

## 4. Ergebnisse

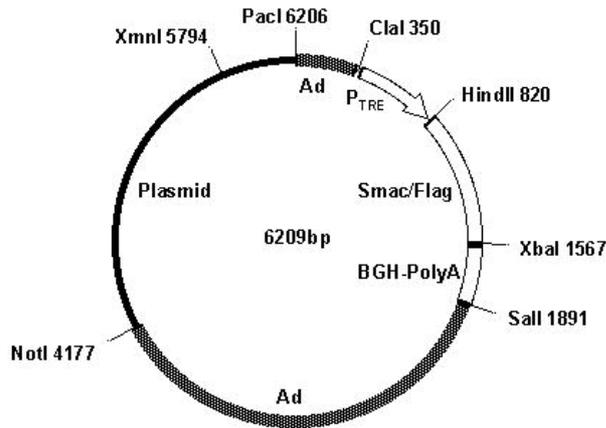
### 4.1 Konstruktion und Charakterisierung eines rekombinanten Adenovirus zur konditionalen Expression von Smac

#### 4.1.1 Herstellung der adenoviralen Plasmide und Generierung eines induzierbaren rekombinanten Adenovirus

Das Ausgangsmaterial für die Klonierung von Smac, die humane C-terminal Flag-markierte cDNA, wurde freundlicherweise von Dr. M. Schuler (III. Abteilung für Innere Medizin, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) zur Verfügung gestellt.

Zur Untersuchung der beteiligten Signalwege, insbesondere zur Klärung der Frage nach der Rolle des proapoptotischen Bax und des antiapoptotischen Proteins Bcl-x<sub>L</sub> bei der Smac-induzierten Apoptose, wurde die „full length“ cDNA zur Klonierung eingesetzt (Du *et al.*, 2000). Um eine konditionale Expression des Transgens zu gewährleisten, wurde das in der Arbeitsgruppe etablierte singuläre adenovirale Vektorsystem auf Basis des von Gossen und Bujard (1992) entwickelten Tetracyclin/Doxicyclin-abhängigen Tet-Off-Systems verwendet. Dabei beinhaltet ein einziger adenoviraler Vektor sowohl eine Region für die konstitutive Expression des Transaktivators, als auch das unter der Kontrolle eines induzierbaren Promoters stehende Transgen. Das adenovirale Rückgrat wird von einem Plasmid der ersten Generation gebildet, welches in der E1 und der E3-Region deletiert ist (pAd1-DelE1/E3). Es wurde so modifiziert, daß die E3-Region durch eine Expressionskassette für den unter der Kontrolle eines CMV-Promoters stehenden tTA-Tet-Off-Transaktivator ersetzt worden ist. Dadurch entstand das für die spätere homologe Rekombination eingesetzte Plasmid pAd1-DelE1/E3-tTA (Gillissen *et al.* 2003).

Bei dem Shuttle-Plasmid pAd2-TRE handelt es sich um ein „left end shuttle-Plasmid“, das zur Insertion von Genen in die E1-Region des Genoms von Adenoviren des Typs 5 dient. Durch Modifikationen von Gillissen *et al.* enthält es ein TRE-Element und ein BGH-Polyadenylierungssignal.

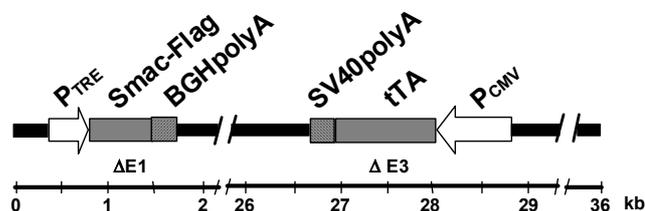


**ABB. 11: Karte des Shuttle-Plasmids pAd2-TRE-Smac/Flag**

In das Plasmid zur Insertion von Genen in die E1-Region wurde die Smac/Flag cDNA nach Amplifikation durch PCR über die Schnittstellen HindIII / XbaI kloniert. Für die homologe Rekombination wurde das Plasmid durch Restriktion mit PacI / NotI und XmnI linearisiert.

Für die Klonierung der humanen C-terminal Flag-markierten cDNA in den Shuttle Vektor wurden mittels PCR über spezifische Primer die Schnittstellen HindIII und XbaI an das amplifizierte Transgen angefügt. Über diese Schnittstellen wurde die Smac/Flag cDNA in den Shuttle-Vektor pAd2-TRE kloniert (Abb.11).

Für die homologe Rekombination in *BJ5183* Zellen wurde das Shuttle-Plasmid durch Restriktion mit PacI / NotI und XmnI und das adenovirale Plasmid pAd1-DelE1/E3-tTA mit PacI linearisiert und kotransformiert. Die Virusproduktion erfolgte in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293, welche die fehlenden E1-Funktionen des adenoviralen Genoms komplementieren kann. Die Transfektion erfolgte durch Calcium-Phosphat-Präzipitation. Dabei wurde die durch PacI linearisierte rekombinante adenovirale DNA an Calcium-Phosphat-Kristalle gebunden, die von den Zellen über Phagozytose aufgenommen werden. Nach Auftreten zytopathischer Effekte, wurden die Zellen geerntet und das „Crude Virus Lysate“ (CVL) zur Propagation des Virus genutzt, dessen genomische Struktur schematisch in Abb. 12 dargestellt ist.



**ABB. 12: Genomische Struktur des rekombinanten Adenovirus Ad5-Smac/Flag-tTA (Ad-Smac)**

Die Sequenzen des Ad5-Genoms sind als schwarze Boxen dargestellt. Grau markiert sind die vormaligen E1 und E3-Regionen, welche durch die Smac/Flag-, bzw. durch die tTA-Expressionskassette ersetzt worden sind. Die Promotoren dieser Expressionskassetten sind als weiße Pfeile in der jeweiligen Transkriptionsrichtung, die dazugehörigen Polyadenylierungssignale als schraffierte Boxen dargestellt.

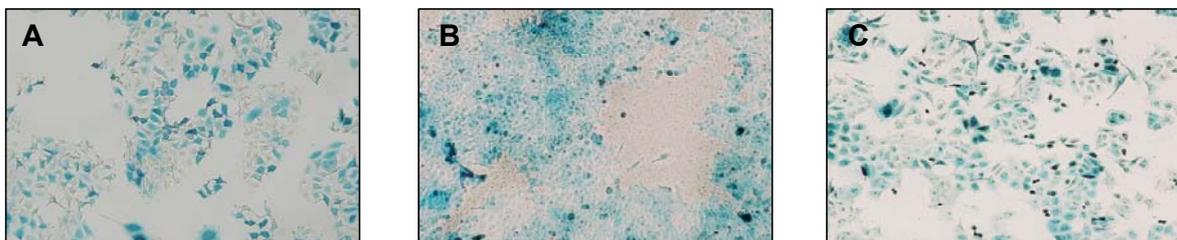
#### 4.1.2 Nachweis der Replikationsinkompetenz und Titerbestimmung von Ad-Smac

Bei der Vermehrung des Virus in den E1A-exprimierenden HEK293-Zellen, kann es unter Umständen zu einer Rekombination des adenoviralen Vektors mit den in der Verpackungszelllinie stabil integrierten Teilen des Adenovirusgenom kommen. In diesem Falle könnte das replikationsdefiziente Virus, das in seiner E1A-Region die Expressionskassette für das Transgen enthält, zu einer replikationsfähigen Form rekombinieren. Die Replikationsinkompetenz des generierten Adenovirus Ad-Smac ließ sich in einer PCR-Reaktion durch den Test auf den E1A-Gehalt der adenoviralen DNA überprüfen. Für Ad-Smac ließen sich in der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese keine Amplifikate der E1A-Region nachweisen, so daß eine Replikation des Virus nach der Infektion ausgeschlossen werden kann.

Die Titerbestimmung („plaque forming units/ $\mu\text{l}$ “) wurde nach der Endpunktverdünnungsmethode durchgeführt. Dazu wurden HEK293 Zellen mit ansteigendem Verdünnungsfaktor des aufgereinigten Virus infiziert. Für Ad-Smac ergab sich dabei eine Viruskonzentration von  $1 \times 10^7$  pfu/ $\mu\text{l}$ .

#### 4.1.3 Nachweis der Transduktionseffizienz eukaryotischer Zellen

Die Transduktionseffizienz der in dieser Arbeit verwendeten Zellsysteme wurde durch die Infektion der Zellen mit 25 MOI eines konstitutiv LacZ-exprimierenden Kontrollvirus (Ad-LacZ) bestimmt. 48 h nach der Infektion wurden die Zellen einer X-Gal-Färbung unterzogen und der Anteil der blau gefärbten Zellen unter dem Mikroskop bestimmt. Es ließ sich in den Zellsystemen DU145 mock, HCT116 control und MCF-7 mock, eine adenovirale Transduktionseffizienz von 80%-90% erreichen (Abb. 13).



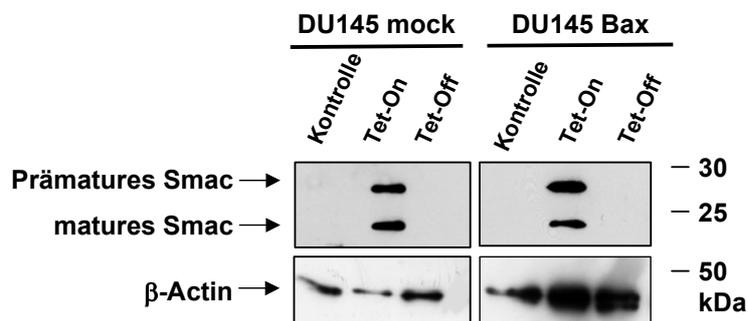
**ABB. 13 :  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung zur Bestimmung der Transduktionseffizienz der verwendeten Zellsysteme** DU145 mock (A), HCT116 control (B) und MCF-7mock (C) Zelllinien wurden mit 25 MOI Ad-LacZ infiziert. Die Färbung mit X-Gal erfolgte 48 h nach der Infektion. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus Aufnahmen mit 10-facher Vergrößerung.

#### 4.1.4 Nachweis der Transgenexpression durch Western Blot-Analyse

Nach Aufreinigung des Virus wurde die Intaktheit des Transgens durch DNA-Sequenzierung überprüft. Dabei wurden in der Sequenz der Smac-cDNA keine Abweichungen im Vergleich zur Originalsequenz festgestellt.

Die Funktionalität der adenoviralen Proteinexpression und die Regulierbarkeit durch das Tet-Off-System wurde zunächst mittels Western Blot-Analyse bestätigt. Hierzu wurden sowohl Bax-defiziente als auch Bax-reexprimierende DU145 Prostata-Karzinomzellen mit 25 MOI Ad-Smac infiziert und unter An- (Tet-Off-), bzw. Abwesenheit (Tet-On-Bedingungen) von 1 µg/ml Doxycyclin inkubiert. 48 h nach der Infektion wurden die Zellen durch Trypsinieren geerntet und Gesamtzelllysate hergestellt.

Um eine Spezifität bezüglich des adenoviral exprimierten Proteins zu erhalten und um endogenes, zelleigenes Smac-Protein bei der Detektion auszuschließen, wurde ein gegen das C-terminale Flag-Epitop gerichteter HRP-gekoppelter Antikörper gewählt. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels, wurde die Membran zusätzlich mit einem anti-β-Actin-Antikörper inkubiert.



**ABB. 14: Western Blot-Analyse zum Nachweis der induzierbaren Expression von Smac/Flag in DU145 mock und Bax Zellen**

Neben der unbehandelten Mediumkontrolle sind Lysate von Zellen aufgetragen, die mit 25 MOI Ad-Smac unter Tet-Off-, bzw. Tet-On-Bedingungen infiziert worden waren. Nachgewiesen wurde die exogene Smac-Expression durch einen anti-Flag-Antikörper. Als Ladungskontrolle diente β-Actin.

In der Western Blot-Analyse ließ sich zu einem Zeitpunkt von 48 h nach der Infektion der Zellen mit 25 MOI Ad-Smac eine deutliche Proteinüberexpression erreichen (Abb. 14). Diese ist in den Bax-profizienten und defizienten DU145 Zellen in gleicher Intensität vorhanden, wenn kein Doxycyclin dem Kulturmedium zugesetzt wurde (Tet-On-Bedingungen). Im Gegensatz dazu konnte die Expression des Transgens vollständig durch die Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin in das Kulturmedium reprimiert werden (Tet-Off-Bedingungen).

Die Proteinexpression äußert sich im Auftreten von zwei Banden, die im Western Blot auf der Höhe von ca. 29 kDa und 23 kDa detektierbar sind. Da mit Smac ein Protein mit

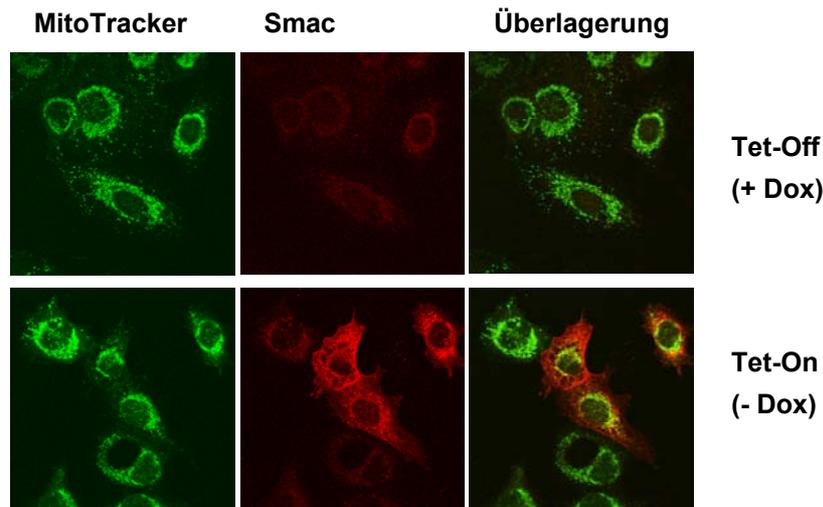
mitochondrialer Zielsequenz zur Expression gebracht wurde, kann die größere der beiden Banden auf Höhe von 29 kDa der immaturren Form des Smac-Proteins zugeordnet werden. Sie enthält die in den ersten 55 von insgesamt 239 AS des Proteins kodierte mitochondriale Zielsequenz. Die 23 kDa Bande läßt von ihrer Größe auf die mature, mitochondriale Form von Smac schließen. Das Vorhandensein der 23 kDa Bande deutet ferner auf eine korrekte intrazelluläre Prozessierung des adenoviral überexprimierten Smac zu seiner maturen Form ohne mitochondriale Zielsequenz hin.

Da sich mit der in diesem Versuch eingesetzten Viruskonzentration von 25 MOI unter Tet-On-Bedingungen eine starke Expression des Smac-Proteins erreichen ließ, wurde diese Viruskonzentration zur Infektion in allen nachfolgenden Experimenten eingesetzt.

#### **4.1.5 Nachweis der Transgenexpression mittels Immunfluoreszenz**

Neben dem Nachweis der Expression des Transgens selbst, wurde auch die Lokalisation des exogen exprimierten Smac-Proteins mittels einer Doppelfärbung im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Für die Immunfluoreszenz wurden Bax-defiziente DU145 mock Zellen eingesetzt, da sich in der Abb. 14 gezeigten Western Blot-Analyse kein Unterschied zwischen dem Bax-Status der Zellen und der adenoviralen Expression von Smac nachweisen ließ.

Zum Zeitpunkt von 24 h nach der Infektion und Kultivierung der Zellen unter Tet-On-, bzw. Tet-Off-Bedingungen, wurden die Zellen mit MitoTracker Green zur selektiven Anfärbung der Mitochondrien versetzt. Anschließend an die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper. Dieser war gegen das humane Smac-Protein gerichtet und detektiert somit sowohl das adenoviral exprimierte Protein, als auch die zelleigenen Formen. Um eine gut sichtbare farbliche Überlagerung in der Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen zu gewährleisten, wurde ein roter AlexaFluor594-gekoppelter sekundärer Antikörper gewählt. Die Bilder für die Anfärbung der Mitochondrien und des Zielproteins unter Tet-On-, bzw. Tet-Off-Bedingungen sind in Abb. 15 als Einzelaufnahmen und als deren Überlagerungen gezeigt. Die repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen der linken Spalte zeigen die Einzelfärbung der Mitochondrien, welche vornehmlich im Bereich des Nukleus angeordnet und nur geringfügiger über den restlichen Teil der Zelle verteilt sind. Die Anfärbung der Mitochondrien durch MitoTracker Green ist unter reprimierten, als auch unter adenoviralen Expressionsbedingungen von gleicher Intensität. In der mittleren Spalte sind Bilder der immunzytochemischen Färbung von Smac gezeigt. Unter Tet-Off-Bedingungen ist nur eine sehr schwache rote Fluoreszenz zu erkennen. Diese schwache



**ABB. 15: Subzelluläres Expressionsmuster von Smac/Flag**

*Bax-defiziente DU145 mock Zellen wurden mit 25 MOI Ad-Smac infiziert und über 24 h unter Tet-On-, bzw. Tet-Off-Bedingungen kultiviert. Durch Inkubation mit „MitoTracker Green“ erfolgte die Anfärbung der Mitochondrien. Nach dem Fixieren folgte die Inkubation mit dem primären gegen Smac gerichteten und dem sekundären AlexaFluor594-gekoppeltem Antikörper. Die Mitochondrien erscheinen nach der Färbung in grün, Smac Protein erscheint nach Anfärbung rot. In der Überlagerung beider Signale erscheinen Kolokalisationen gelb.*

Hintergrundfärbung unter Tet-Off-Bedingungen kann neben unspezifischen Bindungen des Antikörpers auch von dem endogenen Protein herrühren.

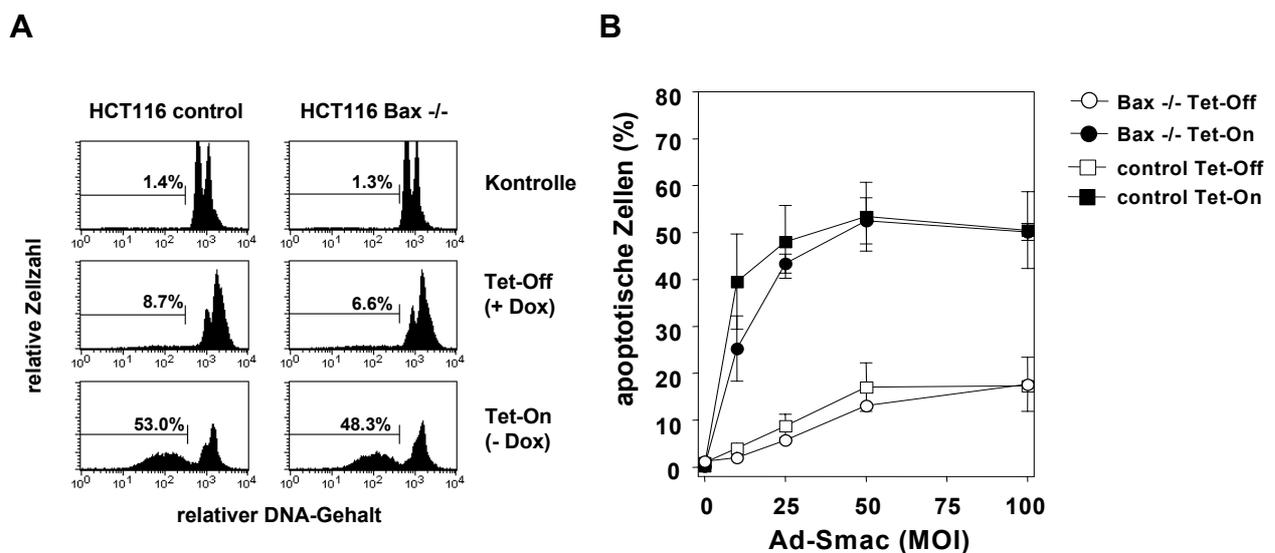
Unter Tet-On-Bedingungen zeigt sich dagegen eine sehr deutliche rote Färbung der Zellen, die jedoch nicht wie in den korrespondierenden Aufnahmen der Mitochondrien nur auf die Peripherie des Nukleus beschränkt ist. Dies wird insbesondere in den Überlagerung der Einzelaufnahmen in der rechten Spalte deutlich. Hier zeigt sich im Bereich der Mitochondrien um den Nukleus herum eine deutliche Gelbfärbung durch Kolokalisation. Darüber hinaus zeigt sich jedoch auch eine netz- und fadenartige Verteilung des Smac-Proteins innerhalb der Zelle.

## 4.2 Untersuchung der Aktivierung von Signalwegen bei der Smac-induzierten Apoptose

### 4.2.1 Bax-unabhängige Apoptoseinduktion durch adenovirale Expression von Smac in HCT116 endogenen Bax-exprimierenden Kontrollzellen und Bax<sup>-/-</sup> Colon-Karzinomzellen

Im Anschluß an die durch Western Blot-Analyse gezeigte Bax-unabhängige Expression des Transgens und der zellulären Lokalisation des Proteins, sollten die zellulären Auswirkungen der Smac-Expression auf die Viabilität von Zellen überprüft werden.

Bax-exprimierende HCT116 control und Bax<sup>-/-</sup> Zellen wurden 24 h nach dem Ausplattieren mit jeweils 10, 25, 50 und 100 MOI Ad-Smac infiziert und unter Tet-Off-, bzw. Tet-On-Konditionen kultiviert. Nach 48 h wurden die Zellen durch Trypsinieren geerntet und für die Messung der DNA-Fragmentierung am Durchflußzytometer aufgearbeitet.



**ABB. 16: Apoptoseinduktion durch adenovirale Expression von Smac in HCT116 control und Bax<sup>-/-</sup> Zellen**  
**(A)** Repräsentative Histogramme nach einer Infektion mit 25 MOI Ad-Smac. Der Prozentsatz der apoptotischen Zellen ist angegeben. **(B)** Dosiswirkungskurve: HCT116 control (Kreise) und Bax<sup>-/-</sup> (Quadrate) Zellen wurden mit der angegebenen MOI infiziert und in An-, bzw. Abwesenheit von Doxycyclin im Medium kultiviert (weiße, bzw. schwarze Symbole). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten aus je drei unabhängigen Experimenten.

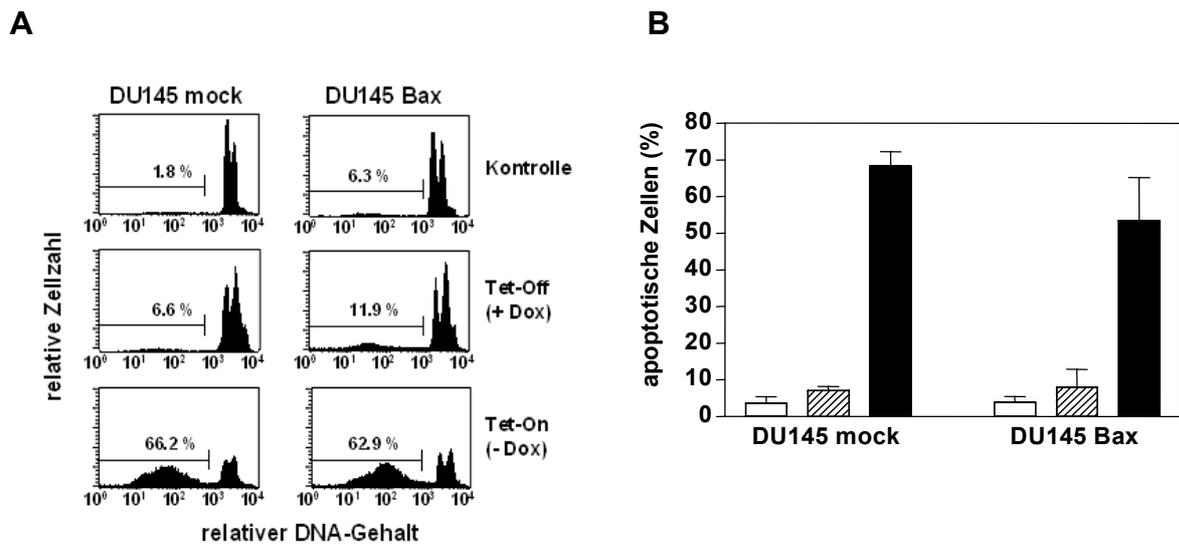
Neben repräsentativen Histogrammen, die die Meßergebnisse für die Infektion mit Ad-Smac bei einer Dosis von 25 MOI zeigen, ist die aus der Titration resultierende Dosiswirkungskurve dargestellt (Abb. 16B). Aufgetragen ist in weiß der Prozentsatz apoptotischer Zellen unter Tet-Off-Konditionen, in schwarz dargestellt sind die erhaltenen Werte unter Abwesenheit von Doxycyclin im Medium (Tet-On-Konditionen). Sowohl für die Bax-exprimierenden als auch für die Bax „knock-out“ HCT116 Zellen läßt sich durch die konditionale Expression von

Smac bezüglich der Apoptoseinduktion (gemessen in Prozent von Zellen mit hypodiploiden DNA-Gehalt) die Form einer Sättigungskurve erkennen. Diese erreicht bei 50 MOI ihren Höhepunkt und nimmt bei der nächst höheren Viruskonzentration von 100 MOI bereits leicht ab. Die Apoptoserate liegt in den unbehandelten Mediumkontrollen beider Zelllinien bei 1%. Unter Tet-Off-Konditionen steigt diese nach der Infektion mit 50 MOI auf maximal 15% an. Bei einer Infektion mit einer geringeren Anzahl von Viruspartikeln/Zelle bleibt die Hintergrundapoptose unter 10% und ist damit gegenüber der Mediumkontrolle nur leicht erhöht. Trotz der Hintergrundapoptose unter Tet-Off-Bedingungen von 15%, ließ sich jedoch durch die adenovirale Expression von Smac bei 50 MOI eine Erhöhung der Apoptoserate um 35 Prozentpunkte auf 50% erzielen.

Unterschiede in der Anzahl der Zellen mit hypodiploiden DNA-Gehalt zwischen den Bax-exprimierenden und Bax-defizienten HCT116 Zellen ließen sich lediglich bei einer Infektion mit einer MOI von 10 beobachten. Bei dieser Viruskonzentration starben die Bax-profizienten Zellen mit 40% (+/- 10%) in einem höheren Maße als die Bax-defizienten HCT116 Zellen mit durchschnittlich 25% (+/- 5%). Mit zunehmender Viruskonzentration nivellierte die Apoptoserate beider Klone jedoch, was darauf hindeutet, daß die Apoptoseinduktion durch Smac unabhängig von ihrem Bax-Status erfolgt.

#### **4.2.2 Bax-unabhängige Apoptoseinduktion durch adenovirale Expression von Smac in DU145 mock und Bax Prostata-Karzinomzellen**

Die sich in den Versuchen mit den HCT116 Zellen abzeichnende Bax-unabhängige Apoptoseinduktion durch die adenovirale Expression von Smac sollte in einem weiteren Zellsystem überprüft werden. Gewählt wurde dafür die Prostata-Karzinomlinie DU145, welche für Bax mutiert ist und daher kein Bax exprimiert. Zur Erzeugung einer isogenen Bax-reexprimierenden Zelllinie wurde in der Arbeitsgruppe die Bax-defiziente DU145 Mutterlinie mit einem retroviralen, die humane Bax- $\alpha$ -cDNA enthaltendem, oder mit leerem Vektor mock-transfiziert. Die aus dieser Transfektion resultierenden DU145 mock und DU145 Bax Zellen wurden mit 25 MOI des Adenovirus infiziert und unter An-, bzw. Abwesenheit von Doxycyclin im Medium kultiviert. Die Zellen wurden nach 48 h geerntet und die DNA-Fragmentierung durchflußzytometrisch gemessen.



**ABB. 17: Bax-unabhängige Apoptoseinduktion durch adenvirale Expression von Smac in DU145 mock und Bax Zellen**

(A) Repräsentative Histogramme nach einer Infektion mit 25 MOI Ad-Smac. Der Prozentsatz der apoptotischen Zellen ist angegeben. (B) Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten aus je drei unabhängigen Experimenten.

Weißer Balken: unbehandelte Kontrolle; schraffierter Balken: Tet-Off-Konditionen; schwarzer Balken: Tet-On-Konditionen

Gezeigt sind in Abb. 17B die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten, sowie repräsentative Histogramme mit den Ergebnissen einzelner Messungen (Abb. 17A).

Der Prozentsatz apoptotischer Zellen in den unbehandelten Mediumkontrollen liegt sowohl in den DU145 mock als auch in den DU145 Bax Zellen bei durchschnittlich 5%. Unter Tet-Off-Bedingungen ist die Hintergrundapoptoserate in beiden Zelllinien mit 10% gegenüber der der Mediumkontrolle nur leicht erhöht. Ein solcher Effekt unter reprimierten Expressionsbedingungen konnte bereits in den HCT116 Zellen beobachtet werden.

Durch Anschalten der Smac-Expression konnte in den Bax-negativen DU145 mock Zellen eine Steigerung der Apoptoserate um das 6,5-fache von 10% auf 66% erreicht werden. In den Bax-exprimierenden DU145 Bax Zellen wurde die durch Smac induzierte Apoptoserate um den Faktor 5,5 gesteigert. Damit fiel der Prozentsatz apoptotischer Zellen mit 55% etwas geringer aus als in den DU145 mock Zellen.

### 4.2.3 Analyse Apoptose-assoziiierter Proteine nach Infektion mit Ad-Smac

Da Smac seine proapoptotische durch eine Aktivierung der Caspase-Signalkaskade entfaltet, sollte die Prozessierung relevanter Ziel- und Effektorproteine, insbesondere der Caspasen-3 und -9 sowie XIAP, einem direkten Kompetitor von Smac bei der Aktivierung von Caspasen, untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden HCT116 control und Bax<sup>-/-</sup> Zellen erneut mit 25 MOI Ad-Smac nach Standardbedingungen infiziert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen auch mit 1 µg/ml des Zytostatikums Epirubicin behandelt. Bei Epirubicin handelt es sich um ein Anthracyclin-Antibiotikum, das durch Interkalation in die DNA und die Generierung von Strangbrüchen als Topoisomerase II $\alpha$ -Hemmer fungiert. Diese Epirubicin-induzierten Schädigungen lösen innerhalb der Zelle eine Aktivierung der Mitochondrien und damit eine nachfolgende Induktion des Caspasesignalweges aus. Daher kann die Prozessierung und Aktivierung von Caspasen unabhängig von der Infektion mit Ad-Smac durch einen anderen Stimulus überprüft werden.

Für die Gewinnung von Gesamtzellysaten erfolgte die Ernte der infizierten Zellen nach 24 h. In Western Blot-Analysen mit Proteinlysaten die 48 h nach der Infektion mit Ad-Smac gewonnen wurden, war es aufgrund der bereits fortgeschrittenen Degradation der apoptotischen Zellen nur möglich eine Abnahme der Proform zu detektieren. Ein Nachweis der Spaltprodukte konnte nicht mehr geführt werden. Ferner handelt sich bei der Aktivierung von Caspasen um einen frühen Prozeß bei der Exekution des Zelltodes, der der apoptotischen DNA-Fragmentierung vorausgeht.

Für die SDS-PAGE wurden je 25 µg Protein eingesetzt, nach Standardbedingungen geblottet und der weiteren Western Blot-Analyse unterzogen.

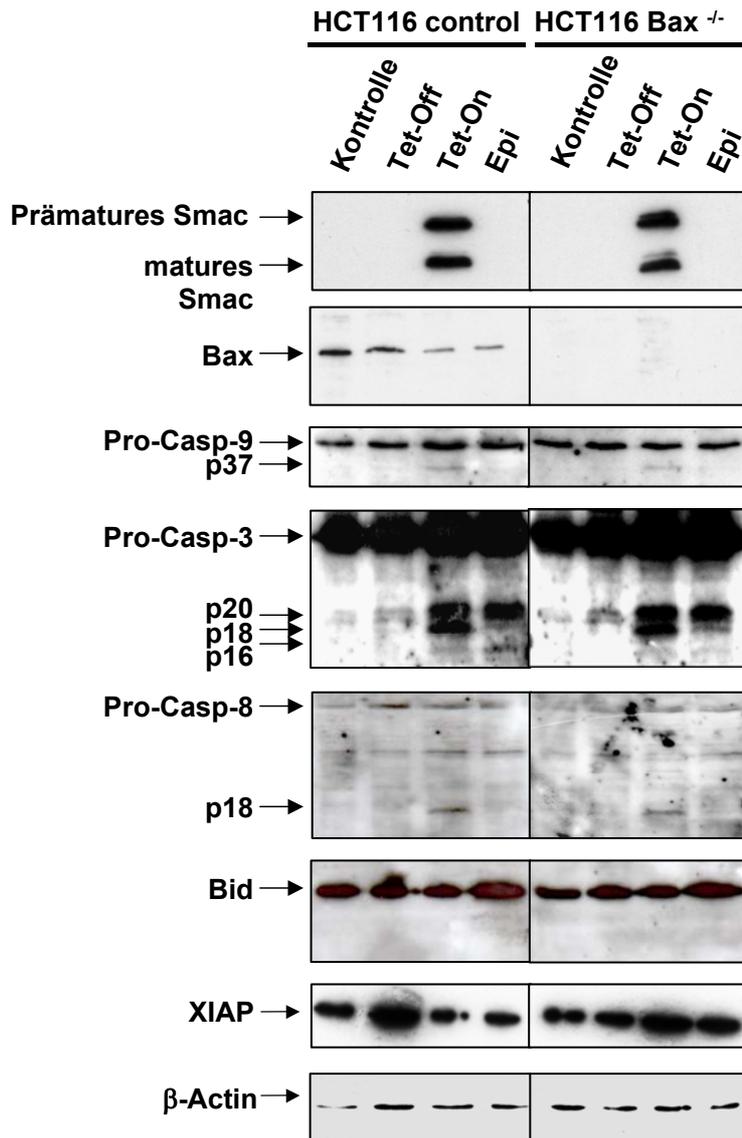
In den HCT116 control Zellen konnte die Expression von Bax nachgewiesen werden, während eine Detektion in den HCT116 Bax<sup>-/-</sup> Zellen nicht möglich war. Bereits 24 h nach der Infektion mit Ad-Smac konnte eine deutliche Expression der prämaternen (29 kDa) und der maturateden Form (23 kDa) von Smac unter Tet-On-Konditionen beobachtet werden. Unter reprimierten Bedingungen war keine Expression von Smac detektierbar. Dies bestätigt die in den DU145 mock und Bax Zellen gemachte Beobachtung der Bax-unabhängigen Expression von Smac (Abb. 14). Als Folge der adenoviralen Expression von Smac ließ sich sowohl in den Bax-profizienten als auch in den Bax-defizienten HCT116 Zellen eine gleichermaßen intensive Prozessierung von Caspase-9 in ihre p37 Untereinheit beobachten. In beiden Zelllinien war in der Mediumkontrolle und unter Tet-Off-Bedingungen keine Spaltung der Pro-Caspase-9 nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnte bereits in der unbehandelten Kontrolle sowie unter Tet-Off-Bedingungen bei Caspase-3 eine geringfügige Spaltung in die

aktiven p20 und p18 Untereinheiten, nicht aber in die p16 Untereinheit detektiert werden. Durch die Expression von Smac ließ sich eine wesentliche Steigerung der Prozessierung erreichen. Allerdings ist auch hier lediglich der Anteil der p20 und p18 Spaltprodukte stark erhöht. Hinsichtlich der p16 Untereinheit konnte keine Zunahme der Bandenintensität detektiert werden.

Ausgehend von einer Aktivierung der Caspase-3 kann es zu einer Aktivierung von Caspase-8 kommen, die die Spaltung von Bid vermittelt. Trunkiertes Bid (tBid) kann die Aktivierung der Mitochondrien über einen Amplifikationsloop verstärken. Zur Untersuchung, ob ein solcher mitochondrialer Amplifikationsloop besteht, wurden sowohl Caspase-8- als auch Bid-Spaltung untersucht. Im Vergleich zu dem zellulären Gehalt der Caspasen-3 und -9 ist der von Caspase-8 relativ gering. Wie für Caspase-9 konnte in der Mediumkontrolle und unter Tet-Off-Bedingungen keine Spaltung oder Abnahme der Proform nachgewiesen werden, während das p18 Spaltprodukt bei Smac-Expression gebildet wurde. Ein Nachweis des Spaltproduktes von Bid war aus technischen Gründen nicht möglich, so daß die Analyse der Bid-Spaltung auf eine Abnahme der Proform reduziert werden mußte. In beiden Zelllinien konnte aber sowohl unter Tet-Off-, als auch unter Tet-On-Bedingungen ein gleichbleibender Gehalt von Bid auf dem Niveau der unbehandelten Kontrollen beobachtet werden.

Ebenfalls unverändert stellte sich in allen experimentellen Ansätzen das Expressionsniveau von XIAP dar. Smac scheint also zu diesem betrachteten Zeitpunkt keinen Einfluß auf die Spaltung des Caspase-inhibierenden und kompetitiven XIAP zu haben.

Nach 24 h Inkubationsdauer mit dem Zytostatikum Epirubicin konnte keine wesentliche Prozessierung von Pro-Caspase-9 detektiert werden, obwohl bereits eine deutliche Spaltung von Caspase-3 in die p20 Untereinheit nachzuweisen war (Abb. 18). Die Intensität der Bande für das p18 Spaltprodukt ist im Vergleich zu der Smac-induzierten Prozessierung deutlich geringer und auch das p16 Fragment kann, wie nach Smac-induzierter Prozessierung, nur schwach detektiert werden. Somit konnte zwar die Prozessierung von Caspasen überprüft werden, aber die erhaltenen Spaltprodukte weisen auf einen anderen Wirkungsmechanismus oder einen anderen zeitlichen Verlauf bei der Exekution von Apoptose durch Epirubicin hin.

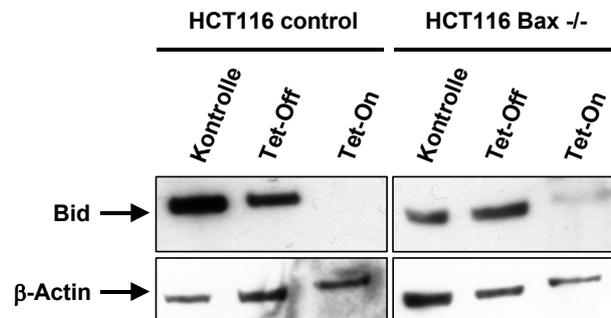


**ABB. 18: Western Blot-Analyse der Expression und Spaltung Apoptose-assoziiierter Proteine nach Smac-Expression**

HCT116 control und Bax<sup>-/-</sup> Zellen wurden nach Infektion mit 25 MOI Ad-Smac in An- bzw. Abwesenheit von 1 µg Doxycyclin im Medium für 24 h kultiviert. Als Positivkontrolle diente die Behandlung mit jeweils 1 µg/ml Epirubicin (Epi), die ebenfalls nach 24 h geerntet wurde. Für die Western Blot-Analyse der Expression der angegebenen Proteine wurden Gesamtzelllysate eingesetzt. Als Ladungskontrolle diente die Inkubation mit einem β-Actin Antikörper.

Da sich 24 h nach der Infektion mit Smac zwar eine Spaltung von Caspase-8, nicht aber jedoch eine Abnahme der Bid-Proform zeigen ließ, wurde die Western Blot-Analyse zur Bid-Spaltung zu einem späteren Zeitpunkt, nach 48 h, erneut durchgeführt (Abb. 19). In den Bax-profizienten HCT116 control Zellen konnte unter Einfluß von Smac-Expression eine vollständige Abnahme der Bid-Proform beobachtet werden. Bax-defiziente HCT116 Zellen wiesen zwar auch eine deutliche Verringerung des Gehaltes der Proform auf, es war jedoch noch eine schwache Bande des ungespaltenen Bid-Proteins nachweisbar. Diese Ergebnisse

zeigen, daß Bax bei der Smac-vermittelten Aktivierung von Caspasen und der daraus resultierenden apoptotischen DNA-Fragmentierung nicht essentiell ist. Im Hinblick auf einen mitochondrialen Amplifikationsloop durch Caspase-8 und die Generierung von tBid kann Bax jedoch möglicherweise eine Rolle spielen.



**ABB. 19: Western Blot-Analyse zur Bid-Spaltung 48 h nach Infektion mit Ad-Smac**  
HCT116 control und  $Bax^{-/-}$  Zellen wurden nach Infektion mit 25 MOI Ad-Smac in An- bzw. Abwesenheit von  $1 \mu\text{g}$  Doxycyclin im Medium für 48 h kultiviert. Es wurden Gesamtzelllysate für die Western Blot-Analyse der Bid-Expression eingesetzt. Als Ladungskontrolle diente der Nachweis von  $\beta$ -Actin.

### 4.3 Abhängigkeit der Apoptoseinduktion durch Ad-Smac von der Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub>

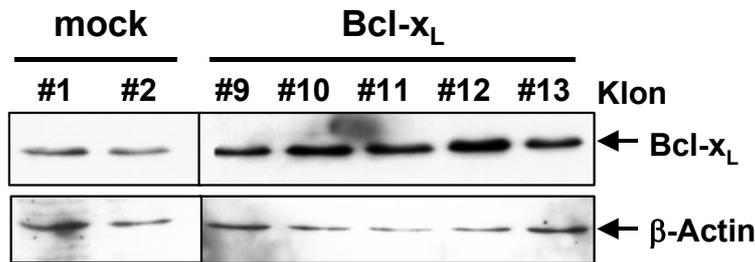
#### 4.3.1 Generierung Bcl-x<sub>L</sub>-überexprimierender HCT116 Zellen

Da das proapoptotische Mitglied der Bcl-2-Proteinfamilie Bax keinen Einfluß auf die Apoptoseinduktion durch adenoviral überexprimiertes Smac-Protein zu haben scheint, wurde die Frage nach der Hemmbarkeit durch das antagonistische und der gleichen Proteinfamilie zugehörige Bcl-x<sub>L</sub> untersucht. Zu diesem Zweck wurden HCT116 control Zellen stabil mit dem retroviralen Vektor pBabePuro.Bcl-x<sub>L</sub>, bzw. mit dem leeren Vektor mock-transfiziert. Dazu wurde Überstand der retroviralen Packzelllinie FLYA-13 zur Infektion von HCT116 Zellen eingesetzt. Nach 48 h wurden die Zellen für drei Wochen unter Puromycin-Selektion gehalten und mehrere stabile Transfektanten isoliert.

Von den generierten Klonen wurden zwei mock-transfizierte und fünf Bcl-x<sub>L</sub> Klone ausgewählt und ihr Expressionsstatus bezüglich Bcl-x<sub>L</sub> mittels Western Blot-Analyse untersucht.

In der folgenden Abbildung (Abb. 20) sind Western Blot-Analysen der verschiedenen Klone dargestellt. Alle fünf Bcl-x<sub>L</sub> Klone (#9 bis #13) weisen eine deutliche Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> im Vergleich zu den eingesetzten mock-transfizierten Klonen auf. Die mitgeführte

Actinkontrolle ermöglicht den Vergleich des Bcl-x<sub>L</sub>-Expressionsniveaus der verschiedenen Klone.



**ABB. 20: Western Blot-Analyse der Expression von Bcl-x<sub>L</sub> in stabilen HCT116-Transfektanten**

Dargestellt ist der Bcl-x<sub>L</sub>-Expressionsstatus in zwei mock-Klonen (#1 und #2) und in fünf mit dem Bcl-x<sub>L</sub>-Retrovirus transfizierten Klone (#9 bis #13). Als Ladungskontrolle diente β-Actin.

Aufgrund der geringeren Bcl-x<sub>L</sub>-Expression des Klones mock2 im Vergleich zu mock1 wurde dieser für weitere zellbiologische Experimente ausgewählt. Als Gegenstück wurde der Klon HCT116 Bcl-x<sub>L</sub>12 mit der stärksten Expression für weitere Experimente eingesetzt. Beide Transfektanten werden im folgenden nur noch als HCT116 mock, bzw. als HCT116 Bcl-x<sub>L</sub> bezeichnet.

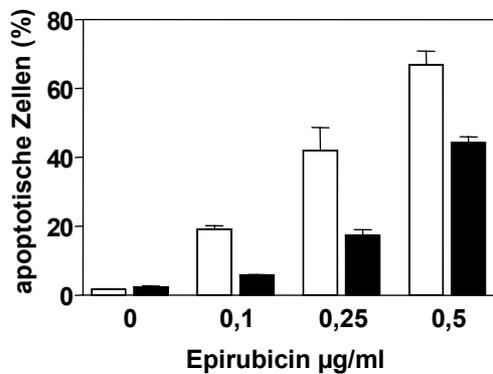
#### 4.3.2 Bestätigung der biologischen Wirksamkeit des überexprimierten Bcl-x<sub>L</sub>

Die zellbiologische Wirksamkeit der gesteigerten Bcl-x<sub>L</sub> Expression wurde durch Behandlung der Transfektanten mit dem Zytostatikum Epirubicin überprüft. Epirubicin aktiviert nach Auslösung von DNA-Schädigungen den mitochondrialen Apoptosesignalweg und induziert somit die Formation des Apoptosoms. Es folgt die Prozessierung von Caspase-9 und über die nachfolgende Aktivierung der Effektorcaspasen wird Apoptose exekutiert. Das antiapoptotische Protein Bcl-x<sub>L</sub> hemmt die Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien und wirkt somit positiv auf das Zellüberleben.

Der zytoprotektive Effekt der Bcl-x<sub>L</sub> Überexpression ist in Abb. 21, in der der Gehalt hypodiploider Zellen 72 h nach Epirubicin-Behandlung aufgetragen wurde, gezeigt.

Es läßt sich eine dosisabhängige Hemmbarkeit des Zelltodes in den Bcl-x<sub>L</sub>-Transfektanten beobachten. Sowohl HCT116 mock als auch HCT116 Bcl-x<sub>L</sub>-Transfektanten zeigten ohne Behandlung eine sehr geringe Apoptoserate. Bei einer Epirubicin-Konzentration von 0,1 µg/ml wurde eine Hemmung der Anzahl apoptotischer Zellen um etwa das Zweieinhalbfache von 20% auf 8% erreicht, bei 0,2 µg/ml Epirubicin konnte eine Reduktion der Zellen mit hypodiploidem DNA-Gehalt um die Hälfte von 40% auf 20% erzielt werden.

Bei einer höheren Dosis des Zytostatikums von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  konnte die Apoptoserate in dem Bcl-x<sub>L</sub> überexprimierenden Klon von 70% auf immerhin noch 45% reduziert werden.



**ABB. 21: Apoptoseinduktion durch Epirubicin im HCT116 mock / Bcl-x<sub>L</sub> Zellsystem**

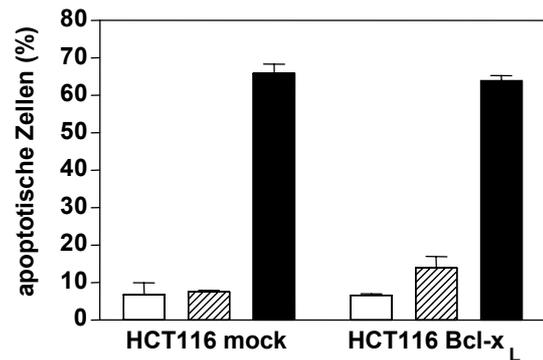
Die Zellen wurden mit den angegebenen Dosen des Zytostatikums behandelt und für 72 h inkubiert. Die DNA-Fragmentierung wurde im Durchflußzytometer gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten aus drei unabhängigen Experimenten.

Weißer Balken: HCT116 mock; schwarzer Balken HCT116 Bcl-x<sub>L</sub>

#### 4.3.3 Die Apoptoseinduktion durch Smac-Expression ist nicht durch Bcl-x<sub>L</sub> hemmbar

Nachdem der zelltodinhistorische Effekt von Bcl-x<sub>L</sub> in Experimenten mit pharmakologischen Zelltodinduktoren gezeigt wurde, sollte der Einfluß des antiapoptotischen Proteins in der Kombination mit der durch Smac-induzierten Apoptose untersucht werden.

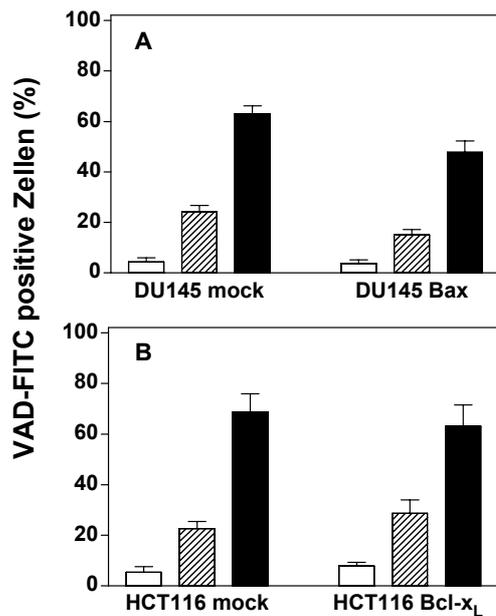
HCT116 mock und Bcl-x<sub>L</sub>-Transfektanten wurden mit 25 MOI Ad-Smac infiziert und für 48 h unter Tet-On-, bzw. Tet-Off-Konditionen kultiviert und die DNA-Fragmentierung auf Einzelzellniveau gemessen. Die Apoptoserate der unbehandelten Mediumkontrollen lag bei beiden Zelllinien bei durchschnittlich 8%. Bei Anwesenheit von Doxycyclin im Medium (Tet-Off-Bedingungen) lag die Hintergrundapoptoserate in den mock-Transfektanten bei 10%, in den Bcl-x<sub>L</sub>-Transfektanten bei 15%. Unter Smac-Expressionsbedingungen ließ sich eine sehr deutliche Erhöhung der Anzahl der Zellen mit hypodiploidem DNA-Gehalt erreichen. Dabei konnte die Zelltodinduktion durch die adenovirale Expression von Smac nicht durch den erhöhten Gehalt der HCT116 Bcl-x<sub>L</sub>-Transfektanten an antiapoptotischem Bcl-x<sub>L</sub> reprimiert werden (Abb. 22). Bei den HCT116 mock-Transfektanten wies ein Anteil von 68% der Zellen die charakteristische apoptotische DNA-Fragmentierung auf. Diejenigen HCT116 Zellen, die stabil Bcl-x<sub>L</sub> überexprimieren, zeigten zu einem Anteil von 65% hypodiploiden DNA-Gehalt und unterschieden sich somit nicht in ihrem Sterbeverhalten von den mock-Transfektanten.



**ABB. 22: Die Induktion von Apoptose durch die Expression von Smac ist nicht durch Bcl-x<sub>L</sub> hemmbar**  
 HCT116 mock und Bcl-x<sub>L</sub> überexprimierende Zellen wurden nach Infektion mit 25 MOI Ad-Smac in An- bzw. Abwesenheit von 1 µg Doxycyclin im Medium für 48 h kultiviert und der Anteil von Zellen mit einem hypodiploiden DNA-Gehalt gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von Triplikaten aus drei unabhängigen Experimenten.  
 Weiße Balken: unbehandelte Kontrolle; schraffierte Balken: Tet-Off-Konditionen; schwarze Balken: Tet-On-Konditionen

#### 4.4 Die Smac-induzierte Caspase-Aktivierung in Abhängigkeit von Bax und Bcl-x<sub>L</sub>

Wie in den Western Blot-Analysen der HCT116 control und Bax<sup>-/-</sup> Zellen gezeigt werden konnte, bewirkt die Expression von Smac zu einem Zeitpunkt von 24 h nach der Infektion eine Aktivierung der Initiator-Caspasen -9 und -8 und eine massive Spaltung der Effektor-Caspase-3 in ihre Untereinheiten (Abb. 18). Dabei konnte nachgewiesen werden, daß das proapoptotische Molekül Bax 24 h nach Ad-Smac Infektion keinen Einfluß auf die proteolytische Aktivierung von Caspasen hat. Eine Analyse der Caspase-Aktivität 48 h nach Virusexposition war mittels Western Blot-Analyse nicht möglich, da keine Spaltprodukte mehr, sondern nur eine Abnahme der Proform der Caspasen detektiert werden konnte. Zur Klärung der Frage nach der katalytischen Aktivität der Caspasen zu diesem Zeitpunkt und ob sowohl Bax als auch Bcl-x<sub>L</sub> einen Einfluß darauf nehmen können, wurde eine durchflußzytometrische Methode zur Detektion aktivierter Caspasen angewendet. Das zellpermeable FITC-konjugierte Tripeptid zVAD-fmk bindet an die aktiven Zentren von Caspasen. Die damit verbundene Zunahme der Fluoreszenzintensität gilt als Maß für die Caspase-Aktivität in der gesamten lebenden Zelle.



**ABB. 23: Induktion von Pan-Caspase-Aktivität durch Smac-Expression**

(A) DU145 (*Bax*<sup>-/-</sup> mock-Transfektanten versus *Bax* rekonstituierte Zellen) und (B) HCT116 (mock- versus *Bcl-xL*-Transfektanten) wurden nach Infektion mit 25 MOI Ad-Smac in An- bzw. Abwesenheit von 1 µg Doxycyclin im Medium kultiviert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, mit einem Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markierten VAD-konjugierten Antikörper gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert.

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten aus je drei unabhängigen Experimenten.

Weißer Balken: unbehandelte Kontrolle; schraffierter Balken: Tet-Off-Konditionen; schwarzer Balken: Tet-On-Konditionen

DU145 mock/Bax Klone sowie HCT116 mock und *Bcl-x<sub>L</sub>*-Transfektanten wurden nach Infektion mit 25 MOI Ad-Smac unter den standardisierten Tet-Off- und Tet-On-Bedingungen für einen Zeitraum von 48 h kultiviert. Nach Inkubation mit dem Fluorochrom zVAD-FITC-fmk wurde die Fluoreszenzintensität der Zellen im Durchflußzytometer gemessen.

Die Caspase-Aktivität in den unbehandelten Kontrollen lag in beiden DU145 Zelllinien bei 4%. Unter reprimierten Expressionsbedingungen ließ sich eine Erhöhung der Anzahl der Zellen mit aktivierten Caspasen in den DU145 mock Zellen auf 24% und in den DU145 *Bax*-Transfektanten auf 16% beobachten (Abb. 23A). Eine solche Erhöhung der Caspase-Aktivität unter Tet-Off-Konditionen bestätigt Beobachtungen aus vorangegangenen Experimenten, daß nach der Infektion mit Ad-Smac auch unter reprimierten Expressionsbedingungen eine gegenüber der Mediumkontrolle leicht erhöhte Rate von apoptotischen Zellen nachzuweisen war (s. 4.2.1 und 4.2.2).

Unter Tet-On-Bedingungen stieg in den DU145 mock Zellen der Anteil der Zellen mit erhöhter Caspase-Aktivität auf 60%; in den DU145 *Bax*-Transfektanten erreichte der Anteil dieser Zellen einen Wert von 50%. Diese Ergebnisse bestätigen bereits auf der Basis von Western Blot-Analysen (Abb. 18) gezeigte Beobachtungen, daß der *Bax*-Status in den hier verwendeten Zellsystemen keinen Einfluß auf die durch Smac hervorgerufene Induktion von Caspasen hat.

In den HCT116 mock- und *Bcl-x<sub>L</sub>*-Transfektanten war die Caspase-Aktivität mit durchschnittlich 5% in den Mediumkontrollen ebenfalls sehr gering (Abb. 23B). Unter Tet-Off-Bedingungen konnte auch in diesem Zellsystem eine Erhöhung der VAD-FITC positiven

Zellen auf 22% in den HCT116 mock und auf 27% in den HCT116 Bcl-x<sub>L</sub> Zellen gemessen werden. Bei Abwesenheit von Doxycyclin im Medium (Smac-Expressionsbedingungen), erhöhte sich der Prozentsatz VAD-FITC positiver Zellen auf 70%, respektive 65%. Dies zeigt deutlich, daß Bcl-x<sub>L</sub> nicht in der Lage ist, die durch die Expression von Smac hervorgerufene Aktivierung von Caspasen zu hemmen.

#### 4.5 Die Rolle der Mitochondrien bei der Smac-induzierten Apoptose

Da in den in dieser Arbeit verwendeten Zellsystemen unabhängig vom Expressionsstatus der oben genannten Proteine Apoptose und massive Caspase-Aktivierung induziert wird, soll der Frage nachgegangen werden, ob eine Aktivierung der mitochondrialen „Permeability Transition Pore“ hervorgerufen wird. Es existieren unterschiedliche Vorstellungen über den zeitlichen Zusammenhang des Verlustes des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung von Cytochrom c. Es gibt Daten darüber, daß die Freisetzung von Cytochrom c dem Verlust der Plasmamembran-Integrität vorausgeht (Goldstein *et al.*, 2000). Zum anderen wird beschrieben, daß die Freisetzung von Cytochrom c ein frühes Ereignis der Apoptose darstellt und unabhängig von aktivierten Caspasen oder einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials stattfinden kann (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998). Es sollte daher die Reihenfolge die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials und die Freisetzung von Cytochrom c in Abhängigkeit aktivierter Caspasen untersucht werden.

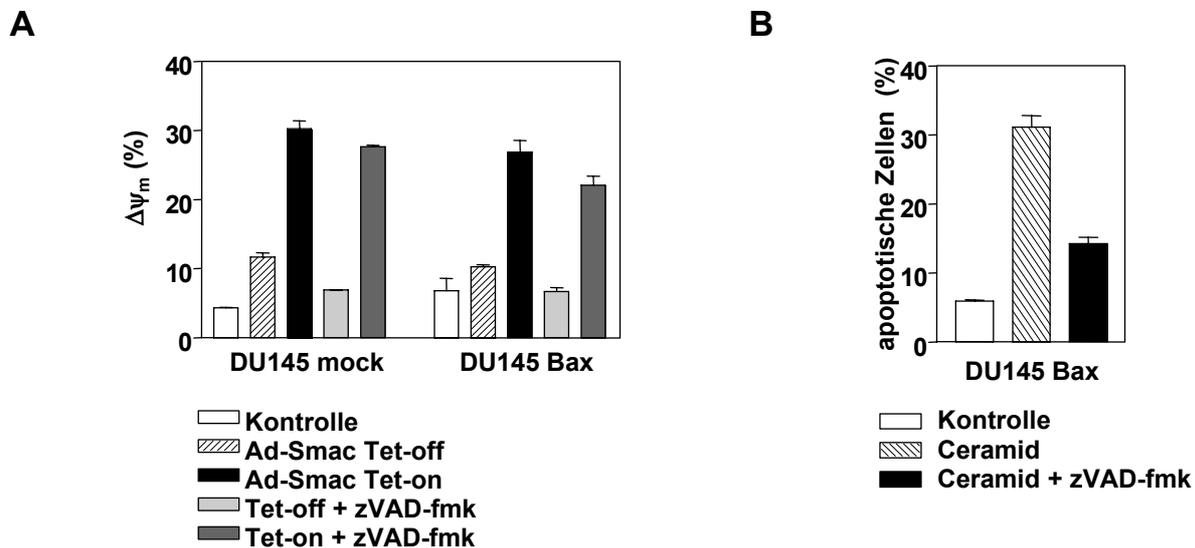
##### 4.5.1 Änderung des mitochondrialen Membranpotentials

Die Aktivierung der Mitochondrien läßt sich mit Hilfe des kationischen fluoreszierenden Farbstoffes JC-1 bestimmen, der in den intakten Mitochondrien der Zellen akkumuliert und bei einem Abfall des Membranpotentials eine Verminderung der Fluoreszenzintensität verursacht.

Die JC-1 Fluoreszenzintensität wurde durchflußzytometrisch auf Einzelzellniveau gemessen. Der prozentuale Anteil von Zellen mit verminderter Fluoreszenz im Vergleich zu unbehandelten Mediumkontrollen wurde für die quantitative Auswertung verwendet.

DU145 mock/Bax Zellen wurden mit 25 MOI Ad-Smac infiziert und über einen Zeitraum von 48 h mit oder ohne 20 µM zVAD-fmk im Medium kultiviert. Sowohl in den DU145 mock als auch in den Bax-Transfektanten zeigten in den Mediumkontrollen maximal 10% der Zellen ein vermindertes Membranpotential (Abb. 24A). Diese Werte änderten sich in beiden Zelllinien unter Tet-Off-Bedingungen nicht. Unter dem Einfluß adenoviraler Smac-Expression

konnte die Anzahl der Zellen, die einen Abfall ihres mitochondrialen Membranpotentials aufwiesen, auf 30% gesteigert werden. Ein Abfall des mitochondrialen Membranpotentials in dieser Höhe trat sowohl in den DU145 mock als auch in den DU145 Bax-Transfektanten auf und kann damit unabhängig von dem Bax-Status der Zellen stattfinden.



**ABB. 24: Einfluß von Bax auf den Smac-induzierten Abfall des mitochondrialen Membranpotentials und dessen Hemmbarkeit durch Caspase-Inhibitoren**

(A) Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials in DU145 mock- und Bax-Transfektanten 48 h nach Infektion mit 25 MOI Ad-Smac unter Tet-Off-, bzw. Tet-On-Konditionen in An- und Abwesenheit von 20  $\mu$ M zVAD-fmk. Der Abfall des mitochondrialen Membranpotentials wurde mit dem kationischen Farbstoff JC-1 bestimmt, dessen Verlust an Fluoreszenzintensität mit der Abnahme des Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) korreliert. (B) Positivkontrolle für zVAD-fmk in DU145 mock-Transfektanten. Die Zellen wurden mit 100  $\mu$ M Ceramid in An- und Abwesenheit von 20  $\mu$ M zVAD-fmk kultiviert und die DNA-Fragmentierung nach 48 h durchflußzytometrisch gemessen. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Zugabe von 20  $\mu$ M zVAD-fmk hatte sowohl in den DU145 mock- als auch den Bax-Transfektanten unter Tet-Off-Konditionen keinen Einfluß auf das Membranpotential im Vergleich zu den Mediumkontrollen. In den DU145 mock Zellen konnte der Zusatz des Breitband-Caspase-Inhibitors unter Tet-On-Bedingungen keine wesentliche Reduktion der Zellen mit verringertem Membranpotential bewirken.

Unter Smac-Expressionsbedingungen zeigte sich nur in den DU145 Bax-Transfektanten ein marginaler hemmender Effekt von zVAD-fmk. So verringerte sich der Anteil der Zellen mit erniedrigtem Membranpotential um fünf Prozentpunkte von 28% auf 23%.

Angesichts der nur sehr geringen inhibitorischen Effekte von zVAD-fmk in den durchgeführten Experimenten wurde die Wirksamkeit des Pan-Caspase-Inhibitors in einem unabhängigen Versuch mit einem anderen Apoptose-induzierenden Agens bestätigt. Das verwendete C<sub>2</sub>-Ceramid induziert über einen Bax-unabhängigen, aber Caspase-abhängigen

Mechanismus Apoptose (von Haefen *et al.*, 2002). DU145 Bax Zellen wurden mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{C}_2$ -Ceramid behandelt und in An- und Abwesenheit von 20  $\mu\text{M}$  zVAD-fmk für 48h kultiviert. Ausgehend von 5% Grundapoptose in der unbehandelten Kontrolle wurde nach der Zugabe von  $\text{C}_2$ -Ceramid eine Apoptoserate von 30% erreicht. Durch den Zusatz von 20  $\mu\text{M}$  zVAD-fmk ließ sich der durch Ceramid-induzierte Zelltod um 50 Prozentpunkte auf 15% reduzieren.

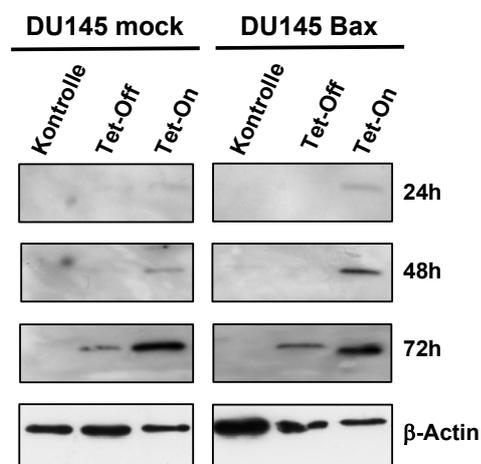
#### 4.5.2 Freisetzung von Cytochrom c

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Untersuchung der Beteiligung der Mitochondrien in der Apoptosesignalkaskade ist deren Freisetzung von proapoptotischen Proteinen ins Zytosol. Hierzu gehört auch Cytochrom c, welches ausgehend von der Formation des Apoptosoms unter anderem an der Ingangsetzung der Caspase-Signalkaskade beteiligt ist.

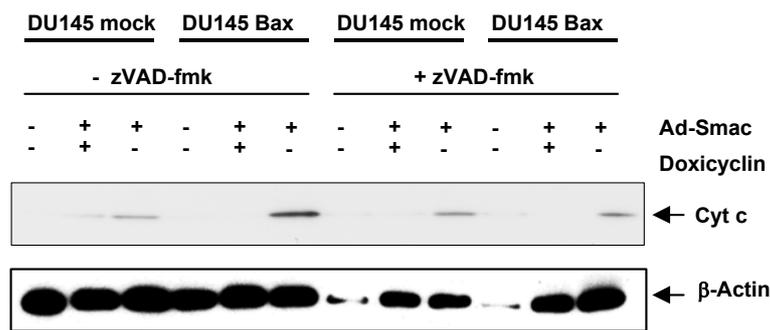
Wie bereits erwähnt, wird die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium unabhängig oder zeitlich verzögert mit dem Abfall des Membranpotentials in Verbindung gebracht.

DU145 mock und Bax-Transfektanten wurden mit 25 MOI Ad-Smac infiziert. Nach jeweils 24 h, 48 h und 72 h wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und für fünf Minuten in einem digitoninhaltigen hypotonen Puffer inkubiert. Bei Digitonin handelt es sich um ein mildes Detergens, welches zunächst nur die Zellmembran angreift, während die Membranen der Organellen intakt bleiben. Nach Pelletieren des Zelldebris wurden die verbliebenen zytosolischen Extrakte mittels Western Blot-Analyse auf ihren Cytochrom c-Gehalt hin untersucht.

**A**



## B



**ABB. 25: Zeitabhängige Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien nach Smac-Expression in Abhängigkeit von Bax**

Bax-negative und Bax rekonstituierte DU145 Zellen wurden in Medium alleine (Kontrolle) oder nach Infektion mit 25 MOI Ad-Smac unter Tet-On-, bzw. Tet-Off-Bedingungen für 24 h-72 h inkubiert. Zytosolische Fraktionen wurden durch Lyse mit Digitonin gewonnen und zur Western Blot-Analyse von Cytochrom c eingesetzt.

(A) Zeitverlauf der Cytochrom c-Freisetzung. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Actin (gezeigt ist der 48 h Zeitpunkt). In (B) erfolgte bei gleichem experimentellen Ansatz wie in (A) die Zugabe von 20  $\mu$ M zVAD-fmk. Die Cytochrom c-Freisetzung wurde 48 h nach Infektion analysiert.

Sowohl in den Bax-defizienten als auch Bax-profizienten DU145 Zellen ließ sich nach 72 h die höchste Intensität der Cytochrom c-Freisetzung detektieren (Abb. 25A). Die Zellen, die unter der Anwesenheit von Doxycyclin im Medium oder unbehandelt kultiviert wurden, zeigten bis 48 h nach Infektion keinerlei Freisetzung von Cytochrom c. In den Bax-Transfektanten konnte bereits nach 24 h eine geringe Cytochrom c-Freisetzung detektiert werden, während dies in den Bax-defizienten Zellen erst nach 48 h der Fall war. Zu diesem Zeitpunkt war die Cytochrom c-Freisetzung in den Bax-profizienten Zellen jedoch bereits deutlich stärker.

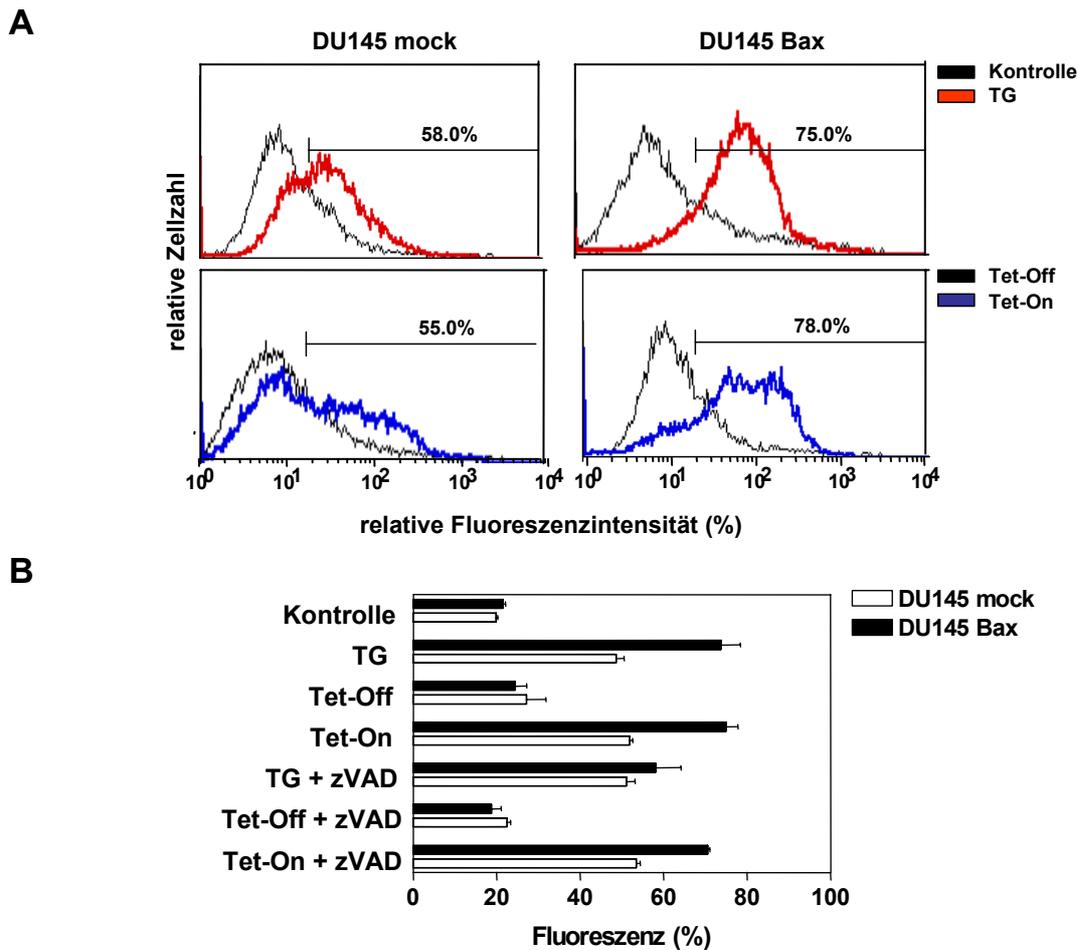
In Abb. 25B ist die Western Blot-Analyse von Zellen gezeigt, die unter den gleichen Bedingungen wie im vorangegangenen Experiment für 48h kultiviert wurden. Es wurden jedoch zusätzlich 20  $\mu$ M zVAD-fmk dem Kulturmedium zugesetzt.

Der Einsatz des Caspase-Inhibitors hatte in den Bax<sup>-/-</sup> Zellen keinen Einfluß auf die Intensität der Cytochrom c-Freisetzung unter Smac-Expressionsbedingungen. In den Bax-exprimierenden Zellen hingegen konnte eine Reduktion der freigesetzten Cytochrom c-Konzentration um etwa die Hälfte auf das Niveau der Bax-defizienten Zellen erreicht werden.

#### 4.6 Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) bei der Apoptoseinduktion durch Smac

Neben dem Auftreten des Abfalls des mitochondrialen Membranpotentials oder dem Anschwellen und der Ruptur der äußeren Membran der Mitochondrien während der Exekution der Apoptosesignalkaskaden, spielt auch die Calcium-Homöostase der Zelle eine wichtige Rolle bei diesem Vorgang. Calcium-abhängige Prozesse stehen im engen Zusammenhang mit der Aktivierung von Caspasen und damit dem programmierten Zelltod. Die wichtigste Organelle der Zelle zum Erhalt des niedrigen zytosolischen Calcium-Haushaltes der Zelle stellt das Endoplasmatische Retikulum dar. Über SERCA-ATPasen werden Calciumionen in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums gepumpt. Freigesetztes Calcium kann auch von den Mitochondrien über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter aufgenommen werden. Der Großteil des freigesetzten Calciums wird über  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter von den in der Nähe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen lokalisierten Mitochondrien aufgenommen. Die Abgabe erfolgt über  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Das Übersteigen eines bestimmten  $\text{Ca}^{2+}$ -Potentials in der mitochondrialen Matrix kann eine Öffnung der „Permeability Transition Pore“ auslösen, was in der Abnahme des Membranpotentials, Anschwellen der mitochondrialen Matrix und Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran resultiert. Es folgt die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren und Cytochrom c aus den Mitochondrien und nachfolgend die Initiation des mitochondrialen Caspasesignalweges. Aufgrund dieser Wechselbeziehungen kann die Aktivierung des Endoplasmatischen Retikulums als ein dem Mitochondrien vorgeschaltetes Ereignis angesehen werden. Aus diesem Grunde wurden die Messungen der Calcium-Fluxe bereits 24 h nach der Infektion mit Ad-Smac durchgeführt, also zu einem Zeitpunkt, bei dem noch wenig Zelltod nach Smac-Expression beobachtet wird.

Die Freisetzung von Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum kann durch die selektive Hemmung der Wiederaufnahme durch die SERCA-ATPase induziert werden. Als pharmakologischer Hemmstoff der SERCA-ATPase wurde dazu Thapsigargin eingesetzt. Es wurde in diesem Falle als Positivkontrolle für die Färbungsreaktion und zugleich Maß für das Maximum der im Experiment erreichbaren zytosolischen Calcium-Konzentration verwendet. DU145 mock und Bax-Transfektanten wurden entweder mit Thapsigargin behandelt, oder aber mit Ad-Smac für 24 h unter Tet-Off-, bzw. Tet-On-Bedingungen inkubiert. Der Nachweis zytosolischen Calciums erfolgte mit dem Farbstoff Fluo-3/AM, dessen Bindung an Calciumionen in einer Erhöhung seiner Fluoreszenz resultiert, die im FACS-Gerät gemessen werden kann.



**ABB. 26: Messung des  $Ca^{2+}$ -Fluxes aus dem Endoplasmatischen Retikulum nach Smac-Expression in Abhängigkeit von Bax**

DU145 mock und Bax Zellen wurden eine Stunde mit  $10 \mu\text{M}$  Thapsigargin inkubiert, bzw. mit 25 MOI Ad-Smac infiziert und 24 h unter Tet-On-, bzw. Tet-Off-Bedingungen und unter Anwesenheit von  $20 \mu\text{M}$  zVAD-fmk kultiviert (A) Histogramme einzelner Messungen mit Prozentangaben für TG-Behandlung, bzw. Tet-On-Bedingungen (B) Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von Triplikaten aus je drei unabhängigen Experimenten.

TG: Thapsigargin

Aus den Histogrammen einzelner Meßwerte und den Balkendiagrammen in Abb. 26 geht eine deutliche Bax-Abhängigkeit der Thapsigargin-induzierten Freisetzung von Calcium in das Zytosol hervor. Die unbehandelten Mediumkontrollen weisen sowohl in den DU145 mock als auch den DU145 Bax-Transfektanten einen Anteil von 20% Zellen mit erhöhter Grundfluoreszenz auf. Nach Zugabe von Thapsigargin kann in den Bax-negativen DU145 mock-Transfektanten ein Anteil von 58% Zellen mit erhöhter Fluoreszenzintensität gemessen werden.

Bei den Bax-profizienten Zellen hingegen liegt die Zahl von Zellen mit erhöhter Fluoreszenzintensität mit 75% deutlich über der der Bax-defizienten Transfektanten.

Nach der Infektion mit Ad-Smac wiesen sowohl die Bax-profizienten als auch die Bax-defizienten DU145 Zellen unter reprimierten Expressionsbedingungen zu 25% eine Erhöhung

in ihrer Fluoreszenzintensität auf. Damit lag die Zahl der Zellen die einen Anstieg in ihrer cytoplasmatischen Calciumionen-Konzentration aufwiesen nur um fünf Prozentpunkte höher als in den unbehandelten Kontrollen. Nach der Expression von Smac ließ sich ein deutlicher Anstieg der cytoplasmatischen Calciumionen-Konzentration erreichen. Unter Tet-On-Bedingungen wiesen die DU145 mock Zellen zu einem Anteil von 55% eine Erhöhung ihrer Fluoreszenzintensität auf. Die DU145 Bax-exprimierenden Zellen hingegen zeigten zu 78% einen Anstieg ihres Fluoreszenzsignals. Damit konnte gezeigt werden, daß durch die Expression von Smac eine Erhöhung der Konzentration von Calciumionen im Zytosol induziert werden kann, die den für die durch Thapsigargin-Behandlung erreichten Werte entsprechen. Diese Ergebnisse zeigen, daß Bax auf die Aktivierung des Endoplasmatischen Retikulum bei beiden Stimuli einen fördernden Einfluß hat.

Da sich bei der Aktivierung der Mitochondrien die Beteiligung aktivierter Caspasen nicht als essentiell herausgestellt hat (siehe 4.5.1), wurde der Frage nachgegangen, ob bei dem Prozeß der Freisetzung von Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum aktivierte Caspasen eine Rolle spielen.

Durch die Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  zVAD-fmk konnte in den DU145 mock Zellen sowohl nach der Behandlung mit Thapsigargin als auch unter Smac-Expressionsbedingungen keine Erniedrigung der anteiligen Zellen mit erhöhter Fluoreszenzintensität erzielt werden.

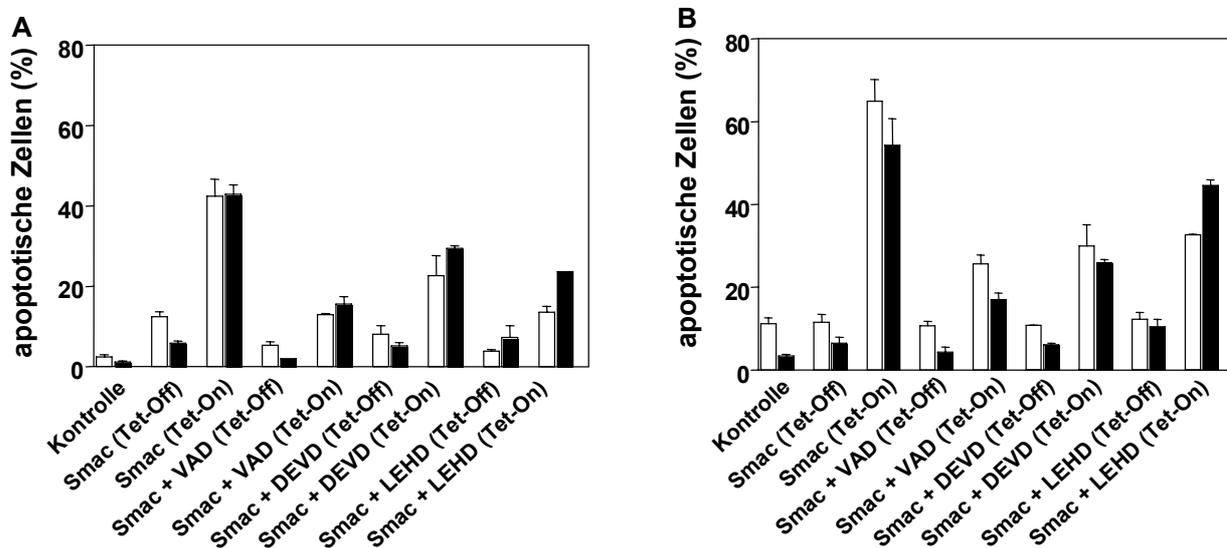
In den Bax-profizienten DU145 Zellen fiel die Wirkung von zVAD-fmk auf Thapsigargin-bedingte Freisetzung von Calcium stärker aus als in den Bax-defizienten Zellen. Es konnte eine Reduktion des Gehaltes der Zellen mit erhöhter Fluoreszenzintensität von 75% auf 58% und somit nahezu auf das Niveau der Bax-defizienten Zellen mit 55% erreicht werden.

Weniger deutlich wirkte sich die Caspase-Inhibition auf die Smac-induzierte Aktivierung des Endoplasmatischen Retikulums aus. Es wurde nur eine marginale Hemmung der Calcium-Freisetzung von 75% auf 70% erreicht.

#### **4.7 Einfluß von selektiven Caspase-Inhibitoren auf die Smac-induzierte apoptotische DNA-Fragmentierung**

In den vorangegangenen Experimenten, wurde die Aktivierung der zentralen Caspasen-3 und -9 in den Bax-positiven und -negativen HCT116 Zellen anhand ihrer Prozessierung in der Western Blot-Analyse untersucht. Der direkte Einfluß der Aktivierung der Caspasen-3 und -9 auf die Apoptoseinduktion und -exekution durch exogen überexprimiertes Smac sollte daher auch auf der Basis der DNA-Fragmentierung und in einem weiteren Zellsystem (DU145

mock/Bax) bestimmt werden. Die Zellen wurden nach adenoviraler Infektion in An- und Abwesenheit des Breitband-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk, sowie den Inhibitoren für C3-ähnliche Caspasen zDEVD-fmk und C9-ähnliche Caspasen zLEHD-fmk inkubiert. Eingesetzt wurden in allen Experimenten eine Konzentration des Inhibitors von 20  $\mu$ M.



**ABB. 27: Einfluß des Bax-Status und selektiver Caspase-Inhibitoren auf die Smac-induzierte Apoptose**

(A) HCT116 control (weiße Balken) versus Bax<sup>-/-</sup> (schwarze Balken) und (B) DU145 mock (weiße Balken) versus Bax-Transfektanten (schwarze Balken) wurden mit 25 MOI Ad-Smac unter Tet-Off, bzw. Tet-On-Konditionen sowie unter An- und Abwesenheit von 20  $\mu$ M des angegebenen Inhibitors inkubiert. Der DNA-Gehalt der Zellen wurde nach 48 h durchflußzytometrisch analysiert.

Gezeigt sind jeweils Mittelwerte apoptotischer Zellen und Standardabweichungen von Triplikaten aus drei unabhängigen Experimenten.

In den HCT116 Zellen (Abb. 27A) konnte unter Smac-Expressionsbedingungen, wie bereits unter 4.2.1 gezeigt, unabhängig von ihrem Expressionsstatus für Bax eine Zelltodrate von 43% erreicht werden. Durch den Zusatz des Breitband-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk konnte der Anteil apoptotischer Zellen unter Tet-On-Bedingungen auf das Maß von Tet-Off-Bedingungen reduziert werden. Dies entspricht einer Reduktion von 43% auf 12% in den Bax-positiven und von 44% auf 6% in den Bax-negativen Zellen. zLEHD-fmk als Inhibitor für Caspase-9 hatte ebenfalls einen stark hemmenden Einfluß auf die Apoptoserate. So konnte in den HCT116 Bax<sup>+/+</sup> control Zellen die Apoptoserate auf 13%, in den HCT116 Bax<sup>-/-</sup> Zellen jedoch nur auf 23% abgesenkt werden. Durch die Verwendung des Caspase-3-Inhibitors zDEVD-fmk wurde der geringste Effekt auf die Zelltodinduktion durch Smac erzielt. Er reduzierte den Anteil apoptotischer Zellen nur um etwa ein Drittel auf 23% (HCT116 control), bzw. 29% (HCT116 Bax<sup>-/-</sup>).

Die DU145 mock Zellen (Abb. 27B) zeigten eine deutliche Reduktion der Apoptoserate nach der Inkubation mit zVAD-fmk von 65% auf etwa 28%, die Bax-reexprimierenden Zellen von 58% auf 18%. Nach dem Zusatz von zDEVD-fmk konnte eine dem Breitband-Caspase-

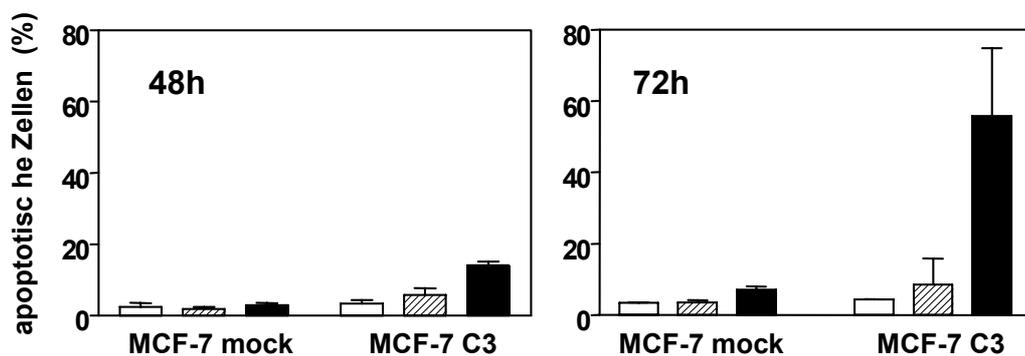
Inhibitor vergleichbare Repression apoptotischer DNA-Fragmentierung erreicht werden (DU145 mock 30%, respektive 28% in DU145 Bax Zellen). Im Vergleich mit den HCT116 Zellen zeigte sich ein besseres Ansprechen der DU145 Zellen auf den Caspase-3-Inhibitor zDEVD-fmk als auf denjenigen für Caspase-9 (zLEHD-fmk). Im Falle des Caspase-9-Inhibitors wurde in den DU145 mock Zellen die Zelltodrate von initialen 65% auf 30%, in den DU145 Bax-Transfektanten von dem Ausgangswert 55% auf 45%.

#### 4.8 Abhängigkeit der Smac-induzierten Apoptose von Caspase-3 in MCF-7 Mamma-Karzinomzellen

Die sich abzeichnende exponierte Rolle von Caspase-3 in der Induktion von Apoptose durch Smac, läßt sich in einem genetischen Modellsystem, in den für Caspase-3 mutierten und damit Caspase-3 negativen Zellen MCF-7 Zellen untersuchen. Als isogene Kontrolle wurden MCF-7 Zellen verwendet, die stabil Caspase-3 reexprimieren (MCF-7 C3 (Friedrich *et al.*, 2001; Jänicke *et al.*, 1998)).

##### 4.8.1 Untersuchung der apoptotischen Zelltodinduktion durch Smac

Es zeigte sich eine klare Abhängigkeit der durch Smac induzierten Apoptose und dem Gehalt der Zellen an Caspase-3. Zu einem Zeitpunkt von 48 h nach der Infektion mit Ad-Smac ließ sich in den Caspase-3 negativen Transfektanten (MCF-7 mock) sowohl unter reprimierten, als auch unter Expressionsbedingungen keine Erhöhung der Apoptoserate über die in der Mediumkontrolle herrschenden Hintergrundapoptose von 5% hinaus feststellen.



**ABB. 28: Die Apoptoseinduktion durch Smac in MCF-7 Zellen ist Caspase-3-abhängig**

MCF-7 mock und MCF-7 C3 Zellen wurden für 48 h und 72 h in Medium oder nach Infektion mit Ad-Smac in An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin inkubiert und die DNA-Fragmentierung gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten aus drei unabhängigen Experimenten.

Weißer Balken: Mediumkontrolle; schraffierter Balken: Tet-Off-Bedingungen; schwarzer Balken: Tet-On-Bedingungen

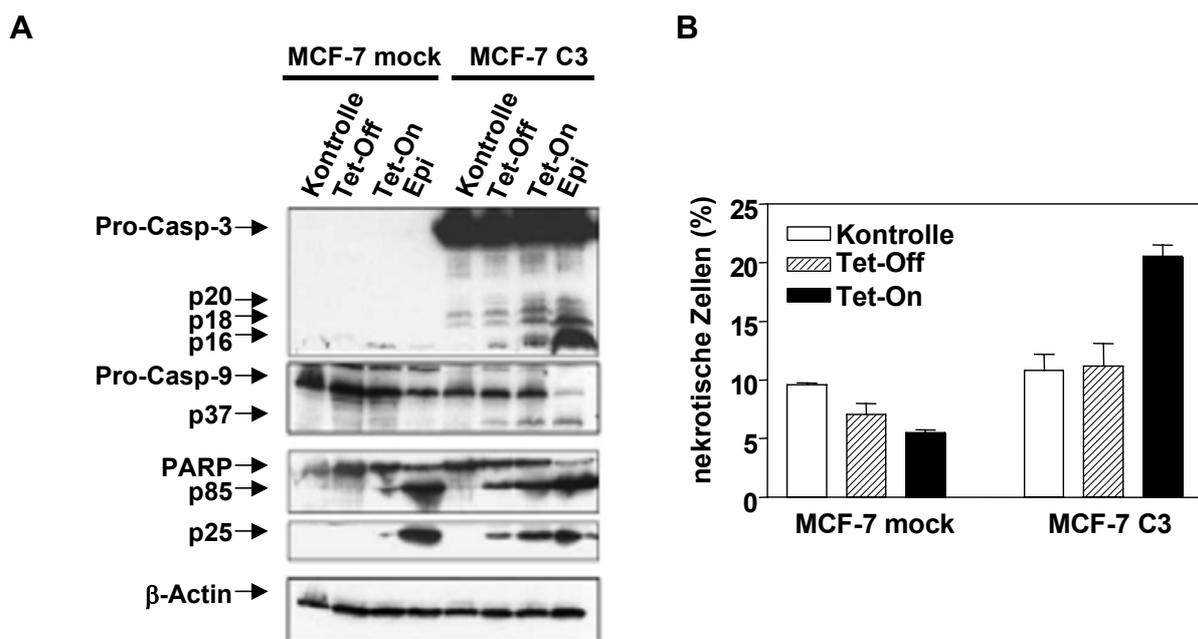
Nach einer Inkubationszeit von 72 h konnte unter Tet-On-Bedingungen keine Veränderung im Sterbeverhalten der MCF-7 mock Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war in den Caspase-3 reexprimierenden Zellen (MCF-7 C3) unter Smac-Expressionsbedingungen bereits nach 48 h ein Anteil von 18%, bei reprimierter Expression ein Anteil von 5% hypodiploiden Zellen meßbar. Nach 72 h lag die Apoptoserate der Caspase-3 reexprimierenden MCF-7 Zellen unter Tet-Off-Bedingungen bei 10%. Eine deutliche Erhöhung der Apoptoserate konnte unter Smac-Expression erzielt werden. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen lag bei Transgenexpression bei durchschnittlich 58% und damit etwa um den Faktor drei höher als zum vorangegangenen Zeitpunkt von 48 h.

#### 4.8.2 Untersuchung der nekrotischen Zelltodinduktion durch Smac

Aufgrund der fehlenden DNA-Fragmentierung in den MCF-7 mock Zellen wurde der Frage nachgegangen, ob die Caspase-3-defizienten Zellen über einen nekrotischen Mechanismus sterben. Diese Form des Zelltodes mündet in der Zerstörung von Zellkomponenten ohne Fragmentierung des Nukleus und der genomischen DNA, so daß sie mit der Methode der modifizierten Zellzyklusanalyse, die zur Bestimmung der DNA-Fragmentierung angewendet wird, nicht erfaßt werden kann. Es wurde daher die Viabilität der Zellen durch Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC / PI untersucht. Annexin-V-FITC dient als Marker für frühapoptotische Zellen, die Phosphatidylserin auf der äußeren Plasmamembran exponieren, während die Gegenfärbung mit PI als Indikator für die Integrität der Zellmembran verwendet wird. Darüber hinaus wurde die Prozessierung der Caspasen-9, -3 und PARP, einem klassischen Caspase-3 Substrat, das an der DNA-Reparatur beteiligt ist, als Komponenten des apoptotischen Signalweges mittels Western Blot-Analyse überprüft. Die Gewinnung der Proteinlysate erfolgte zu einem Zeitpunkt von 36 h nach der Infektion mit Ad-Smac (Abb. 29). Die Caspase-3 negativen MCF-7 mock Zellen exprimieren keine Caspase-3, d.h. die Caspase-3 Proform (32 kDa) war nicht nachweisbar. In diesen Zellen konnte auch nach der Expression von Smac keine Prozessierung von Caspase-9 beobachtet werden. Lediglich der Beginn einer Spaltung von PARP in seine p85 Untereinheit, nicht jedoch in die kleinere p25 Untereinheit war nachzuweisen. Die Zugabe von Epirubicin konnte ebenfalls keine Spaltung der Pro-Caspase-9 induzieren. Detektiert werden konnte jedoch eine deutliche Prozessierung von PARP in seine p85 und p25 Untereinheiten.

In den MCF-7 C3 Zellen zeigte sich eine starke Expression der Pro-Caspase-3. Es ließ sich auch ein geringes Maß der Prozessierung von Caspase-3 in der Mediumkontrolle und unter Tet-Off-Bedingungen beobachten. Die Spaltung in die p20, p18 und die p16 Untereinheit

konnte jedoch unter Smac-Expressionsbedingungen deutlich gesteigert werden. Am stärksten fiel jedoch die Prozessierung der Caspase-3, vornehmlich in die p16 Untereinheit, unter dem Einfluß von Epirubicin aus. Ferner wurden die Abnahme des Pro-Caspase-9 (42 kDa) als auch die parallele Zunahme der aktiven Untereinheit (37 kDa) von Caspase-9 detektiert. Dies wird von einer Proteolyse des Caspase-3-Substrates PARP in seine 85 kDa und 25 kDa Spaltprodukte begleitet. Die Analyse des nekrotischen Zelltodes in den MCF-7 mock Zellen zeigt, daß dieser Zelltod-Mechanismus ausgeschlossen werden kann. Der Anteil PI und Annexin-V-positiver Zellen lag in der Mediumkontrolle bei 9% und nahm unter Tet-Off- und sogar unter Tet-On-Bedingungen bis auf einen Wert von 5% leicht ab. Für die Caspase-3 positiven Zellen lag der Prozentsatz nekrotischer Zellen in der Mediumkontrolle und unter reprimierten Expressionsbedingungen bei 11%. Wurde die Expression von Smac angeschaltet, konnte die doppelte Anzahl nekrotischer Zellen detektiert werden.



**ABB. 29: Die Induktion von apoptotischem und nekrotischem Zelltod durch Smac ist in MCF-7 Zellen strikt Caspase-3-abhängig**

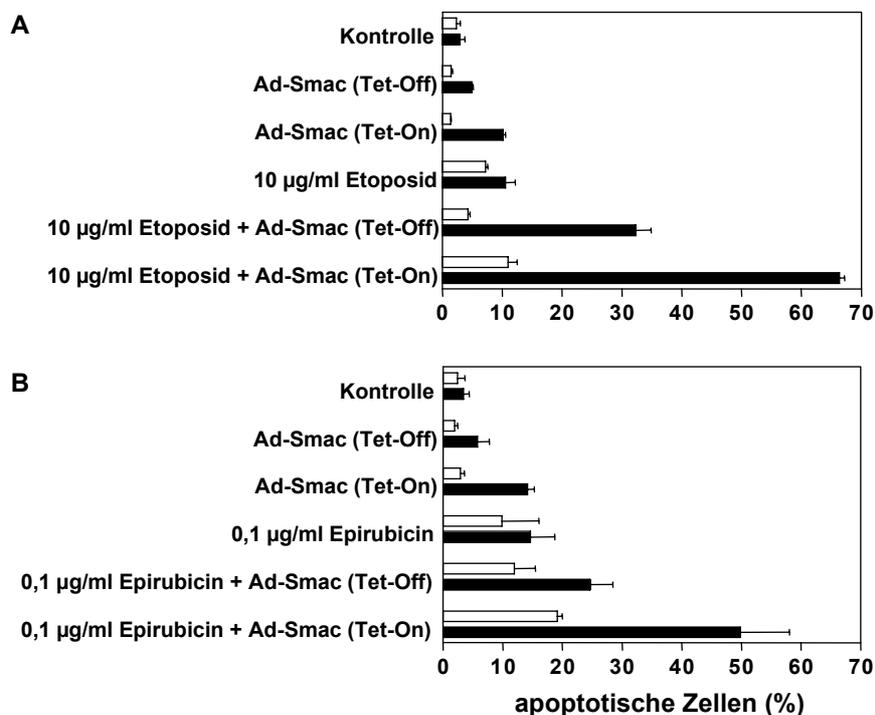
(A) Western Blot-Analyse für die indizierten Proteine in MCF-7 mock und C3-Transfektanten. Die Zellen wurden mit 25 MOI Ad-Smac in An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin infiziert, oder mit 1 µg/ml Epirubicin (Epi) behandelt. Virus-infizierte Zellen wurden 36 h, Zytostatika-behandelte Zellen nach 24 h geerntet.

(B) MCF-7 mock und C3 Zellen wurden 36 h nach Infektion mit Ad-Smac mit Annexin-V-FITC und PI gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. PI und Annexin-V-positiv, membrangeschädigte Zellen wurden als spätapoptotisch, bzw. nekrotisch definiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten aus drei unabhängigen Experimenten.

### 4.8.3 Sensitivierung der Zytostatika-resistenten MCF-7 Zellen durch die exogene Expression von Smac

Neben der Resistenz auf die adenovirale Expression von Smac, zeigen die MCF-7 mock Zellen auch eine deutliche Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, wie z.B. Epirubicin und Etoposid. Diese Resistenz konnte durch die stabile Expression in den C3-Transfektanten durchbrochen werden (Friedrich *et al.* 2001).

Hinsichtlich dieser Tatsache stellte sich die Frage, ob durch die Expression des proapoptotischen Proteins Smac eine Sensitivierung der resistenten Zellen für die oben genannten Chemotherapeutika zu erreichen ist. Dazu wurden die Zellen entweder nur mit 25 MOI Ad-Smac infiziert, nur mit subtoxischen Dosen des jeweiligen Chemotherapeutikums behandelt oder einer Kombination aus beiden Maßnahmen ausgesetzt. Die Messung der DNA-Fragmentierung erfolgte in allen Ansätzen nach 48 h Inkubationszeit.



**ABB. 30: Sensitivierung von Zytostatika-resistenten MCF-7 Zellen für Etoposid- und Epirubicin-induzierten Zelltod durch Infektion mit Ad-Smac**

Die Zellen wurden mit jeweils 25 MOI Ad-Smac infiziert und in An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin kultiviert. Die Behandlung erfolgte (A) mit 10 µg/ml Etoposid, in (B) mit 0,1 µg/ml Epirubicin. Es sind die prozentualen Anteile apoptotischer Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h in Mittelwerten und Standardabweichungen von Triplikaten aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Weißer Balken: MCF-7 mock; schwarzer Balken: MCF-7 C3

Für Etoposid (Abb. 30A) wurde eine subletale Konzentration von 10 µg/ml gewählt, bei der die Apoptoserate in den MCF-7 mock bei 8% und in den MCF-7 C3 bei 10% lag. Die alleinige durch adenovirale Expression von Smac erreichte Apoptoserate lag in den MCF-7 C3 Zellen ebenfalls bei 10%, die der MCF-7 mock Zellen bei 2%. Eine

Kombinationsbehandlung aus Etoposid und Smac-Expression führte in den Caspase-3-defizienten Zellen zu keiner Steigerung über die Apoptoserate von 10% hinaus, die bereits durch Etoposid-Behandlung alleine erreicht worden war. Anders verhielten sich hingegen die MCF-7 C3-Transfektanten. Bereits unter Tet-Off-Bedingungen und der Zugabe von 10 µg/ml Etoposid waren 30% Zellen mit hypodiploidem DNA-Gehalt meßbar. Bei einer Kombination aus Smac-Expression und Etoposid-Behandlung konnte jedoch eine Apoptoserate von 68% erzielt werden.

Im Falle des Chemotherapeutikums Epirubicin (Abb. 30B) wurde eine subletale Dosis von 0,1 µg/ml ermittelt, die in den MCF-7 C3 Zellen zu 15% und in den MCF-7 mock zu 10% apoptotischen Zellen führte. Die konditionale Smac-Expression alleine bewirkte in diesem Falle eine Apoptoserate von 25% (MCF-7 C3), bzw. 5% (MCF-7 mock). Unter Tet-Off-Bedingungen starben bei der kombinierten Behandlung der MCF-7 C3 Zellen mit 25 MOI Ad-Smac und 0,1 µg/ml Epirubicin rund 20% der Zellen. Wurde die Expression von Smac induziert, so stieg die Apoptoserate um mehr als das Doppelte auf 50%.

Die Caspase-3-defizienten mock-Transfektanten hingegen wiesen bei Behandlung mit Epirubicin und Ad-Smac unter Tet-Off-Bedingungen einen Anteil von 12% und unter Expressionsbedingungen von 19% apoptotischen Zellen auf.