

6. Zusammenfassung

Caspasen gehören zur Familie der Cystein-Proteasen und spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Apoptose. Bisher wurden drei Haupt Signalwege für die Spaltung und die damit verbundene Aktivierung von Effektor-Caspasen während der Apoptose identifiziert: A) Ein Rezeptor-vermittelter Signalweg über Caspase-8 unter Ausbildung eines „Death Inducing Signalling Complexes (DISC)“, B) Ein Signalweg über die Mitochondrien in welchem Cytochrom c, Apaf-1 und Caspase-9 miteinander wechselwirken und einen Caspase-aktivierender Komplex bilden (Apoptosom), C) Ein Endoplasmatisches Reticulum spezifischer Signalweg in dem Caspase-12 infolge von ER-Stress aktiviert wird.

Der Zelltod kann in Dichte-arretierten AKR-2B Mausfibroblasten durch Entzug des Serums oder Behandlung mit Anisomycin induziert werden. Der Zelltod zeigt zwar die für die Apoptose typischen morphologischen Veränderungen der Zelle wie Zellfragmentierung und Chromatinkondensation jedoch fehlen andere apoptotische Charakteristika, wie die oligonukleosomale Fragmentierung der DNA oder Änderung des Membranpotentials der Mitochondria. Während der Apoptose wurde eine beachtliche DEVDase Aktivität nachgewiesen, die einem einzelnen Enzym zugeordnet werden konnte. Dieses Enzym hatte typische Eigenschaften von Effektor-Caspasen, wie die der Caspase-3, besaß jedoch einen ungewöhnlich hohen K_M Wert von 100 μM , und die Molmasse der großen Untereinheit betrug 19 kDa anstelle der erwarteten 17 kDa. Mit Hilfe des rekombinanten mCaspase-3 Proteins wurde dieses Enzym in der vorliegenden Untersuchung als Caspase-3 identifiziert. Die N-terminale Sequenzierung des mCaspase-3 Proteins ergab, daß sich die Spaltstelle seiner Prodomäne von der des humanen homologen Proteins unterschied (Asp-9 von Asp-28). Somit betrug die Molmasse der großen Untereinheit der aktiven Caspase-3 19 kDa. Darüberhinaus stimmte der K_M -Wert der rekombinanter mCaspase-3 von $\sim 100 \mu\text{M}$ mit der überein, die in Zellextrakten bestimmt wurde. Die Affinitätsmarkierung in Kombination mit einer 2D-Gelelektrophorese bestätigte, daß tatsächlich Caspase-3 als Haupt-Effektor-Caspase in AKR-2B-Zellen während der Apoptose aktiviert wird.

Im Folgenden wurde untersucht, welcher Signalwege in AKR-2B-Zellen, denen Serum aus dem Nährmedia entzogen wurden war oder die mit Anisomycin behandelt worden waren, zur Aktivierung der Caspase-3 führt. Da eine Beteiligung des Rezeptor-vermittelte Signalweges bereits zuvor ausgeschlossen worden war [129], wurde überprüft, ob der mitochondrial vermittelte Signalweg bei der Aktivierung von Caspase-3 ein Rolle spielt. Gelfiltrations-

experimente ergaben, daß Caspase-3 als freies Enzym und nur in geringen Mengen innerhalb unterschiedlich große Komplexe der Molmassen 600 kDa und 250 kDa eluiert wird. Obwohl die apparenten Molmassen der Caspase-3-haltigen Komplexe mit kürzlich veröffentlichten Daten übereinstimmten, enthielten sie weder Apaf-1 noch Caspase-9. Dies deutet daraufhin, daß der mitochondrial-vermittelte Signalweg ebenfalls nicht an der Caspase-3 Aktivierung beteiligt ist. Somit wird caspase-3 durch einen unbekanntem Signalweg während der Apoptose aktiviert. Darüberhinaus wurde ein neuer Caspase-6 enthaltender Komplex (450 kDa) nach Serumentzug in AKR-2B-Zellen gefunden, der sich deutlich von Caspase-3 haltigen Komplexen unterscheidet.

Caspase-3 ist für die meisten morphologische Veränderungen während der Apoptose verantwortlich. Eine davon ist die intranukleosomale Fragmentierung. Da bei der Apoptose der AKR-2B-Zellen zwar Caspase-3 als Haupt-Effektor-Caspase identifiziert worden war, jedoch keine intranukleosomale Fragmentierung nachgewiesen werden konnten, wurde die intrazelluläre Lokalisation der Caspase-3 untersucht. Durch Überexpression eines Caspase-3-GFP Fusionskonstruktes in AKR-2B Zellen wurde die Procaspase-3 im Cytoplasma lokalisiert, während die aktive Caspase-3 vorwiegend in membranumhüllten Vesikeln und zum Teil im Cytoplasma aktiviert wurde. Es konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Aktive Caspase-3 nicht im Kern lokalisiert war. Diese Daten geben einen ersten Hinweis auf den Mechanismus des Zelltods der AKR-2B Zellen, da sie zeigen daß eine Aktivierung von Caspase-3 an der Cytoplasmembran erfolgt.

Ebenfalls wurde eine mögliche Beteiligung von Caspase-12 und eine ER-Streß vermittelte Signalleitung an der Apoptose in AKR-2B-Zellen untersucht. Kinetische Untersuchungen zeigten, daß Caspase-12 im Fall von Serumentzug oder Behandlung mit Anisomycin zeitgleich mit Caspase-3 aktiviert wurde, was zur Bildung von zwei Spaltprodukte der Molmassen 47 kDa und 35 kDa führte. Dazu wurde untersucht, ob diese beiden Caspasen in der selben Komplex eluiert wurden. Gelfiltrationsexperimente ergaben, daß Caspase-12 als freies Enzym während der Apoptose auftritt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde in allen Publikationen beschrieben, daß Caspase-12 in Folge von ER-Streß aktiviert wird. Nach Serumentzug oder Zugabe von Anisomycin zu AKR-2B-Zellen wurde jedoch kein Anstieg der Synthese des Chaperon-Proteins Grp78, einem Marker für ER-Streß, beobachtet. Dies zeigt, daß beide Behandlungen nicht zur ER-Streß führen. Im Gegensatz dazu erzeugten bekannte Indikatoren von ER Streß wie Thapsigargin und A23187 (ionophor) ER-Streß in AKR-2B-Zellen, was zu unspezifischem Abbau der Caspase-12 führte. Darum ist es

unwahrscheinlich, daß in AKR-2B- Zellen Caspase-12 bei ER-Streß aktiviert wird. Allerdings wurde Caspase-12 nach der *in vitro* Zugabe rekombinanter Caspase-3 zu cytosolischen Extrakten ähnlich wie *in vivo* in Fragmente der Molmassen 47 kDa und 35 kDa gespalten. Zusammenfassend zeigten diese Daten, daß Caspase-12 in AKR-2B-Zellen über Signalwegen aktiviert wird, die ER stress un- abhängig sind und zeigen daß Caspase-3 bei der Aktivierung von Caspase-12 beteiligt ist somit liefern die vorliegenden Untersuchungen einen Hinweis darauf daß neben den klassischen Signalwege weitere Signalwege existieren, die zur Apoptose führten.