

4 Apoptoseregulation

4.1 Zelluläre Reaktion auf DNA-Schädigung

DNA-Schädigung durch Chemotherapeutika oder ionisierende Bestrahlung aktiviert eine physiologische nukleäre Stressantwort, die in Tumorzellen transienten Zellzyklusarrest, zumeist in der G1- und der G2-Phase induziert, wodurch der Zelle die Reparatur und das koordinierte Fortschreiten im Zyklus nach erfolgreicher Reparatur ermöglicht wird. Bei schwerer Schädigung geht die Zelle anstatt in einen transienten in einen permanenten Arrest, der mit charakteristischen morphologischen Veränderungen verbunden ist und als prämaturre Seneszenz bezeichnet wird (**Abb. 2**). Wesentliche Regulatoren dieser Zellzyklusarrest- und Seneszenzprogramme sind neben dem Tumorsuppressorgen p53 und dem p53-induzierten CDK Inhibitor p21^{CIP/WAF-1} die beiden Genprodukte des INK4a-Genlokus: der CDK Inhibitor p16^{INK4a} sowie der p53-Regulator p14^{ARF} (**Abb. 3**). Die Inaktivierung dieser Kontrollgene resultiert in der Unfähigkeit der Tumorzelle, nach DNA-Schädigung im Zellzyklus arretiert zu werden. Im Tiermodell sind solche Zellzyklusarrest- und Seneszenzdefekte mit rascher Reaktivierung des Tumorwachstums nach Therapie verbunden⁷. Die ATM (Ataxia-teleangiectasia mutated) - Kinase wird bei strahlen-induzierter DNA-Schädigung aktiviert und induziert über die Phosphorylierung von Substraten (p53, c-Abl, Rad51) die Aktivierung von Zellzyklusarrest und Reparaturmechanismen.

Schlägt die Reparatur therapie-induzierter Schäden fehl, und sind Seneszenzprogramme der Tumorzelle defekt, werden Zelltodsignalwege aktiviert. Neben seiner Rolle in der Aktivierung von Zellzyklusarrest-Programmen nimmt p53 auch hier eine zentrale Rolle ein⁸. Genexpressionsanalysen mittels DNA-Mikroarrays zeigten, dass p53 die Expression einer Vielzahl von Zelltodgenen induziert (**Abb. 3**). Hierzu gehören im wesentlichen Schlüsselgene des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs, insbesondere pro-apoptische Mitglieder der Bcl-2 Genfamilie (Bax, Bak, verschiedene BH3-only Proteine, z.B. Puma, Noxa, Nbk/Bik), das Adapterprotein APAF-1, sowie eine Reihe weiterer Effektorgene mit teils noch unbekannter Funktion. Zwar werden auch Komponenten des Todesrezeptorsignalwegs induziert⁹, jedoch konnte in einer Reihe von Untersuchungen gezeigt werden, dass dieser Signalweg nicht wesentlich zur Exekution der Apoptose in Tumorzellen nach Bestrahlung oder Chemotherapie beiträgt^{10, 11}. Zu den p53 Zielgenen im Zellzyklus- und DNA-Reparatur-Signalweg gehören p21^{WAF1/CIP1}, 14-3-3 - sigma, Gadd45,

und MSH2. Das p53-Gen ist in vielen menschlichen Tumoren mutiert, die Frequenz hängt ab von der Tumorart. Es gibt zudem eine Vielzahl positiver und negativer Rückkopplungsschleifen, über die Proteinexpression und Aktivität des p53 Genes reguliert werden¹². Auch ist inzwischen bekannt, dass es neben seiner Aktivität als Transkriptionsfaktor eine direkte, transkriptionsunabhängige Apoptose-vermittelnde Aktivität des p53 Proteins gibt¹³. Insgesamt ist klar, dass Komponenten des p53-Signalweges wichtige und zentrale Zielstrukturen für neue Therapie-Modalitäten darstellen¹⁴⁻¹⁶.

4.2 Vernetzung der Signalwege von Zellzyklus und Apoptose

Signale, die den Progress von Zellen im Zellzyklus auslösen, aktivieren immer auch Zelltodsignale. Nur durch die Koordination mit Überlebenssignalen kann eine normale, in den Zellzyklus eingetretene Zelle bzw. Tumorzelle überleben¹⁷. Hierdurch wird verständlich, warum die Überexpression von Zellzyklus-stimulierenden Transkriptionsfaktoren (wie z.B. E2F-1 und dessen Homologe, c-myc, oder auch Cyclin D1), in Modellsystemen Apoptose auslöst. Werden hingegen gleichzeitig Überlebenssignale, z.B. durch erhöhte Expression von Bcl-2 oder Bcl-x_L oder anderer Apoptose-Hemmer, vermittelt, dann überlebt die Zelle das Proliferationssignal, geht nicht in die Apoptose und schreitet im Zellzyklus fort¹⁷.

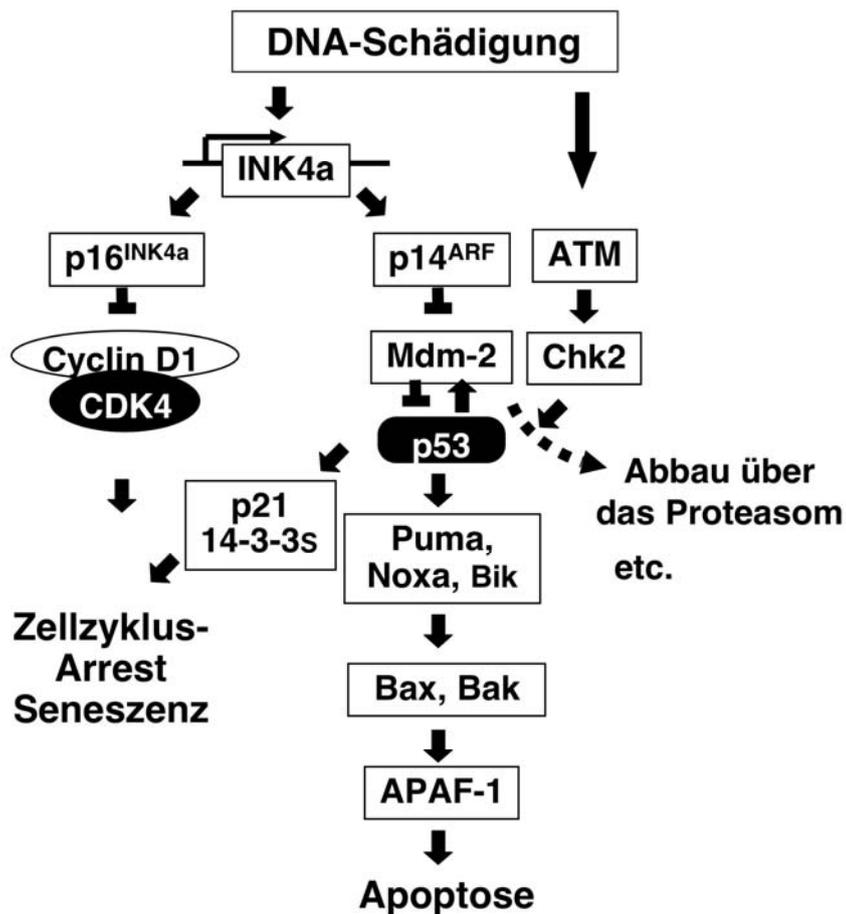


Abb. 3 Signaltransduktion nukleärer Stresssignale

Nukleäre Stress-Signale, z.B. in Folge DNA-Schädigung oder Aktivierung von Onkogenen aktivieren den p53-Signalweg. P53 wirkt als transkriptioneller Aktivator von Zellzyklus-Arrest bzw. Apoptosegenen. Einer der Aktivatoren des p53 Signalwegs ist p14^{ARF}. Neben p14^{ARF}, das Mdm-2 inaktiviert, dadurch den Abbau von p53 über das Proteasom hemmt und somit das Expressionsniveau von p53 erhöht¹⁸, wird p53 zudem über eine Reihe von Stresskinasen, z.B. die ATM-Kinase, aktiviert und stabilisiert. Das zweite Genprodukt des INK4a Genlokus, p16^{INK4a} vermittelt, wie auch p53 und dessen Zielgen p21^{Cip/Waf}, Zellzyklusarrest in der G1-Phase sowie Seneszenz.

Möglicherweise wird durch die gleichzeitige Aktivierung von Proliferations- und Zelltodsignalen die akzidentelle Aktivierung der Zellproliferation vermieden werden. Solche fehlerhaft proliferierenden Zellen würden somit unter physiologischen Bedingungen über Apoptose absterben. Dies erklärt zum Teil, warum Tumoren häufig Inaktivierungen von Zelltodsignalwegen aufweisen.

Ebenso kann die Aktivierung von Zelltodsignalen im Zellzyklus gehemmt werden, indem

die Zelle in der jeweiligen Zellzyklusphase zum adäquaten Zeitpunkt arretiert wird. Zellzyklusinhibitoren wie pRb¹⁹, aber auch die CDKIs, vor allem aber p21^{Cip/Waf}²⁰, können daher anti-apoptotische Wirkung zeigen. So kann der CDKI p21 den Zellzyklus in der G1-, S- und G2-Phase arretieren und hierdurch die Progression geschädigter Zellen im Zellzyklus verhindern. Hierdurch ermöglicht p21^{Cip/Waf} die Reparatur ansonsten fataler Schäden.

Wird p21^{Cip/Waf} inaktiviert, z.B. durch Verlust von p53²¹ oder durch Gen-spezifischen knock-out in experimentellen Systemen²², kommt es nach DNA-Schädigung zur Entkopplung von S-Phase (also DNA-Synthese) und Mitose. Ohne sich zu teilen, durchlaufen solche Zellen multiple DNA-Synthesezyklen und werden hierdurch hyperloid. Manche Autoren sprechen in diesem Zusammenhang auch, nicht ganz korrekt, von einer mitotischen Katastrophe, die letztlich zur Apoptose der betroffenen Zelle führt (s.u.). Inaktivierung von des CDKI p21^{Cip/Waf} in Tumorzellen ist also ein zweischneidiges Schwert. Die Inaktivierung von p21^{Cip/Waf} führt zu einem Verlust der Proliferationskontrolle, und dies vermag einerseits Befunde zur positiven prognostischen Relevanz von p21^{Cip/Waf} Expression in einigen Tumorentitäten erklären. Andererseits sind die Befunde zur Sensibilisierung von Tumorzellen für zytotoxische Therapien im Rahmen eines p21^{Cip/Waf} Verlusts eindeutig (siehe unten).

Weitere Befunde deuten darauf hin, dass diese Wirkung in solchen Tumoren besonders ausgeprägt ist, bei denen es durch Inaktivierung des Rb-Gens zu einer weiteren Störung der Proliferationskontrolle, insbesondere der Zellzykluscheckpunkte in G1 und der S-Phase gekommen ist²³. Kürzlich konnten wir erstmals in humanen Tumoren die Existenz eines p21^{Cip/Waf}-abhängigen Resistenzmechanismus nachweisen²⁴. Patienten mit Rektumkarzinom zeigten ein deutlich kürzeres krankheitsfreies Überleben, wenn es unter neoadjuvanter Radiochemotherapie in überlebenden, residualen Tumorzellen zu einer Verminderung der Proliferation (gemessen an der Expression des mki-67 Genprodukts) kam, z.B. in Folge eines Anstiegs der p21^{Cip/Waf}-Proteinexpression (**Abb. 4**).

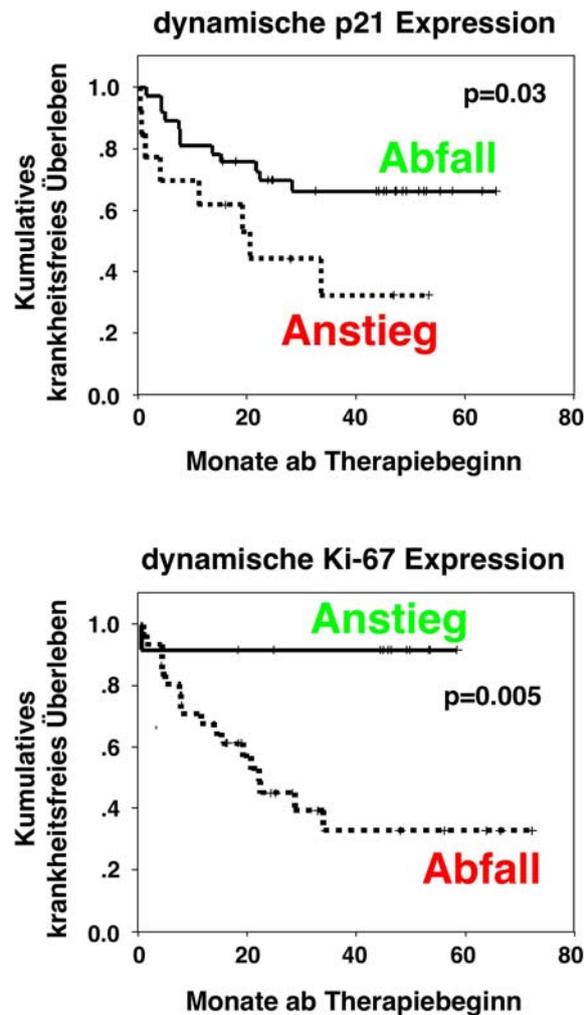


Abb. 4: Proliferation, $p21^{CIP/WAF-1}$ Expression und Prognose von neoadjuvant behandelten Patienten mit Rektumkarzinom

66 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom (T3/T4, 63 Pat. pM0, 3 Pat. pM1) wurden neoadjuvant radiochemotherapiert und im Anschluss tumorreseziert. Proteinexpressionsprofile wurden verglichen zwischen diagnostischen Biopsien vor neoadjuvanter Therapie und in residualen vitalen Tumorzellen, die nach OP im Tumorresektat nachweisbar waren. Patienten mit Anstieg der $p21^{Cip/Waf}$ -Proteinexpression (obere Grafik, unterbrochene Linie) oder Abfall der der Ki-67/MIB-1 Expression (als Surrogatmarker für Tumorzellproliferation; untere Grafik, unterbrochene Linie) zeigten ein deutlich kürzeres krankheitsfreies Überleben. Induktion von $p21^{Cip/Waf}$ korrelierte mit verminderter Tumorzellproliferation. Statistische Signifikanzniveaus wurden mit Hilfe des Mantel-Cox Lograng Tests berechnet²⁴.

Neben den o.g. Genen, die vor allem die Kontrolle des G1-Restriktionspunkts und Zelltod vermitteln, existieren Apoptose-kontrollierende Checkpunkte auch in anderen Phasen des Zellzyklus. So führt die Mehrzahl der genotoxischen Noxen zur Aktivierung von

Checkpunkten und Arretierung der Zelle in der G2-Phase, wohingegen Substanzen, die den Spindelapparat sich teilender Zellen schädigen, wie z.B. Taxane, Vinca Alkaloide und die neue Klasse der Etoposide, ihre Wirkung in der frühen M-Phase entfalten und Mitose-Checkpunkte aktivieren.

4.3 Mitochondrialer Apoptose-Signalweg

Mitochondrien sind somit die bisher wichtigsten Regulatoren und Verstärker der Apoptose-Signalkaskade im Rahmen des Therapie-induzierten Zelltods in Tumorzellen²⁵. Neuere Daten weisen auf eine vergleichbar wichtige Rolle des endoplasmatischen Retikulums beim Therapie-induzierten Zelltod von Tumorzellen hin²⁶. Die Kontrolle dieser beiden Signalwege erfolgt durch die Bcl-2 Genfamilie, deren Mitglieder entweder Apoptose-fördernde oder -hemmende Funktionen ausüben²⁷. Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs erfolgt durch die pro-apoptotischen, Bcl-2-homologen Proteine Bax und Bak. Gehemmt werden diese Apoptoseförderer durch Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 und anderen Apoptose-hemmende Mitglieder der Bcl-2-Genfamilie. Eine besondere Rolle nehmen hierbei die Mitglieder der BH3-only (BH=Bcl-2 homology domain) Genfamilie ein. Dies sind pro-apoptotische Homologe von Bax, die lediglich über eine BH3-Domäne verfügen und als Aktivator von Bax und Bak wirken²⁷). Für verschiedene BH3-only Proteine, und zwar Puma, Noxa, Nbk/Bik, und Hrk, wurde gezeigt, dass ihre Expression durch p53 auf transkriptioneller Ebene aktiviert wird, und dass sie wesentliche Effektoren der p53-induzierten Apoptose sind. Der Verlust der Bax-Expression ist in den meisten Tumoren mit der Resistenz gegen zytotoxische Therapiemodalitäten verbunden. Ebenso konnte in einer Reihe von Tumorentitäten Überexpression von Bcl-2 oder anderen anti-apoptotischen Bcl-2 Homologen mit Resistenz korreliert werden. Die Konsequenzen der Inaktivierung einzelner BH3-only Proteine sind Gegenstand aktueller Untersuchungen. Unklar ist derzeit noch, ob ihre Inaktivierung an der klinischen Therapieresistenz von Tumoren beteiligt ist.

Der Apoptose-regulierende Mechanismus der Bcl-2 Familienmitglieder ist, obwohl Bcl-2 als eines der ersten Gene in dieser Signalkaskade identifiziert wurde, immer noch nicht vollständig geklärt. Als gesichert gilt jedoch, dass BH3-only Proteine, z.B. nach transkriptioneller Aktivierung durch p53, die Oligomerisierung von Bax und dessen

Homolog Bak in der äusseren Mitochondrienmembran auslösen. Hierdurch wird, wahrscheinlich in Folge der Bildung von Kanälen durch oligomerisiertes Bax und Bak, Cytochrom c und ATP aus Mitochondrien freigesetzt²⁸. Dieser Vorgang wird durch Bcl-2 gehemmt. Das nun zytosolische Cytochrom c bindet an APAF-1. Gemeinsam mit der Bindung von ATP bzw. dATP an die CED4-Homologiedomäne von APAF-1 wird hierdurch eine Konformationsänderung in APAF-1 ausgelöst, die zur Rekrutierung und Aktivierung der Procaspase-9 führt. Der Komplex aus APAF-1, Procaspase-9, Cytochrom c und (d)ATP wird als mitochondriales Apoptosom bezeichnet. Die aktive Caspase-9 kann durch limitierte Proteolyse die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 aktivieren, die wiederum eine Vielzahl von regulatorischen und strukturellen Proteinen spalten und hierdurch die Exekution der Apoptose einleiten. Neben Cytochrom c werden noch weitere Proteine aus den apoptotischen Mitochondrien freigesetzt, unter anderem SMAC, der zweite mitochondriale Caspase-Aktivator, der durch Hemmung der anti-apoptotischen IAP-Proteine Caspase Aktivierung vermittelt und dadurch die Exekution der Apoptose verstärkt sowie Omi/HtrA2, eine Serinprotease mit SMAC-ähnlicher Wirkung²⁹.