

5 Signalwegdefekte in malignen Erkrankungen

Aufgrund der häufig geringen prognostischen Relevanz konventioneller klinisch-pathologischer Parameter besteht erheblicher Bedarf an neuen diagnostischen Verfahren, um die Prognose, sowie das Ansprechen von Tumorpatienten auf die Therapie besser und präziser abschätzen zu können. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf den Trend zu risikoadaptierten Tumortherapien und neuen Tumortherapeutika mit molekular definierten Zielstrukturen, wie z.B. den Tyrosin-Kinasehemmern Imatinib (Glivec®) oder Gefitinib (Iressa®) oder auch einer Vielzahl neuer therapeutischer monoklonaler Antikörper. Ein vielversprechender Weg ist, die zellulären Signalwege zu untersuchen, die an der Tumorprogression und insbesondere der Regulation von Zellzyklusarrest und Zelltod nach zytotoxischer Tumortherapie beteiligt sind. Die Störung von Zelltod- und Zellzyklus-Signalwegen trägt nicht nur zur Tumorentstehung bei, sondern ist mit verantwortlich für die Tumorbiologie, den klinischen Verlauf der Erkrankung und die Entwicklung von Resistenzen.

Für die meisten der genannten Zelltodregulatoren konnte mittlerweile in Zelllinienmodellen oder im Tiermodell eine Relevanz für die Entwicklung von Therapieresistenz maligner Tumoren gezeigt werden. Defekte in Schlüsselgenen der Apoptose, wie z.B. p53 und p14^{ARF} oder Bax, tragen zudem, neben ihrer zentralen Rolle in der Tumorentstehung, zur Therapieresistenz von Tumoren bei. Interessanterweise ist das Bild bei der Analyse klinischer Tumore ein ganz anderes. Zwar konnte bei einigen Tumorentitäten mittlerweile ein Apoptose- oder Zellzyklusdefekt als zugrundeliegendes pathogenetisches Prinzip identifiziert werden, jedoch zeigen eine Vielzahl publizierter Daten, dass die Analyse einzelner regulatorischer Gene zumeist kaum geeignet ist, zuverlässige prognostische oder gar prädiktive Marker für das Ansprechen auf Therapie zu identifizieren.

Die beste Datenlage existiert zur prognostischen Bedeutung des Tumorsuppressorgens p53. Nach Abflauen der initialen Euphorie in Folge der Identifizierung dieses wichtigen Tumorsuppressorgens ist nun klar, dass die isolierte Mutation von p53, trotz der zentralen Rolle von p53 in Zellzyklus- und Apoptoseregulation und Tumorpathogenese, in den allermeisten Tumorentitäten kein prognostischer Faktor ist. Ausnahmen sind hämatologische Neoplasien, vor allem die B-CLL. Hier konnte sowohl die Deletion der p53-Gen-tragenden Region auf dem kurzen Arm des Chromsoms 17 (17p)³⁰, als auch die Mutation von p53³¹ als prognostisch relevant identifiziert werden. In einer Vielzahl solider

Tumorentitäten hingegen zeigen neuere Analysen grösserer Patientengruppen und Metaanalysen, dass p53 für sich genommen nur einen schwachen prognostischen Einfluss hat³²⁻³⁶, der vollständig verloren ging, wenn die Patienten mit Chemo- oder Radiotherapie behandelt wurden³⁵. Klar ist mittlerweile auch, dass die in der Mehrzahl der Studien als Surrogatmarker für p53-Mutation analysierte Überexpression des p53 Proteins nicht mit dem p53-Mutationsstatus korreliert, und dies mag einige der diskrepanten Ergebnisse erklären. Insgesamt liess diese unklare Datenlage zu p53 vermuten, dass die Effekte von Tumorthapeutika über alternative Signale vermittelt werden können, die in der Lage sind, p53-Defekte zu überwinden. Dies wurde mittlerweile durch zellbiologische Untersuchungen und genetische Studien an humanen bzw. murinen p53 knock-out Zellen bestätigt.

5.1 p53/Bax

Aus diesem Grund haben wir und auch andere Gruppen begonnen, die Konsequenzen der Inaktivierung von p53 in malignen Tumoren im Kontext weiterer Komponenten der p53-Signalkaskade zu untersuchen. Neben Mutation von p53 kann bei einer Vielzahl von Tumoren der Verlust des pro-apoptotischen Bax-Proteins nachgewiesen werden. Eigene Arbeiten konnten bei einer Vielzahl von Tumoren zeigen, dass der Verlust von Bax mit schlechterem Therapieansprechen bzw. Prognose einhergeht³⁷⁻⁴³. Die Ursache für den Verlust von Bax ist in den meisten Tumoren noch ungeklärt, liegt aber wahrscheinlich auf transkriptioneller Ebene. Bax-Mutationen sind hingegen nur bei einem Teil der Patienten für den Expressionsverlust verantwortlich. Bax-Mutationen werden vor allem bei gastrointestinalen Tumoren (Magen- und kolorektale Karzinome) mit Defekten des DNA-Mismatch-Reparatursystems beobachtet⁴², sind aber bei den meisten Neoplasien extrem selten. In der Tat konnte durch Einbeziehung des nachgeschalteten Bax Gens die prognostische Relevanz von p53 Analysen deutlich verbessert werden (**Abb. 5**).

So hatten Patienten mit lokal fortgeschrittenem Kolonkarzinom im UICC III Stadium bei kombiniertem Defekt von p53 und Bax eine deutlich schlechtere Krankheitsprognose als Patienten mit isoliertem Defekt von Bax oder p53⁴⁰.

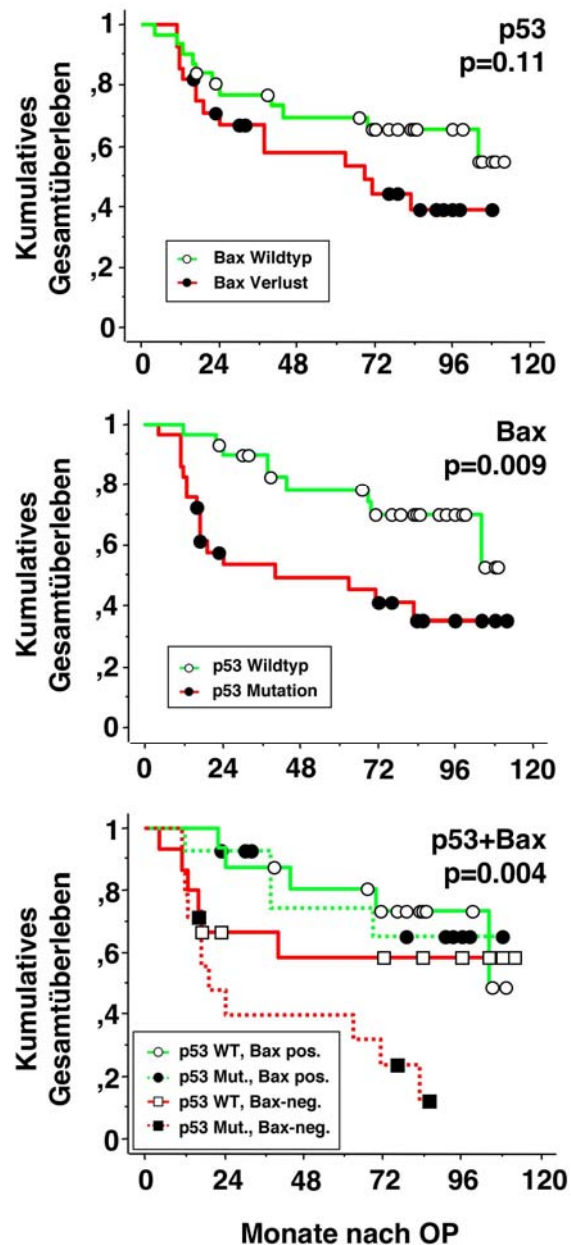


Abb. 5: Inaktivierung des p53/Bax Signalwegs und Prognose von Patienten mit kolorektalem Karzinom.

Tumorgewebe von 59 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Kolonkarzinom im Stadium UICC III wurden retrospektiv auf Mutation bzw. Proteinexpression von p53 und Bax untersucht. Patienten mit kombinierter Inaktivierung von p53 und Bax zeigten die ungünstigste Prognose. Statistische Signifikanzniveaus wurden mit Hilfe des Mantel-Cox Lograng Tests berechnet⁴⁰.

Gleichermassen zeigten Patienten mit Mismatch-Reparatur-defizientem Magenkarzinom bei gleichzeitiger Mutation von p53 und Bax einen deutlich kürzeres Überleben als Patienten, in deren Tumor nur Bax, nicht aber p53 inaktiviert war (Abb. 6)⁴².

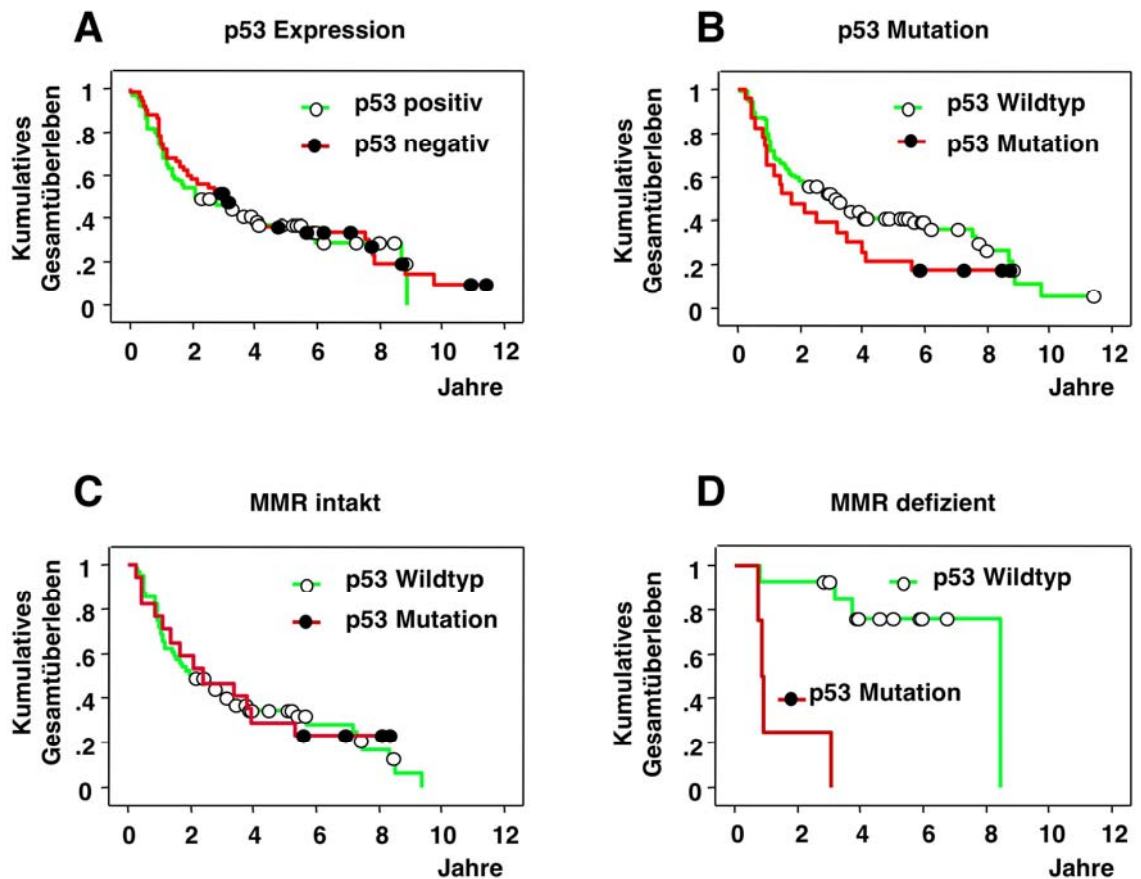


Abb. 6: Inaktivierung von p53 und Bax durch Mutationen resultieren in einer sehr schlechten Prognose bei Patienten mit Magenkarzinomen

Tumorgewebe von 116 Patienten mit Magenkarzinom, die in kurativer Absicht operiert wurden, wurde retrospektiv auf Mutation bzw. Proteinexpression von p53 und Bax sowie Leserastermutationen der Mikrosatelliten BAT25 und BAT26 untersucht. Mutationen im G8-Trakt in Exon 3 des Bax-Genes kommen bei Patienten mit DNA-Mismatch Reparatur-Defekt vor (MMR defizient). Sowohl die Insertion als auch die Deletion eines Guanosins führt zur Einführung eines STOP Codons und prämatuere Translationsabbruch. Weder p53 Proteinexpression (A) noch p53 Genmutation (bei allen Patienten (B) oder in der MMR profizienten Gruppe (C)) führen zu Unterschieden im Gesamtüberleben. Patienten mit kombinierter Mutation von p53 und Bax zeigten hingegen eine extrem ungünstige Prognose (D, $p < 0.0001$). Statistische Signifikanzniveaus wurden mit Hilfe des Mantel-Cox Lograng Tests berechnet⁴².

Die kombinierte Inaktivierung konsekutiv agierender Schlüsselgene der Apoptosekaskade ist somit, wie diese und weitere Befunde zeigen, der isolierten Analyse einzelner Faktoren überlegen. Einer der Gründe hierfür liegt in der Redundanz der analysierten Signalwege. Neben p53 können die strukturell und funktionell homologen Faktoren p63 und p73

Zellzyklusarrest und Apoptose vermitteln. Erst die zusätzliche Inaktivierung eines weiteren p53-Homologs, p63 oder p73, gemeinsam mit p53 führte im Mausmodell zu einer nahezu vollständigen Inaktivierung des Signalwegs, wohingegen die Resistenz gegenüber DNA-Schädigung bei Vorliegen singulärer Gendefekte von p53, p63 oder p73 deutlich geringer ausgeprägt war⁴⁴. Gleichermassen können Defekte im pro-apoptotischen Bcl-2 Homolog Bax durch das homologe Bak vermittelt werden²⁷. Unseren Daten zufolge würde in diesem teils redundanten Signalnetzwerk erst die Inaktivierung zweier nachgeschalteter Gene zu einer signifikanten Beeinträchtigung des Therapieeffekts führen (**Abb. 7**).

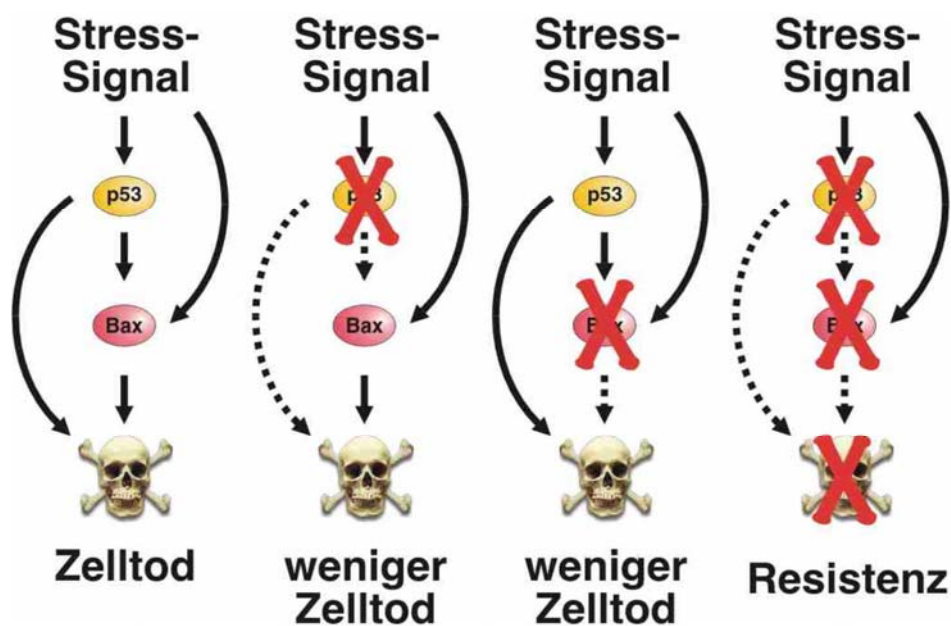


Abb. 7: Modell zur Therapieresistenz in Folge Inaktivierung von konsekutiv agierenden Zelltod-Signalwegkomponenten

Während die Inaktivierung einer einzelnen Signalwegskomponente, wie z.B. Bax oder p53, über alternative, redundante Signalwege zumindest partiell überwunden werden kann, führt die Inaktivierung zweier nachgeschalteter Signalwegsmodule zur weitgehenden Inaktivierung des Signalwegs.

5.2 p53/APAF-1

In diesem Sinne waren auch die Ergebnisse der Untersuchung der Expression des Adaptor-Proteins APAF-1 in 138 Proben von chronisch lymphatischer Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL). Es ist im Zytosol lokalisiert und dem mitochondrialen DiSC nachgeschaltetet: APAF-1 aktiviert im Komplex mit dATP und Cytochrom c die Procaspase 9. In Melanomen war der Verlust von APAF-1 Expression durch epigenetische Modifikation

(DNA-Hypermethylierung) regelmäßig beobachtet und mit der den Melanomen intrinsischen Zytostatikaresistenz in Verbindung gebracht worden^{45,46}. Wir konnten allerdings für den Verlust der APAF-1 Proteinexpression alleine keine prognostische Bedeutung nachweisen. Auch für die ex vivo untersuchte Zelltodinduktion mit verschiedenen Zytostatika war ein Verlust der APAF-1 Proteinexpression, im Gegensatz zu Mutationen von p53, nicht relevant. Allerdings zeigt die Subgruppe p53-genmutierter B-CLL-Patienten eine deutlich bessere Prognose, wenn APAF-1 hoch exprimiert wird (**Abb. 8**). Es kann also hier von einer Redundanz für den p53/APAF-1 Signalweg ausgegangen werden.

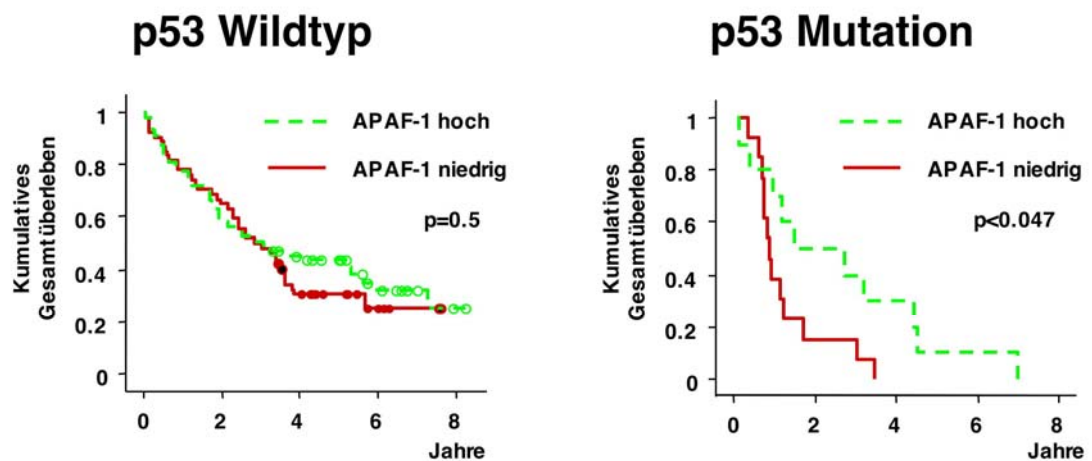


Abb. 8: Prognostische Bedeutung von APAF-1 bei Patienten mit B-CLL

B-CLL Zellen von 138 Patienten wurden auf die Expression von APAF-1 untersucht. Nur im Zusammenhang mit einer Mutation im p53-Gen wird die Expression von APAF-1 für die Lebenserwartung der Patienten relevant (rechts). Statistische Signifikanzniveaus wurden mit Hilfe des Mantel-Cox Lograng Tests berechnet⁴⁷.

5.3 ATM/p53

Das ATM (ataxia teleangiectasia mutated)-Gen ist auf Chromosom 11q22.3 lokalisiert und kodiert ein 350 kDa Protein, das zu einer Familie von Serinkinasen gehört, die, ähnlich der Phosphatidylinositol 3-Kinase, eine hoch konservierte C-terminale Kinase-Domäne aufweisen. Mitglieder dieser Serinkinase-Familie, inklusive ATM, sind an der DNA-Reparatur und an der Zellzykluskontrolle nach DNA-Schädigung beteiligt⁴⁸. Als Antwort auf DNA-Strangbrüche aktiviert und stabilisiert ATM das p53-Protein⁴⁹. Eine Bestätigung,

dass ATM und p53 eine synergistische Rolle in der Tumorgenese spielen, zeigen Mausmodelle: *Atm*(-/-) *p53*(-/-) Mäuse entwickelten Lymphome früher als *Atm*(-/-) oder *p53*(-/-) Mäuse. Möglicherweise agieren p53 und ATM somit in unterschiedlichen, und nur partiell überlappenden Signalwegen. So wurde beobachtet, dass der G1/S Zellzyklus-Checkpoint in *Atm*(-/-) *p53*(-/-) Maus-embryonalen Fibroblasten (MEFs) nach gamma-Bestrahlung aufgehoben ist, allerdings in *Atm*(-/-) MEFs noch intakt ist, vermutlich infolge einer residuellen p53-Funktion der Zellen⁵⁰.

Für die B-CLL war bekannt, dass aufgrund von Mutationen des ATM-Gens und Deletionen von 11q23 die ATM-Expression verloren gehen kann. Dies wurde mit einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht^{51,52}. Untersucht wurde daher die Proteinexpression der ATM-Kinase an 138 Proben von chronisch lymphatischer Leukämie vom B-Zell-Typ. Nur in wenigen Fällen wurde ein Verlust der ATM-Proteinexpression gefunden. Eine niedrige ATM-Expression per se war in diesen Analysen kein prognostischer Faktor. Allerdings wurde, analog zu den Ergebnissen für APAF-1, beobachtet, dass im Falle der gemeinsamen Inaktivierung von p53 ATM ein negativer Einfluss auf die Prognose besteht (**Abb. 9**).

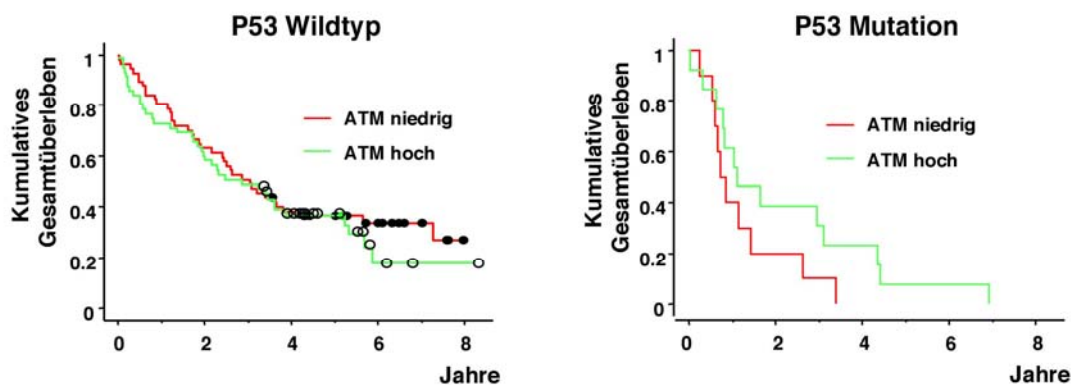


Abb. 9: Einfluss von ATM- und p53-Status bei B-CLL

Zellen von 138 Patienten mit B-CLL^{31, 53, 54} wurden auf die Expression der ATM (ataxia teleangiectasia mutated)-Kinase untersucht. Zur Dichotomisierung wurde die mediane Expression als Grenzwert definiert. Nur im Zusammenhang mit einer Mutation im p53-Gen ($n=23$) zeigt sich ein (nicht statistisch signifikanter) Einfluß der ATM-Expression auf das Überleben (rechts, $p=0.15$). Bei Vorliegen des p53 Wildtyps war die Expression von ATM für die Lebenserwartung der Patienten irrelevant (links, $p=0.58$). Statistische Signifikanzniveaus wurden mit Hilfe des Mantel-Cox Lograng Tests berechnet.

Diese Ergebnisse sprechen für einen divergierenden, aber redundanten Signalweg für ATM und p53. Diese Beobachtung an klinischen Proben stimmt überein mit kürzlich publizierten Ergebnissen aus DNA-Mikroarray-Analysen von p53 und ATM pro- und defizienten B-CLL Proben⁵⁵: hier wurde gezeigt, dass beide Gene intrazellulär unterschiedliche Überlebenssignale aktivieren.

5.4 p53-Apoptose und -Zellzykluseffektoren

Neben der alleinigen Analyse von Apoptosekontrollgenen kann die prognostische Relevanz derartiger Signalweganalysen durch Kombination mit der Analyse zellzyklus-regulierender Genprodukte verbessert werden. Von besonderer Bedeutung ist hier der INK4a Genlokus, da er sowohl für den CDK Inhibitor p16^{INK4a} als auch, über Gebrauch des Exons 1 β anstatt des Exons 1 α , und Ablesung des Exons 2 in einem alternativen Leseraster, für das p14^{ARF} Genprodukt (alternative reading frame) kodiert¹⁸. Neben seiner Funktion als Tumorsuppressorgen wurde für p16 eine Apoptose-induzierende Wirkung⁵⁶, sowie die Kooperation mit p53⁵⁷, zumindest nach adenoviralem Gentransfer, gezeigt. Weiterhin war bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus der Expressionsverlust des CDKI p16 mit kurzem Gesamtüberleben nach Therapie korreliert³⁹. Ebenso zeigten unsere Analysen, dass Überexpression von Cyclin D1 oder Verlust von Bax mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, wobei alle diese genetischen Ereignisse statistisch voneinander unabhängig waren⁴³. Durch kombinierte Analyse der Deregulation des Rb-Signalwegs (p16 und Cyclin D1) und des pro-apoptotischen Bax konnte schliesslich eine Patientengruppe identifiziert werden, die alle Patienten mit Langzeitüberleben enthielt (**Abb. 10**). Alle diese Patienten zeigten eine intakte pRb Expression im Tumor. Diese Daten belegen, dass durch Analyse einiger weniger, relevanter Kandidatengene aus Zellzyklus- und Apoptoseregulation prognostisch günstige von prognostisch ungünstigen Patientent abgegrenzt werden können. Gegenwärtig wird die prognostische und prädiktive Relevanz dieser und weiterer genetische Marker in prospektiven Studien validiert.

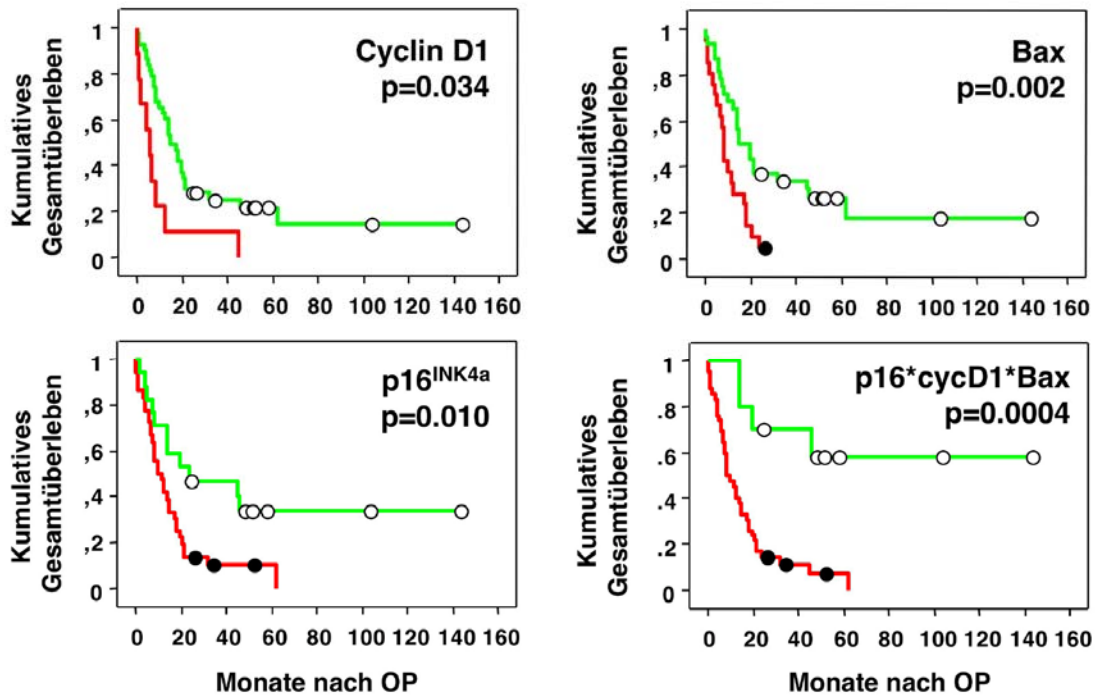


Abb. 10: Prognostische Bedeutung der Deregulation von Komponenten des Rb Signalwegs und Apoptose beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

53 Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus wurden in kurativer Intention multimodal therapiert und mit kurativer Intention R0-reseziert. Patienten mit Überexpression von Cyclin D1 oder Verlust von p16 bzw. Bax (rote Kurven) zeigten ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben. Patienten, deren Tumor Defekte in einer oder mehrerer der Signalwegskomponenten p16, Cyclin D1 oder Bax aufwies, zeigten ein deutlich schlechteres Überleben im Vergleich mit Patienten, in deren Tumor weder Cyclin D1 überexprimiert war, noch p16 oder Bax inaktiviert waren. Statistische Signifikanzniveaus wurden mit Hilfe des Mantel-Cox Lograng Tests berechnet ⁴³.

5.5 Nbk/Bik

Zur Familie der Bcl-2 Proteine gehört eine Gruppe von pro-apoptotischen Genen, die nur die BH3-Domäne (BH3-only) besitzen. Deren Aufgabe scheint es zu sein, eine Verbindung zwischen diversen Zelltodsignalen und der zellulären Apoptosemaschinerie herzustellen⁵⁸. So werden Noxa und Puma durch p53 transkriptionell aktiviert und spielen eine Rolle für die Exekution des p53-induzierten Zelltodes⁵⁹. Bid ist zum einen beteiligt an der Signaltransduktion der Fas-Todesrezeptor-Familie⁶⁰, scheint aber zum anderen durch DNA-Doppelstrangbrüche via ATM-Kinase phosphoryliert und damit aktiviert zu werden⁶¹. BH3-only Proteine können auf zwei Wegen pro-apoptotisch wirken: durch die Inaktivierung anti-apoptotischer Bcl-2 Proteine, oder durch die Interaktion mit pro-

apoptotischen Familienmitgliedern (Bax, Bak)⁶²⁻⁶⁵. Ergebnisse aus knockout Mausmodellen weisen auf eine Funktion mancher BH3-only Gene als Tumorsuppressorgene hin: Bad k.o.-Mäuse entwickeln hochmaligne Lymphome⁶⁶, und Verlust von Bim beschleunigt die Entstehung von Lymphomen im E μ -myc Mausmodell⁶⁷. Über die mögliche Funktion von BH3-only Proteinen in der Tumorgenese beim Menschen ist bislang vor allem spekuliert worden, Daten aus menschlichen Tumoren gab es bislang keine. Manche BH3-only Proteine werden selektiv in einzelnen Geweben exprimiert, so z.B. Nbk(natural born killer)/Bik, das nur in Nierengewebe und in der involutierten Mamma hoch exprimiert wird. Wir konnten beim Nierenzellkarzinom uniform ein Expressionsverlust von Nbk/Bik zeigen, der auf epigenetische Mechanismen (Hypermethylierung), teilweise gepaart mit LOH des Genlokus 22q13.2, beruht (**Abb. 11**). Die ektope Expression von Nbk/Bik mittels adenoviralem Vektor führte zur Apoptoseinduktion⁶⁸. Möglicherweise ist dieser Expressionsverlust mitverantwortlich für die ausgeprägte klinische Apoptoseresistenz der Nierenzellkarzinome.

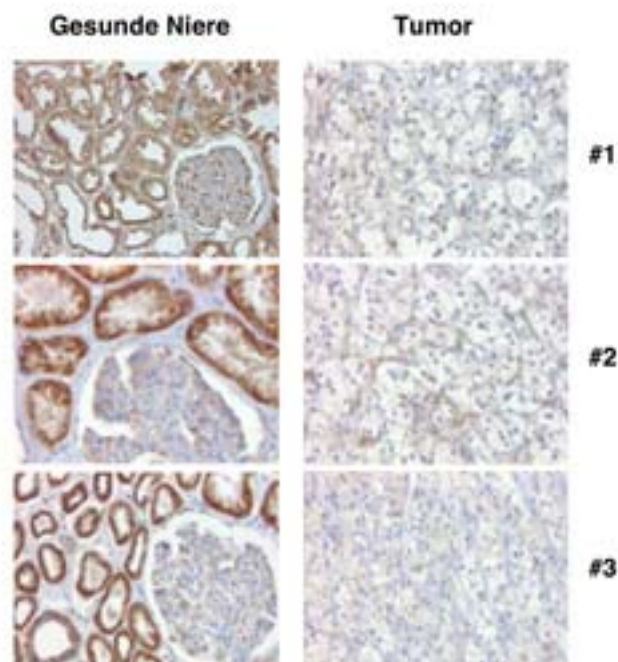


Abb. 11: Nbk/Bik Expression in der gesunden Niere und im Klarzelltumor der Niere von 3 Patienten.

Immunohistochemische Expressionsanalyse (polyklonaler Antikörper gegen ein N-terminale Epitop von Nbk, Vergrößerung 200x). Bei 28 Patienten war die Untersuchung von

normalem und malignem Nierengewebe auf einem Objektträger möglich. Der Expressionsverlust war signifikant (Wilcoxon's Rank test $p < 0.0001$). Insgesamt wurden 57 Tumorproben untersucht: es wurde keine Korrelation zum TNM-Stadium oder Grading gefunden. Zelllinienexperimente konnten DNA-Hypermethylierung als Mechanismus der Expressionsrepression nachweisen; zusätzlich war in 4 von 10 Zelllinien mittels FISH-Analyse eine Deletion des Genlocus 22q11 aufgefallen. In Mutationsanalysen wurde ein single nucleotide polymorphism (SNP) ohne Bezug zu Nbk/Bik-Expression gefunden⁶⁸.