

Analyse der Funktion von Caspase-4 in 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

Mike Trück

geboren am 27.07.1980 in Rottweil am Neckar

2009

Gutachter:

1. Privatdozent Dr. med. habil. Udo R. Markert, Jena
2. Privatdozentin Dr. med. habil. Gudrun Hippus, Jena
3. Privatdozentin Dr. rer. hum. biol. Ulrike Kämmerer, Würzburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04. Mai 2009

Die vorliegende Dissertation wurde im Labor von
Herrn PD Dr. med. habil. Udo R. Markert
am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena,
Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
angefertigt.

meiner Familie gewidmet

„Das Schönste,
was wir entdecken können,
ist das Geheimnisvolle.“

Albert Einstein (1879-1955)



INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	1
EINLEITUNG	
1.1 Motivation der Arbeit	3
1.2 Die Frühschwangerschaft - Weichenstellung für ein neues Leben	5
1.2.1 Von der Ovulation bis zur Implantation	5
1.2.2 Die Invasion der Trophoblastzellen und deren Regulation	6
1.2.3 Fehlregulationen der Trophoblastzellinvasion	9
1.3 Zytokine als Modulatoren der Invasion	10
1.3.1 Leukaemia Inhibitory Factor (LIF)	11
1.3.2 Interleukin 6 (IL-6)	12
1.3.3 Hepatocyte Growth Factor (HGF)	13
1.4 Nekrose und Apoptose	14
1.4.1 Nekrose	14
1.4.2 Apoptose	15
1.4.3 Funktion der Apoptose	16
1.4.4 Apoptose als Ursache für Krankheiten	19
1.5 Caspasen - mehr als nur Motoren der Apoptose	20
1.5.1 Caspase-4	23
1.6 Apoptose und Schwangerschaft	26
1.6.1 Mechanismen der Invasion und Plazentation	26
1.6.2 Funktion der Apoptose in der Plazenta	26
1.6.3 Pathologien der Schwangerschaft und deren klinische Bedeutung	28
ZIELE DER ARBEIT	
2.1 Ziele der Arbeit	30
2.2 Arbeitshypothesen	30
METHODIK	
3.1 Die Zelllinie JEG-3	31

3.2 Kultur der Zelllinie	31
3.3 Einfrieren und Auftauen der Zelllinie	32
3.4 Transfektion der Zellen mittels „small interfering“ RNA (siRNA)	32
3.5 Proteinisolation	35
3.5.1 Lysieren der Zellen	35
3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	35
3.6 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.7 Western Blot	38
3.8 Aktivitätsmessung von Caspase-4 mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	40
3.9 Proliferations-Assay	44
3.10 Apoptose-Assay mittels Annexin V	46
3.10.1 Apoptose-Assay mittels Annexin V via Durchflusszytometrie	47
3.10.2 Apoptose-Assay mittels Annexin V via Fluoreszenzmikroskopie	48
3.11 Statistische Auswertung	49

ERGEBNISSE

4.1 Etablierung der siRNA-Transfektion von Caspase-4 in der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3	50
4.2 Caspase-4-Aktivitätsmessung mittels HPLC	53
4.2.1 Optimierung der Methode	53
4.2.2 Ergebnisse	55
4.3 Proliferations-Assay	57
4.3.1 Einfluss der RNAi von Caspase-4 auf das Proliferations- verhalten der Zelllinie JEG-3	57
4.3.2 Einfluss von LIF auf das Proliferationsverhalten der Zelllinie JEG-3 nach RNAi von Caspase-4	58
4.3.3 Einfluss von HGF auf das Proliferationsverhalten der Zelllinie JEG-3 nach RNAi von Caspase-4	59
4.3.4 Einfluss von Interleukin-6 auf das Proliferationsverhalten der Zelllinie JEG-3 nach RNAi von Caspase-4	60
4.3.5 Gesamtübersicht Proliferation	61

4.4 Apoptose-Assay mittels Annexin V	62
4.4.1 Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses der RNAi von Caspase-4 auf die Apoptose-Rate von JEG-3-Zellen	62
4.4.2 Fluoreszenzmiroskopische Detektion des Einflusses der RNAi von Caspase-4 auf die Apoptose-Rate von JEG-3-Zellen	64
DISKUSSION	
5.1 Funktion von Caspase-4 in trophoblastären Zellen	67
5.2 Protein-„Knock-down“ von Caspase-4 mittels RNAi	68
5.3 Caspase-4-Aktivitätsmessung mittels HPLC	71
5.3.1 Optimierung der Methode	71
5.3.2 Diskussion der Ergebnisse	71
5.4 Proliferations-Assay	74
5.5 Apoptose-Assay mittels Annexin V	76
5.5.1 Diskussion der Methoden	76
5.5.2 Diskussion der Ergebnisse	78
5.6 Schlussfolgerungen & Ausblick	80
ZUSAMMENFASSUNG	82
LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	
Quellenverzeichnis der Abbildungen	84
Literaturverzeichnis	85
ANHANG	
Lebenslauf	I
Publikationsliste	II
Danksagung	IV
Ehrenwörtliche Erklärung	V
Verwendete Geräte und Materialien	VI
Zusammensetzungen von Puffern, Lösungen und Gelen	X

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

AAS	Antibiotic Antimykotic Solution
ADP	Adenosindiphosphat
AFC	7-Amido-4-Trifluoromethylcoumarin
Apaf-1	apoptosis protease activating factor 1
APO1/-R	siehe CD95
APS	Ammoniumpersulfat
Bax	Bcl-2 assoziiertes X-Protein (intrazellulärer proapoptotischer Faktor)
Bcl-2	B-cell-lymphoma-2 (intrazellulärer antiapoptotischer Faktor)
BSA	Bovines Serum-Albumin
CARD	caspase recruiting domain
CAD	caspase-activated DNase
CED	cell death
Ced-3	Apoptose-Gen des Nematoden <i>Caenorhabditis elegans</i> ; entspricht der humanen Caspase-1
CD95	Membranprotein vom Typ I, gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren; dient nach Bindung eines entsprechenden Liganden als Todesrezeptor der Transduktion des Apoptose-Signals Synonyme: APO1-R, Fas-R, TNF-R
CDF	chat development factor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CLB	Zellysepuffer
CrmA	cytokine response modifier gene A
CSF	colony stimulating factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluoreszenz Activated Cell Sorter
Fas	Oberflächenantigen
Fas-L	Fas-Ligand
Fas-R	Fas-Rezeptor
FKS	Fetales Kälberserum

GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICAD	inhibitor of caspase-activated DNase
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)
IFN- γ	Interferon- γ
INCL	Infantile neuronale Zeroidlipofuszinose
IUGR	intrauterine growth restriction
kDa	kilo Dalton
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NGF	nerve growth factor
p35	virales antiapoptotisches Protein des Baculovirus
PS	Phosphatidylserin
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PIGF	Placenta Growth Factor
RISC	RNA inducing silencing complex
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	rounds per minute
SCR	„Scrambled“-Kontrolle (=Transfektion mit nicht-genomischer siRNA)
shRNA	small hairpin RNA / short hairpin RNA
siRNA	small interference RNA
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamin
TIMP	tissue inhibitor matrixmetalloproteinase
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor (siehe CD95)
TRAIL-1	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand 1
TRAIL-R2	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand receptor 2
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick-end labeling
TX	Transcript X (Synonym für Caspase-4)
V	Volumen

Einleitung

1.1 Motivation der Arbeit

Die Schwangerschaft und das Entstehen neuen Lebens gehören bis in unsere heutige Zeit zu den faszinierendsten biologischen Vorgängen im menschlichen Körper. Trotz allem wissenschaftlichen Fortschritt ist es bis heute nicht gelungen, die Mechanismen dieses biologischen Wunders vollständig zu verstehen, viele wichtige Fragen sind ungeklärt. Mit einigen dieser spannenden Fragen beschäftigt sich das Gebiet der Plazentologie und Reproduktionsimmunologie:

- Wie gelingt es der semiallogenen Zygote, sich toleriert durch das mütterliche Immunsystem in die Gebärmutter einzunisten und eine Schwangerschaft erfolgreich zu etablieren?
- Und warum gelingt genau dieses bei einer beträchtlichen Anzahl von Schwangerschaften nicht?
- Durch welche intra- und extrazellulären Mechanismen reguliert der invadierende Trophoblast, anders als maligne Tumoren, sein Wachstum?
- Welche für die klinische Arbeit relevanten Pathologien ergeben sich aus Fehlregulationen während dieses Zeitraums der Frühschwangerschaft?

Frühere Erkenntnisse des Placenta-Labors der Universitätsfrauenklinik Jena, in welchem dieses Gebiet der molekularen Geburtsmedizin mit untersucht wird, sind die Motivation für diese Dissertation.

So konnten Fitzgerald et al. 2005b zeigen, dass die Stimulation von Chorionkarzinom-Zellen, maligne entarteten Trophoblast-Zellen, mit dem in der Frühschwangerschaft für Implantation und Invasion essentiell notwendigen Zytokin Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) zu einer deutlich vermehrten Genexpression des Enzyms Caspase-4 führt.

Caspasen, deren Funktionen in der Initiierung und Ausführung des programmierten Zelltodes (Apoptose) und in der Prozessierung proinflammatorischer Botenstoffe liegen, sind seit Jahren Gegenstand intensiver Forschungen.

Jedoch gibt es einzelne Caspasen, über die bis heute nur wenig bekannt ist und deren Funktionen und Regulation in der Literatur seit Jahren kontrovers diskutiert wird. Zu dieser Gruppe von Caspasen gehört auch die bereits erwähnte Caspase-4.

Die vorliegende Arbeit greift die bisherigen Erkenntnisse von Fitzgerald et al. 2005b auf und untersucht näher die Funktion von Caspase-4 und den Einfluss deren Hemmung durch RNA-Interferenz auf Proliferations- und Apoptose-Verhalten in der humanen Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3, die hier als Modell für die trophoblastären Primärzellen dient.

Auch sollte geklärt werden, ob die Stimulation mit LIF über die Ebene einer vermehrten Genexpression hinaus zu einer direkten Steigerung der Enzymaktivität von Caspase-4 in JEG-3-Zellen führt.

1.2 Die Frühschwangerschaft - Weichenstellung für ein neues Leben

1.2.1 Von der Ovulation bis zur Implantation

In einem regelmäßigen Zyklus von ungefähr 28 Tagen findet in den Ovarien eine Eireifung statt. Dieser ovarielle Zyklus unterliegt einer komplexen hormonellen Regulation (Sadler 1998).

In der Mitte eines jeden Zyklus kommt es mit dem Eisprung zur Freisetzung einer befruchtungsfähigen Oozyte. Diese Freisetzung erfolgt direkt in den Eileiter, wo für die Entstehung einer Schwangerschaft innerhalb von 24 bis 48 Stunden eine Befruchtung stattfinden muss.

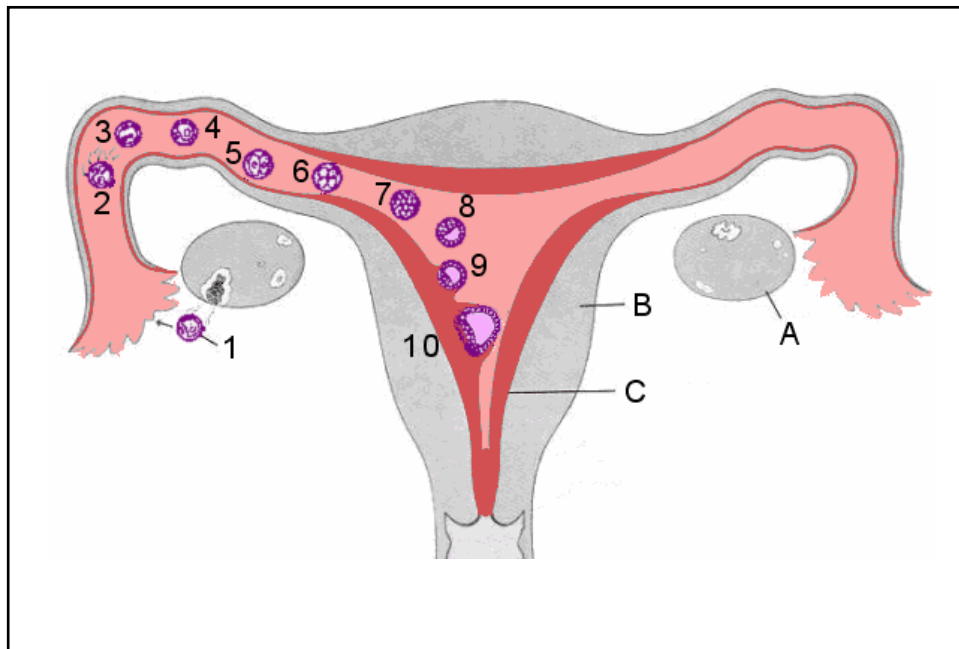


Abbildung 1.1: Die Entwicklung der Blastozyste von der Ovulation bis zur Implantation: Nach dem Eisprung (1) aus dem Ovar (A) und der Fertilisation (2-4) teilt sich die befruchtete Eizelle mehrfach (5-7), bevor sie sich als Blastozyste (8) in das Endometrium (C) des Uterus (B) implantiert (9-10).

Nach der Befruchtung wird die Eizelle nun als Zygote bezeichnet, macht auf ihrem Weg in den Uterus eine Reihe rasch aufeinanderfolgender Zellteilungen durch und wird dadurch in mehrere Tochterzellen, sogenannte Blastomere, geteilt. Nach etwa vier Tagen erreicht die Zygote den Uterus. Zu diesem Zeitpunkt besteht sie aus 16 bis 32 Blastomeren und wird wegen ihres maulbeerartigen Aussehens Morula genannt (Sadler 1998).

Durch Aufnahme von Natrium und Wasser in die Blastomere entsteht in deren Inneren ein zentraler flüssigkeitsgefüllter Hohlraum, die Blastozystenöhle, wodurch sich die Morula in die Blastozyste umwandelt. Es lassen sich in diesem Stadium zwei Zelltypen innerhalb der Blastozyste voneinander abgrenzen: die als Trophoblasten bezeichneten äußeren Zellen, aus welchen im Verlauf die Plazenta entsteht sowie eine Gruppe zentral liegender Zellen, die man als innere Zellmasse bezeichnet, aus welcher sich der Embryo entwickelt (Watson 1992).

Die Blastozyste liegt für etwa weitere 48 Stunden frei in der Uterushöhle und wird durch die Sekretion aus den Uterusdrüsen ernährt. Während dieser Zeit schlüpft sie aus der sie umgebenden Zona pellucida. Anschließend beginnt die freie Blastozyste sich in das Bindegewebe der Uterusschleimhaut zu implantieren und die sich jetzt differenzierenden Trophoblastzellen invadieren nun in das mütterliche Gewebe (Moore 1990).

1.2.2 Die Invasion der Trophoblastzellen und deren Regulation

Die Fähigkeit zu invasivem Wachstum ist eine faszinierende Parallele zwischen Trophoblasten und Krebszellen (Fitzgerald et al. 2005a). Während maligne entartete Zellen jedoch unkontrolliert in das sie umgebende Gewebe einwachsen und dieses zerstören, ist die Invasion der Trophoblastzellen in das endometriale Stroma auf Grund präziser Regulationen zeitlich und räumlich begrenzt (Bischof und Irminger-Finger 2000). Diese Regulationsmechanismen sind Gegenstand intensiver Forschungen, bis heute jedoch nur teilweise aufgeklärt. Ein besseres Verständnis der molekularen Regulation der Trophoblastinvasion ist von großem wissenschaftlichen Interesse, da in ihrer Pathogenese unverstandene Schwangerschaftspathologien wie die Neigung zu rezidivierenden Aborten oder die Präeklampsie, welche mit einer inadäquaten Trophoblastinvasion assoziiert sind hierdurch in Zukunft möglicherweise therapeutisch angebar wären. Auch Krebsforscher versprechen sich durch die Untersuchungen an Trophoblastezellen und deren Regulation neue und wichtige Erkenntnisse für den Kampf gegen Krebs.

Integrine und Extrazelluläre Matrix

Sind viele regulatorische Mechanismen der Trophoblastinvasion bis heute unbekannt, konnten einige dieser Vorgänge bereits entschlüsselt werden.

Wie auch bei der Implantation der Blastozyste sind bei der Invasion und Migration der Trophoblastzellen sogenannte Integrine von großer Bedeutung. Sie fungieren auf der Zelloberfläche der Trophoblasten als Rezeptoren mit unterschiedlichen Bindungsspezifitäten. Mit Hilfe ihrer extrazellulären Domäne vermitteln sie im Rahmen der Trophoblastenmigration die Anlagerung der fetalen Zellen an bestimmte Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) des mütterlichen Stromas (Kühn und Eble 1994). Die Hauptbestandteile dieser EZM sind Kollagene, Fibronectin und Laminin. Durch die Expression von Fibronectin-bindenden Integrinen erlangen die Trophoblastzellen die Fähigkeit zu migrieren, wobei die Rezeptordichte mit der Invasivität der Trophoblasten korreliert. In vitro-Studien zeigen zudem, dass auch Trophoblasten selbst Fibronectin synthetisieren und somit ihr invasives Verhalten selbst regulieren können (Burrows et al. 1993).

Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren

Für eine erfolgreiche Migration und Invasion reicht die Anwesenheit von Fibronectin allein nicht aus. Zusätzlich muss die extrazelluläre Matrix selbst, welche die Wanderung der invadierenden Trophoblasten behindert, degradiert werden. Dazu exprimieren und sezernieren die Trophoblasten verschiedene Proteasen, darunter auch sogenannte Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).

MMPs sind Zink-abhängige Kollagenasen mit hoher Substratspezifität, die sowohl Basalmembranen als auch die interstitielle Matrix enzymatisch abbauen können (Staun-Ram et al. 2004). Da MMPs aufgrund ihrer Spezifität nur bestimmte Bestandteile der EZM degradieren, wird die Struktur der Matrix weitgehend bewahrt, die trophoblastäre Zellwanderung aber durch begrenzte Proteolyse erleichtert (Alberts et al. 2004).

Von besonderer Bedeutung für den Invasionsprozess der Trophoblasten sind die Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 (MMP-2, MMP-9). Die Aufgabe beider Proteasen ist der Abbau von Kollagen Typ IV (Staun-Ram und Shalev 2005). Da dieses Kollagen nicht nur ein Bestandteil der EZM sondern auch Hauptbestandteil von Basalmembranen ist, wird den MMPs 2 und 9 auch eine tragende Rolle beim

Durchbrechen des apikalen Uterusepithels während der Implantation der Blastozyste zugeschrieben (Librach et al. 1991).

Um eine ungebremste Invasion von Trophoblasten in das endometriale Stroma zu verhindern, ist eine Regulation der MMPs unerlässlich. Zu den Faktoren, welche die MMP-Aktivität kontrollieren, gehören unter anderem die Gewebeinhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen (tissue inhibitors of MMPs, TIMP). Diese Inhibitoren binden an die MMPs und blockieren deren proteolytisches Zentrum. Sie verhindern somit den weiteren Abbau von Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Burrows et al. 1996) und hemmen dadurch die Trophoblasteninvasion. TIMPs werden im Verlauf der Schwangerschaft sowohl von den Trophoblasten selbst als auch von dezidualen Zellen synthetisiert (Hurskainen et al. 1996). Das invasive Verhalten der Trophoblasten ist also zum einen selbstreguliert, wird aber auch von maternalem Gewebe kontrolliert (Staub-Ram und Shalev 2005).

Die Invasion in die maternalen Spiralarterien

Um eine ausreichende Versorgung des Embryos mit Nährstoffen und Sauerstoff über das mütterliche Blut zu gewährleisten, ist eine Remodulation der uterinen Spiralarterien durch die invadierenden Trophoblasten erforderlich. Während ihrer Invasion in das endometriale Stroma bauen diese zunächst die glatte Gefäßwandmuskulatur der Spiralarterien ab und ersetzen diese durch Fibrinogen (Lunghi et al. 2007). Anschließend invadieren endovaskuläre Trophoblastzellen in das Lumen der Gefäße, adhären an die Endothelzellen (Enders und King 1991) und kleiden das Gefäßlumen der Spiralarterien komplett aus (Zhou et al. 1997).

Die so modulierten Gefäße unterliegen nun nicht mehr der Regulation durch den mütterlichen Organismus, weisen dadurch eine permanente Querschnittserweiterung und einen gesteigerten Blutfluss in den intervillösen Raum der sich entwickelnden Plazenta auf, wo der feto-maternale Stoffaustausch stattfindet (Burrows et al. 1996). Kommt es bei der trophoblastären Auskleidung dieser mütterlichen Gefäße zu Störungen, kann im Verlauf der Schwangerschaft eine chronische Minderversorgung des Fetus mit Nährstoffen und Sauerstoff resultieren.

1.2.3 Fehlregulationen der Trophoblastzellinvasion

Eine wesentliche Voraussetzung für eine normal verlaufende Schwangerschaft ist die genaue Regulation der invadierenden Trophoblasten. Kommt es in Stadium der Frühschwangerschaft zu Störungen der Trophoblastinvasion in das endometriale Stroma und die mütterlichen Spiralarterien, resultiert ein weites Spektrum von Pathologien, auf die im Folgenden allgemein und ausführlich in Kapitel 2.5.3 eingegangen werden soll.

Dieses Spektrum reicht von relativ häufigen Befunden wie Plazenta-Reifungsstörungen und der sich wahrscheinlich hieraus entwickelnden Präeklampsie über frühzeitige Plazenta-Ablösungen bis hin zu selteneren Krankheitsbildern wie der Blasenmole. Diese zählt zu den benignen Tumoren trophoblastären Ursprungs, die sich aus einer Zygote mit abnormem DNA-Gehalt entwickeln. Makroskopisch ist die Blasenmole durch die Ausbildung traubenförmig angeordneter Bläschen gekennzeichnet. Aus etwa 2,5% aller Blasenmolen entwickelt sich ein sogenanntes Chorionkarzinom (Horn et al. 2003). Dieses Karzinom stellt die schwerwiegendste Erkrankung im Rahmen trophoblastärer Fehlregulationen dar. Es handelt sich dabei um einen extrem aggressiven epithelialen Tumor aus entarteten Trophoblastzellen und ist unter anderem durch eine rasche Metastasierung in die Lungen charakterisiert (Shih und Kurmar 2002). Unbehandelt sterben mehr als 90% der betroffenen Patientinnen innerhalb des ersten Jahres.

1.3 Zytokine als Modulatoren der Invasion

Die erfolgreiche Implantation einer semiallogenen Zygote in das mütterliche Endometrium stellt auf den ersten Blick ein immunologisches Paradoxon dar. Trotz der Anwesenheit einer Vielzahl von endometrialen mütterlichen Immunzellen, vor allem natürlichen Killerzellen, kommt es erstaunlicherweise nicht zu einer Abstoßung des sich entwickelnden Embryos, sondern die Invasion der Trophoblastzellen in das mütterliche Gewebe wird unter anderem sogar von diesen Immunzellen durch vermehrte Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-6, IL-10, ...) begünstigt (Abrahams et al. 2004).

Dieses Beispiel zeigt, welche entscheidende Rolle Zytokine neben der bereits erwähnten Regulation durch MMPs und TIMPs für die Entstehung und den Erhalt einer Schwangerschaft spielen. Einen Überblick über die Funktion verschiedenster Zytokine vor allem während der Frühschwangerschaft soll Tabelle 1.1 geben.

Tabelle 1.1: Ausgewählte Zytokine und deren Bedeutung in der Frühschwangerschaft

Zytokin	Wirkung
Interleukin 1 (IL-1)	<ul style="list-style-type: none"> - wird von der Blastozyste gebildet - stimuliert die Produktion von MMP-9 - hemmt die Funktion von TIMP 1+3
Interleukin 6 (IL-6)	<ul style="list-style-type: none"> - stimuliert die Produktion von MMP-2 und MMP-9
Insulin-like-growth-factor II (IGF II)	<ul style="list-style-type: none"> - wird von Trophoblasten vor allem an der Invasionsstelle gebildet - Inhibition der TIMP-Produktion in der Dezidua
Leukaemia Inhibitory Factor (LIF)	<ul style="list-style-type: none"> - Stimulation der Trophoblastinvasion (ohne LIF bleibt die Invasion nach erfolgter Adhäsion aus) - in hoher Konzentration auch in Tumorzellen zu finden

Im Folgenden wird auf die in dieser Arbeit verwendeten Zytokine ausführlicher eingegangen.

1.3.1 Leukaemia Inhibitory Factor (LIF):

LIF ist ein aus 179 Aminosäuren bestehendes Glykopeptid. Es kommt sowohl in freier, biologisch aktiver Form als auch an Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) gebunden vor.

Dieses Zytokin wurde von Tomida et al. 1984 mit der Eigenschaft beschrieben, in der myeloischen Leukämie-Zelllinie M1 eine Differenzierung der Makrophagen zu induzieren.

Als allgemeine biologische Wirkung wurde zu dieser Zeit eine Stimulierung des hämatopoetischen

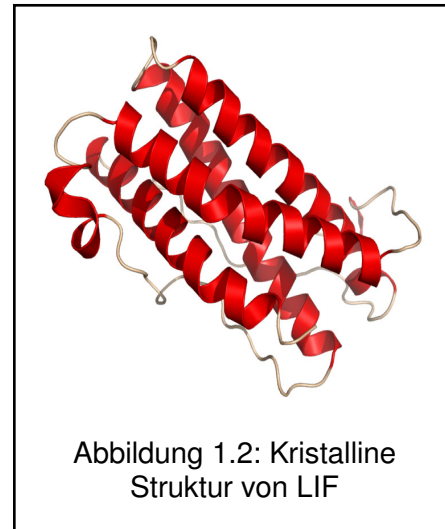
Systems angenommen, insbesondere der Megakaryozyten-Thrombozyten-Reihe (Tomida et al. 1984, Hilton et al. 1988).

Im weiteren Verlauf wurden weitere LIF-Effekte auf Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben jedoch auch in vielen anderen physiologischen Systemen beschrieben (Hilton 1992, Metcalf 1992). Herauszuheben ist hier die Bedeutung von LIF auf die Entwicklung der Blastozyste und die Implantation.

Während der Periimplantationsphase wird LIF von der Gebärmutterschleimhaut (Bhatt et al. 1991) und dem frühen Embryo produziert. Der Faktor scheint zum einen für die erfolgreiche Entwicklung der Blastozyste zwingend notwendig zu sein, zum anderen konnte wiederholt gezeigt werden, dass bei LIF-defizienten Mäusen eine Implantation der bis dahin regelrecht entwickelten Blastozyste nicht möglich ist (Cheng et al. 2002).

LIF scheint jedoch auch beim Menschen für die Etablierung einer Schwangerschaft von entscheidender Bedeutung zu sein: so konnte gezeigt werden, dass in endometrialen Gewebeproben von infertilen Frauen weniger LIF sezerniert wird als bei Frauen ohne Fertilitätsprobleme (Laird et al. 1997, Ledee-Bataille et al 2002).

Diese und weitere, hier ungenannte Ergebnisse, sprechen für eine zentrale Bedeutung von LIF für den Prozeß einer erfolgreichen Invasion (Morrish et al. 1998), Migration sowie Proliferation (Kayisli et al. 2002) von Trophoblastzellen (Fitzgerald et al. 2005a) und somit einer normalen Plazentation (Stewart et al. 1992).



1.3.2 Interleukin 6 (IL-6):

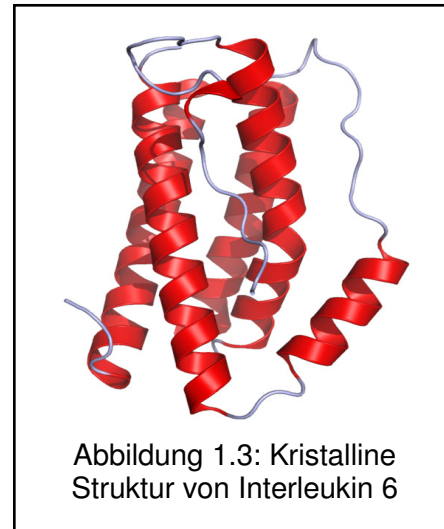
Interleukin 6 (IL-6) wird als inaktives Propeptid aus 212 Aminosäuren synthetisiert. Von diesem Propeptid wird das 184 Aminosäuren lange, aktive Interleukin 6 abgespalten.

Traditionell wird das Th2-Zytokin Interleukin 6 als Effektor der humoralen Immunantwort, als Aktivator der Akute-Phase-Reaktion sowie als Lymphozyten stimulierender Faktor angesehen (Mosmann und Coffman 1989).

Auch bei der Regulation der trophoblastären Implantation und Invasion während der Frühschwangerschaft wurde IL-6 immer wieder eine wichtige Bedeutung zugeschrieben, denn die Konzentration von Interleukin 6 zeigt einen typischen zyklischen Verlauf mit den höchsten IL-6-Spiegeln während der Sekretionsphase, dem Zeitfenster einer möglichen Implantation (Tabibzadeh et al. 1995).

IL-6 vermittelt seine Aktivität über die Bindung an einen hoch affinen Rezeptorkomplex an der Oberfläche der Zielzellen, welcher aus zwei membranproteinen besteht: einem 80 kDa IL-6-Bindungsprotein (Yamasaki et al. 1988) und einem 130 kDa Signaltransduktionsprotein (gp 130, Hibi et al. 1990), welches interessanterweise strukturell mit dem LIF-Rezeptor assoziiert ist (Gearing et al. 1991).

IL-6 reguliert zudem wichtige maternale endokrine Funktionen, indem es die Sekretion von Kortison, Wachstumshormon, Glukagon und Adrenalin steigert. Auch haben mehrere Studien die Relevanz der Expression von IL-6 im endometrialen Zellverband für die Entstehung und den Erhalt der frühen Schwangerschaft in den Mittelpunkt gerückt. So konnte gezeigt werden, dass IL-6 die Sekretion von hCG aus Trophoblastzellen erhöht. Zudem steigert IL-6 das trophoblastäre Proliferations- und Migrationsvermögen (Fitzgerald et al. 2005a) sowie die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 (MMP-2, MMP-9), durch welche Trophoblastzellen ihr lokales Invasionspotential in das endometriale Stroma erhöhen (Meisser et al. 1999). Auch ist bekannt, dass die IL-6-Bildung in Zyklen von Patientinnen mit gehäuft

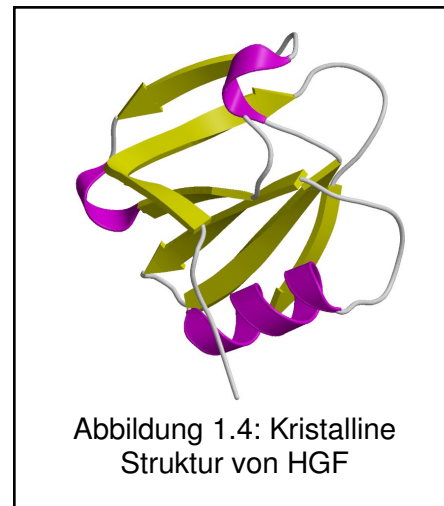


auftretenden frühen Aborten in der mittleren Sekretionsphase supprimiert ist (von Wolff et al. 2000, Jasper et al. 2007).

1.3.3 Hepatocyte Growth Factor (HGF):

Der Hepatozyten stimulierende Faktor (Hepatocyte Growth Factor) und sein starker mitogener Effekt auf Hepatozyten in vitro wurde erstmals von Michalopoulos et al. 1983 beschrieben.

HGF wird als inaktives Polypeptid von vielen Zellen mesenchymalen Ursprungs synthetisiert. Durch proteolytische Spaltung in eine 69 kDa alpha-Kette und 34 kDa beta-Kette sowie die Bindung beider Ketten über Disulfidbrücken entsteht die heterodimere, aktive Form (siehe Abbildung 1.4).



Heute ist bekannt, dass HGF von vielen mesenchymalen Zellen produziert wird und als multifunktionelles Zytokin auf Zellen epithelialen Ursprungs wirkt: insbesondere stimuliert es die Mitogenese, steigert die Proliferation, Invasion und Differenzierung von Trophoblastzellen (Stewart et al. 1996, Kauma et al. 1999) und vermindert gleichzeitig die trophoblastäre Apoptoserate (Dash et al. 2005). Außerdem steigert es die Zellmotilität von Tumorzellen (Comoglio und Boccaccio 2001). Es wurde beobachtet, dass eine verminderte Expression des HGF-Rezeptors auf Trophoblastzellen mit fetaler Wachstumsretardierung und Präeklampsie (Nasu et al. 2000) oder sogar mit einem möglichen Abort des Embryo assoziiert ist (Dokras et al. 2001).

1.4 Nekrose und Apoptose

Der Untergang einer Zelle kann grundsätzlich zweierlei Mechanismen zugeordnet werden:

1. Zelluntergang durch Nekrose
2. Zelluntergang durch Apoptose

Unter Nekrose versteht man den unvorhergesehenen und unmittelbar tödlichen Untergang einer oder mehrerer Zellen infolge direkter Zellschädigung durch Einwirkung verschiedenster exogener Noxen physikalischer oder chemischer Art.

Die Apoptose hingegen ist ein physiologischer Vorgang zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Zellneubildung und Zelluntergang. Sie bezeichnet die aktive Selbstzerstörung einer isolierten Einzelzelle durch ein genetisch gesteuertes Programm.

1.4.1 Nekrose

Bei der Nekrose verlieren Zellen durch äußere Einflüsse wie z.B. thermische, chemische, aktinische oder mechanische Alteration die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der zelleigenen Homöostase. Dies führt meist in größeren Bereichen des Gewebes zu einer Kondensation der Kernsubstanz und durch Einstrom von extrazellulären Ionen und Wasser zu einem Anschwellen der gesamten Zelle sowie der Zellorganellen, besonders der Mitochondrien. Die Folge ist das Bersten der Zelle durch Schädigung der Plasmamembran. Dadurch werden zytoplasmatische Bestandteile und Inhaltsstoffe von Zellorganellen wie z.B. der Lysosomen in den Extrazellularraum freigesetzt. Resultat ist eine direkte Schädigung des umliegenden Gewebes und zudem die Anlockung von Phagozyten und deren Ausschüttung von proinflammatorischen Botenstoffen. Die Nekrose einer Einzelzelle oder eines Zellverbandes stellt somit einen intensiven inflammatorischen Reiz dar und geht praktisch immer mit einer Entzündungsreaktion des Gewebes einher (Searle et al. 1982).

1.4.2 Apoptose

Die Apoptose beschreibt die Fähigkeit von Zellen, in Reaktion auf verschiedene intra- und extrazelluläre Signale den normalen Zellzyklus zu verlassen und eine Art „Selbstmord“ durchzuführen.

Das Phänomen der Apoptose, auch „physiologischer“ oder „programmierter Zelltod“ genannt, ist schon seit Jahrzehnten bekannt. Jedoch erst durch die detaillierte Beschreibung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose durch Kerr et al. im Jahre 1972 wurde die physiologische Zellelimination als eigenständige und genetisch kontrollierte Form des Zelltods erkannt und der Begriff Apoptose geprägt.

Der Begriff Apoptose (apo = ab, weg/los; ptosis = Senkung) stammt aus dem Griechischen und bezeichnet den Fall der Blätter im Herbst. Sie unterscheidet sich in vielen Punkten von dem oben beschriebenen Zelluntergang durch Nekrose:

Es handelt sich hierbei um ein vorbereitetes zelluläres Programm, das in bestimmten Situationen durch den Zellstoffwechsel aktiviert wird. Der Untergang von Zellen nach physiologischen Bedingungen stellt im Gegensatz zur Nekrose einen geregelten Prozess unter strikter molekularer Kontrolle dar. Sowohl die Sensitivität einer Zelle gegenüber einem Zelltod induzierenden Stimulus als auch der Ablauf des „Zelltodprogramms“ unterliegen einer komplexen genetischen Steuerung.

Die Apoptose weist zudem charakteristische biochemische und morphologische Merkmale auf (siehe auch Abbildung 1.5):

- das Chromatin verdichtet sich und wird durch spezifische DNAsen wie z.B. CAD zerstückelt → Zelle, Zellkern und Zellorganellen schrumpfen
- die Zelle stülpt bei intakter Zellmembran kleine Apoptosekörperchen (apoptotic bodies) aus und schnürt diese ab (sog. „membrane blebbing“)
- in vivo kommt es zur Phagozytose der Apoptosekörperchen durch Nachbarzellen sowie angelockte Makrophagen (Wiezorrek et al. 2000) und anschließendem lysosomalem Abbau → eine Entzündungsreaktion bleibt somit aus, da keine intrazellulären Substanzen freigesetzt werden

- in vitro kommt es zum Anschwellen und anschließender Lyse der „apoptotic bodies“

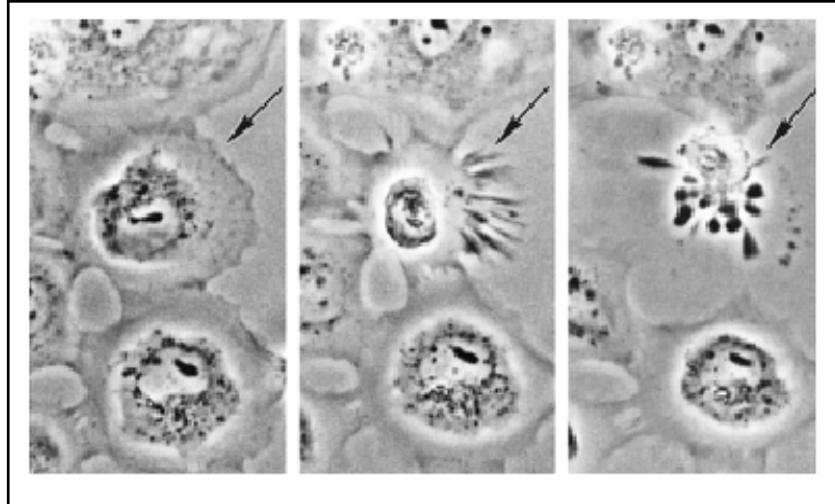


Abbildung 1.5: Die mit einem Pfeil markierte Tumorzelle zeigt typische apoptotische Veränderungen wie Zellschrumpfung, „membrane blebbing“ und die Loslösung von Untergrund und Zellverband.

1.4.3 Funktion der Apoptose

Lange Zeit hat man den Zelltod als ein für den Organismus grundsätzlich negatives Ereignis betrachtet. Dass der Zelltod eine wichtige regulatorische Funktion während der Entwicklung des Organismus sowie bei dessen Erhalt besitzt und damit einen zentralen Teil des Lebens darstellt, war eine überraschende Entdeckung (Kerr et al. 1972).

Unter physiologischen Bedingungen wird in körpereigenen Geweben durch regulatorische Mechanismen eine Homöostase der Zellzahl aufrechterhalten. Zellen in der sogenannten G₀- oder G₁-Phase sind proliferationsfähig und können über Teilung zu einem Anstieg der Zellzahl oder zu Zelldifferenzierung führen. Alternativ zur Proliferation kann es über den Weg der Apoptose zur Abnahme der Zellzahl kommen, um funktionslose, geschädigte oder für den Organismus schädliche Zellen zu eliminieren.

Bereits während der Embryonalentwicklung spielt der gezielte, apoptotisch induzierte Tod bestimmter Zellen eine wichtige Rolle:

So erfolgt während der Entwicklung des Embryos die Formgebung von Körper und Organen durch Apoptose. Beispielsweise werden die Häute zwischen Zehen und Fingern in der menschlichen Embryonalentwicklung apoptotisch entfernt. Störungen dieses Rückbildungsprozesses können z.B. zu bestimmten Extremitätenfehlbildungen wie der Syndaktylie führen. Auch die Ausbildung der Lumina des gesamten Gastrointestinaltrakts erfolgt durch das genetisch gesteuerte Programm des physiologischen Zelltods. Kommt es zu Störungen in diesem Prozess, können membranöse Fehlbildungen und Atresien in diesen Bereichen die Folge sein.

Auch in der Entwicklung des Gehirns spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle: Nervenzellen werden in der Embryonalentwicklung des Menschen im Überschuss angelegt. Wenn sie im weiteren Verlauf der Entwicklung keinen Kontakt zu benachbarten Neuronen herstellen können, fehlen den Nervenzellen Wachstumsfaktoren wie NGF (nerve growth factor) oder CDF (chord development factor) und sie gehen in Apoptose über.

Eine besondere Bedeutung hat die Apoptose bei der Selektion von Keimzellen (Eizellen und Spermien). Jede krankhafte Veränderung im genetischen Material dieser Zellen würde sich unweigerlich auf die Nachkommen übertragen. Hier ist deshalb ein besonders strenges Kontrollsystem erforderlich. Daher werden auch rund 95% der Keimzellen vor dem Erreichen ihrer Reife apoptotisch und anschließend resorbiert.

Im Verlauf des Lebens entfernt die Apoptose nicht mehr funktionsfähige oder nicht mehr benötigte und kranke Zellen aus dem Organismus. Daher spielt sie in allen Geweben eine große Rolle, in welchen Zellen neu gebildet werden oder in denen ein ständiger Umbau erfolgt. Das gilt z.B. für den Darm oder die Haut, die in andauernder zellulärer Erneuerung stehen, aber auch für die Gebärmutter Schleimhaut oder die Brustdrüsen, die während des weiblichen Zyklus einer ständigen morphologischen Veränderung unterliegen.

Das Blutbildungs- und das Immunsystem sind weitere Organe, für deren Entwicklung und Funktion die Apoptose essenziell ist:

Sich entwickelnde Lymphozyten rearrangieren ihre Antigen-Rezeptor-Gene. Nur Rezeptoren, die von funktionell rearrangierten Genen kodiert werden, gelangen an die Zelloberfläche. Lymphozyten, die Fremdartigene erkennen und präsentieren könnten, müssen erhalten werden (positive Selektion). Solche, die körpereigene Strukturen erkennen, werden eliminiert (negative Selektion). So werden nur Lymphozyten mit geeigneter Antigen-Spezifität am Leben erhalten. Die Mehrheit der Lymphozyten, das sind etwa 75 Prozent der B-Lymphozyten-Vorläufer und 95 Prozent der T-Lymphozyten-Vorläufer, werden so während der Entwicklung durch Apoptose eliminiert.

Apoptose tritt aber nicht nur in der Entwicklung eines kompetenten Immunsystems auf, sie ist auch für seine optimale Funktion unerlässlich. Bei einer Infektion regen Moleküle des Erregers (Fremdartigene) Lymphozyten zur Ausreifung an, um das infektiöse Agens zu bekämpfen. Aktivierte zytotoxische T-Lymphozyten eliminieren z.B. virusinfizierte Zellen, indem sie spezifisch deren Apoptose induzieren. Wenn die Erreger schließlich beseitigt sind, muss die Immunantwort wieder herunterreguliert werden, da die stimulierten Lymphozyten weiterhin für den Organismus potentiell gefährliche Zytokine produzieren und sezernieren würden. Auch dies geschieht wieder durch Apoptose. Am Ende einer jeden Immunreaktion induzieren die aktivierten T-Lymphozyten entweder bei sich selbst oder gegenseitig die Apoptose. Die Zellzahl der peripheren Lymphgewebe erreicht so wieder den Ausgangszustand.

Auch durch verschiedenste Einflüsse genetisch veränderte Zellen müssen beseitigt werden. Beispiele für den Einsatz des Apoptoseprogramms sind hierfür Zellen, die durch mutagene Agenzien geschädigt wurden und tumorartig entarten oder von Viren infizierte Zellen, die eine Ansteckungsgefahr darstellen können.

Diese zahlreichen Beispiele machen die essentielle Bedeutung der Apoptose für den Organismus deutlich und zeigen, welche Folgen Fehler in der Regulation der Apoptose haben können.

Auf die Bedeutung der Apoptose für Plazentation und Schwangerschaft wird ausführlich in Kapitel 1.5 eingegangen.

1.4.4 Apoptose als Ursache für Krankheiten

Bei einer Vielzahl von akuten und chronischen Krankheiten spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle. Hierbei muss unterschieden werden zwischen Krankheiten, die mit einer gesteigerten und solche, die mit einer verminderten Apoptoserate einhergehen. Folgende Liste soll einen kurzen Überblick über ausgewählte, mit dem Prozess der Apoptose in Verbindung gebrachte Krankheiten geben:

Gesteigerte Apoptose bei

- HIV (T-Helferzellverlust durch Apoptoseinduktion bei Kontakt von HIV-infizierten mit uninfizierten CD4+ T-Lymphozyten (Stocker et al. 2000))
- Schlaganfall (Ischämie/Reperfusion-Modell: Sauerstoffradikale induzieren neuronale Apoptose (Zador et al. 2003, Ekshyyan und Aw 2004))
- neurodegenerativen Erkrankungen (Friedlander 2003) wie z.B.
 - M. Alzheimer (Eckert et al. 2003, Katayama et al. 2004),
 - M. Parkinson (Tatton et al. 2003) und
 - INCL (Kim et al. 2006)
- akuten Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation

Verminderte Apoptose bei

- Autoimmunerkrankungen durch gestörte negative Selektion autoreaktiver Immunzellen in der lymphozytären Reifungsphase
 - Diabetes mellitus (Autoantikörper gegen pankreatische Insel-Zellen)
 - Systemischer Lupus erythematoses (anti-dsDNA-Antikörper)
- Krebs durch
 - Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 (Cory et al. 2003)
 - Modulation des p53-Signalweges (Halaby et al. 2007)
 - Unterdrückung pro-apoptotischer Proteine (Bax, Apaf-1, Caspasen, Todesrezeptoren (CD95, TRAIL-1, TRAIL-R2))
- Viruserkrankungen (Viren nutzen anti-apoptotische Moleküle, um die Apoptose der infizierten Wirtszelle zu blockieren)
Beispiele für virale Apoptose-Inhibitoren:
 - CrmA des Kuh-Pockenvirus (Komiyama et al. 1994)
 - p35 des Baculovirus (Xue und Horvitz. 1995)

1.5 Caspasen - mehr als nur Motoren der Apoptose

Die Apoptose ist ein äußerst komplexer Vorgang mit einer bis heute nicht vollständig aufgeklärten und verstandenen Reihe an Regulationsmechanismen. Eine Vielzahl von Enzymen und Proteinen ist an diesem zellulären Selbstmordprogramm beteiligt, im Mittelpunkt steht jedoch eine bestimmte Gruppe von Enzymen, die Caspasen.

Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine spezifisch nach der Aminosäure Aspartat schneiden, sogenannte Cysteiny-Aspartasen (Alnemri 1997).

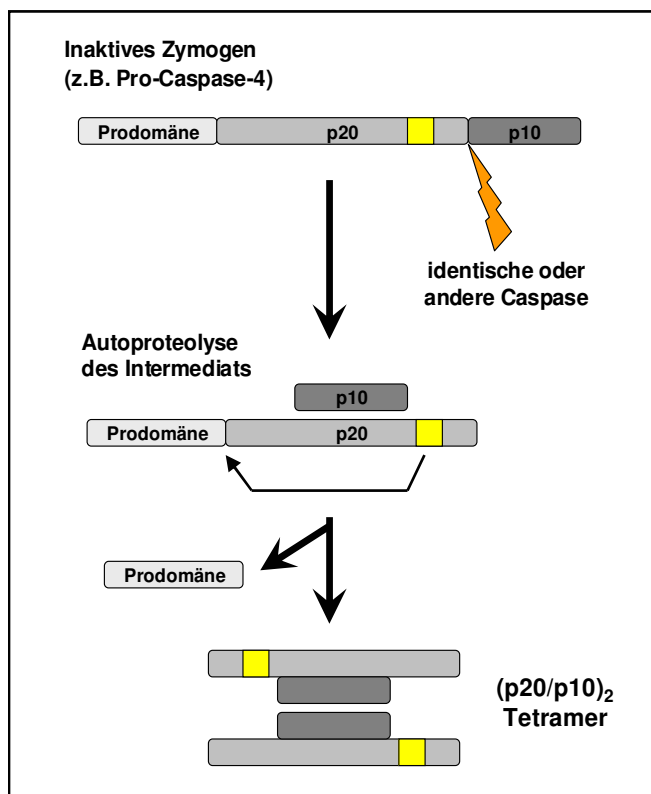


Abbildung 1.6:
Schematische Darstellung des
Aktivierungsvorgangs von
Caspasen am Beispiel
von Caspase-4

Caspasen werden ausschließlich als katalytisch inaktive Proenzyme, sogenannte Zymogene exprimiert. Diese sind aus einer unterschiedlich langen amino-terminalen Prodomäne sowie einer großen (ca. 20 kDa) und einer kleinen Untereinheit (ca. 10 kDa) aufgebaut (Cryns und Yuan 1998, Thornberry 1998). Die proteolytische Prozessierung zur Aktivierung der Caspasen bedarf mindestens zwei aufeinanderfolgender Spaltungen an Aspartatresten, um die große und kleine Untereinheit voneinander und von der Prodomäne zu trennen. Caspasen sind in ihrer

aktiven Konformation heterotetramere Proteine. Dieser heterotetramere Komplex setzt sich aus zwei identischen großen und zwei identischen kleinen Untereinheiten zusammen.

Bisher sind 14 verschiedene Caspasen bekannt, von denen 11 beim Menschen nachgewiesen werden können (Droin et al. 2000).

Diese werden nach heutigem Erkenntnisstand aus phylogenetischer Sicht und ihrer vorrangigen Funktion in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt (Nicholson 1999):

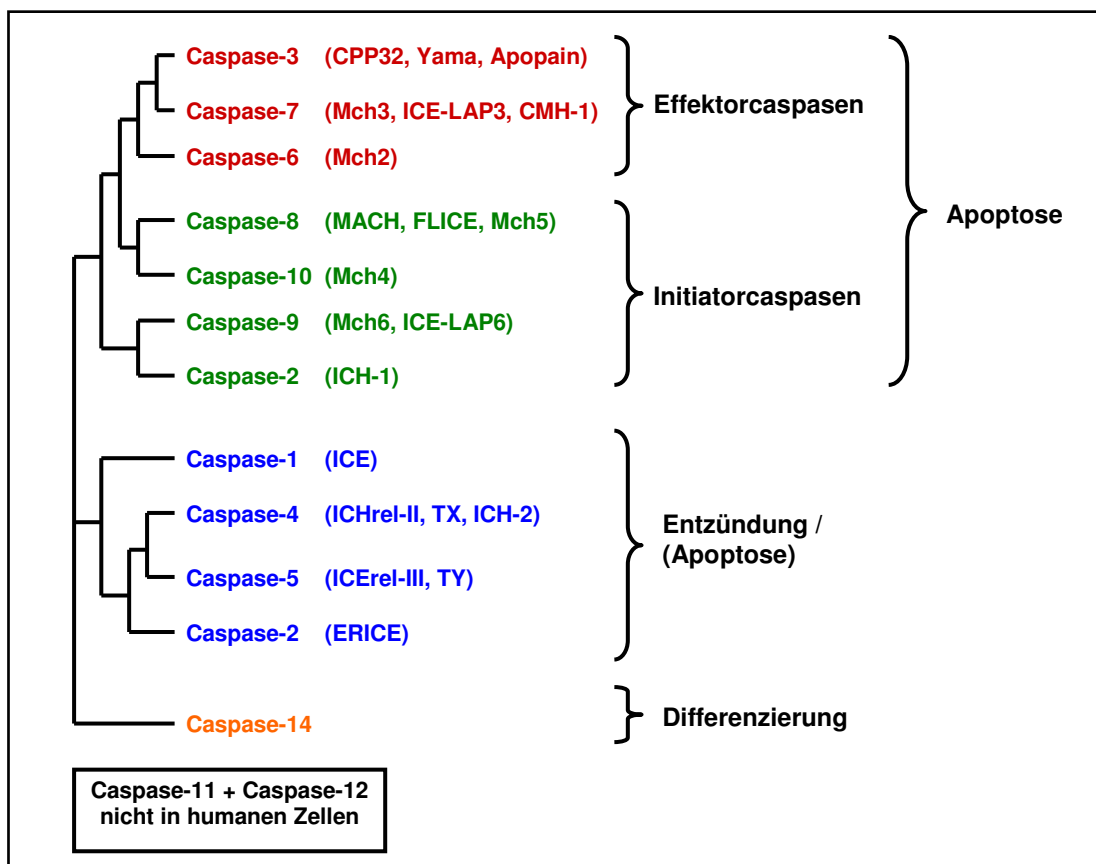


Abbildung 1.7: Einteilung der Caspasen nach strukturellen und funktionellen Gesichtspunkten

Die sogenannte **ced-3-Subfamilie** (ced = cell death) dient der Ausführung und Regulation des Apoptose-Prozesses.

Sie besitzt ihren Namen in Anlehnung an die ersten Apoptose-Gene, welche durch Ellis und Horvitz im Jahre 1991 in Apoptose-Studien an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) erstmals beschrieben wurden. Die genetischen Analysen dieses Fadenwurms, während dessen Entwicklung insgesamt 131 Zellen in

Apoptose gehen, machten es möglich, wichtige Ereignisse im Verlauf des programmierten Zelltodes zu identifizieren. Im Vergleich zu *C. elegans* ist der Mechanismus des programmierten Zelltodes in evolutionär höheren Organismen wesentlich komplizierter und verzweigter aufgebaut (Aravind et al. 2001). Die Grundmechanismen scheinen jedoch die gleichen zu sein.

Die *ced-3*-Subfamilie wird funktionell noch einmal in zwei Subgruppen unterteilt:

Die **Initiator-Caspasen** (siehe Abbildung 1.7, grün) stehen am Beginn der zahlreichen intrazellulären Apoptose-Kaskaden. Sie werden durch verschiedenste extra- und intrazelluläre Apoptose-Signale aktiviert.

Die **Effektor-Caspasen** (siehe Abbildung 1.7, rot) werden im Verlauf von den Initiator-Caspasen aktiviert und

- dienen dem Abbau von Zellstrukturproteinen wie Laminin, Fodrin oder Gelsolin,
- aktivieren ihrerseits spezifische Endonukleasen wie das CAD/ICAD-System zur DNA-Degradierung (Nagata 2000, Widlak 2000) und
- inaktivieren gleichzeitig zelluläre DNA-Reparaturenzyme wie die Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP).

Somit spielen diese Caspasen eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und zellulären Degradierung während des Apoptoseprozesses.

Die sogenannte **ICE-Subfamilie** (siehe Abbildung 1.7, blau) umfasst eine Reihe strukturähnlicher Caspasen. Die Funktion des zuerst beschriebenen Mitglieds dieser Gruppe, Caspase-1 (ICE), liegt vorrangig in der Prozessierung proinflammatorischer Zellbotenstoffe wie z.B. Prointerleukin-1 β (Thornberry et al. 1992, Yuan et al. 1993) und war so namensgebend (ICE = interleukin-1 β converting enzyme). Im Verlauf wurden aufgrund von Strukturähnlichkeiten weitere neu entdeckte Caspasen wie die Caspasen 4 und 5 dieser Subfamilie zugeordnet, deren Funktionen jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden konnten.

1.5.1 Caspase-4 (ICH-2 / TX / ICE_{rel-II})

Caspase-4, welche strukturell der ICE-Subfamilie zugeordnet wird, wurde erstmals 1995 von Kamens et al. beschrieben. Dieser führte mit der bekannten genetischen Kodiersequenz für Caspase-1 (ICE) ein Screening der humanen Thymus-cDNA-Bibliothek „Clontech“ durch und stieß dabei auf ein strukturell verwandtes Protein, welches er ICH-2 (ICE and ced-3 homolog 2) nannte.

Im selben Jahr konnten Munday et al. das Enzym ICH-2, welches mittlerweile auch als Caspase-4 bezeichnet wurde, aus menschlichen Monozyten isolieren und sowohl Struktur als auch Funktion erstmals näher beleuchten.

Caspase-4 ist ein 43,3 kDa Polypeptid aus 377 Aminosäuren, welches durch ein Gen auf dem langen Arm von Chromosom 11 (Genlokus: 11q22-11q23) kodiert wird und eine Strukturhomologie von 53 Prozent mit Caspase-1 aufweist (Kamens et al. 1995, Kamada et al. 1997). Die Bildung erfolgt, wie bei allen Caspasen, als inaktives Proenzym (Zymogen), bestehend aus einer Prodomäne sowie einer großen und einer kleinen Untereinheit (siehe Abbildung 1.8).

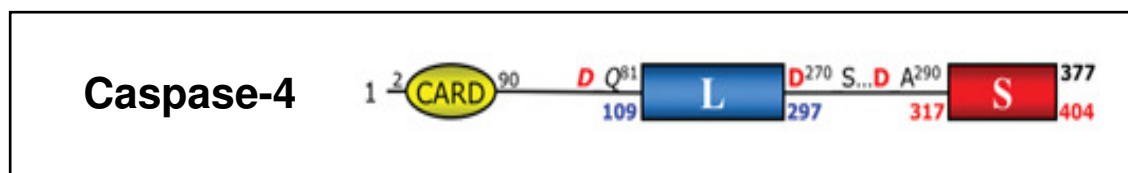


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der inaktiven Procaspase-4: Prodomäne CARD, die große 20kDa-Untereinheit (L=large) und die kleine 10kDa-Untereinheit (S=small)

Durch Abspaltung der Prodomäne CARD (caspase recruiting domain) mittels Autoproteolyse oder durch die Caspasen 8 und/oder 10 sowie anschließender Heterodimerisierung entsteht die aktive Form (siehe Abbildung 1.6 und 1.8) (Karki et al. 2007).

Obwohl aufgrund von Strukturhomologien in die ICE-Subfamilie eingeordnet, zeigte sich nach weiteren Untersuchungen die funktionelle Diversität zu Caspase-1.

So konnten Munday et al. 1995 zeigen, dass es in mit Caspase-4 transfizierten Zellen nur zu einer minimalen Prozessierung von Prointerleukin-1 β kam, während diese in Caspase-1-transfizierten Zellen eindeutig nachweisbar war.

Auch verschiedene andere Untersuchungen (Kamens et al. 1995, Kamada et al. 1997) zeigten Substratdiversitäten dieses jüngeren Mitglieds der ICE-Subfamilie und brachten Caspase-4 immer wieder in Zusammenhang mit dem physiologischen Zelltod via Apoptose (siehe Kapitel 1.2.6.1).

Dies geschah erstmals, als Faucheu et al. 1995 zeigten, dass eine durch Transfektion hervorgerufene Überexpression von Caspase-4 in der Fibroblasten-Zelllinie COS zu einer deutlich erhöhten Apoptoserate in diesen Zellen führte.

Immer wieder wurde Caspase-4 in den darauffolgenden Jahren, direkt oder indirekt, mit den intrazellulären Mechanismen der Apoptose in Verbindung gebracht, gleichzeitig aber deren Beteiligung am programmierten Zelltod auch mehrfach wieder in Frage gestellt.

Die folgende Auflistung soll einen kurzen Überblick über die zum Teil kontroverse Diskussion bezüglich der Funktion von Caspase-4 in der Fachliteratur geben:

Kamada et al. 1997: “Caspase-4 transmits a death signal from caspase-8 to caspase-3 in Fas-mediated apoptotic pathway by cleaving pro-caspase-3“

Ahn et al. 2002: “IFN- γ upregulates caspase-4 in apoptosis of human cholangiocarcinoma cells“

Obeng und Boise 2005: “Caspase-4 is not required in ER stress-induced cell death“

Pelletier et al. 2006: “Activation of caspase-4 while apoptosis of plasma cells“

Kim et al. 2006: “Endoplasmic reticulum stress-induced caspase-4 activation mediates apoptosis and neurodegeneration in INCL”

Liao et al. 2008: “Involvement of endoplasmic reticulum in paclitaxel-induced apoptosis”

Neben dieser möglichen Bedeutung von Caspase-4 in der molekularen Regulation der Apoptose gilt jedoch als gesichert, dass die Funktion von Caspase-4 vor allem in

der Prozessierung von Procaspase-1 in die aktive Form Caspase-1 liegt (Faucheu et al. 1995, Wang et al. 1998).

Zudem konnte, die Ergebnisse von Munday et al. 1995 bestätigend, gezeigt werden, dass Caspase-4 zwar an der proteolytischen Aktivierung von Caspase-1 beteiligt ist, jedoch selbst trotz großer Strukturhomologie mit Caspase-1 nicht bzw. nur in geringem Maße wie Caspase-1 den proinflammatorischen Botenstoff Prointerleukin-1 β zu prozessieren vermag (Fassy et al. 1997).

Laut Genatlas der Université René Descartes, Paris wird Caspase-4 in vielen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert. Neben dem Vorkommen in Plazenta und Uterus wurde bis heute eine vermehrte Expression dieses Enzyms vor allem für weitere Organe wie Herz, Leber, Milz und Knochen beschrieben. Die Funktion von Caspase-4 in diesen Geweben ist jedoch bis heute völlig unklar.

Auch über die Regulation der Genexpression und Enzymaktivität von Caspase-4 bis heute nur wenig bekannt.

Als Negativ-Regulatoren der Caspase-4-Aktivität gelten selektive Caspase-Inhibitoren wie z.B. das virale „cowpox-encoded protein“ CrmA und der antiapoptotische Transkriptionsfaktor p53 (Kamada et al. 1997).

Das Zytokin Leukeamia Inhibitory Factor (LIF) scheint über die Steigerung der Genexpression einen positiven regulatorischen Einfluss auf Caspase-4 zu haben (Fitzgerald et al. 2005b).

1.6 Apoptose und Schwangerschaft

1.6.1 Mechanismen der Invasion und Plazentation

Nach Befruchtung einer Eizelle und deren Entwicklung zur Blastozyste erfolgt nach Adhäsion an das Uterusepithel das kontinuierliche Einwachsen in das mütterliche Endometrium. Diese Vorgänge, welche als Implantation und Invasion bezeichnet werden, geschehen durch stete Induktion von Apoptose des umgebenden, endometrialen Stromas (Harris et al. 2006).

1.6.2 Funktion der Apoptose in der Plazenta

Wie bereits dargestellt, spielt der Vorgang der Apoptose für die Entwicklung der Frühschwangerschaft und auch später während der Morpho- und Organogenese des heranwachsenden Fetus eine zentrale Rolle.

Apoptose ist jedoch nicht nur für die fetale Entwicklung unerlässlich sondern auch in einem weiteren, sich gleichzeitig entwickelnden Organ, der Plazenta von herausragender Bedeutung. Hierbei findet sich Apoptose über den gesamten Verlauf einer Schwangerschaft in unterschiedlichem Ausmaß (Kim et al. 1995). Das besondere Augenmerk der Forschung gilt jedoch besonders dem ersten und dem letzten Trimester. Das Instrument des programmierten Zelltods erfüllt in diesen beiden jeweiligen Stadien der Schwangerschaft durchaus unterschiedliche Aufgaben und betrifft unterschiedliche Zellpopulationen.

In der Frühschwangerschaft kommt es zur gesteigerten Expression von Fas-Ligand durch den Zellverband des invadierenden Synzytiotrophoblasten, was nach Interaktion mit auf endometrialen Stromazellen exprimiertem Fas-Rezeptor zur Apoptose derselben führt (Uckan et al. 1997).

Gleichzeitig ist die Empfindlichkeit der invadierenden Trophoblastzellen selbst gegenüber apoptotischen Stimuli deutlich vermindert, was auf eine vermehrte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in diesen Zellen zurückgeführt wird (Kim et al. 1995).

Im Gegenzug dazu ist eine gesteigerte trophoblastäre bzw. plazentare Apoptoserate im 3. Trimester normal und scheint für das Ende der Schwangerschaft und die Einleitung der Geburt wichtig zu sein (Reed et al. 1994, Smith et al. 1997).

Diese Vermutung deckt sich mit Beobachtungen, die gezeigt haben, dass bei einer Überschreitung des errechneten Geburtstermins die Zahl der apoptotischen Kerne im villösen Trophoblasten deutlich ansteigt, was wiederum auf eine Bedeutung der Apoptose im physiologischen Alterungsprozess der Plazenta hindeutet (Axt et al. 1999).

Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl Initiator- als auch Effektor-Caspasen generell in Zellen aktiviert sind, die sich -unabhängig von der Embryonalentwicklung- in Differenzierung und strukturellem Umbau befinden. In Zytotrophoblastzellen z.B. kommt es vor allem während der frühen Phase der Plazentation in Vorbereitung der Fusionierung zum Synzytiotrophoblasten aber auch während der gesamten weiteren Schwangerschaft zu einem massiven Ab- und Umbau des Zytoskeletts der Zellen, wobei eine deutlich vermehrte Aktivität vor allem der Effektor-Caspasen nachweisbar ist (Black et al. 2004).

Außerdem dient diese Gruppe von Caspasen unter anderem dem Abbau und der Fragmentierung alter Zellkerne sowie deren Abschnürung und Abstoßung in sogenannten syncycial knots innerhalb des multinukleären Zellverbands des Syzytiotrophoblasten (Nelson 1996, Huppertz et al. 1998, Mayhew et al. 1999). Auch andere Zellen wie die Faserzellen der Augenlinse, Keratinozyten und Erythrozyten entledigen sich im Laufe ihrer Differenzierung auf diese Weise ihrer Zellkerne und gewisser Zellorganellen (Ishizaki et al. 1998, Morioka et al. 1998).

1.6.3 Pathologien der Schwangerschaft und deren klinische Bedeutung

Treten während des Stadiums der Invasion und Plazentation Störungen z.B. im Sinne einer gesteigerten trophoblastären Apoptoserate auf, kann die Ausbildung eines insuffizienten plazentaren Apparates resultieren. Diese Tatsache korreliert mit einer erhöhten Inzidenz für Komplikationen wie einem vorzeitigen Verlust der Schwangerschaft sowie Präeklampsie und IUGR (intrauterine growth restriction).

Spontane und habituelle Aborte

Erleidet eine Frau drei oder mehr aufeinander folgende Fehlgeburten, so spricht man von habituellen Aborten oder wiederholten Fehlgeburten. Von dieser Form der Schwangerschaftspathologie sind 0,5-1 % aller schwangeren Frauen betroffen.

In der Literatur finden sich zahlreiche Belege dafür, dass die pathophysiologischen und pathoanatomischen Ursachen dieser Schwangerschaftspathologie zum einen durch ein vermindertes Invasionspotential, zum anderen durch eine erhöhte Apoptoserate im Bereich der sich entwickelnden oder ausgereiften Plazenta bedingt sein könnten.

So konnte gezeigt werden, dass die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 innerhalb des Synzytiotrophoblasten von Frauen mit sporadischen oder habituellen Aborten durchweg vermindert (Lea et al. 1997) und die Rate an apoptotischen Zellen im Synzytiotrophoblasten in Fällen spontaner Aborte, im Gegensatz zu normalen Schwangerschaften, deutlich erhöht ist (Kokawa et al. 1998).

Minas et al. konnten 2007 in abortiven Deziduas vermehrt Fas-L-positive Leukozyten nachweisen und zudem extravillöse Trophoblastzellen, die eine gesteigerte Expression von Fas sowie erhöhte Raten an Apoptose aufwiesen.

Plazentare Insuffizienz und intrauterine Wachstumsrestriktion (IGUR)

Als plazentare Insuffizienz oder Störung der feto-maternalen Einheit wird in der geburtshilflichen Medizin das mangelnde Vermögen des Mutterkuchens (Plazenta) bezeichnet, die nutritive Versorgung des sich entwickelnden Fetus zu gewährleisten. Auch die für den Erhalt einer Schwangerschaft erforderliche Produktion von Hormonen wie Östrogen, Gestagen und humanem Chorion-Gonadotropin (hCG) ist vermindert. Folgen sind eine mangelnde Versorgung des Fetus mit Sauerstoff und Nährstoffen mit resultierender intrauteriner Wachstumsretardierung des

heranwachsenden Kindes. Das Risiko der Frühgeburtlichkeit ist hierdurch deutlich erhöht (Wollmann 1998). Postnatale Komplikationen wie Hypoglykämie und Hypokalzämie sowie ein dauerhaft bestehender Minderwuchs, erhöhte Inzidenzen für Diabetes mellitus Typ II und kardiovaskuläre Erkrankungen im Erwachsenenalter sind zudem beschrieben (Wollmann 2004).

Als mögliche Ursache für die Insuffizienz der feto-maternalen Einheit wird unter anderem eine deutlich erhöhte plazentare Apoptoserate diskutiert. So konnte in Plazentagewebe von Schwangerschaften mit intrauteriner Wachstumsretardierung immunhistochemisch eine deutlich höhere Anzahl an apoptotischen Zellkernen im Bereich des villösen Trophoblasten nachgewiesen werden als in Plazenten von unkomplizierten Schwangerschaften (Axt et al. 1999).

Präeklampsie

Die Präeklampsie, auch EPH- oder Spätgestose genannt, bezeichnet eine Erkrankung während der Schwangerschaft, welche mit erhöhten Blutdruckwerten einhergeht (sogenannte Schwangerschaftshypertonie). Charakterisiert ist die Präeklampsie zudem durch das Vorliegen von Ödemen und einer Proteinurie. Aus diesen drei Leitsymptomen ergibt sich auch der heute nicht mehr gebräuchliche Name EPH-Gestose.

Die exakten Pathomechanismen dieser hypertensiven Schwangerschaftserkrankung sind bis heute nicht vollständig verstanden. Die meisten Autoren sehen eine lokale, inadäquate Trophoblastinvasion in die myometranen Segmente der uterinen Spiralarterien mit resultierender plazentarer Ischämie als initiales Ereignis in der Pathogenese der Präeklampsie an. Die hieraus resultierende plazentare Hypoxämie könnte im Verlauf durch Freisetzung verschiedener biologisch aktiver Substanzen wie z.B. Zytokine zu einer generalisierten endothelialen Dysfunktion mit verminderter Produktion und Freisetzung von lokal vasodilatatorischen Substanzen wie z.B. „nitric oxide“, Prostazyklinen oder „endothelium-derived hyperpolarizing factor“ führen.

Wie diese Beispiele zeigen, sind die molekularen Mechanismen der Implantation und Plazentation sowie deren Regulation und Störungen sowohl von wissenschaftlichem Interesse als auch größter klinischer Bedeutung und bedürfen deshalb weiterer Erforschung und Aufklärung.

Ziele der Arbeit

2.1 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Erkenntnisse über die Funktion von Caspase-4 in der humanen Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 als Modell für Trophoplastzellen zu erlangen. Hierüber finden sich in der Literatur keinerlei Erkenntnisse und auch über die generelle Funktion von Caspase-4 ist bis jetzt nur wenig bekannt.

Ausgehend von den Ergebnissen von Fitzgerald et al. 2005b soll überprüft werden, ob das Zytokin LIF neben einer vermehrten Genexpression auch zu einem direkten Anstieg der Enzymaktivität von Caspase-4 führt.

Ein weiterer Fokus wird in dieser Arbeit auf den Einfluss von Caspase-4 auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten von JEG-3-Zellen gelegt.

Zudem soll evaluiert werden, ob die Zytokine IL-6 und HGF dieselben Effekte in Bezug auf die Enzymaktivität von Caspase-4 sowie das Proliferations- und Apoptoseverhalten von JEG-3-Zellen ausüben wie LIF.

Hierfür wurden 3 Arbeitshypothesen formuliert.

2.2 Arbeitshypothesen

- Die Stimulation der Zelllinie JEG-3 mit LIF führt nicht nur zu einer vermehrten Genexpression von Caspase-4, sondern hat auch einen direkten Einfluss auf deren Enzymaktivität
- Caspase-4 hat Einfluss auf das Proliferationsverhalten von humanen Chorionkarzinom-Zellen der Zelllinie JEG-3
- Caspase-4 ist direkt in die Regulation des Apoptoseverhaltens von humanen Chorionkarzinom-Zellen der Zelllinie JEG-3 involviert

Methodik

3.1 Die Zelllinie JEG-3

Diese Zelllinie wurde im Jahre 1971 von Kohler und Bridson aus der Hirnmetastase eines humanen Chorionkarzinoms isoliert. Vom Ursprungsgewebe ausgehend existieren heute insgesamt 124 Subkulturen.

Diese Tumorzellen haben eine epitheloide Morphologie und wachsen in vitro adhärent als Monolayer. Sie besitzen einen

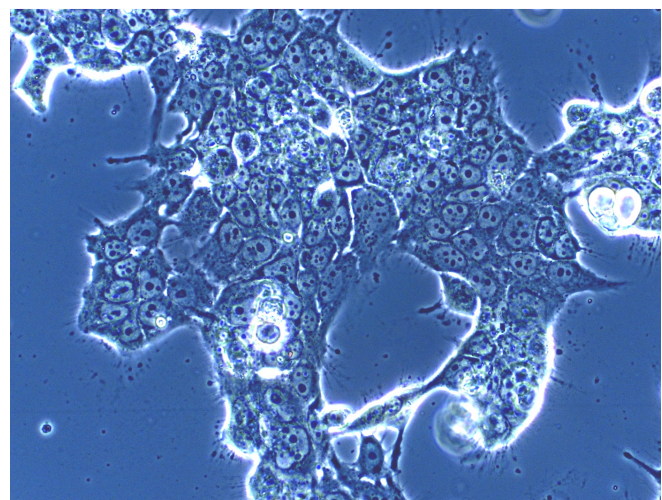


Abbildung 3.1: Zelllinie JEG-3 in Kultur

hypertriploiden Chromosomensatz, wobei die mittlere Chromosomenzahl bei 71 liegt. Bei den meisten der Zellen können insgesamt 11 Chromosomenanomalien wie bestimmte Translokationen, Deletionen und Inversionen etc. beobachtet werden. Neben einer Vielzahl von seltener auftretenden Eigenschaften konnte unter insgesamt 50 Prozent der Zellen ein Y-Chromosom nachgewiesen werden (vgl. American Type Culture Collection, Version 4.200201).

JEG-3 produziert humanes Choriongonadotropin (β -HCG), humanes Chorion-Somatomammotropin und Progesteron. Ferner können die Zellen aus steroidalen Vorstufen Östron und Östradiol synthetisieren.

3.2 Kultur der Zelllinie

Die Zelllinie wurde in 50ml-Zellkultur-Flaschen mit 20-25 ml entsprechendem DMEM-Medium I im Zellkulturschrank unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, humide Atmosphäre) in Kultur gehalten.

Entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit konnten die Zellen alle 3-5 Tage in Einzelzellsuspensionen überführt und in neue Kulturflaschen aufgeteilt, zu Versuchen herangezogen oder zur Lagerung bei -80°C eingefroren werden. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgenommen, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und 1 ml Trypsin zugegeben. Nach einer

Inkubation von 5 Minuten unter Standardbedingungen lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche. Danach wurden die abgelösten Zellen entweder zu Versuchen gebraucht oder verworfen.

3.3 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien

Die Zellen wurden zum Einfrieren, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, in Einzelzellsuspensionen überführt und bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Einfriermedium (95% DMEM-Medium I, 5% Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt und diese anschließend bei -80°C gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen in einem Wasserbad zügig aufgetaut und in entsprechendem Medium aufgenommen. Nach anschließender Zentrifugation (1500 rpm, 5 Minuten) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in DMEM-Medium I resuspendiert, um in 50ml-Zellkultur-Flaschen kultiviert zu werden.

3.4 Transfektion der Zellen mittels „small interfering“ RNA (siRNA)

Hintergrund

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Mechanismus der sequenz-spezifischen posttranskriptionalen Genregulation, der über sogenannte small interfering RNAs (siRNAs) vermittelt wird. In Zellen werden doppelsträngige RNA-Moleküle von einem Dicer-Komplex erkannt und aufgespalten. Es entstehen hierbei 21 bis 23 Nukleotide lange siRNA-Duplexe, die meist aus einer 19 Nukleotide langen Doppelstrangregion mit Einzelstrangüberhängen von je zwei Nukleotiden bestehen. Diese siRNA-Moleküle werden in den RNA inducing silencing complex (RISC) aufgenommen. Der RISC ist ein Multiproteinkomplex mit vier verschiedenen funktionellen Untereinheiten: einer Helikase, einer Exo- und einer Endonuklease sowie Homologie-suchenden Domänen. Das an den RISC-Komplex gebundene siRNA-Duplex wird durch die Helikase entwunden (Kisielow et al. 2002). Dadurch entstehen zwei Einzelstränge, von denen einer der beiden Einzelstränge den RISC-Komplex zu der komplementären Ziel-mRNA führt. Nach der Bindung des siRNA-

RISC-Komplexes wird die mRNA gespalten (Scherr und Eder 2007). Der Schnitt in der Mitte des siRNA-mRNA-Duplex erfolgt durch die Aktivität der Endo- und der Exonuklease. Die gesplattene mRNA wird nun angreifbar für RNAsen. Die Degradierung der mRNA durch die RNAsen verhindert die Translation und somit auch die Neusynthetisierung eines Proteins (Leung und Whittaker 2005). Allerdings dauern diese auf siRNA beruhenden „Knock-down“-Effekte in Abhängigkeit des Proliferationsvermögens sich teilender Zellen nur drei bis sieben Tage an (Omi et al. 2004).

Abbildung 3.2 zeigt einen Überblick über die wichtigsten Schritte der RNA-Interferenz.

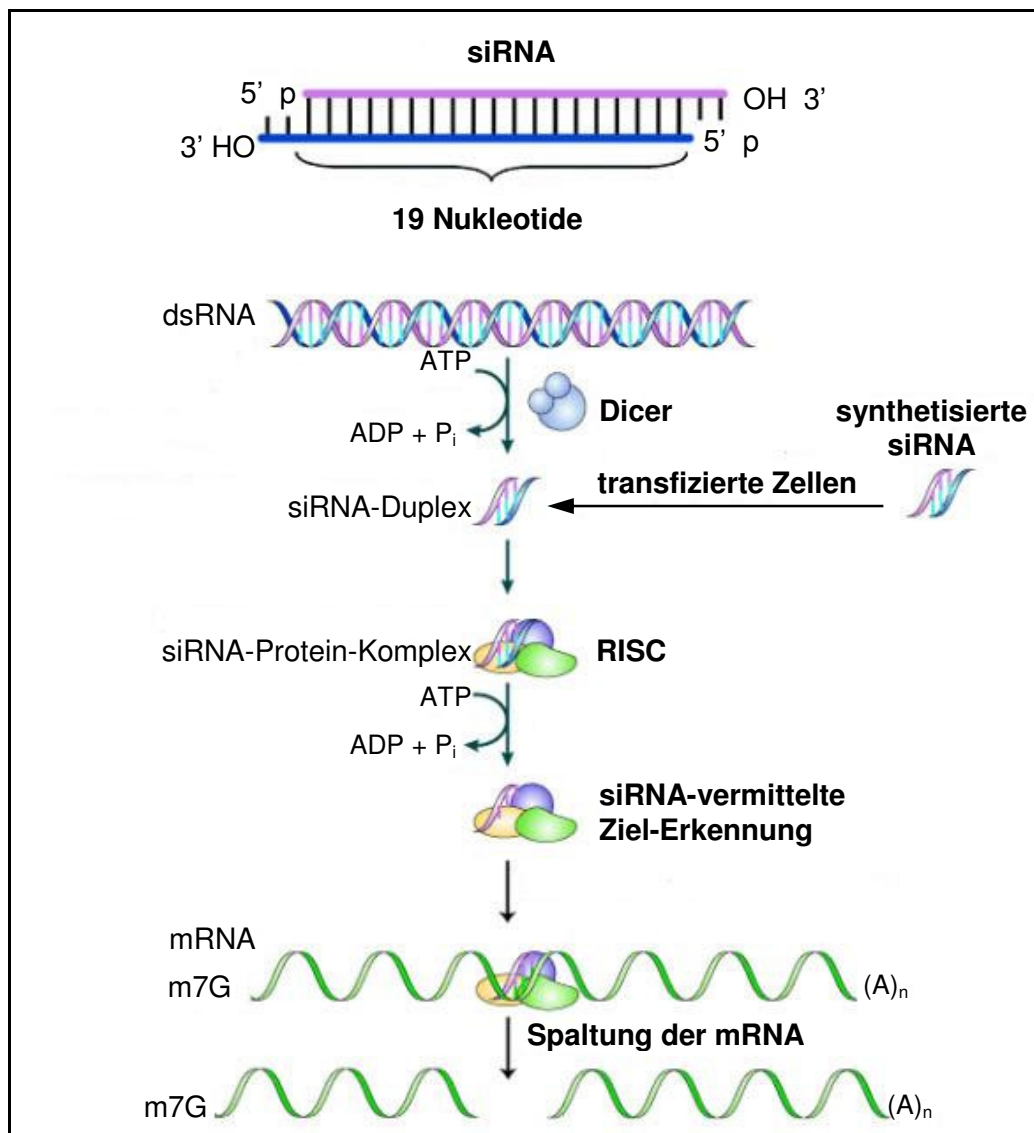


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Transfektion mittels siRNA

Durch die Fähigkeit, die Expression von Genen sequenz-spezifisch zu unterdrücken, sind siRNAs geeignete Werkzeuge für funktionelle Analysen von Genen und Proteinen. Hierzu gibt es verschiedene Methoden, um mit Hilfe von RNAi die Genexpression von zu untersuchenden Zielgenen oder deren Genprodukten zu hemmen. In dieser Arbeit wurde hierfür chemisch synthetisierte siRNA für Caspase-4 mittels des Transfektionsreagens Oligofectamin™ direkt in die Zelle eingeschleust. Dieses Transfektionsreagens bildet eine Liposomen-ähnliche Hülle um die zu transfizierende siRNA und bringt diese so ins Zellinnere.

Durchführung

Vor Transfektion der Zellen erfolgte in einem ersten Schritt das sogenannte Annealing der Oligonukleotide, wobei es zu einer Hybridisierung der Sense- und Antisense-Oligonukleotide kommt.

Hierzu wurden die aus Einzelsträngen bestehenden Sense- und Antisense-Oligonukleotide mit einer Konzentration von 100 μM in nuklease-freiem Wasser gelöst. Anschließend erfolgte die Bildung der siRNA-Duplicis. Dazu wurden jeweils 20 μl der zuvor gelösten Sense- und Antisense-Oligonukleotide in entsprechend verdünntem Annealing Buffer mit einer Endkonzentration von 10 μM für 5 Minuten bei 90°C und anschließend für 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Die Zelllinie JEG-3 diente als Ausgangsmaterial für die Transfektion mittels RNAi. Mit dieser Technik sollte eine weitere Expression des Enzyms Caspase-4 in den Zielzellen unterdrückt werden.

Dazu wurden die Zellen mittels Trypsin vom Boden der Kulturflasche gelöst und gleichmässig unter Zugabe von DMEM-Medium I so auf eine 6-Well-Platte ausgesät, dass die Zellen den Boden des jeweiligen Wells am Tag der Transfektion mit einer Konfluenz von 30-40% bedeckten. Nach ausreichender Adhäsion der Zellen über Nacht erfolgte die Abnahme des Mediums und das Waschen der einzelnen Wells mit Optimem-Medium. Anschließend wurde das Transfektionsreagens mit Optimem-Medium im Verhältnis 10/175 (V/V) verdünnt, für 20 Minuten mit den spezifischen RNA-Oligonukleotiden für Caspase-4 in einer Endkonzentration von 60 nM inkubiert und dann den Zellen zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden wurde jedem Well zusätzlich 500 μl DMEM-Medium (+30% FKS, ohne AAS) zugeführt.

Jeder Transfektion wurde als Negativ-Kontrolle eine untransfizierte Nativ-Zell-Kontrolle sowie eine Kontroll-Transfektion zugefügt, in welcher dieselben Nukleotide in einer nicht-genomischen Reihenfolge angeordnet waren (sog. „Scrambled“-Kontrolle). Der erfolgreiche „Knock-down“ des Zielgens wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen.

3.5 Proteinisolation

3.5.1 Lysieren der Zellen

Zum Lysieren wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturplatte gelöst, in 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und zweimalig mit Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1:1000 in PBS) gewaschen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2500 rpm, 8 Minuten, 5°C), der Überstand verworfen und wiederum Proteinase-Inhibitor-Cocktail hinzupipettiert. Dies wurde einmalig wiederholt, dann der Überstand erneut abpipettiert und jeweils 75 µl Zellysepuffer hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen durch dreimalig abwechselndes Einfrieren in flüssigem Stickstoff, auftauen und durchmischen mittels Vortexer lysiert. Der Lyse folgte ein letzter Zentrifugationsschritt (18000 rpm, 30 Minuten, 5°C). Im Anschluss wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 20°C aufbewahrt.

3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Hintergrund

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode. Bei diesem Assay bindet der Farbstoff Coomassie-Brillantblau unspezifisch an Seitenketten kationischer und hydrophober Aminosäuren. Da sich durch diese Komplexbildung das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 zu 595 nm verschiebt, kann eine photometrische Absorptionsmessung bei 595 nm zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen genutzt werden (Lottspeich 1998).

Durchführung

Hierzu wurden 5 µl der Proteinlösungen mit 995 µl Bradford-Reagenz versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubiert. Die anschließende Messung der Absorption erfolgte in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Parallel zu den Zelllysaten wurden Proben mit bekannten Konzentrationen von BSA zur Erstellung einer Standardkurve gemessen, die zur Ermittlung der Proteinkonzentration der Lysate diente.

3.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Hintergrund

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht. Das zu trennende Proteingemisch wird hierfür auf ein Polymergel, bestehend aus Polyacrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid aufgetragen. Nach dem Anlegen einer äußeren Spannung an das Gel wandern die Proteine je nach Molekulargewicht in unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die im Polymernetzwerk entstandenen Poren. Dabei werden kleinere Proteine weniger in ihrer Bewegung gebremst als große Proteine und wandern daher schneller in Richtung Anode (Voet et al. 2002, Wink 2004). Neben dem Molekulargewicht haben auch die Konformation eines Proteins sowie dessen Gesamtladung einen Einfluss auf die jeweilige Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Daher wird sowohl den Proteingemischen als auch dem Polymergel Natriumdodecylsulfat (SDS) als anionisches Detergenz zugesetzt. Das negativ geladene SDS führt zu einer negativen Nettoladung der Proteine, neutralisiert deren Eigenladung und ermöglicht somit die elektrische Auftrennung der Proteine. Zusätzlich werden die hydrophoben Wechselwirkungen in den Proteinen aufgehoben und dadurch deren Sekundär- und Tertiärstruktur zerstört. Die Denaturierung der Proteine wird durch die zusätzliche Behandlung mit β -Mercaptoethanol unterstützt, welches in der Lage ist, stärkere Disulfidbrücken innerhalb der Proteine zu brechen.

Bei der hier durchgeführten, diskontinuierlichen SDS-PAGE wird das Proteingemisch zunächst auf ein Sammelgel aufgetragen, welches einen größeren Porendurchmesser besitzt als das eigentliche Trenngel. Diese vorangegangene Fokussierung der Proteine im Sammelgel ermöglicht ein gleichmäßigeres Auftrennen der Proteine, da alle Proteine zum gleichen Zeitpunkt in das eigentliche Trenngel gelangen (Laemmli 1970).

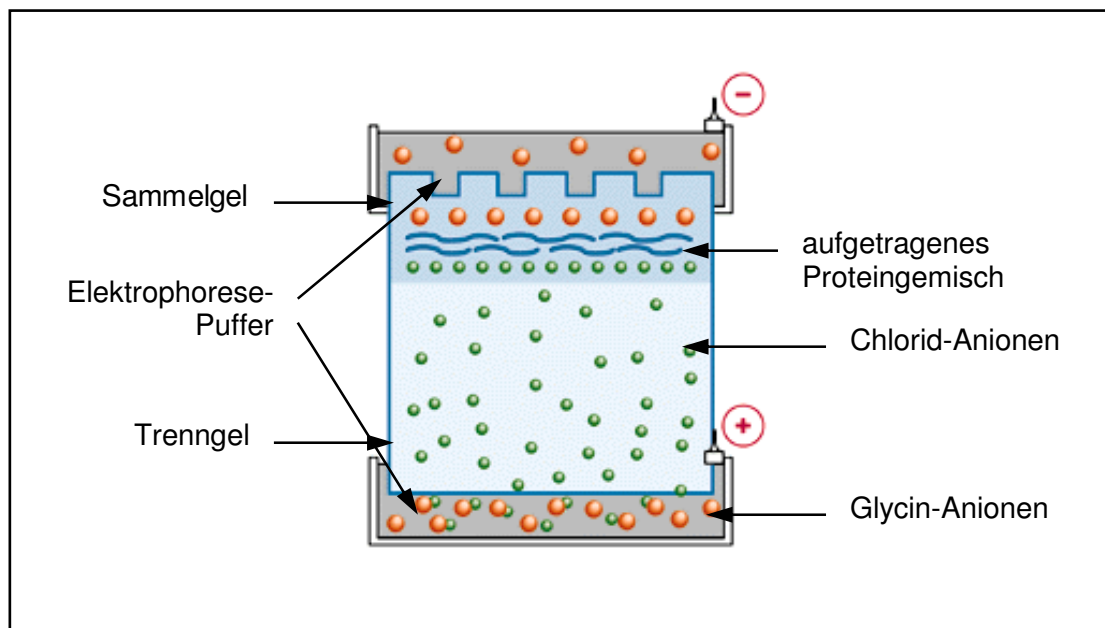


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durchführung

Die Auswahl und Herstellung des Gels erfolgte nach der im Anhang aufgeführten Anleitung. Für eine optimale Auftrennung des 43,3 kDa großen Proteins Caspase-4 wurden 9%-ige Trenngele für größere Proteine zwischen 35-100 kDa verwendet.

Die Proben wurden mit je 20 μ l 5-fach Auftragspuffer versetzt und zusammen mit dem Molekulargewichtsmarker für 5 Minuten bei 95°C zur Denaturierung der Proteine inkubiert, bevor jeweils 20 μ g Protein pro Spur auf das Sammelgel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei 120V und 100mA in 1 x Running Buffer. Anschließend wurden die Gele für den Western Blot weiter verwendet.

3.7 Western Blot

Hintergrund

Mittels Western Blot werden Proteine, die zuvor ihrer Größe nach mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, auf eine stabile Membran übertragen, auf der sie anschließend mit spezifischen Antikörpern detektiert werden können. Dies erlaubt die semi-quantitative Proteinbestimmung einzelner Proteine in einem Probengemisch.

Durchführung

Blotten

Für den Nachweis des Zielproteins Caspase-4 wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus den Zelllysaten über nicht-kovalente Wechselwirkungen auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Filterpapier, Nitrozellulose-Membran und Gel wurden hierfür mit Blot Buffer gefeuchtet und entsprechend der Geräteanleitung geschichtet. Für den Transfer wurde eine Stromstärke von 3mA pro cm² Membran angelegt. Im Anschluss erfolgte zur Überprüfung des Blot-Ergebnisses die passagere Färbung der Membran mit Ponceau-S-Lösung sowie die anschließende Entfärbung mit 0,8%-iger NaOH-Lösung. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die Membran nun für 30 Minuten mit 1 x NET-G-Puffer inkubiert.

Immundetektion

Für die Detektion von Caspase-4 wurde der Primär-Antikörper im Verhältnis 1:1000 mit 1 x NET-G-Puffer verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4°C inkubiert.

Danach wurden alle nicht gebundenen Primär-Antikörper in 3 Waschschrritten zu je 5 Minuten mit 1 x NET-G entfernt. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur für 1 Stunde mit dem Sekundär-Antikörper (1:10000 in 1 x NET-G-Puffer) inkubiert und erneut dreimalig für 5 Minuten mit 1 x NET-G-Puffer gewaschen. Für die Detektion des Chemilumineszenz-Signals wurde die Membran zunächst 1 Minute mit 100/1800 (V/V) verdünnter ECL-Lösung inkubiert. Das Chemilumineszenz-Signal konnte anschließend unter Lichtausschluss mit Hilfe eines

lichtempfindlichen Photofilms detektiert und dieser entwickelt werden. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Bandenintensitäten mit dem Auswertungsprogramm „GelCapture“.

Strippen

Um die jeweiligen Membranen für eine spätere Immundetektion wieder verwenden zu können, wurden sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper von der Membran entfernt. Dies erfolgte durch die Inkubation der Membran in Strip-Puffer bei 50 °C für 30 Minuten. Nach einer weiteren 30-minütigen Inkubation in 1 x NET-G-Puffer wurden die Membranen in Folie eingeschweißt und bei -20 °C eingefroren.

3.8 Aktivitätsmessung von Caspase-4 mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Hintergrund

Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie. Sie stellt ein Trennverfahren dar, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase, dem sogenannten Eluenten, unter hohem Druck durch die stationäre Phase in Form einer Trennsäule transportiert wird. Aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften werden die Probenmoleküle des zu untersuchenden Stoffgemisches über hydrophobe Wechselwirkungen an die stationäre Phase gebunden. Die Verweildauer der Substanzen an der stationären Phase ist aufgrund der unterschiedlich starken Wechselwirkung mit der Oberfläche der stationären Phase unterschiedlich lang. So werden die Probesubstanzen voneinander getrennt.

Hierbei stellt sich eine Abhängigkeit der Menge bzw. Konzentration der eluierten Substanzen von der Zeit dar. Einzelne Stoffe der zu untersuchenden Probe haben jeweils unterschiedliche Retentionszeiten (Schwedt 1996).

Die Darstellung des Ergebnisses dieser Stofftrennung erfolgt in Form eines Chromatogrammes bzw. einer Elutionskurve (siehe Abbildung 3.4).

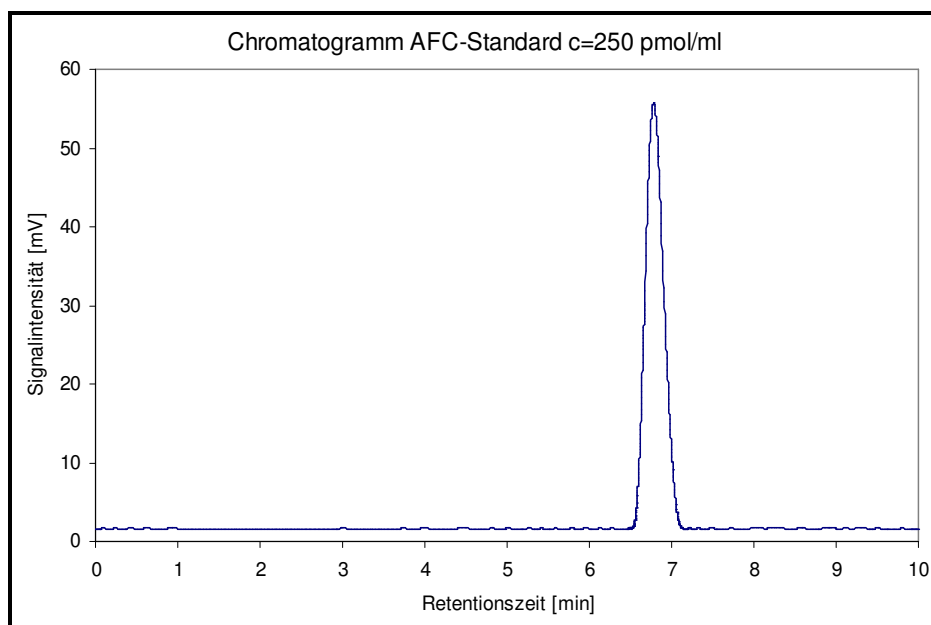


Abbildung 3.4: Beispiel-Chromatogramm
Dargestellt ist die detektierte Signalintensität in Abhängigkeit
von der Elutionszeit

In dieser Arbeit fand die HPLC initial nur aufgrund ihrer Möglichkeit zur photometrischen Bestimmung des freien Fluorochroms 7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarin (AFC) Verwendung. Im weiteren Verlauf kam zur Optimierung der Detektionsmethode auch die Möglichkeit der Probenaufreinigung mittels HPLC zum Einsatz.

Grundlage für den Aktivitätsnachweis von Caspase-4 ist die Substratspezifität der einzelnen Caspasen (Talanian et al. 1997). So spaltet Caspase-4 das Fluorochrom AFC spezifisch von folgender Sequenz von vier Aminosäuren mit Acetyl-Rest ab:

Acetyl - Leucin - Glutamin - Valin - Aspartat - AFC

Die Menge des mittels HPLC detektierbaren, freien AFC ist hierbei proportional zur Caspase-4-Aktivität in den gemessenen Zelllysaten.

Die folgende Abbildung 3.5 gibt schematisch einen Überblick über die Funktion des Assays:

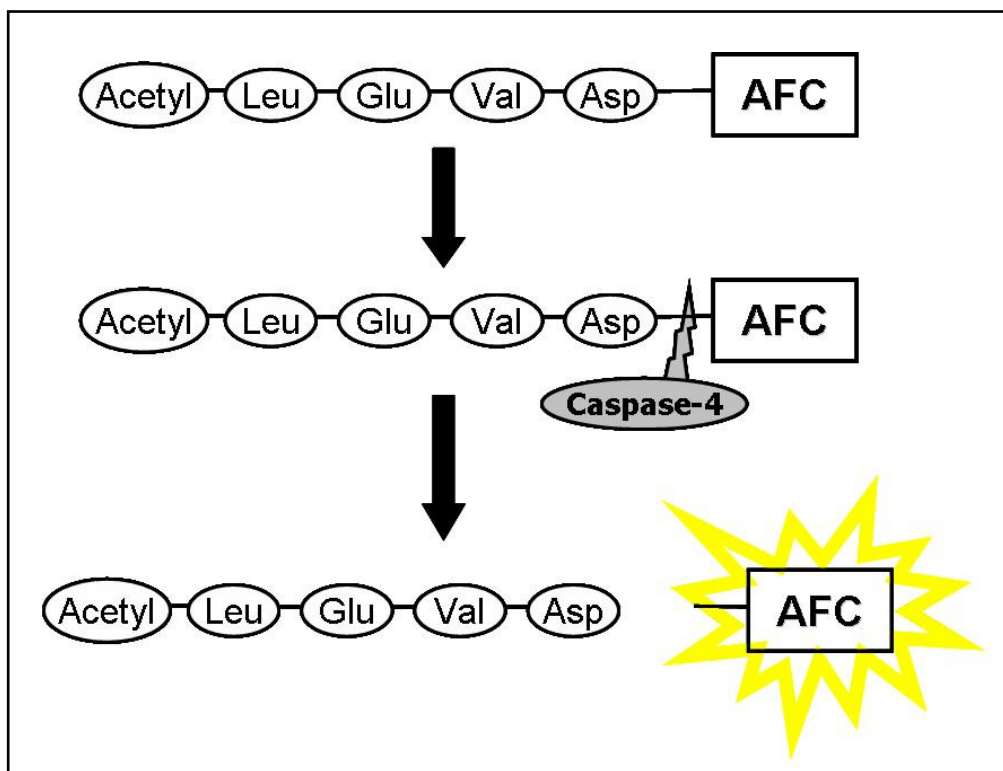


Abbildung 3.5: Schema des Aktivitäts-Assays für Caspase-4: Hierbei spaltet Caspase-4 das Fluorochrom AFC spezifisch von einer Aminosäuresequenz mit Acetylrest ab und wird somit photometrisch detektierbar.

Durchführung

Zunächst erfolgte die Transfektion der Zellen nach dem in Kapitel 3.4 aufgeführten Protokoll. Am Folgetag wurde das Medium abgenommen und die Zellen mittels Trypsin von der 6-Well-Platte gelöst. Nach Zugabe von DMEM-Medium II erfolgte die Aufteilung der transfizierten Zellen zu gleichen Teilen auf eine 12-Well-Platte. Nach 6-stündiger Adhäsionszeit im Zellkulturschrank unter Standardbedingungen und anschließender Zugabe folgender Zytokine

- LIF (Konzentration 10 ng/ml)
- IL-6 (Konzentration 20 ng/ml)
- HGF (Konzentration 10 ng/ml)

in entsprechender Konzentration erfolgte die Inkubation für 24 Stunden im Zellkulturschrank ebenfalls unter Standardbedingungen.

Im Anschluss wurde das Medium jeweils abgenommen und die adhärennten Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zugabe von PBS erfolgte ein vorsichtiges Lösen der Zellen vom Boden der 12-Well-Platten mittels Zellschaber. Danach wurde die PBS/Zell-Suspension in 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und nach erneuter Zugabe von 1 ml PBS erfolgte der Zellaufschluss durch 5-maliges abwechselndes Einfrieren und Auftauen der Eppendorf-Reaktionsgefäße in flüssigem Stickstoff. Nach nochmaligem Zentrifugieren der Proben für 30 Minuten bei 18000 rpm und 6°C wurden die Überstände wiederum verworfen.

Die Zelllysate wurden bei -20°C zwischengelagert und nach den entsprechenden Vorversuchen für den eigentlichen Caspase-4-Aktivitäts-Assay verwendet.

Erstellen der Kalibriergeraden

Das Caspase-4-Substrat AFC (7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarin, $n=21,8188 \mu\text{mol}$) wurde nach Angaben des Herstellers als Stammlösung (AFC in MeOH; $c=10 \mu\text{mol/ml}$) gelöst, welche anschließend zur Herstellung von Standards verwendet wurde. Für alle angesetzten Standards (Konzentration AFC in pmol/ml: 0 / 40 / 50 / 100 / 250 / 500 / 1000 / 1500 / 2000 / 2500 / 3000) wurde 40/60 (V/V) MeOH/H₂O verwendet.

Probenvorbereitung und -messung

Vorbereitend wurde das benötigte Caspase-4-Substrat (5 mg; $M=727,7$ g/mol) in 344 μl DMSO gelöst, so dass sich eine Endkonzentration von $c=20$ $\mu\text{mol/l}$ = 20 mM ergab. Von den vorbereiteten Zellysaten wurden jeweils 5 μl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 245 μl Caspase-4-Puffer sowie 10 μl Caspase-4-Substrat versetzt. Gleichzeitig wurde auch ein Kontroll- bzw. Blindwertansatz in folgender Zusammensetzung vorbereitet: 5 μl deionisiertes H_2O + 245 μl Puffer + 10 μl Substrat. Die Probenansätze wurden kurz mittels Vortexer vermischt und anschließend bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Vor Gebrauch der Proben erfolgte nochmals ein Mischschritt mittels Vortexer, bevor nach Zugabe 10 μl 3N HCl als Stop-Lösung und Inkubation für 15 Minuten weitere chemische Reaktionen innerhalb der Probe unterbunden wurden. Nun wurden die Proben aufgrund des geringen Messvolumens jeweils in Minivolume-Inserts in HPLC-Messgläschen pipettiert und mit einer Einzelprobenlaufzeit von 15 Minuten mittels HPLC gemessen.

Hierbei waren folgende technische Messbedingungen gegeben:

HPLC-Anlage / Säule	siehe Kapitel Anhang
Eluent:	70/30 (V/V) MeOH/H ₂ O
Fluß:	700 $\mu\text{l}/\text{min}$
Injektionsvolumen:	50 μl
Anregungswellenlänge:	400 nm
Emissionswellenlänge:	505 nm

3.9 Proliferations-Assay

Durch Transfektion der verwendeten Zelllinie mittels RNAi erfolgte die Hemmung einer weiteren Expression des Zielgens Caspase-4. Zudem waren eine Negativkontrolle und eine Probe nicht-genomisch transfezierter Zellen Bestandteil der Versuchsdurchführung.

Die Proliferation von Zellen wurde mit dem CellTiter 96[®] One Solution Cell Proliferation Assay (MTT-Test) bestimmt. Hierfür wurden am Folgetag der Transfektion je 100 000 Zellen/Well in 100 µl Medium in eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät.

Nach Hinzugabe der Zytokine

- LIF (Konzentration 10 ng/ml)
- IL-6 (Konzentration 20 ng/ml)
- HGF (Konzentration 10 ng/ml)

in entsprechender Konzentration erfolgte die Inkubation für 24 Stunden im Zellkulturschrank unter Standardbedingungen.

Die jeweiligen Konzentrationen der Zytokine wurden aufgrund folgender Referenzen aus der Literatur gewählt:

- LIF: Fitzgerald et al. 2005
- IL-6: Aoki et al. 1991, Poehlmann et al. 2005
- HGF: Morimoto et al. 1991, Saito et al. 1995, Fitzgerald et al. 2005.

Anschließend wurden 20 µl der Assay-Lösung zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2 bis 4 Stunden konnte die Absorption der Proben bei 490nm Wellenlänge in einem ELISA-Reader gemessen werden. Dieser Assay, auch als MTT-Test bezeichnet, ermöglicht die Einschätzung von Lebensfähigkeit und Proliferation einer Zellkultur.

Mit Hilfe des Tests bestimmt man die Aktivität von Dehydrogenasen in Mitochondrien. Nach Zugabe des schwach gelben 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zur Zellkultur entsteht nach Aufbrechen des Tetrazoliumringes durch mitochondriale Dehydrogenasen das in Alkohol lösliche, dunkelblaue Formazan (siehe Abbildung 3.6).

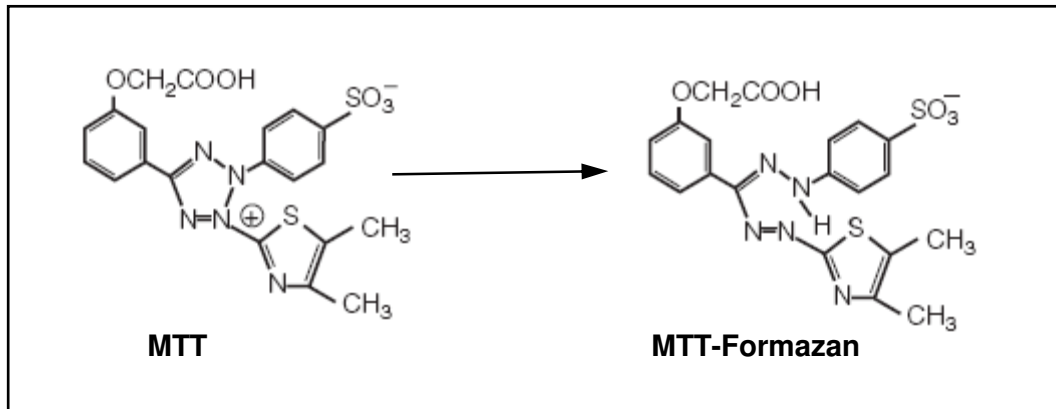


Abbildung 3.6: Schema der Umsetzung des gelben Farbstoffes MTT zum blauen Farbstoff Formazan durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase

Die optische Dichte der alkoholischen Formazanlösung wurde mittels ELISA-Reader photometrisch bestimmt. Die hierbei gemessene Farbstoff-Menge ist proportional der mitochondrialen Aktivität und somit der metabolischen Aktivität in den Zellen.

Da proliferierende Zellen metabolisch aktiver sind als nicht-proliferierende Zellen, wird der MTT-Test in dieser Arbeit zur Detektion von Zellaktivierung und Proliferation verwendet.

3.10 Apoptose-Assay mittels Annexin V

Einführung

Die Plasmamembran einer Zelle ist asymmetrisch aufgebaut. Der Verlust dieser Asymmetrie wird als ein frühes Zeichen der Apoptose gewertet. Phosphatidylserin (PS), das unter physiologischen Bedingungen nur auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist, wird hierbei vermehrt in die nach außen gerichtete Zellmembranseite verlagert.

Das Protein Annexin V bindet sich Ca^{2+} -abhängig spezifisch an PS und dient daher dem Nachweis von Apoptose. Durch einen an Annexin V gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff können apoptotische Zellen sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Beide Nachweismethoden kommen in dieser Arbeit zur Anwendung.

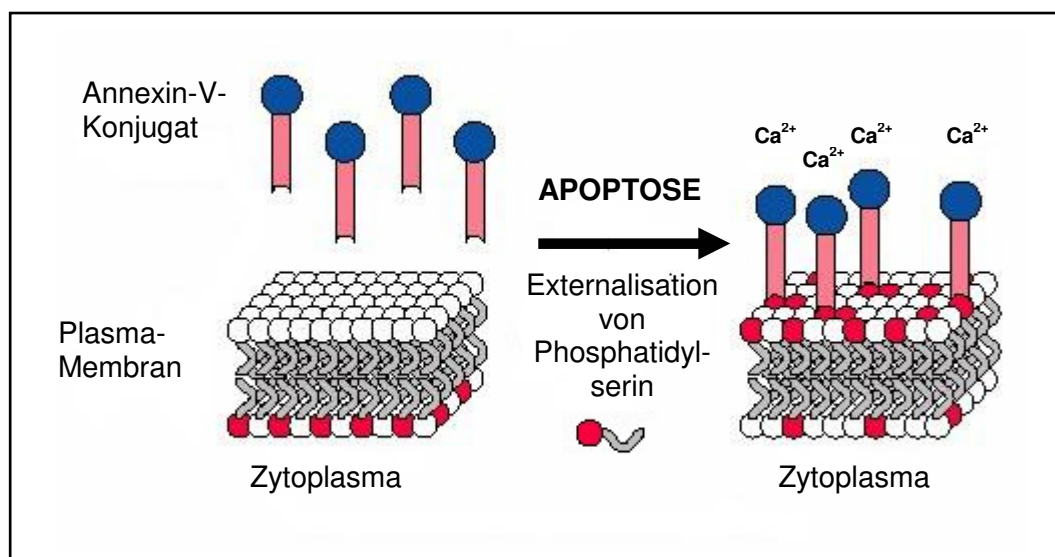


Abbildung 3.7: Schema der Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin in der Plasmamembran apoptotischer Zellen

Mit diesem Assay soll zum einen überprüft werden, ob Veränderungen im Proliferationsverhalten von JEG-3-Zellen nach Transfektion mit Caspase-4-siRNA möglicherweise nur durch eine erhöhte oder verminderte Apoptoserate bedingt sind. Zum anderen soll dieser Assay Anhalte dafür liefern, ob Caspase-4 in der Zelllinie JEG-3 in die Regulation und Ausführung des programmierten Zelltodes involviert ist oder nicht.

3.10.1 Apoptose-Assay mittels Annexin V via Durchflusszytometrie

Hintergrund

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen oder kleine Partikel anhand ihrer Größe, ihrer Oberflächenbeschaffenheit sowie ihrer äußeren und inneren Struktur nach analysiert werden. Die Detektion erfolgt hierbei durch den Laser eines Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS). Der Laser sendet dabei Licht einer bestimmten Wellenlänge aus, welches über eine Fokussierungslinse gebündelt und anschließend auf den Probenstrom weitergeleitet wird. Die in der Probe enthaltenen Zellen bzw. Partikel streuen das Licht in unterschiedliche Richtungen. Hierdurch können Unterschiede in Größe und Granularität von Zellen erfasst werden. Wenn die zu untersuchenden Zellen, wie in dieser Arbeit, mit fluoreszierenden Antikörpern bzw. Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, können theoretisch bis zu 4 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden. Dabei wird ein Teil des gebündelten Lichts durch die Fluorochrome absorbiert und Licht mit einer größeren Wellenlänge emittiert. Dieses emittierte Licht wird über nachgeschaltete Spiegel und Filter in seine einzelnen Wellenlängen aufgetrennt und kann nun detektiert werden. In dieser Arbeit dient diese Methode dem Nachweis des an der Zelloberfläche von apoptotischen JEG-3-Zellen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes Annexin V.

Durchführung

Das Medium der zur Messung in 6-Well-Platten transfizierten Zellen wurde verworfen und die adhärennten Zellen zweimalig vorsichtigen Waschschritten mit PBS unterzogen. Nun erfolgte die Ablösung der adhärennten Zellen vom Boden der jeweiligen Wells mit 500 µl Trypsin, anschließend wurden die Zellen in jeweils 1 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die einzelnen Wells der Platte mit 0,5 ml Medium nachgespült, um alle Zellen aufnehmen zu können. Die Zellen wurden bei 5°C und 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand anschließend abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Medium resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 0,5 ml Annexin V-Binding Puffer sowie ein erneuter Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das

Zellpellet in 70 µl Annexin V-Binding Puffer resuspendiert. Der Zugabe von 5 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Annexin V-FITC folgt die Inkubation der Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nun konnte, nach Zugabe von 0,5 ml FACS-Messlösung und Überführung der Proben in FACS-Messröhrchen, die Messung erfolgen.

Die FACS-Analyse erfolgte auf Einzelzellniveau, wobei 10000 Zellen analysiert wurden und anschließend eine statistische Auswertung mithilfe der Software „Cell Quest Pro“ erfolgte.

3.10.2 Apoptose-Assay mittels Annexin V via Fluoreszenzmikroskopie

Durchführung

Zuerst wurden Objektträger vorbereitend für wenige Minuten in 70% Ethanol eingelegt. Anschließend erfolgte unter sterilen Bedingungen ein Trockenschritt und das gründliche Abspülen der Objektträger mit Aqua dest. sowie wiederum das Trocknen unter Sterilbedingungen.

Das eigentliche Coaten der Objektträger erfolgte mit einer Lösung aus GBSS und Poly-L-Lysin im Verhältnis 1000:1. Hiervon wurden jeweils 500 µl auf die Objektträger pipettiert und für 1 Stunde im Zellkulturschrank unter physiologischen Bedingungen inkubiert. Die restliche Lösung wurde vom Objektträger abgekippt und wiederum für 10-15 Minuten unter Sterilbedingungen getrocknet. Nach Umrandung des sichtbaren Adhäsionsgebietes mit einem Fettstift war die Vorbereitung der Objektträger abgeschlossen. Jetzt wurden die zu verwendenden Zellen einmalig mit PBS gründlich gewaschen und mit jeweils 500 µl Trypsin vom Boden der 6-Well-Platte gelöst. Die Zellsuspension konnte mit 1 ml Medium aufgenommen und in ein 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Nach Abzentrifugieren der Proben für 5 Minuten bei 1500 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1,5 ml DMEM-Medium I resuspendiert.

Nun erfolgte das Aufpipettieren von 200 µl der Zellsuspension auf die Objektträger, welche zur Adhäsion der Zellen mit jeweils zwei gewässerten Pflaumentupfern in einer locker verschlossenen Petrischale über Nacht im Brutschrank inkubiert wurden.

Am Folgetag schlossen sich durch wiederholtes vorsichtiges Eintauchen der Objektträger in PBS Waschschriffe an. Die weitere Probenvorbereitung durch zupipettieren von Annexin V geschah so, dass zum Zeitpunkt des Mikroskopierens eine Inkubationszeit im Dunkeln von 15 Minuten nicht überschritten wurde.

Mikroskopiert wurden alle Proben mittels Phasenkontrast- und Fluoreszenzdarstellungen in unterschiedlichen Gesamtvergrößerungen zwischen 50x und 400x.

3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch Berechnung der Mittelwerte (M) sowie des Standardfehlers (STF) als Maß für die Güte der ermittelten Mittelwerte mittels Microsoft Excel 2003.

Signifikanzen wurden ebenfalls mit Microsoft Excel 2003 unter Verwendung des t-Tests (gepaart, zweiseitig) berechnet. Das Signifikanzniveau wurde jeweils bei $p < 0,05$ erreicht.

Ergebnisse

4.1 Etablierung der siRNA-Transfektion von Caspase-4 in der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist eine effektive Methode, um die Expression von zu untersuchenden Zielgenen herunterzuregulieren. RNAi ist in fast allen mehrzelligen Organismen anwendbar, wobei jedes Zielgen innerhalb eines Genoms potenziell ausgeschaltet werden kann, vorausgesetzt dessen Gensequenz ist bekannt. Diese „loss-of-function“-Technik führte in der 90er Jahren zu einem Durchbruch bei der Untersuchung der Genregulierung, da die Funktion eines bestimmten Gens oft durch die Blockade seiner Expression hergeleitet werden kann. In Organismen, in denen genetische Studien schwer durchführbar sind, bietet die RNAi einen schnellen und sicheren Weg zum Studium der Funktion bekannter Gene. Auch in menschlichen Zellen ist die RNAi wirksam, wo sie unter anderem zur Aufklärung von biochemischen und metabolischen Stoffwechselwegen, zur Validierung potenzieller Angriffspunkte für neue Arzneimittel und schon heute innerhalb experimenteller Studien als Therapeutikum in der Krankheitsbehandlung Verwendung findet.

In dieser Arbeit sollte mittels RNAi die Herunterregulierung der Genexpression des Zielgens Caspase-4 in JEG-3-Zellen etabliert werden, um im weiteren Verlauf anhand verschiedener funktioneller Tests den Einfluss von Caspase-4 auf das Proliferations- und Apoptose-Verhalten von JEG-3-Zellen untersuchen zu können.

Hierzu wurden die JEG-3-Zellen wie in Kapitel 3.4 beschrieben mit Caspase-4-siRNA transfiziert. Es wurden zwei Kontrollen zugefügt: als Negativ-Kontrolle untransfizierte Nativ-Zellen und eine Kontroll-Transfektion mit nicht-genomischer siRNA (sog. „Scrambled“-Kontrolle).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Transfektionsversuche sowie deren Auswertung ausführlich dargestellt.

Abbildung 4.1 zeigt den „Knock-down“ des Zielgens Caspase-4 mittels RNAi. Als Auftragskontrolle ist der β -Aktin-Blot mit dargestellt.

Nach Kontroll-Transfektion mit nicht-genomischer Kontroll-siRNA zeigt sich im Vergleich zur untransfizierten Nativ-Zell-Kontrolle eine leicht vermehrte Caspase-4-Expression, wie in Abbildung 4.1 ersichtlich ist. Im Vergleich zur Negativ-Kontrolle lässt sich durch die Transfektion der Zellen mit Caspase-4-siRNA eine Expressionsreduktion des Zielgens nach 24 Stunden um rund 50 Prozent erreichen.

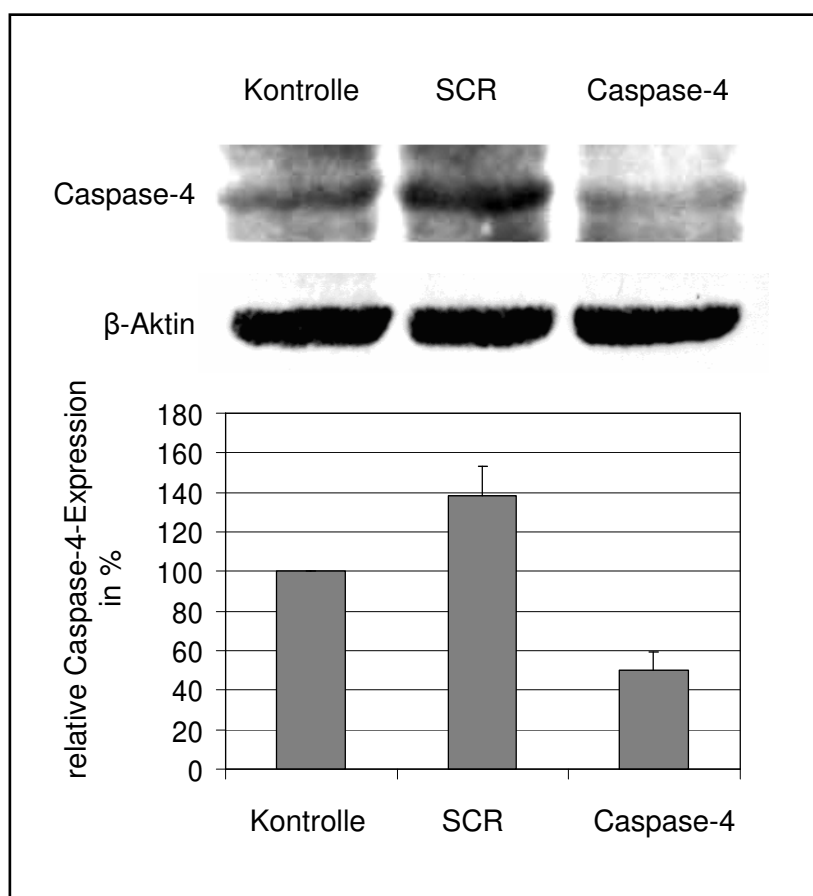


Abbildung 4.1: Western Blot und Quantifizierung der Bandenintensitäten 24 Stunden nach Transfektion mit Caspase-4-siRNA in zwei unabhängigen Versuchen. β -Aktin diente als Auftragskontrolle. Dargestellt ist die relative Caspase-4-Expression (Kontrolle = 100%). Die Fehlerbalken zeigen den jeweiligen Standardfehler, n=2 unabhängige Versuche.

Weitere Versuche zeigten, dass dieser „Knock-down“ für das Zeitintervall bis 72 Stunden nach Transfektion stabil blieb bzw. sich die Transfektionsrate im Vergleich zur Negativ-Kontrolle bis auf rund 80 Prozent erhöhte (siehe Abbildung 4.2).

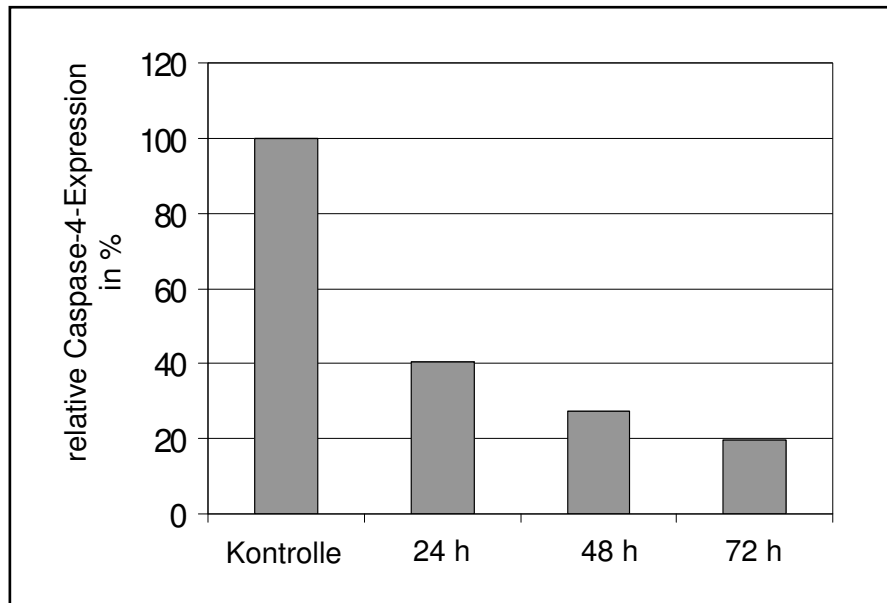


Abbildung 4.2: Quantifizierung der Bandenintensitäten des Western Blots für die Kinetik der relativen Caspase-4-Expression 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion mit Caspase-4-siRNA. β -Aktin diente auch hier als Auftragskontrolle, gegen welche die Bandenintensität von Caspase-4 normalisiert wurde (beide Blots nicht gezeigt). Dargestellt ist die relative Caspase-4-Expression in Prozent (Kontrolle= 100%).

Tabelle 4.1: Reduktion der relativen Caspase-4-Expression nach 24, 48 und 72 Stunden in Prozent

Negativ-Kontrolle	nach 24 h	nach 48 h	nach 72 h
100 %	40,6 %	27,3 %	19,8 %

Somit konnte für die im Folgenden durchgeführten funktionellen Tests von einer Transfektionseffizienz zwischen 50-80 Prozent ausgegangen werden.

4.2 Aktivitätsmessung von Caspase-4 mittels HPLC

4.2.1 Optimierung der Methode

Die allgemein übliche und auch vom Hersteller des Caspase-4-Substrats empfohlene Methode zur Aktivitätsbestimmung von Caspase-4 sah eine einfache photometrische Bestimmung des durch Caspase-4 freigesetzten AFC vor. Hierfür wurde die fluoreszenzphotometrische Funktion der laboreigenen HPLC-Anlage verwendet, da mit dieser die jeweils unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen einstellbar waren.

Die ersten Probe-Messungen erbrachten jedoch Ergebnisse (hier nicht gezeigt), bei denen in den Kontroll-Proben mit reinem Zellkulturmedium DMEM I gleich hohe bzw. deutlich höhere Konzentrationen von freiem AFC gemessen wurden als in den eigentlichen Zelllysaten. Dies sollte eigentlich nicht der Fall sein, da das Fluorochrom AFC nur spezifisch von Caspase-4 von der entsprechenden Aminosäuren-Kette abgespalten werden kann.

Zwei Möglichkeiten ergaben sich als Grund für diese Ergebnisse:

1. das Medium selbst bzw. entsprechende Inhaltstoffe oder Zusätze (FKS, AAS) waren in der Lage, das AFC freizusetzen
oder
2. eine sich im Medium befindliche, unbekannte Substanz besaß unter den in Kapitel 3.8 aufgeführten Messbedingungen selbst fluoreszierende Eigenschaften

Nach entsprechender Recherche konnte die erstere der beiden Möglichkeiten ausgeschlossen werden.

Um die zweite und wahrscheinlichere Möglichkeit auszuschließen, wurde das Fluoreszenzphotometer an eine HPLC-Säule gekoppelt und weitere Probe-Messungen angeschlossen. Hier zeigte sich, dass das detektierbare AFC-Signal offensichtlich aus zwei sich fast vollständig überlagernden Fluoreszenz-Signalen bestand.

Durch weitere Optimierung der Methode und das Einbringen einer weiteren Trennsäule in den Versuchsaufbau konnte im Verlauf das überlagernde Störsignal (Retentionszeit: 5,2 Minuten) abgetrennt und die fehlerfreie Erfassung eines reinen

Fluoreszenz-Signals des freien AFC (Retentionszeit: 6,9 Minuten) erreicht werden (siehe Abbildung 4.3).

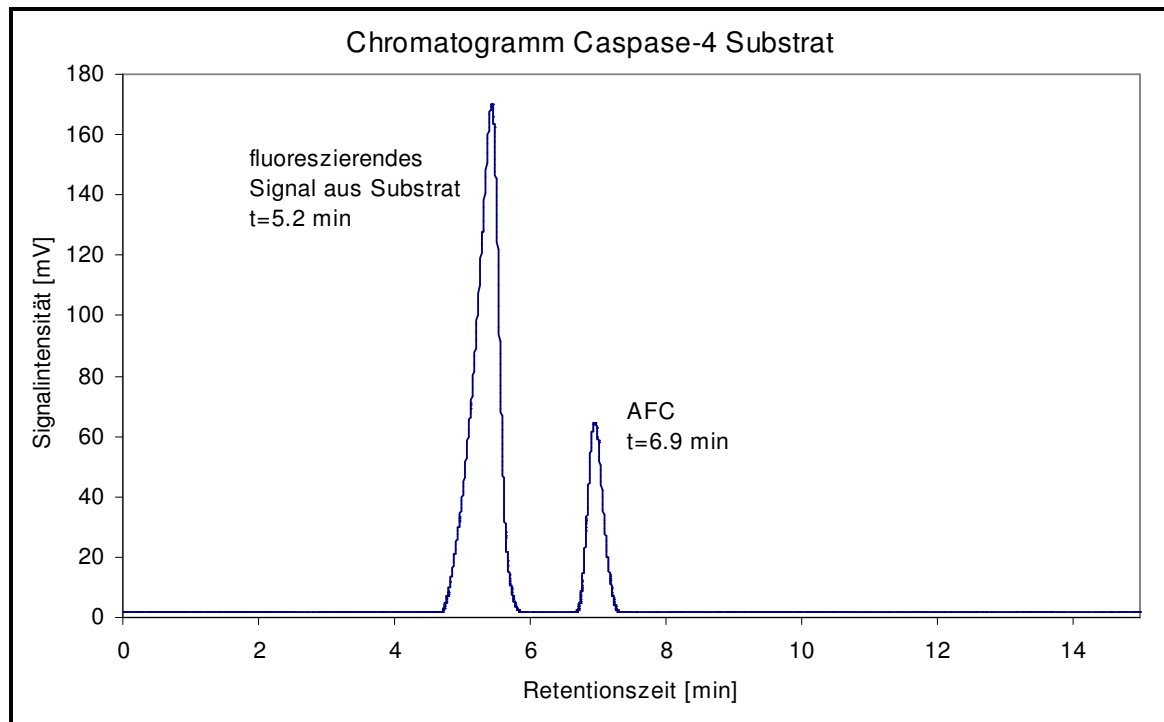


Abbildung 4.3: Chromatogramm nach Einbringen der Trennsäule in den Versuchsaufbau.

Das initial überlagernde Fluoreszenzsignal (Retentionszeit $t=5,2$ min) konnte nun vom eigentlichen Fluoreszenzsignal des freigesetzten AFC (Retentionszeit $t=6,9$ min) abgetrennt werden.

Hiermit konnte eine wesentliche Verbesserung der vom Hersteller des Caspase-4-Substrats empfohlenen Methode erreicht werden und nun die fehlerfreie und exakte Erfassung des freigesetzten AFC garantiert werden (Koehn et al. 2008, in Druck).

Folgende Auflistung soll einen vergleichenden Überblick über die Arbeitsbereiche bzw. Nachweis- und Bestimmungsgrenze der ursprünglichen und der optimierten Methode geben:

Arbeitsbereich Hersteller Caspase-4-Substrat: 1,6 nmol/ml - 4,8 nmol/ml
freies AFC

Arbeitsbereich optimierte Methode: 40 pmol/ml - 3 nmol/ml freies AFC

Nachweisgrenze optimierte Methode: 46 pmol/ml freies AFC

Bestimmungsgrenze optimierte Methode: 113 pmol/ml freies AFC

4.2.2 Ergebnisse

Vor der eigentlichen Versuchsdurchführung wurde aus der Stammlösung des Caspase-4-Substrats eine Verdünnungsreihe angesetzt, um über eine Standardkurve die spätere Konzentrationsbestimmung von freigesetztem AFC vornehmen zu können.

Diese Standardkurve ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

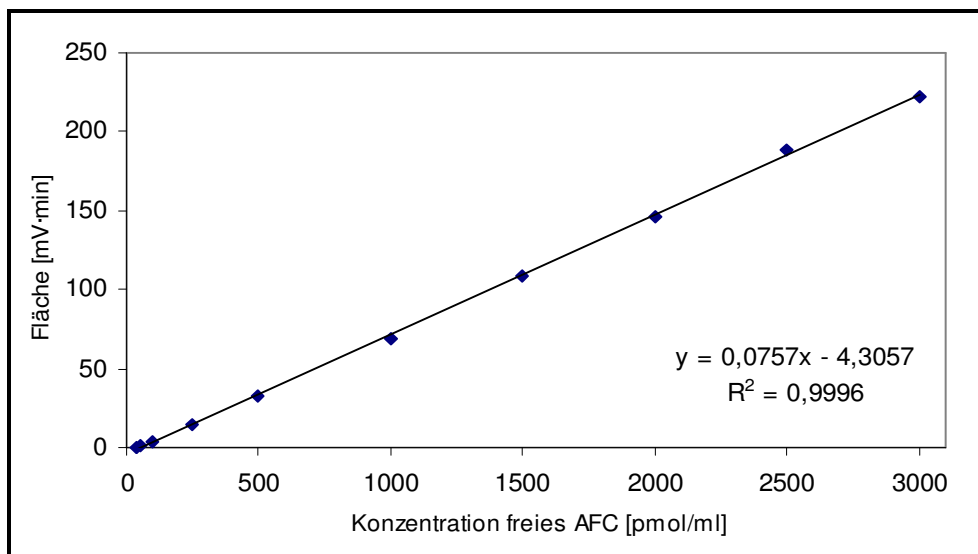


Abbildung 4.4: Standardkurve für die Konzentrationsbestimmung des freien AFC

Wie aus Abbildung 4.4 ersichtlich ist, konnte hiermit die Kalibrierfunktion durch die lineare Regression sehr genau beschrieben werden.

Somit war eine exakte Bestimmung der Konzentration des freien AFC für den in Kapitel 4.2.1 aufgeführten, optimierten Arbeitsbereich garantiert.

Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung von Caspase-4 dargestellt und erläutert werden.

Die Stimulation von JEG-3-Zellen mit den Zytokinen LIF, HGF und IL-6 für 24 Stunden bewirkt sowohl in der Nativ-Zell-Kontrolle als auch nach Transfektion mit Caspase-4-siRNA einen Anstieg der relativen Caspase-4-Aktivität zwischen 10 und 40% (Nativ-Zell-Kontrolle ohne Zytokinstimulation = 100%).

Caspase-4-siRNA transfizierte Zellen weisen im Vergleich zur jeweiligen Nativ-Zell-Kontrolle eine sichtbar verminderte relative Caspase-4-Aktivität auf. Einzige Ausnahme bilden hierbei die Caspase-4-transfizierten JEG-3-Zellen nach Stimulation mit LIF. Hier zeigt sich ein signifikanter Anstieg (t-Test, $p < 0,05$) der relativen Caspase-4-Aktivität.

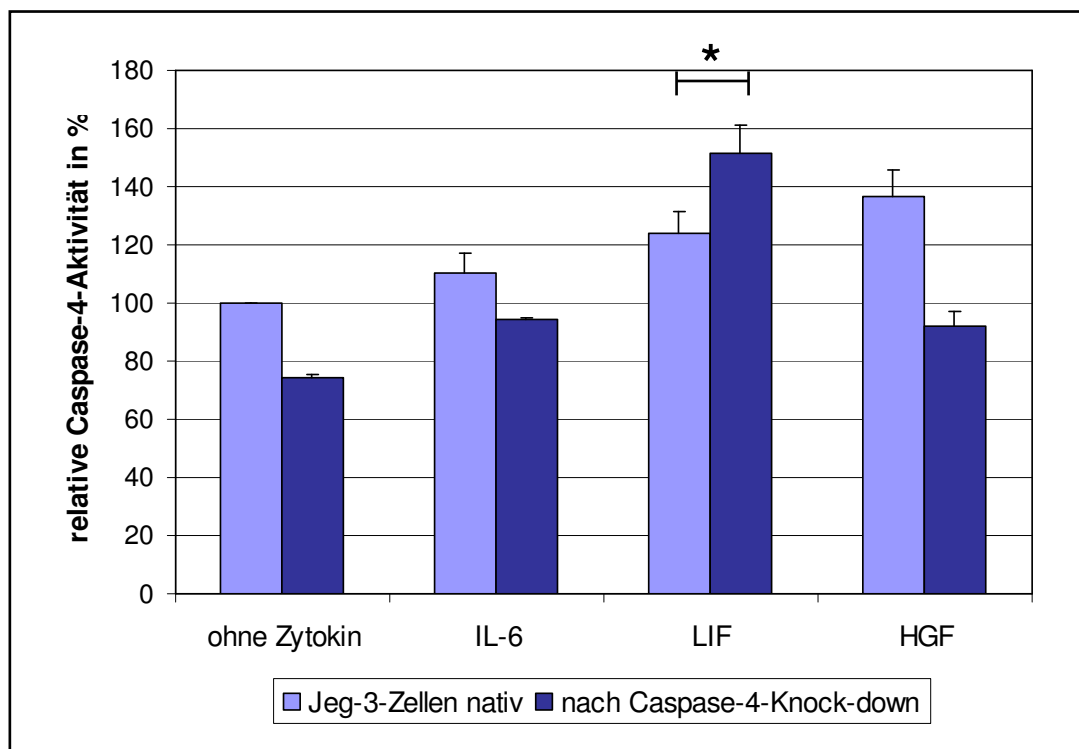


Abbildung 4.5: Einfluss der Zytokine LIF, HGF und IL-6 auf die relative Caspase-4-Aktivität in Prozent nach Transfektion mit Caspase-4-siRNA im Vergleich zu untransfizierten Nativ-Zellen (unstimulierte Nativ-Zell-Kontrolle = 100%) nach einer Stimulationszeit von 24 Stunden.

Dargestellt ist der jeweilige Standardfehler sowie relevante Signifikanzen (t-Test, $p = 0,05$), $n = 4$ unabhängige Versuche.

Tabelle 4.2: Relative Caspase-4-Aktivität nach Stimulation mit IL-6, LIF und HGF in Caspase-4-siRNA transfizierten JEG-3-Zellen im Vergleich zur Nativ-Zell-Kontrolle in Prozent

	ohne Zytokin	IL-6	LIF	HGF
JEG-3-Zellen nativ	100%	110,5%	123,8%	136,4%
Caspase-4-“Knock-down“	74,2%	94,3%	151,4%	91,8%

4.3 Proliferations-Assay

Um den Einfluss von Caspase-4 auf das Proliferationsverhalten von JEG-3-Zellen zu untersuchen, wurde in vier unabhängigen 24 h-Assays das proliferative Verhalten von je 3×10^4 Caspase-4-siRNA transfizierten JEG-3-Zellen untersucht. Als Kontrolle dienten jeweils untransfizierte und nicht-genomisch siRNA-transfizierte JEG-3-Zellen.

4.3.1 Einfluss der RNAi von Caspase-4 auf das Proliferationsverhalten der Zelllinie JEG-3

48 Stunden nach „Knock-down“ von Caspase-4 kommt es im Vergleich zur nicht-genomischen Kontroll-Transfektion ohne Stimulation mit Zytokinen zu einer signifikanten Steigerung ($p=0,044$) der Proliferation in JEG-3-Zellen von im Mittel rund 35 Prozent.

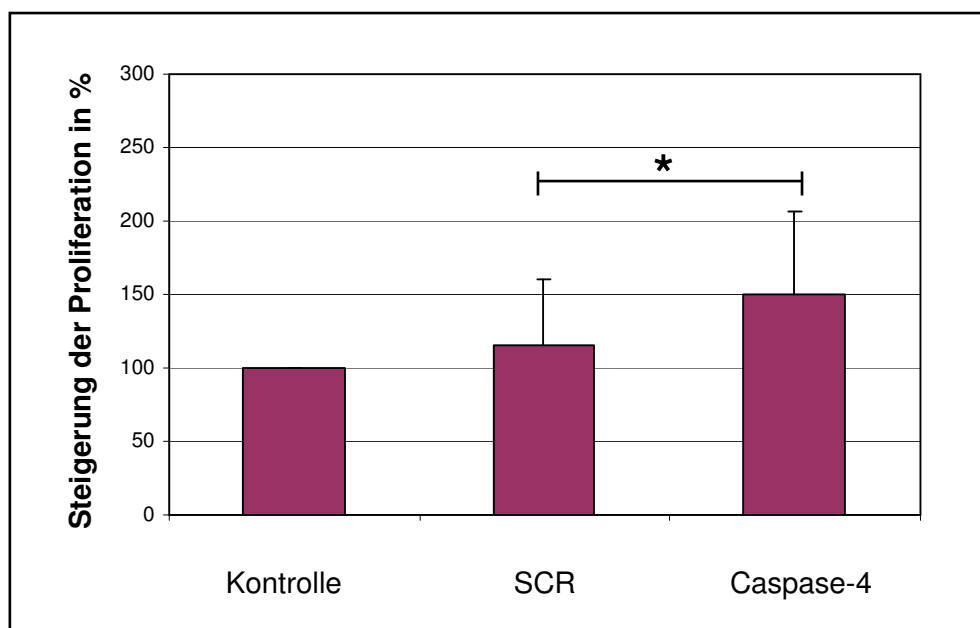


Abbildung 4.6: Proliferation von JEG-3-Zellen nach RNAi von Caspase-4 im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (=100%) und einer nicht-genomischen Kontroll-Transfektion (SCR=„Scrambled“-Kontrolle).

Die Abbildung zeigt den jeweiligen Standardfehler sowie relevante Signifikanzen (t-Test, $p < 0,05$), $n=4$ unabhängige Versuche.

Tabelle 4.3: Steigerung der Proliferation in Prozent ohne Zytokinstimulation

Negativ-Kontrolle	„Scrambled“-Kontrolle	Caspase-4
100%	114,9%	150,3%

4.3.2 Einfluss von LIF auf das Proliferationsverhalten der Zelllinie JEG-3 nach RNAi von Caspase-4

48 Stunden nach „Knock-down“ von Caspase-4 und Stimulation mit LIF in einer Konzentration von 10 ng/ml (Stimulationszeit: 24 Stunden) kommt es im Vergleich zur nicht-genomischen Kontroll-Transfektion zu einer signifikanten Steigerung ($p=0,044$) der Proliferation in JEG-3-Zellen von im Mittel rund 70 Prozent (siehe Abbildung 4.7).

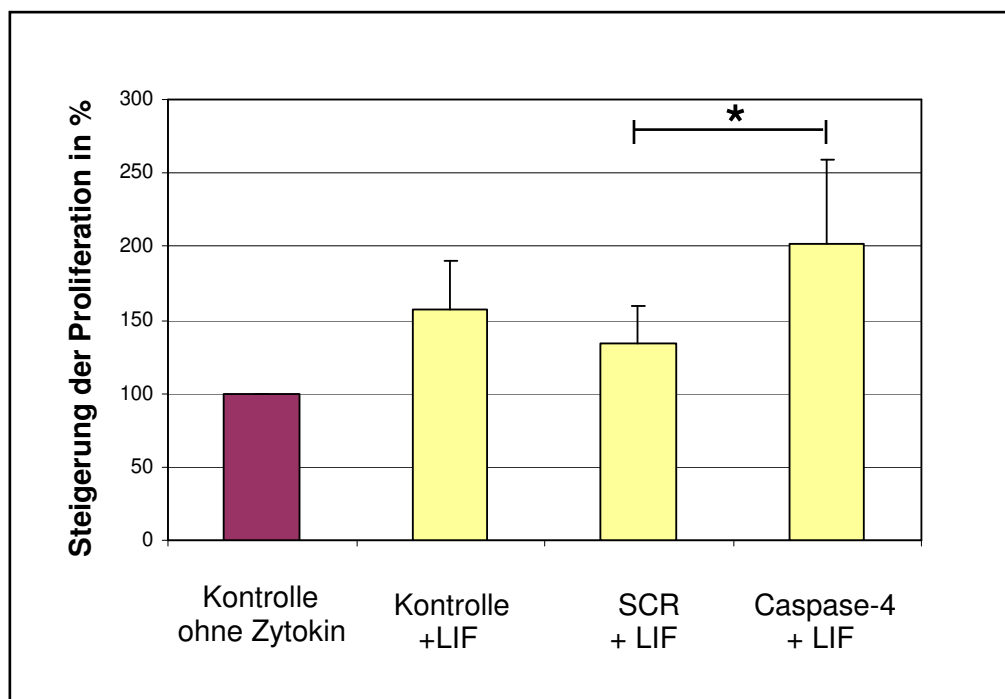


Abbildung 4.7: Proliferation von JEG-3-Zellen nach RNAi von Caspase-4 und Stimulation mit LIF im Vergleich zur unstimulierten Negativ-Kontrolle (=100%) sowie der Negativ-Kontrolle und der nicht-genomischen Kontroll-Transfektion (SCR=„Scrambled“-Kontrolle) nach LIF-Stimulation.

Die Abbildung zeigt den jeweiligen Standardfehler sowie relevante Signifikanzen (t-Test, $p<0,05$), $n=4$ unabhängige Versuche.

Tabelle 4.4: Steigerung der Proliferation in Prozent nach Stimulation mit LIF

Negativ-Kontrolle ohne Zytokin	Negativ-Kontrolle + LIF	„Scrambled“-Kontrolle + LIF	Caspase-4 + LIF
100%	156,6%	134,1%	201,6%

4.3.3 Einfluss von HGF auf das Proliferationsverhalten der Zelllinie JEG-3 nach RNAi von Caspase-4

48 Stunden nach „Knock-down“ von Caspase-4 und Stimulation mit HGF in einer Konzentration von 10 ng/ml (Stimulationszeit: 24 Stunden) kommt es im Vergleich zur nicht-genomischen Kontroll-Transfektion zu einer signifikanten Steigerung ($p=0,006$) der Proliferation in JEG-3-Zellen von im Mittel rund 60 Prozent (siehe Abbildung 4.8).

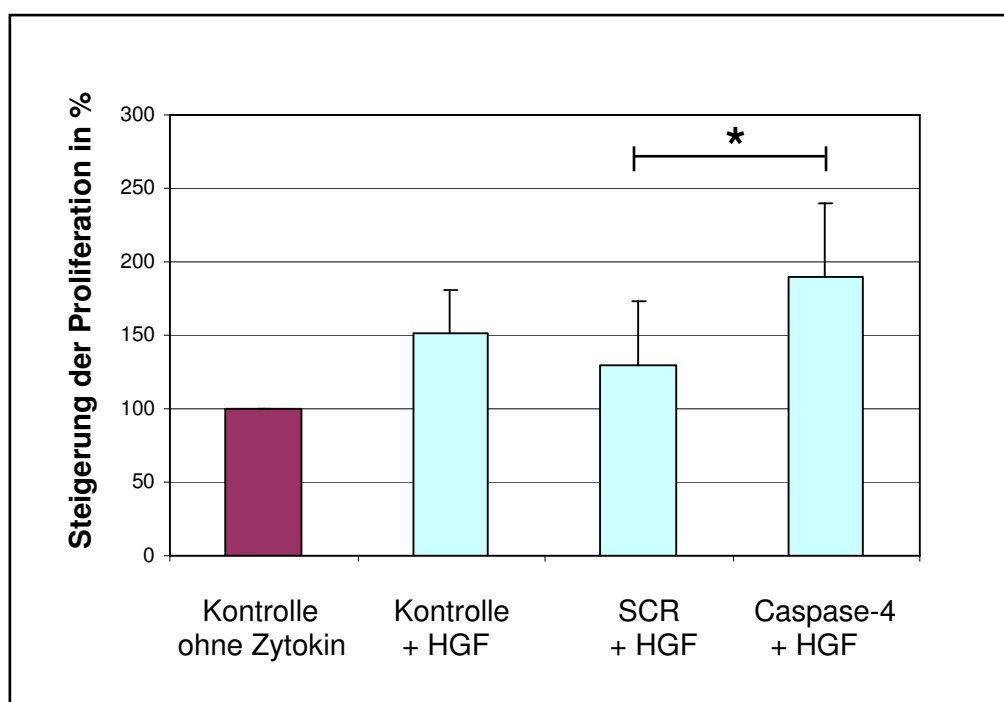


Abbildung 4.8: Proliferation von JEG-3-Zellen nach RNAi von Caspase-4 und Stimulation mit HGF im Vergleich zur unstimulierten Negativ-Kontrolle (=100%) sowie der Negativ-Kontrolle und der nicht-genomischen Kontroll-Transfektion (SCR=„Scrambled“-Kontrolle) nach HGF-Stimulation. Die Abbildung zeigt den jeweiligen Standardfehler sowie relevante Signifikanzen (t-Test, $p<0,05$), $n=4$ unabhängige Versuche.

Tabelle 4.5: Steigerung der Proliferation in Prozent nach Stimulation mit HGF

Negativ-Kontrolle ohne Zytokin	Negativ-Kontrolle + HGF	„Scrambled“-Kontrolle + HGF	Caspase-4 + HGF
100%	151,6%	129,1%	189,7%

4.3.4 Einfluss von Interleukin 6 auf das Proliferationsverhalten der Zelllinie JEG-3 nach RNAi von Caspase-4

48 Stunden nach „Knock-down“ von Caspase-4 und Stimulation mit IL-6 in einer Konzentration von 20 ng/ml (Stimulationszeit: 24 Stunden) kommt es im Vergleich zur nicht-genomischen Kontroll-Transfektion zu einer signifikanten Steigerung ($p=0,009$) der Proliferation in JEG-3-Zellen von im Mittel rund 80 Prozent (siehe Abbildung 4.9).

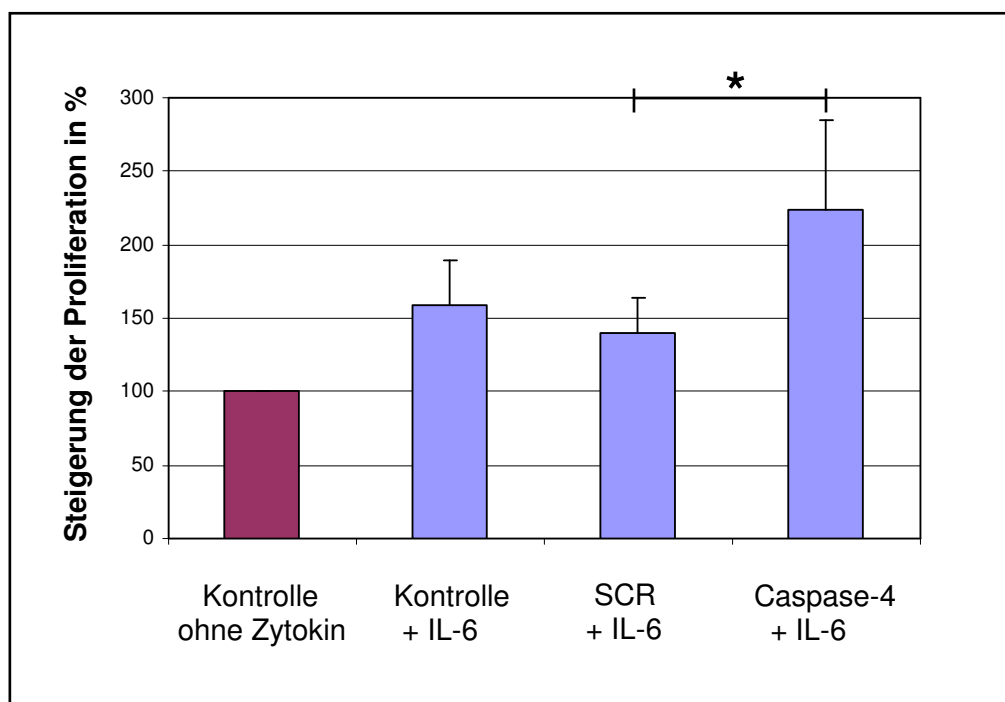


Abbildung 4.9: Proliferation von JEG-3-Zellen nach RNAi von Caspase-4 und Stimulation mit Interleukin 6 im Vergleich zur unstimulierten Negativ-Kontrolle (=100%) sowie der Negativ-Kontrolle und der nicht-genomischen Kontroll-Transfektion (SCR=„Scrambled“-Kontrolle) nach IL-6-Stimulation.

Die Abbildung zeigt den jeweiligen Standardfehler sowie relevante Signifikanzen (t-Test, $p<0,05$), $n=4$ unabhängige Versuche.

Tabelle 4.6: Steigerung der Proliferation in Prozent nach Stimulation mit Interleukin 6

Negativ-Kontrolle ohne Zytokin	Negativ-Kontrolle + HGF	„Scrambled“-Kontrolle + HGF	Caspase-4 + HGF
100%	159,3%	140,1%	223,1%

4.3.5 Gesamtübersicht Proliferation

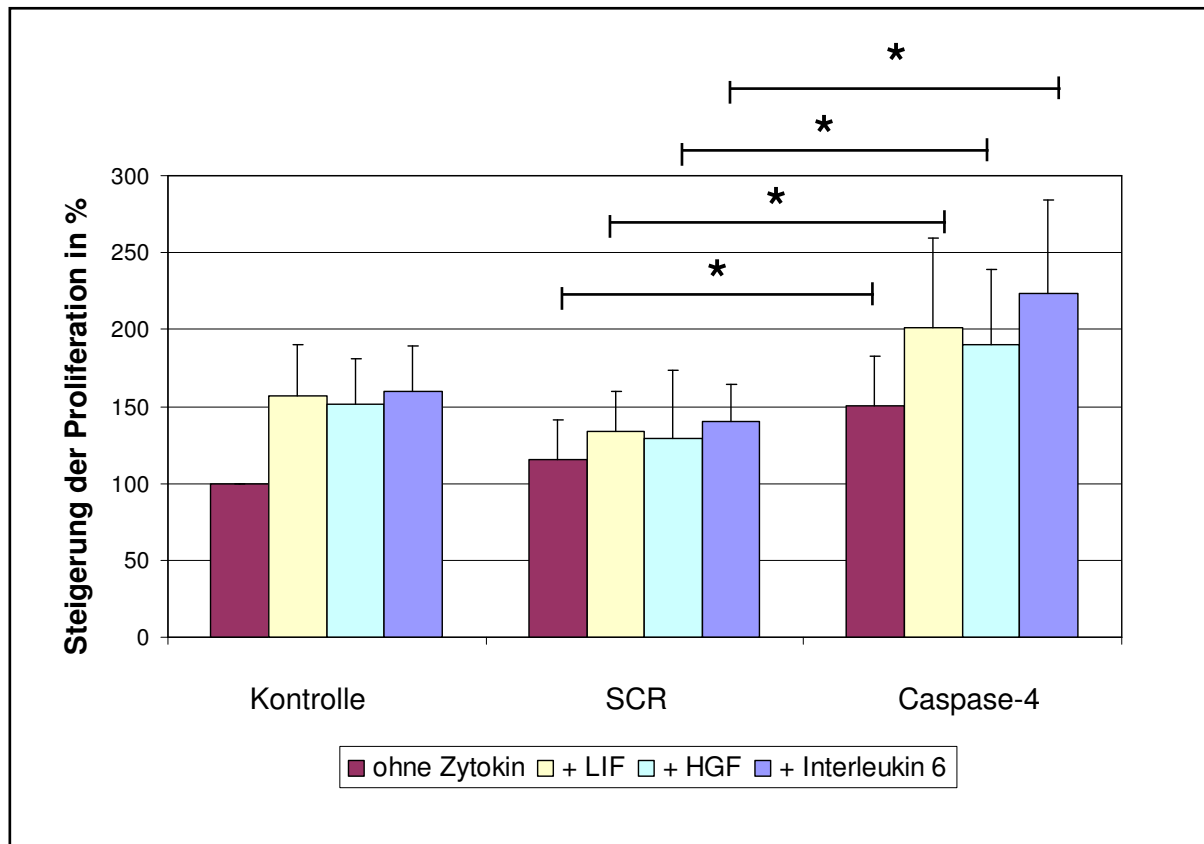


Abbildung 4.10: Gesamtübersicht des Proliferationsverhaltens von JEG-3-Zellen mit und ohne Zytokinstimulation nach RNAi von Caspase-4 im Vergleich zur untransfizierten Negativ-Kontrolle (=100%) sowie einer nicht-genomischen Kontroll-Transfektion (SCR=„Scrambled“-Kontrolle).

Die Abbildung zeigt den jeweiligen Standardfehler sowie relevante Signifikanzen (t-Test, $p < 0,05$), $n=4$ unabhängige Versuche.

Der „Knock-down“ von Caspase-4 in der Zelllinie JEG-3 bewirkt sowohl im Vergleich zur Nativ-Zell-Kontrolle als auch zur nicht-genomischen Kontroll-Transfektion einen Anstieg der Proliferation. Dies gilt für die Proliferationsrate ohne Zytokinstimulation ebenso wie für die Stimulation der Zellen für 24 Stunden mit den Zytokinen LIF, HGF und Interleukin 6 in bereits aufgeführter Konzentration. Statistisch signifikant ($p < 0,05$) ist dieser Anstieg der Proliferationsrate wie in Abbildung 4.10 dargestellt im Vergleich zur nicht-genomisch transfizierten Kontrolle.

4.4 Apoptose-Assay mittels Annexin V

Mittels dieses funktionellen Tests sollte der Einfluss von Caspase-4 bzw. die Unterdrückung der Genexpression dieses Enzyms auf das Apoptose-Verhalten von JEG-3-Zellen untersucht werden.

Wie in Kapitel 3.10 beschrieben, wurden die Zellen nach Transfektion jeweils aufgeteilt, da die Bestimmung der Annexin V-Positivität durch zweierlei unterschiedliche Detektionsmethoden vorgenommen wurde.

Zum einen erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie, zum anderen kam die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Annexin V-Positivität zum Einsatz.

Die Ergebnisse der verschiedenen Detektionsmethoden sollen im Folgenden dargestellt werden.

4.4.1 Durchflusszytometrische Bestimmung des Einflusses der RNAi von Caspase-4 auf die Apoptoserate von JEG-3-Zellen

Der Prozentsatz der Annexin V-positiven Zellen als Marker für das Apoptoseverhalten von JEG-3-Zellen zeigt über das beobachtete Zeitintervall von 72 Stunden eine deutliche Kinetik. Während jeweils nach 24 Stunden die höchsten Apoptoseraten gemessen werden konnten, sank die Anzahl der Annexin V-positiven Zellen im weiteren zeitlichen Verlauf stetig, um nach 72 Stunden die niedrigsten gemessenen Werte zu erreichen. Diese Verminderung der Apoptoseraten um 60-140 Prozent im Vergleich zum jeweiligen Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion zeigte nach der statistischen Auswertung keine deutliche Signifikanz ($p < 0,05$).

Im Bezug auf die Kinetik zeigte sich hierbei kaum ein Unterschied zwischen der untransfizierten Nativ-Zell-Kontrolle sowie den nicht-genomisch bzw. Caspase-4-siRNA transfizierten Zellen.

Jedoch zeigte sich zum Zeitpunkt 24 Stunden nach der Transfektion sowohl bei den nicht-genomisch als auch bei den Caspase-4-siRNA transfizierten Zellen eine um 40-60 Prozent deutlich höhere Apoptoserate im Vergleich zur untransfizierten Nativ-Zell-Kontrolle.

Wie aus Abbildung 4.11 ersichtlich, gleicht sich dieser statistisch signifikante Unterschied der Apoptoserate ($p < 0,05$) im weiteren zeitlichen Verlauf jedoch wieder aus, um zum Zeitpunkt 72 Stunden nach der jeweiligen Transfektion im Vergleich zur untransfizierten Nativ-Zell-Kontrolle weitestgehend gleiche Werte zu erreichen.

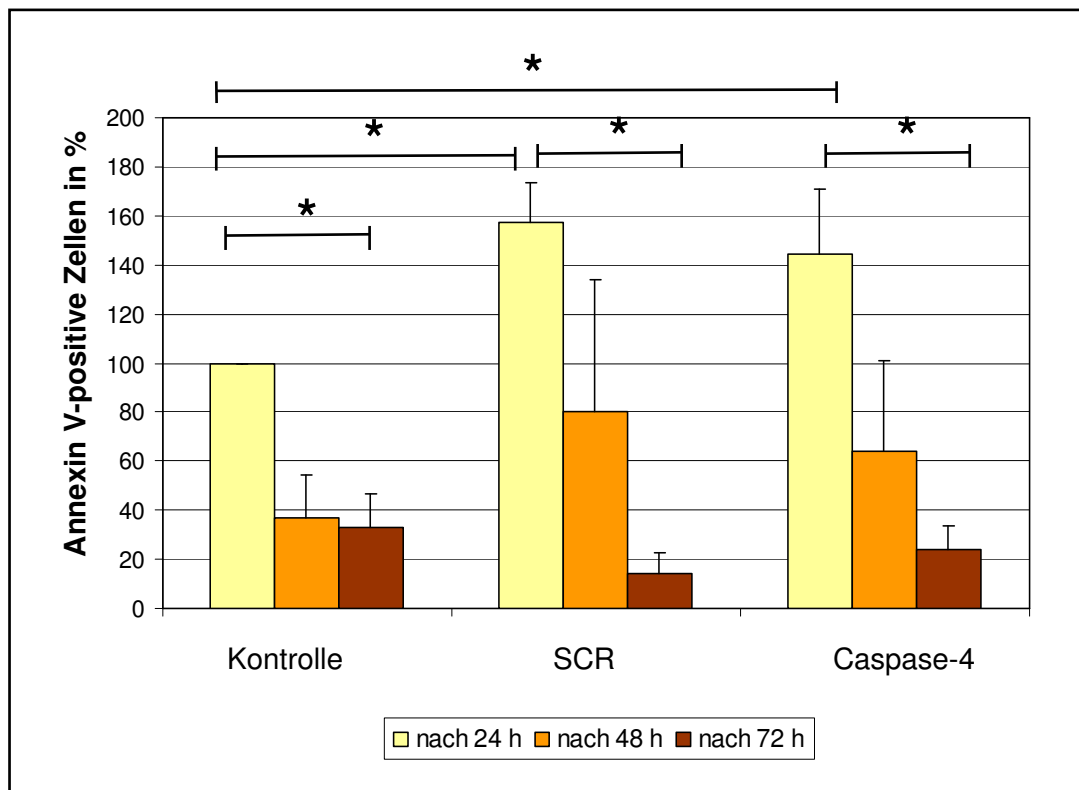


Abbildung 4.11: Apoptoseverhalten von JEG-3-Zellen über einen Zeitraum von 72 Stunden nach RNAi von Caspase-4 im Vergleich zu einer untransfizierten Nativ-Zell-Kontrolle (=100%) sowie einer nicht-genomischen Kontroll-Transfektion (SCR=„Scramled“-Kontrolle).

Die Abbildung zeigt den jeweiligen Standardfehler sowie relevante Signifikanzen (t-Test, $p < 0,05$), $n=3$ unabhängige Versuche.

Tabelle 4.7: Annexin V-positive Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach RNAi in Prozent

	untransfizierte Nativ-Zell-Kontrolle	nicht-genomische Kontroll-Transfektion	Caspase-4-siRNA transfizierte Zellen
nach 24 h	100%	157,5%	144,4%
nach 48 h	36,9%	80,3%	63,9%
nach 72 h	32,8%	14,1%	23,6%

Parallel zur durchflusszytometrischen Detektion der Apoptoserate von Caspase-4-siRNA transfizierten Zellen mittels Annexin V wurden jeweils zu Beginn eines jeden Versuchsansatzes Zellen entnommen und wie in Kapitel 3.10.2 beschrieben für die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung vorbereitet.

Die Ergebnisse dieser fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Zeitpunkte 24 und 72 Stunden nach Transfektion werden im Folgenden in Kapitel 4.4.2 dargestellt.

4.4.2 Fluoreszenzmikroskopische Detektion des Einflusses der RNAi von Caspase-4 auf die Apoptoserate von JEG-3-Zellen

Analog zu den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Bestimmung der Apoptoserate mittels Annexin V zeigt die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Annexin V-Positivität der Zielzellen ebenfalls eine deutlich erhöhte Apoptoserate 24 Stunden nach Transfektion im Vergleich zum Zeitpunkt 72 Stunden nach Transfektion bzw. Aussaat der Zellen auf die vorbereiteten Objektträger (Abbildungen 4.12a-c).

Hierbei ist auch der nochmalige Anstieg der Apoptoserate bei den Zellen der nicht-genomisch transfizierten Kontrolle sowie den Caspase-4-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zur untransfizierten Nativ-Zell-Kontrolle visuell nachvollziehbar.

Zum Zeitpunkt 72 Stunden nach Transfektion ist wie bei der durchflusszytometrischen Bestimmung der Annexin V-Positivität eine deutliche Verminderung der Apoptoserate im Vergleich zum jeweiligen Zeitpunkt nach 24 Stunden zu erkennen (Abbildungen 4.13a-c). Ein Unterschied zwischen den untransfizierten Nativ-Zellen, der nicht-genomisch transfizierten Kontrolle und den spezifisch Caspase-4-siRNA transfizierten JEG-3-Zellen zeigt sich hier ebenfalls kaum.

Annexin V-positive Zellen 24 Stunden nach Transfektion

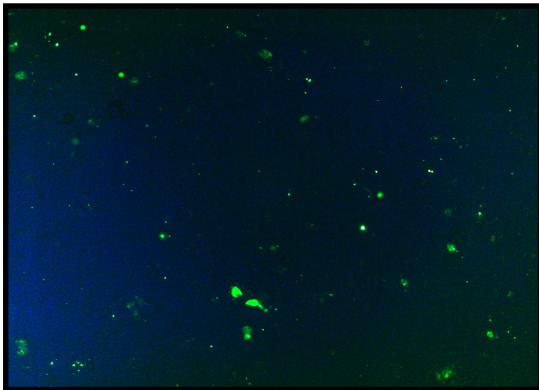


Abbildung 4.12a:
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung
der Annexin V-positiven JEG-3-Zellen
der untransfizierten Nativ-Zell-Kontrolle
nach 24 Stunden
Gesamtvergrößerung: 100x

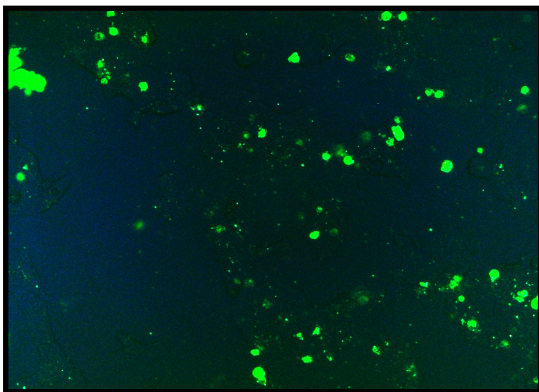


Abbildung 4.12b:
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung
der Annexin V-positiven JEG-3-Zellen
24 Stunden nach Transfektion mit nicht-
genomischer siRNA
Gesamtvergrößerung: 100x

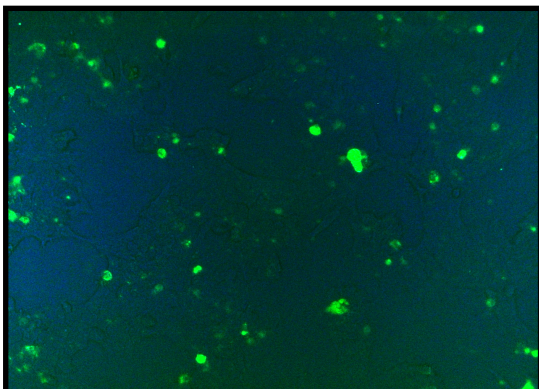


Abbildung 4.12c:
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung
der Annexin V-positiven JEG-3-Zellen
24 Stunden nach der Transfektion mit
Caspase-4-siRNA
Gesamtvergrößerung: 100x

Es wurde darauf geachtet, dass die Gesamtzellzahl in allen fluoreszenz-
mikroskopisch fotografierten Bildausschnitten annähernd identisch war.

Annexin V-positive Zellen 72 Stunden nach Transfektion

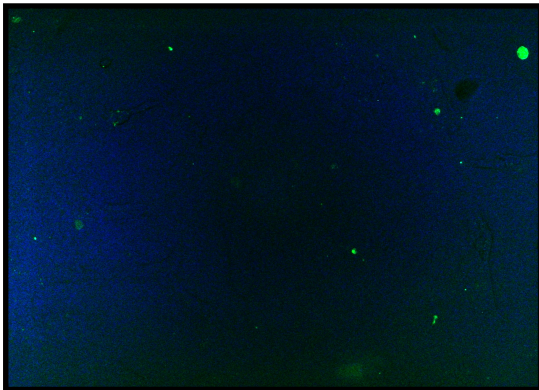


Abbildung 4.13a:
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung
der Annexin V-positiven JEG-3-Zellen
der untransfizierten Nativ-Zell-Kontrolle
nach 72 Stunden
Gesamtvergrößerung: 100x

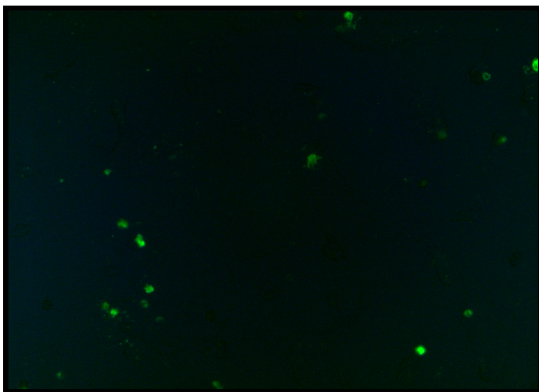


Abbildung 4.13b:
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung
der Annexin V-positiven JEG-3-Zellen
72 Stunden nach Transfektion mit nicht-
genomischer siRNA
Gesamtvergrößerung: 100x

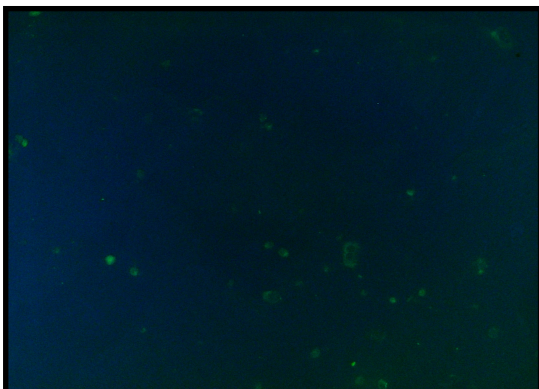


Abbildung 4.13c:
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung
der Annexin V-positiven JEG-3-Zellen
72 Stunden nach der Transfektion mit
Caspase-4-siRNA
Gesamtvergrößerung: 100x

Es wurde darauf geachtet, dass die Gesamtzellzahl in allen fluoreszenzmikroskopisch fotografierten Bildausschnitten annähernd identisch war.

Diskussion

5.1 Funktion von Caspase-4 in trophoblastären Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von Caspase-4 in trophoblastären Zellen näher beleuchtet werden. Hierzu wurde die Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 als Modell-Zelllinie verwendet. Der Grund hierfür ist die mangelnde Verfügbarkeit von humanem plazentarem Material zur Isolierung von Trophoblastzellen, besonders der ersten beiden Schwangerschafts-Trimester. Zudem lassen sich isolierte Trophoblastzellen wegen ihrer kurzen Lebensdauer nicht über einen längeren Zeitraum in Kultur halten. Auch würden Untersuchungen an plazentarem Material aufgrund der Verschiedenheit seiner biologischen Ursprünge (z.B. jeweils unterschiedliche Mütter, mögliche Erkrankungen der Mütter, Komplikationen während der Schwangerschaft, unerkannte Veränderungen der Plazenta ect.) eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse deutlich erschweren.

Aus diesem Grunde wurde für die durchgeführten Versuche die humane Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 als Modell für Trophoblastzellen verwendet, auch wenn dabei zu berücksichtigen ist, dass diese Zelllinie aus transformierten Zellen besteht und deshalb nur als Modell für das Verhalten von Trophoblasten dienen kann. Da transformierte Zellen häufig abweichende Genexpressionsmuster aufweisen (Bischof und Irminger-Finger 2005), bleibt zu klären, ob sich die Ergebnisse dieser Arbeit auf physiologische Trophoblasten übertragen lassen.

Dennoch ist die Verwendung von JEG-3-Zellen im Bereich der Erforschung der molekularen Regulation der Frühschwangerschaft üblich und bietet entscheidende Vorteile:

Die aufwendige Isolierung von Trophoblasten aus Primärmaterial, die häufig ungenügende Mengen an Zellen liefert, entfällt. Außerdem können Trophoblasten während der Isolierung in Mitleidenschaft gezogen werden, so dass sie sich *in vitro* anders verhalten als *in vivo* (Vogiagis und Salamonsen 1999). Dies hätte vor allem im Bereich der durchgeführten Apoptose-Assays zu Problemen hinsichtlich der Interpretation der Ergebnisse führen können.

Darüber hinaus sind die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen unter Verwendung von JEG-3-Zellen einfacher zu vergleichen, da individuelle Unterschiede, wie sie bei der Isolierung von Trophoblasten aus verschiedenen Plazenten berücksichtigt werden müssten, vermieden werden können.

5.2 Protein-„Knock-down“ von Caspase-4 mittels RNAi

Um die Expression von Caspase-4 in JEG-3-Zellen zu reduzieren, wurde die Technik der RNA-Interferenz (RNAi) angewendet. RNAi ermöglicht einen posttranskriptionellen, sequenz-spezifischen „Knock-down“ von Proteinen (McManus und Sharp 2002).

Diese siRNA-vermittelten, intrazellulären Effekte sind prinzipiell von transientser Natur und in ihrer Dauer und „Knock-down“-Effizienz von Zelllinie zu Zelllinie und von Transfektionsart zu Transfektionsart unterschiedlich (Tran et al. 2003). Für die Zelllinie JEG-3 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit dem Transfektionsreagenz Oligofectamine™ eine mit 50-80 Prozent ausreichend hohe und für den Zeitraum der durchgeführten funktionellen Tests stabile „Knock-down“-Rate zu erzielen ist.

Dennoch zeigten sich immer wieder auch deutliche Schwankungen in der Rate der erfolgreich transfizierten Zellen. Hierfür kommen prinzipiell mehrere Ursachen in Frage:

Eine Ursache könnte möglicherweise eine zu geringe Stabilität der verwendeten siRNA sein (Li et al. 2006). Außerdem spielt auch die Proliferationsgeschwindigkeit der betreffenden Zellen eine nicht zu vernachlässigende Rolle, da bei jeder Zellteilung die Konzentration der intrazellulären siRNA jeweils reduziert wird (Omi et al. 2004). Dies würde sich durch die hohe Mitoserate der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 besonders drastisch auf den Protein-„Knock-down“ auswirken.

Spagnou et al. 2004 zeigten zudem, dass sich sowohl zu niedrige Salzkonzentrationen im Medium, in welchem die Liposomenbildung stattfindet als auch zu hohe Konzentrationen von Nukleinsäuren und kationischen Lipiden negativ auf die Bildung der Liposomen auswirken. In diesem Fall könnte die Transfektionseffizienz noch durch Modifikation der Salzkonzentration des Mediums und eine stärkere Verdünnung der Nukleinsäuren und kationischen Lipide gesteigert werden.

Auch könnte auf chemisch modifizierte und somit stabilere siRNAs zurückgegriffen werden. Beispielsweise kann siRNA durch Anknüpfung von Cholesterol an deren 3'-Ende vor einer intrazellulären Degradierung geschützt werden (Kumar und Clarke 2007).

Von einer alleinigen Erhöhung der Konzentration der eingesetzten siRNA wurde abgesehen, da zu hohe Konzentrationen zu unspezifischen Bindungen der siRNA an mRNAs sowie andere Zellbestandteile und damit zu einer Stressreaktion der Zellen führen kann.

Jedoch könnte der Einsatz länger-basierender siRNAs von Vorteil sein. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete siRNA umfasst 19 Nukleotide, wie es momentan weitestgehend Standard ist. Kim et al. 2005 konnten zeigen, dass siRNAs, welche aus 25 bis 27 Nukleotiden bestehen prinzipiell ein größeres Potential bezüglich der Effizienz eines Protein-„Knock-downs“ besitzen.

Zudem besteht die Möglichkeit der Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie mit Hilfe von shRNAs (Yu et al. 2002). ShRNAs sind auf Plasmiden oder viralen Vektoren kodierte Sequenzen, die stabil in das Genom einer Zelle integriert werden und so die Expression des entsprechenden Zielproteins über viele Generationen stabil unterdrücken können (Dorsett und Tuschl 2004). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass ein permanenter „Knock-down“ nicht für zellulär essentielle Proteine möglich ist, da deren Verlust auf Dauer zum Zelltod führen würde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Unterdrückung der Expression eines Proteins mittels siRNA von mehreren Faktoren abhängt, die im Vorfeld für den jeweiligen Zelltyp bekannt sein und gegebenenfalls optimiert werden müssen. Dazu gehören die Transfektionsmethode, Sequenz und Stabilität der siRNA, die Proliferationsrate der Zellen sowie die Halbwertszeit des Proteins.

Um die beobachteten Auswirkungen des „Knock-downs“ eines bestimmten Proteins zudem richtig bewerten zu können, benötigt man verlässliche Kontrollen. Bei jedem der Versuche wurden deshalb parallel mehrere Kontrollen mitgeführt.

Zum einen jeweils eine Nativ-Zell-Kontrolle, wodurch ein Vergleich mit gänzlich unbehandelten Zellen möglich war. Zusätzlich wurden Zellen mit einer sogenannten „Scrambled“-Kontrolle transfiziert. Dabei handelt es sich um eine nicht-genomische siRNA, die dazu dient, die Spezifität von RNAi-Effekten einzuschätzen. Diese Kontrolle kommt den eigentlichen Bedingungen der spezifischen Transfektion für Caspase-4 am nächsten, jedoch darf der Einsatz von „Scrambled“-siRNAs als Kontrolle auch nicht unkritisch betrachtet werden. So konnte auch nachgewiesen werden, dass diese Reagenzien unter Umständen eine signifikante, unspezifische

Reduktion des Gesamtproteinlevels behandelter Zellen bewirken (Spagnou et al. 2004).

Zwar wird in den Ergebnissen dieser Arbeit deutlich, dass die „Scrambled“-siRNA meist keine oder nur geringfügige Veränderungen des Expressions- und Aktivitätsmuster der Zellen verursacht, inwieweit die „Scrambled“-siRNA jedoch tatsächlich frei von unspezifischen Effekten ist, könnte nur durch genomweite Expressions-Analysen zuverlässig untersucht werden.

Abschließend soll erwähnt werden, dass alle Ergebnisse bezüglich der Auswirkungen des „Knock-downs“ der Proteinexpression via siRNA nicht gänzlich unkritisch ausgewertet werden dürfen. In der Vergangenheit wurden die Silencing-Effekte von siRNAs zumeist als ausgesprochen spezifisch beschrieben (Elbashir et al. 2001). Zunehmend wird jedoch deutlich, dass siRNAs neben der selektiven Hemmung von Zielgenen auch weitreichende und komplizierte Nebeneffekte, sogenannte „Off-Target-Effekte“ verursachen. Jackson et al. fanden im Jahre 2003 in einer genomweiten Analyse der Effizienz und Spezifität von siRNAs sichere Anhaltspunkte für Kreuzreaktionen mit Nicht-Ziel-Sequenzen. Zusätzlich zu der eigentlichen Zielsequenz wurden auch Sequenzen mit einer geringeren Sequenzähnlichkeit inhibiert. Die beobachteten Effekte waren hier eher siRNA-spezifisch als Ziel-spezifisch.

5.3 Aktivitätsmessung von Caspase-4 mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

5.3.1 Optimierung der Methode

Der Prozess der Optimierung der Methode zur Aktivitätsbestimmung von Caspase-4 wurde bereits im Kapitel 4.2.1 dargestellt und diskutiert. Deshalb soll im Folgenden die inhaltliche Diskussion der Ergebnisse im Vordergrund stehen.

5.3.2 Diskussion der Ergebnisse

Mit dieser Methode sollte geklärt werden, ob LIF neben der Steigerung der Genexpression von Caspase-4 (Fitzgerald et al. 2005b) auch einen direkten Einfluss auf deren Enzymaktivität besitzt.

Wie in Kapitel 4.2.1 gezeigt, wurde durch die Optimierung der Methode für den relevanten Messbereich eine exakte Bestimmung der Caspase-4-Aktivität gesichert.

Die vorliegenden Ergebnisse (siehe Kapitel 4.2.2) zeigen deutlich, dass die Stimulation von JEG-3-Zellen mit den Zytokinen LIF, IL-6 und HGF zu einer Steigerung der enzymatischen Aktivität von Caspase-4 führt. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die Arbeitshypothese, dass LIF auch einen direkten Einfluss auf die Enzymaktivität von Caspase-4 besitzt. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass auch die Zytokine IL-6 und HGF einen stimulierenden Effekt auf die Aktivität von Caspase-4 ausüben. Dies ist eine bisher ebenso unbekanntes wie interessante Erkenntnis.

Zudem erbrachte die Aktivitätsmessung nach Transfektion der JEG-3-Zellen mit Caspase-4-siRNA eine Verminderung der jeweiligen Caspase-4-Aktivität. Dies zeigt, dass der „Knock-down“, obwohl nicht vollständig, neben einer verminderten Genexpression auch zu einer verminderten Caspase-4-Aktivität führt. Dies gilt auch für die Caspase-4-siRNA transfizierten Zellen nach Stimulation mit IL-6 und HGF. Eine Ausnahme bilden die Caspase-4-transfizierten Zellen nach Stimulation mit LIF: hier kommt es nach „Knock-down“ von Caspase-4 und Zytokin-Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung der Caspase-4-Aktivität.

Hierfür kommen zwei mögliche Erklärungen in Betracht:

Da die Transfektionseffizienz nur zwischen 50 und 80 Prozent beträgt, bleibt eine gewisse Restexpression von Caspase-4 auch nach Transfektion erhalten. Wie

Fitzgerald et al. 2005b zeigen konnten, führt die Stimulation mit LIF zu einer vermehrten Caspase-4-Expression in JEG-3-Zellen, woraus auch nach unvollständigem „Knock-down“ eine im Vergleich zur untransfizierten, LIF-stimulierten Kontrolle erhöhte Enzymaktivität von Caspase-4 möglich wäre.

Eine weitere Erklärung liegt in der Erkenntnis, dass LIF neben einer vermehrten Genexpression von Caspase-4 auch direkt die Aktivierung der bereits synthetisierten, in der Zelle vorliegenden Procaspase-4 induziert. Dies zeigen die in Kapitel 4.2.2. dargestellten Ergebnisse der Caspase-4-Aktivitätsmessung. Diese Beobachtung ist jedoch keine hinreichende Erklärung für die Steigerung der Caspase-4-Aktivität nach Transfektion und LIF-Stimulation, da dieser Effekt auch durch die Zytokine IL-6 und HGF ausgelöst wurde.

Somit legen die Ergebnisse nahe, dass sowohl LIF als auch IL-6 und HGF zu einer direkten Steigerung der Caspase-4-Aktivität über die Aktivierung von bereits vor RNAi in der Zelle vorsynthetisierter Procaspase-4 führen, jedoch nur LIF auch eine Steigerung der Genexpression von Caspase-4 in JEG-3-Zellen bewirkt.

Jedoch wäre dann eine noch deutlicher erhöhte Caspase-4-Aktivität in den untransfizierten Zellen nach LIF-Stimulation zu erwarten gewesen. Dass hier die Messungen eine niedrigere Aktivität von Caspase-4 als in den „Knock-down“-Zellen nach LIF-Stimulation ergaben, ließe sich nur spekulativ erklären:

Während LIF in nativen JEG-3-Zellen zwar zu einer vermehrten Genexpression von Caspase-4 führt, resultiert aus dieser Steigerung der Genexpression aufgrund der intrazellulär in ausreichender Menge vorliegenden Procaspase-4 letztendlich keine effektive Erhöhung der Proteinsynthese des Enzyms Caspase-4. In Caspase-4-siRNA transfizierten Zellen, in denen die Menge der synthetisierten Procaspase-4 durch den „Knock-down“ sowie den natürlichen Turn-over stetig abnimmt, führt die Stimulation mit LIF wie in den Nativ-Zellen zu einer vermehrten Genexpression von Caspase-4. Im Gegensatz zur Nativ-Zell-Situation kommt es nach erfolgreichem „Knock-down“ jedoch aufgrund des intrazellulären Mangels an (Pro-)Caspase-4 über eventuelle Feedback-Mechanismen jedoch zu einer wirklichen Steigerung der Enzymsynthese. Belege für diese Art der Expressions- und Syntheseregulation lassen sich in der Literatur leider nicht finden, so dass dieser Interpretationsansatz der vorliegenden Ergebnisse nur spekulativer Natur sein kann. Bezüglich der Funktion von Caspase-4 in JEG-3-Zellen ergeben sich nach Interpretation der Ergebnisse sowie dem Studium der bereits veröffentlichten Literatur folgende Überlegungen:

Bekannt ist, dass

- Caspase-4 als Aktivator von Caspase-1 fungiert (Faucheu et al. 1995, Wang et al. 1998)
- Caspase-1 das Zytokin Prointerleukin-1 β in die aktive Form Interleukin-1 β prozessiert (Fassy et al. 1997)
- Interleukin-1 β , das von der invadieren Blastozyste synthetisiert wird, zu einer vermehrten Bildung von MMP-9 sowie einer Hemmung von TIMP 1+3 führt, was das lokalinvasive Potential von JEG-3-Zellen bzw. Trophoblasten erhöht (Lala und Graham 1990, Huang et al. 1998, Li et al. 2006)

Hieraus könnte sich folgende Funktionskette ergeben (siehe auch Abbildung 5.1):

Vor allem LIF führt zu einer vermehrten Genexpression (Fitzgerald et al. 2005b) sowie direkten Aktivitätssteigerung (eigene Ergebnisse) von Caspase-4 \rightarrow Caspase-4 aktiviert vermehrt Caspase-1 \rightarrow Caspase 1 und in geringem Maße auch Caspase-4 überführen Prointerleukin-1 β in die aktive Form Interleukin-1 β \rightarrow daraus resultiert eine Zunahme bzw. Regulation der Invasion über eine Steigerung der MMP-9 und gleichzeitigen Hemmung der TIMPs 1 und 3.

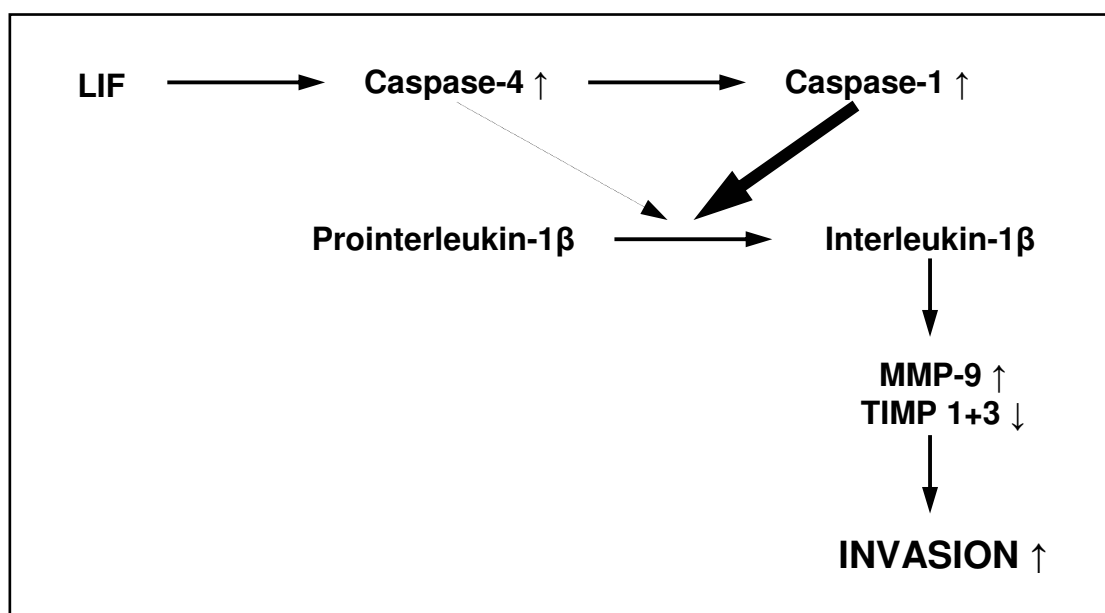


Abbildung 5.1: Schema zur Erklärung der möglichen Funktion von Caspase-4 in der Regulation des Invasionspotentials von JEG-3-Zellen bzw. Trophoblastzellen

Somit könnte Caspase-4 ein bisher unbekannter Regulator der Trophoblastinvasion sein.

5.4 Proliferations-Assay

Mit diesem Assay sollte untersucht werden, ob Caspase-4 bzw. deren „Knock-down“ einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von JEG-3-Zellen hat. Zum wurde überprüft, inwieweit die für die erfolgreiche Etablierung einer Schwangerschaft relevanten Zytokine LIF, HGF und Interleukin 6 nach RNAi von Caspase-4 die Proliferationsrate dieser Zellen beeinflussen.

Hierzu werden die Ergebnisse der Proliferationsversuche noch einmal in einer kurzen Übersicht dargestellt:

- Der „Knock-down“ von Caspase-4 führt zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation in der Zelllinie JEG-3 im Vergleich zur nicht-genomischen Kontroll-Transfektion
- Diese Steigerung der Proliferation lässt sich durch die zusätzliche Stimulation mit den Zytokinen LIF, IL-6 und HGF nochmals steigern

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Verminderung der Genexpression von Caspase-4 mittels RNAi zu einer signifikanten Steigerung des Proliferationsvermögens von JEG-3-Zellen führt. Die Signifikanz dieser Unterschiede im Proliferationsverhalten nach Transfektion mit Caspase-4-siRNA machen eine Interpretation der Ergebnisse im Sinne einer Steigerung der Proliferation durch Seit- bzw. „Off-Target“-Effekte (siehe Kapitel 5.2) unwahrscheinlich. Vielmehr scheint Caspase-4 tatsächlich einen hemmenden Einfluss auf das Proliferationsverhalten von JEG-3-Zellen bzw. Trophoblastzellen zu besitzen. Diese Vermutung lässt sich durch folgende, bereits bekannte Fakten um die Regulationsmechanismen invasiver Trophoblasten untermauern: invadierende Trophoblastzellen vor allem des Synzytiotrophoblasten und letztendlich auch die aus Trophoblasten mutierten Chorionkarzinomzellen der Zelllinie JEG-3 sind hochdifferenzierte Zellen, die sich funktionell hauptsächlich auf die Invasion ins endometriale Stroma spezialisiert haben (Xu et al. 2002). Hierfür ist ein gesteigertes zelluläres Proliferationsvermögen nicht erforderlich bzw. wäre sogar hinderlich und wird deshalb durch intra- und extrazelluläre Negativ-Regulatoren wie den Placenta Growth Factor (PIGF) gehemmt (Graham et al. 1994, Athanassiades und Lala 1998).

Somit könnte das Enzym Caspase-4 neben der in dieser Arbeit aufgezeigten möglichen Funktion als Positiv-Regulator des Invasionsvermögens in JEG-3- bzw. Trophoblastzellen gleichzeitig als Negativ-Regulator des Proliferationsverhaltens in diesen Zellen fungieren.

Die Ergebnisse der Zytokinstimulation decken sich nur teilweise mit den Ergebnissen von Fitzgerald et al. 2005b, wo nur für LIF ein deutlich positiver Effekt auf die Proliferationsrate von JEG-3-Zellen gezeigt werden konnte, während IL-6 nur zu einer geringen Proliferationssteigerung führte und durch die Stimulation mit HGF gar kein Effekt auf die Proliferation sichtbar war.

Jedoch ist in der Literatur ein proliferationssteigernder Effekt aller drei Zytokine auf Zellen trophoblastären und anderen Ursprungs vielfach belegt (Wolf et al. 1991, Lowe et al. 1991, Kloss et al. 1997, Spangenburg und Booth 2002, Das et al. 2002, Wang et al. 2008), so dass die Ergebnisse dieser Arbeit sich mit einer Vielzahl in der Literatur aufgeführter Ergebnisse decken.

5.5 Apoptose-Assay mittels Annexin V

5.5.1 Diskussion der Methoden

Apoptose-Assay mit Annexin V via FACS

Mit dieser Methode ist eine exakte und objektive Bestimmung der Annexin V-positiven Zellen innerhalb einer Zellpopulation möglich. Hierdurch lassen sich quantifizierbare Aussagen über den Anteil der sich in Apoptose befindlichen Zellen treffen. Neben diesen Vorteilen liegt der Nachteil diese Methode jedoch darin, dass die adhärennten JEG-3-Zellen für die Messung durch Abtrypsinieren vom Untergrund gelöst und in mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten aufbereitet werden müssen. Diese Vorbereitungsschritte können für die Zellen einen nicht unerheblichen Zellstress bedeuten, so dass davon ausgegangen werden muss, dass ein in seiner Höhe unbekannter Anteil der Annexin V-positiven Zellen durch die Methode selbst verursacht wird. Da diese Vorbereitungsschritte jedoch für alle gemessenen Proben gleich sind, ist dieser mögliche verfälschende Effekt im Vergleich der Proben untereinander nur von untergeordneter Bedeutung.

Die gemessenen Ergebnisse sind über den bereits diskutierten methodischen Nachteil hinaus aus inhaltlicher Sicht schlüssig: zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Transfektion zeigte sich insgesamt in den transfizierten Zellen eine erhöhte Apoptoserate, welche sich im Verlauf zu den Zeitpunkten 48 und 72 Stunden nach Transfektion deutlich rückläufig zeigte. Dass der Anteil der apoptotischen Zellen in den transfizierten Zellen im Vergleich zur untransfizierten Nativ-Zell-Kontrolle erhöht war, lässt sich möglicherweise durch sogenannte Seit- bzw. „Off-Target“-Effekte der RNA-Interferenz erklären (Tschaharganeh et al. 2007): siRNA kann eine unspezifische Stressreaktion in transfizierten Zellen auslösen, welche zum Zelltod oder zu einer veränderten basalen Expression vieler Gene führt.

Bis jetzt wurde oft angenommen, dass siRNA mit weniger als ~30 Basenpaaren unabhängig von der Sequenz keine unspezifische zelluläre Stressreaktion auslöst. Verschiedene Veröffentlichungen zeigen jedoch, dass das Einbringen von siRNA-Sequenzen in die Zelle über die Induktion der Interferon-Synthese (Kumar et al. 1994) und verschiedener anderer Stoffwechselwege (Jackson et al. 2003, Semizarov et al. 2003, Persengiev et al. 2004, Fedorov et al. 2006) zu einer unspezifischen Reaktion mit Zellstress und Apoptose führen kann.

Apoptose-Assay mit Annexin V via Fluoreszenzmikroskopie

Obwohl die fluoreszenzmikroskopische Detektion der Annexin V-positiven Zellen eine eher subjektive Methode darstellt, mit der eine standardisierte Quantifizierung der Apoptoserate nicht oder nur schwerlich möglich ist, fand diese Methode dennoch in Ergänzung der Bestimmung der Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie Verwendung. Der entscheidende Vorteil dieser Methode liegt darin, dass eine aufwendige Aufbereitung der Zellen vor der Messung entfällt. Somit kommt die Darstellung der Zellen in adhäsiver Kultur der Nativ-Situation deutlich näher und der Anteil der durch die Aufbereitung in Zellstress und Apoptose versetzten Zellen wird somit vernachlässigbar.

Ein weiteres Problem der fluoreszenzmikroskopischen Detektion der Annexin V-positiven Zellen ist die Schwierigkeit, dass die Gesamtzahl der sich im mikroskopischen Blickfeld befindlichen Zellen von einem aufgenommenen Foto zum nächsten variiert. Deshalb wurde darauf geachtet, möglichst einen für die Gesamtheit aller auf einem Objektträger kultivierten Zellen repräsentativen Ausschnitt bezüglich Gesamtzellzahl und Zellbeschaffenheit auszuwählen und fluoreszenzmikroskopisch darzustellen.

Trotz aller Einschränkungen bezüglich Objektivität und sicherer Quantifizierbarkeit der Annexin V-Positivität mittels dieser Methode, zeigen sich visuell ähnliche bis gleiche Ergebnisse wie in der objektiven Messung mittels Durchflusszytometrie. Somit scheinen die vermeintlichen Nachteile der jeweiligen Methoden ohne größere Bedeutung zu sein und sich die durchflusszytometrische und fluoreszenzmikroskopische Detektion der Apoptoserate gegenseitig zu ergänzen.

5.5.2 Diskussion der Ergebnisse

Zwei grundlegende Fragen sollten mit diesem Assay geklärt werden:

- Sind die in den Proliferations-Assays gesehenen Effekte möglicherweise auf eine vermehrte bzw. verminderte Apoptoserate zurückzuführen?
- Gibt es Anhaltspunkte dafür, dass Caspase-4, wie für andere Zellarten in der Literatur kontrovers diskutiert (siehe Kapitel 1.5.1), auch in Chorionkarzinom-Zellen in die Mechanismen des zellulären Apoptose-Programms involviert ist bzw.
- Hat der „Knock-down“ von Caspase-4 einen Einfluss auf das Apoptose-Verhalten von JEG-3-Zellen?

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Steigerung der Proliferationsrate von JEG-3-Zellen nach Caspase-4-siRNA-Transfektion nicht nur eine vermeintliche Erhöhung aufgrund einer verminderten Apoptoserate darstellt, sondern auf eine reale Steigerung der Proliferation zurückzuführen ist. Zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Transfektion, zu dem auch die Detektion der Proliferationsrate stattfand, zeigten sowohl die nicht-genomisch kontrolltransfizierten als auch die Caspase-4-siRNA-transfizierten Zellen sogar eine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zur Nativ-Zell-Kontrolle. Somit kann angenommen werden, dass der gezeigte proliferationssteigernde Effekt des „Knock-downs“ von Casapse-4 in Wirklichkeit noch größer sein könnte, als die Ergebnisse der Proliferations-Assays für sich alleine gesehen implizieren.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass Caspase-4 in der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 nicht in die Regulation des Apoptosegeschehens involviert ist. Die Transfektion, welche wie gezeigt, initial einen potentiell pro-apoptotischen Stimulus für die Zellen darstellt und auch die Herunterregulierung dieses Enzyms scheinen keinerlei Einfluss auf das Apoptoseverhalten von JEG-3-Zellen zu haben. Eine solche Aussage muss jedoch aus folgenden Gründen mit Vorsicht getroffen werden:

Beachtet werden muss, dass der „Knock-down“ mittels RNAi zum einen nicht vollständig ist und die verbleibende Genexpression möglicherweise für eine uneingeschränkte Funktion von Caspase-4 ausreichend sein könnte. Zusätzlich

enthält jede Zelle schon vor Transfektion eine unbekannte Menge an inaktiver Procaspase-4, so dass dieser Vorrat an bereits synthetisiertem Zymogen zusätzlich zur verbliebenen restlichen Genaktivität zu einer durch die Transfektion unbeeinträchtigten Funktion von Caspase-4 beitragen könnte. Diese Überlegungen gelten für alle in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Tests und stellen eine generelle Einschränkung der Interpretierbarkeit der Ergebnisse dar.

Zudem können die Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten Apoptose-Assays nur Anhaltspunkte dafür darstellen, dass Caspase-4 in der Zelllinie JEG-3 nicht in die Regulation oder Ausführung der Apoptose involviert ist.

Diese Hypothese sollte im Verlauf noch durch weitere Apoptose-spezifische Assays wie z.B. cleaved PARP und/oder den TUNEL-Assay überprüft und gesichert werden.

5.6 Schlussfolgerungen & Ausblick

Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit sollten mögliche Funktionen von Caspase-4 in der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 untersucht werden. Hierfür wurde die Technik der RNA-Interferenz angewandt und verschiedene funktionelle Tests durchgeführt, um den Einfluss von Caspase-4 bzw. deren „Knock-down“ auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten von JEG-3-Zellen zu ermitteln.

Zudem konnte im Rahmen dieser Dissertation die bisher allgemein übliche Methode zur Bestimmung der Caspase-4-Aktivität optimiert und dadurch deutlich verbessert werden (Koehn et al. 2008, in Druck).

Die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit lassen folgende Schlüsse bezüglich der Funktion von Caspase-4 in der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 zu:

- Sowohl LIF als auch IL-6 und HGF führen zu einer direkten Steigerung der Caspase-4-Aktivität über die Aktivierung von bereits in der Zelle vorsynthetisierter Procaspase-4, jedoch nur LIF bewirkt auch eine Steigerung der Proteinexpression von Caspase-4 in JEG-3-Zellen.
LIF könnte somit über die in Kapitel 5.3.2 und Abbildung 5.1 dargestellten, bisher unbekanntes Funktionsbeziehungen ein Positiv-Regulator des Invasionsvermögens von JEG-3-Chorionkarzinom- bzw. Trophoblastzellen sein.
- Die Proliferationsversuche nach RNAi von Caspase-4 lassen vermuten, dass Caspase-4 zudem ein intrazellulärer Negativ-Regulator des Proliferationsverhaltens von JEG-3-Chorionkarzinom- bzw. Trophoblastzellen sein könnte.
- Durch die Apoptoseversuche ergaben sich keine Anhalte dafür, dass Caspase-4 in die Ausführung oder Regulation des programmierten Zelltodes von JEG-3-Chorionkarzinom- bzw. Trophoblastzellen involviert ist.

Ausblick

Die vorliegende Arbeit stellt den Anfang in der Charakterisierung der Funktion des Enzyms Caspase-4 in der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 bzw. in Trophoblastzellen dar. Deshalb bedürfen die vorliegenden Ergebnisse, deren Interpretation aufgrund mangelnder Erkenntnisse zu diesem Thema in der Literatur in einigen Bereichen nur von spekulativer Natur sein kann, weiterer Arbeit, um diese zu bestätigen und noch zu erweitern.

Die Etablierung einer mittels shRNA stabil Caspase-4-transfizierten JEG-3-Zelllinie, wie bereits in Kapitel 5.2 diskutiert, wäre hierfür ein erster Schritt.

Zudem sollte mit weiteren funktionellen Tests der Einfluss des „Knock-downs“ von Caspase-4 auf für Trophoblasten essentielle zelluläre Funktionen wie Invasion und Migration untersucht werden, um deren Funktion weiter charakterisieren zu können.

Darüber hinaus steht im Verlauf die Evaluation aller im JEG-3-Modell erbrachten Ergebnisse durch die Wiederholung der funktionellen Tests mit trophoblastären Primärzellen im Vordergrund. Die sich hierfür ergebenden Schwierigkeiten in der technischen Durchführung und für eine spätere Interpretation dieser Versuche wurde ausführlich in Kapitel 5.1 diskutiert.

Zusammenfassung

Einleitung

Das Wunder der Geburt gilt für viele als einer der faszinierendsten biologischen Vorgänge des menschlichen Körpers. Unser Verständnis um die molekularen Mechanismen der Entstehung neuen Lebens und die erfolgreiche Etablierung einer Schwangerschaft ist jedoch bis in unsere heutige Zeit unvollständig.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss des in seiner Funktion bis heute noch wenig verstandenen Enzyms Caspase-4 auf grundlegende zelluläre Funktionen der humanen Chorionkarzinom-Modell-Zelllinie JEG-3, welche als Modell-Zelllinie für invadierende Trophoblasten dient, untersucht.

Anstoß für diese Arbeit gaben die Ergebnisse von Fitzgerald et al. 2005b, welche erstmals eine vermehrte Expression dieses Enzyms in JEG-3-Zellen nach Stimulation mit dem Zytokin Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) aufzeigten.

Methodik

Die Erkenntnisse von Fitzgerald et al. 2005b aufgreifend, sollte untersucht werden, ob die Stimulation von JEG-3-Zellen mit LIF neben einer vermehrten Genexpression auch zu einer direkten Steigerung der Enzymaktivität von Caspase-4 führt.

Um zudem Aussagen über die Funktion von Caspase-4 in der Zelllinie JEG-3 treffen zu können, wurde initial die Unterdrückung der weiteren Genexpression und Proteinsynthese von Caspase-4 mittels RNA-Interferenz (RNAi), einer Technik zur sequenz-spezifischen posttranskriptionalen Genregulation, etabliert.

Mit verschiedenen funktionellen Tests wurde anschließend der Einfluss dieses „Knock-downs“ auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten von JEG-3-Zellen untersucht.

Ebenfalls sollte überprüft werden, ob die für Etablierung und Regulation der Frühschwangerschaft relevanten Zytokine Leukaemia Inhibitory Factor (LIF), Interleukin 6 (IL-6) und Hepatocyte Growth Factor (HGF) einen Einfluss auf die oben genannten Zellfunktionen nach RNAi von Caspase-4 besitzen.

Ergebnisse

Nach erfolgreicher Etablierung der Transfektion von JEG-3-Zellen mittels Caspase-4-siRNA konnte gezeigt werden, dass LIF neben einer vermehrten Genexpression auch direkt zu einer signifikanten Steigerung der Enzymaktivität von Caspase-4 führt.

Hierfür fand eine Methode zur Messung der Caspase-4-Aktivität Anwendung, die im Rahmen dieser Dissertation im Vergleich zur bisher üblichen Methode optimiert und in ihrer Messgenauigkeit deutlich verbessert wurde. Dadurch steht nun eine Methode zur exakten Bestimmung der Aktivität von Caspase-4 bis in niedrigste Konzentrationsbereiche zur Verfügung, die in Zukunft auch für die Bestimmung der Enzymaktivität anderer Caspasen Verwendung finden könnte (Koehn et al. 2008, in Druck).

Die funktionellen Tests konnten zudem zeigen, dass der „Knock-down“ von Caspase-4 sowie die anschließende Stimulation der Zellen mit den Zytokinen LIF, IL-6 und HGF zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation führt.

Im Bezug auf die intrazelluläre Regulation des Apoptose-Verhaltens von JEG-3-Zellen bis 72 Stunden nach Transfektion zeigen die Ergebnisse keinen sicheren pro- oder anti-apoptischen Einfluss von Caspase-4, wie er für andere Zellarten in der Literatur mehrfach beschrieben wurde.

Schlussfolgerungen

Die Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse lässt eine regulatorische Funktion von Caspase-4 vor allem im Bereich der Steigerung des lokalen Invasionspotentials der Chorionkarzinom-Zelllinie JEG-3 vermuten. Die Übertragung dieser Ergebnisse vom JEG-3-Modell auf die trophoblastäre Primärzelle und die Einordnung der Ergebnisse in die bis heute gesicherten Erkenntnisse um die Vorgänge der Trophoblastinvasion und Plazentation lassen den Schluss zu, dass Caspase-4 als Regulator des invasiven Potentials von Trophoblastzellen einen weiteren und bis dato unbekanntem Baustein der molekularen Mechanismen zur erfolgreichen Etablierung einer Schwangerschaft darstellen könnte.

Literatur- & Quellenverzeichnis

Quellenverzeichnis der Abbildungen

- Abb. Deckblatt: <http://www.uni-jena.de/>
- Abb. Widmung: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Da_Vinci_Studies_of_Embryos_Luc_Viatour.jpg (modifiziert)
- Abbildung 1.1: www2.hu-berlin.de/sexology/ATLAS_EN/html/fertilization.html
- Abbildung 1.2: Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>)
- Abbildung 1.3: Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>)
- Abbildung 1.4: CATH Protein Structure Classification (<http://www.cathdb.info>)
- Abbildung 1.5: Klaus Schulze-Osthoff: „In tödlicher Mission: Apoptose, Killerproteasen und Erkrankungen“ (Jahrbuch 2002 der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
- Abbildung 1.6: nach <http://www.uniklinik-duesseldorf.de/deutsch/unternehmen/institute/institutfrmolekularemedizin/lehrevorlesungenss2006/apoptosevorlesung/page.html> modifiziert
- Abbildung 1.8: 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 3.2: <http://www.life.uiuc.edu/shapiro/RNAipathway.jpg> (modifiziert)
- Abbildung 3.3: http://nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/10 (modifiziert)
- Abbildung 3.6: Promega, technical bulletin „CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ (modifiziert)
- Abbildung 3.7: http://www.bdbiosciences.ca/canada/pharming/en/product_pages/annexin/ (modifiziert)

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

Literaturverzeichnis

- Abrahams VM**, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G. 2004. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 51(4):275-82.
- Alberts**, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. 2004. *Molekularbiologie der Zelle*. 4. Auflage. WILEY-VCH Verlag.
- Allaire AD**, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA. 2000. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol*, 96(2):271-276.
- Alnemri ES**. 1997. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem*, 64(1):33-42.
- Aoki Y**, Adachi S, Yoshiya N, Honma S, Kanazawa K and Tanaka K. 1991. Effects of various growth factors on the proliferation and the differentiation of trophoblastic cells in vitro. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 43:1527-1532.
- Aravind L**, Dixit VM, Koonin EV. 2001. Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science*, 291(5507):1279-1284.
- Athanassiades A**, Lala PK. 1998. Role of placenta growth factor (PlGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. *Placenta*, 19(7):465-473.
- Axt R**, Meyberg R, Mink D, Wasemann C, Reitnauer, Schmidt W. 1999. Immunohistochemical detection of apoptosis in the human term and post-term placenta. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 26:56-59.
- Axt R**, Kordina AC, Meyberg R, Reitnauer K, Mink D, Schmidt W. 1999. Immunohistochemical evaluation of apoptosis in placentae from normal and growth-restricted pregnancies. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 26:195-198.
- Bhatt H**, Brunet LJ, Stewart CL. 1991. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(24):11408-11412.
- Bischof B**, Irminger-Finger I. 2005. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *IJBCB*, 37: 1-16.
- Black S**, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, Huppertz B. 2004. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ*, 11(1):90-98.
- Burrows TD**, King A, Loke YW. 1993. Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin and fibronectin. *Hum Reprod*, 8:475-484.

Burrows TD, King A, Loke YW. 1996. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update*, 2:307-321.

Cheng JG, Rodriguez CI, Stewart CL. 2002. Control of uterine receptivity and embryo implantation by steroid hormone regulation of LIF production and LIF receptor activity: towards a molecular understanding of "the window of implantation". *Rev Endocr Metab Disord*, 3(2):119-126.

Comoglio PM, Boccaccio C. 2001. Scatter factors and invasive growth. *Semin Cancer Biol*, 11(2):153-165.

Cory S, Huang DC, Adams JM. 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 22(53):8590-8607.

Cryns V, Yuan J. 1998. Proteases to die for. *Genes Dev*, 12(11):1551-1570.

Das C, Kumar VS, Gupta S, Kumar S. 2002. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. *J Reprod Immunol*, 53(1-2):257-268.

Dash PR, Whitley GS, Ayling LJ, Johnstone AP, Cartwright JE. 2005. Trophoblast apoptosis is inhibited by hepatocyte growth factor through the Akt and beta-catenin mediated up-regulation of inducible nitric oxide synthase. *Cell Signal*, 17(5):571-580.

Dokras A, Gardner LM, Seftor EA, Hendrix MJ. 2001. Regulation of human cytotrophoblast morphogenesis by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Biol Reprod*, 65(4):1278-1288.

Dorsett Y, Tuschl T. 2004. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 3:318-329.

Droin N, Beauchemin M, Solary Em, Bertrand R. 2000. Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade. *Cancer Res*, 60(24):7039-7047.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15:188-200.

Eckert A, Keil U, Marques CA, Bonert A, Frey C, Schussel K, Muller WE. 2003. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*, 66(8):1627-1634.

Ekshyyan O, Aw TY. 2004. Apoptosis in acute and chronic neurological disorders. *Front Biosci*, 9:1567-1576.

Ellis RE, Jacobson DM, Horvitz HR. 1991. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 129(1):79-94.

Enders AC, King BF. 1991. Early stages of trophoblastic invasion of the maternal vascular system during implantation in the macaque and baboon. *Am J Anat*, 192:329-346.

Fassy F, Krebs O, Rey H, Komara B, Gillard C, Capdevila C, Yea C, Faucheu C, Blanchet AM, Miossec C, Diu-Hercend A. 1998. Enzymatic activity of two caspases related to interleukin-1beta-converting enzyme. *Eur J Biochem*, 253(1):76-83.

Faucheu 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.

Fedorov Y, Anderson EM, Birmingham A, Reynolds A, Karpilow J, Robinson K, Leake D, Marshall WS, Khvorova A. 2006. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA*, 12:1188-1196.

Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la Motte T, Poehlmann TG, Markert UR. 2005a. Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem Immunol Allergy*, 88:181-199.

Fitzgerald JS, Tsareva SA, Poehlmann TG, Berod L, Meissner A, Corvinus FM, Wiederanders B, Pfitzner E, Markert UR, Friedrich K. 2005b. 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.

Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR. 2008. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum Reprod Update*, 14(4):335-344.

Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol*, 182(1):41-49.

Friedlander RM. 2003. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med*, 348(14):1365-1375.

Gearing DP, Thut CJ, VandeBos T, Gimpel SD, Delaney PB, King J, Price V, Cosman D, Beckmann MP. 1991. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J*, Oct;10(10):2839-2848.

Graham CH, Connelly I, MacDougall JR, Kerbel RS, Stetler-Stevenson WG, Lala PK. 1994. Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-beta. *Exp Cell Res*, 214(1):93-99.

Halaby MJ, Yang DQ. 2007. p53 translational control: a new facet of p53 regulation and its implication for tumorigenesis and cancer therapeutics. *Gene*, 395(1-2):1-7.

Harris LK, Keogh RJ, Wareing M, Baker PN, Cartwright JE, Aplin JD, Whitley GS. 2006. Invasive trophoblasts stimulate vascular smooth muscle cell apoptosis by a fas ligand-dependent mechanism. *Am J Pathol*, 169(5):1863-1874.

Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. 1990. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, Dec 21;63(6):1149-1157.

Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D. 1988. Purification of a murine leukemia inhibitory factor from Krebs ascites cells. *Anal Biochem*, 173(2):359-367.

Hilton DJ. 1992. LIF: lots of interesting functions. *Trends Biochem Sci*, 17(2):72-76.

Horn LC, Vogel M, Bilek K, Einenkel J. 2003. Villöse und nicht villöse gestationsbedingte Trophoblastenerkrankungen - eine Übersicht. *Geburtsh Frauenheilk*, 63:1233-1245.

Huang HY, Wen Y, Irwin JC, Kruessel JS, Soong YK, Polan ML. 1998. Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor or metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(5):1721-1729.

Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F, Kaufmann P. 1998. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol*, 110(5):495-508.

Hurskainen T, Hoyhtya M, Tuuttila A, Oikarinen A, Autio-Harmainen H. 1996. mRNA expression of TIMP-1, -2 and -3 and 92-kDa type IV collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*, 44:1379-1388.

Ishizaki Y, Jacobson MD, Raff MC. 1998. A role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biol*, 140(1):153-158.

Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, 21(6):635-637.

Lockwood CJ, Yen CF, Basar M, Kayisli UA, Martel M, Buhimschi I, Buhimschi C, Huang SJ, Krikun G, Schatz F. 2007. Preeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin 6 expression in human decidual cells. *Am J Pathol*, 172(6):1571-1579.

Kamada S, Funahashi Y, Tsujimoto Y. 1997. 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. 1997. 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.

Karki P, Dahal GR, Park IS. 2007. Both dimerization and interdomain processing are essential for caspase-4 activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 356(4):1056-1061.

Katayama T, Imaizumi K, Manabe T, Hitomi J, Kudo T, Tohyama M. 2004. Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat*, 28(1-2):67-78.

Kauma SW, Bae-Jump V, Walsh SW. 1999. Hepatocyte growth factor stimulates trophoblast invasion: a potential mechanism for abnormal placentation in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(11):4092-4096.

Kayisli UA, Selam B, Demir R, Arici A. 2000. Expression of vasodilator-stimulated phosphoprotein in human placenta: possible implications in trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod*, 8(1):88-94.

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 CJ, Choe YJ, Yoon BH, Kim CW, Chi JG. 1995. Patterns of bcl-2 expression in placenta. *Pathol Res Pract*, 191(12):1239-1244.

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.

Kisielow M, Kleiner S, Nagasawa M, Faisal A, Nagamine Y. 2002. Isoform-specific knockdown and expression of adaptor protein ShcA using small interfering RNA. *Biochem J*, 363(Pt 1):1-5.

Koehn S, Trueck M, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR, Seyfarth L. 2008. Determination of Caspase-4 released free AFC by RP-HPLC with fluorescence detection. *J Chromatography B*, in Druck.

Kloss CU, Kreuzberg GW, Raivich G. 1997. Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *J Neurosci Res*, 49(2):248-254.

Kokawa K, Shikone T, Nakano R. 1998. Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta*, 19(1):21-26.

Komiyama T, Ray CA, Pickup DJ, Howard AD, Thornberry NA, Peterson EP, Salvesen G. 1994. Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J Biol Chem*, 269(30):19331-19337.

Kumar A, Haque J, Lacoste J, Hiscott J, Williams BR. 1994. Double-stranded RNA-dependent protein kinase activates transcription factor NF-kappa B by phosphorylating I kappa B. *Proc Natl Acad Sci*, 91(14):6288-6292.

Kühn K, Eble J. 1994. The structural bases of integrin–ligand interactions. *Trends Cell Biol*, 4: 256-261.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-685.

Lala PK, Graham CH. 1990. Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and protease inhibitors. *Cancer Metastasis Rev*, 9(4):369-379.

Mayhew TM, Leach L, McGee R, Ismail WW, Myklebust R, Lammiman MJ. 1999. Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13-41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes). *Placenta*, 20(5-6):407-422.

Meisser A, Cameo P, Islami D, Campana A, Bischof P. 1999. Effects of interleukin 6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod*, 5(11):1055-1058.

Laird SM, Tuckerman EM, Dalton CF, Dunphy BC, Li TC, Zhang X. 1997. The production of leukaemia inhibitory factor by human endometrium: presence in uterine flushings and production by cells in culture. *Hum Reprod*, 12:569-574.

Lea RG, al-Sharekh N, Tulppala M, Critchley HO. 1997. The immunolocalization of bcl-2 at the maternal-fetal interface in healthy and failing pregnancies. *Hum Reprod*, 12(1):153-158.

Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. 2002. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod*, 17:213-218.

Leung RKM, Whittaker PA. 2005. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics*, 107:222-239.

Li CX, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf JH. 2006. Delivery of RNA Interference. *Cell Cycle*, 5(18):2103-2109.

Li L, Xing FQ, Chen SL. 2006. Role of interleukin-1beta in regulating human cultured endometrial cell MMP-9 and TIMP-3 expressions in the mid-secretory phase. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 26(8):1143-1145.

Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D, Galardy R, Damsky CH. 1991. 92-kDa type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol*, 113:437-449.

Lottspeich F, Zorbas H. 1998. *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag.

Lowe C, Cornish J, Callon K, Martin TJ, Reid IR. 1991. Regulation of osteoblast proliferation by leukemia inhibitory factor. *J Bone Miner Res*, 6(12):1277-1283.

Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. 2007. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol*, 5:6.

Mayhew TM, Leach L, McGee R, Ismail WW, Myklebust R, Lammiman MJ. 1999. Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13-41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes). *Placenta*, 20(5-6):407-422.

McManus MT, Sharp PA. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*. 3:737-747.

Metcalf D. 1992. Leukemia inhibitory factor - a puzzling polyfunctional regulator. *Growth Factors*, 7:169-173.

Minas V, Jeschke U, Kalantaridou SN, Richter DU, Reimer T, Mylonas I, Friese K, Makrigiannakis A. 2007. Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes and apoptosis of extravillous trophoblasts: a role for CRH and urocortin. *Mol Hum Reprod*, 13(9):663-673.

Moore KL. 1990. *Embryologie*. 3. Auflage. Schattauer Verlagsgesellschaft.

Morimoto A, Okamura K, Hamanaka R, Sato Y, Shima N, Higashio K, Kuwano M. 1991. Hepatocyte growth factor modulates migration and proliferation of human microvascular endothelial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 179:1042-1049.

Morioka K, Tone S, Mukaida M, Takano-Ohmuro H. 1998. The apoptotic and nonapoptotic nature of the terminal differentiation of erythroid cells. *Exp Cell Res*, 240(2):206-217.

Morrish DW, Dakour J, Li H. 1998. Functional regulation of human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol*, 39(1-2):179-195.

Mosmann TR, Coffman RL. 1989. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7: 145-173.

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 ICERelll and ICERellll, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases. *J Biol Chem*, 270(26):15870-15876.

Nagata S. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, 256(1):12-18.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403(6765):98-103.

Nasu K, Zhou Y, McMaster MT, Fisher SJ. 2000. Upregulation of human cytotrophoblast invasion by hepatocyte growth factor. *J Reprod Fertil Suppl*, 55:73-80.

Nelson DM. 1996. Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. *Placenta*, 17(7):387-391.

Nicholson DW. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6(11):1028-1042.

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.

Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H. 2004. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett*, 558(1-3):89-95.

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.

Persengiev SP, Zhu X, Green MR. 2004. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA*, 10(1):12-18.

Poehlmann TG, Fitzgerald JS, Meissner A, Wengenmayer T, Schleussner E, Friedrich K, Markert UR. 2005. Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3. *Placenta*, 26 Suppl A:S37-41.

Reed JC. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*, 124(1-2):1-6.

Sadler TW. 1998. *Medizinische Embryologie*. 9. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Saito S, Sakakura S, Enomoto M, Ichijo M, Matsumoto K, Nakamura T. 1995. Hepatocyte growth factor promotes the growth of cytotrophoblasts by the paracrine mechanism. *J Biochem*, 117:671-676.

Scherr M, Eder M. 2007. Gene Silencing by Small Regulatory RNAs in Mammalian Cells. *Cell Cycle*, 6(4):444-449.

Schwedt G. 1996. *Taschenatlas der Analytik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. 1982. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*, 17 Pt 2:229-259.

Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. 2003. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci*, 100(11):6347-6352.

Shih IM, Kurman RJ. 2002. Molecular basis of Gestational Trophoblastic Diseases. *Curr Mol Med*, 2:1-12.

Smith SC, Baker PN, Symonds EM. 1997. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*, 177(6):1395-1401.

Spagnou S, Miller AD, Keller M. 2004. Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochem*, 43(42):13348-13356.

Spangenburg EE, Booth FW. 2002. Multiple signaling pathways mediate LIF-induced skeletal muscle satellite cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283(1):C204-211.

Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. 2004. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol*, 2:59.

Staun-Ram E, Shalev E. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol*, 3:56.

- Stewart CL**, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359(6390):76-79.
- Stocker H**, Scheller C, Jassoy C. 2000. Destruction of primary CD4(+) T cells by cell-cell interaction in human immunodeficiency virus type 1 infection in vitro. *J Gen Virol*, 81(Pt 8):1907-1911.
- Tabibzadeh S**, Kong QF, Babaknia A, May LT. 1995. Progressive rise in the expression of interleukin 6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum Reprod*, 10(10):2793-2799.
- 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):9677-96782.
- Tatton WG**, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N. 2003. Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3:S61-70; discussion S70-72.
- Thornberry NA**. 1998. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol*, 5(5):R97-103.
- 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**, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381):1312-1316.
- Tomida M**, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M. 1984. Characterization of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic cells purified from conditioned medium of mouse Ehrlich ascites tumor cells. *FEBS Lett*, 178(2):291-296.
- Tran N**, Cairns MJ, Dawes IW, Arndt GM. 2003. Expressing functional siRNAs in mammalian cells using convergent transcription. *BMC Biotechnology*, 3:21.
- Tschaharganeh D**, Ehemann V, Nussbaum T, Schirmacher P, Breuhahn K. 2007. Non-specific effects of siRNAs on tumor cells with implications on therapeutic applicability using RNA interference. *Pathol Oncol Res*, 13(2):84-90.
- Tsujimoto Y**. 1998. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, 3(11):697-707.

Vickers SM, Jhala NC, Ahn EY, McDonald JM, Pan G, Bland KI. 2002. Tamoxifen (TMX)/Fas induced growth inhibition of human cholangiocarcinoma (HCC) by gamma interferon (IFN-gamma). *Ann Surg*, 235(6):872-878.

Voet D, Voet JG, Pratt CW. 2002. Lehrbuch der Biochemie, WILEY-VHC Verlag.

Vogiagis D, Salamonsen LA. (1999). The role of leukemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. *Journal of Endocrinology*, 160:181-190.

von Wolff M, Thaler CJ, Strowitzki T, Broome J, Stolz W, Tabibzadeh S. 2000. Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol Hum Reprod*, 6(7):627-634.

Wang S, Miura M, Jung YK, Zhu H, Li E, Yuan J. 1998. Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell*, 92(4):501-509.

Wang X, Wu H, Zhang Z, Liu S, Yang J, Chen X, Fan M, Wang X. 2008. Effects of interleukin 6, leukemia inhibitory factor, and ciliary neurotrophic factor on the proliferation and differentiation of adult human myoblasts. *Cell Mol Neurobiol*, 28(1):113-124.

Watson AJ. 1992. The cell biology of blastocyst development. *Mol Reprod Dev*, 33:492-504.

Widlak P. 2000. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim Pol*, 47(4):1037-1044.

Wiezorrek R, Schafer H, Bialasiewicz AA, Richard G. 2000. Programmed cell death (apoptosis) in excised subretinal neovascularization. *Ophthalmologie*, 97(2):79-83.

Wink M. 2004. Molekulare Biotechnologie: Konzepte und Methoden. Weinheim: WILEY-VCH Verlag.

Wolf HK, Zarnegar R, Oliver L, Michalopoulos GK. 1991. Hepatocyte growth factor in human placenta and trophoblastic disease. *Am J Pathol*, 138(4):1035-1043.

Wollmann HA. 1998. Intrauterine Wachstumsretardierung. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 146:714-726.

Wollmann HA. 2004. Zu klein bei Geburt (SGA). *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 152:528-535.

Xue D, Horvitz HR. 1995. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature*, 377(6546):248-251.

Xu G, Guimond MJ, Chakraborty C, Lala PK. 2002. Control of proliferation, migration, and invasiveness of human extravillous trophoblast by decorin, a decidual product. *Biol Reprod*, 67(2):681-689.

Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T. 1988. Cloning and expression of the human interleukin 6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science*, 241(4867):825-828.

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.

Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. 2002. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* , 23: 23.

Zador Z, Lacza Z, Benyo Z, Harkany T, Hortobagyi T. 2003. [Apoptosis in focal brain ischemia]. *Ideggyogy Sz*, 56(7-8):216-228.

Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. 1997. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest*, 99:2139-2151.

Anhang

Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronisch zugreifbaren Version nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Scientific Papers

Koehn S, **Trueck M**, Poehlmann TG, Schleussner E, Markert UR, Seyfarth L.
Determination of Caspase-4 released free AFC by RP-HPLC with fluorescence detection.
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2008 Oct 15;874(1-2):111-4. Epub 2008 Aug 26.

Invited Lectures

Markert UR, Poehlmann TG, Busch S, Roediger J, Enkelmann A, **Trueck M**, Fitzgerald JS, Schleussner E.
Immunological regulation of trophoblast invasion.
11th International Symposium of Reproductive Immunology, June 2006, Varna, Bulgaria

Poehlmann TG, Voigt S, Meissner A, de la Motte T, **Trueck M**, Wengenmayer T, Markert UR
Leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 induced intracellular signalling in JEG-3 choriocarcinoma cells.
2. Simposio Latinoamericano Sobre Interacción Materno-Fetal (SLIMP).
Nov 2005, Santiago de Chile.

Published Abstracts

Markert UR, Poehlmann TG, Busch S, Roediger J, Enkelmann A, **Trueck M**, Fitzgerald JS, Schleussner E.
Immunological regulation of trophoblast invasion
A J Reprod Immunol 2006; 56:2

Markert UR, Poehlmann TG, Busch S, Roediger J, Enkelmann A, **Trueck M**, Fitzgerald JS, Schleussner E.
General Aspects of Human Trophoblast Invasion.
4th European Congress of Reproductive Immunology, July 2006, Graz, Austria.
Am J Reprod Immunol 2006; 56:8.
Invited oral presentation

Poehlmann TG, Voigt S, Meissner A, de la Motte T, **Trueck M**, Wengenmayer T, Markert UR.
Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and Interleukin 6 Induced Intracellular Signalling in JEG-3 choriocarcinoma cells.
Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies for Immunology, September 2005, Kiel, Germany. Immunobiol. 2005, 210: 501.
Poster presentation

Poehlmann TG, Voigt S, Meissner A, de la Motte T, **Trueck M**, Wengenmayer T, Markert UR.

Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and Interleukin 6 Induced Intracellular Signalling in JEG-3 choriocarcinoma cells.

Am J Reprod Immunol 2005; 54:168.

Poster presentation

Danksagung

Ich möchte mich bei einer Vielzahl von Menschen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

- bei **Herrn PD Dr. med. Udo R. Markert** für die Überlassung der Arbeit und die wissenschaftliche Betreuung
- bei allen Mitarbeitern des Placenta-Labors für die stets offene und kollegiale Arbeitsatmosphäre, im Besonderen bei

Herrn Dr. rer. nat. Tobias Pöhlmann für seine große Unterstützung und die zahlreichen Anregungen bei allen fachlichen sowie methodischen und technischen Fragen

Frau Dipl. chem. Sandra Köhn und Frau Dr. rer. nat. Lydia Seyfarth für die Zusammenarbeit bei der Erarbeitung und Optimierung der Methode zur Messung der Caspase-4-Aktivität mittels HPLC sowie die Hilfe bei der Auswertung dieser Ergebnisse

stellvertretend für das gesamte Team des Placenta-Labors seien hier noch Dipl. biochem. Susann Busch, Dipl. chem. Stefan Neubeck und Maja Weber genannt

- bei Dipl. troph. Katja Palige für die kritische Durchsicht der Arbeit und ihre hilfreichen Hinweise.
- bei meiner Familie und meinen Freunden für die vielseitige Unterstützung während der Zeit des Studiums und den Jahren der Arbeit an dieser Dissertation sowie für die Aufmunterungen und den Rückhalt in jeglicher Hinsicht

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,
- mir folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

PD Dr. med. habil. Udo R. Markert

Dr. rer. nat. Tobias Pöhlmann

Dipl. chem. Sandra Köhn

- 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,
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 04.05.2009

Verwendete Geräte und Materialien

Geräte

Autoklav	
KSG-112	KSG-Olching
Brutschränke	
HERAcell CO ₂ Inkubator	Heraeus Instruments
FUNCTIONline CO ₂ Inkubator	Heraeus Instruments
Durchflußzytometer	
Flowmax Galaxy	DAKO
FACSCalibur	Becton Dickinson
Auswertungs-Software „Cell Quest Pro“	Becton Dickinson
Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie
Blot-Kammer	Biometra
Micro Plate Reader MPR A4	Dementitec Diagnostics
Thermomixer comfort	Eppendorf
Orbitalschüttler	
Polymax 1040	Heidolph
Spektrophotometer	
Cary UV 50	Bio Varian
Waage	Satorius Basic
Zentrifugen	
Biofuge 13	Heraeus
Labofuge T	Heraeus
Mikro 22R	Hettich
Neubauerkammer	Optik Labor
Pipetten	Eppendorf, Gilson, Hirschmann
Mikrozentrifuge	Roth
Mikroskop (Auflicht)	
Axiovert 25	Zeiss
Mikroskop (Fluoreszenz)	
Axioplan 2	Zeiss
+ Axiocam Hrc	Zeiss

+ HBO 100W	Zeiss
HPLC-Anlage	Shimadzu
Gynkotec HPLC	
Gynkotec Fluorescence	
HPLC Monitor RF 1002	
Vorsäule	MZ Analysentechnik
ODS Hypersil C18, 5µm, 10mm × 4,6 mm	
Säule	ORPEGEN Pharma
HD-SIL-18-5s-80; RP C18,	
5µm, 80Å; 250 × 4 mm	
Gel-Dokumentationsgerät	
MF-ChemiBIS 3.2	Biostep
Auswertungsprogramm „GelCapture“	DNR Bio-Imaging Systems
Western Blot-Quantifizierung	
TotalLab TL100	Nonlinear Dynamics

Verbrauchsmittel

Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2ml)	Sarstedt
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Limited
Zellkulturflaschen	Greiner
Membran Hybond-C	Amersham Pharmacia Biotech
Zellkulturplatten: 6-Well	Becton-Dickinson Labware
12-Well + 24-Well	Nunc
48-Well + 96-Well	Cellstar

Reagenzien

Acrylamid 40%	Roth
Antibiotic Antimycotic Solution (AAS)	SIGMA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Caspase-4-Substrat (Ác-Leu-Glu-Val-Asp-AFC)	Axxora

Chemiluminescent Detection Reagent "LumiGLO"	Cell Signalling Technology
deionisiertes H ₂ O Millipore Synergy UV	Bedford
DMSO	MP Biomedicals
Entwicklungs- und Fixierlösung	Kodak
Ethanol	Roth
FACS Clean	BD
FACS Flow	BD
FACS Lysing	BD
FACS Rinse	BD
Fetales Kälberserum	Bio Whittaker
GBSS	SIGMA
Glycerin	Roth
HBSS	Bio Whittaker
Human LIF	Chemicon
Human IL-6	Hiss Diagnostics
Human HGF	Hiss Diagnostics
MeOH HPLC Gradient Grade	Roth
Molekulargewichtsmarker (Roti-Standard)	Cell Signalling Technology
Molekulargewichtsmarker (Dual Color)	BIO-RAD
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodesylsulfat (SDS)	Roth
Nuklease-freies Wasser	Ambion
Oligofectamin™ Reagent	Invitrogen
Optimem	Gibco
Penicillin/Streptomycin (Pen./Strep.)	PAA
PBS	PAA Laboratories
Poly-L-Lysin	SIGMA
Ponceau S	Roth
Protease Inhibitor Cocktail	SIGMA
5x siRNA Annealing Buffer	Ambion
TEMED	Pharmacia Biotech
Trypsin EDTA	Bio Whittaker
Zell-Lysepuffer (CLB)	Cell Signalling Technology

Zellkulturmedien

DMEM		Bio Whittaker
- DMEM Medium I	(DMEM + 10% FKS + 2% AAS)	
- DMEM Medium II	(DMEM + 30% FKS)	
F-12 (Ham)	(+10% FKS + 2% AAS)	Gibco
Quantum 263	(+2% AAS)	PAA Laboratories

verwendete Antikörper

Mouse anti human Caspase-4 IgG	Calbiochem
Rabbit anti human β -Aktin	Cell Signalling Technology
anti Rabbit Ig-G	Cell Signalling Technology
Annexin V-FITC	Immunotools

Sequenzen der Oligonukleotide

siRNA Anti-Caspase-4	Ambion
Sense	5'-GGAGAAUCUACAGAUGCCCtt-3'
Antisense	5'-GGGCAUCUGUAGAUUCACCtg-3'
Srambled siRNA	Ambion
Sense	5'-GCCACUUAUAAAUUCGUUCtt-3'
Antisense	5'-GAACGAAUUUAUAAGUGGCtt-3'

Zusammensetzungen von Puffern, Lösungen und Gelen

10x Running Buffer (Lauf-Puffer)

1 l Stammlösung:

- 29,04 g Tris Base
- 142,5 g Glycine
- 10 g SDS
- Einstellen mit 1 M HCl auf pH 8,5
- nachträglich verdünnen auf 1x Puffer

nach Verdünnung auf 1x-Puffer:

- 24 mM Tris Base
- 190 mM Glycine
- 0,1 % SDS

1x Blot Buffer (Transfer-Puffer)

- 1 l Stammlösung
- 100 ml 10x Tris/Glycine-Puffer
- 200 ml Methanol
- auf 1 Liter auffüllen

10 x Net-G (Waschpuffer)

-1 l Stammlösung:

- 87,66 g NaCl
- 14,61 g EDTA
- 60,58 g Tris Base
- 2 g Gelatine
- in Wasser lösen und erwärmen
- 5 g Triton X
- zum Schluss zugeben

nach Verdünnung auf 1x-Puffer:

- 1,5 M NaCl
- 0,05 M EDTA
- 0,5 M Tris Base pH=7,5
- 0,2 % Gelatine
- 0,5 % Triton X

Ponceau S:

(Proteinfärbung auf Western Blot-Membran)

0,1 % (w/v) in 5 % Essigsäure

(1g Ponceau S, 50 ml Essigsäure in 1 l A. dest.)

→ 0,05 g Ponceau S, 2,5 ml Essigsäure in 50 ml A. dest.)

bei 4 °C lagern

- Hintergrund entfärben mit A. dest.
- Entfärben mit NaOH (4 g NaOH auf 500 ml a. dest.)

für SDS-PAGE:

86% Glycerin, Lower Tris, A. dest., UpperTris, 40% APS, TEMED

- Lower Tris:**
- 36,3 g Tris
 - 8 ml 10% SDS
 - mit Aqua dest. auf 180ml auffüllen
 - mit konzentrierter HCL auf pH 8,8 einstellen
 - mit Aqua dest. auf 200ml auffüllen

- Upper Tris:**
- 6,06 g Tris
 - 4 ml 10% SDS
 - mit Aqua dest. auf 90 ml auffüllen
 - mit konzentrierter HCL auf pH 6,8 einstellen
 - mit Aqua dest. auf 100ml auffüllen

5 x Auftragspuffer:

50 mM	Tris-HCl
2 %	SDS
0,002 %	Bromphenolblau
10 % (w/v)	Glycerin

Strip-Puffer:

30 min bei 50 °C	
0,7 %	β-Mercaptoethanol
2 %	SDS
0,6 %	Tris-HCl
pH	6,7

Caspase-4 Puffer:

Ansatz nach MP Biomedicals

100 mM HEPES (pH = 7,5)
20 % (V/V) Glycerol
5 mM DTT (Dithiothreitol)
0,5 mM EDTA

Annexin V-Bindepuffer: Ansatz nach Immunotools (10x)

0,1 M HEPES (pH = 7,4)

1,4 M NaCl

25 mM CaCl₂

gelöst in Aqua dest.

PAGE-Gel

Lösung	Sammelgel	Trenngel (9%)
AA/BAA 40%	0,5 ml	1,13ml
4x Lower Tris		1,25ml
4x Upper Tris	1,25 ml	
Glycerin 87%		1ml
Aqua dest.	3,2 ml	1,62ml
APS 40%	18µl	10µl
TEMED	18µl	6µl