

# 1. Einleitung

## 1.1 Der programmierte Zelltod

In einem menschlichen Körper sterben stündlich Millionen von Zellen. Dieses erschreckende Phänomen ist kein Ergebnis einer krankhaften Entartung, sondern dient der Aufrechterhaltung des Ganzen.

Ein gesunder Organismus ist eine sensible Ansammlung von differenzierten Zellen, die stets in einer Balance zwischen Leben und Tod schweben. Einige Zellen sind unersetzlich, andere haben ihre Funktion erfüllt und werden wie auch krankhafte Zellen entfernt. Wieder andere werden nach ihrer begrenzten Lebensdauer durch die nächste Generation ersetzt. Apoptose, oder der programmierte Zelltod, stellt als kontrollierter Zerfall der Zellen die letzte Phase ihrer Entwicklung dar.

Findet sie statt, bleiben benachbarte Zellen, und noch wichtiger der ganze Organismus, davon unbeeinflusst. Ist der Prozeß der Apoptose aber fehlerhaft, hat das merkliche, wenn nicht katastrophale Auswirkungen auf den Gesamtorganismus.

So führt die Apoptose in Nervenzellen beispielsweise zum Verlust essentieller Funktionen im Organismus, was sich in neurodegenerativen Krankheiten manifestiert. Geht die Fähigkeit zur Induktion der Apoptose oder ihres Fortschreitens bei der Reifung von z.B. Immunzellen verloren, so kann dies zu nachhaltigen Autoimmunkrankheiten führen. Werden Zellen resistent gegen die Induktion des Zelltodprogramms, wie bei einigen Formen des Krebses, so kann das eine tödliche Situation für den Organismus bedeuten. Schlechtes „Timing“ oder Fehler im apoptotischen Programm sind verantwortlich für die unterschiedlichsten Entwicklungsschäden. So stellt also die Apoptose eine kritische Funktion für einen gesunden Organismus dar.

Der Tod einzelner Zellen in Geweben wurde erstmals vor mehr als 40 Jahren bei entwicklungsbiologischen Untersuchungen von Vertebraten gefunden [1,2]. In den frühen 70ern beschrieben Kerr, Wyllie & Currie, daß Zellen zumindest zwei unterschiedliche Formen des Todes durchlaufen können: Die gut charakterisierte und meist schnelle Nekrose traumatisch verletzter Gewebe und eine langwierigere und morphologisch davon unterscheidbare Form, die sie Apoptose nannten [3]. Der nekrotische Zelltod ist charakterisiert durch das Schwellen der Zelle, Verletzung der Zellmembranen und durch den unkontrollierten Zerfall des Kerns und cytoplasmatischer Komponenten. Dahingegen tritt bei

Veränderungen ein. Die Dauer, die diese Veränderungen in Anspruch nehmen, variiert in Abhängigkeit vom Stimulus (z.B. Fas-Ligand, Entzug von Wachstumsfaktoren, Chemotherapeutika) und vom Zelltyp.

Die Kriterien, die zur Bestimmung des Zelltodtyps herangezogen werden, beinhalten neben den unterschiedlichen morphologischen Veränderungen nekrotischer bzw. apoptotischer Zellen, auch biochemische und molekularbiologische Vorgänge [4-6]. Bei apoptotischen Zellen ist zu beobachten, daß sie schrumpfen und sich ihre Cytoplasmamembran blasenförmig nach außen stülpt, das sogenannte „blebbing“. Phosphatidylserin, ein Lipid, das ausschließlich in der inneren Schicht der Cytoplasmamembran zu finden ist, kann in apoptotischen Zellen durch AnnexinV auf der Außenseite nachgewiesen werden. Die Chromosomen kondensieren und ordnen sich in der Peripherie des Kernes an. In den meisten, nicht aber in allen Fällen, werden die kondensierten Chromosomen durch spezielle Nucleasen internucleosomal fragmentiert, so daß eine charakteristische DNA-Leiter nachgewiesen werden kann. Abschließend zerfällt die Zelle in sogenannte apoptotische Körperchen, die durch Makrophagen oder benachbarte Zellen aufgenommen werden.

Die übereinstimmenden morphologischen und biochemischen Veränderungen apoptotischer Zellen unterschiedlicher Organismen deuten auf ein allgemeines, konserviertes Programm hin, das den Zelltod auslöst und steuert. In den 90ern wurden bei genetische Analysen des Nematoden *Caenorhabditis elegans*, Genprodukte der sog. „*cell death genes*“ (ced-3, ced-4 und ced-9) isoliert, die essentiell für den Fortgang und die Regulation des Zelltods sind [7,8]. ced-3 und ced-4 haben eine pro-apoptotische Funktion, wohingegen ced-9 antagonistisch wirkt. Ced-9 zeigt signifikante Homologien zum Bcl-2, einem anti-apoptotischen Protein in Säugern. ced-3 stellt ein homologes Gen zu dem des sog. „interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme“ (ICE oder Caspase-1) der Säugetiere dar, dessen Überexpression Apoptose induziert [9]. Dies zeigt nicht nur, daß die molekularen Mechanismen des Zelltods evolutionär konserviert sind, sondern auch, daß Proteasen und im speziellen Caspasen, eine Schlüsselrolle im Zelltodprogramm einnehmen.

## 1.2 Caspasen

Eine außergewöhnliche Familie von Cystein-Proteasen wird durch sog. Caspasen gebildet. Sie stellen eine der wichtigsten Exekutoren des apoptotischen Programms und Träger seines Signals dar. Der Name, Caspase, wurde per Konvention 1996 festgelegt und berücksichtigt die Art des Katalysemechanismus und der Substratspezifität (Abb.1.1) [10].

14 Caspasen sind bislang in Säugern identifiziert worden. Davon sind 12 in humanen Geweben und die Caspasen-11 und -12 ausschließlich in murinen Zellen zu finden [11,12]. Auch in anderen Organismen wurden Caspasen identifiziert; 4 in *Drosophila melanogaster*, zwei aktive Caspasen in *C. elegans*, zwei in *Xenopus leavis*, eine in *Spodoptera frugiperda* und zwei in *Hydra vulgaris* [13,14].

Caspase { cysteinyl aspartate-specific proteinase }  
          { cysteinyl aspartate-specific proteinase }

Abb.1.1: Ursprung der Caspase-Nomenklatur, aus [15]

Caspasen besitzen eine stringente Spezifität für die Hydrolyse ihrer Substrate nach einem Aspartat. Diese Substratspezifität schließt die dem Aspartat (P<sub>1</sub>) vorangehenden 3 Aminosäuren (P<sub>2</sub>-P<sub>3</sub>) ein. Ist das Aspartat in Position P<sub>1</sub> strikt festgelegt, so können Variationen in P<sub>2</sub>-P<sub>4</sub> zumindest in Teilen auf unterschiedliche biologische Funktionen einzelner Caspasen hinweisen [16,17]. Dieser hohe Anspruch an die Substratpeptidsequenz ist aber nicht allein für die Spezifität verantwortlich. Nicht alle Proteine, die optimale Substratsequenzen besitzen werden durch Caspasen gespalten. Dies impliziert einen Einfluß der Tertiärstruktur des Substrats auf die Spaltaktivität [11].

Caspasen werden in der Regel durch Proteolyse aktiviert und bilden eine proteolytische Kaskade [18,19]. Diese Kaskade wird an den sog. Aktivatoren unter den Caspasen gestartet, die dann ihr apoptotisches Signal durch Proteolyse an die sog. Effektoren weitergeben. Effektoren sind, wie ihr Name besagt, die ausführenden Proteasen der Kaskade. Sie tragen direkt zu den biochemischen und morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen durch Proteolyse ihrer Substrate bei.

## Familie der Caspasen

Die Familie der Caspasen kann in zwei phylogenetisch unterscheidbare Unterfamilien, die Homologien zu ICE (Casp-1) bzw. CED-3 aufweisen, eingeteilt werden (Abb.1.2). Mitglieder der ICE-Familie sind hauptsächlich für die posttranslationale Prozessierung von Cytokinen verantwortlich, wohingegen die zweite Unterfamilie im apoptotischen Programm aktiv beteiligt ist. Eine weitere Aufteilung ist durch die unterschiedliche Substratspezifität der Enzyme mittels Verwendung von kombinatorischen Substratbibliotheken möglich [16,17]. So lassen sich die Caspasen durch diese Technik in drei weitere Untergruppen einteilen.

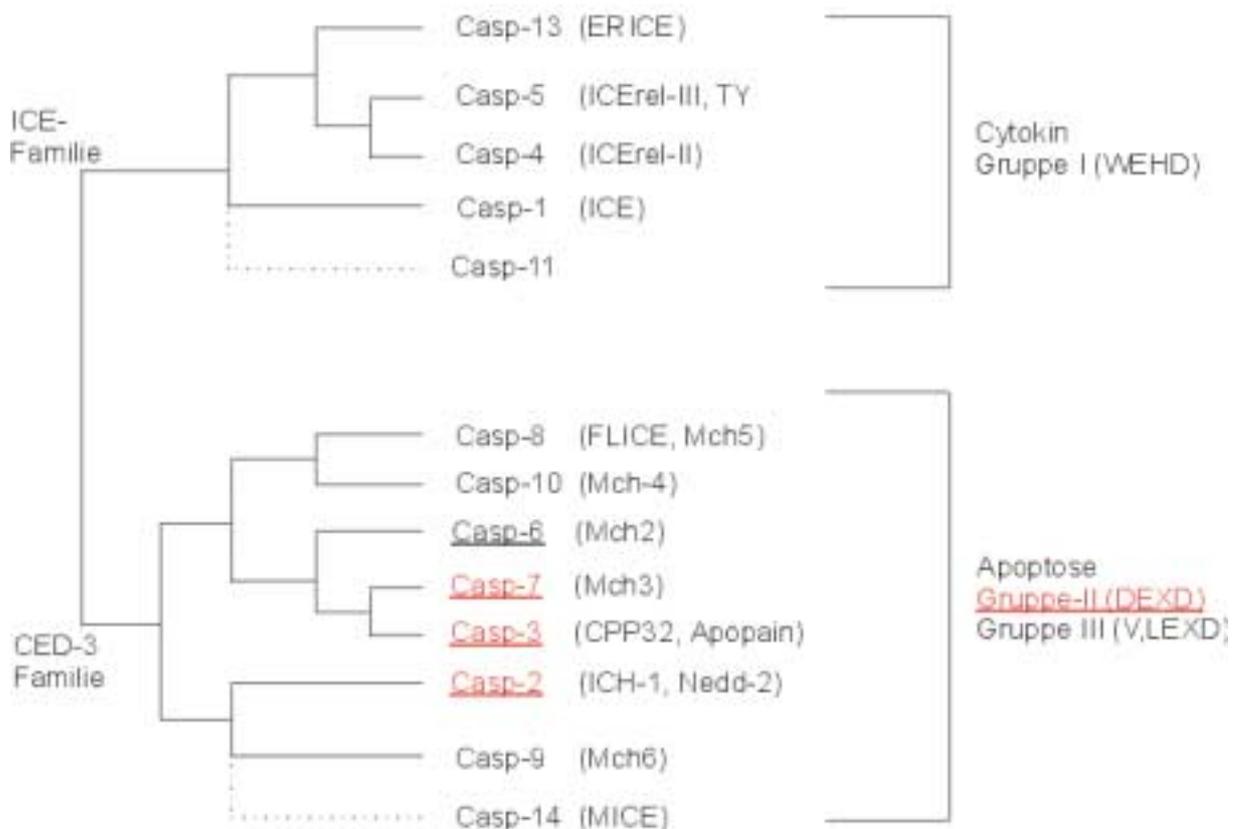


Abb.1.2: Ordnung der Caspasen nach phylogenetischen Gesichtspunkten und ihrer Substratspezifität (nach [15]).

Die Substratposition  $P_4$  scheint die wichtigste Determinante für die Substratspezifität darzustellen. Die meisten Caspasen bevorzugen Glu in Position  $P_3$  und tolerieren einen Austausch an Position  $P_2$ . Mitglieder der Gruppe I (Casp-1, -4, -5, -13) haben keine außergewöhnliche Präferenz für die  $P_4$ -Position, außer daß sie dort sperrige hydrophobe Aminosäuren wie Trp und Tyr bevorzugen (s. Abb1.5 & Tab1.3). Alternativ wird die Gruppe auch die WEHD-Gruppe genannt und gehört vollständig der ICE-Unterfamilie an. Die

Substrate auf. Sie sind, wie auch Ced-3, auf Asp in Position P<sub>4</sub> festgelegt und bevorzugen ein Glu in P<sub>3</sub>. Sie bilden so die Gruppe der DEXD-Caspasen. Dieses Spaltungsmotiv ist in vielen Proteinen zu finden, die während des Zelltods gespalten werden, was die Rolle der GruppeII-Caspasen als Haupteffektoren der Apoptose unterstreicht. Dahingegen ziehen die Mitglieder der GruppeIII (Casp-8, -10, -9, -6) verzweigte aliphatische Aminosäuren in Position P<sub>4</sub>, wie sie in Aktivierungssequenzen der meisten GruppeII und GruppeIII Caspasen selbst vorkommen, vor. Dies hebt die Funktion der GruppeIII als Aktivatoren anderer Caspasen, z.B. der Effektor-Caspasen, hervor [20,21]. Für die Caspasen -12 und -14 liegen noch keine ausreichenden Informationen für ihre Klassifizierung vor. Doch anhand ihrer Primärstruktur kann die Caspase-12 der ICE-Familie zugeordnet werden und scheint das murine Äquivalent zur humanen Caspase-5 zu sein. Die Caspase-14 weist Verwandtschaft zu den Caspasen-2 und -9 auf [14].

Eine mögliche Ausnahme dieser allgemeinen Zuordnung anhand von Substratspezifitäten stellt die Caspase-6 dar. Obwohl sie zur GruppeIII der Caspasen gehört und z.B. die Caspase-3 aktivieren kann, besitzt sie aber auch die Eigenschaft von Effektor-Caspasen, nämlich die Spaltung von Strukturproteinen, wie den Laminen [22,23]. Zudem ist ihr Proenzym strukturell ähnlich zu den Caspasen -3 und -7 aufgebaut. Eine andere Ausnahme ist möglicherweise die Caspase-2, die durch ihre Substratspezifität zur GruppeII (den Effektoren) gehört, aber aufgrund ihres Aufbaus, dem Besitz einer langen Prodomäne und somit der Fähigkeit zur Selbstaktivierung eher den GruppeIII-Caspasen ähnelt [24].

Unter Berücksichtigung dieser Ausnahmen ist eine weitere Variante zur Einteilung der Ced3-Caspasen, nämlich auf der Basis ihres Aufbaus, denkbar. Caspasen mit kurzen Prodomänen (Caspase-3, -6 und -7) bilden danach die Gruppe der Effektoren, wohingegen die restlichen Caspasen lange Prodomänen besitzen und eine Gruppe der Initiatoren und Mediatoren bilden.

### **Struktur der Caspasen**

Caspasen werden als katalytisch inaktive Proenzyme (Zymogene) gebildet, die aus drei Domänen bestehen: Einer N-terminalen Prodomäne (~23-216AS), einer großen Untereinheit (~20kD) mit dem aktivierten Cystein in mitten eines konservierten QACXG-Motives und einer kleinen Untereinheit (~10kD) (s. Abb1.3). Für fast alle Caspasen wurden durch alternatives Spleißen hervorgebrachte verkürzte Isoformen nachgewiesen, die zum Teil durch

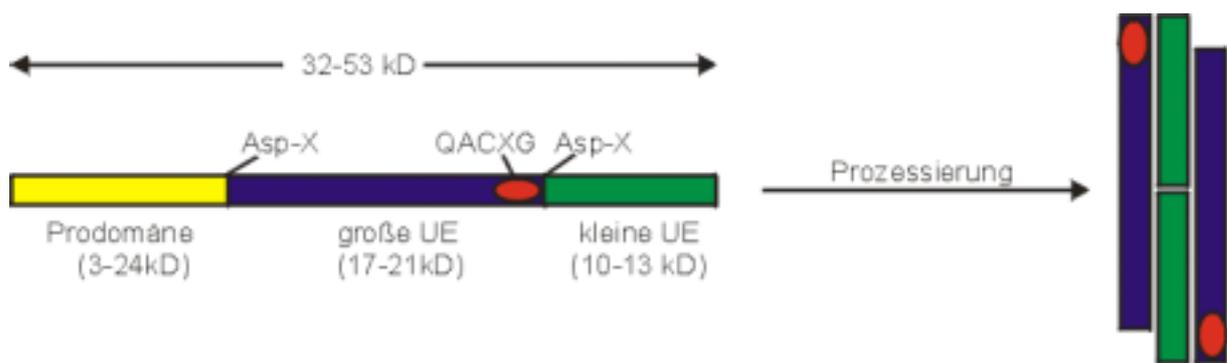


Abb.1.3: Schematische Organisation des Zymogens und der aktivierten Caspase. Durch proteolytische Prozessierung nach Asp-Resten wird das Zymogen in seine Untereinheiten (UE) zerlegt, die sich zum aktiven Heterotetramer mit zwei aktiven Zentren reorganisieren.

Die Aktivierung der Caspasen erfolgt in der Regel durch proteolytische Prozessierung nach einem Aspartat, das sich zwischen den jeweiligen Untereinheiten befindet. Die Sequenzen dieser Spaltstellen und kombinatorische Untersuchungen belegen, daß Caspasen einerseits die Fähigkeit zur eigenen Aktivierung oder, als Teil einer Kaskade, die Fähigkeit zur Aktivierung anderer Caspasen besitzen [27]. Ausnahmen hierbei stellen die Caspasen-3 und -7 dar, die nicht zur gegenseitigen Prozessierung *in vitro* fähig sind [28]. Ebenso konnte *in vivo* eine Aktivität der Caspase-9 auch ohne ihre Prozessierung gefunden werden. Die Abspaltung ihrer Prodomäne in apoptotischen Zellen konnte bislang nicht nachgewiesen werden [29]. Diese N-terminalen Prodomänen beinhalten in der Regel konservierte Regionen zur Protein-Protein-Wechselwirkung, die sog. „caspase recruitment domain“ und die „death effector domain“ (CARD, DED). Sie haben zwei wesentliche Aufgaben: Vermittlung der Oligomerisierung von Procaspasen und Assoziation an multimere Proteinkomplexe, die das Zelltodsignal weiterleiten [30]. Diese Oligomerisierung kann durch noch unbekannte Mechanismen zur autokatalytischen Aktivierung der Caspasen führen. GruppeII-Caspasen besitzen keine lange Prodomäne und sind deshalb auf die Aktivierung durch Caspasen der GruppeIII angewiesen (s. Abb. 1.4) [31]. Ausnahmen hierbei stellen wieder die Caspasen-2 und -6 dar. Erst einmal aktiviert, sind die meisten Effektor-Caspasen fähig, unprozessierte Mitglieder ihrer eigenen Art zu aktivieren. Diese positive Rückkopplung führt zur Amplifikation des apoptotischen Signals.

Ein Vergleich von Proteinsequenzen muriner Caspasen mit ihren humanen Verwandten zeigt unter ihnen deutliche Abweichungen. So sind in murinen Caspasen z.T. zusätzliche Aminosäuren eingefügt und bekannte humane Aktivierungsstellen fehlen oder weichen in ihrer Sequenz ab. Beides resultiert in Variationen des Molekulargewichts der Caspasen und ihren Untereinheiten (vgl.: [26]).

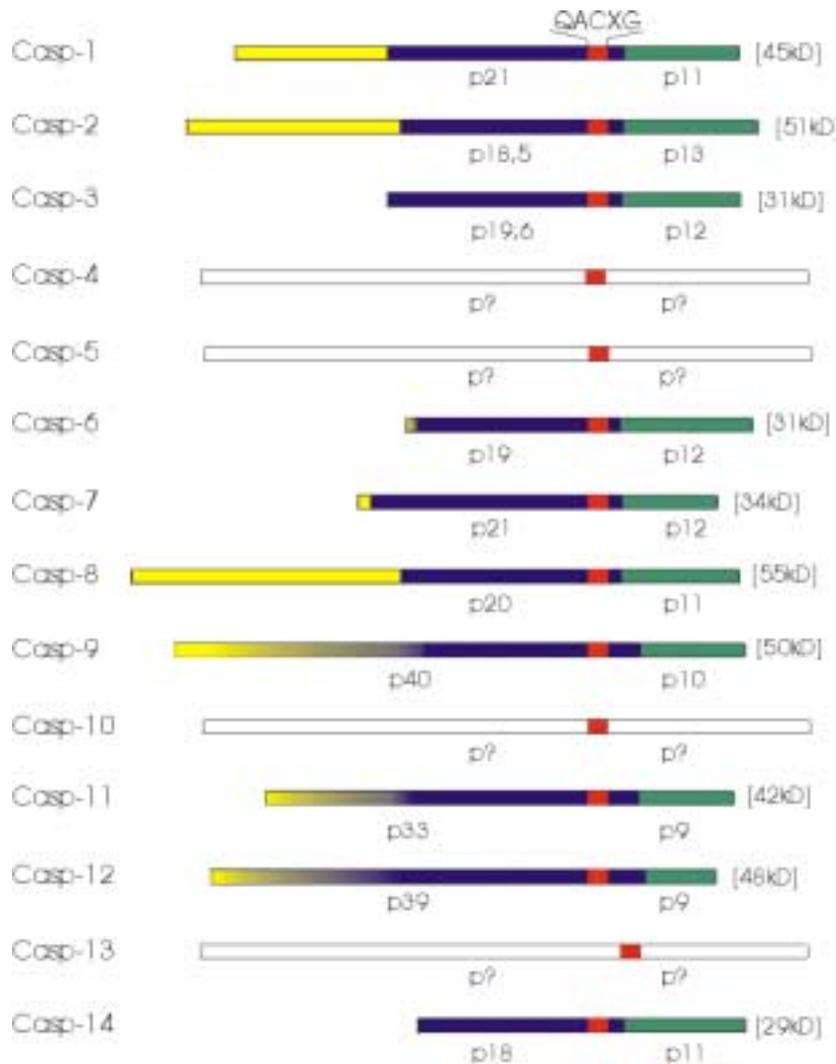


Abb.1.4: Schematische Darstellung muriner Caspasen.

Für die Caspasen-4, -5, -10 und -13 liegen keine murine Sequenzen vor. (Die Casp-12 scheint das murine Homolog der humanen Casp-5 zu sein.) Für die Caspasen-3, -6, -9, -11 und 12 sind keine zu humanen Sequenzen homologe Spaltstellen zu ermitteln. Neben dem Gesamtgewicht der Caspasen [ ] sind die Molekulargewichte der Untereinheiten eingefügt (p). Sequenzen: siehe Acc.Nr. unter 2.Material.

Für zwei Mitglieder der unterschiedlichen Caspasefamilien, Caspase-1 und -3, wurden bislang Röntgenkristallstrukturen publiziert [32,33]. In beiden Fällen besteht das aktive Enzym aus einem Heterotetramer, das sich aus einem Heterodimer der großen (p20) und kleinen (p10) Untereinheit zusammensetzt (s. Abb.1.4). An den gegenüberliegenden Enden des Heterotetramers liegt je ein aktives Zentrum. Essentielle Komponenten für die katalytische Aktivität, wie ein Cys und His im aktiven Zentrum, werden durch die große Untereinheit beigetragen. Die Substratspezifität wird hingegen durch Erkennen der Aminosäuren an

Zentren im Molekül vorliegen, gibt es keinen Hinweis über eine Kooperativität oder allosterische Modulation zwischen den beiden Zentren [15]. Die Homologie im Aufbau der Caspasen läßt gleiche Struktureigenschaften für andere Caspasen vermuten.

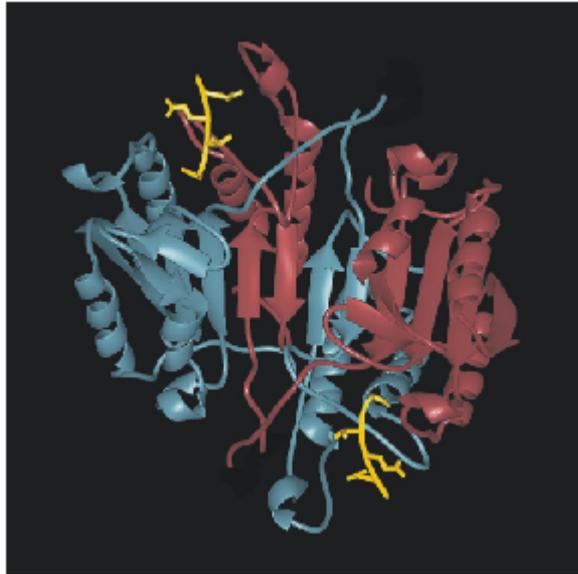


Abb.1.5: Röntgenkristallstruktur der Caspase-3. Das Caspase-Tetramer besteht aus zwei großen Untereinheiten (Außen, links blau und rechts bronze) und zwei kleinen Untereinheiten (Innen, links bronze und rechts blau). Die Struktur ist mit dem Inhibitor, DEVD.cho (gelb), in beiden aktiven Zentren dargestellt. aus: [15]

### **Katalytische Aktivität der Caspasen**

Caspasen erkennen eine relativ kurze Tetrapeptidsequenz in ihren Substraten, welche die Basis zum Design unterschiedlicher synthetischer Substrate und Inhibitoren liefert. Anhand dieser Substrate und Inhibitoren konnte die Topologie der aktiven Zentren und der Katalysemechanismus aufgeklärt werden [15,32,34].

Ähnlich der katalytischen Triade des Michaelis-Komplexes von Serin-Proteasen, bildet das Cys285 mit dem His237 der Caspasen eine Diade (die Numerierung der Reste folgt per Konvention der Caspase-1). Der dritte Teil einer Triade wird möglicherweise durch Carbonyl-Gruppen des Peptidrückgrats an Position 177 beigetragen.

Vor der Substratbindung deprotoniert His237 das katalytische Cys unter Bildung eines Imidazolium-Ions und erlaubt dessen nucleophilen Angriff an die Carbonylgruppe des zu zerlegenden Peptids. Dabei entsteht ein tetraedrisches Zwischenprodukt, bei dem der

Carbonylsauerstoff des Peptids in das sog. Oxyanion-Loch vordringt. Das Zwischenprodukt zerfällt unter Protonierung der  $\alpha$ -Aminogruppe der zu spaltenden Bindung. Die Decarboxylierung und Regeneration des Enzyms läuft im wesentlichen als Umkehrung der vorigen Schritte ab.

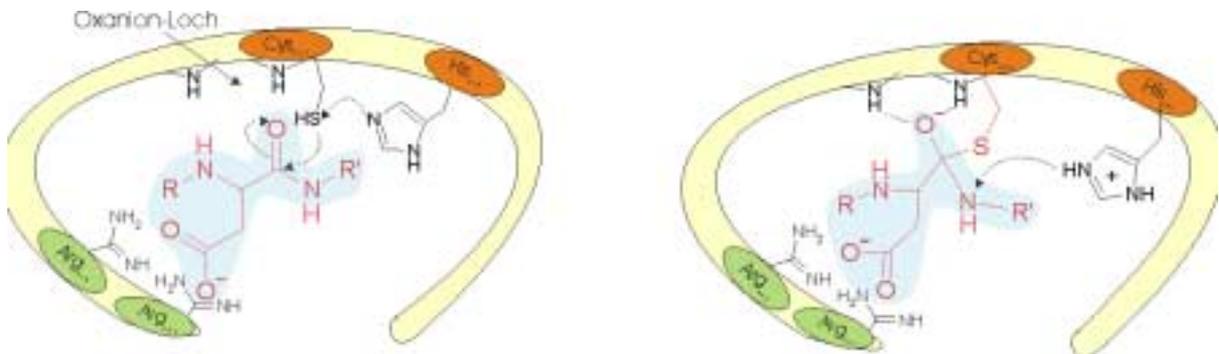


Abb.1.6a: Der Katalyse-Mechanismus der Cys-Proteasen beinhaltet den nucleophilen Angriff des Cys auf die Carbonylgruppe des Substrats

b: und die Stabilisierung eines tetraedrischen Zwischenproduktes.

Zum Design von synthetischen Substraten wurden bekannte Spaltsequenzen von „*in vivo*“-Substraten oder Ergebnisse aus kombinatorischen Peptidbibliotheken herangezogen. So ist DEVD eine Sequenz aus der Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) [35], die durch die GruppeII-Caspasen gespalten wird. VEID stammt aus LaminA, welches dort durch die Caspase-6 nie aber durch die Caspase-3 fragmentiert wird [22,23] und IETD ist die Spaltstelle in der Caspase-3 [36], die zu ihrer Aktivierung führt und durch GruppeIII-Caspasen bevorzugt wird. An die Tetrapeptide ist eine fluorophore oder chromophore Gruppe wie Aminomethylcoumarin (amc) oder para-Nitroanilin (pNa) gekoppelt. Ihre Freisetzung durch Caspasen kann vermessen und somit die Aktivität der Enzyme bestimmt werden.

Mittels solcher Aktivitätstests konnten  $K_M$ -Werte für rekombinante Caspasen ermittelt werden (s. Tab. 1.1a und b) [37,38]. Die zum Teil drastischen Unterschiede der Substratspezifitäten erlauben mitunter eine Klassifizierung von Caspase-Aktivitäten in komplexen Mischungen.

		<b>Substrat</b>	<b>K<sub>M</sub> [μM]</b>
<b>GruppeI</b>			
	Casp-1	WEHD.amc	
	Casp-4	WEHD.amc	31
	Casp-5	WEHD.amc	15
<b>GruppeII</b>			
	Casp-3	DEVD.amc	5
	Casp-7	DEVD.amc	15
<b>GruppeIII</b>			
	Casp-6	VEHD.amc	170
	Casp-8	DEVD.amc	4
	Casp-9	LEHD.amc	408
	Casp-10	VEHD.amc	42

Tab.1.1a: K<sub>M</sub>-Werte von rekombinanten Caspasen und fluorogenen Substraten aus Peptidbibliotheken aus: [37]

<b>Enzyme/Substrate</b>		<b>K<sub>M</sub> [μM]</b>			
		YVAD.pNa	LEHD.pNa	DEVD.pNa	VEID.pNa
<b>GruppeI</b>					
	Casp-1	23	7,3	18	46
	Casp-4	874	31	32	205
<b>GruppeII</b>					
	Casp-3	29000	370	11	250
	Casp-7	kS	490	12	570
<b>GruppeIII</b>					
	Casp-6	kS	1200	180	30

Tab.1.1b: K<sub>M</sub>-Werte von rekombinanten Caspasen und chromogenen Substraten; kS= keine Substratspaltung aus:[38]

Die Wirkung von synthetischen Inhibitoren für Caspasen beruht auf der Simulierung des beschriebenen tetraedrischen Zwischenproduktes [32]. Anstatt einer C-terminalen Peptidbindung am Asp des Substrates (die α-Aminogruppe) ist dort eine Carbonylbindung zu einem Aldehyd oder einem Methylketon mit einer guten Abgangsgruppe vorhanden (s. Abb.1.6)

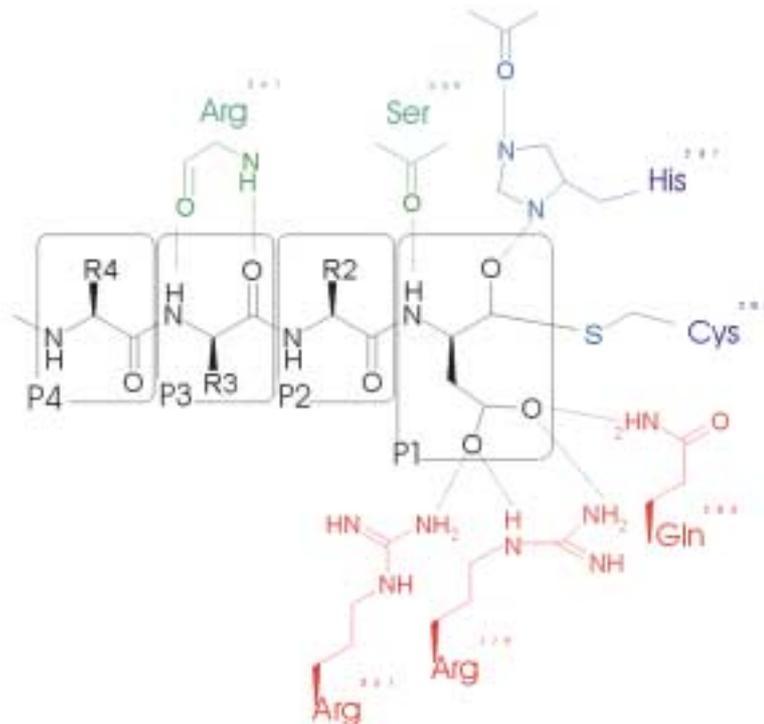


Abb.1.7: Koordination eines kompetitiven Inhibitors, z.B. DEVD.cho, im aktiven Zentrum der Caspasen. Gezeigt sind nur konservierte Reste der Bindetasche von Caspasen. Die Position P<sub>1</sub> ist am intensivsten von konservierten Resten (rot) eingebunden, ansonsten wird nur das Peptidrückgrat an P<sub>3</sub> gebunden. nach: [15]

Durch den Einsatz dieser Inhibitoren und rekombinanter gereinigter Caspasen konnten K<sub>i</sub>-Werte bestimmt werden [39].

Substrate	Enzyme	Inhibitoren		
		K <sub>i</sub> [nM]		
		WEHD.cho	DEVD.cho	IETD.cho
<b>GruppeI</b>				
WEHD.amc	Casp-1	0,056	18	<6
	Casp-4	97	132	400
	Casp-5	43	205	223
<b>GruppeII</b>				
DEVD.amc	Casp-2	>10000	1710	9400
	Casp-3	1960	0,23	195
	Casp-7	>10000	1,6	3280
<b>GruppeIII</b>				
VEHD.amc	Casp-6	3090	31	5,6
	Casp-8	21,1	0,92	1,05
	Casp-9	508	60	108
	Casp-10	330	12	27

Tab.1. 2: K<sub>i</sub>-Werte für die Kombination unterschiedlicher Peptidinhibitoren und rekombinanter Caspasen. aus [39] :WEHD, DEVD und VEHD sind die optimalen Tetrapeptidsequenzen der jeweiligen Substrat-Gruppe. IETD wird bevorzugt durch die Caspasen der GruppeIII gespalten und stellt das Substrat des Casp-3-Aktivators dar.

## „In vivo“-Substrate der Caspasen

Apoptotische Zellen bringen zahlreiche morphologische und biochemische Veränderungen wie DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation, Verlust des mitochondrialen Potentials, Veränderungen in der Membranzusammensetzung und vieles mehr, hervor [4,5]. Untersuchungen mit synthetischen Caspase-Inhibitoren und Caspase-„knock-out“-Mäusen haben eine Verbindung der Caspasen zu den meisten der Veränderungen gezeigt [15,40,41]. Doch ist diese Verbindung noch nicht vollständig verstanden, nicht zuletzt da die meisten bekannten Substrate zufällig gefunden wurden. Eine gezielte Suche nach Substraten durch vergleichende 2D-Gelelektrophorese zwischen lebenden und apoptotischen Zellen hat die Anzahl der gespaltenen Peptide auf annähernd 200 erhöht. Bislang sind davon 70 identifiziert [15] und in Tabelle 1.3 zusammengefaßt.

DXXD-Spaltstellen			nicht-DXXD-Spaltstellen		
↓		gespaltenes Protein	↓		gespaltenes Protein
DEVD	G	PARP	MELD	G	STAT1
DEVD	N	DNA-PKcs	NSPD	A	Sp-1
DVLD	N	Rad51	SELD	A	SRP p72
DELD	Y	Acinus	VFTD	L	NF-kB
<b>DETD</b>	<b>S</b>	<b>ICAD</b>	YVPD	S	PITSLRE Kinase
<b>DAVD</b>	<b>T</b>	<b>ICAD</b>	SHVD	G	PAK2
DEVD	G	DNA-RFC140	EERD	G	p59 <sup>FYN</sup>
DEAD	G	Rb	PAPD	A	CaMK-IV
DVPD	C	HDM2/MDM2	AAVD	G	p28 Bap31
DHVD	L	p21 <sup>CP1/WAF1</sup>	ELPD	G	Actin
DSL D	L	NuMA	SRVD	G	Gas2
DYPD	S	ATM	<b>VEID</b>	<b>N</b>	<b>LaminA</b>
DGPD	G	U1-70K snRNP	<b>VEVD</b>	<b>N</b>	<b>LaminB</b>
DXXD	X	hnRNP-C1/C2	<b>HLAD</b>	<b>S</b>	<b>Bcl-x<sub>L</sub></b>
DEPD	S	SREBP	<b>LQTD</b>	<b>G</b>	<b>BID</b>
DRGD	S	IκBα	VEVD	A	b-APP
DELD	S	D4-GDI	SSTD	S	pro IL16
DELD	A	cPLA <sub>2</sub>	<b>XXXD</b>	<b>X</b>	<b>pro Caspasen</b>
<b>DMQD</b>	<b>N</b>	<b>PKCδ</b>	<u>unbekannte Spaltstelle</u>		
<b>DEVD</b>	<b>K</b>	<b>PKCθ</b>	XXXD	X	MCM3
<b>DGVD</b>	<b>G</b>	<b>PKCζ</b>	XXXD	X	p27 <sup>KIP1</sup>
DTVD	G	MEKK-1	XXXD	X	Wee1
DITD	C	PRK2	XXXD	X	CDC27
DEQD	S	PP2A	XXXD	X	SAF-A/ hnRNP-U
DQTD	T	FAK	XXXD	X	hnRNP-A1
DETD	S	αII-Fodrin	XXXD	X	RasGAP
DEVD	S	βII-Fodrin	XXXD	X	Raf1
DQTD	G	Gelsolin	XXXD	X	Akt
DALD	S	Cytokeratin-18	XXXD	X	Cbl
DXXD	X	LAP-2	XXXD	X	Cbl-b
DITD	F	Nup153	XXXD	X	PKN
DESD	F	Rabaptin-5	XXXD	X	β-, γ- Catenin
DNID	N	APC	XXXD	X	Kinectin
DEED	D	Hsp90	XXXD	X	Calpastatin
DQPD	A	UbqCE NEDD4	XXXD	X	Ataxin-3
<b>DAGD</b>	<b>V</b>	<b>Bcl-2</b>	XXXD	X	AMPA Rezeptoren
DSYD	S	Presenelin 2	P <sub>4</sub> -P <sub>1</sub>		
DXXD	X	Huntington			
DEDD	S	SBMA-AR			
P <sub>4</sub> -P <sub>1</sub>					

Tab.1. 3: „In vivo“-Substrate der Caspasen. Neben den Substraten sind die Spaltstellen aufgeführt. aus: [15].

Eine Funktion der Caspasen ist es, Proteine zu inaktivieren, die die Zelle vor dem Zelltod schützen. Zwei deutliche Beispiele hierfür sind die Spaltungen von Bcl-2 und ICAD. Bcl-2 (*B-cell lymphoma gene 2 product*) ist ein anti-apoptotisches Mitglied der Bcl-Familie. Mitglieder dieser Familie besitzen Schlüsselfunktionen in der Apoptose. Sie können die Weiterleitung des apoptotischen Signals durch Bindung von Adaptormolekülen blockieren, das mitochondriale Membranpotential aufrechterhalten und die Aktivierung der Caspasen auf direktem und indirektem Weg verhindern [42,43]. ICAD (*Inhibitor of Caspase activated DNase*, CAD) ist der Inhibitor einer Nuclease, CAD, die für die DNA-Fragmentierung mitverantwortlich ist. Unter nicht-apoptotischen Bedingungen ist der Inhibitor an CAD assoziiert. Durch die Caspase-vermittelte Proteolyse von ICAD wird CAD freigesetzt und transloziert in den Kern, um dort die intranucleosomalen Doppelstrangbrüche hervorzurufen [44,45].

Aber auch die Aktivierung von pro-apoptotischen Proteinen, wie den Caspasen selbst oder Mitgliedern der Bcl-Familie gehört zum Repertoire der Caspasen. So führt die Spaltung von Bid, einem pro-apoptotischen Mitglied der Bcl-Familie, zur Verstärkung des Zelltodsignals durch Verknüpfung des Rezeptor-vermittelten mit dem mitochondrial-vermittelten Signalweg der Apoptose [46,47]. Die Spaltung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> bringen pro-apoptotische Fragmente hervor, was eine positive Rückkopplung für den apoptotischen Prozeß bedeutet [48]. Eine Amplifikation des apoptotischen Signals durch Spaltfragmente wird ebenfalls erreicht wenn Bestandteile von Signalwegen, wie Mitglieder der MAP-Kinasen (MEKK1 [49]) oder Mitglieder der Protein-KinaseC (PKC $\delta$ ,  $-\zeta$ ,  $-\theta$ ) betroffen sind [50].

Caspasen tragen auch direkt zu den morphologischen Veränderungen apoptotischer Zellen bei, wie dies die Zerstörung der Lamina zeigt. Die Lamina besteht aus einem Kopf-zu-Schwanz-Polymer filamentöser Proteine, den Laminen. Sie bildet eine stabile Struktur unter der Kernmembran und unterstützt die Anordnung des Chromatins [22,51] [52]. Während der Apoptose werden die Lamine gespalten, was zum Zusammenbruch der Lamina führt und zur Kondensation des Chromatins beiträgt. Auch der Hauptbestandteil des Cytoskeletts, Actin, wird während der Apoptose gespalten [53,54].

Caspasen beeinflussen die Umordnung der Zellstrukturen auch über indirekte Wege: z.B. durch Spaltung von Regulatoren des Cytoskeletts, wie Gelsolin, „focal adhesion kinase“ (FAK), Fodrin und die p21-aktivierte Kinase2 (PAK2) [55,56].

## „In vivo“- Inhibitoren der Caspasen, CrmA, p35 und die IAPs

Die Regulation proteolytischer Kaskaden, wie z.B. der Blutgerinnung, wird zum Teil durch die direkte Interaktion von Inhibitoren mit den Proteasen gewährleistet [57]. Es ist nicht verwunderlich, daß dies auch für die Caspase-Kaskade gilt.

Bekannte Inhibitoren für Caspasen sind virale Proteine (CrmA und p35), aber auch zelleigene Faktoren, wie die ständig zunehmende Anzahl von Mitgliedern der IAP-Familie (*inhibitors of apoptosis*).

**CrmA** (*cytokine response modifier A*) ist ein Protease-Inhibitor des Kuhpockenvirus, der zur Familie der Serpine gehört [58]. Er erleichtert die Virusinfektion durch das Blockieren von Entzündungsreaktionen und der Apoptose seiner Wirtszelle. CrmA ist ein selektiver Inhibitor für Caspasen der Gruppen I und -III, den Aktivatoren, mit Ausnahme der Caspase-6. Dieses Inhibitionsprofil ist, verdeutlicht anhand der  $K_i$ -Werte, für rekombinante Caspasen in Tabelle 1.4 zusammengefaßt [39].

	Enzyme	$K_i$ [nM]
<b>Gruppe I</b>		
	Casp-1	0,01
	Casp-4	1,1
	Casp-5	<0,1
<b>Gruppe II</b>		
	Casp-3	1600
	Casp-7	>10000
	Casp-2	>10000
<b>Gruppe III</b>		
	Casp-6	1300
	Casp-8	<0,34
	Casp-9	2,3
	Casp-10	17

Tab.1. 4:  $K_i$ -Werte für rekombinante Caspasen und den viralen Inhibitor CrmA, aus [39]

Die Werte besagen, daß die Wirkung des Serpins für apoptotische Prozesse ausschließlich auf der Inhibition der Aktivator-Caspasen beruht. Diese erkennen seine Pseudosubstratsequenz -LAVD-, im Gegensatz zu den Mitgliedern der Gruppe II, den Effektoren, die DEXD als Substrat favorisieren. Unterschiedliche Untersuchungen haben gezeigt, daß die Wirkung des CrmA auch stark vom Stimulus der Apoptose abhängt. So inhibiert es stets eine Rezeptor-vermittelte Apoptose (Fas-, TNF Rezeptor1). Es verhindert abhängig vom Zelltyp den durch Entzug von Wachstumsfaktoren induzierten Zelltod [25,59] und selten nach Stimulation mit Chemotherapeutika wie Staurosporin [26, diese Arbeit, 60]. Für letztere wird ein Aktivierungsweg für Caspasen über Mitochondrien und der Komplexierung der Caspase-9

Tab.1.4), doch führt möglicherweise ihre Komplexierung und das Vorhandensein der Prodomäne *in vivo* zu einer Situation, die den Zugang des Inhibitors verhindert [39].

Das Baculovirus *Autographa californica* p35-Genprodukt inhibiert die Apoptose in Insekten, Nematoden und Säugern. Es besitzt vor allem die Fähigkeit, die Caspasen der Gruppe I und II zu inhibieren und damit die Apoptose nach den unterschiedlichsten Stimulationen zumindest zu verzögern. Das Wirkungsspektrum des Inhibitors scheint größer, als das des CrmA zu sein. Dies läßt auch seine Pseudosubstratsequenz (-DQMD-), die durch die Caspasen erkannt wird, vermuten [59,61,62].

Die Einleitung und Fortführung des apoptotischen Programms wird indes effizient durch Proteine der **IAP**-Familie gehemmt. Diese Familie enthält sowohl Mitglieder viralen Ursprungs, als auch aus Säugern selbst [59]. Sie zeichnen sich durch eine homologe BIR-Domäne (*baculovirus IAP repeat*) am N-Terminus aus, mit der sie eine begrenzte Auswahl an Caspasen binden und so inaktivieren können. Davon sind die Effektor-Caspasen-3 und -7 betroffen. XIAP, cIAP-1 und cIAP-2 scheinen den mitochondrial-vermittelten Weg zur Aktivierung der Caspase-9 durch die Bindung an den signalweiterleitenden multimeren Komplex (Apoptosom) zu blockieren [63]. Auch konnten cIAP-1 und cIAP-2 im multimeren Komplex der Rezeptoren der TNF $\alpha$ -Familie (DISC) nachgewiesen werden. IAPs werden durch Caspasen nicht gespalten. Sie inhibieren wohl durch direkte Wechselwirkung mit den Caspasen und nicht durch die Bereitstellung eines Pseudosubstrats [64].

### **Initiale Aktivierung der Caspasen-Kaskade**

Ein wichtige Frage in der Regulation der Apoptose stellt die initiale Aktivierung der Caspasen dar.

Bei Caspasen, wie auch bei manch anderen Proteasen, führt erst die limitierte Proteolyse des Zymogens zur Bildung des aktiven Enzyms. Die Expression von rekombinanten Caspasekonstrukten führt überraschenderweise, abhängig von den gewählten Bedingungen, zum Auftreten der zymogenen oder der prozessierten Form der Caspase, wie z.B. bei den Caspasen-3, -7 und -9 [34]. Die rekombinante Caspase-8 hingegen konnte immer nur in ihrer aktivierten Form exprimiert werden. Aus diesen Beobachtungen wurde eine unterschiedliche Grundaktivität, die Zymogenität der Procaspasen abgeleitet. Die Stärke dieser Aktivität

korreliert mit dem Vorhandensein großer Prodomänen und der Fähigkeit dieser Caspasen sich autokatalytisch „in trans“ zu aktivieren. Dies führte zur Entwicklung des Aktivierungsmodells der „induzierten Annäherung“ [30,65]. Dieses Modell beinhaltet die initiale Aktivierung von Caspasen der Gruppe III durch die Komplexierung ihrer Zymogene mittels der Prodomänen in multimeren Komplexen, im speziellen die Caspasen-8 und -9. Ihre Zymogene besitzen eine 1-10%ige Aktivität der prozessierten Form, die damit 100-1000fach höher ist, als die Zymogenität der Effektor-Caspasen [66]. Durch Gruppierung der Zymogene in einem Komplex wird diese Aktivität potenziert, wodurch es zu Autoproteolyse der Initiatoren und zur Aktivierung der Effektor-Caspasen kommt [67]. Für die Caspase-9 konnte durch die Komplexierung im Apoptosom (s. Kap. 1.3) ihre Aktivierung ohne Prozessierung nachgewiesen werden [29]. Der Mechanismus, der diese Aktivität zulässt, ist bislang noch unklar. Als negative Regulatoren der intrinsischen Aktivität der Gruppe III-Caspasen in diesem Modell wirken die IAPs. Sie kompensieren die Zymogenität bis zu einem Schwellenwert, der durch Komplexierung der Caspasen oder Prozessierung überschritten werden kann. Erst danach wird das proteolytische Signal an die Effektoren der Kaskade weitergeleitet.

### **Caspasen als Ziel therapeutischer Ansätze**

Eine fehlgeleitete Apoptose gehört ursächlich zu diversen menschlichen Krankheitsbildern [68-70]. Caspasen als zentrale Mediatoren des Zelltods stellen deshalb ein attraktives Ziel für therapeutische Ansätze dar.

Die gezielte Aktivierung von Caspasen bei Krankheiten mit ineffizienter Apoptose, wie z.B. bei Krebs, würde die systemische Behandlung mit Chemotherapeutika reduzieren können. So führte die Identifikation eines selektiven Oberflächenproteins von entarteten Zellen des Verdauungstraktes, CD55, zur Synthese eines spezifischen Antikörpers, SC-1. Die Behandlung mit diesem Antikörper induziert ein apoptotisches Signal in diesen entarteten Zellen und führt dort zur verstärkten Expression und Aktivierung der Caspasen. Erste klinische Studien erbrachten erfolgversprechende Ergebnisse [71,72]. Weiterhin wurden Caspasen als „Trojanische Pferde“ mittels Gentherapie gegen HIV-Infektionen eingesetzt. Ein Erkennungsmotiv für die HIV-Protease wurde an die Caspase-3 gekoppelt und ermöglicht so die Induktion des apoptotischen Programms in infizierten Zellen [73].

Die Blockierung von Caspasen durch synthetische Inhibitoren bei Krankheitsbildern mit überschießender Apoptose (u.a. neurodegenerative Krankheiten) scheint ein einfacheres therapeutisches Ziel zu sein. So konnte im Tiermodell der pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD(OMe)-CH<sub>2</sub>F bei der Vermeidung von Ischämie und Hypoxie bei Gehirnverletzungen und Transplantationen sowie bei Reperfusionsschäden erfolgreich eingesetzt werden [15]. Problematisch bleibt das richtige Zeitfenster und die Zielsicherheit für die Applikation des Inhibitors. Ein mögliches Lösungspotential liegt in der lokal begrenzten Gabe der Substanzen und in den diversen Studien über die Spezifität der Peptidinhibitoren und Inhibitoren viralen Ursprungs [39,61,64].

### 1.3 Die Bcl-Familie

Die 24 Mitglieder der wachsenden Bcl-2-Familie (s. Abb. 1.7) zeichnen sich durch die Verteilung von 4 homologen Regionen aus: BH1-4 (*Bcl-2 homology regions*) [43,74,75]. Unter ihnen gibt es anti- und pro-apoptische Vertreter, die sowohl als cytosolische als auch als membrangebundene Proteine auftreten.

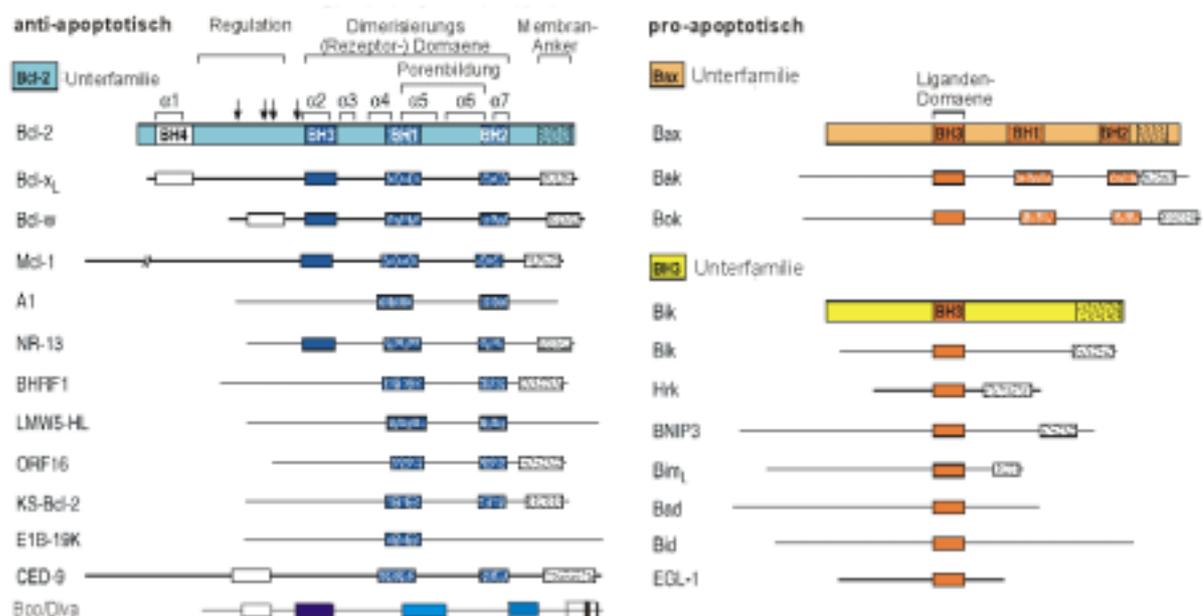


Abb.1.8: Die Bcl-2 Familie.

Es gibt drei Unterfamilien: Die Bcl-2 Gruppe fördert das Überleben und die Bax- und BH3- Gruppen sind proapoptisch. Die Bax-Gruppe ähnelt Bcl-2 bis auf die fehlende BH4-Domäne. Nur die BH3-Domäne weist eine signifikante Homologie der BH3-Gruppe zu Bcl-2 auf.

$\alpha$ 1-7 zeigen die Positionen der Helices in Bcl-xL an, die eine hydrophobe Bindegroße zur Dimerisierung bilden. Pfeile sind Ser- und Thr-Reste, die durch Phosphorylierung die Aktivität der Bcl-Proteine modulieren können. Alle aufgeführten Proteine sind aus Säugern (meist human) bis auf: NR-13 (Huhn), CED-9 und EGL-1 (*C. elegans*) und die viralen proteine BHRF-1, LMW5-HL, ORF16, KS-Bcl-2 und E1B-19K.

Für Bcl-2 und einige seiner Geschwister konnten drei generelle Funktionen aufgezeigt werden: a) Dimerisierung mit anderen Mitgliedern der Familie, b) Bindung nicht-homologer Proteine und c) Bildung von Poren [74,76,77]. BH1-3 Domänen sind essentielle Regionen zur Dimerisierung der Proteine. Insbesondere die BH3 Region ist zur Bindung an andere Mitglieder der Familie notwendig. So ist sie die minimale Homologie, die pro-apoptotische Mitglieder zu Bcl-2 aufweisen und scheint essentiell für ihre apoptose-induzierende Wirkung zu sein. Die dreidimensionale Struktur des Bcl-x<sub>L</sub> zeigt seine Ähnlichkeit zu Diphtherietoxin und Colicin, beides porenbildende Proteine [78]. Die Bildung von Poren in der Membran der Mitochondrien kann je nach Art des Bcl-Proteins den Efflux von Ionen und damit das Membranpotential,  $\Delta\psi_M$ , und den Efflux von pro-apoptotischen Faktoren wie Cytochrom c und AIF (*apoptosis inducing factor*) regulieren [79-83]. Dies kann direkt, wie im Fall des pro-apoptotischen Bax, aber auch indirekt durch den Einfluß von Bcl-2 und Bid auf den sog. „permeability transition pore complex“ geschehen [84] [85,86].

Einen direkten Einfluß von Bcl-2 auf die Aktivierung von Caspasen wurde durch eine Heterodimerisierung mit dem multimeren Aktivator-Komplex, dem Apoptosom durch Überexpression der Proteine postuliert [87]. Dies konnte „*in vivo*“ aber widerlegt werden. Weder Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, A1, Mcl-1 noch Boo konnten im Komplex mit dem Apoptosom oder einem seiner Bestandteile nachgewiesen werden [88].

Für die Regulierung der Bcl-Proteine gibt es zahlreiche Beispiele [89]. Gut untersucht ist die negative Regulation des Bcl-2 durch Bad. Unter physiologischen Bedingungen wird bei Stimulation durch Wachstumsfaktoren ein Signalweg über die PI-3Kinase (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und Akt/PKB aktiviert. Die Phosphorylierung von Bad führt zu dessen Assoziation an das cytosolische Protein 14-3-3. Bei Entzug von Wachstumsfaktoren entfällt diese Phosphorylierung. Bad kann dadurch an das mitochondrial-verankerte Bcl-2 binden und inhibiert dessen anti-apoptotische Wirkung. Die Phosphorylierung des Bad an Ser136 und Ser112 kann *in vivo* durch Akt/PKB direkt oder durch eine mitochondrial-verankerte cAMP-abhängige PKA (Protein Kinase A) an Ser112 vermittelt werden [90-93].

## 1.4 Die Kaskade des apoptotischen Signals

Initiator-Caspasen können durch vielfältige pro-apoptotische Signale aktiviert werden. Im wesentlichen wurden bislang zwei Caspase-Kaskadenmodelle für Säuger entwickelt (s. Abb.1.8).

Im ersten Signalweg, dem Rezeptor-vermittelten oder extrinsischen Weg, wird die Caspase-8 durch Adaptorproteine an einen trimeren Rezeptorkomplex der TNF $\alpha$ -Familie gekoppelt [94,95]. Diese Adapterproteine, ebenso wie der cytosolische Teil der Rezeptoren zeichnen sich durch das Vorhandensein homologer Regionen aus, den sog. „*Death Domains*“ (DD). Nach Trimerisierung des Rezeptors durch seinen Liganden, binden die Adaptoren TRADD u.o. FADD (*TNF-receptor associated, Fas associated death domain protein*) [96] an den Rezeptor und rekrutieren über eine weitere homologe Domäne, der sog. „*Death Effector Domain*“ die pro-Caspase-8 in den Komplex, der als „*Death Receptor Induced Signaling Complex*“ (DISC) bezeichnet wird [21,97,174]. Die Komplexierung der Zymogene führt dann zu deren proteolytischer Aktivierung und Freisetzung vom Komplex.

Der zweite, der mitochondrial-vermittelte oder intrinsische Weg, wird durch Signale von außen oder vom Inneren der Zelle aktiviert. Er beinhaltet die Aktivierung der Caspase-9 in einem multimeren Komplex. Bei der Behandlung mit Chemotherapeutika, Induktion von Stress oder Entzug von Wachstumsfaktoren kommt es zum Efflux von pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien, wie dem Cytochrom c, dATP und AIF (*apoptosis inducing factor*) [98] noch vor dem Zusammenbruch des Membranpotentials [79,81,83,99]. Dieser Efflux wird womöglich durch die Deregulation anti-apoptotischer Funktionen von Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub>- ermöglicht und/oder ist auf die Aktivierung pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie Bax und Bad, zurückzuführen.

Cytochrom c und dATP gehen mit dem cytosolischen Protein Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) unter Hydrolyse von dATP zu dADP einen Komplex ein [160,101,20,14,134]. Dieser Komplex, das Apotosom, besteht aus je 8 Molekülen jeder Komponente und wird über homologe Motive des Apafs, die sog. WD40-Wiederholungen, stabilisiert. Die Rekrutierung der pro-Caspase-9 in den Komplex erfolgt über die homologen CARDS (*caspase recruitment domains*), die im Propeptid der Caspase-9 und in Apaf-1 vorzufinden sind [100,101]. Aus dem Apotosom kommt es danach zur Freisetzung der aktivierten Caspase-9. Die Regulation der Bildung des Apotosoms durch die Assoziation an Bcl-x<sub>L</sub> oder Boo, beides anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie, konnte bisher nur *in vitro* nicht aber *in vivo* gezeigt werden [87,88]. Für die humane Caspase-9 konnte eine

werden. Der murinen Caspase-9 fehlen jedoch die vergleichbaren Phosphorylierungsstellen [102,103].

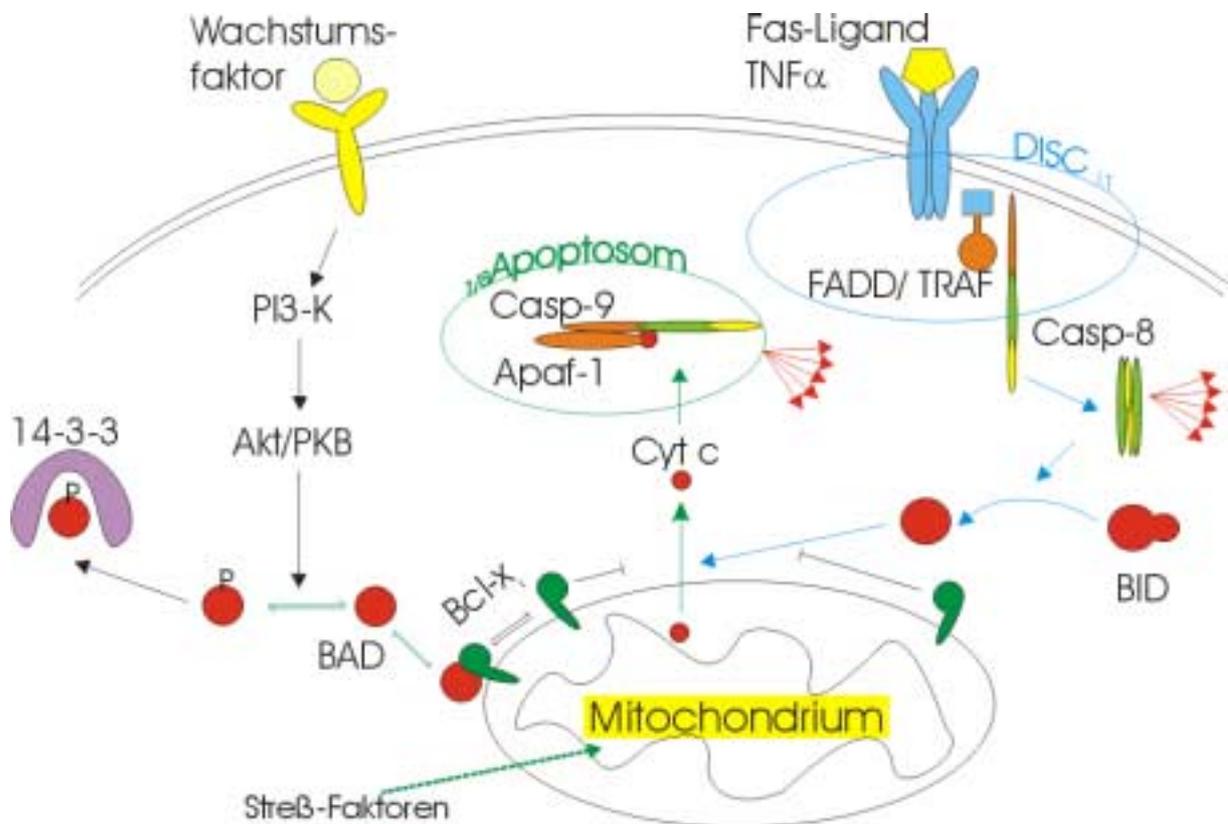


Abb.1.9: Signalwege der Apoptose. Wachstumsfaktoren inhibieren den Efflux des Cytochrom c und somit die Bildung des Apoptosoms. Streß-Faktoren induzieren den mitochondrial-vermittelten Weg (grüne Pfeile). Rezeptoren der TNF $\alpha$ -Familie fördern die Bildung eines DISC und die Aktivierung der Casp-8, -2, -10 (blaue Pfeile). BID verbindet beide Wege. Nach der Aktivierung der Initiator-Caspasen geben diese das Signal an Effektor-Caspasen weiter (rote Pfeile).

i.T.= in Teilen: der DISC besteht noch aus weiteren Komponenten.

1/8 Apoptosom = der Komplex ist 8zählig.

Die so aktivierten Initiator-Caspasen spalten und aktivieren ein überlappendes Set an Effektor-Caspasen, wie die Caspasen-3 und -7 aber auch die Caspase-6. Diese sind wiederum fähig, die Initiator-Caspasen beider Wege in einer Art positiven Rückkopplung zu prozessieren und die Kaskade so zu vervielfältigen [14]. Daneben wird durch die Caspase-8 Bid, ein Mitglied der Bcl-2-Familie, gespalten. Es aktiviert den mitochondrial-vermittelten Weg durch den Efflux an Cytochrom c. Es verbindet somit beide Wege und verstärkt das apoptotische Signal [47]. Erwähnenswert ist außerdem, daß das Apoptosom auch ohne Prozessierung der Caspase-9 Effektor-Caspasen aktivieren kann [29].

Auch gibt es Hinweise für Caspase-unabhängige Apoptose-Signalwege. So führt nicht in jeden Fall die Behandlung mit Caspase-Inhibitoren zum Ausbleiben der apoptotischen Morphologie. Wenn auch die oligonucleosomale DNA-Fragmentierung und das Schrumpfen

bei solchen Zellen fehlt, so ist in manchen Fällen trotzdem die Kondensation des Chromatins, das Auftreten des Phosphatidylserins an der Außenseite der Cytoplasmamembran und die Hydrolyse der DNA in große Fragmente der Größe um 50-150kB zu finden [104,105]. Eine entscheidende Rolle hierbei spielen Caspase-unabhängige Faktoren wie der AIF (*apoptosis inducing factor*), der mit dem Cytochrom c aus den Mitochondrien geschleust wird [106]. Die Überexpression dieses Faktors führt zu den obengenannten apoptotischen Veränderungen auch unter Behandlung mit Caspase-Inhibitoren. Ebenso induzieren pro-apoptotische Faktoren wie Bax bei Überexpression den Zelltod von Caspase-freien Organismen, wie *Saccharomyces cerevisiae* und eine apoptotische Morphologie bei höheren Organismen [43].

### **1.5 Das Zelltodmodell der AKR 2B-Mausfibroblasten**

AKR 2B-Mausfibroblasten stellen eine mehrfach subklonierte Zelllinie dar. Diese Zellen erreichen nach fünftägigem Wachstum eine konfluente Schicht. Durch Serumentzug sterben etwa 40-50% der Kultur nach einer 90minütigen Latenzzeit innerhalb von 6h ab. Die überlebenden Zellen können ohne ein weiteres Sterben unter serumfreien Bedingungen noch mindestens weitere 48h kultiviert werden [107,108]. Unter morphologischen Gesichtspunkten zeigt der Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten typische apoptotische Veränderungen, wie das Bläschenbilden der Cytoplasmamembran, Kondensieren des Chromatins und das Auftreten von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Cytoplasmamembran. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß es zum Schwellen der Mitochondrien und abschließend zu ihrer Schädigung kommt. Durch Videomikroskopie konnte gezeigt werden, daß das Sterben einer individuellen Zelle schon sehr schnell, nach  $80 \pm 20$ min, abgeschlossen ist. Der ATP-Gehalt der intakten Zellen bleibt über diesen Zeitraum, mit etwa 6mM, konstant hoch. Jedoch ist eine Veränderung im Membranpotential der Mitochondrien,  $\Delta\Psi_m$ , nicht festzustellen, ebenso fehlt die internucleosomale DNA-Fragmentierung. Als finaler Schritt des Zelltods kommt es in AKR 2B-Mausfibroblasten zur Ruptur der Cytoplasmamembran, d.h. die gestorbenen Zellen zerfallen weder in sog. apoptotische Körperchen noch werden sie durch überlebende Zellen aufgenommen, sondern enden nekrotisch [107].

Während der 90minütigen Latenzzeit können die AKR 2B-Mausfibroblasten durch die Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen vor dem Tod bewahrt werden. Die protektive Funktion von cAMP konnte durch die Verwendung von 8Br-cAMP und Forskolin gezeigt werden. Die durch den Phorbolster TPA aktivierten Isoformen der Proteinkinase C schützten

ebenso vor dem Zelltod wie PDGF BB. Diese Substanzen stimulieren unterschiedliche Wege und Mechanismen zum Schutz der Zellen. So ist der langfristige Schutz (24h) durch 8Br-cAMP und Forskolin unabhängig von der Proteinbiosynthese, wohingegen die durch TPA und PDGF BB vermittelte Protektion durch den Inhibitor der Proteinbiosynthese Cycloheximid aufgehoben werden kann. Detaillierte Untersuchungen unterschiedlicher Signalwege zeigte, daß keine Vernetzung der PDGF BB- und cAMP-aktivierten Signalwege in ihren frühen Stadien in AKR 2B-Mausfibroblasten besteht [109,110]. Ein protektiver Konvergenzpunkt dieser Wege muß also vor oder innerhalb des apoptotischen Programms in AKR 2B-Mausfibroblasten existieren.

Die Aktivität von Phosphatasen während einer Apoptose konnte durch die Dephosphorylierung des Rb-Proteins nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Ser-/Thr-Phosphataseinhibitor führte zum Ausbleiben dieser Dephosphorylierung und zum Überleben der Zellen [111]. Auch AKR 2B-Mausfibroblasten lassen sich durch Okadainsäure, einem solchen Inhibitor, vor dem Zelltod schützen. Die Regulation des Zelltods in AKR 2B-Mausfibroblasten unterliegt deshalb möglicherweise der Aktivität von Phosphatasen. So konnten auch durch die Methode des sog. „*Differential Display*“ unter Verwendung von Phosphatase-spezifischen Primern differentiell während Serumentzug exprimierte Gene isoliert werden [112]. Der Inhibitor der Actinpolymerisation Colchicin führt zum initialen Zusammenbruch des Cytoskeletts und erstaunlicherweise zum Ausbleiben des Zelltods in AKR 2B-Mausfibroblasten.

ATP und Adenosin sind ebenfalls fähig AKR 2B-Mausfibroblasten unter Serumentzug zu schützen. ATP stimuliert die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Kompartimenten und Adenosin die Bildung von cAMP. Die  $Ca^{2+}$ -Konzentration bleibt von Adenosin unbeeinflusst, wohingegen ATP den cAMP-Spiegel senkt. Diese Substanzen stimulieren demnach unabhängige Schutzmechanismen [113].

AKR 2B-Mausfibroblasten stellen durch ihr reproduzierbares und im Vergleich außergewöhnliches Verhalten nach Serumentzug ein gutes Modell zur Bestimmung von Signalwegen der Regulation und Weiterleitung des apoptotischen Programms dar.

## 1.6 Die Zielsetzung

Der apoptotische Zelltod ist eindeutig durch sichtbare morphologische Veränderungen sterbender Zellen zu erkennen. Diese charakteristischen Veränderungen sind aber das Ergebnis zahlreicher vorangegangener biochemischer Prozesse. Bestandteil und Steuerelement dieser Prozesse sind für die Apoptose typische Signalwege. Die Zusammensetzung dieser aktivierten Kaskaden wird durch den Stimulus und den Zelltyp bestimmt. So beinhaltet die Induktion des Zelltods über membrangebundene Rezeptoren z.B. andere Komponenten als der Zelltod, der durch Streßfaktoren über Mitochondrien ausgelöst wird. Das Wissen um die Komponenten dieser Wege und die Regulation ihrer Aktivierung ist die Grundlage für ein weitreichendes Verständnis des apoptotischen Programms.

Die beim Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten auftretenden morphologischen Veränderungen sind gut beschrieben. Durch den Entzug des Serums wird in diesen Zellen ein Zelltodprogramm gestartet, das zu den morphologischen Charakteristika der Apoptose, wie Chromatinkondensation und „blebbing“, führt. Die weitgehend unkomplizierte Handhabung dieser Zelllinie ermöglicht ihre Kultivierung auch in großen Mengen. Beides bietet die günstigste Grundlage für die Bestimmung biochemischer Merkmale und apoptotischer Signalwege in diesen Zellen. Darüberhinaus läßt das interessante Phänomen, daß 50% der Zellen den induzierten Tod überleben, auf Regulationsmechanismen schließen, die das apoptotische Programm steuern.

Die Ursache der morphologischen Phänomene, welche in apoptotischen AKR 2B-Mausfibroblasten auftreten, sollen aufgeklärt und interpretiert werden. Genauer bedeutet dies, daß diese morphologischen Veränderungen auf die Regulation von Proteinaktivitäten zurückgeführt werden sollen.

Zu diesem Zweck werden die Hauptmediatoren der apoptotischen Signalwege, die Caspasen, genauer betrachtet. Dazu soll die Expression von mRNA dieser Protease-Familie analysiert, sowie die Präsenz der Caspasen auf Proteinebene untersucht werden. Wichtiges weiteres Ziel ist es, die Aktivierung dieser Proteasen zu charakterisieren und ihre Bedeutung im Zelltod der Fibroblasten zu werten.

