FPLC-Startpuffer für GST-Fusionsproteine resuspendieren und Caspase unter denaturierenden Bedingungen reinigen

#### Native Reinigung und Dialyse von myc-(His)<sub>6</sub>-getaggtter Caspase

- Reinigung aus 10-30 ml Bakterienüberstand von 2 l Kultur mittels FPLC über eine mit Nickel beladene HiTrap Chelating Säule (Amersham)
- Elution mit FPLC-Elutionspuffer für His-Fusionsproteine
- SDS-PAGE und Coomassie bzw. Western-Blot zur Kontrolle der Eluate
- ergibt für 2 l Bakterienkultur maximal 5 ml gereinigte Caspase
- Dialyse mittels FPLC über HiTrapDesalting Säule (Amersham) gegen FPLC-Startpuffer für His-Fusionsproteine

### **Native Reinigung von GST-getaggtter Caspase**

- Reinigung aus 10-30 ml Bakterienüberstand von 2 l Kultur mittels FPLC über eine mit Glutathion beladene GSTrap FF Säule (Amersham)
- Elution mit FPLC-Elutionspuffer für GST-Fusionsproteine
- SDS-PAGE und Coomassie bzw. Western-Blot zur Kontrolle der Eluate
- ergibt für 2 l Bakterienkultur maximal 2,5 ml gereinigte Caspase
- Es wurde keine Dialyse durchgeführt.
- Für die Antikörpertests (Kapitel I.4.2) wurde gereinigte GST-3A bzw. 3B in Zentriconfiltern ca. 7fach konzentriert.

### **Denaturierende Reinigung und Dialyse von rekombinanter Caspase**

Die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen wurde mit 3A-myc, 3A<sup>M</sup>-myc, 3B-myc und 3B<sup>M</sup>-myc durchgeführt. Dafür wurden 10 ml resuspendiertes Bakterienpellet mit rekombinanter Caspase von 2 l lysierter Bakterienkultur verwendet und mit dem Xpress<sup>TM</sup> System (Invitrogen) über eine Nickel-Säule nach Protokoll des Herstellers gereinigt. Eluiert wurde mit 15 ml (1 ml Aliquots) denat. Elutionspuffer. Anschließend wurde im Dialyse-Schlauch bei 4 °C gegen 2-3 l Dialysepuffer mit absteigender Harnstoffkonzentration dialysiert.

## **2.5.6 Herstellung der Antikörper anti-3A und anti-3B**

### **anti-3A aus Huhn**

Als Antigen wurde denaturierte, gereinigte 3A-myc verwendet. Die Expression fand in Top 10 *E. coli* statt. Mit der Herstellung des polyklonalen Antikörpers wurde die Firma Davids beauftragt. Zur Immunisierung eines Huhns waren 0,3-1 mg Antigen nötig.

### **anti-3A und anti-3B aus Kaninchen**

Als Antigen wurde denaturierte, gereinigte 3A-myc bzw. 3B-myc verwendet. Die Expression fand in Top 10 *E. coli* statt. Mit der Herstellung des polyklonalen Antikörpers wurde die Firma pab productions beauftragt. Zur Immunisierung eines Kaninchens waren 0,5-1 mg Antigen nötig. Die Seren der Kaninchen wurden nach jedem Boost auf Konzentration und Spezifität des Antikörpers getestet. Aus dem optimalen Serum wurden die Immunglobuline IgG gereinigt.

## 2.5.7 Sequenzierung

### N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung wurde freundlicherweise von Prof. Rainer Deutzmann, Universität Regensburg durchgeführt. Sequenziert wurden:

- a) Abbauprodukt von 3A-myc bei 22 kD (vgl. Abb. ce). Es wurde denaturierte, gereinigte, im Zentriconfilter konzentrierte 3A-myc verwendet.
- b) Abbauprodukt von 3B-myc bei 22 kD nach Inkubation in apoptotischem Hydraextrakt (vgl. Abb. br). Nativ gereinigte, entsalzte, im Zentriconfilter konzentrierte 3B-myc wurde für 4 h im Verhältnis 1:1 mit apoptotischen Hydraextrakt inkubiert.

Mit beiden Proben wurden unter den folgenden Bedingungen eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt und anschließend wurde auf eine PVDF-Membran geblottet und Coomassie gefärbt:

- Probe 1:1 in PVDF-Proteinauftragspuffer (2x) verdünnen
- 10-15 min auf 37 °C erhitzen
- SDS-PAGE durchführen
- PVDF-Membran einige Sekunden in Methanol tränken und 2-3 Min in Blottingpuffer equilibrieren
- Western-Blot bei 125 mA für 20-40 h auf PVDF-Membran durchführen
- Membran 3x5 min mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> waschen
- Membran 5 min in PVDF-Coomassie-Färbelösung färben
- Membran 10-15 min in PVDF-Coomassie-Entfärbelösung entfärben
- Membran 1 h in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> waschen, trocknen, entsprechende Bande ausschneiden und sequenzieren

### Maldi-Sequenzierung

Die Maldi-Sequenzierung von affinitätsgereinigter, aktiver Caspase aus apoptotischen Hydraextrakt wurde von Dr. Stefan Müller, Universität Köln durchgeführt.

### 2.5.8 GST-Pulldown

Für die Interaktionsversuche wurden ungereinigte, lösliche N-terminal GST-getaggte bzw. C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggte 3A und 3B verwendet.

#### Equilibrieren der Sepharose

- Matrix in Glutathion-Sepharose-Flasche durch Schütteln resuspendieren
- 266 µl Glutathion-Sepharose abnehmen
- 2 min bei 1500 g zentrifugieren, Überstand verwerfen
- 2x mit 2 ml kalter PBS für GST-Pulldown waschen
- 2 min bei 1500 g zentrifugieren
- Glutathion-Sepharose Sediment in 200 µl PBS aufnehmen

#### Pulldown

- Binden des GST-Fusionsproteins:
  - 50 µl Glutathion Sepharose 1 h mit GST-Fusionsprotein bei 4 °C schütteln
  - 2 min bei 1500 g zentrifugieren
  - Überstand abnehmen und zur Quantifizierung der GST-Fusionsprotein-Bindung verwenden
- Waschen:
  - 3x 10 min mit 300 –1000 µl PBS mit 0,1 % Nonidet bei 4 °C schütteln
  - Blocken mit 300 – 1000 µl Blockpuffer (GST-Pulldown) für 1 h
  - 2 min bei 1500 g zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zugabe des myc-Fusionsproteins:
  - 50 µl Myc-Fusionsprotein (versch. Konzentrationen in Caspasepuffer mit Proteaseinhibitoren) zugeben
  - Schütteln bei 4 °C über Nacht
  - 2 min bei 1500 g zentrifugieren
  - Überstand abnehmen und zur Quantifizierung der Myc-Fusionsprotein-Bindung verwenden
- 2x 10 min bei 4 °C waschen mit 1 ml Blockpuffer
- 2x 10 min bei 4 °C waschen mit PBS mit 0,1 % Nonidet
- 2 min bei 1500 g zentrifugieren
- 50 µl Proteinauftragspuffer (2x) zu Glutathion-Sepharose zugeben
- auftrennen der Proteine mittels SDS-PAGE
- Western-Blot und Nachweis mit anti-myc und anti-GST-Antikörper

## 2.5.9 Aktivitätsassays

### Fluorogene Peptidsubstrate (Martins *et al.*, 1997)

Als Substrat wurde AcDEVD-amc in DMSO (100 µM aus 10 mM Stock) eingesetzt.

#### Proben:

- Hydraextrakt, hergestellt durch Zerspritzen, Einfrieren und Sonifizieren von normalen und Colchizin-behandelten Hydren
- Hydraextrakt, hergestellt durch Zerspritzen, Einfrieren und Sonifizieren. Anschließend wird in Gegenwart von 10 mM DTT bei Raumtemperatur inkubiert.
- Durch Zellfraktionierung gewonnene Kerne in Kernaufschlußpuffer, Mitochondrien in Mitochondrienpuffer und Cytoplasma von normalen und Colchizin-behandelten Hydren

#### Protokoll:

- Fluorometer eichen mit AMC in DMSO (100 mM): 1:1000 verdünnt in Assay-Puffer oder H<sub>2</sub>O, davon 30 µl in 3 ml H<sub>2</sub>O, gemessen im Fluorometer entsprechen 100 % AMC-Produktion
- Messung: Anregungswellenlänge: 360 nm, Emissionswellenlänge: 475 nm
- Mix herstellen aus AcDEVD-amc und Assaypuffer (1x): 1:50
- Inhibitorbehandlung: Probe vor Zugabe des Substrats 30 min mit Inhibitor (DEVD-CHO, 1 mM) bei RT inkubieren
- 500 µl Substrat-Mix und 50 µl Probe mischen, Negativkontrolle (nur Assaypuffer (1x)) ansetzen
- inkubieren bei RT im Dunklen
- Messung 1, 2 h, usw.
- zur Messung: 300 µl des Ansatzes in 3 ml H<sub>2</sub>O, Fluoreszenz messen

## **Active-site-Markierung mit zEK(bio)D-aomc (Martins *et al.*, 1997) und FITC-VAD-fmk**

### **Proben:**

- nativ gereinigte 3A-myc und ungereinigte, lösliche 3A<sup>M</sup>-myc (zEK(bio)D-aomc und FITC-VAD-fmk)
- ungereinigte, unlösliche, stark konzentrierte 3B-myc, 3BM-myc, 3B\*-myc und 3B\*M-myc, gewonnen aus 2 l Bakterienkultur (FITC-VAD-fmk)
- gereinigte und stark konzentrierte, lösliche 3B-myc und 3BM-myc (zEK(bio)D-aomc und FITC-VAD-fmk), die durch apoptotischen Hydraextrakt gespalten wurde (FITC-VAD-fmk)
- ungereinigte, unlösliche 3B\*-myc, die durch apoptotischen Hydraextrakt gespalten wurde (FITC-VAD-fmk)
- Hydraextrakt, hergestellt durch Zerspritzen, Einfrieren und Sonifizieren von normalen und Colchizin-behandelten Hydren (zEK(bio)D-aomc und FITC-VAD-fmk)
- durch Zellfraktionierung gewonnene Mitochondrien in Mitochondrienpuffer und Cytoplasma von normalen und Colchizin-behandelten Hydren (FITC-VAD-fmk). Das Cytoplasma wurde nach Inkubation mit FITC-VAD-fmk und vor Analyse durch Western-Blot in Zentriconfiltern ca. 8fach konzentriert.
- durch Zellfraktionierung gewonnene Mitochondrien in Mitochondrienpuffer. Nach der active-site-Markierung wurden unlösliche und lösliche Bestandteile nach folgendem Protokoll getrennt:
- Active-site-Markierung der Mitochondrienfraktion in isotonischem Mitochondrienpuffer (+ Antipain, 50 µg/ml, + Calpain, 20 µg/ml) nach Protokoll mit FITC-VAD-fmk (1 µM) nach Protokoll
- nach 2 h Inkubation mit Substrat: Ansatz 20 min bei 15.000 g, 4 °C zentrifugieren
- Überstand + Proteinauftragspuffer (2x): lösliche Mitochondrienbestandteile
- Pellet in gleichem Volumen an Mitochondrienpuffer wie Überstand resuspendieren, Proteinauftragspuffer (2x) zugeben: unlösliche Mitochondrienbestandteile
- SDS-Page und Western Blot, Nachweis mit anti-FITC-Antikörper

### **Protokoll für active-site-Markierung:**

- Probe mit 1 µM zEK(bio)D-aomc oder 1 µM FITC-VAD-fmk in 1x Assaypuffer (Stock 10x) für 2 h bei Raumtemperatur inkubieren
- bei Inhibitorbehandlung: Probe vor Substratzugabe für 30 min mit Inhibitor (DEVD-CHO oder zVAD-fmk oder YVAD-CHO, je 1 µM bei Raumtemperatur inkubieren
- Negativkontrolle: Ansatz ohne Substrat und Ansatz ohne Probe
- nach 2 h: Zugabe von Proteinauftragspuffer (2x) und Aufkochen für 4 min bei 99 °C
- SDS-PAGE und Western-Blot, Nachweis mit Streptavidin bzw. anti-FITC-Antikörper

### 2.5.10 Immunfluoreszenz

- Überführen von je 3 Polypen in eine Petrischale
- Zugabe von Hydramedium + 2 % Urethan in Hydramedium
- Fixierlösung zugeben, wenn Polypen ausgestreckt sind und 1 h bei RT inkubieren
- 3 x 20 min in 1 x PBS waschen
- 15 min in Permeabilisierungslösung inkubieren
- 15 min in Blocklösung inkubieren
- Polypen in je ein Well einer Mikrotiterplatte überführen
- 100 µl Antikörper in Blocklösung zugeben und über Nacht bei 4 °C inkubieren
- 3 x 10 min waschen mit PBS
- in sekundärem Antikörper in Blocklösung für 1,5 h bei RT im Dunklen inkubieren
- 3 x 10 min waschen mit PBS
- für Kernfärbung mit To-Pro-3 (1:1000 in PBS) für 3 min und 10 min in PBS waschen
- Hydren mit Vektashield auf Objektträger einbetten und mit Nagellack versiegeln

Die Präparate wurden mit dem Leica TCS-NT Konfokal Laser Scanning Mikroskop (Leica Microsystems, Mannheim), das mit einer Öl-Immersion Plan-Apochromat 100/1.4NA Objektiv Linse ausgestattet ist untersucht. Visualisiert wurden die Fluorochrome mit einem Argonlaser bei einer Exzitation von 488 nm für FITC und 514 nm für Cy 3 und einer Emission von 500-530 nm für FITC und 570 –590 nm für Cy 3 und mit einem Helium-Neon-Laser bei einer Exzitation von 633 nm und einer Emission von 650-770 nm für TOPRO. Die Proben wurden in einer Reihe optischer Schnitte entlang der z-Achse abgetastet und das Ergebnis in Form von TIFF Bilddateistapeln festgehalten. Die Auflösung war 512x512 Pixel mit einer Pixel Größe von 195 bis 49 nm, je nach Zoomfaktor. Der Axialabstand zwischen den Schnitten betrug 250 nm.

Die 8 bit Einzelkanalbilder wurden in Adobe Photoshop zu einem RGB Bild überlagert, wobei jedem Kanal eine Farbe zugeordnet wurde.

Es wurden folgende Antikörper (Verdünnungen siehe Material) verwendet:

#### Einzelfärbungen:

Erstantikörper	Zweitantikörper
anti-3A (Huhn)	anti-Huhn-FITC
anti-3A (Kaninchen)	anti-Kaninchen-FITC
anti-3A (Kaninchen)	anti-Kaninchen-cy3
anti-3B (Kaninchen)	anti-Kaninchen-FITC
anti-3B (Kaninchen)	anti-Kaninchen-cy3
anti-AAC (Kaninchen)	anti-Kaninchen-FITC
anti-AAC (Kaninchen)	anti-Kaninchen-cy3

**Doppelfärbungen:**

<b>Erstantikörper</b>	<b>Zweitantikörper</b>
anti-3A (Huhn) + anti-3B (Kaninchen)	anti-Huhn-FITC + anti-Kaninchen-cy3
anti-3A (Huhn) + anti-AAC (Kaninchen)	anti-Huhn-FITC + anti-Kaninchen-cy3

**Kontrollen:**

<b>Erstantikörper</b>	<b>Zweitantikörper</b>
Preimmunserum anti-3A (Kaninchen)	anti-Kaninchen-FITC
Preimmunserum anti-3A (Kaninchen)	anti-Kaninchen-cy3
Preimmunserum anti-3B (Kaninchen)	anti-Kaninchen-FITC
anti-3A (Huhn)	anti-Kaninchen-cy3
anti-3B (Kaninchen)	anti-Huhn-FITC
anti-AAC (Kaninchen)	anti-Huhn-FITC
anti-3A (Huhn)	
anti-3A (Kaninchen)	
anti-3B (Kaninchen)	
anti-AAC (Kaninchen)	
	anti-Kaninchen-FITC
	anti-Kaninchen-cy3
	anti-Huhn-FITC

## 2.6 Experimente an Hydra

### 2.6.1 Induktion von Apoptose mit Colchizin, (Cikala *et al.*, 1999)

- ca. 1000 Hydren für 72 h hungern lassen
- Hydren für 8 h in 100 ml Hydramedium mit 0,4 % Colchizin inkubieren
- Hydren waschen mit Hydramedium
- Hydren für 16 h in Hydramedium inkubieren

### 2.6.2 Herstellung von Hydraextrakt durch Zerspritzen, Einfrieren und Sonifizieren, (Cikala *et al.*, 1999)

- 1000 normale oder Colchizin-behandelte Hydren waschen in Hydramedium
- Hydramedium abnehmen und 4 ml Cytoplasmapuffer (ohne EGTA und DTT, mit 20 mM Mercaptoethanol) zugeben
- Hydren mit Spritze homogenisieren
- bei  $-80^{\circ}\text{C}$  einfrieren
- auftauen und mit 6 Impulsen von 10 sec bei hoher Intensität sonifizieren
- Zellbruchstücke bei 10.000 Upm,  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min abzentrifugieren, Pellet verwerfen
- zum Überstand 20  $\mu\text{g/ml}$  Calpain und 50  $\mu\text{g/ml}$  Antipain zugeben
- aliquotieren, Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$

### 2.6.3 Zellfraktionierung von Hydra

- 1000 normale oder Colchizin-behandelte Hydren in Hydramedium waschen
- Hydren in 4 ml Mitochondrienpuffer (+ Antipain, 50  $\mu\text{g/ml}$ , + Calpain, 20  $\mu\text{g/ml}$  + Cytochalasin, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) aufnehmen und 30 min auf Eis stehen lassen
- ca. 40 x auf Eis Dounce homogenisieren
- Zellaufschluß mehrmals kontrollieren:
- 10  $\mu\text{l}$  der homogenisierten Suspension mit 20  $\mu\text{l}$  DAPI-Lösung (0,5 mg/ml) mischen und 1 min bei 1000 g abzentrifugieren
- zum Pellet 10  $\mu\text{l}$  Dissoziationsmedium geben
- Probe auf Objektträger und Aufschluß im Phasenkontrastmikroskop kontrollieren
- homogenisierte Hydren bei 1800 Upm,  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min zentrifugieren  $\alpha$  Überstand 1 + Pellet 1

### Pellet 1 ( = Kernfraktion):

- in 1 ml Mitochondrienpuffer ( + 0,7 % NP 40, + Antipain, 50 µg/ml, + Calpain, 20 µg/ml) aufnehmen und nochmals bei 1800 Upm für 15 min zentrifugieren
- Pellet in 0,5-2 ml Mitochondrienpuffer ( + 0,7 % Nonidet, + Antipain, 50 µg/ml, + Calpain, 20 µg/ml) oder Kernaufschlusspuffer (+ Antipain, 50 µg/ml, +Calpain, 20 µg/ml) aufnehmen
- 200 µl abnehmen und 50 µl 4x Proteinauftragspuffer: SDS-Gel und Proteinbestimmung (Amidoschwarz)
- 10 µl für Kontrolle des Aufschlusses im Mikroskop
- Rest in flüssigem Stickstoff einfrieren und -80 °C-Lagerung
- Überstand 1: bei 12.000 Upm, 4 °C für 30 min zentrifugieren α Überstand 2 + Pellet 2

### Pellet 2 ( = Mitochondrienfraktion):

- in 500 µl Mitochondrienpuffer (+ Antipain, 50 µg/ml, + Calpain, 20 µg/ml) aufnehmen
- ca. 150 µl Probe + 38 µl 4x Proteinauftragspuffer: SDS-Gel und Proteinbestimmung (Amidoschwarz)
- 10 µl für Kontrolle des Aufschlusses im Mikroskop
- Rest in flüssigem Stickstoff einfrieren und -80 °C-Lagerung
- Überstand 2: in Ultrazentrifuge bei 100.000 g, 35.000 Upm, 4 °C für 60 min zentrifugieren α Überstand 3 und Pellet 3

Pellet 3 ( = Mikrosomenfraktion): aufnehmen in 100 µl Mitochondrienpuffer + 25 µl 4x Proteinauftragspuffer

### Überstand 3 ( = Cytoplasmafraktion):

- ca. 150 µl Probe + 38 µl 4x Proteinauftragspuffer für SDS-Gel und Proteinbestimmung (Amidoschwarz)
- Rest in flüssigem Stickstoff einfrieren für -80 °C-Lagerung

## 2.6.4 Inkubation der rekombinanter Caspasen 3B, 3B<sup>M</sup> und 3B\* in apoptotischen Hydraextrakt

### Proben:

- native und denaturierte, gereinigte und ungereinigte 3B-myc. Für die Sequenzierung des Abbauprodukts wurde denat., gereinigte 3B-myc in Zentriconfiltern stark konzentriert.
- native, gereinigte und ungereinigte 3BM-myc
- ungereinigte, unlösliche 3B\*-myc

### Protokoll:

- Probe 1:1 mit apoptotischen Hydraextrakt mischen
- im Ansatz 10x Assaypuffer zu 1x Assaypuffer verdünnen
- to-Wert entnehmen und Proteinauftragspuffer (2x) zugeben
- für 1-4 h bei Raumtemperatur inkubieren
- Proteinauftragspuffer (2x) zugeben und SDS-PAGE und Western-Blot, Nachweis mit anti-myc oder anti-3B-Antikörper
- Behandlung mit Inhibitoren: vor Zugabe der Probe den Hydraextrakt 30 min bei Raumtemperatur mit jeweiligem Inhibitor (DEVD-CHO oder zVAD-fmk oder YVAD-CHO, je 1  $\mu$ M) vorinkubieren

## 2.6.5 Affinitätsreinigung von Caspase 3B\*

Die Affinitätsreinigung von Caspase 3B\* wurde freundlicherweise von Frau Beate Stiening durchgeführt. Es wurde löslicher Extrakt von 10.000 Hydren verwendet und Caspase-Aktivität durch Inkubation bei RT in Gegenwart von DTT induziert. Dabei wurden folgendermaßen vorgegangen:

- Gel-Filtration über eine Sphadex G 100 Säule
- konzentrierte Fraktionen mit biotinylierten Caspase-Substrat zEK(bio)D-aomc inkubieren
- laden auf Streptavidin-Säule und eluieren mit 2 mM Biotin

## **3. ERGEBNISSE**

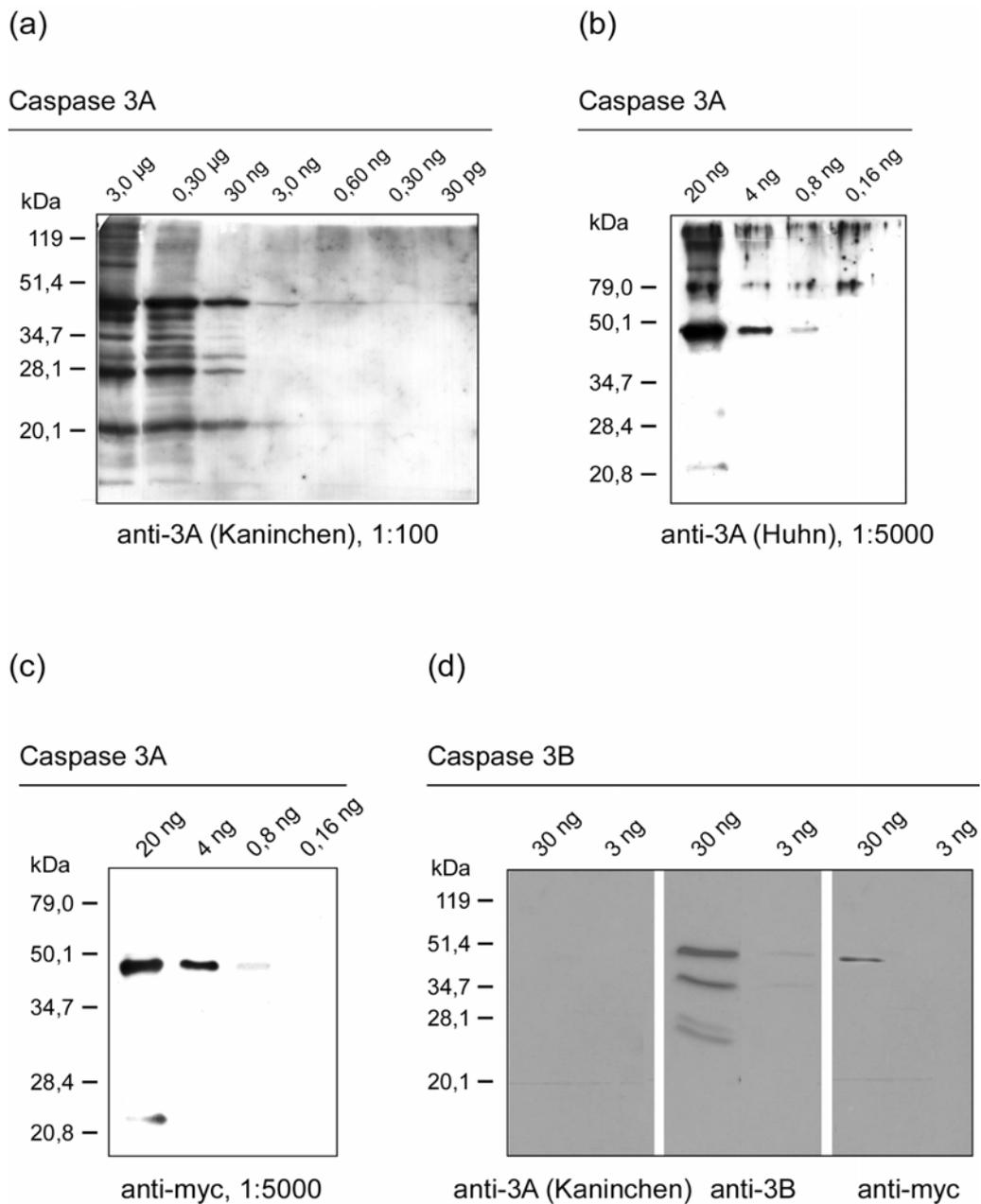
### **3.1 Rekombinante Hydra-Caspasen 3A, 3B und 3B\***

#### **3.1.1 Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen Caspase 3A und 3B**

Wie bei Cikala et al. beschrieben, sind zwei Gene von Caspasen in Hydra identifiziert worden: Caspase 3A und 3B (Cikala *et al.*, 1999). Die veröffentlichten DNA-Sequenzen wurden mit einer zusätzlichen Caspase 3B sehr ähnlichen DNA-Sequenz erweitert. Die Caspase, für die diese Sequenz codiert, wurde Caspase 3B\* genannt. Um die biochemischen Eigenschaften der Hydra-Caspasen genauer zu untersuchen, wurden Caspasen 3A, 3B und 3B\* mit einem carboxyterminalen myc-(His)<sub>6</sub>-Tag in Bakterien exprimiert und Antikörper gegen diese Antigene hergestellt.

Zu Caspase 3A: Die exprimierte, denaturierte, gereinigte Caspase wurde als Antigen zur Immunisierung eines Huhns und eines Kaninchens verwendet. Aus dem Huhn erhielt man ein polyklonales Serum. Nach mehreren Immunisierungs-Boosts des Kaninchens wurden aus dem bezüglich Antikörper-Verdünnung und Spezifität optimalen Serum die Immunglobuline IgG gereinigt und getestet.

Um die Empfindlichkeit der Antikörper zu testen, wurde ein Western-Blot mit verschiedenen Verdünnungen des Antigens mit den Antikörpern analysiert.



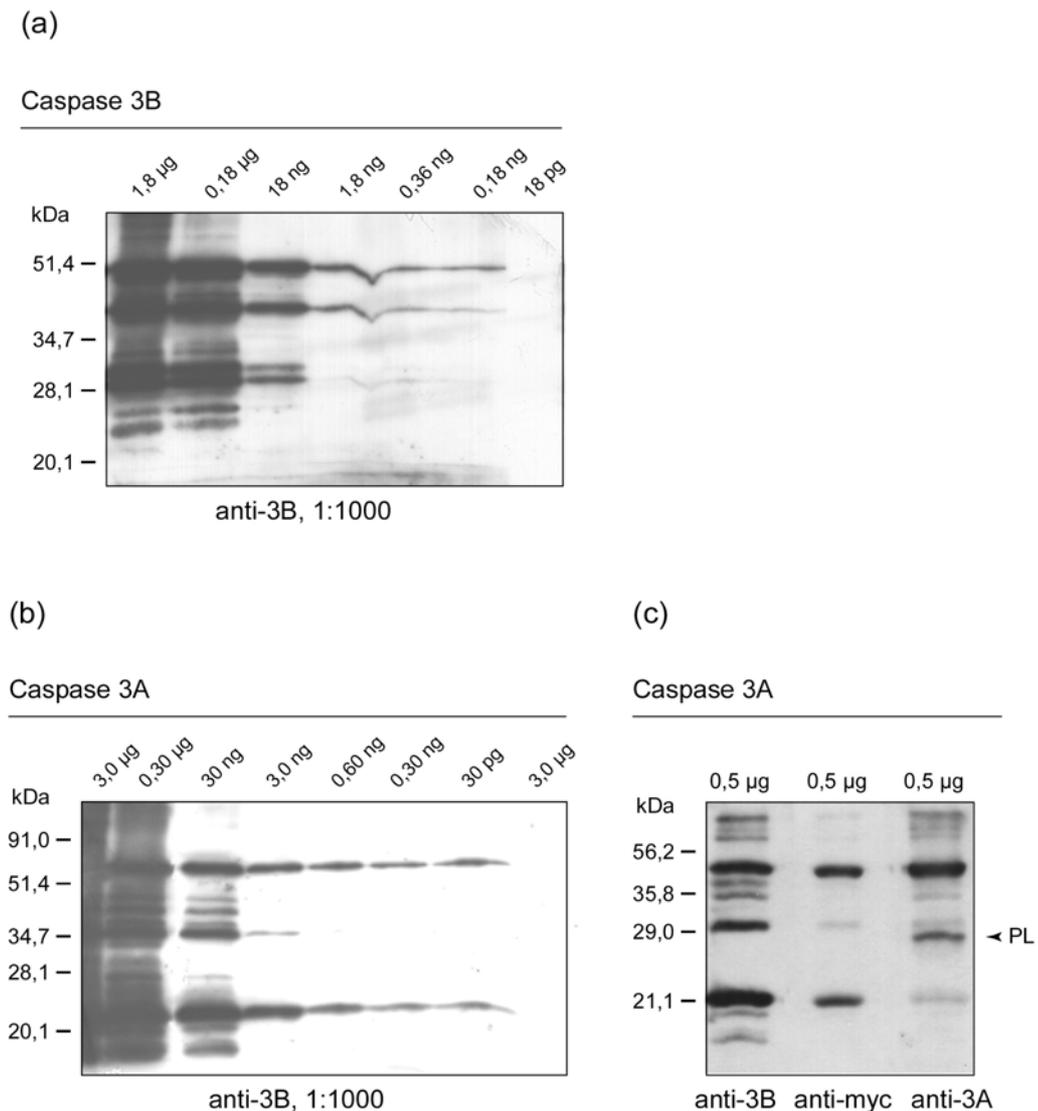
**Abb. 3a-d:** Untersuchung von Empfindlichkeit und Spezifität des anti-3A-Antikörpers, Die Bande bei 50 kD entspricht PLS-myc von Caspase 3A.(3b+c aus: Diplomarbeit T. Glasz, 2000)

Anti-3A-Antikörper aus Kaninchen kann bei einer Verdünnung von 1:100 bis zu 0,6 ng rekombinante Caspase 3A nachweisen (Abb. 3a). Dabei entspricht die Bande bei 50 kD dem Proenzym von Caspase 3A (siehe Kap. 3.1.2). Der Antikörper ist damit ähnlich empfindlich wie anti-3A-Antikörper aus Huhn, der bei einer Verdünnung von 1:5000 0,8 ng Caspase 3A erkennt (Abb. 3b).

Die Sensitivität beider Antikörper entspricht somit der von anti-myc-Antikörper, der bei einer Verdünnung von 1:5000 bis zu 0,8 ng myc-(His)<sub>6</sub>-getaggte Caspase 3A nachweist (Abb. 3c).

Um die Spezifität der Antikörper zu untersuchen, wurde ein Western-Blot mit denaturierter, gereinigter Caspase 3B-myc analysiert. Abbildung 3d zeigt, dass anti-3A-Antikörper aus Kaninchen nicht mit Caspase 3B kreuzreagiert. Auch der anti-3A-Antikörper aus Huhn ist weitgehend spezifisch und reagiert nicht mit myc-(His)<sub>6</sub>-getaggtter Caspase 3B (siehe Diplomarbeit, T. Glasz, 2000). Damit stehen zwei anti-3A-Antikörper zur Verfügung, die in unterschiedlichen Organismen gebildet wurden und bis zu 0,6 ng des Antigens erkennen können.

Zu Caspase 3B bzw. 3B\*: Ein Kaninchen wurde mit denaturierter, gereinigter, myc-(His)<sub>6</sub>-getaggtter Caspase 3B immunisiert, und nach mehreren Immunisierungsboosts wurden aus Kaninchenserum die Immunglobuline IgG gereinigt. Da zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt war, dass Caspase 3B in Hydra nicht transkribiert wird, wurde Caspase 3B und nicht 3B\* als Antigen verwendet. In Kapitel 3.1.3.2 wird gezeigt, dass der anti-3B-Antikörper nicht nur Caspase 3B sondern auch 3B\* nachweist.



**Abb. 4 a-c:** Untersuchung von Empfindlichkeit und Spezifität des anti-3B-Antikörpers, 4a: Die Bande bei 50 kD entspricht PLS von Caspase 3B. 4C: PL entspricht Prodomäne und großer Untereinheit von 3A.

Mit einer optimalen Verdünnung von anti-3B-Antikörper von 1:1000 können bis zu 0,18 ng rekombinante Caspase 3B nachgewiesen werden (Abb. 4a). Der Antikörper ist somit empfindlicher als anti-myc-Antikörper (vgl. Abb. 3c).

Um die Spezifität von anti-3B-Antikörper zu analysieren, wurde die Kreuzreaktion mit myc-(His)<sub>6</sub>-getaggtter Caspase 3A untersucht. Abbildung 4b zeigt, dass der Antikörper bis zu 30 pg Caspase 3A detektiert.

Um zu klären, ob anti-3B lediglich den (His)<sub>6</sub>-Tag von rekombinanter Caspase 3A erkennt oder spezifisch mit 3A reagiert, wurde ein Western-Blot mit gereinigter, unlöslicher Caspase 3A mit den Antikörpern anti-3B, anti-myc und anti-3A analysiert. Wie auf Abbildung 4c gezeigt, gibt es ein Prozessierungsprodukt von Caspase 3A, das keinen myc-(His)<sub>6</sub>-Tag besitzt, da es nicht mit anti-myc-Antikörper detektiert wird. Es handelt sich dabei um Prodomäne und große Untereinheit (PL) von Caspase 3A. Dieses Bruchstück wird von anti-3B-Antikörper nicht erkannt, d.h. der Antikörper ist nicht spezifisch für Caspase 3A, sondern zeigt eine starke Kreuzreaktion mit (His)<sub>6</sub>-getaggtter Procaspase 3A und sämtlichen getaggtten Abbauprodukten. Bei Versuchen zur Prozessierung von rekombinante Caspasen 3B bzw. 3B\* in Extrakt von apoptotischen Hydren wurde gezeigt, dass der Antikörper aber auch spezifisch Caspasen 3B bzw. 3B\* erkennt. Dabei entsteht ein ungetaggttes Bruchstück, das mit anti-3B nachgewiesen wird (vgl. Abb. 23b).

Abbildung 5 gibt einen Überblick über die hergestellten Caspase-Antikörper:

<b>Antikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Empfindlichkeit</b>	<b>Kreuzreaktion mit (His)<sub>6</sub>-Tag</b>
anti-3A	Huhn	0,8 ng	nein
anti-3A	Kaninchen	0,6 ng	nein
anti-3B	Kaninchen	0,18 ng	ja

**Abb. 5:** Tab. 1: Empfindlichkeit und Spezifität der Hydra-Caspase-Antikörper

### 3.1.2 Enzymatische Eigenschaften von Caspase 3A in *E. coli*

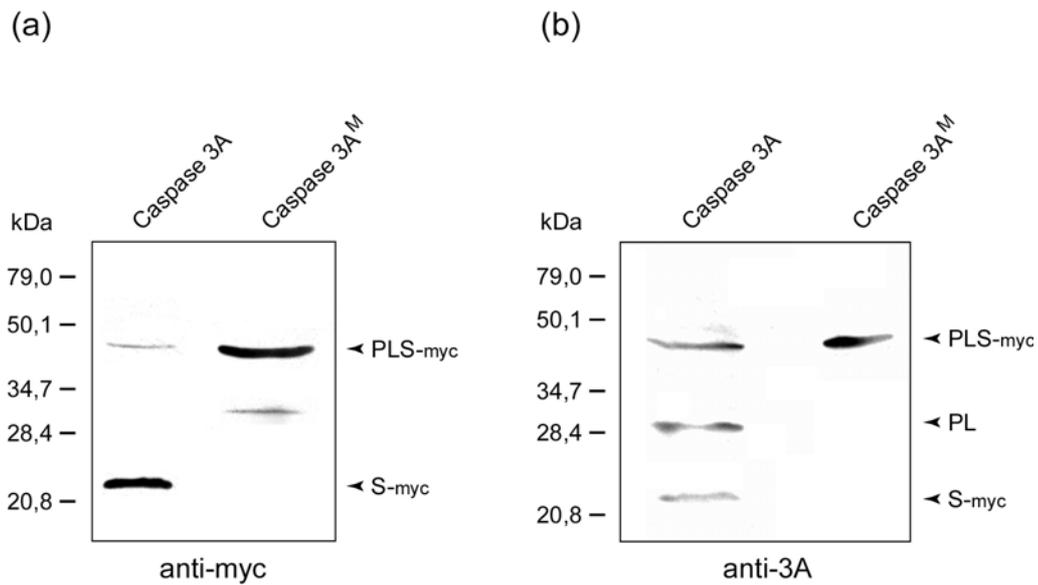
#### 3.1.2.1 Autokatalyse von rekombinanter Caspase 3A

Caspasen werden als Proenzyme synthetisiert und können entweder autokatalytisch oder durch die Einwirkung anderer Caspasen aktiviert werden. Autokatalyse wurde bei der Expression von Caspasen in *E. coli* gezeigt (Xue *et al.*, 1996). Es gibt mehrere Ergebnisse, die nachweisen, dass auch rekombinante Caspase 3A autokatalytisch aktiv ist. In Abbildung 6 sind die aus der Aminosäuresequenz berechneten Größen von Caspase 3A und ihre erwarteten Untereinheiten dargestellt.

Caspase 3A	
<b>PLS</b>	39,8 kD
<b>P</b>	9,9 kD
<b>L</b>	15,3 kD
<b>S</b>	14,6 kD
<b>PL</b>	25,2 kD
<b>LS</b>	29,9 kD
<b>(His)<sub>6</sub>-myc-Tag</b>	3 kD
<b>GST-Tag</b>	27,5 kD

**Abb. 6:** Tab. 2: Größen von Caspase 3A und Untereinheiten

Es wurden Western-Blots von C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggtter, löslicher Caspase 3A mit anti-myc- und anti-3A-Antikörper aus dem Huhn analysiert (Abb. 7a+b). Zusätzlich wurde Caspase 3A<sup>M</sup> analysiert. Es handelt sich hier um eine Mutante von 3A, bei der der Cysteinrest 211 zu Serin mutiert wurde. Cystein ist Bestandteil des aktiven Zentrums von Caspase 3A, 3A<sup>M</sup> ist somit enzymatisch inaktiv.

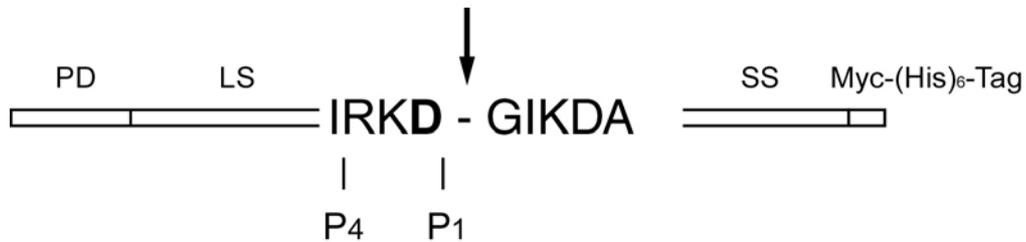


**Abb. 7a+b:** Lösliche Wildtyp-, bzw. mutierte C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggte Caspase 3A (Bakterienlysate), PLS:Proenzym von 3A, PL:Prodomäne und große Untereinheit von 3A, S: kleine Untereinheit von 3A, myc: C-terminaler myc-Tag (aus: Diplomarbeit T. Glasz, 2000)

Mit anti-myc-Antikörper sind bei beiden Proteinen hervortretende Banden bei 46 kD zu sehen, die den Procaspasen von Wildtyp bzw. Mutante mit einer berechneten Größe von 42,8 kD inklusive Tag entsprechen. Die auf dem SDS-Gel beobachteten Größen von rekombinanter Caspase 3A weichen von den berechneten Größen (vgl. Abb. 6) etwas nach oben ab. Bei der zweiten etwa 22 kD großen Bande beim Wildtyp handelt es sich um die kleine Untereinheit von Procaspase 3A mit einer berechneten Größe von 17,6 kD inklusive Tag. Das Fehlen dieser Bande bei der Mutante beweist, dass das 22-kD-Fragment durch autoproteolytische Aktivität von Caspase 3A entstanden ist. Eine Analyse mit anti-3A-Antikörper aus Huhn zeigt für den Wildtyp drei Banden (Abb. 7b): Die 46-kD-Bande, die PLS von 3A bzw. 3A<sup>M</sup> entspricht, die 22 kD große Bande, die der kleinen Untereinheit von 3A entspricht und eine dritte ca. 29 kD große, ungetaggte Bande, die bei der Mutante fehlt. Es handelt sich hier um PL mit einer berechneten Größe von 25,3 kD (vgl. Abb. 6).

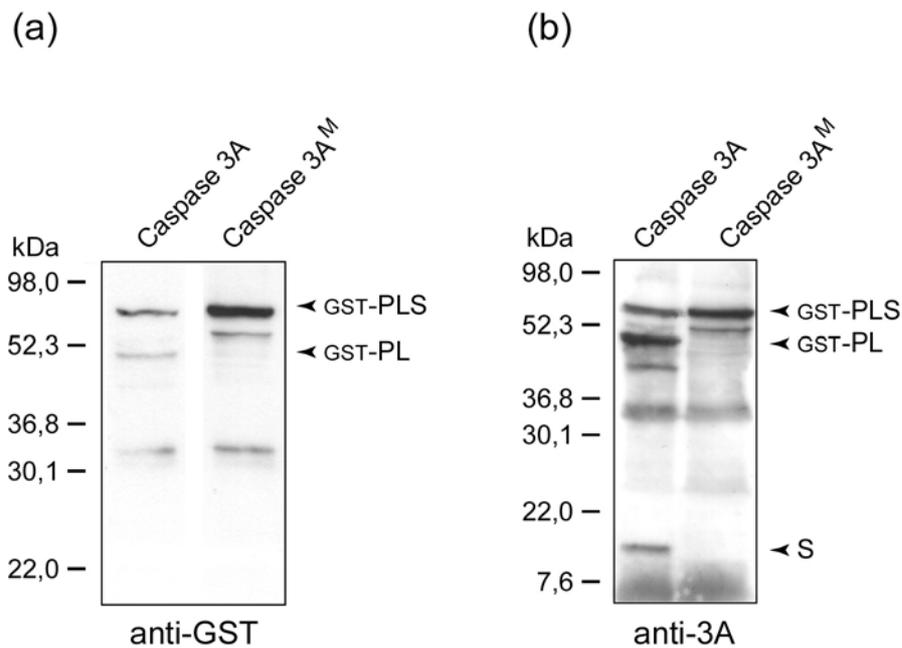
Da mit anti-3A-Antikörper keine Banden detektiert wurden, die getrennter Prodomäne (P) und großer Untereinheit (L) entsprechen, ist dies ein Hinweis darauf, dass die beiden Untereinheiten während der Autoproteolyse nicht getrennt werden.

Zur Bestätigung der Hypothese, dass das 22 kD-Fragment ein autokatalytisches Prozessierungsprodukt von rekombinanter Caspase 3A ist, wurde es N-terminal sequenziert. Die identifizierte Schnittstelle ist auf Abbildung 8 zu sehen. Die N-terminale Sequenz des Fragments liegt direkt neben einem Aspartatrest hinter der vermuteten Schnittstelle zwischen großer und kleiner Untereinheit.



**Abb. 8:** AS-Sequenz der identifizierten Schnittstelle zwischen großer und kleiner Untereinheit von Procaspase 3A

Um zu bestätigen, dass Prodomäne und große Untereinheit bei der Autoproteolyse von Caspase 3A tatsächlich nicht getrennt werden, wurden Wildtyp Caspase 3A und Mutante 3A<sup>M</sup> mit einem GST-Tag (27,5 kD) am amino-terminalen Ende in *E. coli* exprimiert. Ein Western-Blot von Bakterienlysaten, analysiert mit anti-GST-Antikörper ist in Abbildung 9a dargestellt.



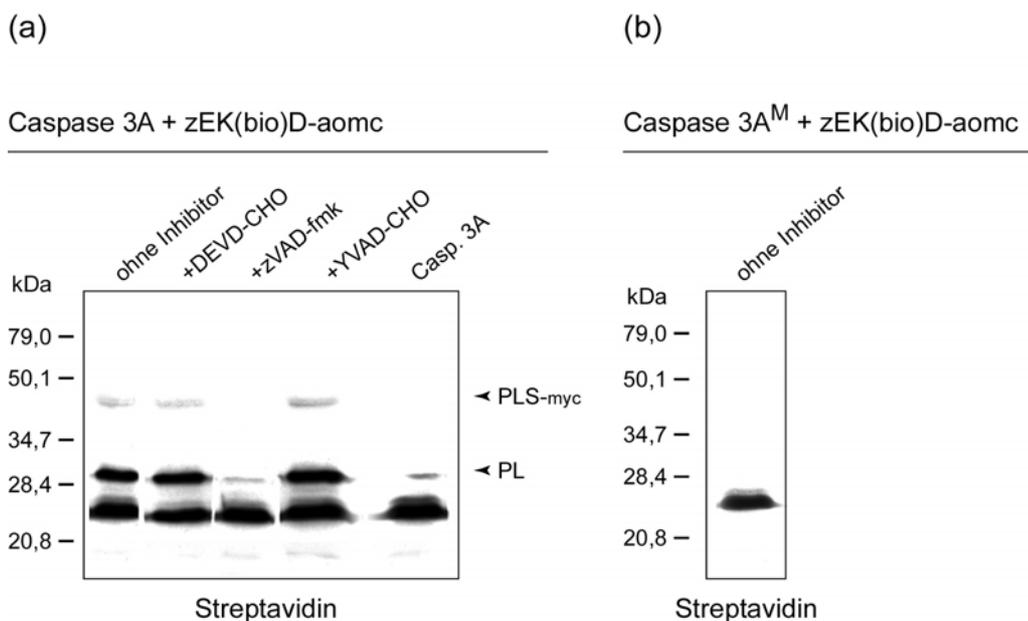
**Abb. 9a+b:** lösliche N-terminalen GST-getaggte Wildtyp bzw. mutierte Caspase 3A (Bakterienlysate), (aus: Diplomarbeit G. Zenner, 2001)

Bei den 70 kD großen Banden bei Wildtyp und Mutante handelt es sich um die Procaspasen mit einer berechneten Größe von 67,3 kD inklusive Tag. Das 50 kD große Fragment beim Wildtyp fehlt bei der Mutante und entspricht GST-PL mit einer berechneten Größe von 52,7 kD inklusive Tag, das durch autoproteolytische Aktivität entstanden ist. Die abgetrennte kleine Untereinheit ist mit anti-GST-Antikörper nicht zu erkennen, da sie keinen GST-Tag besitzt. Das Fehlen einer Bande, die GST-P entspricht, zeigt, dass die Prodomäne von prozessierter Caspase 3A vollständig an die große Untereinheit gebunden bleibt.

Abbildung 9b zeigt eine Analyse des Western-Blots mit anti-3A-Antikörper aus Kaninchen. Sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante ist wiederum die 70 kD große Bande zu sehen, die der jeweiligen Procaspase entspricht. Ebenso sieht man beim Wildtyp die 50 kD Bande von GST-PL, die bei der Mutante fehlt. Die ungetaggte, abgespaltene kleine Untereinheit wird von anti-3A-Antikörper detektiert und hat eine Größe von etwa 15 kD, was der berechneten Größe von 14,6 kD entspricht.

### 3.1.2.2 Enzymatische Aktivität von rekombinanter Caspase 3A

Um enzymatische Aktivität von rekombinanter Caspase 3A nachzuweisen, wurde eine Markierung des aktiven Zentrums (active-site-Markierung) mit Caspase-spezifischen Peptidsubstrat zEK(bio)D-aomc durchgeführt (Martins *et al.*, 1997). Dieses Substrat bindet kovalent an das aktive Zentrum von Caspasen und kann dann auf einem Western-Blot mit Streptavidin nachgewiesen werden. Für die Analyse der Substratspezifität, wurde rekombinante, C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggte Caspase 3A vor der Inkubation mit Substrat mit verschiedenen Caspase-Inhibitoren behandelt.

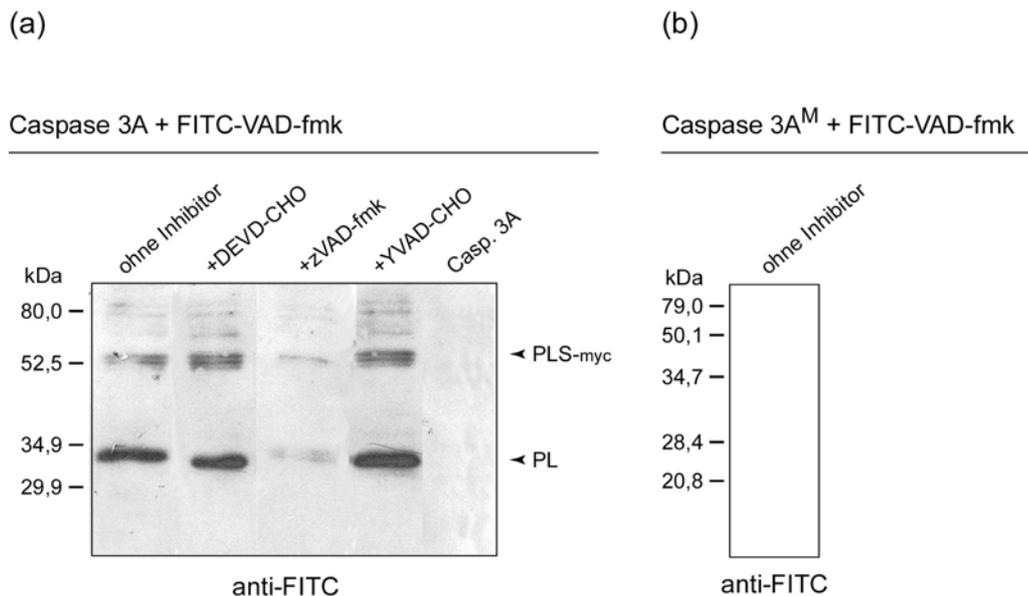


**Abb. 10a+b:** active-site-Markierung von C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggtter, löslicher Caspase 3A bzw. 3A<sup>M</sup> (Bakterienlysate) mit zEK(bio)D-aomc (aus: Diplomarbeit T. Glasz, 2000)

Abbildung 10a zeigt nach der Inkubation von nativer Caspase 3A mit zEK(bio)D-aomc eine prominente Bande bei 29 kD und eine schwächere Bande bei 46 kD. Diese Banden fehlen sowohl bei der im aktiven Zentrum mutierten, ungereinigten, löslichen Caspase 3A<sup>M</sup> (Abb. 10b) als auch bei einer Probe, in der Caspase 3A ohne Substrat inkubiert wurde.

Die Banden entsprechen also aktiver Caspase 3A. Bei der 46 kD-Bande handelt es sich um die Procaspase. Das bedeutet, dass diese enzymatisch aktiv ist. Die 29-kD-Bande entspricht PL mit einer berechneten Größe von 25,2 kD. Diese Bande ist mit anti-3A-Antikörper ebenfalls zu erkennen (vgl. Abb. 7b). Bei der 25 kD großen Bande (Abb. 10a) handelt es sich um eine unspezifische Reaktion von Streptavidin mit biotinylierten Bakterienproteinen, da die Bande auch in der Mutante und Probe ohne Substrat zu sehen ist.

Eine active-site-Markierung mit einem zweiten Caspasesubstrat (FITC-VAD-fmk) bestätigte die enzymatische Aktivität von rekombinanter Caspase 3A. FITC-VAD-fmk bindet ähnlich wie zEK(bio)D-aomc irreversibel an das aktive Zentrum von Caspasen. Aktive Untereinheiten können mit anti-FITC-Antikörper nachgewiesen werden. Wie später (Abb. 12a und 12b) gezeigt, ist dieser Assay empfindlicher als der mit zEK(bio)D-aomc, so dass man damit bis zu fünf mal weniger aktive Caspase nachweisen kann.



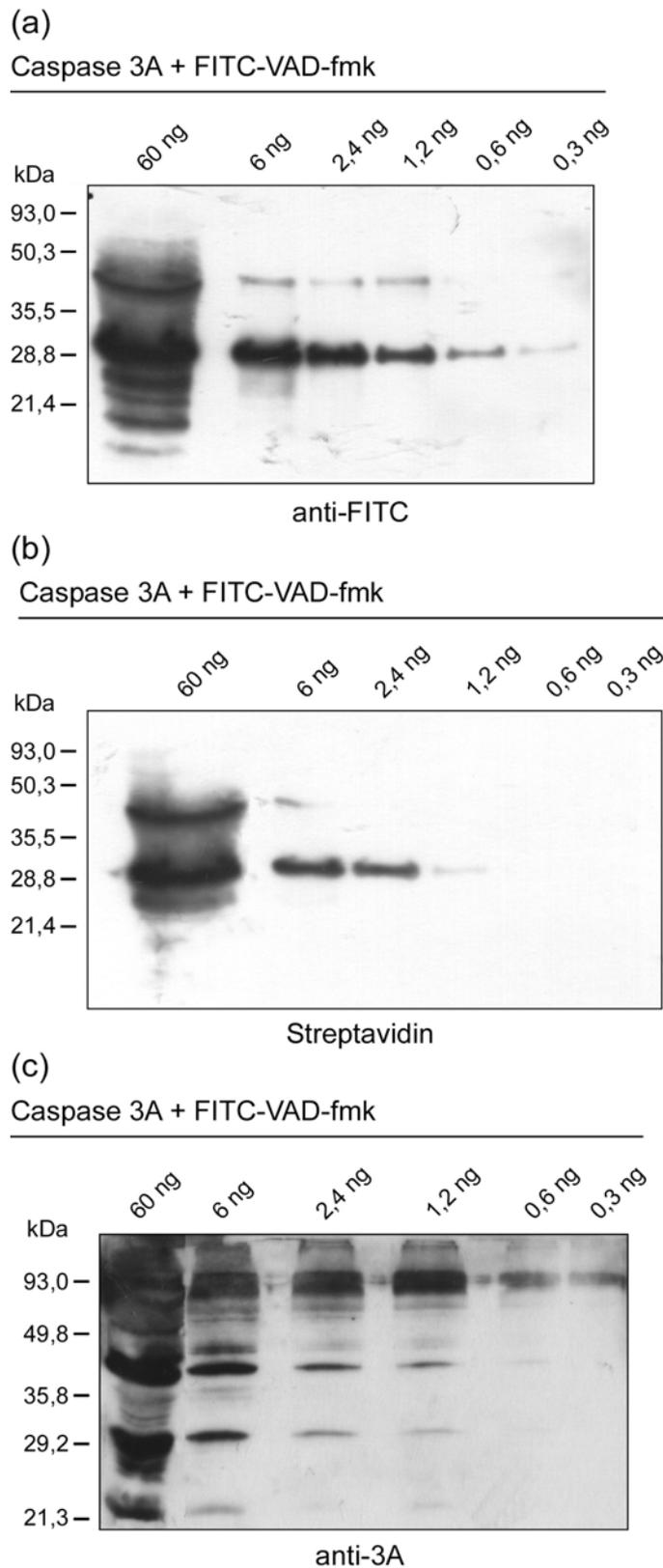
**Abb. 11a+b:** active-site-Markierung von C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggtter, löslicher Caspase 3A bzw. 3A<sup>M</sup> (Bakterienlysate) mit FITC-VAD-fmk

Wie in Abbildung 11a dargestellt, findet man mit FITC-VAD-fmk dieselben markierten Banden wie mit zEK(bio)D-aomc.

Man erkennt das schwächer markierte Proenzym des Wildtyps bei 46 kD und das PL-Fragment bei 29 kD. Unspezifisch sind die Banden zwischen 50 und 80 kD. Sie sind durch Reaktion der Fluormethylgruppe aus FITC-VAD-fmk mit Bakterienproteinen entstanden. Dieses Ergebnis zeigt noch einmal, dass Prodomäne und große Untereinheit nicht voneinander getrennt werden. Außerdem wird gezeigt, daß die aktive Form von Caspase 3A aus Prodomäne und großer Untereinheit besteht. Bei der Mutante 3A<sup>M</sup> findet man wiederum keine markierte Banden.

Bei der Vorinkubation mit verschiedenen Inhibitoren zeigt sich, dass die Aktivität von rekombinanter Caspase 3A mit Caspase-3-Inhibitor DEVD-CHO und Caspase-1-Inhibitor YVAD-CHO nicht gehemmt wird (Abb. 10a+11a). Der universelle Caspase-Inhibitor zVAD-fmk dagegen hemmte die Spaltung beider Substrate. Auch für N-terminal GST-getaggte Caspase 3A wurde die Aktivität von Procaspase und PL mit dem selben Inhibitorprofil nachgewiesen (vgl. Diplomarbeit, G. Zenner, 2001).

Um die Menge nachgewiesener Caspase-Aktivität mit den Proteinsubstraten zEK(bio)D-aomc und FITC-VAD-fmk besser einschätzen zu können, wurde die Empfindlichkeit beider active-site-Markierungen getestet. Dafür wurde 60 ng lösliche C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggte Caspase 3A (Bakterienlysate) mit zEK(bio)D-aomc bzw. FITC-VAD-fmk inkubiert und anschließend verschiedene Verdünnungen der Assays auf einem Western-Blot mit Streptavidin, anti-FITC- und anti-3A-Antikörper aus Kaninchen analysiert.

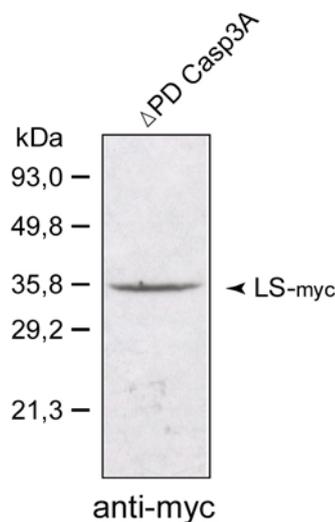


**Abb. 12a-c:** Empfindlichkeit der active-site-Markierungen mit zEK(bio)D-aomc und FITC-VAD-fmk, untersucht mit löslicher Caspase 3A (Bakterienlysat)

Abbildung 12a-c zeigt, dass der Assay mit FITC-Substrat eine höhere Empfindlichkeit als der mit zEK(bio)D-aomc besitzt. Mit anti-FITC-Antikörper können bis zu 0,3 ng aktive Caspase nachgewiesen werden (Abb. 12a), während mit Streptavidin maximal 1,2 ng aktive Caspase 3A erkannt werden (Abb. 12b). Der anti-3A-Antikörper aus Kaninchen weist bis zu 0,6 ng Caspase 3A nach (Abb. 12c).

### 3.1.2.3 Prozessierung und Aktivität von Caspase 3A ohne Prodomäne

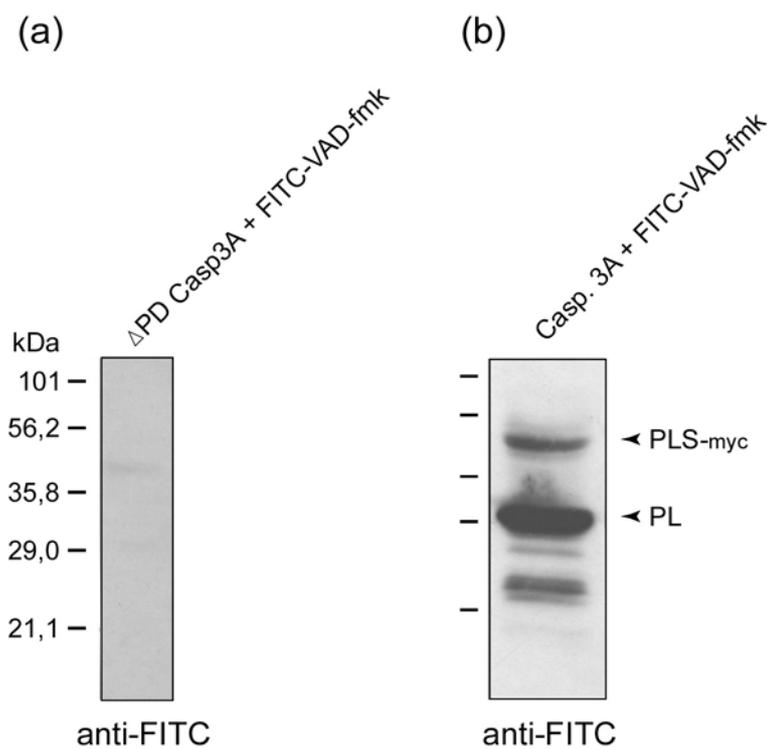
Es wurde gezeigt, dass bei Aktivierung von rekombinanter Caspase 3A keine Spaltung zwischen Prodomäne und großer Untereinheit erfolgt. Um die Rolle der Prodomäne genauer zu untersuchen, wurde Caspase 3A ohne Prodomäne ( $\Delta$ PD Casp3A) mit einem carboxyterminalen myc-(His)<sub>6</sub>-Tag in *E. coli* exprimiert.



**Abb. 13:** lösliche, C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggte Caspase 3A ohne Prodomäne (Bakterienlysat)

Abbildung 13 zeigt lösliche  $\Delta$ PD Casp3A, detektiert mit anti-myc-Antikörper. Bei der 35-kD-Bande handelt es sich um die Procaspase 3A ohne Prodomäne mit einer berechneten Größe von 32,9 kD inklusive Tag (vgl. Abb. 6).

Es fehlt jedoch die 22-kD-Bande der kleinen Untereinheit, die bei der Expression des Volllängen-Proteins deutlich zu sehen ist (vgl. Abb. 7a). Das bedeutet, dass sich Caspase 3A ohne Prodomäne nicht selbst prozessiert. Die Prodomäne ist also zur autokatalytischen Prozessierung der Procaspase 3A essentiell. Eine active-site-Markierung von löslicher, ungereinigter  $\Delta$ PDCasp3A mit FITC-VAD-fmk zeigt, dass Procaspase 3A ohne Prodomäne keine enzymatische Aktivität besitzt (Abb. 14a).



**Abb. 14a+b:** Untersuchung der Enzymaktivität von C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggtter  $\Delta$ PDCasp3A und Caspase 3A mit FITC-VAD-fmk

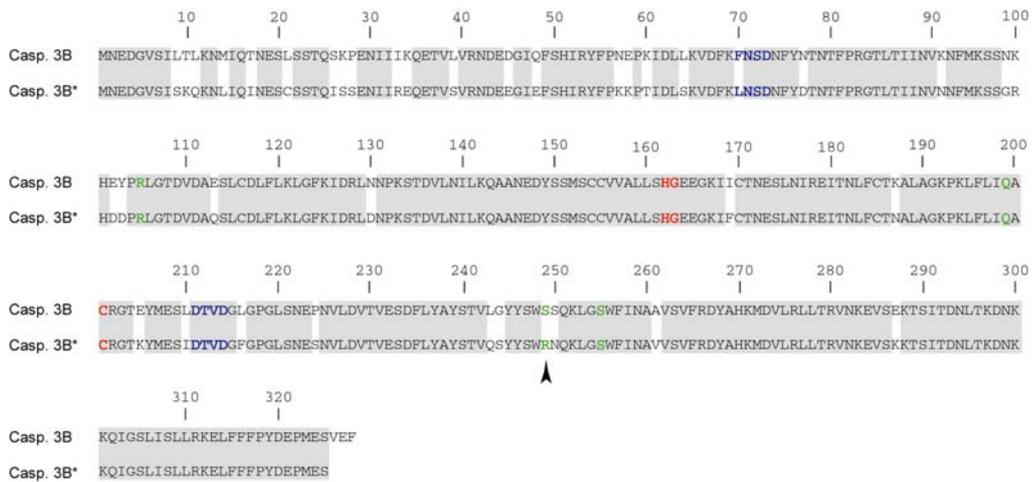
Man erkennt mit anti-FITC-Antikörper keine Bande, die aktiver  $\Delta$ PDCasp3A entspricht. Im Gegensatz dazu findet man bei Wildtyp Caspase 3A mit anti-FITC-Antikörper zwei prominente Banden bei 46 und 29 kD, die aktiver Procaspase 3A und PL entsprechen (Abb. 14b). Bei den Banden zwischen 27 kD und 20 kD handelt es sich um unspezifische Abbauprodukte von Caspase 3A, die Aktivität besitzen.

### **3.1.3 Enzymatische Eigenschaften der Caspasen 3B und 3B\* in *E. coli***

#### **3.1.3.1 Eine neue DNA-Sequenz für Caspase 3B: Caspase 3B\***

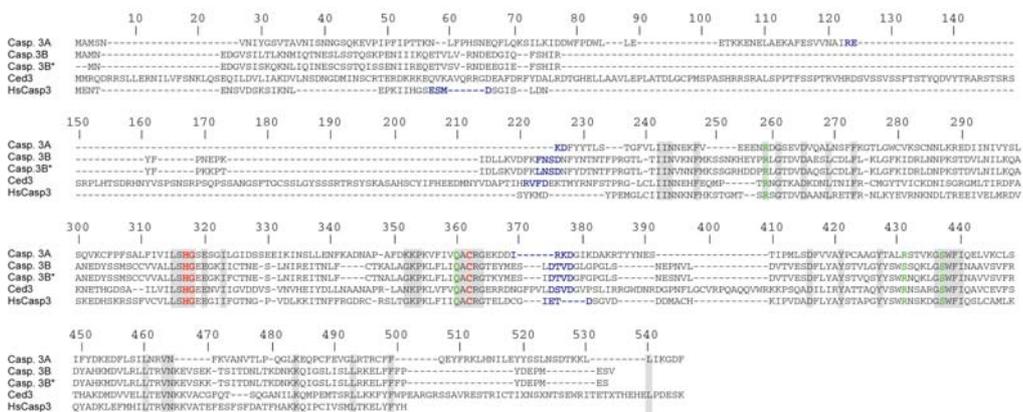
Wie Caspase 3A wurden auch 3B und 3B\* in *E. coli* exprimiert, um deren biochemische Eigenschaften zu klären.

Bei Caspase 3B\* handelt es sich um eine neu identifizierte Caspase-Sequenz, die der von Cikala veröffentlichten DNA-Sequenz von Caspase 3B äußerst ähnlich ist (Cikala *et al.*, 1999). Cikala *et al.* hatten durch PCR mit degenerierten Primern, die konservierte Sequenzen aus humaner Caspase-3 und Ced-3 aus *C. elegans* enthielten, aus Hydra cDNA zwei kurze Sequenzen isoliert. Deren kompletter, offener Leserahmen wurde anschließend durch Screenen einer Hydra-cDNA Bibliothek (*H. vulgaris*,  $\lambda$  ZAPII cDNA Bibliothek) erhalten. Die beiden Caspasen wurden als Caspase 3A und 3B bezeichnet. Zur Kontrolle wurden Primer gegen Caspase 3B hergestellt und aus Hydra hergestellte cDNA mit RT PCR gescreent. Der Screen wurde freundlicherweise von Frau Beate Stiening durchgeführt. Dabei wurde trotz mehrmaliger Wiederholung mit verschiedenen Primern immer eine Sequenz erhalten, die nicht der ursprünglich veröffentlichten Caspase 3B entsprach, welche in der cDNA-Bibliothek gefunden worden war. Diese Sequenz ist Caspase 3B sehr ähnlich und wird im Folgenden als Caspase 3B\* bezeichnet. Es wurde in Hydra cDNA kein Transkript von Caspase 3B gefunden. Daher muss es sich bei der in der Gen-Bibliothek gefundenen Caspase 3B um ein Artefakt handeln, das *in vivo* nicht transkribiert wird. Ein Vergleich der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen der Caspasen 3B und 3B\* ist in Abbildung 15 gezeigt.



**Abb. 15:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hydra-Caspasen 3B und 3B\* (blau: Prozessierungsstellen, rot: aktives Zentrum, grün: AS, beteiligt an Substratstabilisation)

Die Sequenz-Analyse zeigt, dass Caspase 3B\* ebenfalls für eine typische Pro-caspase codiert, die aus einer Pro-domäne, einer großen und einer kleinen Untereinheit besteht. Die Aminosäuresequenz beider Caspasen sind zu 88 % identisch. Die vorhergesagten Prozessierungsstellen zwischen großer und kleiner Untereinheit sind in beiden Caspasen gleich. Die putativen Schnittstellen zwischen Pro-domäne und großer Untereinheit unterscheiden sich nur in einer Aminosäure. Jedoch enthält Caspase 3B\* im Gegensatz zu 3B an Position 249 ein Arginin.



**Abb. 16:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der Hydra-Caspasen 3A, 3B, 3B\* mit *Ced-3* aus *C. elegans* und humaner Caspase-3

Beim Sequenzvergleich mit den verwandten Caspasen 3A, Ced-3 aus *C. elegans* und humaner Caspase 3 (Abb. 16) wird deutlich, dass diese Caspasen an der entsprechenden Stelle ebenfalls einen Arginin-Rest besitzen. Dieser ist an der Bindung des Caspase-Substrats beteiligt (Wilson *et al.*, 1994). Caspase 3B\* ist also in Bezug auf Arg 249 den verwandten Caspasen ähnlicher als Caspase 3B. Da außerdem die ursprüngliche DNA-Sequenz von 3B in Hydra nicht gefunden werden konnte, gehen wir davon aus, dass Caspase 3B\* und nicht 3B neben Caspase 3A die zweite aktive Caspase in Hydra ist.

### 3.1.3.2 Expression der Caspasen 3B und 3B\* in *E. coli*

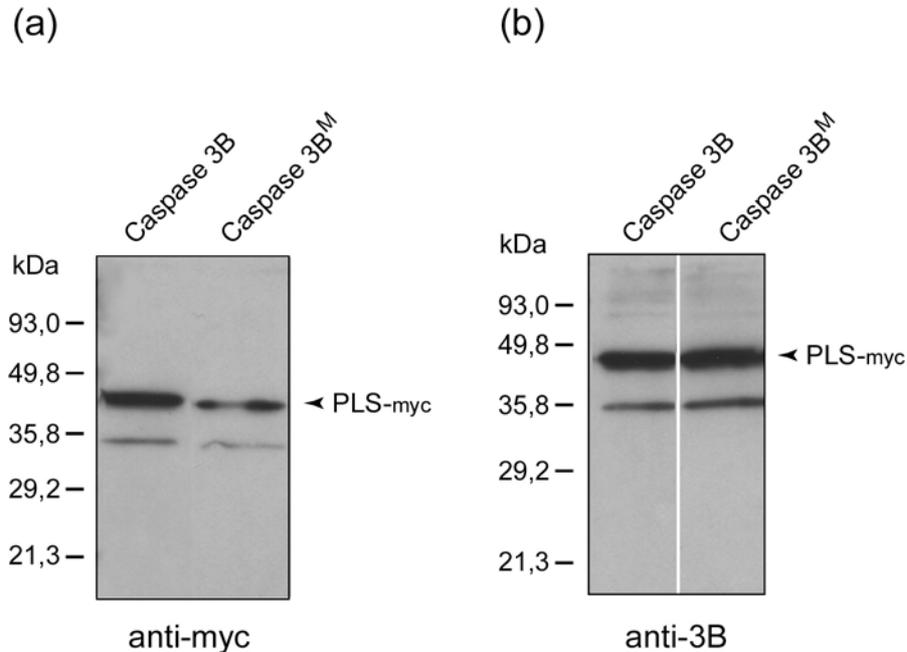
Nach Herstellung des Antikörpers wurden die rekombinanten Caspasen 3B und 3B\* biochemisch untersucht. Caspase 3B wurde in die Experimente mit einbezogen, da der anti-3B-Antikörper gegen diese Caspase gerichtet ist und außerdem zum Zeitpunkt der Experimente noch nicht bekannt war, dass Caspase 3B nicht transkribiert wird. Die berechneten Größen der Caspasen 3B und 3B\* und deren Prozessierungsprodukte sind in Abbildung 17 gezeigt.

	<b>Caspase 3B</b>	<b>Caspase 3B*</b>
<b>PL</b>	37,1 kD	36,8 kD
<b>P</b>	8,6 kD	8,4 kD
<b>L</b>	15,8 kD	15,7 kD
<b>S</b>	12,7 kD	12,8 kD
<b>PL</b>	24,4 kD	24,1 kD
<b>LS</b>	28,5 kD	28,5 kD
<b>(His)<sub>6</sub>-myc-Tag</b>	3 kD	

**Abb. 17:** Tab.3: Größen der Caspasen 3B und 3B\* und Untereinheiten

Die Caspasen 3B und 3B\* wurden mit einem carboxyterminalen myc-(His)<sub>6</sub>-Tag in *E. coli* exprimiert. Zusätzlich wurden im aktiven Zentrum mutierte Caspasen 3B<sup>M</sup> und 3B\*<sup>M</sup> mit dem selben Tag exprimiert.

Bei diesen Mutanten befindet sich anstelle des Cysteins an Position 201 ein Serinrest.



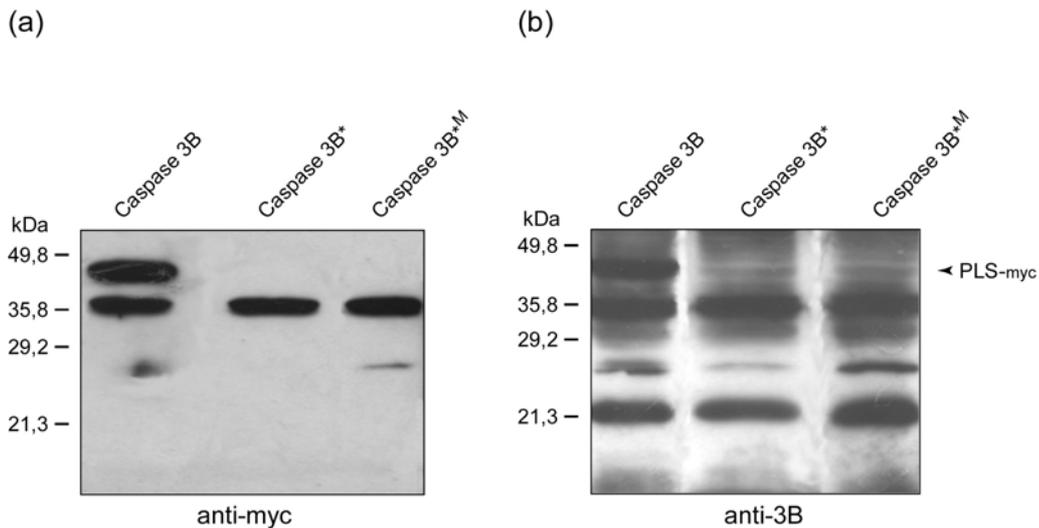
**Abb. 18a+b:** native, gereinigte, C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggte Wildtyp-, bzw. mutierte Caspase 3B

Abbildung 18a zeigt einen Western-Blot von nativer, gereinigter Caspase 3B und 3B<sup>M</sup>, der mit anti-myc-Antikörper analysiert wurde. Bei beiden Proben sind zwei deutliche Banden zu sehen: Die oberste Bande ist etwa 46 kD groß und stellt die Procaspase 3B (PLS) mit einer berechneten Größe von 40,1 kD inklusive Tag dar. Die tatsächliche Größe des rekombinanten Proteins ist also wie bei Caspase 3A auf einem SDS-Gel größer als die vorhergesagte Größe. Die zweite Bande hat eine Größe von 35 kD. Dieses Proteinfragment ist durch die Aktivität bakterieller Proteasen und nicht durch autoproteolytische Aktivität von Caspase 3B entstanden, da es auch bei der inaktiven Mutante zu sehen ist.

Auch mit anti-3B-Antikörper lässt sich kein Hinweis auf proteolytische Aktivität von Caspase 3B finden (Abb. 18b).

Dieser Antikörper erkennt dieselben beiden Banden und es gibt keinen Unterschied zwischen Wildtyp und mutierter Caspase 3B.

Für rekombinante Caspase 3B\* erhält man ein ähnliches Ergebnis:



**Abb. 19a+b:** Lösliche Wildtyp-, bzw. mutierte C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggte Caspase 3B\* und Wildtyp 3B (Bakterienlysate)

Ein Western-Blot von ungereinigter, löslicher Caspase 3B\* und 3B\*<sup>M</sup> zeigt mit anti-myc-Antikörper eine prominente Bande bei etwa 35 kD (Abb. 19a). Bei Caspase 3B gibt es eine entsprechende Bande gleicher Größe. Es kann sich bei dieser Bande nicht um ein Proteinfragment handeln, das durch Autoproteolyse von Caspase 3B\* entstanden ist, da es bei der inaktiven Mutante ebenfalls zu sehen ist. Ein Volllängen-Enzym von Caspase 3B\* bzw. 3B\*<sup>M</sup> wird mit anti-myc-Antikörper nicht erkannt. Offensichtlich werden die rekombinanten Caspasen 3B\* und 3B\*<sup>M</sup> in *E. coli* am N-terminalen Ende proteolytisch abgebaut. Eine Ursache hierfür könnten die beiden Leucin-Reste an Pos 63 (vgl. Abb. 15) sein, die ein Angriffspunkt für bakterielle Proteasen sein könnten und in Caspase 3B nicht existieren.

Abbildung 19b zeigt, dass anti-3B-Antikörper mit Caspase 3B\* ebenfalls reagiert. Dies liegt an der äußerst ähnlichen Aminosäuresequenz von Caspase 3B und 3B\*.

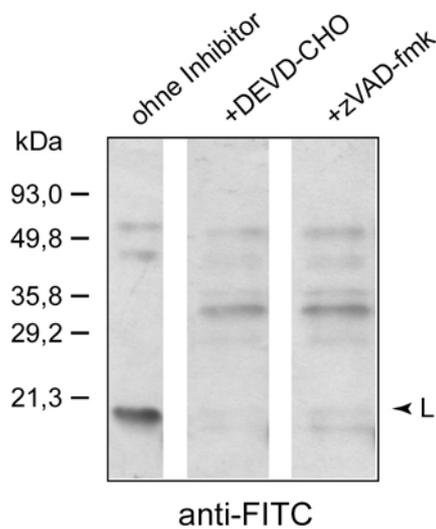
Bei einer Detektion mit anti-3B, der empfindlicher als anti-myc-Antikörper ist, ist eine schwache Bande bei 46 kD sichtbar, die einer geringen Menge an Vollängen-Enzym von Caspase 3B\* entspricht. Die Banden von Caspase 3B\* zwischen 35 kD und 20 kD stellen Abbauprodukte von Caspase 3B\* dar, die durch bakterielle Proteasen entstanden sind, da sie bei der Mutante ebenfalls zu sehen sind.

### **3.1.3.3 Enzymatische Aktivität der rekombinanten Caspasen 3B und 3B\***

In bisherigen Versuchen hatten die rekombinanten Caspasen 3B und 3B\* keine autoproteolytische Aktivität gezeigt. Um zu untersuchen, ob die beiden Caspasen tatsächlich enzymatisch inaktiv sind oder sich nur nicht selbst prozessieren können, wurde die Aktivität mit Caspase-Substrat FITC-VAD-fmk getestet. Es konnte jedoch für lösliche, rekombinante Caspasen 3B bzw. 3B\* keine Aktivität nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

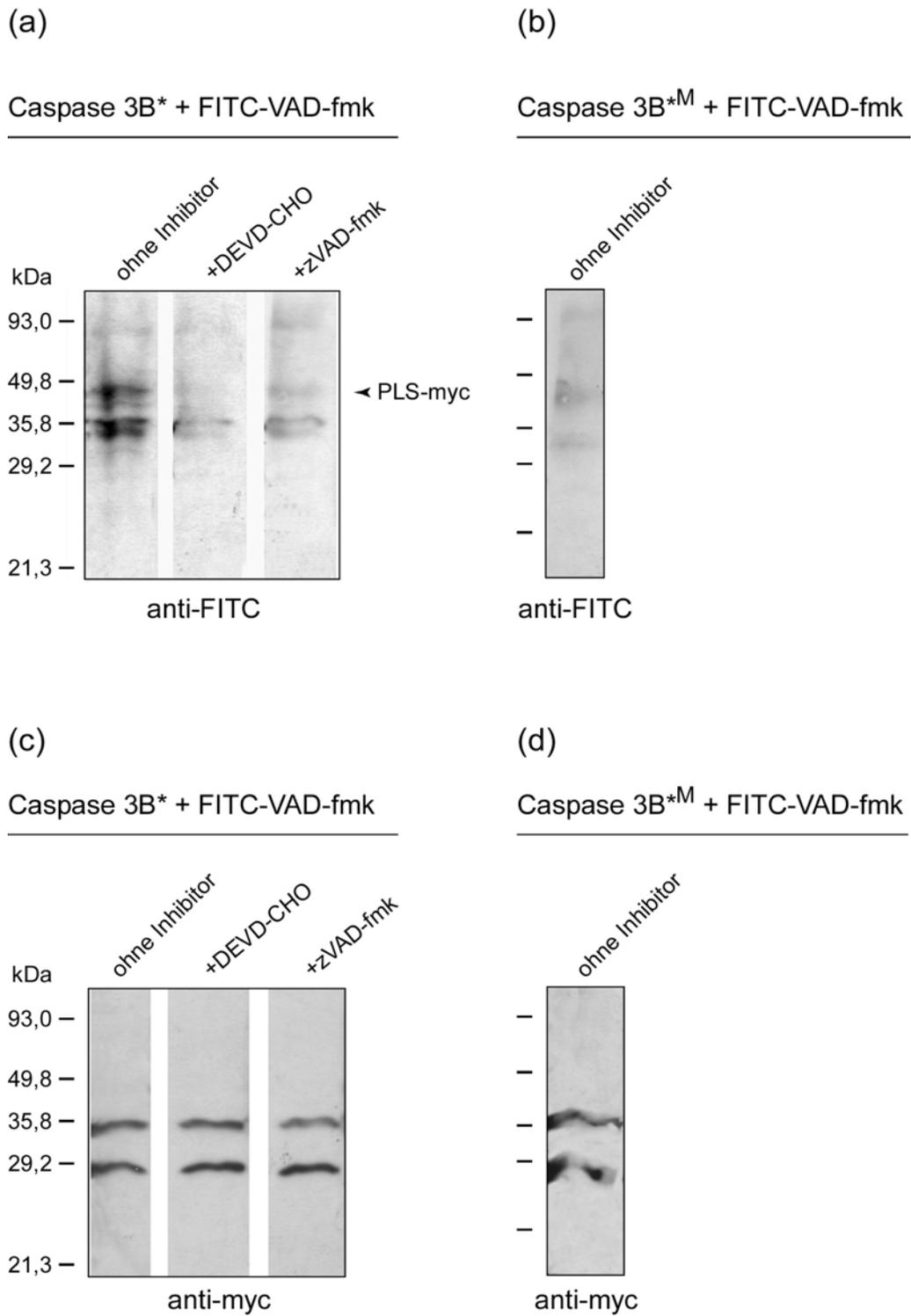
Die Caspasen 3B und 3B\* werden bei der Expression in *E. coli* in inclusion bodies verpackt und befinden sich nach Bakterien-Aufschluss zum größten Teil im unlöslichen Pellet. Bei Kontrollexperimenten mit Flag-getaggten Ced-3 aus *C. elegans* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Barbara Conradt, MPI, München), das nach Expression in *E. coli* ebenfalls unlöslich ist, wurde gezeigt, dass FITC-Markierung im unlöslichen Pellet möglich ist.

## Ced-3-Flag + FITC-VAD-fmk



**Abb. 20:** active-site-Markierung von unlöslichem Ced-3-Flag (von Barbara Conradt, MPI, München) mit FITC-VAD-fmk

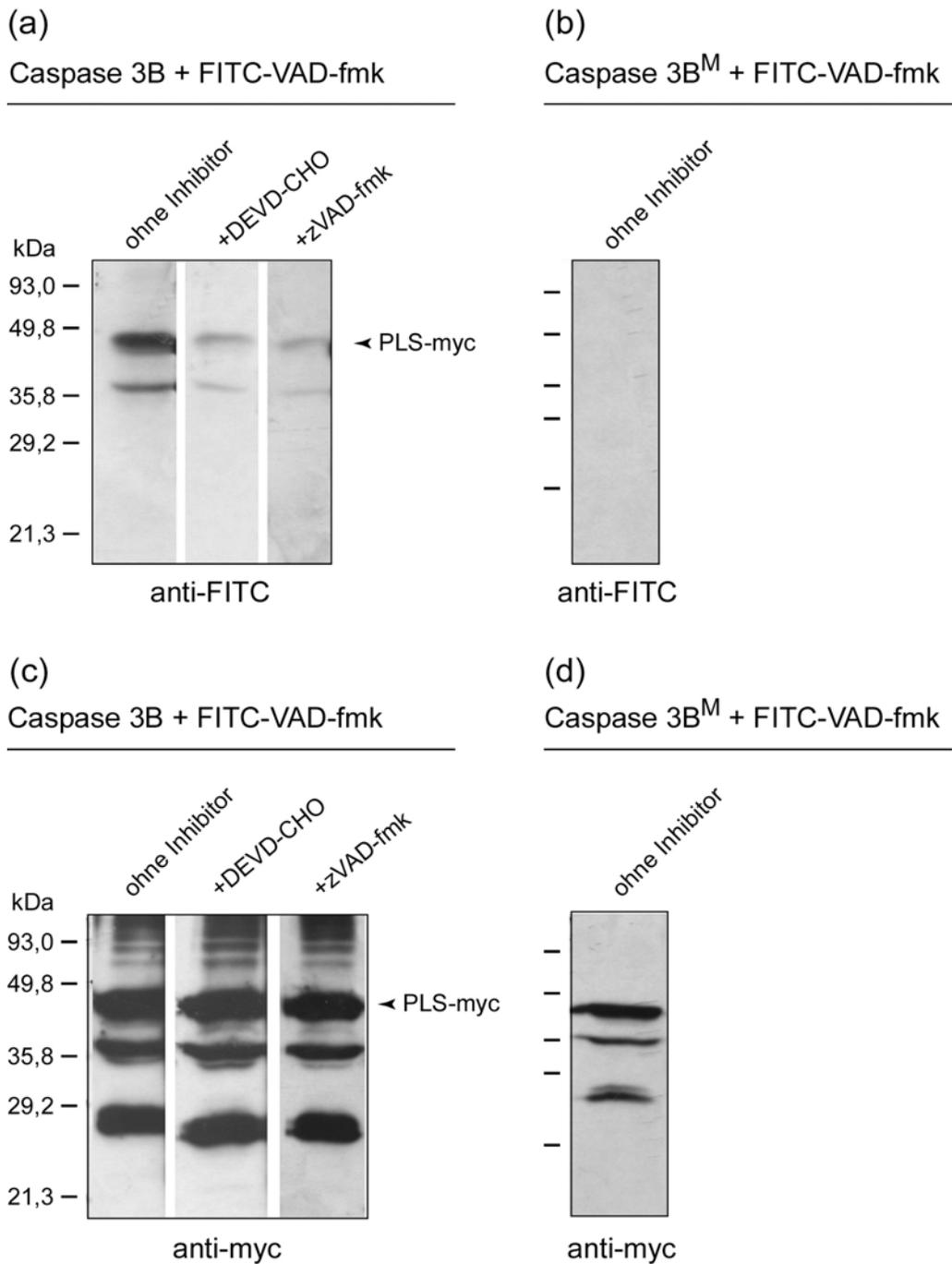
Abbildung 20 zeigt die markierte, große Untereinheit von Ced-3 mit einer berechneten Größe von 17 kD (Xue *et al.*, 1996). Die Aktivität wurde spezifisch mit DEVD-CHO und zVAD-fmk gehemmt. Da diese active-site-Markierung, die normalerweise mit löslichem Protein durchgeführt wird, erfolgreich mit unlöslichem Ced-3 ausgeführt worden war, wurde die Aktivität von Caspase 3B\* und 3B nochmals mit unlöslichen, rekombinanten Protein untersucht. Dafür wurde Wildtyp und inaktive Mutante in einer 2 l Bakterienkultur exprimiert und nach Aufschluß der Bakterien und Zentrifugation das unlösliche, konzentrierte Pellet mit FITC-VAD-fmk inkubiert. Um ein Hemmprofil der Aktivität zu erstellen, wurde Caspase 3B\* vor Zugabe des Substrats mit den Inhibitoren DEVD-CHO oder zVAD-fmk vorbehandelt.



**Abb. 21a-d:** active-site-Markierung von unlöslicher, C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggtter Caspase 3B\* und 3B<sup>M</sup> mit FITC-VAD-fmk

Die Analyse des Western-Blots mit anti-FITC-Antikörper zeigt für Caspase 3B\* ein markiertes Fragment von etwa 46 kD, das dem Vollängen-Enzym 3B\* (PLS) entspricht (Abb. 21a). Wie auf Abbildung 21c deutlich wird, wird PLS mit anti-myc-Antikörper nicht detektiert, da dieses wie beschrieben stark proteolytisch abgebaut wird. Anti-FITC-Antikörper ist jedoch empfindlicher als anti-myc-Antikörper und kann daher auch geringe Mengen an PLS erkennen. Ebenfalls mit FITC-VAD-fmk markiert sind zwei Abbauprodukte bei 35 kD und 36 kD. Sämtliche, markierte Banden fehlen bei mutierter Caspase 3B\*<sup>M</sup> (Abb. 21b). Demzufolge ist Procaspase 3B\* enzymatisch aktiv. Wie auf Abbildung 21a außerdem zu erkennen ist, hemmen sowohl zVAD-fmk als auch DEVD-CHO die Aktivität.

Auch für rekombinante Caspase 3B lässt sich mit FITC-VAD-fmk Aktivität nachweisen.



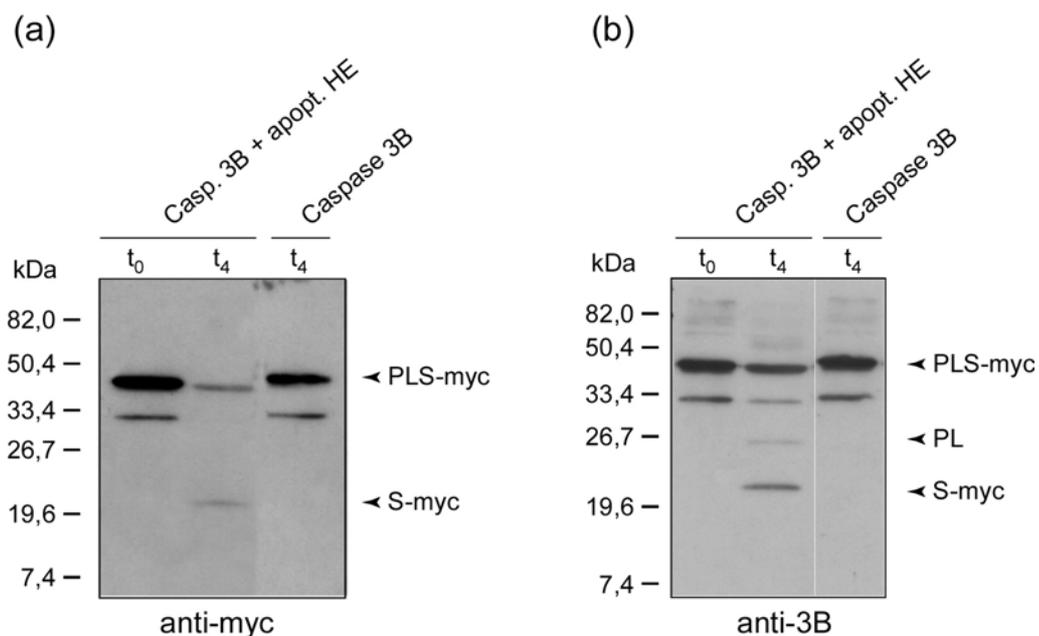
**Abb. 22a-d:** active-site-Markierung von unlöslicher, C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggtter Caspase 3B und 3B<sup>M</sup> mit FITC-VAD-fmk

Abbildung 22a zeigt eine markierte Bande bei 46 kD, die Procaspase 3B (PLS) entspricht und auch von anti-myc-Antikörper erkannt wird (Abb. 22c). Mutierte Caspase 3B<sup>M</sup> ist inaktiv (Abb.22b).

Außerdem mit FITC-VAD-fmk markiert und deshalb aktiv ist das ca. 35 kDa große Abbauprodukt von Caspase 3B. Eine Vorbehandlung mit Caspase-Inhibitoren ergab für Caspase 3B dasselbe Hemmprofil wie für 3B\* (Abb. 22a): Die Aktivität wird durch DEVD-CHO und zVAD-fmk gehemmt. Da die Caspasen 3B und 3B\* sehr ähnliche Aminosäuresequenzen aufweisen, ist es durchaus möglich dass beide rekombinanten Caspasen die selbe spezifische Enzymaktivität besitzen.

### 3.1.3.4 Prozessierung der rekombinanten Caspasen 3B und 3B\* in apoptotischen Hydra-Extrakt

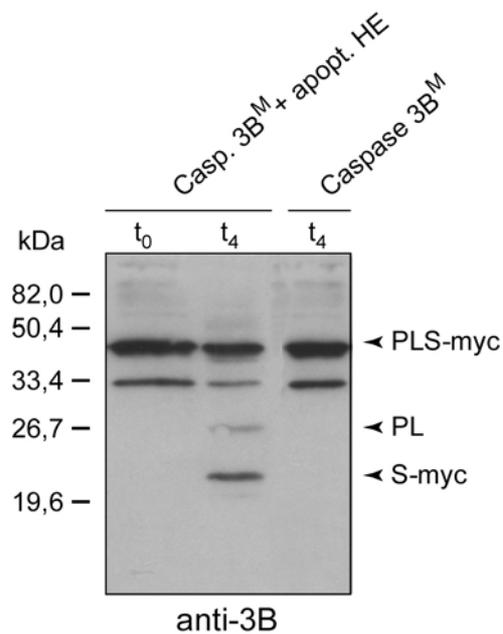
Die rekombinanten Procaspasen (PLS) 3B und 3B\* zeigen enzymatische Aktivität. Beide Caspasen prozessieren sich in *E. coli* jedoch nicht selbst. Um zu testen, ob die Autoprozessierung von cytoplasmatischen Faktoren abhängt, wurden die C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggten Procaspasen mit Extrakt aus Hydren, in denen mit Colchizin Apoptose induziert worden war für 3-4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf einem Western-Blot analysiert.



**Abb. 23a+b:** Prozessierung von nativer, gereinigter, C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggter Caspase 3B in apoptotischen Hydraextrakt

Abbildung 23a zeigt das Ergebnis einer Inkubation von gereinigter, nativer Caspase 3B in apoptotischen Extrakt. Caspase 3B wird nach 4 h im Hydraextrakt gespalten. Es wurde mit anti-myc-Antikörper neben PLS bei 46 kD eine etwa 22 kD große Bande nachgewiesen. Bei diesem Fragment handelt es sich um die kleine Untereinheit S-myc mit einer berechneten Größe von 15,7 kD inklusive Tag. Zur Kontrolle der Stabilität von Caspase 3B wurde eine Probe, die lediglich das Proenzym enthielt für 4 h inkubiert. Es fand keine Abspaltung des 22 kD-Fragments statt.

Eine Analyse des Blots mit anti-3B-Antikörper zeigt eine zusätzliche, ungetaggte Bande von etwa 27 kD (Abb. 23b). Es handelt sich hierbei um das Gegenstück zur abgespaltenen, kleinen Untereinheit, also PL mit einer berechneten Größe von 24,4 kD. Die Tatsache, dass dieses Fragment von anti-3B-Antikörper erkannt wird, zeigt wie erwähnt, dass der Antikörper nicht nur mit (His)<sub>6</sub>-getaggtten Proteinen, sondern auch spezifisch mit Caspase 3B reagiert. Prodomäne und große Untereinheit von Caspase 3B werden nicht voneinander getrennt, da keine zusätzlichen Fragmente sichtbar sind, die diesen Untereinheiten entsprechen. Die Inkubation von apoptotischen Extrakt mit ungereinigter Caspase 3B oder mit denaturierter, gereinigter Caspase 3B führte zum selben Ergebnis (nicht gezeigt). Ebenso wurde die inaktive Mutante von 3B in apoptotischen Hydraextrakt gespalten.

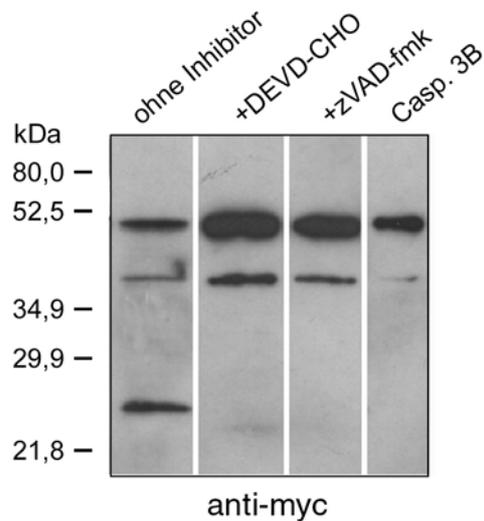


**Abb. 24:** Prozessierung von nativer, gereinigter, C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggtter Caspase 3B<sup>M</sup> in apoptotischen Hydraextrakt

Abbildung 24 zeigt nach Inkubation von nativer, gereinigter Mutante in apoptotischen Extrakt auf einem Western-Blot mit anti-3B-Antikörper die selben 24 kD und 22 kD großen Banden, die den Spaltprodukten entsprechen. Das bedeutet, dass die Prozessierung von Caspase 3B durch eine in vivo aktive Caspase und nicht durch von Hydraextrakt stimulierte Autoprocessing erfolgt.

Um die Spezifität der in vivo Caspase genauer zu untersuchen, wurde Extrakt von apoptotischen Hydren mit Caspase-Inhibitoren vorinkubiert, anschließend rekombinante Caspase 3B zugegeben und die Ansätze inkubiert.

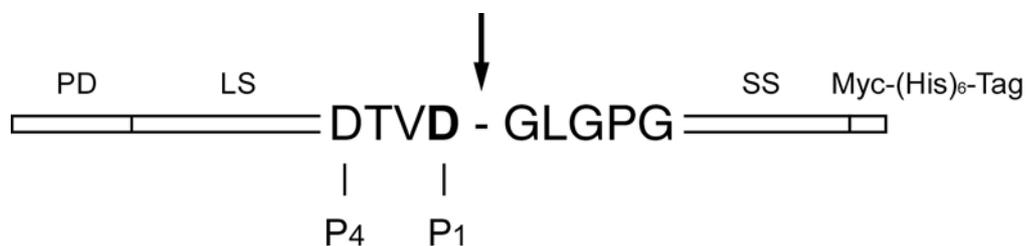
## Caspase 3B + apopt. Hydraextrakt



**Abb. 25:** Prozessierung von nativer, gereinigter, rekombinanter Caspase 3B in apoptotischen Hydraextrakt in Anwesenheit von Inhibitoren

Wie Abbildung 25 zeigt, wurde die Abspaltung des 22 kD-Fragments durch DEVD-CHO und zVAD-fmk gehemmt. Trotz Prozessierung von rekombinanter Caspase 3B, konnte weder mit zEK(bio)D-aomc noch mit FITC-VAD-fmk Aktivität der gespaltenen, Caspase nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Um die Spaltstelle zu identifizieren, wurde das 22 kD Fragment N-terminal sequenziert.



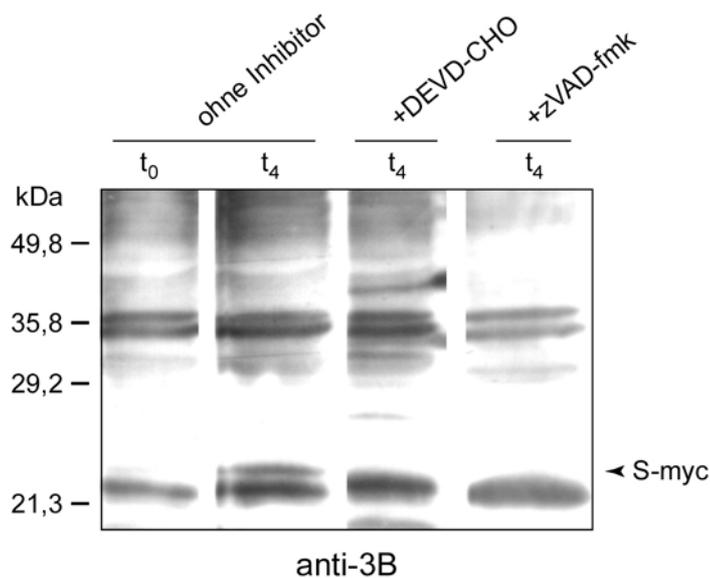
**Abb. 26:** AS-Sequenz der identifizierten Schnittstelle zwischen großer und kleiner Untereinheit von rekombinanter Procaspase 3B nach Inkubation in apoptotischen Hydraextrakt

Wie in Abbildung 26 gezeigt, liegt der N-terminale Rest des 22 kD-Fragments direkt neben einem Aspartatrest.

Die Schnittstelle befindet sich hinter der vermuteten Spaltstelle zwischen großer und kleiner Untereinheit. Die Tatsache, dass es sich bei dem 22 kD-Fragment tatsächlich um die kleine Untereinheit mit einer berechneten Größe von 15,7 kD inkl. Tag handelt, zeigt, dass rekombinante Caspase 3B und deren Bruchstücke auf einem SDS-Gel weitaus höher laufen als berechnet.

Nachdem bekannt war, dass die Sequenz von Caspase 3B in Hydra cDNA nicht existiert, wurde auch rekombinante Caspase 3B\* mit apoptotischen Hydraextrakt inkubiert und die Spezifität der Spaltung mit den Inhibitoren DEVD-CHO und zVAD-fmk untersucht.

#### Caspase 3B\* + apopt. Hydraextrakt



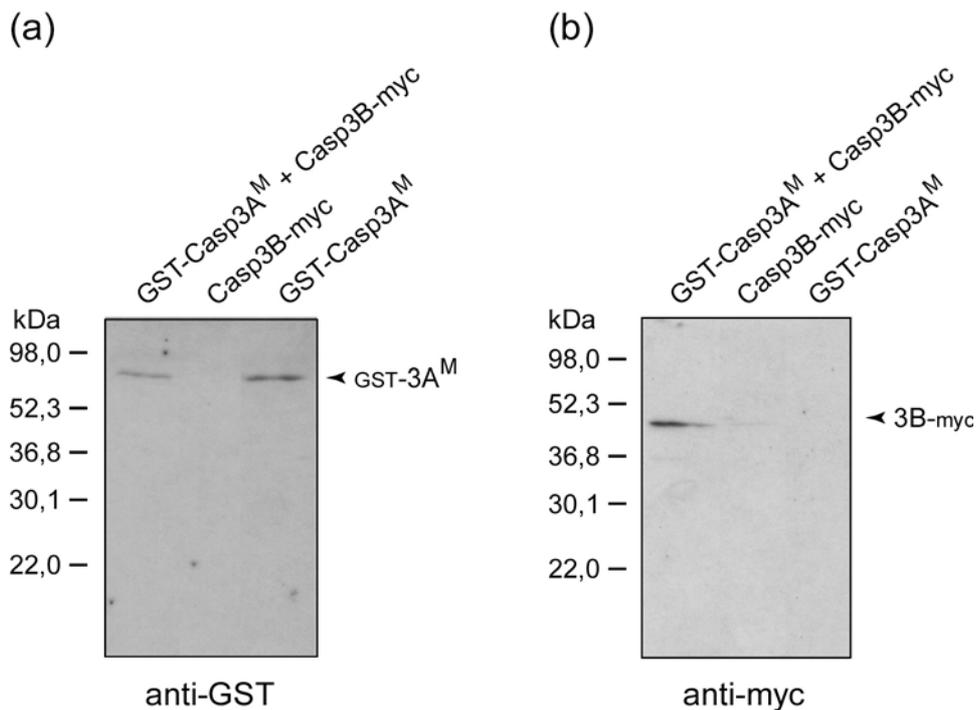
**Abb. 27:** Prozessierung von unlöslicher, C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggtter Caspase 3B\* (Bakterienlysate) in apoptotischen Hydraextrakt

Abbildung 27 zeigt, dass mit anti-3B-Antikörper ebenfalls das 22 kD-Fragment nachgewiesen wird. Die Bande, die dem zweiten Abbauprodukt entspricht, fehlt.

Dabei würde es sich um PL handeln, das aufgrund der N-terminalen Proteolyse von Caspase 3B\* verkürzt ist. Stattdessen gibt es eine Bande bei ca. 21 kD, die nach 4 h unabhängig von den Inhibitoren an Stärke zunimmt. Sie ist daher durch proteolytischen Abbau der rekombinanten Caspase 3B\* entstanden. Abbildung 27 zeigt, dass die Spaltung von Caspase 3B\* wie die von 3B von DEVD-CHO und zVAD-fmk gehemmt wird. Beide rekombinanten Caspasen werden also spezifisch von aktiver Caspase in vivo prozessiert. Wie für Caspase 3B konnte auch für 3B\* trotz Prozessierung keine Aktivität des gespaltenen Fragments nachgewiesen werden.

#### **3.1.4 Interaktion zwischen den rekombinanten Caspasen 3A und 3B**

Um zu prüfen, ob sich die beiden Caspasen 3A und 3B\* gegenseitig prozessieren, wurde die Interaktion und mögliche Prozessierung in vitro mit rekombinanten Caspasen 3A und 3B in Pull Down Experimenten untersucht. Diese Versuche wurden mit Caspase 3B und nicht mit 3B\* durchgeführt, da 3B\* zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert war. Es wurde GST-3A<sup>M</sup> mit Hilfe des GST-Tags an Glutathion-Sepharose gebunden. Dann wurde Caspase 3B-myc zur Probe gegeben. Interagiert Caspase 3B-myc mit an die Säule gebundenem GST-3A<sup>M</sup> wird dieses bei der anschließenden Zentrifugation copräzipitiert. Um dies zu prüfen, wurden die Proben auf einem Western-Blot mit den unterschiedlichen Antikörpern anti-myc und anti-GST analysiert.



**Abb. 28a+b:** Pulldown Experiment mit Glutathion-Sepharose: Copräzipitation von GST-3A<sup>M</sup> und 3B-myc

Abbildung 28a zeigt, dass GST-3A<sup>M</sup> an die Glutathion-Sepharose gebunden hat. Man erkennt mit anti-GST-Antikörper eine Bande bei 70 kD, die Procaspase GST-3A<sup>M</sup> entspricht. Außerdem wird deutlich, dass Caspase 3B-myc nicht mit Glutathion-Sepharose copräzipitiert wird (Abb. 28b, mittlere Spur). Wurde jedoch an Sepharose gebundene GST-3A<sup>M</sup> mit 3B-myc inkubiert, so ergibt sich nach anschließender Zentrifugation eine Copräzipitation von 3B-myc (Abb. 28a und b, 1. Spur). Man erkennt mit anti-myc-Antikörper eine Bande bei 46 kD, die Procaspase 3B-myc entspricht. Es wurde somit gezeigt, dass GST-3A<sup>M</sup> und 3B-myc *in vitro* interagieren. Auch für die umgekehrt markierten Moleküle, also 3A<sup>M</sup>-myc und GST-3B wurde Interaktion nachgewiesen (nicht gezeigt). Die Kontrollen, bei denen GST-3B und 3A<sup>M</sup>-myc mit Glutathion-Sepharose alleine inkubiert wurden, zeigten, dass nur GST-3B an die Sepharose gebunden hatte, und die Interaktion somit spezifisch war. Autoproteolytisch inaktive, rekombinante Caspase 3B wurde jedoch nicht prozessiert.

Die Interaktion mit Caspase 3A<sup>M</sup> führt also nicht zur Autoprocessing von 3B. Auch nach Inkubation von GST- oder myc-getaggtter Caspase 3B mit der jeweils anders getaggtten Caspase 3A konnte keine Prozessierung von rekombinanter Caspase 3B nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

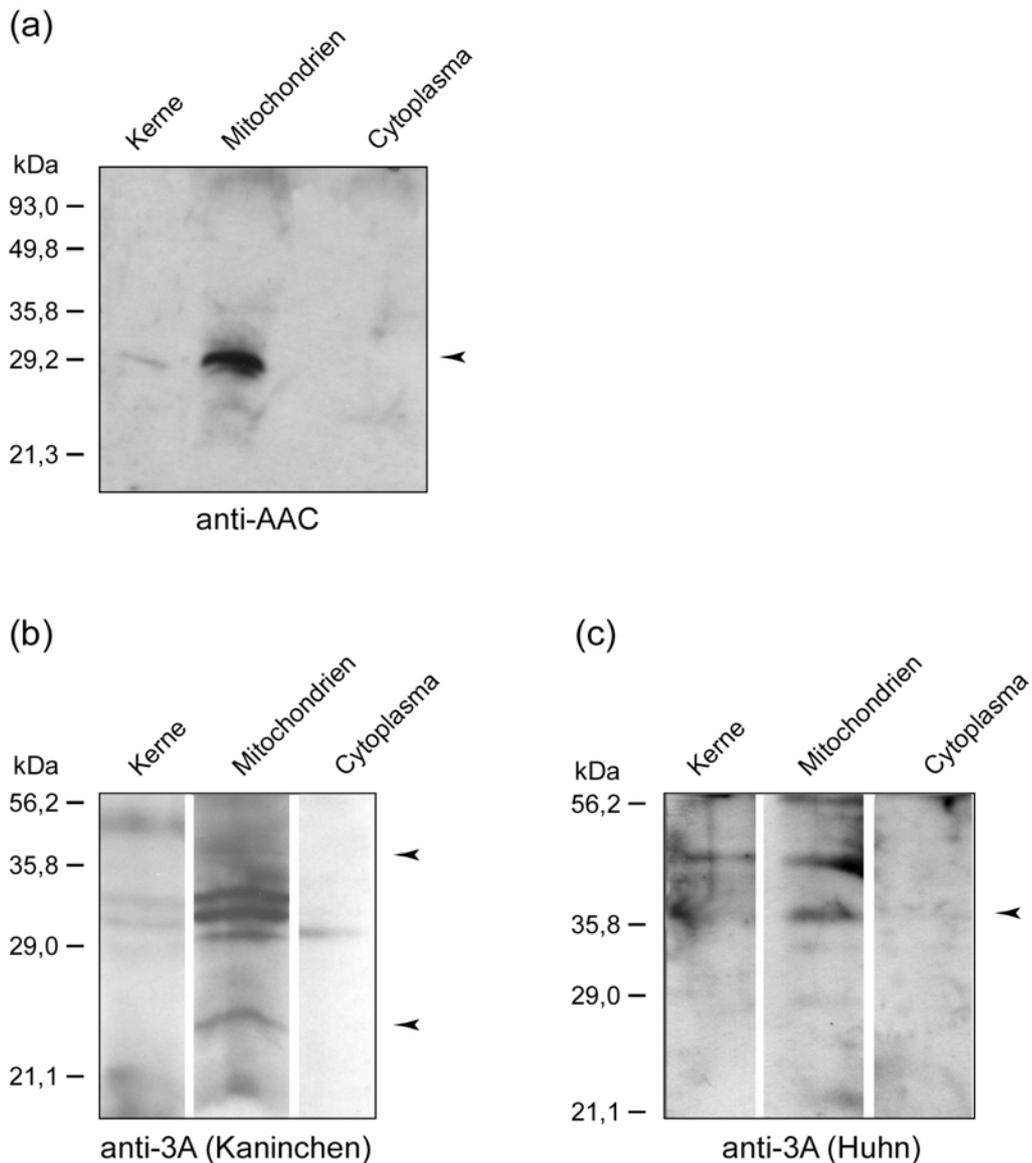
## **3.2 Hydra-Caspasen 3A und 3B\* in vivo**

### **3.2.1 Caspase 3A in vivo**

#### **3.2.1.1 Lokalisation und Aktivität von Caspase 3A**

Um festzustellen, ob in Hydra ein Zusammenhang zwischen Caspase-Aktivität und Apoptose besteht, wurden Lokalisation und Aktivität der Caspasen 3A und 3B\* in vivo untersucht.

Zunächst zu Caspase 3A: Um die Lokalisation von Caspase 3A in der Zelle zu untersuchen, wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt. Dafür wurden Hydren in isotonischem Puffer Dounce-homogenisiert und die einzelnen Zellbestandteile Kerne, Mitochondrien und Cytoplasma durch differentielle Zentrifugation voneinander getrennt. Die Qualität der Zellfraktionierung wurde mit dem Mitochondrien-spezifischen, polyklonalen anti-AAC Antikörper (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Johannes Herrmann, Adolf Butenandt-Institut, München) kontrolliert. Dieser Antikörper ist gegen einen ADP/ATP-Carrier in Mitochondrien von *Neurospora crassa* gerichtet und wurde in Kaninchen hergestellt.

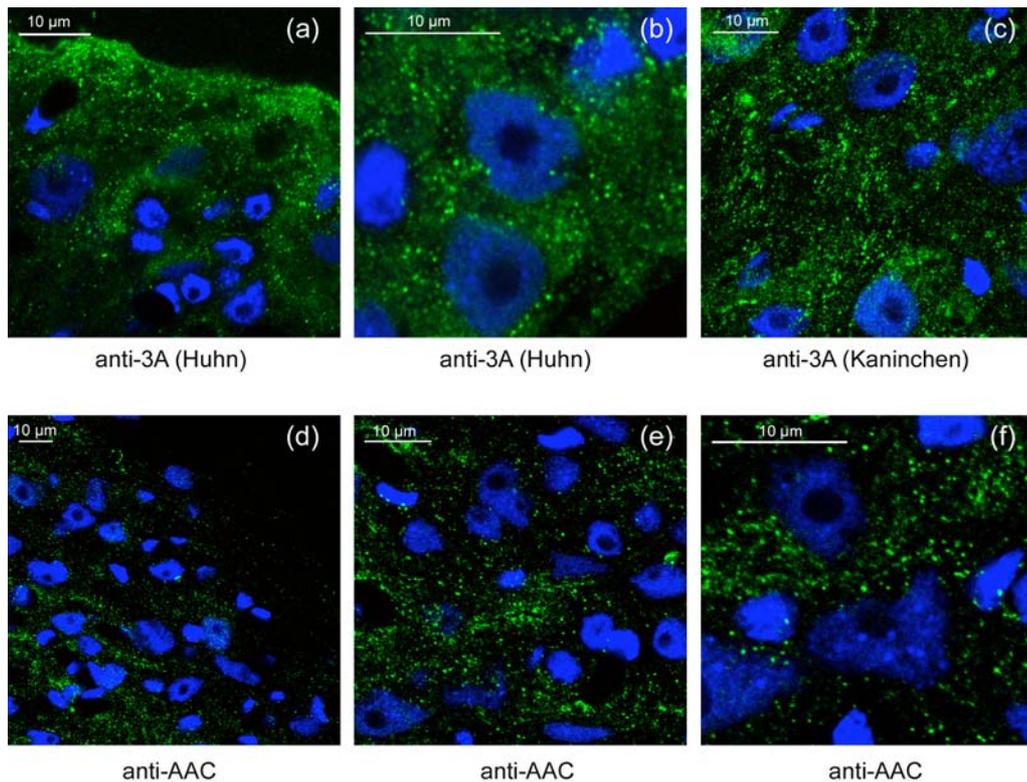


**Abb. 29a-c:** Subzelluläre Fraktionen von Hydren

Abbildung 29a zeigt die isolierten Fraktionen auf einem Western-Blot, analysiert mit anti-AAC-Antikörper. In *N. crassa* hat AAC eine berechnete Größe von 32 kD. Da dieser Carrier in verschiedenen Organismen stark konserviert ist (Loytynoja und Milinkovitch, 2001), geht man davon aus, dass es sich bei der sichtbaren 32-kD-Bande um Hydra-AAC handelt. Es zeigt sich, dass die einzelnen Zellfraktionen sehr sauber voneinander getrennt wurden, da AAC ausschließlich in der Mitochondrienfraktion nachgewiesen wird.

Die Analyse der Zellfraktionen mit anti-3A-Antikörper aus Kaninchen zeigt, dass Caspase 3A *in vivo* hauptsächlich in der Mitochondrienfraktion lokalisiert ist (Abb. 29b). Man erkennt in dieser Fraktion zwischen 36 kD und 29 kD mehrere Banden. Wir gehen davon aus, dass es sich bei diesen Proteinfragmenten um Abbauprodukte von Procaspase 3A mit einer berechneten Größe von 39,8 kD handelt, da diese Banden je nach Güte der Fraktionierung unterschiedlich stark erscheinen. Die 30-kD-Bande nimmt dabei zugunsten der oberen Banden an Intensität zu. Darüber hinaus entsprechen diese Abbauprodukte in ihrer Größe weder Procaspase 3A noch einem spezifischen Prozessierungsprodukt von 3A (vgl. Abb. 6). Abbildung 29b zeigt eine weitere etwa 25 kD große Bande. Dieses Proteinfragment entspricht PL von Caspase 3A mit einer berechneten Größe von 25,2 kD. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Caspase 3A *in vivo* auch ohne Induktion von Apoptose prozessiert wird und das Prozessierungsprodukt wie bei dem rekombinanten Enzym PL ist. Mit anti-3A-Antikörper aus Huhn weist man Caspase 3A ebenfalls in den Mitochondrien nach (Abb. 29c). Man erkennt eine etwa 36 kD große Bande, die Procaspase 3A entspricht. Die Abbauprodukte zwischen 29 und 35 kD und das 25 kD-Fragment werden mit diesem Antikörper nicht erfasst. Es ist möglich, dass die anti-3A-Antikörper aus Huhn und Kaninchen für unterschiedliche Epitope von Caspase 3A spezifisch sind und deshalb die Fragmente von 3A unterschiedlich gut nachweisen.

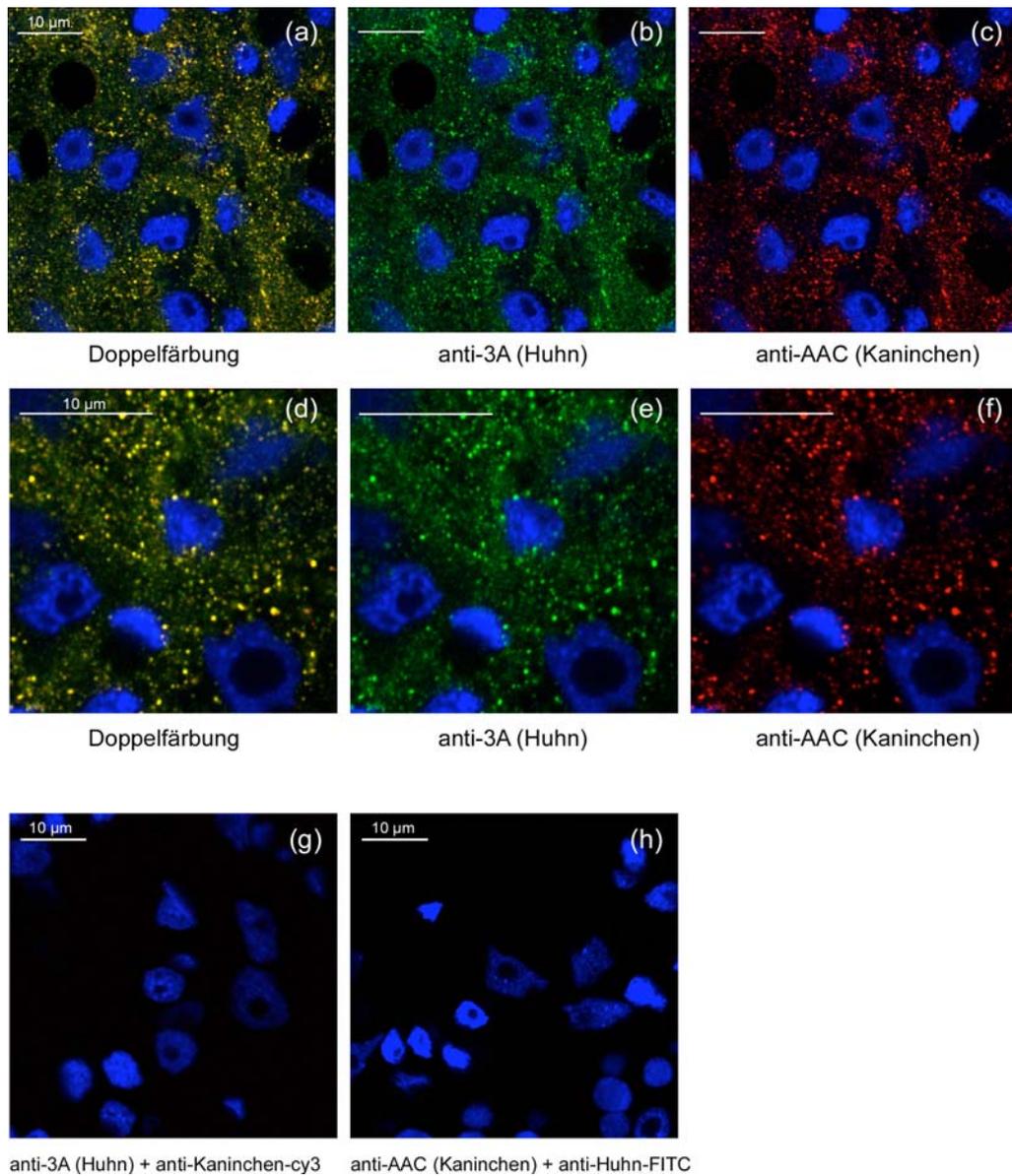
Um die Lokalisation von Caspase 3A in den Mitochondrien zu bestätigen, wurden zusätzlich Immunfärbungen von ganzen, fixierten Hydren mit anti-3A-Antikörper aus Huhn und Kaninchen durchgeführt. Als Zweitantikörper wurden FITC-gekoppelter anti-Huhn- bzw. anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Die Färbungen wurden am konfokalen Mikroskop visualisiert, wobei Bilder von einzelnen, optischen Schnitten durch die Zelle gemacht wurden.



**Abb. 30a-f:** Immunfärbungen von ganzen Hydren mit anti-3A- aus Huhn (a+b) und Kaninchen (c) und anti-AAC-Antikörper (d-f) als Erstantikörper und FITC-gekoppeltem Zweitantikörper, blau: DNA-Färbung, grün: Antikörper-Färbung

Abbildung 30 zeigt zwei verschiedene Vergrößerungen einer Färbung mit anti-3A-Antikörper aus Huhn (Abb. 30a+b) und eine Färbung mit anti-3A-Antikörper aus Kaninchen (Abb. 30c). Rot sind die mit DNA-Farbstoff gefärbten Zellkerne, grün die Caspase-Färbung dargestellt. Zu sehen ist ein punktförmiges, grünes Muster. Die Antikörperfärbung zeigt kleine ca. 1 µm große Partikel, die aufgrund ihrer Verteilung und Größe Mitochondrien entsprechen. Zum Vergleich wurde eine Färbung mit dem Antikörper gegen das Mitochondrienprotein AAC durchgeführt. Abbildung 30d-f zeigt, dass die Punkte in Form und Verteilung tatsächlich Mitochondrien entsprechen könnten.

Zum Beweis wurde eine Doppelfärbung mit anti-AAC-Antikörper aus Kaninchen und anti-3A-Antikörper aus Huhn durchgeführt.

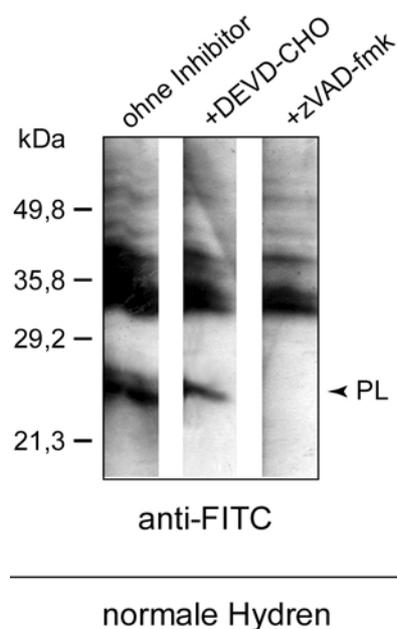


**Abb. 31a-h:** Doppelfärbungen von ganzen Hydren (a-f) mit anti-3A- aus Huhn (grün) und anti-AAC-Antikörper aus Kaninchen (rot), DNA-Färbung (blau). Gelbe Punkte weisen auf überlappende Strukturen hin. Kontrolle der Kreuzreaktion der Zweitantikörper mit den Immunglobulinen der jeweils anderen Art (g+h)

In Abbildung 31a-f ist Caspase 3A-Färbung in grün und AAC-Färbung in rot dargestellt. Die Doppelfärbung zeigt eine deutliche Überlappung der Strukturen, die mit den verschiedenen Antikörpern detektiert wurden (Abb. 31a+d). Die Kontrollfärbungen belegen, dass die Zweitantikörper gegen Huhn und Kaninchen nicht mit den Immunglobulinen der jeweils anderen Art kreuzreagieren (Abb. 31g+h).

Zellfraktionierung und Immunfärbung haben gezeigt, dass Caspase 3A in vivo in den Mitochondrien lokalisiert ist. Dabei fand man in der Mitochondrienfraktion mit anti-3A-Antikörper eine Bande bei 25 kD, die prozessierter, aktiver PL von Caspase 3A entspricht. Um die Identität dieser Bande genauer zu analysieren, wurden durch Zellfraktionierung Mitochondrien aus Hydra isoliert und diese in Gegenwart von Chaps mit Caspase-Substrat FITC-VAD-fmk inkubiert. Zusätzliche Proben wurden vor Zugabe des Substrats mit den Inhibitoren DEVD-CHO und zVAD-fmk vorbehandelt.

Mitochondrien Extrakt + FITC-VAD-fmk



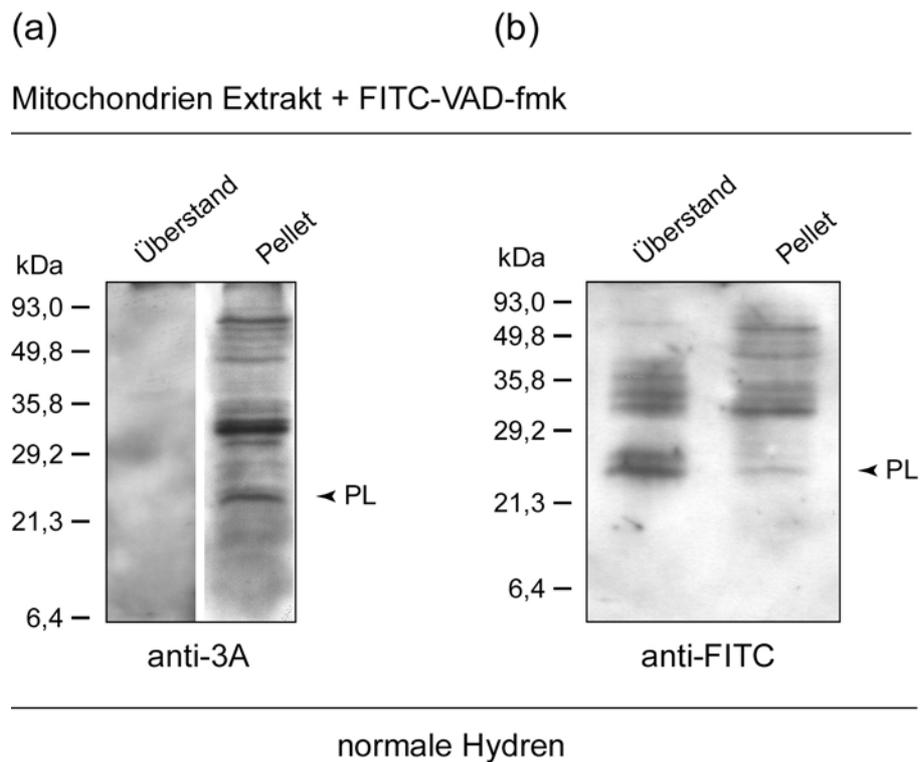
**Abb. 32:** active-site-Markierung der Mitochondrienfraktion mit FITC-VAD-fmk

Auf Abbildung 32 ist ein Western-Blot des Assays, analysiert mit anti-FITC-Antikörper dargestellt. Man erkennt eine Bande bei 25 kD, die PL mit einer berechneten Größe von 25,2 kD entspricht. Eine Behandlung mit Caspase3-spezifischen Inhibitor DEVD-CHO und dem universellen Caspase-Inhibitor zVAD-fmk macht deutlich, dass die Caspase-Aktivität nur mit zVAD-fmk, jedoch nicht mit DEVD-CHO gehemmt wird.

Das Hemmprofil der aktiven Caspase in Mitochondrien entspricht dem von rekombinanter Caspase 3A, deren enzymatische Aktivität ebenfalls nur mit zVAD-fmk gehemmt wurde (vgl. Abb. 10a + 11a). Darüber hinaus handelt es sich bei der 25 kD-Bande, die mit anti-FITC-Antikörper detektiert wird, um die gleiche Bande, die auch mit anti-3A-Antikörper in der Mitochondrienfraktion nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 29b). Bei den Banden zwischen 32 kD und 50 kD handelt es sich um unspezifische Reaktionen der Fluormethylketongruppe von FITC-VAD-fmk mit mitochondrialen Proteinen, da die Banden nicht gehemmt werden. Da mit anti-FITC-Antikörper kein Fragment detektiert werden konnte, das der großen Untereinheit mit einer berechneten Größe von 15,3 kD entspricht, gehen wir davon aus, dass Caspase 3A in vivo wie das rekombinante Enzym nicht zwischen Prodomäne und großer Untereinheit getrennt wird und die aktive Form aus Prodomäne und großer Untereinheit besteht.

Caspase 3A ist eine mitochondrial lokalisierte Caspase, die konstitutiv, also unabhängig von Apoptose aktiv ist. Die Aktivität ist nicht DEVD-spezifisch.

Um die Art der Bindung zwischen Mitochondrien und Caspase 3A genauer zu charakterisieren, wurden durch differentielle Zentrifugation isolierte Mitochondrien wie oben in Gegenwart von Chaps mit FITC-VAD-fmk inkubiert, zentrifugiert und Überstand und Pellet getrennt voneinander auf einem Western-Blot mit anti-FITC- und anti-3A Antikörper analysiert.

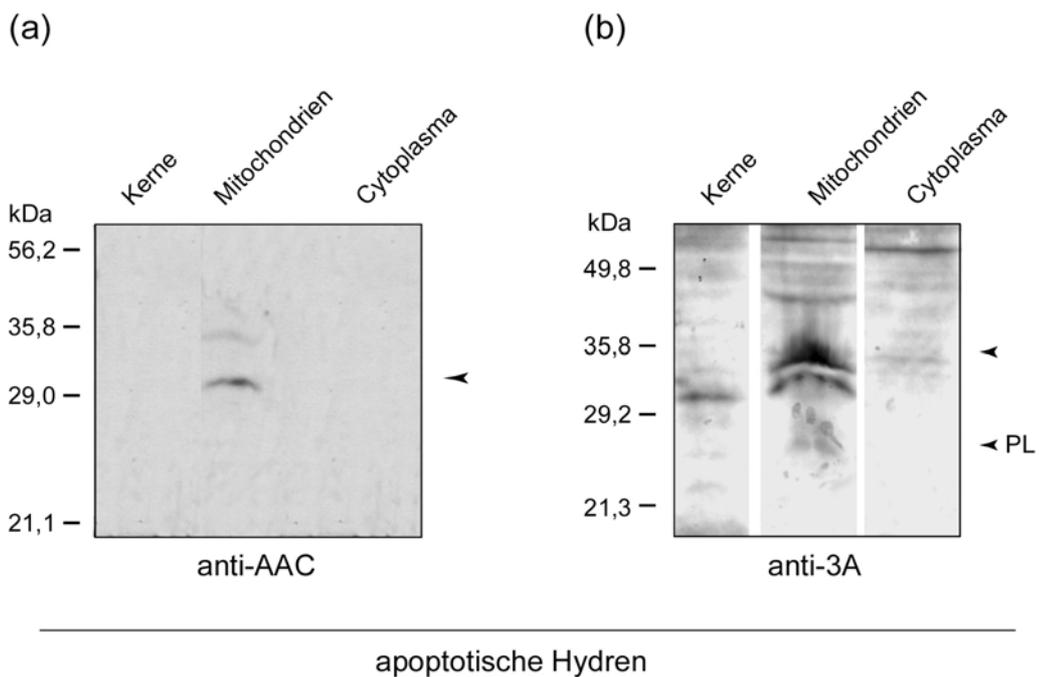


**Abb. 33a+b:** active-site Markierung submitochondrialer Fraktionen mit FITC-VAD-fmk

Auf Abbildung 33a erkennt man mit anti-3A-Antikörper, dass die Banden zwischen 35 und 29 kD, die Abbauprodukten von Procaspase 3A entsprechen im Pellet nachgewiesen werden. Caspase 3A scheint daher relativ stark an den Mitochondrien verankert bzw. fest an die Membran gebunden zu sein. Wäre Caspase 3A im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert, würde sie jetzt im Überstand sein. Eine Analyse mit anti-FITC-Antikörper zeigt, dass aktive Caspase 3A offensichtlich vom membrangebundenen in den löslichen Zustand übergeht, da aktives PL (25 kD) sich im Überstand der zentrifugierten Mitochondrien befindet (Abb. 33b). Mit anti-3A-Antikörper wird diese aktive Caspase im Überstand nicht nachgewiesen. Dies bedeutet, dass nur ein sehr kleiner Teil der membrangebundenen Caspase 3A aktiv ist. Anti-FITC-Antikörper ist empfindlicher als anti-3A-Antikörper und kann daher die geringe Menge an aktiver Caspase detektieren (vgl. Abb. 12a+c).

### 3.2.1.2 Lokalisation und Aktivität von Caspase 3A in apoptotischen Hydren

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob sich Lokalisation und Aktivität von Caspase 3A nach Induktion von Apoptose ändert. Die Zellfraktionierung wurde daher von Hydren durchgeführt, in denen mit Colchizin Apoptose induziert worden war.



**Abb. 34a+b:** Subzelluläre Fraktionen von apoptotischen Hydren

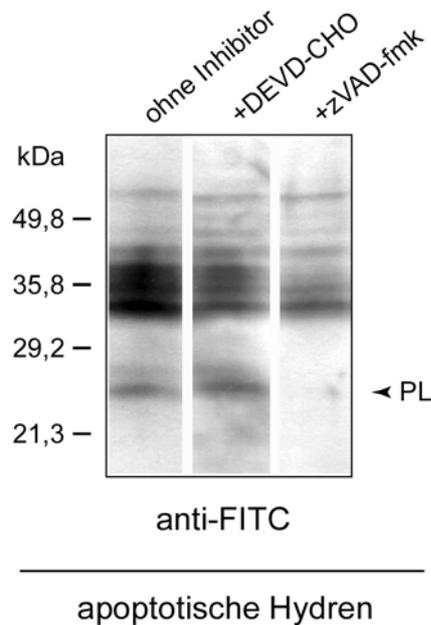
Mit anti-AAC-Antikörper wurde wieder die Reinheit der Mitochondrienfraktionen kontrolliert. Die 32 kD-Bande befand sich nur in der Mitochondrienfraktion, was eine hohe Qualität der Fraktionierung bedeutet (Abb. 34a).

Die einzelnen Fraktionen wurden mit anti-3A-Antikörper aus Kaninchen analysiert. Abbildung 34b zeigt, dass Caspase 3A auch während Apoptose in den Mitochondrien lokalisiert ist. Man erkennt wie bei nicht-apoptotischen Hydren mehrere Banden zwischen 35 und 29 kD. Außerdem weist man in apoptotischen Tieren die 25 kD-Bande nach, die aktiver PL von Caspase 3A entspricht.

Die mitochondriale Lokalisation von Caspase 3A ändert sich also bei Induktion von Apoptose nicht.

Durch Markierung mit FITC-VAD-fmk wurde anschließend die Aktivität von Caspase 3A in apoptotischen Zellen untersucht.

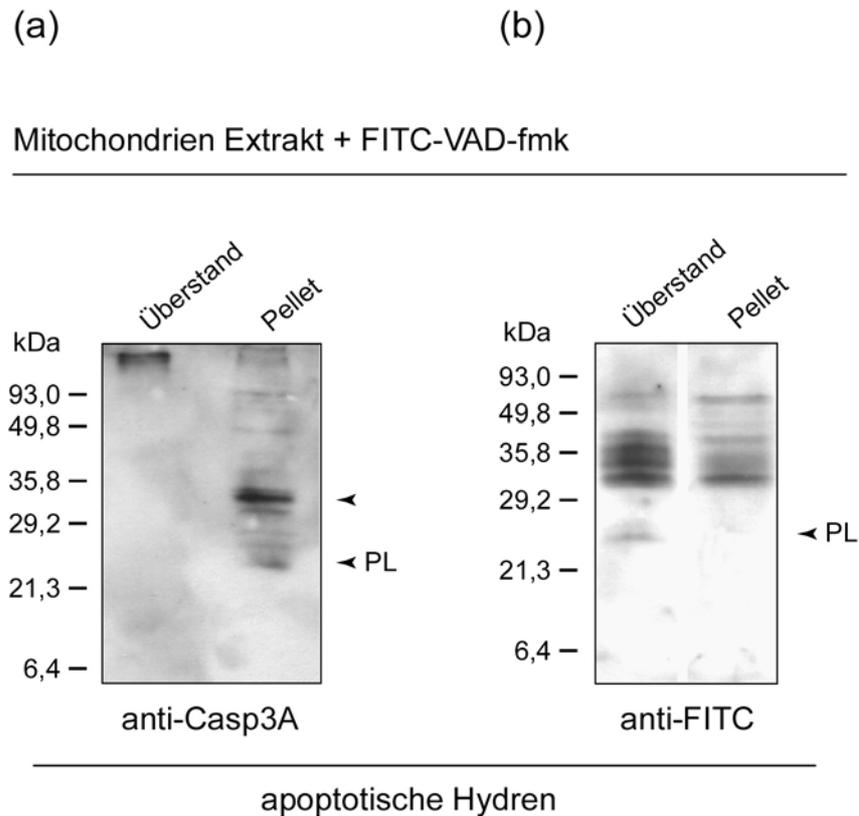
Mitochondrien Extrakt + FITC-VAD-fmk



**Abb. 35:** active-site-Markierung der Mitochondrienfraktion von apoptotischen Hydren mit FITC-VAD-fmk

Abbildung 35 zeigt, dass auch nach Induktion von Apoptose mit anti-FITC-Antikörper das gleiche 25 kD große Fragment wie bei nicht-apoptotischen Tieren (vgl. Abb. 32) nachgewiesen wird. Die Markierung wird von zVAD-fmk, jedoch nicht von DEVD-CHO gehemmt. Dieses Inhibitorprofil stimmt mit dem von Caspase 3A in normalen Hydren und dem von rekombinanter Caspase 3A überein.

Wird die Mitochondrienfraktion von apoptotischen Hydren nach Inkubation mit Substrat in Gegenwart von Chaps zentrifugiert und Überstand und Pellet getrennt voneinander analysiert, ergibt sich das gleiche Ergebnis wie bei nicht-apoptotischen Hydren.



**Abb. 36:** active-site-Markierung submitochondrialer Fraktionen von apoptotischen Hydren mit FITC-VAD-fmk

Ein Nachweis mit anti-3A-Antikörper zeigt, dass sich Caspase 3A wiederum hauptsächlich im unlöslichen Bestandteil der Mitochondrien befindet (Abb.36a). Ein geringer Teil wird aktiviert und geht in den löslichen Überstand. Anti-FITC-Antikörper erkennt die 25 kD große Bande, die aktiver PL von Caspase 3A entspricht (Abb. 36b).

Es handelt sich bei Caspase 3A also um eine mitochondrial lokalisierte Caspase, deren Aktivität und Lokalisation durch die Induktion von Apoptose nicht beeinflusst wird.

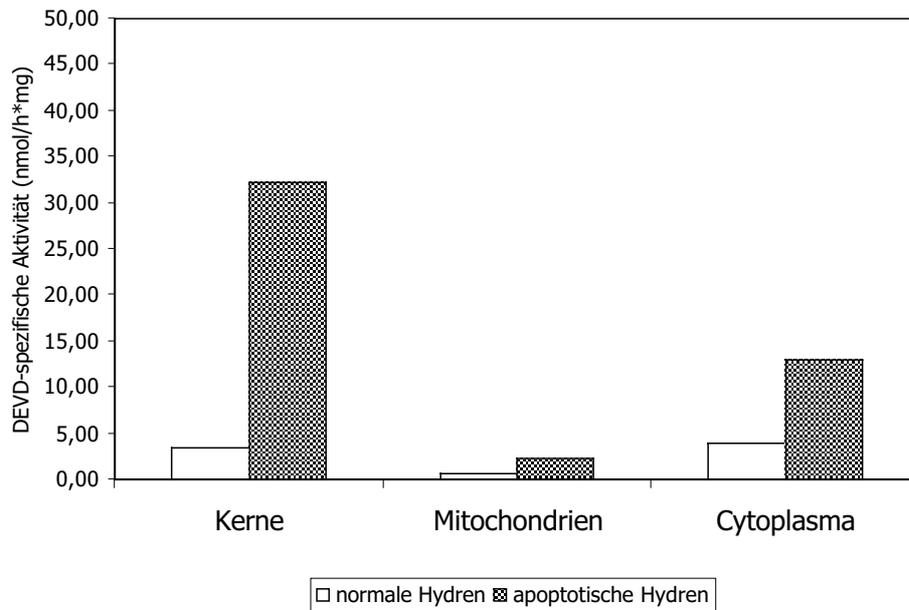
### **3.2.2 Caspase 3B\* in vivo**

#### **3.2.2.1 Apoptose-induzierte Caspase-Aktivität in Hydra-Cytoplasma**

Nachdem die mitochondriale Lokalisation von Caspase 3A gezeigt worden war, sollte die Aktivität und Lokalisation der zweiten Hydra-Caspase 3B\* untersucht werden. Dabei wurde versucht, einen Zusammenhang zu früheren Experimenten herzustellen. Cikala et al. hatten in Hydra durch Behandlung mit Colchizin Apoptose induziert und anschließend apoptotische Zellen mit den typisch morphologischen Veränderungen (Kernzerfall, Phagozytierung) nachgewiesen (Cikala et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass durch die Induktion von Apoptose auch Caspasen aktiviert werden. Diese wurden mit fluorogenem Caspasesubstrat AcDEVD-amc in Zellextrakt von apoptotischen Hydren nachgewiesen. Sie waren durch DEVD-CHO und zVAD-fmk hemmbar, nicht jedoch durch YVAD-CHO (Cikala et al., 1999). Im löslichen Zellextrakt von apoptotischen Hydren existiert also eine apoptose-induzierte, DEVD-spezifische Caspase-Aktivität.

Bei der Herstellung von Hydra-Zellextrakt wurde die Zellsuspension schockgefroren und sonifiziert, was zum Aufbrechen einzelner Membranen und Zellbestandteile führt. Es ist möglich, dass die Caspase-Aktivität in solchen Extrakten von der Zerstörung der Zellbestandteile abhängt oder zumindest davon beeinflusst wird. Um dies zu untersuchen, wurde eine weitere Methode zur Isolation von Hydra-Extrakt durchgeführt. Colchizin behandelte Tiere und unbehandelte Kontrolltiere wurden in isotonischem Puffer Dounce-homogenisiert und die einzelnen Zellfraktionen (Kerne, Mitochondrien und Cytoplasma) durch differentielle Zentrifugation getrennt. Durch diese Methode bleiben die einzelnen Zellbestandteile weitgehend intakt.

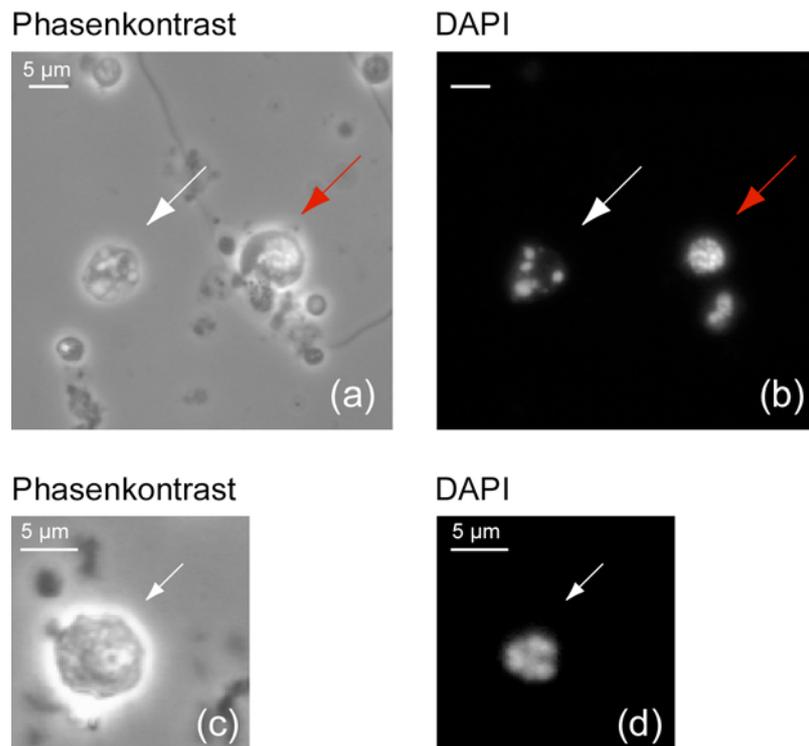
In den isolierten Fraktionen wurde Caspase-Aktivität mit fluorogenem AcDEVD-amc gemessen. Die Kernfraktion wurde vor Substratzugabe mit Detergenz und Salz behandelt.



**Abb. 37:** DEVD-spezifische Caspase-Aktivität in subzellulären Fraktionen von normalen und apoptotischen Hydren

Abbildung 37 zeigt, dass sowohl in der Kernfraktion als auch in der Cytoplasmafraktion von apoptotischen Tieren DEVD-spezifische Caspase-Aktivität gemessen wurde. Die spezifische DEVD-Aktivität beider Fraktionen alleine ist aber deutlich geringer als die im Hydraextrakt, der durch Einfrieren und Sonifizieren isoliert wurde (nicht gezeigt). Zusammen ergeben jedoch Caspase-Aktivität in Kern- und Cytoplasmafraktion einen ähnlichen Wert wie die Aktivität in löslichem Hydraextrakt.

Um den Ursprung der Caspase-Aktivität in der Kernfraktion nach Dounce-Homogenisierung zu klären, wurden die Bestandteile der Kernfraktion mit fluoreszierendem DNA-Farbstoff DAPI gefärbt und am Fluoreszenz-Mikroskop untersucht.



**Abb. 38:** Phasenkontrast- (a+c) und fluoreszenzmikroskopische (b+d) Aufnahme der nach Dounce-Homogenisieren isolierten Kern-Fraktion (roter Pfeil: Kern, weißer Pfeil: apoptotische Vakuole)

Auf Abbildung 38a+c lässt sich erkennen, dass apoptotische Vakuolen (weißer Pfeil), die durch das Homogenisieren unbeschädigt freigesetzt wurden, gemeinsam mit den Kernen (roter Pfeil) abzentrifugiert werden. Die DAPI-Fluoreszenz (Abb. 38b+d) zeigt deutlich den fraktionierten Kern innerhalb der apoptotischen Vakuole. Die DEVD-abhängige Caspase-Aktivität in der Kernfraktion stammt also von abzentrifugierten, vor Detergenz-Behandlung noch intakten apoptotischen Vakuolen. Die restliche messbare Aktivität nach Dounce-Homogenisieren im Cytoplasma apoptotischer Hydren wird durch Caspase aus gebrochenen, apoptotischen Vakuolen oder apoptotischen Cytoplasma, das noch nicht phagozytiert wurde hervorgerufen.

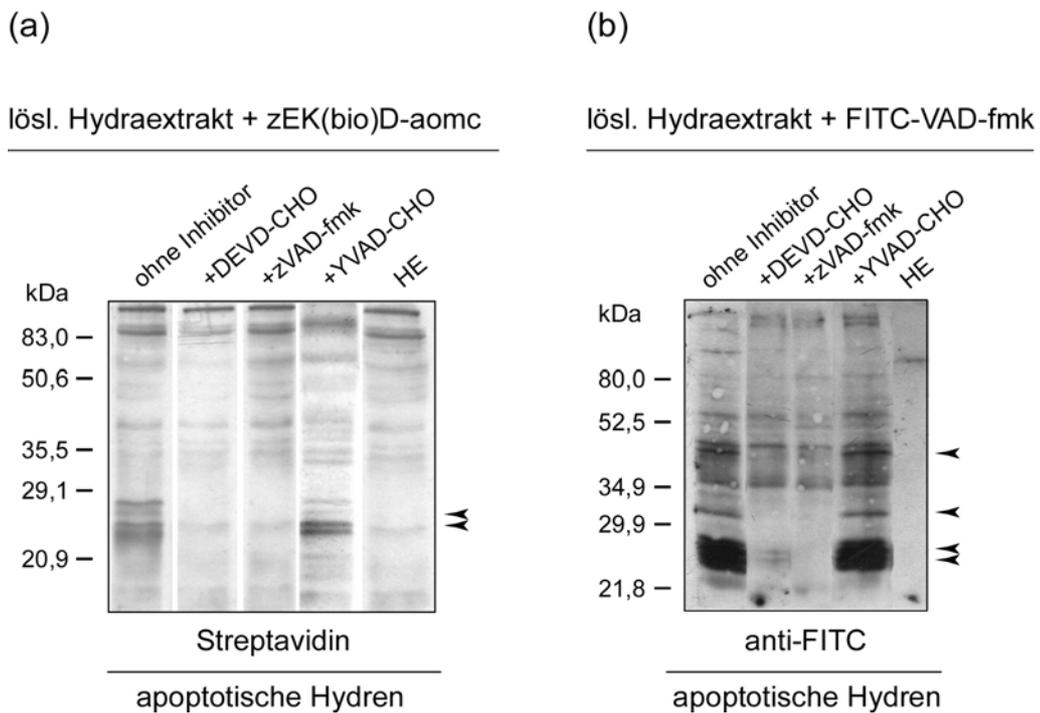
Die Kernfraktion unbehandelter Kontrolltiere sowie die Mitochondrienfraktion von normalen und apoptotischen Hydren zeigte keine nennenswerte DEVD-spezifische Aktivität (vgl. Abb. 37).

In nach Dounce-Homogenisieren isoliertem Cytoplasma unbehandelter Kontrolltiere zeigte sich eine ca. fünf mal geringere Aktivität als in Cytoplasma- und Kernfraktion nach Apoptose-Induktion (vgl. Abb. 37).

Behandelt man Hydren mit Colchizin und isoliert anschließend die löslichen Zellbestandteile, so lässt sich also unabhängig von der Isolationsmethode apoptose-induzierte DEVD-spezifische Caspase-Aktivität nachweisen. Es kann sich bei dieser Caspase nicht um Caspase 3A *in vivo* handeln, da diese zum einen während Apoptose ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert und aktiv ist. Zum anderen wird die Aktivität von Caspase 3A nicht durch DEVD-CHO inhibiert. Caspase 3B\* hingegen war in den *in vitro* Versuchen durch DEVD-CHO gehemmt worden (vgl. Abb. 21). Im folgenden soll nun geklärt werden, ob es sich bei der während Apoptose im Cytoplasma aktiven Caspase tatsächlich um 3B\* *in vivo* handelt.

### **3.2.2.2 Active-site-Markierung der Caspase im Cytoplasma von apoptotischen Hydren**

Zur Klärung der molekularen Identität der apoptose-abhängigen Caspase-Aktivität wurde eine Markierung des aktiven Zentrums mit den Caspase-Substraten zEK(bio)D-aomc und FITC-VAD-fmk durchgeführt. Löslicher Extrakt von Colchizin-behandelten Hydren wurde 2 h mit Substrat inkubiert. Zusätzlich wurde apoptotischer Extrakt mit Caspase-3 Inhibitor DEVD-CHO, mit zVAD-fmk und Caspase-1-Inhibitor YVAD-CHO vorbehandelt und anschließend die Aktivität untersucht.



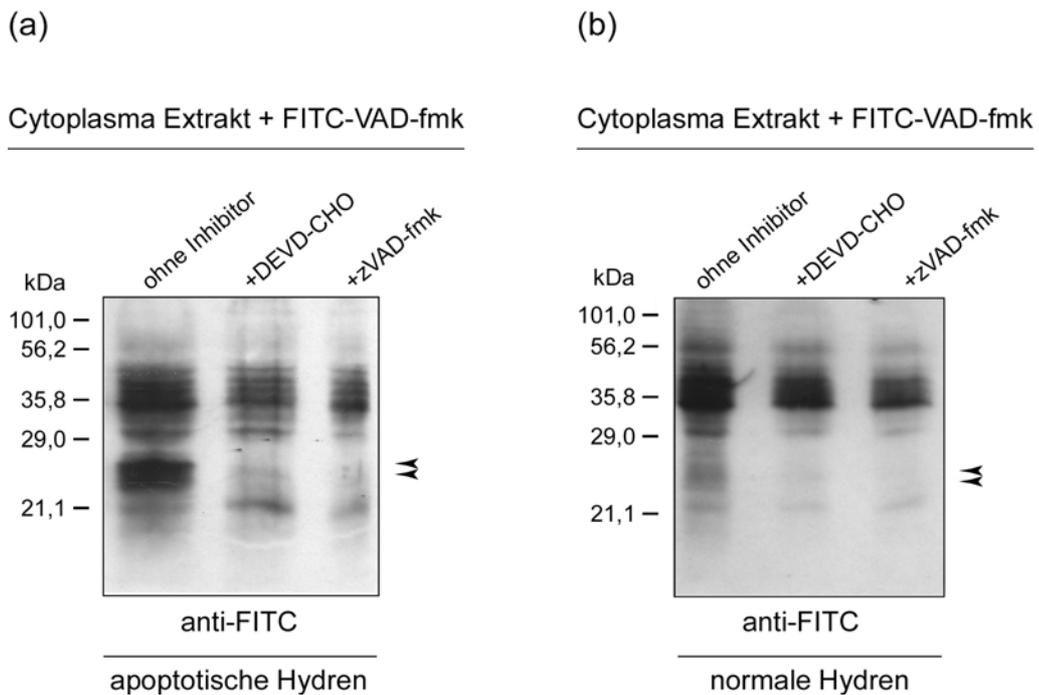
**Abb. 39a+b:** Nachweis von DEVD-spezifischer Caspaseaktivität im löslichen Extrakt von apoptotischen Hydren mit zEK(bio)D-aomc und FITC-VAD-fmk

Abbildung 39a zeigt, dass mit zEK(bio)D-aomc vier Fragmente mit einer Größe von 28, 27, 25 und 23 kD markiert wurden. Die Markierung wurde durch die Inhibitoren DEVD-CHO und zVAD-fmk gehemmt, nicht jedoch durch YVAD-CHO. Dies entspricht dem Hemmprofil, das mit fluorogenem AcDEVD-amc gemessen wurde. Die schwächeren Banden zwischen 30 und 100 kD sind unspezifisch, da sie unabhängig von der Behandlung mit Substrat entstehen (Abb. 39a, letzte Spur) und außerdem nicht gehemmt werden.

Abbildung 39b zeigt nach der Inkubation von apoptotischen Extrakt mit FITC-VAD-fmk vier markierte Banden einer Größe zwischen 28 und 23 kD, die aktiver Caspase entsprechen. Hinzu kommen zwei schwächere Banden mit 30 und 37 kD. Sämtliche dieser markierten Banden wurden mit zVAD-fmk und Caspase-3-Inhibitor DEVD-CHO gehemmt. Mit YVAD-CHO erfolgte keine Hemmung.

Dies entspricht der Markierung und dem Hemmprofil mit fluorogenem zEK(bio)D-aomc als Substrat. Die zusätzlichen nicht hemmbaren Banden sind unspezifisch und durch Bindung der Fluormethylketongruppe an Hydraproteine im Extrakt entstanden. Sie fehlen daher in einer Probe von Hydraextrakt ohne Substrat (Abb. 39b, letzte Spur).

Um die mit zEK(bio)D-aomc und FITC-VAD-fmk nachgewiesene Caspase-Aktivität zu belegen, wurde wie oben eine zweite Methode verwendet, um löslichen Zellextrakt von Hydren zu isolieren. Das durch Dounce-Homogenisieren gewonnene Cytoplasma von Colchizin-behandelten Hydren und unbehandelten Kontrolltieren wurde mit FITC-VAD-fmk auf Caspase-Aktivität untersucht. Aus Versuchen mit AcDEVD-amc war bekannt, dass die Aktivität in Cytoplasma, das durch Homogenisierung gewonnen wurde geringer ist als in durch Zerspritzen isoliertem Extrakt, da ein Teil der apoptotischen Vakuolen mit den Kernen abzentrifugiert wird (vgl. Abb. 37 + 38). Daher wurden die Proben nach Inkubation mit Substrat ca. 8 fach konzentriert, um mit anti-FITC Antikörper aktive Caspase detektieren zu können.



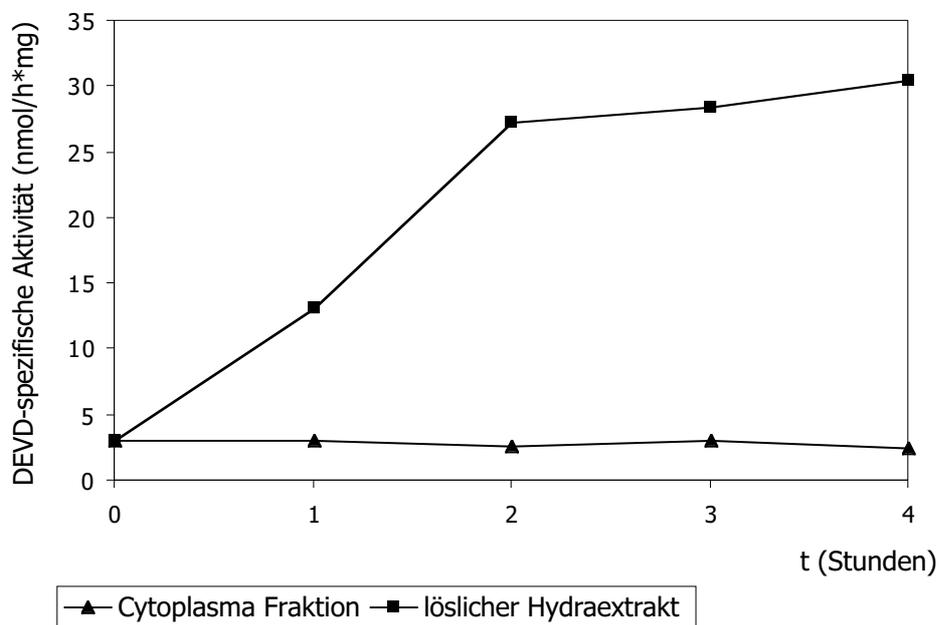
**Abb. 40a+b:** Nachweis von DEVD-spezifischer Caspaseaktivität in durch Dounce-Homogenisieren isoliertem Cytoplasma von apoptotischen und normalen Hydren mit FITC-VAD-fmk

Abbildung 40a zeigt nach Homogenisieren von apoptotischen Hydren genau wie nach Zerspritzen mehrere Banden zwischen 27 und 23 kD, die aktiver Caspase entsprechen. Wiederum wird die Aktivität durch DEVD-CHO und zVAD-fmk gehemmt. Unbehandelte, nicht apoptotische Tiere zeigen im Cytoplasma eine nur schwache Caspase-Aktivität (Abb. 40b). Es wurde also mit fluorogenem Peptidsubstrat AcDEVD-amc und durch active-site-Markierung mit zEK(bio)D-aomc oder FITC-VAD-fmk Caspase-Aktivität im Cytoplasma von apoptotischen Hydren nachgewiesen. Aus den genannten Gründen handelt es sich hierbei wahrscheinlich um Caspase 3B\*.

### 3.2.2.3 Affinitätsreinigung von Caspase 3B\*

Um die bei Apoptose aktive Caspase als 3B\* zu identifizieren, wurde diese aus dem Cytoplasma von Hydren affinitätsgereinigt und mit anti-3A und anti-3B-Antikörper untersucht. Die Reinigung wurde freundlicherweise von Frau Beate Stiening durchgeführt. Wie beschrieben waren Antikörper gegen rekombinante Caspasen 3A und 3B in Huhn bzw. Kaninchen hergestellt worden. Der anti-3B-Antikörper erkennt auch Caspase 3B\*.

Da es schwierig war, eine ausreichende Menge an apoptotischen Cytoplasma durch Dounce-Homogenisieren zu isolieren, wurde löslicher Extrakt von nicht-apoptotischen Hydren durch Schockgefrieren und Sonifizieren hergestellt. Caspase-Aktivität wurde durch Inkubation des Extrakts mit DTT induziert.



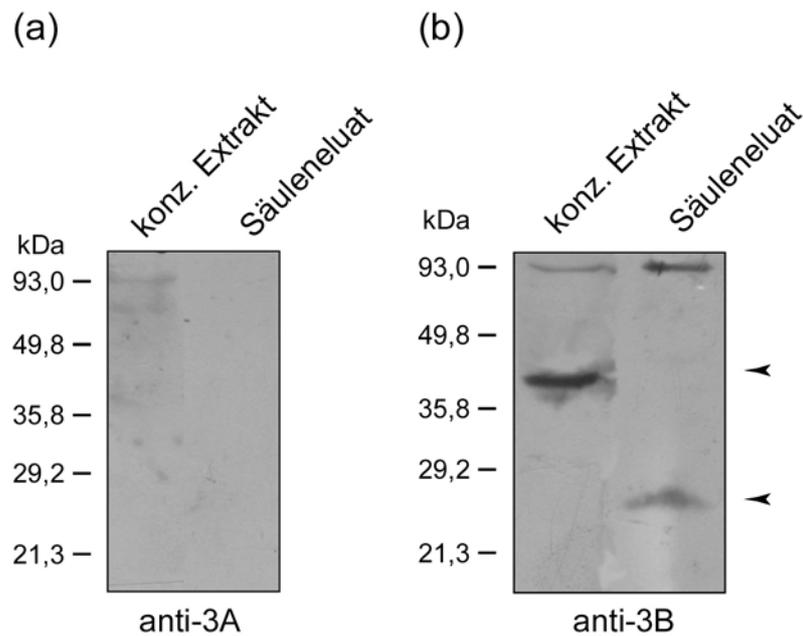
**Abb. 41:** DEVD-spezifische Caspase-Aktivität in Hydra-Cytoplasma nach Dounce-Homogenisieren oder im löslichen Extrakt nach Schockgefrieren und Sonifizieren

Abbildung 41 zeigt, dass durch diese Inkubation mit DTT in nicht-apoptotischen Extrakt die selbe Caspase-Aktivität wie nach Induktion

von Apoptose mit Colchizin entsteht. Sie wird durch DEVD-CHO gehemmt, aber nicht mit YVAD-CHO, wie eine Markierung des aktiven Zentrums mit zEK(bio)D-aomc zeigt (nicht gezeigt). Die Größen und die Intensität der Banden sind dabei die gleichen wie im Cytoplasma von apoptotischen Hydren. Offensichtlich wird aktive Caspase entweder durch Induktion von Apoptose oder durch Zerstören der Zellorganellen durch Schockgefrieren und Sonifizieren in den löslichen Überstand freigesetzt. Daher lässt sich auch im Cytoplasma von nicht-apoptotischen, Dounce-homogenisierten Hydren keine Caspase-Aktivität induzieren (Abb. 41), da beim Dounce-Homogenisieren die Zellorganellen weitgehend intakt bleiben.

Um die durch Inkubation mit DTT aktivierte Caspase aus dem Extrakt zu reinigen, wurde dieser auf einer DEAE-Anionen-Austauscher-Säule vorgereinigt. Die aktiven Fraktionen wurden durch Gel-Filtration weiter konzentriert. Um aktive Caspase selektiv zu reinigen, wurden die konzentrierten Fraktionen mit biotinylierten Caspase-Substrat zEK(bio)D-aomc inkubiert. Anschließend wurden die Fraktionen auf eine Streptavidin-Säule geladen und aktive Caspase mit Biotin von der Säule eluiert.

Um die gereinigte Caspase zu identifizieren, wurden die Fraktionen vor und nach dem Reinigen über die Affinitätssäule auf einem Western-Blot mit den anti-3A- und anti-3B-Antikörpern (Kaninchen) analysiert.



**Abb. 42a+b:** Western-Blot von konzentriertem, aktiviertem löslichem Hydra-Extrakt vor und nach Affinitätsreinigung der DEVD-spezifischen Caspase-Aktivität

Die Proben in der Säule enthalten ein stark konzentriertes Proteingemisch mit aktiver Caspase, während die Proben nach Elution von der Säule ausschließlich konzentrierte, aktive Caspase enthalten. Abbildung 42a zeigt, dass sich mit anti-3A-Antikörper keine Reaktion mit den Proteinen auf dem Blot ergab. Es handelt sich bei der affinitätsgereinigten Caspase also nicht um Caspase 3A. Der anti-3B-Antikörper reagierte mit den geblotteten Proteinen (Abb. 42b). Man erhielt sowohl in der Probe vor dem Laden auf die Streptavidin-Säule als auch in der anschließend eluierten Probe jeweils eine Bande. Die durch Apoptose im Hydra-Cytoplasma aktivierte Caspase ist also Caspase 3B\*. Die Bande nach der Elution hat eine Größe von 25 kD und entspricht der Größe der markierten Fragmente von aktiver Caspase in Colchizin-behandeltem Hydra-Extrakt (vgl. Abb. 39b). Es kann sich bei der 25 kD Bande nicht um die große Untereinheit von Caspase 3B\* handeln, da diese eine berechnete Größe von 15,7 kD hat (vgl. Abb. 17).

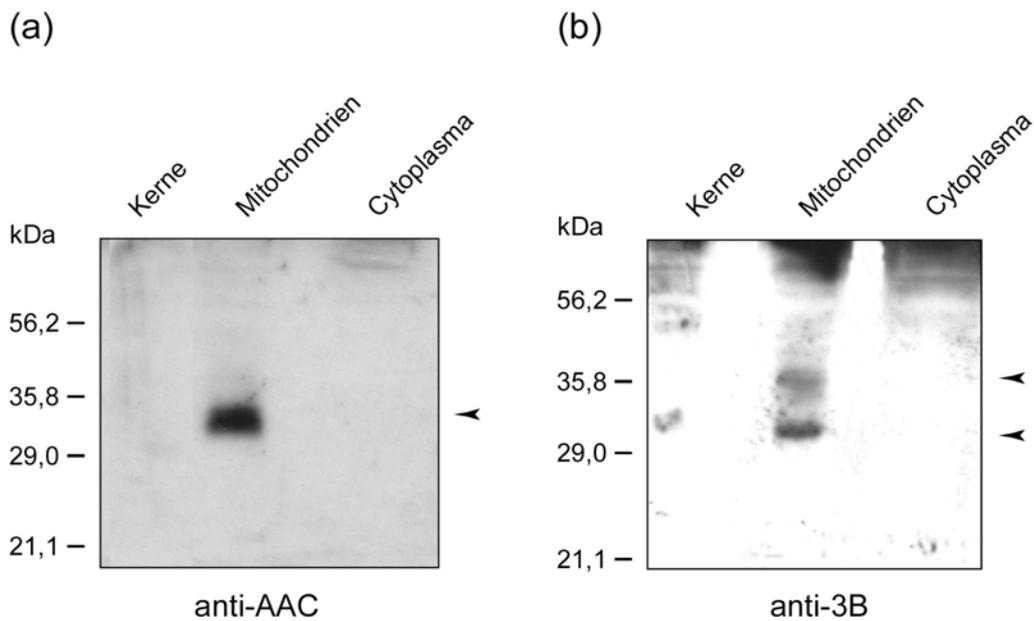
Das markierte Fragment entspricht PL von Caspase 3B\*, d. h. einem aktiven Fragment aus großer Untereinheit und Prodomäne mit einer berechneten Größe von 24,1 kD. Das bedeutet, dass für die Aktivierung von Caspase 3B\* die Prodomäne nicht abgespalten wird. Dies entspricht der Prozessierung von rekombinanter Caspase 3B\* bzw. 3B in apoptotischem Hydraextrakt: Zum einen zeigt das Ergebnis, dass es sich bei der Cytoplasma-Caspase, die die rekombinanten Caspasen schneidet um Caspase 3B\* in vivo handelt. Zum anderen werden die rekombinanten Caspasen wie Caspase 3B\* in vivo nur zwischen großer und kleiner Untereinheit geschnitten, Prodomäne und große Untereinheit bleiben ungetrennt.

Bei der 37 kD großen Bande, die mit anti-3B-Antikörper vor der Reinigung des Extrakts über die Affinitätssäule detektiert wird (Abb. 42b), handelt es sich um konzentrierte Procaspase 3B\* (PLS) mit einer berechneten Größe von 36,8 kD (vgl. Abb. 17).

Eine MALDI-Sequenzierung der 25 kD-Bande bestätigt, dass es sich bei der affinitäts-gereinigten Caspase tatsächlich um Caspase 3B\* handelt. Die gereinigte, sequenzierte Caspase enthält mehrere Peptide von Caspase 3B\*.

#### **3.2.2.4 Lokalisation von Caspase 3B\* in vivo**

Wie die active-site-Markierung zeigte, befindet sich Caspase 3B\* nach Induktion von Apoptose als aktive Caspase im Cytoplasma von Hydren. Um die Lokalisation von Caspase 3B\* im nicht-apoptotischen Normalzustand der Zelle zu klären, wurde eine subzelluläre Zellfraktionierung von Hydren durchgeführt. Die Reinheit der Mitochondrienfraktion wurde wiederum mit Mitochondrien-spezifischen anti-AAC-Antikörper bestätigt (Abb. 43a).

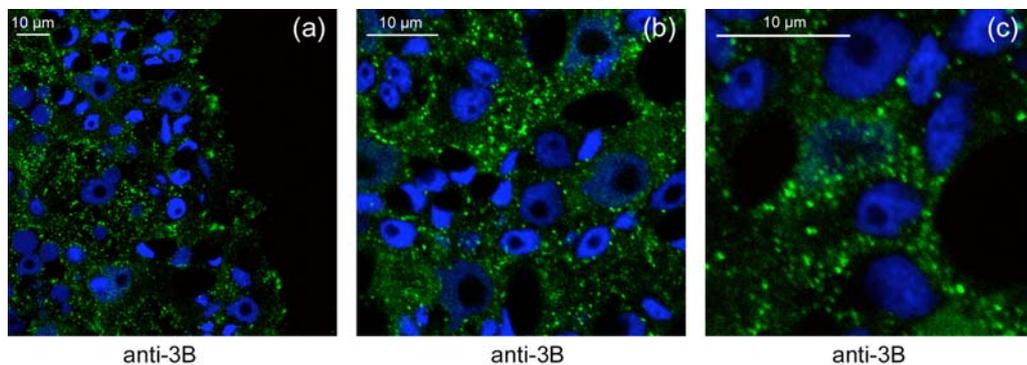


**Abb. 43a+b:** Subzelluläre Fraktionen von Hydren

Um Caspase 3B\* zu lokalisieren, wurde anschließend ein Western-Blot der Fraktionen mit anti-3B-Antikörper analysiert. Abbildung 43b zeigt, dass anti-3B-Antikörper mit einer etwa 36 kD großen und einer 29 kD großen Bande in der Mitochondrien-Fraktion reagiert, während in Kern- und Cytoplasma-Fraktion keine Banden zu sehen sind. Dies bedeutet, dass Caspase 3B\* in Zellen von nicht-apoptotischen Hydren in den Mitochondrien lokalisiert ist. Bei der 36 kD-Bande handelt es sich um Procaspase 3B\* (PLS) mit einer berechneten Größe von 36,8 kD. Die 29 kD Bande entspricht mit ihrer Größe nicht der von prozessierter, aktiver Caspase 3B\*. Diese hat eine Größe von 24,1 kD und besteht aus Prodomäne und großer Untereinheit. Außerdem konnte mit FITC-VAD-fmk für die 29 kD-Bande keine DEVD-spezifische Aktivität in Mitochondrien nachgewiesen werden. Ebenso fand man mit fluorogenem Caspase-Substrat AcDEVD-amc keine DEVD-spezifische Aktivität in Mitochondrien (vgl. Abb. 37). Caspase 3B\* ist somit in den Mitochondrien inaktiv. Daher nehmen wir an, dass es sich bei der 29 kD Bande um ein Abbauprodukt der Procaspase handelt, die in Mitochondrien proteolytisch angegriffen wird.

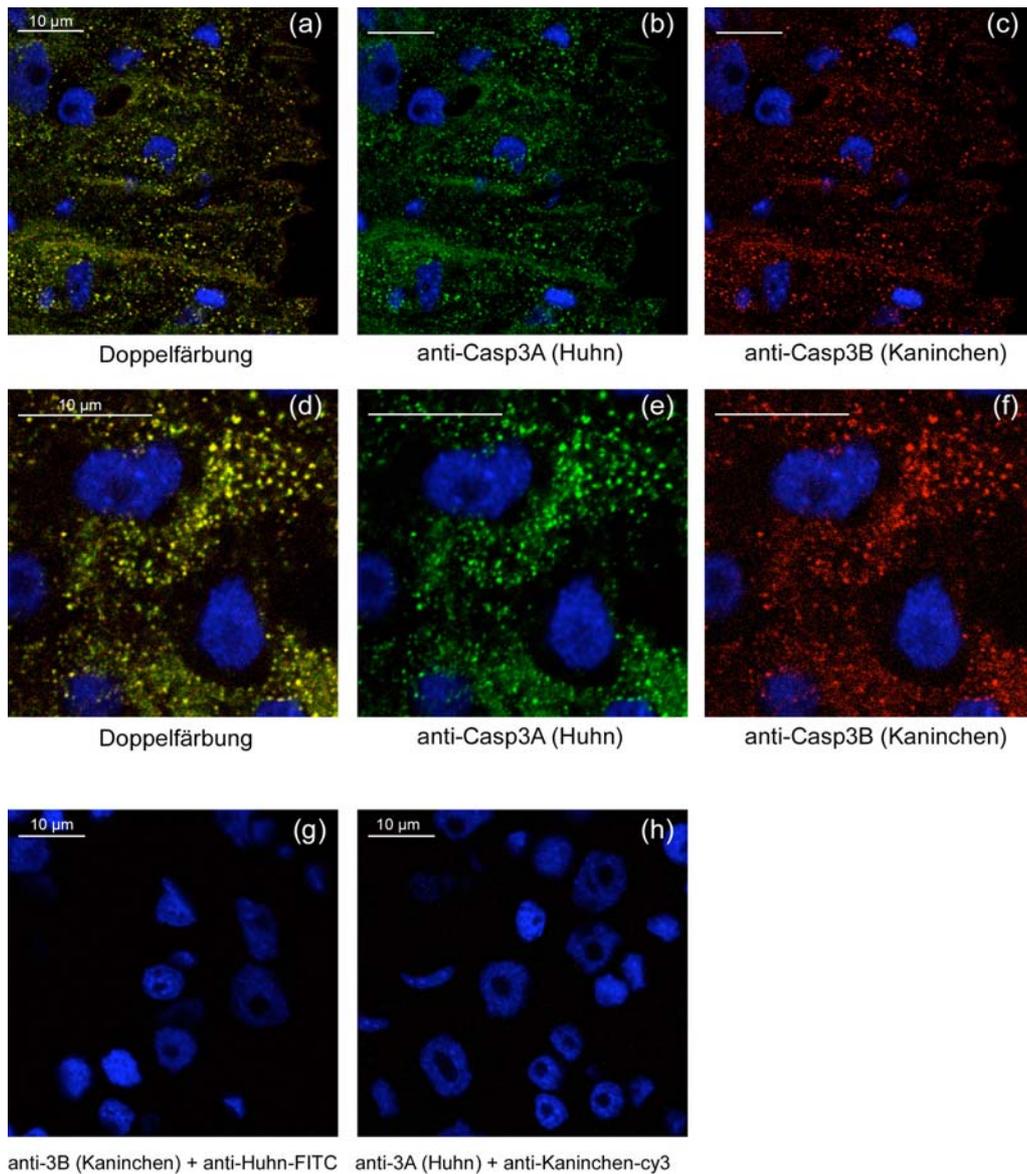
Dafür spricht auch, dass die Intensität der Bande zunimmt, wenn die Mitochondrienfraktion längere Zeit bei 4 °C stehen gelassen wird. Darüber hinaus sind je nach Güte der Fraktionierung manchmal mehrere Banden zwischen 35 und 29 kD zu sehen, die den Zwischenprodukten des Abbaus entsprechen.

Um die mitochondriale Lokalisation von Caspase 3B\* in vivo zu bestätigen, wurden Immunfärbungen von ganzen, fixierten Hydren durchgeführt und diese am konfokalen Mikroskop analysiert.



**Abb. 44a-c:** Immunfärbungen von ganzen Hydren mit anti-3B-Antikörper als Erstantikörper und FITC-gekoppeltem Zweitantikörper, blau: DNA-Färbung, grün: Antikörper-Färbung

Abbildung 44 zeigt drei verschiedene Vergrößerungen einer Färbung mit anti-3B-Antikörper. Man erkennt wie für Caspase 3A eine punktförmige, im Cytoplasma gleichmäßig verteilte Färbung. Die Größe der Punkte ist etwa 1-2 µm. Ein Vergleich mit einer Immunfärbung mit Mitochondrien-spezifischen anti-AAC-Antikörper (vgl. Abb. 30d-f) zeigt, dass Mitochondrien in Verteilung und Form dem Muster von Caspase 3B\* ähneln. Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurde eine Doppelfärbung mit anti-3B-Antikörper aus Kaninchen und anti-3A-Antikörper aus Huhn durchgeführt. Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, ist Caspase 3A in den Mitochondrien von Hydren lokalisiert.



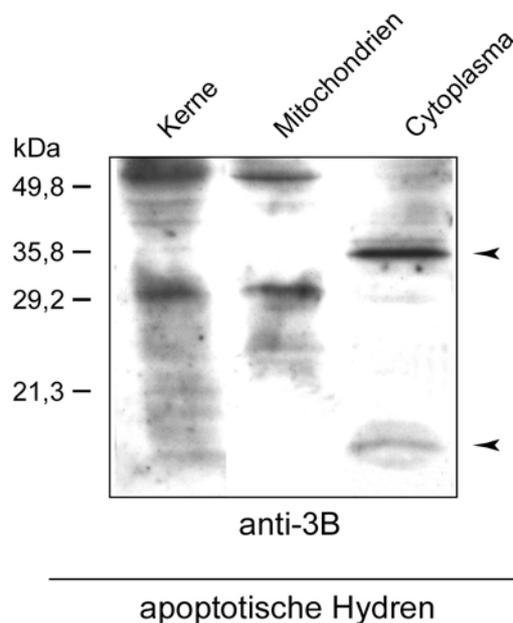
**Abb. 45a-h:** Doppelfärbungen von ganzen Hydren mit anti-3A- aus Huhn (grün) und anti-3B-Antikörper aus Kaninchen (rot), DNA-Färbung (blau), (a-f). Gelbe Punkte weisen auf überlappende Strukturen hin. Kontrolle der Kreuzreaktion der Zweitantikörper mit den Immunglobulinen der jeweils anderen Art (g+h)

Abbildung 45a-f zeigt zwei verschiedene Vergrößerungen dieser Doppelfärbung. In grün ist Caspase 3A, in rot Caspase 3B\* und in blau sind die Kerne dargestellt. Eine Überlappung der beiden Filter (Abb. 45a+d) zeigt, dass Caspase 3B\* und mitochondriale Caspase 3A kolokalisieren. Kontrollen zur Kreuzreaktion der Zweitantikörper zeigten keine Färbung (Abb. 45g+h).

Zellfraktionierung und Western-Blot zeigen also, dass die inaktive Procaspase 3B\* in den Mitochondrien lokalisiert ist.

### 3.2.2.5 Aktivierung und Translokation von Caspase 3B\* bei Apoptose

Inaktive Caspase 3B\* ist mitochondrial lokalisiert. Die während Apoptose aktivierte Caspase 3B\* befindet sich im Cytoplasma, wie Versuche mit fluorogenem AcDEVD-amc und active-site-Markierung gezeigt haben. Im folgenden soll gezeigt werden, dass Caspase 3B\* tatsächlich nach der Induktion von Apoptose von den Mitochondrien ins Cytoplasma transloziert und dort aktiviert wird. Es wurden Hydren mit Colchizin behandelt und anschließend eine Fraktionierung der Zellorganellen durchgeführt. Die Qualität der Fraktionierung wurde mit anti-AAC-Antikörper bestätigt (nicht gezeigt).

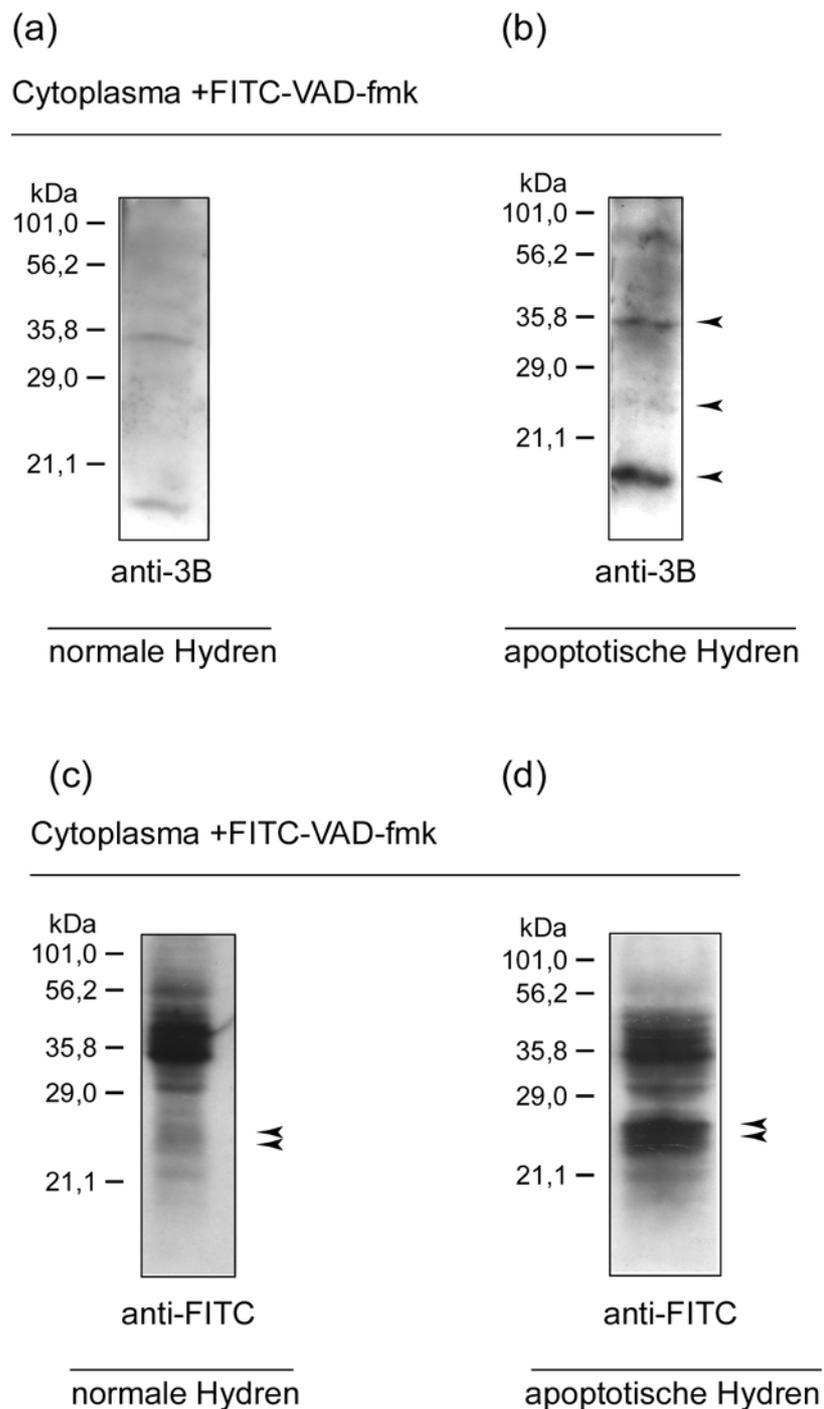


**Abb. 46:** Subzelluläre Fraktionen von apoptotischen Hydren

Eine Analyse der Fraktionen mit anti-3B-Antikörper ist in Abbildung 46 dargestellt.

Im Gegensatz zum Cytoplasma von nicht-apoptotischen Hydren, weist man im Cytoplasma apoptotischer Hydren mit anti-3B-Antikörper eine 36 kD große, prominente Bande nach. Diese Bande entspricht Procaspase 3B\* (PLS), die bei Apoptose von den Mitochondrien ins Cytoplasma transloziert. Außerdem erkennt man im Cytoplasma ein ca. 10 kD großes Fragment. Hierbei könnte es sich um die kleine Untereinheit (S) von Caspase 3B\* mit einer berechneten Größe von 12,8 kD handeln, die zur Aktivierung von der Procaspase abgespalten wird. Das entsprechende Gegenstück PL, das aus apoptotischen Cytoplasma affinitätsgereinigt wurde (vgl. Abb. 42b) ist nicht vorhanden. Es ist möglich, dass PL während der Isolation der Zellfraktionen proteolytisch abgebaut wurde. Eine weitere Bande, die bei normalen Hydren nicht existiert, ist die 29 kD große Bande in der Kernfraktion. Hier handelt es sich um Procaspase 3B\* im Cytoplasma von apoptotischen Vakuolen, die mit den Kernen abzentrifugiert wurden. Offensichtlich wird die Procaspase dabei ebenfalls stark proteolytisch abgebaut. Außerdem weist man bei apoptotischen Hydren eine 29 kD große Bande in der Mitochondrienfraktion nach, die wiederum proteolytisch abgebauter Procaspase 3B\* entspricht. Es handelt sich um Caspase 3B\* in Mitochondrien von nicht-apoptotischen Zellen, welche auch in Colchizin-behandelten Hydren noch vorhanden sind.

Abbildung 47 zeigt, dass Caspase 3B\* bei Apoptose von den Mitochondrien ins Cytoplasma transloziert.



**Abb. 47a-d:** active-site-Markierung von Caspase 3B\* nach Induktion von Apoptose in Hydra-Cytoplasma nach Dounce Homogenisieren

Es handelt sich um konzentriertes, durch Dounce-Homogenisieren isoliertes Cytoplasma von unbehandelten und Colchizin-behandelten Tieren. Dieses wurde jeweils stark konzentriert, mit Caspase-Substrat FITC-VAD-fmk inkubiert und auf Western-Blots mit anti-FITC- und anti-3B-Antikörper untersucht. Man kann deutlich erkennen, dass sich bei normalen Tieren kaum Caspase 3B\* im Cytoplasma befindet, wie die Analyse mit anti-3B-Antikörper zeigt (Abb. 47a). Außerdem wird nur geringe Caspase-Aktivität nachgewiesen (Abb. 47c). Nach Induktion von Apoptose findet man deutlich mehr Caspase 3B\* im Cytoplasma (Abb. 47b). Caspase 3B\* wird im Cytoplasma prozessiert und aktiviert, da man mit FITC-VAD-fmk die entsprechenden Banden markiert (Abb. 47d). Mit anti-3B-Antikörper erkennt man im konzentrierten Cytoplasma apoptotischer Hydren neben den 35 kD und 10 kD Banden, die PLS und S entsprechen auch eine schwache Bande bei 25 kD, die PL mit einer berechneten Größe von 24,1 kD entspricht und mit der mit FITC-VAD-fmk markierten, aktiven Bande bei 25 kD übereinstimmt. Bei den zusätzlichen FITC-markierten Banden handelt es sich um proteolytische Abbauprodukte von PL.

Caspase 3B\* ist also eine apoptose-abhängige Caspase, die sich als inaktives Proenzym in den Mitochondrien befindet. Bei Induktion von Apoptose transloziert PLS ins Cytoplasma, wo es zu PL und S prozessiert und aktiviert wird.

## **4. DISKUSSION**

### **4.1 Die Mitochondriale Lokalisation von Caspasen**

#### **4.1.1 Die mitochondriale Lokalisation der Hydra-Caspasen**

M. Cikala hat in Hydra zwei Gene für Caspasen gefunden: Caspase 3A und 3B (Cikala *et al.*, 1999). In dieser Doktorarbeit wurden polyklonale Antikörper gegen die rekombinanten Caspasen 3A und 3B hergestellt und damit die Lokalisation der Hydra-Caspasen in der Zelle untersucht. Mit anti-3B-Antikörper detektiert man dabei die neu identifizierte Caspase 3B\*, die eine nahezu identische Aminosäuresequenz wie 3B hat. Caspase 3B wird in Hydra nicht transkribiert.

Sämtliche Ergebnisse der Doktorarbeit zeigen, dass Caspasen in Hydra in Mitochondrien lokalisiert sind: Zum einen wurden Immunfärbungen von fixierten Hydren mit anti-3A-, anti-3B- und mitochondrienspezifischen anti-AAC-Antikörper durchgeführt (vgl. Abb. 30, 31, 44, 45). Das Ergebnis dieser Färbungen spricht für eine mitochondriale Lokalisation beider Caspasen. Die Caspasen-Antikörper färben punktförmige, im Cytoplasma verteilte Strukturen, die Mitochondrien äußerst ähnlich sind. Bei der Doppelfärbung mit anti-AAC- und anti-3A- bzw. mit anti-3A- und anti-3B-Antikörper wurde eine deutliche Überlappung der Antikörper festgestellt.

Ebenso wurden subzelluläre Fraktionen von Hydren mit den Antikörpern analysiert und die Caspasen 3A und 3B\* in der Mitochondrienfraktion lokalisiert (vgl. Abb. 29, 43). Mit jedem Antikörper wurden mehrere, deutliche Banden nachgewiesen.

Außerdem wurde die isolierte Mitochondrienfraktion mit Chaps behandelt, zentrifugiert und der Anteil an Caspase 3A in Überstand und Pellet mit anti-3A-Antikörper auf Western-Blots untersucht (vgl. Abb. 33).

Es zeigt sich, dass trotz Chaps-Behandlung nur ein geringer Teil von Caspase 3A im Überstand lokalisiert ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Caspase 3A mit der äußeren oder inneren Mitochondrien-Membran verbunden ist.

Beide Caspasen werden in den isolierten Mitochondrien teilweise proteolytisch abgebaut. In der Literatur wird eine Gruppe von mitochondrialen ATP-abhängigen AAA-Proteasen beschrieben, die an der inneren Mitochondrien-Membran lokalisiert sind und membranständige, falsch gefaltete Proteine abbauen (Langer T., 1996, Rep M., 1996). Diese Proteasen sind innerhalb der Eukaryonten hoch konserviert (Käser M., 2000). Zusätzlich wurde im Säuger eine AAA-Protease identifiziert, die im Intermembranraum von Mitochondrien lokalisiert ist (Sitte *et al.*, 1998). Es handelt sich hier um eine Thiolprotease. Es ist durchaus möglich, dass ähnliche Proteasen in Hydra existieren, die während der Zellfraktionierung nicht komplett gehemmt wurden und daher die Caspasen proteolytisch angreifen. Die Verwendung von Thiol-Proteasehemmern könnte den Abbau verhindern.

Mit anti-3A-Antikörper weist man in der Mitochondrienfraktion eine 25 kD große Bande von Caspase 3A nach. Bei einer active-site-Markierung der isolierten Mitochondrien mit FITC-VAD-fmk wurde das 25 kD Fragment, das PL von Caspase 3A entspricht markiert (vgl. Abb. 32). Das Hemmprofil dieser Markierung stimmt mit dem von rekombinanter Caspase 3A überein. Es handelt sich also bei Caspase 3A um eine mitochondrial lokalisierte, konstitutiv aktive Caspase.

Für Caspase 3B\* lässt sich in den Mitochondrien weder mit fluorogenem Peptidsubstrat AcDEVD-amc noch mit FITC-VAD-fmk Aktivität nachweisen. Es wurde jedoch durch active-site-Markierung mit FITC-VAD-fmk Aktivität von Caspase 3B\* im Cytoplasma von apoptotischen Hydren gezeigt. Außerdem wurde Caspase 3B\* in diesem Cytoplasma mit anti-3B-Antikörper nachgewiesen. Caspase 3B\* wird also bei Apoptose aktiviert, nachdem sie ins Cytoplasma transloziert ist.

#### **4.1.2 Die mitochondriale Lokalisation anderer Caspasen**

Nicht nur Hydra-Caspasen sind mitochondrial lokalisiert. Dies wird durch einer Reihe von Veröffentlichungen belegt. So wiesen unter anderem Krebs und Mancini humane Caspase-3 in den Mitochondrien nach (Krebs *et al.*, 1999, Krebs *et al.*, 2000, Mancini *et al.*, 1998, Samali *et al.*, 1998, Zhivotovsky *et al.*, 1999). Ihre Daten stützen sich auf die Analyse mit Caspase-3-Antikörpern. Untersucht wurden ebenfalls Western-Blots von subzellulären Fraktionen und immunhistochemische Färbungen von Kultur- und Gewebezellen. Zusätzlich konnte in den isolierten Mitochondrien mit fluorogenem Peptidsubstrat AcDEVD-amc spezifische Caspase-Aktivität nachgewiesen werden. Krebs *et al.* reinigten die aktive Caspase aus den Mitochondrien und identifizierten sie mittels Sequenzierung als Caspase-3. Auch humane Caspasen-2, -8 und -9 sind mitochondrial lokalisiert. So wurde aktive Caspase-2 und -9 aus Mitochondrien von Maus-Leberzellen gereinigt (Susin *et al.*, 1999). Die mitochondriale Lokalisation von Caspase-9 wurde mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen von verschiedenen Geweben der Ratte, die mit anti-Caspase-9-Antikörper immunhistochemisch analysiert wurden, gezeigt (Krajewski *et al.*, 1999). Ebenso belegen Immunfärbungen und Western-Blots mit anti-Caspase-8-Antikörper, dass sich Caspase-8 in den Mitochondrien befindet (Qin *et al.*, 2001).

Die erwähnten Arbeitsgruppen zeigten außerdem, dass die humanen Caspasen-2, -3, -8 und -9 im Membranzwischenraum lokalisiert sind.

So wurde zum Beispiel die Lokalisation von Caspase-3 im mitochondrialen Intermembranraum durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Immunogold markierten Kulturzellen bestätigt (Mancini *et al.*, 1998). Durch die Analyse submitochondrialen Fraktionen auf Western-Blots mit Caspase-2 und Caspase-9-Antikörpern, wurden beide Caspasen in der Intermembranfraktion nachgewiesen (Susin *et al.*, 1999).

Sämtliche Arbeitsgruppen finden die humanen Caspase jedoch zusätzlich im Cytoplasma, was bei Hydra-Zellen von normalen Tieren nicht der Fall ist. Hier sind die Caspasen ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert.

Im Gegensatz zu den genannten Veröffentlichungen, gibt es auch Literatur in der die mitochondrialen Lokalisation der Caspasen widerlegt wird. Van Loo *et al.* untersuchten zum Beispiel Western-Blots mit Zellfraktionen von Maus-Hepatocyten mit verschiedenen Caspase-Antikörpern und konnten die Enzyme nicht in der Mitochondrienfraktion nachweisen (van Loo *et al.*, 2002). Sie fanden Caspase-2, -3, -8 und -9 ausschließlich in der Cytoplasmafraktion. Die Arbeitsgruppe begründet dieses unterschiedliche Ergebnis mit einer anderen Quelle für die verwendeten Caspase-Antikörper.

Außerdem wurde die Lokalisation von GFP-getaggtten Caspasen in Jurkat-Zellen untersucht und dabei keine der erwähnten humanen Caspasen in Mitochondrien nachgewiesen (Shikama *et al.*, 2001). Stattdessen befanden sich GFP-Caspase-3, -8 und -9 im Cytoplasma, GFP-Caspase-2 im Nukleus. Es ist jedoch möglich, dass die GFP-getaggte Caspasen aufgrund methodischer Schwierigkeiten anders lokalisieren als erwartet. Die Ergebnisse schließen daher eine mitochondriale Lokalisation nicht zwingend aus.

Loo et al. argumentieren außerdem gegen eine mitochondriale Lokalisation von Caspasen, da diese keine mitochondriale Signal-Sequenz besitzen (van Loo *et al.*, 2002). Auch für die Hydra-Caspasen 3A und 3B\* konnte mit Hilfe des PSORT Programms (<http://psort.nibb.ac.jp>) keine derartige Sequenz identifiziert werden. Es gibt aber mitochondriale Proteine (z. B. Cytochrom c), die ebenfalls keine typische Signal-Sequenz besitzen und sich dennoch im mitochondrialen Intermembranraum befinden.

## **4.2 Die Rolle der Caspase-Prodomäne**

### **4.2.1 Keine Prozessierung der Hydra-Caspasen zwischen Prodomäne und großer Untereinheit**

Mehrere Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen, dass beide Hydra-Caspasen nur zwischen großer und kleiner Untereinheit, jedoch nicht zwischen Prodomäne und großer Untereinheit prozessiert werden.

Zunächst zu Caspase 3A: In Western-Blots von rekombinanter, C-terminal myc-(His)<sub>6</sub>-getaggtter Caspase 3A wurde mit anti-3A-Antikörper ein ungetaggttes ca. 29 kD großes Fragment, das PL entspricht nachgewiesen (vgl. Abb. 7). Das entsprechende Fragment wurde auch bei der Analyse von N-terminal GST-getaggtter Caspase 3A mit anti-GST-Antikörper nachgewiesen (vgl. Abb. 9). In beiden Fällen wurde eine Bande die S von Caspase 3A entspricht gefunden, jedoch keine Bande, die P oder L darstellt. Die PL-Banden wurde nicht bei mutierter, inaktiver Caspase 3A<sup>M</sup> gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich rekombinante Caspase 3A zwischen großer und kleiner Untereinheit selbst prozessiert. Dabei wird die Prodomäne nicht abgeschnitten.

Auch *in vivo* wurde in isolierten Hydra-Mitochondrien mit anti-3A-Antikörper ein 25 kD großes Fragment nachgewiesen, das PL von Caspase 3A entspricht. Das bedeutet, dass sich auch Caspase 3A *in vivo* nicht zwischen Prodomäne und großer Untereinheit prozessiert.

Mit einer active-site-Markierung von rekombinanter Caspase 3A wurde gezeigt, dass das PL-Fragment enzymatisch aktiv ist (vgl. Abb. 10, 11, 12). Auch aktive Caspase 3A *in vivo* setzt sich aus Prodomäne und großer Untereinheit zusammen: Bei einer active-site-Markierung von Hydra-Mitochondrien wurde ein 25 kD großes Fragment nachgewiesen, das PL entspricht (vgl. Abb. 32).

Es wurde außerdem gezeigt, dass die Prodomäne für die enzymatische Aktivität von Caspase 3A essentiell ist: So ließ sich bei der Expression von Caspase 3A ohne Prodomäne mit FITC-VAD-fmk kein aktives Fragment nachweisen (vgl. Abb. 14).

Zu Caspase 3B\*: Für rekombinante Caspase 3B\* konnte keine Selbstprozessierung gezeigt werden. Es wurde jedoch rekombinante Caspase 3B\* bzw. 3B mit apoptotischen Hydraextrakt inkubiert. Dabei fand eine Prozessierung der rekombinanten Caspase zwischen großer und kleiner Untereinheit, aber nicht zwischen Prodomäne und großer Untereinheit statt (vgl. Abb. 23 und 27). Dieses Ergebnis zeigt, dass auch rekombinante Caspase 3B\* nicht zwischen Prodomäne und großer Untereinheit prozessiert wird.

Aktive Caspase 3B\* *in vivo* wurde aus dem Cytoplasma affinitätsgereinigt. Von der DEVD-Säule wurde ein ca. 25 kD großes Fragment eluiert, das mit anti-3B-Antikörper nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 42). Der Größe nach entspricht dieses Fragments PL. Aktive Caspase 3B\* *in vivo* besteht also wie 3A aus Prodomäne und großer Untereinheit.

### 4.2.2 Die Funktion der Caspase-Prodomäne

In der Literatur werden Caspasen auf Grund der Größe ihrer Prodomäne in zwei Gruppen eingeteilt (Kumar und Colussi, 1999): Caspasen der Gruppe I wie humane Caspase-2 oder-8 haben lange Prodomänen. Sie sind Initiator-Caspasen. Mitglieder der Gruppe II dagegen haben kurze Prodomänen und sind Effektor-Caspasen, die meist durch Caspasen der Gruppe I aktiviert werden. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem Caspase-3 oder -6. Die Hydra-Caspasen 3A und 3B\* haben mit 85 bzw. 73 Aminosäuren relativ lange Prodomänen und sind damit eher in die Gruppe I einzuordnen.

Es wurde gezeigt, dass lange Prodomänen oft regulatorische Funktionen übernehmen. Die Prodomäne von Caspase-9 zum Beispiel enthält eine CARD-Sequenz, die eine Interaktion mit Apaf-1 möglich macht (Shiozaki *et al.*, 2002). Shiozaki *et al.* zeigten, dass die enzymatische Aktivität von Caspase-9 durch die Interaktion mit Apaf-1 bis um das Fünffache gesteigert wird. Die CARD-Sequenz ist in vielen Prodomänen der Gruppe I-Caspasen enthalten und ist relativ konserviert (Thome *et al.*, 1998). In den Hydra-Caspasen 3A und 3B\* konnte jedoch keine derartige Sequenz identifiziert werden. Es ist möglich, dass die Prodomäne der Hydra-Caspasen auch nach der Aktivierung der Caspasen mit anderen Proteinen interagiert und deshalb nicht abgetrennt wird. Zum Beispiel wird Caspase 3B\* erst nach Translokation ins Cytoplasma aktiviert bzw. prozessiert. Die Aktivierung könnte also von bestimmten Faktoren abhängen, die sich im Cytoplasma befinden. Eine Interaktion mit diesen Faktoren könnte ähnlich wie bei Caspase-9 über die Prodomäne stattfinden. Auch Caspase-9 wird nur zwischen großer und kleiner Untereinheit geschnitten, die Prodomäne wird nicht abgetrennt (Duan *et al.*, 1996, Srinivasula *et al.*, 1996).

Eine weitere Funktion von langen Prodomänen ist die Lokalisation von Caspasen. So wurde gezeigt, dass die Prodomäne von Caspase-2 eine NLS-Sequenz enthält, die eine Kernlokalisierung der Caspase hervorruft (Colussi *et al.*, 1998a). Bei Transfektion von Kulturzellen mit Caspase-2 mit und ohne Prodomäne zeigte sich eine unterschiedliche Lokalisation von Caspase-2 (Colussi *et al.*, 1998a). Baliga *et al.* wiesen eine Kernlokalisierung der GFP-fusionierten Prodomäne von Caspase-2 nach (Baliga *et al.*, 2003). Für Caspase-1 wurde eine Kernlokalisationssequenz in der Prodomäne nachgewiesen (Mao *et al.*, 1998).

Es wurde gezeigt, dass eine lange Prodomäne außerdem die autokatalytische Aktivität und die Induktion von Apoptose verstärken kann. So wurde in NIH-3T3 Zellen durch Transfektion eines Fusionsproteins aus langer Prodomäne von Caspase-2 und Caspase-3 massiv Apoptose induziert (Colussi *et al.*, 1998b).

Mittels Yeast-two-Hybrid wurde außerdem nachgewiesen, dass die lange Prodomäne von Caspase-2 die Dimerisierung der Caspase-Moleküle vermittelt (Colussi *et al.*, 1998b). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Caspasen-2 bzw. -1 ohne Prodomäne nicht prozessiert werden können, da eine Dimerisierung nicht möglich ist (Butt *et al.*, 1998, Van Crieking *et al.*, 1996).

### **4.3 Translokation und Aktivierung von Caspase 3B\* bei Apoptose**

M. Cikala hat in löslichem Extrakt von apoptotischen Hydren mit AcDEVD-amc Caspase-Aktivität nachgewiesen (Cikala *et al.*, 1999). Diese Aktivität ist DEVD-spezifisch und wird mit dem Caspase-3 Inhibitor DEVD-CHO und dem universellen Caspase-Inhibitor zVAD-fmk gehemmt. Auch mit FITC-VAD-fmk wurde im Cytoplasma von apoptotischen Hydren aktive Caspase der gleichen Spezifität markiert (vgl. Abb. 39, 40). Die aktive Caspase wurde aus löslichem Extrakt von nicht-apoptotischen Hydren affinitätsgereinigt und mit anti-3B-Antikörper als 3B\* identifiziert (vgl. Abb. 42).

Mit Hilfe von Immunfärbungen und Zellfraktionierung wurde gezeigt, dass Caspase 3B\* als Proenzym in der Mitochondrienfraktion lokalisiert ist. Eine Analyse von apoptotischen Zellfraktionen mit anti-3B-Antikörper machte deutlich, dass Caspase 3B\* bei Apoptose als Proenzym ins Cytoplasma transloziert ist und dort prozessiert wurde (vgl. Abb. 47). Deshalb konnte Caspase 3B\* auch nur aus löslichem Extrakt von nicht-apoptotischen Tieren affinitätsgereinigt werden, wenn die Zellorganellen durch Schockgefrieren und Sonifizieren vorher zerstört worden waren. Caspase 3B\* wird dabei offensichtlich aus den Mitochondrien freigesetzt und proteolytisch aktiviert.

Offenbar hängt die Aktivierung von Caspase 3B\* von Faktoren ab, die sich im Cytoplasma befinden. Es ist möglich, dass Caspase 3B\* ähnlich wie Caspase-9 (Li *et al.*, 1997) einen Komplex mit cytoplasmatischen Proteinen bildet, um die Prozessierung und Aktivierung zu ermöglichen. Die mitochondriale Lokalisation wäre ein Mechanismus, um die Aktivierung im nicht-apoptotischen Zustand zu inhibieren.

Für Caspase-2 und -9 wurde ebenfalls eine Änderung der Lokalisation nach Induktion von Apoptose nachgewiesen (Susin *et al.*, 1999): Es wurde mit Staurosporin Apoptose induziert und die Lokalisation nach Zellfraktionierung mit anti-Caspase-2- und anti-Caspase-9-Antikörper untersucht. Vor Apoptose-Induktion befinden sich beide Caspasen unprozessiert in der Mitochondrienfraktion, nach Induktion von Apoptose wurden die Caspasen als prozessierte Fragmente im Cytoplasma lokalisiert. Dieses Ergebnis stützen Susin *et al.* mit Immunfärbungen von normalen und apoptotischen Kulturzellen. Eine andere Arbeitsgruppe hingegen fand mit Immunfärbungen, dass Caspase-9 nach Staurosporin-Behandlung von den Mitochondrien in den Kern transloziert (Krajewski *et al.*, 1999). Auch für Caspase-8 wurde eine Translokation bei Apoptose und anschließende Prozessierung nachgewiesen: Durch die Analyse von Zellfraktionen mit anti-Caspase-8-Antikörper wurde gezeigt, dass der Anteil an Procaspase-8 in der Mitochondrienfraktion nach Induktion von Apoptose abnimmt. Im Gegenzug dazu konnte eine Zunahme an prozessierter Caspase-8 in der Cytoplasma-Fraktion von apoptotischen Zellen festgestellt werden (Qin *et al.*, 2001).

Auf welche Weise die Induktion von Apoptose die Freisetzung von Caspase 3B\* aus den Mitochondrien verursacht, wurde noch nicht geklärt. Es ist jedoch möglich, dass die Durchlässigkeit der PT-Poren in der äußeren Mitochondrienmembran damit in Zusammenhang steht. So wurden zum Beispiel gereinigte Mausleber-Mitochondrien mit Prooxidans t-BHP behandelt und eine verstärktes Anschwellen der Mitochondrien festgestellt, was mit wachsender Permeabilität einhergeht (Costantini *et al.*, 2002). Nach dieser Behandlung und anschließender Zentrifugation wurde Caspase-9 im Überstand nachgewiesen. Durch Zugabe von Cyclosporin A, einem Inhibitor der PT-Pore konnte die Freisetzung von Caspase-9 gehemmt werden.

## 4.4 Die Evolution von Caspasen als mitochondriale Enzyme

Hydren sind gemeinsam mit Schwämmen die einfachsten Vielzeller, in denen Caspasen identifiziert wurden (Cikala *et al.*, 1999, Wiens *et al.*, 2003). Bakterien, Einzeller, Pilze und Pflanzen besitzen Cystein-Proteasen, die aufgrund ihres Caspase-homologen katalytischen Zentrums als Meta- bzw. Paracaspasen bezeichnet werden (Uren *et al.*, 2000). Im Eukaryonten-Einzeller *L. major* wurde nach Induktion von Apoptose Aktivität einer dieser Cystein-Proteasen nachgewiesen (Arnoult *et al.*, 2002). Es ist möglich, dass Meta- und Paracaspasen die ursprüngliche Form der Caspasen bilden.

Eine phylogenetischer Vergleich zwischen Meta-, Paracaspasen und Caspasen aus Eukaryonten und entsprechenden Proteasen aus dem Proteobakterium *Rhizobia* zeigt eine klare phylogenetische Verwandtschaft zwischen den Enzymen aus Eukaryonten und denen aus Proteobakterien (Koonin und Aravind, 2002). Da Mitochondrien durch Endosymbiose von Proteobakterien entstanden sind, ist dies ein Hinweis darauf, dass Caspasen mitochondrialen Ursprungs sein könnten.

Hydra steht als einfacher, gewebusbildender Organismus an der phylogenetischen Basis der Metazoa. Man geht davon aus, dass sich Caspasen erst mit der Vielzelligkeit in Tieren entwickelt haben. In dieser Doktorarbeit wurde durch Immunfärbungen und die Analyse von zellulären Fraktionen mit anti-3A- und anti-3B-Antikörper gezeigt, dass Caspasen in Hydra mitochondrial lokalisiert sind. Dieses Ergebnis unterstützt die Theorie, dass Caspasen ursprünglich mitochondrial lokalisiert sein könnten.

Außerdem wurden Zellfraktionen von apoptotischen Hydren mit anti-3A-Antikörper analysiert und Caspase 3A in den Mitochondrien nachgewiesen.

Durch active-site-Markierung mit FITC-VAD-fmk wurde Aktivität von Caspase 3A in Mitochondrien von normalen und apoptotischen Hydren gezeigt (vgl. Abb. 32, 35). In beiden Fällen wurde ein Fragment markiert, das aufgrund seiner Größe einer Bande entspricht, die auch mit anti-3A-Antikörper erkannt wurde. Bei Apoptose wurde keinerlei Veränderung der markierten Bande hinsichtlich Intensität, Größe und Lokalisation festgestellt. Die mitochondriale Caspase 3A ist also unabhängig von Apoptose aktiv. Dieses Ergebnis führt zu weiteren Spekulationen über den evolutionären Ursprung von Caspasen. Es ist möglich, dass sich Caspasen von eigentlich mitochondrialen Proteasen zu Zelltod-spezifischen Enzymen entwickelt haben.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

M. Cikala hatte zwei Gene für Caspasen in Hydra identifiziert: 3A und 3B (Cikala *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden polyklonale Antikörper gegen rekombinante Hydra-Caspasen 3A und 3B im Kaninchen hergestellt. Der anti-3A-Antikörper aus Kaninchen ist wie der bereits hergestellte anti-3A-Antikörper aus Huhn (siehe Diplomarbeit T. Glasz, 2000) spezifisch für Caspase 3A. Der anti-3B-Antikörper ist ebenfalls spezifisch für Caspase 3B, reagiert aber auch mit (His)<sub>6</sub>-getagten Proteinen.

Es wurde eine dritte Caspase 3B\* identifiziert, die in Hydra aktiv ist, und deren Aminosäuresequenz nahezu identisch zu der von Caspase 3B ist. Caspase 3B wird in Hydra nicht transkribiert. Es wurde gezeigt, dass der anti-3B-Antikörper auch Caspase 3B\* erkennt.

Rekombinante Caspasen 3A, 3B und 3B\* wurden als Wildtyp und Mutanten, bei denen das aktive Zentrum mutiert ist, in *E. coli* exprimiert (siehe auch Diplomarbeiten T. Glasz, 2000, N. Schmidt, 1999, G. Zenner, 2001). Wildtyp Caspase 3A ist autokatalytisch aktiv. Autoproteolyse erfolgt zwischen großer und kleiner Untereinheit nach einem Aspartatrest. Die rekombinanten Caspasen 3B und 3B\* zeigten keine Selbstprozessierung.

Durch active-site-Markierung mit FITC-VAD-fmk und zEK(bio)D-aomc wurde gezeigt, dass rekombinante Caspase 3A enzymatisch aktiv ist. Die aktive Form von Caspase 3A besteht aus Prodomäne und großer Untereinheit. Die Aktivität wurde durch zVAD-fmk, jedoch nicht durch den Caspase-3-Inhibitor DEVD-CHO gehemmt. Exprimiert man Caspase 3A ohne Prodomäne, so findet man weder Autokatalyse noch enzymatische Aktivität. Die Prodomäne ist also für die Aktivität von Caspase 3A essentiell.

Enzymatische Aktivität konnte mit FITC-VAD-fmk ebenfalls für rekombinante Caspasen 3B und 3B\* gezeigt werden. Die Aktivität der Procaspase wird jedoch sowohl durch zVAD-fmk als auch durch DEVD-CHO gehemmt.

Außerdem wurde nachgewiesen, dass rekombinante Caspasen 3B und 3B\* im löslichen Extrakt von apoptotischen Hydren von einer in vivo Caspase prozessiert werden. Es erfolgt ein Schnitt zwischen großer und kleiner Untereinheit nach einem Aspartatrest. Die Prozessierung kann durch zVAD-fmk und durch DEVD-CHO gehemmt werden.

Es wurden subzelluläre Fraktionen von Hydren hergestellt. Mit Hilfe der anti-3A-Antikörper wurde festgestellt, dass Caspase 3A in vivo in der Mitochondrienfraktion lokalisiert ist. Dieses Ergebnis wurde durch Immunfärbungen von ganzen Hydren mit den anti-3A-Antikörpern und durch Doppelfärbung mit anti-3A-Antikörper und mitochondrien-spezifischen anti-AAC-Antikörper bestätigt. In Fraktionen von apoptotischen Hydren wurde Caspase 3A mit anti-3A-Antikörper ebenfalls in den Mitochondrien nachgewiesen.

In der Mitochondrienfraktion wurde mit FITC-VAD-fmk aktive Caspase 3A nachgewiesen. Die aktive Form ist wie beim rekombinanten Enzym PL, die Aktivität wird mit zVAD-fmk, jedoch nicht mit DEVD-CHO gehemmt. In Mitochondrien von apoptotischen Hydren wurde die selbe Aktivität nachgewiesen. Caspase 3A ist also eine konstitutiv aktive mitochondrial lokalisierte Caspase.

Durch Analyse der subzellulären Fraktionen mit anti-3B-Antikörper wurde Caspase 3B\* in vivo in der Mitochondrienfraktion nachgewiesen. Immunfärbungen mit anti-3B-Antikörper und Doppelfärbungen mit anti-3B- und anti-AAC-Antikörper bestätigen dieses Ergebnis. Bei Fraktionen von apoptotischen Hydren wurde Caspase 3B\* im Cytoplasma nachgewiesen.

Ebenso wurde im Cytoplasma von apoptotischen Hydren mit AcDEVD-amc, FITC-VAD-fmk und zEK(bio)D-aomc Aktivität von Caspase 3B\* nachgewiesen. Wie beim rekombinanten Enzym ist die Aktivität sowohl durch zVAD-fmk als auch durch DEVD-CHO hemmbar. Wurden die Zellorganellen von nicht-apoptotischen Hydren durch Schockgefrieren und Ultraschallbehandlung aufgebrochen, so wurde im löslichen Überstand die selbe Caspase-Aktivität gefunden. Diese aktive Caspase wurde affinitätsgereinigt und als 3B\* identifiziert. Caspase 3B\* ist also eine mitochondrial lokalisierte Caspase, die bei Apoptose oder beim Aufbrechen der Mitochondrien ins Cytoplasma transloziert und dort aktiviert wird.

## 6. LITERATUR

- Ameisen, J. C.** (1996) The origin of programmed cell death. *Science* 272(5266): 1278-9.
- Arnoult, D., Akarid, K., Grodet, A., Petit, P. X., Estaquier, J. and Ameisen, J. C.** (2002) On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ* 9(1): 65-81.
- Baliga BC, C. P., Read SH, Dias MM, Jans DA, Kumar S.** (2003) Role of Prodomain in Importin-mediated Nuclear Localization and Activation of Caspase-2. *J Biol Chem* 278(7): 4899-905
- Bosch, T. C. and David, C. N.** (1984) Growth regulation in Hydra: relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. *Dev Biol* 104(1): 161-71.
- Butt, A. J., Harvey, N. L., Parasivam, G. and Kumar, S.** (1998) Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal regions. *J Biol Chem* 273(12): 6763-8.
- Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Böttger, A., David, C. N.** (1999) Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan hydra. *Curr Biol* 9(17): 959-62.
- Colussi, P. A., Harvey, N. L. and Kumar, S.** (1998a) Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. A novel function for a caspase prodomain. *J Biol Chem* 273(38): 24535-42.
- Colussi, P. A., Harvey, N. L., Shearwin-Whyatt, L. M. and Kumar, S.** (1998b) Conversion of procaspase-3 to an autoactivating caspase by fusion to the caspase-2 prodomain. *J Biol Chem* 273(41): 26566-70.
- Costantini, P., Bruey, J. M., Castedo, M., Metivier, D., Loeffler, M., Susin, S. A., Ravagnan, L., Zamzami, N., Garrido, C. and Kroemer, G.** (2002) Pre-processed caspase-9 contained in mitochondria participates in apoptosis. *Cell Death Differ* 9(1): 82-8.
- Denault, J. B. and Salvesen, G. S.** (2002) Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 102(12): 4489-500.
- Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, A. M., Poirier, G. G., Froelich, C. J., He, W. W. and Dixit, V. M.** (1996) ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J Biol Chem* 271(28): 16720-4.

- Honegger, T., Zürrer, D., Tardent, P.** (1989) Oogenesis in Hydra Carnea: A new model based on light and electron microscopic analyses of oocyte and nurse cell differentiation. *Tissue and Cell* 21(3): 381-93
- Jacobson, M. D., Weil, M. and Raff, M. C.** (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88(3): 347-54.
- Käser M., L. L.** (2000) Protein degradation in mitochondria. *Cell & Developmental Biology* 11(181-90)
- Kerr, J. F., Harmon, B., Searle, J.** (1974) An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibres. *Journal of Cell Science* 14(3): 571-85
- Koonin, E. V. and Aravind, L.** (2002) Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ* 9(4): 394-404.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Ellerby, L. M., Welsh, K., Xie, Z., Deveraux, Q. L., Salvesen, G. S., Bredesen, D. E., Rosenthal, R. E., Fiskum, G. and Reed, J. C.** (1999) Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10): 5752-7.
- Krebs, J. F., Armstrong, R. C., Srinivasan, A., Aja, T., Wong, A. M., Aboy, A., Sayers, R., Pham, B., Vu, T., Hoang, K., Karanewsky, D. S., Leist, C., Schmitz, A., Wu, J. C., Tomaselli, K. J. and Fritz, L. C.** (1999) Activation of membrane-associated procaspase-3 is regulated by Bcl-2. *J Cell Biol* 144(5): 915-26.
- Krebs, J. F., Srinivasan, A., Wong, A. M., Tomaselli, K. J., Fritz, L. C. and Wu, J. C.** (2000) Heavy membrane-associated caspase 3: identification, isolation, and characterization. *Biochemistry* 39(51): 16056-63.
- Kumar, S. and Colussi, P. A.** (1999) Prodomains--adaptors--oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem Sci* 24(1): 1-4.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Langer T, N. W.** (1996) Regulated protein degradation in mitochondria. *Experientia* 52: 1069-76
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X.** (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease complex. *Cell* 91: 479-89

- Loytynoja, A. and Milinkovitch, M. C.** (2001) Molecular phylogenetic analyses of the mitochondrial ADP-ATP carriers: the Plantae/Fungi/Metazoa trichotomy revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10202-7.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S. J., Wesselborg, S. and Frohlich, K. U.** (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9(4): 911-7.
- Mancini, M., Nicholson, D. W., Roy, S., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Casciola-Rosen, L. A. and Rosen, A.** (1998) The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J Cell Biol* 140(6): 1485-95.
- Mao, P. L., Jiang, Y., Wee, B. Y. and Porter, A. G.** (1998) Activation of caspase-1 in the nucleus requires nuclear translocation of pro-caspase-1 mediated by its prodomain. *J Biol Chem* 273(37): 23621-4.
- Martin, S. J., Green, D. R. and Cotter, T. G.** (1994) Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends Biochem Sci* 19(1): 26-30.
- Martins, L. M., Kottke, T., Mesner, P. W., Basi, G. S., Sinha, S., Frigon, N., Jr., Tatar, E., Tung, J. S., Bryant, K., Takahashi, A., Svingen, P. A., Madden, B. J., McCormick, D. J., Earnshaw, W. C. and Kaufmann, S. H.** (1997) Activation of multiple interleukin-1beta converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272(11): 7421-30.
- Meier, P., Finch, A. and Evan, G.** (2000) Apoptosis in development. *Nature* 407(6805): 796-801.
- Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A.** (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22(8): 299-306.
- Qin, Z. H., Wang, Y., Kikly, K. K., Sapp, E., Kegel, K. B., Aronin, N. and DiFiglia, M.** (2001) Pro-caspase-8 is predominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J Biol Chem* 276(11): 8079-86.
- Rep M, G. L.** (1996) The role of protein degradation in mitochondrial function and biogenesis. *Curr Genet* 30: 367-80
- Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D. P. and Orrenius, S.** (1998) Detection of pro-caspase-3 in cytosol and mitochondria of various tissues. *FEBS Lett* 431(2): 167-9.

- Seipp, S., Schmich, J. and Leitz, T.** (2001) Apoptosis--a death-inducing mechanism tightly linked with morphogenesis in *Hydractina echinata* (Cnidaria, Hydrozoa). *Development* 128(23): 4891-8.
- Shikama, Y., U, M., Miyashita, T. and Yamada, M.** (2001) Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. *Exp Cell Res* 264(2): 315-25.
- Shiozaki, E. N., Chai, J. and Shi, Y.** (2002) Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(7): 4197-202.
- Sitte, N., Dubiel, W. and Kloetzel, P. M.** (1998) Evidence for a novel ATP-dependent protease from the rat liver mitochondrial intermembrane space: purification and characterisation. *J Biochem (Tokyo)* 123(3): 408-15.
- Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Zangrilli, J., Robertson, N., Armstrong, R. C., Wang, L., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G. and Alnemri, E. S.** (1996) The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem* 271(43): 27099-106.
- Sugiyama, T. and Fujisawa, T.** (1978) Genetic analysis of developmental mechanisms in *Hydra*. II. Isolation and characterization of an interstitial cell-deficient strain. *J Cell Sci* 29: 35-52.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M. and Kroemer, G.** (1999) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 189(2): 381-94.
- Terada, H., Sugiyama, T. and Shigenaka, Y.** (1988) Genetic analysis of developmental mechanisms in *hydra*. XVIII. Mechanism for elimination of the interstitial cell lineage in the mutant strain Sf-1. *Dev Biol* 126(2): 263-9.
- Thome, M., Hofmann, K., Burns, K., Martinon, F., Bodmer, J. L., Mattmann, C. and Tschopp, J.** (1998) Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol* 8(15): 885-8.
- Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y.** (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281(5381): 1312-6.

- Uren, A. G., O'Rourke, K., Aravind, L. A., Pisabarro, M. T., Seshagiri, S., Koonin, E. V. and Dixit, V. M.** (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 6(4): 961-7.
- Van Criekinge, W., Beyaert, R., Van de Craen, M., Vandenabeele, P., Schotte, P., De Valck, D. and Fiers, W.** (1996) Functional characterization of the prodomain of interleukin-1beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 271(44): 27245-8.
- van Loo, G., Saelens, X., Matthijssens, F., Schotte, P., Beyaert, R., Declercq, W. and Vandenabeele, P.** (2002) Caspases are not localized in mitochondria during life or death. *Cell Death Differ* 9(11): 1207-11.
- Wiens, M., Krasko, A., Perovic, S. and Muller, W. E.** (2003) Caspase-mediated apoptosis in sponges: cloning and function of the phylogenetic oldest apoptotic proteases from Metazoa. *Biochim Biophys Acta* 1593(2-3): 179-89.
- Wilson, K. P., Black, J.A.F., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., et al** (1994) Structure and mechanism of interleukin-1-beta converting-enzyme. *Nature* 370: 270-5
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R.** (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
- Xue, D., Shaham, S. and Horvitz, H. R.** (1996) The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. *Genes Dev* 10(9): 1073-83.
- Zhivotovsky, B., Samali, A., Gahm, A. and Orrenius, S.** (1999) Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* 6(7): 644-51.

## 7. ANHANG

### 7.1 DNA-Sequenzen

#### Caspase 3A

```

ATGTCTAATG TTAATATTTA TGGTTCCTGTA ACTGCTGTAA ATATTTCAAA
TAATGGTTCT CAAAAAGAAG TTCCTATTCC ATTTCATTCC ACAACAAAAA
ATTTATTTCC GCATTCCAAT GAACAGTTTT TACAGAAAAG TATTTTAAAG
ATAGATGATT GGTTCCTGA TTGGTTATTA GAAGAAACCA AAAAAGAAAA
TGAGTTAGCA GAGAAAGCAT TCGAATCAGT TGTGAACGCA ATTCGTGAAA
AAGATTTTTA TTACACATTA AGTACTGGTT TTGTATTGAT CATCAACAAC
GAAAAATTTG TTGAGGAAGA AAATAGAGAT GGCTCGGAAG TAGACGTTCA
AGCTTTAAAC TCTTTTTTCA AAGGTACTTT AGGTGGTGC GTAAAATCCT
GTAACAACCT GAAAAGGAA GATATTATTA ATATTGTGTA TTCTCTCTCT
CAAGTAAAGT GTTTTCCATT CTCTGCGTTA TTTATCGTTA TTTTATCTCA
TGGATCAGAA TCTGGAATAC TTGGCATCGA TTCATCTGAA GAGATAAAAA
TCAACAGTCT GCTTGAAAAC TTTAAAGCTG ATAATGCTCC TGCCTTTGAT
AAAAACCTA AAGTTTTTAT TGTACAGGCA TGCAGAGGGG AAAAAGATGA
TATCAGAAAA GATGGTATAA AAGATGCTAA AAGAATTAT TATAATGAAT
CAACCATTCC CATGTTAAGC GATTTTGTG TTGCTTACCC ATGCGCAGCA
GGATACACTG CTCTAAGATC AACAGTAAA GGTTCTGGT TTATTCAAGA
GTTGGTTAAA TGTTTGTGCGA TATTTTACGA TAAAGAAGAC TTTTTATCTA
TTTTGAATCG GGTAAATTTT AAAGTTGCAA ACGTTACGTT GCCACAAGGT
TTAAAAGAAC AGCCTTGTGTT TGAGGTGGT TTGCGCACGC GATGTTTTTT
TCAAGAGTAT TTCAGAAAA TACATAATAT TTTAGAATAT TACAGTTCGT
TAAACTCCGA TACAAAAAAG TTACTAATTA AAGGTGATTT TGAATTC

```

#### Caspase 3B

```

ATGGCAATGA ATGAGGATGG GTTTTCCATA TTAACTCTAA AAAACATGAT
TCAAACCAAC GAAAGTTTAT CAAGTACCCA AAGCAAGCCT GAAAACATAA
TAATAAAACA AGAGACAGTT TTAGTCAGGA ATGACGAGGA TGGTATACAA
TTTTTCGCACA TACGATATTT TCCTAATGAG CAAAAATAG ATTTATTGAA
GGTTGATTTT AAGTTTAACT CTGATAACTT TTATAATACC AATACTTTTC
CAAGAGGAAC TTTAACAATT ATAAATGTAA AAAATTTTAT GAAATCTTCT
AATAAGCATG AATACCCTAG ATTAGGTACA GATGTTGATG CAGAGAGTTT
ATGTGATCTT TTTCTAAAAT TAGGTTTTTAA AATAGATAGG TTAAATAATC
CCAAGTCAAC TGATGTATTA AACATACTGA AGCAGGCAGC AAATGAAGAT
TATTCTTCAA TGAGTTGTTG TGTGGTGGCA TTACTATCAC ATGGAGAAGA
GGGTAAAATT ATTTGCACAA ACGAATCTTT AAATATAAGG GAAATAACAA
ATCTGTTCTG CACTAAAGCT TTAGCAGGAA AACCAAATTT ATTTTTAATT
CAAGCATGCT GAGGAACAGA ATACATGGAA TCATTAGACA CGGTTGATGG
TCTCGGACCT GGATTGTCAA ATGAACCAA TGTCCTAGAT GTAACGTTG
AAAGCGATTT TTTGTACGCT TATTCAACAG TTCTAGGTTA TTATAGCTGG
AGCAGTCAAA AACTTGGTTC ATGGTTTATT AATGCTGCTG TTTCTGTCTT
TCGTGATTAT GCCCATAAAA TGGACGTTTT ACGACTTTTA ACACGCGTGA
ACAAAGAAGT GAGCGAAAAA ACGTCAATAA CCGATAATCT AACAAAAGAT
AATAAAAAAC AAATCGGTTT ACTAATCTCT CTATTGCGAA AAGAGTTATT
TTTCTTTCCA TATGATGAAC CTATGGAATC C

```

**Caspase 3B\***

ATGAATGAGG ATGGGGTTTC CATTTCAAAA CAAAAAAATT TGATTCAAAT  
 CAACGAAAGT TGTTCAAGTA CCCAAATCAG TTCGGAAAAT ATAATAAGGG  
 AACAAAGAGAC AGTTTCAGTC AGGAATGACG AGGAAGGTAT AGAATTTTCG  
 CACATAAGAT ATTTTCCTAA AAAGCCAACA ATAGATTTTAT CGAAGGTTGA  
 TTTCAAGTTA AACTCTGATA ACTTTTATGA TACTAACACT TTTCCAAGAG  
 GAACTTTAAC AATAATAAAT GTAAACAAC TTTATGAAATC TTCTGGTCGG  
 CATGATGACC CTAGATTAGG TACAGATGTT GATGCACAGA GTTTATGTGA  
 TCTTTTTCTA AAATTAGGTT TTTAAATAGA TAGGTTAGAT AATCCCAAGT  
 CAACTGATGT ATTAACATA CTGAAGCAGG CAGCAAATGA AGATTATCT  
 TCAATGAGTT GTTGTGTGGT GGCATTACTA TCACATGGAG AAGAGGGTAA  
 AATTTTTTGC ACAAACGAAT CTTTAAATAT AAGGGAAATA ACAAATCTAT  
 TCTGCACTAA TGCTTTAGCC GGAAAACCAA AATTATTTTTT AATTCAAGCA  
 TGTCGAGGAA CAAAATACAT GGAATCAATA GACACGGTTG ATGGTTTCGG  
 ACCTGGATTG TCAAATGAAT CAAATGTCCT AGATGTAAC GTTGAAAGCG  
 ATTTTTTGTA CGCTTATTCA ACAGTTCAA GTTATTATAG CTGGAGAAAT  
 CAAAACTTG GTTCGTGGTT TATTAATGCT GTTGTTCCTG TCTTTCGTGA  
 TTATGCCCAT AAAATGGACG TTTTACGACT TTTAACACGC GTGAACAAAG  
 AAGTAAGCAA AAAAACGTCG ATAACCGATA ATCTAACGAA AGATAATAAA  
 AAACAAATCG GTTCACTAAT CTCTCTATTG CGAAAAGAGT TATTTTTCTT  
 TCCATATGAT GAACCTATGG AATCC

**7.2 Aminosäuresequenzen****Caspase 3A**

MSNVNIYGSV TAVNISNNGS QKEVPIPFIP TTKNLFPHSN EQFLQKSILK  
 IDDFWPDWLL EETKKENELA EKAFESVVNA IREKDFYYTL STGFVLIINN  
 EKFEVEENRD GSEVDVQALN SFFKGTLGWC VKSCNNLKRE DIINIVYSLS  
 QVKCFPSAL FIVILSHGSE SGILGIDSSE EIKINSLEN FKADNAPAFD  
 KKPKVFIVQA CRGEKDDIRK DGIKDAKRTY YNESTIPMLS DFVVAYPCAA  
 GYTALRSTVK GSWFIQELVK CLSIFYDKED FLSILNRVNF KVANVTLPQG  
 LKEQPCFEVG LRTRCFFQEY FRKLNHILEY YSSLNSDTKK LLIKGDFFEF

**Caspase 3B**

MAMNEDGVSI LTLKNMIQTN ESLSSTQSKP ENIIKQETV LVRNDEDGIQ  
 FSHIRYFPNE PKIDLLKVDF KFNSDNFYNT NTFPRGTLTI INVKNFMKSS  
 NKHEYPRLGT DVDAESLCDL FLKLGFKIDR LNNPKSTDVL NILKQANED  
 YSSMSCCVVA LLSHGEEGKI ICTNESLNIR EITNLFCTKA LAGKPKLFLI  
 QACRGTEYME SLDTVDGLGP GLSNPNVLD VTVESDFLYA YSTVLGYYSW  
 SSQKLGSWFI NAAVSVFRDY AHKMDVLRLL TRVNKEVSEK TSITDNLTKD  
 NKKQIGSLIS LLRKELFFFP YDEPMES

**Caspase 3B\***

MNEDGVSISK QKNLIQINES CSSTQISSEN IIREQETVSV RNDEEGIEFS  
 HIRYFPKKPT IDLSKVDFKL NSDNFYDTNT FPRGTLTIIN VNNFMKSSGR  
 HDDPRLGTDV DAQSLCDLFL KLGFKIDRLD NPKSTDVLNI LKQANEDYS  
 SMSCCVVALL SHGEEGKIFC TNESLNIREI TNLFCTNALA GPKPLFLIQA  
 CRGTYMESI DTVDGFGPGL SNESNVLDVT VESDFLYAYS TVQSYYSWRN  
 QKLGSWFINA VVSVFRDYAH KMDVLRLLTR VNKEVSKKTS ITDNLTKDNK  
 KQIGSLISLL RKELFFFPYD EPMES

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Nikola Schmidt          Diplom-Biologin,  
geboren am 8.7.1973 in Hof/Saale, ledig

### Schule

---

9/79-7/83                  Grundschule in München  
9/83-7/92                  Gymnasium in München und Landshut  
8.7.1992                  Abitur am Hans-Leinberger-Gymnasium,  
Landshut (Note: 1,7)

### Studium

---

11/1992-10/1994          Studium des Lehramts an Grundschulen,  
Ludwig-Maximilians-Universität, München  
11/1994-10/1999          Studium der Biologie,  
Ludwig-Maximilians-Universität, München  
Schwerpunkt: Zellbiologie und Biochemie  
Abschluss: Diplom-Biologin (Note: 1,2)

### Berufliche Tätigkeit und Promotion

---

7/2000-7/2003          Promotion am Department Biologie II,  
Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie,  
Prof. Charles N. David  
Ludwig-Maximilians-Universität, München  
Biochemische und molekularbiologische  
Laborarbeit, Lehrauftrag

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Charles N. David für die Bereitstellung des Themas, die inhaltliche und fachliche Betreuung und die große Hilfe beim Schreiben dieser Arbeit.

Außerdem danke ich Frau Dr. Angelika Böttger und Frau Dr. Olga Alexandrova für die wissenschaftliche Betreuung der Versuche.

Vielen Dank auch an Frau Beate Stiening für die Ausführung wichtiger Versuche, die zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Darüber hinaus danke ich der gesamten Arbeitsgruppe David für das angenehme Arbeitsklima.