

1 Einleitung – Die Problematik

1.1 Klinische Relevanz der Apoptoseforschung

Untersuchungen der letzten Jahre haben die Bedeutung des kontrollierten Zelltodes (Apoptose) für eine Vielzahl von menschlichen Erkrankungen aufgezeigt. Die Unterdrückung des physiologischen Apoptoseprogramms trägt zur Leukämogenese über unterschiedliche Mechanismen bei, hierzu gehören Akkumulation von Genmutationen, Wachstums-Faktor unabhängiges Überleben von Zellen, Resistenz gegenüber immunvermittelter Zytotoxizität und Übergehen von Zellzyklusregulatoren, die normalerweise Apoptose induzieren würden. Defekte Apoptosemechanismen spielen auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Resistenzmechanismen der Leukämiezellen gegen Chemotherapie und Bestrahlung. Die Kernmaschinerie der Zelltodsignaltransduktionswege lässt sich auf einige – im Verlauf der Evolution gut konservierte – Proteine reduzieren. Diese Arbeit stellt die wichtigsten molekularen Grundlagen der Apoptoseregulation sowie ihre Beteiligung bei malignen Erkrankungen vor. Darüberhinaus wurden antiapoptotisch wirkende Proteine als Zielstrukturen für neue diagnostische und therapeutische Ansätze untersucht, um Tumor- und Resistenzentstehung in der Zukunft therapeutisch beeinflussen zu können.

Innerhalb eines Jahres wird beim Gesunden durch den programmierten Zelltod eine Zellmenge eliminiert, die fast dem Körpergewicht entspricht.¹ Der morphologische Prozess dieses Zelluntergangs wird Apoptose genannt und ist mikroskopisch durch Schrumpfen des Zytoplasmas, Kondensation des Kernchromatins sowie Fragmentierung der Zelle in umschlossene Vesikel charakterisiert.^{2,3} Diese durch das Mikroskop zu beobachtenden Abläufe werden von biochemischen Prozessen induziert und begleitet. So kommt es auf der Zelloberfläche zur Externalisierung von Phosphatidylserinresten und anderen Veränderungen, die das Erkennen der apoptotischen Zellen durch phagozytierende Zellen induzieren. Intrazellulär steht bei der Apoptose die Spaltung sowohl der chromosomalen DNS (Deoxyribonukleinsäure) in hochmolekulare Fragmente als auch von Polypeptiden im Vordergrund. Diese Spaltung lebenswichtiger Strukturen der Zelle wird im Wesentlichen durch eine Familie von intrazellulären Proteasen, Caspasen genannt, vollbracht. Die Aktivierung von Caspasen ist der biochemische Prozess, der mehr als andere eine zelluläre Reaktion als Apoptose definiert.^{4,5}

Im Verlauf der letzten Jahre hat sich das Verständnis der beim Apoptoseprogramm aktivierten Prozesse deutlich verbessert; so konnten einige entscheidende Signaltransduktionswege aufgedeckt werden. Auf der anderen Seite bleibt noch viel über die genauen Mechanismen des Zelltodes zu lernen. So ist weiterhin unklar, wie spezifisch normale oder kranke Zellen für die Induktion des Zelltodes selektioniert werden und wie

sich Zellen, die normalerweise sterben würden, gegen die Aktivierung des normalen Apoptoseprogrammes erfolgreich schützen. Der Fortschritt in diesem Bereich der Forschung ist langsam, da mechanistische Studien in Vertebraten aufwändig und zeitraubend sind und einige Schlüsselmoleküle der Apoptose noch auf ihre Identifizierung warten. Glücklicherweise sind aber die grundlegenden Mechanismen der Apoptose während der Evolution stark konserviert worden. Daher haben Studien der Regulationsmechanismen des Apoptoseprogramms an einfachen Organismen wie *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) die Rahmenbedingungen für eine weitere Analyse des Zelltodes in Säugetierzellen erbracht.⁶

Während der postembryonischen Entwicklung des Nematoden *C. elegans* sterben 131 der 1090 Zellen des Wurms durch Apoptose. Die Isolierung und molekulare Charakterisierung der wichtigsten in diesen Prozess involvierten Gene, *ced-3*, *ced-4* und *ced-9*, belegen den hohen Grad an Homologie dieser Gene im Tierreich.⁷ Das Protein *ced-3* ist den menschlichen Caspasen homolog, während für *ced-9* gezeigt werden konnte, dass es ein funktionelles Homolog des menschlichen antiapoptotischen Proteins Bcl-2 ist. APAF-1 (apoptotic protease-activating factor 1) schliesslich ist ein menschliches Homolog des *ced-4* Proteins.⁸ Insgesamt zeigen diese Daten den hohen Grad an Konservierung der Apoptosesignalwege vom Nematoden zum Menschen und legen die Existenz eines gut konservierten zentralen Apoptosemechanismus in allen Zellen nahe.⁹

Insbesondere haben diese Arbeiten auf genetischem Wege die Bedeutung von Caspasen für den Apoptoseprozess gezeigt: Zellen mit Mutationen im *ced-3* Gen, die zu einem Verlust der Funktion dieses Genes führen, zeigen kein klassisches Apoptoseverhalten mehr. Inzwischen sind eine Vielzahl von menschlichen Caspasen isoliert und ihre Bedeutung für das Apoptoseprogramm durch zahlreiche Studien, welche die Funktion von Caspasen entweder durch Überexprimierung oder Ausschalten ihrer Expression in Zellen untersuchen, belegt worden. Darüberhinaus hat die Identifizierung von *ced-4* als *ced-3* regulierendes Protein geholfen, Apoptosewege aufzuklären und die Bedeutung von *ced-4* als Regulator der Caspasenaktivität aufzuzeigen. *Ced-4* kann physisch mit der inaktiven Proform von *ced-3* interagieren. Parallel hierzu interagiert in humanen Zellen APAF-1 mit der Prodomäne von Procaspase-9 und aktiviert diese in der Gegenwart von Cytochrom c. Diese Beobachtung zeigte, dass *ced-4* die Aktivität von Caspasen reguliert. Diese genetischen Studien in *C. elegans* waren bahnbrechend für die Ausarbeitung des gegenwärtig bestehenden Apoptosemodells beim Menschen, darüber hinaus wird diese Art von Untersuchungen sicher auch in der Zukunft heute noch unklare Fragen beantworten können.⁶

Klinisch detektierbare Malignome stellen Ansammlungen von Zellen dar, die den physiologischen Mechanismen, die normalerweise die Zellzahl kontrollieren, entkommen konnten. Üblicherweise versuchen die meisten klinisch-therapeutischen Ansätze einer

Tumorthherapie die Zellproliferation zu beeinflussen. Durch die im Folgenden ausgeführten Mechanismen rückt in der Zukunft die Apoptose und ihr Fehlen in Tumorzellen mehr in das Visier der klinischen Medizin. In den letzten Jahren ist viel über die Regulationsmechanismen des Zelltodes von normalen und Tumorzellen gelernt worden. Wichtiger Meilenstein ist hier zum Beispiel die Bedeutung von Onkogenen als antiapoptotische Proteine: So bilden Zellen, die das normale RAS oder MYC Protoonkogen überexprimieren, Tumormanifestationen mit einer hohen Rate an apoptotischen als auch mitotischen Tumorzellen. Hingegen finden sich in Tumoren aus Zellen, die das mutierte, onkogene RAS überexprimieren, viele Zellen in Mitose, aber es finden sich kaum apoptotische Zellen.⁹ Darüberhinaus hat die Isolierung von Bcl-2 aus folliculären Lymphomen und die Entdeckung seines Wirkmechanismus die Vorstellung zur Lymphomentwicklung revolutioniert: Studien mit transgenen Tieren haben die Bedeutung von Bcl-2 als Onkogen belegt. Mäuse, die Bcl-2 transgen in B- und T-Zellen exprimieren, entwickeln gehäuft lymphatische Neoplasien. Allerdings gibt es eine lange Latenzzeit bis zur Entwicklung der Lymphome und die Inzidenz dieser Neoplasien in den transgenen Tieren ist niedrig. Die Rate an Lymphomen ist in doppelt transgenen Mäusen, die Bcl-2 und MYC exprimieren, allerdings deutlich erhöht. Deregulierte Zellzykluskontrolle und Blockierung der Apoptose induzieren also sehr potent eine neoplastische Transformation, zum mindesten im Mausmodell.¹⁰

Es wird zur Zeit intensiv über den kontrollierten Zelltod bei Leukämiezellen geforscht. Da die bisherigen Daten belegen, dass der Zelltod das Ergebnis eines aktiven, durch Genexpression kontrollierten Prozesses ist, zielen viele Anstrengungen darauf ab, Substanzen zu entwickeln, die selektiv mit den Zelltod-Proteinen interagieren. Im Folgenden werden die wichtigsten, den Apoptoseprozess steuernden Moleküle vorgestellt sowie das gegenwärtige Wissen zur Bedeutung der Apoptose-steuernden Moleküle für die neoplastische Transformation und Therapieresistenz und ihre mögliche Rolle als Zielstrukturen rational entwickelter Medikamente beleuchtet. Diese Arbeit kann nicht alle Aspekte der molekularen und klinischen Apoptoseforschung wie die genaue Rolle der Mitochondrien für die Apoptose,¹¹ und die Verbindung von Zellzyklus und Apoptose berücksichtigen.¹² Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Bedeutung von antiapoptotischen Molekülen als prognostische Marker und potentielle therapeutische Zielstrukturen bei malignen Erkrankungen.

1.2 Die Bcl-2 Proteinfamilie: Induktoren und Blocker des Apoptoseprogramms

Die menschlichen Bcl-2 Proteine stellen die grösste bekannte Apoptose-regulierende Genfamilie dar. Das Apoptose-blockierende Bcl-2 Gen wurde als Protoonkogen im Bruchpunkt der chromosomalen Translokation t(14;18) bei niedrigmalignen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen gefunden. Die onkogene Bedeutung der Überexpression von Bcl-2, die sich bei den meisten folliculären Lymphomen und bei einigen Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie vom B-Zelltyp (B-CLL) sowie bei diffus-grosszelligen Lymphomen findet, konnte in Versuchen mit transgenen Mäusen verifiziert werden. Diese Mäuse akkumulieren grosse Mengen an sich nicht teilenden B-Zellen. Parallel hierzu ist die B-CLL das klassische Beispiel einer lymphatischen Neoplasie, die primär durch ein Zuwenig an Apoptose als ein Zuviel an Zellteilung charakterisiert ist.¹

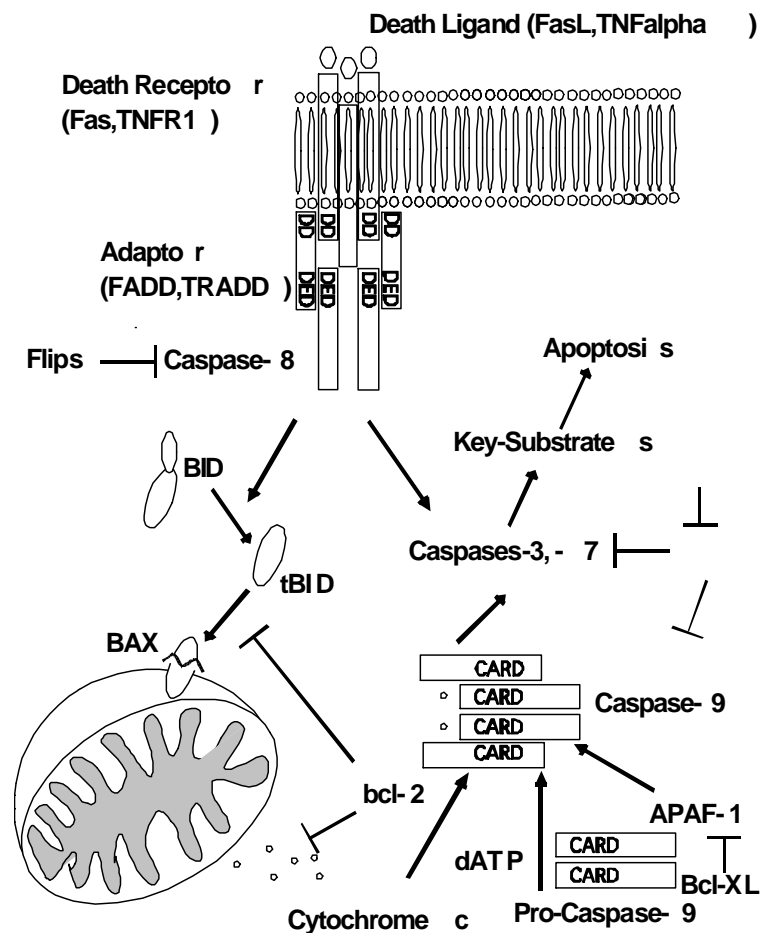
Die Bcl-2 Proteinfamilie kann in zwei Gruppen aufgeteilt werden: Apoptose blockierende Familienmitglieder wie Bcl-2, Bcl-XL, BAG1, MCL1 und A1 sowie Aktivatoren des Apoptoseprogramms wie BAX, BOK, BIM, BIK, BCL-XS, BIK, BID, BAK und BAD.¹³ Eine pathologische Überexpression unterschiedlicher Apoptose-blockierender Familienmitglieder ist für verschiedene maligne Neoplasien beschrieben worden, allerdings sind die zur Überexpression des Bcl-2 Protein führenden Mechanismen bisher überwiegend schlecht verstanden.¹

Seit der Entdeckung von Bcl-2 als antiapoptotischem Protein 1988 sind verschiedene Theorien zu seinem Wirkungsmechanismus publiziert worden: Die Daten legen nahe, dass Bcl-2 auf verschiedenen Ebenen der apoptotischen Signalkaskade einwirkt. Zwei grundlegende molekulare Wirkungen sind beschrieben worden: die Bindung an andere Proteine und Ionenkanal-Aktivität. Antiapoptotische Proteine der Bcl-2 Familie können mit proapoptotischen Proteinen derselben Familie heterodimerisieren, hierdurch wird deren Funktion antagonisiert (Fig. 1). Die strukturelle Grundlage für diese Dimerisation zwischen Bcl-2-Familienmitgliedern ist durch Röntgenstrukturanalysen sowie magnetresonanztomografische Untersuchungen aufgeklärt worden: Die Bindung findet zwischen einer hydrophoben Tasche des antiapoptotischen Bcl-XL Proteins und einer alpha-helikalen Region, BH3-Region genannt, des proapoptotischen BAX statt.^{1,13}

Eine bedeutende Verbindung zwischen mitochondrialen und zytoplasmatischen apoptotischen Ereignissen wurde durch die Entdeckung von APAF-1 hergestellt.⁸ APAF-1 ist ein zytosolisches Protein, das erst durch die Bindung an Cytochrom C aktiviert wird. Cytochrom c ist ein mitochondriales Protein, das nach unterschiedlichen Apoptose-induzierenden Reizen ins Zytosol transloziert und dann APAF-1 binden kann.¹⁴ Der resultierende Komplex aus APAF-1 und Cytochrom c bindet dann die Procaspase-9,

dieser Prozess führt zur Aktivierung dieser Initiatorcaspase und zur Induktion einer Caspasenkaskade mit nachfolgender Apoptose (Fig. 1 und 2). Bcl-XL kann an APAF-1 binden und so den durch Überexpression von APAF1 induzierten Apoptoseprozess blockieren, da APAF-1 dann nicht mehr an Procaspase-9 binden kann und so diese Initiatorcaspase nicht aktiviert wird. Die direkte Interaktion zwischen APAF-1 und Bcl-2 Proteinen ist aber von anderer Seite angezweifelt worden.¹⁵

Fig. 1



Legende: Apoptose-Signaltransduktionswege: Es gibt zwei klassische Signaltransduktionswege, über die Caspasen in der Zelle aktiviert werden. Der Todesrezeptorweg beginnt mit der Bindung und Aktivierung eines Todesrezeptors wie Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNF-R1), schliesslich wird über Adaptorproteine wie Fas adaptor death domain (FADD) die Initiatorcaspase-8 aktiviert. Der mitochondriale Signalweg führt nach Ausschüttung von Cytochrom c und dessen Bindung an apoptotic protease-activating factor-1 (APAF-1) zur Aktivierung der Initiatorcaspase dieses Signalweges, Caspase-9. Einmal aktiviert, spalten die Caspasen-8 und -9 die Effektorcaspasen wie z. B. die Caspasen-3 und -7, die den Zelltod exekutieren. Caspase recruitment domain (CARD), death domain (DD), death effector domain (DED), FAS-Ligand (FASL) FLICE/caspase-8 inhibitory proteins (FLIPs), truncated BID (tBID), TNF-receptor-associated death domain (TRADD). aus Tamm I et al., Lancet Onc (2001) 2, 33-42

Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle im Apoptoseprozess. Verschiedene proapoptotische Stimuli induzieren die Translokation des proapoptotischen BAX aus dem Zytosol zu den Mitochondrien, dieser Vorgang führt dann zur Ausschüttung des Caspase-aktivierenden Faktors Cytochrom c. Die Struktur von BAX ist der Poren-induzierenden Region des Diphtherietoxins ähnlich. Das Diphtherietoxin induziert Kanäle in Biomembranen, dieses erlaubt den Übertritt von Toxinteilen in die Zelle, hierdurch wird die mRNA-Translation blockiert, so dass die Zelle stirbt. In ähnlicher Weise vermag BAX direkt Löcher in der äusseren Mitochondrienmembran zu induzieren, was ebenfalls zur Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol mit nachfolgender Caspaseaktivierung führt.¹

Die proapoptotischen Effekte von BAX sind darüber hinaus durch dessen Assoziation mit dem mitochondrialen Porenkomplex bedingt. Die Öffnung einer durch Cyclosporin blockierbaren Pore in der inneren mitochondrialen Membran ist mit der Induktion von Apoptose assoziiert. Eine der Konsequenzen der Öffnung dieser Pore ist das Anschwellen der Mitochondrien und das nachfolgende Platzen der äusseren mitochondrialen Membran, auch über diesen Mechanismus induzieren proapoptotische Bcl-2 Familienmitglieder wie BAX die Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol, was dann die Caspasenkaskade induziert.¹¹

Wie nutzen maligne Zellen diese Apoptose-Mechanismen? Die reduzierte Expression proapoptotischer Proteine wie BAX und BAK ist wiederholt für verschiedene Entitäten berichtet worden.⁵ Darüberhinaus wurden inaktivierende Mutationen im Bax-Gen bei Magen- und Kolonkarzinomen sowie hämatopoetischen Neoplasien gefunden.¹⁶ Studien an knock-out-Mäusen haben gezeigt, dass BAX als Tumorsuppressor in vivo agieren kann. Ein weiterer Mechanismus - neben der reduzierten Expression proapoptotischer Proteine - zur Inaktivierung proapoptotischer Bcl-2 Proteine ist für Proteinkinasen, die in der Signaltransduktion von Ras und Wachstumsfaktor-Rezeptoren bedeutsam sind, beschrieben worden: Die Phosphorylierung des proapoptotischen BAD Proteins durch AKT und andere Kinasen inaktiviert BAD, da es in phosphorylierter Form nicht mehr mit anderen antiapoptotischen Bcl-2 Familienmitgliedern wie Bcl-2 oder Bcl-XL heterodimerisieren kann und so deren antiapoptotische Funktion nicht mehr blockieren kann.¹

Die Bcl-2 Familie wird auch mit der Therapieresistenz von malignen Zellen in Verbindung gebracht. Zytostatika und Bestrahlung wirken durch Induktion von Apoptose in den Tumorzellen. Es gibt eine Vielzahl von Hinweisen, dass Bcl-2 ein Multiresistenzgen darstellt, das Apoptose durch Bestrahlung und sämtliche klinisch verwendeten Zytostatika blockieren kann.¹⁷ Parallel hierzu kann durch eine therapeutische Herunterregulierung der Expression von Bcl-2, z. B. durch Antisensekonstrukte, die Sensibilität von Tumorzellen für verschiedene Chemotherapeutika verstärkt werden. Daher sind zur Zeit

mehrere Phase III-Studien bei verschiedenen Entitäten aktiv, welche die Bedeutung von Antisensekonstrukten gegen Bcl-2 zusammen mit einer Chemotherapie untersuchen.¹⁸ Die Höhe der Expression von Bcl-2 Familienmitgliedern bei verschiedenen Malignomen könnte prognostische Bedeutung erlangen, speziell zur Vorhersage des klinischen Ansprechens einer Chemotherapie.

So wurden zum Beispiel hohe Konzentrationen an Bcl-2-Protein bei Patienten mit B-CLL gemessen, bei der B-CLL erfolgt die Überexpression von Bcl-2 durch transkriptionelle Aktivierung und überwiegend nicht durch chromosomale Abnormalitäten am Bcl-2 Locus wie beim folliculären Lymphom.^{9,19} Eine verstärkte Expression von Bcl-2 ist ebenfalls oft beim Neuroblastom zu finden, hier ist auch eine Assoziation zwischen prognostisch ungünstiger Histologie und hohen Bcl-2-Spiegeln gezeigt worden.²⁰ Allerdings findet sich für die Mehrheit der Malignome keine direkte Assoziation zwischen Expressionshöhe eines Bcl-2 Familienmitgliedes und Therapieresistenz oder Progress der Erkrankung. Beispielsweise war die Expression von Bcl-2 in kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen höher als bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen, die Sensitivität für spontane oder durch Bestrahlung induzierte Apoptose in vitro korrelierte hier invers mit der Expression von Bcl-2.⁵ Mögliche Erklärungen für die Beobachtung, dass die Expression von Bcl-2 Familienmitgliedern nicht mit dem Therapieansprechen oder Überleben korreliert, schliessen transkriptionelle oder post-translationale Regulationsmechanismen dieser Proteine mit ein. Diese Mechanismen sind zum Beispiel Modifikationen von Proteinen wie BAD via Phosphorylierung durch AKT und andere Kinasen.²¹ Ähnliches gilt für BAX: um proapoptotisch wirken zu können, muss BAX aus dem Zytoplasma zu den Mitochondrien translozieren, um die Ausschüttung von Cytochrom c ins Zytosol zu induzieren (Fig. 1). Das Signal zur Aktivierung und Translokation erhält BAX durch Bindung an das nur aus der BH3-Domäne bestehende proapoptotische Protein BID. Das bloße Messen der Expressionshöhe von BAX als Prognosemarker mag deshalb nicht ausreichend sein, da sowohl das inaktive zytosolische als auch das aktive, in der Mitochondrienwand befindliche BAX immunhistochemisch oder im Immunoblot gemessen wird. Darüberhinaus beruhen die meisten der publizierten klinischen Daten auf retrospektiven Untersuchungen mit kleinen Fallzahlen. Die Bedeutung der Bcl-2 Familie als Prognosemarker muss noch weiter in grossen randomisierten und prospektiv angelegten klinischen Studien untersucht werden.

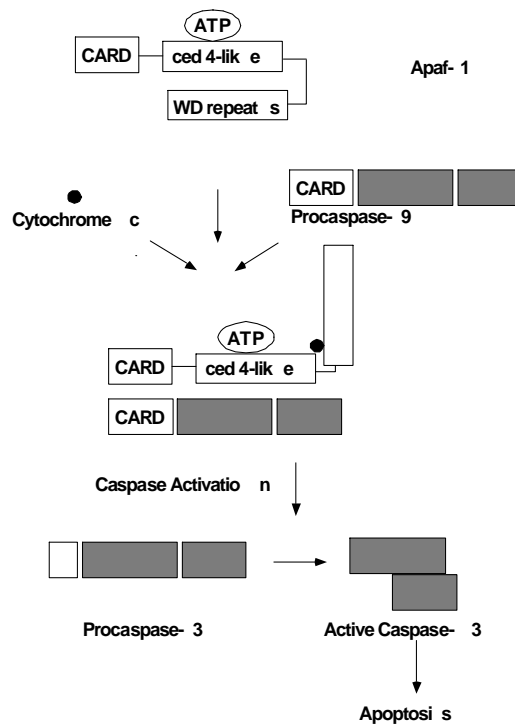
Bcl-2 Gene werden durch p53 reguliert. Das p53 Protein funktioniert als Sensor für genotoxischen Stress, so kommt es zum Beispiel nach DNA-Schäden durch Bestrahlung p53-induziert zum Zellzyklusarrest oder zur Induktion von Apoptose. Eine direkte Verbindung zwischen p53 und der Bcl-2 Familie wurde durch die Beobachtung hergestellt, dass die Promoterregion von BAX typische p53-Bindungsstellen aufweist und das BAX-Gen als direktes transkriptionelles Ziel von p53 identifiziert werden konnte.²² Die

Überexpression von BAX oder anderen proapoptotischen Familienmitgliedern macht Tumorzellen sensibler für durch Chemotherapeutika-induzierte Apoptose, hingegen reduziert das Ausschalten der BAX-Expression in Tumorzellen - z. B. durch Antisensekonstrukte – Chemotherapie-induzierte Apoptose. Diese Daten zeigen die Bedeutung der Bcl-2 Familie sowohl als Modulatoren der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie als auch als Mediatoren ihrer zytotoxischen Effekte. Die Fähigkeit von Zytostatika und Bestrahlung zur Induktion von BAX kann erklären, warum Malignome trotz hoher Expressionsspiegel an Bcl-2 Protein, wie z. B. kleinzellige Bronchialkarzinome, initial gut auf die Therapie ansprechen, dann aber im Rezidiv – üblicherweise mit Verlust eines funktionstüchtigen p53 einhergehend – therapieresistent sind.⁵

1.3 Caspasen: Killer-Proteasen

Die überwiegende proteolytische Aktivität im Rahmen des apoptotischen Prozesses geht von Caspasen aus, intrazellulären Zystein-abhängigen Proteasen mit einer Spezifität für Asparaginsäure.²³ Die Aktivierung jeder der in einer inaktiven Proform in der Zelle vorliegenden Procaspasen selber erfolgt ebenfalls durch proteolytische Abspaltung der Prodomäne mit anschliessender Organisation der grossen und kleinen Untereinheit der Caspase zu einem aktivem Enzymkomplex (s. Fig. 2). Strukturanalysen konnten für die Caspasen-1 und -3 zeigen, dass die aktiven Caspasen aus zwei Heterodimeren bestehen, die über die kleine Untereinheit interagieren, so dass insgesamt ein Tetramer mit zwei katalytischen Zentren vorliegt. Die Substratspezifität der einzelnen Caspasen wird im Wesentlichen durch die Sequenz von vier Aminosäuren N-terminal zur Substratbindungsstelle bestimmt.²⁴

Fig. 2



Legende: Die Caspaseaktivierung im mitochondrialen Apoptoseweg ist von APAF-1 und Cytochrom c abhängig. Nach Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien bildet sich ein Apoptosom genannter supramolekularer Komplex aus Cytochrom c, APAF-1 und Caspase-9. Hierdurch werden die Effektorcaspasen wie Caspase-3 aktiviert. Caspase recruitment domain (CARD), tryptophan/aspartic acid repeats (WD-repeats), aus Tamm I et al., Lancet Onc (2001) 2, 33-42

Die verschiedenen Caspasen sind über eine proteolytische Kaskade miteinander verbunden, man unterscheidet früh in der Signaltransduktionskette aktivierte sogenannte Initiatorcaspasen wie die Caspasen-8 und -9 von weiter distal gelegenen Effektorcaspasen wie z. B. die Caspasen-3 und -7, die dann die zellulären Proteine spalten und die eigentliche Apoptose exekutieren. Darüberhinaus weisen die inaktiven Vorstufen der Caspasen sogenannte Prodomänen auf, die jeweils strukturell verwandte Aminosäuresequenzen enthalten, mit deren Hilfe die Procaspasen an ihre spezifischen Aktivatoren binden. Zwei verschiedene Typen solcher Interaktionsdomänen innerhalb der Prodomänen von Initiatorcaspasen konnten bisher identifiziert werden: "death effector domains" (DED) und "caspase recruitment domains" (CARD). Die Caspasen-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12 und -13 weisen Prodomänen mit entweder DEDs oder CARDs auf. Im Gegensatz hierzu haben die Caspasen-3, -6, -7 und -14 kurze Prodomänen ohne diese Interaktionsdomänen. DEDs und CARDs verbinden die Initiatorcaspasen – am bedeutsamsten die Caspasen-8 und -9 – via homophile Interaktionen mit wichtigen regulatorischen Molekülen. Initiatorcaspasen haben Substratspezifitäten, die sehr ähnlich zu den Caspasenerkennungssequenzen in ihrer eigenen Struktur sind, daher können sich diese Initiatorsequenzen auch autokatalytisch aktivieren. Optimale Caspasenerkennungssequenzen für Initiatorsequenzen sind aber in der Sequenz verschiedener Effektor-Procaspasen wie Procaspasen-3 und -7 zu finden, hierüber erfolgt die Aktivierung der Effektorcaspasen durch die Initiatorcaspasen.²⁵ Caspasen funktionieren also als proteolytische Kaskade diesbezüglich ähnlich der Aktivierung der Blutgerinnung.

Offensichtlich wäre die Inaktivierung von Caspasen von Vorteil für eine Tumorzelle, die dem programmierten Zelltod entgehen möchte. Bisher sind inaktivierende Mutationen für verschiedene Caspasen gezeigt worden: Caspase-10 weist häufig "mis-sense" Mutationen bei Patienten mit autoimmunem lymphoproliferativem Syndrom Typ II auf.²⁶ "Frameshift" Mutationen innerhalb von Caspase-5 finden sich bei 28% der Patienten mit Endometriumkarzinom, 62% der Patienten mit Kolonkarzinom und bei 44% der Patienten mit Magenkarzinom des Mikrosatelliten-Mutator-Phänotyps.²⁷ Darüberhinaus exprimieren kleinzellige Bronchialkarzinomzellen die Procaspasen-1, -4, -8 und -10 signifikant geringer als nicht-kleinzellige Bronchialkarzinomzellen.²⁸ Interessanterweise weist die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 eine 47 Basenpaare lange Deletion innerhalb von Exon 3 des Caspase-3 Gens auf, so dass diese Zelllinie keine Caspase-3 exprimiert, aber dennoch – vermutlich wegen der Anwesenheit anderer Effektorcaspasen – für Apoptosestimuli sensibel ist.²⁹ Das Caspase-8 Gen ist häufig bei Patienten mit Neuroblastom inaktiviert. Das Gen wird durch DNA-Methylierung und Gen-Deletion ausgeschaltet.³⁰ Interessanterweise fand sich eine komplette Inaktivierung von Caspase-8 fast nur bei Patienten mit Neuroblastomen, die auch das Onkogen MYC-N überexprimierten, was eine mögliche Rolle für Caspase-8 als Tumorsuppressor durch

Kontrolle der Amplifikation von MYC-N nahelegt.³⁰

Trotz dieser faszinierenden Erkenntnisse der letzten Jahre über die molekularen Abläufe der Apoptose bleiben viele Fragen ungeklärt: Während die Bedeutung von Caspasen für den programmierten Zelltod inzwischen ausser Frage steht, bleibt die Rolle des Caspasen-unabhängigen Zelltodes zur Zeit offen. Dessen Bedeutung wird durch Experimente nahegelegt, in denen pharmakologisch Caspasen in ihrer Aktivität blockiert werden: meist sterben die Zellen nach verschiedenen proapoptotischen Stimuli - wenn auch zeitlich verzögert – mit zum Teil veränderter Morphologie dennoch. Darüberhinaus werden nicht-Caspase ähnliche Proteasen wie Cathepsine, Caspaine und Granzyme während der Apoptose aktiviert, ihre Rolle in diesem Prozess ist noch nicht abschliessend definiert und zur Zeit Gegenstand aktiver Forschung.³¹

1.4 Inhibitoren der Apoptose: Der Name ist Programm

Die Proteinfamilie der "Inhibitoren der Apoptose" (IAPs) sind im Rahmen der Evolution gut konservierte antiapoptotische Proteine.^{32,33} Zuerst in Baculoviren entdeckt,³⁴ fanden sich homologe Proteine in Fliegen, Würmern, Mäusen und Menschen.²⁵ Diese Proteine blockieren Apoptose durch direkte Bindung an spezifische Caspasen (Fig. 1).⁵ Bisher sind die Effektorcaspasen-3 und -7 sowie die Initiatorcaspase-9 als direkte Bindungspartner der IAPs, die dadurch die Caspaseaktivität blockieren, bekannt. Andere Caspasen, wie die Caspasen-1, -6, -9 oder -10, binden hingegen IAPs nicht.

Zur Zeit ist bekannt, dass IAPs mindestens zwei wichtige Apoptosewege blockieren können: den mitochondrialen Apoptoseweg mit Caspase-9 und Cytochrom c sowie den Todesrezeptorweg, der durch die Tumornekrosefaktor-Rezeptoren aktiviert wird (Fig. 1). IAPs können auch einen dritten Signaltransduktionsweg mit Granzym B als direkten Aktivator von Caspase-3 blockieren.^{35,36}

Der mitochondriale oder intrinsische Apoptoseweg wird durch die Ausschüttung von Cytochrom c von den Mitochondrien ins Zytoplasma initiiert (Fig. 1 und 2). Cytochrom c befindet sich normalerweise zwischen der inneren und der äusseren Mitochondrienmembran. Als Reaktion auf verschiedene Apoptosestimuli wie z. B. Chemotherapie mit Etoposid oder Bestrahlung wird Cytochrom ins Zytoplasma ausgeschüttet und bindet dort APAF-1 und die Procaspase-9. Dieser Komplex wird Apoptosom genannt und führt zur Aktivierung der Initiatorcaspase-9, die dann die Effektorcaspasen-3 und -7 aktiviert (Fig. 1).^{8,37,38}

Der Todesrezeptor-Signaltransduktionsweg oder extrinsische Caspaseweg beginnt mit der TNF-Familie von Zytokinrezeptoren, zu der Fas (CD95), DR4 (Trail-R1) und TNF-R1 (CD120a) gehören (Fig. 1). Diese Todesrezeptoren werden über Liganden, die an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors binden, aktiviert. Nach dieser Aktivierung binden Adaptermoleküle wie FADD (Fas-activated death domain) an die intrazelluläre Domäne des aktivierten Rezeptors. Über dieses Adaptermolekül bindet schliesslich Caspase-8 an den Rezeptor via die DED ("death effector domain"), dieser Komplex aus FADD und Caspase-8 wird auch DISC ("death-inducing signaling complex") genannt.³⁹ Caspase-8 dimerisiert am DISC, die aktive Caspase-8 transloziert dann vom DISC wieder ins Zytosol, wo die Effektorcaspasen gespalten und dadurch aktiviert werden, die dann die eigentliche Zerstörung der Zelle vornehmen.^{38,40,41}

Der intrinsische und der extrinsische Signaltransduktionsweg kommen schliesslich bei der Aktivierung der Effektorcaspasen, wie z. B. Caspase-3, zusammen. Die Effektorcaspasen spalten dann lebensnotwendige Polypeptide in der Zelle, so dass die Zelle schliesslich untergeht. Obwohl die beiden Signalwege aus didaktischen Gründen getrennt vorgestellt

wurden, existieren in vivo doch verschiedene Verbindungswege. Beispielsweise wird BID, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie, das nur aus der BH3-Domäne besteht, durch aktive Caspase-8 aus dem extrinsischen Signalweg gespalten und dadurch aktiviert. Dieses aktivierte BID gelangt in die Mitochondrien, wo es die äussere Zellmembran für Cytochrom c durchlässiger macht, so dass sekundär der intrinsische Signalweg ebenfalls aktiviert wird und das apoptotische Geschehen intrazellulär verstärkt.^{38,42}

Die IAPs interferieren also überwiegend in den distalen Anteilen der proteolytischen Apoptosekaskade, indem sie die Effektorcaspasen-3 und -7 blockieren, sowie im mitochondrialen Apoptoseweg, indem Caspase-9 blockiert wird. Die Fähigkeit von cIAP1 und cIAP2, an Tumornekrosefaktor (TNF) Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAFs) zu binden, legt aber nahe, dass die IAPs die Caspasenkaskade bereits auf Rezeptorebene blockieren können.⁴³

Ein anderes Caspasen blockierendes Protein ist cFLIP.⁴⁴ cFLIP bindet an Caspase-8 und kann so dessen proteolytische Aktivität inhibieren und dadurch antiapoptotisch wirken. cFLIP blockiert so durch Fas-Ligand induzierte Apoptose, durch Chemotherapeutika wie Vincristin oder Etoposid induzierte Apoptose bleibt aber unbeeinträchtigt, da diese Substanzen über Fas unabhängige Wege den Zelltod induzieren.⁴⁵ Darüberhinaus hat cFLIP aber wahrscheinlich neben der Blockierung der Rezeptor-vermittelten Apoptose noch andere Funktionen, da es auch NF- κ B und Erk aktivieren kann.⁴⁶

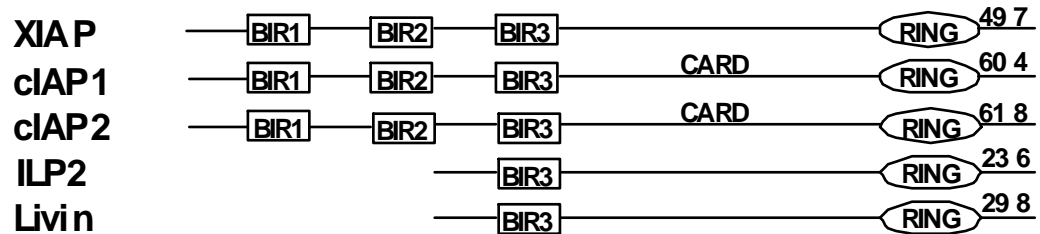
Heute sind acht humane IAP-Familienmitglieder bekannt. Proteine werden als IAP-Familienmitglieder bezeichnet, wenn sie zwischen einem und drei "Baculovirus-IAP-Repeat" (BIR)-Domänen aufweisen, eine Zink-bindende Region von ca. 70 Aminosäuren Länge.³² IAPs können ebenfalls eine "caspase recruitment domain" (CARD-) oder eine RING-Domäne enthalten.³² Die IAP-Proteine sind abhängig von der Homologie der BIR-Domänen und der Anwesenheit eines RING-Fingers in drei Gruppen unterteilt worden (Fig. 3).⁴⁷

Die IAPs der Gruppe 1 enthalten homologe BIR-Domänen und einen RING-Finger (Fig. 3). XIAP weist drei BIR-Domänen und einen RING-Finger auf. Es war das als erstes identifizierte humane IAP und ist heute neben Survivin das funktionell am besten charakterisierte. Duckett et al. identifizierten XIAP 1996 als humanes homologes Protein der Baculovirus-IAPs.⁴⁸ Die Blockierung der Caspaseaktivität ist der bestverstandene Mechanismus, über den IAPs Apoptose verhindern. In enzymatischen Testverfahren blockiert rekombinantes XIAP die aktiven Caspasen-3 und -7 in nanomolaren Konzentrationen in vitro. In der Zellkultur blockiert in 293-Zellen überexprimiertes XIAP die durch Bax oder Fas induzierte Aktivierung von Procaspase-3 und dadurch Apoptose (Fig. 1).⁴⁹ Der Effekt von XIAP auf Caspasen wird strukturell durch die BIR-Domänen vermittelt. Auch wenn die Struktur der BIR-Domänen ähnlich ist, inhibieren

unterschiedliche BIR-Domänen verschiedene Caspasen: Die BIR2-Domäne von XIAP bindet und blockiert beispielsweise die Effektorcaspasen-3 und -7, während dessen BIR3-Domäne Caspase-9 blockiert.^{50,51}

Fig. 3

Klasse 1 :



Klasse 2 :



Klasse 3 :



Legende: Die Inhibitor der Apoptose-Proteinfamilie. Heute sind acht humane IAP-Proteine bekannt. Strukturell gemeinsam ist allen die Baculovirus-Inhibitory-Repeat (BIR)-Domäne. Caspase recruitment domain (CARD), verändert nach Tamm I et al., Lancet Onc (2001) 2, 33-42

Nachdem durch zellbiologische und biochemische Experimente die anti-Caspasenwirkung von XIAP nahegelegt wurde, konnte die physische Bindung zwischen XIAP und Caspasen durch kristallographische Untersuchungen dargestellt werden: Die BIR2-Domäne von XIAP (Aminosäuren 163-240) inklusive ihrem N-terminalem Ende (Aminosäuren 124-162) bindet und blockiert die Effektorcaspasen-3 und -7, während die BIR3-Domäne (Aminosäuren 241-356) die Initiatorcaspase des intrinsischen Apoptosewegs, Caspase-9, bindet und dadurch blockiert.⁵² Diese Studien legten die Basis für die Entwicklung von IAP-Blockern, die spezifisch die IAP-Caspasen-Bindungsstelle auf Seiten der IAPs blockieren sollen, so dass die anti-Caspasen und damit antiapoptotische Funktion der IAPs zum Beispiel in Tumorzellen inhibiert werden kann.

Die BIR2-Domäne von XIAP blockiert die Caspasen-3 und -7: Die Aminosäuren 138-146 von XIAP binden die Effektorcaspasen im Bereich des aktiven Zentrums der Caspasen, die restlichen an der Bindung beteiligten AS sorgen für eine Stabilisierung des Komplexes. Der Mechanismus der Caspasen-Blockierung besteht also aus einer sterischen Blockierung.⁵³ Die BIR3-Domäne von XIAP blockiert hingegen Caspase-9:

Während in Zellkulturexperimenten die anti-Caspase-9 Wirkung von XIAP schon seit längerem bekannt war, konnte der Mechanismus strukturell erst vor kurzem aufgeklärt werden: Die BIR3-Domäne von XIAP bildet einen Heterodimer mit der monomeren Caspase-9, hierdurch wird die für die Aktivierung nötige Dimerisierung der Caspase-9 verhindert.⁵⁴ Anders als bei der BIR2-Domäne erfolgt die Blockierung von Caspase-9 also ohne eine direkte Interaktion mit dem aktivem Zentrum der Caspase.

Darüberhinaus wurden diese Ergebnisse durch elegante Mutationsstudien ergänzt: Mutationen innerhalb des N-terminalen Endes der BIR2-Domäne (z. B. D148A) blockieren XIAPs antiapoptotische Funktion nach Fas (Aktivator des extrinsischen Signalwegs) und Bax (Aktivator des intrinsischen Signalwegs) induzierter Apoptose.⁵⁰ Im Gegensatz hierzu wird mit Mutationen im Bereich der BIR3-Domäne (z. B. W310A) nur die Bax-Apoptose blockierende Funktion von XIAP aufgehoben, während durch Fas-Ligand induzierte Apoptose weiterhin durch XIAP blockiert wird. Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse also die Daten der oben beschriebenen Strukturstudien, dass die BIR2-Domäne von XIAP die Effektorcaspasen-3 und -7 und die BIR3-Domäne die Initiatorcaspase-9 bindet.

Zwei andere IAP-Mitglieder der Gruppe 1 sind cIAP1 und cIAP2, die mit drei BIR-Domänen und einem RING-Finger strukturell XIAP sehr ähnlich sind. Diese IAPs wurden über ein "yeast-two-hybrid"-Verfahren mit TRAF-1 und -2 gefunden, ihre genaue Funktion am TNF-Rezeptor ist aber nicht bekannt.⁵⁵ cIAP1 und cIAP2 sind ubiquitär exprimiert, die Expression von cIAP1 ist aber am höchsten im Thymus, Hoden und Ovar, während die Expression von cIAP2 am höchsten in Milz und Thymus ist.⁵⁵ cIAP1 und cIAP2 binden ebenfalls an die Caspasen-3 und -7, allerdings mit geringerer Affinität als XIAP.⁵⁶ Die Caspasen-1, -6, -8 und -12 werden von diesen IAPs nicht blockiert. cIAP2 auf Chromosom 11q21 und ein neues Gen, MLT auf Chromosom 18q21, liegen an dem Bruchpunkt der t(11;18)(q21;q21), die sich in ca. 50% der Patienten mit niedrig-malignen Lymphomen des Mucosa assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT) nachweisen lässt.⁵⁷ Obgleich die funktionelle Bedeutung dieser Translokation bisher nicht abschliessend geklärt ist, liegt eine pathogenetisch ursächliche Rolle von cIAP2 bei MALT-Lymphomen nahe.⁵⁸ Livin und ILP2 weisen nur eine BIR-Domäne und einen RING-Finger auf, aber ihre BIR-Domäne hat die grösste Homologie zur dritten BIR-Domäne von XIAP, cIAP1 und cIAP2. Livin blockiert die Caspasen-3 und -9 mit ähnlicher Affinität wie cIAP1. ILP2 ist beim gesunden Erwachsenen nur im Hodengewebe nachweisbar, sonst ist es in einer lymphoblastischen Zelllinie nachgewiesen worden. ILP2 blockiert spezifisch Caspase-9, aber nicht die Caspasen-3, -7 oder -8.⁵⁹

Die 2. Gruppe der IAP-Familie enthält nur ein Mitglied: NAIP, das drei BIR-Domänen aber keinen RING-Finger aufweist (Fig. 3). NAIPs BIR-Domänen sind strukturell weiter von denen der Gruppe 1 entfernt. NAIP wurde 1995 auf der Suche nach einem Kandidatengen für die kindliche spinale Muskelatrophie isoliert.⁶⁰ NAIP ist beim

Erwachsenen in Leber, Plazenta und ZNS exprimiert. Es blockiert die Caspasen-3 und -7, aber nicht -1, -4 und -8.⁶¹

IAPs der Gruppe 3 wie Survivin enthalten nur eine BIR-Domäne ohne RING-Finger (Fig. 3). Survivin ist während der fetalen Entwicklung aber nicht in den meisten adulten Geweben exprimiert.⁶² Die bevorzugte Expression von Survivin während der Entwicklung legt eine besondere Rolle während dieser Phase nahe. Survivin ist in vielen malignen Entitäten überexprimiert.⁶² So ist die Überexpression von Survivin bei kolorektalen^{63,64}, Magen-⁶⁵, Lungen-⁶⁶, Mamma-⁶⁶ sowie Blasenkarzinomen⁶⁷, hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen⁶⁸ und bei der kindlichen AML⁶⁹ mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Beim Neuroblastom findet sich eine stärkere Expression von Survivinprotein bei späten als bei frühen Erkrankungsstadien.^{70,71}

Das ungewöhnliche Expressionsmuster sowie seine physiologische Funktion haben klinisches Interesse an Survivin als Prognose- oder Tumormarker sowie als molekulares Therapieziel geweckt. Beispielsweise wurde versucht, den Survivin-Promoter als Tumorspezifischen Promoter zum transkriptionellen "Targeting" maligner aber nicht gesunder Zellen zu nutzen.⁷²

Die Expression von Survivin ist abhängig vom Zellzyklus: Die Expression ist am höchsten während der G2/M-Phase und fällt während des Zellzyklusarrest rasch ab.⁷³ Am Beginn der Mitose bindet Survivin an die mitotische Spindel, die Blockierung dieser Interaktion inhibiert Survivins antiapoptotische Funktion. Die Überexpression von Survivin bei verschiedenen malignen Entitäten könnte so diesen Kontrollpunkt während der Zellteilung überwinden helfen und hierdurch auch transformierten Zellen die Zellteilung unter Umgehung von Zellteilungskontrollpunkten während der G2/M-Phase erlauben. Suzuki et al. haben die Bedeutung von Survivin als Zellzyklusregulator unterstrichen, indem sie als direkten Bindungspartner "Zyclin-abhängige Kinase 4" (cdk4) isolieren konnten.⁷⁴ Survivin hat also eine Brückenfunktion zwischen Apoptose – durch Bindung und Blockierung von Caspasen – und Zellteilung als Zellzyklusregulator durch Bindung an cdk4. Im Unterschied zu p53, das die Zellteilung während der S-Phase mit der Apoptose verknüpft, verbindet Survivin antiapoptotische Funktionen mit der Kontrolle der späteren Phasen des Zellzyklus (G2/M).^{75,76}

Survivin als kleinstes humanes IAP-Familienmitglied blockiert ebenfalls zum Beispiel durch Bax induzierte Apoptose. Mit Hilfe eines "yeast-two-hybrid"-Systems konnte ein Survivin bindendes Protein, Hepatitis-B-X-interacting Protein (HBXIP), identifiziert werden. In vitro blockieren beide Proteine zusammen, aber nicht alleine, rekombinante Caspase-9.⁷⁷

Neben der anti-Caspasefunktion der IAPs sind noch andere zelluläre Funktionen aufgedeckt worden. IAPs regulieren die Zellteilung: Eine Bedeutung der IAPs bei der

Zellteilung wurde bereits früh durch die Beobachtung nahegelegt, dass Hefen keine Caspasen, aber IAPs mit nur einer BIR-Domäne exprimieren. Die Deletion dieser Hefen-IAPs führt zu schweren Störungen während der Meiose.⁷⁸ In menschlichen Zellen kolokalisiert Survivin mit dem mitotischen Apparat, eine Bindung wurde an Tubulin B, Zentrosomen und Kinetochoren beschrieben. Eine Blockierung von Survivin mit anti-Survivin Antikörpern verzögert den Eintritt in die Metaphase der Zellteilung und führt zu mitotischen Zellen mit kürzeren und weniger dichten mitotischen Spindeln.⁷³

IAPs kontrollieren den Zellzyklus: Überexpression von XIAP arretiert Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus, dieser Wachstumsarrest ist mit einer reduzierten Expression der Zykline A und D1 sowie einer verstärkten Expression der Zyklin-abhängigen Kinaseinhibitoren p21 und p27 assoziiert.⁷⁹ Darüberhinaus bindet XIAP die Zellzyklusregulatoren MAGE-1 und NRAGE, die funktionelle Bedeutung dieser Interaktion ist zur Zeit aber unklar.⁸⁰ Survivin ist ebenfalls mit der Regulation des Zellzyklus in Verbindung gebracht worden. So ist Survivin in HeLa-Zellen während der G1-Phase des Zellzyklus praktisch nicht detektierbar, die Expression steigt aber 5-40-fach während der S-Phase und der G2/M-Phase an, eine Bindung an cyclin-dependent-kinase 4 (cdk4) wurde beschrieben.⁷⁴ Über diesen Mechanismus könnte auch ein Teil der antiapoptotischen Funktion von Survivin erklärbar sein, da die adenovirale Überexpression von cdk4 blockierenden cdk inhibitor Proteinen wie p16 in Tumorzellen Apoptose auslöst.¹¹³

IAPs kontrollieren noch andere Signaltransduktionswege: IAP-Proteine spielen ebenfalls eine Rolle bei der Aktivierung des "nuclear factor-kappa B" (NF-kB). XIAP und NAIP formen beispielsweise einen Komplex mit der TAK1-Kinase und ihrem Kofaktor TAB1, welche die c-Jun-NH2-terminale Kinase-1 aktivieren. Hierdurch wird schliesslich NF-kB via die mitogen-aktivierte Proteinkinase-Phosphorylierungskaskade aktiviert.⁸¹ Darüberhinaus induziert XIAP die Translokation der NF-kB p65 Untereinheit zum Zellkern, ein für die Aktivierung von NF-kB notwendiger Schritt.⁸² Schliesslich ist gezeigt worden, dass XIAP die Degradierung des NF-kB Inhibitors I-kB induziert, wodurch NF-kB aktiviert wird.⁷⁹ In der Zukunft wird es wichtig sein, für jede IAP-Funktion im Bereich der Signaltransduktion, Zellteilung und -zyklus die notwendige IAP-Domäne zu identifizieren. Dieses Wissen könnte die Entwicklung von Inhibitoren der anti-Caspase-Funktion der IAPs ermöglichen, die aber die Zellzykluswirkung unbeeinträchtigt lassen.

Vor kurzem wurde eine homologe Gruppe von Proteinen entdeckt, welche die "Inhibitoren der Apoptose" blockieren können. Deren Wirkungsweise soll hier kurz dargestellt werden, da sie als Prototypen therapeutischer IAP-Inhibitoren dienen können. Die IAP-Aktivität modulierende Proteine wurden erstmals in Drosophila identifiziert: Die humanen homologen Proteine zu Reaper, Hid, Grim⁸³ und Sickie⁸⁴ wurden kurze Zeit später identifiziert und Smac/Diablo⁸⁵ und Omi/Htra2 genannt.⁸⁶

Smac und Omi sind mitochondriale Proteine, die mit Cytochrom c nach Apoptosestimuli aus den Mitochondrien ins Zytoplasma translozieren, dabei werden sie nach proteolytischer Spaltung aktiviert (Fig. 1). Die aktiven Proteine binden IAPs, so dass diese nicht mehr an Caspasen binden können.^{85,86} Die IAP-blockierende Funktion der Smac-Proteine ist in ihrem N-terminalen Ende lokalisiert.

Peptide, die sieben N-terminal gelegene Aminosäuren von Smac enthalten, sind ausreichend, IAPs anti-Caspasefunktion zu blockieren.⁸⁷ Die Mutation des N-terminalen Alanins in Glyzin blockiert die Wirkung des Peptides komplett.⁸⁸ Wenn diese Peptide in vitro in Zellen eingebracht werden, können H460 Bronchialkarzinomzelllinien für verschiedene Chemotherapeutika wie Taxol und Cisplatin und Neuroblastomzellen für eine Behandlung mit "tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand" (TRAIL) sensitiviert werden.^{89,90} Ähnliche Ergebnisse wurden mit Omi und den IAP-Inhibitoren in Drosophila erzielt. Die anti-Tumor Eigenschaften der Smac-Peptide wurden auch in Xenograft-Modellen untersucht: So war für Zell-permeable Versionen dieser Peptide zusammen mit einer Chemotherapie mit Cisplatin oder TRAIL bei Lungenkarzinom- oder Gliom-Xenograften ein Rückgang der Tumormanifestationen zu beobachten.^{89,90} Folglich stellen diese Peptide Prototypen für kleine Moleküle dar, welche die Wirkung von Smac imitieren, IAPs blockieren und so potentiell eine therapeutische Option bei verschiedenen Malignomen, die IAPs überexprimieren, darstellen.³⁸ Vor diesem klinischen Hintergrund wurden bereits Strukturuntersuchungen durchgeführt, um die physischen Interaktionen zwischen IAPs und Smac-Proteinen besser zu verstehen. Diese Untersuchungen konnten zeigen, dass Smac XIAP an zwei distinkten Domänen bindet. Das N-terminale Ende von Smac (Aminosäuren 56-59) bindet im Bereich der BIR3-Domäne von XIAP und blockiert so kompetitiv die Bindung von BIR3 an Caspase-9. Mutationen in der BIR3-Domäne, welche die Bindung an Caspase-9 blockieren, inhibieren auch die Bindung an Smac. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Bindungsstelle von Smac und Caspase-9 nahe beieinanderliegt oder überlappt. Allerdings sind die Bindungsstellen nicht identisch, da einige wenige Mutationen zwar die Bindung von BIR3 an Caspase-9 aber nicht an Smac blockieren.^{88,91} Smac und sein N-terminales Peptid binden auch an die BIR2-Region von XIAP, aber mit einer um ca. 10-fach niedrigeren Affinität als für die BIR3-Region. Wie Smac die Bindung von Caspase-3 an BIR-2 blockiert ist zur Zeit nicht genau bekannt.⁸⁸ Omi bindet mit geringerer Affinität als Smac an die BIR3-Domäne.⁹² Das aktive Omi ist ein Trimer, Mutationen, die diese Trimerisierung blockieren, inhibieren ebenfalls Omis anti-IAP Funktion. Zusätzlich zur Bindung an die BIR3-Domäne kann Omi selber verschiedene IAPs wie XIAP, cIAP1 und cIAP2 aber nicht Survivin spalten und dadurch inaktivieren.⁹³ XAF1 ist ein anderer IAP-Inhibitor. XAF1 bindet XIAP im Zellkern, so dass es nicht mehr mit den zytosolischen Caspasen interagieren kann.⁹⁴