

Aus dem Institut für physiologische Chemie

Geschäftsführender Direktor:

Prof. Dr. A. Hasilik

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Proteinolyse-unabhängige proapoptotische
Wirkung von Cathepsin D und Procathepsin D**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Olga Geisel, geb. Schestkova

aus Moskau

Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

28.11.2007

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Andrej Hasilik

Korreferent: Prof. Dr. W. Garten

2. Korreferent: Prof. Dr. K. T. Preissner, Gießen

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
1 Einleitung.....	7
1.1 Die Apoptose.....	7
1.1.1 Die Regulation der Apoptose	9
1.1.2 Der extrinsische Weg	11
1.1.3 Der intrinsische Weg über das Mitochondrium.....	12
1.1.4 Die Rolle von Caspasen.....	14
1.1.5 Die Beteiligung von Lysosomen	15
1.2 Die Cathepsine.....	17
1.2.1 Die Klassifizierung von Cathepsinen und Implikationen außerhalb des Lysosoms	17
1.2.2 Das Cathepsin D	17
1.2.2.1 Die Biosynthese und lysosomales <i>targeting</i> von Cathepsin D...	19
1.2.2.2 Das Cathepsin D und die Apoptose.....	20
1.3 Fragestellung	23
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Material	24
2.1.1 Geräte	24
2.1.2 Seren und Antiseren.....	27
2.1.3 Radiochemikalien	27
2.1.4 Laborchemikalien	27
2.1.5 Medien und Waschlösungen	31
2.1.6 Eukaryote Zelllinien	31
2.1.7 Sonstige Materialien.....	32
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Zellkultur.....	33

2.2.2 Mikroinjektion	33
2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie.....	34
2.2.4 Der Nachweis von Apoptose	35
2.2.4.1 Die DAPI Färbung.....	35
2.2.4.2 Die Annexin V Färbung.....	35
2.2.4.3 Die Fixierung der Zellen.....	36
2.2.4.4 Der Apoptosenachweis mittels ELISA	36
2.2.5 Auswertung	37
2.2.6 Statistische Analysen	38
2.2.7 SDS-PAGE.....	38
2.2.8 Die Western-Blot-Analyse	39
2.2.9 Affinitätschromatografie.....	40
2.2.9.1 Herstellung von Zytoplasmaextrakt	40
2.2.9.2 Ligandenchromatographie	40
2.2.10 ³⁵ S-Met-Markierung von humanen Vorhautfibroblasten	41
2.2.10.1 Quervernetzung des ³⁵ S-Met-Label markierten Zytoplasmaextraktes humaner Fibroblasten.....	42
3 Ergebnisse	45
3.1 Induktion von Apoptose in Fibroblasten und HeLa Zellen durch Procathepsin D	45
3.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.....	47
3.2.2 Die quantitative und statistische Auswertung der Versuche.....	55
3.2.2.1 Versuche mit humanen Fibroblasten	55
3.2.2.2 Versuche mit HeLa Zellen	58
3.2.3 Der Nachweis von Apoptose mittels ELISA.....	59
3.3 Die Extraktion und Charakterisierung des mikroinjizierten Procathepsin D	61
3.4 Vorversuche zur Identifizierung des Bindungspartners von Cathepsin D.....	62

3.4.1. Ligandenchromatographie zur Bindungspartnersuche von Cathepsin D im Zytosol	63
3.4.2 Das <i>cross-linking</i> mit DSP	64
4 Diskussion	66
4.1 Apoptoseinduktion durch Procathepsin D	66
4.2 Vorversuche zur Bindungspartnersuche.....	71
4.3 Ausblick.....	71
5 Literaturverzeichnis	72
Verzeichnis der akademischen Lehrer	81
Danksagung	82

Zusammenfassung

Verschiedene Studien weisen auf eine Beteiligung von Cathepsin D an Apoptose hin. In manchen Systemen ist die durch Cathepsin D mediierte Apoptose durch seinen Inhibitor Pepstatin A hemmbar, in anderen ist die enzymatische Aktivität des Cathepsin D für seine apoptotische Involvierung entbehrlich. Diese Arbeit zeigt, dass in humanen Vorhautfibroblasten und HeLa Zellen Apoptose durch die Mikroinjektion von reifem, katalytisch aktivem Cathepsin D als auch seinem inaktivem Präkursor Procathepsin D in das Zytoplasma der Zellen induziert werden kann. Dabei verbleibt das mikroinjizierte Procathepsin D ungespalten im Zytosol.

Dieses Ergebnis bekräftigt die Hypothese, dass der proapoptotische Effekt von Cathepsin D im Zytosol unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität ist und legt nahe, dass die Interaktion von Cathepsin D mit dem ihm nachfolgenden Effektor nicht das aktive Zentrum einschließt, da dieses im Procathepsin D von der Prosequenz verdeckt ist. Es kann gefolgert werden, dass Cathepsin D und Procathepsin D mit einem oder mehreren zytoplasmatischen pro- oder antiapoptotischen Proteinen wechselwirken und ihre Aktivität steigern bzw. hemmen können. Im Hinblick auf die Tatsache, dass unter definierten Bedingungen Lysosomen permeabilisiert werden und das Cathepsin D im Zytosol nachgewiesen werden kann, wird es von Interesse sein den/die möglichen Bindungspartner zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit erfolgten zusätzliche Versuche, über eine Ligandenchromatographie und *cross-linking* Ansätze einen möglichen zytosolischen Bindungspartner des Cathepsin D zu finden, die jedoch weiterer Erforschung bedürfen.

Außerdem wurden andere Stoffe, wie das Saposin B oder C₂-Ceramid zusammen mit Cathepsin D in das Zytoplasma von Fibroblasten mikroinjiziert, was zu keiner wesentlichen Effektänderung führte.

1 Einleitung

1.1 Die Apoptose

„Alles Warten ist Warten auf den Tod“ (Franz Werfel)

Die Zelle – Grundeinheit biologischer Systeme – unterliegt verschiedensten Kontrollmechanismen bei Wachstum, Differenzierung und bei ihrem Tod. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte konnten zeigen, dass es mehrere Möglichkeiten für eine Zelle gibt, zu sterben. Eine grobe Einteilung besteht in Nekrose und Apoptose, einem durch Pathogenese herbeigeführten und einem „geplanten“ Tod.

Das Wort „Apoptosis“ stammt aus dem Altgriechischen und bedeutet den „Fall der Blätter im Herbst“ oder das „Ausfallen der Blütenblätter einer Blume“. Der Begriff der „Apoptose“ in der biologischen Forschung wurde von Kerr, Wyllie und Currie im Jahr 1972 eingeführt. Sie definierten mit ihm eine Reihe morphologischer, elektronenmikroskopisch darstellbarer Veränderungen, die nach Entzug von Wachstumsfaktoren bei Leberzellen zu beobachten waren (Kerr, Wyllie *et al.*, 1972). Interessanterweise wurde der „programmierte Zelltod“ 1842 von Carl Vogt beschrieben, als er Untersuchungen zur Entwicklung der Kaulquappen der Gemeinen Geburtshelferkröte durchführte.

Der Ausdruck Apoptose beschreibt eine bestimmte Zellmorphologie. Er sollte nicht synonym mit „programmiertem Zelltod“ gebraucht werden, der normalerweise über die Apoptose läuft. Der Ausdruck „programmierter Zelltod“ bezeichnet ein zeit- und positionsabhängiges Sterben von Zellen während der Entwicklung eines Organismus (Lawen, 2003).

Da die Apoptose normalerweise keine Entzündung nach sich zieht, kann sie als eine Art physiologischer Zelltod betrachtet werden. Die Apoptose ist etwa 20-mal schneller als die Mitose, deswegen lässt sie sich selten *in vivo* beobachten. Apoptotische Zellen werden, ohne eine Spur zu hinterlassen, von ihren Nachbarzellen eingekesselt und abgebaut. Um die Zellhomöostase der Population zu erhalten muss eine Balance zwischen Zellwachstum und

Niedergang gefunden werden. Würde nur Mitose ohne den Zelltod stattfinden, hätte ein 80-jähriger Mensch 2 Tonnen Knochenmark und lymphatisches Gewebe, sein Darm wäre 16 km lang (Lawen, 2003). In der frühen Ontogenese ist die Apoptose unentbehrlich zur Ausbildung der Organstruktur, später reguliert sie die Zellzahl (Strasser, O'Connor *et al.*, 2000), selektiert maligne Zellen und schützt vor viral infizierten Zellen (Shub, 1994). Ein bekanntes Beispiel ist der Thymus, in dem die Zellpopulation um 95 % durch Apoptose reduziert wird (Jacobson, Weil *et al.*, 1997).

Die Apoptose ist ein biologischer Vorgang, der genetisch festgelegt ist und charakteristische morphologische und biochemische Merkmale besitzt. Der Zelltyp und das Differenzierungsstadium der Zelle sind entscheidend für das Signal, das zur Auslösung des programmierten Zelltodes führt. Zum Beispiel kann er über die Aktivierung membranständiger Rezeptoren ausgelöst werden (CD95-, TNF- und B-Zell-Rezeptor), durch den Entzug von Wachstumsfaktoren oder durch Verlust von Zell-Zell-Kontakten. Auf der anderen Seite kann das apoptotische Programm über intrazelluläre Rezeptoren (z.B. durch Glukokortikoide), DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Schädigung (UV- und Röntgenstrahlung, Zytostatika), Hitze, Kälte oder Störungen des Zellmetabolismus (Nukleotidsynthese) initiiert werden. Alle genannten Aktivierungsmechanismen münden in der gleichen Enzymkaskade, der Caspasenkaskade, die den Tod der Zelle nach sich zieht. Allerdings zeigen neuere Forschungsergebnisse, dass ein Caspase-unabhängiger Weg der Apoptose existiert (Broker, Kruyt *et al.*, 2005).

In den letzten Jahren stieg das Interesse an Apoptose exponentiell an. Momentan beschäftigen sich 13.000 Publikationen jährlich mit Apoptose, was 2 % aller biowissenschaftlichen Publikationen ausmacht. Das steigende Interesse begründet sich in der Erkenntnis, dass Apoptose in vielen Erkrankungen des Menschen eine wesentliche Rolle spielt (Lawen, 2003), zum Beispiel bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, AIDS, Schäden nach Ischämien, wie dem Herzinfarkt oder einem Schlaganfall. Einen großen Stellenwert nehmen Virusinfekte, Autoimmunerkrankungen und als wichtigsten Punkt die Krebserkrankungen ein (Lawen 2003).

Das Phänomen der Apoptose ist mit spezifischen biochemischen und morphologischen Veränderungen der Zelle assoziiert, die das Zytoplasma, den Nukleus und die Plasmamembran involvieren. In der frühen Apoptose rundet sich die Zelle ab, verliert Kontakte zu den Nachbarn und schrumpft. Im Zytoplasma dilatiert das endoplasmatische Retikulum, die Zisternen schwellen an, formen Vakuolen und Vesikel. Im Nukleus kondensiert das Chromatin und aggregiert zu einer kompakten Masse, um anschließend von Endonukleasen zwischen Nukleosomen fragmentiert zu werden. Dieses kann in der typischen DNA-Leiter-Formation nachgewiesen werden (Johnson, Vaillant *et al.*, 1996).

Der Nukleus treibt auf und formt mehrere Fragmente. In der Plasmamembran lösen sich die Zell-Zell-Interaktionen, die Membran konsolidiert sich und formiert eine bläschenartige Morphologie (sog. *blebbing*). Die Zelle löst sich in verschieden große „Pakete“ auf, die „*apoptotic bodies*“ genannt werden (Kerr, Winterford *et al.*, 1994). Unter physiologischen Bedingungen entstehen bestimmte Modifizierungen der Plasmamembran, die die Erkennung der apoptotischen Zellen durch Phagozyten erlauben. Da die „*apoptotic bodies*“ von einer noch intakten Membran umgeben sind, kommt es normalerweise nicht zum „Auslaufen“ des Zellinhaltes und damit nicht zur Entzündung. Hierin liegt ein großer Unterschied zur Nekrose. Die Nekrose bedient sich keiner geregelten Mechanismen zum Abbau von Proteinen und Nukleinsäuren, sie ist Folge irreversibler Schädigungen, die durch Einwirkung verschiedener Noxen entstehen. Es kommt zur Erhöhung der Membranpermeabilität und als unmittelbare Folge zum Anschwellen der Zelle und deren Organellen (Oncoze). Gekoppelt an den Verlust der Membranintegrität ist die Freisetzung lysosomaler Enzyme, die den zellulären Desintegrationsprozess fördern.

1.1.1 Die Regulation der Apoptose

Die Nematode *Caenorhabditis elegans* ist ein elegantes Arbeitsmodell um die genetische Regulation der Apoptose zu erforschen, ihr gesamtes Genom ist bereits sequenziert und genetische Mutanten können leicht hergestellt werden. *C. elegans* Hermaphroditen besitzen 1090 somatische Zellen, 131 von ihnen begehen Selbstmord durch Apoptose. 116 der 131 sterbenden Zellen gehören zum Nervensystem und anderem ektodermalen Gewebe. Zwei Moleküle: Das

CED-3 (*CED*, *C.elegans cell death proteins*) und CED-4 wirken proapoptotisch (Desnoyers und Hengartner, 1997). Auf der anderen Seite wirkt ein CED-9 der Apoptose entgegen. Das CED-3 ist eine Proteinase, das CED-4 kann sie aktivieren, CED-9 hemmt Apoptose indem es an CED-4 bindet. Ein weiteres proapoptotisches Gen, EGL-1, interagiert mit CED-9 und inhibiert dessen antiapoptotische Aktivität, was zur Aktivierung des CED-4/CED-3-Komplexes führt (Conradt und Horvitz, 1998). Die immense Wichtigkeit dieser Entdeckungen wurde 2002 mit dem Nobelpreis belohnt. Es stellte sich heraus, dass Apoptose evolutiv konserviert ist und dass das menschliche Genom Orthologe und Homologe enthält. Zum Beispiel entsprechen dem CED-3 die Caspasen, dem CED-4 das Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) und die Bcl-2 Proteinfamilie dem CED-9.

Ein weiteres anschauliches Beispiel zur Regulation der Apoptose sind Lymphozyten. Während ihrer Entwicklung ändern diese Zellen ihre Apoptoseneigung („apoptotischer Phänotyp“). Die wesentlichen Determinanten dieses „apoptotischen Phänotyps“ sind die Expressionsspiegel von *bcl-2* (*B-cell-leukemia/lymphom 2*) und *bcl-x*, außerdem Fas und FasL (Krammer, 2000).

Grundsätzlich sind Entwicklungsstadien, die vor allem die Selektion von Zellen beinhalten, mit niedriger Expression von Bcl-2 und/oder Bcl-x assoziiert, während Proliferation durch hohe Expression von Bcl-2/Bcl-x charakterisiert ist (Behrens und Mueller, 1997). Die Proteine dieser Bcl-2 Familie, deren Namensgeber, das Onkogen *bcl-2*, als Folge einer chromosomalen Translokation in B-Zell-Lymphomen überexprimiert ist (Tsujiimoto, Cossman *et al.*, 1985), spielen eine wesentliche regulatorische Rolle in der Apoptose. Im Gegensatz zu anderen Onkogenen besteht die Funktion von *bcl-2* nicht darin Proliferation zu stimulieren, sondern Zellen vor Apoptose zu bewahren (Hockenberry, Coody *et al.*, 1990). Die Familie der Bcl-2- ähnlichen Proteine beinhaltet antiapoptotische Moleküle wie Bcl-2 und Bcl-xL und proapoptotische wie Bax, Bak und Bid (Wei, Zong *et al.*, 2001).

1.1.2 Der extrinsische Weg

Der extrinsische Weg der Apoptose läuft über Rezeptoren an der Außenfläche der Plasmamembran. Liganden dieser Rezeptoren initiieren über komplexe Signalkaskaden die Ausführung der Apoptose. Beispiele für solche Rezeptoren stellen das Fas (identisch mit Apo-1, CD95) und der TNF-alpha (Tumor Nekrose Faktor alpha) Rezeptor TNF-R dar. Diese beiden besitzen eine zytosolische Todesdomäne DD (*death domain*). Der rezeptorinduzierte Weg führt hier zur Aktivierung von Caspase 8 oder 10 (sog. Initiatorcaspasen), welche die sog. Effektorcaspasen aktivieren (siehe unten). Zum Beispiel ist das FasL an der Oberfläche von T-Zellen lokalisiert, das an das Fas der Zielzelle binden kann, die anschließend stirbt. Die Bindung von FasL an Fas führt zur Rezeptortrimerisierung, das Adapterprotein FADD (*Fas-associated death domain protein*) kann anschließend an DD binden. Diese FADD DED Domäne (*death effector domain*) ist ihrerseits in der Lage die Procaspase 8 zu aktivieren. Der Komplex aus Procaspase 8, Fas, FasL, FADD wird DISC (*death-inducing signaling complex*) genannt. Caspase 8 kann einerseits weitere Caspase 8 Moleküle rekrutieren, andererseits die Effektorcaspase 3 aktivieren und Bid spalten, wodurch ein 15 kDa großes Spaltprodukt tBid (p15Bid) entsteht, das zu den Mitochondrien transloziert und die Freisetzung von Cytochrom c in das Zytosol auslöst (Ashkenazi, 2002). Es existieren weitere TNF-R Familienmitglieder mit Todesdomänen, zum Beispiel DR4, DR5, CAR1, p75 und TNF-R1.

Als ein *second messenger* der Fas-induzierten Apoptose wurde zunächst das C₂-Ceramid erwogen, diese Hypothese wurde dann weitestgehend verlassen (Cifone, De Maria *et al.*, 1994); (Okazaki, Kondo *et al.*, 1998). Das C₂-Ceramid entsteht außerhalb der *de novo* Synthese durch die Sphingomyelinase, die das Sphingomyelin der Plasmamembran hydrolysiert. Dieses Enzym kann direkt durch Caspase 3 stimuliert werden. C₂-Ceramid selbst kann Apoptose auslösen, und viele apoptoseinduzierende Chemotherapeutika erhöhen den C₂-Ceramidspiegel (Radin, 2001; Radin, 2003).

1.1.3 Der intrinsische Weg über das Mitochondrium

Das Mitochondrium ist ein von zwei Elementarmembranen umgebenes Organell mit einer eigenen zirkulären doppelsträngigen DNA. Laut Endosymbiontenhypothese vereinigte es sich mit der eukaryoten Zelle.

Das Mitochondrium ist der Ort der Atmungskette und des Zitratzyklus, es versorgt die Zelle mit Energie und ist am Fett- und Glucosestoffwechsel beteiligt. Nach neueren Studien kommt dem Mitochondrium außerdem eine wesentliche Rolle bei der Apoptose zu (Desagher und Martinou, 2000).

Der mitochondriale Weg wird über eine Vielzahl verschiedener Noxen aktiviert, zum Beispiel über oxidativen Stress oder zytotoxische Chemotherapeutika. Das apoptotische Signal führt zum Austritt von Cytochrom c aus dem Intermembranspalt des Mitochondriums in das Zytosol.

In nicht-apoptotischen Zellen ist das Cytochrom c ein essentieller Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, der Elektronen von der Cytochrom c-Reduktase auf die Cytochrom c-Oxidase überträgt. Cytochrom c ist mit der mitochondrialen Innenmembran auf der Seite des Intermembranspalts assoziiert. Das Cytochrom c-Apoprotein, das nicht proapoptotisch wirkt, wird im Zytoplasma synthetisiert und gelangt über einen speziellen Mechanismus in die Mitochondrien, wo es seine Hämgruppe erhält und zum komplett gefalteten Holocytochrom c wird. Dieses Holoprotein kann unter normalen Umständen den Intermembranspalt nicht verlassen.

Im Zytoplasma bindet das Cytochrom c Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) (Shi, 2002). Frühere Erhebungen verwiesen auf die Notwendigkeit des mitochondrialen Membranpotentialverlustes für die Eröffnung mitochondrialer Poren. Neuere Experimente deuten an, dass beides für den Austritt von Cytochrom c entbehrlich ist (Waterhouse, Ricci *et al.*, 2002; Ly, Grubb *et al.*, 2003).

Nach der Bindung von Apaf-1 an das Cytochrom c erfolgt die Bildung des Apoptosomes, eines etwa 1 MDa Oligomers, der die Aktivierung von Caspasen initiiert (Shi, 2002). Das Apoptosom enthält sieben Apaf-1 Moleküle, sieben Cytochrom c, sieben (d)ATP (Adenosin-Triphosphat) und sieben Procaspase 9

Moleküle. Die Procaspase 9 ist die Initiatorcaspase des Apoptosomes (Waterhouse, Ricci *et al.*, 2002). Die apoptosomgebundene Caspase 9 ist in der Lage Effektorcaspasen, zum Beispiel die Caspase 3 zu aktivieren, die die Apoptose weiter umsetzen. Die Struktur des Apoptosomes konnte durch *low-resolution kryo*-Elektronenmikroskopie identifiziert werden: Es formiert ein «Rad des Todes» mit einer siebenfachen Symmetrie (Acehan, Jiang *et al.*, 2002; Salvesen und Renatus, 2002; Shi, 2002).

Als Beispiel für die Wichtigkeit der Apoptose im lebenden Organismus dienen z.B. Versuche mit Hirngewebe von Apaf-1, Caspase 9 und Caspase 3 mutierten Mäusen, die durch insuffiziente Reifung die Notwendigkeit der Apoptose bei der Ausdifferenzierung und Entwicklung neuronaler Netzwerke demonstrieren (Nijhawan, Honarpour *et al.*, 2000).

Proteine des intrinsischen Apoptoseweges können von Onkogenen herauf- oder herunter reguliert werden, z.B. weisen viele Melanomlinien eine niedrige Syntheserate von Apaf-1 auf. (Cecconi und Gruss, 2001; Green und Evan, 2002).

Nach der Aktivierung des intrinsischen Weges verlassen viele weitere proapoptotische Moleküle neben dem Cytochrom c das Mitochondrium (van Loo, Saelens *et al.*, 2002). Eines dieser Moleküle ist z.B. Smac/Diablo, ein Inhibitor der IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*), die die Caspasenaktivierung verhindern (De Laurenzi und Melino, 2000; Du, Fang *et al.*, 2000; Green, 2000). Mitochondrien können des Weiteren einen Apoptose-induzierenden Faktor, das AIF freigeben, der einen der Apoptose ähnlichen Zelltod ohne die Aktivierung der Caspasenkaskade auslöst (Hunot und Flavell, 2001; Joza, Susin *et al.*, 2001).

Wesentliche Fragen bleiben im intrinsischen Weg weiterhin unbeantwortet: Wie sehen die Poren aus, durch die das Cytochrom c und die anderen Faktoren austreten? Woraus formieren sie sich? (Desagher und Martinou, 2000)

Es gibt Hinweise darauf, dass der Austritt von Cytochrom c durch die Caspasenaktivierung stimuliert wird und ein Amplifizierungskreis formiert wird. Außerdem wirken viele Moleküle bei der Bildung mitochondrialer Poren mit:

Bax, VDAC (*voltage-dependent anion channel*), Lipide und andere noch unbekannte Moleküle (Grubb, Ly *et al.*, 2001; Tsujimoto und Shimizu, 2002). Einige neuere Studien verweisen auf antiapoptotische Wirkungen des Bcl-x durch seine Bindung an VDAC (Malia und Wagner, 2007).

1.1.4 Die Rolle von Caspasen

Die Induktion von Apoptose kann über externe oder interne Stimuli erfolgen. Der extrinsische Weg läuft über Rezeptoren an der Außenseite der Plasmamembran. Der zweite, intrinsische Weg führt über das Mitochondrium. Beide münden an einem bestimmten Punkt in einen identischen Ablauf. Dieser ist die Aktivierung spezifischer Enzyme – der Caspasen. Es handelt sich um eine Familie von Proteinasen, die einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum besitzen und ihre Substrate nach einem Aspartat-Rest spalten, was sich in ihrer Namensgebung widerspiegelt.

Caspasen sind keine rein zytoplasmatisch lokalisierten Enzyme, sondern zeigen vielmehr ein komplexes Verteilungsmuster. In einer Vielzahl humaner Zelllinien und Geweben ist beispielsweise Caspase 3 sowohl diffus zytoplasmatisch als auch mitochondrial lokalisiert (Mancini, Nicholson *et al.*, 1998).

Zur Zeit sind 14 menschliche Caspasen bekannt (Strasser, O'Connor *et al.*, 2000). Sie werden als Proenzyme synthetisiert, die durch Proteinolyse mittels anderer Caspasen kaskadenartig aktiviert werden (Earnshaw, Martins *et al.*, 1999).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Caspasen in Gruppen einzuteilen. Funktionell werden drei Klassen unterschieden: (i) die Initiatorcaspasen mit einer langen Prodomäne (über 90 AS), die die DED (C8, C10) oder die Caspaserekrutierungsdomäne CARD (C2, C9) enthalten; (ii) die Exekutionscaspasen oder Effektoren, die kurze Prodomänen enthalten (C3, C6, C7) und (iii) die Übrigen, die eher bei der Cytokinreifung als bei Apoptose beteiligt sind (Grutter, 2000). Während der Aktivierung werden die Prodomänen abgeschnitten und die kleinen und großen Untereinheiten trennen sich, alle Spaltungen erfolgen hierbei nach Aspartatresten. Das aktive Zentrum wird

durch die Grenzfläche der beiden Untereinheiten gebildet: ein Arginin, ein Histidin, ein Cystein der großen Untereinheit und ein Arginin der kleinen. Die Caspasen bilden Heterotetramere aus (Grutter, 2000).

Die Initiatorcaspasen spalten und aktivieren die Effektorcaspasen. Diese ihrerseits spalten anschließend zelluläre Substrate, was zur Ausbildung der typischen apoptotischen Morphologie führt. Caspase 3 ist in der Lage viele wichtige Substrate zu spalten, zum Beispiel ICAD (*inhibitor of caspase-activated DNAase*), ROCK1 (*Rho-associated coiled-coil forming kinase 1*), poly(ADP-ribose)polymerase – ein DNA-Reparaturenzym, Actin, Fodrin und Lamin. Caspase 3 führt über ROCK1 zum sog. *blebbing*, der Bläschenbildung der Plasmamembran, zum Zerfall der Zellstruktur und via ICAD zur DNA-Fragmentierung (Nagata, 2000; Coleman, Sahai *et al.*, 2001; Leverrier und Ridley, 2001; Manji und Friesen, 2001; Sebbagh, Renvoize *et al.*, 2001; Donepudi und Grutter, 2002; Salvesen und Duckett, 2002; Shi, 2002; Waterhouse, Ricci *et al.*, 2002).

Peptid-Caspase-Inhibitoren können die Caspasenaktivierung und damit Apoptose verhindern (Garcia-Calvo, Peterson *et al.*, 1998). Verschiedene zelluläre und virale Proteine fungieren als Caspase-Inhibitoren. Zum Beispiel inhibieren IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*) aktivierte Caspasen. Neuronale Zellen enthalten z.B. die NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory proteins*), deren Gen-Expression bei einigen Parkinson Varianten das Überleben der Zellen fördert (Crocker, Wigle *et al.*, 2001). Viele Viren enthalten virale IAP, virale antiapoptotische Bcl-2 Proteine oder andere Apoptose-Inhibitoren, die das Absterben infizierter Zellen verhindern.

1.1.5 Die Beteiligung von Lysosomen

Das Lysosom ist ein von einer Membran umgebenes Organell, in dem ein saurer pH-Wert herrscht und zahlreiche Proteinasen sowie andere Hydrolasen, die den Abbau anfallender Stoffe ermöglichen, vorliegen. Lysosomen sind dynamische Organellen, sie erhalten membrangebundene Vesikel aus dem biosynthetischen, endozytotischen und autophagozytotischen Verkehr der Zelle und sorgen für ein *recycling* der Bausteine der zu hydrolysierenden Makromoleküle (Kroemer und Jaattela, 2005).

Die Wichtigkeit des Lysosomes und der lysosomalen Hydrolasen beim Abräumen der sterbenden Zelle in der Endphase der Apoptose sowie der Nekrose ist seit Langem bekannt (de Duve, 1983; Savill und Fadok, 2000).

Mittlerweile liegen vermehrte Hinweise auf eine weitaus frühere Beteiligung des Lysosomes beim programmierten Zelltod vor. Obwohl die Ultrastruktur des Lysosomes während der Frühphasen der Apoptose weitestgehend erhalten bleibt, verlassen lysosomale Proteinase das Lysosom in Richtung Zytosol.

Neue Technologien erlauben diese Leckage der lysosomalen Membran aufzuspüren, die nicht nur im Verlauf der Apoptose auftritt, sondern diese auch initiieren kann (Brunk, Neuzil *et al.*, 2001; Guicciardi, Leist *et al.*, 2004; Jaattela, 2004). Es wurde aufgezeigt, dass diese sog. Permeabilisierung der lysosomalen Membran Apoptose, bis hin zu nekroseartigem Zelltod vermitteln kann.

Lysosomale Membranpermeabilisierung kann durch apoptotische Stimuli, intrazelluläre *second messenger* und lysosomotrope Toxine induziert werden. Oft folgt der Permeabilisierung der lysosomalen Membran die Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran und die Aktivierung von Caspasen, die beiden Meilensteine der Apoptose (Boya, Andreau *et al.*, 2003; Cirman, Oresic *et al.*, 2004).

Eine Hypothese besagt, dass beschränktes Auslaufen lysosomaler Inhalte zu Apoptose führt, während eine generelle Lysosomruptur in der Nekrose der Zelle mündet (Brunk, Dalen *et al.*, 1997; Kagedal, Zhao *et al.*, 2001).

Lysosomale Pathologien sind häufig in Krebszellen zu beobachten, in denen eine Überexpression der Gene lysosomaler Enzyme an der Gewebeinvasion und dem Tumorwachstum beteiligt ist. Zum Beispiel verhindert überexprimiertes Hitzeschockprotein 70 die Permeabilisierung der lysosomalen Membran (Nylandsted, Brand *et al.*, 2000; Farkas, Hantschel *et al.*, 2003; Rohde, Daugaard *et al.*, 2005). Für die krebsspezifische Medikation könnten in Zukunft Stoffe mit lysosomotropen, HSP70 herunter regulierenden oder die vakuoläre H⁺-ATPase hemmenden Eigenschaften entwickelt werden (Kroemer und Jaattela, 2005).

1.2 Die Cathepsine

1.2.1 Die Klassifizierung von Cathepsinen und Implikationen außerhalb des Lysosoms

Die Cathepsine bilden eine Familie lysosomaler Hydrolasen, die Proteine optimal bei einem sauren pH abbauen. Nach den essentiellen Aminosäuren im aktiven Zentrum können die Cathepsine in drei Gruppen eingeteilt werden: Cystein- (Cathepsine B, C, H, F, K, L, O, S, V, W), Aspartat- (D und E) oder Serin-Proteinasen (Cathepsin G) (de Duve, 1983). Neben ihrer Funktion im allgemeinen Proteinabbau konnten *knock-out* Experimente auf weitere interessante Funktionen hinweisen: z.B. die Neovaskularisation von endothelialen Progenitorzellen (Urbich, Heeschen *et al.*, 2005), die Antigenpräsentation (Nakagawa, Roth *et al.*, 1998), Einfluss auf das Zellwachstum und die Gewebshomöostase (Saftig, Hetman *et al.*, 1995; Koike, Nakanishi *et al.*, 2000; Koike, Shibata *et al.*, 2003).

Weitere Funktionen außerhalb des lysosomalen Kompartiments, z.B. nach einer Sekretion in den Extrazellularraum, sind der Abbau extrazellulärer Matrix und die Induktion von invasivem Wachstum bei Fibroblasten. Herausragend ist die Beteiligung der Cathepsine an der Apoptose nach dem Austritt in das Zytosol (Barrett, 1970; Rochefort und Liaudet-Coopman, 1999; Koblinski, Ahram *et al.*, 2000; Joyce, Baruch *et al.*, 2004; Turk, Kos *et al.*, 2004; Fehrenbacher und Jaattela, 2005; Laurent-Matha, Maruani-Herrmann *et al.*, 2005; Liaudet-Coopman, Beaujouin *et al.*, 2006).

1.2.2 Das Cathepsin D

Cathepsin D [E.C.3.4.23.5] ist eine ubiquitäre, lysosomale Aspartat-Endoproteinase (Barrett, 1970). Die lang bekannte Funktion dieser Proteinase ist der Abbau von Proteinen bei saurem pH-Wert im Lysosom. Neben dieser klassischen Rolle konnte gezeigt werden, dass Cathepsin D Präkursoren biologisch aktiver Proteine in prälysosomalen Kompartimenten spezialisierter Zellen aktivieren kann (Diment, Martin *et al.*, 1989). *Knock-out* Experimente des Cathepsin D-Genes belegten, dass homozygote Mäuse sich zunächst normal entwickelten. Nach dem Abstillen begannen die Jungtiere an Gewicht zu

verlieren und starben am 26. Tag postnatal (Saftig, Hetman *et al.*, 1995). Zwei wesentliche Pathologien konnten aufgezeigt werden: Nekrosen und Hämorrhagien im Dünndarm, erhöhte Apoptose im Thymus, während die Halbwertszeit der meisten Proteine unverändert war. Diese Studie zeigte, dass Cathepsin D wesentlich beim Gewebe-remodelling und der Erneuerung bestimmter Epithelien beteiligt ist.

Im Gegensatz zu anderen Gewebeproteinasen (z.B. Serin- oder Metalloproteinasen) existiert für Cathepsin D kein endogener Inhibitor. Das Pepstatin A, ein natürlicher Inhibitor von Aspartatproteinasen, wird aus Actinomycetenstämmen isoliert und dient häufig zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von Cathepsin D und zu *in vitro* Funktionsversuchen (Umezawa, Aoyagi *et al.*, 1970).

Wie andere Aspartatproteinasen auch (z.B. Renin, Chymosin oder Pepsinogen) besitzt das Cathepsin D eine zweilappige Domänenstruktur. Kristallstrukturen des nativen und des Pepstatin A-inhibierten reifen humanen Cathepsin D zeigten eine hochgradige Tertiärstrukturähnlichkeit mit anderen Aspartatproteinasen. Es gibt bis jetzt keine *high-resolution* Struktur für das Procathepsin D (Baldwin, Bhat *et al.*, 1993; Metcalf und Fusek, 1993; Lee, Gulnik *et al.*, 1998).

Interessanterweise wird Cathepsin D in Brustkrebszellen überexprimiert, was auf Östrogenwirkung zurückgeführt wird (Rocheffort, Cavailles *et al.*, 1989; Cavailles, Augereau *et al.*, 1993). Seine zytoplasmatische Quantität dient als Prognosefaktor dieser Tumorart, diese kann bis zu 50-mal höher als in der Normalpopulation sein und korreliert mit der Aggressivität des Malignoms (Capony, Rougeot *et al.*, 1989; Rocheffort, 1992; Westley und May, 1999). Auch das Procathepsin D ist bei Patienten mit Brustkrebs oft erhöht, es wird in diesen Fällen von den Krebszellen sezerniert und ist im Plasma messbar (Brouillet, Dufour *et al.*, 1997; Liaudet-Coopman, Beaujouin *et al.*, 2006). Einige Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Rolle des Cathepsin D als Mitogen für Krebszellen, Stimulator der Metastasierung und der Kolonieproliferation (Liaudet-Coopman, Beaujouin *et al.*, 2006). Außer der Stimulation des Tumorwachstums wird dem Cathepsin D die Fähigkeit zugeschrieben die

Angiogenese zu steigern (Berchem, Glondu *et al.*, 2002) und zwar unabhängig von seiner katalytischen Aktivität. Es ist in der Lage invasives Wachstum von Fibroblasten herbeizuführen, ebenfalls unabhängig von seiner proteolytischen Aktivität (Laurent-Matha, Maruani-Herrmann *et al.*, 2005). Eine Hypothese besagt, dass das von Brustkrebszellen sezernierte Cathepsin D von Fibroblasten gebunden wird. Ein Bindungsprotein scheint die stromale Proliferation des Tumors zu aktivieren (Liaudet-Coopman, Beaujouin *et al.*, 2006).

1.2.2.1 Die Biosynthese und lysosomales *targeting* von Cathepsin D

Das Cathepsin D wird als Prä-Pro-Enzym am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und unterliegt bis zum Erreichen seiner reifen Form im Lysosom mehreren proteolytischen Spaltungen (Hasilik und Neufeld, 1980; Richo und Conner, 1991; Richo und Conner, 1994).

Die Mechanismen der Reifung und Aktivierung lysosomaler Proteinasen verbleiben weiterhin größtenteils unbekannt (Ishidoh und Kominami, 2002). Es werden drei Varianten der Aktivierung und Prozessierung von Aspartatproteinasen diskutiert. Zum ersten die komplette Autoaktivierung, die zum Beispiel beim Pepsinogen des Schweins beschrieben wurde (Tang und Wong, 1987). Bei der zweiten Möglichkeit handelt es sich um die vollständig von außen assistierte Aktivierung beim Pro-Renin (Hsueh und Baxter, 1991). Für das Cathepsin D wurde eine dritte „Mischversion“ aus Autoaktivierung und Enzym-assistierter Reifung angenommen (Richo und Conner, 1991; Conner und Richo, 1992; Larsen, Boisen *et al.*, 1993). Mithilfe einer Cathepsin D-Mutante, dem katalytisch inaktiven D231N-Cathepsin D in einer Cathepsin D defizienten Zelllinie, konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Reifung von Cathepsin D unabhängig von seiner Aktivität abläuft und damit einen ähnlich dem Pro-Renin komplett Enzym-assistierten Weg der Aktivierung nimmt (Laurent-Matha, Derocq *et al.*, 2006).

Der initialen kotranslationalen Abspaltung des Signalpeptids folgend entsteht das Procathepsin D. An zwei N-glykosylierbaren Stellen werden Oligosaccharide hinzugefügt. Das 52 kDa schwere Proenzym wandert im Golgi-Apparat in Richtung des Lysosomes. Dabei bindet es an Mannose-6-Phosphat-

Rezeptoren, von denen es in Endosomen getrennt wird (von Figura und Hasilik, 1986; Kornfeld, 1990). Je nach Zelltyp kann das Cathepsin D unabhängig vom Mannose-6-Phosphat-Rezeptor in das Lysosom gelangen (Rijnboutt, Kal *et al.*, 1991; Capony, Braulke *et al.*, 1994).

In Endosomen wird es zur intermediären, einkettigen 48 kDa Form umgewandelt (wohl durch ein anderes Enzym). Diese wesentliche proteolytische Aktivierung hängt wahrscheinlich von lysosomalen Cystein- und/oder Aspartatproteinasen ab (Hentze, Hasilik *et al.*, 1984; Samarel, Ferguson *et al.*, 1989). Anschließend wird die 48 kDa Intermediärform zu der reifen Form mit einer kleineren aminoterminalen (14 kDa) und einer größeren carboxyterminalen (34 kDa) Kette umgebaut. Begleitend zur Konversion in die zweikettige Form werden Aminosäurereste zwischen den beiden Ketten und mehrere Aminosäuren am Carboxyterminus der schweren Kette abgebaut (Erickson und Blobel, 1983; Kobayashi, Honke *et al.*, 1992).

Es wird angenommen, dass der Umbau von lysosomalen Cysteinproteinasen vollzogen wird, da er partiell durch Leupeptin gehemmt werden kann. Mehrere Studien sprechen für eine spezifische Beteiligung von Cathepsin B und L (Laurent-Matha, Derocq *et al.*, 2006; Gieselmann, Hasilik *et al.*, 1985). Im aktiven Zentrum des humanen Cathepsin D befinden sich die Aspartatreste Asp-33 und Asp-231, die sich in der 14 kDa bzw. 34 kDa Kette befinden (Metcalf und Fusek, 1993).

Es bleibt zu erwähnen, dass Procathepsin D, dem Pepsinogen ähnlich, zur säureabhängigen Autoaktivierung *in vitro* befähigt ist. Dies resultiert im aktiven Pseudocathepsin D, ein Enzym, das noch 18 Aminosäuren der Proform in sich trägt (Hasilik, von Figura *et al.*, 1982).

1.2.2.2 Das Cathepsin D und die Apoptose

Die tatsächliche Funktion von Cathepsin D in der Apoptose ist derzeit nicht bekannt. Cathepsin D kann Apoptose verhindern (Saftig, Hetman *et al.*, 1995; Koike, Nakanishi *et al.*, 2000; Koike, Shibata *et al.*, 2003) oder induzieren (Deiss, Galinka *et al.*, 1996; Roberg und Ollinger, 1998; Wu, Saftig *et al.*, 1998; Ollinger, 2000; Kagedal, Johansson *et al.*, 2001; Roberg, 2001; Johansson,

Steen *et al.*, 2003; Takuma, Kiriu *et al.*, 2003; Emert-Sedlak, Shangary *et al.*, 2005).

Durch verschiedenste Agenzien kann Apoptose ausgelöst werden, bei der Cathepsin D ein Schlüsselmediator zu sein scheint (Fehrenbacher und Jaattela, 2005). Beispiele sind IFN- γ , FAS/APO, TNF-alpha (Deiss, Galinka *et al.*, 1996), oxidativer Stress (Roberg und Ollinger, 1998; Kagedal, Johansson *et al.*, 2001; Roberg, 2001; Takuma, Kiriu *et al.*, 2003), Adriamycin und Etoposide (Wu, Saftig *et al.*, 1998; Emert-Sedlak, Shangary *et al.*, 2005), Cisplatin und 5-Fluorouracil (Emert-Sedlak, Shangary *et al.*, 2005) sowie Stauroporine (Johansson, Steen *et al.*, 2003), Thioredoxin-1 (Haendeler, Popp *et al.*, 2005), Resveratrol (Trincheri, Nicotra *et al.*, 2006).

Die Rolle von Cathepsin D wurde im Austritt der reifen 34 kDa Form in das Zytosol gesehen, das dann zum mitochondrialen Ausstrom von Cytochrom c führt (Roberg und Ollinger, 1998; Ollinger, 2000; Kagedal, Johansson *et al.*, 2001; Roberg, 2001; Roberg, Kagedal *et al.*, 2002). Außerdem wurde eine Aktivierung der Procaspasen 9 und 3 (Ollinger, 2000; Roberg, Kagedal *et al.*, 2002; Johansson, Steen *et al.*, 2003; Heinrich, Neumeyer *et al.*, 2004), eine *in vitro* Spaltung von Bid bei pH 6,2 (Heinrich, Neumeyer *et al.*, 2004) sowie die Aktivierung von Bax unabhängig von der Bid Spaltung (Bidere, Lorenzo *et al.*, 2003) beschrieben.

Mehrere Studien zeigten, dass Pepstatin A, ein Aspartatproteinasen-Inhibitor, teilweise die durch bestimmte Agenzien induzierte Apoptose verzögern kann, z.B. von IFN- γ und FAS/APO (Deiss, Galinka *et al.*, 1996), Staurosporine (Terman, Neuzil *et al.*, 2002; Bidere, Lorenzo *et al.*, 2003; Johansson, Steen *et al.*, 2003), TNF-alpha (Deiss, Galinka *et al.*, 1996; Demoz, Castino *et al.*, 2002; Heinrich, Neumeyer *et al.*, 2004), Serum Deprivation (Shibata, Kanamori *et al.*, 1998), oxidativem Stress (Ollinger, 2000; Kagedal, Johansson *et al.*, 2001; Roberg, 2001; Takuma, Kiriu *et al.*, 2003) oder Resveratrol (Trincheri, Nicotra *et al.*, 2006). Die Ko-Mikroinjektion von Cathepsin D mit Pepstatin A konnte die hierdurch ausgelöste Apoptose aufheben (Roberg, Kagedal *et al.*, 2002). Die Autoren dieser zahlreichen Studien sehen die apoptotische Rolle des Cathepsin D in seiner katalytischen Aktivität begründet.

Andere Studien zeigen jedoch, dass Pepstatin A den Zelltod durch Etoposide, Doxorubicin, TNF-alpha oder Anti-CD95 nicht verhindern konnte (Demoz, Castino *et al.*, 2002; Tardy, Tyynela *et al.*, 2003; Emert-Sedlak, Shangary *et al.*, 2005). Nach Ergebnissen von Beaujouin *et al.*, (2006) erhöht die Überexpression einer katalytisch inaktiven Cathepsin D Mutante die Chemosensitivität und apoptotische Antwort auf Etoposide. Hier sprechen sich die Autoren gegen eine proteolytische Beteiligung von Cathepsin D bei seiner apoptotischen Wirkung aus.

Eines der Zielmoleküle von Cathepsin D ist das Thioredoxin-1. Haendeler *et al.*, (2005) untersuchten die Spaltung dieses in der Apoptose durch Cathepsin D im Lysosom. Hier wird eine Rolle des Cathepsin D in der Apoptose vorgeschlagen, bei der nicht das Austreten aus dem Lysosom, sondern die katalytische Aktivität notwendig ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass diese umfangreichen Studien eine entscheidende Beteiligung des Cathepsin D an Apoptose belegen. Es ist denkbar, dass dieses Protein an multiplen Apoptosewegen beteiligt ist. Unklar ist weiterhin, ob nach seinem Austritt aus den Lysosomen für eine Initiierung der Apoptosekaskade seine proteolytische Aktivität benötigt wird.

1.3 Fragestellung

In der vorliegenden Dissertation soll die Bedeutung der katalytischen Aktivität von Cathepsin D bei der Induktion von Apoptose untersucht werden, in dem die nicht aktive Proform des Cathepsin D, das Procathepsin D, in das Zytosol verschiedener Zelllinien mikroinjiziert wird. Die Wirkung soll mit der des reifen Cathepsin D und der des Cytochrom *c* verglichen werden. Weiterhin sollen durch Ko-Mikroinjektion eventuelle Interaktionen des Cathepsin D mit einigen bekannten Faktoren der Apoptose und lysosomalen Proteinen während seiner Aktion im Zytosol untersucht werden. Hierbei handelt es sich um das C₂-Ceramid, dessen apoptotische Interaktionen ansatzweise untersucht worden sind (Misasi, Garofalo *et al.*, 2004), das Saposin B und das Prosaposin.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
12-Bit CCD Monochromkamera	F-View II FW	Soft Imaging System GmbH, Münster
Brutschrank	Function Line	Heraeus, Hanau
Drehrad	Eigenbau der Institutswerkstatt	Werkstatt des Instituts für physiologische Chemie
Druckinjektor	Femtojet	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer	Eigenbau der Institutswerkstatt	Werkstatt des Instituts für physiologische Chemie
ELISA-Reader	MRX	Dynatech Laboratories, Denkendorf
Feinwaage	SBA 33	Scaltec, Heiligenstadt
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX61, mit einer BX-UCB + U- HSTR2 Steuerung und einer U-RFL-T UV- Lampe	Olympus, Hamburg
Flüssigkeitsszintillationszähler	1 600 TR	Canberra Packard, Dreieich
Gefrierschrank -70 °C	Herafreeze	Heraeus, Hanau

Heizblock	Eigenbau der Institutswerkstatt	Werkstatt des Instituts für physiologische Chemie
Kühlzentrifuge	RMC 14	Sorvall, Bad Homburg
Magnetrührer	Ika HTR 80-68	Jahnke & Kunkel GmbH; Staufen i. Br.
Mikroinjektionsnadeln	Femtotipps II	Eppendorf, Hamburg
Mikromanipulator	Injectman NI2	Eppendorf, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop	Telaval 31	Zeiss, Oberkochen
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss Axiovert 10	Zeiss, Jena
pH-Messgerät	Delta 350 & 320	Mettler-Toledo, Giessen
Photometer	Gene Quant	Pharmacia, Freiburg i. Br.
Pipetten	Pipetman P2, P20, P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
Schüttler	Eigenbau der Institutswerkstatt	Werkstatt des Instituts für physiologische Chemie
Software	analySIS 3.2	Soft Imaging System GmbH, Münster
Software	ImageJ Version 1.42	Rasband, W.S., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Software	Photoshop, Version 9	Adobe, San Jose, USA

Sterile Werkbank	Modell ET 130V/UV	Ehret, Emmerdingen
Sterile Werkbank	Typ. KS18	Herasafe, Kendro
Tischzentrifuge	PicoFuge	Stratagene, Heidelberg
Tischzentrifuge gekühlt	ST 21	Sorvall, Bad Homburg
Ultrazentrifuge	Combi Plus	Sorvall, Bad Homburg
Vortexer	Vortex-Genie 2	Bender & Hohbein, Zürich
Waage	BP 410	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Thermomix BU	Braun, Melsungen
Wasserbad	1003	GFL, Burgwedel
Wasserentionisierungsanlage	Milli Q UF plus	Millipore, Erkrath
Wippe	Eigenbau der Institutswerkstatt	Werkstatt des Instituts für physiologische Chemie
Zellzählgerät	Casi 1 DT	Schärfe, Reutlingen
Zentrifuge	Labofuge 400 e	Heraeus, Hanau

2.1.2 Seren und Antiseren

Kaninchen-Antiserum gegen humanes Cathepsin D/Glycerin 50%	Eigene Herstellung (Lemansky und Hasilik, 2001)
Ziegen-Antiserum gegen Kaninchen-IgG	Bio-Rad, Richmond, Californien (USA)
Ziegenkontrollserum	Eigene Herstellung (Lemansky und Hasilik, 2001)

2.1.3 Radiochemikalien

³⁵ S-Translabel: [³⁵ S]Cys(30 %)/Met(70 %)	ICN, Meckenheim
[¹⁴ C] methylierte molekulare Standards für die Gelelektrophorese mit der Zusammensetzung: Myosin 220 kDa, Phosphorylase-b 97,4 kDa, Rinderserumalbumin 66 kDa, Ovalbumin 46 kDa, Carboanhydrase 30 kDa, Lysozym 14,3 kDa	Sigma, Deisenhofen

2.1.4 Laborchemikalien

Die im Folgenden aufgelisteten Laborchemikalien wurden mindestens in *p.a.* Qualität eingesetzt.

Chemikalie	Hersteller	Ort
Ac-DEVD-CHO	Calbiochem	San Diego, CA
Acrylamid	Serva	Heidelberg
Annexin V Alexa Fluor 350 conjugate	Molecular Probes	Eugene, Oregon
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck	Darmstadt
Bisacrylamid	Serva	Heidelberg
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt

BSA (Rinderserumalbumin)	Serva	Heidelberg
C ₂ -Ceramid (N-Acetyl-D-Sphingosin)	Sigma	München
CaCl ₂ (Kaliumchlorid)	Merck	Darmstadt
Cathepsin D	In der Arbeitsgruppe aus Plazenten gereinigt	
Cell Death Detection ELISA plus	Roche	Penzberg
CNBr fast flow Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech	München
Coomassie Brilliant Blue R	Serva	Heidelberg
Cytochrom c	Sigma	München
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	Hoechst Dye 33342, Sigma	München
Dextran-konjugiertes Alexa Fluor 488 (Molekulargewicht 10.000)	Molecular Probes	Eugene, Oregon
Dextran-konjugiertes Texas Red (Molekulargewicht 10.000)	Molecular Probes	Eugene, Oregon
Diphenyloxazol (DPO)	Roth	Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth	Karlsruhe
DSP (Dithiobis-succinimidyl- propionat)	Sigma	München
DTT (Dithiothreitol)	Merck	Darmstadt

ECL™ Western Blotting <i>Detection Reagents</i>	Amersham Pharmacia Biotech	München
EDTA (Ethylendiamin- tetraacetat, di-Na Salz)	Merck	Darmstadt
Ethanol	Roth	Karlsruhe
FBS (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	Boehringer	Mannheim
Glutamin	Boehringer	Mannheim
Glycerin	Serva	Heidelberg
Glycin	ICN	Meckenheim
<i>Goat anti-rabbit IgG-HRP</i>	Bio-Rad	München
HCl (Salzsäure, 32%)	Merck	Darmstadt
Hygromycin B	GIBCO-BRL	Karlsruhe
IAA (Iodazetamid)	Serva	Heidelberg
Mowiol	Hoechst	Frankfurt
Na ₃ PO ₄ (Natriumphosphat)	Merck	Darmstadt
Na-Desoxycholat	Merck	Darmstadt
NaN ₃ (Natriumazid)	Merck	Darmstadt
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck	Darmstadt
Natriumacetat	Merck	Darmstadt
NP-40 (Nonidet P-40)	Boehringer	Mannheim
Pansorbin (in Formaldehyd fixierte Staphylokokken- zellwände (StaphA), 10 % Suspension	Merck	Darmstadt

Paraformaldehyd	Serva	Heidelberg
Penicillin G	GIBCO-BRL	Karlsruhe
Percoll	Pharmacia-Biotech	Freiburg
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva	Heidelberg
Procathepsin D	In der Arbeitsgruppe hergestellt (Gopalakrishnan, Grosch <i>et al.</i> , 2004)	
Propidium Jodid	Fluka BioChemika	Buchs, Schweiz
Saccharose	Roth	Karlsruhe
Sapoin B	Arbeitsgruppe Prof. Sandhoff	Bonn
SDS (Natriumdodecylsulfat, 100 % C-12)	Roth	Karlsruhe
SDS-PAGE Standard, <i>broad range</i>	Bio-Rad	München
Streptomycin	GIBCO-BRL	Karlsruhe
Tris (Trishydroxymethyl- aminomethan)	ICN	Meckenheim
Triton X-100	Serva	Heidelberg
Trypsin-Lösung	GIBCO-BRL	Karlsruhe

Das verwendete Wasser entstammte in allen Fällen der MiliQ UF-Anlage (Fa. Millipore, Erkrath).

2.1.5 Medien und Waschlösungen

- Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM), Eagle, 1959
- Eagle's Minimal Essential Medium (MEM), E15-024, PAA Laboratories, Pasching, Österreich
- Puck's Lösung:

0,8 % (w/v)	NaCl
0,04 % (w/v)	KCl
0,035 % (w/v)	NaHCO ₃
0,1 % (w/v)	Glucose
0,02 % (w/v)	EDTA
0,1 % (w/v)	Trypsin
- Trypsin/EDTA (0,05 % in PBS (*phosphate buffered saline*), L11-004, PAA Laboratorien, Pasching, Österreich)
- PBS: 0,14 M NaCl, 10 mM Na-Phosphat, pH 7,0
- Markierungsmedium (MEM ohne Cystein und Methionin)

2.1.6 Eukaryote Zelllinien

- Fibroblasten: Menschliche Vorhautfibroblasten wurden bei der Firma Promocell (Heidelberg, Deutschland) erworben.
- HeLa Zellen (Epithelzellen des Zervixkarzinoms von Henrietta Lacks)

2.1.7 Sonstige Materialien

Kunststoff- und Glasartikel	Hersteller	Ort
1,5 ml Reaktionsgefäße	Greiner	Nürtingen
6-Well (3,5 cm) Platten	Greiner	Nürtingen
Cellophanfolie	Pütz Folien	Taunusstein-Wehen
Einmalpipetten (1 ml, steril)	Falcon	Heidelberg
Kulturflaschen (25 cm ²)	Greiner	Nürtingen
Kunststoffröhrchen (10 ml, 12 ml, 50 ml) steril	Greiner	Nürtingen
Microloader	Eppendorf	Hamburg
Objektträger 75x26 mM	Menzel-Gläser	Braunschweig
Petrischalen (9 cm)	Greiner	Nürtingen
Röntgenfilme XAR-5	Kodak AG	Stuttgart
Sterilfilter	Schleicher & Schuell	Dassel
Szintillationsröhrchen	Packard	Groningen/Holland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Menschliche Vorhautfibroblasten wurden in MEM mit Zusatz von 2 mM Glutamin, 50 I.U./ml Penicillin-G, 50 µg/ml Streptomycin und 10 % FBS kultiviert. HeLa Zellen wurden in DMEM kultiviert, mit dem Zusatz von 50 I.U./ml Penicillin-G, 50 µg/ml Streptomycin und 10 % FBS. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C aufbewahrt und mit 5 % CO₂ begast. Pro Woche erfolgte eine Passage. Die Zellzahl wurde mittels Zellzählgerät oder einer Neubauerzählkammer bestimmt. Die Experimente wurden durchgeführt als sich die Zellen in den Passagen 8-15 befanden. Etwa 24 h vor der Mikroinjektion wurden die Fibroblasten mit einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² auf Deckgläschen in 35 mM Platten angesiedelt.

2.2.2 Mikroinjektion

Alle Injektionsversuche fanden mit der Absicht statt, in das Zytosol zu treffen. Die Einstellungen am Gerät wurden folgendermaßen vorgenommen: 100 hPa Druck, 1,5 sec Einstichdauer, Gegendruck von 150 hPa. Hierdurch konnte in allen Versuchen das Mikroinjektionsvolumen pro Zelle konstant gehalten werden. Pro Versuchsansatz wurden auf 4 Deckgläschen mit Fibroblasten oder HeLa Zellen jeweils ca. 250 Zellen mikroinjiziert. Zum Nachweis der gelungenen Mikroinjektion enthielten alle Injektionslösungen 1 mg/ml Dextran-konjugiertes Alexa Fluor 488 gelöst in PBS pH 7,0 oder Dextran-konjugiertes Texas Red in der Konzentration 0,5 mg/ml.

Je nach Fragestellung enthielten die Injektionslösungen folgende Substanzen:

- 0,5 mg/ml Cathepsin D (Konzentration bestimmt über OD₂₈₀) in PBS nach Roberg *et al.*, (2002)
- 0,5 mg/ml Procathepsin D in PBS.
- 3 mg/ml Cytochrom c in PBS.

- 25 μM *caspase-3-like proteinase inhibitor* Ac-DEVD-CHO in PBS. Dieser wurde allein und in Kombination mit Cathepsin D oder Procathepsin D injiziert.
- 5 μM Pepstatin A mit und ohne Procathepsin D oder Cathepsin D
- 0,5 mg/ml Prosaposin in PBS mit und ohne Procathepsin D.
- 13 μM C₂-Ceramid gelöst in PBS mit 1 % DMSO mit / ohne Cathepsin D.
- PBS mit 1 % DMSO als Kontrolle für den C₂-Ceramid Versuch.
- 13 μM Saposin B gelöst in PBS allein und mit Cathepsin D.
- PBS ohne Zusatz von Protein als Kontrolle.

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Nach der Mikroinjektion wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und mit frischem Medium weitere 30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml PBS gereinigt und abfotografiert. Nach dem Fotografieren wurden die Zellen in Medium überführt und für weitere 11,5 h im Brutschrank inkubiert.

Nach dieser Inkubationsperiode von 12 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit DAPI oder Annexin V Alexa Fluor 350 Konjugat gefärbt und erneut abfotografiert.

Es wurden folgende Farbfilter verwendet:

Filtername	Färbungen	Anregungswellenlänge in nm	Emissionswellenlänge in nm
DAPI	DAPI, Annexin V	330 - 385	345 - 455
FITC	Alexa Fluor 488	470 - 490	494 - 518
TRITC	Texas Red, Propidium Jodid	530 - 550	555 - 580

Die Zellen wurden (nach 30 min und 12 h) in 100facher Vergrößerung Gesichtsfeld für Gesichtsfeld digital fotografiert mit der Zielsetzung, alle Gesichtsfelder mit injizierten Zellen bei einer Überlappung von ca. 50 % zu erfassen. Anschließend wurden durchgehende Hintergrundartefakte mit dem Programm ImageJ durch einen „Rolling Ball“-Algorithmus entfernt (Abbildung 1). Weiterhin wurden durch unterschiedliche Zellhöhen entstandene Unschärfen mit Hilfe der Dekonvolution anhand einer PSF (*Point Spread Function*) Matrix durch ImageJ entfernt. Die einzelnen Gesichtsfelder wurden mit der Funktion *Photomerge* des Programms Photoshop zu einem Bild der gesamten Zellpopulation zusammengefügt und unter optischer Kontrolle ausgezählt.

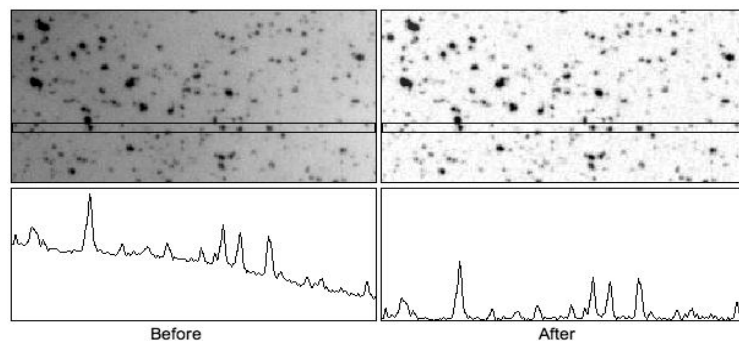


Abbildung 1: Grafische Darstellung der Software Funktion nach ImageJ

2.2.4 Der Nachweis von Apoptose

2.2.4.1 Die DAPI Färbung

4,6-Diamidino-2-phenylindol wurde in einer Konzentration von 4 µg/ml zum Medium der mikroinjizierten Zellen gegeben, diese wurden 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Zellen mit homogen gefärbten, rundlichen Kernen wurden als nicht apoptotisch, während Zellen mit hell aufleuchtenden Kernen, kondensierten oder „gelöcherten“ bzw. einer fragmentierten Kernfärbung als apoptotisch gewertet wurden.

2.2.4.2 Die Annexin V Färbung

Ein Annexin-Bindungspuffer wurde gemäß dem Ratschlag des Herstellers angesetzt: 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7,4 (mit NaOH eingestellt). Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gereinigt. Es

wurden 200 µl des Annexin-Bindungspuffers mit 20-80 µl „Annexin V conjugate“ und 1 µg/ml Propidiumjodid auf die Zellen getropft und 15 min bei RT (Raumtemperatur) auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin-Bindungspuffer gewaschen, fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.4.3 Die Fixierung der Zellen

Zur Fixierung nach den Versuchen wurden die Deckgläschen mit eiskaltem PBS gewaschen, 20 min mit 4 % Paraformaldehyd in H₂O bei RT versetzt und nach erneutem dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS in 10 µl vorgewärmten Mowiol auf Objektträger gebettet.

2.2.4.4 Der Apoptosenachweis mittels ELISA

Der ELISA basiert auf dem *in vitro* Nachweis von zytoplasmatischen Histon-assoziierten-DNA-Fragmenten (Mono- und Oligonukleosomen), die bei Apoptose gebildet werden. Eine Streptavidin beschichtete Platte kann das Anti-Histon-Biotin binden, dieses bindet die bei der Apoptose entstehenden Nukleosome. Auf der anderen Seite binden die Nukleosome Anti-DNA-POD (Peroxidase), die das Substrat ABTS spaltet und die Lösung grün verfärbt. Der Aufbau dieses käuflichen Produktes entspricht einem Sandwich-ELISA und wird in der Abbildung 2 des Herstellers verdeutlicht.

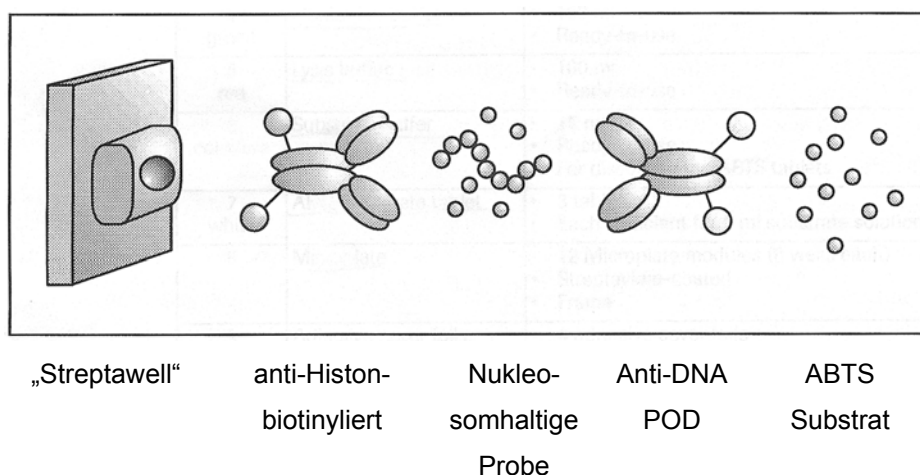


Abbildung 2: Funktionsweise des ELISA-Nachweises der Apoptose

Etwa 12 h nach der Mikroinjektion, mit und ohne 0,5 mg/ml Procathepsin D, von 1.500 - 2.500 dicht in der Mitte eines Deckgläschens angesiedelten Zellen wurden diese mit 30 µl Lysispuffer aus dem Kit lysiert, in Kunststoffbehälter überführt und gemäß den Anforderungen des Herstellers dem ELISA zugeführt. Das Lysat wurde zunächst für 10 min bei 200 x g (Vielfaches der Erdbeschleunigung) zentrifugiert. Vorsichtig wurden 20 µl des Überstandes, der die Zytoplasmafraktion darstellte, in die mit Streptavidin beschichteten Mikroplatten übertragen. Die Lysate der mikroinjizierten Zellen lagen hierbei als Doppelproben vor, um Ungenauigkeiten zu vermeiden. Der Mikroplatte wurden ebenfalls Proben der Positiv- und Negativkontrollen und einer Hintergrundkontrolle aus dem Kit beigelegt. Zu allen Proben wurde 80 µl sog. *Immunoreagent* hinzugefügt, das aus 72 µl *Incubation buffer*, 4 µl Anti-Histone-Biotin und 4 µl Anti-DNA-POD aus dem Kit bestand. Nach sorgfältiger Abdeckung inkubierte die befüllte Mikroplatte auf einem Schüttler bei 300 rpm (Umdrehungen pro Minute) für 2 h, bei einer Temperatur von 20 °C. Klopfend wurde die Flüssigkeit aus den Mikroplatten entfernt und sie wurden 3-mal mit jeweils 250 µl *Incubation buffer* gewaschen. Anschließend bekam jede Probe 100 µl der ABTS Lösung aus dem Kit, wurde für 20 min bei 250 rpm erneut auf dem Schüttler inkubiert und dem ELISA-Reader zugeführt. Gemessen wurde bei 405 nm, als Referenzwellenlänge dienten 490 nm. Der Messwert der ABTS-Lösung wurde von den erzielten Werten abgezogen.

2.2.5 Auswertung

Mit dem oben dargestellten Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie entstanden zwei Aufnahmen von den mikroinjizierten Zellen: eine 30 min und eine 12 h nach der Mikroinjektion. Zunächst wurden die sichtbaren Zellen beider Aufnahmen gezählt und aufeinander bezogen. Gab es nach 12 h weniger Zellen als nach 30 min, wurde gefolgert, dass diese an Apoptose verstorben sind. Zu dieser „Differenz“ zwischen 30 min und 12 h wurden außerdem alle Zellen gezählt, die nach 12 h eine apoptotische Morphologie aufwiesen. Als apoptotisch wurden pyknotische, geschrumpfte und rundliche Zellen gezählt. Hierbei wurde die DAPI- und Annexin-Färbung herangezogen und der Anteil apoptotischer Zellen nach 12 h ermittelt. Dieser Anteil wurde zu der Differenz zwischen der Zellzahl nach 30 min und 12 h addiert und

die „gesamte apoptotische Menge“ auf die Gesamtzellzahl nach 30 min bezogen.

$$\frac{(Zellanzahl_{30\text{min}} - Zellanzahl_{12h}) + \text{apopt.Zellen}_{12h}}{Zellanzahl_{30\text{min}}} \times 100 = \text{Apoptoserate } [\%]$$

Alle Prozentwerte sind auf ganze Zahlen gerundet worden. Die Fotografien der Zellen wurden von mindestens zwei Personen ausgezählt und beurteilt. Alle Versuche wurden mindestens 4-mal durchgeführt.

2.2.6 Statistische Analysen

Die Signifikanzprüfung erfolgte mit einem nichtparametrischen Test für zwei unabhängige Stichproben, dem Mann-Whitney U-Test. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

2.2.7 SDS-PAGE

(Laemmli, 1970)

Es wurden 1,0 mM dicke 15%ige Polyacrylamidgele (PAA-Gele) folgender Zusammensetzung verwendet:

	Sammelgel (ml)	Trenngel (ml)
30 % (w/v) Acrylamid	1,6	15
1 % (w/v) Bisacrylamid	1,1	4
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	2,5	-
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	-	7,5
Aqua dest.	4,7	4,1
10 % (w/v) SDS (100 % C-12)	0,1	0,3
TEMED	0,01	0,025
25 % APS	0,04	0,1

Die vormontierte Gelapparatur (Eigenbau der Institutswerkstatt) wurde bis 4 cm unter den Rand mit Polyacrylamid-Lösung für das Trenngel gegossen und nach dessen Polymerisation wurde das Sammelgel bis an die Oberkante hin aufgefüllt.

Anschließend wurde der Plastikamm luftblasenfrei eingeführt und die Taschen des Gels ausgeformt. Nach weiteren ca. 30 min war die Polymerisation abgeschlossen und der Kamm wurde entfernt. Nach dem Absaugen der Flüssigkeit aus den Taschen und Einfüllen des oberen Elektrodenpuffers konnten die vorbereiteten Proben in die Geltaschen mit Hilfe von Kapillarspitzen luftblasenfrei pipettiert werden. Taschen ohne Probe wurden mit dem jeweiligen Referenzpuffer gefüllt, äußere Taschen sollten nach Möglichkeit ohne Proben bleiben, um den „*smiling*“ Effekt zu vermeiden. Die Anoden und Kathodenpuffer wurden mit einem Durchflusskühler auf ca. 4 °C geregelt.

Anodenpuffer:	384 mM	Tris
	23 mM	Glycin, pH 8,3
Kathodenpuffer:	0,1 % (w/v)	SDS
	8 x 10 % (w/v)	Bromphenolblau
	in 250 ml Anodenpuffer	

Die Elektrophorese wurde mit 20 mA pro Gel gestartet. Nach dem Einlaufen der Bromphenolbande in das Trenngel wurde auf 30 mA erhöht.

Als molekulare Standards dienten je nach Fragestellung käufliche ¹⁴C-methylierte molekulare Standards oder nicht radioaktive Massenstandards für die Gelelektrophorese. Diese wurden den Proben entsprechend aufbereitet. Im Anschluss wurden die Proteine im Gel fixiert und mittels Coomassie- oder Silberfärbung (Merril, Goldman *et al.*, 1981) sichtbar gemacht.

2.2.8 Die Western-Blot-Analyse

Um eine mögliche zytosolische Spaltung des Procathepsin D zu untersuchen, wurde Procathepsin D in das Zytoplasma von 6.000 Zellen mikroinjiziert. Diese wurden 8 h später mit 20 µl mit folgendem Puffer lysiert: 20 mM DTT, 2 % (w/w) SDS, 0,5 M Tris pH 6,8, 26 % (v/v) Glycerol. Die Proben wurden anschließend in einem Polyacrylamidgel (s.o.) elektrophoretisch aufgetrennt und durch eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach einer Inkubation von 30 min in 5 % (w/v)

Trockenmilchpulverlösung in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM CaCl₂, 0,01 % Antifoam A, 0,05 % Triton X-100, 0,02 % NaN₃ (Blockpuffer) wurde das Gel über Nacht mit *rabbit anti-cathepsin D* Antikörpern, die Cathepsin D als auch Procathepsin D binden in der Verdünnung von 1:3.000 in 10 ml Blockpuffer im Schüttler inkubiert. Die Blots wurden 30 min lang mit TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl) und TBST (TBS mit 0,5 % Tween 20) gewaschen. Für 2 h wurde dann bei 37 °C mit dem zweiten Antikörper, dem *goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate*, der spezifisch den ersten Antikörper bindet in der Verdünnung 1:6.000 in Blockpuffer inkubiert. Nach einem Waschschrift mit TBS und TBST, wurden die ECLTM Western Blotting Detection Reagents benutzt den Anweisungen des Herstellers folgend, um Proteine auf der Membran nachzuweisen. Nach 2 min Inkubationsperiode wurden die Blots auf einem Röntgenfilm nach 5 und 15 min entwickelt.

2.2.9 Affinitätschromatografie

(Cuatrecasas, 1970)

2.2.9.1 Herstellung von Zytoplasmaextrakt

Zwei große, konfluente Kulturflaschen Fibroblasten oder HeLa Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, abgeschabt und bei 400 x g für 5 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde anschließend in 6 ml Homopuffer (250 mM Sucrose, 10 mM Essigsäure, 10 mM Triethanolamin, 5 mM EDTA, pH 7,4) gelöst. Es folgte eine Stickstoff-Kavitation für 15 min. Nach einer Zentrifugation bei 1 200 rpm für 10 min bei 4 °C ohne Bremsfunktion wurde der Überstand, der dem postnukleären Überstand entspricht, abgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 14.000 rpm für 15 min bei 4 °C in der Eppendorffzentrifuge wurde der Überstand abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung gekühlt gelagert.

2.2.9.2 Ligandenchromatographie

Zur Erstellung der Affinitätssäule wurden 18 mg CNBr *fast flow* Sepharose abgewogen, gemäß den Hinweisen des Herstellers mit 1 mM HCl gespült, trocken gesaugt und mit jeweils 75 µg Cathepsin D oder Procathepsin D in 0,1 M NaHCO₃ bei pH 8,5 vermengt. Nach 15 min bei RT und 5 h bei 4 °C auf

dem Drehrad, wurde für 12 h bei 4 °C 40 µl Ethanolamin (1 M, pH 8) bzw. Tris-HCl 0,1 M pH 8 zum Blockieren von möglichen freien Bindungsstellen hinzugegeben. Anschließend folgten 6 Waschgänge abwechselnd mit 250 µl 0,1 M Natriumacetat und 1 mM Pepstatin A bei pH 3,6 und 250 µl 0,1 M Tris-HCl bei pH 8. Zwischen den Waschschrritten erfolgten Zentrifugationsschritte bei 4 °C, mit 2 000 rpm über 2 min. Nach einer abschließenden Reinigung mit PBS pH 7,0 wurde die Säule in einer gelben Pipettenspitze unter Zuhilfenahme von silanisierter Glaswolle hergestellt.

Beispielhafter Durchlauf:

Zytoplasmatischer Extrakt von Fibroblasten oder HeLa Zellen mit dem Volumen von ca. 500 µl wird nach und nach auf die Säule aufgetragen, der Durchbruch wird unten gesammelt. Anschließend wird 3-mal mit Homopuffer gewaschen und eluiert: zunächst 2 Säulenvolumina Salzlösung: 0,5 M NaCl, 25 mM Phosphat, pH 7,2. Danach 2 Säulenvolumina Puffer: 0,25 M Acetat, 0,25 M Formiat, 1 µM Pepstatin A, pH 3,5. Schließlich 2 Säulenvolumina Homopuffer durchlaufen lassen. Säule waschen, in PBS mit Parafilm verschließen und kühl lagern.

Zu den gesammelten Proben wurde das 4-fache Volumen 100%iges Aceton gegeben und die Proben bei -20 °C gelagert.

Zur Auswertung wurden die Proben bei 14.000 rpm, 4 °C für 10 min zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Niederschläge mit 20 µl *solubilizer* (120 mM DTT, 2 % w/w SDS, 0,5 M Tris pH 6,8, 26 % v/v Glycerol) für 5 min bei 95 °C inkubiert.

Für das Silbergel wurden die Proben mit jeweils 5 µl JAA versetzt, 10 min bei 37 °C inkubiert und aufgetragen.

2.2.10 ³⁵S-Met-Markierung von humanen Vorhautfibroblasten

Eine konfluente Flasche Fibroblasten wurde 3-mal mit Hungermedium gewaschen (Hungermedium enthielt kein FBS, kein Cystein und Methionin). Die Zellen bekamen 5 ml Hungermedium und 10 % dialysiertes FBS und wurden 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend folgte ein Waschgang nach dem

Hungermedium mit 1 mCurie (100 µl) ³⁵S-Met-Label über Nacht hinzugefügt wurde. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 2-mal mit 10 ml PBS gewaschen, das Markierungsmedium wurde eingefroren. Nach dem Abschaben der Zellen in 10 ml PBS wurde 5 min bei 300 x g zentrifugiert und der Niederschlag in 50 µl PBS gelöst. Folgende Agenzien wurden dann zum Lysieren der Zellen hinzugefügt:

- 1,25 µl 20 % Triton X-100
- 0,5 µl 0,5 M JAA in PBS
- 0,5 µl 0,2 M PMSF

Nach einer Inkubation von 5 min bei RT erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 14.000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung kühl gelagert. Er entsprach dem Zytoplasmaextrakt der markierten Zellen.

2.2.10.1 Quervernetzung des ³⁵S-Met-Label markierten Zytoplasmaextraktes humaner Fibroblasten

Der Zytoplasmaextrakt der markierten Zellen wurde in zwei 15 µl Proben aufgeteilt, zu beiden wurde 1 µg Cathepsin D gegeben. Eine der beiden Proben bekam zusätzlich 1 µl H₂O, die andere 0,3 µl DSP (1 mM in DMSO), dieses wurde 10 min bei 37 °C inkubiert. Zum Blocken der Bindung wurde anschließend 2 µl 100 mM Ethanolamin, pH 8 zum für 2 min bei 37 °C hinzugegeben.

Alle Proben wurden mit folgenden Agenzien aufgefüllt:

- 800 µl TBS mit
 - 0,5 % TX-100
 - 10 % FBS
 - 5 mM JAA

und 8 µl 10 % SDS. Nach zwei Frier/Tau-Schritten bei - 80 °C und 37 °C bekam jede Probe je 100 µl StaphA-Zellwandsuspension (Pansorbin) zur Präadsorption. Nach sorgfältiger Durchmischung kamen die Proben für 30 min bei 9 °C auf ein Drehrad. Diese Inkubation hatte den Sinn, unspezifisch an Staphylokokken bindende Proteine aus dem Überstand zu entfernen und somit

Kontaminationen in der späteren Fluorographie zu vermeiden. Anschließend wurde bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Überstand zu einer zweiten, vorbereiteten StaphA-Zellwandsuspension gegeben und der letzte Schritt wiederholt. Nach den zwei Waschgängen wurde mit 18.000 rpm bei 4 °C für 1 h zentrifugiert.

Es wurden anschließend 5 µg Cathepsin D-Antikörper oder 10 µl α-Cathepsin D-Serum hinzugefügt und bei 9 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben mit je 20 µl einer 10%igen, vorgewaschenen StaphA-Zellwandsuspension versetzt und 30 min bei 9 °C auf dem Drehrad inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Immunkomplexe an das Protein A der Bakterienzellwand gebunden. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min wurden die Überstände eingefroren und die Niederschläge mit verschiedenen Lösungen gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert und die Überstände verworfen.

- 3-mal 0,8 ml Immunomix (0,5 % (w/v) Na-Desoxycholat, 0,5 % (w/v) BSA; 1,0 % (w/v) Triton X-100, 10 mM PBS, pH 7,4) mit 0,2 % SDS
- 2-mal 0,8 ml Immunomix mit 2 M KCl
- 2-mal 0,8 ml Neufeldpuffer (600 mM NaCl, 0,1 % (w/v) SDS, 0,05 % (v/v) NP-40, 10 mM Tris/HCl, pH 8,5)
- 1-mal 0,8 ml 1/10 TBS

Danach wurde jeweils 60 µl 1,5-fach Probenpuffer (125 mM Tris/HCl, 1 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) dazugegeben, und 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach einer letzten Zentrifugation bei 13.000 rpm für 2 min wurde der Überstand abgenommen und in zwei 30 µl Proben geteilt. Zu einer der beiden Proben wurde 3 µl 1M DTT gegeben, zu der anderen 3 µl Wasser. Nach 5 min bei 95 °C wurde ein SDS-PAGE mit käuflichem Massenstandard durchgeführt. Anschließend wurde das Gel zur Vorbereitung für die Fluorographie (Laskey und Mills, 1975) in drei DMSO-Bädern für 20 min gewaschen. Es folgte ein DPO-Bad über Nacht. Nach Wässerung für 45 min wurde das Gel 2 h zwischen zwei Cellophanfolien im Vakuum getrocknet.

Zur qualitativen Auswertung der Gele wurden die radioaktiven Banden auf Röntgenfilmen visualisiert. Hierzu wurden zwei vorgeblitzte (dient der Sensibilisierung des Filmes) XAR-5 Röntgenfilme mit dem getrockneten Gel in einer Röntgenfilmkassette inkubiert. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit erfolgte die Entwicklung und Fixierung des Röntgenfilmes.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion von Apoptose in Fibroblasten und HeLa Zellen durch Procathepsin D

Ziel der Versuche war es, durch die Mikroinjektion von Procathepsin D und der Mikroinjektion von Cathepsin D mit verschiedenen Beimischungen, mögliche proapoptotische Effekte zu untersuchen. Die Kontrollmikroinjektionen zeigten eine apoptotische Morphologie von 7 % nach 12 h Inkubation (Abbildung 3a).

Es zeigte sich, dass nach der Mikroinjektion von 0,5 mg/ml Procathepsin D in das Zytoplasma humaner Fibroblasten eine Induktion apoptotischer Morphologie erfolgte. Nach 12 h war diese bei über 53 % der Zellen nachweisbar (Abbildung 3b, c). Die Färbung mit DAPI zeigte pyknotische Nuklei (Abbildung 4). Die Färbung mit Annexin V indizierte die Translokation des Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Membranseite, was ein Charakteristikum früher Apoptose darstellt (Abbildung 5). Ferner konnte die Induktion apoptotischer Morphologie durch die Mikroinjektion von Cathepsin D nachgewiesen werden, was die Ergebnisse von Roberg *et al.*, (2002) bestätigt (Abbildung 3d).

Das nach Li *et al.*, (1997) mikroinjizierte Cytochrom c (3 mg/ml) löste in den hier präsentierten Versuchen entsprechende Apoptose aus. In HeLa Zellen waren ähnliche Effekte nach der Mikroinjektion dieser drei Proteine nachweisbar. Um wesentliche Effekte der unterschiedlichen Mikroinjektionen darzustellen, z.B. das Zusammenschrumpfen von einzelnen Zellen, wurden die Zellen nach 30 min und 12 h Inkubation (Abbildung 3) abfotografiert.

Caspase 3 ist eine der wichtigsten Effektorcaspasen, wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde. Vor einiger Zeit verwiesen mehrere Studien auf einen Einfluss von Cathepsin D auf die Apoptose vor dem Ausstrom von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Brustugun, Fladmark *et al.*, 1998; Kagedal, Johansson *et al.*, 2001; Roberg, Kagedal *et al.*, 2002; Johansson, Steen *et al.*, 2003). Um die Teilnahme von Caspasen an der Procathepsin D-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden Fibroblasten und HeLa Zellen mit 25 μ M *caspase-3-like proteinase inhibitor* Ac-DEVD-CHO in Kombination mit

0,5 mg/ml Procathepsin D mikroinjiziert. Im Vergleich zur Kontrolle war die Apoptose in diesen Versuchen nicht erhöht (Abbildung 3e). Auch die apoptotischen Effekte von Cathepsin D und Cytochrom c konnten durch eine Ko-Mikroinjektion mit Caspase 3-Inhibitor verhindert werden.

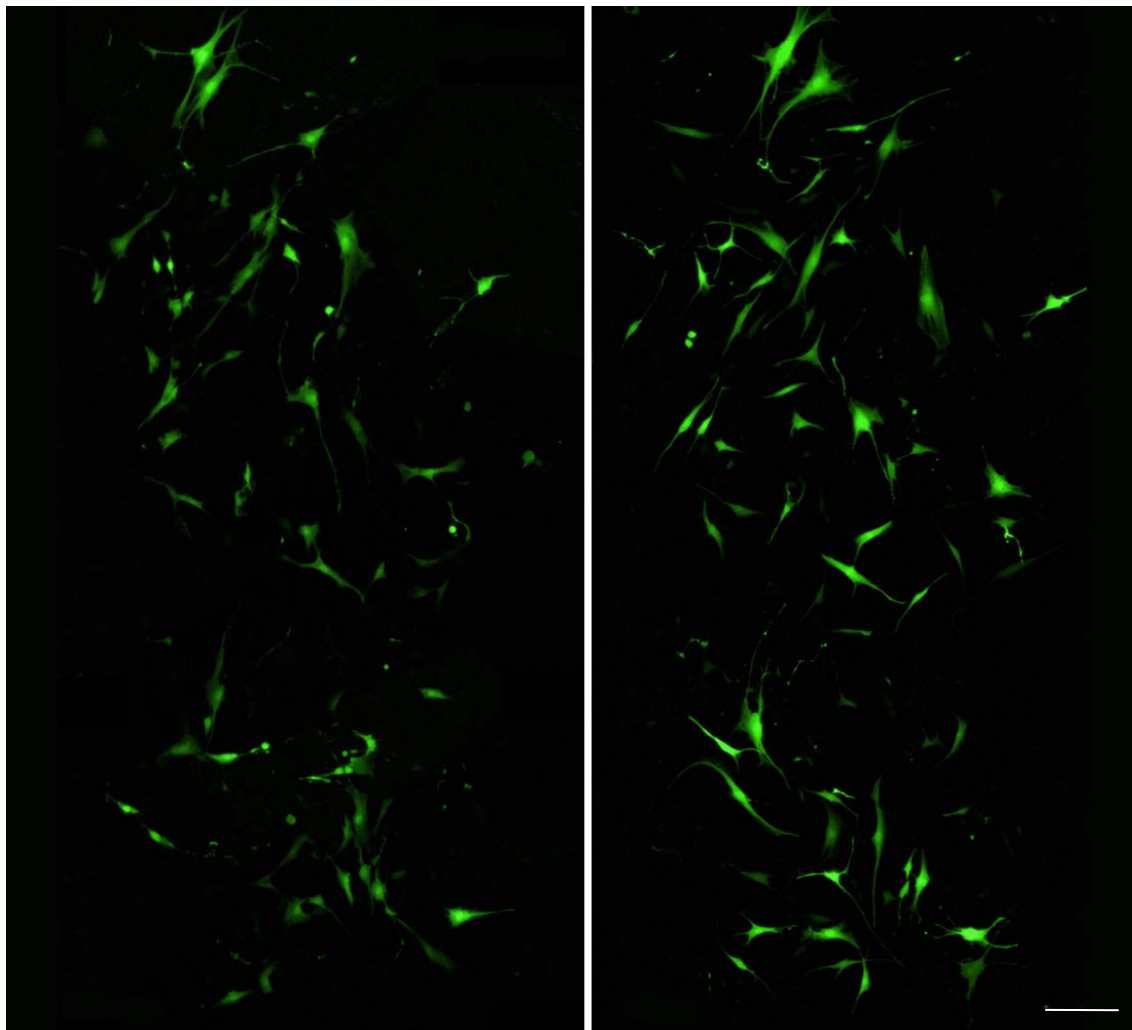
Es wurde der Effekt der Mikroinjektion eines Procathepsin D und Pepstatin A Gemisches untersucht. Hierzu wurden 0,5 mg/ml Procathepsin D mit 5 μ M Pepstatin A mikroinjiziert. Nach 12 h war die Apoptoserate 54 % und damit mit der Apoptoserate ohne der Beimischung von Pepstatin A vergleichbar (Abbildung 3f). In einem Kontrollexperiment wurden Zellen mit 0,5 mg/ml Cathepsin D mit 5 μ M Pepstatin A mikroinjiziert, und auch hier ergab sich im Gegensatz zu Roberg *et al.*, (2002) eine Apoptosequote von 54 % nach 12 h.

Um eine mögliche Spaltung des Procathepsin D nach seiner Mikroinjektion in das Zytoplasma zu untersuchen, wurden 6.000 Zellen mit 0,5 mg/ml Procathepsin D mikroinjiziert, die 8 h später lysiert und einer Western Blot Analyse zugeführt wurden (Abbildung 9). Diese konnte aufzeigen, dass zumindest 8 h nach der Mikroinjektion, wenn apoptotische Effekte bereits messbar waren, das Procathepsin D unverändert im Zytoplasma vorlag. Daraus wurde gefolgert, dass es nicht zu einer Spaltung des mikroinjizierten Procathepsin D während der vorgestellten Experimente kam.

Des Weiteren lässt sich aufzeigen, dass eine Ko-Mikroinjektion von Procathepsin D und Prosaposin zu einer Apoptoserate von 56 % nach 12 h führt. Eine Mikroinjektion von Cathepsin D zusammen mit C₂-Ceramid oder Saposin B führt zu keiner zusätzlichen Änderung der Apoptoserate.

3.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Es wurden drei Methoden zur Einschätzung der apoptotischen Effekte nach Mikroinjektion angewandt: Alexa Fluor-Fotografien mit Vergleich der Zellmorphologie 30 min und 12 h nach der Mikroinjektion, die DAPI Färbung zur Untersuchung der Zellkernmorphologie und die Annexin V Färbung zum Nachweis einer Translokation von Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Membranseite.

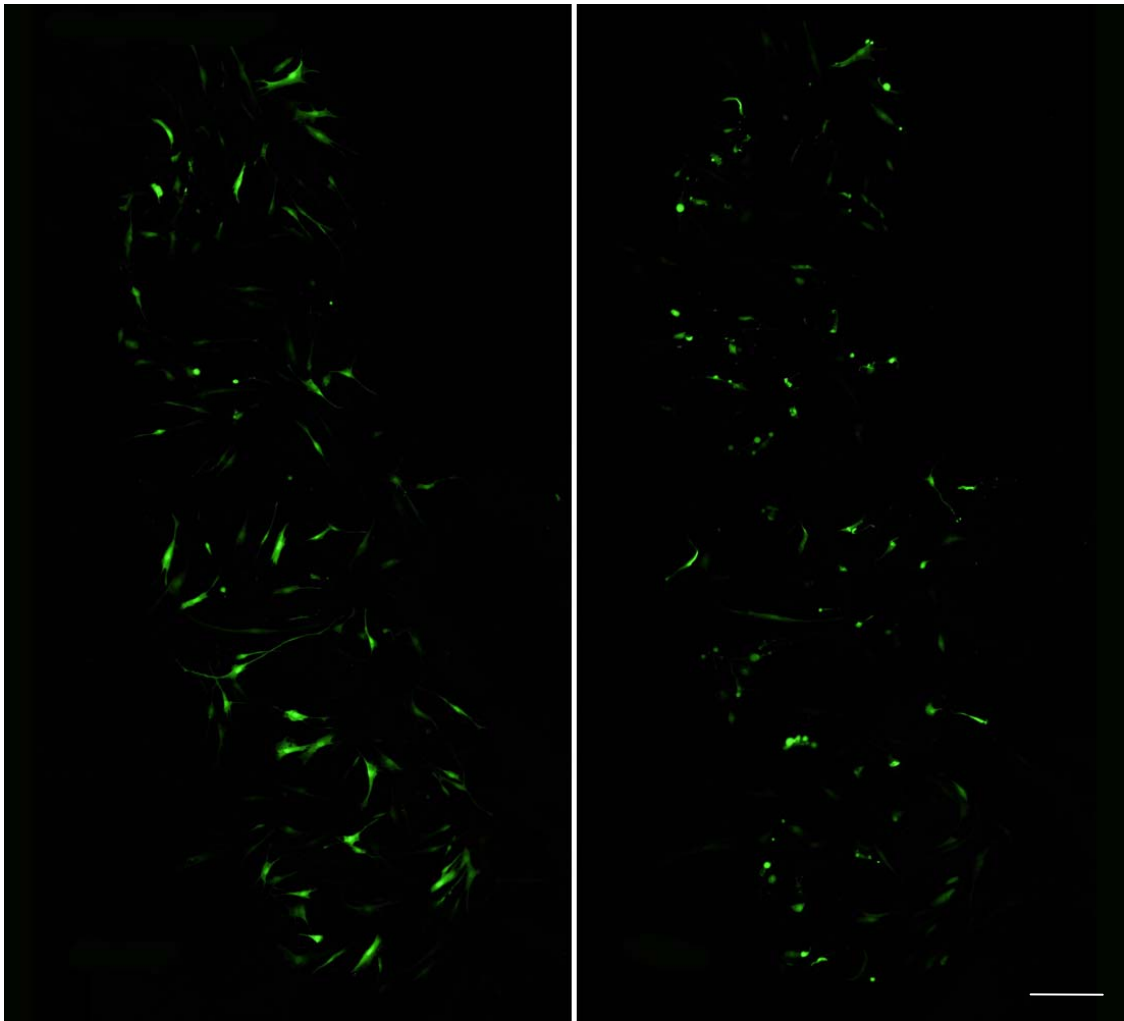


30 min

12 h

Abbildung 3a: Morphologie von Fibroblasten nach Mikroinjektion der Kontrolllösung. Die Kontrolllösung bestand aus 1 mg/ml Alexa Fluor 488 in PBS pH 7,0. Im Vergleich ist die Zellmorphologie unverändert, pyknotische oder abgerundete Zellen bilden sich nicht aus.

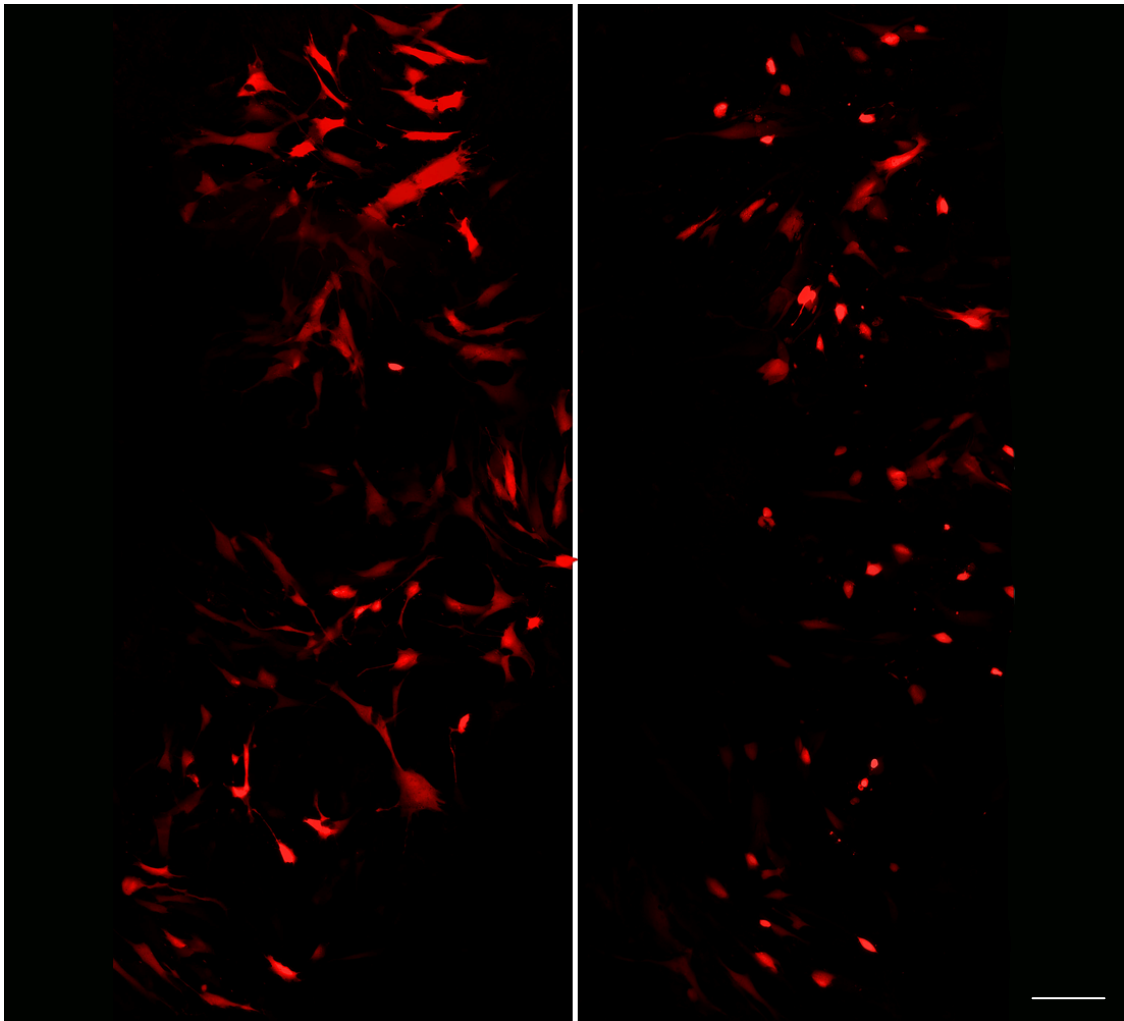
Abbildung 3a-f zeigt Fibroblasten, die 30 min und 12 h nach der Mikroinjektion fotografiert und nach ihrer Morphologie beurteilt wurden. Es wurde auf abgerundete, geschrumpfte Zellen, eine Verringerung der Zellzahl und sog. Membran-*blebbing* nach 12 h geachtet. Der Maßstabbalken unten rechts entspricht 100 μm .



30 min

12 h

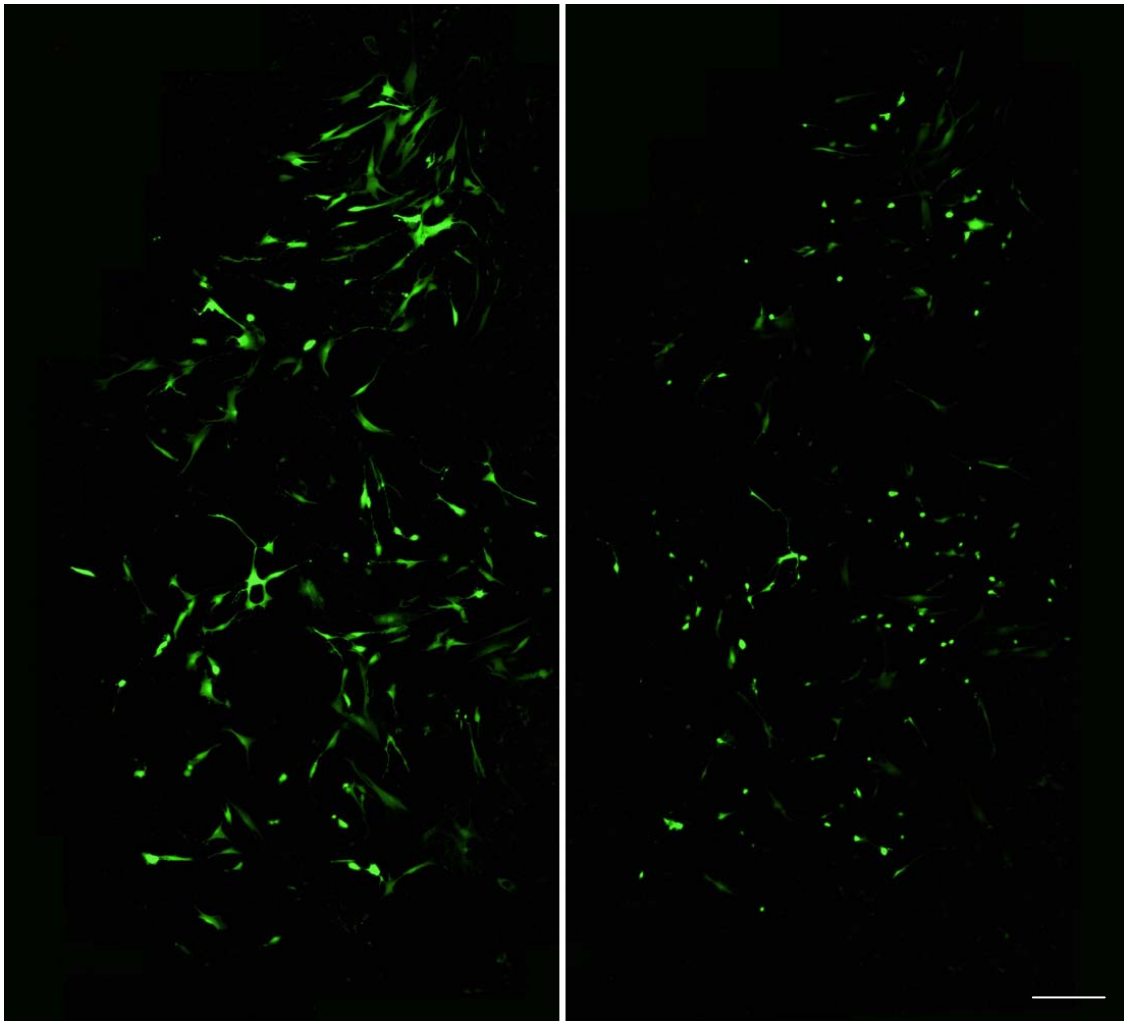
Abbildung 3b: Morphologie von Fibroblasten nach Procathepsin D-Mikroinjektion. Die Zellen wurden mit 0,5 mg/ml Procathepsin D in der Kontrolllösung mikroinjiziert. Es folgen deutliche morphologische Veränderungen nach 12 h, im Sinne einer Abrundung der Zellen, Verlust der Zell- Zellkontakte und einem Zellzahlverlust.



30 min

12 h

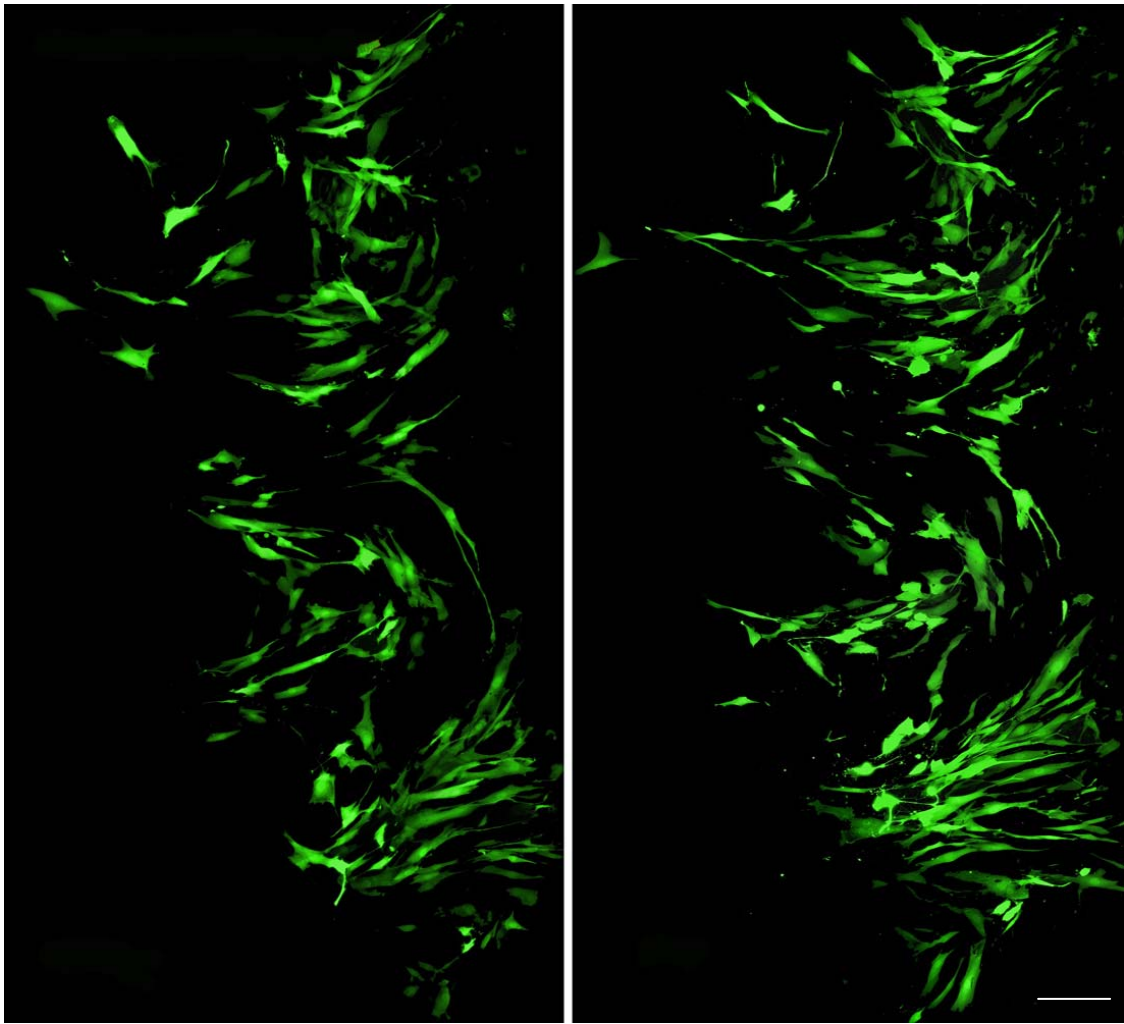
Abbildung 3c: Morphologie von Fibroblasten nach Procathepsin D-Mikroinjektion. Die Zellen erhielten 0,5 mg/ml Procathepsin D in Texas red als Kontrolllösung. Es sollte der Effekt des mikroinjizierten Farbstoffes untersucht werden. Auch in diesem Versuch zeigen sich deutliche morphologische Veränderungen der Zellen nach 12 h.



30 min

12 h

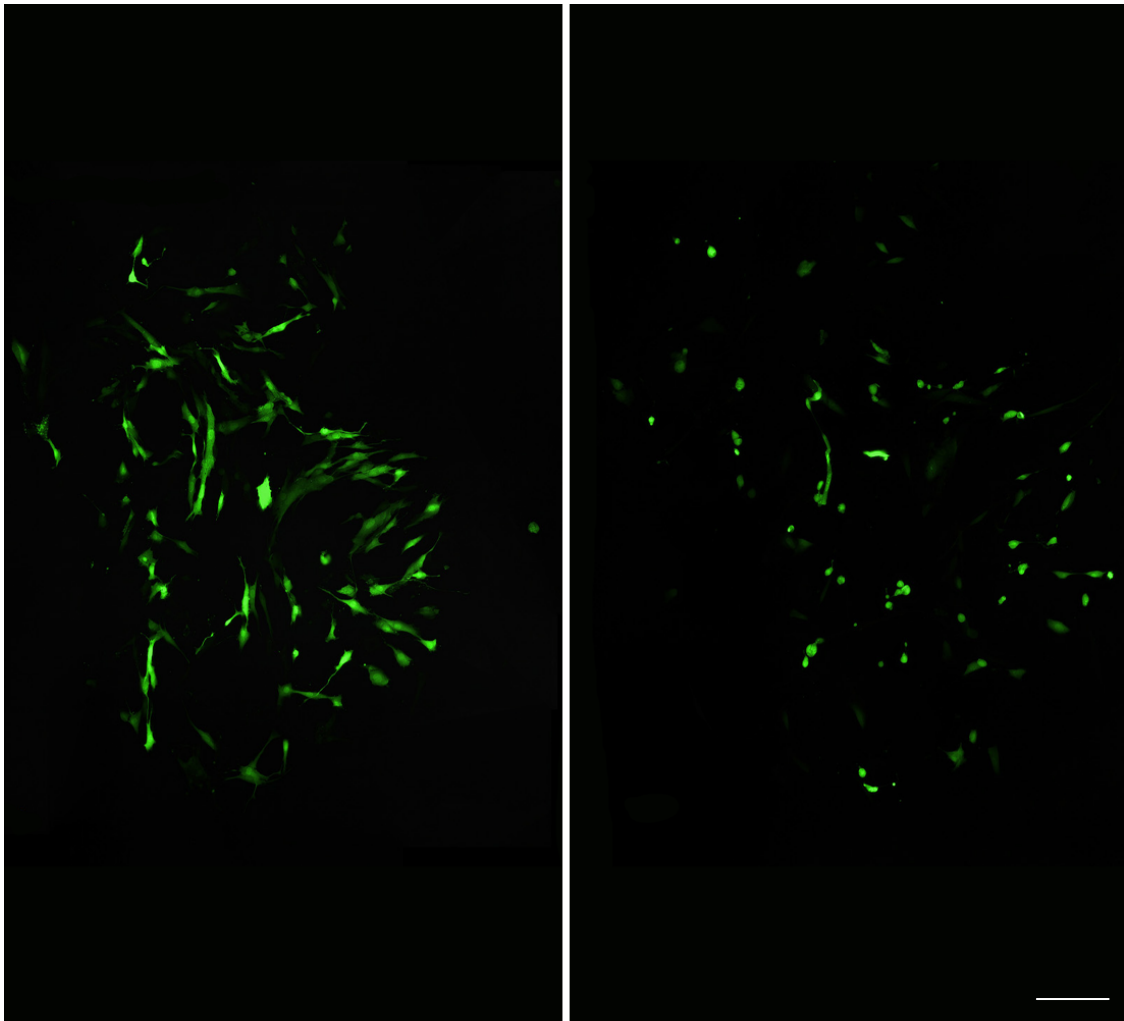
Abbildung 3d: Morphologie von Fibroblasten nach Cathepsin D-Mikroinjektion. Nach der Mikroinjektion von 0,5 mg/ml Cathepsin D in der Kontrolllösung sind die Effekte mit denen nach Procathepsin D Mikroinjektion vergleichbar.



30 min

12 h

Abbildung 3e: Morphologie von Fibroblasten nach Procathepsin D- und Caspase 3-Inhibitor-Mikroinjektion. Es erfolgte eine Mikroinjektion von 0,5 mg/ml Procathepsin D und 25 μ M Ac-DEVD-CHO (Caspase 3-Inhibitor) in der Kontrolllösung. Eine apoptotische Morphologie nach 12 h ist nicht erkennbar.



30 min

12 h

Abbildung 3f: Morphologie von Fibroblasten nach Procathepsin D- und Pepstatin A-Mikroinjektion. Es erfolgte die Mikroinjektion von 0,5 mg/ml Procathepsin D mit 5 μ M Pepstatin A in der Kontrollösung. Es findet sich apoptotische Morphologie nach 12 h und damit kein protektiver Pepstatin A Effekt.

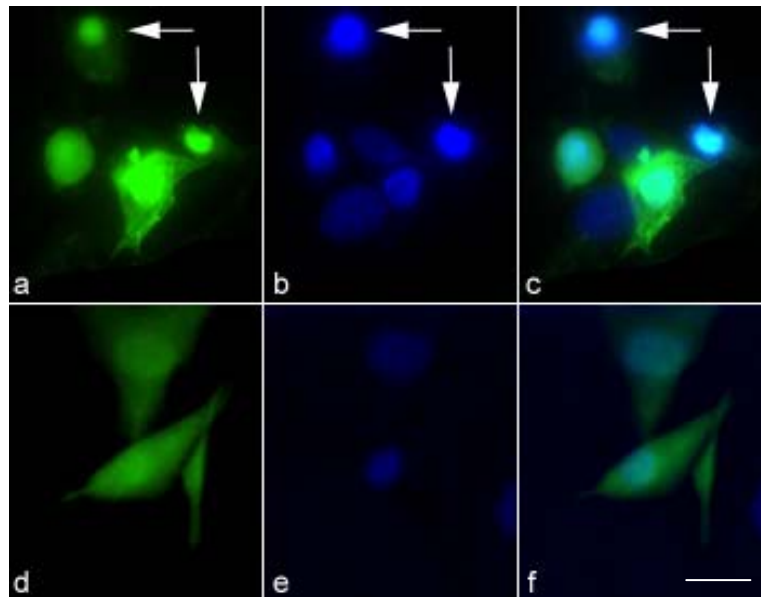


Abbildung 4: DAPI Färbung zum Vergleich apoptotischer und Kontrollfibroblasten. Bei der Färbung mit DAPI, die bei Kontrollen und Procathepsin D mikroiinjizierten Zellen nach 12 h Inkubationszeit erfolgte, wurde auf ein helleres Farbstoffsignal (das von der Mikroskopkamera nicht identisch wiedergegeben werden kann), auf pyknotische Nuklei, abgerundete Zellen, Kondensation der DNA und Fragmentierung in kleine Stücke geachtet. Die Aufnahmen a, b und c zeigen mit 0,5 mg/ml Procathepsin D mikroiinjizierte Zellen nach 12 h in der DAPI (b) und Alexa Fluor (a) Färbung und als Überlagerung der beiden Farbstoffe (c). Erkennbar ist eine Aufhellung des DAPI-Signals und eine veränderte Kernmorphologie in den abgerundeten, geschrumpften Zellen (mit Pfeilen markiert). Die Aufnahmen d, e und f zeigen eine DAPI Färbung nach der Mikroiinjektion der Kontrolllösung. Der Maßstabbalken unten rechts entspricht 25 μm .

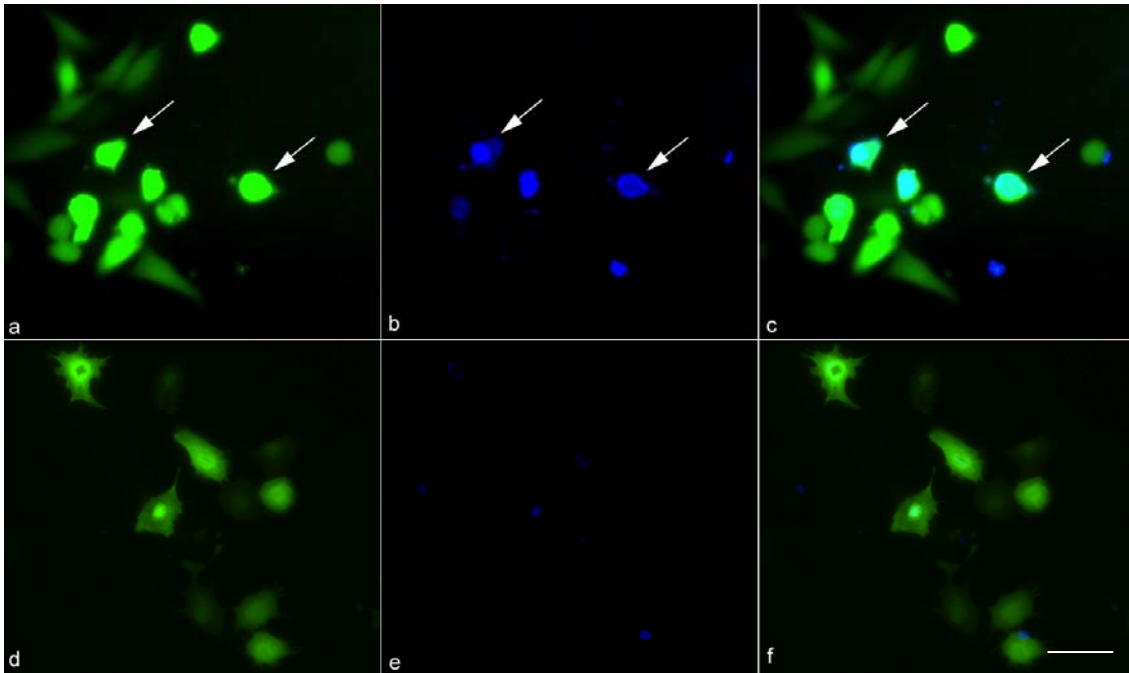


Abbildung 5: Annexin V Färbung zum Apoptosenachweis bei mikroinjizierten HeLa Zellen. Die Abbildung zeigt eine Annexin V Färbung. Mittels dieser wird die Translokation des Phosphatidylserins von der inneren auf die äußere Membranseite nachgewiesen. Die obere Zeile zeigt HeLa Zellen, die mit 0,5 mg/ml Procathepsin D in Kontrolllösung mikroinjiziert wurden in der Alexa Fluor Färbung (a), der blauen Annexin V Anfärbung (b), und die Überlagerung der beiden Farbstoffe (c). Zu erkennen sind abgerundete, geschrumpfte Zellen, die sich mit Annexin V anfärben lassen (mit Pfeilen markiert). Die untere Zeile zeigt eine Kontrollmikroinjektion und anschließende Annexin V Färbung (e). Der Maßstabbalken unten rechts entspricht 50 μm .

3.2.2 Die quantitative und statistische Auswertung der Versuche

3.2.2.1 Versuche mit humanen Fibroblasten

Nach der Mikroinjektion wurden die Zellen im Zeitintervall von 30 min und 12 h abfotografiert. Anhand der Kriterien abgerundeter, geschrumpfter Zellmorphologie, der DAPI- oder Annexin V-Färbung und der Zellzahldifferenz wurde der Anteil apoptotisch aussehender Zellen ermittelt. Jeder Versuch wurde mindestens 4-fach wiederholt, pro Ansatz wurden ca. 250 Zellen mikroinjiziert. Die Auswertung erfolgte durch mindestens zwei Personen, um Beobachtereffekte zu kontrollieren.

$$\frac{(Zellanzahl_{30\text{min}} - Zellanzahl_{12\text{h}}) + \text{apopt. Zellen}_{12\text{h}}}{Zellanzahl_{30\text{min}}} \times 100 = \text{Apoptoserate} [\%]$$

In den folgenden Tabellen ist der Anteil apoptotischer Zellen als Mittelwert der gesamten durchgeführten Versuche dargestellt. Ein Mann-Whitney-U-Test wurde in einigen Versuchen durchgeführt, um die Signifikanz der Differenz zwischen den Apoptoseraten bei der Mikroinjektion der Kontrolle und bestimmter Injektate zu verdeutlichen. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Inhalt der Mikroinjektionslösung: 1 mg/ml Alexa Fluor in PBS pH 7,0 mit folgenden Zugaben:	Anteil apoptotischer Morphologie als Mittelwert der gesamten Versuche (%)	Standardabweichung der ermittelten Apoptosewerte (%)	U-Test: p =
-	7	3	-
0,5 mg/ml Cathepsin D	46	11	0,003
3 mg/ml Cytochrom c	60	6	0,006
0,5 mg/ml Procathepsin D	53	5	0,0001
0,5 mg/ml Procathepsin mit 25 µM Caspase 3-Inhibitor	11	4	0,00009
25 µM Caspase 3-Inhibitor	8	3	-
0,5 mg/ml Procathepsin und 0,5 mg/ml Prosaposin	56	6	-
0,5 mg/ml Prosaposin	10	3	-
0,5 mg/ml Cathepsin D und 13 µM Saposin B	46	5	0,006
13 µM C ₂ -Ceramid und 0,5 mg/ml Cathepsin D	50	6	0,006
0,5 mg/ml Procathepsin D und 5 µM Pepstatin A	54	14	0,0018
0,5 mg/ml Cathepsin D und 5 µM Pepstatin A	54	12	0,0034
5 µM Pepstatin A	9	1	-

Um die Effekte des mikroinjizierten Fluoreszenzfarbstoffes zu untersuchen, wurde in einigen Versuchen Texas red zum Nachweis der Mikroinjektion eingesetzt.

Inhalt der Mikroinjektionslösung: 0,5 mg/ml Texas red in PBS pH 7,0 mit folgenden Zugaben:	Anteil apoptotischer Morphologie als Mittelwert der gesamten Versuche (%)	Standardabweichung der ermittelten Apoptosewerte (%)	U-Test : p =
-	8	3	-
0,5 mg/ml Procathepsin D	50	6	0,014

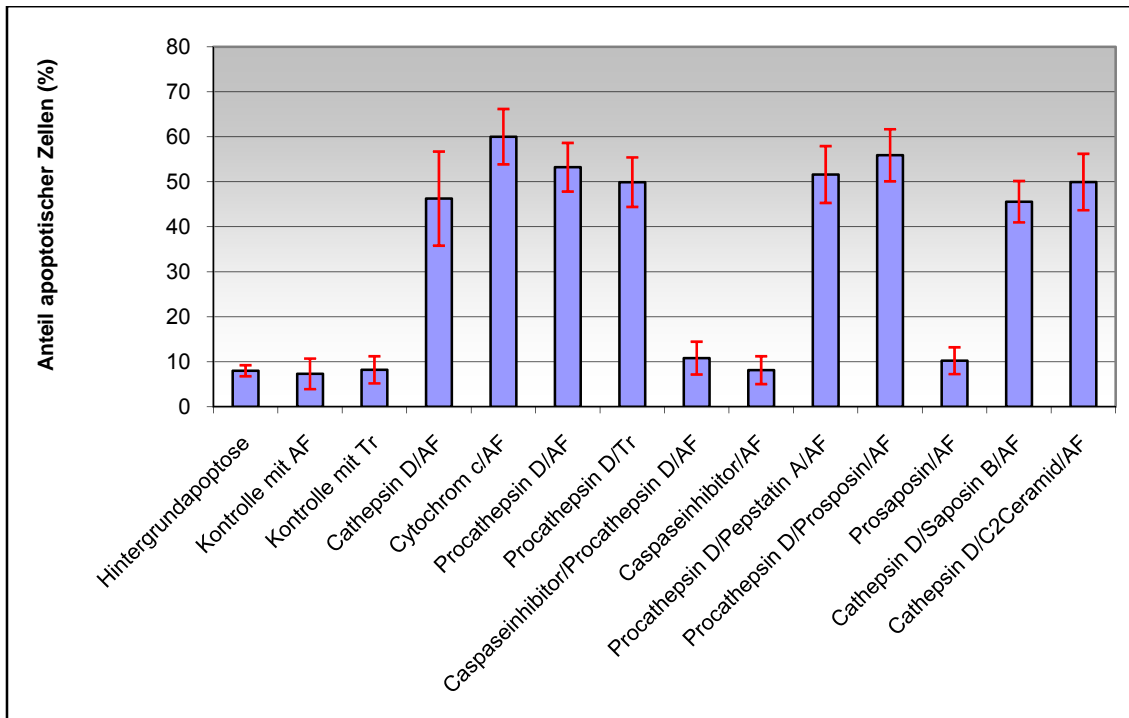


Abbildung 6: Grafische Zusammenfassung der prozentualen Apoptose bei Fibroblasten.

In der Abbildung sind die Mittelwerte der Anteile apoptotischer Zellen (%) und die Standardabweichungen zu sehen. Der Begriff Hintergrundapoptose bezeichnet den Anteil apoptotischer Zellen in einer Fibroblastenkontrollgruppe, die angesiedelt, gefärbt und abfotografiert, aber nicht mikroinjiziert wurde. Die Apoptoseraten wurden 12 h nach Mikroinjektion verschiedener Substanzen ermittelt. Alexa Fluor wurde mit AF und Texas Red mit Tr abgekürzt.

3.2.2.2 Versuche mit HeLa Zellen

Inhalt der Mikroinjektionslösung: 1 mg/ml Alexa Fluor in PBS pH 7,0 mit folgenden Zugaben:	Anteil apoptotischer Morphologie als Mittelwert der gesamten Versuche (%)	Standardabweichung der ermittelten Apoptosewerte (%)	U-Test : p =
-	6	3	-
0,5 mg/ml Cathepsin D	53	8	0,02
0,5 mg/ml Procathepsin D	49	5	0,02
3 mg/ml Cytochrom c	65	5	0,33
0,5 mg/ml Procathepsin D mit 0,5 mg/ml Prosaposin	52	3	-
0,5 mg/ml Procathepsin D mit 25 µM Caspase 3-Inhibitor	6	2	0,33
25 µM Caspase 3-Inhibitor	8	4	-
0,5 mg/ml Prosaposin	6	3	-

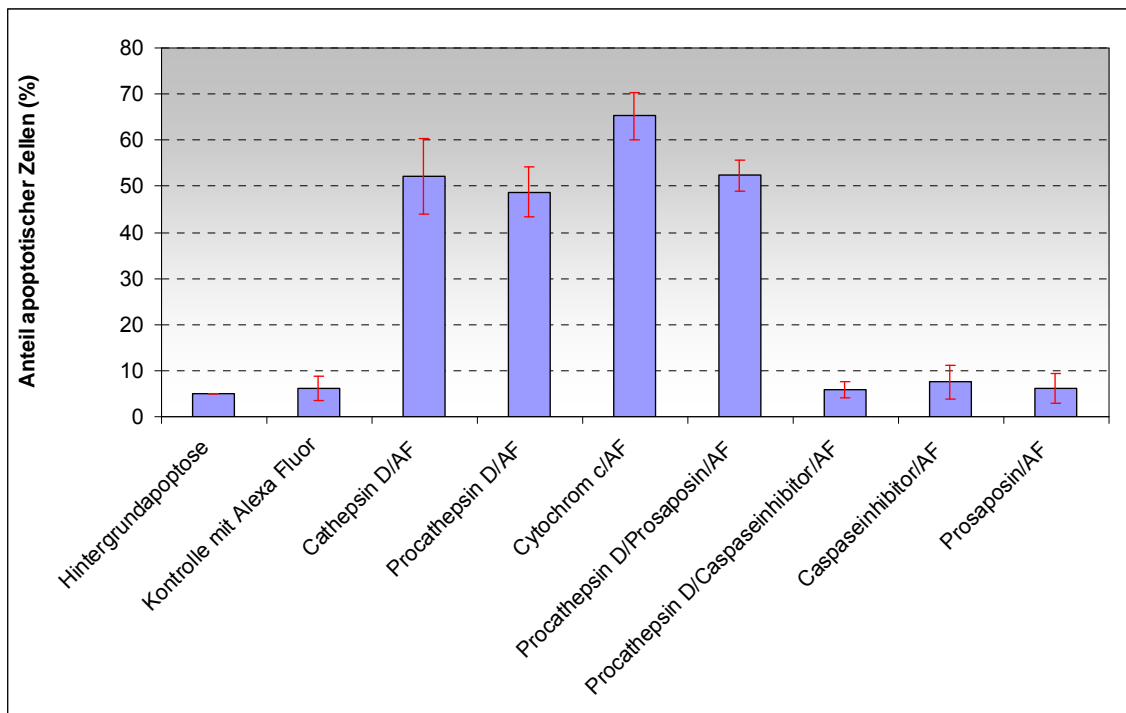


Abbildung 7: Grafische Zusammenfassung der prozentualen Apoptose bei HeLa Zellen.

In der Abbildung sind die Mittelwerte der Anteile apoptotischer Zellen (%) und die Standardabweichungen zu sehen. Der Begriff Hintergrundapoptose bezeichnet den Anteil apoptotischer Zellen in HeLa Zellen, die angesiedelt, gefärbt und abfotografiert, aber nicht mikroinjiziert wurden. Die Apoptoseraten wurden 12 h nach Mikroinjektion verschiedener Substanzen ermittelt. Alexa Fluor wurde mit AF abgekürzt.

3.2.3 Der Nachweis von Apoptose mittels ELISA

Der Apoptose-ELISA von Roche misst den Anteil von fragmentierten DNA-Komplexen in Zellen, der bei der Apoptose erheblich ansteigt. Etwa 2.000 Fibroblasten, die mit 0,5 mg/ml Procathepsin D in 1 mg/ml Alexa Fluor 488 in PBS pH 7,0 mikroinjiziert wurden, wurden lysiert und gemäß den Anweisungen des Herstellers dem Apoptose-ELISA zugeführt. Er zeigt, dass die mit Procathepsin D mikroinjizierten Zellen nach 12 h Inkubation deutlich mehr fragmentierte DNA Komplexe enthalten, als die Kontrolle. In den vorliegenden Experimenten wurde der ELISA nicht nur zur Qualifizierung der Apoptoserate benutzt, sondern auch als zusätzliche Möglichkeit die Apoptose durch eine Untersuchung chromosomaler Veränderungen zu bestätigen.

A												
Ausdruck um 14:10 am 11.06.06											Seite 1	
DYNATECH MRX												
TEST NR.	: 25		W/L MODUS		: DUAL		DATUM		: 11.06.06			
TEST NAME	: APOPTOSE		TEST FILTER		: 405 nm		ZEIT		: 14:10			
PLATTE	: 0060		REF. FILTER		: 490 nm		BEDIENER		:			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.117	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C	0.000	0.000	0.505	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
D	0.000	0.000	0.443	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E	0.000	0.000	1.170	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
F	0.000	0.000	0.117	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
G	0.000	0.000	0.107	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
H	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
DYNATECH LABORATORIES												

Abbildung 8: Beispiel eines ELISA Tests von Procathepsin D induzierter Apoptose bei Fibroblasten.

Anordnung auf der ELISA-Platte:

Position auf der Mikroplatte, Spalte 3	Inhalt
B	Inkubationspuffer (Negativkontrolle des Kit)
C	Zellysat nach Mikroinjektion mit Procathepsin D und 12 h Inkubation
D	Doppelwert
E	Positivkontrolle aus dem Kit
F	Zellysat nach Mikroinjektion der Kontrolllösung und 12 h Inkubation
G	Das benutzte Farbreagenz (Hintergrundkontrolle)

An diesem Beispiel wurde gezeigt, dass nach Mikroinjektion von Procathepsin D die Absorption auf 0,474 (entspricht 474 mU, Mittelwert) gestiegen ist. Dieser Wert liegt 3-fach über den Kontrollwerten (0,117 bei der Probe mit Kontrolllösung, bzw. 0,107 bei den Hintergrundkontrollen) und bestätigt die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung der Apoptose nach Procathepsin D Mikroinjektion.

3.3 Die Extraktion und Charakterisierung des mikroinjizierten Procathepsin D

Nach der Feststellung, dass die Mikroinjektion von Procathepsin D eine ähnliche apoptotische Reaktion wie die Mikroinjektion von Cathepsin D auslöst, sollte im Anschluss untersucht werden, ob eine Spaltung des Procathepsin D nach seiner Mikroinjektion in das Zytosol stattfindet.

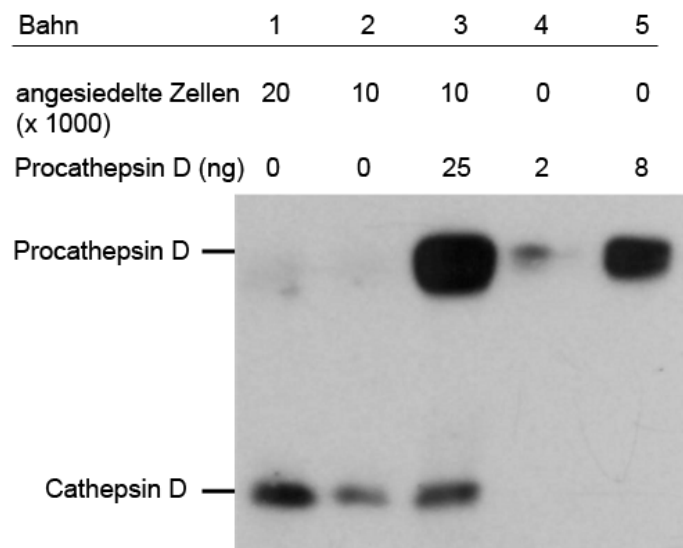


Abbildung 9: Western Blot zum Nachweis von Procathepsin D im Zytosol mikroinjizierter Fibroblasten. Gezeigt wird ein Western Blot lysierter Fibroblasten. Diese wurden mit Procathepsin D mikroinjiziert, für 8 h inkubiert, dann lysiert und der Western-Blot-Analyse zugeführt. In Bahn 1 und 2 wurden Lysate von Kontrollzellen (mikroinjiziert mit Kontrollpuffer) aufgetragen. In den Kontrollzellen wurde ausschließlich die schwere Kette des reifen Cathepsin D beobachtet. Die Präkursor-Form konnte wegen ihres geringen Anteils am gesamten Cathepsin D nicht sichtbar gemacht werden. In Bahn 3 wurde das Lysat der mit Procathepsin D mikroinjizierten Zellen aufgetragen. Es zeigte sich eine prominente Procathepsin D-Bande. Diese entsprach dem mikroinjizierten Procathepsin D. Die Intensität der reifen Cathepsin D-Bande in den mit Procathepsin D mikroinjizierten Zellen wurde nicht verstärkt. Bahn 4 und 5 enthielten Vergleichsproben von 2 ng und 8 ng Procathepsin D gelöst in PBS.

Aus dem Versuch konnte geschlossen werden, dass in den Zellen die mikroinjizierte Präkursor-Form mindestens 8 h unverändert blieb, und nicht zu den elektrophoretisch schneller wandernden enzymatisch aktiven intermediären und reifen Formen umgewandelt wurde. Es zeigte sich, dass die Proform des Cathepsin D im Zytosol nicht gespalten wird.

Zur Berechnung der Menge an Procathepsin D im Lysat der mikroinjizierten Zellen: Das Injektat enthielt 0,5 mg/ml Procathepsin D. Nach der Mikroinjektion fehlte der Nadel circa ein Volumen von 500 nl, das folglich mikroinjiziert wurde. Dieses mikroinjizierte Volumen enthielt 250 ng Procathepsin D. In der Annahme, dass ein Teil der mikroinjizierten Lösung im Zytosol der beobachteten Zellen ankam, ein Teil der behandelten Zellen platzte und zusätzlich ein Teil der Lösung beim Auslaufen der Nadel verloren ging, wurde der Teil des Injektates, der in die Zellen gelang auf 10 % geschätzt. Dies entsprach etwa 25 ng.

3.4 Vorversuche zur Identifizierung des Bindungspartners von Cathepsin D

In dieser Dissertation wurden zusätzlich zur eigentlichen Fragestellung zwei Versuche unternommen, einen vermutlich im Zytosol vorliegenden Interaktionspartner des Cathepsin D im Zytosol zu finden. Hierzu wurden zwei Strategien entworfen. Die erste verfolgte das Konzept einer affinitätschromatografischen Aufreinigung des gesuchten Proteins mittels Ligandenchromatographie. Es wurden Säulen mit zwei Liganden konzipiert: eine Cathepsin D- und eine Procathepsin D-bindende. Aufgereinigtes Zytoplasmaextrakt aus Fibroblasten und HeLa Zellen sollte aufgetragen werden, sodass der Bindungspartner an dem gebundenen Cathepsin D oder Procathepsin D haften bleibt. Anschließend sollte durch pH- und Salzgehalt-Änderung die Bindung gelöst und das gesuchte Bindungsprotein nach der Elution durch SDS PAGE identifiziert werden.

Nach einem anderen Konzept sollten eventuelle Bindungspartner mittels eines *cross-linkers* mit Cathepsin D kovalent verbunden und anschließend zusammen mit Cathepsin D durch Immunpräzipitation isoliert und im SDS PAGE nachgewiesen werden. Hierzu wurden zunächst Fibroblasten und HeLa Zellen mit ³⁵S-Translabel radioaktiv markiert, ein Zytoplasmaextrakt dieser Zellen wurde hergestellt, zu dem „kaltes“ Cathepsin D und der *cross-linker* DSP gegeben wurde. Nach der anschließenden Immunpräzipitation, wurden die Proben zweigeteilt. Eine Hälfte wurde reduziert, um die Disulfidbrücken im Reagenz aufzuspalten und eventuell vernetzte Moleküle voneinander zu trennen. Im anderen Teil blieb die Vernetzung erhalten. Die Immunpräzipitate

wurden durch SDS-PAGE getrennt und die radioaktiv markierten Polypeptide fluorographisch sichtbar gemacht.

3.4.1. Ligandenchromatographie zur Bindungspartnersuche von Cathepsin D im Zytosol

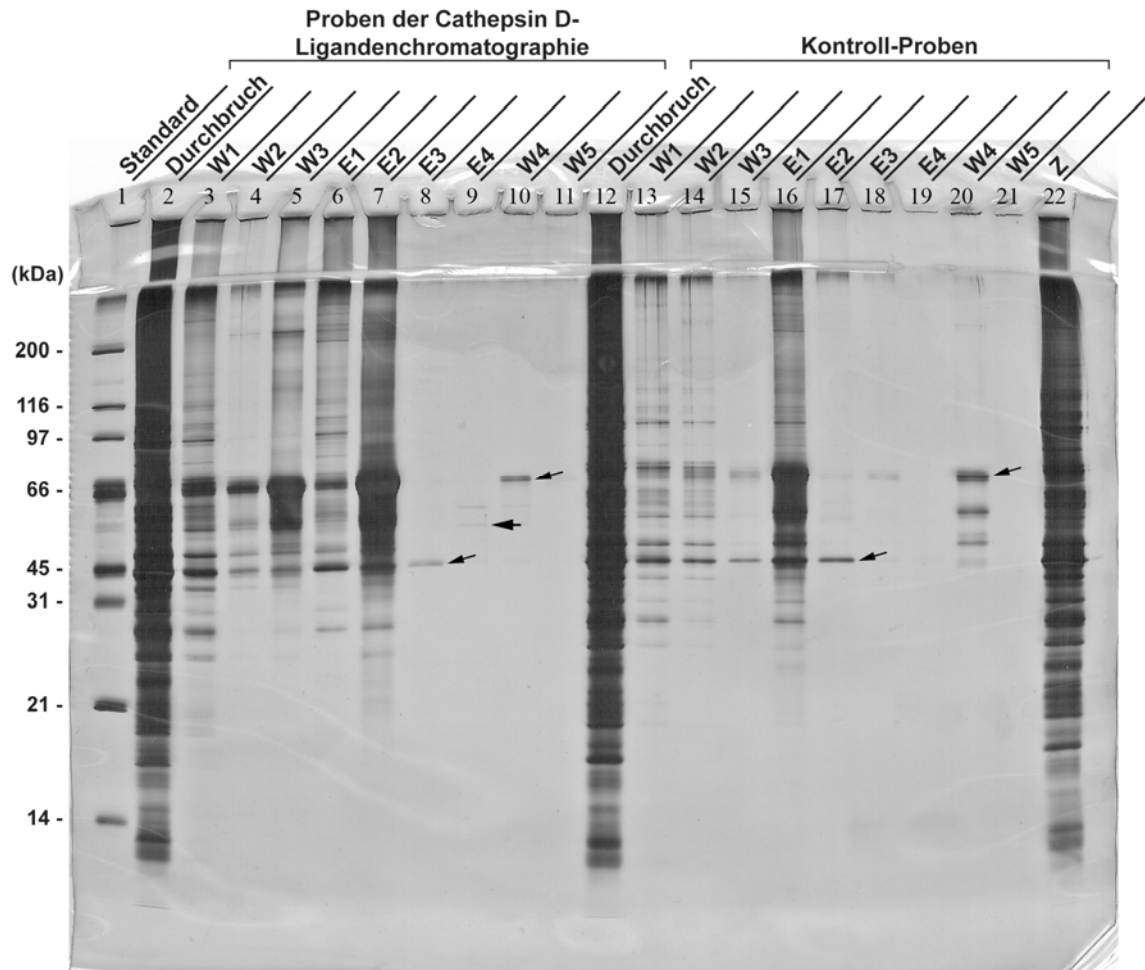


Abbildung 10: Charakterisierung von möglichen Bindungspartnern nach Affinitätschromatographie durch SDS-PAGE. Der linke Teil der Abbildung zeigt das Ergebnis eines Versuches mit einer Affinitätssäule, die Cathepsin D gebunden hatte, der rechte Teil das Ergebnis bei einer Kontrollsäule mit blockierten Bindungsstellen. Beide Säulen wurden nach einem Waschgang mit Zytoplasmaextrakt (Z) aus HeLa Zellen beladen, der Durchbruch wurde gesammelt. Nach drei Waschgängen ($W_{1,2,3}$) wurde anschließend mittels pH-Änderung ($E_{1,2}$) und Salzkonzentrationserhöhung ($E_{3,4}$) die Bindung der Säule zum eventuellen gebundenen Protein aufgehoben, die Eluate (E_{1-4}) wurden gesammelt. Es folgten zwei weitere Waschgänge ($W_{4,5}$). Im Anschluss wurde das Gel mit Silbernitrat gefärbt. In beiden Eluatfraktionen der Kontroll- und der Cathepsin D-bindenden Säule zeigen sich einige Proteine (durch schräge Pfeile markiert). Andere erscheinen nicht in der Kontrollsäulen-Elution (mit horizontalen Pfeilen markiert). Diese möglichen Bindungspartner haben ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa.

Das Muster der eluierten Proteine konnte nach wiederholten Versuchen nicht bestätigt werden. Durch Affinitätschromatographische Versuche konnten keine Bindungspartnermoleküle ermittelt werden.

3.4.2 Das *cross-linking* mit DSP

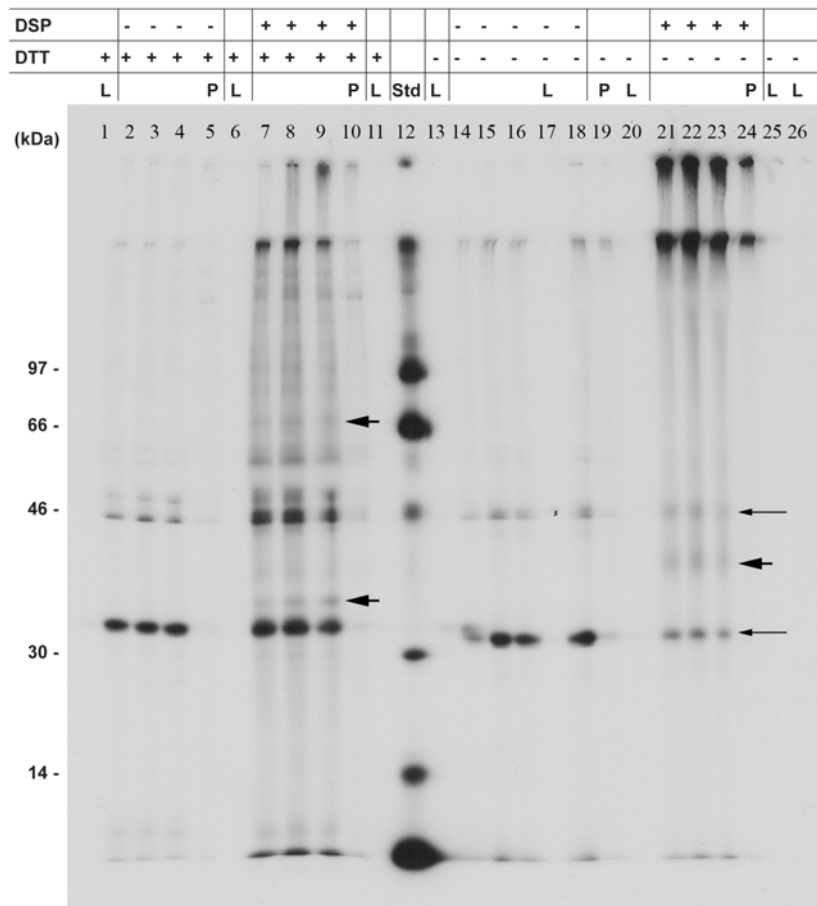


Abbildung 11: Kopräzipitation nach *cross-linking* von Cathepsin D mit dem möglichen Bindungspartner. Fibroblasten wurden metabolisch markiert, anschließend wurde aus diesen ein Zytoplasmaextrakt gewonnen. Dieser wurde mit kaltem Cathepsin D versetzt und inkubiert. Ein Aliquot der Proben wurde mit DSP behandelt, um Cathepsin D mit seinem möglichen Bindungspartner zu vernetzen. Das Cathepsin D bzw. die Cathepsin D-Konjugate wurden immunpräzipitiert. Diese Immunpräzipitate wurden mit SDS behandelt und durch SDS-PAGE unter reduzierten und nicht-reduzierten Bedingungen analysiert. Hierdurch sollte in einem Teil der Proben die Vernetzung erhalten bleiben, in anderen das Cathepsin D von dem möglichen Bindungspartner getrennt dargestellt werden. Die radioaktiven Proteine wurden durch Fluorographie sichtbar gemacht. Die mit „L“ in der Gelbeschriftung bezeichneten Proben entsprechen Proben mit Kontrolllösung, die mit „P“ bezeichneten, Proben mit Präimmunsereum statt Antikörperzugabe. Zugabe von DTT und DSP ist über der jeweiligen Probe mit +/- gekennzeichnet. Die Beschreibung der mit Pfeilen markierten Banden erfolgt im Text.

Durch Anwendung der einfachen Vernetzungsmethode konnten Hinweise auf mögliche Bindungspartner erhalten werden. In Abbildung 11 sind in den antikörperbehandelten Proben die Banden mit dem reifen Cathepsin D und seinem Präkursor Procathepsin D mit dünnen Pfeilen beispielhaft markiert. Sie repräsentieren das endogene, radioaktiv markierte Cathepsin D und Procathepsin D. In den Proben, die nach der Markierung *cross-linker* und kaltes Cathepsin D erhielten, zeigen sich des Weiteren andere Banden, die mit dickeren kleinen Pfeilen angezeigt sind und ca. 66 und 35 kDa entsprechen. Diese stellen mögliche Bindungspartnerproteine dar und bedürfen näherer Erforschung. Eine Weiterführung dieser Versuche wurde im Rahmen der Arbeit jedoch nicht geplant.

4 Diskussion

4.1 Apoptoseinduktion durch Procathepsin D

Das Ziel dieser Dissertation war die Rolle des Cathepsin D bei der Apoptose mit besonderem Schwerpunkt auf der Wirkung im Zytoplasma und der Beteiligung der enzymatischen Aktivität zu untersuchen. Das Modell für das nicht aktive Cathepsin D war das Procathepsin D. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass das ins Zytosol eingeführte Procathepsin D, analog dem reifen Cathepsin D, apoptotisch wirkt. Es wurde gezeigt, dass Procathepsin D während seiner Anwesenheit im Zytosol nicht in seine aktiven Formen umgesetzt wurde. Die ausgelöste Apoptose war Caspasen-abhängig, denn in Anwesenheit eines Caspase 3-Inhibitors war die Apoptoserate mit der der Kontrolle vergleichbar. Pepstatin A, ein Hemmstoff von Cathepsin D, konnte die durch Procathepsin D und Cathepsin D induzierte Apoptose nicht verhindern. Sowohl das Enzym als auch das Proenzym waren in der Lage nach Mikroinjektion in das Zytosol Apoptose auszulösen. Zusammenfassend lässt sich folgern, dass der an der Apoptose beteiligte Teil des reifen Cathepsin D dem in der Proform von der Prosequenz nicht bedeckten Anteil entspricht. Damit nimmt der Bereich des aktiven Zentrums des reifen Cathepsin D wahrscheinlich nicht an der apoptotischen Wirkung teil. Diese Ergebnisse konnten an zwei Zelllinien demonstriert werden: humane Fibroblasten und HeLa Zellen.

Die vorliegende Studie bestätigt die Ergebnisse des proapoptotischen Effektes von mikroinjiziertem Cathepsin D (Roberg, Kagedal *et al.*, 2002), stellt jedoch den antiapoptotischen Effekt von Pepstatin A in den mikroinjizierten Zellen in Frage. Mehrere Hypothesen kommen als Erklärung dieser kontroversen Ergebnisse in Frage:

Das Pepstatin A bindet an das aktive Zentrum des reifen Cathepsin D. So verhindert es die Spaltung eines Substrates, möglicherweise auch die Bindung an einen zytosolischen Bindungspartner, wenn dieser an das aktive Zentrum des Cathepsin D andockt. Die Annahme, Pepstatin A verhindert das Binden eines zytosolischen Partners an Cathepsin D ist wahrscheinlich nicht haltbar,

denn wie in der vorliegenden Studie gezeigt, kann Procathepsin D Apoptose auslösen, in welchem das aktive Zentrum durch die Prosequenz verdeckt ist. Das Cathepsin D ist eines der lysosomalen Enzyme, die einen wesentlich saureren pH benötigen als zum Beispiel Cathepsin B oder L, um enzymatisch wirksam zu sein. Die Azidifizierung des Zytoplasmas auf einen pH von 6,7-7 ist ein dokumentiertes Phänomen in der Apoptose (Gottlieb, Nordberg *et al.*, 1996; Matsuyama, Llopis *et al.*, 2000). Das Cathepsin D jedoch spaltet Substrate *in vitro* bis zu einem pH von 6,2 und nicht höher (Capony, Morisset *et al.*, 1987). Daraus lässt sich schließen, dass die zytoplasmatischen pH Bedingungen sehr unvorteilhaft für die enzymatische Aktivität des Cathepsin D sind. Es bleibt also offen und äußerst unwahrscheinlich, dass Cathepsin D nach seiner Entlassung in das Zytoplasma Substrate spalten kann. Sicher ist, dass Procathepsin D im Zytoplasma wie auch anderswo nicht katalytisch aktiv sein kann. Zwar ist eine Autoaktivierung des Procathepsin D zum sog. Pseudocathepsin D bekannt, diese tritt jedoch nur bei saurem pH-Wert auf. Durch eine entsprechende Kontrolle wurde in der vorliegenden Arbeit die Unversehrtheit des Procathepsin D im Zytoplasma nachgewiesen. Auch die Bindung von Pepstatin A an das Cathepsin D ist an einen sauren pH-Wert gebunden. Somit erscheint es unwahrscheinlich, dass Pepstatin A das Cathepsin D an einer katalytischen Reaktion im Zytoplasma hindern kann.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die Diskrepanz zur Studie von Roberg *et al.*, (2002) bestünde in der Annahme, die Unterschiede kämen durch einen unterschiedlichen Versuchsansatz zustande: In den hier gezeigten Versuchen haben alle Injektate einen pH 7,0, während Roberg *et al.*, (2002) unter anderem mit pH 5,0 mikroinjizierten. Außerdem sei auf die Tatsache verwiesen, dass Pepstatin A nicht nur das Cathepsin D, sondern auch das im Lysosom vorhandene Cathepsin E in seiner katalytischen Aktivität inhibiert, dessen mögliche Rolle in der Apoptose bis jetzt unklar ist (Trincheri, Nicotra *et al.*, 2006).

Wie in der Einleitung beschrieben, liegen in der Literatur unterschiedliche Befunde über den Einfluss von Pepstatin A, dem Inhibitor des Cathepsin D auf die Apoptose vor. In mehreren neueren Studien konnte Pepstatin A den Zelltod von Etoposid, Doxorubicin, TNF-alpha oder anti-CD95 behandelten Zellen nicht

verhindern (Demoz, Castino *et al.*, 2002; Tardy, Tyynela *et al.*, 2003; Emert-Sedlak, Shangary *et al.*, 2005). Bei der photodynamischen Therapie von Maus-Hepatoma Zellen war Pepstatin A nicht in der Lage, die Spaltung von Bid oder Aktivierung von Procaspase 9 und 3 zu aktiven Caspasen zu unterdrücken (Reiners, Caruso *et al.*, 2002).

Beaujouin *et al.*, (2006) beobachteten, dass der Wild-Typ und eine Cathepsin D Mutante aus dem Lysosom in das Zytosol transloziert werden können und die Induktion Caspase-abhängiger Apoptose erhöhen. Auch in ihrem System kann Pepstatin A die Effekte von Cathepsin D auf die Apoptose nicht aufhalten (Beaujouin, Baghdiguian *et al.*, 2006).

Haendeler *et al.*, (2005) berichten über eine enzymatische Spaltung von Thioredoxin-1 durch Cathepsin D im Lysosom, bei H₂O₂ induzierter Apoptose, ohne eine Translokation des Cathepsin D in das Zytoplasma und schlagen hiermit eine andere Involvierung des Cathepsin D in der Apoptose vor. Diese ist Pepstatin A sensitiv und kann nur vom intakten Cathepsin D, nicht jedoch von mutiertem ausgeführt werden (Haendeler, Popp *et al.*, 2005).

Eine Spekulation wäre, dass bestimmte apoptotische Signale unter saurem pH im Lysosom entstehen. Eine solche proapoptotische Funktion von Cathepsin D wäre dann Pepstatin A sensitiv. Im Gegensatz dazu führen zytosolische Effekte von Cathepsin D zur Permeabilisierung von Mitochondrien und dem Ausstrom von Cytochrom c in das Zytosol, der die Aktivierung von Caspasen nach sich zieht. Solche Effekte können unabhängig von der enzymatischen Aktivität des Cathepsin D sein. Daher kann das Procathepsin D unter künstlichen Bedingungen das Gleiche bewirken.

Zahlreiche Berichte schreiben Cathepsin D eine Rolle in der Proliferationsregulation, in der Angiogenese und in der Apoptose zu. Einige dieser Effekte scheint es in seiner Rolle als Enzym auszuführen, andere wiederum benötigen seine proteinolytische Aktivität nicht. Diese Studie beschreibt eine Involvierung von Cathepsin D in der Apoptose, bei der Interaktionen mit der Apoptosemaschinerie auf seiner molekularen Struktur beruhen, und zwar auf dem Teil, den Cathepsin D mit seiner inaktiven Proform gemeinsam hat. Domänen, die sich die aktive reife Form des Cathepsin D und die Proform

Procathepsin D nicht teilen, also das aktive Zentrum und die Reste der 98-102 *processing loop* scheinen an den apoptotischen Funktionen des Cathepsins D nicht beteiligt zu sein. Diese Entdeckung kann die Suche nach dem zytosolischen Bindungspartner, aber auch nach den lysosomalen Permeabilisierungsfaktoren begünstigen.

Die Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran und der Lysosomen waren Gegenstand neuerer Reviews (Kroemer und Jaattela, 2005). Die Kombination der hier gezeigten Ergebnisse mit der Beobachtung, dass Cytochrom c in der Anwesenheit von zytosolischem Cathepsin D (Johansson, Steen *et al.*, 2003) das Mitochondrium verlässt, könnte bedeuten, dass Cathepsin D einen Promotor der Porenbildung in der mitochondrialen Außenmembran darstellt, indem es zum Beispiel mit einem oder mehreren zytoplasmatischen pro- oder antiapoptotischen Proteinen in eine Wechselwirkung tritt und ihre Aktivität steigert bzw. hemmt. Aus den permeabilisierten Lysosomen können weitere Enzyme, beispielsweise Cysteinproteinasen, austreten die für Pepstatin-resistente Apoptoseauslösung verantwortlich gemacht werden können. Dies ist ebenfalls Gegenstand aktueller Studien (Guicciardi, Leist *et al.*, 2004; Paris, Bertoglio *et al.*, 2007).

Die Experimente in dieser Studie wurden mit HeLa Zellen und Fibroblasten durchgeführt. Dies führt zu der Annahme, dass das hier vorgestellte Konzept nicht auf eine Zelllinie beschränkt bleiben, sondern eine Rolle in Krebs- und in Primärzelllinien spielen muss.

Abschließend soll ein Schaubild als Zusammenfassung der unterschiedlichen Hypothesen zur Involvierung des Cathepsin D in der Apoptose vorgestellt werden.

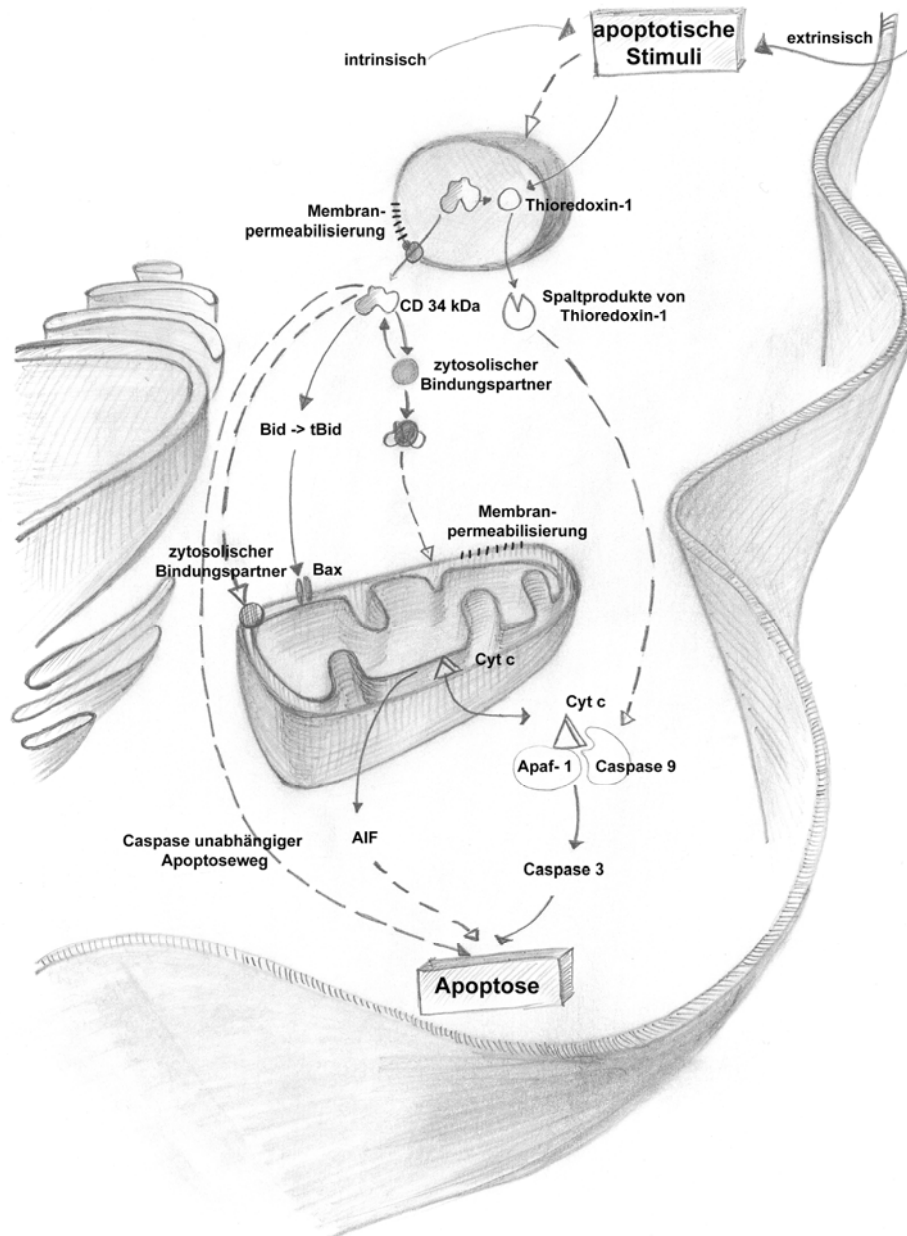


Abbildung 12: Übersicht verschiedener Mechanismen der Cathepsin D Beteiligung in der Apoptose. Diese Abbildung fasst die Beteiligung des Cathepsin D unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Dissertation zusammen. Die lysosomale Beteiligung in der Apoptose kann über den intrinsischen und den extrinsischen Weg eingeleitet werden. Daraufhin ist Cathepsin D (CD) in der Lage Thioredoxin-1 im Lysosom zu spalten, dessen Spaltprodukte treten in das Zytoplasma über und setzen die weitere Apoptosemaschinerie in Gang (Haendeler, Popp *et al.*, 2005). Cathepsin D kann selbst aus dem Lysosom austreten, wahrscheinlich durch Permeabilisierung der lysosomalen Membran (Kroemer und Jaattela, 2005). Im Zytoplasma kann es über noch unbekannte Wege die Caspase-unabhängige Apoptose auslösen (Broker, Kruyt *et al.*, 2005), eventuell das Bid Protein spalten (Heinrich, Neumeyer *et al.*, 2004; Blomgran, Zheng *et al.*, 2007) oder wie vermutet mit einem noch unbekanntem Bindungspartner interagieren. Dieser kann als zytosolisches Molekül vorliegen oder in der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert sein. Diese Interaktion führt möglicherweise zur Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran, zum Ausstrom von Cytochrom c oder auch AIF, der Formation des Apoptosoms und der Aktivierung der Effektorcaspasen.

4.2 Vorversuche zur Bindungspartnersuche

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Vorversuche zur Identifizierung der an der Apoptose beteiligter Bindungspartnermoleküle von Cathepsin D bzw. Procathepsin D durchgeführt. In einem Versuchsansatz mit metabolisch-markierten Zellen und einem *cross-linker* (DSP) wurden Kandidatproteine mit scheinbaren Polypeptidmassen von ca. 66 und 35 kDa gefunden. Weitere Untersuchungen dieser Proteine und ihre Identifizierung setzen umfangreichere Arbeiten voraus, die nicht zur Aufgabe dieser Studie gezählt werden können.

4.3 Ausblick

In den letzten Jahren wurden neue Einblicke in die Regulation des zellulären Lebens bzw. der Apoptose gewonnen. Störungen der Apoptose scheinen an der Entstehung diverser Erkrankungen beteiligt zu sein. Sehr verlockend erscheint daher die Möglichkeit, regulatorisch mittels Medikamenten in apoptotische Prozesse einzugreifen. Für viele Arzneimittel, wie z.B. das Paclitaxel, das Doxorubicin, die Chinolonantibiotika, das Vitamin D (Broker, Krut et al., 2005) wurde bereits ein solcher Einfluss beschrieben und ist Gegenstand aktueller Forschung.

Eine Voraussetzung für die Entwicklung rationaler Eingriffe in die Apoptose zwecks Heilung von Erkrankungen ist eine weitgehende Aufklärung des apoptotischen Prozesses. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen im Hinblick auf die Aufklärung der Beteiligung von Cathepsin D an der Apoptose zwei Fragen auf: Welche nichtenzymatische Wechselwirkungen von Cathepsin D mit zytosolischen oder mitochondrialen Proteinen führen zur Aktivierung von Caspasen bzw. welche intralysosomale katalytische Reaktionen von Cathepsin D und welche Produkte dieser Reaktionen wirken proapoptotisch.

5 Literaturverzeichnis

- Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang and C. W. Akey (2002). "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation." Mol Cell **9**(2): 423-32.
- Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." Nat Rev Cancer **2**(6): 420-30.
- Baldwin, E. T., T. N. Bhat, S. Gulnik, M. V. Hosur, R. C. Sowder, 2nd, R. E. Cachau, J. Collins, A. M. Silva and J. W. Erickson (1993). "Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: implications for lysosomal targeting and drug design." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6796-800.
- Barrett, A. J. (1970). "Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver." Biochem J **117**(3): 601-7.
- Beaujouin, M., S. Baghdiguian, M. Glondu-Lassis, G. Berchem and E. Liaudet-Coopman (2006). "Overexpression of both catalytically active and -inactive cathepsin D by cancer cells enhances apoptosis-dependent chemo-sensitivity." Oncogene **25**(13): 1967-73.
- Behrens, T. W. and D. L. Mueller (1997). "Bcl-x and the regulation of survival in the immune system." Immunol Res **16**(2): 149-60.
- Berchem, G., M. Glondu, M. Gleizes, J. P. Brouillet, F. Vignon, M. Garcia and E. Liaudet-Coopman (2002). "Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis." Oncogene **21**(38): 5951-5.
- Bidere, N., H. K. Lorenzo, S. Carmona, M. Laforge, F. Harper, C. Dumont and A. Senik (2003). "Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis." J Biol Chem **278**(33): 31401-11.
- Blomgran, R., L. Zheng and O. Stendahl (2007). "Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization." J Leukoc Biol.
- Boya, P., K. Andreau, D. Poncet, N. Zamzami, J. L. Perfettini, D. Metivier, D. M. Ojcius, M. Jaattela and G. Kroemer (2003). "Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion." J Exp Med **197**(10): 1323-34.
- Broker, L. E., F. A. Krzyt and G. Giaccone (2005). "Cell death independent of caspases: a review." Clin Cancer Res **11**(9): 3155-62.
- Brouillet, J. P., F. Dufour, G. Lemamy, M. Garcia, N. Schlup, J. Grenier, J. C. Mani and H. Rochefort (1997). "Increased cathepsin D level in the serum of patients with metastatic breast carcinoma detected with a specific pro-cathepsin D immunoassay." Cancer **79**(11): 2132-6.
- Brunk, U. T., H. Dalen, K. Roberg and H. B. Hellquist (1997). "Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts." Free Radic Biol Med **23**(4): 616-26.
- Brunk, U. T., J. Neuzil and J. W. Eaton (2001). "Lysosomal involvement in apoptosis." Redox Rep **6**(2): 91-7.
- Brustugun, O. T., K. E. Fladmark, S. O. Doskeland, S. Orrenius and B. Zhivotovsky (1998). "Apoptosis induced by microinjection of cytochrome

- c is caspase-dependent and is inhibited by Bcl-2." Cell Death Differ **5**(8): 660-8.
- Capony, F., T. Braulke, C. Rougeot, S. Roux, P. Montcourrier and H. Rochefort (1994). "Specific mannose-6-phosphate receptor-independent sorting of pro-cathepsin D in breast cancer cells." Exp Cell Res **215**(1): 154-63.
- Capony, F., M. Morisset, A. J. Barrett, J. P. Capony, P. Broquet, F. Vignon, M. Chambon, P. Louisot and H. Rochefort (1987). "Phosphorylation, glycosylation, and proteolytic activity of the 52-kD estrogen-induced protein secreted by MCF7 cells." J Cell Biol **104**(2): 253-62.
- Capony, F., C. Rougeot, P. Montcourrier, V. Cavailles, G. Salazar and H. Rochefort (1989). "Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells." Cancer Res **49**(14): 3904-9.
- Cavaillès, V., P. Augereau and H. Rochefort (1993). "Cathepsin D gene is controlled by a mixed promoter, and estrogens stimulate only TATA-dependent transcription in breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(1): 203-7.
- Cecconi, F. and P. Gruss (2001). "Apaf1 in developmental apoptosis and cancer: how many ways to die?" Cell Mol Life Sci **58**(11): 1688-97.
- Cifone, M. G., R. De Maria, P. Roncaioli, M. R. Rippo, M. Azuma, L. L. Lanier, A. Santoni and R. Testi (1994). "Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase." J Exp Med **180**(4): 1547-52.
- Cirman, T., K. Oresic, G. D. Mazovec, V. Turk, J. C. Reed, R. M. Myers, G. S. Salvesen and B. Turk (2004). "Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins." J Biol Chem **279**(5): 3578-87.
- Coleman, M. L., E. A. Sahai, M. Yeo, M. Bosch, A. Dewar and M. F. Olson (2001). "Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I." Nat Cell Biol **3**(4): 339-45.
- Conner, G. E. and G. Richo (1992). "Isolation and characterization of a stable activation intermediate of the lysosomal aspartyl protease cathepsin D." Biochemistry **31**(4): 1142-7.
- Conradt, B. and H. R. Horvitz (1998). "The C. elegans protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9." Cell **93**(4): 519-29.
- Crocker, S. J., N. Wigle, P. Liston, C. S. Thompson, C. J. Lee, D. Xu, S. Roy, D. W. Nicholson, D. S. Park, A. MacKenzie, R. G. Korneluk and G. S. Robertson (2001). "NAIP protects the nigrostriatal dopamine pathway in an intrastriatal 6-OHDA rat model of Parkinson's disease." Eur J Neurosci **14**(2): 391-400.
- Cuatrecasas, P. (1970). "Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads." J Biol Chem **245**(12): 3059-65.
- de Duve, C. (1983). "Lysosomes revisited." Eur J Biochem **137**(3): 391-7.
- De Laurenzi, V. and G. Melino (2000). "Apoptosis. The little devil of death." Nature **406**(6792): 135-6.
- Deiss, L. P., H. Galinka, H. Berissi, O. Cohen and A. Kimchi (1996). "Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha." Embo J **15**(15): 3861-70.

- Demoz, M., R. Castino, P. Cesaro, F. M. Baccino, G. Bonelli and C. Isidoro (2002). "Endosomal-lysosomal proteolysis mediates death signalling by TNFalpha, not by etoposide, in L929 fibrosarcoma cells: evidence for an active role of cathepsin D." Biol Chem **383**(7-8): 1237-48.
- Desagher, S. and J. C. Martinou (2000). "Mitochondria as the central control point of apoptosis." Trends Cell Biol **10**(9): 369-77.
- Desnoyers, S. and M. O. Hengartner (1997). "Genetics of apoptosis." Adv Pharmacol **41**: 35-56.
- Diment, S., K. J. Martin and P. D. Stahl (1989). "Cleavage of parathyroid hormone in macrophage endosomes illustrates a novel pathway for intracellular processing of proteins." J Biol Chem **264**(23): 13403-6.
- Donepudi, M. and M. G. Grutter (2002). "Structure and zymogen activation of caspases." Biophys Chem **101-102**: 145-53.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li and X. Wang (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins and S. H. Kaufmann (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." Annu Rev Biochem **68**: 383-424.
- Emert-Sedlak, L., S. Shangary, A. Rabinovitz, M. B. Miranda, S. M. Delach and D. E. Johnson (2005). "Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome c release, caspase activation, and cell death." Mol Cancer Ther **4**(5): 733-42.
- Erickson, A. H. and G. Blobel (1983). "Carboxyl-terminal proteolytic processing during biosynthesis of the lysosomal enzymes beta-glucuronidase and cathepsin D." Biochemistry **22**(22): 5201-5.
- Farkas, B., M. Hantschel, M. Magyarlaki, B. Becker, K. Scherer, M. Landthaler, K. Pfister, M. Gehrman, C. Gross, A. Mackensen and G. Multhoff (2003). "Heat shock protein 70 membrane expression and melanoma-associated marker phenotype in primary and metastatic melanoma." Melanoma Res **13**(2): 147-52.
- Fehrenbacher, N. and M. Jaattela (2005). "Lysosomes as targets for cancer therapy." Cancer Res **65**(8): 2993-5.
- Garcia-Calvo, M., E. P. Peterson, B. Leiting, R. Ruel, D. W. Nicholson and N. A. Thornberry (1998). "Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors." J Biol Chem **273**(49): 32608-13.
- Gieselmann, V., A. Hasilik and K. von Figura (1985). "Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro." J Biol Chem **260**(5): 3215-20.
- Gopalakrishnan, M. M., H. W. Grosch, S. Locatelli-Hoops, N. Werth, E. Smolenova, M. Nettersheim, K. Sandhoff and A. Hasilik (2004). "Purified recombinant human prosaposin forms oligomers that bind procathepsin D and affect its autoactivation." Biochem J **383**(Pt. 3): 507-15.
- Gottlieb, R. A., J. Nordberg, E. Skowronski and B. M. Babior (1996). "Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 654-8.
- Green, D. R. (2000). "Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors." Cell **102**(1): 1-4.
- Green, D. R. and G. I. Evan (2002). "A matter of life and death." Cancer Cell **1**(1): 19-30.
- Grubb, D. R., J. D. Ly, F. Vaillant, K. L. Johnson and A. Lawen (2001). "Mitochondrial cytochrome c release is caspase-dependent and does not

- involve mitochondrial permeability transition in didemnin B-induced apoptosis." Oncogene **20**(30): 4085-94.
- Grutter, M. G. (2000). "Caspases: key players in programmed cell death." Curr Opin Struct Biol **10**(6): 649-55.
- Guicciardi, M. E., M. Leist and G. J. Gores (2004). "Lysosomes in cell death." Oncogene **23**(16): 2881-90.
- Haendeler, J., R. Popp, C. Goy, V. Tischler, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2005). "Cathepsin D and H₂O₂ stimulate degradation of thioredoxin-1: implication for endothelial cell apoptosis." J Biol Chem **280**(52): 42945-51.
- Hasilik, A. and E. F. Neufeld (1980). "Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight." J Biol Chem **255**(10): 4937-45.
- Hasilik, A., K. von Figura, E. Conzelmann, H. Nehrkorn and K. Sandhoff (1982). "Lysosomal enzyme precursors in human fibroblasts. Activation of cathepsin D precursor in vitro and activity of beta-hexosaminidase A precursor towards ganglioside GM2." Eur J Biochem **125**(2): 317-21.
- Heinrich, M., J. Neumeyer, M. Jakob, C. Hallas, V. Tchikov, S. Winoto-Morbach, M. Wickel, W. Schneider-Brachert, A. Trauzold, A. Hethke and S. Schutze (2004). "Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation." Cell Death Differ **11**(5): 550-63.
- Hentze, M., A. Hasilik and K. von Figura (1984). "Enhanced degradation of cathepsin D synthesized in the presence of the threonine analog beta-hydroxynorvaline." Arch Biochem Biophys **230**(1): 375-82.
- Hockenberry, M. J., D. K. Coody and B. S. Bennett (1990). "Childhood cancers: incidence, etiology, diagnosis, and treatment." Pediatr Nurs **16**(3): 239-46.
- Hsueh, W. A. and J. D. Baxter (1991). "Human prorenin." Hypertension **17**(4): 469-77.
- Hunot, S. and R. A. Flavell (2001). "Apoptosis. Death of a monopoly?" Science **292**(5518): 865-6.
- Ishidoh, K. and E. Kominami (2002). "Processing and activation of lysosomal proteinases." Biol Chem **383**(12): 1827-31.
- Jaattela, M. (2004). "Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression." Oncogene **23**(16): 2746-56.
- Jacobson, M. D., M. Weil and M. C. Raff (1997). "Programmed cell death in animal development." Cell **88**(3): 347-54.
- Johansson, A. C., H. Steen, K. Ollinger and K. Roberg (2003). "Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine." Cell Death Differ **10**(11): 1253-9.
- Johnson, K. L., F. Vaillant and A. Lawen (1996). "Protein tyrosine kinase inhibitors prevent didemnin B-induced apoptosis in HL-60 cells." FEBS Lett **383**(1-2): 1-5.
- Joyce, J. A., A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraudo, F. Y. Tsai, D. C. Greenbaum, J. H. Hager, M. Bogyo and D. Hanahan (2004). "Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis." Cancer Cell **5**(5): 443-53.
- Joza, N., S. A. Susin, E. Daugas, W. L. Stanford, S. K. Cho, C. Y. Li, T. Sasaki, A. J. Elia, H. Y. Cheng, L. Ravagnan, K. F. Ferri, N. Zamzami, A.

- Wakeham, R. Hakem, H. Yoshida, Y. Y. Kong, T. W. Mak, J. C. Zuniga-Pflucker, G. Kroemer and J. M. Penninger (2001). "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death." Nature **410**(6828): 549-54.
- Kagedal, K., U. Johansson and K. Ollinger (2001). "The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress." Faseb J **15**(9): 1592-4.
- Kagedal, K., M. Zhao, I. Svensson and U. T. Brunk (2001). "Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases." Biochem J **359**(Pt 2): 335-43.
- Kerr, J. F., C. M. Winterford and B. V. Harmon (1994). "Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy." Cancer **73**(8): 2013-26.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Kobayashi, T., K. Honke, S. Gasa, T. Fujii, S. Maguchi, T. Miyazaki and A. Makita (1992). "Proteolytic processing sites producing the mature form of human cathepsin D." Int J Biochem **24**(9): 1487-91.
- Koblinski, J. E., M. Ahram and B. F. Sloane (2000). "Unraveling the role of proteases in cancer." Clin Chim Acta **291**(2): 113-35.
- Koike, M., H. Nakanishi, P. Saftig, J. Ezaki, K. Isahara, Y. Ohsawa, W. Schulz-Schaeffer, T. Watanabe, S. Waguri, S. Kametaka, M. Shibata, K. Yamamoto, E. Kominami, C. Peters, K. von Figura and Y. Uchiyama (2000). "Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons." J Neurosci **20**(18): 6898-906.
- Koike, M., M. Shibata, Y. Ohsawa, H. Nakanishi, T. Koga, S. Kametaka, S. Waguri, T. Momoi, E. Kominami, C. Peters, K. Figura, P. Saftig and Y. Uchiyama (2003). "Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice." Mol Cell Neurosci **22**(2): 146-61.
- Kornfeld, S. (1990). "Lysosomal enzyme targeting." Biochem Soc Trans **18**(3): 367-74.
- Krammer, P. H. (2000). "CD95's deadly mission in the immune system." Nature **407**(6805): 789-95.
- Kroemer, G. and M. Jaattela (2005). "Lysosomes and autophagy in cell death control." Nat Rev Cancer **5**(11): 886-97.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Larsen, L. B., A. Boisen and T. E. Petersen (1993). "Procathepsin D cannot autoactivate to cathepsin D at acid pH." FEBS Lett **319**(1-2): 54-8.
- Laskey, R. A. and A. D. Mills (1975). "Quantitative film detection of 3H and 14C in polyacrylamide gels by fluorography." Eur J Biochem **56**(2): 335-41.
- Laurent-Matha, V., D. Derocq, C. Prebois, N. Katunuma and E. Liaudet-Coopman (2006). "Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: involvement of cathepsins L and B." J Biochem (Tokyo) **139**(3): 363-71.
- Laurent-Matha, V., S. Maruani-Herrmann, C. Prebois, M. Beaujouin, M. Glondu, A. Noel, M. L. Alvarez-Gonzalez, S. Blacher, P. Coopman, S. Baghdiguan, C. Gilles, J. Loncarek, G. Freiss, F. Vignon and E. Liaudet-Coopman (2005). "Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth." J Cell Biol **168**(3): 489-99.

- Lawen, A. (2003). "Apoptosis-an introduction." *Bioessays* **25**(9): 888-96.
- Lee, A. Y., S. V. Gulnik and J. W. Erickson (1998). "Conformational switching in an aspartic proteinase." *Nat Struct Biol* **5**(10): 866-71.
- Leverrier, Y. and A. J. Ridley (2001). "Apoptosis: caspases orchestrate the ROCK 'n' bleb." *Nat Cell Biol* **3**(4): E91-3.
- Liaudet-Coopman, E., M. Beaujouin, D. Derocq, M. Garcia, M. Glondu-Lassis, V. Laurent-Matha, C. Prebois, H. Rochefort and F. Vignon (2006). "Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis." *Cancer Lett* **237**(2): 167-79.
- Ly, J. D., D. R. Grubb and A. Lawen (2003). "The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update." *Apoptosis* **8**(2): 115-28.
- Malia, T. J. and G. Wagner (2007). "NMR Structural Investigation of the Mitochondrial Outer Membrane Protein VDAC and Its Interaction with Antiapoptotic Bcl-x(L)." *Biochemistry* **46**(2): 514-25.
- Mancini, M., D. W. Nicholson, S. Roy, N. A. Thornberry, E. P. Peterson, L. A. Casciola-Rosen and A. Rosen (1998). "The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling." *J Cell Biol* **140**(6): 1485-95.
- Manji, G. A. and P. D. Friesen (2001). "Apoptosis in motion. An apical, P35-insensitive caspase mediates programmed cell death in insect cells." *J Biol Chem* **276**(20): 16704-10.
- Matsuyama, S., J. Llopis, Q. L. Deveraux, R. Y. Tsien and J. C. Reed (2000). "Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis." *Nat Cell Biol* **2**(6): 318-25.
- Merril, C. R., D. Goldman, S. A. Sedman and M. H. Ebert (1981). "Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins." *Science* **211**(4489): 1437-8.
- Metcalf, P. and M. Fusek (1993). "Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site." *Embo J* **12**(4): 1293-302.
- Misasi, R., T. Garofalo, L. Di Marzio, V. Mattei, C. Gizzi, M. Hiraiwa, A. Pavan, M. Grazia Cifone and M. Sorice (2004). "Prosaposin: a new player in cell death prevention of U937 monocytic cells." *Exp Cell Res* **298**(1): 38-47.
- Nagata, S. (2000). "Apoptotic DNA fragmentation." *Exp Cell Res* **256**(1): 12-8.
- Nakagawa, T., W. Roth, P. Wong, A. Nelson, A. Farr, J. Deussing, J. A. Villadangos, H. Ploegh, C. Peters and A. Y. Rudensky (1998). "Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus." *Science* **280**(5362): 450-3.
- Nijhawan, D., N. Honarpour and X. Wang (2000). "Apoptosis in neural development and disease." *Annu Rev Neurosci* **23**: 73-87.
- Nylandsted, J., K. Brand and M. Jaattela (2000). "Heat shock protein 70 is required for the survival of cancer cells." *Ann N Y Acad Sci* **926**: 122-5.
- Okazaki, T., T. Kondo, T. Kitano and M. Tashima (1998). "Diversity and complexity of ceramide signalling in apoptosis." *Cell Signal* **10**(10): 685-92.
- Ollinger, K. (2000). "Inhibition of cathepsin D prevents free-radical-induced apoptosis in rat cardiomyocytes." *Arch Biochem Biophys* **373**(2): 346-51.
- Paris, C., J. Bertoglio and J. Breard (2007). "Lysosomal and mitochondrial pathways in miltefosine-induced apoptosis in U937 cells." *Apoptosis*.

- Radin, N. S. (2001). "Killing cancer cells by poly-drug elevation of ceramide levels: a hypothesis whose time has come?" Eur J Biochem **268**(2): 193-204.
- Radin, N. S. (2003). "Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs." Biochem J **371**(Pt 2): 243-56.
- Reiners, J. J., Jr., J. A. Caruso, P. Mathieu, B. Chelladurai, X. M. Yin and D. Kessel (2002). "Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage." Cell Death Differ **9**(9): 934-44.
- Richo, G. and G. E. Conner (1991). "Proteolytic activation of human procathepsin D." Adv Exp Med Biol **306**: 289-96.
- Richo, G. R. and G. E. Conner (1994). "Structural requirements of procathepsin D activation and maturation." J Biol Chem **269**(20): 14806-12.
- Rijnboutt, S., A. J. Kal, H. J. Geuze, H. Aerts and G. J. Strous (1991). "Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells." J Biol Chem **266**(35): 23586-92.
- Roberg, K. (2001). "Relocalization of cathepsin D and cytochrome c early in apoptosis revealed by immunoelectron microscopy." Lab Invest **81**(2): 149-58.
- Roberg, K., K. Kagedal and K. Ollinger (2002). "Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts." Am J Pathol **161**(1): 89-96.
- Roberg, K. and K. Ollinger (1998). "Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuing apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes." Am J Pathol **152**(5): 1151-6.
- Rochefort, H. (1992). "Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis." Eur J Cancer **28A**(11): 1780-3.
- Rochefort, H., V. Cavailles, P. Augereau, F. Capony, T. Maudelonde, I. Touitou and M. Garcia (1989). "Overexpression and hormonal regulation of pro-cathepsin D in mammary and endometrial cancer." J Steroid Biochem **34**(1-6): 177-82.
- Rochefort, H. and E. Liaudet-Coopman (1999). "Cathepsin D in cancer metastasis: a protease and a ligand." Apmis **107**(1): 86-95.
- Rohde, M., M. Daugaard, M. H. Jensen, K. Helin, J. Nylandsted and M. Jaattela (2005). "Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms." Genes Dev **19**(5): 570-82.
- Saftig, P., M. Hetman, W. Schmahl, K. Weber, L. Heine, H. Mossmann, A. Koster, B. Hess, M. Evers, K. von Figura and et al. (1995). "Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells." Embo J **14**(15): 3599-608.
- Salvesen, G. S. and C. S. Duckett (2002). "IAP proteins: blocking the road to death's door." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 401-10.
- Salvesen, G. S. and M. Renatus (2002). "Apoptosome: the seven-spoked death machine." Dev Cell **2**(3): 256-7.
- Samarel, A. M., A. G. Ferguson, R. S. Decker and M. Lesch (1989). "Effects of cysteine protease inhibitors on rabbit cathepsin D maturation." Am J Physiol **257**(6 Pt 1): C1069-79.
- Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**(6805): 784-8.

- Sebbagh, M., C. Renvoize, J. Hamelin, N. Riche, J. Bertoglio and J. Breard (2001). "Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces mC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing." Nat Cell Biol **3**(4): 346-52.
- Shi, Y. (2002). "Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9." Structure **10**(3): 285-8.
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." Mol Cell **9**(3): 459-70.
- Shibata, M., S. Kanamori, K. Isahara, Y. Ohsawa, A. Konishi, S. Kametaka, T. Watanabe, S. Ebisu, K. Ishido, E. Kominami and Y. Uchiyama (1998). "Participation of cathepsins B and D in apoptosis of PC12 cells following serum deprivation." Biochem Biophys Res Commun **251**(1): 199-203.
- Shub, D. A. (1994). "Bacterial viruses. Bacterial altruism?" Curr Biol **4**(6): 555-6.
- Strasser, A., L. O'Connor and V. M. Dixit (2000). "Apoptosis signaling." Annu Rev Biochem **69**: 217-45.
- Takuma, K., M. Kiri, K. Mori, E. Lee, R. Enomoto, A. Baba and T. Matsuda (2003). "Roles of cathepsins in reperfusion-induced apoptosis in cultured astrocytes." Neurochem Int **42**(2): 153-9.
- Tang, J. and R. N. Wong (1987). "Evolution in the structure and function of aspartic proteases." J Cell Biochem **33**(1): 53-63.
- Tardy, C., J. Tyynela, A. Hasilik, T. Levade and N. Andrieu-Abadie (2003). "Stress-induced apoptosis is impaired in cells with a lysosomal targeting defect but is not affected in cells synthesizing a catalytically inactive cathepsin D." Cell Death Differ **10**(9): 1090-100.
- Terman, A., J. Neuzil, K. Kagedal, K. Ollinger and U. T. Brunk (2002). "Decreased apoptotic response of inclusion-cell disease fibroblasts: a consequence of lysosomal enzyme missorting?" Exp Cell Res **274**(1): 9-15.
- Trincheri, N. F., G. Nicotra, C. Follo, R. Castino and C. Isidoro (2006). "Resveratrol induces cell death in colorectal cancer cells by a novel pathway involving lysosomal cathepsin D." Carcinogenesis.
- Tsujimoto, Y., J. Cossman, E. Jaffe and C. M. Croce (1985). "Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma." Science **228**(4706): 1440-3.
- Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2002). "The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis." Biochimie **84**(2-3): 187-93.
- Turk, V., J. Kos and B. Turk (2004). "Cysteine cathepsins (proteases)--on the main stage of cancer?" Cancer Cell **5**(5): 409-10.
- Umezawa, H., T. Aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki and M. Hamada (1970). "Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes." J Antibiot (Tokyo) **23**(5): 259-62.
- Urbich, C., C. Heeschen, A. Aicher, K. Sasaki, T. Bruhl, M. R. Farhadi, P. Vajkoczy, W. K. Hofmann, C. Peters, L. A. Pennacchio, N. D. Abolmaali, E. Chavakis, T. Reinheckel, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2005). "Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization." Nat Med **11**(2): 206-13.
- van Loo, G., X. Saelens, M. van Gorp, M. MacFarlane, S. J. Martin and P. Vandenabeele (2002). "The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet." Cell Death Differ **9**(10): 1031-42.
- von Figura, K. and A. Hasilik (1986). "Lysosomal enzymes and their receptors." Annu Rev Biochem **55**: 167-93.

- Waterhouse, N. J., J. E. Ricci and D. R. Green (2002). "And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis." Biochimie **84**(2-3): 113-21.
- Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-30.
- Westley, B. R. and F. E. May (1999). "Prognostic value of cathepsin D in breast cancer." Br J Cancer **79**(2): 189-90.
- Wu, G. S., P. Saffig, C. Peters and W. S. El-Deiry (1998). "Potential role for cathepsin D in p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity." Oncogene **16**(17): 2177-83.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die nachfolgenden Damen und Herren in Marburg, denen ich an dieser Stelle herzlich danke:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Bien, Berger, Bertallanfy, Cetin, Daut, Engel, Eschenbach, Feuser, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Gemsa, Geus, Göke, Görg C., Görg K., Gotzen, Gressner, Grimm, Griss, Grzeschik, Gudermann, Haas, Habermehl, Happle, Hasilik, Hofbauer, Holst, Hoyer, Huffmann, Joseph, Kaffarnik, Kann, Kern, Klose, Kleine, Klenk, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhn, Lange, Lenz, Leppek, Lill, Liss, Lohoff, Löffler, Lorenz, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Oertel, Peters, Pfab, Schäfer, Remschmidt, Renz, Richter, Riedmiller, Roeper, Röhn, Rothmund, Schachtschabel, Schmidt, Schnabel, Schulz, Seitz, Seyberth, Siegel, Simon, Steiniger, Vogelmeier, Voigt, Weihe, Werner, Westermann.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Andrej Hasilik danke ich für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit, außerordentliches Engagement bei der Betreuung und die Verwirklichung dieser Dissertation in der physiologischen Chemie der Philipps-Universität Marburg.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Ralf Jacob für die Unterstützung während meiner Arbeit und die Möglichkeit der Benutzung der Mikroinjektionsanlage.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Bernd Kösters für das intensive Korrekturlesen und Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Lemansky für seine Unterstützung bei der Arbeit mit radioaktivem Material.

Herrn Heinrich Kaiser und Frau Gertraud Jarosch danke ich für die Unterstützung bei der Verarbeitung der Proben und die wunderbare Zusammenarbeit.

Ferner möchte ich mich recht herzlich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hasilik für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Klima bedanken.

Zuletzt möchte ich meinem Ehemann danken, der mich während der Anfertigung dieser Dissertation sehr unterstützt hat, meinen Eltern, meiner Freundin Rebekka Schirren sowie meiner Schwester Helena.