

## 5. Diskussion

Die Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien stellt einen entscheidenden Schritt für die Initiierung der mitochondrial vermittelten Apoptose dar. Dies schließt die Freisetzung von Cytochrom c und ATP zur Aktivierung des Apoptosoms ein. Zusätzliche Faktoren wie AIF („apoptosis inducing factor“), Endonuklease G, die Serin-Protease Omi/HtrA2 und Smac verstärken oder induzieren selbst über unterschiedliche Wirkungsmechanismen die Initiation und Exekution des Zelltodes. Smac wirkt dabei nach seinem Austritt aus den Mitochondrien als Aktivator von Caspasen durch die Inhibierung deren Bindung an IAP-Proteine.

In dieser Arbeit wurde die „full length“ Smac cDNA in einen konditional exprimierbaren adenoviralen Vektor kloniert. Damit wurde die Möglichkeit geschaffen, die an der Apoptoseinduktion durch Smac beteiligten Signalwege in unterschiedlichen, für adenovirale Transduktion permissiven, humanen Karzinomzelllinien zu untersuchen, besonders in Abhängigkeit von den beiden antagonistischen Bcl-2-Familienmitgliedern Bax und Bcl-x<sub>L</sub>. Hinsichtlich der Signalwege und Mechanismen bei der Smac-induzierten Apoptose wurde vor allem die Aktivierung und Prozessierung von Caspasen, insbesondere von Caspase-3, und deren Einfluß auf die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges untersucht. Es soll in diesem Kontext darüber hinaus eine mögliche Beteiligung des Endoplasmatischen Retikulums diskutiert werden.

### 5.1 Mechanismen der Apoptoseinduktion durch Smac-Expression

#### 5.1.1 Die adenovirale Expression von Smac induziert Apoptose in humanen Karzinomzelllinien ist unabhängig von Bax und Bcl-x<sub>L</sub>

In verschiedenen Zellsystemen wurde gezeigt, daß zytosolisch exprimiertes Smac oder Isoformen des Proteins Apoptose induzieren können. Smacβ beispielsweise fehlt die mitochondriale Zielsequenz, was zu einer kortikalen Verteilung in der Zelle und nach proteolytischer Abspaltung des N-Terminus zur Unfähigkeit zur Interaktion mit IAP's führt. Diese Spleißvariante und andere N-terminale trunke Formen können jedoch Apoptoseinduktion potenzieren (Roberts *et al.*, 2001).

Die Freisetzung von maturem Smac direkt in das Zytosol unter Umgehung der mitochondrialen Prozessierung, wurde in Arbeiten von Hunter *et al.* (2003) durchgeführt. Dazu wurden HeLa Zellen transient mit einem Plasmid transfiziert, welches eine Smac-Ubiquitin-Fusionssequenz trägt. Das Fusionsprotein wurde nachfolgend von zytosolisch lokalisierten Ubiquitin-spezifischen Proteasen gespalten, so daß biologisch aktives Smac-Protein generiert wurde. Mit diesem System konnte jedoch keine direkte Zelltodinduktion erfolgen, es wurde aber eine Sensitivierung der Zellen gegenüber der Apoptoseinduktion durch Etoposid erreicht.

Durch die adenovirale konditionale Expression von „full length“ Smac konnte in dieser Arbeit in drei unterschiedlichen Zellsystemen, HCT116 (Bax<sup>+/-</sup>/ Bax<sup>-/-</sup>; mock / Bcl-x<sub>L</sub>) sowie DU145 mock/Bax Apoptose induziert werden. Das Auftreten apoptotischer DNA-Fragmentierung konnte dabei dosisabhängig und unabhängig vom Bax-Status der Zellen gemessen werden, wie in Abb. 16B gezeigt ist. Ferner zeigte auch die Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> keine Zelltod-hemmende Wirkung (Abb. 22). Die adenovirale Smac-Expression kann demnach Apoptose-resistente Phänotypen, die beispielsweise durch den Verlust von Bax oder erhöhte Expression von Bcl-x<sub>L</sub> entstehen, umgehen. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß der adenovirale Gentransfer des Apoptose-fördernden Proteins p14<sup>ARF</sup> einem Bax-unabhängigen Mechanismus folgend Zelltod induziert. Die Aktivierung der Mitochondrien und die nachfolgende Apoptoseinduktion konnte jedoch durch das antiapoptotische Bcl-2 Homologe Bcl-x<sub>L</sub> gehemmt werden (Hemmati *et al.*, 2002). Für die Smac-induzierte Apoptose konnte dies durch den Vergleich der Zelltodinduktion in HCT116 Zellen, die stabil Bcl-x<sub>L</sub> überexprimieren und mock-Transfektanten, nicht gezeigt werden. Bcl-x<sub>L</sub> Überexpression interferierte zwar mit Epirubicin-induzierter Apoptose (Abb. 21), der zytoprotektive Effekt durch Stabilisierung der Mitochondrienmembran und Hemmung der Öffnung der „Permeability Transition Pore“ durch Bcl-x<sub>L</sub> war bei der Smac-induzierten Apoptose jedoch nicht relevant. Diese Daten zeigen, daß Smac unabhängig von Bax und Bcl-x<sub>L</sub> Apoptose induzieren und somit Defekte in Karzinomzellen, die durch den Verlust von Bax oder die Überexpression des Bcl-2 Homologen Bcl-x<sub>L</sub> zurückzuführen sind, umgehen kann.

McNeish *et al.* (2003) zeigten ebenfalls nach adenoviraler Expression eine Apoptose-induzierende Wirkung von Smac, dessen „full length“ cDNA unter der Kontrolle des konstitutiven CMV-Promoters stand. Im in dieser Arbeit verwendeten System konnte in Ovarial-Karzinomzellen eine dosisabhängige Abnahme des Zellüberlebens erzielt werden. Mit einer eingesetzten MOI von 30 konnte 48 h nach Infektion eine Abnahme des Zellüberlebens in den humanen IGROV1- und OVCAR4-Ovarial-Karzinomzellen um jeweils

40% induziert werden. Bei einer MOI von 60 lag die Apoptoserate bei 60% (IGROV-1), bzw. 65% (OVCAR-4). Damit liegt die Zelltodinduktion des in dieser Arbeit verwendeten konditionalen Smac Adenovirus in den DU145 mock/Bax (65% / 55% Zelltod) und HCT116 mock/ Bcl-x<sub>L</sub> Zellen (je ca. 65% Zelltod) zum gleichen Zeitpunkt deutlich höher, obwohl hier mit einer geringeren MOI von 25 gearbeitet wurde. Eine der mit der Arbeit von McNeish vergleichbare Apoptoserate wurde in den HCT116 Bax<sup>+/-</sup>/Bax<sup>-/-</sup> (48% / 45% Zelltod) erreicht, so daß deren Sensitivität vergleichbar zu sein scheint. Aussagen über den Bax oder Bcl-x<sub>L</sub>-Status wurden von den von McNeish verwendeten Ovarial-Karzinommodellen nicht getroffen, so daß jedoch keine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse möglich ist. Ferner wurde ein nicht regulierbarer adenoviraler Vektor eingesetzt, so daß zur Überprüfung der Toxizität des adenoviralen Systems ein Konstrukt ohne Transgen als Kontrolle zur Transfektion mitgeführt wurde. Im Gegensatz zu den Tet-Off-Konditionen in der hier vorliegenden Arbeit, zeigte der Kontrollvirus von McNeish *et al.* bei einer MOI von 60 keine über die der Mediumkontrolle hinausgehende Apoptoserate.

In dieser Arbeit wurde mit Ad-Smac ein Adenovirus der ersten Generation verwendet, welches in der E1 und E3-Region deletiert ist. Damit wurde die Replikationsinkompetenz des Virus und die Deletion der Immunantwort-induzierenden Gene gewährleistet. Zu beobachten war jedoch, daß die Grundapoptoserate unter reprimierten Expressionsbedingungen leicht über der der unbehandelten Mediumkontrollen lag. In HCT116 Bax<sup>+/-</sup> und Bax<sup>-/-</sup> Zellen wurde für die Erstellung der Dosis-Wirkungskurve maximal eine MOI von 100 eingesetzt, die unter reprimierten Expressionsbedingungen zu einer Apoptoserate von 15% führte. Auch bei der in nachfolgenden Versuchen eingesetzten MOI von 25 konnte eine Erhöhung der Grundapoptoserate in den DU145 mock/Bax Zellen auf 10% und in den HCT116 mock/Bcl-x<sub>L</sub> Zellen auf 15% beobachtet werden.

Brand *et al.* (1999) konnten zeigen, daß Adenoviren der ersten Generation bei hohen MOI von 100-400 in murinen Zellen und humanen Karzinomzellen einen transienten G2/M Arrest auslösen und Apoptose induzieren können. Trotz der Deletionen in der E1 und der E3-Region, konnte die Expression der zytotoxischen adenoviralen Gene *E2*, *E3* und *E4*, deren Promotoren bei hohen MOI aktiv sind, nachgewiesen werden. In den hier durchgeführten Experimenten kamen deutlich geringere Viruskonzentrationen zur Verwendung, so daß angenommen werden kann, daß die HCT116 und DU145 Zellsysteme sich empfindlicher gegenüber einer adenoviralen Infektion verhalten, als die in den Arbeiten von Brand *et al.* verwendeten humanen Lungen- und hepatozellulären Karzinomlinien.

### 5.1.2 Die Prozessierung und Aktivierung Apoptose-relevanter Caspasen durch Smac-Expression ist unabhängig von Bax

Die Aktivierung der Caspasen stellt für die Induktion der Apoptose ein essentielles Ereignis dar. Verschiedene Signalwege führen zur Aktivierung der Caspasen, was direkt oder indirekt mit dem Auftreten der für die Apoptose typischen, morphologischen Veränderungen der Zelle, wie Fragmentierung von DNA und Nukleus, Degradation des Zytoskeletts und Blockierung von DNA-Reparaturmechanismen, einhergeht (Cohen *et al.*, 1997). Um die Mechanismen der Smac-induzierten Apoptose näher zu betrachten, wurden „Schlüssel-Caspasen“ untersucht: Caspase-8 als Initiatorcaspase des Todesrezeptorsignalweges und als Mediator des mitochondrialen Amplifikationsloops, Caspase-9 als Initiatorcaspase des intrinsischen mitochondrialen Zelltodsignalweges sowie Caspase-3, die eine zentrale Rolle unter den Effektorcaspasen einnimmt. In der Western Blot-Analyse zeigte sich nach Smac-Expression in den HCT116 Zellen bereits eine deutliche Prozessierung von Caspase-3 in ihre Untereinheiten. In den Bax-profizienten HCT116 Zellen ließ sich neben den p20 und p18-Spaltprodukten auch eine Bande des p16-Produktes nachweisen. Das Vorhandensein dieses p16-Fragmentes war in den HCT116 Bax<sup>-/-</sup> Zellen etwas schwächer ausgeprägt. Im Hinblick auf die in Abb. 16 gezeigte Dosiswirkungskurve, läßt sich eine partielle Abhängigkeit des Smac-induzierten Zelltodes vom Bax-Status der Zellen bei einer niedrigen Viruskonzentration beobachten. Bei einer Infektion der Zellen mit 10 MOI ließ sich in den Bax-profizienten Zellen eine Zelltodrate von durchschnittlich 40%, in den Bax-defizienten HCT116 Zellen von durchschnittlich 25% erzielen. Bei einer Viruskonzentration von 25 MOI war kein signifikant unterschiedliches Sterbeverhalten mehr zu beobachten. Innerhalb der Signaltransduktion zur Aktivierung der Caspase-Signalkaskade, insbesondere von Caspase-3, kann jedoch eine solche partielle Bax-Abhängigkeit bestehen, die sich aber nicht mehr auf Ebene der DNA-Fragmentierung äußert.

Deutlich wird die Abhängigkeit von Bax bei den Zellen, die zur Kontrolle mit Epirubicin behandelt worden waren. In den Bax<sup>+/-</sup> Zellen war die Intensität des p16-Spaltproduktes wesentlich deutlicher ausgeprägt als in den Bax<sup>-/-</sup> Zellen (Abb. 18). Diese Bax-Abhängigkeit läßt sich beispielsweise dadurch erklären, daß DNA-schädigende Agenzien wie Zytostatika über DNA-abhängige Protein-Kinasen den Transkriptionsfaktor p53 durch Phosphorylierung aktivieren. P53 kann somit proapoptotische Zielgene wie z.B. Bax, Puma oder Noxa hochregulieren, oder aber als transkriptioneller Repressor für antiapoptotische Gene wie z.B. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> und Survivin wirken (Bartke *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 2002; Nakano und Vousden, 2001; Oda *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001).

Unter Tet-Off-Bedingungen war ebenfalls eine schwache Prozessierung von Pro-Caspase-3 über das Maß der Mediumkontrolle hinaus zu beobachten. Da jedoch die Expression von Smac durch die Zugabe von Doxycyclin vollständig reprimiert werden kann, könnten solche Effekte auf eine Grundtoxizität des Virus selbst zurückgeführt werden. Andererseits kann eine geringfügige Expression von Smac auch unter Tet-Off-Bedingungen nicht ausgeschlossen werden. In Bezug auf die Prozessierung von Caspase-9 konnte unter Smac-Expressionsbedingungen sowohl in den Bax-profizienten als auch in den Bax-defizienten HCT116 Zellen kein Unterschied detektiert werden. Auch die Intensität des p18-Spaltproduktes von Caspase-8 war unabhängig vom Bax-Status der Zellen ausgeprägt. Im Gegensatz zu Caspase-3 konnte unter reprimierten Expressionsbedingungen keine Prozessierung der Proformen von Caspase-9 und -8 beobachtet werden. Dies ist vermutlich auf den vergleichsweise geringen Gehalt der Zellen an diesen beiden Caspasen zurückzuführen ist und somit mögliche Spaltprodukte unter Tet-Off-Bedingungen nicht hinreichend detektiert werden können.

Nach Behandlung mit Epirubicin waren, anders als bei Caspase-3, überraschend weder Spaltprodukte von Caspase-9 noch von Caspase-8 detektierbar. Dies ist möglicherweise auf die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege zurückzuführen. Ferner weisen sowohl die HCT116 Bax<sup>+/-</sup> als auch die HCT116 Bax<sup>-/-</sup> Zellen den gleichen Gehalt an XIAP auf. Eine Reduktion von XIAP unter Smac-Expressionsbedingungen konnte nicht nachgewiesen werden. Yang *et al.* (2004) zeigten in HeLa Zellen, daß Smac über sein N-terminales IAP-Bindemotiv die selektive Degradation von c-IAP1 und c-IAP2 über das Ubiquitin/Proteasom-System vermitteln kann. Eine Reduktion des Gehaltes anderer IAP-Familienmitgliedern, wie z. B. XIAP und Livin hingegen, konnte in den HeLa Zellen nicht beobachtet werden. Dennoch wurde eine Förderung der Auto-Ubiquitinierung aller dieser vier IAP-Familienmitglieder über ihre RING-Domäne (E3-Ubiquitin-Ligase) durch Smac nachgewiesen werden. Creagh *et al.* (2004) zeigten darüber hinaus, daß Smac präferentiell die Ubiquitin-Ligaseaktivität von XIAP reprimiert, während die von c-IAP1 und c-IAP2 in einem deutlich geringeren Umfang herabgesetzt wird. Hingegen wurde für den Modellorganismus *Drosophila*, für das Smac Orthologe Grim eine Ubiquitinierung und spezifische Degradation von XIAP beschrieben. Eine Apoptose-induzierende Wirkung durch Grim konnte in diesem System jedoch nicht nachgewiesen werden (Silke *et al.*, 2004).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Prozessierung des unreifen 29 kDa Smac-Proteins in seine mitochondriale mature 23 kDa Form gezeigt. McNeish *et al.* (2003) zeigten hingegen in ihren experimentellen Ansätzen zur adenoviralen Überexpression von Smac und der daraus

resultierenden Apoptoseinduktion keine Prozessierung der prämaternen 29 kDa Form von Smac. Es stellt sich daher die Frage, ob prämaternes Smac-Protein trotz seiner N-terminalen mitochondrialen Zielsequenz, die die eigentliche IAP-Bindesequenz enthält, aktiv sein kann. Roberts *et al.* (2001) demonstrierten, daß Smac $\beta$ , eine alternative Spleißvariante von Smac ohne mitochondriale Zielsequenz, Apoptose in MCF-7 Zellen im Bezug auf unterschiedliche Stimuli, sowohl Rezeptor- als auch mitochondrial vermittelt, potenzieren kann. Aufgrund dieser Beobachtungen anhand N-terminaler prozessierter Formen stellten Roberts *et al.* (2001) die Hypothese auf, daß auch die C-terminalen Fragmente von Smac proapoptotische Funktionen ausüben können, die unabhängig von IAP-Interaktionen und mitochondrialer Lokalisation sind. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Effekte der kontroversen Daten der Arbeit von McNeish *et al.* bezüglich der Spaltung von Smac darstellen. McNeish *et al.* zeigten in ihrem Zellsystem ferner in den Western Blot-Analysen 48 h nach Infektion der Zellen eine deutliche Spaltung von Caspase-3 und -9. Im Gegensatz zu den hier gezeigten Daten wurde jedoch keine Prozessierung von Caspase-8 nachgewiesen.

## 5.2 Der Einfluß von Caspasen auf die Smac-induzierte Apoptose

Um neben der proteolytischen Spaltung auch funktionell den Einfluß von Caspase-3 und -9 auf den Smac-induzierten Zelltod untersuchen zu können, wurden der Breitband-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk und alternativ dazu zDEVD-fmk und zLEHD-fmk als Hemmstoffe von Caspase-3-, bzw. Caspase-9-ähnlichen Caspasen in Konzentrationen von je 20  $\mu$ M eingesetzt. Die Smac-induzierte DNA-Fragmentierung war nach Zugabe von zVAD-fmk sowohl in den HCT116 als auch in den DU145 Zellen nahezu vollständig hemmbar. Ebenso interferierten zDEVD-fmk und zLEHD-fmk mit der Smac-induzierten Apoptose. Allerdings zeigten die beiden Zelllinien ein unterschiedliches Ansprechen auf diese spezifischen Inhibitoren. In den HCT116 Zellen konnte durch zLEHD-fmk eine stärkere Hemmung, die nahezu der von zVAD-fmk entsprach, während in den DU145 damit nur eine Zelltod-Hemmung von ca. 40% erzielt werden konnte. Umgekehrt verhielt es sich bei der Verwendung von zDEVD-fmk (Abb. 27). Im Hinblick auf die Abhängigkeit der Zelltod-Induktion von Caspase-3, die in den Versuchen mit synthetischen Inhibitoren und den Versuchen mit MCF-7 mock und C3 Zellen gewonnen wurden, ist die auftretende Prozessierung von Caspase-8 in den HCT116 Zellen vermutlich auf eine verstärkte Caspase-3 Aktivität zurückzuführen. Allerdings können Einflüsse durch die Aktivierung des Todesrezeptorsignalweges nicht vollständig ausgeschlossen werden, gerade vor dem Hintergrund des für die Caspase-8-Induktion immer

wieder diskutierten Mechanismus der induzierten NÄhe im Komplex mit FADD oder FLIP<sub>L</sub> (Donepudi *et al.*, 2003). Darüber hinaus wird Caspase-8 neben Caspase-12 eine initiiierende Rolle nach Aktivierung des Endoplasmatischen Retikulums zugeschrieben (Breckenridge *et al.*, 2002) (s. 5.4.2).

Die sich in den sich durch den Einsatz synthetischer Caspase-Inhibitoren Versuchen in den HCT116 Zellen abzeichnende prävalente Rolle von Caspase-3 konnte in dem MCF-7 Zellsystem näher untersucht werden. Eingesetzt wurden Caspase-3 negative MCF-7 mock-Transfektanten und Caspase-3 retransfizierte MCF-7 C3 Zellen (Jänicke *et al.*, 1998). Im Vergleich zu den HCT116 und DU145 Zellsystemen, die nach 48 h eine Apoptoserate von 50%-70% aufwiesen, waren zu diesem Zeitpunkt erst 10% der MCF-7 C3 Zellen mit hypodiploiden DNA-Gehalt unter Tet-On-Konditionen detektierbar. 72 h nach Infektion stieg die Apoptoserate in den Caspase-3 reexprimierenden Zellen auf 58% an, während die Caspase-3-defizienten mock-Transfektanten keine Erhöhung ihres hypodiploiden DNA-Gehaltes über das Niveau der Mediumkontrollen hinaus zeigten (Abb. 28).

Um Caspase-unabhängigen, nekrotischen Zelltod, der mit den bis dato eingesetzten Methoden der durchflußzytometrischen DNA-Fragmentierung nicht detektierbar ist, auszuschließen, wurde die Zellviabilität mittels Annexin-V-FITC / Propidiumjodid-Doppelfärbung bestimmt. Der Anteil nekrotischer Zellen, lag 36 h nach Infektion mit Ad-Smac in den MCF-7 C3-Transfektanten bei 20%, während bei den mock-Transfektanten auch nekrotischer Zelltod nicht nachweisbar war. Es handelt sich hierbei somit um sekundäre Nekrose, die nach längerer Inkubation primär apoptotischer Zellen häufig beobachtet wird.

Zugleich fehlte in diesen Zellen auch eine Prozessierung von Caspase-9 in der Western Blot-Analyse, während diese in den Caspase-3-profizienten Zellen deutlich detektierbar war. Caspase-3 scheint somit die dominante Effektorcaspase des Smac-induzierten Zelltodes zu sein. Die Degradation von PARP, einem essentiellen Enzym bei DNA-Reparaturvorgängen, in seine p85 und p25-Fragmente war in den Caspase-3-defizienten Zellen unter Smac-Expressionsbedingungen nur sehr schwach nachweisbar. Die Behandlung mit Epirubicin induzierte in diesen Zellen jedoch deutlich die Bildung von PARP-Spaltprodukten. In den MCF-7 C3-Transfektanten hingegen konnte bei induzierter Smac-Expression ein deutliches Auftreten der PARP-Fragmente nachgewiesen werden (Abb. 29).

Es zeichnet sich daher ab, daß Caspase-9, oder aber auch andere, durch Smac induzierbare Caspasen, in Abwesenheit von Caspase-3 die Exekution von Apoptose in diesem System nicht oder nur unzureichend aktivieren können. Gemessen an den Inhibitorexperimenten in den HCT116 Zellen wird somit eine Caspase-3 Aktivierung der Prozessierung von Caspase-9

unter den hiesigen Versuchsbedingungen vorangestellt. Allerdings muß die Aktivierung von Caspase-9 als Initiatorcaspase des mitochondrialen Signalweges nicht ausschließlich auf ihrer proteolytischen Spaltung beruhen. Die Generierung enzymatisch aktiver Caspase-9 kann auch durch das Modell der induzierten Nähe im Komplex des Apoptosoms erfolgen. In einem von Renshaw *et al.* (2001) postuliertem Modell erfolgt durch die Rekrutierung an das Apoptosom eine hohe lokale Dichte von Caspase-9 Zymogenen entstehen, die durch Konformationsänderung zu einer „Dimer-induzierten“ Aktivierung führt. Eine Aktivierung von Caspase-9 über einen solchen „selbstinduzierten Mechanismus“ kann jedoch in den Caspase-3-defizienten MCF-7 Zellen unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht beobachtet werden.

In der Arbeit von McNeish *et al.* (2003) konnte in den darin verwendeten Ovarial-Karzinomzellen OVCAR3 eine ähnlich starke Abhängigkeit des Smac-induzierten Zelltodes von Caspase-3 beschrieben werden. Durch die stabile Expression von Caspase-3 konnte bei 30 MOI eine Reduktion des Zellüberlebens von 100% auf 20% erreicht werden.

Die in der hier vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse deuten somit darauf hin, daß die Aktivierung von Caspase-3 einen essentiellen Schritt für die Smac-induzierte Apoptose darstellt und nicht durch die autokatalytische Prozessierung anderer Caspasen, z.B. Caspase-9, komplementiert werden kann.

### **5.3 Die Rolle der Mitochondrien bei der Smac-induzierten Apoptose**

#### **5.3.1 Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und Amplifikation der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade**

Die Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle bei der Exekution des Zelltodes. Sie können als Ausgangspunkt für den intrinsischen Apoptosesignalweg über die Initiatorcaspase-9 und das Apoptosom dienen, und zugleich über einen Amplifikationsloop über Caspase-3, Caspase-8 und die Spaltung von Bid Zelltodsignale verstärken. Da in dieser Arbeit mit Smac ein proapoptotisches mitochondriales Protein zur Expression kam, war die Analyse der Beteiligung der Mitochondrien während der Induktion von Apoptose von großer Bedeutung.

Untersucht wurde der Smac-induzierte Zusammenbruch des Membranpotentials, die in diesem Zusammenhang diskutierte Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum, sowie die Abhängigkeit dieser beiden Prozesse von der Aktivität von Caspasen.

### 5.3.1.1 Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials

Neben der Freisetzung von Cytochrom c wurde auch das Membranpotential in dem DU145 mock/Bax Zellen untersucht. In beiden Zelllinien konnte unabhängig von ihrem Bax-Status bei Smac-Expression in 25-30% der Zellen ein Abfall des mitochondrialen Membranpotentials gemessen werden. Durch den Zusatz des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk konnte wiederum in den DU145 Bax Zellen eine marginale Hemmung beobachtet werden, was die erhaltenen Daten zur limitierten Bax-Abhängigkeit der Cytochrom c-Freisetzung stützt (Abb. 25). Andererseits spielt ein solcher Bax-abhängiger Effekt bei der Induktion von Apoptose, gemessen in DNA-Fragmentierung, keine wesentliche Rolle. Nur bei einer Transduktion der Zellen mit einer geringen Virusdosis von 10 MOI konnte in den HCT116 Zellen eine Differenz von 10% in der DNA-Fragmentierung beobachtet werden, die aber bereits bei der nächst höheren Viruskonzentration wieder nivellierte (Abb. 16). Diese Ergebnisse lassen den Rückschluß auf einen partiellen Bax-abhängigen und einen zumindest teilweise Caspase-abhängigen Amplifikationsloop der Mitochondrien zu. Hinweise darauf gibt auch eine Betrachtung der Bid-Spaltung. Zu einem Zeitpunkt von 24 h nach Infektion mit Ad-Smac, bei dem der Prozentsatz apoptotischer Zellen in beiden HCT116 Klonen bei durchschnittlich 10% lag, war trotz der deutlichen Prozessierung der Caspasen-3 und -8 keine Abnahme der Bid-Proform zu detektieren (Abb. 18). Nach 48 h hingegen war in den Bax-profizienten HCT116 Zellen keine Bid-Proform mehr nachweisbar, während die Bax<sup>-/-</sup> Zellen noch Spuren davon im Western Blot zeigten (Abb. 19).

Frühere Experimente zur Aktivierung der Mitochondrien wurden in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) durchgeführt, in denen gezielt Bax, Bak oder beide Gene (DKO) deletiert worden waren. Anhand dieser murinen Zellsysteme wurde zunächst eine redundante Rolle von Bax und Bak in ihrer Fähigkeit zur Aktivierung der Mitochondrien postuliert. Der durch Caspasen vermittelten Spaltung des BH3-Only Proteins Bid folgte demnach die Oligomerisierung von Bax und/oder Bak. Diese Bcl-2 Familienmitglieder können direkt Poren in der äußeren Mitochondrienmembran bilden und somit deren Permeabilisierung ermöglichen, oder aber mit Untereinheiten der „Permeability Transition Pore“ (PTP) interagieren und somit einen Abfall des Membranpotentials induzieren (Antonsson *et al.*, 2000; De Giorgi *et al.*, 2002; Martinou und Green, 2001; Narita *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2000). So zeigten Wei *et al.* (2000), daß Bax<sup>-/-</sup>/Bak<sup>-/-</sup> MEF's nach Überexpression von p15-tBid keine Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien zeigen und Apoptose-resistent sind. Die Expression von p15-tBid in Wildtyp MEF Zellen induzierte hingegen Zelltod. Cheng *et al.* (2001) demonstrierten ferner, daß Bax/Bak DKO Zellen auch gegenüber

der Expression anderer BH3-Only Proteine, z.B. Bim, Bad und Noxa, resistent waren. MEF's die nur singular für Bax oder Bak-defizient waren, erwiesen sich als ebenso sensitiv hinsichtlich der Überexpression von BH3-Only Proteinen wie Wildtyp Zellen.

Neuere Arbeiten in humanen Zellsystemen zeigen jedoch, daß Bax und Bak keine redundante Rolle bei der Aktivierung der Mitochondrien spielen und einander nicht ohne weiteres komplementieren können. So wird beim Todesrezeptor-vermittelten Apoptosesignalweg die Spaltung von Bid durch Caspase-8, bei zytotoxischen Reaktionen durch Granzyme B vermittelt. Beide Effektoren generieren unterschiedliche Spaltprodukte von Bid. Caspase-8 erzeugt ein p15-tBid-Fragment, während durch Granzyme B ein p13-tBid-Spaltprodukt entsteht. In zellfreien Systemen interagieren beide Spaltprodukte mit Mitochondrien, sie zeigen jedoch nach Injektion in humane Glioblastomzellen Unterschiede in ihrer Interaktion mit Bax und Bak (Cartron *et al.* 2003; Wei *et al.* 2000). Zellen, die sowohl für Bax als auch Bak positiv waren, zeigten nach Zugabe von beiden trunktierten Bid-Formen Apoptose. Bax-negative Zellen wiesen eine Resistenz gegenüber p13-tBid-induzierter Apoptose, nicht aber gegenüber p15-tBid-Fragment vermitteltem Zelltod auf. Bak negative Zellen zeigten hingegen ein gegensätzliches Verhalten (Cartron *et al.* 2003). Auch für andere BH3-Only Proteine konnte eine differenzierte Wirkungsweise über Bax und Bak nachgewiesen werden. Für Bik/Nbk wurde von Gillissen *et al.* (2003) eine Aktivierung der Mitochondrien über einen Bax-abhängigen, aber Bak-unabhängigen Mechanismus beschrieben. Das mitochondrial lokalisierte BH3-Only Protein Puma („p53 upregulated modulator of apoptosis“) beispielsweise interagiert mit Bcl-x<sub>L</sub> und vermittelt die Translokation und Oligomerisierung von Bax am Mitochondrium. Die gezielte Zerstörung des Bax-Gens in HCT116 Zellen hatte die vollständige Resistenz gegenüber exogener Expression von Puma zur Folge, die sonst beispielsweise in colorektalen Karzinomzellen direkt Apoptose induziert (Yu *et al.* 2003; Yu *et al.* 2001). Nbk und Puma scheinen somit, wie auch p13 tBid, vollständig über Bax, jedoch nicht über Bak zu signalisieren. Ebenso konnte für die synergistische Wirkung von TRAIL und dem Chemotherapeutikum 5FU eine vollständige Abhängigkeit von Bax und Unabhängigkeit von Bak gezeigt werden (von Haefen *et al.*, 2004).

Die Aktivierung der Mitochondrien und die Freisetzung von Cytochrom c nach Smac-Expression erfolgte unabhängig vom Bax-Status der DU145 Zellen, so daß ein Bak-abhängiger Mechanismus bei der Smac-induzierten Apoptose nicht ausgeschlossen werden kann. Sowohl die DU145 als auch die HCT116 Zellsysteme weisen einen signifikanten Gehalt an Bak auf (Gillissen *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu steht jedoch, daß die Zelltod-Induktion durch Überexpression des zytoprotektiven Bcl-x<sub>L</sub> in den HCT116 Zellen durch Epirubicin

partiell hemmbar war, während die durch Smac-Expression ausgelöste Apoptose nicht reprimiert werden konnte. Im adenoviralen System von McNeish *et al.* (2003) hatte die Überexpression von Bcl-2 ebenfalls keinen hemmenden Einfluß auf die Smac-induzierte Apoptose, während die durch Cisplatin induzierter Zelltod vollständig gehemmt werden konnte.

Arbeiten von Twiddy *et al.* (2004) legen darüber hinaus eine mögliche Beteiligung von Omi/HtrA2 und Smac an der direkten Regulation und Zusammensetzung des Apoptosoms und somit eine Beeinflussung der direkten Folgen mitochondrialer Aktivierung nahe.

Omi wurde als das humane Homologe zu der bakteriellen Serin-Protease HtrA2, die auch als Chaperon unter erhöhten Temperaturbedingungen aktiv ist, erstmals beschrieben. So ist auch Omi/HtrA2 in die zelluläre Antwort auf thermischen und oxidativen Streß involviert und wird als 50 kDa Vorläuferprotein wie Smac auch mit einer N-terminalen mitochondrialen Zielsequenz exprimiert. Im Gegensatz zu Smac kann Omi diese 133 AS große Sequenz autokatalytisch entfernen (Savopoulos *et al.*, 2000). Dies führt zur Exposition seiner N-terminalen Aminosäuresequenz „AVPS“, die eine hohe Ähnlichkeit mit den IAP-Bindemotiven von Proteinen aus Smac/DIABLO, Orthologen aus *Drosophila* und Caspase-9 aufweist. Ähnlich wie auch bei Smac hat eine Deletion des IAP-Bindemotivs keinen Einfluß auf die Apoptose-induzierende Wirkung oder die DEVD-Spaltungsaktivität von Omi/HtrA2 (Li *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2001). An isolierten Apoptosom-Komplexen aus humanen THP.1 Zellysaten, die sowohl Omi/HtrA2 als auch Smac enthielten, war die Caspase-Prozessierung um den Faktor 6-8 höher als in solchen ohne diese beiden mitochondrialen Faktoren. Der Komplex enthielt dabei lediglich Apaf-1 und die prozessierten p35/p34 Untereinheiten von Caspase-9. Eine Assoziation von XIAP mit oligomerisiertem Apaf-1, prozessierter Caspase-9 und der p20-Untereinheit von Caspase-3 unter nativen Bedingungen sowie in Omi/HtrA2 und Smac-freien zytosolischen Extrakten wurde nachgewiesen (Bratton *et al.*, 2001; Twiddy *et al.*, 2004). In apoptotischen Zellen hingegen war die Komplexbildung von XIAP nicht mehr nachweisbar, was die Annahme zuläßt, das Smac und/oder Omi/HtrA2 XIAP aus dem Apoptosom sequestrieren und damit bereits auf dieser Ebene die Prozessierung von Caspase-9 und -3 beeinflussen können.

### 5.3.1.2 Freisetzung von Cytochrom c

Die Freisetzung von Cytochrom c wurde über einen Zeitverlauf von 24 h, 48 h und 72 h nach der Transduktion mit Ad-Smac mittels Western Blot-Analyse untersucht. Wie in Abb. 24 zu sehen ist, zeigen sowohl Bax-defiziente als auch Bax-profiziente DU145 Zellen Cytochrom c

in den zytosolischen Extrakten, welches bereits 24 h nach adenoviraler Infektion zu detektieren ist und nach 72 h seine stärkste Intensität erreicht. Interessanterweise zeigt sich in den DU145 Bax Zellen zu den Zeitpunkten von 24 h und 48 h eine deutlichere Freisetzung von Cytochrom c als in den mock-Transfektanten (Abb. 25B). Dies deutet auf einen teilweise Bax-abhängigen Mechanismus hin. In den reprimierten, doxycyclinhaltigen Ansätzen war erst zum Zeitpunkt von 72 h Cytochrom c nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt war jedoch schon eine Apoptoserate von 20% (DU145 mock), bzw. 30% (DU145 Bax) unter Tet-Off-Bedingungen meßbar. Die unbehandelten Kontrollen zeigten zu keinem Zeitpunkt Freisetzung von Cytochrom c.

Die Caspase-Aktivität, gemessen durch die Bindung des Peptid-Substrats VAD-FITC an die aktiven Zentren von Caspasen, lag 48 h nach adenoviraler Infektion sowohl in den DU145 als auch in den HCT116 Zellen bei 50%-70%, unabhängig vom Bax- oder Bcl-x<sub>L</sub>-Expressionsstatus der Zellen (Abb. 23). Für die Untersuchung des Einflusses aktiver Caspasen auf die Aktivierung der Mitochondrien, wurde der Breitband-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk eingesetzt und der Cytochrom c Gehalt der Zellysate mittels Western Blot-Analyse untersucht.

Wie in Abb. 25B gezeigt, hatte die Caspase-Inhibition keinen Einfluß auf die Cytochrom c Freisetzung in den DU145 mock Zellen. In den DU145 Bax Zellen hingegen ließ sich die Freisetzung von Cytochrom c auf das Niveau der Bax-defizienten Transfektanten absenken. Dies deutet, wie bereits die Ergebnisse zur Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials, auf einen teilweise Bax-abhängigen Amplifikationsloop der Mitochondrien hin. Wie die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials so ist auch bezüglich der Freisetzung von Cytochrom c eine Caspasen-unabhängige Wirkung von Smac am Mitochondrium zu beobachten. Ferner ist aber wiederum nicht auszuschließen, daß Smac oder Ad-Smac bei Aktivierung der Mitochondrien und Cytochrom c-Freisetzung über einen Bak-abhängigen Mechanismus wirken.

#### **5.4 Die Rolle des Endoplasmatischen Retikulums bei der Smac-induzierten Apoptose**

In den konfokalen Immunfluoreszenzaufnahmen hat sich die zuverlässige Regulierbarkeit des Tet-Off-Systems, die in den Western Blot-Analysen bereits gezeigt wurde, bestätigt (Abb. 14 und Abb. 15). So sind unter reprimierten Expressionsbedingungen nur schwache diffuse punktuelle Färbungen in ähnlicher Intensität wie in den nur mit Medium kultivierten Zellen zu sehen, die aufgrund des verwendeten Antikörpers wahrscheinlich von zelleigenem, endogenem

Smac-Protein herrühren. Erkennbar in grün sind die spezifisch angefärbten Mitochondrien, die vornehmlich in der Umgebung des Nukleus lokalisiert sind. Nach Anschalten der konditionalen Expression von Smac, zeigt sich hingegen ein anderes Bild. Neben der klaren gelblichen Überlagerungen der in grün angefärbten Mitochondrien mit dem rot angefärbten exogenen Smac-Protein, lassen sich auch fadenartige und punktuelle Proteinverteilungen erkennen. Eine eindeutige Zuordnung zu anderen Organellen außer den Mitochondrien ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, die subzelluläre Struktur einer netzartigen Verteilung durch die gesamte Zelle könnte aber Rückschlüsse darauf zulassen, daß Smac auch in oder an den tubulären Kompartimenten des Endoplasmatischen Retikulums lokalisieren kann. Zwar sind neben der mitochondrialen Form auch zytosolisch lokalisierte Isoformen von Smac nachgewiesen worden, eine potentielle Rolle am Endoplasmatischen Retikulum wurde jedoch noch nicht beschrieben.

#### 5.4.1 Der Einfluß von Calcium auf die Smac-induzierte Apoptose

Neben der Lokalisation weisen auch andere in dieser Arbeit generierten Daten auf eine mögliche funktionelle Bedeutung des Endoplasmatischen Retikulums hin. So ließen sich bereits 24 h nach konditionaler Smac-Expression Änderungen in der zytosolischen Calcium-Konzentration messen. In dem verwendeten DU145 mock/Bax Zellsystem lag der Prozentsatz von Zellen mit deutlicher Positivität für zytosolisches Calcium bei etwa 20% und wurde auch nicht überstiegen, wenn die Zellen nach Infektion unter Tet-Off-Konditionen kultiviert wurden. Die in dieser Arbeit verwendete Meßmethode erlaubt jedoch keine absolute Quantifizierung der zytosolischen Calcium-Konzentration, sie ist vielmehr ein Maß für einen relativen Prozentsatz an Calcium-Efflux aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Nach Smac-Expression steigt die gemessene Fluoreszenzintensität auf durchschnittlich 75% in den Bax-profizienten und auf 50% in den Bax-defizienten Zellen (Abb. 26). Die durch Ad-Smac induzierten Fluoreszenzintensitäten spiegeln auch den durch die Verwendung von Thapsigargin-induzierten maximalen Calcium-Efflux aus dem Endoplasmatischen Retikulum wieder. Die Bax-abhängige Freisetzung von Calcium nach Zugabe von Thapsigargin bestätigt bereits die für Bax<sup>-/-</sup> und Bak<sup>-/-</sup> murinen embryonalen Fibroblasten gemachten Aussagen, die eine stark reduzierte Calcium-Freisetzung nach Thapsigargin-Induktion aufweisen (Scorrano *et al.*, 2003).

### 5.4.2 Die Rolle von Caspasen am Endoplasmatischen Retikulum

Eine Vielzahl durchgeführter Untersuchungen zur Induktion von Apoptose nach ER-Streß sind in murinen Systemen durchgeführt worden, wobei ein großer Focus auf die Rolle von Caspase-12 gelegt wurde, die spezifisch nach Induktion von ER-Streß gespalten wird (Nakagawa *et al.*, 2000). Die proteolytische Aktivierung von Caspase-12 kann durch m-Calpain, einer Calcium-abhängigen zytosolischen Cystein-Protease, erfolgen (Nakagawa und Yuan, 2000; Nakagawa *et al.*, 2000). Das Vorhandensein einer CARD-Domäne legt die Vermutung nahe, daß sich ähnlich dem Apoptosom ein aktivierender Komplex mit anderen CARD-beinhaltenen Proteinen bildet, der auch eine Oligomerisierung und Autokatalyse von Caspase-12 ermöglicht. Die Existenz von funktioneller Caspase-12 ist hingegen für den Menschen nicht beschrieben. Es findet zwar Transkription in mRNA statt, aber aufgrund von „frame shift“ Mutationen und einem prämaturnen Stop-Codon kommt es zu keiner Expression eines funktionellen Proteins (Fischer *et al.*, 2002). Dies macht es schwer die bisherigen Daten der Literatur vor einem humanen Hintergrund zu diskutieren und relativiert die bisherige Literatur zu ER-induziertem Streß. Hitomi *et al.* (2004) beschrieben kürzlich eine mögliche Beteiligung von Caspase-4 in ER-Streß induzierter Apoptose, die die Rolle von muriner Caspase-12 übernehmen kann. Caspase-4 ist ein Mitglied der Caspase-1 Subfamilie, die auch die humanen Caspasen-14, -1, -5, sowie die murine Caspase-12 umfaßt, und hauptsächlich in Inflammationsprozesse involviert ist. Für Caspase-4 wurde eine primäre Lokalisation in Membranen des Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen. Ebenso konnten Nachweise an den Mitochondrien geführt werden, was zusätzliche, ER-unabhängige Funktionen implizieren mag. Es konnte jedoch eine Prozessierung nach ER-spezifischen Stimuli wie z.B. Thapsigargin und Tunicamycin beobachtet werden, während Agenzien, die eine Beteiligung der Mitochondrien einschließen, wie z.B. Etoposid, Staurosporin und UV-Strahlung, keine Spaltung hervorriefen. Darüber hinaus hatte die Überexpression von Bcl-2 ebenfalls keinen Einfluß auf die Caspase-4-Proteolyse.

Auch Caspase-8 wird eine initiierende Rolle am Endoplasmatischen Retikulum zugeschrieben. Das Bcl-2 assoziierte Protein-31 (BAP31), ein integrales 28 kDa großes ER-Protein, liegt in einem Komplex mit Pro-Caspase-8 und Bcl-2, bzw. Bcl-x<sub>L</sub> vor (Ng *et al.*, 1997). Diese Aggregation kann durch das kürzlich beschriebene BH3-Only Protein Spike verhindert werden (Mund *et al.*, 2003). Freigesetzte, aktive Caspase-8 kann BAP31 proteolytisch zu einem p20-Fragment spalten, welches in der ER-Membran integriert bleibt. Eine Überexpression dieses Fragmentes löst eine Calcium-Freisetzung aus und sensitiviert die Mitochondrien gegenüber Caspase-8-induzierter Apoptose (Breckenridge *et al.*, 2003).

Der durch Ad-Smac induzierte Ausstrom von Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum kann jedoch nicht durch den Einsatz des Breitband-Caspase-Inhibitors zVAD-fmk gehemmt werden (Abb. 26B). Das Auftreten des maximalen Calcium-Effluxes bereits 24 h nach der Induktion durch Ad-Smac läßt die Vermutung zu, daß das Endoplasmatische Retikulum einer Aktivierung der Mitochondrien vorgeschaltet ist, da erst nach 48 h ein Bax-unabhängiger Abfall des mitochondrialen Membranpotentials von 30% meßbar ist. Die Aktivierung beider Organellen, des Mitochondriums und des Endoplasmatischen Retikulums, mag somit zu einem Teil zu einem Caspase-unabhängigen Mechanismus erfolgen, obwohl die für Smac bisher beschriebenen Wirkmechanismen vollständig auf einer Aktivierung von Caspasen beruhen. Eine Möglichkeit besteht darin, daß der verwendete Breitband-Caspase-Inhibitor nicht alle zellulären Caspasen in gleichem Maße hemmen kann und beispielsweise bezüglich Caspase-4 oder -8 weniger selektiv wirkt. Untersuchungen mit weiteren spezifischen Peptidsubstraten und Western Blot-Analysen zur Expression von Caspase-4 in DU145 Zellen könnten in nachfolgenden Experimenten Aufschluß darüber bringen.

### **5.5 Sensitivierung von MCF-7 Zellen für Zytostatika-induzierte Apoptose - Einsatzmöglichkeiten von Smac/DIABLO in der Tumorthherapie**

Vorangegangene Ergebnisse aus dieser Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß sich MCF-7 Mamma-Karzinomzellen durch die Reexpression von Caspase-3 für Zytostatika-induzierten Zelltod sensitivieren lassen (Friedrich *et al.*, 2001). Dazu wurden unter anderem Epirubicin und Etoposid verwendet. Das Zytostatikum Epirubicin gehört zu der Gruppe der Anthrazyklin-Antitumor-Antibiotika, die aus Spezies von *Streptomyces* gewonnen werden. Durch die Interkalation in die DNA-Doppelstränge, die auf nichtkovalenten Wechselwirkungen beruht, treten Veränderung in den Abständen der Basenpaare zueinander auf und Rückgrat sowie Ganghöhe der Helix werden verändert. Dadurch werden indirekt DNA-bindende Enzyme wie beispielsweise DNA- und RNA-Polymerasen sowie Topoisomerasen in ihrer Funktion negativ beeinflusst. Eine weitere toxische Wirkung der Anthrazykline liegt in der Generierung freier Sauerstoffradikale, die Strangbrüche in der DNA verursachen können. Das Chemotherapeutikum Etoposid, aus der Gruppe der Epipodophyllotoxine, führt ebenfalls zu DNA-Strangbrüchen und Chromosomenabberationen, wobei ebenfalls eine Hemmung der DNA-Topoisomerase II erfolgt, allerdings ohne direkte Interkalation in die DNA. Für beide Zytostatika wurden Wirkungsmechanismen über die Mitochondriums nachgewiesen (Custodio *et al.*, 2001; von Haefen *et al.*, 2002).

Western Blot-Analysen sowie Immunfluoreszenzaufnahmen bestätigen eine korrekte Prozessierung und eine mitochondriale Lokalisation des adenoviral exprimierten Smac-Proteins. Bei Einsatz subtoxischer Dosen beider Zytostatika konnte durch die parallele Expression von Smac eine deutliche Sensitivierung der MCF-7 C3 Zellen erreicht werden. Caspase-3-defiziente MCF-7 Zellen weisen trotz einer kombinierten Behandlung mit Ad-Smac eine hohe Resistenz gegenüber diesen beiden Chemotherapeutika auf (Abb. 30). Vermutlich reicht der intrinsische Gehalt der Caspasen-9, -6 und -7, die durch IAP-Moleküle inhibiert und dementsprechend von Smac aktiviert werden können, nicht aus, um effektiven Zelltod zu induzieren. Ebenso wird die Aktivierung von CAD und damit einhergehende apoptotische DNA-Fragmentierung durch das Fehlen von Caspase-3 unterbunden. In den MCF-7 C3 Zellen hingegen reicht die durch DNA-Schädigung hervorgerufene Störung der Mitochondrienintegrität und die damit verbundene Freisetzung von exogenem Smac in das Zytosol aus, um die „downstream“ der Organelle liegende Caspase-Signalkaskade effektiv zu aktivieren und somit Zelltod zu induzieren.

Vor dem Hintergrund, daß XIAP, cIAP-1 und/oder -2 in verschiedenen Tumoren überexprimiert sein können und deren ektopische Überexpression Apoptose verhindert, geriet deren gezielte Inhibierung und die Verstärkung der Wirkung von Zytostatika durch Smac/DIABLO in den Focus der Krebstherapie (Dai *et al.*, 2003; Hunter *et al.*, 2003; Salvesen und Duckett, 2002; Tamm *et al.*, 1998). N-terminale Smac Peptide konnten die Apoptoserate von Krebszellen bei gleichzeitiger Behandlung mit TRAIL, Taxanen, Epothilon, Topoisomerase-Inhibitoren und Antimetaboliten deutlich steigern (Arnt *et al.*, 2002; Du *et al.*, 2000; Fulda *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003).

Auch eine Umgehung mitochondrialer Defekte, wie die Folgen durch den Verlust von Bax oder eine Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub>, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist durch die adenovirale Überexpression von Smac möglich. Somit kann der Einsatz von Smac, insbesondere auch von synthetischen Peptiden, welche die IAP-Bindemotive imitieren, als ein neuartiger therapeutischer Ansatz für die Überwindung resistenter Phänotypen gesehen werden.

5.6 Modell zur Smac-vermittelten Apoptose: Fazit und Ausblick

Zusammenfassend kann folgendes, zum Teil hypothetisches Bild zur Induktion von Apoptose durch die adenovirale Expression von Smac gezeichnet werden: Nach adenoviraler Expression ist das Smac-Protein, wie aufgrund seiner Zielsequenz prognostiziert, in den Mitochondrien nachweisbar. Von dort kann es nach zellulärem Streß freigesetzt werden und wie in der Literatur beschrieben die inhibitorische Wirkung der IAP-Proteine auf die bereits prozessierte Caspasen-3 und -9 aufheben. Darüber hinaus kommt es zur Prozessierung von Caspase-8 und nachfolgender Bid-Spaltung, entweder direkt durch Caspase-8 oder die Effektorcaspase-3, was auf die Existenz eines mitochondrialen Amplifikationsloops schließen läßt. Dieser erfolgt jedoch unabhängig von Bax und Bcl-x<sub>L</sub>. Es wird vermutlich über diesen Amplifikationsloop die Freisetzung von Cytochrom c vor einem deutlich meßbaren Abfall Membranpotentials induziert. Sowohl die Aktivierung der Mitochondrien als auch die Freisetzung von Cytochrom c können unabhängig von aktiven Caspasen stattfinden.

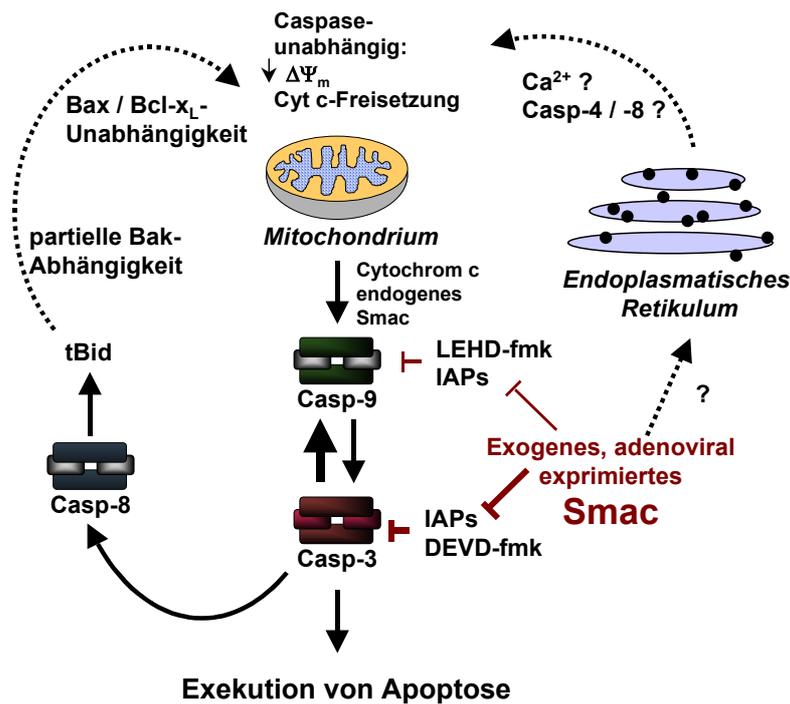


ABB. 31: Modell für die Smac-vermittelte Apoptose

Alternativ zur Signalübertragung durch Bax, kann eine Abhängigkeit von Bak bei der Aktivierung der Mitochondrien beispielsweise nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Hypothese, basierend auf einer Lokalisation von Smac am Endoplasmatischen Retikulum, bezieht dessen Aktivierung mit ein. Über noch ungeklärte Mechanismen erfolgt die Freisetzung von Calciumionen ins Zytosol nachweislich vor einer Aktivierung der

Mitochondrien. Obwohl dieser Vorgang ebenfalls keiner Hemmbarkeit durch zVAD-fmk unterliegt, kann eine Beteiligung der Caspasen-4 und/oder -8 am Smac-induzierten Zelltod nicht ausgeschlossen werden.

Ausgehend von den dargestellten Untersuchungen ergeben sich weitere Fragestellungen, beispielsweise nach möglichen Einflüssen von anderen Bcl-2 Homologen, wie z.B. Bax, Puma und Bcl-2 auf die Aktivierung der Mitochondrien. Auch die Rolle des Endoplasmatischen Retikulums und die durch die Freisetzung von Calciumionen aktivierten Signalwege bieten weitere Möglichkeiten die grundlegenden Mechanismen der Smac-induzierte Apoptose weiterführend zu untersuchen.