

3. Ergebnisse

Das „Trojanische Pferd“ (TP), ein zellkernspezifischer Inhibitor der PKC?

Herstellung von TP

Die TP-Fusionspeptide bestehen aus der inhibitorischen Pseudosubstratsequenz der cPKCs (PKCI), dem Penetratin und einem NLS in unterschiedlicher Kombination zueinander (Abb.9). Zusätzlich wurde bei einigen Fusionspeptiden zur Kontrolle noch eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Xho I bzw. zur immunzytochemischen Detektion ein myc-tag eingebaut. Die DNA-Sequenzen der einzelnen Peptide wurden

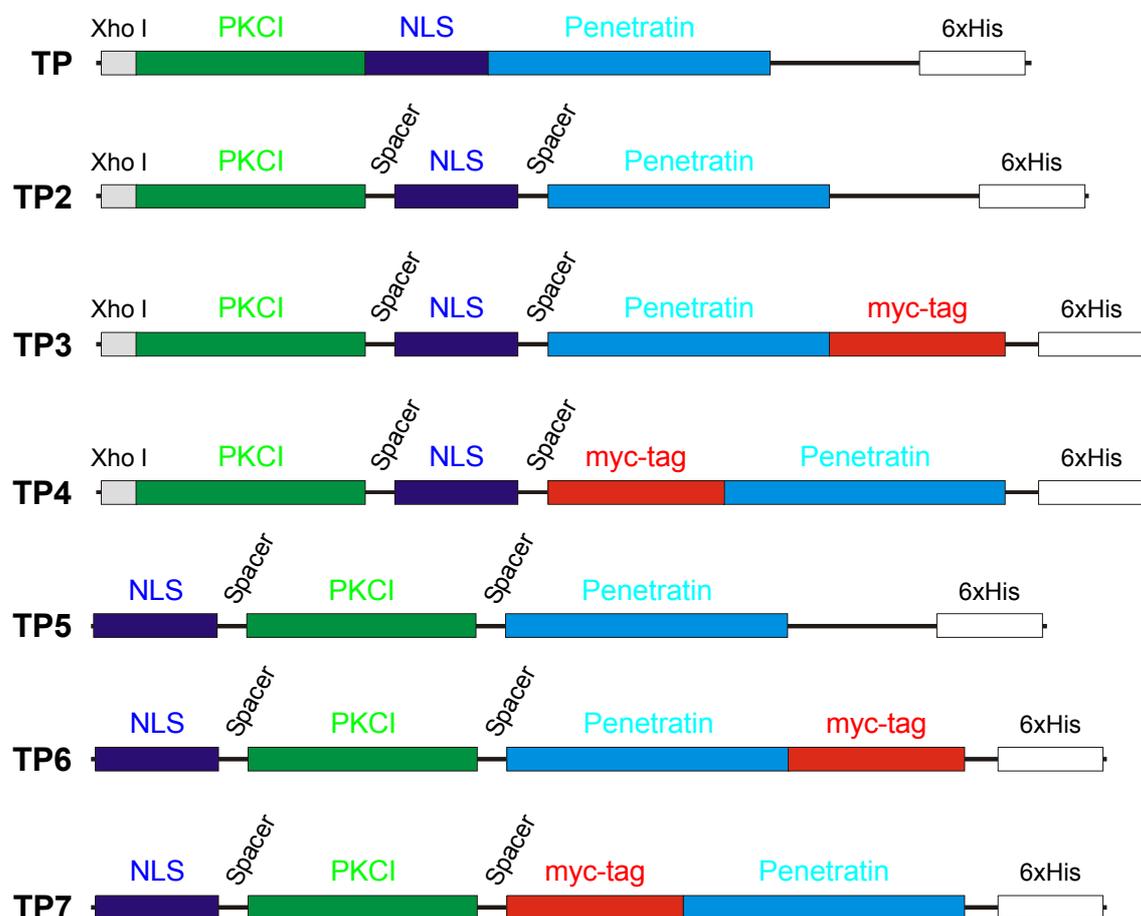


Abbildung 9. Die TP-Fusionspeptide bestehen aus dem PKC-Inhibitor (PKCI), einem NLS und dem Penetratin. Sie sind unterschiedlich miteinander kombiniert und besitzen zum Teil Glycin-Prolin-Spacer, eine Xho I-Restriktionsschnittstelle und einen myc-tag. Die Xho I-Schnittstelle dient zur Kontrolle, ob die TP-DNA korrekt in das Plasmid pHO2c inseriert wurde. Für eine immunzytochemische Detektion wird der myc-tag verwendet. Außerdem können alle Peptide mit Hilfe des His-6-tag über eine Ni-Säule aufgereinigt werden.

ermittelt und von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert. Die Oligonukleotide (siehe Kapitel „Material und Methoden“, Tab.4) wurden einzeln phosphoryliert, entsprechend miteinander hybridisiert und in das Plasmid pHO2c inseriert (=pTP), das vorher mit den Restriktionsenzymen Nde I und Hind III linearisiert wurde. Nach Transformation in kompetente DH5 α -*E.coli*-Zellen wurde pTP für analytische Untersuchungen durch die Mini- Präparation und für präparative Zwecke durch die Maxi-Präparation isoliert. Um die korrekte Insertion der pTP-Präparation zu überprüfen, wurde ein Restriktionsverdau sowie eine Sequenzierung durchgeführt.

Das Plasmid pHO2c besitzt nur eine Schnittstelle für Pst I, weshalb pHO2c nach einem Restriktionsverdau mit Pst I und Xho I nur ein linearisiertes Fragment (5678bp) ergeben soll. pTP enthält zusätzlich eine Schnittstelle für Xho I, weshalb 2 Fragmente (1203bp und 4573bp) erwartet werden. Das Agarosegel (Abb.10) weist zwei Fragmente für pTP und ein Fragment für pHO2c in den entsprechenden Größen auf.

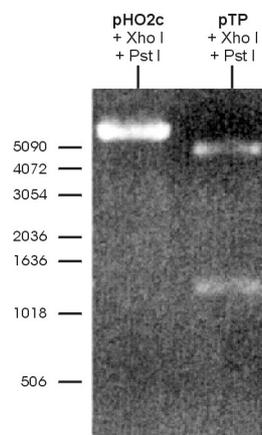


Abbildung 10. Restriktionsverdau von pHO2c und pTP. pHO2c enthält eine Schnittstelle für Pst I, aber keine für Xho I. pTP hingegen enthält auch eine Xho I-Schnittstelle. Es entstehen 2 Fragmente mit den Größen 1203 bp und 4573 bp für pTP, während pHO2c nur linearisiert wird.

Alternativ kann der Restriktionsverdau auch mit dem Enzym BssH II durchgeführt werden, da sowohl das Plasmid pHO2c als auch der PKCI eine Schnittstelle für BssH II enthalten. Nach korrekter Insertion ergeben sich für die TP-Fusionspeptide 2 Fragmente, im Gegensatz zu pHO2c, das nur ein linearisiertes Fragment ergibt.

Ferner konnte die korrekte Sequenz von pTP durch Sequenzierung bestätigt werden (Abb.11).

```

1...CTT TAA GAA G GA GAT ATA CA T ATG CTC GAG CGT TTT GCG C GT AAA GGC GC
   CTT TAA GAA G GA GAT ATA CA T ATG CtC GAG CGT TTT GCG C GT aAA GGC GC
51 G CTG CGT CAG AAA AAC GTG C CG AAA AAA AA A CGC AAA GTG CGT CAG ATC A
   G CTG CGT CAG AaA AAC GTG C CG AAA AAA AA A CGC AAA GTG CGT CAG ATC A
101 AA ATC TGG TT T CAG AAC CGT CGT ATG AAA T GG AAA AAA AG C TTG AAT TCG
   Aa ATC TGG TT T CAG AAC CGT CGT ATG AaA T GG AAA Aaa AG C TTG AAT TCG
151 CAC CAT CAC C AC CAT CAC TG A TAG GAT CCG GCT GCT AAC A AA GCC ...
   CAC CAT CAC C AC CAT CAC TG A TAG GaT CCG GCT GCT AAC A AA GCC

```

Abbildung 11. Sequenz von pTP. Die theoretisch erwartete Sequenz ist schwarz, die experimentell ermittelte farbig markiert, wobei die TP-DNA blau, das Plasmid pHO2c grün, die 6 Histidine des His-6-tags kursiv und die beiden Stopcodons unterstrichen dargestellt sind.

Um die TP-Fusionspeptide zu exprimieren und zu isolieren, wurden die entsprechenden pTP-Plasmide in BL21(DE3)-*E.coli*-Zellen transformiert. Zunächst kleine Expressions- und Extraktionsansätze ergaben, dass die TP-Peptide sich im Pellet des Extraktionsansatzes als unlösliche Peptide befanden (Abb.12), weshalb die weiteren Extraktionen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurden.

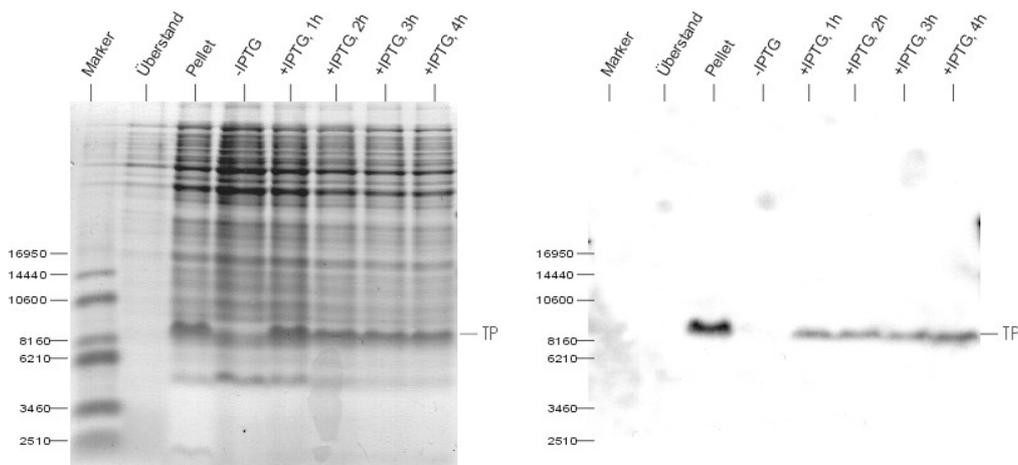


Abbildung 12. Das Tricینگel (links) und der Western Blot (rechts) zeigen die einzelnen Aufarbeitungsschritte der Extraktion zur Bestimmung der Löslichkeit von TP. Es wurden Proben vor der Zugabe von IPTG (nichtinduzierte Kontrolle, -IPTG), 1h, 2h, 3h und 4h nach Zugabe von IPTG (+IPTG) überprüft. Dabei zeigt die nichtinduzierte Kontrolle erwartungsgemäß keine Bande für TP. Im Pellet ist eine starke Bande für TP zu sehen, im Überstand jedoch nicht. Somit ist TP als unlösliches Protein im Pellet angereichert.

Nach präparativer Expression und Aufreinigung von TP unter denaturierenden Bedingungen konnten die Fusionspeptide mit Puffer „E“ (8M Harnstoff, 0,1M Phosphatpuffer, 0,01M Tris/ HCl, pH 4,5) von den Nickel-Säulen eluiert werden (Abb.13). Die Aufreinigung von TP unter denaturierenden Bedingungen sollte für spätere Versuche nicht problematisch sein, da die PKCI-NLS-Penetratin-Fusionspeptide

aus einzelnen Peptiden bestehen, die für ihre Funktionsfähigkeit nicht unbedingt eine räumliche Struktur aufweisen müssen.

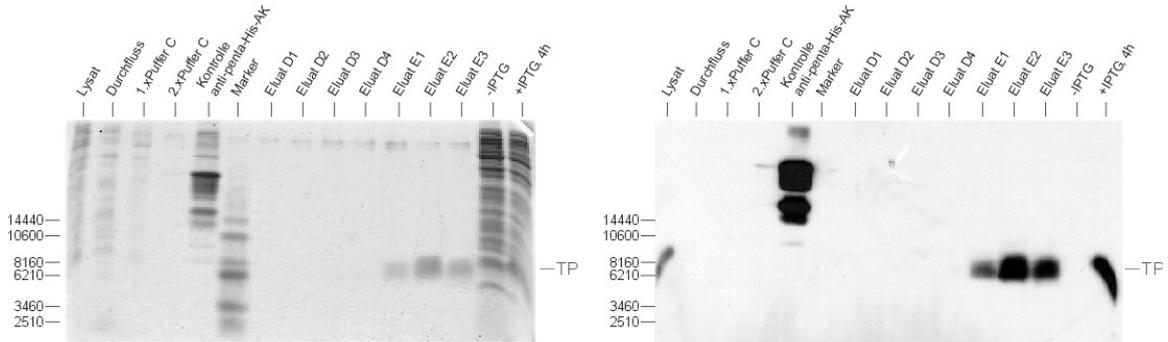


Abbildung 13. In dem Tricینگel (links) und in dem Western Blot (rechts) sind die einzelnen Schritte der TP-Aufreinigung dargestellt. Das Lysat wurde mit GuHCl denaturiert, bevor es mit Ni-NTA-Agarose versetzt und auf die Säule gegeben wurde. Puffer C wurde zum Waschen der Säule und Puffer D und E zum Eluieren benutzt. TP besitzt ein Molekulargewicht von 6,2kDa. Wie diese beiden Abbildungen zeigen, konnte TP erst mit Puffer E eluiert werden.

Die Salze des Puffers „E“ wurden durch Dialyse mit destilliertem Wasser entfernt, da der Harnstoff z.B. die MALDI-Massenspektrometrie und das Phosphat den *in vitro* PKC-Aktivitätstest erheblich stören würden. Eine anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford ergab, dass 0,29 mg/ml (insgesamt 0,58 mg) TP aus 100ml Expressionskultur isoliert werden konnten.

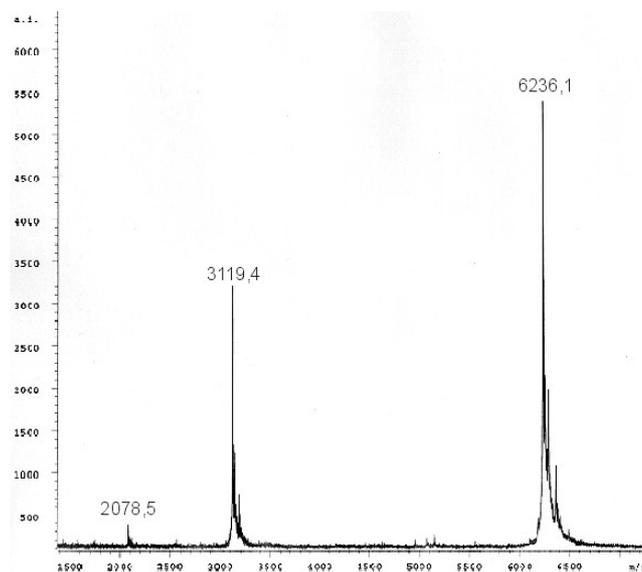


Abbildung 14. MALDI-massenspektrometrische Messung von TP. Es wurde ein Molekulargewicht von 6237,5 Da erwartet. Dieser Wert stimmt mit dem ermittelten Molekulargewicht von 6236 Da sehr gut überein.

Da TP im Tricingel bei ca. 8kDa, anstatt bei ca. 6kDa zu sehen war, wurde zur Kontrolle noch eine Messung mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie durchgeführt. Für TP wurde ein Molekulargewicht von 6237 Da erwartet, ein Wert, der mit den durch die MALDI-Massenspektrometrie ermittelten 6236 Da sehr gut übereinstimmt (Abb.14). Die beobachtete Verschiebung des Proteins zu höheren Molekulargewichten im Tricingel könnte auf der großen Anzahl hydrophober und großer Aminosäuren beruhen.

TP hemmt die PKC in vitro sehr effektiv

Um zu zeigen, dass TP tatsächlich die Proteinkinase C hemmen kann, wurde *in vitro* ein PKC-Aktivitätstest durchgeführt. Dabei wurde mit Hilfe von radioaktiv markiertem ATP ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$) die Aktivität von PKC ohne TP, mit TP und mit dem kommerziell erhältlichen Pseudosubstrat sowohl unter stimulierenden als auch unter nicht stimulierenden Bedingungen bestimmt. Die PKC wurde durch Zugabe eines Gemisches aus Phosphatidylserin und Dioleoylglycerol (Diolein) stimuliert. Die Aktivität der PKC ohne inhibierendes Reagens wurde auf 100% gesetzt. Die graphische Darstellung (Abb.15) zeigt, dass schon bei einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ TP die PKC zu 50%

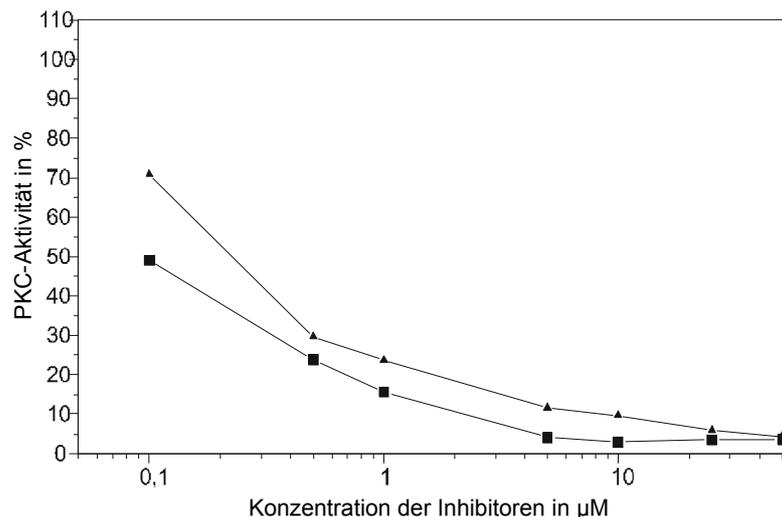


Abbildung 15. *In vitro*-PKC-Aktivitätstest bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen unter stimulierenden Bedingungen. TP ist durch Quadrate und das Pseudosubstrat durch Dreiecke dargestellt. Wie dieser Test zeigt, inhibieren schon $0,1\mu\text{M}$ TP zu 50,9% die PKC. Das Pseudosubstrat zeigt ähnliche Ergebnisse, wirkt aber bei allen Konzentrationen schwächer inhibierend als TP.

gehemmt wird. Bei einer TP-Konzentration von 50µM wurde die PKC unter nicht stimulierenden Bedingungen zu 84% (Daten hier nicht gezeigt), unter stimulierenden Bedingungen zu 97% inhibiert. Ein ähnliches Ergebnis wurde für das Pseudosubstrat erreicht.

TP transloziert nicht in die Zellkerne

Penetratin besitzt die Fähigkeit, hydrophile Verbindungen durch die Plasmamembran zu führen. Die nukleären Lokalisationssignale (NLS) sind für den gezielten Transport in die Zellkerne verantwortlich. Nach Zugabe von TP zu den adhärenen Zelllinien NIH 3T3 und Neuro2a und Immunzytochemie wurde nun untersucht, ob die PKCI-NLS-Penetratin-Fusionspeptide schnell in die Zellkerne translozieren. Dazu wurden 30min, 1 Stunde und 4 Stunden nach Zugabe von TP die Zellen mit dem monoklonalen anti-penta-His-Antikörper bzw. mit dem anti-myc-Antikörper in Kombination mit dem zweiten Cy3-konjugierten anti-Maus-IgG-Anitkörper behandelt. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI gefärbt. Sowohl nach 30 min als auch nach 1 und 4 Stunden konnte TP nur im Zytosol, aber nicht in den Zellkernen detektiert werden (Abb.16).

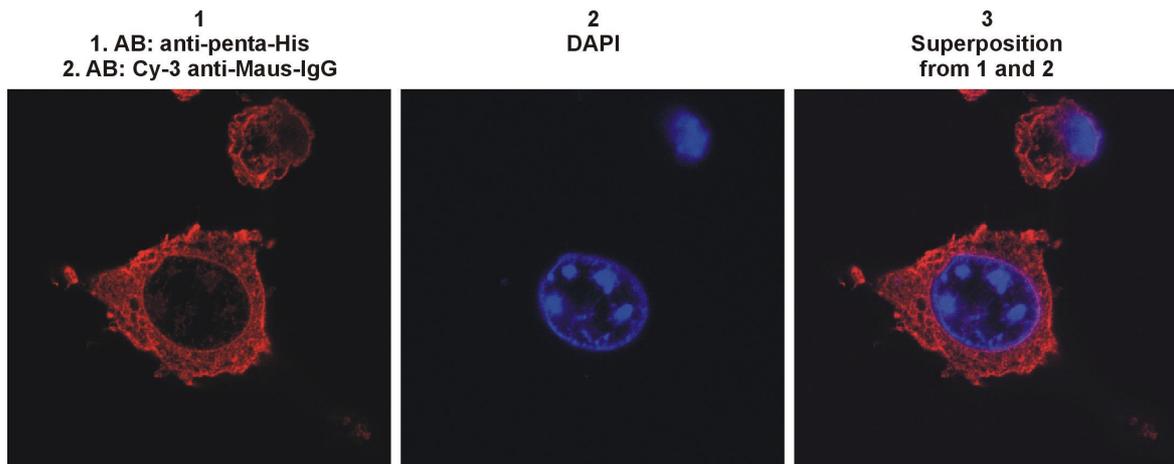


Abbildung 16. Zytosolische Akkumulation von TP in Neuro-2a-Zellen nach 4 Stunden. (1: Fluoreszenz des zweiten Antikörpers Cy-3; 2: DAPI-Zellkernfärbung der gleichen Zellen; 3: Überlagerung der Bilder 1 und 2.) Die Fusionspeptide translozierten nicht in die Zellkerne. Somit ist eine zellkernspezifische Inhibition der PKC ausgeschlossen.

Tabelle 2 fasst die einzelnen Schritte der TP-Fusionspeptide zusammen. Es konnte weder bei TP noch bei TP2, TP5 und TP6 eine Translokation in den Zellkern festgestellt werden. Die Expression von TP3 und TP4 ergab keine ausreichende Menge an Protein. Da zu erwarten war, dass auch sie nicht in die Zellkerne translozieren, wurde dieser

Penetratin-Ansatz nicht weiter verfolgt. Stattdessen wechselten wir die Strategie und nutzten VP22 als Werkzeug für die zellkernspezifische Translokation der PKC.

Fusionspeptid	Präparation von pTP	Expression und Isolierung von TP	Translokation von TP	<i>in vitro</i>-PKC-Aktivitätstest
TP	+	+	keine Translokation in den Zellkern	+
TP2	+	+	keine Translokation in den Zellkern	n.d
TP3	+	zu wenig Protein	n.d	n.d
TP4	+	zu wenig Protein	n.d	n.d
TP5	+	+	keine Translokation in den Zellkern	n.d
TP6	+	+	keine Translokation in den Zellkern	n.d
TP7	+	n.d.	n.d	n.d

Tabelle 2. Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte der TP-Fusionspeptide. Alle TP-Kombinationen konnten erfolgreich in pHO2c inseriert werden. Die Expression und Isolierung von TP, TP2, TP5 und TP6 ergab ausreichend Protein, um eine Internalisierung in Säugetierzellen durchzuführen. Diese ergab, dass keines der getesteten Fusionspeptide in die Zellkerne translozierte. Die Expression und Isolierung von TP3 und TP4 ergab für eine Internalisierung zu wenig Protein. Ein *in vitro*-PKC-Aktivitätstest wurde nur bei TP durchgeführt. (+: erfolgreich; n.d.: nicht durchgeführt)

Das „virulente Trojanische Pferd“ (vTP), ein zellkernspezifischer Inhibitor der PKC

Herstellung von vTP

vTP besteht aus der inhibitorischen Pseudosubstratsequenz der cPKCs (PKCI) und dem Herpes Simplex Virusprotein VP22. Das Plasmid pVP22 kodiert für dieses VP22. Um die PKC-Inhibitor-DNA an das Plasmid zu koppeln (Abb.17), wurde die DNA-Sequenz des Inhibitors ermittelt und von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden einzeln phosphoryliert und miteinander

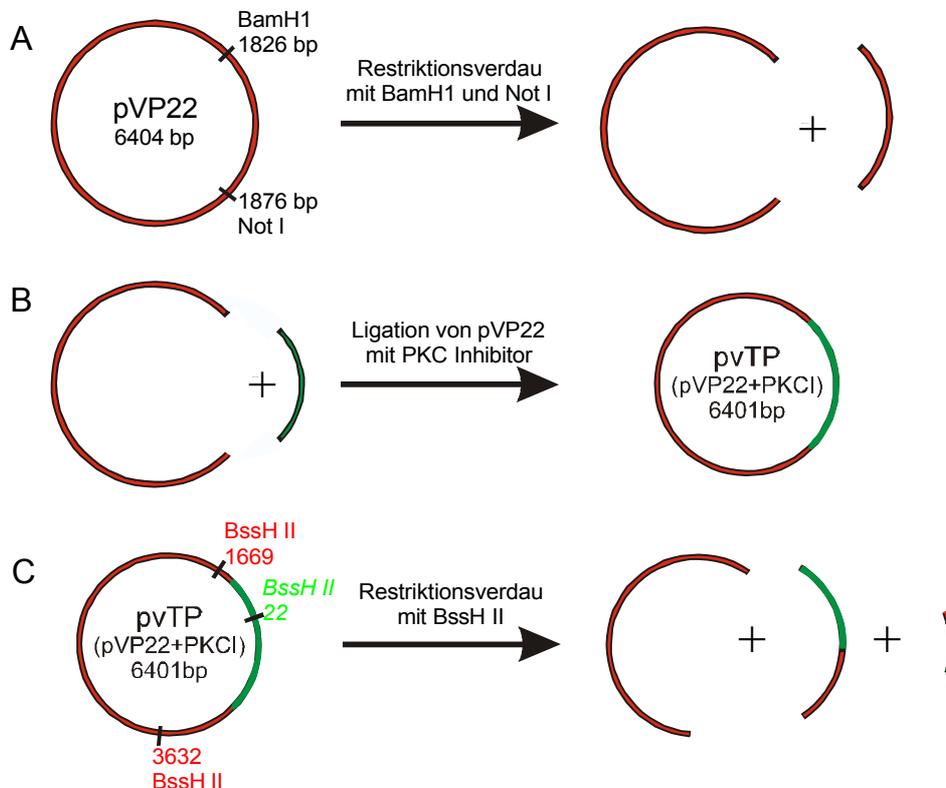


Abbildung 17. Herstellung von pvTP, das für das VP22-PKCI Fusionsprotein kodieren wird. (A) Das Plasmid pVP22 wird mit Restriktionsenzymen linearisiert und (B) mit den Oligonukleotiden, die der inhibitorischen Pseudosubstratsequenz der cPKCs entsprechen, ligiert. (C) Um zu überprüfen, ob die Ligation erfolgreich war, wird anschließend pvTP mit Restriktionsenzymen gespalten. pvTP enthält 3 Schnittstellen für BssH II, im Gegensatz zu pVP22, das nur 2 Schnittstellen enthält. Wenn die Ligation erfolgreich war, dann müssen sich für pvTP 3 Fragmente mit den Größen 179 bp, 1781 bp und 4441 bp ergeben.

hybridisiert. Das Plasmid pVP22 wurde währenddessen mit den Restriktionsenzymen BamH1 und Not I geschnitten. Die Oligonukleotide wurden so synthetisiert, dass sie an

ihren Enden komplementär zu den BamH1- und Not I- Schnittstellen des Plasmides waren, weshalb sie problemlos mit dem linearisierten pVP22 ligiert werden konnten.

Nach Transformation in kompetente DH5 α -*E.coli*-Zellen wurde pvTP für analytische Untersuchungen mit Hilfe einer Mini- Präparation und für präparative Zwecke mit Hilfe der Maxi-Präparation aus den Bakterien isoliert. Dabei konnten durch die Maxi-Präparation 300-500 μ g Plasmid-DNA gewonnen werden.

Um den Erfolg der pvTP-Präparation zu überprüfen, wurde ein Restriktionsverdau mit BssH II durchgeführt. Da der PKCI selbst auch eine Schnittstelle für BssH II aufweist, sollte der Verdau von pvTP 3 Fragmente (179bp, 1781bp und 4441bp) ergeben, im Gegensatz zu pVP22, das 2 Schnittstellen für BssH II enthält, weshalb 2 Fragmente (1963bp und 4441bp) erwartet werden. Das Agaraosegel (Abb.18) zeigt 3 Fragmente für pvTP und zwei für pVP22 in den entsprechenden Größen.

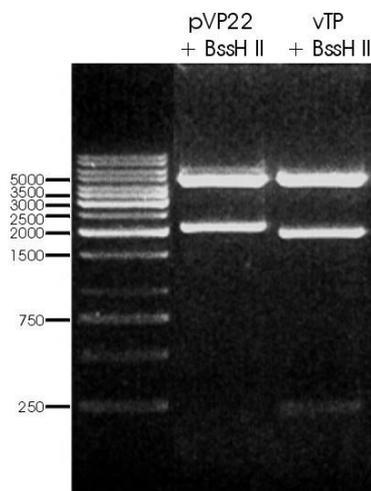


Abbildung 18. Restriktionsverdau von pvTP und pVP22. pvTP enthält drei Schnittstellen für BssH II, im Gegensatz zu pVP22, das nur zwei aufweist. Es ergeben sich zwei Fragmente der Größen 1963 bp und 4441 bp für pVP22 (Bahn 2) und 3 Fragmente der Größen 179 bp, 1781 bp und 4441 bp für pvTP (Bahn 3).

Die korrekte Insertion wurde ferner durch Sequenzierung verifiziert (Abb.19). Die dabei erhaltene Sequenz entspricht dem Plasmid pVP22 mit dem eingebauten PKC Inhibitor.

```

1 ...CGG CCC GTC G  AG GGT ACC GA  G CTC GGA TCC  CGT TTT GCG C  GT AAA GGC GC
   CGG CCC GTC G  AG GGT ACC GA  G CTC GGA TCC  CGT TTT GCG C  GT AAA GGC GC
51  G CTG CGT CAG  AAA AAC GTG G  GC GGC CGC TC  G AGT CTA GAG  GGC CCG CGG T
   G CTG CGT CAG  AAA AAC GTG G  GC GGC CGC TC  G AGT CTA GAG  GGC CCG CGG T
101 TC GAA CAA AA  A CTC ATC TCA  GAA...
    TC GAA CAA AA  A CTC ATC TCA  GAA...
  
```

Abbildung 19. Sequenz von pvTP. Die erwartete Sequenz ist schwarz und die experimentell ermittelte ist farbig dargestellt, wobei der Vektor grün und der Inhibitor blau markiert ist.

Wie der Restriktionsverdau und die Sequenzierung zeigen, konnte die inhibitorische Pseudosubstratsequenz der cPKCs erfolgreich in das Plasmid pVP22 inseriert werden.

Translokation von vTP in die Zellkerne der NIH 3T3-, Neuro2a- und U937-Zellen

VP22 besitzt die bemerkenswerte Eigenschaft des interzellulären Transportes, d.h. VP22 transloziert nach seiner Expression in einer Subpopulation infizierter Zellen, in welchen er größtenteils im Zytoplasma vorkommt, in die Zellkerne vieler benachbarter Zellen.

Mit Hilfe der Transfektion und der Immunzytochemie wurde nun untersucht, ob vTP ebenfalls die Fähigkeit besitzt, in die Zellkerne zu translozieren. Dazu wurden sowohl die adhärennten NIH 3T3- und Neuro2a-Zellen als auch die Suspensionszellen U937 mit pvTP transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem monoklonalen anti-myc-Antikörper in Kombination mit dem zweiten Cy3-konjugierten anti-Maus-IgG-Antikörper behandelt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die pvTP-transfizierten Zellen zeigen eine starke Fluoreszenz im Zytoplasma (Abb.20), im Gegensatz zu den benachbarten Zellen, bei denen nur die Zellkerne Fluoreszenz aufweisen. Das bedeutet, dass nach ihrer Expression in den infizierten Zellen vTP-Proteine in viele Zellkerne der umliegenden NIH 3T3-Zellen translozieren.

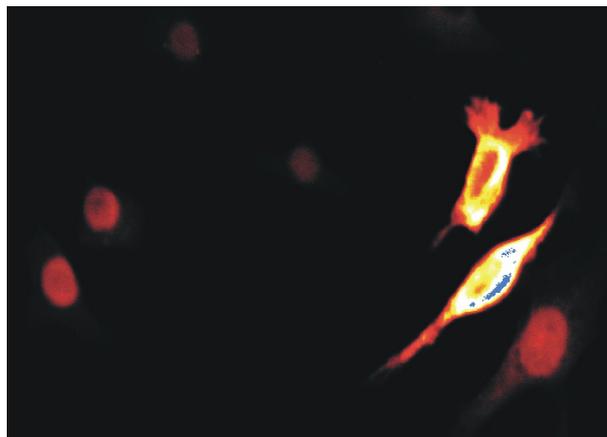


Abbildung 20. Interzellulärer Transport und nukleärer Import von vTP in NIH 3T3-Zellen. Die konfokalen Mikroskopaufnahmen zeigen im Zytoplasma der infizierten Zelle eine starke Fluoreszenz. In den benachbarten Zellen leuchten nur die Zellkerne infolge der vTP-Translokation.

Ähnliche nukleäre vTP-Akkumulationen wurden außerdem in Neuro2a- und U937-Zellen beobachtet (Abb.21). Die interzelluläre Verteilung von vTP ist ähnlich der von Elliott und O'Hare [1997] beschriebenen.

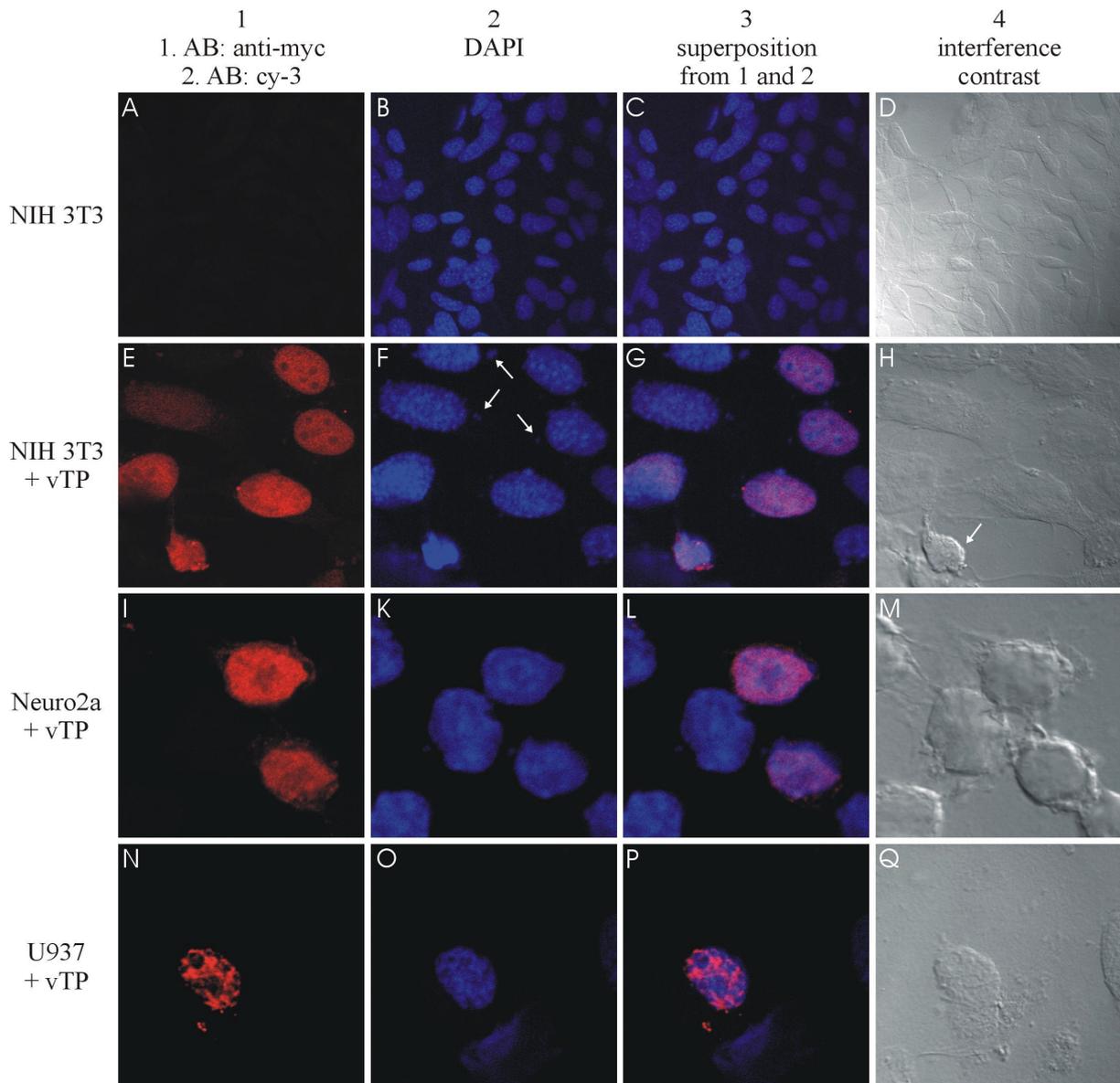


Abbildung 21. Die konfokalen Mikroskopaufnahmen zeigen, dass sowohl in den adhärennten Zelllinien NIH 3T3 und Neuro2a als auch in der Suspensionszelllinie U937 vTP in die Zellkerne transloziert. (A-H: NIH 3T3-Zellen, I-M: Neuro2a-Zellen; N-Q: U937-Zellen; A-D: nicht-transfizierte Kontrollzellen; E-Q: pvTP-transfizierte Zellen. Spalte 1 zeigt die Fluoreszenz des 2. Antikörpers Cy-3, Spalte 2 zeigt die gleichen Zellen nach DAPI-Färbung, Spalte 3 repräsentiert eine Überlagerung von „Spalte 1“ und „Spalte 2“ und Spalte 4 stellt Interferenzkontrastaufnahmen der gleichen Zellen dar.) Die Zellkerne, in die die vTP-Proteine translozierten, zeigen eine starke Fluoreszenz. Zellen, die von vTP unberührt blieben, sind in den mit anti-myc-/ Cy-3-Antikörpern markierten Bildern nicht, jedoch in den mit DAPI markierten Bildern zu sehen. Die weißen Pfeile weisen auf apoptotische Morphologien in Form apoptotischer Körperchen und einer apoptotischen Zelle hin, die jeden Zellkontakt und ihre charakteristische flache Form verloren hat.

Expression von vTP in präparativem Maßstab

Es gibt viele Anwendungs- und Untersuchungsmöglichkeiten für vTP, wie z.B. den *in vitro* PKC-Aktivitätstest, um die inhibierende Wirkung von vTP auf die PKC zu kontrollieren, oder die direkte Zugabe des Proteins zu Säugetierzellen. Deshalb wäre es sehr vorteilhaft, vTP quantitativ zu exprimieren und zu isolieren.

Das Plasmid pVP22, in das der PKCI insertiert wurde, enthält zwar eine T7-Promotersequenz; Diese ist allerdings unvollständig, weshalb die Expression von vTP bzw. VP22 als Kontrollprotein in Bakterien-Zellen nicht möglich ist.

Die Translokationsuntersuchungen in verschiedenen Säugetierzelllinien haben gezeigt, dass nach Transfektion dieser Zellen mit pvTP vTP exprimiert und in die umliegenden Zellkerne geschleust wird. So wurden zunächst sowohl CHO-Zellen als auch NIH 3T3-Zellen mit pvTP bzw. pVP22 transfiziert und das Protein in unterschiedlicher Art und Weise aufgereinigt. Das His-6-tag ausnutzend wurden Ni-NTA-Agarose oder magnetische Ni-Kügelchen (*Ni-magnetic beads*) verwendet. Es wurden außerdem verschiedene Elutionspuffer entweder mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen oder mit unterschiedlichen pH-Werten benutzt. Das führte zu dem Ergebnis, dass sehr schwache Proteinbanden im SDS-Gel und im Western Blot zu sehen waren, die den 38 kDa des vTP bzw. des VP22 entsprechen. Jedoch waren die Eluate mit weiteren Proteinen verunreinigt und die Proteinkonzentrationen außerdem extrem gering. Da die aus Phosphat und Imidazol bestehenden Elutionspuffer für die weiteren Studien störend wirken, mussten sie mit Hilfe der Dialyse entfernt werden, was zu weiterem Proteinverlust führte. Die Ausbeute war im Verhältnis zum Aufwand extrem gering und nicht für einen PKC-Aktivitätstest ausreichend, weshalb die Expression von vTP bzw. VP22 in Säugetierzelllinien nicht weiter verfolgt wurde. Stattdessen sollte die DNA-Sequenz, die für vTP bzw. VP22 codiert, in ein anderes Plasmid insertiert werden, wodurch die Expression in Bakterienzellen möglich wird.

Dazu wurde das Plasmid pHO2c verwendet und mit den Restriktionsenzymen Nde I und Hind III linearisiert. Die Enden der entsprechenden vTP- bzw. VP22-DNA-Sequenzen aus pvTP und pVP22 wurden mit Hilfe der PCR und des Restriktionsverdau so verändert, dass sie zu dem linearisierten Plasmid pHO2c kompatible Schnittstellen erhielten. Nach Ligation, Transformation in DH5 α -*E.coli*-Zellen und DNA-Mini-Präparation wurde eine ausreichende DNA-Menge erhalten. Nachdem die korrekte Insertion sowohl mit Hilfe des Restriktionsenzym BssH II

(Abb.22) und einer Sequenzierung bestätigt worden war, wurden pHO2c/vTP bzw. pHO2c/VP22 in BL21(DE3)-*E.coli*-Zellen transformiert, die Expression mit IPTG induziert und die Proteinisolierung durchgeführt.

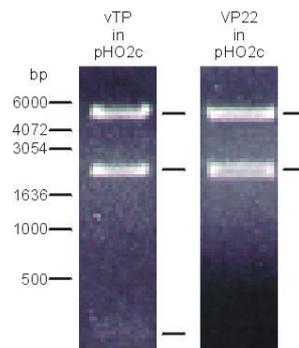


Abbildung 22. vTP bzw. VP22 in pHO2c. Der Restriktionsverdau mit BssH II zeigt 3 Fragmente für pHO2c/vTP (179, 1998, 4548bp) und 2 Fragmente für pHO2c/VP22 (1998, 4730bp) in den entsprechenden Größen, d.h. vTP bzw. VP22 wurden korrekt in pHO2c inseriert.

Ein zunächst kleiner Expressions- und Extraktionsansatz ergab, dass vTP und VP22 sich im Pellet des Extraktionsansatzes als unlösliche Proteine befanden (Abb.23), weshalb die weiteren Extraktionsversuche unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurden.

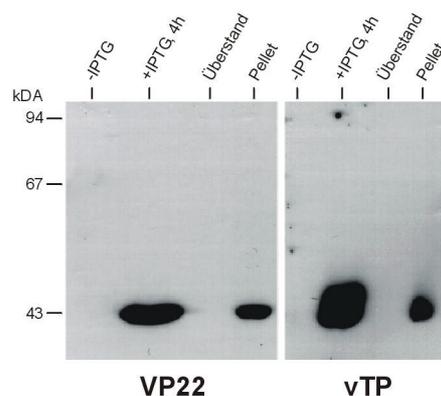


Abbildung 23. Bestimmung der Löslichkeit des Proteins. Es wurden Proben vor der Zugabe von IPTG (nichtinduzierte Kontrolle, -IPTG), 4h nach Zugabe von IPTG (induzierte Kontrolle, +IPTG, 4h) und nach Lyse der Zellen (Überstand und Pellet) analysiert. Dabei zeigt die nichtinduzierte Kontrolle erwartungsgemäß keine Bande für vTP bzw. VP22 im Gegensatz zur induzierten Kontrolle. Da im Pellet eine starke Bande für vTP bzw. VP22 zu sehen ist, im Überstand aber nicht, lässt sich daraus schlussfolgern, dass vTP und VP22 als unlösliche Proteine im Pellet angereichert sind.

Nach präparativer Expression und Isolierung des Proteins unter denaturierenden Bedingungen konnten vTP und VP22 mit Puffer „D“ (8M Harnstoff, 0,1M Phosphatpuffer, 0,01M Tris/HCl, pH 5,9) von der Nickel-Säule eluiert werden (Abb. 24). Die Proteinkonzentration in den Eluaten lag zwischen 0,06 und 0,08mg/ml, was einer absoluten Menge von 30 bis 40µg Protein (pro 150ml Expressionskultur) entsprach. Die SDS-Polyacrylamidgelen zeigen aber außer den 38kDa Banden, die vTP bzw. VP22 entsprechen, noch in fast allen Eluatfraktionen Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von etwa 30kDa. Es könnte sich hierbei um die β -Lactamase handeln, die mit einem Molekulargewicht von 29kDa [Jelsch et al., 1993] sehr gut mit den beobachteten Proteinbanden übereinstimmen kann. Sie wird durch die Selektion gegen Ampicillin induziert und kann bei Verwendung einer Nickel-Säule mit

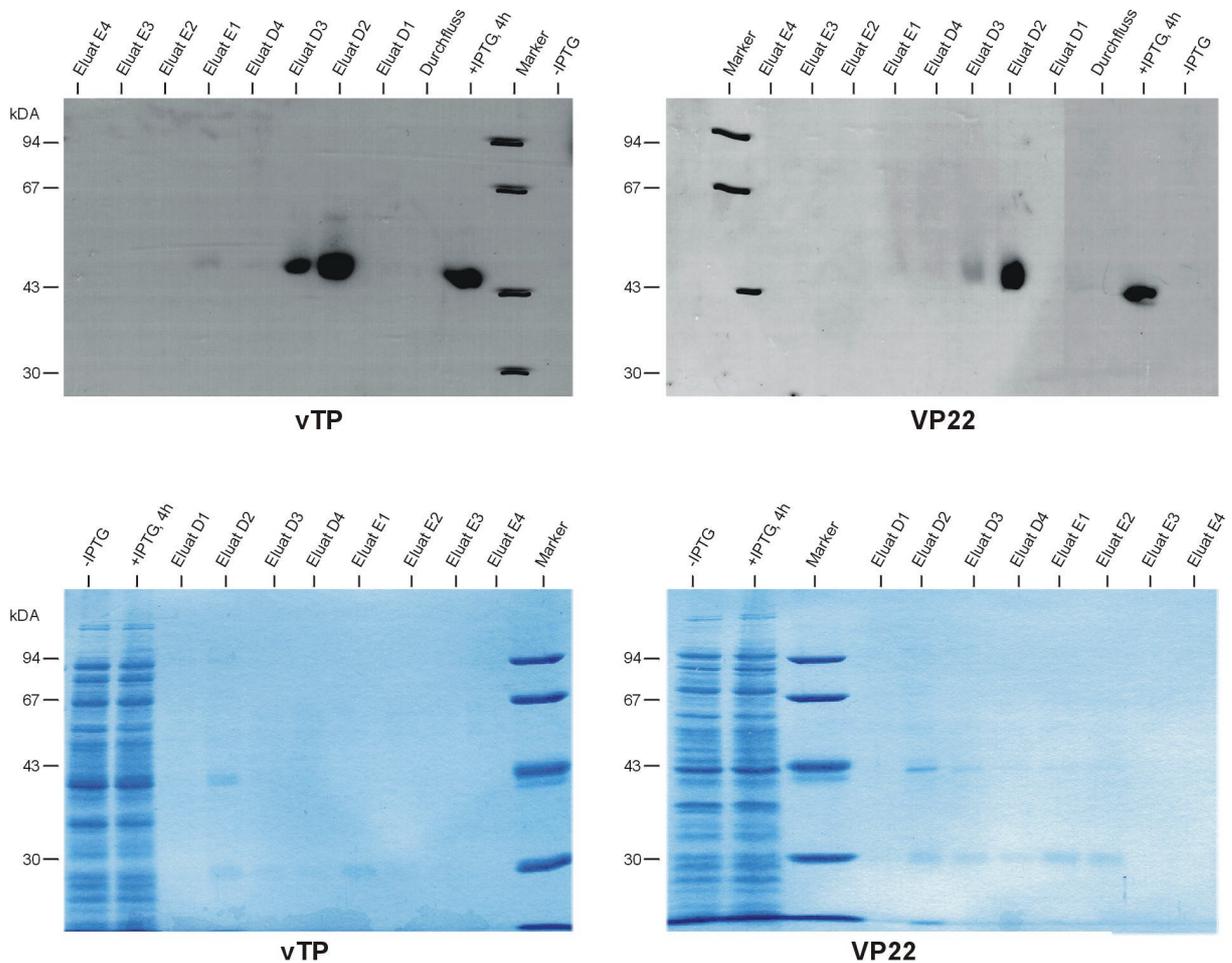


Abbildung 24. Reinigung über eine Nickel-Säule. (oben: Western Blot: Detektion von vTP bzw. VP22 über Penta-His-Antikörper/ anti-Maus IgG-Meerrettich-Peroxidase; unten: SDS-Gel): Das Lysat wurde mit GuHCl denaturiert, mit Ni-NTA-Agarose versetzt und in eine Säule gegeben. Puffer D und E wurden zum Eluieren des Proteins verwendet. vTP besitzt ein Molekulargewicht von 38,0kDa und VP22 von 38,1kDa. Wie diese Abbildungen zeigen, wurde sowohl vTP als auch VP22 mit Puffer D eluiert. In den SDS-Gelen sind außerdem in fast allen Eluatfraktionen Proteinbanden um die 30kDa zu sehen.

aufgereinigt werden. Da die β -Lactamase jedoch keine phosphorylierende Aktivität besitzt, würde sie einen PKC-Aktivitätstest nicht stören.

Um nun den Harnstoff und das Phosphat aus dem Elutionspuffer zu entfernen, da sie spätere Untersuchungen wie z.B. die MALDI-Massenspektrometrie oder enzymatische Reaktionen stören würden, wurden die Eluate gegen unterschiedliche Puffer dialysiert. Dabei gingen aber fast alle Proteine verloren, so dass nach der Dialyse nur noch ca. 4 bis 10 μ g Protein nachweisbar waren. Das gleiche Ergebnis wurde durch Gelfiltration mit unterschiedlichen Elutionspuffern erzielt.

Expression in	Protein-aufreinigung mit	Elutionspuffer	Dialyse	Gelfiltration mit Sephadex G50-Säule	
Expression von vT P bzw. VP22 in Säugerzellen					
CHO-Zellen	Ni-NTA-Agarose-	mit je 20mM, 40mM, 80mM, 120mM bzw. 400mM Imidazol	gegen Wasser (Slide-A-Lyzer)		
NIH 3T3-Zellen					
NIH 3T3-Zellen	magnet. Ni-Beads	mit 250mM Imidazol (=Elutionspuffer; QIAGEN)			
Vereinigung aller Eluate	Ni-NTA-Agarose-Säule	mit je 40mM, 80mM, 120mM bzw. 400mM Imidazol			
Expression von pHO2c/vT P bzw. pHO2c/VP 22 in BL21(DE3)-Zellen					
BL21(DE3)	Ni-NTA-Agarose-Säulen	mit Puffer "D" (pH 5,9) und "E" (pH 4,5) (=Elutionspuffer; QIAGEN)	gegen Wasser (Slide-A-Lyzer; centricon 10)	gegen abnehmende Harnstoffkonzentrationen	Laufpuffer: Wasser oder 20mM TEA
		mit 20m M TEA, statt Phosphat in Puffer "D", mit 10m M TEA, statt Phosphat in Puffer "E"			
		mit 10m M TEA, statt Phosphat in Puffer "D", mit 5mM TEA, statt Phosphat in Puffer "E"			
		mit 20m M TEA, statt Phosphat in Puffer "D", mit 5mM TEA, statt Phosphat in Puffer "E"			
		mit 10m M TEA, statt Phosphat in Puffer "D", mit 10m M TEA, statt Phosphat in Puffer "E"			
		mit 6M GuHCl, 0,1M Citrat, statt Harnstoff und Phosphat in Puffer "D" und in Puffer "E"			
		mit 6M Gu HCl, statt Harnstoff in Puffer "D" und in Puffer "E"			
		Vereinigung aller Eluate			

Tabelle 3. Übersicht über die unterschiedlichen Aufreinigungsversuche von vTP bzw. VP22.

In Tabelle 3 sind die unterschiedlichen Expressions- und Aufreinigungsversuche von vTP bzw. VP22 aufgeführt. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bis jetzt

nach mehrmaligen Versuchen auf unterschiedliche Art und Weise weder vTP noch VP22 erfolgreich überexprimiert werden konnte.

vTP führt zum Zelltod der NIH 3T3-Zellen

NIH 3T3 Zellen wurden mit pvTP bzw. pVP22 transfiziert. Ein, zwei, drei und vier Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit einem Phasenkontrast-Mikroskop untersucht. Anschließend wurde nach immunzytochemischer Behandlung mit anti-myc-Antikörper als erstem, Cy-3-konjugiertem-anti-Maus IgG als zweitem Antikörper und DAPI zur Zellkernfärbung die Zellzahl pro mm^2 bestimmt. Dazu wurden je 10 verschiedene Felder pro Deckgläschen zufällig ausgewählt und die Gesamtanzahl der Zellen auf diesen Feldern bestimmt.

Die Beobachtungen der Phasenkontrastmikroskopie ergaben, dass bei allen Ansätzen pro Tag die gleiche Zellzahl vorhanden war. Nach der Immunzytochemie war aber die Zellzahl signifikant verschieden. Der Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass tote oder sterbende NIH 3T3 Zellen ihre adhärenente Eigenschaft verlieren und sich ablösen. Deshalb werden sie mit dem Medium bei der immunzytochemischen Behandlung abgesaugt. Abbildung 25 zeigt, dass sich nach 3-4 Tagen die Anzahl der pvTP-behandelten Zellen signifikant verringert, im Gegensatz zu den unbehandelten und pVP22-transfizierten Zellen. So bleibt die Zellzahl der pvTP-transfizierten Zellen über die vier Tage nahezu gleich, während sich die Anzahl der unbehandelten Zellen mehr als verzehnfacht und die der pVP22-transfizierten Zellen verachtfacht.

Da die Verteilung der Zellen auf den Deckgläschen nicht einer statistischen Normalverteilung entsprach, wurde zur statistischen Auswertung der Kruskal-Wallis- und der Mann-Whitney-Test herangezogen. Diese beiden nicht-parametrischen Tests vergleichen zwei unabhängige bzw. drei und mehr unabhängige Gruppen von Probanden miteinander. Sie ergaben, dass sowohl der Unterschied der Zellzahl pro mm^2 zwischen den unbehandelten und den pvTP-transfizierten Zellen als auch zwischen den pVP22-transfizierten und pvTP-behandelten Zellen hoch signifikant ist (Tag 2, 3 und 4: $p \leq 0,01$ für beide Tests). Dieser drastische Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass durch die Anwesenheit des PKC-Inhibitors in den Zellkernen die Zellen sterben, sich ablösen und dadurch abgesaugt werden.

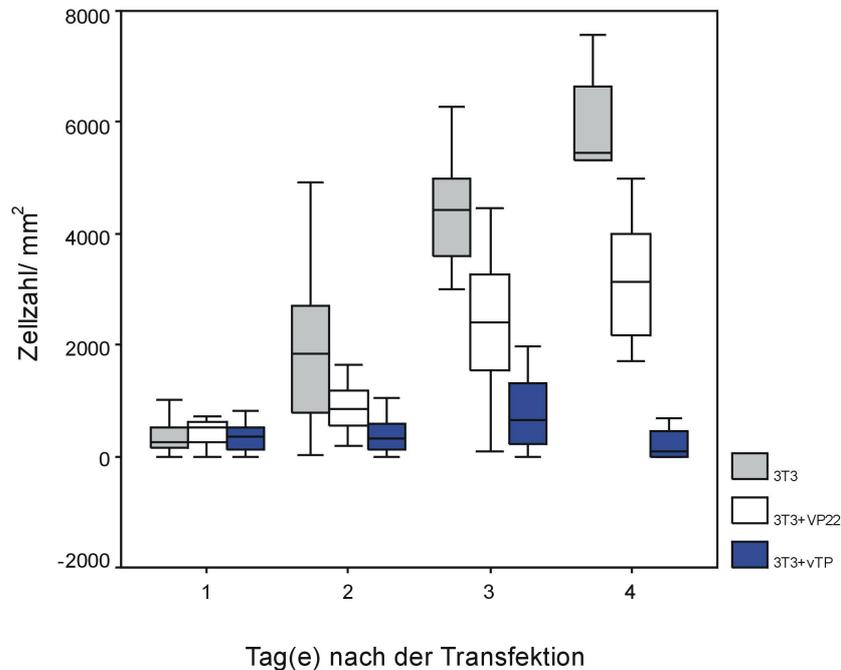


Abbildung 25. vTP führt zum Zelltod. NIH 3T3-Zellen wurden mit 0,75 μ g pvTP bzw. pVP22 transfiziert. Unbehandelte Zellen dienten als zusätzliche Kontrolle. Ein, zwei, drei und vier Tage nach der Transfektion wurden die Zellen immunzytochemisch aufbereitet und die Zellzahl pro mm² bestimmt. Nach 3-4 Tage starb eine signifikant hohe Anzahl vTP-behandelter Zellen. Die Daten sind in einem Boxplot dargestellt [Turkey, 1977]: Das Ende der Boxen sind die Quartile Q₁ und Q₃ und die Länge der Box entspricht dem Interquartilbereich (IQR, *interquartile range*). Die Box enthält die mittleren 50% der Daten. Die horizontale Linie innerhalb der Box ist der Median. Die vertikalen Linien verlängern sich zu den extremen Daten innerhalb 1,5 IQR vom Ende der Box, die damit die Variabilität und Schiefe anzeigen.

Außerdem war eine große Anzahl apoptotischer Körperchen auf den Deckgläschen der pvTP-transfizierten Zellen zu sehen. Der Pfeil in Abbildung 21H kennzeichnet eine typische apoptotische Zelle, die jeden Zellkontakt zu anderen Zellen und ihre charakteristische längliche, flache Form normaler Fibroblastenzellen verloren hat. Die apoptotischen Körperchen in Abbildung 21F zeigen, dass die Zellen der Apoptose unterliegen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass vTP durch seine Anwesenheit in den Zellkernen zum Absterben und wahrscheinlich zum apoptotischen Zelltod der NIH 3T3-Zellen führt.

NIH 3T3-Zellen sterben durch Apoptose

Es konnte gezeigt werden, dass der zellkernspezifische Inhibitor der PKC, vTP, zum Zelltod der NIH 3T3-Zellen führt. Es soll nun nachgewiesen werden, dass der Zelltod tatsächlich durch Apoptose induziert wird.

NIH 3T3-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen pvTP bzw. pVP22 transfiziert. Ein Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe des *Cell Death Detection* ELISA analysiert. Wenn die Zellen apoptotisch sterben, wird u.a. durch die Caspase-aktivierte DNase der DNA-Doppelstrang in den leicht zugänglichen Linker-Regionen zwischen den Nukleosomen in Mono- und Oligonukleosomen gespalten. Die Plasmamembran der Zellen bleibt in diesem frühen Stadium der Apoptose intakt, wodurch es zur Anreicherung der Mono- und Oligonukleosomen im Zytoplasma der sterbenden Zelle kommt. Bei dem *Cell Death Detection* ELISA werden zwei monoklonale Maus-Antikörper gegen Histon und DNA verwendet. Anschließend wird der Anteil der im Immunkomplex fixierten Peroxidase des anti-DNA-Peroxidase-Antikörpers mit ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat(6)]) als Substrat photometrisch bestimmt.

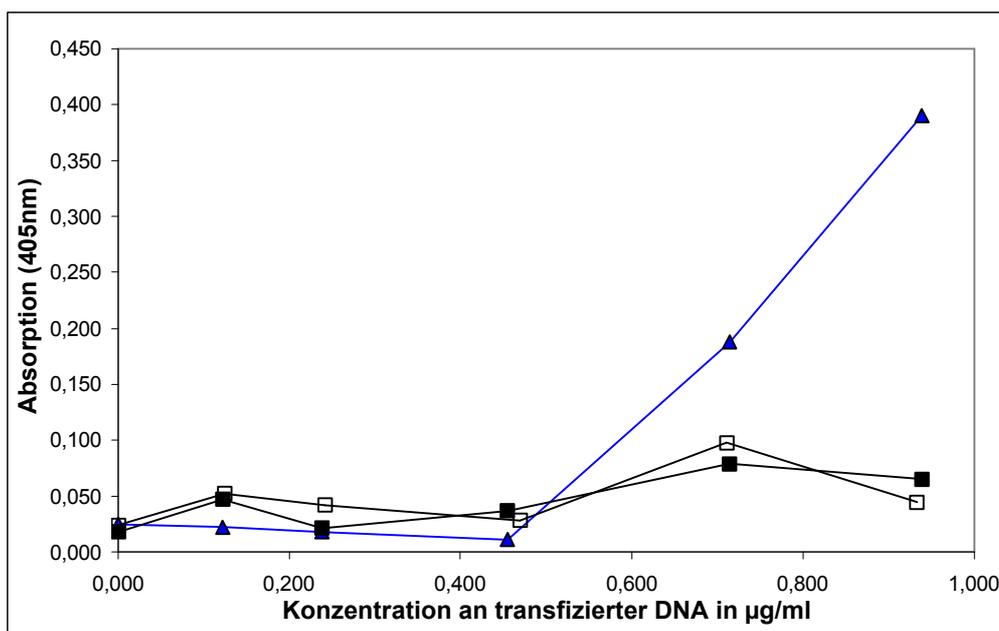


Abbildung 26. vTP induziert Apoptose in NIH 3T3-Zellen. NIH 3T3-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an pvTP bzw. pVP22 transfiziert (**blaues Dreieck:** pvTP-transfizierte Zellen; **schwarzes Quadrat:** Superfect-behandelte Zellen; **weißes Quadrat:** pVP22-transfizierte Zellen). Ein Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe des *Cell Death Detection* ELISA analysiert und die Absorptionen der Mono- und Oligonukleosomen im Zytoplasma bestimmt. Konzentrationen von 0,7µg/ml und 0,9µg/ml pvTP induzieren Apoptose in den behandelten Zellen.

Dies ermöglicht den spezifischen Nachweis von Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten.

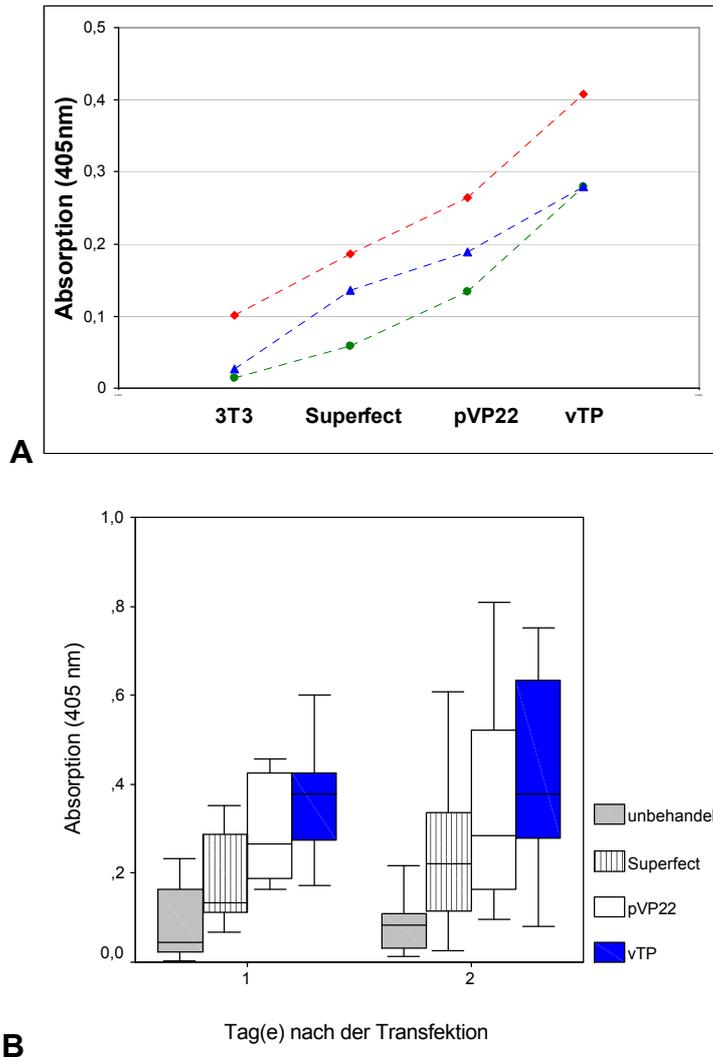


Abbildung 27. Zellen sterben durch Apoptose. NIH 3T3-Zellen wurden mit 1,3µg/ml pvTP und pVP22 transfiziert. Ein und zwei Tage nach der Transfektion wurden die Absorptionen der Mono- und Oligonukleosomen im Zytoplasma mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA analysiert und statistisch mit dem Wilcoxon Test ausgewertet.

(A) Typische, ausgewählte Experimente (rot: Experiment 1, blau: Experiment:2, grün: Experiment 3; 2 Tage nach der Transfektion). Die Messwerte, die zu einem Experiment gehören, wurden durch Strichlinien miteinander verbunden. Die Absorptionen schwanken von Experiment zu Experiment zum Teil sehr stark. Jedoch zeigen sie innerhalb eines Experimentes im Vergleich zu den anderen Experimenten die gleiche Tendenz und Signifikanz.

(B) Die Daten aller Experimente (Tag 1: n=8; Tag 2: n=12) sind in einem Boxplot dargestellt [Turkey, 1977]. Der Wilcoxon Test zeigt, dass die Absorptionen der vTP-behandelten Zellen und der pVP22-behandelten Zellen signifikant verschieden sind. Das Gleiche gilt für vTP-behandelte Zellen im Vergleich mit den Kontrollzellen (Tag 1: vTP — pVP22, vTP — Superfect, pVP22 — Superfect, Superfect — NIH 3T3: $p \leq 0,05$; vTP — NIH 3T3, pVP22 — NIH 3T3: $p \leq 0,01$; Tag 2: vTP — pVP22: $p \leq 0,05$; vTP — NIH 3T3, vTP — Superfect, pVP22 — NIH 3T3, pVP22 — Superfect, Superfect — NIH 3T3: $p \leq 0,01$).

Unterhalb einer Konzentration von 0,45µg/ml transfizierter DNA zeigen sowohl die pvTP-transfizierten als auch die pVP22-behandelten Zellen sowie die Kontrollzellen eine ähnlich niedrige Absorption, was auf eine geringe Menge an zytoplasmatischen Mono- und Oligonukleosomen hindeutet (Abb.26). Oberhalb einer Konzentration von 0,45µg/ml erhöht sich die Absorption der pVP22-transfizierten Zellen und der Kontrollzellen nur leicht, im Gegensatz zu den pvTP-transfizierten Zellen, bei denen die Absorption aufgrund einer signifikanten Anreicherung der Mono- und Oligonukleosomen im Zytoplasma deutlich erhöht war.

Um diese Daten zu verifizieren, wurden in weiteren Experimenten die NIH 3T3-Zellen mit 1,3µg/ml pvTP bzw. pVP22 transfiziert und ein und zwei Tage nach der Transfektion analysiert. Abbildung 27A zeigt drei ausgewählte, typische Messreihen. Die Absorptionen der einzelnen Proben schwanken von Experiment zu Experiment zum Teil stark. Werden aber nur die Proben eines Experimentes miteinander verglichen, so ist bei allen Experimenten die gleiche Tendenz zu sehen: In den pvTP-transfizierten Zellen ist die Anreicherung der Mono- und Oligonukleosomen am größten. In Abbildung 27B sind alle durchgeführten Messungen in einem Boxplot dargestellt und mit dem Wilcoxon-Test statistisch ausgewertet: Sowohl nach einem als auch nach zwei Tagen war die Absorption, d.h. die Anreicherung der Mono- und Oligonukleosomen im Zytoplasma der pvTP-behandelten Zellen signifikant höher als die der pVP22-behandelten Zellen und der Kontrollzellen. Die Absorptionen, d.h. die Anreicherungen der Mono- und Oligonukleosomen in den zytoplasmatischen Fraktionen der pVP22-transfizierten Zellen und der Zellen, die nur mit Superfect behandelt wurden, sind niedrig, aber dennoch signifikant höher als die der unbehandelten Zellen. Somit haben Superfect und VP22 ihren eigenen kleinen Effekt auf die NIH 3T3-Zellen.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Anwesenheit von vTP, dem zellkernspezifischen Inhibitor der PKC, in NIH 3T3-Zellen in signifikanter Weise Apoptose induziert. Dies bedeutet, dass die Proteinkinase C im Zellkern eine sehr wichtige anti-apoptotische Rolle spielt.