

Sonja Kierschke

Dr.med.

Spaltung von Hsp90 alpha durch Calpain in aktivierten apoptotischen Lymphozyten

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Hanns-Martin Lorenz

Das Heat Shock Protein 90 (Hsp90) gehört zur Klasse der Chaperone und stellt den größten nicht-ribosomalen Proteinanteil im Zytosol und die größte Proteinfraction im Endoplasmatischen Retikulum dar. Es liegt im Zytosol in zwei Isoformen vor: Hsp90 alpha als induzierbare Isoform und Hsp90 beta als konstitutiv vorkommende Isoform. Unter Einfluss von Stressoren auf die Zelle, wie z. B. Hitze, UV-Licht, Entzündung oder Infektion, werden die HSPs vermehrt synthetisiert. Die intrazellulären Funktionen des Hsp90 bestehen unter anderem in der Faltung von neu-synthetisierten Proteinen, dem Transport von Proteinen, der Verhinderung von unerwünschter Proteinaggregation und der Reaktivierung oder Degradierung von denaturierten Proteinen. Dem extrazellulären Hsp90 wird dagegen eine immunogene Eigenschaft zugesprochen. Diese umfasst (1) die Fähigkeit, als Chaperon Peptide zu binden, (2) die rezeptorvermittelte Endozytose durch antigen-präsentierende Zellen, (3) die Stimulation von Monozyten und Makrophagen zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine sowie (4) die Reifung dendritischer Zellen durch Hsp-Bindung an den Toll-like Rezeptor 2, bzw. 4.

Unter physiologischen Bedingungen wird apoptotisches Material in den Zellen durch umliegende Phagozyten beseitigt, ohne eine Immunantwort zu induzieren. Durch extrazelluläres Hsp90 kann dagegen die immunogene Aktivität von apoptotischen Zellen verstärkt werden. So kann z. B. bei SLE-Patienten eine erhöhte Ablagerung von Hsp90 in den Nieren und ein erhöhter Anteil an anti-Hsp90 Autoantikörpern im Serum nachgewiesen werden. Hieraus lässt sich auf eine Beteiligung des Hsp90 an der Pathogenese des SLE schließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Abbau von Hsp90 in apoptotischen Zellen näher betrachtet, unter der Annahme, dass Hsp90 unter physiologischen Bedingungen während der Apoptose aktiv verändert bzw. abgebaut werden muss, um eine Immunreaktion zu verhindern. Tatsächlich ließ sich eine Spaltung des Hsp90 in aktivierten, apoptotischen Zellen (Lymphoblasten und stimulierten PBMCs) nachweisen. Bei näherer Betrachtung der zytosolischen Isoformen des Hsp90 konnte gezeigt werden, dass ausschließlich die induzierbare Isoform Hsp90 α gespalten wird. Das entstandene Spaltprodukt konnte im Western Blot detektiert werden und hat in etwa eine Größe von 55 kDa.

In den weiteren Versuchen wurde der Spaltungsmechanismus untersucht. Durch Zugabe eines Pan-Caspase-Inhibitors (zVAD-FMK) ließ sich die Spaltung komplett inhibieren. Spezifischere Inhibitoren wie ein Caspase 3/8- und ein Caspase 9-Inhibitor konnten lediglich teilweise die Spaltung inhibieren. Durch Calpain, eine caspase-abhängig aktivierbare Protease, ließ sich die Hsp90 Spaltung spezifisch blockieren. Calpain liegt intrazellulär gebunden an seinen Inhibitor Calpastatin vor. Während der Apoptose kommt es zu einer Spaltung des Calpastatins durch Caspase 3 und zu einer Aktivierung des Calpains.

Um zu verdeutlichen, dass Hsp90 in apoptotischen Zellen gespalten werden muss, um eine Inflammation zu vermeiden, wurden Zytokinanalysen durchgeführt. Hierbei wurden Monozyten mit apoptotischen, aktivierten Zellen koinkubiert und nach 24 Stunden die Zytokinkonzentrationen in den Überständen gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-2, IFN γ , IL-17A, TNF α und IFN α durch Inhibition der Hsp-90 Spaltung oder durch Zugabe von extrazellulärem Hsp90 ansteigen. Somit konnte bewiesen werden, dass in apoptotischen, aktivierten Zellen eine Spaltung des Hsp90 notwendig ist, um eine anti-inflammatorische Beseitigung des apoptotischen Materials zu gewährleisten. Durch einen unzureichenden Abbau von Hsp90 während der Apoptose kann so die Entstehung von Autoimmunkrankheiten begünstigt werden.