

5 Diskussion

5.1 AKR 2B-Mausfibroblasten als Zelltodmodell

Dichtearretierte Fibroblasten, wie Balb/c-3T3 oder AKR 2B-Zellen, sterben während des Entzugs von Serum. Beide Zelllinien zeigen dabei für eine Apoptose typische morphologische Veränderungen wie z.B. die Kondensation des Chromatins. Sie sterben aber letztendlich dafür untypisch an dem Zusammenbruch der Integrität ihrer Cytoplasmamembran [107,109,145,146]. In beiden Fällen ist das Zellsterben nach etwa 5-6 Stunden abgeschlossen und hinterläßt einen Anteil an überlebenden Zellen (10-20% Balb/c-3T3 und 50% AKR 2B). Untersuchungen haben gezeigt, daß eine Voraussetzung für das Überleben dieser Zellen eine Proteinneusynthese ist [110,143].

Durch ihre unkomplizierte Handhabung und durch das ungewöhnliche differentielle Verhalten der Gesamtpopulation während des Zelltods stellen die AKR 2B-Mausfibroblasten eine interessante Grundlage für die Erforschung der Apoptose und ihrer Regelmechanismen dar. In der vorliegenden Arbeit sollte das Modell des Zelltods dieser Zelllinie unter besonderer Berücksichtigung der Caspasen untersucht werden. Damit wurde eine Basis für zukünftige Studien zum Verständnis von Regelmechanismen, die den Zelltod vorantreiben oder zum Überleben führen, geschaffen.

5.2 Caspasen im Zelltodmodell der AKR 2B-Mausfibroblasten

5.2.1 Nachweis der Caspasen

Durch molekularbiologische Untersuchungen konnten alle für die Apoptose relevanten Caspasen in AKR 2B-Mausfibroblasten nachgewiesen werden. Der Nachweis der RNA-Spezies durch RT-PCR fiel zunächst durch ungenügende Sequenzinformationen für murine Caspasen schwer und war nur für die murine Caspase-2 und -1 möglich (s.Abb.4.8). Ein niedriges Expressionsniveau der Caspasen ist möglicherweise für die fehlende Amplifikation der anderen Caspasen verantwortlich. Dieses niedrige Expressionsniveau machte die Reinigung von RNA zu polyA⁺-RNA notwendig. Northern Blot-Untersuchungen mit Sonden aus der humanen Zelllinie Jurkat erbrachten den Nachweis von Transkripten der Caspase-1, -2, -3, -8 und -10 (s. Abb.4.9). Der fehlende Nachweis für die Caspasen-4, -6, -7 und -9 kann ebenfalls ursächlich an ihrem niedrigen Expressionsniveau oder an einer unzureichenden

Bindung der Sonden liegen. So sind die Signalstärken der Hybridisierungen mit der KontrollpolyA⁺-RNA aus Jurkat in diesen Fällen ebenfalls sehr schwach. Auch stellt die Wahl von Sonden humanen Ursprungs trotz ihrer Sequenzhomologie von 85% bis 95% zu Maussequenzen keine optimalen, wenngleich doch ausreichende, Voraussetzungen dar.

Letztendlich konnten die fehlenden Caspasetranskripte mittels eines Nuklease-Protektionsassays in AKR 2B-Mausfibroblasten durch kommerzielle sowie selbst hergestellte Sonden identifiziert werden (s.Abb.4.12). Ausnahmen stellen hierbei die Caspasen-4, -5 und -14 dar. Die Caspasen-4 und -5 sind Mitglieder der ICE-Unterfamilie. Ihnen wird keine Funktion im apoptotischen Programm zugeordnet [15,56]. Zudem ist die Caspase-12, die vermutlich das murine Homolog zur humanen Caspase-4 darstellt, in AKR 2B-Mausfibroblasten nachweisbar. Die Caspase-14 wird in den Fibroblasten, wenn überhaupt, nur in sehr geringem Maße exprimiert, was aus der geringen Bandenintensität unter Verwendung der selbst hergestellten Sonde und auch durch den fehlenden Nachweis mittels der kommerziellen Sonde abzuleiten ist. Die Funktion der nur in embryonalem Gewebe exprimierten Caspase-14 ist unklar. Nach einem apoptotischen Stimulus wird sie weder prozessiert, noch ist sie in der Lage Effektor-Caspasen zu aktivieren [132,133]. Aus diesen Gründen wurde darauf verzichtet, die Expression dieser Caspasen weiter zu untersuchen.

Durch Western Blot konnte keine Prozessierung der untersuchten Caspasen-1, -2, -3 und -6 während des Serumentzugs, d.h. ihre Aktivierung durch Spaltung in Untereinheiten, gefunden werden (s.Abb.4.14-4.17 und Abb.4.23). Die verwendeten Antikörper oder Antiseren für die Caspasen-1, -2 und -3 sind prinzipiell in der Lage Spaltprodukte dieser Proteasen zu detektieren. Dies konnte durch BrCN-Spaltungen gezeigt werden (s. Abb.4.13). Außerdem lassen dies auch die Herstellerangaben für die Antikörper für die Caspasen-6 und -9, und ein Sequenzvergleich vermuten [147]. Man kann bei einer BrCN-Spaltung aber nicht völlig ausschließen, daß neue Epitope an den gespaltenen Proteinen entstehen. Die zur Spaltung verwendeten Proben enthielten neben den Caspasen auch andere Proteine, so daß auch „Falsch-Positive“ entstehen könnten, die durch die Antikörper erkannt wurden. Eine Erklärung für den fehlenden Nachweis prozessierter Caspasen kann unter Umständen in ihrem niedrigen Expressionsniveau zu finden sein. Da dieses Niveau auch auf Proteinebene im Vergleich zu Ba/F3-Zellen niedrig erscheint, stieß die Detektion des Western Blots möglicherweise auf Grenzen. Würde nur ein Teil der entsprechenden Caspasenpopulation aktiviert, so könnte das Auftreten der kleinen Untereinheiten undetektierbar bleiben. Dagegen sprechen Western Blot-Untersuchungen von Fraktionen eines Anionenaustauschers. Hier konnten die aktivierten Spaltprodukte nicht nachgewiesen werden, obwohl die

unprozessierten Caspasen mit einem intensiven Signal detektiert wurden (s.Abb.4.23). Es bleibt zu vermuten, daß es zu keiner Prozessierung dieser Caspasen in AKR 2B-Mausfibroblasten kommt.

Die fortschreitende Publikation muriner Caspase-Sequenzen und die Verwendung neuerer getesteter Antikörper für murine Caspasen sollte für die Zukunft eine bessere Basis zur Identifikation der Caspasen-Population und ihrer Aktivierung in AKR 2B-Mausfibroblasten bieten.

5.2.2 Enzymatische Aktivität der Caspasen

Ein gängiges und spezifisches Mittel zum Nachweis von Caspasen in Apoptosemodellen ist die Verwendung von Peptidinhibitoren [21,39,61,128,129].

Caspase-Inhibitoren schützen vorm Zelltod

Durch den Einsatz von Tetrapeptidinhibitoren konnte die Beteiligung von Caspasen im Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten nach Serumentzug in der vorliegenden Arbeit belegt werden (s.Abb. 4.1). Um die Aufnahme der Inhibitoren durch die Zellen zu erleichtern, wurden sie in serumfreiem Medium mittels eines kurzfristigen hypotonischen Schocks appliziert. Wie Kontrollen zeigten, hat dieser Schock alleine keinen Einfluß auf den Zelltod. Er verbesserte aber die Aufnahme der Inhibitoren, so daß ein fast 100%iger Schutz vermittelt wurde. Ohne diese Behandlung konnten nur maximal 80% der Zellen überleben [110]. Die selektive Wirkung der Inhibitoren beruht auf ihrer für Caspasen spezifischen Tetrapeptidsequenz und nicht auf der daran gekoppelten kovalentbindenden Chlormethylketon-Gruppe (cmk). Erst unter vergleichbar hohen Konzentrationen konnte ein inhibitorischer Effekt der Gruppe auf Caspasen gefunden werden [136]. Bei der Verwendung anderer Peptidinhibitoren, die ebenfalls mit einer solchen Gruppe ausgestattet sind, z.B. Serinproteasen-Peptidinhibitoren (TLCK, Tosyl-lysyl-cmk und TPCK, Tosyl-phenyl-cmk) konnte jedoch das Sterben anstatt, wie zu erwarten wäre, das Überleben der Fibroblasten induziert werden [107].

Trotz ihrer unterschiedlichen Peptidsequenz sind alle drei verwendeten Inhibitoren in vergleichbarem Maße fähig, die Zellen vor dem Zelltod zu bewahren. Die ermittelten ED₅₀-Werte für diese Inhibitoren variieren kaum. Bei der Verwendung vergleichbarer Inhibitoren unter zellfreien Bedingungen (s.Kap. 4.2.3) wurden deutliche Variationen in ihrer Spezifität,

Werten. Diese Diskrepanz zwischen den IC₅₀- und den ED₅₀-Werten läßt sich durch die Beobachtung erklären, daß unter hohen Konzentrationen die Spezifität der Inhibitoren abnimmt [148]. Zur Penetration der Zellmembran sind aber offensichtlich solche hohen Mengen an Inhibitoren notwendig, so daß die ED₅₀-Werte fast um den Faktor 1000 über den IC₅₀-Werten liegen und keine Unterschiede in ihren Spezifitäten mehr festzustellen sind.

Zeitabhängigkeit der Caspase-Aktivität

Caspasen weisen drei Stunden nach Serumentzug in AKR 2B-Mausfibroblasten ihre maximale Aktivität auf (s.Abb. 4.2). Dies, wie auch die maximalen spezifischen Umsatzraten der Caspasen, ist konsistent mit Befunden aus anderen Apoptosemodellen [137,149-151]. Für die Substrate der Initiator-Caspasen, VEID.pNa und IETD.pNa, besteht in AKR 2B-Fibroblasten eine konstitutive Spaltaktivität. Diese Grundaktivität konnte schon in THP.1-Zellen, einer humanen Tumorzellen-Zelllinie, gefunden werden [149]. Sie weist darauf hin, daß auch in AKR 2B-Zellen Initiator-Caspasen ohne Apoptosestimulus stets aktiv vorliegen könnten. Sie würden, entsprechend dem Aktivierungsmodell der „induzierten Annäherung“ z.B. durch Dissoziation von zelleigenen Inhibitoren, wie den IAPs, während der Präparation aktiviert, bzw. ihre Aktivität freigesetzt (s. Kapitel 1.1) [30] [59].

Die Maxima der drei Spaltaktivitäten sind zeitlich konkurrent. Die Anstiegsrate indes unterscheidet sich zwischen der DEVDase (16-19fach) und den Substraten für Initiator-Caspasen (0,5 bzw. 2fach) drastisch. Es besteht deshalb unter Berücksichtigung einer übergreifenden Substratspezifität von Caspasen [15,16] die Möglichkeit, daß der beobachtete zeitliche Anstieg der VEIDase- und IETDase-Aktivität durch die DEVDase beeinflusst oder gar ganz vermittelt wird. Diese Unterschiede in der konstitutiven und maximalen spezifischen Aktivität machen deutlich, daß nicht nur ein Enzym diese Spaltungen vermittelt, sondern vielmehr ein Gemisch aus zumindest zwei Caspasen vorliegen muß.

Durch den Fas-Liganden induziert, konnte in HL-60-Zellen eine sequenzielle Aktivierung der Caspasen gefunden werden [152,153]. Dabei wurde ein Maximum einer YVADase nach 30 min und das 30fach höhere einer DEVDase nach 3h Inkubation festgestellt. Dies konnte in AKR 2B-Mausfibroblasten nicht nachvollzogen werden. Zumal das Substrat YVAD.amc, das diesen Beobachtungen zugrunde liegt, in AKR 2B-Mausfibroblasten nicht erkannt wird. Es wird durch die Caspasen der ICE-Unterfamilie gespalten und nur schlecht, wenn überhaupt, durch die Caspasen der apoptotischen Kaskade [16,38]. Eine Beteiligung dieser Caspasen-Gruppe an dem Zelltod kann deshalb in AKR 2B-Mausfibroblasten ausgeschlossen werden.

Ein ähnlicher zeitlicher Verlauf wie bei der Caspase-Aktivität ließ sich anhand der Spaltung von Laminen in AKR 2B-Mausfibroblasten nach der Induktion des Zelltodes ermitteln (s. Abb.4.6a). Diese wurden korrelierend mit der maximalen Aktivität der Caspasen nach 3h Serumentzug abgebaut. Daß dieser Abbau durch Caspasen vermittelt werden kann ist bekannt [23,154,155]. Allein für die Caspase-6 konnte bislang diese Substratspezifität nachgewiesen werden. Sie erkennt die Peptidsequenzen VEID-X bzw. VEHD-X in den Laminen und spaltet sie. Im Gegensatz dazu ist die Caspase-3 nicht in der Lage Lamine zu fragmentieren [23]. Durch den Einsatz des Inhibitors VEID.fmk konnte gezeigt werden, daß auch in AKR 2B-Fibroblasten Caspasen und nicht ausschließlich, wie ebenfalls beschrieben, Serin-Proteasen des Kerns für den Abbau der Lamine verantwortlich sind (s. Abb.4.6b) [154]. Demnach weist die Spaltung dieses „*in vivo*“-Substrats der Caspasen auf eine nach 3h maximale Caspase-6-Aktivität in AKR 2B-Zellen hin. Eine Aktivierung von Serin-Proteasen durch Caspasen ist nicht bekannt, aber auch nicht auszuschließen. Caspasen spalten ihr Substrat in der Regel an einer spezifischen Position, so daß zwei Spaltprodukte nachweisbar sind [15,37]. Spaltprodukte der Lamine konnten in AKR 2B-Mausfibroblasten nicht detektiert werden. Dies kann am Verlust der Epitope für die verwendeten Antikörper liegen, oder bedeuten, daß nicht Caspasen die Fragmentierung direkt verursachen, sondern in diesem Fall vielmehr Mittler des apoptotischen Signals sind.

Bestimmung der K_M -Werte und ihre Aussage

Durch den Einsatz einer kombinatorischen Peptidbibliothek liegen die Substratspezifitäten von rekombinanten Caspasen vor [16,17,38]. Dabei wurde nicht nur die optimalen Substrate bzw. Inhibitoren für die rekombinanten Caspasen, sondern auch die jeweiligen K_M bzw. K_i -Werte bestimmt. Diese Werte wurden als Referenz zur Identifikation der in AKR 2B-Mausfibroblasten aktivierten Caspasen herangezogen.

In dem Vergleich der K_M -Werte rekombinanter Caspasen (s.Tab. 5.1 [38]) mit den K_M -Werten aus AKR 2B-Mausfibroblasten konnten aber nur wenige Übereinstimmungen gefunden werden. So gleicht lediglich der Wert für die Caspase-3 mit dem Substrat VEID.pNa, dem für den cytosolischen Extrakt der Mausfibroblasten. Jedoch weist dagegen dieses rekombinante Enzym einen wesentlich geringeren K_M -Wert für das Substrat DEVD.pNA auf als für AKR 2B-Mausfibroblasten ermittelt wurde. Für die verbleibenden Bestimmungen sind keine übereinstimmenden Werte zu finden. Anhand des Vergleichs läßt sich demnach keine gesicherte Aussage über die Identität der Caspasen treffen. Im Kontrollexperiment wurden Jurkat-Zellen mit TNF α stimuliert und damit u.a. die Caspase-3

und -8 aktiviert [94]. Eine K_M -Wertbestimmung für eine DEVDase hat gezeigt, daß durch die angewandte Methode durchaus für die Caspase-3 bzw. -8 typische Werte ermittelt werden können. Trotzdem ist der Vergleich von K_M -Werten gereinigter rekombinanter Caspasen mit denen von Caspasen in einer komplexen Mischung, wie ein cytosolischer Extrakt sie darstellt, mit aller Vorsicht zu betrachten.

Enzyme/ CE		Substrate		
		K_M [μ M]		
		YVAD.x	DEVD.pNa	VEID.pNa
Jurkat		-	11,5 ± 2,2	-
AKR 2B		kS	79 ± 18	236 ± 78
GruppeI	Casp-1	23	18	46
	Casp-4	874	32	205
GruppeII	Casp-3	29000	11	250
	Casp-7	kS	12	570
GruppeIII	Casp-6	kS	180	30

Tab.5. 1: Vergleich von K_M -Werten von rekombinanten Caspasen und aus AKR 2B-Mausfibroblasten bzw. Jurkat-Zellen (fett).

kS: keine Substratspaltung, CE: Cytosolischer Extrakt, aus: [38]

Die K_M -Werte für die eingesetzten Substrate und den cytosolischen Extrakt machen deshalb letztendlich nur deutlich, daß es sich in den Fibroblasten entweder um ein komplexes Gemisch konkurrierender Enzyme handelt oder um ein Enzym mit noch unbekanntem katalytischen Eigenschaften. Ersteres wird durch die Beobachtung gestützt, daß unter Verwendung einer dihyperbolischen Funktion eine bessere Regression der Enzymkinetik zu berechnen ist. Diese Funktion berücksichtigt, daß möglicherweise mehrere Enzyme die Kinetik beeinflussen [156]. -DEVD-X- bietet von den eingesetzten Substraten die beste Erkennungssequenz. Sie wird am effektivsten durch die Caspasen-3, -7 und -8 gespalten [38].

Bestimmung der K_i -Werte und ihre Aussage

Wie für den Vergleich der K_M -Werte gilt auch für K_i -Werte die Einschränkung, daß nur eine grobe Zuordnung oder ein Ausschluß derselben getroffen werden kann. So kristallisieren sich auch nach der Bestimmung von K_i -Werten nur mögliche Kandidaten heraus. Der Inhibitor DEVD.cho liefert den geringsten K_i -Wert für die DEVDase von 1,7nM, was zur halbmaximalen Inhibition rekombinanter Caspasen-3, -7 und -8 ausreicht (vgl. Tab.5.2) [39]. Ein Vergleich der Ergebnisse für den Inhibitor IETD.cho und dieser Caspasen schließt aber

AKR 2B-Mausfibroblasten bringen die Caspase-3 bzw. -9 in die engere Auswahl möglicher aktiver Caspasen in AKR 2B-Mausfibroblasten.

Substrate	rek.Enzyme/ CE	Inhibitoren	
		K _i [nM]	
		DEVD.cho	IETD.cho
GruppeII			
	AKR 2B	1,7 ± 0,5	125,8 ± 5,6
DEVD.x	Casp-2	1710	9400
	Casp-3	0,23	195
	Casp-7	1,6	3280
GruppeIII			
	AKR 2B	63 ± 25	243 ± 16
VEXD.x	Casp-6	31	5,6
	Casp-8	0,92	1,05
	Casp-9	60	108

Tab.5. 2: Vergleich der K_i-Werte aus AKR 2B-Mausfibroblasten und rekombinanten Caspasen. CE: Cytosolischer Extrakt, aus: [39]

Auch die Unterschiede in den K_i-Wert-Bestimmungen für kovalent bindende, irreversible Inhibitoren machen klar, daß verschiedene Caspasen in den AKR 2B-Mausfibroblasten aktiviert sind (s. Abb. 4.18a und b). So konnte durch die Substanzen bio-DEVD.aomk und bio-YVKD.aomk die DEVDase effizient (K_i ≅ 170nM bzw. 180nM) inhibiert werden. Jedoch vermittelten diese Inhibitoren eine nur mäßige Reduktion (um rund 20-40%) der VEIDase- bzw. IETDase-Aktivität bei K_i-Werten von 2000-20 000nM. Dies läßt vermuten, daß die VEIDase, bzw. die IETDase eine Mischaktivität aus DEVDase und einer anderen Aktivität darstellt. Der Anteil den die DEVDase zu dieser Mischung beiträgt wird durch die Inhibitoren effektiv blockiert, wohingegen die restliche Aktivität weitgehend unbeeinflusst von den Inhibitoren bleibt. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Aktivitäten unterstützt. Hier scheint kausal die DEVDase für den zeitlichen Anstieg der VEIDase- und IETDase-Aktivität nach 3h Serumentzug verantwortlich zu sein. Die konstitutive Aktivität würde demnach durch ein anderes Enzym oder ein Enzymgemisch vermittelt. Die DEVDase ist folglich im Modell der AKR 2B-Mausfibroblasten die aktivierbare und für die apoptotischen Veränderungen verantwortliche Effektoraktivität.

Selektive Inhibition der aktivierten Caspasen durch markierende Inhibitoren

Die verwendeten irreversiblen Inhibitoren, oder besser Inaktivatoren, sollen ihrer Tetrapeptidsequenz nach die Caspasen der Gruppe II bzw. der Gruppe I inhibieren. Untersuchungen haben aber gezeigt, daß diese biotinylierten Inhibitoren zur Affinitätsmarkierung der Caspasen-3, -6, ihrer Isoformen und vermutlich der Caspase-2, also hauptsächlich Caspasen mit Effektoreigenschaften, herangezogen werden können. Eine Markierung der Caspase-7 oder anderer konnte dabei bislang noch nicht gezeigt werden [136,148,151,155,157,158]. Der Unterschied in der Reaktivität dieser Inhibitoren zu den kompetitiv wirkenden Inhibitoren, z.B. bio-DEVD.aomk ($K_i=170\text{nM}$) im Vergleich zu DEVD.cho ($K_i=1,7\text{nM}$) am Beispiel der DEVDase, ist möglicherweise in ihrer Struktur zu suchen. Kompetitive Inhibitoren wirken durch die Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustands, der bei der Substratspaltung entsteht und sind somit um 10^4 affiner als vergleichbare Substrate ($K_M=74\mu\text{M}$). Geschwindigkeitsbestimmend ist hierbei die Assoziation des Inhibitors an das aktive Zentrum. In gewissem Maße gilt dies auch für die Inaktivatoren, jedoch kommt ihre inhibitorische Wirkung erst nach der Kopplung an das Cystein des aktiven Zentrums voll zum Tragen. Der erste Schritt, die Assoziation der Inaktivatoren, ist womöglich durch an sie gekoppeltes Biotin und Benzolderivate, die die Paßform verändern, erschwert. Die Bindung an das Cystein stellt den zweiten Schritt der Inhibition dar. Diese wird durch die relativ niedrige Reaktivität der Aryloxymethyl-Gruppe (aomk) als Abgangsgruppe bei einer nukleophilen Substitutionsreaktion negativ bestimmt. Diese Behinderung beider Schritte wirkt sich vermutlich direkt auf den K_i -Wert aus. Vorteil der reduzierten Reaktivität der aomk-Gruppe liegt in ihrer feststellbar erhöhten Selektivität für Cystein-Proteasen [137]. Bei der Inhibition der VEIDase und IETDase machte sich dies möglicherweise bemerkbar (s.Abb. 4.18). Hier wurde durch die Inaktivatoren nur eine unvollständige Inhibition, bei einer verbleibenden 60-80%igen Restaktivität, vermittelt. Restaktivitäten konnten ebenfalls, wenn auch in deutlich geringerem Maße ($\approx 20\%$), bei der Verwendung von kompetitiven Caspase-Inhibitoren festgestellt werden (vgl. Abb. 4.2 und 4.4a-c). Beides läßt, neben der unterschiedlichen Reaktivität der Inhibitoren, auch eine konstitutive Aktivität anderer Proteasen als Caspasen vermuten. Diese Enzyme (z.B. Serin-, Metalloproteasen, u.a.) würden hauptsächlich beim Abbau der Substrate vor allem mit den Motiven -VEID- bzw. -IETD- eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu Inaktivatoren senken kompetitive Caspase-Inhibitoren den Abbau dieser Substrate auf eine $\approx 20\%$ ige Restaktivität. Sie hätten folglich nicht nur, wie angenommen, einen Einfluß auf Caspasen, sondern auch auf andere Proteasen [21,37,39,61,128,129]. Dagegen könnten diese unspezifischen Proteasen

durch Inhibitor-Mixturen, die den Zellextrakten standardmäßig zugesetzt wurden um kontaminierende Aktivitäten zu unterbinden, demnach nicht ausreichend gehemmt werden. Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß die für VEID.pNa und IETD.pNa festgestellten konstitutiven Spaltaktivitäten nicht ausschließlich auf Caspasen zurückzuführen sind.

Übergreifende Substratspezifität

Widersprüche ergeben sich aus den Experimenten zur gegenseitigen Konkurrenz zweier Substrate (s.Kap. 4.2.4). Durch die Konkurrenz der DEVDase durch das Substrat mit dem Motiv -VEID- und umgedreht, bestätigt sich, daß in AKR 2B-Mausfibroblasten Caspasen mit übergreifender Substratspezifität aktiviert werden. Die dabei ermittelten K_i -Werte entsprechen in etwa den K_M -Werten für diese konkurrierenden Substrate. Daraus ließe sich ableiten, daß lediglich ein Enzym die Aktivitäten vermittelt. Da aber die Konkurrenz nicht vollständig ist, d.h. immer eine Restaktivität bleibt, kann man dies ausschließen. Vielmehr unterstreichen diese Werte, daß es sich um ein Gemisch aktiver Caspasen in AKR 2B-Mausfibroblasten handelt und daß diesem Gemisch eine dominante DEVDase, wie die Caspase-3, vorsteht. Diese ist in der Lage das Substrat VEID zu spalten, wenn auch mit niedrigerer Affinität als DEVD und stellt einen gewichtigen Anteil an der VEIDase-Aktivität dar.

Letztendlich ist aus den Informationen von den K_M - und K_i -Wert-Bestimmungen abzuleiten, daß zumindest zwei unterschiedliche Caspase-Gruppen in AKR 2B-Mausfibroblasten aktiv sind. Aus der Charakterisierung der DEVDase kann man schließen, daß mit Sicherheit dazu eine Caspase mit Effektoreigenschaften gehört, die im Gemisch dominiert. Die konstitutive Spaltaktivität für Substrate der Initiator-Caspasen fügt auch diese Gruppe der Caspasen in das Apoptosemodell der AKR 2B-Mausfibroblasten ein. Darüber hinaus besteht eine konstitutive Caspase-unabhängige Proteaseaktivität, die vermutlich einen gewichtigen Anteil an der Spaltung von Substraten der Initiator-Caspasen hat.

5.3 Reinigung der Caspasenaktivität

Um eine bessere Aussage zur Identität der aktivierten Caspasen in AKR 2B-Mausfibroblasten zu treffen, wurden die Aktivitäten mittels chromatographischer Verfahren gereinigt. An diese

Gelelektrophorese angefügt. Eine Grundvoraussetzung für daran anschließende Schritte ist das Wissen um die Position der aktivierten Caspasen im Gel der denaturierenden Gelelektrophorese. Da mit den verwendeten Antikörpern für Caspasen bislang keine aktivierten Untereinheiten in AKR 2B-Mausfibroblasten nachgewiesen werden konnten, mußten diese zuvor markiert werden. Eine spezifische Markierung aktivierter Caspasen oder „Affinitätsmarkierung“, wird z.B. durch die biotinylierten kovalent bindenden Inhibitoren bio-EKD.aomk, bio-DEVD.aomk und bio-YVAD.aomk erreicht [23,136,137,151,153,155]. Diese Inhibitoren binden im aktiven Zentrum des Enzyms und können mittels des angekoppelten Biotins nach der Denaturierung des Proteins nachgewiesen werden. Durch diese Inhibitoren konnten bislang die Caspasen-3 und -6 markiert werden. Sie sind vermutlich auch in der Lage, die Caspase-2 zu binden [23,137].

Selektive Markierung der aktivierten Caspasen

Die K_i -Wert-Bestimmung für die kovalent bindenden Inhibitoren in AKR 2B-Mausfibroblasten läßt vermuten, daß nur Caspasen der DEVDase-Aktivität selektiv durch die Inhibitoren markiert werden können (s.Abb. 4.18). Um die optimalen Bedingungen für eine maximale Markierung zu ermitteln, wurde der ideale Zeitpunkt nach der Induktion des Zelltods und die optimale Konzentration der Inhibitoren bestimmt. Korrelierend mit der Aktivität der DEVDase konnte in unbehandelten Zellen, wenn überhaupt, eine nur verschwindend geringe Markierung gezeigt werden, wohingegen eine maximale Markierung 3h nach Serumentzug erreicht wurde. Um möglichst alle aktivierten Caspasen zu markieren, wurden für weitere Experimente je 10 μ M der Inhibitoren eingesetzt und die Markierungsdauer auf 30min festgelegt. Dies trägt der Beobachtung Rechnung, daß die Selektivität der Inhibitoren mit zunehmender Konzentration und Dauer ihrer Einwirkung sinkt [148]. Bei dieser Konzentration wurde eine maximale Markierung und Inhibition der DEVDase in AKR 2B-Mausfibroblasten erreicht.

Auffallend bei den entstandenen Mustern des Affinitäts-Blots ist, daß jeweils nur eine Bande bei rund 18kD durch die Markierung erzeugt wurde. Dies steht im Kontrast zu Publikationen, die stets multiple Banden im Bereich von 20-17kD durch Affinitätsmarkierung aufweisen [23,136,137,155,157]. Wie beschrieben sind diese Bandenmuster jeweils typisch für den verwendeten Zelltyp und Zelltodstimulus; sie sind aber unabhängig vom verwendeten markierenden Inhibitor [137]. Sowohl die Inhibitoren (bio-DEVD.aomk oder bio-YVAD.aomk) als auch der Zelltodstimulus (Serumentzug oder Anisomycin (s. Abb. 4.28))

oder eine Reinigung der Aktivität durch Anionenaustausch-Chromatographie (s.Abb. 4.24, 4.25) haben auch in AKR 2B-Mausfibroblasten keinen Einfluß auf das Markierungsmuster.

Dies gilt auch für eine zweidimensionale Auftrennung der markierten Proteine. Im Gegensatz zu den beschriebenen komplexen Mustern aus den Caspasen-3 und -6, tritt bei AKR 2B-Mausfibroblasten nach 3h Serumentzug eine Aufspaltung der Markierung in nur zwei spezifische Flecken auf (s.Abb. 4.21). Der geringe Unterschied im isoelektrischen Punkt beider Flecken läßt vermuten, daß es sich um ein Protein handelt, das in zwei sehr ähnlichen Isoformen auftritt. Diese unterscheiden sich vermutlich nur um eine negative Ladung, die durch eine posttranslationale Modifikation, wie Desaminierung, hervorgerufen wird. Solche Modifikationen könnten die Aktivität der Enzyme regulieren. Ferner ist auszuschließen, daß zwei unterschiedliche Enzyme nur in einem solchen Fleck zusammenlaufen. So zeigen Isoformen der Caspasen-3 und -6 nach einer 2D-Gelelektrophorese ein weitaus komplizierteres Muster (4-6 Flecken) als in AKR 2B-Mausfibroblasten zu finden [137]. Zudem sind bei diesen vorliegenden Untersuchungen stets beide Caspasen markiert vorzufinden. Das Markierungsmuster der AKR 2B-Mausfibroblasten läßt deshalb vermuten, daß dort, wenn überhaupt, nur eine der beiden Caspasen markiert nachgewiesen werden kann. Unklar ist, warum meist nur diese (selten die Caspase-7) und nicht weitere Caspasen mit ähnlichen Substratspezifitäten, wie die Caspase-8, durch diese Affinitätsmarkierung nachzuweisen sind. Mögliche Erklärungen dafür sind in ihrer Affinität zum Inhibitor, in ihrer Lokalisation und ihrem Expressionsniveau zu suchen. So sagt die Substratspezifität und der K_M -Wert nichts über die maximalen Umsatzraten für ein Enzym aus. Wären solche Umsatzraten für gegebene Tetrapeptide bei ähnlichem K_M vergleichbar niedrig, würde auch die Bindung des Inhibitors verlangsamt. Dagegen steht, daß die Inhibitoren in relativ hohen Konzentrationen für eine ausgedehnte Dauer eingesetzt wurden und der irreversible Mechanismus den sie vermitteln, eine Markierung aller Caspasen erlauben sollte, auch solcher mit niedriger Affinität zu den Inhibitoren. So ist für die Caspasen-3 und -6 bekannt, daß sie Inhibitoren mit dem Motiv -YVAD- schlecht binden [37,39,129] und trotzdem markiert werden. Zudem ist kein Unterschied im Markierungsmuster für bio-DEVD.aomk und bio-YVAD.aomk zu erkennen, was aufgrund der Substratspezifitäten denkbar wäre. Eine weitere Erklärung für eine fehlende Markierung anderer Caspasen bietet womöglich ihre subzelluläre Lokalisation. So ist für die Caspase-9 bekannt, daß sie *in vitro* durch den Inhibitor CrmA inhibiert werden kann, aber *in vivo* von ihm unbeeindruckt ist. Diese verhinderte Inhibition *in vivo* wird auf ihre Komplexierung im Apoptosom zurückgeführt [39]. Jedoch handelt es sich bei den in AKR 2B-Mausfibroblasten eingesetzten Inhibitoren um kleine Peptide, die ihr Ziel

auch in komplexierten Caspasen finden sollten. Der Einschluß von Caspasen in zelluläre Kompartimente, als mögliche Ursache ihrer Unzugänglichkeit, scheint mit ihrer Funktion im apoptotischen Programm unvereinbar. Solche versteckten Caspasen wären auch für ihre Substrate unerreichbar. Membranständige Caspasen wären durch die Präparation des cytosolischen Extraktes isoliert und somit dem Assay entzogen. Diese Caspasen würden bei diesem Nachweis fehlen. Es gibt jedoch weder einen Hinweis für eine solche Lokalisation der Caspasen noch konnte eine zusätzliche Markierung in einem vollständigen Zellysat gefunden werden [137]. Die wahrscheinlichste Erklärung für den fehlenden Nachweis anderer Caspasen ist auf einer einfacheren Ebene zu finden. Limitierend auf eine Affinitätsmarkierung würde sich ein niedriges Expressionsniveau der Caspasen auswirken. Zwar würden unter diesen Umständen die Caspasen markiert, doch könnte die Sensitivität der anschließenden Detektion nicht ausreichend sein um sie nachzuweisen. Die Caspasen-3 und -6 werden demnach stärker exprimiert als andere Mitglieder der apoptotischen Caspasen, was zum Modell der kaskadenartigen Aktivierung der Caspasen paßt [18,19].

Das vergleichbar arme Markierungsmuster der AKR 2B-Mausfibroblasten und die fast vollständige Inhibition der DEVDase-Aktivität durch den Marker läßt vermuten, daß diese nur durch eine Caspase maßgeblich gebildet wird. Dies erleichtert die Reinigung und Analytik des Enzyms wesentlich.

Reinigung der Caspase-Aktivität durch Anionenaustausch-Chromatographie

Die eigentliche Reinigung der Caspasen aus dem cytosolischen Extrakt von apoptotischen AKR 2B-Mausfibroblasten beginnt mit der Auftrennung der Proteine mittels Anionenaustausch-Chromatographie (s.Kap. 4.4.2.1). Diese Methode wurde schon zuvor zur Reinigung von Caspasen erfolgreich herangezogen [129,138,158,159]. Durch die Bindung der Aktivitäten (DEVDase, VEIDase und IETDase) an das Anionenaustauschmaterial konnte diese von 95% des Gesamtproteins gereinigt werden (s.Abb. 4.22). Die Verhältnisse der gebundenen Aktivitäten zueinander entsprach im wesentlichen der Ausgangssituation wie sie im cytosolischen Extrakt vorlag: Eine dominante DEVDase- und eine um ein Drittel geringere VEIDase- bzw. eine um ein Viertel geringere IETDase-Aktivität. Im Gegensatz dazu gab es in den Fraktionen des Durchbruchs ein gleiches Verhältnis zwischen DEVDase, VEIDase und IETDase (s.Abb. 4.22). Eine darauf beruhende Aussage über eine mögliche Trennung von Caspasen kann aufgrund der niedrigen Gesamtausbeute nicht gemacht werden. Eine bei zunehmendem Alter des Materials zunehmende Aktivität in den Fraktionen des Durchbruchs

zu Ungunsten der gebundenen Aktivität läßt vielmehr darauf schließen, daß die Verteilung auf eine unzureichende Bindekapazität des Materials zurückzuführen ist.

Die Ausbeute der DEVDase gegenüber dem aufgetragenen cytosolischen Extrakt betrug nur etwa $20 \pm 5\%$. Der Verlust der Aktivität kann viele Ursachen haben. Ein Einfluß des Puffers auf die Aktivität kann ausgeschlossen werden, denn Ausgangsmaterial und gereinigte Aktivität unterscheiden sich diesbezüglich kaum (50mM NaCl). Auch die Materialien der HPLC-Anlage und die Dauer, die die Reinigung in Anspruch nimmt, sind dafür kaum verantwortlich, denn eine anschließende Reinigung der Fraktionen unter gleichenden äußeren Bedingungen mittels einer Chromatographie mit Hydroxylapatit (s.Kap. 4.4.3) reduzierte die Aktivität nicht weiter. Eine größere Bedeutung kommt der Beobachtung zu, daß Caspasen zum Teil in multimeren Komplexen zusammengefaßt scheinen. Es sind dies der DISC, das Apoptosom, beides Komplexe der Initiator-Caspasen und die kürzlich beschriebenen Aposom-Komplexe [97,149,160]. Das Aposom und Mikroapostom sind multimere Komplexe, die aus Bestandteilen des Apoptosoms (wie Apaf-1, Caspase-9, Cytochrom c) und neben noch unbekanntem Komponenten, aus den Effektor-Caspasen-3 und -7 gebildet werden. Inwiefern diese Komplexe einen Einfluß auf die Aktivität bereits prozessierter Caspasen haben, ist nicht bekannt. Würde ein möglicher positiver Einfluß von ihnen ausgehen, ginge dieser während der Chromatographie durch Dissoziation der Komponenten sicher verloren. Ein Verlust an Aktivität wäre, wie beobachtet, zu erwarten. Ein solcher Komplex von etwa 200kD konnte kürzlich durch erste Untersuchungen mittels Gelfiltration für AKR 2B-Mausfibroblasten durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden [161]. Eine weitere Möglichkeit für den Verlust an Aktivität wäre eine weitreichende Verteilung der Aktivitäten in den gesammelten Fraktionen, d.h. daß neben den Fraktionen mit hoher Aktivität die Caspasen in allen Fraktionen in so geringen Mengen vorlägen, daß sie undetektierbar blieben.

Durch Western Blot konnte gezeigt werden, daß die gereinigten Aktivitäten frei von den untersuchten Caspasen-1, -2, -3, und -9 sind (s.Abb. 4.23). Daneben fiel auf, daß keine Untereinheiten von aktivierten Caspasen-1, -2 oder -3 in den aufgefangenen Fraktionen detektiert wurden. Da aber ihre unprozessierte Form sehr deutlich erkannt wurde, sollte der Detektion ihrer prozessierten Untereinheiten, falls vorhanden, nichts im Wege stehen. Dies läßt vermuten, daß diese Proteasen in AKR 2B-Mausfibroblasten nicht aktiviert werden und nicht für die gereinigte DEVDase-Aktivität verantwortlich sind. Voraussetzung dafür ist, daß die verwendeten Antikörper dazu auch, wie beschrieben, in der Lage sind (s. Beipackzettel und [102,162]). Lediglich für die Caspase-9 konnten Untereinheiten detektiert werden. Diese lagen separiert von der DEVDase-Aktivität vor, sind also auch nicht für sie verantwortlich.

Der Antikörper für die Caspase-9 weist multiple unspezifische Bindungen zu anderen Proteinen auf. Die Spezifität der Bindung zu den vermutlichen Untereinheiten bedarf deshalb einer Überprüfung durch andere Antikörper, dies gilt auch für die anderen detektierten Caspasen.

Die Aktivitäten konnten im Affinitäts-Blot durch die biotinylierten Inhibitoren markiert werden, wohingegen andere, während des Salzgradienten aufgefangene Fraktionen, keine Markierung aufwiesen (s.Abb. 4.24). Dies gibt keinen Hinweis darauf, ob ausschließlich die DEVDase-Aktivität in den aktiven Fraktionen vorliegt, d.h. diese von anderen gereinigt wurde. Dies könnte durch eine K_i -Wert-Bestimmung für die biotinylierten Inhibitoren mit diesen Fraktionen untersucht werden. Ein Nachweis der konstitutiven Aktivität in diesen Fraktionen könnte einen weiteren Hinweis auf eine erfolgte Trennung ermöglichen. Eine chromatographische Auftrennung von cytosolischem Extrakt aus unbehandelten AKR 2B-Mausfibroblasten scheint aber aufgrund der niedrigen Ausgangsaktivität und des hohen Verlustes während der Reinigung aussichtslos.

Das Ziel dieser Anwendung, Caspase-Aktivitäten von Proteinen zu trennen, wurde erreicht. Jedoch war die Reinigung noch nicht ausreichend, wie der Versuch zur Sequenzierung der markierten Caspasen zeigte. Hier wurden die markierten aktiven Fraktionen durch 2D-Gelelektrophorese von weiterem störenden Protein befreit. Dabei wurde die maximale Beladung an Protein für die 1. Dimension der Gelelektrophorese erreicht (s.Abb. 4.25). Eine Proteinsequenzierung des Caspase-haltigen Punktes scheiterte im wesentlichen an der nicht ausreichenden Menge des speziellen Proteins.

Weitere Reinigung der Aktivität durch Hydroxylapatit

Um größere Mengen der Caspase auftrennen zu können, mußte ein weiterer Reinigungsschritt eingefügt werden. Dazu wurde eine chromatographische Auftrennung der aktiven, gebundenen Fraktionen des Anionenaustauschers mittels Hydroxylapatit erfolgreich etabliert (s.Abb. 4.26). Durch diesen zusätzlichen Reinigungsschritt konnte die Aktivität von weiteren 95% des Proteins in den Fraktionen befreit werden, das entspricht einer maximalen Gesamtreinigung um den Faktor 1000. Bei dieser Chromatographie trat kein weiterer nennenswerter Aktivitätsverlust ein. Die DEVDase stellt die Hauptaktivität in den Fraktionen dar. Der geringe Anteil an VEIDase- und IETDase-Aktivität läßt vermuten, daß nur ein Enzym, die DEVDase, in diesen Fraktionen vorliegt. Wie an der Commassie-Färbung von den durch SDS-PAGE getrennten Fraktionen zu erkennen ist, konnte die Proteinmenge stark

reduziert werden (s.Abb. 4.27). Dies bietet nun beste Voraussetzungen, um zukünftig genügend gereinigtes Material für eine Sequenzierung zu sammeln.

5.4 Signalwege

Um die Beteiligung von Signalwegen an der Regulation des Zelltods in AKR 2B-Mausfibroblasten zu untersuchen, wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt.

Anisomycin

Durch die Behandlung der Zellen mit Anisomycin, einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, sollte untersucht werden, ob durch einen anderen Streßinduktor eine vom Serumentzug unterscheidbare Form des Zelltods induziert wird. In dazu grundlegenden Experimenten zur zeitabhängigen und konzentrationsabhängigen Induktion des Zelltods mit dieser Substanz konnte gezeigt werden, daß die Zellen in einem vergleichbaren zeitlichen und morphologischen Verlauf sterben. Dabei kommt es zum Abbau von Laminen und zur Aktivierung der p38 MAP-Kinase und der Jun-Kinasen. Die Beteiligung dieser Kinasen an der Regulation des Zelltodes konnte aber anhand der Diskrepanz im zeitlichen Verlauf ihrer Aktivierung zum Zelltodmodell und durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren ausgeschlossen werden [143]. Die Inhibition der Proteinbiosynthese durch Anisomycin führt dazu, daß alle Zellen sterben und nicht, wie unter Serumentzug, nur 50%. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer Neusynthese von Protein zum Überleben der Fibroblasten.

Durch Affinitäts-Blots konnte gezeigt werden, daß die gleiche DEVDase wie unter Serumentzug durch Anisomycin aktiviert wird (s.Abb.4.28). Durch Streßfaktoren induzierte apoptotische Signalwege konvergieren demnach in einem gemeinsamen Weg, der zur Aktivierung der DEVDase in AKR 2B-Mausfibroblasten führt. Unter den zwei postulierten Hauptsignalwegen der Apoptose, dem Rezeptor- und dem mitochondrial-vermitteltem Weg, scheint letzterer am wahrscheinlichsten beteiligt zu sein. Sein Einfluß auf Modelle des Zelltods nach Entzug von Wachstumsfaktoren oder der Behandlung mit Chemotherapeutika ist zahlreich beschrieben [80,81,85,144,163].

Einfluß von CrmA auf den Zelltod der AKR 2B-Mausfibroblasten

Das virale Protein CrmA ist ein selektiver Inhibitor für Caspasen der Gruppe-I und -III mit Ausnahme der Caspase-6. Eine grundlegende Beteiligung dieser Caspasen, z.B. der Caspase-8, im Zelltodmodell sollte durch den Einsatz des Inhibitors gezeigt bzw.

Ansätze verfolgt. Zum einen wurde CrmA im Expressionsvektor pBK und zum anderen als Fusionsprotein mit GFP in AKR 2B-Mausfibroblasten überexprimiert. In beiden Fällen konnte nach der Induktion des Zelltods kein Effekt des CrmA auf das Zellsterben festgestellt werden (s.Abb.4.29, 4.31, 4.32). Im ersten Ansatz war nicht eindeutig festzustellen, ob diese Beobachtung auf CrmA zurückzuführen ist oder einen Effekt der niedrigen Transfektionseffizienz darstellte.

Eine selektive Betrachtung der CrmA-exprimierenden Zellen löste dieses Problem. Dazu wurde im zweiten Ansatz CrmA N-terminal an das grünfluoreszierende Protein GFP gekoppelt und das Fusionsprotein in AKR 2B-Mausfibroblasten exprimiert. Anhand der Fluoreszenz des Fusionsproteins konnten die transfizierten Zellen mikroskopisch identifiziert werden. Bei Serumentzug konnte festgestellt werden, daß die CrmA-exprimierenden Zellen ebenso starben wie nicht-exprimierende Fibroblasten. CrmA vermittelt also keinen Schutz vor dem Zelltod in AKR 2B-Mausfibroblasten. Zum gleichen Ergebnis kommt die Auswertung der FACS-Analyse der transfizierten Zellen. Die Überprüfung der DNA-Sequenz des Fusionskonstruktes, die Überprüfung mittels Western Blot (hier nicht gezeigt) und der Nachweis seiner Fluoreszenz in transfizierten Zellen bestätigt, daß CrmA erfolgreich exprimiert wurde. Nicht auszuschließen ist jedoch, daß durch das fusionierte GFP der Zugang des CrmA zu den Caspasen erschwert wird oder die Pseudosubstratsequenz -LVAD- im C-terminalen Drittel des Inhibitors durch das GFP maskiert ist. Das Testen des Konstruktes an einem bekannten Apoptosemodell (Jurkat stimuliert mit TNF- α) scheiterte an der mangelnden Transfektionseffizienz mit diesen Zellen. Andere bekannte Modelle standen nicht zur Verfügung.

Da der hemmende Einfluß des CrMAs auf die Caspase-8 *in vivo* bekannt ist [21,27,59,60,97,165], kann, unter Vorbehalt der Funktionsfähigkeit des Inhibitors, eine tragende Rolle dieser Caspase und damit der Rezeptor-vermittelte Weg für das Zelltodmodell der AKR 2B-Mausfibroblasten ausgeschlossen werden. Die Caspase-9, die eine vergleichbare Funktion im mitochondrial-vermittelten Weg besitzt, wird *in vitro* durch diesen Inhibitor effizient blockiert [39]. Jedoch konnte eine Inhibition *in vivo* bislang nicht gezeigt werden. Die Beteiligung dieses Weges in AKR 2B-Mausfibroblasten nach Serumentzug sollte anhand des beschriebenen Effluxes an Cytochrom c von den Mitochondrien ins Cytosol beobachtet werden [79-81,83,166]. Der für diesen Weg essentielle Efflux an Cytochrom c konnte in den AKR 2B-Mausfibroblasten nach induziertem Zelltod nicht gefunden werden (s.Abb.4.33). Auch die dafür typische Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ konnte

durch FACS-Analysen nicht festgestellt werden [107,143]. So scheint die Beteiligung auch dieses Weges im Zelltodmodell der AKR 2B-Mausfibroblasten fraglich.

Konvergenz unterschiedlicher protektiver Signalwege

Die Stimulation unterschiedlicher Signalwege innerhalb der ersten 90 Minuten des Serumentzugs, führt zum Schutz der AKR 2B-Mausfibroblasten [109,110,113]. Trotz der unterschiedlichen Mechanismen, der sie sich bedienen (vgl. Kap.1.4), konvergieren diese Wege alle in einem Punkt. Sie alle verhindern die Aktivierung oder die Aktivität der DEVDase während des Serumentzugs (s. Abb.4.33). Da für die VEIDase ein direkter Einfluß durch die DEVDase angenommen werden kann, gilt dies auch für sie. Somit liegt dieser Konvergenzpunkt in der apoptotischen Signalkette oberhalb der DEVDase. Die schon zuvor festgestellte konstitutive Aktivität der VEIDase blieb unbeeinträchtigt von den Stimulantien bestehen (vgl. Abb.4.2). Da der Ursprung dieser Aktivität wohl nicht allein auf Caspasen zurückzuführen ist, kann dieser Beobachtung keine entscheidende Bedeutung zugeordnet werden.

Diese protektiven Signalwege haben eine wichtige physiologische Bedeutung. Die Untersuchungen zeigen, daß durch diese Wege eine zeitlich begrenzte Toleranz für Mangelzustände vermittelt wird. Auch zeigen sie, daß zwischen ihnen eine kompetitive Wirkung besteht. So würde durch den Mangel nur eines Wachstumsfaktors ohne die Konkurrenz die apoptotische Maschinerie gestartet. Die Folge wäre der Tod der betroffenen Zelle. Bei zeitig eng limitierten Erscheinungen macht dies aber für den Gesamtorganismus keinen Sinn. So muß das apoptotische Programm ein Regulativ besitzen, daß auch die zeitliche Begrenztheit eines Mangel- bzw. Streßzustandes erkennt und das Programm aussetzt. Dieses Regulativ bildet der Konvergenzpunkt, der durch die Signalwege gesteuert wird und die Aktivierung der Caspasen verhindert. Die obere zeitliche Grenze für das Regulativ stellt die Aktivierung der Caspasen selbst dar. Sie ist der sogenannte „*point of no return*“.

5.5 Zusammenfassende Diskussion

Für das Zelltodmodell der AKR 2B-Mausfibroblasten konnte gezeigt werden, daß alle für ein apoptotisches Programm relevanten und bekannten Caspasen auf mRNA-Ebene exprimiert

werden [15,16,134]. Auch sind alle untersuchten Caspasen (-1, -2, -3, -6 und -9) als Zymogen in den Fibroblasten nachweisbar. Trotz dieses Nachweises konnte eine Aktivierung der Caspasen durch Western Blot, mit Ausnahme der Caspase-9, nicht gezeigt werden. Dieser Befund bedarf einer zukünftigen Überprüfung durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen Epitope muriner Caspasen. Die essentielle Rolle der Caspasen im Zelltodmodell wurde aber unbestreitbar durch den protektiven Effekt der spezifischen Inhibitoren und der induzierten Aktivität der Caspasen belegt. Neben einer konstitutiven Caspase-Aktivität (VEIDase und IETDase) konnte 3 Stunden nach Serumentzug eine davon unterscheidbare maximale Caspase-Aktivität (DEVDase) festgestellt werden. Diese Beobachtung, sowie K_M - und K_i -Wert-Bestimmungen dieser Aktivitäten und die Konkurrenz zweier Substrate verdeutlichen, daß in den apoptotischen Fibroblasten ein Gemisch an aktivierten Caspasen vorliegt. Diesem Gemisch steht eine dominante DEVDase vor, wie sie zum Beispiel die Caspase-3 darstellt. Im Vergleich der K_M und K_i -Werte kristallisiert sich dieses Enzym als möglicher Verursacher der DEVDase-Aktivität heraus. Durch biotinylierte Caspase-Inhibitoren konnte die große aktive Untereinheit dieser DEVDase markiert und durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Es stellte sich dabei heraus, daß diese Aktivität wohl nur durch ein Enzym mit zwei Isoformen vermittelt wird. Als *in vivo*-Substrat der Caspasen konnte die Spaltung der Lamine beobachtet werden. Diese Substrate sind typisch für die Aktivität der Caspase-6, nicht aber für die Caspase-3. Da aber die Aktivität der Caspase-6 durch die K_M - und K_i -Werte nicht spezifisch nachgewiesen werden konnte, bleibt zu vermuten, daß diese Caspase zwar aktiviert wird, aber nur einen kleinen Anteil an der Gesamtaktivität stellt. Auch ist nicht auszuschließen, daß durch die DEVDase aktivierte Enzyme, z.B. Serin-Proteasen für den Abbau der Lamine verantwortlich sind. Neben der hohen Wahrscheinlichkeit, daß bekannte Caspasen für die Aktivitäten verantwortlich sind, besteht die Möglichkeit, daß die DEVDase-Aktivität durch eine neue, 15. Caspase gebildet wird. Dieses Enzym besäße noch unbekanntes katalytisches Charakteristika, die die Effektoreigenschaften der Caspase-3 mit den Substratspezifitäten der Caspase-6 kombiniert und eine vergleichbar geringe Anzahl an Isoformen aufweist.

Die Identifikation der DEVDase-bestimmenden Caspase könnte, im Falle bekannter Caspasen, nur durch bessere Antikörper erreicht werden oder auch, im Falle unbekannter Caspasen, durch eine Sequenzierung. Durch Anionenaustausch-Chromatographie und Chromatographie mit Hydroxylaptit wurde die Caspase-Aktivität soweit gereinigt, daß einer Proteinsequenzierung mit dem Ziel der Identifikation der Caspase zukünftig nichts im Wege steht.

Mittels Anisomycin konnte gezeigt werden, daß durch einen anderen Streßinduktor als Serumentzug ein dazu gleichendes apoptotisches Programm gestartet werden kann. Dies deutet darauf hin, daß ein allgemeines Programm in AKR 2B-Mausfibroblasten existiert, das zur Aktivierung der Caspasen führt. Für Chemotherapeutika, Serumentzug oder allgemein Streß ist bekannt, daß der mitochondrial-vermittelte Apoptoseweg induziert wird [80,83,90,144,163]. Dieser beinhaltet den Efflux von Cytochrom c aus den Mitochondrien, die Assoziation der Caspase-9 an den Faktor Apaf-1 in einem hochmolekularen Komplex und den Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials [81,167,168]. Dies tritt in AKR 2B-Mausfibroblasten unter Streßbedingungen nicht ein. Dieser Weg scheint also nicht für die Aktivierung der DEVDase in AKR 2B-Mausfibroblasten verantwortlich zu sein. Ein weiteres Indiz dafür ist das vergleichbar geringe Expressionsniveau des Bcl-2, dessen anti-apoptotische Funktion gerade in diesem Weg verankert scheint [143,80,83,144,169,170]. Auch konnte eine Dephosphorylierung des pro-apoptotischen Faktors Bad, wie sie initial zur Aktivierung des mitochondrial-vermittelten Weges beschrieben ist [90-92,171,172], in AKR 2B-Mausfibroblasten nach Serumentzug nicht gezeigt werden [161]. Der zweite Weg zur Induktion des apoptotischen Programms ist die durch Rezeptoren vermittelte Bildung des DISC, ein hochmolekularer Komplex aus Rezeptor, Adaptorproteinen und der Caspase-8 [97,141,173]. Letztere kann durch das virale Serpin CrmA inhibiert werden. Dieser Inhibitor zeigt aber in AKR 2B-Mausfibroblasten keinen protektiven Effekt nach der Induktion des Zelltods. Zudem ist die Aktivierung dieses Weges durch Entzug von Wachstumsfaktoren nicht beschrieben. Eine Initiation des apoptotischen Programms in den Fibroblasten über diesen Komplex scheint ebenfalls unwahrscheinlich.

Den Schutz, den zahlreiche Substanzen vorm Zelltod bieten, sei es durch Induktion von Signalwegen oder unbekannter Mechanismen, zeigt, daß die Aktivierung der Caspasen durch einen Konvergenzpunkt dieser Signalwege oder Mechanismen reguliert wird. Dieser unbekannt Konvergenzpunkt liegt oberhalb eines Signalweges dessen Zusammensetzung und Regulation Ziel weiterer Forschung ist. Komponente eines solchen Weges könnte ein hochmolekularer Komplex sein, wie er durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe kürzlich entdeckt wurde. Seine Zusammensetzung scheint sich von den beschriebenen Aposomen, Apoptosomen und DISC zu unterscheiden [161].