

6 Unterschiedliche zytotoxische Therapien nutzen differente Signalwegskomponenten

Ein weiterer Grund für die unzureichende prognostische Relevanz von einzig auf p53 beschränkten Analysen für Therapieansprechen auf zytotoxische Tumorthérapien dürfte zudem in der Tatsache begründet sein, dass nicht alle Tumorthérapeutika über p53-abhängige Signalwege wirken. Bei dem Vergleich des p53-Status mit der Empfindlichkeit von primären B-CLL Zellen für ein Panel von Zytostatika, sowie ionisierende Bestrahlung zeigte sich, dass p53-Mutation mit Resistenz gegenüber Bestrahlung, Alkylantien, sowie Nukleosidanaloga wie z.B. Fludarabin bzw. Cladribin korrelierte (**Abb. 12**).

Hingegen zeigte sich kein Einfluss bezüglich der Apoptose-Induktion durch Anthrazykline wie z.B. Doxorubicin, Vinca-Alkaloide, wie z.B. Vincristin, sowie Glukokortikoide³¹. Vergleichbare Daten liegen uns auch für die funktionellen Konsequenzen einer Inaktivierung von Bax vor, wobei sich interessanterweise das Resistenzprofil von dem p53-mutierter B-CLL Zellen unterscheidet. Verlust von Bax war mit Resistenz gegenüber Anthrazyklinen, Alkylantien, und Vincristin assoziiert, wohingegen Nukleosidanaloga und Glukokortikoide unabhängig von Bax Apoptose induzierten⁶⁹.

Diese Daten zur Nutzung selektiver Zelltodsignalwege durch zytotoxische Tumorthérapeutika werden unterstützt von präklinischen Untersuchungen, die zeigten, dass auch Taxane ihre Antitumorwirkung unabhängig von p53 entfalten⁷⁰. Für die p53-Unabhängigkeit des Taxan-induzierten Zelltods sprechen auch klinische Daten, die gute Wirksamkeit von Taxanen in Ovarial- und Mammkarzinomen mit gestörtem p53 zeigen⁷¹⁻⁷³. Diese Daten belegen, dass spezifische Signalwegsdefekte durch die rationale Wahl eines geeigneten Therapeutikums umgangen und das klinische Ansprechen maligner Tumoren trotz Vorliegens zentraler genetischer Defekte bereits heutzutage durch Einsatz geeigneter, konventioneller zytotoxischer Tumorthérapien erreicht werden kann.

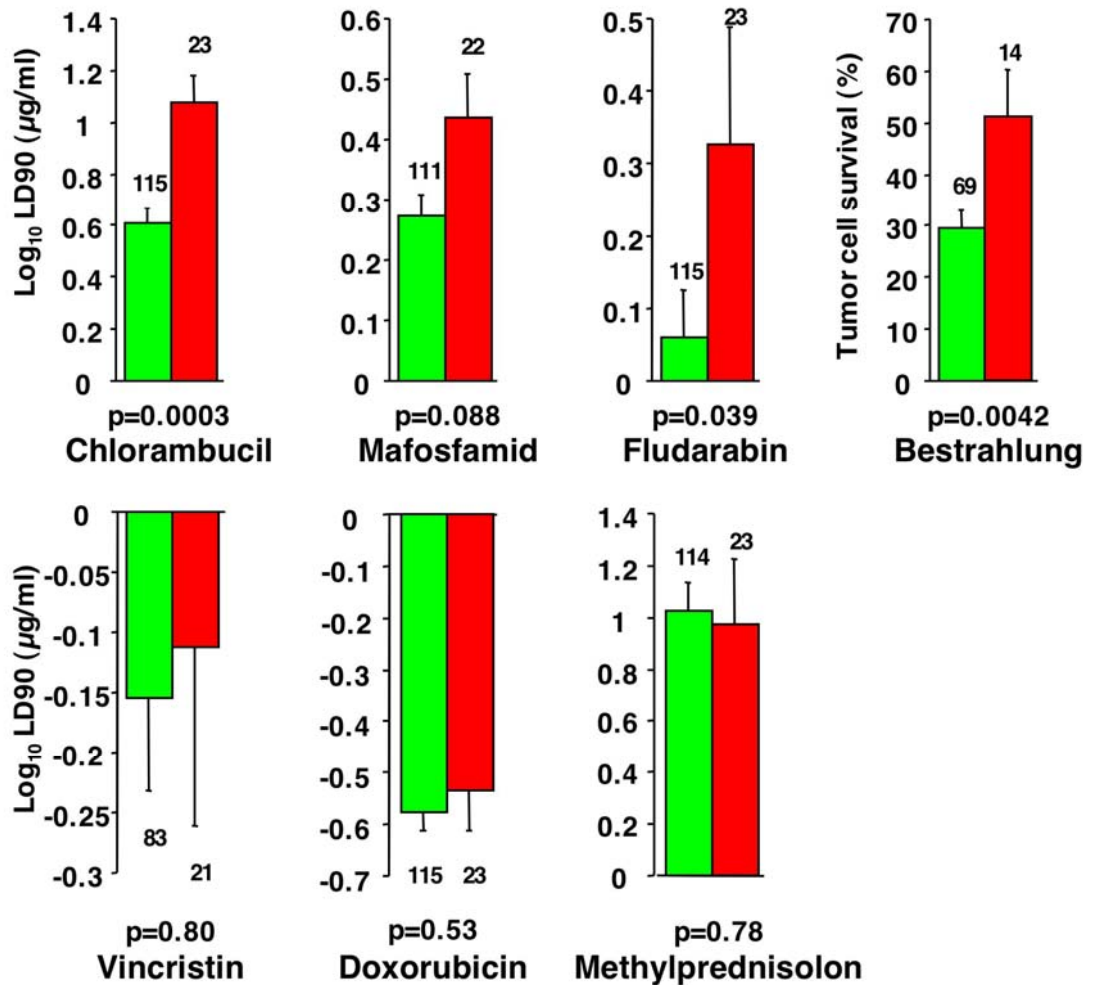


Abb. 12: Therapie-induzierter Zelltod und p53 Status in B-CLL Zellen.

Leukämiezellen von Patienten mit B-CLL wurden *ex vivo* auf Empfindlichkeit für zytotoxische Tumorthherapie untersucht. Gezeigt sind logarithmierte LD90 Daten (Chemotherapeutika) bzw. prozentuales Überleben der Leukämiezellen nach Bestrahlung mit γ -Bestrahlung (2 Gy). Grüne Balken: p53-Wildtyp, rote Balken: Leukämiezellen mit mutiertem p53. Signifikanzniveaus wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests berechnet. Zahlen über den Balken stehen für die Anzahl getesteter Patienten. Insgesamt zeigten 23 der 138 untersuchten CLL-Patienten p53-Mutationen der Tumorzell-DNA³¹.

Weitere Hinweise für die differentielle Bedeutung von Komponenten des p53-Signalweges erhielten wir aus der Untersuchung von Kolonkarzinomzellen (HCT116). In einem isogenen Zellsystem mit knock-out von entweder p53 (p53^{-/-}), Bax (Bax^{-/-}) oder p21^{Cip/Waf} (p21^{-/-}) konnten wir zeigen, dass p53-Verlust alleine nicht zu einer ausgeprägten Resistenz gegenüber Bestrahlung, 5-FU oder Hitzeschock/Hyperthermie führt. Für

p21^{Cip/Waf} zeigte sich, dass der Verlust zu einer Sensibilisierung für Zelltodinduktion nach Bestrahlung und, stärker noch, für das Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU) führte. Der Verlust von Bax resultierte in diesem in vitro System interessanterweise nur in einer geringen Resistenz gegenüber Bestrahlung und 5-FU, führte aber zu einer deutlichen Resistenz gegenüber Hitzeschock/Hyperthermie-induziertem Zelltod (Abb. 13).

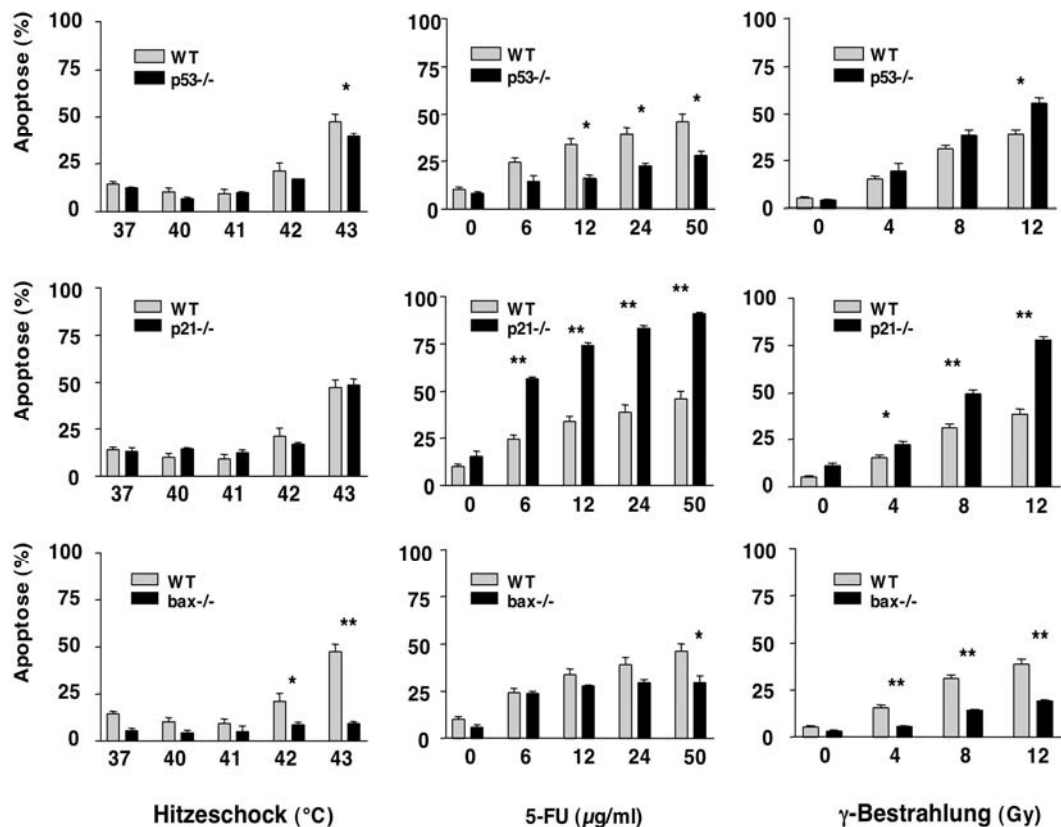


Abb. 13: Therapie-induzierter Zelltod in Relation zu p53-, Bax- und p21^{Cip/Waf}-Status von HCT116-Kolonkarzinomzellen

Isogene HCT116 Zellen wurden in vitro mit unterschiedlichen Dosen von Hitzeschock, 5-Fluorouracil (5-FU) und ionisierender Bestrahlung behandelt. Apoptose wurde nach 72 Stunden auf Einzelzellebene durchflusszytometrisch mittels Messung des zellulären DNA-Gehaltes bestimmt. Graue Balken: Wildtyp (WT). Schwarze Balken: p53-/- (obere Reihe), p21-/- (untere Reihe), Bax -/- (mittlere Reihe). Signifikanzniveaus wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests berechnet. ** p < 0.005, * p < 0.05⁷⁴

Diese Ergebnisse werden bestätigt durch die Untersuchung der erwähnten Tumorproben von Patienten mit Rektumkarzinom, die neoadjuvant mit einer multimodalen Therapie aus 5-FU und Bestrahlung ± Hyperthermie behandelt wurden²⁴.

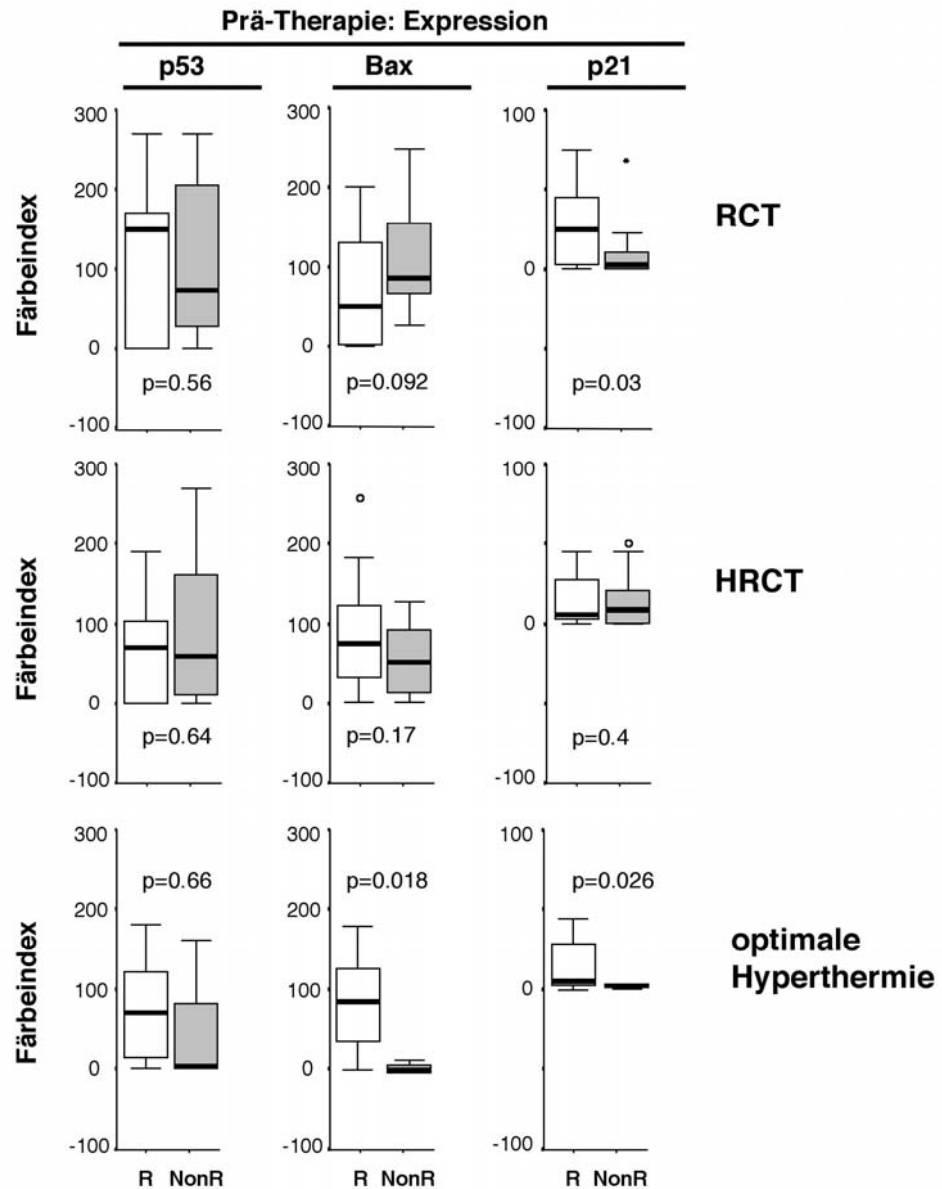


Abb. 14: Prä-Therapie-Expression von p53, Bax und p21 und lokale Tumorkontrolle bei Rektumkarzinompatienten.

66 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom (T3/T4, 63 Pat. pM0, 3 Pat. pM1) wurden neoadjuvant mit 5-FU und Bestrahlung \pm Hyperthermie behandelt und im Anschluss tumorreseziert. Proteinexpressionsprofile wurden verglichen zwischen Respondern (R) und Nonrespondern (NonR). Unterschiede im Färbeindex (Produkt aus Prozentsatz positiver Zellen (0-100) und Färbeintensität (0-3)) wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests berechnet. RCT: nur Radiochemotherapie. HRCT: alle Patienten, die zu RCT + Hyperthermie randomisiert waren. Optimale Hyperthermie: nur Patienten, in denen $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$ für mehr als 120 Minuten erreicht wurde.

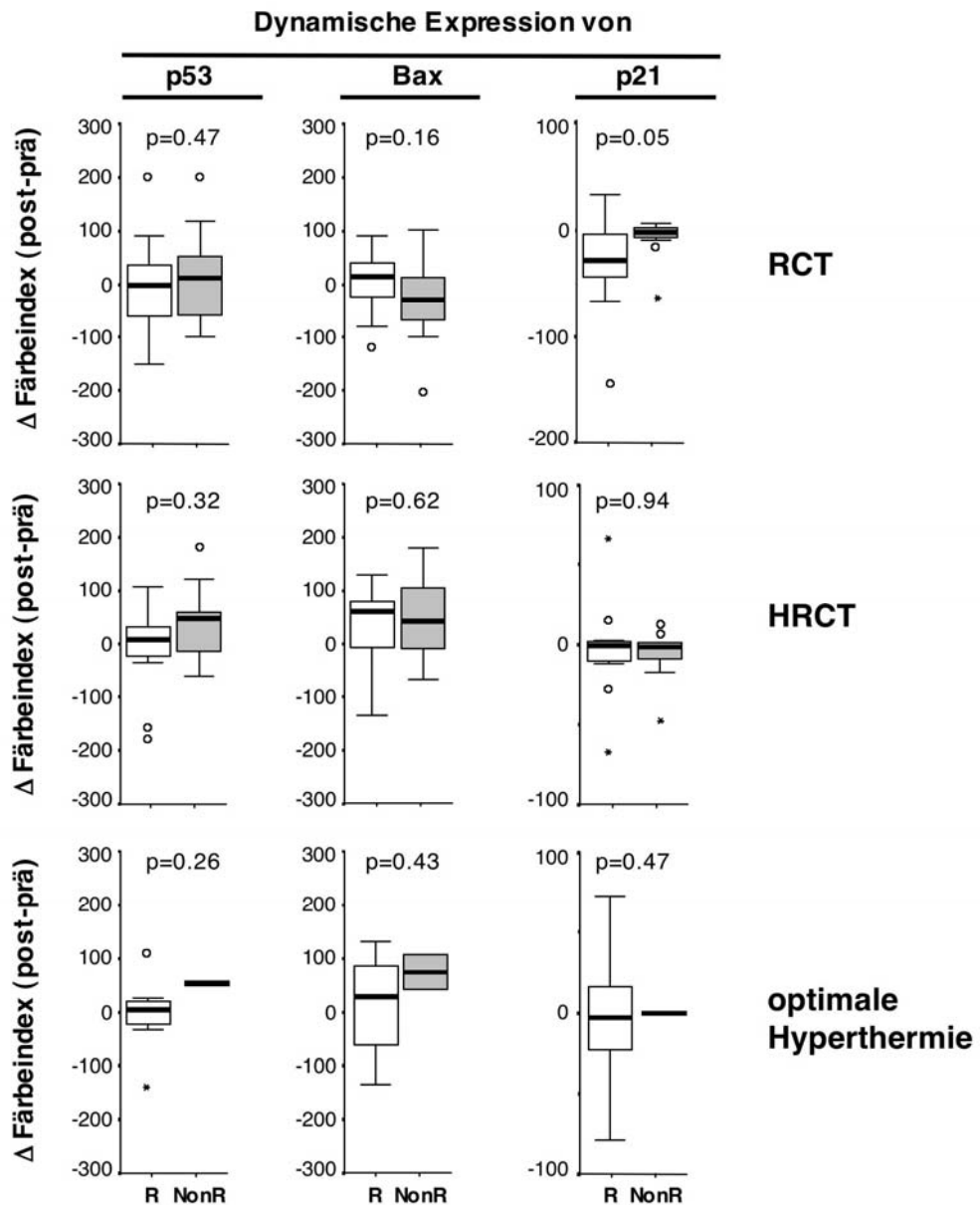


Abb. 15: Neoadjuvant therapierte Rektumkarzinome. Hochregulation von $p21^{Cip/Waf}$ ist bei alleiniger Radiochemotherapie mit verminderter lokaler Tumorkontrolle assoziiert

66 Patienten mit lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom (T3/T4, 63 Pat. pM0, 3 Pat. pM1) wurden neoadjuvant mit 5-FU und Bestrahlung \pm Hyperthermie behandelt 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. Weiße Balken: Responder (R), graue Balken: Nonresponder (NonR). Unterschiede im Färbeindex (Produkt aus Prozentsatz positiver Zellen (0-100) und Färbeintensität (0-3)) wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests berechnet. RCT: nur Radiochemotherapie. HRCT: alle Patienten, die zu RCT + Hyperthermie randomisiert waren. Optimale Hyperthermie: vgl. Abb. 14⁷⁴.

Eine geringe Bax-Expression war mit einem signifikant schlechteren Ansprechen des Rektumkarzinoms verbunden, wenn die Patienten mit optimaler Hyperthermie ($\geq 40.5^{\circ}\text{C}$ für ≥ 120 Minuten) behandelt wurden (**Abb 14**). Gleichermassen war die Hochregulation von p21^{Cip/Waf} durch die neoadjuvante Therapie mit einem schlechteren lokalen Ansprechen auf die Radiochemotherapie verbunden (**Abb 15**).