

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten die durch das proapoptotische mitochondriale Protein Smac/DIABLO induzierten Apoptosesignalwege und dessen potentieller Einsatz zur Sensitivierung von Tumorzellen für Zytostatika untersucht werden.

Die vollständige Flag-markierte humane Smac cDNA wurde unter der Kontrolle des „Tet-Off-Systems“ *in cis* in einen adenoviralen Vektor kloniert. Mittels Western Blot-Analysen konnte die korrekte Prozessierung des 29 kDa Vorläuferproteins in seine mature 23 kDa Form nachgewiesen werden. Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten die mitochondriale Lokalisation des Smac-Proteins.

Die Expression von exogenem Smac induzierte in Bax<sup>+/-</sup> und Bax<sup>-/-</sup> HCT116 Colon-Karzinomzellen und den Bax-negativen DU145 mock und Bax rekonstituierten Prostata-Karzinomzellen dosisabhängig und unabhängig von deren Bax-Expressionsstatus Apoptose. Begleitet wurde dieser Prozeß von der proteolytischen Aktivierung der Caspasen-3, -9 und -8. Der Einsatz eines Pan-Caspase-Inhibitors konnte den Smac-induzierten Zelltod nahezu vollständig hemmen. Eine Aktivierung der Mitochondrien wurde durch Smac-Expression unabhängig vom Bax-Status der Zellen induziert. Bezüglich der Freisetzung von Cytochrom c hingegen, konnte eine partielle Bax-Abhängigkeit nachgewiesen werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurde in HCT116 Zellen das antiapoptotische Bcl-2 Homologe Bcl-x<sub>L</sub> durch retrovirale Infektion stabil zur Überexpression gebracht. Die Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> hatte keinen Einfluß auf das Sterbeverhalten der Zellen nach Smac-Expression, konnte aber den Zelltod durch Epirubicin partiell hemmen. Aufgrund einer möglichen Lokalisation des Smac-Proteins am Endoplasmatischen Retikulum, sollte dessen Einfluß auf die Smac-induzierte Apoptose untersucht werden. Der Ausstrom von Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Cytosol ging zeitlich einer Aktivierung der Mitochondrien voraus. Im Vergleich zu Bax-defizienten Zellen zeigten die Bax-exprimierenden DU145 Zellen analog zur Cytochrom c-Freisetzung eine stärkere Induktion des Calcium-Effluxes nach Smac-Expression und Behandlung mit Thapsigargin. Mit dem MCF-7 Zellsystem stand ein Modell zur Untersuchung der Caspase-3-Abhängigkeit der Smac-induzierten Apoptose zur Verfügung. Caspase-3-defiziente Transfektanten erwiesen sich als vollständig resistent gegenüber Smac-vermittelter Apoptose, wohingegen Caspase-3-rekonstituierte MCF-7 C3 Zellen für Smac-induzierten Zelltod sensibler waren. Es stellte sich weiterhin die Frage, ob durch eine Kombination von Ad-Smac und dem Einsatz von

Zytostatika eine Zelltodsensitivierung der MCF-7 Zellen ermöglicht werden konnte. Die Kombination aus subtoxischen Dosen der Zytostatika Epirubicin und Etoposid und der Infektion mit Ad-Smac resultierte in einer deutlichen Steigerung der Apoptoserate in Abhängigkeit der Anwesenheit von Caspase-3.

Die Expression von exogenem Smac-Protein induzierte demnach in unterschiedlichen Karzinomzellen, die aufgrund des Verlustes von Bax oder der Überexpression von Bcl-x<sub>L</sub> Defekte in ihrem mitochondrialen Apoptosesignalweg aufweisen, Apoptose oder sensitivierte diese für den Zelltod durch Zytostatika. Somit kann der Einsatz von Smac als ein neuartiger therapeutischer Ansatz für die Überwindung resistenter Phänotypen gesehen werden.