

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte die essentielle Beteiligung von Caspasen im Zelltodmodell der AKR 2B-Mausfibroblasten nachgewiesen und ihre Aktivitäten charakterisiert werden.

AKR 2B-Mausfibroblasten stellen eine subklonierte und gut charakterisierte Zelllinie dar, in der durch Entzug des Serums der Zelltod induziert wird. Während des Zelltods sterben innerhalb von 6h etwa 50% einer dichtearretierten Kultur. Die überlebenden Zellen bleiben von diesem Mangelzustand für mindestens weitere 48h unbeeinflusst, benötigen aber zum Überleben eine Proteinneusynthese. Der Zelltod zeigt für eine Apoptose typische morphologische Veränderungen der Zelle, obwohl apoptotische Charakteristika, wie die oligonukleosomale Fragmentierung der DNA oder die Aufnahme der zerfallenen Zelle durch benachbarte Zellen, ausbleiben.

Mittels unterschiedlicher Methoden konnte die Expression von mRNA aller für den apoptotischen Prozeß bekannten relevanten Caspasen in den AKR 2B-Mausfibroblasten nachgewiesen werden. Die Caspasen-1, -2, -3, -6 und -9 liegen in ihrer zymogenen Form konstitutiv in den Zellen vor. Mit Ausnahme der Caspase-9 konnte die durch Serumentzug induzierte Spaltung dieser Caspasen in Untereinheiten und somit ihre Aktivierung nicht detektiert werden. Die wesentliche Beteiligung dieser Cystein-Proteasen wurde jedoch durch den protektiven Effekt spezifischer Inhibitoren und den Nachweis ihrer spezifischen Aktivität bestimmt. Die Charakterisierung dieser enzymatischen Aktivitäten lieferte Hinweise zur Identität der aktivierten Caspasen. Neben einer konstitutiven VEIDase- und IETDase-Aktivität wird 3h nach Entzug des Serums eine DEVDase maximal aktiviert. Das Gemisch an Caspase-Aktivitäten wird durch eine DEVDase dominiert. Diese Aktivität wird zum größten Teil durch nur ein Enzym gestellt, wie durch eine Affinitätsmarkierung und 2D-Gelelektrophorese gezeigt wurde. K_M - und K_i -Wert-Bestimmungen der DEVDase deuten darauf hin, daß dieses Enzym typische Effektoreigenschaften, wie die der Caspase-3, besitzt. Daneben werden Lamine während des Zelltods in AKR 2B-Mausfibroblasten abgebaut, was auf eine aktivierte Caspase-6 hinweist. Die enzymatischen Charakteristika dieser Protease weichen aber von den in AKR 2B-Mausfibroblasten festgestellten Werten deutlich ab, so daß man ihr nur eine untergeordnete Rolle im Caspasen-Gemisch zuordnen kann. Eine mehrfach chromatographische Reinigung der Aktivität bietet die beste Grundlage für eine anschließende Sequenzierung der Caspase mit dem Ziel ihrer Identifizierung.

Durch die Expression des viralen Caspase-Inhibitors CrmA konnte eine tragende Rolle der

Programms in AKR 2B-Mausfibroblasten ausgeschlossen werden. Gleiches gilt für den mitochondrial-vermittelten Weg, für dessen Beteiligung, bis auf die Spaltung der Caspase-9, keine Hinweise vorliegen. Der Weg, der zur Aktivierung der DEVDase führt, ist Ziel gegenwärtiger Untersuchungen. Substanzen, die Signalwege aktivieren (PDGF-BB, TPA, Forskolin und 8Br-cAMP) oder auch Substanzen, deren Verbindung zu Signalwegen noch weitgehend offen ist, schützen die Zellen vor dem Zelltod. Der protektive Effekt dieser Signalwege konzentriert sich in einem Konvergenzpunkt, der auf noch unbekannt Weise die Aktivierung der Effektor-Caspasen blockiert. Die Identität dieses Konvergenzpunktes und des von ihm ausgehenden protektiven Weges ist Ziel weiterer Untersuchungen. So ist es möglicherweise dieser Weg, der zum Überleben von 50% der AKR 2B-Mausfibroblasten während des Serumentzugs wesentlich beiträgt.

6 Summary

In the work presented here, the essential involvement of caspases in the cell death of AKR 2B-fibroblasts could be proved as well as their activities could be characterized.

Confluent AKR 2B-fibroblasts, a good characterized and subcloned cell line, rapidly disintegrate after serum deprivation. Dying of the cells ceases after 6 hours with a survival of 50%. These surviving cells remain unaffected for additional 48 hours which is dependent on neo-protein biosynthesis. During cell death AKR 2B-fibroblasts show morphological changes characteristically for apoptosis, even though typical features like oligonucleosomal DNA fragmentation is absent.

Using different approaches the expression of mRNA of all known caspases, which are believed to be involved in apoptosis essentially, was successfully detected in AKR 2B-fibroblasts. Caspases-1, -2, -3, -6 and -9 were constitutively expressed as zymogens. With the exception of Caspase-9, the processing into their active subunits induced by serum removal could not be detected. At least their considerable importance during cell death of AKR cells could be proved by using specific caspase inhibitors and by determination of their specific activity. The characterization of that activity gave some hints for the identity of activated caspases. Beside constitutive VEIDase and IETDase activities, a DEVDase reaches its maximum 3 hours after the onset of apoptosis. The present mixture of caspase activity is dominated by this DEVDase, which seems to be represented by just one enzyme, as shown by affinity labeling and 2D-SDS-PAGE. Determinations of K_M - and K_I -values lead to the conclusion, that this enzyme has typical effector caspase characteristics, like caspase-3. Cleavage of lamins during cell death of the fibroblasts indicate that a caspase-6 became active. However, the known characteristics of caspase-6 are different of that found in AKR 2B cells, so that it may play just a minor role in the caspase mixture. Established repeated purification steps by chromatography, offers best conditions for protein sequencing and identification of the active caspase.

The involvement of the receptor mediated pathway could be excluded by an overexpression of CrmA, a cowpox virus derived Caspase inhibitor; also there are no hints for an involvement of the mitochondria mediated pathway, except of caspase-9 cleavage. Pathways which lead to DEVDase activation are of major interests in present and future. Stimulation of signal pathways by PDGF-BB, TPA, Forskolin and 8Br-cAMP and others agents protect the fibroblasts from death. The stimulated pathways converge in one point up stream of effector-caspase activation. The identification of this point and its regulatory properties is a future goal, which will maybe lead to an understanding of processes responsible for surviving of