

Aus der Abteilung für experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

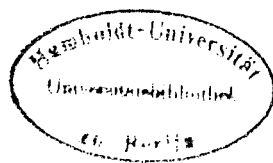
Genetische und epigenetische Untersuchung des Promotors
und der 5'-nichtkodierenden Region des Bcl-2-Gens der Ratte

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Monika Trendelenburg
aus Katowice



Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter:

1. PD Dr. Josef Priller
2. Prof. Dr. Reinhold Schäfer
3. Prof. Dr. Andreas von Deimling

WG 1940

Datum der Promotion: 14. 10.2003

Ich widme es meiner Oma Eli

1. Einleitung

Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit den Regulationsmechanismen des Bcl-2-Gens. Bcl-2 gehört zu den bekanntesten antiapoptotischen Proteinen und spielt in der Biologie eine wichtige Rolle. Ich werde zunächst den Zusammenhang zwischen der Apoptose und der Funktion der Bcl-2-Proteine erläutern. Anschließend werden ganz allgemein die Regulationsmechanismen der Genaktivität bei Eukaryoten und insbesondere die DNA-Methylierung und die Transkriptionsfaktoren dargestellt. Zum Schluß werde ich den Aufbau des Bcl-2-Gens darstellen und daraus die Problemstellung dieser Arbeit ableiten.

1.1.0 Apoptose

Apoptose ist die häufigste Form des Zelluntergangs im Organismus. Sie ist evolutionär hochkonserviert (1) und wird durch eine komplexe intrazelluläre Maschinerie initiiert.

Die Erforschung der Apoptose hat eine lange Geschichte (2). Im zweiten nachchristlichen Jahrhundert beschrieb als erster Galenus Galen die Regression der larvalen und fetalen Strukturen im Laufe der Ontogenese, und bereits 1842 erkannte Carl Vogt, daß Zellen durch "programmierten Tod" sterben können. 1906 beschrieb Collin zum ersten Mal einen spontanen Neuronenuntergang während der Entwicklung von Motoneuronen und Spinalganglien. Die erste klare morphologische Beschreibung des programmierten Zelltodes gelang 1885 Flemming. Er prägte dafür den Begriff „Chromatolyse“, eine Umschreibung, die lange ihre Gültigkeit behielt. Kerr, Wyllie und Currie schließlich beobachteten an toxinbehandelten Leberzellen eine den sterbenden Embryonalzellen vergleichbare Morphologie und prägten hierfür den umfassenden Begriff "Apoptose" (3). Apoptose kann man damit vereinfacht als morphologisch definiertes Synonym für programmierten Zelltod umfassen. Apoptose ist nicht nur in der Entwicklung von Bedeutung, sie spielt auch bei der Erhaltung der Gewebekomöostase eine große Rolle und ermöglicht dem vielzelligen Organismus eine optimale Anpassung der Zellzahl an die Umweltbedingungen (4). So werden Zellen, die durch virale Infektion oder Mutation geschädigt sind, via Apoptose entfernt. Die Apoptose ist durch eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen definiert (5). Als frühestes morphologisches Merkmal der Apoptose verdichtet sich das Chromatin, an mehreren Stellen der Zelloberfläche stülpen sich Zytoplasmablasen aus (apoptotische Körperchen). Später wird das Zisternensystem des endoplasmatischen Retikulums dilatiert und fragmentiert, die Mitochondrien weisen flockige Verdichtungen auf.

Charakteristischerweise wird die DNA durch Endonukleasen zwischen den Nukleosomen gespalten, wobei kurze (ca. 180bp) Fragmente entstehen (6, 7). Im Gegensatz dazu ist die Nekrose durch ein Anschwellen der Zelle charakterisiert. Dies führt zur Zerstörung der Plasmamembran und zur Freisetzung des Inhalts des Zytosols (proteolytische Enzyme etc.) und von Zellorganellen in den interzellulären Raum. Eine inflammatorische Reaktion mit einhergehender Gewebsschädigung, die man so nur bei der Nekrose und nicht bei der Apoptose sieht, ist die Folge. Bei der Apoptose werden die Apoptosekörper sowie die apoptotischen Zellen entweder in ein Drüsenlumen abgestoßen oder von den benachbarten Zellen phagozytiert. Welchen der beiden Wege die Zelle einschlägt, hängt von der Art (8) und Intensität des Stimulus, der Zellart und dem Entwicklungsstadium der Zelle ab (9).

1.1.1 Rolle der Apoptose im ZNS und insbesondere beim Schlaganfall

Im ZNS spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M.Alzheimer, M.Parkinson, amyotrophe Lateralsklerose (ALS), M.Pick etc. (10).

Beim ischämischen Insult existieren beide Arten des Zelluntergangs nebeneinander. Im Zentrum des Infarkts, in dem der Blutfluss auf unter 20% des Ausgangswertes reduziert ist, werden die Zellen nekrotisch. In dem umgebenden Gewebe („Penumbra“) dominiert der apoptotische Zelluntergang (11). Eine transiente oder permanente Reduktion des Blutflusses führt zur Erschöpfung der Sauerstoff- und Energiespeicher, die wiederum den Verlust des Membranpotentials und eine anoxische Depolarisation (12) der Neurone zur Folge hat. Die Depolarisation führt zur Aktivierung der präsynaptischen, spannungsabhängigen Calciumkanäle und zur Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren in den synaptischen Spalt. Eine Aktivierung der N-methyl-D-aspartat-Rezeptoren (NMDA) und anderen Glutamatrezeptoren führt zu einem Überangebot an Calcium, das als universeller Botenstoff eine Signalkaskade hervorruft. Proteolytische Enzyme werden dabei aktiviert und zerstören Proteine des Zytoskeletts. Die aktivierte Phospholipase A2 und Cyclooxygenasen produzieren freie Radikale. Freie NO-Anionen, die durch die calciumabhängige NOS (*nitric oxide synthase*) gebildet werden, reagieren mit Superoxid zu dem hoch reaktiven Peroxynitrit, das die Gewebszerstörung beschleunigt. Im Kern der minderperfundierten Gehirnareale kommt es in wenigen Minuten zu der o.g. anoxischen Depolarisation, Zellen sterben rapide durch Lipolyse, Proteolyse und Disaggregation von Mikrotubuli. In der benachbarten Penumbra kommt es zu repetitiven Depolarisationen der Neurone und zur Aktivierung der apoptotischen Kaskade. Die Vorgänge in

der Penumbra vergrößern im Endeffekt das Infarktgebiet, eine gezielte Hemmung der apoptotischen Kaskade stellt somit einen wichtigen therapeutischen Ansatz zur Minimierung des Ischämieschadens dar (12).

1.1.2 Pathomechanismen der Apoptose

Zu den Effektoren der apoptotischen Kaskade gehören spezifische Proteasen (Caspasen), die zelluläre Substrate spalten und dadurch das morphologische und biochemische Bild der Apoptose bestimmen. Mehr als 30 verschiedene Substrate für Caspasen sind derzeit bekannt. (13). Sie zerstören nicht nur die Proteine des Zytoskeletts (Actin, Plectin, Gelsolin) und ganze Zellstrukturen, sondern können auch die DNA und ihre Reparaturmechanismen direkt angreifen (z.B.: das DNA-Reparaturenzym ADP-ribose-Polymerase PARP). Die endonukleäre Lamina, eine Struktur der Kernmembran, die für die Chromatinkondensation mitverantwortlich ist, wird von den Caspasen geschnitten, was zu einer Chromatinkondensation führt.

Die Beobachtung, daß Caspasen-Vorläufer in allen Zellen konstitutiv exprimiert werden, legt die Vermutung nahe, daß sie als Effektor-Proteasen in inaktiver Form vorliegen und erst bei entsprechendem Stimulus von Initiator-Caspasen aktiviert werden. Tatsächlich existieren drei Wege der Aktivierung (**Abb.1**).

Bei dem rezeptorvermittelten Weg wird über die Stimulation und Trimerisierung des *death receptors* CD95 und unter Mitwirkung des Adapters FADD/MORT1 der *death inducing signaling complex* (DISC) gebildet, der wiederum durch autokatalytische Spaltung das Proenzym Caspase 8 aktiviert. Aktive Caspase 8 aktiviert weitere Effektor-Caspasen, insbesondere die Caspase 3.

Der zweite, indirekte Weg bedient sich der Mitochondrien als Verstärker. Bei diesem Signalweg sind die DISC-Bildung und die Aktivierung der Caspase 8 reduziert. Die Signalamplifikation wird hier durch das Molekül BID (Mitglied der Bcl-2-Familie) vermittelt.

BID wird bei einer geringen Aktivität der Caspase 8 gespalten und kann anschließend die Mitochondrien zur Freisetzung von Cytochrom c anregen (14,15). Dieses bildet unter Anwesenheit von dATP mit Apafl das Apoptosom. Am Apoptosom wird Caspase 9 aktiviert, die ihrerseits wiederum Effektor-Caspasen aktiviert (16,17).

Ein dritter Signalweg ist Caspasen-unabhängig. Der Apoptose Induzierende Faktor (AIP) wird aus den Mitochondrien freigesetzt und verfügt selbst über eine Proteaseaktivität (17).

Monika Trendelenburg
Torstr. 109
10119 Berlin

Tel.: (030) 44048076
monika.trendelenburg@charite.de

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Eltern: Ursula Wywial (geb. Kullik) und Jerzy Wywial
Geburtsdatum: 26.11.1970 in Katowice (Polen)
Familienstand: verheiratet
Kinder: Tochter Lea (3J.) und Sohn Jan (13M.)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schullaufbahn:

1977-1985 Marie Curie-Grundschule in Katowice
1985 Ausreise in die BRD
1985-1990 Evangelisches Privatgymnasium Dietrich Bonhoeffer in Hilden (NRW)
29.05.1990 Abitur (Note 1.8)

Studium:

SS 91-WS 91/92 Studium an der FU Berlin im Fachbereich Psychologie
WS 91/92 Teilnahme an Vorlesungen und Kursen im Fachbereich Humanmedizin

1992-1999 Medizinstudium an der FU Berlin
29.04.1994 Medizinische Vorprüfung (Physikum)
19.09.1995 Erstes Staatsexamen

10.1995-03.1996 Auslandsaufenthalt in Südafrika, Famulatur
1997-2000 Forschungsarbeit mit dem Ziel der Promotion in der Abteilung für Experimentelle Neurologie der Neurologischen Klinik der Charité

14.04.1998 Zweites Staatsexamen

27.04.98-14.08.98 1 PJ-Tertial, Innere Abteilung des Krankenhauses Zehlendorf
17.08.98-4.12.98 2 PJ-Tertial, Psychiatrische Klinik und Poliklinik der FU Berlin
7.12.98-1.03.99 3 PJ-Tertial, Chirurgische Klinik der FU Berlin

28.04.1999 Staatsexamen (Note 2.3)

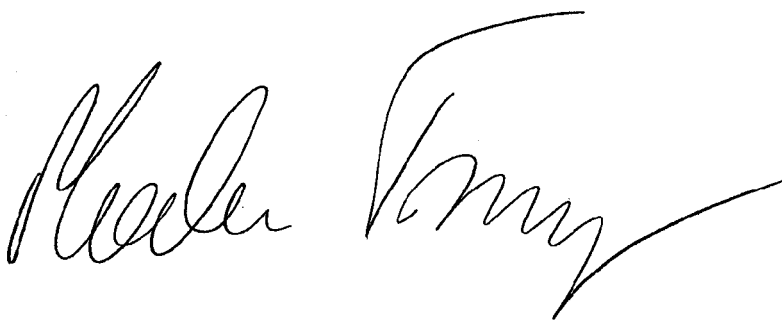
3.08.1999 Geburt der Tochter Lea
7.08.2002 Geburt des Sohnes Jan
1999-2003 Betreuung der Kinder und Fertigstellung der Promotionsarbeit
Seit 15. 08.2003 ÄIP in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité, Universitätsmedizin Berlin CCM

Monika Trendelenburg
Torstraße 109
10119 Berlin

Berlin, den 17.03.2003

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die Dissertationsschrift zum Thema: „Genetische und epigenetische Untersuchung des Promotors und der 5' nichtkodierenden Region des Bcl-2-Gens der Ratte“ von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Monika Trendelenburg', with a long, sweeping horizontal stroke extending to the right.

Monika Trendelenburg