

Caspase-4-Aktivitätsassay mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie - Eine sensitive Methode für die direkte Bestimmung in der Zellkultur am Beispiel der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Anne Theresa Bingel

geboren am 5. Februar 1986 in Sangerhausen

2016

Gutachter:

1. Prof. Dr. Udo Markert, Jena
2. Frau Prof. Dr. Ingrid Hilger, Jena
3. Prof. Dr. Udo Jeschke, München

Tag der öffentlichen Verteidigung: 12.06.2017

Für meine Eltern und Robert

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Motivation der Arbeit	3
1.2 Caspasen – Die Funktionen im Überblick	5
1.2.1 Apoptose – Caspasen als Hauptakteure des programmierten Zelltods .	5
1.2.2 Inflammation – Caspasen als Mediatoren der Entzündung	8
1.2.3 Zelldifferenzierung und Proliferation – Die Rolle der Caspasen beim Überleben der Zelle	9
1.2.4 Fehlregulation von Caspasen – Pathologien als Folge dysfunktionaler Enzyme.....	10
1.3 Caspasen – Im Detail	11
1.3.1 Einteilung und Eigenschaften.....	11
1.3.2 Caspase-4	15
1.3.3 Caspase-Substrate	20
1.3.4 Caspase-Inhibitoren.....	23
1.4 Bestimmung der Caspase-Aktivität – Eine Übersicht der Caspase-Assays	24
1.4.1 Detektionsmöglichkeiten auf Proteinebene	24
1.4.2 Detektionsmöglichkeiten auf mRNA/DNA - Ebene	26
1.5 HPLC – High Performance Liquid Chromatography	27
2 ZIELE DER ARBEIT	32
2.1 Ziele der Arbeit.....	32
2.2 Arbeitshypothesen.....	33
3 METHODIK	34
3.1 Die Zelllinie JEG-3.....	34
3.2 Kultur der Zelllinie JEG-3.....	34
3.3 Einfrieren und Auftauen der Zelllinie JEG-3.....	35
3.4 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	35
3.5 Aktivitätsbestimmung einer rekombinanten Caspase-4	36
3.6 Direkte Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 in der Zellkultur JEG-3 durch RP-HPLC	38
3.7 Indirekte Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 nach Proteinisolation aus der Zellkultur JEG-3 durch RP-HPLC	43
3.8 Aufnahme von Fluoreszenzspektren von Caspase-4-Substrat, freiem AFC	

und einem Gemisch beider Substanzen	47
3.9 Erstellen von Kalibriergeraden und Messung von AFC-Standardlösungen bei verschiedenen Wellenlängen zur Bestimmung des Wellenlängenoptimums ...	49
3.10 Untersuchung der Stabilität von Caspase-4-Substrat im Zellkulturüberstand bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen.....	50
3.11 Einfluss von magnetischen Nanopartikeln auf die Detektion der Fluoreszenz von AFC durch RP-HPLC.....	51
3.12 Statistische Auswertung	52
4 ERGEBNISSE	53
4.1 Aktivitätsbestimmung einer rekombinanten Caspase-4	53
4.2 Direkte Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 durch Bestimmung der AFC-Konzentration in Zellkulturüberständen und Zelllysaten von JEG-3 durch RP-HPLC	55
4.2.1 Optimierung der RP-HPLC-Messbedingungen.....	55
4.2.2 Ergebnisse für die Zellkulturüberstände	57
4.2.3 Ergebnisse für die Zelllysate	62
4.2.4 Vergleich der AFC-Konzentrationsbestimmung in Zellkulturüberständen und den dazugehörigen Zelllysaten.....	66
4.3 Vergleich der direkten und indirekten Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 einer JEG-3-Zellkultur.....	69
4.4 Untersuchung von Fluoreszenzspektren.....	71
4.4.1 Ein Vergleich der Fluoreszenzspektren von Caspase-4-Substrat, freiem AFC und einem Gemisch beider Substanzen.....	71
4.4.2 Erstellen von Kalibriergeraden und Messung von AFC-Standardlösungen bei verschiedenen Wellenlängen zur Bestimmung des Wellenlängenoptimums.....	73
4.5 Untersuchung der Stabilität des Caspase-4-Substrats im Zellkulturüberstand bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen.....	74
4.5.1 Lagerung des Zellkulturüberstands bei Raumtemperatur	74
4.5.2 Vergleich der Lagerung des Zellkulturüberstands bei -20°C und -80°C	76
4.5.3 Einfluss wiederholter Temperaturänderungen auf die Stabilität des Caspase-4-Substrats im Zellkulturüberstand	77
4.6 Einfluss von magnetischen Nanopartikeln auf das Fluoreszenzsignal von freiem AFC	80
5 DISKUSSION.....	82
5.1 Direkte Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 in der Zellkultur JEG-3 durch	

RP-HPLC	82
5.2 Vergleich der direkten und indirekten Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 in Zellkulturüberständen und Zelllysaten der Zellkultur JEG-3	90
5.3 Untersuchung der Stabilität des Caspase-4-Substrats bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen.....	93
5.4 Einordnung der fluoreszenzbasierten direkten Aktivitätsmessung der Caspase-4 mittels RP-HPLC und ein Vergleich mit anderen Methoden zur Caspase-Aktivitätsbestimmung	96
6 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	101
LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	I
Abbildungsverzeichnis	I
Literaturverzeichnis	II
ANHANG	X
Publikation	X
Danksagung.....	XI
Ehrenwörtliche Erklärung	XII
Verwendete Geräte, Materialien und Zusammensetzung von Puffern.....	XIII

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

AFC	7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarin (Ac-LEVD-AFC ist das Caspase-4-Substrat, bestehend aus AFC, einem Tetrapeptid und einem Acetyl-Rest)
Apaf-1	Apoptosis protease activating factor-1
Bax	Bcl-2 assoziiertes X-Protein (intrazellulärer proapoptotischer Faktor)
Bcl-2	B-cell-lymphoma-2 (intrazellulärer antiapoptotischer Faktor)
BID	BH3 interacting-domain death agonist
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
CAD	Caspase-activated DNase
CARD	Caspase-recruitment domain
CASBAH	The CAspase Substrate DataBAse Homepage
CASP-4	Caspase-4 Gen
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CD95	Membranprotein vom Typ I, gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren; auch als Todesrezeptor bezeichnet, dient der Transduktion des Apoptose-Signals, Synonyme: APO1-R, Fas-R, TNF-R
CED	Cell death abnormality (Mutante des Fadenwurms <i>Caenorhabditis elegans</i>)
Ced-3	Apoptose-Gen des Nematoden <i>Caenorhabditis elegans</i> , entspricht der humanen Caspase-1
Ced-4	Apoptose-Gen des <i>Caenorhabditis elegans</i> mit Bedeutung während der Embryogenese
CFP	Cyan fluorescent protein
CrmA	Cowpox virus serpin, Cytokine response modifier A
CXCL7	Chemokine (C-X-C motif) ligand 7
DED	Death effector domains
DEVD	Tetrapeptid (Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat)
DISC	Death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dUTP	2'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated via death domain
FAM	Fluorescein (FITC steht für Fluoresceinisothiocyanat)
Fas	Oberflächenantigen
FKS	Fetales Kälberserum
FLIVO	FLuorescence in vIVO
FLICA	Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases
FMK	Fluoromethylketon
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energietransfer
GNP	Gold-Nanopartikel
GRP78	Glucose-regulated protein 78
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HGF	Hepatocyte growth factor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAP	Inhibitors of Apoptosis
ICE	Interleukin-1 β converting enzyme
ICErel-II	ICE-related-2 (Synonym für Caspase-4)
ICH-2	ICE and ced-3 homolog 2 (Synonym für Caspase-4)
ICE	Interleukin Converting Enzyme
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
LEVD	Tetrapeptid (Leucin-Glutamat-Valin-Aspartat)
LIF	Leukaemia Inhibitory Factor
LPS	Lipopolysaccharide
MeOH	Methanol
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
NF κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	Nucleotide binding oligomerization domain
NP	Nanopartikel (GNP steht für Gold-NP, MNP für Magnetische NP)
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
RNA	Ribonucleinsäure
PICS	Proteomic identification of protease cleavage sites
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
RIP1	Receptor-interacting protein 1
RP-HPLC	Reversed-Phase-High Performance Liquid Chromatography
rpm	rounds per minute
SCL	Positional scanning synthetic combinatorial libraries
TG	Thapsigargin
TLR	Toll-like receptor
TM	Tunicamycin
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TNFR	TNF-Rezeptor
TRADD	TNFR-1-associated death domain
TRAF6	TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAP1	TNF-receptor-associated protein 1
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
TX	Transcript X (Synonym für Caspase-4)
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UPLC-MS	Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass-Spectrometry
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
YFP	Yellow fluorescent protein
Z	Benzyloxycarbonylschutzgruppe
Z-VAD-FMK	Pan-Caspase-Inhibitor (Tripeptid VAD: Valin-Alanin-Aspartat)
Z-LEVD-FMK	Caspase-4-Inhibitor

ZUSAMMENFASSUNG

Caspase-4 ist eine ubiquitäre Cysteinprotease, die sich vor allem in der äußeren Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) befindet. Sie zählt zu den inflammatorischen Caspasen, die man auch als ICE-Subfamilie zusammenfasst. Zu dieser Gruppe zählt man aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit Caspase-1, -4 und -5. Ihr Aufgabenschwerpunkt ist die Regulation entzündlicher Prozesse. Der Caspase-4 schreibt man zudem eine Schlüsselrolle bei der ER-induzierten Apoptose zu. Es besteht eine Vielzahl von Möglichkeiten, Caspasen und deren katalytische Aktivität in Geweben und Zellen zu bestimmen. Hierbei unterscheidet man den Nachweis auf mRNA- und DNA-Ebene von dem auf Ebene des Proteins. Bei zuletzt genannter Methode spielt insbesondere die Bestimmung der Aktivität funktionsfähiger Enzyme durch Umsetzung spezifischer Caspase-Substrate, die aus einem an ein Peptid gekoppelten Fluorochrom bestehen, eine wichtige Rolle. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer neuen Herangehensweise an die fluorimetrische Caspase-Aktivitätsbestimmung, unter Verwendung der RP-HPLC und eines fluoreszierenden Caspase-Substrats. Die etablierten Caspase-Assays beruhen auf der Herstellung eines Proteinisolats von Zellen einer bestimmten Zellkultur. Dem Proteingemisch wird das entsprechende Caspase-Substrat beigefügt. Wenn Caspasen im aktivierten Zustand vorliegen, wird dieses katalytisch umgesetzt unter Freisetzung der gekoppelten und detektierbaren Verbindungen. Es sollte am Beispiel der Caspase-4 in adhärent wachsenden, humanen Chorionkarzinomzellen der Zelllinie JEG-3 gezeigt werden, dass eine direkte Aktivitätsmessung der Caspase-4 in einer solchen Zellkultur erfolgen kann, unter Verwendung des Zellkulturüberstands und dem membrangängigen Caspase-4-Substrat (Ac-LEVD-AFC). Hierfür inkubierte die JEG-3-Zellkultur zuvor mit dem Caspase-4-Substrat für insgesamt vier Stunden. Das Substrat diffundierte in die Zellen und wurde dort von aktiver Caspase-4 umgesetzt. Das abgespaltene fluoreszierende AFC diffundierte in den Zellkulturüberstand. Anschließend erfolgte darin die Konzentrationsbestimmung des AFC nach vorheriger chromatographischer Auftrennung von anderen fluoreszierenden Bestandteilen des Zellkulturüberstands. Dabei konnte man sehen, dass der Zellkulturzusatz eines spezifischen membrangängigen Caspase-4-Inhibitors einen reduzierenden Effekt auf die Caspase-4-Aktivität der JEG-3-Zellkultur ausübt. Wurde hingegen sogar ein Pan-Caspase-Inhibitor zuge-

setzt, sanken die Caspase-4-Aktivität und damit die detektierbare AFC-Konzentration noch weiter. Dies ließ vermuten, dass an der Katalyse des Caspase-4-Substrats auch andere Caspasen beteiligt sind. Es zeigte sich, dass der Anteil an freigesetztem AFC, der in den Zellen verbleibt und nicht in den Zellkulturüberstand diffundiert, ca. 2,5-fach geringer ist. Dessen Bestimmung ist fehlerbehafteter und möglicherweise verzichtbar. Die Bestimmung der AFC-Konzentration erfolgte durch einen mit der RP-HPLC-Anlage gekoppelten Fluoreszenzdetektor. Da auch intaktes Caspase-4-Substrat fluoresziert, konnte durch die chromatographische Trennung eine Überlagerung der Signale bei der Detektion vermieden werden. Der Wechsel zu einer Gradientenelution erbrachte eine bessere Quantifizierung im niedrigen Konzentrationsbereich (bis zu 0,2 pmol/ml, im Vergleich zu 40 pmol/ml durch ein isokratisches Trennverfahren). Das Verhältnis der beiden Eluenten Wasser und Methanol änderte sich im zeitlichen Verlauf. Der Nachteil dieser präziseren Bestimmung war eine Verlängerung der Elutionszeit von freiem AFC und der Zeit zur Reequilibration des HPLC-Systems. Die Fluoreszenzspektren der einzelnen fluoreszierenden Bestandteile des Zellkulturüberstands wurden zudem ausgewertet. AFC fluoresziert maximal im Bereich von 490 nm, wird es bei 400 nm angeregt. Das intakte Caspase-4-Substrat weist in diesem Bereich jedoch ebenfalls eine nicht zu vernachlässigende Fluoreszenz auf, obwohl das AFC noch an das Tetrapeptid gebunden ist. Die Emissionsspektren beider Substanzen überlappen sich folglich. Die chromatographische Auftrennung von AFC und Caspase-4-Substrat machte eine Messung am Fluoreszenzmaximum von AFC ohne Störeinflüsse möglich. Wird der Zellkulturüberstand von der Zellkultur getrennt und die enzymatische Reaktion durch Methanol beendet, zeigt sich ein nicht unerheblicher Anteil an nicht-enzymatischer AFC-Freisetzung, der erst nach sechs Stunden unter Lagerung bei Raumtemperatur signifikant ist. Eine Lagerung des Zellkulturüberstands bei einer Temperatur von -20°C ist der bei -80°C vorzuziehen, da bis zu sieben Tage ohne signifikante Zunahme des nicht-enzymatisch umgesetzten AFC-Anteils zu rechnen ist. Auch kann der Zellkulturüberstand problemlos einmalig auf -20°C eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Zusammenfassend beschreiben wir eine alternative Herangehensweise an die fluoreszenzbasierte Caspase-4-Aktivitätsmessung auf Grundlage des Zellkulturüberstands nicht lysierter, adhärent wachsender JEG-3-Zellen mit Bestimmung der AFC-Konzentration nach vorheriger chromatographischer Auftrennung.

1 EINLEITUNG

1.1 Motivation der Arbeit

Entscheidet sich eine Zelle für den programmierten Zelltod, setzt sie eine Reihe komplexer Mechanismen in Gang, die in der Auflösung der Zelle enden. Eine Gruppe von Proteasen, die sogenannten Caspasen, besitzen hierbei eine Schlüsselrolle. Doch nicht nur die Apoptose soll zu den Aufgaben der Caspasen gehören, auch bei Regulationsmechanismen der Entzündung misst man bestimmten Mitgliedern dieser Proteasefamilie eine wichtige Bedeutung zu, ebenso wie bei Prozessen der Zellproliferation und Differenzierung (Lamkanfi et al. 2007). Deren Aktivierung im Netzwerk dieser Aufgaben ist streng kontrolliert. So werden sie als inaktive Procaspasen produziert und erlangen erst dann katalytische Aktivität, wenn spezifische Signalmoleküle Kaskaden in Gang setzen, die in der Organisation der Enzyme in höhermolekularen Komplexen enden. Apoptotische Caspasen wiederum aktivieren oder inaktivieren nachgeschaltete Substrate, was letztlich zur Zerstörung der einzelnen Zelle führt, ohne jedoch entzündliche Prozesse hierdurch zu initiieren. Aktivierte inflammatorische Caspasen ziehen die Freisetzung einer Reihe von entzündlichen Botenstoffen nach sich, wodurch die Antwort der angeborenen Immunität des Organismus generiert werden kann.

Die Endoproteasen sind in ein komplexes Netzwerk von Signalwegen involviert. Fehlregulierte Caspasen führen daher zu einer Störung des reibungslosen Ablaufs wichtiger biologischer Prozesse und können aufgrund ihrer spezifischen Aufgaben zu einer Vielzahl von Krankheiten führen. Man geht davon aus, dass viele Karzinome und entzündliche Erkrankungen durch gestörte Caspase-Aktivität bedingt sein können. Um effektive therapeutische Strategien zu entwickeln, ist es von enormer Bedeutung, genau zu verstehen, in welchem feinen Regelwerk diese Enzyme arbeiten und kontrolliert werden.

Caspasen und deren Funktionsmechanismen sind Gegenstand intensiver Forschungen. Es gibt eine Reihe von Caspasen, über deren Metabolismus man bis heute viele Erkenntnisse gewinnen konnte. Ebenso gibt es einzelne Caspasen, über die nur wenig bekannt ist und deren Aufgabenbereich Gegenstand zahlreicher Studien und

Diskussionen ist. Hierzu gehört die Caspase-4. Immer mehr kristallisiert sich heraus, dass sie ein Enzym ist, deren Aufgabenschwerpunkt bei entzündlichen Prozessen und bei der Apoptose liegt, die durch Stress im Endoplasmatischen Retikulum induziert wird. Hierbei dient sie in vielen Untersuchungen dieses spezifischen Zelltodes als dessen Indikator. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit die Aktivität dieser und anderer Caspasen sehr genau bestimmen zu können.

Erkenntnisse des Placenta-Labors der Universitätsfrauenklinik auf dem Gebiet der Caspase-Aktivitätsmessung sind die Motivation dieser Dissertation.

So konnten Koehn et al. 2008 eine Methode zur Quantifizierung von 7-Amino-4-Trifluoro-Methylcoumarin (AFC) in Lysaten der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 entwickeln, bei der mittels RP-HPLC die Aktivität der Caspase-4 bestimmt werden konnte (Koehn et al. 2008). Fitzgerald et al. konnten 2005 zeigen, dass die Genexpression von Caspase-4 in diesen maligne entarteten Trophoblastzellen gesteigert wird, nach vorheriger Stimulation mit dem Zytokin Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) (Fitzgerald et al. 2005).

Die vorliegende Dissertation greift die Erkenntnisse beider oben genannter Arbeiten auf und stellt eine Weiterentwicklung und Verbesserung des Enzymaktivitäts-Assays durch RP-HPLC dar. So soll gezeigt werden, dass man die Aktivität der Caspase-4 bereits aus den Zellkulturüberständen der JEG-3 Zellen bestimmen kann, was zu einer Optimierung und Vereinfachung der Caspase-Aktivitätsbestimmung beitragen soll.

Caspasen stehen im Mittelpunkt zahlreicher Studien, die sich mit der Apoptose und Inflammation befassen. Aktuell gibt es eine Reihe von etablierten Methoden zur Caspase-Aktivitätsmessung. Diese Arbeit soll die fluoreszenzbasierte Bestimmung der Caspase-4-Aktivität mittels RP-HPLC mit diesen vergleichen, sowie Vor- und Nachteile verdeutlichen.

1.2 Caspasen – Die Funktionen im Überblick

1.2.1 Apoptose – Caspasen als Hauptakteure des programmierten Zelltods

Der genetisch regulierte und evolutionär konservierte programmierte Zellsuizid ist entscheidend für die Homöostase und Integrität des Zellorganismus. Er besitzt nicht zuletzt deswegen eine entscheidende Bedeutung für regulär ablaufende physiologische Prozesse der Gewebeerneuerung und ein intaktes Immunsystem. Überalterte Zellen sollen aus dem Gewebe eliminiert werden, ohne entzündliche Prozesse in Gang zu setzen. Das spielt sowohl beim Wachstum, als auch bei der Involution von Organen eine entscheidende Rolle. So führen ein Prolactinabfall zur Rückbildung der laktierenden Milchdrüse und ein Mangel an Androgenen zu Apoptose im Prostatagewebe.

Für einen reibungslosen Ablauf der Apoptosemaschinerie sind eine Vielzahl von Proteinen und proteolytischen Prozessen notwendig. Im Mittelpunkt dieser Signalwege steht eine Gruppe von Proteasen, die sogenannten Caspasen. Diese Enzyme werden durch proapoptotische Stimuli getriggert und sind Teil eines intrazellulären Geschehens, das in der Auflösung der Zelle kulminiert. Entscheidend hierfür sind in Kaskaden ablaufende Prozesse.

Die Bezeichnung „apoptosis“ wurde 1972 von Kerr et al. zur Beschreibung des programmierten Zelltodes als regulierte Form des Zelluntergangs vorgeschlagen. Sie wollten damit ein spezifisches morphologisches Muster des Zelltodes beschreiben, welches sie bei der Zellelimination während der Embryonalentwicklung und bei der normalen Gewebeerneuerung in gesundem Gewebe beobachten konnten. Das Wort „apoptosis“ stammt aus dem Griechischen und bezeichnet den Fall der Blätter von Bäumen und soll einen Vergleich zum kontrollierten Vorgang der Elimination einzelner Bestandteile im Organismus aufzeigen, ohne dass dieser dabei zerstört wird (Kerr et al. 1972).

Folgende morphologische Prozesse laufen beim programmierten Zelltod ab (siehe auch Abbildung 1.1):

- Das Chromatin verdichtet sich und wird durch CAD (caspase-activated DNase) in kleine Fragmente von ca. 180 Basenpaaren zerkleinert

- Zelle und Zellkern schrumpfen und werden in membranumhüllte Körperchen abgeschnürt (apoptotic bodies)
- Phosphatidylserin wird an die Außenseite der Zellmembran exponiert, wodurch umliegenden Zellen und Makrophagen diese apoptotischen Zellreste erkennen, phagozytieren und im Phagosom abbauen, ohne ein entzündlichen Prozess in Gang zu setzen

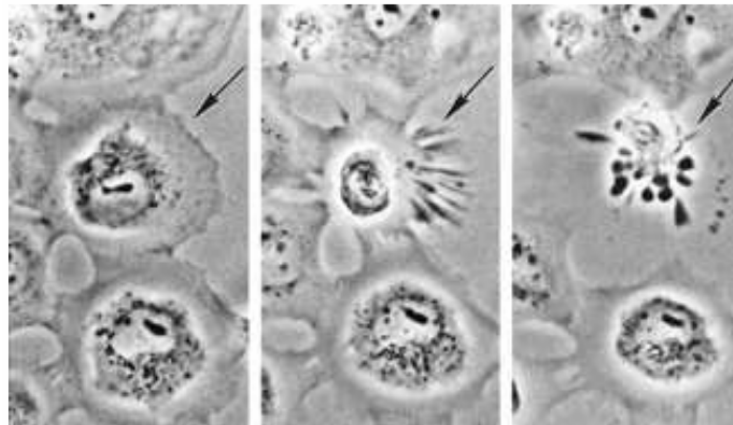


Abbildung 1.1: Morphologische Prozesse während des programmierten Zelltods. Die Tumorzelle schrumpft, schnürt Membranausstülpungen ab („membrane blebbing“) und löst sich vom Untergrund und aus dem Zellverband.

Diese morphologisch relativ einfach zu beschreibenden Vorgänge spiegeln nicht annähernd die Komplexität der involvierten Mechanismen auf molekularer Ebene wieder.

Es gibt zwei fest etablierte Aktivierungswege der Apoptose: Den extrinsischen (Rezeptor-vermittelten) und den intrinsischen (Mitochondrien-vermittelten) Weg, die beide zur Initiierung der Effektorcaspasen führen, um so den Tod der Zelle herbeizuführen. Abbildung 1.2 gibt einen schematischen Überblick beider Signalwege.

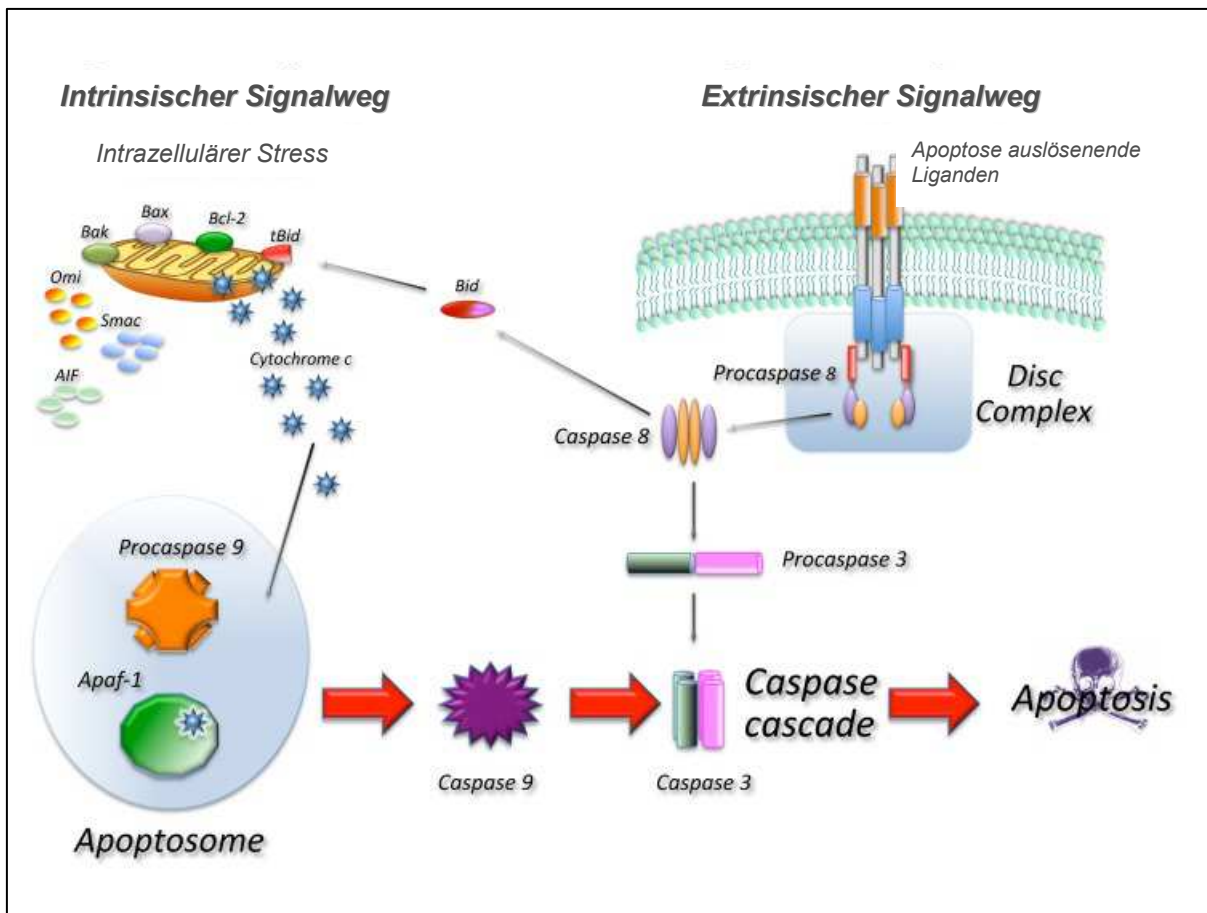


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der zur Apoptose führenden Aktivierungswege. Beim extrinsischen Signalweg binden Liganden an ihre spezifischen Rezeptoren der Zellmembran, was zur Bildung des DISC-Komplexes führt. Hierdurch wird Caspase-8 aktiviert. Intrazelluläre Stressoren führen bei der intrinsischen Signalkaskade zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Dies führt zur Bildung des Apoptosoms und zur Aktivierung der Caspase-9. Caspase-8 und -9 aktivieren nachgeschaltete Effektorcaspasen, was im programmierten Zelltod endet. Das BH₃ only Protein Bid verbindet beide Signalwege miteinander. Es kann durch Caspase-8 aktiviert werden und so den mitochondrialen Apoptoseweg einleiten.

Beim extrinsischen Aktivierungsweg führen verschiedene Stimuli, wie TNF- α , TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) oder eine Aktivierung des Liganden/Rezeptorkomplexes Fas/CD95 zur Auslösung der nachgeschalteten Signalwege. Diese Liganden binden an Rezeptoren der Plasmamembran, die zur TNF-Rezeptor-Familie gehören (TNFR), wodurch auf der zytosolischen Seite Adaptermoleküle wie FADD (Fas-associated via death domain), TRADD (TNFR-1-associated death domain) und RIP1 (receptor-interacting protein 1) gebunden werden. Durch diese Interaktion werden Caspase-8 und -10 rekrutiert und aktiviert, um den „death inducing signaling complex“ (DISC) zu bilden (Ashkenazi und Dixit 1999, Krammer 2000).

Beim mitochondrialen Weg führen Schäden an DNA und Mitochondrien, sowie zytotoxischer Stress oder UV-Schäden zur Aktivierung von Proteinen, die zur Bax-Subfamilie und zur Bcl-2-Familie gehören. Diese binden an die Mitochondrienmembran, wodurch sie im Rahmen der MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization) durchlässig für Cytochrom c und eine Reihe weiterer Faktoren wird (Chipuk und Green 2008). Im Zytosol bindet Cytochrom c an Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1), was zur Bildung des "Apoptosomes" führt und die Initiator-Caspase-9 aktiviert (Cain et al. 2002).

Beide Wege führen letztendlich zur proteolytischen Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7. Durch deren Fähigkeit zur Proteinspaltung werden zellprotektive Proteine inaktiviert und das wiederum zerstört Eiweiße im Zytoplasma und im Zellkern, was schließlich zur Auflösung der Zelle führt.

1.2.2 Inflammation – Caspasen als Mediatoren der Entzündung

Caspasen werden vorrangig mit den molekularen Prozessen der Apoptose in Verbindung gebracht. Das Wirkungsspektrum der Caspasen umfasst aber ebenso entscheidende physiologische Prozesse der Entzündung als Antwort auf Pathogene oder Gewebeerstörung. Apoptose und Entzündung stellen evolutionär konservierte Prozesse dar. Insofern überrascht es nicht, dass Caspasen Teil beider regulierter Abläufe sind.

Die zuerst entdeckte Caspase-1 ist das Enzym, welches die pro-inflammatorische Zytokine IL-1 β , -18 und -33 prozessiert (Thornberry et al. 1992, Gracie et al. 2003, Schmitz et al. 2005). Diese Zytokine sind Teil der angeborenen Immunität und werden vermehrt exprimiert als Reaktion auf Erreger und Endotoxine (Dinarello 2004). So führt deren Bildung zu Fieber sowie der Anlockung und Aktivierung von Immunzellen. Neben Caspase-1 gehören beim Menschen die Caspasen-4, -5 und bei Mäusen die Caspasen-11 und -12 zur Gruppe der inflammatorischen Caspasen. Die Gene aller inflammatorischen Caspasen des Menschen befinden sich auf dem Chromosom 11q22. Als vollständig synthetisierte und aktivierte Enzyme agieren sie zusammen mit anderen Proteinen in großen Multiproteinkomplexen, den sogenannten „Inflammasomes“, die für die Aktivierung der Enzyme entscheidende Bedeutung besitzen (Martinon et al. 2002). Diese Komplexe verfügen über eine ligandenbindende

Region, die das Signal zur Aktivierung gibt. Zudem gibt es eine Domäne mit Zuständigkeit für die Oligomerisierung der Caspasen und eine Region, die für die Bindung der Caspasen an ihre Prodomäne, wie beispielsweise der CARD (caspase-recruitment domain), notwendig ist. Die Oligomerisierungsdomänen sind intrazelluläre Sensoren für Pathogene und andere Stressoren. Sie werden als „NOD-like receptors“ (nucleotide binding oligomerization domain) bezeichnet und erkennen bakterielle Peptidoglykane (Inohara et al. 2005). Dies führt zur weiteren Rekrutierung einer Reihe nachgeordneter Proteine, unter anderem dem nuclear-factor κ B, dessen Aktivierung die Caspase-1 in ihren Wirkungszustand versetzt. Erkennt die Zelle intrazelluläre Erreger, aktiviert sie Caspase-1, wodurch eine Reihe pro-inflammatorischer Mediatoren freigesetzt werden und so der Zelltod herbeigeführt werden kann. In diesem Falle spricht man auch von „Pyroptosis“, hergeleitet von „Pyro“ im Sinne von Fieber und „ptosis“ mit Bezug auf den Untergang der Zelle, um so den pro-inflammatorischen programmierten Zelltod zu beschreiben (Fink und Cookson 2005). In der humanen Monozytenzelllinie THP-1 konnte gezeigt werden, dass LPS die Formierung der „Inflammasomes“ triggern. Hierbei wird über TLR-4 Caspase-4 aktiviert, wodurch schließlich die Pyroptosis und die IL-1 β -Freisetzung initiiert wird (Schmid-Burgk et al. 2015).

1.2.3 Zelldifferenzierung und Proliferation – Die Rolle der Caspasen beim Überleben der Zelle

Der programmierte Zelltod ist ein bis ins kleinste Detail organisierter physiologischer Prozess, bei dem viele Signalmoleküle und Enzyme koordiniert zusammenspielen müssen. Caspasen sind nur ein Teil dieser komplexen Maschinerie. Doch ist es für die Zelle ebenso von Bedeutung auch das Überleben durch Proliferation und Differenzierung detailliert zu gestalten. Hier beginnt das Aufgabenfeld der Caspasen abseits von Apoptose und Entzündung. Dabei spielen sowohl die proteolytische Aktivität der katalytischen Domäne, als auch nicht-proteolytische Funktionen der Prodomänen eine Rolle. Caspasen können unabhängig von der Apoptose aktiviert werden und eine Reihe von Zytokinen, Kinasen, Transkriptionsfaktoren und Polymerasen aktivieren. So soll Caspase-8 für die Proliferation von T-, B- und NK-Zellen verantwortlich sein (Chun et al. 2002). Caspase-2, -3 und -9 sollen während der Differen-

zierung von Erythroblasten aktiviert werden (Zermati et al. 2001) und die Caspase-3 bei der Differenzierung von Skelettmuskelzellen (Fernando et al. 2002).

1.2.4 Fehlregulation von Caspasen – Pathologien als Folge dysfunktionaler Enzyme

Die Apoptose gehört zu den spannendsten Bereichen der medizinischen Grundlagenforschung, nicht zuletzt deswegen, weil eine Vielzahl von Pathologien damit verknüpft ist. Ein fehlerhaft regulierter Zelltod kann Ursache krankhafter Zustände sein, wenn dadurch die Gewebemöostase nicht aufrechterhalten werden kann. Insofern verwundert es nicht, dass Störungen im programmierten Zelltod mit gesteigerter oder verminderter Apoptose Ursache von Karzinomen, Autoimmunerkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen sein können.

Im Grunde kann jeder kleine Baustein der Apoptosekaskade gestört sein und somit als Ursache für krankhafte Zustände in Frage kommen. Es ist von großer Bedeutung genau zu wissen, welches Enzym oder welches Signalmolekül nicht funktioniert, um genau an dieser Stelle einen therapeutischen Angriffspunkt finden zu können.

Defekte der Proteine der Bcl-2-Familie werden bei einer Reihe lymphoproliferativer Erkrankungen (Egle et al. 2004) und bei kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchi-alkarzinomen (Han et al. 2002) angetroffen. Durch Fehler im Signalweg des Todesrezeptors im Sinne einer verminderten Expression des Rezeptors können Tumorzellen dem Immunsystem entkommen. So konnte gezeigt werden, dass CD95 in Leberzellkarzinomen (Strand et al. 1996) und invasiven Ösophagustumoren (Gratas et al. 1998) vermindert exprimiert wird.

Mutationen im Gen der Caspase-8 beeinträchtigen die Proliferation von T-, B- und NK-Zellen, mit dem Ergebnis einer gestörten Immunität (Chun et al. 2002). Viele Autoimmunerkrankten können mit einer vermehrten Sekretion proinflammatorischer Zytokine einhergehen. Man setzt daher die Hoffnung in eine medikamentöse Beeinflussung von Caspase-1 als ein Aktivator von IL-1 β und IL-18 bei der Rheumatoiden Arthritis, der Osteoarthritis und bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Howley und Fearnhead 2008).

Bei den neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem Morbus Parkinson und dem Morbus Alzheimer, wurde in betroffenem Gewebe eine verstärkte Caspase-Aktivität registriert. Caspasen sollen sowohl das Tau-Protein, als auch das β -Amyloid-

Vorläufer-Protein spalten können (Gamblin et al. 2003). Neurotoxische Effekte durch das von Caspase-1 prozessierte IL-1 β soll beim Morbus Parkinson eine Rolle spielen (Ferrari et al. 2006).

Auch wenn sowohl eine gesteigerte, als auch eine verminderte Aktivität der Caspasen zu krankhaften Zuständen führen können, scheint eine vermehrte Expression dieser Enzyme ein besserer therapeutischer Ansatzpunkt zu sein (Howley und Fearnhead 2008). Aus dieser Tatsache ergibt sich die Möglichkeit einer medikamentösen Therapie, um mit Caspase-Inhibitoren eine gesteigerte Apoptose bremsen zu können. Bei der Gefahr von akutem Zelluntergang, wie bei verschiedenen Lebererkrankungen beschrieben, soll dieser hierdurch verhindert werden (Linton et al. 2005, Callus und Vaux 2007). Aber auch bei der Krebstherapie hofft man, durch die Beeinflussung der Caspasen den durch die Krebszelle inhibierten programmierten Zelltod wieder anschalten zu können (Putt et al. 2006, Wolan et al. 2009).

1.3 Caspasen – Im Detail

1.3.1 Einteilung und Eigenschaften

Caspasen werden beschrieben als eine Familie hoch konservierter Proteasen mit der Aminosäure Cystein im aktiven Zentrum, die ihre Substrate spezifisch hinter Aspartatresten spalten. Aktuell sind 18 Mitglieder identifiziert, von denen 14 in humanen Zellen wiederzufinden sind und dort eine spezifische Funktion besitzen sollen (Agard et al. 2010, Crawford und Wells 2011). Caspase-13 ist ein Enzym des Rindes (Koenig et al. 2001). Die Caspase-14 soll im Gegensatz zu anderen ubiquitär exprimierten Caspasen nur in Keratinozyten vorhanden sein und dort eine wichtige Rolle beim Schutz vor UVB-induzierten Zellschäden haben (Denecker et al. 2007). Die Caspasen-15, -17, -18 sind im Gegensatz zu Caspase-16 nicht im humanen Organismus anzutreffen (Eckhart et al. 2005, Eckhart et al. 2008).

Um eine einheitliche Namensgebung bei der wachsenden Anzahl von Cystein-Proteasen zu gewährleisten, schlug man den Terminus „Caspasen“ vor. Dieser leitet sich von der Bezeichnung der Enzyme als sogenannte Cysteinylnyl-Aspartasen ab. Die

arabische Zahl der Caspase ergibt sich aus dem Datum der Publikation (Alnemri 1997).

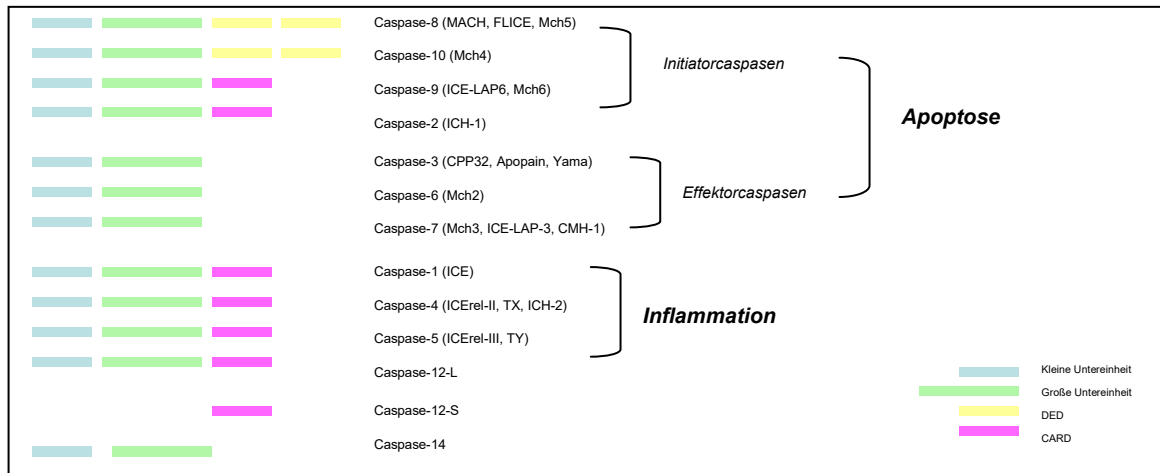


Abbildung 1.3: Übersicht der humanen Caspasen. Dargestellt ist die Einteilung der Caspasen nach Struktur und Funktion. Sie besitzen zumeist eine große und eine kleine Untereinheit, sowie die Prodomänen CARD („caspase recruitment domain“) oder DED („death effector domain“). In Klammern sind Bezeichnungen der Enzyme vor der Vereinheitlichung der Nomenklatur aufgeführt.

Phylogenetisch teilt man die Caspasen in zwei große Gruppen ein (siehe auch Abbildung 1.3). Auf der einen Seite gibt es die **inflammatorischen Caspasen**, die man auch als ICE-Subfamilie zusammenfasst. Zu dieser Gruppe zählt man aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit Caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13 und -14. Das zuerst beschriebene Mitglied war die Caspase-1, der man die proteolytische Aktivierung von Prointerleukin-1 β , einem proinflammatorischen Botenstoff der Zelle, zuschrieb und die man folglich initial als ICE (interleukine-1 β -converting enzyme) bezeichnete (Black et al. 1989, Thornberry et al. 1992). Man konnte zeigen, dass Mäuse, die einen Defekt der Caspase-1 haben, eine Störung in der Produktion von IL-1 β haben und somit eine beeinträchtigte inflammatorische Reaktion, jedoch eine ungestört ablaufende Apoptose (Li et al. 1995). So unterscheidet man diese Proteasen von der Gruppe der **apoptotischen Caspasen**, die man auch als Ced-3-Subfamilie bezeichnet. Grund dafür ist ihre Ähnlichkeit zu Produkten von Apoptose-Genen (Ced-3 und Ced-4), die man im Nematoden *Caenorhabditis elegans* untersuchte (Ellis und Horvitz 1986, Yuan et al. 1993). Diese Gruppe lässt sich unterteilen in zwei weitere Subgruppen:

Initiatorcaspasen

- Diese sind für die Initiierung der intrazellulär ablaufenden Apoptosekaskaden verantwortlich und für die Aktivierung der Effektorcaspasen
- Sie enthalten in ihrer Prodomäne entweder eine CARD („caspase recruitment domain“) oder DED („death effector domain“), die für Protein-Protein-Interaktionen wichtig sind
- Sie werden in großen Multiprotein-Aktivierungs-Komplexen rekrutiert, z.B. dem „Apoptosome“, welches CARD oder DED bindet und so zur Oligomerisierung der Monomere und deren Aktivierung führt (Chowdhury et al. 2008). Eine proteolytische Spaltung ist hierfür nicht zwingend notwendig (Boatright et al. 2003)

Effektorcaspasen:

- Mitglieder dieser Gruppe verantworten die Auflösung der Zelle
- Sie sind als Zymogen bereits dimerisiert und werden aktiviert durch eine proteolytische Spaltung durch Initiator-Caspasen und eine Änderung der Quartärstruktur (Boatright et al. 2003)
- Ihre kürzeren Prodomänen sind maximal 20-30 Aminosäuren lang (Chowdhury et al. 2008)

Grundsätzlich besteht bei allen Caspasen eine gewisse Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz, dem strukturellen Aufbau und ihrer Substratspezifität (Nicholson und Thornberry 1997). Weitere Differenzierungen innerhalb der Caspasen lassen sich anhand der Existenz einer langen oder kurzen Prodomäne oder anhand der Substratspezifität machen.

Caspasen werden als katalytisch inaktive Proenzyme, sogenannte Zymogene, synthetisiert. Diese sind aus einer amino-terminalen Prodomäne variabler Länge (30-50 kDa, 23-216 Aminosäuren), sowie einer großen (ca. 20 kDa) und einer kleinen Untereinheit (ca. 10 kDa) aufgebaut. Die Prodomänen einzelner Caspasen enthalten „caspase-recruitment domains (CARD)“ oder „death effector domains (DED)“, die bei der Bildung von Proteinkomplexen für die Aktivierung der Caspasen eine Rolle spielen (Fuentes-Prior und Salvesen 2004). Erst die Aktivierung durch zwei proteolytische Prozessierungen lässt das funktionsfähige Enzym entstehen. Hierbei wird spe-

zifisch hinter Aspartatresten carboxy-terminal an der P1-Position des Substrats gespalten. Dieser Vorgang kann sowohl durch Autokatalyse, als auch durch andere Caspasen geschehen, so dass die große und die kleine Untereinheit des Enzyms von der Prodomäne abgespalten werden und einen funktionsfähigen heterodimeren Komplex formen können (Cryns und Yuan 1998, Thornberry und Lazebnik 1998, Nicholson 1999). Kristallographische Analysen konnten zeigen, dass ein aktives Enzym ein Tetramer ist, das aus zwei dieser Heterodimeren aufgebaut ist (Wilson et al. 1994). Abbildung 1.4 zeigt schematisch die Prozesse bei der Aktivierung von Caspasen am Beispiel der Caspase-4.

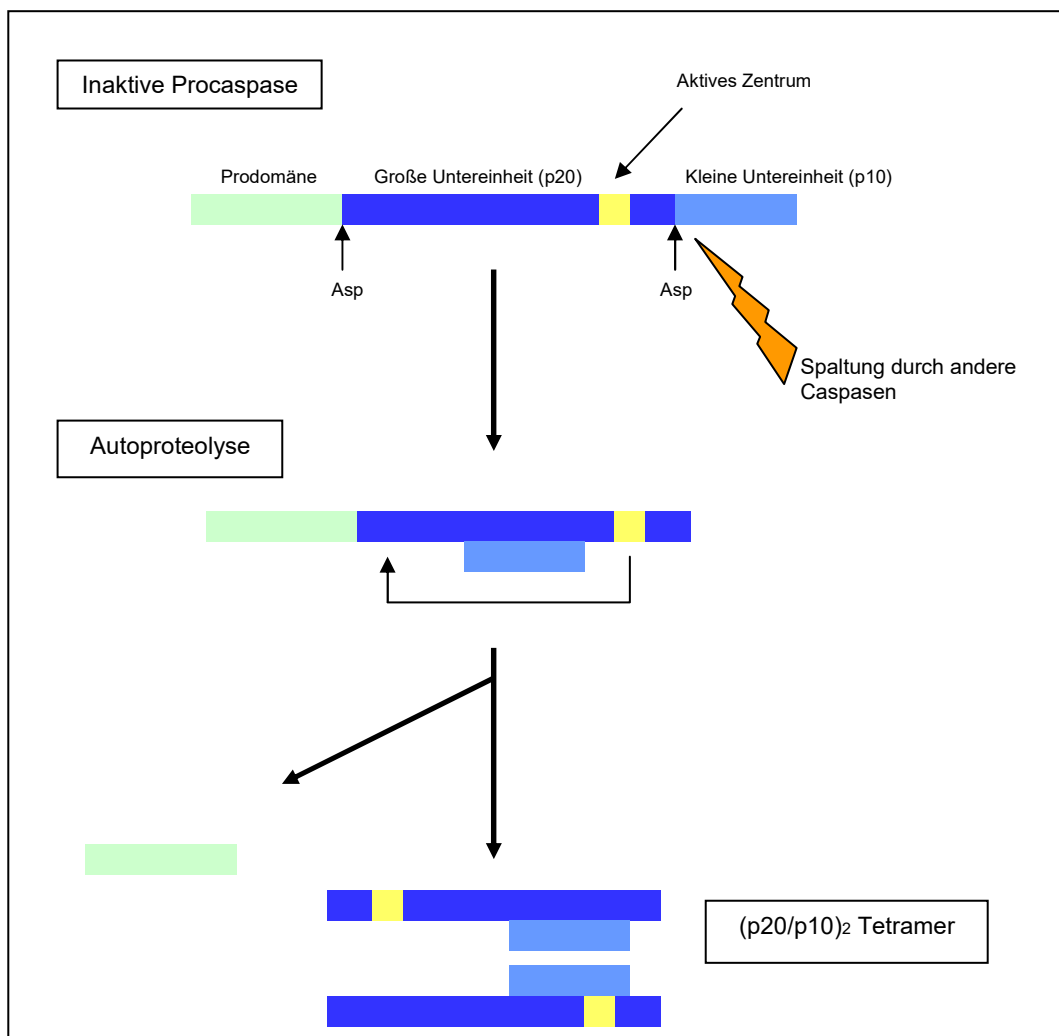


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Aktivierung der Caspasen am Beispiel der Caspase-4. Die in der Zelle als inaktive Procaspasen (Zymogene) vorliegenden Enzyme werden in zwei aufeinander folgenden Schritten aktiviert. Der proteolytischen Spaltung zwischen den beiden Untereinheiten folgt die Abspaltung der Prodomäne. Dann beginnt die Dimerisierung zum Tetramer.

Eine Besonderheit der Caspasen ist ihre Eigenschaft in großen Multi-Proteinkomplexen zu funktionieren. So gibt es beispielsweise das „Apoptosome“ für Caspase-9, den „DISC“ (death inducing signaling complex) für Caspase-8, und -10 (Cain et al. 2002) und das „Inflammasome“, bei dem die Caspase-1 eine wichtige Rolle spielt (Martinon und Tschopp 2004). Diese Multiproteinkomplexe sind entscheidend bei der Aktivierung der Initiator-Caspasen. Ein pro-apoptotisches Signal führt zur Bindung an die Prodomänen, so dass die lokale Konzentration der Caspasen erhöht wird. Diese räumliche Nähe induziert die nötige Dimerisierung der Monomere zum aktionsfähigen Enzym (Riedl und Salvesen 2007).

1.3.2 Caspase-4

Die Identifizierung der Funktion einer Vielzahl von Caspasen ist bis zum heutigen Zeitpunkt schon weit voran geschritten. Über andere wiederum ist bis heute noch nicht viel bekannt. Hierzu gehört die Caspase-4.

Caspase-4 zählt zu den Caspasen, die vordergründig in die Prozesse der Entzündung involviert sein sollen (Chowdhury et al. 2008). Sie besitzt demnach neben zwei kleinen Domänen (p20 und p10) eine lange Pro-Domäne (p22) (siehe Abbildung 1.5), die im Prozess der Aktivierung katalytisch abgespalten wird, um aus dem inaktiven Zymogen ein aktives Enzym zu generieren (Munday et al. 1995). Um eine vollständige Aktivierung der Caspase-4 zu erreichen, sind zwei Schritte nötig: Zum einen die Abspaltung der Pro-Domäne CARD (caspase recruiting domain) infolge einer Auto-proteolyse bzw. durch andere vorgeschaltete Enzyme und zum anderen eine Dimerisierung.

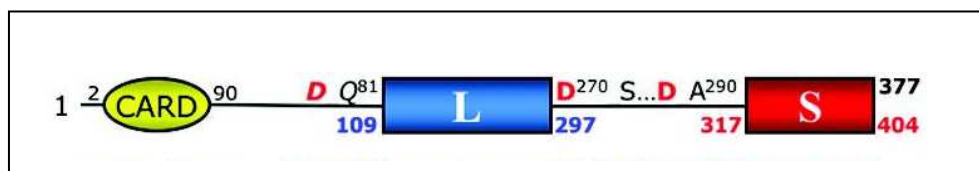


Abbildung 1.5: Die inaktive Procaspase-4 in schematischer Darstellung. Prodomäne CARD (Caspase-recruitment domain), große 20 kDa-Untereinheit (L = Large), kleine 10 kDa-Untereinheit (S = Small).

Die Identifizierung der Caspase-4 gelang 1995 interessanterweise drei Gruppen nahezu zeitgleich. Kamens et al. durchsuchten mit einer bekannten genetischen Kodiersequenz für ICE (spätere Caspase-1) eine humane Thymus c-DNA-Bibliothek. Dabei identifizierten sie das Gen ICH-2 (später *CASP4*) auf dem langen Arm von Chromosom 11 (Genlokus: 11q22.2-q22.3) und nachfolgend das dazugehörige Protein als ein neues Mitglied der Interleukin-1beta-converting-Enzymfamilie. Das neue Protein ICH-2 besaß eine 53-prozentige strukturelle Ähnlichkeit zu ICE und ebenfalls ähnliche katalytische Eigenschaften, jedoch unterschiedliche Substrat- und Inhibitorprofile. So lag es damals nahe, auch anzunehmen, dass dieses Enzym ebenfalls in die Prozesse der Entzündung involviert sein könnte, wobei eine Beteiligung bei der Apoptose nicht ausgeschlossen wurde. Kamens et al. konnten zeigen, dass Thymozyten und Makrophagen von ICE-defizienten Mäusen einen verminderten Gehalt an IL-1 β besitzen, die Abläufe des programmierten Zelltodes aber nicht beeinträchtigt schienen (Kamens et al. 1995).

Munday et al. isolierten aus Monozyten ein Protein aus 377 Aminosäuren mit einer Masse von 43,3 kDa und gaben ihm den Namen ICE rel II. Auch hier konnte gezeigt werden, dass eine Sequenzidentität von 53% zu ICE bestand. Trotz der großen Ähnlichkeit kristallisierte sich auch hier heraus, dass das neu entdeckte Protein mehr in die Abläufe der Apoptose verwickelt ist, als in die Prozessierung von IL-1 β (Munday et al. 1995).

Faucheu et al. stießen in der Fibroblasten-Zelllinie COS auf eine neue Cysteinprotease, die man TX nannte (Transcript X). Sie besaß eine 50-prozentige Sequenzhomologie zu ICE und die Beteiligung bei der Aktivierung von IL-1 β war weniger ausgeprägt, als die Fähigkeit zur Induktion von Apoptose und zur Prozessierung des Präkursorproteins von ICE und dem eigenen (Faucheu et al. 1995).

Verwirrenderweise hatte das Enzym initial auch drei verschiedene Namen. Erst Alnemri et al. schlugen 1996 eine einheitliche Namensgebung vor (Alnemri et al. 1996).

Caspase-4 scheint ein ubiquitär exprimiertes Enzym zu sein. So ist es in Geweben, wie der Plazenta (Faucheu et al. 1995, Kamens et al. 1995, Munday et al. 1995, Fitzgerald et al. 2005), den Ovarien (Kamens et al. 1995), Lunge, Leber, Pankreas, Nieren und Muskeln (Munday et al. 1995) anzutreffen. Auch Zellen der Haarfollikel

(Soma et al. 1998), Melanomzellen (Mao et al. 2010), Leukozyten (Faucheu et al. 1995) und Plasmazellen (Pelletier et al. 2006) sollen Caspase-4 besitzen.

Auch wenn die genauen molekularen Mechanismen der Caspase-4 noch nicht detailliert geklärt sind, kennt man heute einige Pathologien, bei denen Caspase-4 eine Rolle spielen soll, so z.B. Frühaborte (Liu et al. 2011), die polyzystische Nierenerkrankung (Ali et al. 2000) oder auch die Nephropathische Cystinose (Sansanwal et al. 2010). Viele karzinomatöse Erkrankungen werden in Zusammenhang mit Caspase-4 gebracht, z.B. das Cholangiokarzinom (Ahn et al. 2002, Chawla-Sarkar et al. 2003), das Bronchialkarzinom (Yamamoto-Yamaguchi et al. 2003) und das Ovarialkarzinom (Gaggero et al. 2004). Auch eine Beteiligung bei gastrointestinalen Stromatumoren (Kim et al. 2009) und dem Magenulkus (Yaguchi et al. 2010) wird diskutiert.

Anfänglich ging man davon aus, dass die Caspase-4 nicht im Hirngewebe zu finden sei (Faucheu et al. 1995, Kamens et al. 1995, Munday et al. 1995). Doch neuere Studien belegen genau das Gegenteil. Der Caspase-4 wird sogar eine besondere Rolle im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen zugeschrieben. Kim et al. sehen einen Zusammenhang von Apoptose und Caspase-4 bei der infantilen neuronalen Ceroid-Lipofuszinose (Kim et al. 2006). Das neurotoxische Amyloid-beta, welches bekanntlich einen Anteil an der Pathogenese des Morbus Alzheimer besitzt, verursacht einen Zelluntergang und in diesem Zusammenhang eine Aktivierung der Caspase-4, nachgewiesen in Neuroblastomzellen durch Hitomi et al. 2004 (Hitomi et al. 2004). Eine Reihe weiterer Untersuchungen bestätigt die Beteiligung von Caspase-4 bei apoptotischen Prozessen, die Ursache für den Morbus Alzheimer sein sollen (Yukioka et al. 2008). Auch bei der familiären Amyotrophen Lateralsklerose konnte eine vermehrte Spaltung von Caspase-4 unter ER-Stress in Neuroblastomzellen nachgewiesen werden (Koyama et al. 2010). ER-Stress soll ursächlich sein für eine Reihe weiterer neurodegenerativer Erkrankungen, so z.B. beim Morbus Huntington (Kouroku et al. 2002) und dem Morbus Parkinson (Ryu et al. 2002). Da Caspase-4 eine Schlüsselrolle bei ER-induzierter Apoptose besitzen soll, kann man vermuten, dass es demzufolge auch bei der Pathogenese anderer neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt ist (Matsuzaki et al. 2010).

Caspase-4 ist eine Cysteinprotease, die sich vor allem in der äußeren Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) befindet (Hitomi et al. 2004). Aufgrund dieser

Lokalisation geht man von einer Beteiligung bei der Apoptose aus, die durch ER-Stress induziert wird (Hitomi et al. 2004, Liang et al. 2007). So konnte gezeigt werden, dass die ER-Stressoren Tunicamycin (TM) und Thapsigargin (TG) zu einer vermehrten Aktivierung von Caspase-4 führen. Andere apoptoseauslösende Reagentien, wie Etoposid, Staurosporin und UV-Licht zeigen nicht den gleichen Effekt. Reduziert man die Caspase-4 Expression durch Small interfering RNA, führt dies zu einer verminderten Rate an Zellen mit ER-induzierter Apoptose (Hitomi et al. 2004).

Die Rolle der Caspase-4 als ein ER-spezifisches Enzym ist von Bedeutung, bleibt aber weiterhin kontrovers diskutiert. So bezweifeln Obeng et Boise die Notwendigkeit von Caspase-4 für ER-Stress induzierten Zelltod (Obeng und Boise 2005). Möglicherweise ist die Relevanz der Cysteinprotease auch nur zellspezifisch (Oda et al. 2008).

Da das Gen für die Caspase-4 auf demselben Locus liegt wie das Gen für Caspase-1 und dieses Enzym in inflammatorische Prozesse verwickelt ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch Caspase-4 an Prozessen der Entzündung beteiligt ist (Sollberger et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass in der humanen Monozyten-Zelllinie THP1 Caspase-4 „upstream“ in die Aktivierung von NFκB bei dem durch Lipopolysaccharide (LPS) induziertem TLR-4 Signalweg involviert ist. LPS triggern eine Interaktion von TRAF6 (TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6) und Caspase-4, was zu einem NFκB-abhängigen Anstieg von Transkription und Translation einer Reihe von Chemokinen und Zytokinen führt, z.B. IL-8, CCL4, CCL20, IL-1β, HGF, EGF, CCL5, CXCL7. Im Gegensatz zu Caspase-1, die für die Aktivierung von IL-1β aus der Pro-Form verantwortlich ist, scheint Caspase-4 für die Synthese von Pro-IL-1β notwendig zu sein, da dessen Transkription durch NFκB reguliert wird (Lakshmanan und Porter 2007). Man geht sogar soweit, der Caspase-4 eine entscheidende Rolle bei der im menschlichen Organismus ausgeprägten Endotoxinsensitivität zuzuschreiben, die in einer ausgeprägten Aktivierung von Caspase-1 und den „Inflammasomes“ resultiert (Kajiwara et al. 2014). Ähnliche Erkenntnisse konnte man in Keratinozyten gewinnen. Eine Aktivierung des „Toll-like Rezeptors 3“ (TLR-3) führt zu einer vermehrten Aktivierung von Caspase-4 und dies wiederum steigert die Freisetzung von pro-IL-1β, ohne die aktive Form zu generieren (Grimstad et al. 2013). IL-1β sowie weitere proinflammatorische Stoffe, wie TNF-α, IFN-γ und LPS induzieren in Pigmentepithelzellen der Retina, genau wie Tunicamycin und Thapsigargin, ER-Stress und hierbei die

mRNA Expression und Enzymaktivierung der Caspase-4. Dieser Vorgang kann wiederum durch Dexamethason und IL-10 unterdrückt werden. Auch Nickles et al. konnten zeigen, dass Caspase-4 für die Regulation der Zielgene von TNF- α benötigt wird, um unter anderem NF κ B zu aktivieren (Nickles et al. 2012). Eine Aufgabe bei der angeborenen Immunität und bei bakteriellen Infektionen soll Caspase-4 in Makrophagen besitzen, da sie nach Infektion mit verschiedenen Bakterien auch hier die IL-1 β -Produktion steigern soll (Kayagaki et al. 2011).

Folglich scheint Caspase-4 ein wichtiges Enzym sowohl bei Inflammation als auch bei ER-Stress induzierter Apoptose zu sein (Bian et al. 2009).

Die genaue Rolle von Caspase-4 im Zellmetabolismus, sowie eine genaue Identifizierung zelleigener Substrate und Inhibitoren, sind auch bis heute noch nicht vollständig gelungen. Doch Caspase-4 ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung und eine Vielzahl von Interaktionen ist bereits erkannt. So konnten Agard et al. 2010 drei potentielle Substrate durch Massenspektrometrie identifizieren: Splicing Factor U2AF 65 kDa subunit, Actin (cytoplasmic 1) und Ataxin. Doch welche genaueren Interaktionen mit Caspase-4 bestehen und welche Bedeutung das für die Zelle hat, ist noch nicht annähernd geklärt (Agard et al. 2010).

Bekannt ist weiterhin, dass Caspase-4 bei Fas-induzierter Apoptose beteiligt ist. So regulieren agonistische Antikörper des Fas-Rezeptors Caspase-4 nach oben, was zur vermehrten Aktivierung von Caspase-3 führt. Deshalb geht man davon aus, dass Caspase-4 „upstream“ von Caspase-3 und „downstream“ von Caspase-8 agiert (Kamada et al. 1997b) Genauso soll auch Caspase-9 durch Caspase-4 aktiviert werden (Yamamuro et al. 2011). In atrialen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass der durch Simvastatin induzierte Zelltod durch Blockade von Caspase-4 gemindert werden konnte. So verhindert die Inhibition von Caspase-4 durch den Caspase-Inhibitor Z-LEVD-FMK die Aktivierung von Caspase-3 und -7 und somit den intrinsischen Apoptose-Weg (Ghavami et al. 2012). Ein weiterer Beweis dafür, dass Caspase-4 die nachgeschalteten Caspasen-3 und -9 aktiviert, konnte in humanen Melanomzellen erbracht werden, wenn in diesen durch Tunicamycin und Thapsigargin eine ER-induzierte Apoptose ausgelöst wurde (Jiang et al. 2007). GRP78 ist ein Chaperon aus dem ER, welches protektiv der Apoptose durch ER-Stress entgegenwirkt. Man konnte zeigen, dass eine räumliche Nähe zur Caspase-4 im ER besteht

und dass GRP78 ein Negativ-Regulator der Caspase ist. Desweiteren sollen TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) und ein „Knockdown“ vom mitochondrialen TRAP1 (TNF-receptor-associated protein 1) Apoptose induzieren, bei der Caspase-4 beteiligt ist, allerdings „downstream“ von Caspase-8, -9 und -3 (Mao et al. 2010).

Störungen der zellulären Ca^{2+} -Homöostase führen zu ER-Stress. Demzufolge ist es nicht verwunderlich, dass auch Caspase-4 hierdurch beeinflusst sein soll. Calpain, welches durch eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration stimuliert wird, kann als ein möglicher Induktor von Caspase-4 betrachtet werden (Matsuzaki et al. 2010). Caspase-Inhibitoren, wie das virale CrmA (cowpox virus serpin, cytokine response modifier A) und Baculovirus p35 sind wiederum als Negativ-Regulatoren für Caspase-4 bekannt (Kamada et al. 1997a).

1.3.3 Caspase-Substrate

Caspasen gehören zur großen Familie der Proteasen, die Proteine und Peptide hydrolytisch spalten. Dabei zeichnen sie sich durch ihre „Polyspezifität“ aus. Darunter versteht man die Fähigkeit eine Reihe verschiedener Substrate mit hoher Treffsicherheit zu erkennen und zu katalysieren (Crawford und Wells 2011). Das aktive Zentrum enthält die Aminosäuren Histidin und Cystein, zusammen mit einer Kontaktstelle für die P4-P1-Stellen des Substrats (Schechter und Berger 1967). Die Stelle, an der die Caspase schneidet, liegt C-terminal hinter der P1-Position (siehe auch Abbildung 1.6) und an genau dieser Stelle muss sich ein Aspartat-Rest befinden. Das ist ungewöhnlich für Proteasen, aber typisch, wie der Name schon sagt, für Caspasen. Aminoterminal zur Schnittstelle folgen mindestens vier Aminosäuren. Die Reihenfolge dieser Aminosäuren variiert unter den Caspasen, was die Bandbreite der Substrate und Aufgaben dieser Enzyme erklären kann. Bei der Erkennung der Zielproteine sind sowohl die Primär- und Sekundärstruktur, genauso wie die Tertiär- und Quartärstruktur von entscheidender Bedeutung (Thornberry und Lazebnik 1998, Fuentes-Prior und Salvesen 2004, Crawford und Wells 2011).

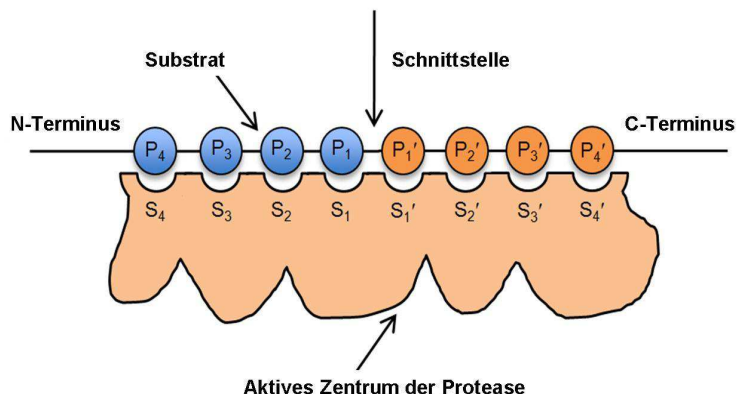


Abbildung 1.6: Nomenklatur der Substratspezifität von Proteasen nach Schechter und Berger. Das aktive Zentrum der Proteasen besteht aus Taschen, den sogenannten „Subsites“. Jede dieser Taschen bindet eine entsprechende Aminosäure in der Substratsequenz. Diese werden aufsteigend durchnummeriert, beginnend an der Schnittstelle mit P₁-4 in Richtung des N-Terminus und P₁'-4' in Richtung des C-Terminus. Die „Subsites“ des aktiven Zentrums werden korrespondierend mit S₁-4 und S₁'-4' bezeichnet.

Es gibt eine Reihe verschiedener Techniken der Proteomik, um zu bestimmen, welche Aminosäuren an den Positionen P₂-4 des Substrats lokalisiert sein müssen, damit eine bestimmte Caspase es bevorzugt katalysiert. Beispielhaft sollen an dieser Stelle PS-SCL (positional scanning synthetic combinatorial libraries) (Thornberry et al. 1997) und PICS (proteomic identification of protease cleavage sites) (Schilling und Overall 2008) genannt werden. Das Wissen welche Aminosäuresequenz bevorzugt von einer spezifischen Caspase erkannt wird, dient der Herstellung von Peptid-Substraten und -Inhibitoren zur Untersuchung der Aktivität dieser Enzyme. Anhand der Tetrapeptid-Präferenz kann man die Caspasen in verschiedene Gruppen einordnen:

- *Gruppe-I: Caspase-1, -4, und -5 bevorzugen die Tetrapeptidsequenz WEHD*
- *Gruppe-II: Caspase-2, -3, und 7 bevorzugen DEXD*
- *Gruppe-III: Caspase-6, -8, und -9 bevorzugen (L/V)EXD*

Neben der absoluten Notwendigkeit für Aspartat in der Position P₁, scheint P₄ ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. So befinden sich vorwiegend aromatische und hydrophobe Aminosäuren auf P₄ für die Gruppe-I-Caspasen. Gruppe-II zieht für P₄ Aspartat vor und Gruppe-III-Enzyme akzeptieren verschiedene Aminosäuren, vor allem mit aliphatischen Seitenketten. Alle Caspasen haben eine Präferenz für Glutaminsäure für die Position P₃ und alle, bis auf einzelne Ausnahmen, tolerieren ver-

schiedene Aminosäuren („X“) für P2 (Thornberry et al. 1997). Es gibt keine Peptidsequenz, die ausschließlich von einer Caspase präferiert wird. Vielmehr existiert unter den Caspasen eine Gruppenspezifität, was deren bevorzugte Substrate betrifft (Benkova et al. 2009). Diese synthetisch hergestellten Substrate sind jedoch nicht identisch mit den natürlichen intrazellulären Substraten, welche meist aus mehr als vier Aminosäuren bestehen. Daher überrascht es nicht, dass die Aminosäure carboxy-terminal zur Schnittstelle neben P1-4 ebenfalls von Bedeutung für die Enzym-Substrat-Interaktion ist (Timmer und Salvesen 2007), ebenso wie die bereits erwähnte räumliche Struktur der Caspasen. Diese carboxy-terminale Aminosäure an P1' sollte ungeladen und klein sein. Hierfür eignen sich Glycin, Serin und Alanin (Stennicke et al. 2000).

Typischerweise bestehen die kommerziell hergestellten Substrate aus einem acetylierten Tetrapeptid und einem chromophoren oder fluoreszierenden Anhang C-terminal zu Aspartat in der P1-Position. Am häufigsten kommen hier p-Nitroanilin-, Coumarin-, oder Rhodamin-basierte Farbstoffe zur Anwendung (Gurtu et al. 1997). Die Detektion mittels Fluoreszenz-Assay beruht auf der enzymatischen Abspaltung des Fluorochroms hinter P1, wodurch ein fluoreszierendes Signal generiert wird (Benkova et al. 2009).

Die Detektion mittels synthetischer Substrate leistet einen großen Beitrag um die Aktivität der Caspasen vor allem *in vitro* zu untersuchen. Doch ebenso ist es interessant, welche Proteine und Peptide tatsächlich intrazellulär verstoffwechselt werden. Die Liste der Substrate aller Caspasen wächst stetig. Oft ist jedoch unklar, welche Funktion diese besitzen und ob deren Proteolyse einen biologischen Effekt besitzt (Timmer und Salvesen 2007). Um die wachsende Anzahl von identifizierten natürlichen Substraten übersichtlich darstellen zu können, etablierte man Online-Datenbanken wie CASBAH (The CASpase Substrate DataBAse Homepage) (Luthi und Martin 2007) und MEROPS (Rawlings et al. 2012).

Damit Caspasen katalytisch aktiv sein können, benötigen sie ein dafür optimales Milieu. Dieses besteht für eine Reihe der Enzyme im neutralen pH-Bereich von 6,8 – 7,2. Dieses Optimum zeigt unter allen Mitgliedern nur minimale Unterschiede. Sowohl lebende als auch sich in Apoptose befindende Zellen weisen dieses vor und garantieren so das reibungslose Funktionieren der Enzyme. Im sauren pH-Bereich

sind die Interaktionen zwischen Enzym und Substrat gestört, da das wichtige Asparat an der P1-Position dann in protonierter Form vorliegt und folglich nicht gut an das Enzym binden kann (Stennicke und Salvesen 1997).

1.3.4 Caspase-Inhibitoren

Zur Untersuchung der Caspasen sind neben den Substraten die Inhibitoren ebenfalls von großer Wichtigkeit. So konnte mithilfe des Inhibitors für Caspase-1 (Ac-YVAD-CHO) gezeigt werden, dass dieses Tetrapeptid die Freisetzung von IL-1 β signifikant senkt. Daraus schlussfolgerte man, dass dieses Enzym entscheidend für die Prozessierung von pro-IL-1 β ist (Thornberry et al. 1992).

Unter den Inhibitoren der Caspasen muss man virale und zelluläre von den synthetischen unterscheiden. Viren, die Gene für Caspase-Inhibitoren tragen, sind in der Lage die Zellintegrität nach dem viralen Befall länger aufrecht zu erhalten, um möglichst viele Virusbestandteile replizieren zu können und um die Immunantwort auf den Virusbefall zu unterbinden. CrmA (Cytokine Response Modifier A), ein Produkt des Kuhpockenvirus, war einer der ersten identifizierten Inhibitoren. Es ist ein Serpin, ein Inhibitor für Serinproteasen. Es besitzt zusätzlich eine negative Wirkung auf Cysteinproteasen, unter anderem auf Caspase-1 (Ray et al. 1992) und eine Reihe weiterer Caspasen, in dem man die Pseudosubstrat-Region P4-P1 (LVAD) so modifizierte, dass sie von eben diesen anderen Caspasen gut erkannt werden konnte (Ekert et al. 1999). Ein weiteres virales Genprodukt, das Protein p35 vom Baculovirus, kann ebenfalls die Apoptose negativ regulieren durch Hemmung von Caspasen 1 - 4 und Ced-3 (Bump et al. 1995). IAP's (inhibitor of apoptosis) sind eine Genfamilie, deren Polypeptide ebenfalls Caspasen negativ in Zellen beeinflussen und sie so vor dem Untergang schützen. Ein Mitglied dieser Familie ist XIAP, welches Gruppe-II-Caspasen in Säugetierzellen hemmt (Deveraux et al. 1997).

Die synthetisch hergestellten Inhibitoren wurden entwickelt, zum einen als Forschungswerkzeug, um mehr über das Funktionieren der Caspasen in Erfahrung zu bringen, und zum anderen setzte man in sie die Hoffnung, als therapeutische Mittel den Zelltod zu verhindern, so unter anderem bei neurodegenerativen Erkrankungen oder Ischämien. Die Inhibitoren agieren als Pseudosubstrate und sind folglich kompetitiv. Die artifiziellen Inhibitoren können, im Gegensatz zu den Substraten, aus nur

einer Aminosäure (Boc-Asp-FMK), einem Tripeptid (z-VAD-FMK) oder aus einem Tetrapeptid (YVAD-FMK) bestehen, welche beispielsweise mit einem Fluoromethylketon gekoppelt sind. Je nach Anhängsel unterscheidet man dann zwischen reversiblen und irreversiblen Inhibitoren. Reversibel agieren Aldehyde, Nitrile und Ketone. Hingegen ist der Einsatz von Inhibitoren mit Diazomethylketonen und Halomethylketonen irreversibel. Abhängig von der Peptidsequenz hemmen die Inhibitoren gruppenspezifisch. Z-VAD-FMK, ein Fluoromethylketon, ist in der Lage als Pan-Caspase-Inhibitor irreversibel auf alle Caspasen zu wirken (Garcia-Calvo et al. 1998).

1.4 Bestimmung der Caspase-Aktivität – Eine Übersicht der Caspase-Assays

Die Detektion von Apoptose begann mit der konventionellen Licht- und Elektronenmikroskopie, mit denen man Änderungen der Morphologie wie Kondensation von Kern und Zellplasma, bis hin zur Zellfragmentierung beobachten konnte (Kerr et al. 1972). Mithilfe von fluoreszierenden oder anderen Standardfärbemethoden der Histologie ließ sich kondensiertes Chromatin nachweisen (McCarthy und Evan 1998). Mit dem Annexin-Assay kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob sich Zellen in der Apoptose befinden.

Die Möglichkeiten auf molekularer Ebene die Caspaseaktivierung bzw. deren Aktivität zu bestimmen sind von enormer Bedeutung und breit gefächert. Grundsätzlich unterscheidet man die Bestimmung auf Proteinebene von der auf mRNA- bzw. DNA-Ebene.

1.4.1 Detektionsmöglichkeiten auf Proteinebene

Unter Verwendung von Antikörpern lassen sich mit Western-Blot und Immunhistochemie Aussagen über die Aktivierung und Aktivität von Caspasen treffen. Die Vorteile des Westernblots liegen in der einfachen Handhabung mit großer Nachweisvielfalt unter hoher Sensitivität und Spezifität, auch wenn die Reproduzierbarkeit mitunter schwierig ist. Verwendet werden Antikörper gegen die Caspasen selbst (Huppertz et al. 1999) oder gegen spezifische Caspase-Substrate wie PARP oder Lamin (McCarthy und Evan 1998). So lassen sich Änderungen der Zymogenexpression

nachweisen, genauso wie Fragmente der Enzyme nach deren proteolytischer Aktivierung. Doch ist der Nachweis der Fragmente kein grundsätzlicher Indikator für eine Aktivierung der Caspasen. Die Effektorcaspasen (3, 6 und 7) werden durch Proteolyse aktiviert. Die dabei entstandenen Fragmente sind dabei Ausdruck ihrer Aktivierung. Hingegen ist bei der Aktivierung der Initiatorcaspasen eine zusätzliche Dimerisierung der Fragmente notwendig, sodass der Nachweis dieser kein klarer Anhalt für tatsächlich aktive Caspasen ist. Wichtig ist auch, dass man Aktivierung und Aktivität nicht gleichsetzen kann. Eine aktivierte fragmentierte, bzw. auch dimerisierte Caspase, die durch Caspase-Inhibitoren gehemmt ist, ist nicht aktiv. Bei der Zelllyse für den Western-Blot werden diese Komplexe aus Caspase und Inhibitor zerstört, so dass der Western-Blot eine aktivierte Caspase zeigen kann, ohne dass diese in der Zelle Proteolyse betrieben hat. Mit dieser Methode lässt sich folglich nicht zwischen gehemmter und aktivierter Caspase unterscheiden. Bei der Immunhistochemie lassen sich auch durch eine große Antikörpervielfalt Zymogene und Enzymfragmente nachweisen, ebenso mit hoher Sensitivität und Spezifität. Insbesondere lassen sich Änderungen der subzellulären Lokalisation der Enzyme aufzeigen. Aber auch hier ist der Nachweis des prozessierten Enzyms nicht gleich zu setzen mit einem tatsächlich aktiven Enzym, da auch hier dieses Enzym durch einen Inhibitor gebunden sein kann (Kaufmann et al. 2008, Troy et al. 2011). Zusätzlich ist anzumerken, dass die Formalinfixierung bei Fluoreszenzmessungen ungeeignet ist, da ein starkes Hintergrundsignal stören kann.

Weiterhin kommt, wie auch in dieser Arbeit, die Fluoreszenz- oder kolorimetrisch-basierte Enzymaktivitätsmessung vielfach zur Anwendung. Gemessen werden hierbei fluoreszenz- oder farbstoffgekoppelte Substrate nach enzymatischer Spaltung mittels HPLC, UPLC, oftmals auch gekoppelt mit Massenspektrometrie (UPLC-MS), mit konventionellen Plattenreadern (Mao et al. 2010) oder in diversen in-vivo-Modellen (Cen et al. 2008).

Auch dienen fluoreszierende Peptid-gekoppelte Inhibitoren zur Caspase-Detektion mittels FACS, Plattenreader-Analyse oder Fluoreszenzmikroskopie. Im Gegensatz zu FACS haben die meisten anderen Methoden den Nachteil, dass die Enzymaktivität nur in einer großen Zellpopulation bestimmt werden kann und nicht in individuellen Zellen. Bei der Durchflusszytometrie umgeht man diesen Punkt, indem einzelne Zellen mittels Caspase-Antikörper angefärbt werden (Vermees et al. 2000). Eine andere

Methode, die die Detektion auf der Ebene einer einzelnen Zelle gewährleistet, basiert auf dem Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass unter Abwesenheit von Caspase-3 (wie beim normalen Zellwachstum) die Emissionsenergie der Fluoreszenz des angeregten fluoreszierenden Donorproteins CFP (cyan fluorescent protein) zum Akzeptormolekül YFP (yellow fluorescent protein) transferiert werden kann, wodurch gelbes fluoreszierendes Licht emittiert wird. Die aktivierte Caspase-3 wird das Sensorprotein (CFP-linker-YFP) am Linkerprotein nach der Sequenz DEVD spalten. Das ändert den FRET mit dem Ergebnis eines veränderten Emissionsprofils des Sensorproteins. Nun wird nicht von YFP sondern von CFP fluoreszierendes Licht emittiert. Diese Änderung kann detektiert werden unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie oder der internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (Morgan und Thorburn 2001, Tian et al. 2007, Angres et al. 2009).

1.4.2 Detektionsmöglichkeiten auf mRNA/DNA - Ebene

Zum Nachweis von Caspase-DNA im Agarose- oder Polyarylamidgel dient die PCR unter einfacher Handhabung und guter Reproduzierbarkeit. Der Nachweis ist jedoch nur semi-quantitativ und es ist kein direkter Nachweis der Enzymaktivität möglich. Eine Messung semi- aber auch absolut-quantitativer Unterschiede ermöglicht die qRT-PCR (quantitative real-time PCR) unter Verwendung von interkalierenden Farbstoffen (SYBR- oder EVA-Green) oder markierenden Sonden (Taq-Man-Sonden) (Buh Gasparic et al. 2010). Auch hier stehen unter guter Reproduzierbarkeit gute Auswertungsmöglichkeiten zur Verfügung. Jedoch lässt sich keine Aussage über die Enzymaktivität treffen, lediglich über die Expressionsrate. Außerdem sind Anschaffungskosten für Geräte und Reagenzien sehr hoch.

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) ist ein Assay um fragmentierte DNA im Rahmen von apoptotischen Prozessen zu detektieren. Hierbei erkennt die Transferase so genannte „nicks“ als Diskontinuität in der DNA und katalysiert die Bindung von dUTP an diese Stellen. dUTP sind mit einem fluoreszierenden oder Biotin-gekoppelten Marker versehen, um die anschließende Detektion durch Fluoreszenz-Mikroskopie zu ermöglichen (Wang et al. 2005).

1.5 HPLC – High Performance Liquid Chromatography

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie stellt ein Trennverfahren dar, bei der durch Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie und Anwendung eines hohen Druckes ein zu untersuchendes Stoffgemisch räumlich und zeitlich, unter Verwendung einer sich bewegenden mobilen und einer stationären Phasen, untersucht und getrennt wird. Hierbei kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den im Eluenten (mobile Phase) gelösten Bestandteilen des Stoffgemisches und der Trennsäule (stationäre Phase). Hierbei gilt: Die Retentionszeit des zu analysierenden Stoffes ist umso länger, je höher die Affinität zur stationären Phase ist. Folglich wird er später eluiert und detektiert als ein Stoff mit geringerer Affinität. Ein Maß für die Eigenschaft sich bevorzugt in der mobilen oder in der stationären Phase aufzuhalten, ist der sogenannte Verteilungskoeffizient K :

$$K_X = \frac{c_{\text{stat}}}{c_{\text{mob}}}$$

c_{stat} : Konzentration des zu bestimmenden Stoffes X in der stationären Phase

c_{mob} : Konzentration des Stoffes X in der mobilen Phase

Die Bestandteile eines Analyten gehen mit der mobilen und der stationären Phase unterschiedlich starke Wechselwirkungen ein. Hierzu zählen:

- Dispersionskräfte
- Dipol-Dipol-Wechselwirkungen
- Wasserstoffbrückenbindungen
- Der pH-Wert bei der Ionenaustauschchromatographie

Im Chromatogramm (Abbildung 1.7) wird das detektierte Signal in Abhängigkeit von der Zeit als Glockenkurve dargestellt. Es liefert wichtige Informationen zum analysierten Stoffgemisch. Aus den verschiedenen Wechselwirkungen ergibt sich eine typische Retentionszeit t_R für jeden Stoff eines Gemisches. Hierunter versteht man die Zeitspanne vom Einspritzen des Probengemisches bis zur Detektion des Signalmaximums. Sie ist abhängig von der Länge der Trennsäule und der Fließgeschwindigkeit der gewählten mobilen Phase. Je länger also die Trennsäule ist und je langsamer der Eluent strömt, desto größer ist t_R . Diese Zeit ist bei unveränderten Messbedingungen immer gleich und proportional zur Stoffmenge, genau wie Höhe und Flä-

che des im Chromatogramm dargestellten Peaks. Integriert man diesen, so erhält man eine quantitative Bestimmung des jeweiligen Stoffes. Beim Erstellen einer Kalibrierkurve macht man sich diese konstanten Eigenschaften zunutze. Man injiziert Probelösungen genau bekannter Konzentrationen, ermittelt Fläche und Höhe der Signale und erstellt hieraus die Kalibrierkurve. Hiermit lässt sich dann aus dem Peak einer unbekannt Probe die dazugehörige Konzentration festlegen (Meyer 2008b).

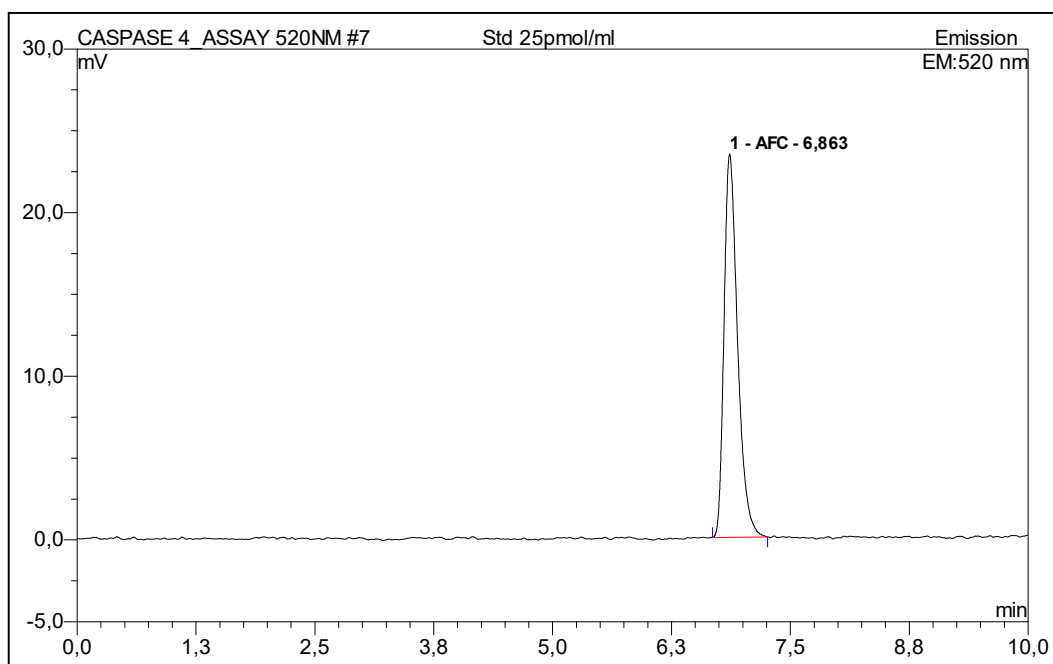


Abbildung 1.7: Chromatogramm. Dargestellt ist das Chromatogramm für ein AFC-Standardgemisch mit der Konzentration von 25 pmol/ml. Die Retentionszeit beträgt 6,863 min.

Unter Totzeit t_0 versteht man die Zeit, die von einer nicht retardierten Substanz und der mobilen Phase benötigt wird, die Trennsäule zu durchlaufen. Die bessere Aussage über die Retentionsdauer liefert der Retentionsfaktor k , der unabhängig von Säulenlänge und Fließgeschwindigkeit ist.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Optimale Werte für k liegen zwischen 1 und 10. Bei Werten < 1 strömen die Analyten zu schnell durch die Säule aufgrund zu geringer Wechselwirkung mit der stationären Phase. Bei zu hohen k -Werten sind dementsprechend die Analysezeiten zu lang.

Der Trennfaktor α , oder auch relative Retention, ist ein Maß dafür, ob zwei Bestandteile eines Analyten voneinander getrennt werden. Voraussetzung hierfür sind unterschiedliche k -Werte.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \text{ mit } k_2 > k_1$$

Für $\alpha = 1$ gilt, dass die beiden Bestandteile des Stoffgemisches nicht voneinander getrennt werden, da die Retentionszeiten identisch sind. Der Trennfaktor liefert demnach eine Aussage über die Selektivität des gewählten chromatographischen Trennsystems.

Die Auflösung R gibt Informationen über die Trennung zweier benachbarter Peaks. Sie lässt sich mit Hilfe des Quotienten aus dem Abstand der Peakmaxima und dem arithmetischen Mittel aus den beiden Basisbreiten w bestimmen:

$$R = 1,18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{1/2; 1} + w_{1/2; 2}}$$

$w_{1/2}$ bezeichnet die Peakbreite auf halber Höhe. Mit einer Auflösung R von $> 1,5$ kann man zwei benachbarte Signale mit ähnlicher Fläche getrennt darstellen (Meyer 2008b).

Eine HPLC-Anlage kann entweder als Kompaktanlage oder aus verschiedenen Modulen aufgebaut sein. Grundsätzlich besteht sie aus einem Reservoir für das Lösungsmittel, einer Zuleitung mit Fritte, einer Hochdruckpumpe, einem Probenaufgabesystem, einer Trennsäule sowie einem Detektor mit Datenauswertung (Meyer 2008a). Abbildung 1.8 zeigt schematisch den Aufbau einer HPLC-Anlage.

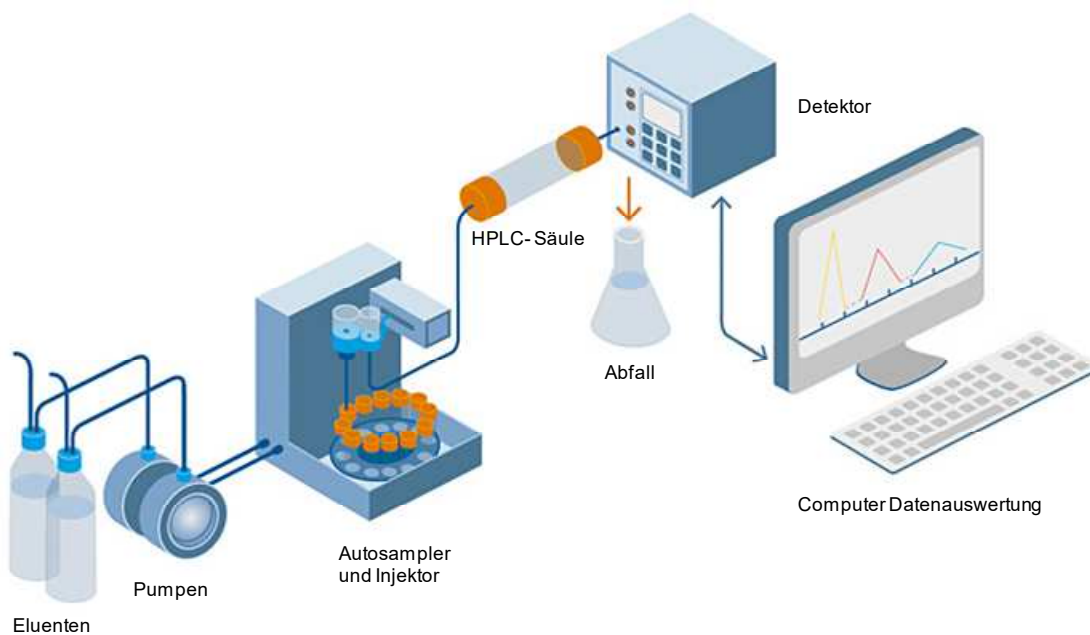


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung einer HPLC-Anlage.

Bei der Wahl der passenden mobilen Phase gilt es neben ausreichender Reinheit zu beachten, dass die Viskosität nicht zu groß ist, und dass sie bei Verwendung von UV- oder Fluoreszenzdetektoren ausreichend UV-durchlässig ist. Es sollte mit dem zu untersuchenden Stoffgemisch keine chemischen Reaktionen eingehen, einen optimalen Brechungsindex und Siedepunkt besitzen und weder Korrosion der Säule auslösen, noch toxische Stoffe freisetzen. Häufig werden Wasser, Methanol oder Acetonitril verwendet. Werden Lösungsmittel mit unterschiedlich starker Elutionskraft eingesetzt und diese zeitlich variabel auf die Säule gebracht, so entsteht ein Lösungsmittelgradient. Die Elutionskraft der mobilen Phase nimmt mit der Zeit zu, so dass auch schwer trennbare Stoffe bei dieser sogenannten Gradientenelution chromatographisch getrennt werden können. Im Gegensatz hierzu verwendet man bei der isokratischen Trennung nur ein Lösungsmittelgemisch (Meyer 2008a).

Die verwendeten Säulen bestehen meistens aus Stahl 316 und weisen für analytische Zwecke einen Innendurchmesser von 2-5 mm und eine Länge von 5-30 cm auf. Der Innendurchmesser bestimmt die für die Säule günstigste Flussrate. Um höhere Trennleistungen zu erzielen, ist es von Vorteil den Partikeldurchmesser der stationären Phase zu verkleinern, anstatt mit längeren Säulen zu arbeiten, da eine Längenzunahme mit einer Erhöhung des Retentionsvolumens und damit einer Verringerung der Peaks verknüpft ist. Um die Trennsäule vor Verunreinigungen zu schützen, bietet

es sich an, eine Vorsäule mit ähnlichem Packungsmaterial zu verwenden (Meyer 2008b).

Die dünnen Säulen werden mit Material gepackt, welches eine Partikelgröße von 3-10 µm besitzt. Hieraus ergibt sich die Anforderung mit hohen Drücken von bis zu 350 bar, teilweise sogar bis 500 bar zu arbeiten, um die Trennung der Stoffgemische in kurzen Analysezeiten zu gewährleisten. Die Pumpen sollten möglichst pulsationsfrei arbeiten, um einen kontinuierlichen Fluss zu ermöglichen. Am häufigsten kommen Kurzhub-Kolben- oder Diaphragmapumpen zum Einsatz.

Der Prozess der Trennung bei der Chromatographie findet in den Säulen mit der stationären Phase statt und basiert auf Adsorption und Verteilung. Man unterscheidet zwischen Normalphasen (NP)- und Umkehrphasen (*reversed phase*, RP)-Chromatographie. Bei der NP-Chromatographie werden beispielsweise Silicagel (Kieselgel) und Aluminiumoxid als polare stationäre Phase verwendet und unpolare Stoffe unter Verwendung eines unpolaren Lösungsmittels als mobile Phase getrennt. Hierbei kommt z.B. Hexan als Eluent zum Einsatz. Im Gegensatz hierzu trennt man bei der RP-Chromatographie polare komplexere Stoffgemische an unpolaren stationären Phasen mittels polarer Lösungsmittel, wie Wasser, Methanol und Acetonitril (mit steigender Elutionskraft). Als stationäre Phase dient Octadecylsilan (ODS). Dies ist ein Silicagel, dessen Oberfläche mit hydrophoben Octadecylresten (C-18) versehen ist. Je unpolarer also ein Analyt des Probengemisches ist, umso stärker tritt er mit der stationären Phase in Wechselwirkung und umso später wird er eluiert.

Weitere Beispiele zur chromatographischen Trennung stellen je nach Wechselwirkungsprinzip die Ionenaustausch-, Ionenpaar-, Ausschluss-, und die Affinitätschromatographie dar.

Detektiert wird sehr häufig mit UV- und Fluoreszenzdetektoren. Diese stellen ein Photometer mit Durchflusszelle dar, durch die die chromatographisch aufgetrennte Probeflüssigkeit strömt. Bei UV-Detektion misst man hierbei die Änderung der Lichtintensität und wertet diese nach dem Lambert-Beer-Gesetz aus. Die Fluoreszenzdetektion beruht auf dem Prinzip, dass die Durchflussküvette mit Licht der für den zu detektierenden Stoff passenden Wellenlänge bestrahlt und das von der Probe emittierte Licht längerer Wellenlänge mittels Fotodiode erfasst wird (Meyer 2008a).

2 ZIELE DER ARBEIT

2.1 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer neuen Herangehensweise an die fluorimetrische Caspase-Aktivitätsbestimmung durch RP-HPLC.

Die etablierten Caspase-Assays beruhen auf der Herstellung eines Zelllysats, also ein Proteinisolat von Zellen einer bestimmten Zellkultur. Dieses dient als Grundlage für die quantitative Aktivitätsbestimmung der zu interessierenden Caspasen unter Verwendung spezifischer Caspase-Substrate, die aus einem an ein Peptid gekoppelten Farbstoff oder Fluorochrom bestehen. Dem Proteingemisch wird das entsprechende Substrat beigefügt. Wenn Caspasen im aktivierten Zustand vorliegen, wird dieses katalytisch umgesetzt. Durch die katalytische Reaktion folgt die Freisetzung der gekoppelten und nun detektierbaren Farbstoffe bzw. Fluorochrome.

Wir wollen am Beispiel der Caspase-4 in humanen Chorionkarzinomzellen der Zelllinie JEG-3 zeigen, dass eine direkte Aktivitätsmessung der Caspase in einer solchen Zellkultur erfolgen kann, unter Verwendung des Zellkulturüberstands. Hierfür inkubierte die JEG-3-Zellkultur zuvor mit dem membrangängigen Caspase-4-Substrat (Ac-LEVD-AFC). Dieses besteht aus einem Tetrapeptid (LEVD), das an einen Acetyl-Rest und das Fluorochrom AFC (7-Amido-4-Trifluoromethylcoumarin) gebunden ist. Zum besseren Verständnis soll im Folgenden die Caspase-4-Aktivitätsmessung auf Grundlage des Zellkulturüberstands als *direkte Aktivitätsbestimmung* bezeichnet werden. Voraussetzung hierfür ist eine mit Caspase-4-Substrat und Caspase-Inhibitoren behandelte JEG-3-Zellkultur. Die Caspase-4-Aktivitätsmessung auf Basis von JEG-3-Zellen, deren Zelllysate erst mit Caspase-4-Substrat und Caspase-Inhibitoren behandelt wird, soll als *indirekte Aktivitätsbestimmung* bezeichnet werden.

Zudem soll ein weiterer Fokus der vorliegenden Arbeit die Weiterentwicklung der von Koehn et al. beschriebenen chromatographischen Konzentrationsbestimmung des Fluorochroms AFC sein (Koehn et al. 2008). Die Optimierung der RP-HPLC-Messbedingungen soll die Quantifizierung von AFC auch in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich ermöglichen.

2.2 Arbeitsypothesen

- Die Caspase-4-Aktivität kann im Zellkulturüberstand der Zelllinie JEG-3 bestimmt werden. Voraussetzung ist die Diffusion des Caspase-4-Substrats in die Zelle, die dortige katalytische Umsetzung und die Diffusion des entstandenen fluoreszierenden AFC in den Zellkulturüberstand.
- Der größte Anteil des freigesetzten AFC diffundiert in den Zellkulturüberstand und verbleibt nicht intrazellulär. Eine Aufarbeitung der Zellen kann demnach entfallen und vereinfacht die Probenhandhabung.
- Ein Wechsel des chromatographischen Trennverfahrens zur Gradientenelution mit einem höheren Anteil an organischen Lösungsmitteln soll die Erfassung von sehr geringen AFC-Konzentrationen ermöglichen.
- Durch die chromatographische Auftrennung fluoreszierender Störsignale ist die Bestimmung des freigesetzten AFC und damit der tatsächlichen Caspase-Aktivität noch genauer.

3 METHODIK

3.1 Die Zelllinie JEG-3

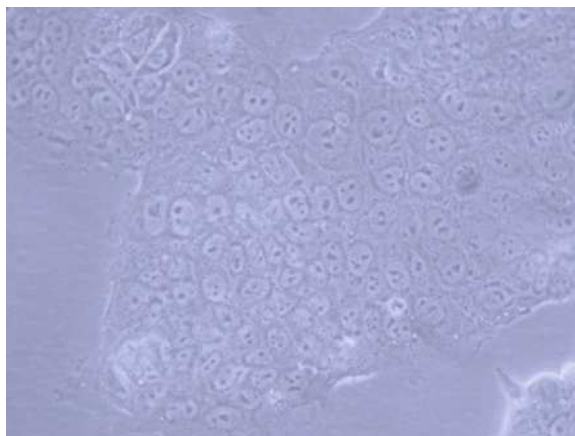


Abbildung 3.1: Die Zelllinie JEG-3 in Kultur.

1971 isolierten Kohler und Bridson die Zelllinie JEG-3 (siehe Abbildung 3.1) aus einer Gehirnetastase eines humanen Chorionkarzinoms. Aus diesem Ursprungsgewebe entstanden bis heute 124 Subkulturen (Kohler und Bridson 1971).

Die immortalisierte Zelllinie der menschlichen Plazenta besitzt eine epitheliale Morphologie und wächst *in vitro* adhärent als Monolayer unter Bildung von Zellaggregaten. Die Zellen verfügen über einen hypertriploiden Chromosomensatz mit einer mittleren Chromosomenzahl von 71. Insgesamt kann man bis zu elf verschiedene Chromosomenanomalien finden, darunter Translokationen, Inversionen und Deletionen. Auch findet man bei einem Teil der Zellen ein Y-Chromosom.

Zu den Produkten dieser Chorionkarzinomzellen gehören neben dem humanen Choriongonadotropin (hCG) auch humanes Chorion-Somatomammotropin und Progesteron. Außerdem sind JEG-3 in der Lage aus steroidalen Vorstufen Östron und Östradiol zu produzieren (vgl. American Type Culture Collection).

3.2 Kultur der Zelllinie JEG-3

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 50 ml-Zellkulturflaschen mit 20-25 ml von dem für sie geeigneten DMEM-Medium, welches 2% Penicillin/Streptomycin und 10% Fetales Kälberserum enthielt, unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, humide At-

mosphäre).

Sobald die Zellen in den jeweiligen Kulturflaschen eine Konfluenz von ca. 75% erreicht hatten, erfolgte nach Entfernung des Mediums ein Waschschrift mit PBS. Um die Zellen vom Boden zu lösen, folgte anschließend die Zugabe von 1 ml Trypsin. Nach kurzer Inkubation unter Standardbedingungen konnte zum Passagieren die entstandene Zellsuspension nun auf weitere Kulturflaschen verteilt werden und unter den oben genannten Bedingungen weiter in Kultur gehalten werden. Die restliche Suspension wurde verworfen, zur Lagerung bei -80°C eingefroren oder für Experimente verwendet. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit erfolgten die genannten Schritte in einem Abstand von 2-4 Tagen.

3.3 Einfrieren und Auftauen der Zelllinie JEG-3

Zum Einfrieren der Zellen wurden sie, wie zum Passagieren, in Einzelsuspensionen überführt und anschließend bei 1500 rpm und für 5 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde entfernt und verworfen. Das Zellpellet wurde dann im Einfrieremedium resuspendiert. Dieses Einfrieremedium bestand aus 95% DMEM-Medium und 5% Dimethylsulfoxid (DMSO). Nachfolgend verteilte man die Suspension in entsprechende Gefäße und konnte sie so bei -80°C lagern.

Damit die Zellen wieder in eine Kultur überführt werden konnten, wurden sie im Wasserbad zügig aufgetaut und in 5 ml DMEM-Medium aufgenommen. Dann zentrifugierte man diese Suspension für 5 min bei 1500 rpm, verwarf anschließend den Überstand und resuspendierte das Zellpellet im Nährmedium. Anschließend überführte man die Zellsuspension in 50 ml-Zellkulturflaschen.

3.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Hintergrund

Um die Konzentration der Proteine zu bestimmen, wurde die Methode nach Bradford verwendet (Bradford 1976). Hierbei handelt es sich um einen Assay, bei dem der saure Farbstoff Coumassie-Brilliant-Blau unspezifisch an basische und aromatische Aminosäuren, insbesondere Arginin, bindet. Durch diese Interaktion ändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm. Diese Änderung der

Extinktion macht man sich bei einer photometrischen Absorbtionsmessung bei 595 nm zunutze, um die Proteinkonzentration zu bestimmen (Lottspeich 1998).

Durchführung

Zur Bestimmung benötigte man 5 µl der Proteinlösung, die mit 995 µl des Bradford-Reagenz versetzt wurde. Es folgte eine Inkubation dieses Gemisches unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur. Anschließend konnte man mithilfe eines Spektrophotometers die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm messen. Unter den gleichen Bedingungen erfolgte parallel die Bestimmung der Absorption einer Standardreihe bekannter Konzentrationen von bovinen Serumalbumin. Aus den Absorptionswerten ermittelte man in Abhängigkeit der Konzentration eine Standardkurve, die zur Bestimmung der Proteinkonzentration (in mg/ml) der Zelllysate diene.

3.5 Aktivitätsbestimmung einer rekombinanten Caspase-4

Hintergrund

Ziel dieser Arbeit war es, den Weg von der Zellkultur und der enzymatischen Spaltung des Substrats bis zur Detektion des freigesetzten AFC zu verkürzen und auf den Schritt der Proteinisolation zu verzichten. Das Caspase-4-Substrat sollte direkt zur Zellkultur gegeben werden, die Zellmembran permeieren und in den vitalen Zellen von den vorhandenen Caspase-4-Enzymen umgesetzt werden.

Um die optimale Zeitdauer für die Inkubation der JEG-3-Zellen mit Substrat abschätzen zu können, sollte vorab eine Aktivitätsbestimmung einer rekombinanten Caspase-4 mit Caspase-4-Substrat *in vitro* erfolgen. Die zeitabhängige Umsetzung des Caspase-4-Substrats mit kommerziell erhältlicher Caspase-4 wurde gemessen, um das Zeitoptimum für den Caspase-Assay in der Zellkultur zu finden. Abbildung 3.2 gibt einen Überblick über den Ablauf der Caspase-4-Aktivität.

Durchführung

Hierfür wurden in ein verschließbares Probengefäß 1,5 ml des DMEM-Mediums und 30 µl Caspase-4-Substrat (0,39 mM) gefüllt, gemischt und zur Bestimmung des Blindwertes 50 µl entnommen. Anschließend wurde 1,5 µl (1U/µl) der aufgereinigten aktiven Caspase-4 hinzugegeben. Dann wurde das Probengemisch unter Standardbedingungen bei 37°C inkubiert. Von diesem Gemisch wurde zu 10 verschiedenen

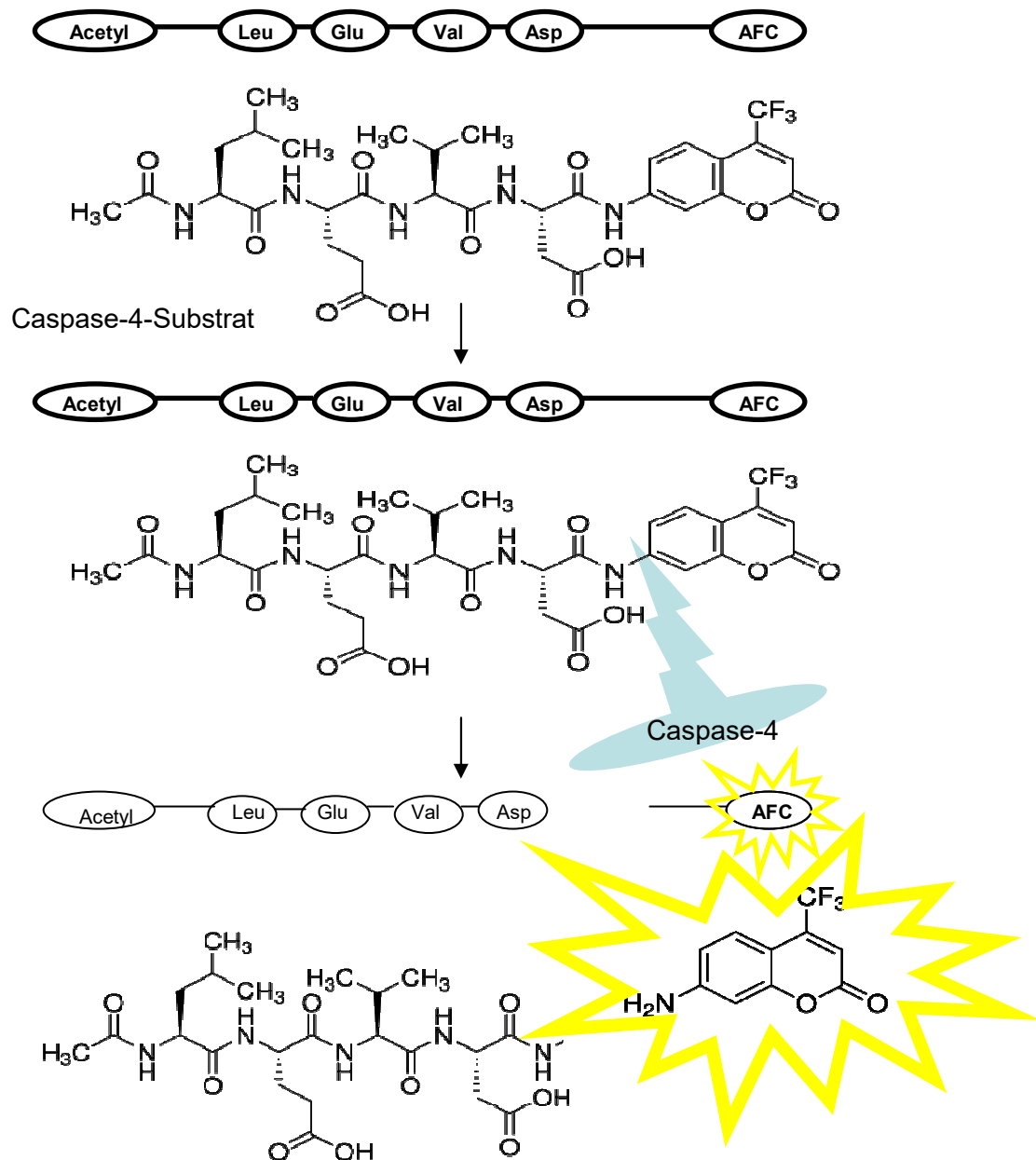


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Substratspaltung durch Caspase-4. Das Caspase-4-Substrat Ac-LEVD-AFC wird durch die Caspase-4 hinter der P1-Position (Aspartat) zwischen dem Tetrapeptid und AFC gespalten. Dies führt zum Fluoreszieren von AFC, wodurch es detektierbar wird. Abk.: Leu-Leucin, Glu-Glutaminsäure, Val-Valin, Asp-Aspartat.

Zeit punkten (nach 0,5 / 1 / 2 / 3 / 4 / 5 / 6 / 7 / 8 und 24 Stunden), beginnend bei 30 min Inkubationszeit und spätestens nach 24 Stunden, eine Probe entnommen und in ein HPLC-Microinsert gefüllt, um dann durch RP-HPLC das freigesetzte AFC chromatographisch aufzutrennen und anschließend mittels Fluoreszenzdetektor die Kon-

zentration von AFC in pmol/ml zu bestimmen. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt und zu jedem Zeitpunkt wurden jeweils zwei Proben entnommen.

3.6 Direkte Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 in der Zellkultur JEG-3 durch RP-HPLC

Hintergrund

Die Messung der Caspase-4-Aktivität basiert auf der Fähigkeit des Enzyms eine bestimmte Tetrapeptidsequenz eines Substrats zu erkennen, spezifisch nach Aspartat zu spalten und hierdurch einen detektierbaren Farbstoff oder ein Fluorochrom zu generieren (Talanian et al. 1997). Diese Substratspezifität macht man sich bei synthetisch hergestellten Substraten zunutze. Wie unter Punkt 3.5 erläutert, spaltet die Caspase-4 das Fluorochrom AFC (7-Amino-4-Trifluoro-Methylcoumarin) nach der Sequenz von vier Aminosäuren, die an einen Acetyl-Rest gebunden sind:

Acetyl-Leucin-Glutamat-Valin-Aspartat-AFC

Dieses intakte Caspase-4-Substrat emittiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von 400 nm. Nach der enzymatischen Spaltung durch die Caspase-4 emittiert das freie AFC ein gelb-grünes Licht bei einer Wellenlänge von 505 nm, was unter Verwendung eines Fluorometers oder Fluoreszenz-Plattenreaders quantifiziert werden kann. Im folgenden Experiment wurde Caspase-4-Substrat zu einer JEG-3-Zellkultur gegeben. Anschließend wurde das mittels Fluoreszenzdetektor gemessene AFC-Signal einer Probe des Zellkulturüberstands gemessen, die zuvor chromatographisch mittels RP-HPLC aufgetrennt wurde. Computergestützt erfolgte die Integration und Berechnung der AFC-Konzentration (in pmol/m). Hierbei ist die Konzentration des detektierten freien AFC proportional zur Caspase-4-Aktivität in der jeweiligen Zellkultur. Voraussetzung war die Fähigkeit von AFC aufgrund seines hydrophoben Charakters problemlos aus der Zelle in der Überstand zu diffundieren, was bereits andere Gruppen zeigen konnten (Tao et al. 2007, Kaufmann et al. 2008). Abbildung 3.3 soll einen Überblick über den Assay geben:

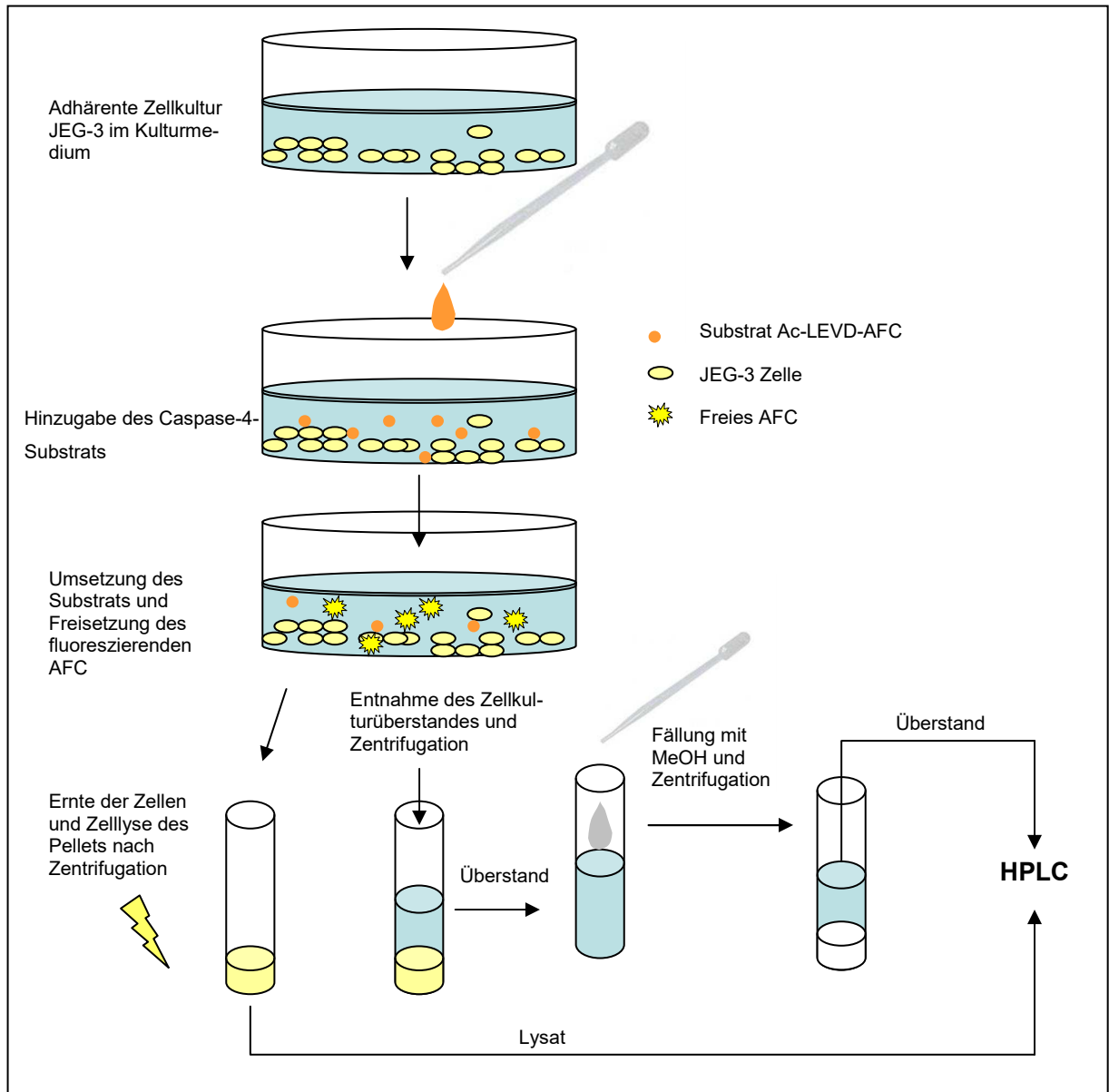


Abbildung 3.3: Schematischer Ablauf des direkten Caspase-4-Aktivitätsassays. Das Caspase-4-Substrat diffundiert nach Zugabe zum Medium in die Zellen hinein. Dort erfolgt die Umsetzung durch die aktive Caspase-4. Das frei gewordene AFC diffundiert dann entsprechend dem Konzentrationsgradienten aus der Zelle in den Überstand. Dann erfolgt die Quantifizierung des AFC unmittelbar nach Abnahme im Überstand und im Zelllysat nach erfolgter Zellyse. In beiden Proben wurde die Reaktion durch Methanol gestoppt.

Die Caspase-Assays, deren Detektion mittels Plattenreader oder Fluoreszenz-Photometer erfolgt, haben einen entscheidenden Nachteil: Andere Fluoreszenzsignale, die bei der Präparation der Proben entstehen, wirken als störende Signale bei gleicher Anregungs- und Emissionswellenlänge (Koehn et al. 2008). Folglich ist die Quantifizierung des AFC-Signals ungenau. Durch nicht-enzymatische Spaltung entstehen Fragmente bestehend aus AFC gekoppelt an ein oder mehrere Aminosäuren.

So emittiert auch das ungespaltene Substrat ebenfalls geringfügig bei der Detektionswellenlänge von 505 nm, die vom Hersteller so empfohlen wird. Trennt man hingegen die Bestandteile der Probe chromatographisch auf, kann man diese fluoreszierenden Störsignale ausschalten, da das freie AFC später eluiert als das unverdaute Substrat oder die Fragmente aus AFC und unterschiedlich vielen Aminosäuren (siehe Abbildung 3.4).

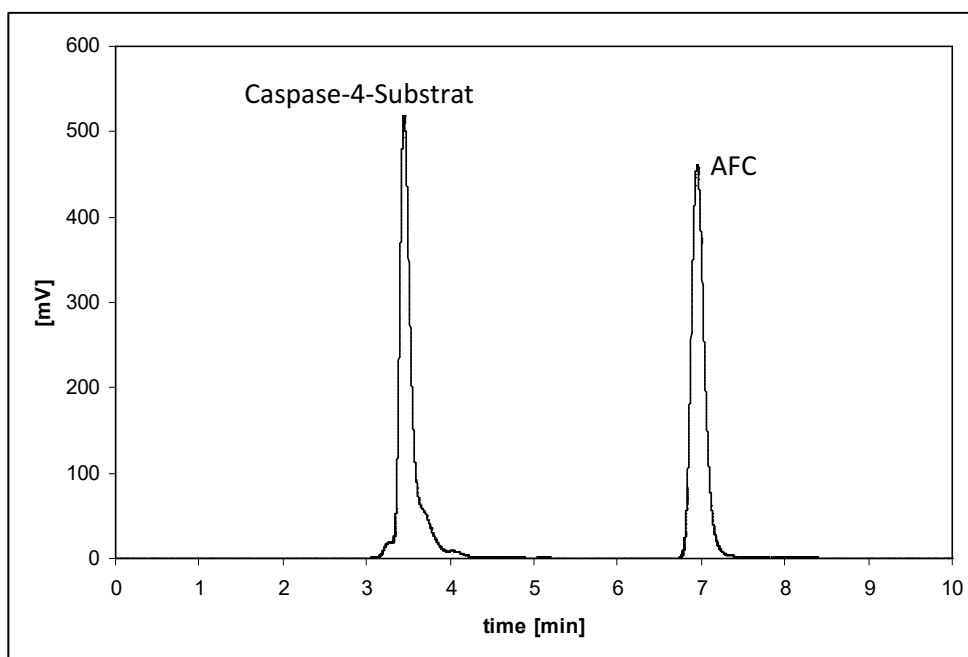


Abbildung 3.4: Das Chromatogramm verdeutlicht, das mittels RP-HPLC zwei deutlich zu trennende Fluoreszenzsignale (Signalintensität in mV) nach unterschiedlichen Retentionszeiten (time in min) erscheinen. Das Fluoreszenzsignal des freien AFC erscheint nach ca. 7,3 min, wohingegen das intakte Caspase-4-Substrat nach ca. 3,5 min als detektierbares Signal erscheint.

Durch die deutliche Auftrennung kann das AFC-Signal klar definiert werden und mittels Integration quantitativ bestimmt werden.

Für die flüssigkeitschromatographische Trennmethode wurde ein RP-HPLC-System von Gynkotec verwendet, bestehend aus Pumpe, Autosampler und UV-Detektor. Das Fluoreszenzsignal wurde durch den RF1002 Fluoreszenzdetektor von Gynkotec erfasst. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge wurde auf jeweils 400 und 505 nm eingestellt. Die zur Kontrolle des HPLC-Systems, Datenerfassung und Auswertung herangezogene Software war von Chromeleon (Version 6.8, Dionex). Zur chro-

matographischen Trennung wurde folgende Säule verwendet: Aqua perfect RP column (C18, 250 x 4 mm, 5 µm, MZ Analysentechnik). Die Vorsäule bestand aus dem identischen Packungsmaterial und hatte die gleiche Länge. Die Säulentemperatur wurde bei 30°C konstant gehalten, die Flussrate auf 0,7 ml/min und das Injektionsvolumen auf 50 µl festgesetzt. Es stand kein gekühlter Autosampler zur Verfügung, so dass bei einer Raumtemperatur von 22 °C gemessen wurde.

Die mobile Phase bestand aus folgendem Gemisch:

- Eluent (A) 10% Methanol / Wasser (v/v)
- Eluent (B) 100% Methanol

Abbildung 3.5 soll das angewendete Gradientensystem darstellen:

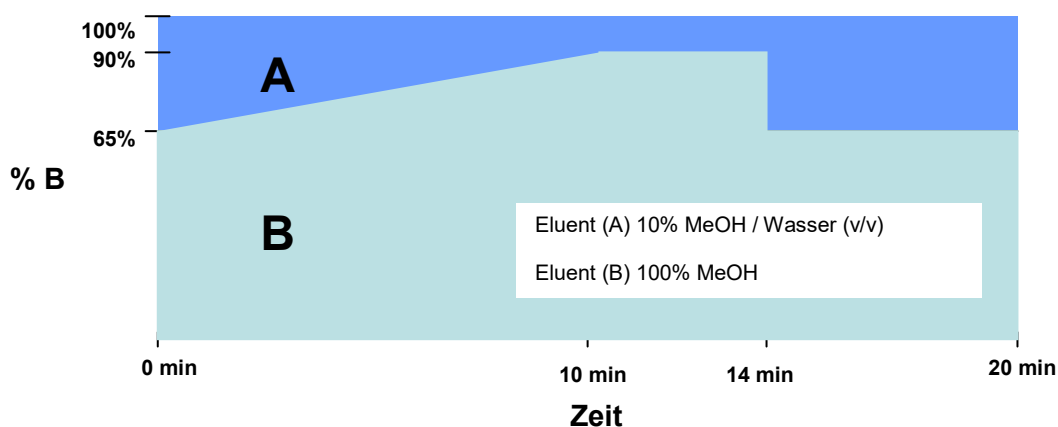


Abbildung 3.5: Gradientensystem im Messzeitraum von 20 min. Der Anteil von 65% Eluent B wurde über 10 min auf 90% gesteigert und 4 min bei 90% konstant gehalten. Dann wurde der Anteil von Eluent B innerhalb von 0,1 min auf 65% gesenkt und auf diesem Niveau wurde das System für 6 min reequilibriert.

Durchführung

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Medium in der Zellkulturflasche entnommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Anschließend wurden sie in ein 15 ml Gefäß überführt und 5 min bei 1800 rpm zentrifugiert. Der hierdurch entstandene Überstand wurde entfernt und verworfen. Das Zellpellet wurde in 3 ml DMEM-Medium resuspendiert. Mittels der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen gezählt, so dass jeweils 400.000 Zellen in ein Kulturbereich einer 6-Well-Zellkulturplatte gegeben werden konnten.

Die Zellen wurden dann für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert (37°C, 5% CO₂, humide Atmosphäre). Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium entnommen und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen.

Aufbereitet wurden drei verschiedene Versuchsansätze in den Kulturbereichen der JEG-3-Zellen der 6-Well-Zellkulturplatte:

- Zugabe von 970 µl DMEM-Medium, 10 µl Proteinase-Inhibitor-Mix G und 20 µl Caspase-4 Substrat (0,4 mM)
- Zugabe von 960 µl DMEM-Medium, 10 µl Proteinase-Inhibitor-Mix G, 10 µl Caspase-4 Inhibitor (0,002 mM) und 20 µl Caspase-4 Substrat (0,4 mM)
- Zugabe von 960 µl DMEM-Medium, 10 µl Proteinase-Inhibitor-Mix G, 10 µl Pancaspase-Inhibitor (0,01 mM) und 20 µl Caspase-4 Substrat (0,4 mM)

Die Reihenfolge der Zugabe musste beachtet werden. Das Medium wurde zuerst zugegeben, dann folgte der nicht membrangängige Protease-Inhibitor-Mix. Dieser sollte eine enzymatische Spaltung des Substrats außerhalb der JEG-3-Zellen verhindern. Der Caspase-4-Inhibitor und der Pan-Caspase-Inhibitor wurden eine Stunde vor dem Substrat zur Zellkultur gegeben, damit diese Zeit hatten in die Zelle zu diffundieren und die Caspase-4 bzw. alle Caspasen zu hemmen. Nach Zugabe aller Bestandteile wurde die 6-Well-Platte vorsichtig geschwenkt und dann unter Standardbedingungen im Inkubator für vier Stunden gelagert. Da das Substrat eine gewisse Rate an Zerfall vorwies, ohne dass eine enzymatische Umsetzung hierbei eine Rolle spielt, wurde für alle Ansätze ein Blindwert mitgeführt. Hierfür wurden drei Kulturbereiche der 6-Well-Platte im gleichen Verhältnis und mit identischen Mengen Medium, Substrat, Proteinase-Inhibitor und Caspase-Inhibitor versehen und ebenfalls unter Standardbedingungen gelagert.

Nach vier Stunden wurde aus dem Ansatz für den Blindwert 150 µl entnommen und 300 µl Methanol hinzugefügt. Hierdurch wurde die Reaktion gestoppt. Zum Ausfällen wurde die Proben für 15 min auf Eis gelagert und im Anschluss in einen Centrifugal Filter überführt und darin für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde entnommen und in ein HPLC-Gläschen mit konischem Boden gegeben.

Aus den Zellkulturbereichen der JEG-3-Zellkultur wurde der komplette Überstand entnommen und 10 min bei 8000 rpm und 5°C zentrifugiert. Der Überstand vom Zentrifugat wurde ebenfalls mit Methanol (1:3) versetzt, um ihn anschließend 15 min auf Eis zu lagern. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm in einem Centrifu-

gal Filter wurde die Probe in ein konisches HPLC-Gefäß gegeben.

Die im Kulturbereich verbliebenen Zellen wurden mit 400 µl Zellysepuffer und mit Proteinase-Inhibitor versetzt, um sie anschließend ernten zu können. Es folgte ein dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen auf Eis. Aus diesem Zelllysats wurde ein Teil 30 min bei 18000 rpm und 5°C zentrifugiert und zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford verwendet. Der andere Teil des Lysats wurde mit Methanol (1:3) versetzt, auf Eis ausgefällt und anschließend zentrifugiert.

Dann erfolgt die chromatographische Auftrennung des freigesetzten AFC von anderen fluoreszierenden Bestandteilen der Probe unter den beschriebenen HPLC-Messbedingungen. Anschließend wurde die AFC-Konzentration fluorimetrisch in den Blindwerten, den Proben aus den Zellkulturüberständen und den dazugehörigen Zelllysaten bestimmt. Die erhaltenen Messwerte wurden in pmol/ml angegeben und spiegeln die Konzentrationen des AFC in dem jeweiligen Kulturbereich der 6-Well-Zellkulturplatte wieder. Die Lysate wurden in einem Volumen von 400 µl Zellysepuffer verarbeitet, so dass die gemessenen Konzentrationen mit dem Faktor 0,4 multipliziert wurden.

Der Versuch wurde an vier Tagen durchgeführt. An jedem der vier Messzeitpunkte wurden drei Kulturbereiche einer 6-Well-Kulturplatte mit JEG-3-Zellen vorbereitet: Entweder setzte man den Zellen „Caspase-4-Substrat“ oder „Caspase-4-Substrat und Caspase-4-Inhibitor“ oder „Caspase-4-Substrat und einen Pan-Caspase-Inhibitor“ zu. Im Zellkulturüberstand wurde die Konzentration von freigesetztem AFC bestimmt (in pmol/ml). An den einzelnen Messtagen wurden entweder zwei oder drei identische Versuchsansätze präpariert. Die „Messtage“ 1-4 unterschieden sich dadurch, dass für jeden Tag ein neuer Zellkulturansatz verwendet wurde. Die Zellen stammten aus unterschiedlichen Passagen einer Zelllinie JEG-3.

3.7 Indirekte Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 nach Proteinisolation aus der Zellkultur JEG-3 durch RP-HPLC

Fragestellung

Die direkten Caspase-Assays beruhen auf dem Prinzip der Zellkultivierung, der anschließenden Zellyse und Proteinisolation. Die Zellen können vorab mit Agenzien behandelt werden, die eine vermehrte Apoptose auslösen. Erst das Proteinisolat wird

dann entsprechend dem Protokoll mit Caspase-Substrat, Puffern und gegebenenfalls mit Caspase-Inhibitoren behandelt, um dann die Aktivität der Caspase quantitativ zu erfassen. Nach einer definierten Inkubationszeit wird die Reaktion gestoppt und es erfolgt die Bestimmung des freigesetzten Fluorochroms oder Farbstoffes durch die entsprechenden Fluoreszenz- oder UV-Detektoren.

Die in dieser Arbeit verwendete Herangehensweise an die Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 setzte voraus, dass die vitalen Zellen mit Caspase-4-Substrat inkubiert wurden und das freigesetzte AFC im Überstand bestimmt werden konnte. Somit war ein direkter Vergleich beider Methoden nicht möglich, da die unterschiedlichen Probenaufbereitungen dies nicht zuließen.

Gegenüberstellen ließen sich jedoch folgende Aspekte:

- Durchführung und Probenhandhabung
- Fehlerquellen und Störfaktoren
- Vergleich der Blindwerte und Standardabweichungen
- Reproduzierbarkeit

Durchführung

24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Medium der Zellkulturflasche entnommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Anschließend wurden sie in ein 15 ml Gefäß überführt und 5 min bei 1800 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde entfernt und verworfen. Das Zellpellet wurde in 3 ml DMEM-Medium resuspendiert. Mittels der Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen gezählt, so dass jeweils 400.000 Zellen auf die Kulturbereiche einer 6-Well-Zellkulturplatte verteilt werden konnten.

Die Zellen wurden dann für 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert (37°C, 5% CO₂, humide Atmosphäre). Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen.

Wie unter Punkt 3.6 beschrieben, wurden sechs Kulturbereiche einer 6-Well-Platte vorbereitet. Drei dieser Wells wurden verwendet, um die Zellen lediglich mit Caspase-4-Substrat zu inkubieren und wiederum drei weitere Wells standen zur Behandlung der Zellen mit Caspase-4-Substrat und Caspase-4-Inhibitor bereit. In diesem Versuch wurde auf die Behandlung der Zellen mit einem Pan-Caspase-Inhibitor ver-

zichtet. Es erfolgte eine vierstündige Inkubation mit Substrat- bzw. Substrat/Inhibitor-Zusatz. Anschließend wurde, wie unter Punkt 3.6 beschrieben, weiter verfahren, so dass in jeweils drei Proben des Überstands der lediglich mit Caspase-4-Substrat behandelten Zellen und den dazugehörigen Lysaten und in drei Proben mit Caspase-4-Substrat und zusätzlichem Caspase-4-Inhibitor-Zusatz inklusive Lysaten analytisch mittels RP-HPLC die AFC-Konzentration gemessen wurden.

Wir führten außerdem den bereits von Koehn et al. beschriebenen Caspase-4-Assay durch, der eine Proteinisolation aus einer Zellkultur vor der eigentlichen Caspase-Aktivitätsmessung mittels RP-HPLC voraussetzte (Koehn et al. 2008). Diese Methodik erforderte eine Zellaufarbeitung, wie sie bei anderen etablierten Caspase-Assays angewendet wird, weswegen hierfür ebenfalls sechs Wells präpariert wurden (drei zur späteren Inkubation des daraus entstandenen Proteinisolats mit Caspase-4-Substrat und drei zur späteren Inkubation mit Caspase-4-Substrat und Caspase-4-Inhibitor). Um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde bei der Vorbereitung der Zellen genauso verfahren, wie bei der Präparation der Zellen, in deren Überstand freies AFC bestimmt werden sollte. Wichtig hierbei war die Tatsache, dass die Zellen aus derselben Passage stammten, wie für den Vergleichsversuch. Im Gegensatz hierzu wurde nach 24 Stunden das Medium aus den Kulturbereichen entfernt. Nach einem Waschschrift mit PBS konnten die Zellen geerntet werden. Diese Zellsuspension wurde bei 2000 rpm und 6°C für 5 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde entfernt und verworfen. Zum Zellpellet wurde 200 µl des Zellyse-puffers ohne Proteinase-Inhibitorzusatz gegeben. Das Pellet wurde darin gut mittels Pipette und Vortexer resuspendiert und auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Proben fünfmalig in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Eis langsam aufgetaut. Die Lysate wurden dann 30 min bei 18000 rpm und 6°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und für den weiteren Versuch verwendet, wobei das Pellet verworfen werden konnte. Aus dem Zentrifugat wurden 20 µl zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford verwendet.

Zu dem Zellysat der JEG-3-Zellen, was lediglich mit dem Caspase-4-Substrat versehen werden sollte, wurde 5 µl des Proteinisolats zu 240 µl Caspase-4-Puffer gegeben und dieses Gemisch 30 min im 30°C warmen Wasserbad inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 5 µl Caspase-4-Substrat (Ac-LEVD-AFC, c = 20 mM in DMSO, Konzentration im Ansatz: 0,4 mM), beziehungsweise 5 µl destilliertes Wasser zur

Bestimmung des Blindwertes. Die Probenansätze wurden mittels Vortexer gut gemischt und anschließend für vier Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dann wurden 200 µl der Probe entnommen und nach einem Mischschritt mittels Vortexer mit 400 µl MeOH zum Beenden der Reaktion versetzt, im Gegensatz zu Koehn et al., die HCl verwendeten.

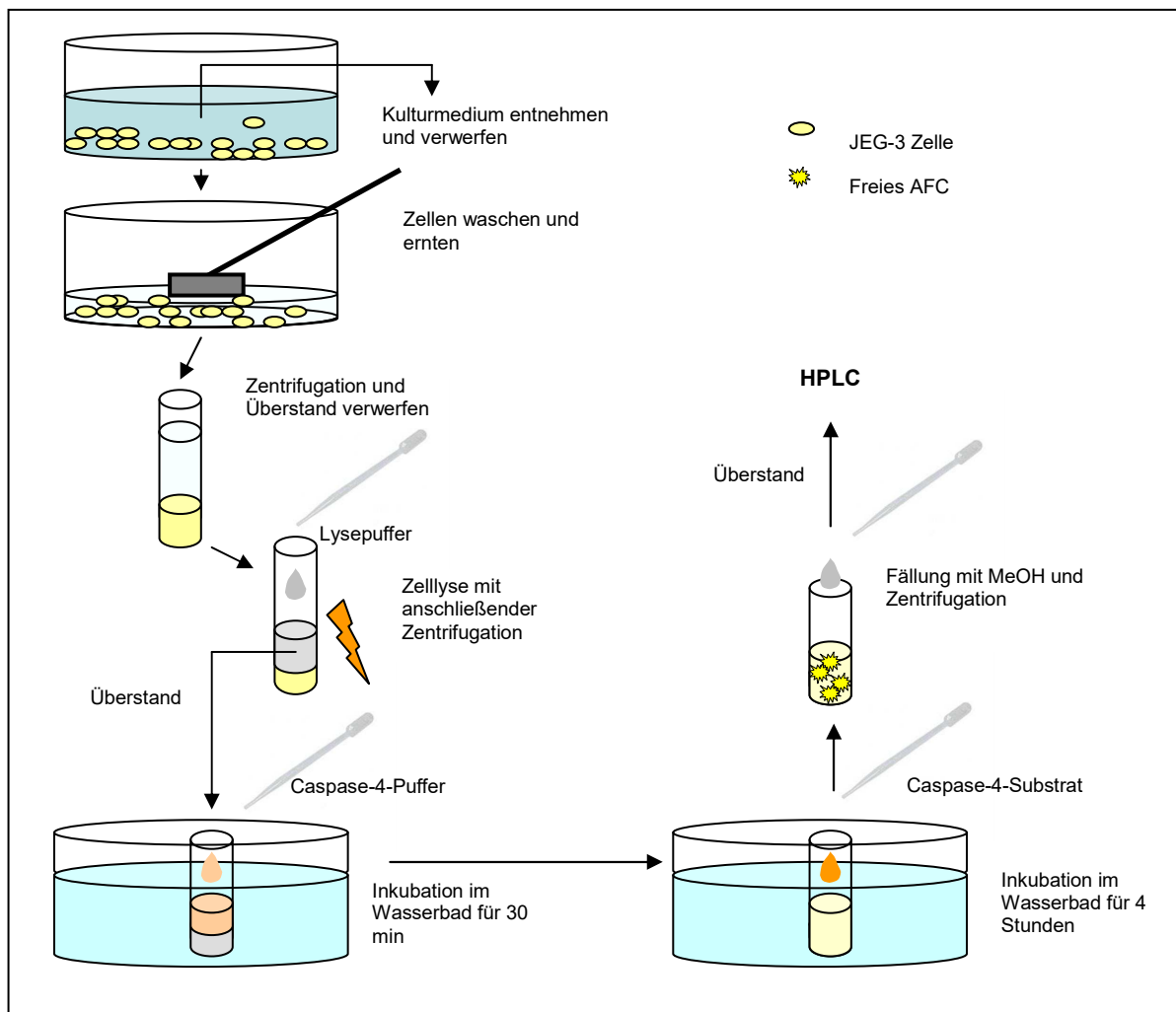


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des indirekten Caspase-Assays. Basierend auf einer Zellyse, Proteinisolierung und anschließender Inkubation des Lysats mit dem Caspase-4-Substrat wird die Caspase-4-Aktivität der Zellen bestimmt. In diesem Fall nach chromatographischer Auftrennung und Fluoreszenzmessung.

Um die Caspase-4-Reaktion zu hemmen, wurde in einem weiteren Versuchsansatz zusätzlich der Caspase-4-Inhibitor (Z-LEVD-FMK) hinzugegeben. Für 30 min im Wasserbad inkubierte hierbei folgendes Probengemisch: 5 µl Zellysat, 237,5 µl Caspase-4-Puffer und 2,5 µl Caspase-4-Inhibitor (Z-LEVD-FMK, $c = 0,002$ mM). Danach

wurden 5 µl Caspase-4-Substrat (Ac-LEVD-AFC, c = 20 mM in DMSO, Konzentration im Ansatz: 0,4 mM) hinzugefügt und dieses Gemisch ebenfalls 4 Stunden bei 37°C im Wasserbad gelagert. Auch hierbei wurden dann 200 µl der Probe mit 400 µl MeOH versetzt. Die mit Methanol versehenen Proben wurden dann für 25 min auf Eis gelagert und dann in einem Centrifugal Filter für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und gefiltert. Das Filtrat wurde anschließend analytisch mittels RP-HPLC aufgetrennt und die Fluoreszenz des freigesetzten AFC und damit die AFC-Konzentration in pmol/ml quantitativ bestimmt. Abbildung 3.6 zeigt schematisch die verschiedenen Schritte der Probenvorbereitung für diesen indirekten Caspase-Assay, um dadurch die Caspase-4-Aktivität mit RP-HPLC zu bestimmen.

Beide Versuchsansätze wurden parallel dreifach durchgeführt und an einem anderen Tag erneut dreifach wiederholt, allerdings mit einer älteren Passage der JEG-3-Zellen.

3.8 Aufnahme von Fluoreszenzspektren von Caspase-4-Substrat, freiem AFC und einem Gemisch beider Substanzen

Hintergrund

Fluoreszenz definiert ein optisches Phänomen, bei dem ein Photon von einem Atom oder einem Molekül absorbiert und später ein Photon mit niedrigerer Energie und größerer Wellenlänge emittiert wird. Fluoreszenz ist genau wie die Phosphoreszenz eine besondere Art der Lumineszenz (kaltes Leuchten). Bei der Fluoreszenz erfolgt im Gegensatz zur Phosphoreszenz die Emission unmittelbar auf die Absorption innerhalb von 10^{-8} sec. Die Energie kann bei den Absorptionsvorgängen in einem Molekül oder Atom auf unterschiedliche Weise aufgenommen werden. Bei der Photolumineszenz erfolgt die Energiezufuhr durch Absorption von ultraviolettem Licht (UV), sichtbarem Licht (VIS) oder infrarotem Licht (IR). Diese Photolumineszenz, zu der auch die Fluoreszenz gehört, kann für quantitative und qualitative Analysen verwendet werden. Trägt man beispielsweise die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Wellenlänge auf, so zeichnet man hierbei ein Fluoreszenzspektrum auf. Dabei ist zwischen dem Anregungs- und Emissionsspektrum zu unterscheiden. Man bezeichnet die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei fester Anregungswellenlänge von der

Emissionswellenlänge als Fluoreszenz-Emissionsspektrum, kurz Fluoreszenzspektrum. Man misst die spektrale Verteilung des emittierten Lichts, indem man den Monochromator (Filter) für die Emissionswellenlänge verändert. Fluorophore werden hierbei diejenigen Moleküle genannt, deren Energieumwandlung mit Fluoreszenzercheinungen verknüpft ist. Eine Probe sollte in einem Spektralbereich angeregt werden, in dem sie einen relevanten Extinktionskoeffizienten hat.

Ein Fluoreszenzspektrometer besteht im Wesentlichen aus einer Lichtquelle zur Anregung, zwei Monochromatoren (Filtern) zur Selektion der Anregungs- und Emissionswellenlänge, einer Messküvette und einem Photomultiplier zur Detektion.

Fragestellung

Die Angaben der Hersteller zur optimalen Emissionswellenlänge von AFC variieren in einem Bereich von 480-520 nm. Ziel und Bedingung zur Detektion von AFC im niedrigen Konzentrationsbereich, sollte das Messen am Fluoreszenzmaximum sein. Mit diesem Versuch sollte eine Aussage darüber getroffen werden, bei welcher Wellenlänge freies AFC am besten bestimmt werden kann, unter Berücksichtigung anderer fluoreszierender Stoffe der Probe als Störfaktoren, um somit den Messfehler möglichst gering zu halten. Die Quantifizierung durch RP-HPLC ermöglicht es, die einzelnen fluoreszierenden Probenbestandteile eines Stoffgemisches chromatographisch aufzutrennen. Somit durchlaufen diese den Fluoreszenzdetektor nach unterschiedlichen Elutionszeiten. Eine Überlagerung der Fluoreszenz wird somit minimiert.

Durchführung

Aufgenommen wurden Fluoreszenzspektren von drei verschiedenen Probenlösungen. Diese enthielten:

- Caspase-4-Substrat
- AFC-Standardlösung mit einer Konzentration von $c = 200 \text{ pmol/ml}$
- Ein Gemisch aus intaktem Caspase-4-Substrat und freiem AFC

Das Gemisch aus Caspase-4-Substrat und freiem AFC stammte aus dem Überstand einer JEG-3-Zellkultur, die mit dem Caspase-4-Substrat für vier Stunden unter Standardbedingungen inkubierte. Diese Probe beinhaltet folglich noch intaktes Caspase-4-Substrat und frei gewordenes AFC, welches zuvor in den Zellen durch Caspase-4 vom Tetrapeptid abgespalten wurde und aus der Zelle diffundiert ist. Das reine Cas-

pase-4-Substrat wurde analytisch mit RP-HPLC vom Caspase-4-Substrat-AFC-Gemisch getrennt, da es vor dem freien AFC nach 4 min eluiert und somit separiert werden konnte. Neben diesen beiden Proben wurde ebenfalls ein Fluoreszenzspektrum von einer freien AFC-Standardlösung ($c = 200 \text{ pmol/ml}$) aufgenommen.

Als Fluoreszenzspektrometer kam eine HITACHI Model F-4500 (Eintrittspalt: 5 nm, Austrittspalt: 5 nm) zum Einsatz. Dessen Anregungsmonochromator wurde auf die konstante Anregungswellenlänge von 400 nm eingestellt und die Emissionswellenlängen (λ) variierten von 300 – 650 nm. Als Strahlungsquelle diente eine Xenon-höchstdrucklampe XBO 150 und als Detektor ein Photomultiplier Tube, Typ R928 mit einem „scan speed“ von 240 nm/min. Die Fluoreszenzintensität wurde in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge ermittelt. Die Messung erfolgte punktweise mit $\Delta\lambda = 1\text{nm}$. Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute bei der Festkörpermessung erfolgte gegen einen inneren Standard der Polymerprobe AT 63,1.

3.9 Erstellen von Kalibriergeraden und Messung von AFC-Standardlösungen bei verschiedenen Wellenlängen zur Bestimmung des Wellenlängenoptimums

Hintergrund

Die computergestützte Datenauswertung erforderte das Erstellen einer Kalibriergeraden. Die Messung durch RP-HPLC macht die Detektion auch nur sehr geringer Konzentrationen von freiem AFC möglich, so dass man einen Rückschluss auf eine niedrige Caspase-Aktivität und damit die Produktion nur sehr geringer Mengen von AFC ziehen kann. Dies setzt optimal eingestellte Messbedingungen voraus und macht insbesondere das Messen am Wellenlängenoptimum notwendig. Die Angaben der Hersteller bezüglich der Detektionswellenlänge variieren, so dass wir diese testeten und die für unseren Versuch optimale Wellenlänge finden wollten.

Durchführung

Zur Kalibration wurde nach Angaben des Herstellers eine Stammlösung des 7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarins (AFC, $n = 21,8188 \text{ } \mu\text{mol}$) hergestellt. Hierfür wurde AFC in 2,182 ml MeOH (100%, HPLC-Grade, $c = 10 \text{ } \mu\text{mol/ml}$) gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden Verdünnungslösungen zum Anfertigen von Standardgemischen hergestellt. Für alle angesetzten Verdünnungslösungen und Standards wurde

ein 40/60 (v/v) MeOH/Wasser-Gemisch verwendet. Folgende Standardlösungen wurden verwendet: Konzentration AFC in pmol/ml 1 / 2,5 / 5 / 7,5 / 10 / 25 / 50 / 75 / 100 / 250. Mit jedem Standard wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und um eine Verschleppung des AFC auf der Säule zu vermeiden, wurde zwischen zwei Proben ein Eluent (Methanol-Wasser-Gemisch) gemessen. In jeder Standardprobe wurde bei konstanter Anregungswellenlänge von 400 nm und drei verschiedenen Emissionswellenlängen (490 / 505 / 520 nm) quantitativ das Fluoreszenzsignal (in mV*min) erfasst.

3.10 Untersuchung der Stabilität von Caspase-4-Substrat im Zellkultur-überstand bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen

Hintergrund

Das Caspase-4-Substrat unterliegt auch ohne Einwirken einer enzymatischen Spaltung einem Zerfall in unterschiedlich große Bestandteile. Hierbei entsteht unter anderem auch freies AFC. Dieses kann das tatsächliche Messergebnis verfälschen. Als Einflussfaktoren auf das Substrat wirken hierbei Temperaturänderungen, Zusätze zum Substrat und die Lagerungszeit an sich. Dieser Versuch sollte dazu dienen, beurteilen zu können, ob die Häufigkeit des Einfrierens und Auftauens einen Einfluss auf die Stabilität des Substrats hat. Es sollte weiterhin die Stabilität des Substrats während der Lagerung bei Raumtemperatur, bei -80°C und -20°C untersucht werden.

Durchführung

Die Überstände der JEG-3-Zellkultur aus sechs Kulturbereichen einer 6-Well-Kulturplatte, die vier Stunden mit Caspase-4-Substrat unter Standardbedingungen inkubierten, wurden entnommen und in einem Reaktionsgefäß gemischt, um die für diesen Versuch benötigte Probenmenge herzustellen. Dieses Gemisch wurde auf zwölf HPLC-Gläschen mit je 500 µl verteilt. Zwei dieser Proben wurden bei Raumtemperatur gelagert und jeweils fünf bei -20°C und -80°C.

Unter den oben beschriebenen HPLC-Bedingungen wurden in den zwei bei Raumtemperatur gelagerten Proben nach 0 / 2 / 4 / 6 und 20 Stunden und nach 4 Tagen die Konzentration an freiem AFC (in pmol/ml) mittels RP-HPLC quantifiziert. Es wurden folglich zwei Versuchsreihen durchgeführt und deren Mittelwerte berechnet.

Die bei -20°C und -80°C gelagerten Proben wurden nach 0 / 4 / 7 / 14 und 28 Tagen bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend darin die AFC-Konzentration in pmol/ml bestimmt. Eine der jeweils fünf Proben wurde zu allen fünf Zeitpunkten aufgetaut und gemessen, die anderen jeweils erst ab dem 2., 3., 4., oder 5. Messtag und zu allen darauf folgenden Messtagen. So wurde beispielsweise eine Probe an Tag 7 zum ersten Mal aufgetaut und darin die Konzentration an freiem AFC chromatographisch bestimmt mit Wiederholung dieser Prozedur an Tag 14 und 28. Es wurden zwei Versuchsreihen bei beiden Temperaturen durchgeführt und deren Mittelwerte berechnet.

3.11 Einfluss von magnetischen Nanopartikeln auf die Detektion der Fluoreszenz von AFC durch RP-HPLC

Hintergrund

Nanopartikel besitzen eine Größe von 1-100 nm in mindestens einer Ausrichtung. Magnetische Nanopartikel (MNP) sind bis zu 10 nm groß und bestehen aus Metallen, wie Kobalt, Nickel, Mangan und Eisen sowie deren Metalllegierungen oder Oxiden. Magnetische Nanopartikel zeichnen sich durch eine besondere thermische und chemische Stabilität aus, was sie zu sehr guten Trägerstoffen in biomedizinischen Anwendungen macht. Am häufigsten kommen Eisenoxidpartikel zum Einsatz. Homogene Strukturen und eine große Adsorptionsfläche sind weitere Eigenschaften der magnetischen Nanopartikel (Gu et al. 2006). Sie sind daher vielversprechende diagnostische und therapeutische Werkzeuge in der Medizin. So dienen sie z.B. als Carrier bei den Drug-Delivery-Systemen in der zielgerichteten Tumorthherapie (Chomoucka et al. 2010), als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (Meng et al. 2011) und zur Hyperthermie-Behandlung aufgrund ihrer Fähigkeit zur Wärmeproduktion im magnetischen Wechselfeld (Laurent et al. 2011).

Arbeiten des Placenta-Labors beschäftigten sich mit der Plazenta-Perfusion und der möglichen Penetration magnetischer Nanopartikel über die Plazentaschranke. Dieser Versuch sollte dazu dienen, beurteilen zu können inwiefern MNP die fluoreszenzbasierte Caspase-4-Aktivitätsmessung beeinträchtigen.

Fragestellung

Magnetische Nanopartikel finden im diagnostischen Bereich eine breite Anwendung.

Sie dienen mit hoher Selektivität zur Manipulation und Separierung von Proteinen aus Zellysaten unter Anlage eines externen magnetischen Feldes (Safarik und Safarikova 2004). Auch Zellen können mithilfe von NMP manipuliert werden. Daher ist es von Interesse zu wissen, ob die magnetischen Nanopartikel den Detektionsprozess, beispielsweise eines Fluoreszenzsignals stören können. Hierfür wurde der Einfluss der MNP auf die Bestimmung der Fluoreszenz von freiem AFC untersucht.

Durchführung

Die Nanopartikelstammlösung (fluid-MAG-D mit Eisen (II,III)-Oxid im Kern) wurde mit zweifach destilliertem Wasser 1:100 verdünnt ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). 983 μl F-12 Medium wurde zusammen mit 10 μl AFC-Stammlösung (100 pmol/ml oder 10 pmol/ml) und 6,8 μl der Nanopartikel-Stammlösung ($0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) gemischt. Zur Messung des Blindwertes wurde anstelle der Nanopartikelstammlösung bidestilliertes Wasser verwendet. Die Proben wurden mit einem Vortexer gut gemischt. Im Folgenden wurden aus diesem Gemisch 0,5 ml entnommen und mit 1 ml MeOH versetzt. Es folgte eine Lagerung auf Eis für 20 min. 500 μl jeder Probe wurden in einen Centrifugal Filter überführt und 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. In jedem Zentrifugat wurde anschließend mit der RP-HPLC freies AFC chromatographisch aufgetrennt und anschließend das Fluoreszenzsignal von AFC gemessen (in $\text{mV} \cdot \text{min}$). Es wurden für jede Konzentration (entweder 10 oder 100 pmol/ml) drei Versuchsansätze durchgeführt.

3.12 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde Microsoft Excel 2007 verwendet. Hiermit erfolgte die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichung als Maß für die Güte der ermittelten Mittelwerte.

Microsoft Excel 2007 wurde ebenfalls zur Berechnung der Signifikanzen verwendet unter Verwendung des t-Tests (gepaart, zweiseitig). Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ erreicht.

Unter Verwendung von SPSS erfolgte die zweifaktorielle, univariate Varianzanalyse (ANOVA) nach dem allgemeinen linearen Modell.

4 ERGEBNISSE

4.1 Aktivitätsbestimmung einer rekombinanten Caspase-4

Um die Aktivität einer Reihe von Caspasen zu bestimmen, stehen verschiedene Detektionsmöglichkeiten zur Verfügung, wie sie unter Punkt 1.4 erläutert wurden. Für die meisten dieser Verfahren ist es nötig, nach Kultivierung der gewünschten Zellkultur deren Proteine zu isolieren. Diese entstandenen Lysate werden dann nach standardisiertem Protokoll mit dem passenden Fluoreszenz- oder Farbstoff-gekoppelten Caspase-Substrat inkubiert. Nach einem definierten Zeitraum wird die Reaktion beendet und anschließend fluorimetrisch oder kolorimetrisch die umgesetzte Substratmenge bestimmt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Caspase-4-Aktivität einer Zellkultur zu bestimmen und dabei auf den Schritt der Zellyse zu verzichten. Das Caspase-4-Substrat wurde hierfür direkt zur Zellkultur gegeben, so dass es in die Zellen diffundieren und dort von aktiver Caspase-4 umgesetzt werden konnte. Freies AFC trat anschließend entsprechend des Diffusionsgleichgewichts in den Überstand über und sollte aus diesem durch RP-HPLC aufgetrennt und mittels Fluoreszenzdetektion bestimmt werden.

Eine Aktivitätsbestimmung auf Grundlage einer vitalen, adhärent wachsenden Zellkultur war in der Literatur nicht ausreichend beschrieben. Daher brauchten wir einen Anhalt, wie lange die Zellen mit dem Caspase-4-Substrat behandelt werden sollten, um eine ausreichende Zeit für die Diffusion und Umsetzung zu gewährleisten. Tao et al. bestimmten die Caspase-3-Aktivität in einer Reihe nicht-adhärent wachsender Zellen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Caspase-Aktivität nach Inkubation der Zellen mit dem Substrat und vorheriger Behandlung mit verschiedenen Apoptose auslösenden Chemotherapeutika nach vier Stunden nachlässt. Als mögliche Ursache hierfür wurde eine vermehrte Durchlässigkeit der Zellmembran für Caspasen und eine zunehmende Inaktivierung nach dieser Zeit vermutet (Tao et al. 2007).

Untersucht werden sollte der zeitliche Verlauf der enzymatischen Freisetzung von AFC durch eine rekombinante Caspase-4 bei definierter Caspase-4-Substrat- und Enzymkonzentration (siehe Abbildung 4.1). Es wurde die identische Substratkonzentration des Caspase-4-Substrats gewählt, die auch im Zellkulturansatz herrschte. Die

AFC- Konzentration (in pmol/ml) im Versuchsansatz wurde zu 10 verschiedenen Zeitpunkten (nach 0,5 / 1 / 2 / 3 / 4 / 5 / 6 / 7 / 8 und 24 Stunden), beginnend bei 30 min Inkubationszeit und spätestens nach 24 Stunden bestimmt. Die AFC-Konzentration nach 24 Stunden wurde als 100% festgelegt. Das Diagramm in Abbildung 4.1. zeigt die Ergebnisse von zwei Versuchsdurchführungen. An jedem Messzeitpunkt wurden je zwei Proben entnommen, darin die AFC-Konzentration bestimmt und deren Mittelwerte berechnet. Es zeigt sich ein konstanter Anstieg des freigesetzten AFC innerhalb der ersten vier Stunden, in denen 50% des im definierten Beobachtungsintervall freigesetzten AFC detektiert wurden. Innerhalb weiterer vier Stunden steigerte sich dieses lediglich auf 60%.

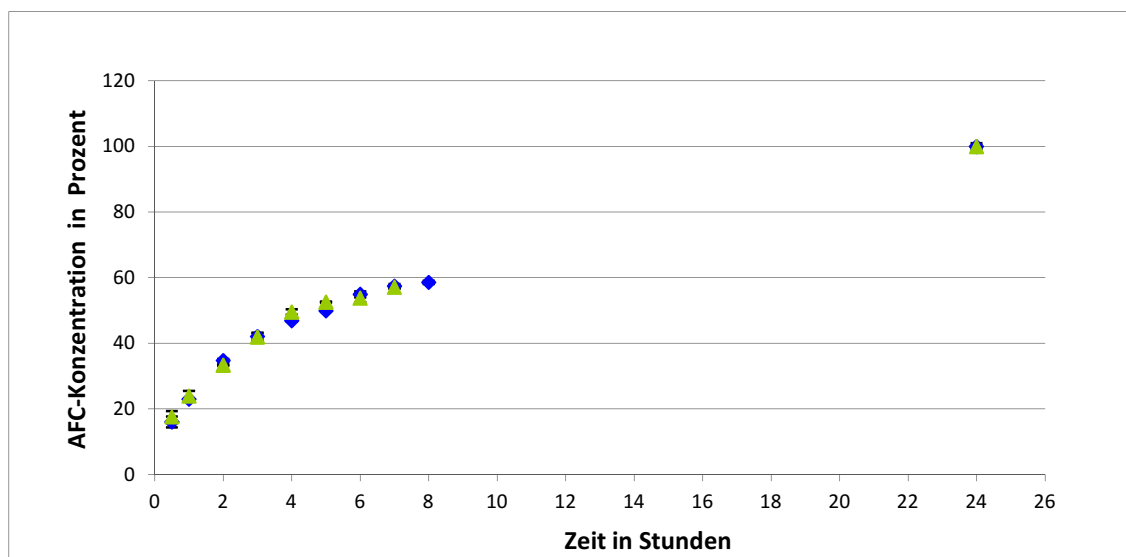


Abbildung 4.1: Quantifizierung der Caspase-Aktivität einer rekombinanten Caspase-4 im in-vitro-Versuch. Dargestellt ist die AFC-Konzentration in Prozent in Abhängigkeit von der Zeit, wobei die AFC-Konzentration nach 24 Stunden als 100% festgelegt wurde. Es gab zwei Versuchsansätze (grüne Datenpunkte, blaue Datenpunkte) und damit zwei Messreihen mit Messungen an 10 verschiedenen Zeitpunkten. An jedem Messzeitpunkt wurden von jedem Versuchsansatz zwei Proben entnommen und der Mittelwert bestimmt. Die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen Standardabweichungen.

Da innerhalb der ersten vier Stunden bereits die Hälfte der umgesetzten AFC-Menge erreicht wurde und im weiteren zeitlichen Verlauf keine deutliche Steigerung zu registrieren war, erschien ein Zeitraum von vier Stunden als optimale Inkubationszeit, insbesondere um Diffusion des Caspase-4-Substrats und dessen Umsetzung zu gewährleisten, um ein quantifizierbares Signal im Fluoreszenzdetektor zu erhalten.

4.2 Direkte Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 durch Bestimmung der AFC-Konzentration in Zellkulturüberständen und Zelllysaten von JEG-3 durch RP-HPLC

4.2.1 Optimierung der RP-HPLC-Messbedingungen

Der in dieser Arbeit verwendete Caspase-4-Assay ist eine Weiterentwicklung der bereits von Koehn et al. entwickelten fluoreszenzbasierten Aktivitätsbestimmung von Caspase-4 durch RP-HPLC (Koehn et al. 2008).

Koehn et al. verwendeten ein isokratisches Trennverfahren durch ein konstantes Verhältnis von Methanol und Wasser (70/30) für die mobile Phase. Mit dem Ziel, eine bessere Quantifizierung im niedrigen Konzentrationsbereich zu erreichen, erfolgte ein Wechsel zu einer Gradientenelution. Es wurden zwei verschiedene Eluenten verwendet. Zum einen ein Gemisch aus 10% Methanol und Wasser und zum anderen 100%iges Methanol. Das Verhältnis beider Eluenten änderte sich im zeitlichen Verlauf (siehe Abbildung 3.5) mit Zunahme des Methanol-Anteils innerhalb von 10 min. Für 4 min wurde dieses Verhältnis konstant gehalten, um das System dann wieder mit dem Ausgangsverhältnis der beiden Bestandteile zu reequilibrieren. Vorteil dieses Gradientensystems war die Aufzeichnung spitzerer Peaks im Chromatogramm, die besser integriert werden konnten und daher eine genauere Datenauswertung ermöglichten. Dies ist speziell dann von Vorteil, wenn zwischen zwei zu quantifizierenden Probenbestandteilen nur geringe Unterschiede in der Fluoreszenz bestehen und wenn die Proben nur einen geringen Anteil an freiem AFC aufweisen. Zudem hat ein Gradientensystem mit zunehmendem Anteil organischer Lösungsmittel den Vorteil, Verunreinigungen besser von der Säule entfernen zu können.

Wir verwendeten das identische Packungsmaterial und die identische Größe der Säule (C18, 250 x 4 mm, 5 µm) wie Koehn et al.. Wir tauschten jedoch die Vorsäule (ODS Hypersil column, C18, 10 x 4,6 mm, 5 µm) gegen eine Säule aus, die identisch zur Hauptsäule war.

Versuche, deren Resultate an dieser Stelle nicht im Einzelnen aufgeführt werden sollen, erbrachten das Problem, dass beim isokratischen Trennverfahren und einem erhöhten Probendurchlauf die Bestimmungen im Verlauf ungenauer wurden. Es la-

gerten sich Substanzen auf der Säule ab, wodurch es zu einem Anstieg des Druckes auf der Säule kam, sich die Zeit bis zur Elution des AFC verlängerte und ein Eluentendurchlauf zwischen zwei Proben nicht mehr ausreichte, die Verunreinigungen zu beseitigen. Neben der Gradientenelution konnte der Grad der Verunreinigung und damit die Lebensdauer einer Säule verbessert werden, indem die Proben vor Injektion in das HPLC-System mit Methanol ausgefällt wurden.

Insgesamt konnte eine präzisere Quantifizierung von niedrigen Konzentrationen bis zu 0,2 pmol/ml erreicht werden, im Vergleich zu 40 pmol/ml durch das isokratische Trennverfahren. Der Nachteil dieser präziseren Bestimmung war jedoch, dass sich die Elutionszeit von freiem AFC verlängerte und das AFC-Signal statt nach 6,9 min erst nach 7,3 min detektierbar war. Abbildung 4.2 zeigt das entsprechende Chromatogramm. Durch das Gradientensystem verlängerte sich auch die Zeit für die Reequilibrierung von 5 auf 10 min, sodass mit einer Standardlaufzeit von 10 min für die AFC-Bestimmung ein Probendurchlauf insgesamt 20 min in Anspruch nahm.

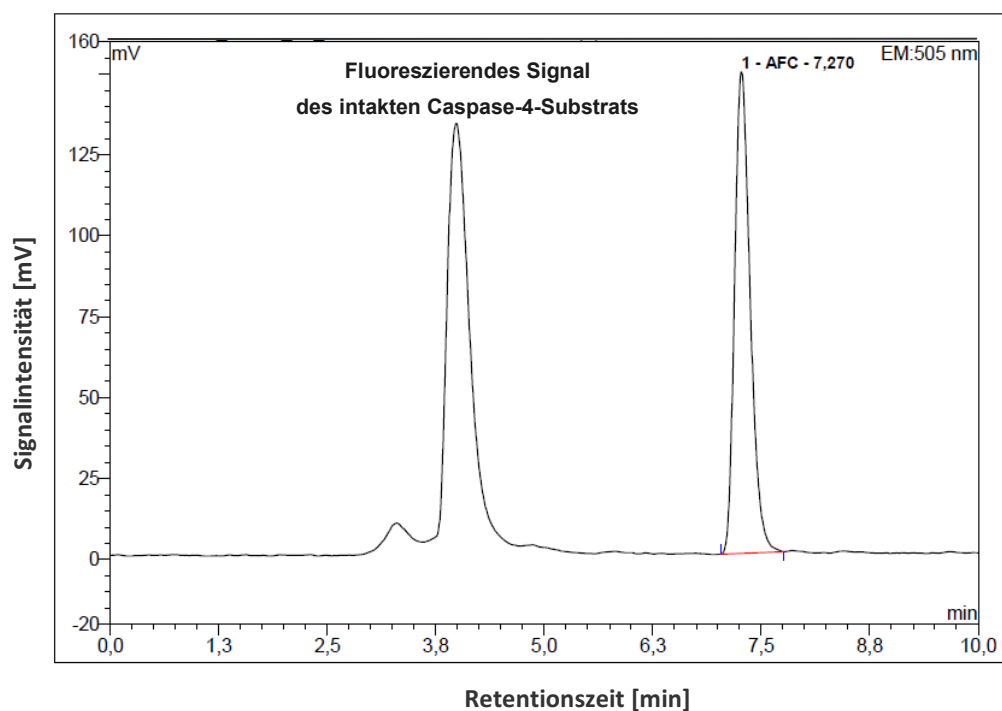


Abbildung 4.2: Darstellung des Chromatogramms einer RP-HPLC mit Gradientenelution. Dargestellt ist die Signalintensität von AFC nach $t_R = 7,27$ min und vom intakten Caspase-4-Substrat nach $t_R = 4$ min. Die Anregungswellenlänge betrug 400 nm, die Emissionswellenlänge (EM) 505 nm.

4.2.2 Ergebnisse für die Zellkulturüberstände

Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweifaktorielle, univariate Varianzanalyse (allgemeines lineares Modell). Hierbei sollte der Einfluss des Zusatzes zur JEG-3-Zellkultur bestehend aus

- Caspase-4-Substrat oder
- Caspase-4-Substrat und Caspase-4-Inhibitor oder
- Caspase-4-Substrat und Pan-Caspase-Inhibitor

und der Einfluss des jeweiligen Messzeitpunktes (Messung am 1. Tag vs. 2. Tag vs. 3. Tag vs. 4. Tag) auf das Messergebnis (AFC-Konzentration in pmol/ml) im Zellkulturüberstand und dem dazugehörigen Zellysate (Ergebnisse hierzu siehe 4.2.3) und deren Interaktionseffekt auf das Messergebnis untersucht werden. Es handelt sich hierbei um eine zweifaktorielle Varianzanalyse, bestehend aus zwei Faktoren (unabhängige Variablen). Der eine Faktor war der Zellkulturzusatz, der dreifach abgestuft war, da die drei oben aufgeführten Zellkulturzusätze zu der JEG-3-Zellkultur gegeben werden konnten. Der Messzeitpunkt „Messtag“ stellte den anderen Faktor dar, der vierfach abgestuft war, weil folglich an vier verschiedenen Tagen der Versuch durchgeführt wurde und so vier Messzeitpunkte entstanden. Gemessen wurde die Konzentration an freiem AFC in pmol/ml als abhängige Variable. Anhand des gesättigten Modells wurde neben allen Haupteffekten (Einfluss der Zellkulturzusätze und Einfluss des Messzeitpunktes) auch die Wechselwirkung zwischen den Faktoren berechnet (siehe Abbildung 4.3).

Folgende Fragen sollten mit diesem Versuch geklärt werden:

- Unterscheidet sich die Caspase-4-Aktivität (Höhe der gemessenen AFC-Konzentrationen) der JEG-3-Zellkulturen, wenn zu den Zellen neben dem Caspase-4-Substrat auch ein Caspase-4-Inhibitor oder ein Pan-Caspase-Inhibitor zugesetzt wird?
- Wie sehr unterscheiden sich die Messergebnisse, wenn der Versuch an vier verschiedenen Tagen durchgeführt wird?

- Hat der jeweilige Inhibitor-Zusatz an den verschiedenen Tagen einen unterschiedlich starken reduzierenden Einfluss auf die Höhe der AFC-Konzentration?

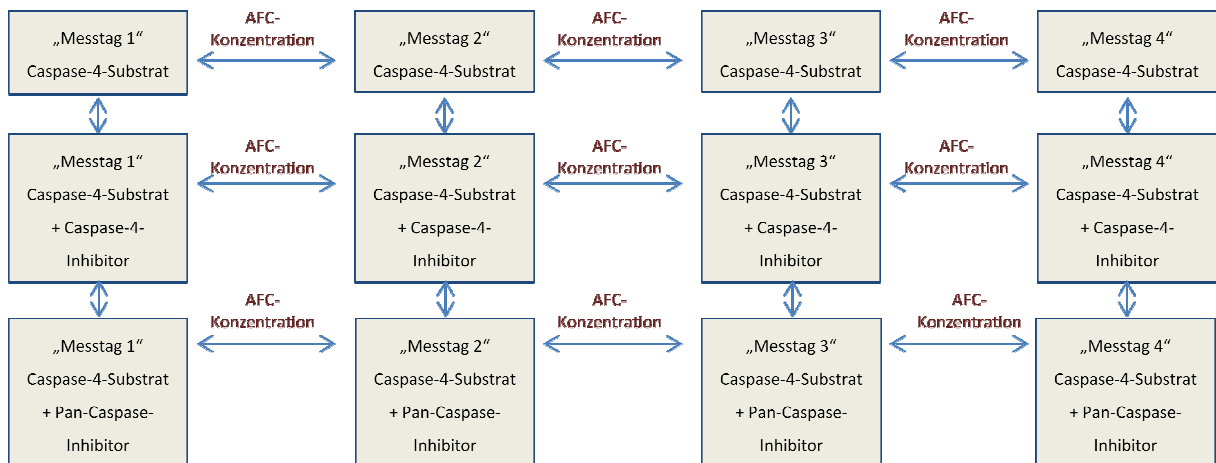


Abbildung 4.3: Modellformulierung zum Versuch. Untersucht wurden der Einfluss der unabhängigen Variablen „Zellkulturzusatz“ und „Messtag“ auf die abhängige Variable „AFC-Konzentration“ und deren Interaktion.

An jedem der vier Messzeitpunkte wurden drei Kulturbereiche einer 6-Well-Kulturplatte mit JEG-3-Zellen vorbereitet: Entweder setzte man den Zellen „Caspase-4-Substrat“ oder „Caspase-4-Substrat und Caspase-4-Inhibitor“ oder „Caspase-4-Substrat und einen Pan-Caspase-Inhibitor“ zu. Im Zellkulturüberstand wurde die Konzentration von freigesetztem AFC bestimmt (in pmol/ml). An den einzelnen Messzeiten wurden entweder zwei oder drei identische Versuchsansätze präpariert. Die „Messtage“ 1-4 unterschieden sich dadurch, dass für jeden Tag ein neuer Zellkulturansatz verwendet wurde. Die Zellen stammten aus unterschiedlichen Passagen einer Zelllinie JEG-3.

Um das Modell zu überprüfen, wurden somit für die Zellkulturüberstände folgende Daten an den vier verschiedenen Messtagen und für die drei verschiedenen Zellkulturzusätze erhoben (siehe Tabelle 4.1):

Tabelle 4.1: AFC-Konzentration der Zellkulturüberstände für die drei verschiedenen Zellkulturzusätze an den vier verschiedenen Messzeitpunkten. Aufgeführt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen der gemessenen AFC-Konzentrationen in pmol/ml der Versuchsansätze an den jeweiligen Messtagen (entweder n = 2 oder 3 Versuchsansätze pro Tag) in Abhängigkeit vom Zellkulturzusatz.

Zellkulturzusatz	Messzeitpunkt	Mittelwert	Standardabweichung	n
Caspase-4-Substrat	1. Messtag	154,53	24,60	2
	2. Messtag	278,52	107,34	3
	3. Messtag	138,78	16,21	3
	4. Messtag	289,72	98,22	3
Caspase-4-Substrat + Caspase-4-Inhibitor	1. Messtag	125,97	23,33	2
	2. Messtag	230,05	103,60	3
	3. Messtag	91,89	36,68	3
	4. Messtag	187,05	40,55	2
Caspase-4-Substrat + Pan-Caspase-Inhibitor	1. Messtag	86,23	1,08	2
	2. Messtag	195,51	91,46	3
	3. Messtag	50,14	2,39	2
	4. Messtag	159,07	29,17	3

Betrachtet man den ersten Messzeitpunkt (1. Messtag), wird ersichtlich, dass die Konzentration von freiem AFC im Überstand durch die Vorbehandlung der Zellen mit Caspase-4-Inhibitor vor Inkubation mit Caspase-4-Substrat reduziert wurde. Wurden die Zellen hingegen sogar mit einem Pan-Caspase-Inhibitor versetzt, sank die registrierte AFC-Konzentration noch deutlicher. Das zeigte einerseits, dass sowohl das Substrat, als auch die Inhibitoren die Zellmembran überwinden konnten und ließ andererseits vermuten, dass an der Katalyse des Caspase-4-Substrats auch andere Caspasen beteiligt sind. Die Reduktion der AFC-Konzentration infolge des Inhibitor-Zusatzes ließ sich an allen der vier Messzeitpunkte beobachten. Die Mittelwerte der gemessenen AFC-Konzentrationen bei identischem Zellkulturzusatz an den verschiedenen Messtagen variieren jedoch im direkten Vergleich.

Der Homogenitätstest nach Levene auf Gleichheit der Varianzen ergab mit 0,043 ein signifikantes Ergebnis. Folglich war keine Varianzenhomogenität gegeben, so dass als Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche der LSD-Test (Least Significant Difference Test) angewendet wurde. Dieser prüft auf Einzelunterschiede der Mittelwerte bei varianzheterogenen Stichproben. Hierbei zeigte sich, dass die mittlere Differenz zwi-

schen dem Zellkulturansatz mit dem Zusatz „Caspase-4-Substrat“ und dem aus „Caspase-4-Substrat mit Caspase-4-Inhibitor“ nur knapp nicht signifikant war ($p = 0,052$). Die mittlere Differenz der Messergebnisse für den Zellkulturansatz mit dem Zusatz „Caspase-4-Substrat“ und dem Zusatz „Caspase-4-Substrat und Pancaspase-Inhibitor“ war mit $p = 0,009$ signifikant. Im Mehrfachvergleich der Messzeitpunkte untereinander unterschieden sich mit Ausnahme von 1. zum 3. „Messtag“ und vom 2. zum 4. „Messtag“ alle Messdurchläufe signifikant voneinander.

Die Varianzanalyse ergab für die Variable „Zellkulturzusatz“ eine Signifikanz (p-Wert) von 0.021. Dieser Wert lag unter dem Signifikanzniveau von 0.05, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Variable „Zellkulturzusatz“ alleine einen Einfluss auf das Ergebnis der AFC-Konzentrationsbestimmung hatte. Für den Faktor Messzeitpunkt („Messtag“) wurde eine Signifikanz (p-Wert) von 0.001 ausgegeben. Auch dieser Wert lag weit unter dem Signifikanzniveau von 0.05, so dass auch hierbei davon ausgegangen werden konnte, dass der Faktor „Messtag“ alleine einen Einfluss auf das Ergebnis der AFC-Konzentrationsbestimmung hatte. Die Signifikanz für die Interaktion zwischen Zellkulturzusatz und Messzeitpunkt lag mit 0.984 über dem Signifikanzniveau von 0.05. Dies deutete daraufhin, dass der Zellkulturzusatz und der jeweilige Messzeitpunkt zusammen keinen signifikanten Einfluss auf die AFC-Konzentration hatten. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die Zellkulturzusätze, insbesondere die Inhibitorzusätze einen Einfluss auf die gemessene AFC-Konzentration hatten, jedoch unabhängig an welchem Tag gemessen wurde. Der Messzeitpunkt für sich betrachtet, spielt allerdings eine entscheidende Rolle und kann einen deutlichen Einfluss auf das Messergebnis ausüben. An jedem der Messzeitpunkte wurde eine andere Passage der gleichen JEG-3-Zellkultur verwendet. Folglich waren auch bei identischer Handhabung und Probenvorbereitung die Zellen an den vier Messtagen unterschiedlich alt und offensichtlich mit unterschiedlicher Caspase-4-Aktivität, erkennbar an den vier unterschiedlich großen Mittelwerten der AFC-Konzentration an Messtag 1, 2, 3 und 4 bei fehlendem Inhibitorzusatz. An dieser Stelle ist jedoch anzumerken, dass sich die Ergebnisse an Tag 1 und 3, sowie an Tag 2 und 4 ähnelten.

Es interessierte an dieser Stelle noch die Frage, ob die Auswirkung auf die Caspase-Aktivität durch den Caspase-4-Inhibitor und den Pan-Caspase-Inhibitor an den vier verschiedenen Messtagen in gleicher Ausprägung stattfand (siehe Abbildung 4.4).

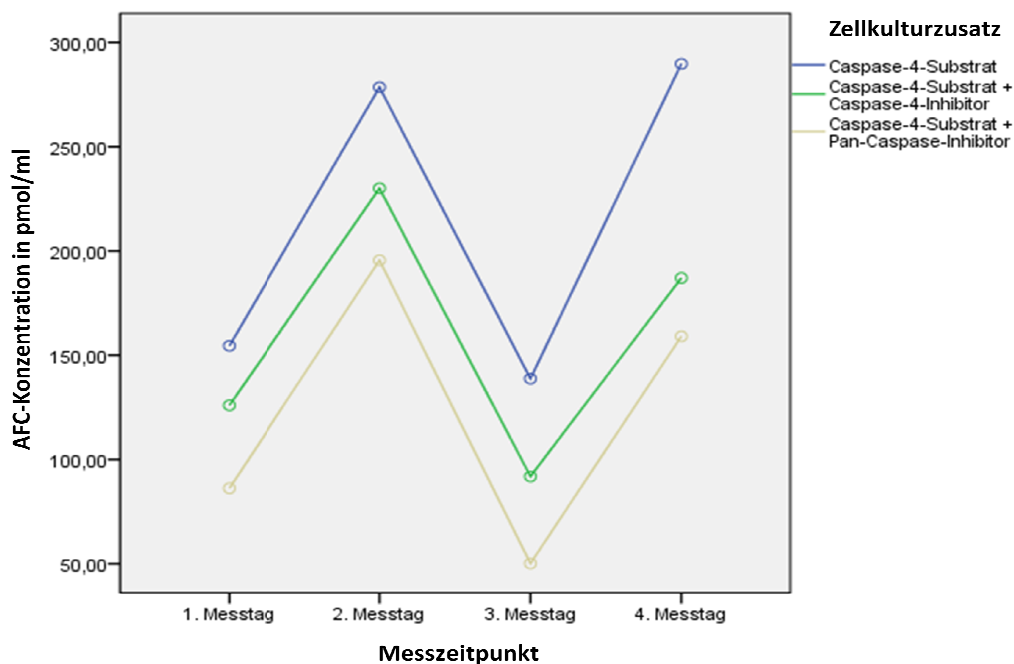


Abbildung 4.4: AFC-Konzentration für den Zellkulturüberstand der JEG-3-Zellkultur in pmol/ml. Das Liniendiagramm zeigt die verschiedenen geschätzten Randmittel der Messergebnisse der AFC-Konzentrationen für die Überstände der JEG-3-Zellkultur der drei verschiedenen Zellkulturzusätze an vier verschiedenen Messtagen.

Dargestellt sind die geschätzten Randmittel der AFC-Konzentrationen in pmol/ml in den Überständen der Zellkulturansätze mit verschiedenen Zellkulturzusätzen. Geschätzte Randmittel werden oft als zusätzliche Mittelwerte neben den deskriptiven Werten beim linearen Modell ausgegeben. Auf deren Grundlage werden bei der Varianzanalyse die Effekte der Faktoren auf Signifikanz geprüft. Geschätzte Randmittel werden eingesetzt, wenn unbalancierte Stichprobenumfänge vorliegen. Sie sind aber dann die besseren Schätzer für die Mittelwerte. In unserem Fall bestand an den vier Messtagen pro Zellkulturzusatz nicht immer der gleiche Stichprobenumfang. Betrachtet man in Tabelle 4.1 beispielsweise für den Zellkulturzusatz „Caspase-4-Substrat“ die vier verschiedenen Messtage, wird ersichtlich, dass an Messtag 1 zwei Versuchsansätze mit Caspase-4-Substrat zur Messung bereit standen, an Messtag 2, 3 und 4 jedoch drei.

Die obere Linie (blau) repräsentiert AFC-Konzentrationen, wenn ausschließlich Caspase-4-Substrat zur Zellkultur gegeben wurde, die mittlere Linie (grün) zeigt die Ergebnisse der Messungen nach Zusatz eines Caspase-4-Inhibitors und die untere Linie (gelb) steht für die AFC-Konzentrationen nach Hinzugabe eines Pan-Caspase-

Inhibitors. Nach jeder Inhibitorbehandlung der Zellen erfolgte die Hinzugabe des Caspase-4-Substrats. An jedem der vier Messtage wurden die höchsten geschätzten Randmittel der AFC-Konzentrationen in den Zellkulturansätzen mit Caspase-4-Substrat ohne Inhibitor-Zusatz erreicht. Auch wurde an jedem der vier Messzeitpunkte durch den Pan-Caspase-Inhibitor eine deutlichere Reduktion der AFC-Konzentration als durch den Caspase-4-Inhibitor bewirkt. Evident wird in Abbildung 4.4 ein annähernd paralleler Verlauf der drei Linien ohne Überschneidungen, da keine Wechselwirkung der Faktoren („Messtag“ und „Zellkulturzusatz“) bestanden. Zellkulturzusatz und Messtag zusammen schienen also keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung zu haben. Jeder der beiden Faktoren für sich betrachtet, hatte allerdings allein einen Einfluss auf das Messergebnis. Weiterhin wird deutlich, dass trotz unterschiedlich großer geschätzter Randmittel für die Ergebnisse an den verschiedenen Messtagen, der Caspase-4-Inhibitor und der Pan-Caspase-Inhibitor an jedem Messtag den nahezu gleichen Effekt auf die Zellkultur und damit die Caspase-4-Aktivität ausübten.

4.2.3 Ergebnisse für die Zelllysate

Aus den Zellkulturansätzen zur Bestimmung der Caspase-4-Aktivität durch Messung der AFC-Konzentration im Zellkulturüberstand (Ergebnisse siehe 4.2.2) wurde auch die AFC-Konzentration in den dazugehörigen Zelllysaten bestimmt, also der AFC-Anteil, der in der Zelle nach Katalyse durch die Caspase-4 verblieb und nicht in den Zellüberstand diffundiert. Hierfür wurden die Zellen nach Abnahme des Zellkulturüberstands geerntet und lysiert. In dem entstandenen Proteinisolat wurde die AFC-Konzentration bestimmt. Der Unterschied zu konventionellen indirekten Caspase-Assays bestand darin, dass die Zellkultur mit Caspase-4-Substrat, -Inhibitor und Pan-Caspase-Inhibitor inkubierte und nicht erst deren Zelllysate. Ziel sollte es sein, herauszufinden, wie viel AFC nach katalytischer Abspaltung vom Tetrapeptid in der Zelle verbleibt und wie Durchführbarkeit und Handhabung dieser Zellyse zu beurteilen sind. Die statistische Auswertung erfolgte auch hierbei mit der zweifaktoriellen univariaten Varianzanalyse durch das allgemeine lineare Modell. Untersucht wurde der Einfluss der Behandlung der JEG-3-Zellkultur mit folgenden Zellkulturzusätzen:

- Caspase-4-Substrat oder

- Caspase-4-Substrat und Caspase-4-Inhibitor oder
- Caspase-4-Substrat und Pan-Caspase-Inhibitor

und der Einfluss des jeweiligen Messzeitpunktes (Messung am 1. Tag vs. 2. Tag vs. 3. Tag vs. 4. Tag) auf das Messergebnis (AFC-Konzentration in pmol/ml) im Zellkulturüberstand (siehe 4.2.2) und dem dazugehörigen Zelllysate. Es handelt sich hierbei um eine zweifaktorielle Varianzanalyse bestehend aus dem dreifach abgestuften Faktor „Zellkulturzusatz“ und dem vierfach abgestuften Faktor des Messzeitpunktes. Gemessen wurde auch hier die Konzentration an freiem AFC in pmol/ml als abhängige Variable. Anhand des gesättigten Modells wurde neben allen Haupteffekten (Einfluss der Zellkulturzusätze und Einfluss des Messzeitpunktes) auch die Wechselwirkung zwischen den Faktoren berechnet.

Um das Modell zu überprüfen, wurden somit für die Zelllysate folgende Daten an den vier verschiedenen Messtagen und für die drei verschiedenen Zellkulturzusätze erhoben (siehe Tabelle 4.2):

Tabelle 4.2: AFC-Konzentration der Zelllysate für die drei verschiedenen Zellkulturzusätze an den vier verschiedenen Messzeitpunkten. Aufgeführt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichungen der gemessenen AFC-Konzentrationen in pmol/ml der Versuchsansätze an den jeweiligen Messtagen (entweder n = 2 oder 3 Versuchsansätze pro Tag) in Abhängigkeit vom Zellkulturzusatz.

Zellkulturzusatz	Messzeitpunkt	Mittelwert	Standardabweichung	n
Caspase-4-Substrat	1. Messtag	216,51	17,94	2
	2. Messtag	307,26	18,61	3
	3. Messtag	235,13	103,17	3
	4. Messtag	241,48	52,69	3
Caspase-4-Substrat + Caspase-4-Inhibitor	1. Messtag	201,19	37,05	2
	2. Messtag	212,25	22,75	3
	3. Messtag	194,34	58,94	3
	4. Messtag	163,39	30,27	2
Caspase-4-Substrat + Pan-Caspase-Inhibitor	1. Messtag	149,41	6,76	2
	2. Messtag	135,06	34,27	3
	3. Messtag	137,44	33,58	2
	4. Messtag	91,56	13,52	3

Bei Betrachtung der gemessenen AFC-Konzentrationen in den Zelllysaten wird auch hier ersichtlich, dass an allen vier Messtagen die höchsten Werte in den Zellkulturansätzen ohne Inhibitor-Zusatz erreicht wurden. Die Wirkung des Caspase-4-Inhibitors und des Pan-Caspase-Inhibitors war dementsprechend auch in den Zelllysaten eine reduzierende auf die Höhe der AFC-Konzentration. Nach Vorbehandlung der JEG-3-Zellen mit einem Pan-Caspase-Inhibitor wurden die AFC-Konzentrationen an allen vier „Messtagen“ deutlicher reduziert, als durch Vorbehandlung mit dem Caspase-4-Inhibitor. Die Reduktion durch die beiden Inhibitoren fiel jedoch an allen vier Messzeitpunkten unterschiedlich stark aus. So war der reduzierende Effekt durch den Caspase-4-Inhibitor an Messtag 1 am geringsten. Die Mittelwerte der gemessenen AFC-Konzentrationen bei identischem Zellkulturzusatz an den verschiedenen Messtagen variierten jedoch im direkten Vergleich.

Die Varianzanalyse, welche nach dem allgemeinen linearen Modell berechnet wurde, zeigte für die Zelllysate, dass der „Zellkulturzusatz“ einen signifikanten Einfluss auf das Messergebnis hatte ($p = 0,00$). Der Faktor „Messtag“ besaß bei den Zelllysaten keinen signifikanten Einfluss ($p = 0,188$). Die Signifikanz für die Interaktion zwischen Zellkulturzusatz und Messzeitpunkt lag mit 0.656 über dem Signifikanzniveau von 0.05. Dies deutete daraufhin, dass der Zellkulturzusatz und der jeweilige Messzeitpunkt zusammen keinen signifikanten Einfluss auf die AFC-Konzentration in den Zelllysaten hatten.

Der Homogenitätstest nach Levene auf Gleichheit der Varianzen ergab mit 0,075 ein signifikantes Ergebnis ($p = 0.1$), so dass folglich keine Varianzhomogenität gegeben war. Als Post-hoc-Test für Mehrfachvergleiche wurde der LSD-Test angewendet. Die mittlere Differenz der Messergebnisse für die Zellkulturansätze mit den verschiedenen Zusätzen: „Caspase-4-Substrat“, „Caspase-4-Substrat und Caspase-4-Inhibitor“, sowie „Caspase-4-Substrat und Pancaspase-Inhibitor“ war stets signifikant. Die mittlere Differenz der Messergebnisse für den Zellkulturzusatz „Caspase-4-Substrat“ mit dem Zellkulturzusatz „Caspase-4-Substrat und Pancaspase-Inhibitor“ war sogar hoch signifikant ($p = 0,000$). Der Mehrfachvergleich der Messtage ergab zum größten Teil keine signifikanten Ergebnisse. Lediglich die mittlere Differenz der Messergebnisse vom 2. zum 4. Tag ergaben einen signifikanten Unterschied ($p = 0,033$).

Zusammenfassend zeigten die Resultate für die AFC-Konzentrationen, die in den Zelllysaten der JEG-3-Zellen bestimmt wurden, an den vier Messstagen ebenfalls die gleiche Tendenz, dass der Pancaspase-Inhibitor die AFC-Konzentration deutlicher senkt, als der spezifische Caspase-4-Inhibitor. Folglich besaß der Faktor „Zellkulturzusatz“ einen Einfluss auf die AFC-Konzentration. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für die dazugehörigen Zellkulturüberstände zeigte jedoch der reduzierende Effekt an allen Messstagen eine unterschiedliche Ausprägung. Dies soll Abbildung 4.5 verdeutlichen:

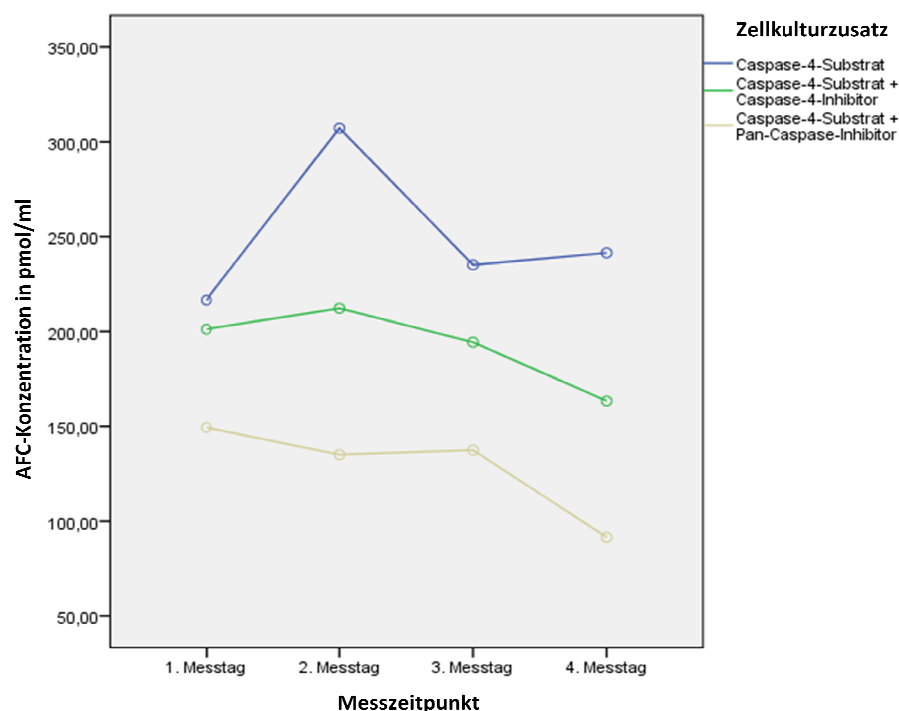


Abbildung 4.5: AFC-Konzentration für die JEG-3-Zelllysate in pmol/ml. Das Liniendiagramm zeigt die verschiedenen geschätzten Randmittel der Messergebnisse der AFC-Konzentrationen für die Proteinisolate der JEG-3-Zellkulturen mit den drei jeweils verschiedenen Zellkulturzusätzen an vier verschiedenen Messzeitpunkten.

Dargestellt sind die geschätzten Randmittel der AFC-Konzentrationen in pmol/ml in den Zelllysaten der Zellkulturansätze mit verschiedenen Zellkulturzusätzen. Die obere Linie (blau) repräsentiert AFC-Konzentrationen in den Zelllysaten, wenn ausschließlich Caspase-4-Substrat zur Zellkultur gegeben wurde, die mittlere Linie (grün) zeigt die Ergebnisse der Messungen nach zusätzlicher Behandlung mit einem Caspase-4-Inhibitor und die untere Linie (gelb) steht für die AFC-Konzentrationen nach

Hinzugabe eines Pan-Caspase-Inhibitors. An jedem der vier Messtage wurden die höchsten geschätzten Randmittel der AFC-Konzentrationen in den Zellkulturansätzen mit Caspase-4-Substrat ohne Inhibitor-Zusatz erreicht. Auch wurde an jedem der vier Messzeitpunkte durch den Pan-Caspase-Inhibitor eine deutlichere Reduktion der AFC-Konzentration als durch den Caspase-4-Inhibitor bewirkt. Im Gegensatz zur Abbildung 4.4 zeigen die Linien keinen parallelen Verlauf. Überschneidungen sind jedoch auch hierbei nicht ersichtlich. Dies bedeutet zum einen, dass die Zellkulturzusätze an jedem Messtag einen unterschiedlich starken Einfluss auf die AFC-Konzentration hatten und die einzelnen Messtage untereinander nicht vergleichbar sind. Zum anderen hatten auch hier Zellkulturzusatz und Messtag zusammen keinen Einfluss auf die Ergebnisse der AFC-Konzentrationsbestimmung. Es spielte zwar auch hier eine Rolle, an welchem Tag wir die Messung durchführten, folglich welche Passage der JEG-Zellkultur verwendet wurde, aber der reduzierende Effekt durch die Inhibitoren war an allen vier Tagen, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung, ersichtlich. Denn auch hier deutete sich an, dass die „Grundaktivität“ der Caspase-4 an den vier Tagen unterschiedlich ausgeprägt war. Ob die unterschiedlich ausfallende Wirkung der Inhibitoren auf die AFC-Konzentration in den Lysaten ein Problem der Probenvorbereitung war, soll an anderer Stelle diskutiert werden.

4.2.4 Vergleich der AFC-Konzentrationsbestimmung in Zellkulturüberständen und den dazugehörigen Zelllysaten

Bei der in dieser Arbeit diskutierten neuen direkten Herangehensweise an die Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 sollte gezeigt werden, dass man einen Rückschluss auf die Aktivität ziehen kann, wenn man die AFC-Konzentration im Überstand einer Zellkultur bestimmt, wenn diese zuvor mit dem Caspase-4-Substrat bzw. Caspase-Inhibitoren behandelt wurde. Ein Vergleich der direkten und indirekten Caspase-Aktivitätsmessung an einer gemeinsamen Zellkultur ist nicht möglich, da Zellen, die bereits mit dem Caspase-4-Substrat behandelt wurden, nicht erneut nach dem Schritt der Zellyse und Proteinisolation zur Behandlung mit dem Caspase-4-Substrat in Frage kommen.

An dieser Stelle sollte der Anteil des freigesetzten AFC im Zellkulturüberstand und dem dazugehörigen Lysat der Zellen bei der direkten Caspase-Aktivitätsmessung in

der JEG-3-Zellkultur, wenn diese zuvor mit Caspase-4-Substrat und Caspase-4-Inhibitor behandelt wurde, untersucht werden (auf die Behandlung der Zellen mit einem Pancaspase-Inhibitor wurde an dieser Stelle verzichtet). Die Gegenüberstellung sollte Auskunft über die Fehlerquellen bei der Probenvorbereitung, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Verteilung des AFC nach katalytischer Spaltung auf Zellkulturüberstand und Zelllysat geben.

Die Versuchsdurchführung entsprach der unter 3.6 beschriebenen Methode. Hierfür wurden JEG-3-Zellen in je zwei Kulturbereiche einer 6-Well-Zellkulturplatte gegeben. Dann wurde entweder nur Caspase-4-Substrat zu den Zellen gegeben, oder zuvor der Caspase-4-Inhibitor, um die vorhandenen Caspasen zu hemmen. Anschließend bestimmten wir die AFC-Konzentration im Zellkulturüberstand und im Zelllysat, nachdem die JEG-Zellen geerntet und lysiert wurden. Dieser Versuchsansatz wurde dreimal wiederholt. Es wurden immer JEG-3-Zellen der gleichen Passage verwendet. Abbildung 4.6 gibt einen Überblick über die Mittelwerte der erhobenen AFC-Konzentrationen in den Überständen (dunkelblau) und Lysaten (hellblau).

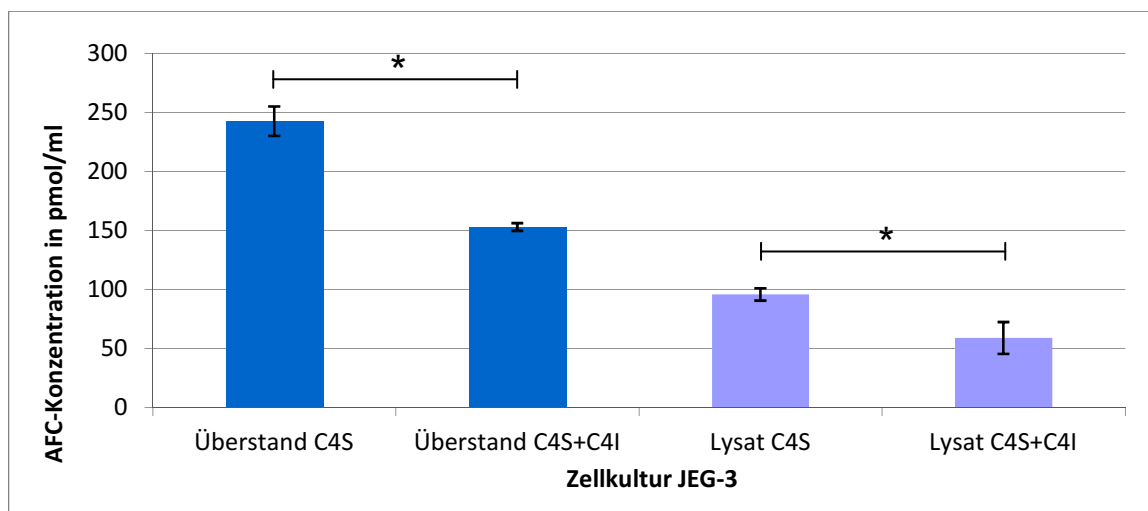


Abbildung 4.6: Bestimmung der AFC-Konzentrationen im Überstand und im dazugehörigen Lysat einer Zellkultur von JEG-3 nach Behandlung der Zellen mit Caspase-4-Substrat und -Inhibitor. Die Säulen stellen die Mittelwerte der AFC-Konzentrationen in pmol/ml des Überstands (dunkelblaues Säulenpaar) und dem dazugehörigen Zelllysat (hellblaues Säulenpaar) dar. Die linke Säule beider Säulenpaare zeigt die Konzentration an freiem AFC im Überstand und Lysat von Zellen, die nur mit Caspase-4-Substrat behandelt wurden. Die rechte Säule beider Säulenpaare zeigt die Konzentration an freiem AFC im Überstand und Lysat einer Zellkultur, die zusätzlich mit Caspase-4-Inhibitor behandelt wurde. Die Säulen zeigen Mittelwerte von jeweils drei Zellkulturansätzen mit den dazugehörigen Standardabweichungen, sowie relevante Signifikanzen (t-Test, $p < 0,05$). Abk.: C4S: Caspase-4-Substrat, C4I: Caspase-4-Inhibitor. $n = 3$ unabhängige Versuche.

Es kommt zur Darstellung, dass sich die gemessenen Konzentrationen von freiem AFC mit Angabe in pmol/ml zwischen dem Zelllysate und dem dazugehörigen Zellkulturüberstand unterschieden. Die AFC-Konzentration im Zellkulturüberstand war ca. 2,5 fach größer im Vergleich zum jeweiligen Zelllysate der aufbereiteten Zellen (siehe Abbildung 4.6). Der reduzierende Effekt auf die Konzentration von freigesetztem AFC durch den Caspase-4-Inhibitor war in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten vergleichbar und statistisch signifikant.

Betrachtet man die Säulenpaare in Abbildung 4.6 für den Zellkulturüberstand „dunkelblau“ und das dazugehörige Zelllysate „hellblau“ der JEG-3-Zellen, kann eine Reduktion der absoluten AFC-Menge pro Versuchsansatz durch eine zusätzliche Caspase-4-Inhibitorbehandlung vor der eigentlichen vierstündigen Substratinkubation um den Faktor 1,6 sowohl im Überstand, als auch im dazugehörigen Lysate verzeichnet werden.

Da die Handhabung der Zellkulturüberstände in der Probenvorbereitung deutlich einfacher war als die der Zelllysate, war die Tatsache, dass der größte Teil des freigesetzten AFC in den Zellkulturüberstand diffundiert, sehr interessant. Das Kreisdiagramm in Abbildung 4.7 soll verdeutlichen, dass sich die größte Menge an AFC im Überstand einer Zellkultur befindet, nachdem das Caspase-4-Substrat in der Zelle umgesetzt und AFC freigesetzt wurde, welches in den Überstand diffundierte. Die Abbildung soll verdeutlichen, dass lediglich ca. ein Fünftel des freigesetzten AFC in den Zellen verbleibt. Der weitaus größere Anteil des freien AFC befindet sich im Zellkulturüberstand (43%) aus dem es auch bestimmt werden kann. Der Anteil des Blindwerts (38%) muss berücksichtigt und abgezogen werden.

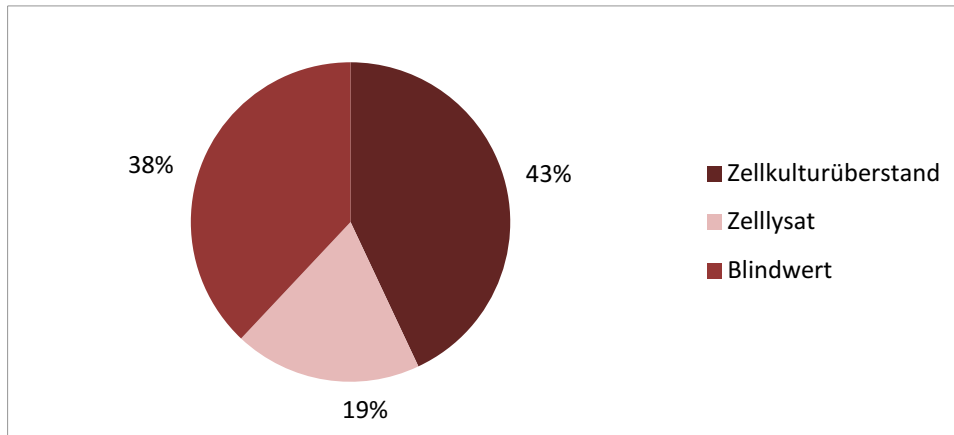


Abbildung 4.7: Verteilung des freien AFC nach erfolgter enzymatischer Umsetzung des Caspase-4-Substrats auf den Zellkulturüberstand und das Zelllysat von JEG-3 unter Berücksichtigung des Blindwerts. Das Kreisdiagramm zeigt die prozentualen Anteile an der Gesamtmenge von freigesetzten AFC in einem Versuchsansatz (entsprechend einem Well einer 6-Well-Zellkulturplatte) nach dem die Zellen mit Caspase-4-Substrat behandelt wurden.

4.3 Vergleich der direkten und indirekten Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 einer JEG-3-Zellkultur

Sobald Zellen einer JEG-3-Zellkultur mit einem Caspase-4-Substrat oder –Inhibitor vorbehandelt sind, ist eine Durchführung einer indirekten Caspase-4-Aktivitätsmessung auf Grundlage eines Zelllysats der gleichen Zellen nicht mehr möglich. Wie bereits erwähnt ist eine Gegenüberstellung beider Herangehensweisen nur möglich, wenn zwei getrennte Versuchsansätze verwendet werden. Wir führten mit JEG-3-Zellen der gleichen Passage zum einen eine direkte Caspase-4-Aktivitätsmessung durch, wie unter 3.6 beschrieben. Die Zellen wurden entweder mit Caspase-4-Substrat oder mit Caspase-4-Substrat und Caspase-4-Inhibitor behandelt. Anschließend bestimmten wir im Zellkulturüberstand und im Zelllysat die AFC-Konzentration. Zudem nutzten wir die Zellen der gleichen Passage für den bereits von Koehn et. al. beschriebenen indirekten Caspase-4-Assay (Koehn et al. 2008) mit den von uns beschriebenen optimierten HPLC-Messbedingungen. Hierfür wurden Zellen einer JEG-3-Zellkultur lysiert. Das entstandene Proteinisolat wurde in einer gepufferten Lösung mit Caspase-4-Substrat oder Caspase-4-Substrat und Caspase-4-Inhibitor behandelt. Nach Beendigung der Reaktion wurde in den Proben AFC

chromatographisch aufgetrennt und die Konzentration mittels Fluoreszenzdetektor bestimmt. Beide Versuchsansätze wurden parallel dreifach durchgeführt und an einem anderen Tag erneut dreifach wiederholt, allerdings mit einer älteren Passage der JEG-3-Zellen. Die Mittelwerte der erhobenen Ergebnisse zeigt Abbildung 4.8:

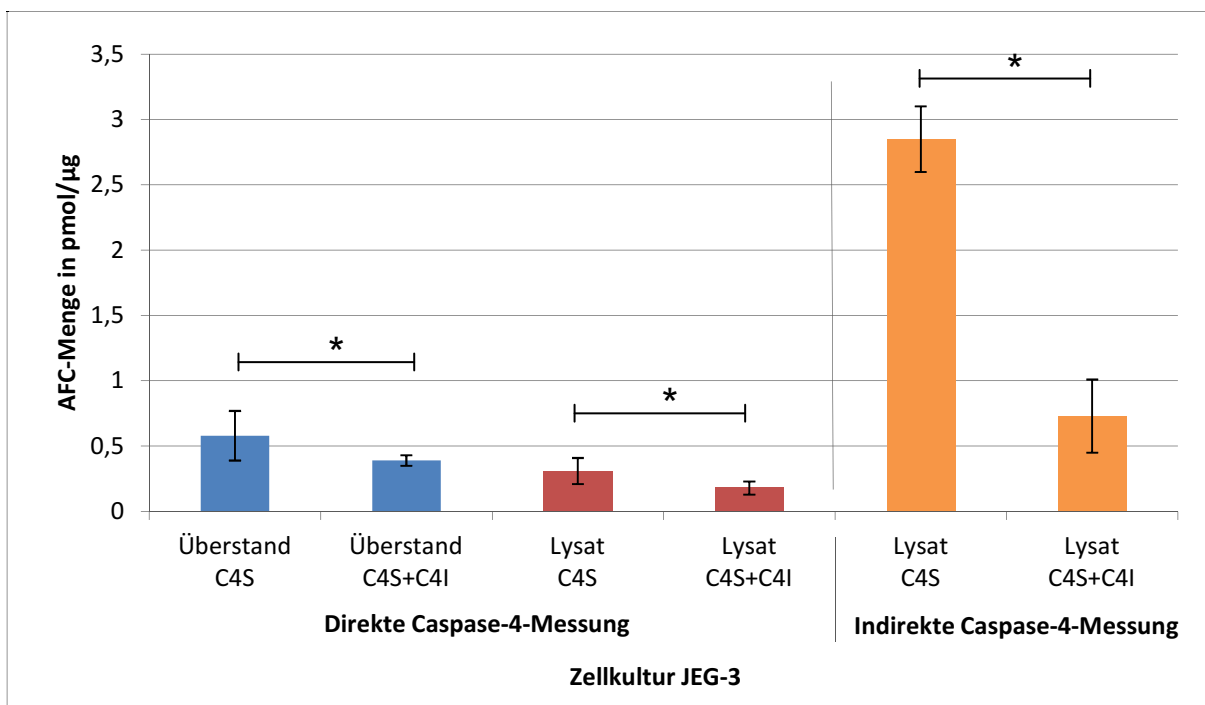


Abbildung 4.8: Vergleich der freigesetzten Menge an AFC bezogen auf den Proteingehalt einer Zellkultur JEG-3 in pmol/µg. Das linke Säulenpaar („blau“) zeigt die Menge AFC in pmol/µg des Zellkulturüberstands, das mittlere Säulenpaar („rot“) zeigt die AFC-Menge des Lysat der Zellkultur, die mit Caspase-4-Substrat bzw. Caspase-4-Substrat und -Inhibitor behandelt wurden (direkte Caspase-Aktivitätsmessung). Das rechte Säulenpaar („orange“) zeigt die AFC-Menge einer Zellkultur, dessen Proteinisolat erst mit Caspase-4-Substrat bzw. Caspase-4-Substrat und -Inhibitor inkubierte (indirekte Caspase-Aktivitätsmessung). Die Säulen zeigen Mittelwerte von jeweils sechs Zellkulturansätzen mit den dazugehörigen Standardabweichungen, sowie relevante Signifikanzen (t-Test, $p < 0,05$). Abk.: C4S: Caspase-4-Substrat, C4I: Caspase-4-Inhibitor, $n = 6$ Versuche.

Bezogen auf die Proteinmenge wird durch die indirekte Caspase-4-Aktivitätsmessung in der gleichen Passage der JEG-3-Zellen eine höhere Caspase-4-Aktivität gemessen, auch wenn ein Caspase-4-Inhibitor die Caspase-4-Aktivität hemmen sollte, im Vergleich zu dem Zellkulturüberstand und dem Zelllysate der JEG-3-Zellen, die direkt mit Caspase-4-Substrat behandelt wurden.

Beim Vergleich des Zellkulturüberstands und des Zelllysats bei der direkten Caspase-4-Messung überwiegt der AFC-Anteil pro µg Protein im Überstand den im Lysat.

Die Reduktion der AFC-Menge durch die vorherige Blockade der Caspase-4 durch den spezifischen Caspase-4-Inhibitor fällt bei der indirekten Messung deutlicher aus (auf 25%), bei der direkten Messung der Caspase-4-Aktivität bei Überstand und Ly-sat um ca. 1/3, jedoch immer signifikant.

4.4 Untersuchung von Fluoreszenzspektren

4.4.1 Ein Vergleich der Fluoreszenzspektren von Caspase-4-Substrat, freiem AFC und einem Gemisch beider Substanzen

Der in dieser Arbeit beschriebene Caspase-Assay beruht auf der Tatsache, dass das synthetische Caspase-4-Substrat (Ac-LEVD-AFC) nach enzymatischer Spaltung in der vitalen Zelle ein freies fluoreszierendes AFC generiert, das so mithilfe eines Fluoreszenzspektrometers nach chromatographischer Trennung von anderen fluoreszierenden Bestandteilen des Probengemisches in der RP-HPLC quantitativ bestimmt werden kann. Hierfür muss die für das AFC charakteristische Anregungs- und Emissionswellenlänge bekannt sein, da eine Messung am Fluoreszenzmaximum entscheidend wichtig ist, um eine genaue Detektion auch sehr geringer Mengen AFC zu gewährleisten. Die Herstellerangaben zu den Anregungs- und Emissionswellenlängen für das freigesetzte AFC werden zumeist mit 400 nm und 505 nm angegeben, die Emissionswellenlängen variieren aber bei der großen Anzahl an verfügbaren kommerziell erhältlichen Assay Kits von 480 - 520 nm.

Die Aufnahme der Fluoreszenzemissionsspektren der drei Substanzen sollte zur Klärung folgender Fragestellungen beitragen:

- Bei welcher Wellenlänge liegt das Fluoreszenzmaximum von AFC?
- Fluoresziert das unverdaute Caspase-4-Substrat?
- Wie stark fluoresziert das Caspase-4-Substrat im Bereich der vom Hersteller empfohlenen Emissionswellenlänge von 505 nm und stört damit die Detektion von AFC?

Die Abbildung 4.9 zeigt die aufgenommenen Fluoreszenzemissionsspektren von freiem AFC, Caspase-4-Substrat und dem Gemisch aus intaktem Caspase-4-Substrat und freiem AFC, werden alle drei Substanzen bei 400 nm angeregt. Das

Gemisch ist gleichzusetzen mit dem Zellkulturüberstand nach vierstündiger Inkubation mit Caspase-4-Substrat.

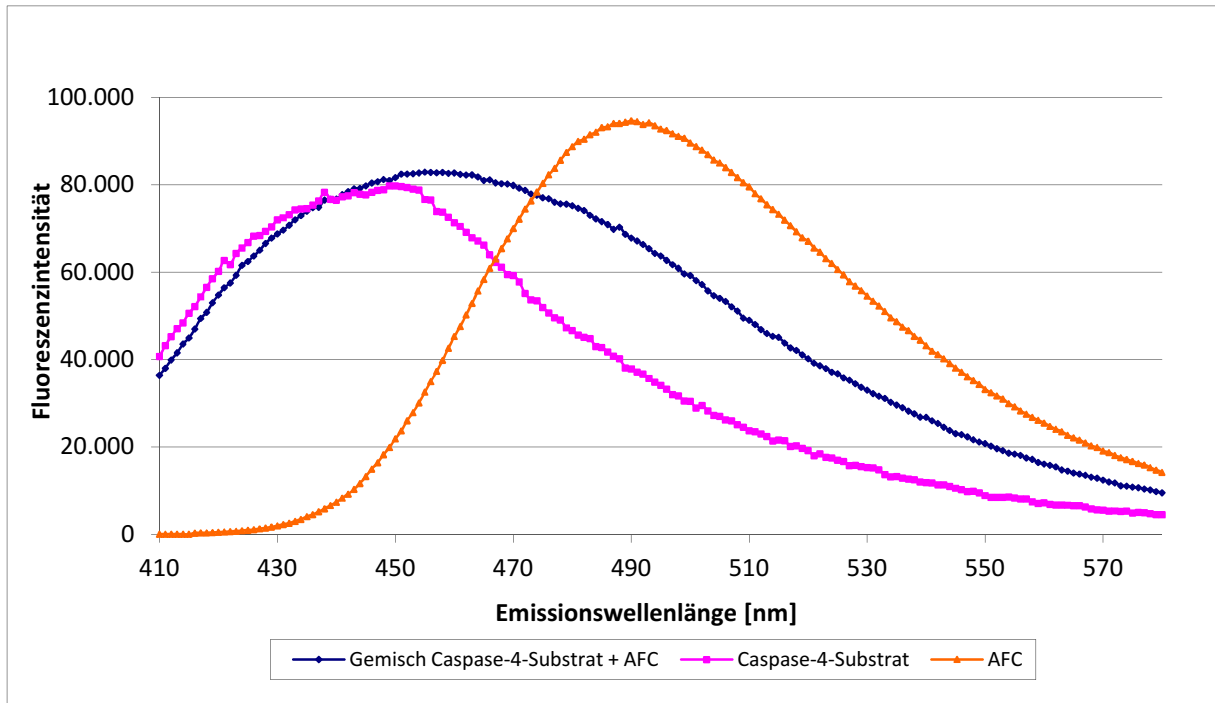


Abbildung 4.9: Fluoreszenzspektren von AFC, Caspase-4-Substrat und einem Gemisch aus Caspase-4-Substrat und AFC. Darstellung der aufgenommenen Fluoreszenz-emissionsspektren bei konstanter Anregungswellenlänge von 400 nm (Auftragung der Fluoreszenzintensität über der Wellenlänge). Die drei Kurven repräsentieren Emissionsspektren: Caspase-4-Substrat-AFC-Gemisch (blau), Caspase-4-Substrat (rosa), AFC-Standardlösung (orange).

Aus den Kurven wird ersichtlich, dass freies AFC ein größeres Fluoreszenzmaximum besitzt als die beiden anderen Verbindungen. Es fluoresziert maximal im Bereich von 490 nm, wird es bei 400 nm angeregt. Das intakte Caspase-4-Substrat und das Gemisch weisen jedoch ebenfalls eine Fluoreszenz auf, obwohl das AFC noch an das Tetrapeptid gebunden ist. Die Fluoreszenzmaxima der drei getesteten Ansätze unterscheiden sich. So fluoresziert freies AFC bei einer Wellenlänge von 490 nm maximal, das Caspase-4-Substrat bei 449 nm und das Gemisch bei 455 nm. Die Emissionsspektren aller drei Proben überlappen sich, insbesondere das Emissionsspektrum von AFC und unverdaulichem Caspase-4-Substrat. Die Fluoreszenz des Substrats bei der Wellenlänge von 505 nm entspricht 64% der Fluoreszenz des freien AFC bei dieser Wellenlänge. Bei 490 nm beträgt der Anteil 72%.

4.4.2 Erstellen von Kalibriergeraden und Messung von AFC-Standardlösungen bei verschiedenen Wellenlängen zur Bestimmung des Wellenlängenoptimums

Die Messung von Standardkonzentrationen des freien AFC dient der Computergestützten Datenauswertung. Da die optimale Detektionswellenlänge für AFC nicht bei 505 nm, wie von den Herstellern empfohlen, sondern bei 490 nm liegt, wurde das Fluoreszenzsignal von zehn verschiedenen Standardlösungen des AFC bei drei verschiedenen Wellenlängen aufgenommen, wie in Abbildung 4.10 dargestellt:

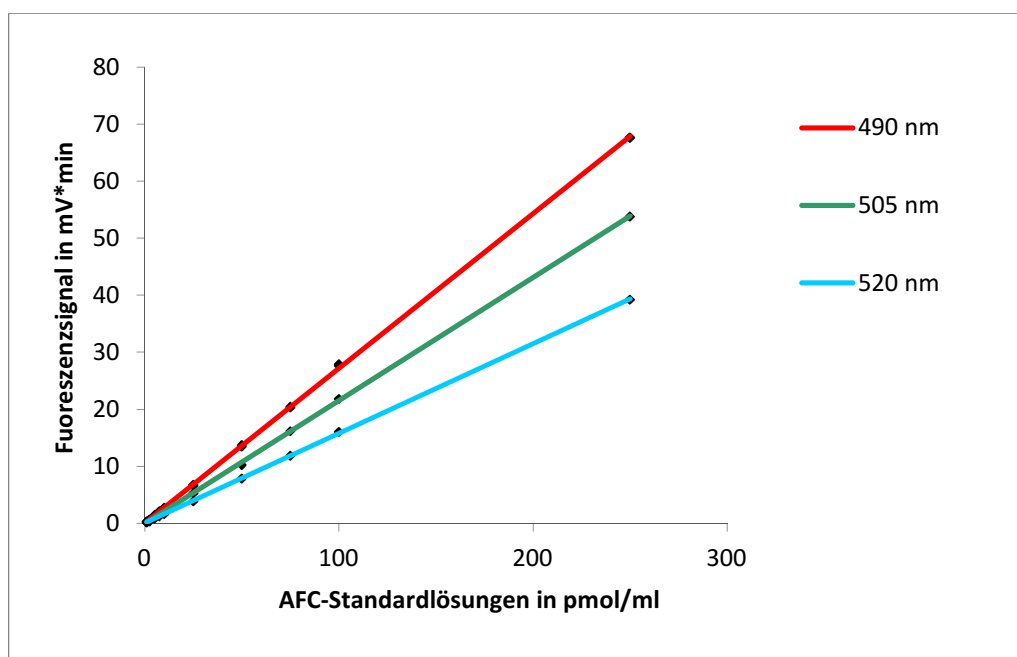


Abbildung 4.10: Kalibriergeraden der AFC-Standardlösungen. Gemessen wurde das Fluoreszenzsignal von AFC (mV*min) in den Standards mit den Konzentrationen 1 / 2,5 / 5 / 7,5 / 10 / 25 / 50 / 75 / 100 / 250 pmol/ml bei den Emissionswellenlängen 490 / 505 / 520 nm und konstanter Anregungswellenlänge von 400 nm. Mit jeder Standardlösung wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt

Die Kalibriergeraden der AFC-Standardlösungen haben ein Bestimmtheitsmaß von 0,99 und sind demzufolge hinreichend genau. Sie unterschieden sich lediglich in den Anstiegen. Beim Wellenlängenoptimum von 490 nm ist der Anstieg am größten (0,27). Bei 505 nm beträgt er 0,22 und bei 520 nm 0,16.

4.5 Untersuchung der Stabilität des Caspase-4-Substrats im Zellkulturüberstand bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen

Ziel dieses Versuchs sollte die Untersuchung der Stabilität von noch nicht enzymatisch umgesetztem Caspase-4-Substrat im Zellkulturüberstand bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen sein. Hierfür wurde, wie unter Punkt 3.10 erläutert, mit einer gepoolten Probe der Zellkulturüberstände gearbeitet. Der Zellkulturüberstand der JEG-3-Zellkulturen, die in sechs Kulturbereichen einer 6-Well-Kulturplatte wuchsen und für vier Stunden mit Caspase-4-Substrat inkubierten, wurde entnommen und zusammengeführt. Es wurden folglich die Zellkulturüberstände aus mehreren Zellkulturansätzen verwendet. Dieses Gemisch beinhaltete nicht umgesetztes Caspase-4-Substrat, freigesetztes AFC und AFC-gebunden an unterschiedlich lange Peptidfragmente. Das Vorgehen der Probenvorbereitung entsprach dem unter Punkt 3.6 beschriebenen Protokoll. Mit MeOH wurde die Reaktion gestoppt, die Proben ausgefällt und anschließend zentrifugiert.

Es sollten folgende Fragenstellungen geklärt werden:

- Über welchen Zeitraum ist intaktes Caspase-4-Substrat ohne Kühlung im Autosampler bei Raumtemperatur stabil?
- Wie relevant ist der nicht-enzymatische Zerfall des Substrats?
- Hat die unterschiedliche Lagerung der Zellkulturüberstände über einen längeren Zeitraum bei -20°C und bei -80°C einen Einfluss auf die Probenstabilität?
- Spielt die Häufigkeit des Einfrierens und Auftauens der Zellkulturüberstände beim nicht-enzymatischen Zerfall des Caspase-4-Substrats eine Rolle?

4.5.1 Lagerung des Zellkulturüberstands bei Raumtemperatur

Zunächst wurde die Stabilität des Caspase-4-Substrats im Zellkulturüberstand nach gestoppter enzymatischer Reaktion durch MeOH bei Raumtemperatur näher betrachtet. Da von einem nicht-enzymatischen Zerfall auszugehen war, sollte geprüft werden, wie lange die Proben im nicht gekühlten Autosampler stabil blieben. Es wurde im Zellkulturüberstand von JEG-3-Zellen, die für vier Stunden mit Caspase-4-Substrat inkubierten, die AFC-Konzentration nach Beendigung der Reaktion durch

MeOH nach 0 / 2 / 4 / 6 / 20 und 96 Stunden und Lagerung bei Raumtemperatur bestimmt. Zwei Versuchsreihen wurden durchgeführt und deren Mittelwerte berechnet.

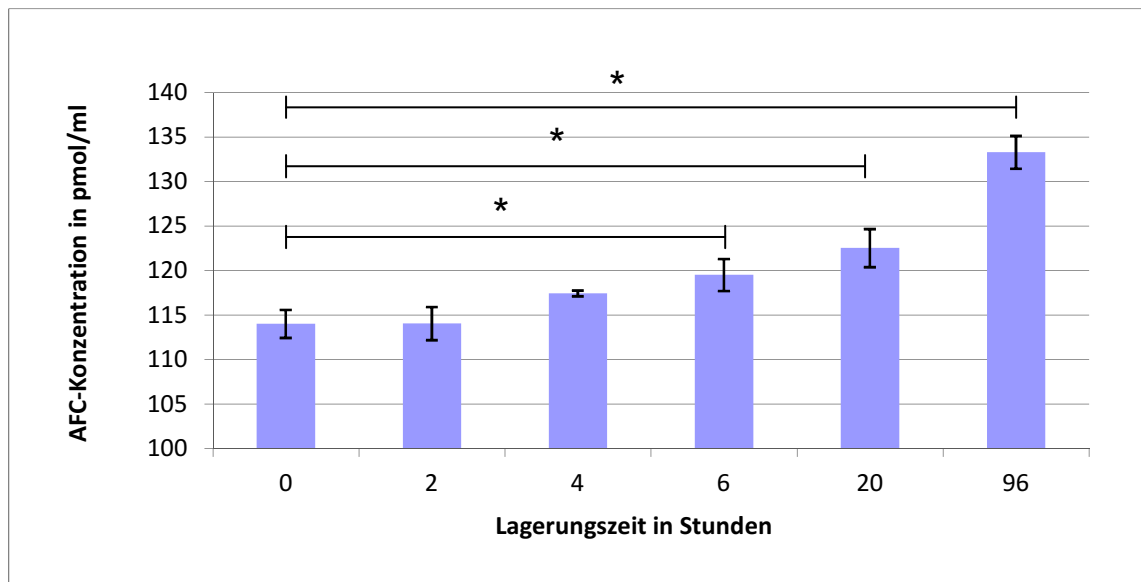


Abbildung 4.11: AFC-Konzentration in Zellkulturüberständen von JEG-3-Zellen bei Lagerung unter Raumtemperatur. Darstellung der AFC-Konzentration in pmol/ml in Abhängigkeit von der Lagerungszeit. Der Zellkulturüberstand stammt von JEG-3-Zellen, die für vier Stunden mit Caspase-4-Substrat inkubiert wurden. Nach Abnahme des Zellkulturüberstands wurde die Reaktion mit MeOH gestoppt und der Überstand wurde bei Raumtemperatur gelagert. An sechs verschiedenen Zeitpunkten (nach 0 / 2 / 4 / 6 / 20 und 96 Stunden) wurde die AFC-Konzentration quantifiziert. Dargestellt in den Säulen ist der Mittelwert aus zwei Versuchsansätzen und die dazugehörige Standardabweichung, sowie relevante Signifikanzen (t-Test, $p < 0,05$).

Es zeigte sich eine stetige Zunahme des freien detektierbaren AFC in den Zellkulturüberständen, werden diese bei Raumtemperatur gelagert (siehe Abbildung 4.11). Der zu verzeichnende Anstieg entstand durch eine nicht-enzymatische Umsetzung des Caspase-4-Substrats, da die Katalyse des Substrats durch intakte Caspase-4 nach Beendigung der Reaktion durch MeOH nicht mehr möglich war und der Überstand von den Zellen getrennt wurde. Die Zunahme während der gesamten Lagerungszeit von 96 Stunden betrug 14,5%. Ersichtlich ist, dass innerhalb der ersten zwei Stunden die gemessene AFC-Konzentration konstant blieb und folglich kaum ein Substraterfall zu registrieren war. Nach diesen zwei Stunden nahmen jedoch dieser nicht-enzymatische Zerfall und damit die Konzentration an freiem detektierbarem AFC stetig zu. Nach sechs Stunden kam es zu einer statistisch signifikanten Zunahme der AFC-Konzentration (t-Test, $p < 0,05$).

4.5.2 Vergleich der Lagerung des Zellkulturüberstands bei -20°C und -80°C

Da eine Lagerung bei Raumtemperatur nur über einen begrenzten Zeitraum keinen signifikanten Zerfall des Caspase-4-Substrats garantierte, war es interessant zu wissen, ob die Proben eingefroren werden können und zu einem späteren Zeitpunkt in diesen die AFC-Konzentration bestimmt werden kann, zum Beispiel bei einer großen Anzahl von zu messenden Proben, ohne dass ein signifikanter Anstieg der AFC-Konzentration durch nicht-enzymatische Spaltung ursächlich dafür war. Der Hersteller empfahl eine Lagerung von gelöstem Caspase-4-Substrat bei -20°C. Es wurden folglich fünf Proben des Zellkulturüberstands (entnommen von JEG-Zellen, die für vier Stunden mit Caspase-4 inkubierten, gestoppte Reaktion mit MeOH) bei -20°C und -80°C gelagert und darin nach 1 / 4 / 7 / 21 und 28 Tagen die AFC-Konzentration bestimmt. Jede der Proben wurde nur zu einem Zeitpunkt aufgetaut und darin die AFC-Konzentration quantifiziert. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde die AFC-Konzentration einer Probe des Zellkulturüberstands bestimmt, die nicht eingefroren wurde. Es gab zwei Messreihen. Die Mittelwerte der Messungen zeigt Abbildung 4.12:

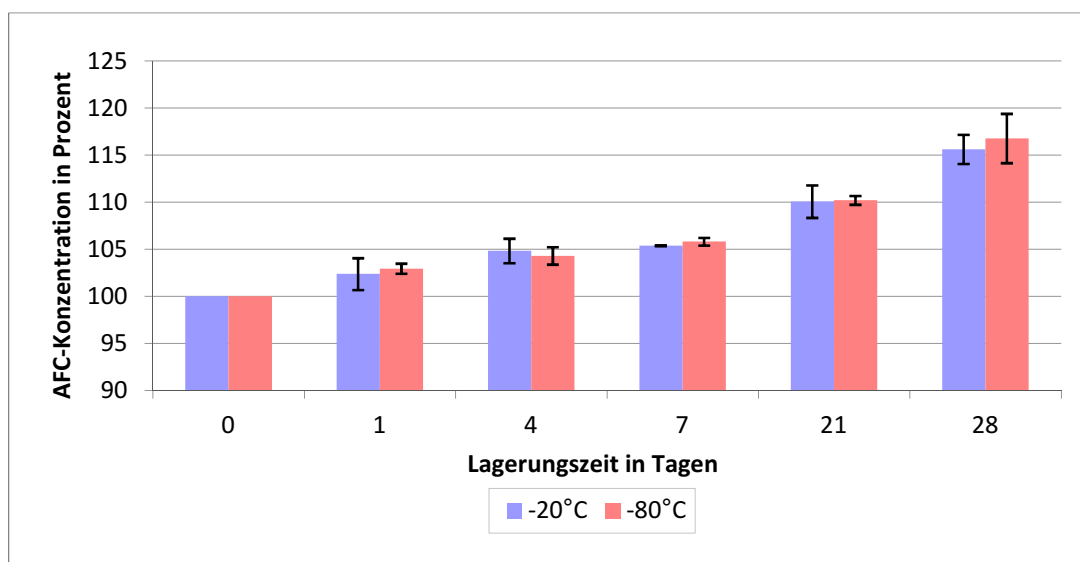


Abbildung 4.12: AFC-Konzentration bei Lagerung des Zellkulturüberstands bei -20°C und -80°C. Dargestellt ist die AFC-Konzentration in Prozent, wobei der Messwert zum Zeitpunkt $t = 0$ als 100% festgesetzt wurde. Es wurden jeweils fünf Proben des Zellkulturüberstands bei beiden Temperaturen gelagert und zu jedem Messzeitpunkt wurde eine dieser Probe aufgetaut und darin die AFC-Konzentration gemessen. Die Säulen zeigen die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichung. Zur besseren Übersicht wurden die Signifikanzen nicht eingezeichnet. Gemessen wurde zu sechs verschiedenen Zeitpunkten ($t = 0 / 1 / 4 / 7 / 21 / 28$ Tage), wobei die Probe, die an $t = 0$ bestimmt wurde, nicht eingefroren wurde. $n =$ zwei unabhängige Versuchsreihen.

Werden die Proben bei -20°C oder -80°C über 28 Tage gelagert, ist auch hierbei eine Zunahme der AFC-Konzentration, die nicht durch eine Caspase-4-Katalyse bedingt ist, zu verzeichnen. Zwischen den Ergebnissen mit Lagerung bei -20°C und bei -80°C besteht an den einzelnen Messzeitpunkten kein signifikanter Unterschied. Hingegen ist die Zunahme der AFC-Konzentration bei -20°C -Lagerung ab einer Lagerung von sieben Tagen signifikant und bei -80°C -Lagerung bereits ab dem ersten Tag, (t-Test, $p < 0,05$). Zur besseren Übersicht wurde auf die Darstellung der Signifikanzen in der Abbildung 4.12 verzichtet.

4.5.3 Einfluss wiederholter Temperaturänderungen auf die Stabilität des Caspase-4-Substrats im Zellkulturüberstand

Geprüft wurde zudem, welchen Einfluss wiederholter Temperaturänderungen, wie sie beim Einfrieren und Auftauen entstehen, auf die Zunahme der AFC-Konzentration haben. Untersucht wurde dies bei der Lagerung der oben beschriebenen Zellkulturüberstände, die noch unverdautes Caspase-4-Substrat enthielten bei -20°C und -80°C (siehe Abbildung 4.13 und 4.14). Hierfür wurden fünf Proben des Zellkulturüberstands bei beiden Temperaturen gelagert. In einer der Proben („blau“) wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ die AFC-Konzentration bestimmt. Diese wurde zu jedem der weiteren fünf Messzeitpunkte (nach 1 / 4 / 7 / 21 und 28 Tagen) aufgetaut und die AFC-Konzentration quantifiziert. Die nebenstehenden Säulen zeigen die quantitativ erfasste AFC-Konzentration für die Proben des Zellkulturüberstands, die erst zu späteren Messzeitpunkten aufgetaut wurden. Die Probe „rot“ wurde erst nach vier Tagen aufgetaut und dann wieder bei jedem weiteren Messzeitpunkt (nach 7, 21 und 28 Tagen). Die Messung der Probe „grün“ erfolgte erstmalig nach sieben Tagen und dann zu jedem der folgenden Messdurchläufe. Folglich wurde die Probe „violett“ nur zu den beiden letzten Untersuchungszeitpunkten quantifiziert und die Probe „orange“ wurde lediglich einmal nach vier Wochen aufgetaut und deren Konzentration an freiem AFC bestimmt. Dieser Versuchsdurchlauf wurde bei beiden Temperaturen zweimal durchgeführt. Abbildung 4.13 zeigt die Mittelwerte der Zellkulturüberstände, die bei -20°C gelagert wurden:

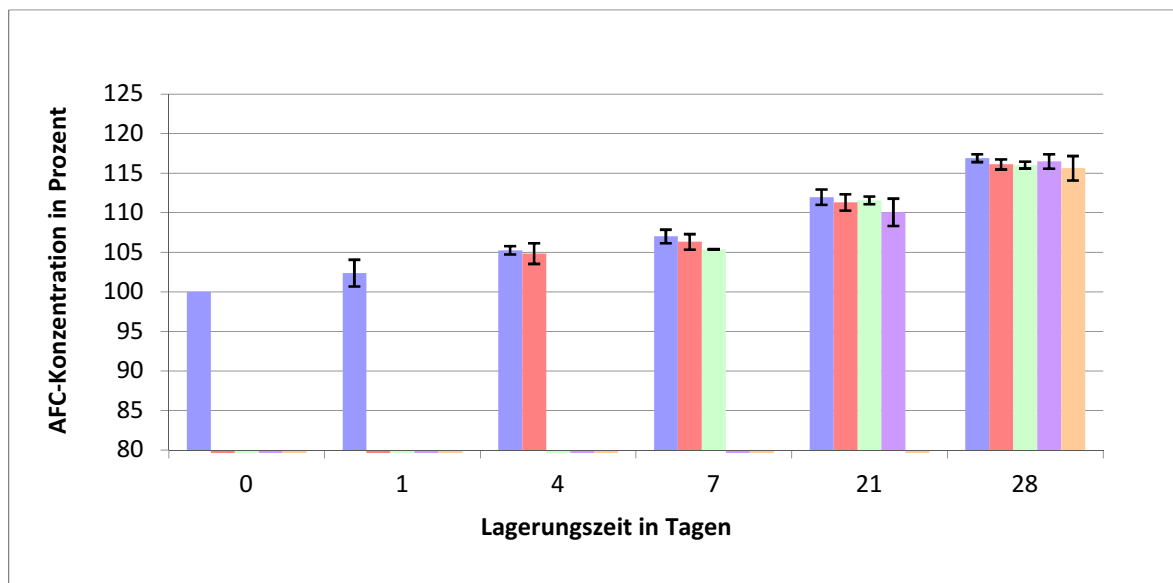


Abbildung 4.13: AFC-Konzentration der Zellkulturüberstände nach Lagerung bei einer Temperatur von -20°C und mehrfachem Einfrieren und Auftauen. Darstellung der AFC-Konzentration in Prozent der bei -20°C gelagerten Zellkulturüberstände, in Abhängigkeit von der Lagerungszeit, wobei der Messwert zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns ($t = 0$ Tage) als 100% festgesetzt wurde. AFC-Quantifizierung in der Probe „blau“: am 1.-6. Messzeitpunkt, Probe „rot“: am 3.-6. Messzeitpunkt, Probe „grün“: 4.-6. Messzeitpunkt, Probe „violett“: 5.-6. Messzeitpunkt, Probe „orange“: nur am 6. Messzeitpunkt. Die sechs Messzeitpunkte erfolgten nach 0 / 1 / 4 / 7 / 21 und 28 Tagen. Die Zellkulturüberstände wurden nach der Messung wieder eingefroren und am nächsten Messzeitpunkt erneut aufgetaut. $n = 2$ Versuchsreihe. Dargestellt sind der Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung.

Bei jeder Probe des Zellkulturüberstands, unabhängig von der Häufigkeit der Einfrierens und Auftauens, ist eine stetige Zunahme der AFC-Konzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum zu registrieren. Nach vier Tagen ist die Zunahme der AFC-Konzentration zwischen der zu diesem Tag erstmalig aufgetauten Probe des Zellkulturüberstands (rot) und der anderen Probe (blau), die bereits einmal mehr nach 24 Stunden aufgetaut wurde, nur minimal (0,43%). Nach sieben Tagen erbringt die Messung einen Unterschied der Probe „blau“ zur erstmalig an diesem Tag gemessenen Probe „grün“ von 1,64 %. Dieser Unterschied wird auch nach 21 Tagen mit 1,91 % („blau“ vs. „violett“) und am letzten Messzeitpunkt nach vier Wochen mit 1,27 % („blau“ vs. „orange“) nicht größer. Die mehrfach eingefrorenen und aufgetauten Proben zeigen eine etwas größere AFC-Konzentration, als die genauso lang gelagerten Proben, die jedoch seltener eingefroren und aufgetaut wurden.

Die Probe des Zellkulturüberstands „blau“, die zu allen Messdurchläufen aufgetaut wurde, zeigt nach vier Tagen und damit nach zweimaligem Auftauen einen signifi-

kanten Anstieg der AFC-Konzentration. Die Probe „rot“ des Zellkulturüberstands, in der nach vier Tagen die AFC-Konzentration quantifiziert wurde, zeigt nach sieben Tagen Lagerung und zweimaligem Auftauen eine signifikante Zunahme von freiem AFC. Die anderen Proben zeigen bereits nach dem ersten Auftauen einen signifikanten Anstieg der AFC-Konzentration im Vergleich zur Messung zum Zeitpunkt $t = 0$. Das bedeutet, das zweimalige Einfrieren und Auftauen zu einer signifikanten Zunahme der AFC-Konzentration führen oder eine Lagerung und erstmaliges Auftauen nach spätestens sieben Tagen. Zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten bestehen keine signifikanten Unterschiede in der AFC-Konzentration zwischen den einzelnen an diesem Tag quantifizierten Proben (t-Test, $p < 0,05$). Zur besseren Übersicht wurde auf die Darstellung der Signifikanzen in der Abbildung 4.13 verzichtet.

Werden die Zellkulturüberstände hingegen sogar bei -80°C gelagert, zeigt sich auch hier eine stetige Zunahme der AFC-Konzentration durch einen nicht-enzymatisch bedingten Zerfall des Caspase-4-Substrats (siehe Abbildung 4.14).

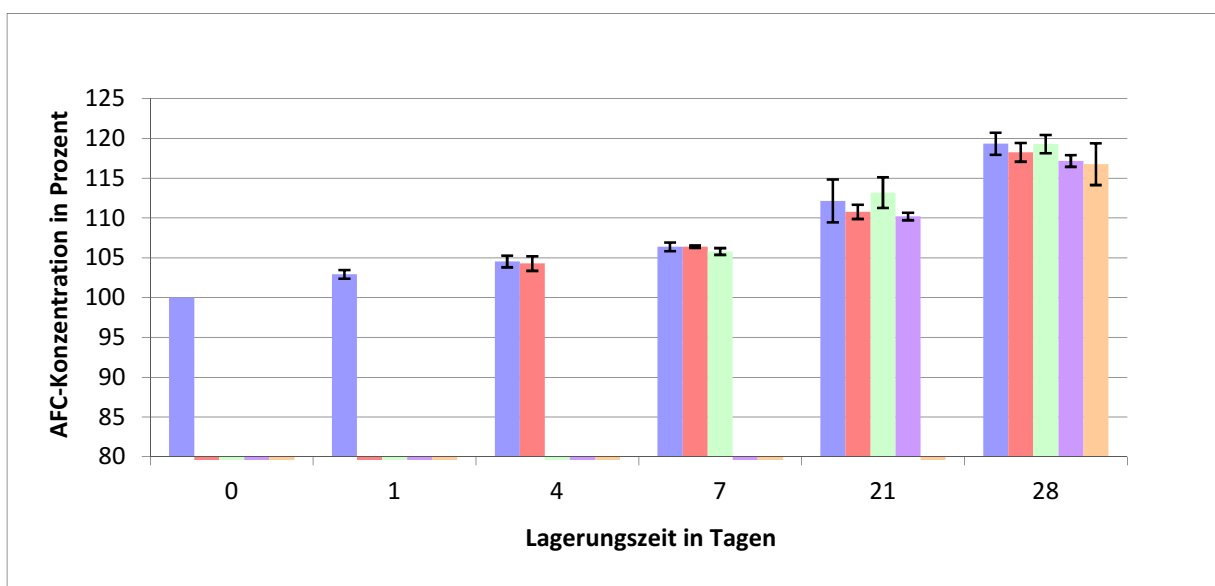


Abbildung 4.14: AFC-Konzentration der Zellkulturüberstände nach Lagerung bei einer Temperatur von -80°C und mehrfachem Einfrieren und Auftauen. Darstellung der AFC-Konzentration in Prozent der bei -80°C gelagerten Zellkulturüberstände, in Abhängigkeit von der Lagerungszeit, wobei der Messwert zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns ($t = 0$ Tage) als 100% festgesetzt wurde. AFC-Quantifizierung in der Probe „blau“: am 1.-6. Messzeitpunkt, Probe „rot“: am 3.-6. Messzeitpunkt, Probe „grün“: 4.-6. Messzeitpunkt, Probe „violett“: 5.-6. Messzeitpunkt, Probe „orange“: nur am 6. Messzeitpunkt. Die sechs Messzeitpunkte erfolgten nach 0 / 1 / 4 / 7 / 21 und 28 Tagen. Die Zellkulturüberstände wurden nach der Messung wieder eingefroren und am nächsten Messzeitpunkt erneut aufgetaut. $n = 2$ Versuchsreihen. Dargestellt sind der Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung.

Die Zunahme ist allerdings auch hier nur gering: 0,26% für die Messung nach vier Tagen („blau“ vs. „rot“), 0,57% für die Messung nach sieben Tagen („blau“ vs. „grün“), 1,96% am vorletzten Messzeitpunkt nach drei Wochen („blau“ vs. „violett“) und 2,56% am letzten Messdurchlauf nach vier Wochen („blau“ vs. „orange“).

Bei der -80°C-Lagerung zeigt sich bereits nach einmaligem Einfrieren und Auftauen, bzw. nach einem Tag Lagerung eine signifikante Zunahme der AFC-Konzentration in den Proben. Auch hier besteht innerhalb der Proben an den einzelnen Messtagen kein signifikanter Unterschied (t-Test, $p < 0,05$). Zur besseren Übersicht wurde auf die Darstellung der Signifikanzen in der Abbildung 4.14 verzichtet.

4.6 Einfluss von magnetischen Nanopartikeln auf das Fluoreszenzsignal von freiem AFC

Magnetische Nanopartikel finden in der heutigen biomedizinischen Wissenschaft eine zunehmende Anwendung, beispielsweise als Trägersubstanz in der Medikamentenapplikation und als Detektionsmittel in der Bildgebung.

Bekannt ist, dass magnetische Nanopartikel die Eigenschaft besitzen, Fluoreszenz in ihrem unmittelbaren Umfeld zu verändern. Hierbei handelt es sich um eine Fluoreszenzlöschung. Herrera et al. konnten zeigen, dass copolymerumhüllte Magnetit-Nanopartikel im Wasser fluoreszieren. Mit steigender Temperatur steigt diese Fluoreszenz in Dispersion an (Herrera et al. 2008).

Nanopartikel können nicht nur im gesamten Organismus verwendet werden, sondern auch auf Zellebene. Sie durchdringen die Zellmembran und können so für ein breites Anwendungsfeld der in-vitro-Forschung dienen. Wenn dann allerdings eine Messung der Zellmetaboliten mittels fluoreszenzbasierter Detektion erfolgt, ist es von Interesse zu wissen, ob dieses Signal durch sie verändert wird. Projekte, die zu diesem Zeitpunkt im Placenta-Labor durchgeführt wurden, untersuchten die Placentagängigkeit dieser magnetischen Nanopartikel. Weiterhin beschäftigten sich Arbeiten mit dem Verhalten der Zellinvasion von Trophoblastenzellen der Plazenta und damit verbundener Pathologien. Die Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 diente hierbei als Modell. Man konnte zeigen, dass nach Stimulation mit LIF (Leukaemia inhibitory Factor), einem Faktor, der die Trophoblastenproliferation, -migration und -invasion anregt, die

Expression der mRNA für Caspase-4 steigert. Eine Relevanz der Caspase-4 für die Fähigkeit der Chorionkarzinomzellen und Trophoblastzellen zur Invasion wurde angenommen (Fitzgerald et al. 2005).

Mit dem verwendeten Fluoreszenzphotometer misst man hinreichend genau in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen, so dass auch geringfügige Unterschiede gut quantifiziert werden können. So wurde der Einfluss der magnetischen Nanopartikel auf die Erfassung des fluoreszierenden AFC-Signals zweier Standardlösungen (10 und 100 pmol/ml) getestet (siehe Abbildung 4.15). Dieses wurde durch die magnetischen Nanopartikel etwas verstärkt. Bei einer Konzentration von 100 pmol/ml AFC sogar statistisch signifikant ($p=0,002$). Bei einem Zehntel dieser Konzentration zeigte sich keine statistisch signifikante Zunahme (t-Test, $p<0,05$). Es wurden für jede Konzentration drei Versuchsansätze durchgeführt.

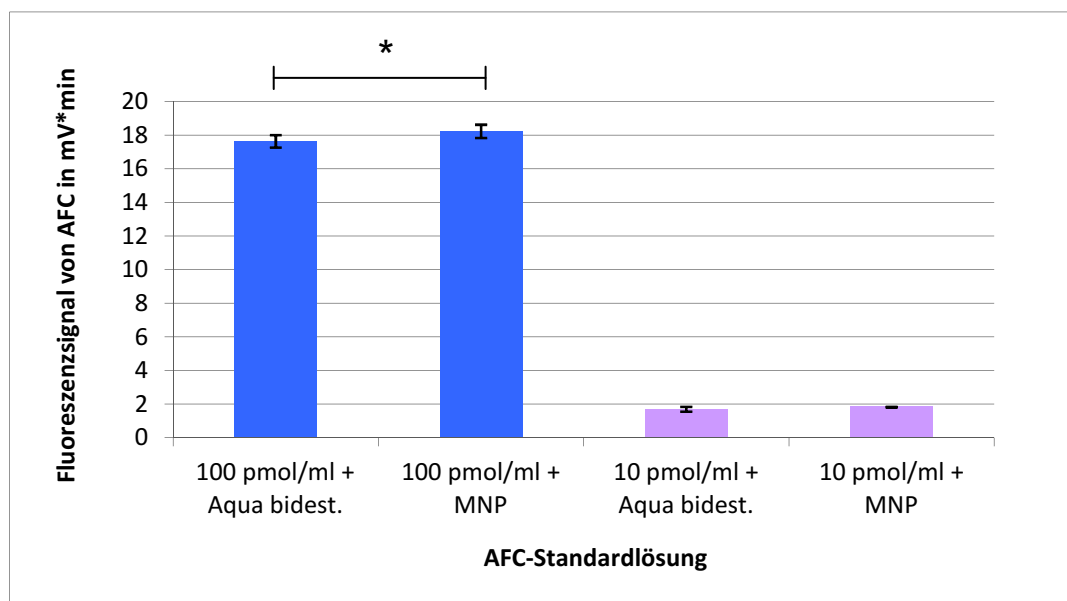


Abbildung 4.15: Einfluss der magnetischen Nanopartikel auf das AFC-Signal. Die Säulenpaare „blau“ und „lila“ zeigen das Fluoreszenzsignal (Fläche der Emission von AFC in mV*min) von AFC-Standardlösungen mit Konzentrationen von 100 pmol/ml und 10 pmol/ml. Die linke Säule des zeigt das Fluoreszenzsignal von freiem AFC, das mit bidest. Wasser als Blindwert inkubiert. Die rechte Säule repräsentiert das Ergebnis der Messung der mit Nanopartikeln behandelten AFC-Standardlösung. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie relevante Signifikanzen. $n = 3$ unabhängige Versuche. Abk.: BW: Blindwert, MNP: magnetische Nanopartikel.

5 DISKUSSION

5.1 Direkte Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 in der Zellkultur JEG-3 durch RP-HPLC

Caspasen sind Enzyme, die sowohl eine Rolle bei Apoptose und Inflammation spielen, als auch bei physiologisch ablaufenden Prozessen, wie der Zelldifferenzierung und Proliferation. Sie sind zentraler Forschungsschwerpunkt im Bereich maligner Erkrankungen, insbesondere weil man sich durch ein besseres Verständnis des Caspase-Metabolismus erhofft, Angriffspunkte für neue Medikamente zu finden. So überrascht es nicht, dass großes Interesse besteht, insbesondere deren Aktivität in bestimmten Zellen und Geweben bestimmen zu können. Hierfür steht eine Reihe an verschiedenen etablierten Caspase-Assays zur Verfügung, die wir in dieser Arbeit unter den indirekten Methoden zur Caspase-Aktivitätsmessung zusammenfassen. Für sie dient ein Proteinisolat der Zellen als Grundlage, die gegebenenfalls zuvor mit Apoptose auslösenden Stimulanzen behandelt werden. Erst dieses Zelllysate wird mit dem jeweiligen spezifischen Caspase-Substrat und Caspase-Inhibitor versetzt. Die Abläufe sind standardisiert und beinhalten eine definierte Zusammensetzung der benötigten Puffer. Die verfügbaren Kits enthalten das Substrat und oftmals auch die notwendigen Puffer, Inhibitoren und Zusätze, um die enzymatische Reaktion zu beenden. Gemessen wird dann die in einer bestimmten Zeit umgesetzte Menge des Substrats, beispielsweise durch Messung der Konzentration eines freigesetzten Fluorochroms, das an ein spezifisches Substrat gekoppelt ist und nach Einwirken der aktiven Caspase hydrolytisch abgespalten wird (Zapata et al. 1998). Die Bestimmung der Fluoreszenz erfolgt in den meisten Fällen durch einen Plattenreader, dessen Detektionswellenlänge so eingestellt sein muss, damit die Emissionswellenlänge des zu detektierenden Fluorochroms optimal erfasst wird (Talanian et al. 1997, Kaufmann et al. 2008).

Ziel dieser Arbeit war die direkte Bestimmung der Caspase-4-Aktivität auf Grundlage des Zellkulturüberstands am Beispiel der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3. Es sollte gezeigt werden, dass die Probenaufarbeitung, die sich zeitlich zwischen der Kultur der Zellen und der Detektion der durch die Caspasen im Proteinisolat umgesetzten Substrate befindet, deutlich verkürzt und vereinfacht werden kann. Hierfür wurde ei-

ne andere Herangehensweise an den Assay gewählt. Das von uns verwendete synthetische Caspase-4-Substrat besteht lediglich aus vier Aminosäuren und einem gekoppelten Fluorochrom, dem AFC. Unter der Voraussetzung, dass dieses Caspase-Substrat, problemlos die Zellmembran überwinden kann, gingen wir davon aus, dass eine Aktivitätsbestimmung daher auch direkt in der adhärent wachsenden Zellkultur JEG-3 möglich ist. Für nicht adhärent wachsende Zellen konnte dies bereits gezeigt werden (Mack et al. 2000, Tao et al. 2007). Hierfür wurde das Caspase-4-Substrat (Ac-LEVD-AFC) nicht erst zu den Zelllysaten gegeben, sondern direkt zur Zellkultur. Möglich machte dies die Membranpermeabilität des Substrats, welches in die Zellen diffundierte und dort von der aktiven Caspase-4 spezifisch hinter Aspartat an der P4-Position gespalten und umgesetzt wurde. Dadurch wurde AFC freigesetzt. Es ist ein Fluorochrom, das aufgrund seiner kleinen Größe und seines hydrophoben Charakters ebenfalls problemlos aus der Zelle in den Überstand diffundiert (Komoriya et al. 2000). Nach entsprechender Aufarbeitung konnte in diesem Zellüberstand mittels RP-HPLC das AFC zunächst von anderen fluoreszierenden und damit störenden Bestandteilen chromatographisch getrennt und anschließend quantitativ bestimmt werden. Ein nicht-membrangängiger Proteinase-Inhibitor schützte im Überstand vor einer ungewollten extrazellulären enzymatischen Umsetzung des Caspase-4-Substrats. Die chromatographische Auftrennung war von enormer Wichtigkeit, da die intakten Caspase-Substrate eine Autofluoreszenz besitzen und damit die Fluoreszenzbestimmung des abgespaltenen Fluorochroms, beispielsweise bei der Fluoreszenzmikroskopie, stören, trennt man die einzelnen Bestandteile nicht chromatographisch voneinander auf (Liu et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass das Caspase-4-Substrat bei einer Wellenlänge von 449 nm maximal fluoresziert, wenn es bei 400 nm angeregt wurde.

Betrachtet man die Literatur und die Herstellerhinweise zur genauen Verwendung des Caspase-4-Substrats, können keine genauen Angaben gefunden werden über die Zeit, die die adhärent wachsenden JEG-3-Zellen mit dem Substrat in Verbindung gebracht werden können, um eine ausreichend quantifizierbare Menge an AFC zu erhalten. Für nicht adhärent wachsende Zellen sollen schon 60 min zu messbaren Ergebnissen einer Caspase-3-Aktivität führen (Mack et al. 2000). Unter Verwendung einer rekombinanten Caspase-4 in Verbindung mit synthetisch hergestelltem Caspase-4-Substrat, sollte diese Zeitdauer genau festgelegt werden, um auf der einen Sei-

te eine ausreichende Zeit für eine Diffusion des Substrats in die Zelle, eine katalytische Umsetzung und die Diffusion des frei gewordenen AFC in den Überstand zu gewährleisten und auf der anderen Seite die Zellen dem in DMSO gelösten Substrat nicht zu lange auszusetzen. Bereits nach einem Sechstel des Beobachtungszeitraumes von 24 Stunden (nach 4-5 Stunden) wurde 50% des insgesamt umgesetzten AFC freigesetzt (siehe Abbildung 4.1). Innerhalb dieses Zeitraumes zeigte sich ein linearer Anstieg der Konzentration des freigesetzten AFC. So erschien eine Inkubationszeit von vier Stunden als angemessen, um gleichzeitig den eben angeführten Ansprüchen an den Versuch gerecht zu werden und eine gute Versuchsdurchführung zu gewährleisten. Durch diesen Versuch sollte keine Enzymkinetik mit Bestimmung der K_m -Werte erstellt werden, da diese in der Literatur bereits ausreichend beschrieben ist (Talanian et al. 1997).

Neben der Zeitdauer der Inkubation der Zellen mit dem Caspase-4-Substrat, stellte sich die Frage, wie hoch die Konzentration des Caspase-4-Substrats gewählt werden sollte, die zur JEG-3-Zellkultur gegeben werden kann. In der Literatur fanden sich auch hierzu keine genaueren Angaben. In einer Reihe von vorab durchgeführten Versuchen, deren Ergebnisse in dieser Arbeit nicht detailliert aufgeführt werden sollten, konnte gezeigt werden, dass die optimale Konzentration des Substrats in der Zellkultur bei 0,4 mM lag, so dass damit ein in der RP-HPLC gut quantifizierbares Signal erfasst werden konnte. In dem von Koehn et al. beschriebenen Versuchsansatz, in dem erst das Lysat der Zellen mit Caspase-4-Substrat inkubiert, wählte man die identische Konzentration an Caspase-4-Substrat, die zu den Lysaten gegeben wurde (Koehn et al. 2008). Nach der vierstündigen Inkubation der Zellen mit dem Caspase-4-Substrat und den Inhibitoren (Caspase-4-Inhibitor oder Pan-Caspase-Inhibitor) wurde der Überstand entnommen, zunächst zentrifugiert, um Zellen und Zellreste zu entfernen und anschließend wurde mit Methanol die enzymatische Reaktion beendet, um jegliche weitere Caspase-Aktivität zu unterbinden. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde in den Proben des Zellkulturüberstands AFC von den restlichen Probenbestandteilen chromatographisch durch die RP-HPLC getrennt und die Konzentrationen fluorimetrisch bestimmt. Die adhären wachsenden JEG-3-Zellen verblieben zunächst im Kulturbereich der Zellkulturplatten und wurden dann geerntet. Anschließend wurden daraus Proteinisolate gewonnen, in denen ebenfalls nach Ausfällung mit Methanol die AFC-Konzentration quantifiziert wurde. Die Ergeb-

nisse weisen darauf hin, dass die AFC-Konzentration im Überstand gesenkt werden konnte, wenn die Zellen zuvor mit einem spezifischen Caspase-4-Inhibitor behandelt wurden. Wurde den Zellen sogar ein Pan-Caspase-Inhibitor zugesetzt, sank die AFC-Konzentration noch deutlicher. Dies zeigte zum einen, dass beide Inhibitoren auch die Zellmembran überwinden können und zum anderen, dass an der Katalyse des Caspase-4-Substrats auch andere Caspasen beteiligt sein müssen.

Die Ergebnisse zeigen also, dass eine Bestimmung der Caspase-Aktivität aus dem Überstand möglich ist. Ziel war es, ausschließlich mit ihm als Probengrundlage zu arbeiten und auf eine Aufarbeitung der Zellen hin zu einem Lysat zu verzichten. Voraussetzung hierfür war jedoch, dass sich der Anteil des umgesetzten AFC, was in der Zelle verweilt und nicht nach extrazellulär diffundiert, möglichst gering war. Die Resultate der Messungen konnten zeigen, dass der Anteil an AFC, der in den Zellkulturüberstand diffundiert 2,5 fach und damit deutlich größer ist, als der Anteil, der intrazellulär verbleibt (siehe Abbildung 4.6). Auch bezogen auf die Proteinkonzentration der JEG-3-Zellen im Versuchsansatz zeigen die Zellkulturüberstände einen größeren AFC-Anteil, als die dazugehörigen Zelllysate (siehe Abbildung 4.8). Somit könnte auf die Probenaufarbeitung der Zellen, um den intrazellulären Anteil des freien AFC zu bestimmen, verzichtet werden. Jedoch ist eine Zellyse zur Bestimmung des Proteingehalts notwendig, um, wie in der Abbildung 4.8 dargestellt, die Konzentration des freigewordenen AFC in der JEG-3-Zellkultur darauf zu beziehen. Bezieht man die AFC-Konzentration nicht auf den Proteingehalt der lysierten Zellen, sondern auf die Zellzahl im Versuchsansatz, könnte möglicherweise komplett auf die Zellyse verzichtet werden, und somit die Probenvorbereitung noch mehr vereinfacht werden. In den Caspase-Assays mit indirekter Herangehensweise wird zumeist der gemessene Anteil der freigesetzten Fluorochroms auf den Proteingehalt der lysierten Zellen bezogen (Kaufmann et al. 2008) oder ausschließlich die Fluoreszenzintensität angegeben (Mack et al. 2000). Der Verzicht auf die Zellyse zur AFC-Konzentrationsbestimmung hätte nicht nur den zeitlichen Vorteil. In den Zelllysaten zeigten die Inhibitoren offensichtlich eine unterschiedlich starke Auswirkung auf die AFC-Konzentration und damit die Caspase-4-Aktivität. Sie erbrachten keine ähnlich gut reproduzierbaren Ergebnisse, wie die AFC-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen, wenn die Zellen mit Caspase-4-Substrat, dem Caspase-4-Inhibitor oder dem Pan-Caspase-Inhibitors behandelt wurden (Vergleich Abbildung 4.4 und 4.5). In

den Zellkulturüberständen variierte zwar die Grundaktivität der Caspase-4 in den JEG-3-Zellen (erkennbar an der unterschiedlich ausfallenden AFC-Konzentration der nur mit Caspase-4-Substrat behandelten Zellen, siehe Abbildung 4.4), der hemmende Einfluss durch die Inhibitoren an den vier Tagen war aber immer identisch und an jedem Tag in gleicher Ausprägung vorhanden, bezogen auf die AFC-Konzentration einer nur mit Caspase-4-Substrat behandelten JEG-3-Zellkultur. Diese Varianz bei den Ergebnissen der Zellysate ist möglicherweise auf ein Problem bei der Probenaufarbeitung zurückzuführen, z.B. auf einen nicht zu kalkulierenden Verlust des AFC bei den Zentrifugationen zur Zellyse.

Unter Verwendung einer Gradientenelution mit einem höheren Anteil an organischen Lösungsmitteln wurden die einzelnen fluoreszierenden Bestandteile der Probe (intaktes Caspase-4-Substrat und freies AFC) aufgetrennt. Daher konnten spitzere und besser zu integrierende Peaks generiert werden, die eine präzisere Bestimmung im niedrigen Konzentrationsbereich ermöglichten. Das Signal von freiem AFC und das Signal des Caspase-4-Substrats konnten somit noch besser getrennt werden, was bei einer fluorimetrischen Quantifizierung im Plattenreader nicht möglich ist. Denn hierbei findet keine chromatographische Auftrennung der beiden fluoreszierenden Bestandteile der Probe vor der eigentlichen Detektion statt, was somit zu einer Überlagerung beider Signale führt und damit die Bestimmung verfälschen kann. Denn wie in der Abbildung 4.9 dargestellt, überlagern sich die Emissionsspektren von AFC und dem Caspase-4-Substrat bei einer zumeist in den Plattenreadern eingestellten und vom Hersteller des Caspase-4-Substrats empfohlenen Detektionswellenlänge von 505 nm. Der höhere Anteil an organischen Lösungsmitteln hatte den weiteren Vorteil, dass Verunreinigungen leichter von der Säule gewaschen werden konnten, die ohnehin geringer waren im Vergleich zu der von Koehn et al. beschriebenen Probenvorbereitung, da wir alle Proben mit Methanol ausfällten und somit Proteine, die schwer von der Säule gewaschen werden konnten, gar nicht erst in das HPLC-System gelangten (Koehn et al. 2008). Somit erhöhte sich die Lebensdauer der Säulen enorm. Die präzisere Bestimmung auch sehr geringer AFC-Konzentrationen durch dieses Gradientensystem brachte jedoch eine Verlängerung der Elutionszeit von freiem AFC von 6,9 min auf 7,3 min mit sich. Auch die Zeit um das HPLC-System zu reequilibrieren, also Verunreinigungen nach einem Probendurchlauf von

der Säule zu entfernen, um weitere Messdurchläufe nicht zu stören, verdoppelte sich von 5 auf 10 min. Insgesamt war dies nachteilig zu bewerten, da für die Messung einer Probe 10 min für die eigentliche AFC-Bestimmung und weitere 10 min für die Reinigung der Säule gebraucht wurden. Im Vergleich zur Bestimmung der Fluoreszenz mit einem Plattenreader bei dem innerhalb kürzester Zeit und im Prinzip zeitgleich in 96 Proben problemlos die AFC-Signale bestimmt werden können, ist dies deutlich nachteilig für die von uns verwendete Installation des HPLC-Systems. Jedoch sind auch für ein HPLC-System Probenbereiche mit 96-Well-Platten-Einsätzen im Sinne eines Hochdurchsatz-Verfahrens verfügbar. Doch auch eine zeitgleiche Bestimmung aller Proben ist infolge der nötigen chromatographischen Auftrennung jeder einzelnen Probe nicht möglich.

Da es sich bei AFC um ein nach Abspaltung fluoreszierendes Coumarin handelte, erfolgte dessen Quantifizierung durch ein Fluoreszenzspektrometer. Die Art der Spektroskopie basiert auf dem Phänomen der Fluoreszenz. Hierbei wird nach Anregung eines Fluorophors spontan Licht emittiert, was zur Quantifizierung des jeweiligen Stoffes ausgenutzt wird. Die Fluorophore besitzen ein für sie charakteristisches Emissionsspektrum, wenn sie konstant bei einer Wellenlänge angeregt werden. Für die exakte Quantifizierung dieser Fluorophore ist es wichtig, das Fluoreszenzmaximum zu kennen, da dieses bei der fluoreszenzphotometrischen Bestimmung am Monochromator genau eingestellt werden kann. Die Aufnahme der Spektren in Abbildung 4.9 zeigt, dass das Fluoreszenzmaximum von freiem AFC bei 490 nm liegt, wenn es bei 400 nm angeregt wird. Vergleicht man die Empfehlungen der Hersteller zur einzustellenden Emissionswellenlänge, wird ersichtlich, dass für den Caspase-4-Assay mit Ac-LEVD-AFC als spezifisches Caspase-4-Substrat zumeist eine Emissionswellenlänge von 505 nm empfohlen wird (siehe Datenblatt (1) MP Biomedicals, Katalognummer AFC155). Für andere Caspase-Assays geben die Hersteller für die Emissionswellenlänge keine konkrete Emissionswellenlänge und oftmals eine Spannbreite von bis zu 40 nm an (siehe Datenblatt (2) BD Pharmingen, Materialnummer 556574). Für den Caspase-4-Assay bedeutet dies, dass hierbei nicht am Wellenlängenoptimum gemessen wird. Das Messen am Fluoreszenzmaximum gestattet es jedoch auch, Konzentrationen des AFC im sehr niedrigen Bereich quantitativ zu erfassen. Deshalb empfiehlt es sich, die Einstellung der Emissionswellenlänge des Fluoreszenzphotometers möglichst nahe an diesem Optimum vorzunehmen, weil

hierdurch die Varianz unter den Messergebnissen möglichst gering gehalten werden kann. Um dieses Optimum der Emissionswellenlänge zu finden, wurde bei einer konstanten Anregungswellenlänge von 400 nm die Fluoreszenzemissionsspektren von AFC, Caspase-4-Substrat und einem Gemisch beider Bestandteile aufgenommen. Aus den aufgenommenen Spektren (siehe Abbildung 4.9) wird ersichtlich, dass sich die Fluoreszenzspektren von AFC, Caspase-4-Substrat und dem Gemisch beider Substanzen, insbesondere beim Vergleich von AFC und intaktem ungespaltenen Caspase-4-Substrat, überschneiden. Diese Überlappung erlangt eine Bedeutung, wenn in der zu untersuchenden Probe (ob Zellkulturüberstand oder Zellysat) beide Bestandteile vorhanden sind und diese vor der fluorimetrischen Messung nicht chromatographisch aufgetrennt werden. Die Hersteller des Caspase-4-Substrats empfehlen zumeist die Fluoreszenz des AFC im Plattenreader zu bestimmen. Hierfür wird eine Probe des Zellysats im Ganzen in die jeweilige Messapparatur gestellt. Die Hersteller des Caspase-4-Substrats empfehlen zudem eine Emissionswellenlänge von 505 nm einzustellen. Misst man nun bei 505 nm, um das AFC-Signal zu bestimmen, erfasst man neben dem fluoreszierenden AFC auch das fluoreszierende Signal des Caspase-4-Substrats, da sich beide Signale bei dieser Wellenlänge überlagern. Die Quantifizierung ist hierbei demzufolge ungenau. Trennt man hingegen das Proben-gemisch nun chromatographisch mittels RP-HPLC auf und misst anschließend im Fluoreszenzphotometer die Emission, kann zwischen beiden Probenbestandteilen unterschieden werden und das Signal des AFC separat bestimmt werden. Das intakte Caspase-4-Substrat durchläuft die HPLC-Säule schneller (siehe Chromatogramm in Abbildung 4.2). Der störende Einfluss des Signals des fluoreszierenden Caspase-4-Substrats entfällt hierbei. Es zeigte sich, dass das Fluoreszenzsignal von AFC bei 490 nm am größten ist. Warum empfiehlt nun der Hersteller eine Emissionswellenlänge bei 505 nm am Messgerät einzustellen, obwohl das Fluoreszenzmaximum von AFC doch bei 490 nm liegt? Da die Messung zum größten Teil nicht nach chromatographischer Auftrennung der fluoreszierenden Bestandteile erfolgt, hat die Bestimmung bei 505 nm im Vergleich zu 490 nm den Vorteil, dass der Anteil der Fluoreszenz des Caspase-4-Substrates am gemessenen Signal geringer, jedoch nicht komplett zu vernachlässigen ist. Auch für das Medium ist eine gewisse Hintergrundfluoreszenz beschrieben, so dass oft in Zell-basierten Assays statt mit Medium mit PBS gearbeitet wurde (Mack et al. 2000). Unter Verwendung des DMEM-Mediums als

Trägerlösung für das Caspase-Substrat und die Inhibitoren konnte bei den erhobenen Resultaten kein störender Einfluss aufgezeigt werden und somit ein deutlich besseres Milieu für die JEG-3-Zellen garantiert werden.

Um ein Fluorophor an seinem Wellenlängenoptimum zu quantifizieren, ist eine möglichst präzise Einstellung der Emissionswellenlänge erforderlich. Bei einem Großteil der verfügbaren Plattenreader handelt es sich oft um eine Filter-basierte Optik. Die Geräte verfügen über eine begrenzte Auswahl solcher Filter, die meist bei einer Anzahl von 4-8 liegen. Somit kann bei diesen Geräten nicht an jeder Wellenlänge gemessen werden. Bei dem von uns verwendeten Fluoreszenzphotometer, das mit der HPLC-Anlage verknüpft war, ist eine Wellenlängenselektion durch einen Monochromator möglich und das in Schritten von 1 nm. Hierbei kann jede Wellenlänge eingestellt werden und man ist nicht an eine vorgegebene Wellenlänge der Filter gebunden. Diese Systeme sind auch für Plattenreader verfügbar, dann aber im Vergleich zu der Filter-basierten Optik sehr preisintensiv.

Die Aufnahme der AFC-Standardgeraden bei drei unterschiedlichen Wellenlängen diente nicht nur zur computergestützten Datenauswertung, sondern dem Vergleich der Messbedingungen und deren Optimierung (siehe Abbildung 4.10). Das hohe Bestimmtheitsmaß aller drei Kalibriergeraden ist Ausdruck der guten Messgenauigkeit der HPLC-Apparatur. Es können sehr niedrige Konzentrationen des AFC im Bereich von 0,2 pmol/ml detektiert werden. Die drei Geraden unterscheiden sich im Anstieg. Der steilste Anstieg wurde bei der Messung am Wellenlängenoptimum von 490 nm registriert. Entfernt man sich bei der Einstellung der Emissionswellenlänge von diesem Optimum, nimmt der Anstieg ab und somit auch die Messgenauigkeit im niedrigen Konzentrationsbereich. Folglich bestätigte diese Messung, dass eine möglichst nahe am Wellenlängenoptimum eingestellte Emissionswellenlänge die Detektion im niedrigen Konzentrationsbereich verbessert und den Messfehler in diesem Bereich reduziert. Die Genauigkeit der Messung erlaubte sogar die Darstellung der durch magnetische Nanopartikel minimal veränderten Fluoreszenz von AFC. In dem von uns durchgeführten Versuch zeigte sich ein signifikanter Einfluss der MNP auf die Fluoreszenz hoher Konzentrationen von AFC.

5.2 Vergleich der direkten und indirekten Aktivitätsbestimmung der Caspase-4 in Zellkulturüberständen und Zelllysaten der Zellkultur JEG-3

Es sollte die indirekte Herangehensweise zur Caspase-Aktivitätsbestimmung mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methodik der direkten Caspase-4-Aktivitätsbestimmung gegenübergestellt werden. Die Detektion des Fluoreszenzsignals von AFC und die chromatographische Auftrennung von anderen fluoreszierenden Bestandteilen der Probe waren bei beiden Methoden identisch und besaßen einen hohen Grad an Messgenauigkeit. Verglichen werden sollte also die Probenvorbereitung der direkten und indirekten Methode vor der chromatographischen Auftrennung und fluorimetrischen Messung des AFC. Auch wenn keine absolute Vergleichbarkeit der beiden Bestimmungsmethoden herzustellen war, wurde jedoch Wert darauf gelegt, die Durchführung und Probenhandhabung, sowie Fehlerquellen und Störfaktoren zu beurteilen. Auch das Verhalten der Blindwerte, ebenso die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sollten beleuchtet werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Probenhandhabung, insbesondere der Probengrundlage (Zellkulturüberstand und Zelllysate) bestehen grundsätzlich in der allgemeinen Verarbeitung und Vorbereitung der Zellen vor der tatsächlichen chromatographischen Messung Unterschiede, auch wenn bei beiden Methoden eine 4-stündige Inkubation mit Caspase-Substrat einkalkuliert werden muss. Entweder wurden die Zellen direkt mit Caspase-4-Substrat und –Inhibitor behandelt oder erst deren Zelllysate. Eine gleichzeitige Durchführung der direkten und indirekten Caspase-4-Aktivitätsmessung auf Grundlage derselben JEG-3-Zellen war daher nicht möglich. Lediglich ein Vergleich anhand von JEG-3-Zellen der gleichen Passage konnte durchgeführt werden. Um am Ende die gemessenen AFC-Konzentrationen dann miteinander vergleichen zu können, bezogen wir sie auf den Proteingehalt der Zellen im jeweiligen Zellkulturansatz (siehe Abbildung 4.8). Die Caspase-4-Aktivität wurde in den Zelllysaten mit der indirekten Methode deutlich höher gemessen, als mit der direkten Methode. Ursächlich hierfür kann der Prozess, der Zellyse sein, der für die Zellen Stress bedeutet und möglicherweise zu einer Aktivierung von Caspase-4 führt. Die Probenvorbereitung, um ein Lysat von Zellen, ob adhärenz oder nicht-adhärenz wachsend, zu erhalten, beinhaltet deren Kultivierung und eine mögliche Applikation

von stimulierenden Zellzusätzen. Dann folgen die Ernte der Zellen, verschiedene Waschvorgänge und Zentrifugationen. Im nächsten Schritt werden die Zellen mit einem Zelllysepuffer versehen. Nach mehrfachem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen auf Eis ist das Ergebnis ein Proteinisolat der Zellen, welches sowohl für den entsprechenden Caspase-Assay, als auch für die Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet werden kann. Diese Abläufe sind standardisiert und werden für eine Vielzahl auch anderer Assays verwendet (Kaufmann et al. 2008). Ziel dieser Arbeit war es, zu zeigen, dass auf viele Schritte dieser Probenaufarbeitung verzichtet werden kann und damit eine klare Ersparnis des zeitlichen Aufwands und eine Reduktion möglicher damit verbundener Fehlerquellen erreicht werden kann, wenn die eigentliche enzymatische Reaktion und Umsetzung des Caspase-Substrats durch aktive Enzyme der vitalen Zellkultur stattfindet und nicht erst im Zelllysat. So sollte der Prozess der Zelllyse umgangen werden. Denn unklar ist, was die Zerstörung der Zelle durch Lysepuffer, Zentrifugation und der Temperaturwechsel beim Einfrieren und Auftauen tatsächlich bewirken. Caspasen liegen intrazellulär in der inaktiven Form als Zymogene vor. Setzt die Zelle den geregelten Prozess der Apoptose oder Inflammation in Gang, werden diese durch Proteinspaltung und Änderung der räumlichen Strukturen in den Zustand einer aktiven Caspase versetzt. Der Lysevorgang ist ein enormer Stress für die Zelle, der möglicherweise Caspasen aktiviert, die im Ruhezustand nicht katalytisch aktiv waren. Und eben diesen physiologischen Zustand ohne Störeinflüsse gilt es doch eigentlich abzubilden. Möglicherweise führt der Prozess der Zelllyse auch dazu, dass zuvor in verschiedenen Organellen der Zelle separierte Caspasen nun Zugang zu anderen Pro-Caspasen haben und sie fälschlicherweise aktivieren (Zapata et al. 1998). Dieser Vorgang und der Stress durch die Zelllyse kann eine Ursache dafür sein, dass durch die indirekte Bestimmung des AFC eine höhere Aktivität der JEG-3-Zellen der gleichen Passage gemessen wurde (siehe Abb. 4.8). Möglicherweise führen die Schritte der Zelllyse mit Zentrifugation, der Zelllysepuffer und der wiederholte Temperaturwechsel beim Einfrieren und Auftauen auch zu einer Zerstörung der räumlichen Struktur der Caspasen, was deren Inaktivität zur Folge hätte. So würde man in diesem Fall eine scheinbar verminderte Caspase-4-Aktivität messen und somit nicht den eigentlichen Grundzustand der vitalen Zelle abbilden. Andererseits können auch während der Inkubationszeit der Zellen mit den Substraten und Inhibitoren Caspasen durch die Zusätze aktiviert werden und

damit würde man durch die direkte Bestimmungsmethode eine vermeintlich höhere Aktivität messen (Mack et al. 2000).

Die Bestimmung der Caspase-4-Aktivität von lebenden JEG-3-Zellen auf Grundlage des sich im Überstand befindlichen AFC bedeutete nicht nur die Zellyse und den damit verbunden störenden Einfluss auf die Proteine zu umgehen. Es war auch zudem eine enorme Zeitersparnis und eine vereinfachte Versuchsdurchführung damit verbunden. Die Überstände mussten lediglich entnommen, ausgefällt und zentrifugiert werden und standen sofort zur quantitativen Bestimmung zur Verfügung. Bei Betrachtung der Ergebnisse für die AFC-Konzentrationen im Zellkulturüberstand und im Zelllysate nach Behandlung der Zellen mit Caspase-4-Substrat und den Inhibitoren fällt die Varianz der Messergebnisse auf (siehe Tabelle 4.1 und 4.2). Bezieht man hingegen die AFC-Konzentration auf die Proteinkonzentration der Zellen im Versuchsansatz, dann ist die Schwankungsbreite der Ergebnisse mit den Messwerten bei der indirekten Methode vergleichbar (siehe Abbildung 4.8). Hier bestehen nach Aufarbeitung des Lysats sehr gute und stabile Messbedingungen. Auch die Probenhandhabung nach der Zellyse ist einfach, schafft eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und ermöglicht einen hohen Probendurchlauf, vernachlässigt man die Tatsache, dass durch den Prozess der Zellyse die eigentlich zu messenden Zustände verfälscht sein können (Mack et al. 2000). Der Faktor der lebenden Zelle als Probengrundlage spielt für die unterschiedlich hoch ausfallende AFC-Konzentration und damit Caspase-4-Aktivität in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten bei der direkten Aktivitätsbestimmung eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Möglicherweise führt die Behandlung der Zellen mit Caspase-4-Substrat und den beiden Inhibitoren auch zu einem Caspase-aktivierenden Zellstress mit vermehrter Expression und Aktivierung der Enzyme. Möglicherweise ändert sich durch die Zellzusätze die Membranpermeabilität für die Caspasen, so dass diese die intrazelluläre Lokalisation wechseln, durch andere Enzyme aktiviert werden oder gar aus der Zelle diffundieren (Tao et al. 2007). Für Experimente, die am selben Tag durchgeführt wurden, wurden immer Zellen aus der gleichen Passage einer Kultur verwendet. An anderen Messtagen kamen folglich andere Passagen der JEG-3-Zellen zum Einsatz. Die AFC-Konzentrationen innerhalb eines Messtages zeigten geringere Unterschiede verglichen mit denen anderer Messtage (Vergleich Tabelle 4.1 und 4.2). Als Grund hierfür ist das unterschiedliche Alter der Zellen sicher nicht zu vernachlässigen.

Der Anteil an freiem AFC, der durch eine nicht-enzymatische Einwirkung im Medium entsteht, ist nicht unerheblich, was das Mitführen einer Blindwertprobe unerlässlich macht. Gründe für die hohe Konzentration an AFC im Blindwert sind möglicherweise Zusätze im Medium, die eine Abspaltung von AFC vom Tetrapeptid bewirken, die Hitze im Inkubator oder möglicherweise war auch das Substrat schon zu lang in DMSO gelöst, wobei sehr darauf geachtet wurde, dass hierbei keine zu langen Lagerzeiten entstanden. So steigert sich die AFC-Konzentration vermeintlich während der eigentlichen Untersuchung und kann durch diese störenden Einflüsse fälschlicherweise zu hoch gemessen werden (Mack et al. 2000). Befindet sich die Probe mehr als sechs Stunden in der Warteschleife für die HPLC-Messung ohne Kühlung der Proben, muss spätestens dann eine erneute Bestimmung des Blindwertes mit korrigierter Berechnung erfolgen, da ab diesem Zeitpunkt mit einer signifikanten Zunahme des AFC in der Probe durch Zerfall zu rechnen ist.

5.3 Untersuchung der Stabilität des Caspase-4-Substrats bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen

Die Stabilität des Caspase-4-Substrates stellt für die flüssigkeitschromatographische Detektion einen wichtigen Faktor dar, da die Bestimmung einer einzelnen Probe einige Zeit in Anspruch nimmt. Anhand der beschriebenen chromatographischen Auftrennung der verschiedenen fluoreszierenden Signale kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich hierbei um AFC gekoppelt an das Tetrapeptid handelt, oder um freies AFC (siehe Abbildung 4.2). Das Caspase-4-Substrat unterliegt einem gewissen Zerfall, ohne dass eine enzymatische Spaltung eingewirkt hat. Die vom Hersteller optimalen Lagerungsbedingungen sind in solider Form Raumtemperatur und in DMSO-gelöster Form -20°C . Sobald das Substrat in DMSO gelöst wird, entsteht freies AFC und AFC mit unterschiedlich langen Peptidfragmenten. Hierbei spielen möglicherweise äußere Einflussfaktoren, wie das Alter des Substrats, die Zeit, die vergeht, nachdem es in DMSO gelöst wurde, die Lagerungstemperatur, die Anzahl der Einfrier- und Auftauvorgänge und möglicherweise auch Inhaltsstoffe des Mediums, wie FKS und antibiotische Zusätze, eine nicht zu vernachlässigende Rolle.

Ein Messdurchlauf innerhalb einer HPLC-Apparatur nimmt einige Minuten in Anspruch. Aus der sich im Autosampler befindlichen Probe wird eine geringe Menge

entnommen. Sie passiert nach der Vorsäule die eigentliche Säule, in welcher die einzelnen Probenbestandteile abhängig von ihren Wechselwirkungen mit dem Packungsmaterial aufgetrennt werden und nach unterschiedlich langen Elutionszeiten dann im Fluoreszenzdetektor erscheinen und dort bestimmt werden können. Einzelne Messungen benötigen je nach Einstellung bis zu 10 min. Nach jedem Messdurchlauf wird die Säule von Verunreinigungen befreit, um eine Verschleppung des AFC zu verhindern, was nachfolgende Messungen beeinträchtigen könnte. Hierfür diene ein Gemisch aus Wasser und Methanol. Bei den gewählten Einstellungen des HPLC-Systems mussten hierfür ebenfalls 10 min einkalkuliert werden. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, dass der Enzym-unabhängige Zerfall nach der durch Methanol gestoppten enzymatischen Reaktion so gering wie möglich ist, während sich die Proben in der Warteschleife für die Messung befinden. Der Zerfall, der vor Zugabe auf die Zellen entsteht, lässt sich durch Mitführen des Blindwertes beurteilen. Auch kann durch wiederholtes Messen des Blindwertes ein weiterer Enzym-unabhängiger Zerfall des Substrats nach gestoppter Reaktion durch Caspase-4 einkalkuliert werden. Es gilt zu bewerten, ob ein gekühlter Autosampler nötig ist, der die Proben vor der eigentlichen Messung auf einer bestimmten Temperatur stabil kühlt. Weiterhin ist es interessant zu wissen, ob die Zellüberstände mehrfach eingefroren und aufgetaut werden können, um sie gegebenenfalls zu einem späteren Zeitpunkt mit anderen Proben wiederholt messen zu können und welchen Einfluss die Lagerung bei -20°C und -80°C auf die Zunahme des freien AFC nimmt.

Die Messergebnisse der bei Raumtemperatur gelagerten Proben des Zellkulturüberstands zeigen, dass der in den ersten zwei Stunden zu verzeichnende nicht-enzymatische Zerfall des Substrats zu vernachlässigen ist. Auch in den folgenden Stunden ist die Zunahme an detektierbarem freien AFC nur gering. Folglich ist bei Messdurchläufen mit geringer Probenanzahl nicht zwingend eine Kühlung im Autosampler nötig. Ist es notwendig, eine größere Probenanzahl an einem Tag zu bestimmen, empfiehlt es sich, eine Kühlung der Zellkulturüberstände vorzunehmen, oder gegebenenfalls den Blindwert erneut zu bestimmen und korrigiert in die Berechnung einzubeziehen. Eine Kühlung der Proben verlängert die Zeit bis die nicht-enzymatische AFC-Freisetzung zunimmt und das Messergebnis beeinflusst. Auch hier ist jedoch die Mitführung eines Blindwertes nötig. Gekühlte Autosampler können bei Messdurchgängen mit einer großen Probenanzahl die Messbedingungen für alle

Proben weitestgehend konstant halten. Da von einem nicht-enzymatischen Zerfall bei Raumtemperatur auszugehen ist und die Bestimmung des freien AFC durch RP-HPLC auch kleine Unterschiede misst, sind konstante äußere Messbedingungen sehr wichtig.

Aufgrund eines hohen Probenaufkommens an Zellkulturüberständen und des von uns beschriebenen zeitlichen Aufwands für die AFC-Konzentrationsbestimmung durch die RP-HPLC sollte es möglich sein, in den Proben des Zellkulturüberstands zu einem späteren Zeitpunkt die AFC-Konzentration messen zu können. Dies erfordert eine adäquate Lagerung der Proben. Betrachtet man die Messergebnisse der Zellkulturüberstände, die bei -80 °C und -20 °C gelagert wurden, zeigt sich eine stetige Zunahme der AFC-Konzentration innerhalb von vier Wochen bei -80 °C -Lagerung von ca. 17% der eingangs bei Raumtemperatur gemessenen Probe und ca. 16% bei Lagerung im -20 °C kalten Gefrierschrank.

Der Vorgang des Einfrierens und Auftauens und insbesondere die Häufigkeit dieser Vorgänge hat ebenfalls Einfluss auf den Zerfall des intakten Caspase-4-Substrats. Die Hersteller weisen in ihren Empfehlungen zur Probenhandhabung darauf hin, dass das Substrat, sobald es in DMSO gelöst ist, so selten wie möglich eingefroren und aufgetaut werden sollte. Das gilt grundsätzlich auch für das im Zellkulturüberstand und in DMEM-Medium gelöste Caspase-4-Substrat, das nicht in die Zelle diffundierte und daher dort auch nicht enzymatisch umgesetzt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass auch bei dem verwendeten Caspase-4-Substrat eine Abhängigkeit von der Anzahl der Einfrier- und Auftauvorgänge zu beobachten war. Je seltener die Probe einem Temperaturwechsel ausgesetzt war, umso geringer war die Zunahme der Konzentration des freien AFC. Festzuhalten ist, dass der Temperaturwechsel und die Lagerung bei Minusgraden, bzw. die generelle Lagerung und Aufbewahrung der Proben den Zerfall des Substrats mit der Zeit begünstigen. Mehrmaliges Einfrieren und Auftauen führt zu einer früheren signifikanten Zunahme der AFC-Konzentration im Zellkulturüberstand, ohne dass hierbei eine enzymatische und damit gewollte Spaltung eine Rolle spielt. Bei -20 °C -Lagerung geschah dies spätestens nach dem 7. Tag der Lagerung, bzw. nach zweimaligem Temperaturwechsel. Bei -80 °C -Lagerung war bereits nach einem Tag und einmaligen Einfrieren und Auftauen eine signifikante Zunahme der AFC-Konzentration in der Probe zu verzeichnen. Auch hier ist anzumerken, dass unter Mitführung eines Blindwertes dieser, wenn auch nicht groß aus-

fallender Zerfall des Substrats bei der Quantifizierung korrigiert werden kann. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass -20 °C eine ausreichend niedrige Temperatur zur Probenlagerung für eine Woche ist, und dass zweimaliges Einfrieren und Auftauen der Proben akzeptabel sind.

5.4 Einordnung der fluoreszenzbasierten direkten Aktivitätsmessung der Caspase-4 mittels RP-HPLC und ein Vergleich mit anderen Methoden zur Caspase-Aktivitätsbestimmung

Die Rolle der Caspasen beim programmierten Zelltod ist einschlägig bekannt. Fehlregulierte Caspasen als Dreh- und Angelpunkt bei der Pathogenese von tumorösen und neurodegenerativen Erkrankungen zu bezeichnen, ist sicher nicht übertrieben. Sie sind daher attraktiver Angriffspunkt für Medikamente und wichtiges Messinstrument, um Apoptose *in vitro* und *in vivo* zu bestimmen. Dies führte dazu, dass viele Techniken entwickelt wurden, um die Aktivität der Caspasen messbar machen zu können und um damit die Rolle jeder einzelnen Caspase zu definieren. Eine Hürde aller dieser Bestimmungstechniken ist die überlappende Substratspezifität der einzelnen Caspasen in den verschiedenen Gruppen der Initiator-, Effektor- und inflammatorischen Caspasen, die es schwierig macht, die Aktivität einer einzelnen Caspase singular zu quantifizieren. (Benkova 2009, Nicholls und Hyman 2014). Auch bei unseren Ergebnissen muss man diese Tatsache berücksichtigen. Durch die Verwendung eines Pan-Caspase-Inhibitors wurde im Vergleich zum selektiven Caspase-4-Inhibitor die AFC-Konzentration und damit die eigentliche Caspase-4-Aktivität noch weiter reduziert, so dass davon ausgegangen werden muss, dass auch andere Caspasen das Caspase-4-Substrat umsetzen. Möglicherweise spielen auch andere Enzyme als Caspasen eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Eine Kreuzreaktivität für Caspase-3-Substrate und Cathepsin B wurde bereits beschrieben (Mackay 2016). Umso mehr ist die Entwicklung von noch spezifischeren Substraten für Caspasen mit überlappender Substratspezifität notwendig, unter Berücksichtigung allosterischer Effekte und anderer sekundärer Bindungsstellen (Nicholls und Hyman 2014).

Bei der traditionellen kolorimetrischen Aktivitätsbestimmung der Caspasen durch ein an ein Peptid gebundenes Chromophor, z.B. para-Nitroanilin (pNA), wird nach Abspaltung des Farbstoffes gelbes Licht emittiert und im Spektrophotometer oder Plat-

tenreader quantifiziert. Nachteilig sind die geringe Sensitivität und die fehlende Möglichkeit der Anwendung im in-vivo-Modell. Aufgrund der einfachen Handhabung und der niedrigen Kosten finden sie trotzdem heute noch breite Anwendung, vor allem bei Hochdurchsatzverfahren. Daher besteht auch Interesse bessere Substrate zu entwickeln, die die Sensitivität verbessern (Maysinger und Hutter 2015).

Bei der fluoreszenzbasierten Aktivitätsbestimmung, wie sie in dieser Arbeit beschrieben ist, macht man sich ein an ein Tetrapeptid gekoppeltes Fluorochrom zu nutze. Insbesondere bei der Aktivitätsbestimmung *in vitro* finden diese synthetisch hergestellten Substrate breite Anwendung. Die Applikation bei der Aktivitätsmessung bei Modellen *in vivo* wird durch eine erschwerte Membrangängigkeit bestimmter Substrate im Einsatz eingeschränkt (Nicholls und Hyman 2014). Wir konnten jedoch für das Caspase-4-Substrat (Ac-LEVD-AFC) zeigen, dass eine gute Membranpermeabilität in adhärent wachsenden JEG-3-Zellen besteht. Auch für die Caspase-Substrate Ac-DEVD-AFC und Ac-DEVD-AMC konnte gezeigt werden, dass die Membran von Jurkat-, HL-60- und HL-60/MX2-Zellen rasch überwunden werden konnte (Mack et al. 2000, Tao et al. 2007). Die synthetischen peptidbasierten Substrate und Inhibitoren, die in der in-vitro-Forschung häufig eingesetzt werden, wurden zur besseren Anwendung *in vivo* so modifiziert, dass sie die Zellmembran besser überwinden können. So wurde beispielsweise FLICA (fluorochrome-labeled inhibitor of caspases) entwickelt. Man konnte zeigen, dass die Caspase-Inhibitoren FAM-VAD-FMK und FAM-VEID-FMK die Zellmembran von HL-60-Zellen, Jurkat-Zellen und HeLa-Zellen problemlos passieren können und durch das gebundene Fluoromethylketon (FMK) ans aktive Zentrum der aktivierten Caspasen binden und dann fluoreszieren. FAM-VAD-FMK ist ein Fluorescein-Derivat (FAM) des von uns verwendeten Pan-Caspase-Inhibitors zVAD-FMK. Die Peptidsequenz VAD wurde von allen Caspasen erkannt, VEID war spezifisch für Caspase-6. Die Apoptose wurde in den Zellen durch Behandlung mit Chemotherapeutika ausgelöst. Die Intensität der Fluoreszenz wurde dann mittels Durchflusszytometrie bestimmt, um damit auf die Aktivität der Caspasen zu schließen. Spezifische Substrate waren hierfür nicht zwingend notwendig. Auch eine Messung der Fluoreszenz im Plattenreader oder eine Fluoreszenz-Mikroskopie war möglich (Bedner et al. 2000, Amstad et al. 2001). Auch eine Messung der Fluoreszenz nach chromatographischer Auftrennung sollte realisierbar sein. Wir konnten mit unseren Experimenten zeigen, dass auch der nicht modifizierte Pan-Caspase-Inhibitor

(zVAD-FMK) und ebenso der Caspase-4-Inhibitor (Z-LEVD-FMK) problemlos die Zellmembran der JEG-3-Zellen überwinden können und beide Inhibitoren somit in zellbasierten Versuchsmodelle eingesetzt werden könnten. Nachteil der Aktivitätsbestimmung der Caspasen mit FLICA ist die Tatsache, dass diese Inhibitoren irreversibel an die Caspasen binden und daher den weiteren Erhalt der Zelle unterbinden. Im Gegensatz ist zu prüfen, ob die ausschließliche Verwendung von Caspase-Substraten ohne Inhibitoren, wie in unserem Versuchsaufbau, die weitere Entwicklung der Zelle beeinflusst. Die Attraktivität von fluoreszierenden peptidbasierten Substraten führte zur Entwicklung einer Reihe von sehr gut membrangängigen synthetischen Substraten, z.B. PhiPhiLuxG1D2 (Packard et al 1996), die ihre Anwendung in FACS und anderen Hochdurchsatzverfahren finden. Voraussetzung zur Verwendung für die Durchflusszytometrie oder die Fluoreszenzmikroskopie ist die fehlende Membrangängigkeit des abgespaltenen Fluorochroms (Maysinger und Hutter 2015). Die Substrate besitzen meist zwei Fluorophore. Nach Abspaltung kommt es zu einer Änderung der räumlichen Struktur, wodurch der hydrophobe Charakter und damit die Membrangängigkeit verloren gehen. Mit unseren Ergebnissen konnten wir zeigen, dass AFC sehr gut membrangängig ist und sich daher für eine Bestimmung im Zellkulturüberstand eignet, und möglicherweise ein Einsatz bei durchflusszytometrischen Verfahren eher ungünstig scheint (Komoriya et al. 2000). DEVD-NucView488 ist ein an ein Tetrapeptid gekoppeltes Fluorophor, das erst zu fluoreszieren beginnt, wenn es an DNA bindet, nachdem es durch aktive Caspasen vom Tetrapeptid gespalten wurde. Im Zytoplasma fluoresziert es demnach nicht (Cen et al. 2008). All diese Substrate, wie auch das von uns verwendete Caspase-4-Substrat eignen sich für die Aktivitätsbestimmung im lebenden Zellmodell. Eine der größeren Herausforderungen der in-vivo-Forschung besteht darin, diese Reagenzien so zu modifizieren, dass sie auch in Tiermodellen eingesetzt werden können, um so zum Beispiel Apoptose von Tumoren nach einer Chemotherapie anzuzeigen. Schwierigkeit bei der Entwicklung von Substraten, die hierbei zur Anwendung kommen, ist nicht nur die Membrangängigkeit, sondern auch die Gewebegängigkeit und die Möglichkeit dann im Gewebe den fluoreszierenden Stoff zu detektieren (Nicholls und Hyman 2014). Hierfür eignet sich zum Beispiel ein Caspase-3-Substrat-basierter (DEVD) Radiotracer $[(18)\text{F}]\text{-CP18}$, um durch eine PET Bildgebung die Apoptose in Tumore anzuzeigen. $[(18)\text{F}]\text{-CP18}$ ist ein Substrat, das an die von Caspase-3 präferierte Peptidsequenz DEVD

gebunden ist. Nach Katalyse akkumuliert das ^{18}F -markierte Tetrapeptid (DEVD) im Zytoplasma und kann so dargestellt werden (Xia et al. 2013). FLIVO (FLuorescence in vivo) ist die in-vivo-Version von FLICA. Hierbei wird ein zellpermeabler fluoreszierender Pan-Caspase-Inhibitor in Tiere injiziert, zirkuliert durch den Körper und geht in Zellen über, in denen er an die Caspasen bindet und sie somit markiert. Die zu interessierenden Gewebe können dann anschließend *ex vivo* durch Mikroskopie und Durchflusszytometrie analysiert werden (Cursio et al. 2008).

Eine weitere Möglichkeit der Caspaseaktivitätsmessung basiert auf der Biolumineszenz (z.B. Caspase-Glo® 3/7 Assay von Promega). Hierbei wird das Caspase-Substrat durch die Caspasen so gespalten, dass Aminoluciferin freigesetzt wird. Dieses wiederum dient als Substrat für die Luciferase. Es wird dadurch ein leuchtendes Signal generiert. Im Gegensatz zur Fluoreszenz ist keine Anregung hierfür notwendig, wodurch keine Überlagerung mit anderen fluoreszierenden Komponenten störend wirken kann, wie es in unserem fluoreszenzbasierten Assay der Fall ist, trennt man die einzelnen Bestandteile nicht chromatographisch voneinander auf. Signale bei der Biolumineszenz-Methode sollen deutlich früher generiert werden und damit eine Zeitersparnis bedeuten (O'Brien et al. 2005). Auch für Caspase-4 wurde eine solche Anwendung bereits beschrieben (Yang et al. 2015) Allerdings eignen sie sich nicht für die Anwendung in lebenden Zellen und im Tiermodell, da das Enzym Luciferase dort nicht natürlicherweise vorkommt (Maysinger und Hutter 2015).

Um alternativ zu diesen Aktivitätsassays nicht die Rate der proteolytischen Aktivität zu messen, sondern durch die Proteinmenge der Caspase-4 auf deren Aktivität zu schließen, steht beispielsweise das Immunoblotting zur Verfügung, basierend auf Antikörpern (Western Blot, ELISA) (Hitomi et al. 2004, Kim et al. 2006). Wie bereits unter 1.4.1 erläutert, ist hierbei nachteilig zu bewerten, dass durch diese Methode nicht zwischen exprimierten Enzym und tatsächlich aktivierten Enzym unterschieden werden kann, da für die Aktivierung eine Änderung der räumlichen Struktur notwendig ist, die so nicht erfasst werden kann (Boatright et al. 2003, Vaculova und Zhivotovsky 2008). Bei dem Nachweis von Produkten der Caspase-Aktivität, wird ein Rückschluss auf die aktivierten Enzyme gezogen. Beim bloßen Nachweis der Proteine ist dies nicht sicher möglich, da diese auch an Inhibitoren gebunden sein können, durch den Prozess der Zellyse davon gelöst werden und somit eigentlich nicht aktiv sind (Kaufmann et al. 2008).

Eine weitere Möglichkeit zur Caspase-Aktivitätsbestimmung besteht in der Applikation von Nanopartikeln. Hierbei kommen zumeist Gold-Nanopartikel zur Anwendung (GNP). Die Methode basiert auf dem Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (Maysinger und Hutter 2015). Konjugiert man FITC (Fluorescein Isothiocyanat) an GNP durch eine Peptidsequenz, die bevorzugt von Caspasen erkannt wird, dann wird die Fluoreszenz von FITC unterbunden. Nach der Abspaltung durch Caspase-Katalyse wird FITC freigesetzt und die Fluoreszenz wird messbar gesteigert. Gleichzeitig führt die Abspaltung des negativ geladene Peptids und FITC von den GNP zu einer Veränderung der elektrostatischen Struktur und zu einer Aggregation der GNP, wodurch es zu einem Farbwechsel von rot zu blau kommt. Folglich kann eine fluorimetrische und eine kolorimetrische Messung erfolgen (Tang et al. 2013). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Methoden erlaubt die auf Nanopartikel basierende Methodik eine Beobachtung der Caspase-Aktivität in vitalen Zellen. Fünf GNPs, die durch ein Peptid satellitenartig an ein Kern-GNP gebunden sind, werden sukzessive durch eine aktive Caspase-3 abgespalten. Hierdurch ändert sich die Signalintensität, die kontinuierlich in der Frühphase der Caspase-3-Aktivierung durch Dunkelfeldmikroskopie spektrometrisch bestimmt werden kann. Dies erlaubt somit eine Echtzeit-Aufnahme der zunehmenden Aktivität (Jun et al. 2009). Magnetische NP (MNP) fungieren als Kontrastmittel, die die T1- oder T2-Relaxationszeit verändern. In-vivo-MR-Techniken erlauben dadurch eine nicht-invasive Untersuchung von Organen. Koppelt man die MNP nun an Biosensoren, die in Geweben oder Zellen akkumulieren, von Proteasen umgesetzt werden und dadurch eine lokale Konzentrationserhöhung bedingen, kann dies durch eine Änderung des T2-Signals in der MR-Technik dargestellt werden (Eckert et al. 2013).

6 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit sollte eine neue Herangehensweise an die fluoreszenzbasierte Caspase-4-Aktivitätsbestimmung in der Chorionkarzinomzelllinie JEG-3 untersucht werden. Die Interpretation der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse lässt folgende Aussagen zu:

- Die Caspase-4-Aktivität lässt sich quantitativ auch auf Grundlage des Zellkulturüberstands bestimmen. Caspase-4-Substrat diffundiert problemlos nach intrazellulär, AFC wird dort katalytisch vom Tetrapeptid abgespalten und gelangt entsprechend des Diffusionsgleichgewichts in den Zellkulturüberstand. Insgesamt ist die AFC-Konzentration im Überstand deutlich größer als der intrazellulär verbleibende Anteil.
- Die Umstellung der RP-HPLC von einer isokratischen Trennmethode zu einer Gradientenelution ermöglicht eine optimierte Bestimmung im sehr niedrigen Konzentrationsbereich bis zu 0,2 pmol/ml und eine bessere Signaltrennung zweier Substanzen mit nur geringen Unterschieden in der AFC-Konzentration. Durch den erhöhten Anteil von organischen Lösungsmitteln kann der Grad an Verunreinigung der Säule minimiert und damit deren Lebensdauer erhöht werden.
- Die chromatographische Trennung der in der Probe enthaltenen fluoreszierenden Bestandteile, bestehend aus freiem AFC und Caspase-4-Substrat, lässt eine Messung am Wellenlängenoptimum von AFC mit 490 nm zu, da sich die beiden Signale hierdurch nicht überlagern. Eine Hintergrundfluoreszenz wird somit minimiert.
- Eine Lagerung des Zellkulturüberstands mit noch nicht enzymatisch umgesetztem Caspase-4-Substrat bei -20°C ist der bei -80°C vorzuziehen, da der nicht enzymatische Zerfall bei dieser Temperatur geringer ist. Zudem sollte der Zellkulturüberstand nach Behandlung der Zellen mit Caspase-4-Substrat vor einer Quantifizierung des AFC so selten wie möglich eingefroren und aufgetaut werden. Bei Raumtemperatur kann eine Lagerung für ca. sechs Stunden ohne Kühlung erfolgen.

Insgesamt ist hervorzuheben, dass die direkte Herangehensweise an die Caspase-Aktivitätsmessung eine gute Alternative zu den etablierten Assays, auch für andere Caspasen, sein kann. Es wird die Aktivität der im aktivierten Zustand vorliegenden Caspase-4 gemessen. Der störende Einfluss der Zellyse auf die Caspase-4-Proteine wird somit umgangen. Inwiefern die Caspase-Substrate und -Inhibitoren einen Einfluss auf die intrazelluläre Caspase-4-Aktivität besitzen, ist nicht sicher auszuschließen. Nachteilig zu bewerten, ist der geringe Probendurchsatz, dessen Zeitaufwand durch die chromatographische Auftrennung jeder einzelnen Probe von Zellkulturüberstand und -lysat, die eingesparte Zeit bei der Probenvorbereitung übersteigt.

Ausblick

Der in dieser Arbeit diskutierte Assay stellt eine Änderung der Probenvorbereitung zur Aktivitätsbestimmungen von Caspase-4 dar. Aufgrund mangelnder vorbeschriebener Erkenntnisse hierzu in der Literatur sollte diese Art der Probenhandhabung jedoch noch weiter kritisch untersucht werden. So sollte der Einfluss der Substrats und der Inhibitoren auf die Zelle genauer beleuchtet werden. Um die Caspase-4-Aktivität der JEG-3-Zellen noch differenzierter zu betrachten, ist eine Stimulation der Caspase-4 durch ER-Apoptose-Induktoren oder durch LIF, wie bei Fitzgerald et. al. beschrieben, eine weitere Möglichkeit (Fitzgerald et al 2005). Auch durch die Anwendung des Verfahrens auf nicht adhärent wachsende Zellen oder Primärkulturen der Plazenta können Pathologien genauer untersucht werden.

Da gezeigt werden konnte, dass der in den Zellen verbleibende Anteil an AFC geringer ist, als der in den Überstand diffundierte AFC-Anteil, kann in Zukunft eine Lysierung der Zellen möglicherweise komplett entfallen. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob diese Herangehensweise an die Aktivitätsbestimmung damit auch für einen Hochdurchsatz mit der RP-HPLC geeignet ist. Entsprechende Zellkulturplatten-Einsätze für die HPLC sind dafür verfügbar. Denkbar wäre damit eine Probenvorbereitung der in den Zellkulturplatten befindlichen Zellen durch entsprechende Substrate und Inhibitoren und eine direkt daran anschließende fluorimetrische Bestimmung nach chromatographischer Auftrennung in der HPLC-Apparatur. Eine Herausforderung an diesen Caspase-4-Aktivitätsassay ist zum einen die Verbesserung der Substratspezifität für Caspase-4 beispielsweise durch allosterische bzw. alternative Bindungsstellen oder Kopplung an andere Träger, wie zum Beispiel NP, um somit die Funktion der Caspase-4 noch genauer betrachten zu können.

LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Schulze-Osthoff, Klaus. 2003. In tödlicher Mission: Apoptose, Killerproteasen und Erkrankungen. In: Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2002. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, 119-130.
- Abbildung 1.2: Favalaro et al. Role of apoptosis in disease. Aging (Albany NY). 2012 May; 4(5):330-49. (modifiziert)
- Abbildung 1.3: McIlwain et al. Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013 Apr 1;5(4):a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656. (modifiziert)
- Abbildung 1.4: Schulze-Osthoff, Klaus. 2003. In tödlicher Mission: Apoptose, Killerproteasen und Erkrankungen. In: Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf 2002. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, 119-130. Und Chowdhury et. al. Caspases – an Update. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2008 Sep;151(1):10-27. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.05.010. Epub 2008 Jul 3. (modifiziert)
- Abbildung 1.5: Aus Fuentes-Prior P, Salvesen GS. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. Biochem J, 384(Pt 2):201-32.
- Abbildung 1.6: <http://lightning.med.monash.edu/PROSPER/methodology.html> (modifiziert)
- Abbildung 1.8: http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/index.html (modifiziert)
- Abbildung 3.2: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a2099?Lang=de®ion=DE> (modifiziert)
- Abbildung 3.3: Pipette aus http://bilder.afterbuy.de/images/NPZZNW/pipette3ml_m.jpg
- Abbildung 3.6: Pipette aus http://bilder.afterbuy.de/images/NPZZNW/pipette3ml_m.jpg

Bei allen nicht im Quellenverzeichnis aufgeführten Abbildungen handelt es sich um eigene Fotos oder Darstellungen.

Literaturverzeichnis

- Agard NJ, Maltby D, Wells JA. 2010. Inflammatory stimuli regulate caspase substrate profiles. *Mol Cell Proteomics*, 9 (5):880-893.
- Ahn EY, Pan G, Vickers SM, McDonald JM. 2002. IFN-gamma upregulates apoptosis-related molecules and enhances Fas-mediated apoptosis in human cholangiocarcinoma. *Int J Cancer*, 100 (4):445-451.
- Ali SM, Wong VY, Kikly K, Fredrickson TA, Keller PM, DeWolf WE, Jr., Lee D, Brooks DP. 2000. Apoptosis in polycystic kidney disease: involvement of caspases. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 278 (3):R763-769.
- Alnemri ES. 1997. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem*, 64 (1):33-42.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. 1996. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*, 87 (2):171.
- Amstad PA, Yu G, Johnson GL, Lee BW, Dhawan S, Phelps DJ. 2001. Detection of caspase activation in situ by fluorochrome-labeled caspase inhibitors. *Biotechniques*, 31 (3):608-610, 612, 614, passim.
- Angres B, Steuer H, Weber P, Wagner M, Schneckenburger H. 2009. A membrane-bound FRET-based caspase sensor for detection of apoptosis using fluorescence lifetime and total internal reflection microscopy. *Cytometry A*, 75 (5):420-427.
- Ashkenazi A, Dixit VM. 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 11 (2):255-260.
- Bedner E, Smolewski P, Amstad P, Darzynkiewicz Z. 2000. Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, 259 (1):308-313.
- Benkova B, Lozanov V, Ivanov IP, Mitev V. 2009. Evaluation of recombinant caspase specificity by competitive substrates. *Anal Biochem*, 394 (1):68-74.
- Bian ZM, Elner SG, Elner VM. 2009. Dual involvement of caspase-4 in inflammatory and ER stress-induced apoptotic responses in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50 (12):6006-6014.
- Black RA, Kronheim SR, Sleath PR. 1989. Activation of interleukin-1 beta by a co-induced protease. *FEBS Lett*, 247 (2):386-390.
- Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherland DP, Green DR, Salvesen GS. 2003. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell*, 11 (2):529-541.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Buh Gasparic M, Tengs T, La Paz JL, Holst-Jensen A, Pla M, Esteve T, Zel J, Gruden K. 2010. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Anal Bioanal Chem*, 396 (6):2023-2029.
- Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferez C, Franklin S, Ghayur T, Li P, et al. 1995. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*, 269 (5232):1885-1888.
- Cain K, Bratton SB, Cohen GM. 2002. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, 84 (2-3):203-214.
- Callus BA, Vaux DL. 2007. Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical. *Cell Death Differ*, 14 (1):73-78.
- Cen H, Mao F, Aronchik I, Fuentes RJ, Firestone GL. 2008. DEVD-NucView488: a novel class of enzyme substrates for real-time detection of caspase-3 activity in live cells. *FASEB J*, 22 (7):2243-2252.

- Chawla-Sarkar M, Lindner DJ, Liu YF, Williams BR, Sen GC, Silverman RH, Borden EC. 2003. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis*, 8 (3):237-249.
- Chipuk JE, Green DR. 2008. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*, 18 (4):157-164.
- Chomoucka J, Drbohlavova J, Huska D, Adam V, Kizek R, Hubalek J. 2010. Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacol Res*, 62 (2):144-149.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. 2008. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 151 (1):10-27.
- Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG, Skoda-Smith S, Atkinson TP, Straus SE, Lenardo MJ. 2002. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature*, 419 (6905):395-399.
- Crawford ED, Wells JA. 2011. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu Rev Biochem*, 80:1055-1087.
- Cryns V, Yuan J. 1998. Proteases to die for. *Genes Dev*, 12 (11):1551-1570.
- Cursio R, Colosetti P, Auberger P, Gugenheim J. 2008. Liver apoptosis following normothermic ischemia-reperfusion: in vivo evaluation of caspase activity by FLIVO assay in rats. *Transplant Proc*, 40 (6):2038-2041.
- Denecker G, Hoste E, Gilbert B, Hocheplied T, Ovaere P, Lippens S, Van den Broecke C, Van Damme P, D'Herde K, Hachem JP, Borgonie G, Presland RB, Schoonjans L, Libert C, Vandekerckhove J, Gevaert K, Vandenabeele P, Declercq W. 2007. Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat Cell Biol*, 9 (6):666-674.
- Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388 (6639):300-304.
- Dinarello CA. 2004. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res*, 10 (4):201-222.
- Eckert MA, Vu PQ, Zhang K, Kang D, Ali MM, Xu C, Zhao W. 2013. Novel molecular and nanosensors for in vivo sensing. *Theranostics*, 3 (8):583-594.
- Eckhart L, Ballaun C, Hermann M, VandeBerg JL, Sipos W, Uthman A, Fischer H, Tschachler E. 2008. Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol Biol Evol*, 25 (5):831-841.
- Eckhart L, Ballaun C, Uthman A, Kittel C, Stichenwirth M, Buchberger M, Fischer H, Sipos W, Tschachler E. 2005. Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity. *J Biol Chem*, 280 (42):35077-35080.
- Egle A, Harris AW, Bath ML, O'Reilly L, Cory S. 2004. VavP-Bcl2 transgenic mice develop follicular lymphoma preceded by germinal center hyperplasia. *Blood*, 103 (6):2276-2283.
- Ekert PG, Silke J, Vaux DL. 1999. Inhibition of apoptosis and clonogenic survival of cells expressing crmA variants: optimal caspase substrates are not necessarily optimal inhibitors. *EMBO J*, 18 (2):330-338.
- Ellis HM, Horvitz HR. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44 (6):817-829.
- Faucheux C, Diu A, Chan AW, Blanchet AM, Miossec C, Herve F, Collard-Dutilleul V, Gu Y, Aldape RA, Lippke JA, et al. 1995. A novel human protease similar to the interleukin-1 beta converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. *EMBO J*, 14 (9):1914-1922.
- Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA. 2002. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (17):11025-11030.

- Ferrari CC, Pott Godoy MC, Tarelli R, Chertoff M, Depino AM, Pitossi FJ. 2006. Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. *Neurobiol Dis*, 24 (1):183-193.
- Fink SL, Cookson BT. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, 73 (4):1907-1916.
- Fitzgerald JS, Tsareva SA, Poehlmann TG, Berod L, Meissner A, Corvinus FM, Wiederanders B, Pfitzner E, Markert UR, Friedrich K. 2005. Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 37 (11):2284-2296.
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*, 384 (Pt 2):201-232.
- Gaggero A, De Ambrosis A, Mezzanzanica D, Piazza T, Rubartelli A, Figini M, Canevari S, Ferrini S. 2004. A novel isoform of pro-interleukin-18 expressed in ovarian tumors is resistant to caspase-1 and -4 processing. *Oncogene*, 23 (45):7552-7560.
- Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI, Cryns VL. 2003. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (17):10032-10037.
- Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. 1998. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem*, 273 (49):32608-32613.
- Ghavami S, Yeganeh B, Stelmack GL, Kashani HH, Sharma P, Cunnington R, Rattan S, Bathe K, Klonisch T, Dixon IM, Freed DH, Halayko AJ. 2012. Apoptosis, autophagy and ER stress in mevalonate cascade inhibition-induced cell death of human atrial fibroblasts. *Cell Death Dis*, 3:e330.
- Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. 2003. Interleukin-18. *J Leukoc Biol*, 73 (2):213-224.
- Gratas C, Tohma Y, Barnas C, Taniere P, Hainaut P, Ohgaki H. 1998. Up-regulation of Fas (APO-1/CD95) ligand and down-regulation of Fas expression in human esophageal cancer. *Cancer Res*, 58 (10):2057-2062.
- Grimstad O, Husebye H, Espevik T. 2013. TLR3 mediates release of IL-1beta and cell death in keratinocytes in a caspase-4 dependent manner. *J Dermatol Sci*, 72 (1):45-53.
- Gu H, Xu K, Xu C, Xu B. 2006. Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection. *Chem Commun (Camb)*, (9):941-949.
- Gurtu V, Kain SR, Zhang G. 1997. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem*, 251 (1):98-102.
- Han H, Landreneau RJ, Santucci TS, Tung MY, Macherey RS, Shackney SE, Sturgis CD, Raab SS, Silverman JF. 2002. Prognostic value of immunohistochemical expressions of p53, HER-2/neu, and bcl-2 in stage I non-small-cell lung cancer. *Hum Pathol*, 33 (1):105-110.
- Herrera AP, Rodriguez M, Torres-Lugo M, Rinaldi C. 2008. Multifunctional magnetite nanoparticles coated with fluorescent thermo-responsive polymeric shells. *Journal of Materials Chemistry*, 18 (8):855-858.
- Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M. 2004. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol*, 165 (3):347-356.
- Howley B, Fearnhead HO. 2008. Caspases as therapeutic targets. *J Cell Mol Med*, 12 (5A):1502-1516.
- Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. 1999. The apoptosis cascade--morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol (Berl)*, 200 (1):1-18.
- Inohara, Chamailard, McDonald C, Nunez G. 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem*, 74:355-383.

- Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, Wang YF, Kiejda KA, Zhang XD, Hersey P. 2007. Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cancer Res*, 67 (20):9750-9761.
- Jun YW, Sheikholeslami S, Hostetter DR, Tajon C, Craik CS, Alivisatos AP. 2009. Continuous imaging of plasmon rulers in live cells reveals early-stage caspase-3 activation at the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (42):17735-17740.
- Kajiwara Y, Schiff T, Voloudakis G, Gama Sosa MA, Elder G, Bozdagi O, Buxbaum JD. 2014. A critical role for human caspase-4 in endotoxin sensitivity. *J Immunol*, 193 (1):335-343.
- Kamada S, Funahashi Y, Tsujimoto Y. 1997a. Caspase-4 and caspase-5, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases, are CrmA-inhibitable proteases. *Cell Death Differ*, 4 (6):473-478.
- Kamada S, Washida M, Hasegawa J, Kusano H, Funahashi Y, Tsujimoto Y. 1997b. Involvement of caspase-4(-like) protease in Fas-mediated apoptotic pathway. *Oncogene*, 15 (3):285-290.
- Kamens J, Paskind M, Hugunin M, Talanian RV, Allen H, Banach D, Bump N, Hackett M, Johnston CG, Li P, et al. 1995. Identification and characterization of ICH-2, a novel member of the interleukin-1 beta-converting enzyme family of cysteine proteases. *J Biol Chem*, 270 (25):15250-15256.
- Kaufmann SH, Lee SH, Meng XW, Loegering DA, Kottke TJ, Henzing AJ, Ruchaud S, Samejima K, Earnshaw WC. 2008. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*, 44 (3):262-272.
- Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M, Dixit VM. 2011. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, 479 (7371):117-121.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26 (4):239-257.
- Kim SJ, Zhang Z, Hitomi E, Lee YC, Mukherjee AB. 2006. Endoplasmic reticulum stress-induced caspase-4 activation mediates apoptosis and neurodegeneration in INCL. *Hum Mol Genet*, 15 (11):1826-1834.
- Kim YR, Kim KM, Yoo NJ, Lee SH. 2009. Mutational analysis of CASP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, and 14 genes in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol*, 40 (6):868-871.
- Koehn S, Trueck M, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR, Seyfarth L. 2008. Assessment of caspase-4 released free AFC by RP-HPLC and fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 874 (1-2):111-114.
- Koenig U, Eckhart L, Tschachler E. 2001. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 285 (5):1150-1154.
- Kohler PO, Bridson WE. 1971. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 32 (5):683-687.
- Komoriya A, Packard BZ, Brown MJ, Wu ML, Henkart PA. 2000. Assessment of caspase activities in intact apoptotic thymocytes using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *J Exp Med*, 191 (11):1819-1828.
- Kouroku Y, Fujita E, Jimbo A, Kikuchi T, Yamagata T, Momoi MY, Kominami E, Kuida K, Sakamaki K, Yonehara S, Momoi T. 2002. Polyglutamine aggregates stimulate ER stress signals and caspase-12 activation. *Hum Mol Genet*, 11 (13):1505-1515.
- Koyama Y, Hiratsuka T, Matsuzaki S, Yamagishi S, Kato S, Katayama T, Tohyama M. 2010. Familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS)-linked SOD1 mutation accelerates neuronal cell death by activating cleavage of caspase-4 under ER stress in an in vitro model of FALS. *Neurochem Int*, 57 (7):838-843.
- Krammer PH. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407 (6805):789-795.
- Lakshmanan U, Porter AG. 2007. Caspase-4 interacts with TNF receptor-associated factor 6 and mediates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB-dependent production of IL-8

- and CC chemokine ligand 4 (macrophage-inflammatory protein-1). *J Immunol*, 179 (12):8480-8490.
- Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ*, 14 (1):44-55.
- Laurent S, Dutz S, Hafeli UO, Mahmoudi M. 2011. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci*, 166 (1-2):8-23.
- Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, McDowell J, Paskind M, Rodman L, Salfeld J, et al. 1995. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell*, 80 (3):401-411.
- Liang B, Song X, Liu G, Li R, Xie J, Xiao L, Du M, Zhang Q, Xu X, Gan X, Huang D. 2007. Involvement of TR3/Nur77 translocation to the endoplasmic reticulum in ER stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 313 (13):2833-2844.
- Linton SD, Aja T, Armstrong RA, Bai X, Chen LS, Chen N, Ching B, Contreras P, Diaz JL, Fisher CD, Fritz LC, Gladstone P, Groessl T, Gu X, Herrmann J, Hirakawa BP, Hoglen NC, Jahangiri KG, Kalish VJ, Karanewsky DS, Kodandapani L, Krebs J, McQuiston J, Meduna SP, Nalley K, Robinson ED, Sayers RO, Sebring K, Spada AP, Ternansky RJ, Tomaselli KJ, Ullman BR, Valentino KL, Weeks S, Winn D, Wu JC, Yeo P, Zhang CZ. 2005. First-in-class pan caspase inhibitor developed for the treatment of liver disease. *J Med Chem*, 48 (22):6779-6782.
- Liu AX, He WH, Yin LJ, Lv PP, Zhang Y, Sheng JZ, Leung PC, Huang HF. 2011. Sustained endoplasmic reticulum stress as a cofactor of oxidative stress in decidual cells from patients with early pregnancy loss. *J Clin Endocrinol Metab*, 96 (3):E493-497.
- Liu J, Bhalgat M, Zhang C, Diwu Z, Hoyland B, Klaubert DH. 1999. Fluorescent molecular probes V: a sensitive caspase-3 substrate for fluorometric assays. *Bioorg Med Chem Lett*, 9 (22):3231-3236.
- Luthi AU, Martin SJ. 2007. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 14 (4):641-650.
- Mack A, Furmann C, Hacker G. 2000. Detection of caspase-activation in intact lymphoid cells using standard caspase substrates and inhibitors. *J Immunol Methods*, 241 (1-2):19-31.
- Mackay M, Perez-Lopez AM, Bradley M, Lilienkampf A. 2016. Eliminating caspase-7 and cathepsin B cross-reactivity on fluorogenic caspase-3 substrates. *Mol Biosyst*, 12 (3):693-696.
- Mao ZG, Jiang CC, Yang F, Thorne RF, Hersey P, Zhang XD. 2010. TRAIL-induced apoptosis of human melanoma cells involves activation of caspase-4. *Apoptosis*, 15 (10):1211-1222.
- Martinon F, Tschopp J. 2004. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*, 117 (5):561-574.
- Martinon F, Burns K, Tschopp J. 2002. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell*, 10 (2):417-426.
- Matsuzaki S, Hiratsuka T, Kuwahara R, Katayama T, Tohyama M. 2010. Caspase-4 is partially cleaved by calpain via the impairment of Ca²⁺ homeostasis under the ER stress. *Neurochem Int*, 56 (2):352-356.
- Maysinger D, Hutter E. 2015. Nanoparticle-based caspase sensors. *Nanomedicine (Lond)*, 10 (3):483-501.
- McCarthy NJ, Evan GI. 1998. Methods for detecting and quantifying apoptosis. *Curr Top Dev Biol*, 36:259-278.
- Meng X, Seton HC, Lu le T, Prior IA, Thanh NT, Song B. 2011. Magnetic CoPt nanoparticles as MRI contrast agent for transplanted neural stem cells detection. *Nanoscale*, 3 (3):977-984.

- Meyer VR. 2008a. Bereitstellung der Apparatur bis zur Probenaufgabe. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 61-75.
- Meyer VR. 2008b. Theoretische Grundlagen. Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 15-53.
- Morgan MJ, Thorburn A. 2001. Measurement of caspase activity in individual cells reveals differences in the kinetics of caspase activation between cells. *Cell Death Differ*, 8 (1):38-43.
- Munday NA, Vaillancourt JP, Ali A, Casano FJ, Miller DK, Molineaux SM, Yamin TT, Yu VL, Nicholson DW. 1995. Molecular cloning and pro-apoptotic activity of ICEreIII and ICEreIII, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases. *J Biol Chem*, 270 (26):15870-15876.
- Nicholls SB, Hyman BT. 2014. Measuring caspase activity in vivo. *Methods Enzymol*, 544:251-269.
- Nicholson DW. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6 (11):1028-1042.
- Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 22 (8):299-306.
- Nickles D, Falschlehner C, Metzigg M, Boutros M. 2012. A genome-wide RNA interference screen identifies caspase 4 as a factor required for tumor necrosis factor alpha signaling. *Mol Cell Biol*, 32 (17):3372-3381.
- O'Brien MA, Daily WJ, Hesselberth PE, Moravec RA, Scurria MA, Klaubert DH, Bulleit RF, Wood KV. 2005. Homogeneous, bioluminescent protease assays: caspase-3 as a model. *J Biomol Screen*, 10 (2):137-148.
- Obeng EA, Boise LH. 2005. Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 280 (33):29578-29587.
- Oda T, Kosuge Y, Arakawa M, Ishige K, Ito Y. 2008. Distinct mechanism of cell death is responsible for tunicamycin-induced ER stress in SK-N-SH and SH-SY5Y cells. *Neurosci Res*, 60 (1):29-39.
- Packard BZ, Toptygin DD, Komoriya A, Brand L. 1996. Profluorescent protease substrates: intramolecular dimers described by the exciton model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (21):11640-11645.
- Pelletier N, Casamayor-Palleja M, De Luca K, Mondiere P, Saltel F, Jurdic P, Bella C, Genestier L, Defrance T. 2006. The endoplasmic reticulum is a key component of the plasma cell death pathway. *J Immunol*, 176 (3):1340-1347.
- Putt KS, Chen GW, Pearson JM, Sandhorst JS, Hoagland MS, Kwon JT, Hwang SK, Jin H, Churchwell MI, Cho MH, Doerge DR, Helferich WG, Hergenrother PJ. 2006. Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy. *Nat Chem Biol*, 2 (10):543-550.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. 2012. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*, 40 (Database issue):D343-350.
- Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS, Pickup DJ. 1992. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell*, 69 (4):597-604.
- Riedl SJ, Salvesen GS. 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (5):405-413.
- Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene LA. 2002. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 22 (24):10690-10698.
- Safarik I, Safarikova M. 2004. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagn Res Technol*, 2 (1):7.
- Sansanwal P, Kambham N, Sarwal MM. 2010. Caspase-4 may play a role in loss of proximal tubules and renal injury in nephropathic cystinosis. *Pediatr Nephrol*, 25 (1):105-109.

- Schechter I, Berger A. 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, 27 (2):157-162.
- Schilling O, Overall CM. 2008. Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites. *Nat Biotechnol*, 26 (6):685-694.
- Schmid-Burgk JL, Gaidt MM, Schmidt T, Ebert TS, Bartok E, Hornung V. 2015. Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *Eur J Immunol*.
- Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, 23 (5):479-490.
- Sollberger G, Strittmatter GE, Kistowska M, French LE, Beer HD. 2012. Caspase-4 is required for activation of inflammasomes. *J Immunol*, 188 (4):1992-2000.
- Soma T, Ogo M, Suzuki J, Takahashi T, Hibino T. 1998. Analysis of apoptotic cell death in human hair follicles in vivo and in vitro. *J Invest Dermatol*, 111 (6):948-954.
- Stennicke HR, Salvesen GS. 1997. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem*, 272 (41):25719-25723.
- Stennicke HR, Renatus M, Meldal M, Salvesen GS. 2000. Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *Biochem J*, 350 Pt 2:563-568.
- Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. 1996. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med*, 2 (12):1361-1366.
- Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD, Wong WW. 1997. Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem*, 272 (15):9677-9682.
- Tang A, Mei B, Wang W, Hu W, Li F, Zhou J, Yang Q, Cui H, Wu M, Liang G. 2013. FITC-quencher based caspase 3-activatable nanoprobe for effectively sensing caspase 3 in vitro and in cells. *Nanoscale*, 5 (19):8963-8967.
- Tao Z, Goodisman J, Penefsky HS, Souid AK. 2007. Caspase activation by anticancer drugs: the caspase storm. *Mol Pharm*, 4 (4):583-595.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281 (5381):1312-1316.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356 (6372):768-774.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*, 272 (29):17907-17911.
- Tian H, Ip L, Luo H, Chang DC, Luo KQ. 2007. A high throughput drug screen based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) for anticancer activity of compounds from herbal medicine. *Br J Pharmacol*, 150 (3):321-334.
- Timmer JC, Salvesen GS. 2007. Caspase substrates. *Cell Death Differ*, 14 (1):66-72.
- Troy CM, Akpan N, Jean YY. 2011. Regulation of caspases in the nervous system implications for functions in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 99:265-305.
- Vaculova A, Zhivotovsky B. 2008. Caspases: determination of their activities in apoptotic cells. *Methods Enzymol*, 442:157-181.
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*, 243 (1-2):167-190.

- Wang K, Brems JJ, Gamelli RL, Ding J. 2005. Reversibility of caspase activation and its role during glycochenodeoxycholate-induced hepatocyte apoptosis. *J Biol Chem*, 280 (25):23490-23495.
- Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, et al. 1994. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*, 370 (6487):270-275.
- Wolan DW, Zorn JA, Gray DC, Wells JA. 2009. Small-molecule activators of a proenzyme. *Science*, 326 (5954):853-858.
- Xia CF, Chen G, Gangadharmath U, Gomez LF, Liang Q, Mu F, Mocharla VP, Su H, Szardenings AK, Walsh JC, Zhao T, Kolb HC. 2013. In vitro and in vivo evaluation of the caspase-3 substrate-based radiotracer [(18)F]-CP18 for PET imaging of apoptosis in tumors. *Mol Imaging Biol*, 15 (6):748-757.
- Yaguchi T, Saito M, Yasuda Y, Nishizaki T. 2010. Caspase-4 activation in association with decreased adenosine deaminase activity may be a factor for gastric ulcer. *Digestion*, 81 (1):62-67.
- Yamamoto-Yamaguchi Y, Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y. 2003. Induction of apoptosis by combined treatment with differentiation-inducing agents and interferon-alpha in human lung cancer cells. *Anticancer Res*, 23 (3B):2537-2547.
- Yamamuro A, Kishino T, Ohshima Y, Yoshioka Y, Kimura T, Kasai A, Maeda S. 2011. Caspase-4 directly activates caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Sci*, 115 (2):239-243.
- Yang HJ, Wang M, Wang L, Cheng BF, Lin XY, Feng ZW. 2015. NF-kappaB regulates caspase-4 expression and sensitizes neuroblastoma cells to Fas-induced apoptosis. *PLoS One*, 10 (2):e0117953.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75 (4):641-652.
- Yukioka F, Matsuzaki S, Kawamoto K, Koyama Y, Hitomi J, Katayama T, Tohyama M. 2008. Presenilin-1 mutation activates the signaling pathway of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Neurochem Int*, 52 (4-5):683-687.
- Zapata JM, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. 1998. Granzyme release and caspase activation in activated human T-lymphocytes. *J Biol Chem*, 273 (12):6916-6920.
- Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, Varet B, Solary E, Hermine O. 2001. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med*, 193 (2):247-254.

Datenblätter zu Caspase-Assays:

(1) MP Biomedicals, Katalognummer AFC155

http://www.mpbio.com/includes/msds/03AFC155/MP_DS_03AFC155.pdf

(2) BD Pharmingen, Materialnummer 556574:

http://wwwbdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/cell_bio/live/web_enabled/67201U_556574.pdf

ANHANG

Publikation

Caspase-4-Assay in Jeg-3 Choriocarcinoma Cells: A New Approach Using RP-HPLC (Poster); **Bingel A**, Enke U, Schmidt P, Poehlmann T, Schleussner E, Seyfarth L, Sep 2011, International Federation of Placenta Associations Meeting, Geilo, Norway

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Plazenta-Labor der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt.

Mein Dank gilt einer Vielzahl von Menschen, die diese Arbeit im Entstehen unterstützt und zum Gelingen beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Udo R. Markert für die Überlassung der Arbeit und die wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Ebenso geht mein Dank an die gesamte Arbeitsgruppe des Plazenta-Labors. Die Arbeit dort war geprägt durch eine besonders kollegiale und angenehme Atmosphäre, die immer wertvolle Diskussionen und eine produktive Zusammenarbeit ermöglichte.

Mein Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Tobias Pöhlmann und Herrn Dr. med. Mike Trück für die Einweisung in die Laborarbeit und Frau Katja Kolpak für die Unterstützung bei den HPLC-Messungen. Ich möchte mich bei Frau Dr. rer. nat. Lydia Seyfarth für ihre Unterstützung und ihre Betreuung im Umgang mit der HPLC, die fachlichen Anregungen bei der Auswertung der Ergebnisse und der Erarbeitung der optimierten Methodik der HPLC-Messung bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, insbesondere bei meinen Eltern und meinem Bruder Robert, für die bedingungslose Unterstützung bei der Arbeit an dieser Dissertation, den außerordentlich großen Rückhalt und das in mich aufgebrachte Vertrauen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. habil. Udo R. Markert
Dr. rer. nat. Lydia Seyfarth

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Berlin, 12.06.2017

Verwendete Geräte, Materialien und Zusammensetzung von Puffern

Geräte

<u>Autoklav</u> KSG-112	KSG-Ölching
<u>Brutschränke</u> HERAcell CO2 Inkubator FUNCTIONline CO2 Inkubator	Heraeus Instruments
<u>HPLC-Anlage</u> Gynkotec HPLC GINA Pumpe: Ultimate 3000 Pump Autosampler GINA 50 Ultimate 3000 Variable Wavelength Detector RF1002 Fluorescence HPLC Monitor Chromleon Software Version 6.8 Vorsäule: Aqua perfekt C18, 250 x 0,4 mm, 5 µm Säule: Aqua perfect C18 250 x 0,4 mm, 5 µm	Gynkotec Dionex Gynkotec Dionex Gynkotec Dionex MZ Analysentechnik MZ Analysentechnik
<u>Mikroskop</u> (Auflicht) Axiovert 25	Zeiss
<u>Neubauerzählkammer</u>	Optik Labor
<u>Pipetten</u>	Eppendorf, Gilson Hirschmann, Brand
<u>Spektrophotometer</u> Cary UV 50	Bio Varian
<u>Vortexer</u> Vortex Genie 2	Scientific Industries
<u>Waage</u>	Satorius Basic
<u>Wasserbad</u>	Huber Medingen
<u>Zentrifugen</u> Biofuge 13 Mikro 22R Universal 30F	Heraeus Hettich Hettich
<u>Fluoreszenzspektrometer</u> HITACHI Model F-4500 (Eintrittspalt: 5 nm, Austrittspalt: 5 nm)	Hitachi

Verbrauchsmittel

Centrifugal Filter Nanosep 0,45 µm, 500 µl	VWR
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5 / 1,5 / 2 ml)	Sarstedt
HPLC-Flasche V-Form 1,1 ml, 32 x 11,6 mm farblos	Chromatographie Handel Müller
HPLC-Flasche 1,5 ml, 32.0 x 11.6, braun	Chromatographie Handel Müller
HPLC-Mikroinsert Öffnung 5 mm, 0,1 ml 31 x 5 mm farblos	Chromatographie Handel Müller
HPLC-Septen Silicon-weiß, PTFE-rot	Chromatographie Handel Müller
HPLC-Schraubkappe mit Septum, Loch 5,5 mm	Chromatographie Handel Müller
Küvetten	Sarstedt
Menzel-Gläser	Thermo Scientific
Pipettenspitzen	Greiner
Röhrchen (15 / 50 ml)	Greiner
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturplatten (F-Boden) (6- / 96-well)	Greiner

Zellkulturmedien

DMEM Medium (DMEM + 10% FKS + 2% Antibiotic Antimykotic Solution), Low glucose 1 g/l	PAA
Zellkulturmedium F12	PAA Laboratories

Reagenzien

AFC - Stammlösung A8401-5MG $c_1 = 100 \text{ pmol/ml}$, $c_2 = 10 \text{ pmol/ml}$	Sigma
Antibiotic Antimykotic Solution (AAS)	Sigma

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories
Caspase-4, rekombinant 1U/μl in PBS	PromoKine
Caspase-4-Inhibitor (Z-LEVD-FMK) 2 mM Stammlösung in DMSO	ENZO
Caspase-4-Substrat (Ac-LEVD-AFC) 20 mM Stammlösung in DMSO 25 mg gelöst in 1,72 ml DMSO	MP Biomedicals
DMSO	MP Biomedicals
Fetales Kälberserum (FKS)	Bio Whittaker
Methanol HPLC Gradient Grade	Roth
Nanopartikel Stammlösung NM A002 (fluidMAG-D) $c_{SL} = 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$	Chemicell
Pan-Caspase-Inhibitor (Z-VAD-FMK) 10 mM Stammlösung in DMSO 1,1 mg gelöst in 230 μl DMSO	Peptide Institute
PBS	PAA
Penicillin/Streptomycin	PAA
Protease-Inhibitor-Mix G 31,2 mg in 1 ml Aqua dest. 100 fache Stammlösung	Serva
Trypanblau	Sigma
Trypsin EDTA	Lonza
Wasser HPLC Gradient Grade	Roth
Zell-Lysepuffer	Cell Signaling Technology

Puffer

<u>Caspase-4 Puffer</u>	Ansatz nach MP Biomedicals 100 mM HEPES (pH = 7,5) 20% (V/V) Glycerol 5 mM DTT (Dithiothreitol) 0,5 mM EDTA
-------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------