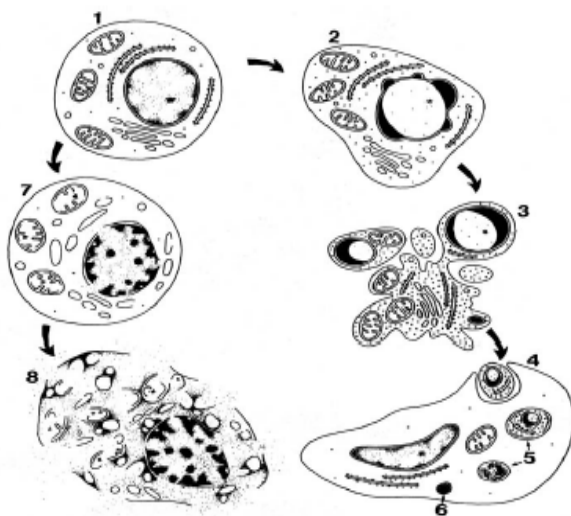


# 1. Einleitung

## 1.1 Apoptose: Programmierter Zelltod

Der Begriff der „Apoptose“ zur Beschreibung distinkter biochemischer und morphologischer Prozesse, die Zellen bei der selektiven Eliminierung aus dem Organismus durchlaufen, wurde 1972 durch John Kerr geprägt. Programmierter Zelltod spielt bei der Embryonalentwicklung, der Differenzierung, Entwicklung und der Homöostase in Geweben und nicht zuletzt auch bei der Pathogenabwehr im Immunsystem eine wichtige Rolle. Auch durch exogene Einflüsse, wie dem Entzug von Wachstumsfaktoren, dem Einfluß DNA-schädigender Agenzien oder auch durch irreparable Schädigungen der Zelle kann Apoptose hervorgerufen werden, die sich in die Abfolge charakteristischer Merkmale gliedern läßt:

Die Zelle beginnt zu schrumpfen, der Nukleus und das Zytoplasma kondensieren, das Chromatin sowie strukturelle Zellbestandteile wie das Zytoskelett und Lamine werden zerstört. Die Degradation des Chromatins geschieht durch aktivierte Endonukleasen, welche die chromosomale DNA in nukleosomale Fragmente von ca. 200 bp oder deren Vielfache spalten, was bei der Auftrennung im Gel zu der für apoptotische Zellen charakteristischen DNA-Leiter führt (Wyllie, 1980; Wyllie *et al.*, 1980). Morphologisch folgt die Abschnürung von Teilen der Plasmamembran („Membrane-Blebbing“), aus der die sogenannten apoptotischen Körperchen hervorgehen, die dann von benachbarten Zellen oder Makrophagen durch Phagozytose eliminiert werden.



**ABB. 1: Schematische Darstellung der zellulären Veränderungen beim Prozeß der Apoptose und Nekrose**

(1) normale Zelle; **Apoptose (2-6):** (2) Chromatin-kondensation und Aggregation an der nukleären Membran, (3) Fragmentierung des Nukleus, Ausbildung apoptotischer Körperchen, (4-5) Phagozytose und lysosomaler Verdau durch Nachbarzellen, (6) Degradation zu Resten und Verklumpung des Chromatins. **Nekrose (7-8):** Zerstörung der Membranintegrität, Ruptur und Desintegration von Zellbestandteilen (nach Kerr *et al.*, 1994).

Im Gegensatz zu diesem genetisch gesteuerten, aktiven Vorgang steht der nekrotische Zelltod. Die Zelle stirbt dabei unkontrolliert und setzt nach der Ruptur der Plasmamembran ihr Zytoplasma, degradierte Zellbestandteile sowie lysosomale Proteine in ihre Umgebung frei. Dies hat lokale Entzündungsreaktionen zur Folge (Kerr *et al.*, 1994; Wyllie, 1980).

Störungen im Ablauf der Apoptose durch Inaktivierung oder Mutation an der Regulation beteiligter Gene werden mit schweren Erkrankungen in Verbindung gebracht. So ist ein übermäßiger Verlust von T-Zellen in HIV-Patienten die Folge einer pathologisch gesteigerten T-Zellapoptose. Auch in neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer und Parkinson kommt ein Übermaß von Zellverlust zum Tragen. Krankheitsbilder, die mit einer Reduktion der Apoptoserate in Zusammenhang stehen, sind z.B. Autoimmunerkrankungen, bei denen die Negativ-Selektion autoreaktiver B- und T-Zellen gestört ist.

Auch in Tumoren ist eine Dysregulation von Proliferations- und Zelltodkontrolle zu beobachten. Während in normalem Gewebe ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und -tod vorherrscht, wird in Tumoren aufgrund der genetischen Instabilität der Zellen Apoptose gehemmt und Proliferation gefördert. Bereits in ihrer Proliferation gestörte Zellen können in nachfolgenden Schritten weitere genetische Schädigungen akkumulieren. Eine solche nachfolgende Transformation kann auch zur Ausbildung von Resistenzen maligner Tumore gegenüber bei der Krebstherapie eingesetzten Maßnahmen, z.B. Chemotherapie, führen.

## 1.2 Apoptosesignalwege

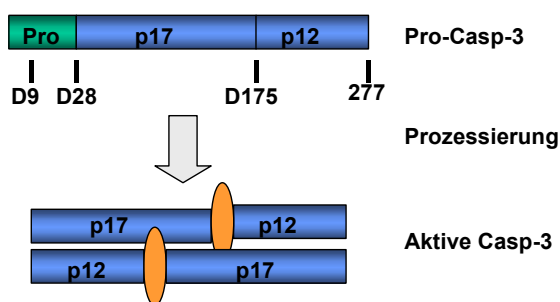
### 1.2.1 Caspasen als zentrale Exekutionsfaktoren: Nomenklatur und Aktivierung

Wichtige Erkenntnisse über die an der Apoptose beteiligten Gene und Signalkaskaden wurden aus biochemischen Studien an der Entwicklung des Nematoden *Caenorhabditis elegans* gewonnen, in deren Verlauf 131 von 1090 somatischen Zellen gezielt aus dem Organismus entfernt werden (Ellis *et al.*, 1991). Eine essentielle Rolle in diesem Prozeß kommt dem Zusammenspiel der Gene *CED-3*, *CED-4* und *CED-9* (*CED*: „cell death abnormal“) und *Egl-1* zu, die für Proteine kodieren, die an der Exekution oder Regulation von Apoptose wesentlich beteiligt sind. *CED-4* ist ein ATP-abhängiges Protein, das mit der zymogenen Form von *CED-3* das sog. „Apoptosom“ bildet, was in der Prozessierung und Aktivierung der einzigen klassischen Caspase *CED-3* in dem Nematoden resultiert (Lamkanfi *et al.*, 2002). Das *CED-9* Protein des Nematoden stellt einen Zelltodinhibitor dar, der ein typisches antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie in Säugern repräsentiert. Das Genprodukt von

*CED-4* liegt in der Signalkaskade zwischen *CED-3* und *CED-9* und wurde in Säugern als Apaf-1 identifiziert. In gesunden Zellen wird die Aktivierung von *CED-4* und *CED-3* durch das Bcl-2-Homologe *CED-9* verhindert (Chinnaiyan *et al.*, 1997; Spector *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1997). Die negative Regulation von *CED-4* durch *CED-9* kann durch das proapoptotische Egl-1, einem BH-3-Only Familienmitglied, aufgehoben werden.

Ausgehend von den Beobachtungen in *C. elegans* kam es zur Entdeckung von humanen Homologen, von denen als erstes das *CED-3* Homologe „interleukin-1b-converting enzyme“ (ICE) beschrieben wurde (Miura *et al.*, 1993; Thornberry, 1997). Es stellt die erste beschriebene humane Caspase dar, von deren Grundstruktur ausgehend bis dato eine Reihe weiterer Caspasen identifiziert wurden. Die Nomenklatur „Cysteinyl-Aspartasen“ geht auf die Tatsache zurück, daß sie ihre Substrate spezifisch nach Aspartatresten spalten. Ferner zeichnen sie sich durch die Konservierung des Pentapeptidmotivs „QACXG“ in ihrem aktiven Zentrum aus, wobei X für die Aminosäuren R, Q oder G stehen kann (Alnemri *et al.*, 1996).

Da sie die zentralen Faktoren in der Exekution des programmierten Zelltodes darstellen, liegen Caspasen in der Zelle als funktionell inaktive Zymogene vor, die erst durch sequentielle proteolytische Spaltung, sei es autokatalytisch oder durch andere Caspasen, ihre Aktivität entfalten (Cohen, 1997). Die Zymogene bestehen aus drei Untereinheiten: einer N-terminalen Prodomäne sowie einer großen (ca. 20 kDa / p20) und einer kleinen Untereinheit (ca. 10 kDa / p10), welche durch eine Linker-Region getrennt sind. Durch proteolytische Prozessierung werden beide Untereinheiten freigesetzt und es bilden sich aktive Heterotetramere, bestehend aus je zwei p20/p10 Heterodimeren mit einem katalytischen Zentrum. In Abb. 2 ist die proteolytische Aktivierung schematisch am Beispiel der Caspase-3 dargestellt.



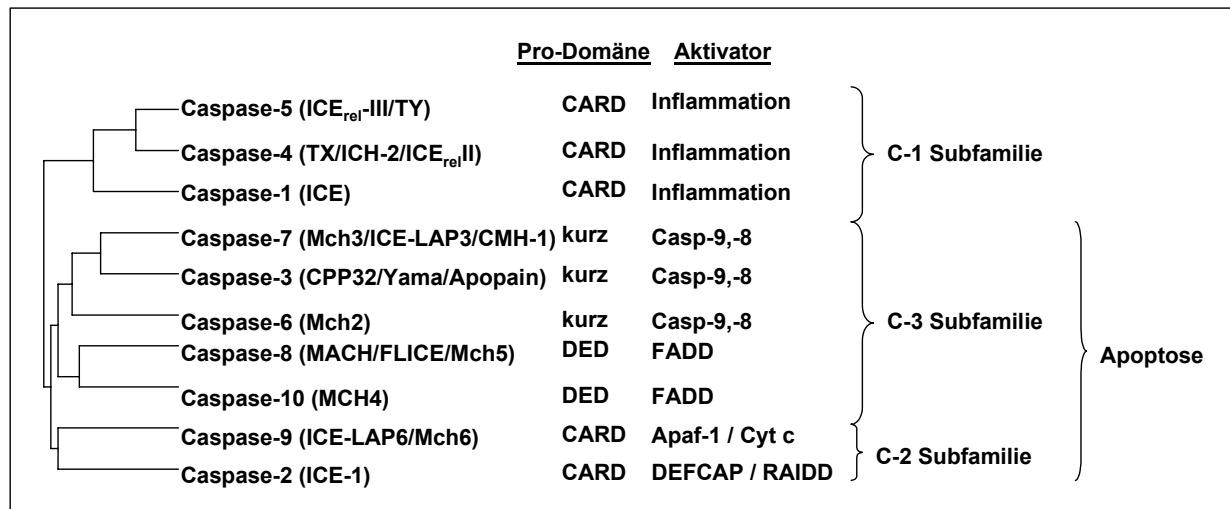
**ABB. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung von Caspase-3**

Das inaktive Zymogen besteht aus einer N-terminalen Prodomäne, sowie einer großen und kleinen Untereinheit. Nach Prozessierung bildet sich ein Heterotetramer aus je zwei großen und kleinen Untereinheiten. Aktive Zentren sind in gelb dargestellt; D: für Spaltung relevante Aspartatreste; Pro: Prodomäne; p17: große Untereinheit; p12: kleine Untereinheit

Grundsätzlich können Caspasen in zwei Klassen unterteilt werden - Initiator- und Effektorcaspasen, die sich im wesentlichen durch die Länge und Struktur ihrer Prodomäne unterscheiden. Initiatorcaspasen weisen eine lange Prodomäne auf, die Aminosäuresequenzen zur Selbstassoziation und für die Bindung an aktivierende Adaptermoleküle beinhaltet – die

DED („Death Effector Domain“) und die CARD („Caspase Recruitment Domain“)-Region. Die CARD-Domäne erlaubt elektrostatische Wechselwirkungen zwischen mehreren Pro-Caspasen und Adapterproteinen. Die DED-Domäne ermöglicht hierbei eine hydrophobe Bindung an aktivierende Adaptermoleküle (Cohen, 1997; Earnshaw *et al.*, 1999; Stennicke und Salvesen, 2000). Eine Aktivierung von Pro-Caspase-9 findet beispielsweise in einem Komplex mit Apaf-1 statt (s. 1.2.3). Für Pro-Caspase-2, die nach genotoxischem Streß aktiviert wird, wurde ein ähnlicher aktivierender Proteinkomplex („PIDDosom“) beschrieben, der die Adaptermoleküle PIDD („p53-induced protein with Death Domain“) und RAIDD („RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with Death Domain“) beinhaltet (Tinel und Tschopp, 2004). Effektorcaspasen hingegen tragen kurze Prodomänen und werden sequentiell von Initiatorcaspasen durch proteolytische Spaltung aktiviert. Die Beobachtung einer sequentiellen Spaltung von Caspasen führte zu dem Konzept einer kaskadenartigen Aktivierung (Stennicke und Salvesen, 2000). Diese beginnt mit der autokatalytischen Proteolyse von Initiatorcaspasen, die dann nachfolgende, sog. Effektorcaspasen prozessieren und somit ebenfalls aktivieren. Zu der Gruppe der Initiatorcaspasen mit langen Prodomänen gehören die Caspasen-2, -8, -9, -10 und -12). Sie werden entweder über den extrinsischen Todesrezeptorsignalweg über die Komplexbildung mit dem Rezeptor- und Adaptermolekülen aktiviert, oder wie im Falle der Caspase-9 im Anschluß an einen intrinsischen Stimulus des Mitochondriums. Aber auch in diesem Falle ist eine Rekrutierung an einen initiierenden Komplex (Apoptosom) notwendig. (s. 1.2.2 und 1.2.3). In die Gruppe der Effektorcaspasen mit kurzen Prodomänen sind die Caspasen-3, -6 und -7 einzuordnen. Ihre initiale proteolytische Aktivierung hängt von der Spaltung durch Initiatorcaspasen ab. In Abb. 3 ist eine Übersicht über die phylogenetische Gruppierung der bislang klassifizierten humanen Caspasen dargestellt. Die Einordnung von humaner Caspase-12 ist umstritten, da sie in den meisten Menschen aufgrund verschiedener Mutationen für einen prämaturnen Translationsstopp und somit für ein trunkiertes, infunktionelles Protein (Caspase-12s) kodiert (Fischer *et al.*, 2002). Schwarzafrikaner tragen diese Mutante weniger häufig und exprimieren auch Caspase-12L. Allerdings zeigt die humane Caspase-12 keinerlei enzymatische Aktivität, ist also für die Zelltodregulation bzw. -initiation nicht von Bedeutung (Lamkanfi *et al.*, 2004). Ebenso umstritten ist die Rolle von Caspase-13 (ERICE), die hohe Sequenzhomologien zu den Caspasen-4 und -5 aufweist (Humke *et al.*, 1998). Andere Arbeiten ordnen diese Caspase jedoch bovinem Ursprung zu (Koenig *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2000). Ein weiterer Vertreter der Caspasen mit kurzer Prodomäne stellt die Caspase-14 dar, deren Aktivität mit der Differenzierung von Keratinocyten und nicht direkt mit Apoptose in Verbindung gebracht

wird (Eckhart *et al.*, 2000a; Eckhart *et al.*, 2000b; Van de Craen *et al.*, 1998).



**ABB. 3: Dendrogramm humaner Caspasen**

Alternative Bezeichnungen sind in Klammern angegeben. Zu den in entzündliche Prozesse involvierten Caspasen gehören die Caspasen der C-1-Subfamilie. Die Mitglieder der C-2 und C-3 Subfamilie sind an der Exekution von Apoptose beteiligt.

Nach Adams (2003) und Cohen (1997).

Caspasen zielen bei der kontrollierten Zerstörung der Zelle von innen heraus auf die Spaltung verschiedenster Zielmoleküle ab, die grob unterteilt werden können in solche, die für das „housekeeping“ der Zelle nötig sind, bzw. für die Aktivierung proapoptotischer, oder die Inaktivierung antiapoptotischer Proteine (Fischer *et al.*, 2003). Um die strukturellen Veränderungen des Nukleus, des Zytoplasmas und der Plasmamembran zu bewerkstelligen werden u.a. nukleäre Lamine durch Caspase-6 gespalten (Lazebnik *et al.*, 1995; Orth *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1996). Auch der zytoskelettale Bestandteil Actin und eine Reihe weiterer Actin-regulatorischer Proteine werden prozessiert (Brockstedt *et al.*, 1998; Cryns *et al.*, 1996; Janicke *et al.*, 1998; Jänicke *et al.*, 1998; Mashima *et al.*, 1997; Nath *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998b). Ebenfalls zu den Caspase-Substraten gehören Proteine, die auf die DNA-Synthese und -Reparatur maßgeblichen Einfluß haben. Bei PARP („Poly(ADP-ribose) Polymerase“) beispielsweise handelt es sich um ein nukleäres Enzym, welches in der Folge von DNA-Strangbrüchen den Transfer von ADP-Ribose-Polymeren auf sich selbst oder andere im Nukleus lokalisierte Proteine katalysiert, die an der Reparatur und Stabilität der DNA beteiligt sind. Darüber hinaus wird die Nuklease DFF40/CAD, die die Zerlegung der genomischen DNA in internukleosome Fragmente katalysiert, aktiviert (Enari *et al.*, 1998; Halenbeck *et al.*, 1998). Dies geschieht durch die durch Caspase-3 katalysierte Spaltung ihres Inhibitors DFF45/ICAD, was zur Freisetzung der aktiven CAD und letztlich zur Entstehung der

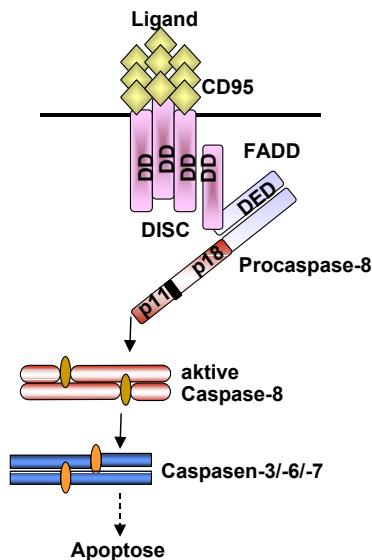
charakteristischen nukleosomalen DNA-Fragmente führt (Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1997; Sakahira *et al.*, 1998).

### 1.2.2 Rezeptorvermittelte Apoptose

Neben der Übertragung von Signalen, die der Aktivierung, Proliferation und der Differenzierung von Zellen dienen, können Oberflächenrezeptoren auch extrazelluläre zytotoxische Signale übertragen, so z.B. während der Entwicklung und der Eliminierung von Tumorzellen durch das Immunsystem (Ashkenazi und Dixit, 1998; Schulze-Osthoff, 1994).

Diese sogenannten Todesrezeptoren bilden eine Subfamilie der TNF-R-Superfamilie und zeichnen sich durch den Besitz einer cysteinreichen extrazellulären und einer konservierten zytoplasmatischen Region, der sog. „Death Domain“ (DD) aus (Ashkenazi und Dixit, 1998). Die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor führt zu dessen Trimerisierung und als eine Folge davon zur intrazellulären Aggregation von DD-Regionen, welche wiederum die Rekrutierung von nichtenzymatischen Adaptermolekülen durch ihre C-terminale DD-Sequenz, wie z.B. FADD („Fas-associated protein with death domain“) ermöglichen. Neben der Möglichkeit der Interaktion mit der DD-Domäne des Rezeptors können diese Adaptermoleküle über ihre N-terminale DED-Domäne simultan mit der DED-Domäne in der Prodomäne von Initiatorcaspasen interagieren. Dieser Proteinkomplex aus trimerisiertem Rezeptor, Adaptermolekül und Pro-Caspase wird auch als DISC („Death inducing signaling complex“) bezeichnet. Vor allem die Rekrutierung der Pro-Caspase-8 spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Als Konsequenz aus der DISC-Bildung werden die Caspase-8 Zymogene in räumliche Nähe zueinander gebracht, die in ihrer Dimerisierung und der Bildung von katalytisch aktiven Heterotetrameren resultiert. Eine autokatalytische Spaltung muß nicht zwangsläufig zu einer Aktivierung von Pro-Caspase-8 führen (Boatright *et al.*, 2003). Nach dem Modell der induzierten Nähe soll neben der proteolytischen Spaltung auch die durch die Rekrutierung im DISC erfolgende Stabilisierung durch räumliche Nähe der Zymogene als Voraussetzung für deren Aktivierung gelten. Neben Caspase-8 spielt auch die homologe Caspase-10 eine initiierende Rolle bei der rezeptorvermittelten Apoptose (Boatright und Salvesen, 2003; Donepudi *et al.*, 2003). Zusätzlich zu den Initiatorcaspasen-8 und -10 können auch andere Moleküle in die Steuerung dieses Signalkomplexes eingreifen. Ein Beispiel dafür ist das Caspase-8 Homolog FLIP („FLICE-like inhibitory protein“), welches selbst keine proteolytische Aktivität besitzt und in verschiedenen Isoformen (FLIP-L und FLIP-S) exprimiert wird (Thome und Tschopp, 2001). Ihr Einfluß auf die Regulation der rezeptorvermittelten Aktivierung von Caspase-8 kann sowohl inhibitorisch als auch

aktivierend sein. So verhindern hohe Konzentrationen von FLIP-L die Aktivierung von Caspase-8 im DISC, indem sie vermutlich um Bindungsstellen kompetitieren. In niedrigen, physiologisch relevanten Konzentrationen hingegen kann FLIP-L vermutlich durch Heterodimerisierung mit Pro-Caspase-8 aktivierend wirken (Chang *et al.*, 2002; Micheau *et al.*, 2002).



**ABB. 4: Rezeptorvermittelte Apoptose am Beispiel von CD95**

Nach Bindung des Liganden erfolgt die Trimerisierung des Rezeptors. An dessen DD-Domäne werden Adaptermoleküle wie FADD rekrutiert. Die Integration von Pro-Caspase-8 in den DISC über ihre DED-Domäne führt durch induzierte Nähe zu ihrer katalytischen Aktivierung und die nachfolgende Spaltung von Effektorcaspasen.

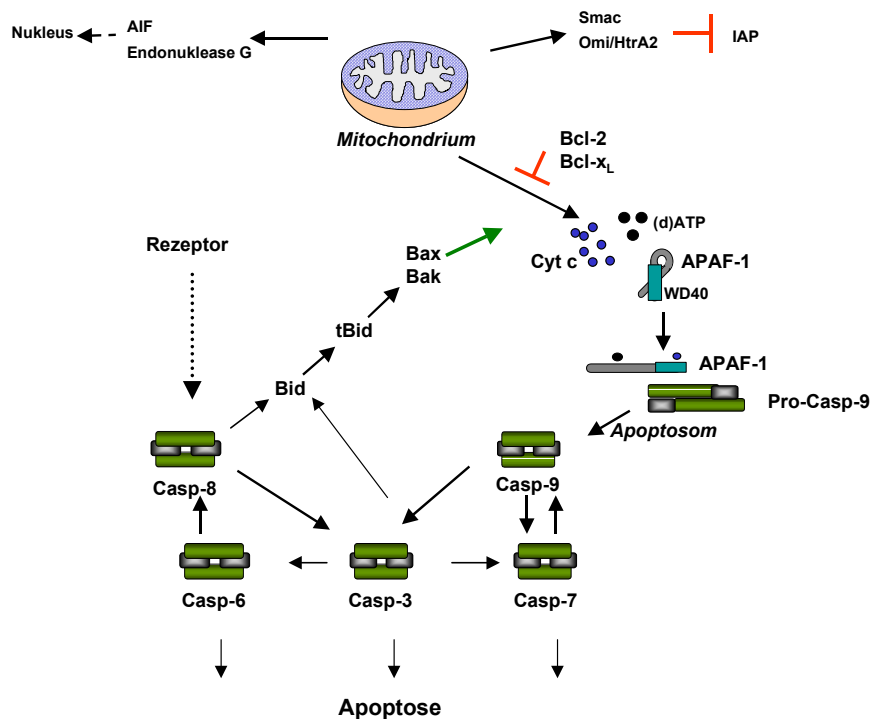
DD: Death Domain; DED: Death Effector Domain; DISC: Death Inducing Signaling Complex; FADD: Fas-associated protein with death domain.

### 1.2.3 Mitochondrial vermittelte Apoptose

Die Mitochondrien stellen die zentrale Verknüpfungsstelle vieler verschiedener Zelltodsignale dar. Sie integrieren beispielsweise die Schädigungen der Zelle, die durch Zytostatika, Hitzeschock, Bestrahlung oder dem Entzug von Wachstumsfaktoren hervorgerufen werden. Andererseits können auch von ihnen direkt Zelltodsignale ausgehen – so beeinflussen sie den zytoplasmatischen pH-Wert und tragen zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei, einem Anzeichen in frühen Stadien der Apoptose (van der Heiden *et al.*, 1997).

Liu *et al.* zeigten 1996, daß in zellfreien Systemen zur Aktivierung von Pro-Caspase-3 (d)ATP und Cytochrom c notwendig sind. Cytochrom c wird aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt und bildet gemeinsam mit (d)ATP und Apaf-1-Multimeren („Apoptosis protease-activating factor-1“) einen hochmolekularen apoptosomalen Komplex von ca. 1,4 MDa. Die Bindung von Cytochrom c an seine C-terminalen WD40-Domänen induziert die Konformationsänderung des inaktiven Apaf-1 Monomers zu einer Öffnung seiner Struktur und ermöglicht so die Exposition seiner CARD-Domäne, welche sonst durch zwei WD40-Domänen gebunden ist. Die anschließende Bindung von (d)ATP ermöglicht eine Rekrutierung von Pro-Caspase-9, der Initiatorcaspase des intrinsischen Signalweges, über

seine N-terminale CARD-Domäne. Durch Dimerisierung erfolgt die allosterische, ca. 1000-fache über die Grundaktivität des Zymogens hinaus gehende Aktivierung (Acehan *et al.*, 2002; Rodriguez und Lazebnik, 1999). Ausgehend davon kommt es zur proteolytischen Spaltung und Aktivierung der als latente Dimere vorliegende Effektorcaspasen-3, -6 und -7 (Boatright und Salvesen, 2003; Kang *et al.*, 2002) welche dann durch die Spaltung von Todessubstraten zur Exekution der Apoptose führen.



**ABB. 5: Übersicht über die mitochondriale Induktion der Caspasesignalkaskade und Verknüpfung mit dem Todesrezeptorsignalweg**

Der Abfall des mitochondrialen Membranpotentials durch apoptotische Stimuli führt zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Faktoren in das Zytosol. Cytochrom c bildet mit (d)ATP, Apaf-1 und Pro-Casp-9 das Apoptosom, was zur Aktivierung der Initiator-Casp-9 führt. Ausgehend davon werden die Effektor-Casp-3, -6, -7 aktiviert, Todessubstrate gespalten und Zelltod exekutiert. Die Aktivierung des Mitochondriums selbst kann durch Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> inhibiert, bzw. durch Bax und Bak initiiert werden (s. 1.3). Eine Verknüpfung mit dem Todesrezeptorsignalweg und eine Amplifikation der mitochondrialen Signalkaskade ist über die Casp-8-vermittelte Spaltung von Bid und die Casp-6 vermittelte Spaltung von Casp-8 möglich. Ferner ist eine Casp-3 induzierte Proteolyse von Bid möglich.

Eine Verbindung des Todesrezeptor- und des mitochondrialen Signalweges kann durch die durch Spaltung von Bid vermittelt werden. Bid kann durch die Initiatorcaspase-8 im Todesrezeptorsignalweg, oder aber auch durch Caspase-6 und -3 zu seiner trunktierten Form tBid prozessiert werden. Durch Bindung von tBid an Bax oder Bak wird in diesen Proteinen eine Konformationsänderung ausgelöst, die beispielsweise durch Insertion in die äußere Mitochondrienmembran eine Aktivierung des Organells zur Folge hat. Somit wird eine



Amplifikation des mitochondrialen Signalweges durch die Freisetzung von Cytochrom c und proapoptotischer Faktoren (AIF, Omi/HtrA2, Smac) erreicht. Die Wirkungsweise der Caspase-Aktivierung durch Smac wird unter 1.4.1 beschrieben.

#### 1.2.4 Apoptoseinduktion durch das Endoplasmatische Retikulum (ER)

Die Rolle des ER bei der Vermittlung von Apoptose gerät immer weiter in den Vordergrund. Als Ort der Proteinsynthese können Stresssignale, wie z.B. die Akkumulation mißgefalteter Proteine im Lumen des ER zur Aktivierung der „unfolded protein response“ (UPR) führen, welche über Chaperone und die Aktivierung der in der zytoplasmatischen Seite der ER-Membran lokalisierten Caspase-12 zum Zelltod führt. In Caspase-12 „knock out“ Mäusen wurde gezeigt, daß ihre Aktivierung unabhängig von rezeptor- oder mitochondrial-vermittelter Apoptose ist. Ihre Rolle im Menschen ist jedoch aufgrund der Expression eines trunkierten Proteins bei den meisten Menschen, ausgenommen Schwarzafrikaner, nicht bekannt (Nakagawa und Yuan, 2000). Immer größere Bedeutung wird jedoch der Regulation der intrazellulären Calcium-Homöostase, der Interaktion des ER mit den Mitochondrien und der nachfolgenden Aktivierung der Caspasesignalkaskade beigemessen. Unter physiologischen Bedingungen ist der Hauptanteil der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im ER gespeichert. Die Aufnahme erfolgt energieabhängig über die Sarco(Endo)Plasmatische Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), während die Freisetzung via Inositol 1,4,5-Triphosphat ( $\text{IP}_3$ )-regulierte Rezeptoren oder den Ryanodin (RyR)  $\text{Ca}^{2+}$ -Rezeptor erfolgt (Berridge *et al.*, 2000). Der Großteil des freigesetzten Calciums wird über  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter von den in der Nähe der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen lokalisierten Mitochondrien aufgenommen. Die Abgabe erfolgt über  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Diese räumliche Nähe ermöglicht eine Modulation, Propagation und Synchronisation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale vom ER, wie z.B. eine Anpassung an einen gesteigerten Energiebedarf der Zelle durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Stimulation der NAD(P)H und nachfolgenden ATP-Produktion (McCormack *et al.*, 1990).

Die Induktion mitochondrialer Apoptose durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wird durch eine Regulation der Öffnung der „Permeability Transition Pore“ (PTP), die beide Mitochondrienmembranen durchspannt, reguliert. Das Übersteigen eines bestimmten  $\text{Ca}^{2+}$ -Potentials in der mitochondrialen Matrix löst eine Öffnung der Pore aus, was zum Verlust des Membranpotentials und der nachfolgenden Freisetzung von proapoptotischen Faktoren und Cytochrom c führt. Boehning *et al.* (2003) zeigten ferner, daß nach  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Cytochrom c-Freisetzung dieses zum ER translozieren und dort mit  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren interagieren und somit eine positive Rückkopplung induzieren kann.

Neben der Diskussion um die Aktivierung muriner Caspase-12 nach ER-Streß, wird auch eine direkte Beteiligung von Caspase-3 an der Calcium-Homöostase beschrieben. Hirota *et al.* zeigten 1999, daß Caspase-3 in Jurkat-Zellen Typ1 IP<sub>3</sub>-Rezeptoren spaltet und damit unter apoptotischen Bedingungen dessen Aktivität herabsetzt. Darüber hinaus wird auch eine Spaltung der Plasmamembran Ca<sup>2+</sup>-ATPase beschrieben, die für die langfristige Calcium-Homöostase der Zelle wichtig ist. Ein Funktionsausfall während der Apoptose führt primär zu einer Ca<sup>2+</sup>-Überladung und sekundär zu apoptotischem oder nekrotischem Zelltod (Paszty *et al.*, 2002; Schwab *et al.*, 2002).

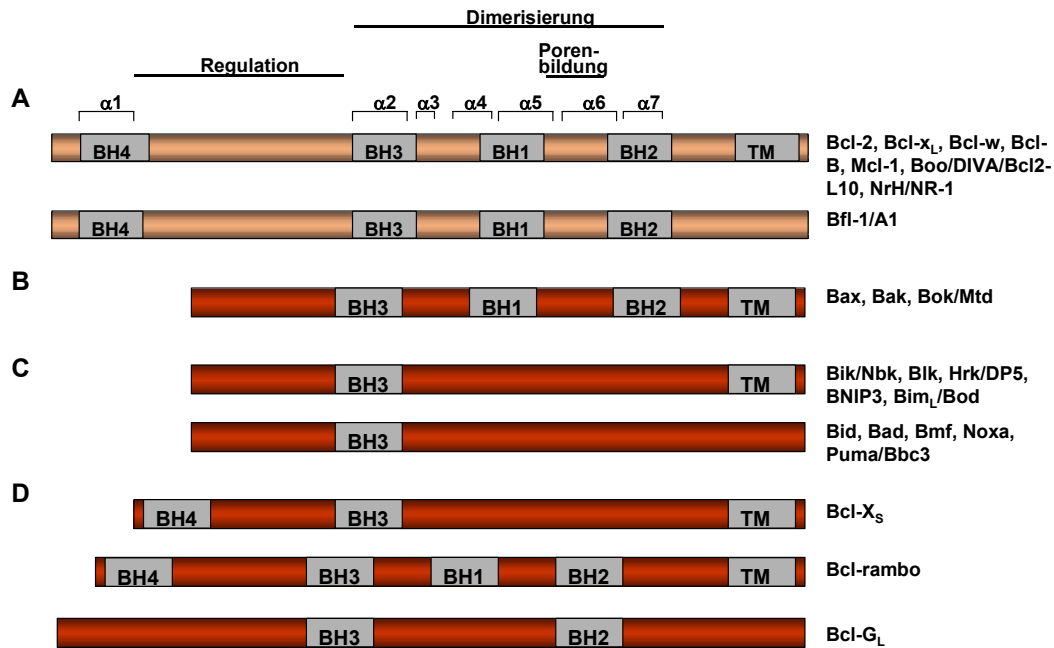
Neben den Caspasen gehören auch die zytosolischen Calpaine zur Gruppe der Cystein-Proteasen, die unter anderem auch bei apoptotischen Prozessen eine Rolle spielen. Calpaine sind Ca<sup>2+</sup>-abhängige Proteasen, die durch ihren endogenen Inhibitor Calpastatin reguliert werden. Calpastatin ist z.B. ein Zielprotein von Caspase-3 (Pörn-Ares *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998a). Von seinem Inhibitor freigesetztes Calpain kann ebenso wie Caspasen zur Aktivierung von Bax und Bid beitragen (Toyota *et al.*, 2003; Mandic *et al.*, 2002).

### 1.3 Organellenspezifische Apoptoseregulation

#### 1.3.1 Die Bcl-2 Proteinfamilie

Die Mitglieder der Bcl-2 Familie sind eine evolutionär hochkonservierte Gruppe von Proteinen. Auch Viren, wie z.B. Adenoviren, das Epstein-Barr-Virus, Herpes simplex und Hepatitis C kodieren für „Bcl-2 ähnliche“ Überlebensfaktoren. Sie nutzen ihre eigenen Genprodukte zur Erhaltung der Wirtszelle, auf die sie während ihrer Replikation angewiesen sind, und benötigen daher keine proapoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder zur Verlängerung des lytischen Zyklus (Adams und Cory, 2001). Das namensgebende Protein Bcl-2 („B-cell lymphoma gene 2“) wurde bereits 1984 beschrieben (Tsujimoto *et al.*, 1984). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie umfassen sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Mitglieder und besitzen mindestens eine der vier definierten  $\alpha$ -helikalen Bcl-2 Homologie-Domänen BH1, BH2, BH3 oder BH4 (Adams und Cory, 1998). Eine Übersicht über die Klassifikation und Struktur der humanen Bcl-2-Familienmitglieder ist in Abb. 6 dargestellt.

Das Vorhandensein der BH-Domänen 1-4 in der Bcl-2-Subfamilie, ist für die anti-apoptotischen Funktionen essentiell. Sie besitzen keine enzymatische Aktivität, vermitteln jedoch die hydrophobe und elektrostatische Interaktion der Mitglieder mit anderen BH3-enthaltenden proapoptotischen Vertretern der Bax- und der BH3-Only-Proteinfamilien.



**ABB. 6: Schematische Übersicht über die strukturelle und funktionelle Klassifizierung der Bcl-2-Familienmitglieder in Säugern**

In braun sind die antiapoptotischen, in rot die proapoptotischen Proteine dargestellt. **A:** Bcl-2-Subfamilie, **B:** Bax-Subfamilie, **C:** BH3-only-Subfamilie, **D:** multidomänen Proteine  
 BH-Domänen: Bcl-2 Homologie-Domänen; TM = Transmembrandomäne  
 (Borner, 2003; Daniel et al., 2003).

In Mutationsstudien konnte gezeigt werden, daß die BH1-, BH2- und BH3-Domänen, im Gegensatz zur BH4-Domäne, die Fähigkeit der Proteine, Homo- und Heterodimere zu bilden, ausmachen. Dies geschieht über eine von den BH1-3 Domänen gebildete hydrophobe Tasche, die unter nicht-apoptotischen Umständen von der eigenen N-terminalen BH4-Domäne stabilisiert wird. (Borner, 2003; Borner et al., 1994a; Borner et al., 1994b; Hanada et al., 1995; Yin et al., 1994).

### 1.3.2 Regulation mitochondrialer Apoptose

Einige Vertreter der Bcl-2-Subfamilie weisen Transmembrandomänen auf, die ihnen die Insertion in die äußere Mitochondrienmembran, die Kernmembran oder in die des Endoplasmatischen Retikulums ermöglichen. Hierdurch verhindern sie am Mitochondrium die Freisetzung von Cytochrom c oder anderen proapoptotischen Faktoren.

Aufgrund der wechselseitigen Beziehungen zwischen pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern ist auch das stöchiometrische Verhältnis und die Bindungsaffinitäten untereinander ein wesentlicher Faktor, der bei der Induktion von Apoptose eine Rolle spielt.

### 1.3.2.1 Beeinflussung des Membranpotentials durch BH3-Only-Proteine

Bei ihrer Aktivierung durch innere und äußere Streßsignale durchlaufen BH3-Only Proteine post-translationale Modifikationen wie z.B. Dephosphorylierung und Phosphorylierung, oder aber ihre proteolytische Spaltung (Gross *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998).

Die proapoptotische Aktivität der BH3-Only Proteine wird sowohl transkriptioneller Ebene oder durch post-translationale Modifikationen reguliert. Noxa, Puma, Bax und Bak sind beispielsweise Zielgene von p53, die nach DNA-Schädigung z.B. durch Zytostatika oder Bestrahlung hochreguliert werden, während antiapoptotische Moleküle wie z.B. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> transkriptionell reprimiert werden (Bartke *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 2002; Nakano und Vousden, 2001; Oda *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001).

Neuere Arbeiten haben gezeigt, daß p53 neben seiner Rolle als Transkriptionsfaktor auch eine direkte apoptotische Rolle am Mitochondrium ausüben kann. Dies äußert sich in einer BH3-Only-ähnlichen Aktivität, nämlich der direkten Interaktion mit den zytoprotektiven Proteinen Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> und der nachfolgenden Freisetzung von Cytochrom c. Darüber hinaus wurde eine direkte Aktivierung von Bax und eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und Induktion von Apoptose durch p53 beschrieben, wenngleich keine direkte physikalische Interaktion beider Moleküle beobachtet werden konnte (Chipuk *et al.*, 2004; Mihara *et al.*, 2003). Bad wird durch Dephosphorylierung nach Entzug von Wachstumsfaktoren aktiviert und von seinem Bindungspartnern, Mitgliedern der 14-3-3-Proteinfamilie, freigesetzt. Es kann mit überlebensfördernden Bcl-2-Proteinen interagieren und somit seine proapoptotische Wirkung entfalten (Zha *et al.*, 1996). Bim und Bmf sind hingegen in normalen Zellen an Elemente des Zytoskeletts gebunden. Nach ihrer Aktivierung translozieren sie zu den Mitochondrien und können dort die Aktivität anderer Bcl-2-Proteine kontrollieren und die Aktivierung der Mitochondrien steuern. (Puthalakath *et al.*, 1999; Puthalakath *et al.*, 2001). Bid ist eines der Moleküle, die nur eine BH3-Domäne tragen. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Verbindung zwischen dem rezeptorvermittelten und dem mitochondrial aktivierten Zelltodprogramm. Aufgrund des Fehlens einer Transmembrandomäne liegt es als p22-Bid zytosolisch vor. Es überträgt proteolytische Signale auf die Aktivierung der Mitochondrien und kann sowohl von aktiver Caspase-8, als auch von anderen aktivierten Effektorcaspasen, hauptsächlich Caspase-3, gespalten werden. Das so entstehende p15-tBid transloziert zu den Mitochondrien und kann dort über Interaktion mit Bax oder Bak die Freisetzung von Cytochrom c induzieren. Neben der Amplifikation des mitochondrialen Signalweges können so auch Todessignale aus anderen Organellen über Bid als Sensormolekül integriert werden.

Es läßt sich ein genereller Wirkmechanismus der proapoptotischen Vertreter der BH3-Only Proteinfamilie über eines der beiden Moleküle Bax und Bak beschreiben, während es für die Mechanismen von Bax und Bak selbst derzeit unterschiedliche Modellvorstellungen gibt.

Bax und Bak regulieren im wesentlichen die intrinsischen Signalwege und sind sowohl am Mitochondrium als auch am ER aktiv (Scorrano *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2001). Inaktives Bax liegt als Monomer zytosolisch oder in lockerer Assoziation mit Membranen vor und seine BH3-lokalisierte „Bindungstasche“ ist mit seiner eigenen C-terminalen Helix besetzt. Nach apoptotischen Signalen kann Bax nach einer Konformationsänderung in seinem N- und C-Terminus in Form von Homo-Oligomeren in die äußere Mitochondrienmembran inserieren (Eskes *et al.*, 2000). Inaktives Bak hingegen ist bereits vornehmlich an den Mitochondrien lokalisiert, durchläuft bei Aktivierung eine allosterische Konformationsänderung am N-Terminus und kann die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran beeinflussen. Ein Modell für die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran stellt die Formation von Poren durch Bax-, bzw. Bak-Oligomere dar. Dies gründet sich auf die strukturelle Ähnlichkeit mit den Mitgliedern der Bcl-2-Familie. Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>, deren  $\alpha$ -Helices in der BH-1-Region strukturelle Ähnlichkeiten mit Poren-formenden bakteriellen Toxinen aufweisen (Muchmore *et al.*, 1996). Die Bedeutung der BH3-Domäne für seine proapoptotische Wirkung zeigt sich auch darin, daß der Transfer dieser Region auf das antiapoptotische Bcl-2 dieses trotz Anwesenheit seiner BH4-Domäne in ein proapoptotisches Molekül konvertieren konnte (Hunter und Parslow, 1996).

Trotz ähnlicher Wirkungsweisen kristallisiert sich für Bax und Bak keine redundante Rollenverteilung heraus. So lokalisiert beispielweise das BH3-Only-Protein Bik/Nbk („Bcl-2 interacting killer“ / „Natural born killer“) am ER und nicht am Mitochondrium, so daß eine Aktivierung der Mitochondrien über einen Bax-abhängigen, aber Bak-unabhängigen Mechanismus indirekt erfolgen kann (Boyd *et al.*, 1995; Gillissen *et al.*, 2003; Han *et al.*, 1996). In der immun-induzierten Apoptose via Caspase-8 oder Granzyme B werden unterschiedliche Spaltprodukte von Bid generiert. Caspase-8 erzeugt ein p15-tBid-Spaltprodukt, während Granzyme B ein p13-tBid-Fragment generiert. Beide Spaltprodukte interagieren im zellfreien System mit Mitochondrien, zeigen jedoch nach Mikroinjektion in humane Glioblastomzellen Unterschiede in ihrer Interaktion mit Bax und Bak (Cartron *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2000). Während Bax/Bak profiziente Zellen für beide trunkierten Bid-Formen sensitiv waren, zeigten Bax negative Zellen eine Resistenz gegenüber p13-tBid, aber nicht gegenüber p15-tBid induzierter Apoptose. Bak negative Zellen hingegen verhielten sich gegensätzlich (Cartron *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen geben Anlaß zu der Annahme, daß

auch nach anderen Apoptosestimuli Bax und Bak in unterschiedlicher Präferenz ihre Wirkung entfalten können.

### 1.3.2.2 Modelle zur Änderung des mitochondrialen Membranpotentials

Neben der Möglichkeit der Ausbildung neuer Kanäle durch Bax oder Bak selbst, können diese Moleküle auch mit bereits existierenden mitochondrialen Kanälen interagieren oder diese modulieren. Ein Beispiel dafür wäre die „Permeability Transition Pore“ (PTP), die beide mitochondrialen Membranen umspannt und für den Transport von Adenin-Nukleotiden oder anderen kleinen Molekülen verantwortlich ist. Hauptkomponenten dieses Kanals sind der „Voltage Dependent Anion Channel“ (VDAC, von dem in Säugern drei Isoformen beschrieben sind) in der äußeren und der Adenin-Nukleotid-Transporter (ANT) in der inneren mitochondrialen Membran, sowie Cyclophilin D in der Matrix. In Rekonstitutionsversuchen konnte gezeigt werden, daß VDAC, dessen Aktivität durch Bax, Bak und Bcl-2 reguliert wird, den zentralen Kern der PTP darstellt (Marzo *et al.*, 1998; Narita *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1999). Der geöffnete Kanal erlaubt den Durchtritt von Molekülen bis zu einer Größe von 1500 Da, wobei der Protonengradient durchbrochen und die Atmungskette entkoppelt wird. Bax und Bak können in isolierten Mitochondrien und in VDAC-haltigen Liposomen Cytochrom c-Freisetzung induzieren, die durch Bcl-x<sub>L</sub> inhibierbar ist (Jürgensmeier *et al.*, 1998; van der Heiden *et al.*, 1997). Die Hyperosmolalität der Mitochondrienmatrix führt zu einem Einstrom von Flüssigkeit und damit zu einer Volumenexpansion der inneren Mitochondrienmembran, und infolge dessen zu einer Ruptur der äußeren Membran (Narita *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1999). In lebenden Zellen läßt sich eine Interaktion von Bak mit dem an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten VDAC2 nachweisen, die eine Aktivierung von Bak verhindert. Antiapoptotische Bcl-2 Familienmitglieder können Bak aus seiner Bindung mit VDAC2 verdrängen und somit die Homo-Oligomerisierung von Bak und die nachfolgende Aktivierung der Mitochondrien initiieren (Cheng *et al.*, 2003).

Neben der Porenbildung durch Proteine der Bax-Subfamilie und ihrer Wirkung über BH3-Only-Familienmitglieder, werden weitere Modellvorstellungen zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und zum Abfall des Membranpotentials diskutiert (Ly *et al.*, 2003). Durch die transiente Öffnung der PTP wird eine mitochondriale Depolarisation durch die Entkopplung des Protonengradienten induziert, ohne das es zu einem Anschwellen der Matrix kommt. Eine weitere Vorstellung geht von einer direkten Interaktion des Apoptose-induzierenden Agens mit der PTP aus, was zu einer Depolarisation des Mitochondriums, einem Anschwellen der Matrix durch Einstrom von Wasser und Ruptur der äußeren

Mitochondrienmembran und damit zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium führt. Ferner wird auch angenommen, daß ein Schließen des VDAC zu einem Verlust des ATP/ADP-Austausches mit dem Zytosol führt, wodurch die  $F_0F_1$ -ATP-Synthase-Aktivität reduziert wird. Es kommt in Folge dessen zur Hyperpolarisation des Mitochondriums, einem Anschwellen der Matrix durch Einstrom von Wasser, zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran und damit zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium.

### 1.3.3 Regulation am Endoplasmatischen Retikulum (ER)

Bcl-2 kann wie bereits beschrieben nicht nur an der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert sein, sondern findet sich auch in perinukleären Membranen oder denen des ER. Eine ektopische Bcl-2-Überexpression trägt zu einer partiellen Resistenz gegenüber Stimuli bei, die den zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Spiegel erhöhen wie, z.B. Ceramid, Staurosporin, der Entzug von Wachstumsfaktoren oder Thapsigargin, einem selektiven Inhibitor der SERCA (Distelhorst und McCormick, 1996). Weitere Aufschlüsse über das Verhalten von Bcl-2 am ER konnten durch die Generierung von zielgerichteten Bcl-2-Mutanten gewonnen werden. Um eine Lokalisationsspezifität zu gewährleisten, wurde deren Transmembrandomäne durch die von Cytochrom b5 ersetzt, so daß ein Fusionsprotein Bcl-cb5 entstand (Zhu *et al.*, 1996). Bei Cytochrom b5 handelt es sich um den Bestandteil eines Enzymkomplexes im glatten ER, der bei der Einführung von Doppelbindungen in Fettsäuren eine Rolle spielt. Die Bcl-cb5-Überexpression resultierte in einem Schutz vor dem Zelltod durch einige Apoptose-Induktoren, so z.B. gegenüber Ceramid, ionisierender Strahlung, Thapsigargin und der Überexpression von Bax und Bad (Annis *et al.*, 2001; Rudner *et al.*, 2001; Thomenius *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2001).

Auch an das ER-gebundene Proteine interagieren mit Bcl-2 Proteinen und nehmen so Einfluß auf apoptotische Vorgänge. Bap31 („Bcl-2-associated protein-31“) beispielsweise ist ein 28 kDa großes integrales Membranprotein, das eine zytosolische Domäne besitzt, die mit Pro-Caspase-8, Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 interagieren kann. Ein neuartiges BH3-Only-Protein, Spike, hemmt am ER die Komplexbildung aus Bap31 und Bcl-x<sub>L</sub> (Mund 2003). Die Spaltung von Bap31 durch Caspase-8 generiert ein in der Membran verbleibendes p20-Fragment, was zu  $Ca^{2+}$ -Freisetzung und nachfolgender Caspasen-unabhängiger Mitochondrienaktivierung führt (Breckenridge *et al.*, 2003). Auch für das BH3-Only-Protein Bad wird eine Aktivierung über das ER beschrieben. Es kann durch Calcineurin, einer  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Protein-

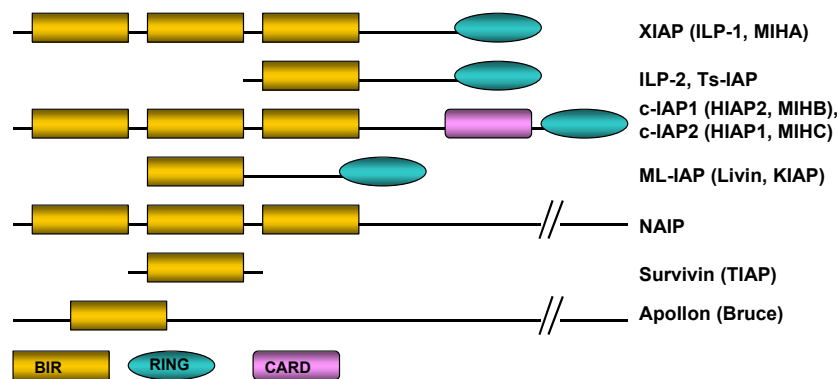
Phosphatase, dephosphoryliert werden und an den Mitochondrien die Freisetzung proapoptotischer Faktoren induzieren (Wang *et al.*, 1999).

Rudner *et al.* (2002) postulieren eine weitere Hypothese der Bcl-2 Wirkung am ER. Um hohe toxische zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zu vermeiden, könnte es den verfügbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts im ER reduzieren, oder seine Wiederaufnahme ins ER oder Mitochondrien beschleunigen, so daß nach Streßsignalen die zu Verfügung stehende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nicht einen intrazellulären Schwellenwert übersteigt. Eine aus zu hohem zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel resultierende Überladung der Mitochondrien führt, z.B. über die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Öffnung des „Voltage Dependent Anion Channel“ zum Zelltod. Auch die proapoptotischen Vertreter der Bcl-2-Familie modulieren die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase. So weisen beispielsweise Bax/Bak-defiziente murine embryonale Fibroblasten eine reduzierte ER  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und Fähigkeit der Aufnahme durch Mitochondrien auf. Sie sind ferner resistent gegenüber Thapsigargin- oder Ceramid-induzierter Apoptose (Scorrano *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2001).

#### **1.4 Regulation von Caspase-Aktivität und proapoptotischen Faktoren – „Inhibitors of Apoptosis Proteins“ (IAP`s)**

Der Prototyp der IAP-Familie, IAP selbst, wurde durch genetische Screenings nach Regulatoren für das Überleben der Wirtszelle nach Infektion mit Baculoviren entdeckt (Crook *et al.*, 1993). Inzwischen wurden acht humane, aber auch weitere Orthologe in Hefen, Nematoden und *Drosophila* identifiziert (Birnbaum *et al.*, 1994; Duckett *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 1999; Hay *et al.*, 1995; Roy *et al.*, 1995; Uren *et al.*, 1999). Die zwei in Baculoviren gefundenen Sequenz-Motive umfassen die „Baculovirus IAP Repeat“ (BIR), eine ~70AS Zink-bindende Domäne, durch die die Zugehörigkeit zur IAP-Proteinfamilie manifestiert wird, und die RING- („Really Interesting New Gene“) Domäne (Freemont *et al.*, 1991; Hinds *et al.*, 1999; Miller, 1999). Die bis zu in drei Tandem-Repeats vorkommenden BIR-Domänen sind essentiell für die antiapoptotischen Eigenschaften der IAP`s, während die C-terminal lokalisierte RING-Domäne die Degradation von sich selbst oder anderen Zielproteinen durch Ubiquitinierung katalysiert. Sie scheint aber keinen Einfluß auf die antiapoptotische Funktion der Familienmitglieder c-IAP1, c-IAP2 und XIAP zu haben und ist wie in der Übersichtsdarstellung in Abb.7 dargestellt nicht in allen IAP-Familienmitgliedern vertreten (Deveraux *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1998).





**ABB. 7: Übersicht über die humanen IAP-Familienmitglieder**

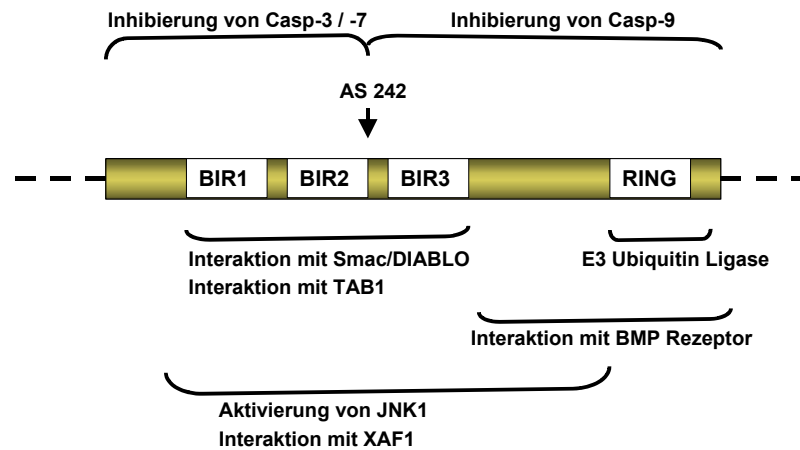
Alternative Bezeichnungen sind in Klammern angegeben..

BIR: Baculovirus IAP Repeat; CARD: Caspase Recruitment Domain; ILP: IAP-like protein; MIHA: mammalian IAP homologue A; NAIP: neuronal apoptosis inhibitory protein (nach Salvesen und Duckett, 2002).

Die Regulation von Caspasen beginnt wie bereits beschrieben schon auf der Ebene der Aktivierung der Zymogene, aber auch aktive Caspasen können direkt über Bindung von IAP's inhibiert werden.

Das am besten charakterisierte IAP-Molekül ist das ubiquitär in adultem und fetalem Gewebe exprimierte 57 kDa Protein XIAP (Abb. 8). Seine BIR3-Domäne bindet direkt C-terminal an die Linker-Sequenz der kleinen Untereinheit der Caspase-9, so daß deren vorangegangene proteolytische Spaltung für ihre Inaktivierung durch XIAP nötig ist (Liston *et al.*, 2001; Srinivasula *et al.*, 2001). Der Mechanismus zur Inhibierung und Bindung an die Effektorcaspasen-3 und -7 unterscheidet sich hingegen im Hinblick auf die sterische Anordnung der beteiligten Partner von dem der Caspase-9.

Nach Fas-induzierter Apoptose kann eine Caspasen-abhängige proteolytische Spaltung von XIAP in zwei distinkte Fragmente beobachtet werden, ein N-terminales, welches die BIR1 und BIR2-Domäne, und ein C-terminales, welches die BIR3 und die RING-Domäne beinhaltet (Roy *et al.*, 1997). Während das N-terminale Spaltprodukt *in vitro* und *in vivo* präferentiell Caspase-3 und -7 inhibiert, so läßt sich für das C-terminale Fragment eine Präferenz für Caspase-9 beobachten (Deveraux *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000). Dies läßt den Schluß zu, daß die modulare Anordnung der BIR-Domänen innerhalb des IAP-Proteins durch proteolytische Spaltung eine Spezifizierung der Aktivität in der Antwort auf zelluläre Streßsignale ermöglicht.



**ABB. 8: Funktionelle Domänen des XIAP-Proteins**

Darstellung der Domänen für Bindungspartner und deren Affinität.

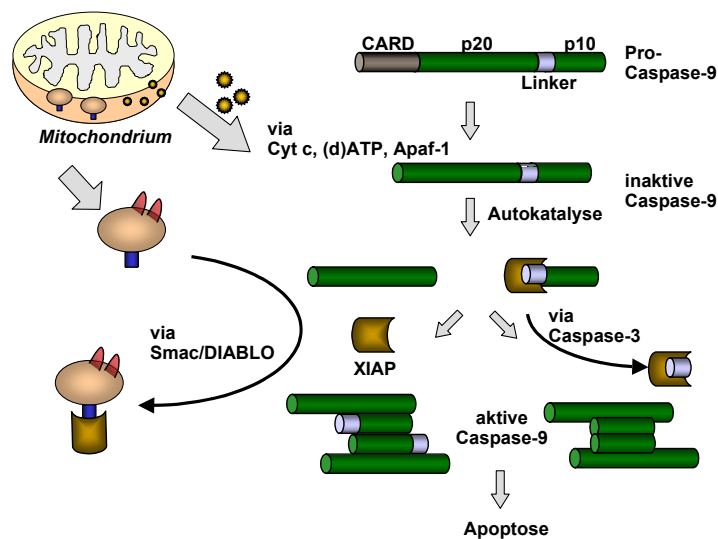
BIR: Baculovirus IAP Repeat; BMP: Bone morphogenic protein; IRES: Internal Ribosome Entry Site; RING: Really Interesting New Gene; TAB1: TAK1-binding protein. Die proteolytische Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil markiert (nach Holcik und Korneluk, 2001).

Ferner ist in der 5'-UTR des XIAP Gens eine „Internal Ribosome Entry Site“ (IRES) lokalisiert und ermöglicht eine vom normalen „Capping“ der mRNA unabhängige Translation des Proteins vor allem unter Streß-Bedingungen, wie z.B. virale Infektion, Entzug von Wachstumsfaktoren, Hypoxie oder Bestrahlung, wenn die normale zelluläre Proteinbiosynthese inhibiert wird (Holcik und Korneluk, 2000). Eine negative Regulation erfährt XIAP bislang durch drei erst kürzlich identifizierte Proteine, XAF1 („XIAP associated Factor 1“), NRAGE („Neutrophin receptor-interacting melanoma antigen gene (MAGE) homologue“) und Smac/DIABLO (Du *et al.*, 2000; Jordan *et al.*, 2001; Liston *et al.*, 2001; Verhagen *et al.*, 2000).

#### 1.4.1 Regulation von IAP's durch Smac/DIABLO

Das proapoptotische mitochondriale Protein Smac/DIABLO („Second mitochondria derived activator of caspases“ / „Direct IAP binding protein with low pI“) wurde zeitgleich von den Gruppen um Du *et al.* (Du *et al.*, 2000) über die Charakterisierung fraktionierter, humaner Zellextrakte und um Verhagen *et al.* (2000) durch Coimmunpräzitationsstudien mit transient überexprimiertem XIAP in murinen Zellen erstmalig beschrieben. Die „full length“ cDNA von Smac kodiert für ein 239 AS großes Protein, dessen 55 N-terminalen Aminosäuren als amphipatische  $\alpha$ -helicale mitochondriale Zielsequenz dienen, die nach Import in das Organell abgespalten wird. Somit ergibt sich für die prämaturre Form des Proteins eine Größe von 28 kDa, in der maturen, in der mitochondrial lokalisierten Form von ca. 21 kDa (Du *et al.*, 2000). Röntgenstrukturanalysen ergaben, daß Smac in Lösung und nach Freisetzung aus den Mitochondrien als symmetrisches Homo-Dimer vorliegt und sowohl mit der BIR2 (AS 124-

240) als auch mit der BIR3-Domäne (AS 241-356) von XIAP interagieren kann (Chai *et al.*, 2000). Bedeutend für seine proapoptotische Wirkung sind jedoch die ersten vier Aminosäuren, die nach Abspaltung der MTS freigesetzt werden und das Motiv „AVPI“ bilden. Durch seine Bindung an IAP's antagonisiert Smac deren Caspase-inhibitorische Wirkung und führt somit zu einer Aktivierung der Caspasesignalkaskade auf Ebene der Caspasen-9 und -3. Deren Aktivität nach ihrer proteolytischen Spaltung wird durch Bindung an die BIR-Domänen reprimiert (Deveraux und Reed, 1999; Ekert *et al.*, 2001).



**ABB. 9:** Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Smac/DIABLO am Beispiel von Caspase-9 Erklärungen im Text (nach Nicholson, 2001).

Im Falle von Caspase-9 beinhaltet das N-terminale Ende der Linker-Region eine Peptidsequenz aus vier Aminosäuren, welche die XIAP-Bindungsstelle von Smac imitiert, und somit die Bindung des eigenen sterischen Inhibitors XIAP ermöglicht (Srinivasula *et al.*, 2001). Der durch die Bindung an XIAP erreichte katalytisch inaktive Zustand von Caspase-9 kann durch zwei Mechanismen aufgehoben werden - zum einen durch die Kompetition der Bindung von Smac um den Inhibitor XIAP und zum anderen kann nach der Prozessierung von Caspase-9 durch Caspase-3 die Abspaltung des XIAP-gebundenen Linker-Peptides erfolgen. Somit könnte die funktionelle Aktivität von Caspase-9 trotz Anwesenheit von XIAP erklärt werden. Funktionelle Homologe von Smac beispielsweise in *Drosophila* (Reaper, Hid, Grim) weisen die gleichen charakteristischen N-terminalen Aminosäuresequenzen auf, was auf einen konservierten Wirkungsmechanismus schließen lässt (Abrams, 1999; Chen *et al.*, 1996; Vucic *et al.*, 1998).

Genom-Analysen ergaben eine Lokalisation von Smac auf Chromosom 12q und führten zu der Entdeckung weiterer Spleißvarianten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , die sich in der Ausbildung ihrer

mitochondrialen Zielsequenz und ihrer Fähigkeit an IAP's zu binden unterscheiden. Smac $\beta$  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. Nichtsdestotrotz können diese Spleißvariante und andere N-terminale trunke Formen Apoptose-Induktion potenzieren (Roberts *et al.*, 2001). Smac-Peptide, die aus dem N-Terminus des Proteins generiert wurden, konnten darüber hinaus in humanen lymphatischen Zellen die Sensitivität für Epothilon B und TRAIL-induzierte Apoptose erhöhen (Guo *et al.*, 2002). Ferner wurde gezeigt, daß die lokale Injektion von N-terminalen Peptiden in Kombination mit TRAIL im murinen Xenotransplant-Modell eine Regression von Glioblastomen *in vivo* bewirken konnte (Fulda *et al.*, 2002). Interessanterweise zeigen jedoch homozygot Smac-deletierte Mäuse *in vitro* und *in vivo* keinen detektierbaren Phänotyp bezüglich ihrer Fertilität und im Ansprechen auf unterschiedliche Apoptosestimuli (Okada *et al.*, 2002).

#### 1.4.2 Weitere Faktoren zur Regulation von IAP's

Die Überexpression des nukleär lokalisierten XAF1 führte zu einer Redistribution des unter normalen Umständen zytoplasmatischen XIAP in den Nukleus und zur Antagonisierung seiner Apoptose-inhibierenden Wirkung. Die erniedrigte Expression oder der Verlust von XAF1 in einigen humanen Tumorzellen läßt die Annahme zu, daß es sich hierbei um einen potentiellen Tumor-Suppressor handelt (Liston *et al.*, 2001).

Der genaue Wirkungsmechanismus von NRAGE ist ebenfalls noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde jedoch von Jordan *et al.* 2001 gezeigt, daß die Bindung von NRAGE an XIAP durch den Entzug von Wachstumsfaktoren induziert werden kann und von einer Potenzierung der Caspase-Aktivität gefolgt wird.

XIAP spielt neben Caspase-inhibitorischen Wirkung auch in rezeptorvermittelten Signalwegen eine Rolle. In „Yeast Two-Hybrid“-Versuchen wurde eine Interaktion mit dem BMP-Rezeptor, einem Mitglied der TGF $\beta$ -Rezeptor-Familie, und seinem Adaptermolekül TAB1 nachgewiesen. Dieser spielt bei vielen zellulären Prozessen wie z.B. Wachstum, Morphogenese und Differenzierung eine Rolle (Yamaguchi *et al.*, 1999). IAP's tragen wie bereits erwähnt durch ihre C-terminale RING-Domäne eine intrinsische Ubiquitin-Ligase Aktivität. Protein-Polyubiquitinierung, dient der Markierung und Zuführung abzubauenender Proteine zum 26S-Proteasomkomplex. Ubiquitin, ein kleines in allen eukaryotischen Zellen vorhandenes 8,5 kDa Protein, spielt eine wichtige Rolle bei der Markierung zu degradierender Proteine. An diesem Prozeß sind sequentiell drei Proteine beteiligt: ein Ubiquitin-

aktivierendes Enzym (E1), ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2 oder Ubc) und eine Ubiquitin-Ligase (E3) (Jackson *et al.*, 2000; Joazeiro und Weissman, 2000). Die Substratspezifität wird in erster Linie durch E3 bestimmt, welches sowohl an das Substrat als auch an E2 binden und damit die Übertragung von Polyubiquitin ermöglichen kann. Die E3-Aktivität von XIAP kann ihre Selbstzerstörung während der Apoptose von Thymozyten katalysieren. cIAP1 reguliert darüber hinaus den Proteinexpressionsspiegel von TRAF2, einem intrazellulären Signalmolekül für den TNF-Rezeptor2. Ferner vermittelt cIAP1 die Monoubiquitinierung von Caspase-3 und -7, während XIAP Caspase-3 polyubiquitiniert (Huang *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001). Hu und Yang (2003) zeigten, daß auch der negative IAP-Regulator Smac ein Zielprotein für cIAP1 und cIAP2 darstellt. Trotz gleicher Konzentrationen von XIAP führte eine Überexpression von cIAP1 und cIAP2 zu einer Erniedrigung der Smac Konzentration und zu dessen Ubiquitinierung *in vitro* und *in vivo*. Ein ähnliches Zusammenspiel zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren läßt sich auch in *Drosophila* beobachten. Das Smac-Homologe Reaper wird dort ebenfalls durch einen IAP-abhängigen Mechanismus reguliert. In umgekehrter Richtung läßt sich in *Drosophila* auch eine durch Reaper, Hid und Grim ausgelöste Ubiquitinierung und Degradation von IAP beschreiben (Olson *et al.*, 2003). Es kristallisiert sich demnach auch bei diesen antagonistischen Proteinen, Smac, seinen Homologen und den IAP-Familienmitgliedern eine wechselseitige Regulation heraus, die mit dem Zusammenspiel zwischen pro- und antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie und deren komplexe Regulation von Zellüberleben und Apoptose vergleichbar ist.

### 1.4.3 Proapoptotische mitochondriale Faktoren

Neben der Freisetzung von Cytochrom c, gelangen nach Störung der Integrität der Mitochondrienmembran weitere proapoptotische Moleküle aus dem Intermembranraum und der Matrix in das Zytosol.

Bei AIF („apoptosis inducing factor“) handelt es sich um ein hochkonserviertes, in seiner maturen Form 57 kDa großes Protein, welches sehr große Homologien zu bakteriellen und pflanzlichen Oxidoreduktasen aufweist (Susin *et al.*, 1999). Es trägt sowohl eine mitochondriale als auch eine nukleäre Signalsequenz und transloziert nach apoptotischen Stimuli aus dem Mitochondrium in den Nukleus. Dort induziert AIF sowohl periphere Chromatinkondensation als auch DNA-Fragmentierung in hochmolekulare, ca. 50 kb große Fragmente. Diese ist jedoch nicht mit der oligonukleosomalen DNA-Leiter vergleichbar. Die Überexpression von AIF führte neben diesen nukleären Faktoren auch zum Zusammenbruch

den mitochondrialen Membranpotentials und der Exposition von Phosphatidylserin auf der Plasmamembran (Loeffler *et al.*, 2001; Susin *et al.*, 1999). Auf molekularer Ebene läßt sich jedoch keine intrinsische Nukleaseaktivität beschreiben und auch die Oxidoreduktaseaktivität ist für die apoptotische Wirkung nicht essentiell (Miramar *et al.*, 2001). Diese AIF-induzierten Effekte sind unabhängig von aktivierten Caspasen, es gibt aber Wechselwirkungen zwischen AIF und der Caspasesignalkaskade auf verschiedenen Ebenen. CD95 induzierter Zelltod setzt beispielsweise eine primäre Aktivierung von Caspase-8 voraus, die p15-tBid generiert, welches dann AIF aus isolierten Mitochondrien freisetzen kann (Susin *et al.*, 1997; Zamzami *et al.*, 2000).

**Endonuklease G** ist wie sein Homologes cps-6 in *C. elegans* ein 30 kDa Protein mit Lokalisation in der mitochondrialen Matrix. Obwohl zunächst als in die DNA-Replikation involviertes Protein beschrieben, wird es nach apoptotischen Stimuli über den TNF-Rezeptor oder UV-Strahlung aus den Mitochondrien freigesetzt, transloziert zum Nukleus und ist dort an der DNA-Fragmentierung beteiligt (Li *et al.*, 2001; Parrish *et al.*, 2001; van Loo *et al.*, 2002).

Die Serinprotease **Omi/HtrA2** („high temperature requirement A2“) hat bakterielle Homologe, die ähnlich wie Chaperone für eine Korrektur der Struktur mißgefalteter Proteine oder aber für deren Degradation sorgen. In Säugern ist es in seiner maturen prozessierten Form 37 kDa groß und wird ubiquitär exprimiert. Durch seine mitochondriale Zielsequenz (MTS) wird es in den Intermembranraum der Organelle dirigiert, wo diese abgespalten wird, um die mature Form des Proteins zu generieren. Zytosolisches, extramitochondrial exprimiertes Omi/HtrA2, welches als Homo-Trimer vorliegt, kann Caspase-abhängigen Zelltod durch die katalytische Spaltung von IAP's und der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und nachfolgender Cytochrom c-Freisetzung induzieren (Faccio *et al.*, 2000; Hegde *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2004; Verhagen *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003). Eine weitere funktionell wichtige Rolle spielt seine N-terminale Aminosäuresequenz „AVPS“ zur inhibitorischen Interaktion mit IAP's, die auch in ähnlicher Form als „AVPI-Sequenz“ in Smac/DIABLO wiederzufinden ist.

Ferner kann Omi/HtrA2 auch Caspasen-unabhängig und in Abwesenheit von Apaf-1 und Caspase-9 Zelltod induzieren. Dabei ist seine Wirkung als Serinprotease unerläßlich (Hegde *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001). Eine Caspasen-unabhängige physiologische Wirkung von Omi/HtrA2 bei der Homöostase der Mitochondrien legen Jones *et al.* (2003) nahe. In *mnd2* Mäusen („motor neuron degeneration 2“) führt eine „missense Mutation“ in *Omi/HtrA2* zu

Muskelschwund, Neurodegeneration und der Involution von Milz und Thymus, was den juvenilen Tod der Tiere zur Folge hat.

**Smac/DIABLO** gilt jedoch nach seiner Entdeckung als Prototyp der proapoptischen mitochondrialen Moleküle in Bezug auf die Fähigkeit der Regulation von IAP's und somit seiner Fähigkeit zur Potenzierung der Caspase-Aktivität. Dies äußert sich auch darin, daß in der experimentellen Tumorthherapie Smac und seine Isoformen als potentielle Wirkstoffe, beispielsweise als Peptide, erprobt werden.

## 1.5 Zielsetzung

In malignen Tumoren ist die Exekution von Apoptose oftmals durch den Verlust von Bax oder aber die Überexpression von antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie, wie z.B. Bcl-2 oder Bcl-x<sub>L</sub> gestört (Mrozek *et al.*, 2003; Raisova *et al.*, 2001; Sturm *et al.*, 2001). Der Verlust von Caspase-3 in Folge von Mutationen in Mamma-Karzinomzellen (MCF-7) führte zu einer erworbenen Resistenz gegenüber Zytostatika (Friedrich *et al.*, 2001).

Durch die lokale Applikation von N-terminalen Smac-Peptiden in maligne Tumoren konnte bereits die Regression von Tumorzellen erreicht werden (Fulda *et al.*, 2002). Eine Überexpression der maturen Form des Proteins konnte Apoptose potenzieren (Roberts *et al.*, 2001). Außer der fördernden Wirkung auf die Aktivität von Caspasen sind jedoch weitere Mechanismen der Smac-induzierten Apoptose und die dabei aktivierten Signalwege bislang kaum untersucht worden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Signalwege, die bei der Smac-induzierten Apoptose eine Rolle spielen, näher untersucht werden. Da die meisten bislang veröffentlichten Arbeiten von der maturen, mitochondrialen Form des Proteins ausgegangen sind, wurde in dieser Arbeit die prä-mature Form von Smac inklusive seiner mitochondrialen Zielsequenz eingesetzt. Ziel war es zunächst die „full length“ Smac cDNA unter der Kontrolle eines konditionalen, Tet-Off-regulierbaren Promoters in ein adenovirales Expressionssystem zu klonieren.

Für zellbiologische Untersuchungen unter Verwendung des induzierbaren Smac-Expressionsvektors, standen in der Arbeitsgruppe eine Vielzahl von Zellsystemen zur Verfügung, die sich in ihrem Expressionsstatus bezüglich verschiedener Mitglieder der Bcl-2-Familie unterscheiden. In den in Vorarbeiten generierten DU145 mock und Bax sowie HCT116 Bax und Bax<sup>-/-</sup> Zellen sollte die Auswirkung des Bax-Status auf die Apoptose-Induktion von Smac analysiert werden. Auch der Frage nach dem Einfluß von Bcl-x<sub>L</sub> auf die Induktion der Caspasesignalkaskade und der Exekution von Apoptose sollte in generierten Bcl-x<sub>L</sub> überexprimierenden HCT116- Transfektanten nachgegangen werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob in Folge der Smac-Überexpression eine Aktivierung der Mitochondrien und des Endoplasmatischen Retikulums auftritt.

Ferner sollte der Frage nach der Rolle von Caspase-3 und einer möglichen Sensitivierung diesbezüglich negativer MCF-7 Zellen in Kombination adenoviraler Überexpression von Smac beim Zytostatika-induzierten Zelltod nachgegangen werden.