1. Einleitung

1.1. Deregulation von Apoptose in Tumoren

Die Hauptursachen beim Umschalten von normalem zu malignem Zellwachstum stellen die direkte oder indirekte Störung der Zellzyklusregulation und der Apoptose dar. In den letzten Jahren wurde nachgewiesen, daß die verschiedenen Behandlungsmethoden bei malignen Erkrankungen wie Chemotherapie oder auch Strahlentherapie über die Induktion von Apoptose wirken. Dabei töten die Zytostatika die Zellen nicht direkt, sondern schädigen die DNA und verursachen auf diese Weise die Aktivierung endogener Suizidprogramme.

Die Zahl der Zellen in einem Organ wird durch die Rate der Zellimmigration, der Zellteilung und des Zelltods bestimmt. Der Zellverlust durch programmierten Zelltod, Apoptose, geschieht in vielen Geweben in unterschiedlichen Stadien der Zelldifferenzierung. Defekte in den Prozessen, die den programmierten Zelltod kontrollieren, können das Zellüberleben verlängern und zum neoplastischen Zellwachstum unabhängig von der Zellteilung beitragen. Fehler in der Regulation des Apoptosesignalweges können zu einer genetisch instabilen Umgebung und Akkumulation von Genmutationen, Unterdrückung von Immunantworten, Umgehung von Zellzyklus-Kontrollpunkten, die normalerweise Apoptose induzieren würden, Wachstumsfaktor/Hormon-unabhängiges Zellüberleben, Unterstützung des Zellüberlebens während der Metastasierung und der Resistenz gegenüber zytotoxische Chemotherapeutika und Strahlung führen.

Ähnlich dem Zellzyklus umfaßt auch der programmierte Zelltod ein komplexes Netzwerk aus Apoptose-Förderern und -Inhibitoren, um das Gleichgewicht für eine normale Zellhomöostase zu gewährleisten. Zu den Kernregulatoren der Apoptose gehören Proteine, die oft als Multigenfamilien mit zahlreichen Homologen existieren. Dazu zählen u.a. die Familie der TNF-Todesrezeptoren, die Familie der Caspasen, die Bcl-2-Familie, die IAP-Proteinfamilie und APAF-1.

Die Bedeutung der Apoptose bei der Chemotherapie wird zur Zeit ausführlich erforscht. So konnte gezeigt werden, daß im wesentlichen alle traditionellen Zytostatika ihre zytotoxische Wirkung über den Apoptosesignalweg ausüben. Die Regulation der Apoptosesignalwege spielt jedoch nicht nur bei der Behandlung von malignen Erkrankungen eine Rolle, sondern ist auch an der Ausbildung von Resistenzen gegenüber

Zelltodinduktion beteiligt. Defekte in der Zelltodregulation kann die Resistenz gegenüber der Therapie zur Konsequenz haben, nicht weil durch die Chemotherapeutika oder Strahlung kein Schaden der DNA, Mikrotubuli oder anderer Strukturen induziert wird, sondern weil die Tumorzellen nicht sterben und Möglichkeiten zur Reparatur haben. Im Falle der Caspasen wurden einige Beispiele für den Expressionsverlust oder Mutationsinaktivierung von Caspasegenen in humanen Tumorzellinien gefunden (Zapata et al., 1998; Benjamin et al., 1998; Yamamoto et al., 1998). Die Inhibition von Todesrezeptorsignalen durch zelluläres FLIP ist mit der Fas-Resistenz in einigen Tumortypen verbunden (Irmler et al., 1997). Die Resistenz im Fas-Todesrezeptor-Signalweg verhindert z.B. die Apoptose von Tumoren durch zytolytische T-Zellen und NK-Zellen (Golstein, 1997). Es existieren mittlerweile viele Daten über Veränderungen in der Expression von pro-und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie in Tumorzellen und Resistenzentwicklung gegen zytotoxische Tumortherapien. Einige dazuführende Mechanismen beinhalten strukturelle Veränderungen, wie die Bcl-2-aktivierende chromosomale Translokation, Einzelnukleotid-Substitution und Bax-inaktivierende Frameshift-Mutationen (Rampino et al., 1997) sowie transkriptionale und posttranskriptionale Regulationen, die auch zur Ausbildung von Resistenzen gegenüber diversen Apoptosestimuli führen.

1.2. Therapie und Resistenz bei Krebserkrankungen

1.2.1. Das Mammakarzinom

Der Anteil an Mammakarzinomen beträgt etwa ein Drittel aller maligner Tumore bei Frauen. Die Inzidenz liegt in Europa bei 30-60/100 000 pro Jahr, mit einer jährlichen Zuwachsrate von etwa 3 % (Miller, 1991).

Bei 35 % der weiblichen Bevölkerung liegt ein erhöhtes Mammakarzinomrisiko vor. Zu den Risikofaktoren für die Mehrzahl aller Erkrankungen zählen Alter über 50 Jahre, Alkoholkonsum, exogene Hormone, Strahlenbelastung, fettreiche Nahrung und Adipositas.

Genetische Ursachen sind bei etwa 5% der Frauen für eine Erkrankung mitverantwortlich. Auf molekularer Ebene spielen die 4 Tumorsuppressorgene BRCA-1, BRCA-2, p53 und das Ataxia teleangiectatica-Gen AT eine besondere Rolle (Buchholz et al., 1999).

Mutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA-1 oder BRCA-2 sind mit einem 85 % igen Risiko der Brustkrebsentstehung verbunden. Keimbahnmutationen im p53-Gen treten bei weniger als 10 % aller familiär auftretenden Mammakarzinomfälle auf, vorwiegend bei Patientinnen mit Li-Fraumeni-Syndrom, jedoch wesentlich häufiger als somatische Mutationen bei den sporadischen Brustkrebserkrankungen. BRCA-1 kann die p53-abhängige Genexpression durch einen post-transkriptionalen Mechanismus aktivieren. BRCA-1-stabilisiertes p53 zeigt erhöhte Sequenz-spezifische DNA-Bindung und transkriptionale Aktivität (Somasundaram et al., 1999).

Die Prognose der Patientinnen korreliert eng mit der Größe des Primärtumors und dem Lymphknotenstatus. Es können auch nach Ablauf der Fünfjahresüberlebenszeit in einem Zeitraum von bis zu 20 Jahren noch lokale Rezidive und/oder Fernmetastasen auftreten. Der wichtigste prognostische Faktor für das Therapieansprechen beim Mammakarzinom ist der axilläre Lymphknotenstatus. Zu den neueren Prognosefaktoren gehören Proliferationsmarker (Thymidinmarkierung, Topoisomerase II, Ki 67), Tumorsuppressor-Gene (p53, RB, c-myc), Resistenzfaktoren (MDR-1, Glutathion-S-Transferase), Wachstumsfaktoren/-rezeptoren (EGF-R, c-erbB2,3, TGF-alpha, TGF-beta), die Gewebe-infiltration oder auch Hitzeschock-Proteine (Seeber und Becher, 1995).

.

1.2.2. Chemotherapie

Die derzeit optimale Behandlungsstrategie besteht in einer den jeweiligen Bedingungen angepaßten sequentiellen Anwendung von chirurgischen Maßnahmen, Strahlentherapie sowie primärer und adjuvanter Chemotherapie. Ziel ist es, falls eine Heilung nicht möglich ist, bei der oft langjährig erforderlichen Therapie eine maximale Lebensqualität für die Patientinnen zu erhalten oder wieder herzustellen und gleichzeitig eine möglichst lange Überlebensdauer zu erreichen.

Um die Chemotherapie möglichst effektiv anzuwenden, werden unterschiedlich wirkende Zytostatika kombiniert eingesetzt. Bei Anthrazyklin-haltigen Chemotherapieprotokollen werden zum Beispiel Doxorubicin oder Epirubicin mit Cyclophosphamid und /oder 5-Fluoruracil kombiniert. Eine Standardbehandlung bei adjuvanter Therapie besteht aus der Kombination aus Cyclophosphamid, Methothrexat und 5-Fluoruracil (CMF-Schema). Taxane wie Docetaxel (Taxotere) und Paclitaxel zählen zu den wirksamsten Therapeutika bei der Behandlung von metastatischem Brustkrebs. Die Wirkungsweise der verschiedenen zellschädigenden Einflüsse ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

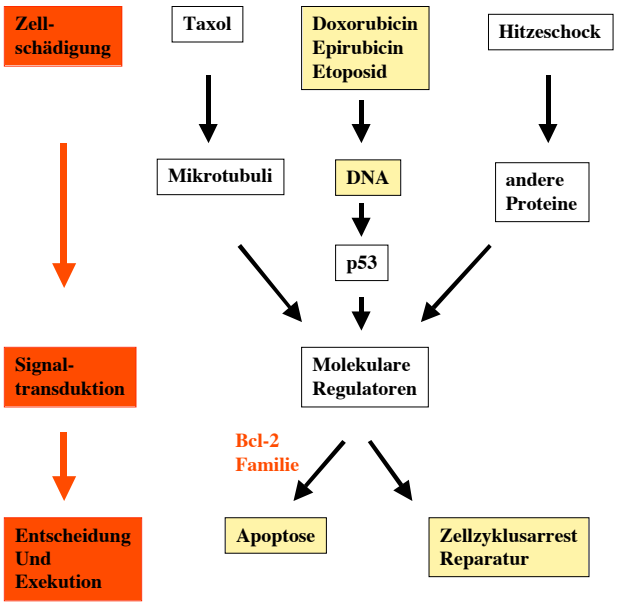

Abb.1: Schematische Darstellung der Wirkungsweise verschiedener zellschädigender Stimuli zur Krebsbehandlung

1.2.2.1. Epipodophyllotoxin: Etoposid

DNA–Topoisomerasen sind das Angriffsziel verschiedener Gruppen von Zytostatika. Man unterscheidet zwei Gruppen von Topoisomerase II Inhibitoren, katalytische Inhibitoren und Topoisomerase II Gifte. Die zweite Gruppe kann in DNA-Interkalatoren und nicht-interkalierende Substanzen unterteilt werden (Strumberg, Pommier et al., 1999).

Das Chemotherapeutikum Etoposid (VP-16) gehört zu der Gruppe der Epipodophyllotoxine, die ebenfalls die Topoisomerase II inhibieren, aber nicht in die DNA interkalieren.

Die DNA-Topoisomerasen sind in der Lage, den Superspiralisierungsgrad intrazellulärer DNA zu kontrollieren und auf diese Weise auch die Wechselwirkung anderer Proteine mit der DNA zu beeinflussen. Diese Enzyme können die bei der DNA-Replikation, Transkription, Rekombination und anderen Prozessen auftretenden topologischen Probleme, wie z.B. wie Überwindung, Verkettung oder Verknotung, beheben. Bisher sind beim Menschen zwei Gruppen solcher Enzyme bekannt, die Topoisomerase I und II (Wang, 1996). Topoisomerasen I verursachen Einzelstrangbrüche. Dadurch kann sich die DNA um den anderen Strang drehen und entwinden.

Die Topoisomerase II alpha und beta liegen beide im Nukleus als Homodimere aus zwei identischen Einheiten vor und benötigen ATP und Mg(II), um die Spaltung beider

DNA–Stränge der Doppelhelix zu katalysieren (Watt und Hickson, 1994). Dabei befinden sich zwischen den beiden versetzten Einschnitten vier Basenpaare. Eine andere DNA–Doppelhelix kann sich durch den doppelten Strangbruch hindurchwinden, bevor die Stränge wieder ligiert werden. Der Strangbruch wird über das dimere Enzym fixiert, indem eine Tyrosylseitenkette des Enzyms die Phosphodiesterbindung angreift und mit jedem der beiden DNA-Stränge eine kovalente 5`-Phospho-Tyrosinbindung bildet (Rowe et al., 1986). Dadurch entsteht eine Lücke im Doppelstrang, deren Enden mit jeweils einer Hälfte des Topoisomerase II Dimers geschützt ist. Dieser Protein/ DNA Komplex wird spaltbarer Komplex genannt. Nach Passage des anderen Doppelstranges durch die Lücke wird der transiente Doppelstrangbruch wieder ligiert. Topoisomerase II Inhibitoren binden an den binären DNA–Enzymkomplex und bilden einen ternären Komplex. Auf diese Weise wird sowohl die katalytische Aktivität des Enzyms gehemmt als auch eine oder beide Enzymeinheiten in ihrer Komplexbildung mit einem bzw. beiden DNA–Strängen stabilisiert und damit die Wiedervereinigung der DNA-Stränge und folglich die Replikation und Transkription inhibiert. Das heißt, die Hemmung der Topoisomerase II induziert letale DNA Doppelstrangbrüche.

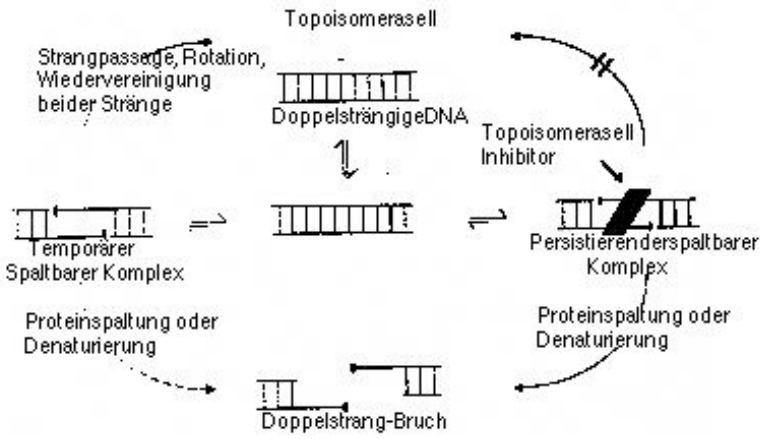

Abb.2: Mechanismus der Wirkungsweise der Topoisomerase II Inhibitoren

Die Wirkung der Topoisomerase II alpha Inhibitoren ist stark Zellzyklus-abhängig, weil das Enzym selbst in den Zellzyklusphasen sehr unterschiedlich exprimiert wird. Es konnte eine schwache Expression während der G0/G1 Phase nachgewiesen werden, die in der S-Phase stark ansteigt und in der G2/M Phase ihr Maximum erreicht (Krishan et al., 1975). Es ist bekannt, daß ein Mangel an Topoisomerase II in proliferierenden Zellen zum

Absterben dieser Zellen führt, in ruhenden Zellen jedoch keinen Einfluß hat (Sullivan et al., 1987).

Neben der Hemmung der Topoisomerase II existieren weitere Mechanismen der Zytotoxizität von Etoposid. Dazu gehört die Bildung von DNA-Strangbrüchen, die jedoch nicht aus der DNA-Schädigung von Etoposid selbst entstehen, sondern als Ergebnis des intrazellulären enzymatischen Metabolismus des Chemotherapeutikums (Haim et al. 1986). Der Dimethoxyphenolring kann durch Oxidation in ein Phenoxyradikal übergehen, das wiederum durch Oxidation zum Orthochinon und weitere Reduktion zum Semichinon werden kann (Abb.3). Die metabolischen Produkte wie das Orthochinon und die kurzlebigen Zwischenprodukte Phenoxy- und Semichinonradikal sind an verschiedenen chemischen Reaktionen beteiligt, die die DNA und andere Zellbestandteile schädigen. So kann zum Beispiel das Phenoxyradikal direkt intrazelluläre Thiole oxidieren (Tyurina et al., 1995). Das Orthochinonderivat von Etoposid kann fest an doppelsträngige DNA binden und diese biologisch inaktivieren. Es existieren außerdem Daten, daß die zytotoxische Aktivität von Etoposid durch thiolabhängigen oxidativen Stress erhöht werden kann (Gantchev und Hunting, 1997).

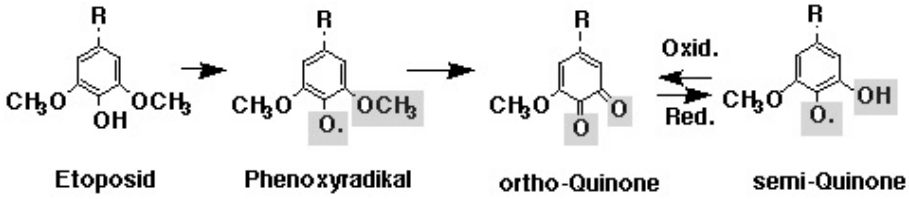

Abb. 3: Mechanismus der Bildung von Sauerstoffradikalen bei Etoposid

1.2.2.2. Anthrazykline

Epirubicin, Doxorubicin und Daunorubicin gehören zu den Anthrazyklin-Antitumor-Antibiotika. Sie werden aus verschiedenen Spezies von Streptomyces isoliert.

Die mit Anthrazyklinen verursachten DNA-Schäden entstehen durch die Interkalation in die DNA (Di Marco et al., 1984), die Hemmung der DNA- und RNA-Synthese, die Hemmung der Topoisomerase II (Ross et al., 1978), Aconitase, Beeinflussung des Ceramidmetabolismus und die Bildung freier Sauerstoffradikale (Lown et al., 1977). Epirubicin unterscheidet sich als Isomer strukturell nur geringfügig von Doxorubicin, ist aber aufgrund des niedrigeren pKa-Wertes (keine Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur

Aminogruppe) lipophiler und kann deshalb schneller die Zellmembran durchdringen (Mouridsen et al., 1990). Der größte Anteil des intrazellulären Wirkstoffes der Anthrazykline ist im Zellkern nachweisbar, wo er in die DNA-Doppelhelix interkaliert und die Topoisomerase II hemmt.

DNA-Interkalation

Die DNA-Interkalation wurde 1963 von Lerman als nichtkovalente Wechselwirkung beschrieben, bei der die Wirkstoffmoleküle senkrecht zur Helixachse der DNA fixiert werden. Dies bewirkt eine vertikale Separierung der Basenpaare, das Zuckerphosphatrückgrat wird verformt und die Ganghöhe der Helix vergrößert. Dieser energetisch günstige Prozeß verläuft spontan. Die Watson-Crick-Wasserstoffbrücken werden dabei nicht gestört, aber durch Entwinden der DNA an der Bindungsstelle wird die reguläre helicale Struktur verändert und als dessen Folge wird die Funktion der DNA-bindenden Enzyme, wie DNA-Polymerasen und Topoisomerasen beeinflußt. Die Interkalation von Wirkstoffen, wie zum Beispiel Zytostatika, stellt also nur einen ersten Schritt in der DNA-Schädigung dar.

Hemmung der Topoisomerase II

Bei vielen Antitumormitteln wie den Anthrazyklinen Epirubicin und Doxorubicin sind die DNA-Topoisomerasen nach erfolgter DNA-Interkalation am Mechanismus beteiligt. Das Aufwinden der Doppelhelix als Folge der DNA-Interkalation kann zu einer Orientierung des Wirkstoffs führen, die für eine Bindung mit der Topoisomerase in dem ternären Komplex aus DNA, Enzym und Wirstoff günstig ist. Der Wirkstoff beeinflußt so deren Funktion bei der Spaltungs-Wiederverknüpfungsreaktion der DNA-Stränge. Dabei ist die Interkalation für die zielgerichtete Modulation der Topoisomerase II Funktionen zwar notwendig, aber nicht ausreichend. Es wurde eine starke Korrelation zwischen Interkalationsstärke und der Bildung des spaltbaren Komplexes aus DNA und Topoisomerase, jedoch nicht zwischen DNA-Interkalation und Antitumoraktivität nachgewiesen.

Bildung von Sauerstoffradikalen

Die Toxizität der Anthrazykline wird weiterhin durch Sauerstoff-abhängige DNA-Schädigung nach Bildung von freien Radikalen hervorgerufen. Dabei werden verschiedene

Möglichkeiten diskutiert, bei denen DNA-Strangbrüche verursachende Hydroxyradikale generiert werden (Pan et al., 1981). In der Abbildung 4 ist eine der Möglichkeiten dargestellt. Mit Hilfe des Flavoenzyms NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase als Katalysator kann nach einer Ein-Elektronen-Reduktion des Anthrazyklins ein Anthrazyklin-Semichinonradikal erzeugt werden, woraus durch Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff unter Regenerierung des Anthrazyklins ein Superoxidradikal entsteht. Sowohl aus dem Superoxidradikal als auch aus dem Anthrazyklin-Semichinonradikal können Hydroxiradikale gebildet werden, die DNA-Strangbrüche verursachen können (Hertzberg et al., 1984).

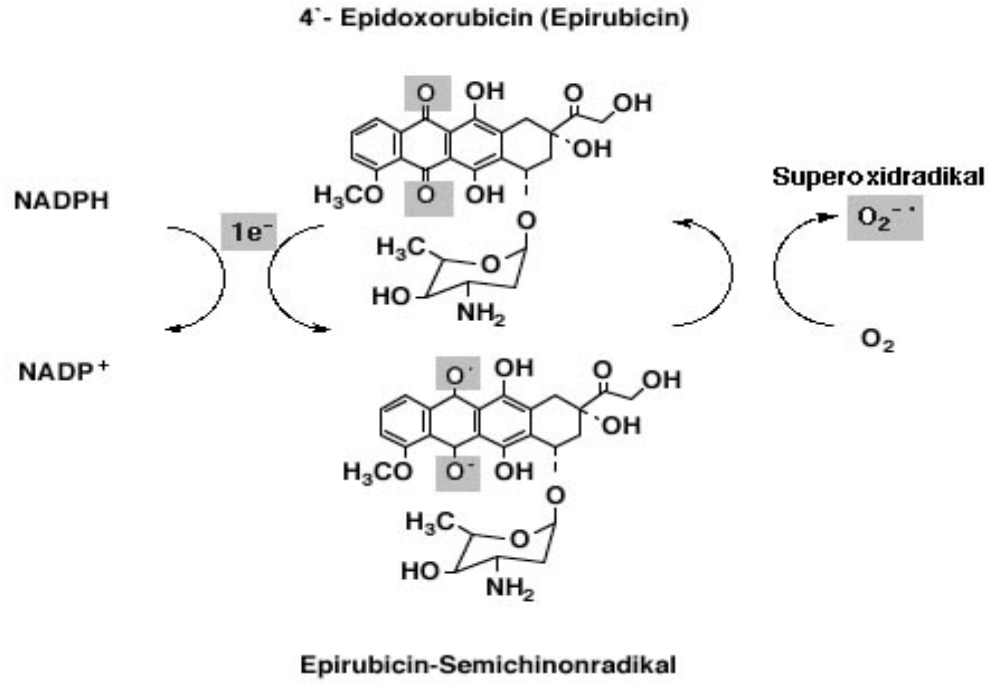

Abb.4: Mechanismus der Bildung von Sauerstoffradikalen bei Epirubicin

1.2.2.3. Taxol

Taxol gehört zur Klasse der Taxane. Es wurde zunächst aus der Rinde der Pazifischen Eibe gewonnen und wird heute synthetisch hergestellt.

Die Zytotoxizität von Taxol wird über eine Verstärkung der Tubulin-Polymerisation (Mikrotubulusbildung) vermittelt (Nicolaou, 1994a). Die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligten Mikrotubuli spielen bei der Übertragung von Zellsignalen, Zellbewegungen und dem Ablauf der Mitose eine Rolle. Vor der Mitose bricht das Zytoskelett zusammen und aus dem Tubulinpool entsteht die Mitosespindel.

Die Polymerisation des Tubulins findet oberhalb einer kritischen Konzentration statt. Taxol bewirkt eine Herabsetzung dieser kritischen Konzentration des Tubulins und verkürzt die Induktionszeit für die Polymerisation. Die entstehenden Mikrotubuli bestehen nur noch aus 12 statt 13 Profilamenten, haben also einen geringeren Durchmesser, sind kürzer und resistent gegenüber Depolymerisation. Die Isolierung von Tubulin in Form stabiler Strukturen führt zu einem Mangel an freiem Tubulin. Auf diese Weise verhindert Taxol die Ausbildung der Mitosespindel, hemmt die Fortbewegung der Zellen sowie den axonalen und intrazellulären Transport (Nicolaou 1994a).

Taxol arretiert die Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus, in der es an die □-Tubulin Untereinheit bindet, und blockiert so die Zellteilung. Aus diesem Zellzyklusarrest heraus sterben die Zellen (Griffon et al., 1997).

1.2.3. Hyperthermie

1.2.3.1. Hyperthermie als Therapiekonzept

Hyperthermie ist ein seit langem postuliertes Therapieprinzip bei der Krebsbehandlung. Hyperthermie-induzierte Apoptose wurde sowohl in hämatopoetischen Neoplasien als auch in Karzinom- und Sarkomzellen beschrieben (Sakaguchi et al., 1995; Fuller et al., 1994; Fairbairn et al., 1995; Barry et al., 1990; Yonezawa et al., 1996). Von besonderem Interesse ist, daß durch die Kombination von Hyperthermie mit Zytostatika bzw. ionisierender Strahlung verstärkt Apoptose ausgelöst werden kann (Gabai et al., 1995). Durch die kombinierte Hyperthermie und Zytostatikagabe konnte Apoptose auch bei zuvor Chemotherapie- und Strahlungs-refraktären Tumorzellen induziert werden (Osman et al., 1995; Shchepotin et al., 1994).

Die Erwärmung von Tumorzellen kann durch Energieapplikation von außen in Körperzellen mittels nichtinvasiver Techniken (Ultraschall und elektromagnetische Wellen im Mikrowellenbereich für lokale und regionale Hyperthermie, Infrarotstrahlung für die Ganzkörperhyperthermie) oder nichtinvasiver Techniken (interstitielle Hyperthermie, hypertherme Extremitätenperfusion) erzielt werden. Jedoch ist bisher wenig über die molekularen Zusammenhänge als zelluläre Antwort auf Hyperthermie bekannt. Unklar ist ebenfalls, warum einige Tumorzellen nach hyperthermer Behandlung sterben und andere Zellen Hyperthermie-unempfindlich sind.

1.2.3.2. Hyperthermie-induzierte Veränderungen in der Zelle

Während der Hyperthermie treten innerhalb des Energiemetabolismus und der gesteigerten Glycolyse verstärkt metabolische Reaktionen auf, die anschließend teilweise dereguliert ablaufen. Der Zellzyklus verläuft temperaturabhängig, wobei besonders die späte S-Phase und die Mitose thermosensitiv reagieren.

Infolge von Hyperthermie kommt es zu Konformationsänderungen von Proteinen, Destabilisierung von Makromolekülen und von multimolekularen Strukturen wie des Zytoskeletts und von Membranen (Streffer, 1985). Die Mikrotubuli des Zytoskeletts disaggregieren mit der Konsequenz, daß die mitotische Teilung nicht vervollständigt werden kann.

Als Antwort auf zellulären Stress werden konstitutiv im Zytoplasma vorhandene Hitzeschockfaktoren durch Hyperphosphorylierung und Trimerisierung aktiviert. Die folgende Translokalisierung in den Kern und Bindung an sogenannte Hitzeschockelemente in Hitzeschock-Genen hat die vermehrte Synthese von Hitzeschockproteinen zur Folge (Morimoto et al. 1992, Angelidis, 1991).

Alle Zellen, prokaryotisch und eukaryotisch, reagieren bei einer Temperaturerhöhung mit einer vermehrten Synthese von Hitzeschockproteinen (Hsp's, Stressproteine). Die Hsp's gehören zu den hochkonservierten Proteinen hinsichtlich Struktur und Funktion als molekulare Chaperone (Lindquist et al., 1988; Arrigo, 1998; Ellis, 1996). Sie umfassen mehrere Familien mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Das Hsp70 hat zytoprotektive Aktivität u.a. gegenüber Hitze, verschiedenen Zytostatika, Bestrahlung, oxidativen Stress (Jäättela, 1999). Hsp70 enthält drei für die Chaperonaktivität wichtige funktionelle Strukturen, eine ATPase-Domäne, eine Substrat-bindende Domäne und ein C-terminales EEVD-Motif, das die ATPase-Aktivität, die Substratbindung und die Wechselwirkung mit Cochaperonen reguliert (Bukau and Horwich, 1998; Freeman et al., 1995).

Unter Normalbedingungen hemmen Hsp70-Chaperone die Aggregation und unterstützen die Faltung und Zusammensetzung von Polypeptiden. In Hitze-behandelten Zellen kann Hsp70 die Aggregation hemmen und die Rückfaltung denaturierter Proteine unterstützen, d.h. der toxische Effekt denaturierter Proteine wird neutralisiert (Nollen et al., 1999).

Die Hitzeschockproteine, z.B. Hsp70 und Hsp27, sind oft in menschlichen Tumoren überexprimiert und ihre Expression korreliert in einigen Krebsarten mit schlechter Prognose und Therapieresistenz. Bei Brustkrebs ist Hsp70 z.B. ein prognostischer Faktor, der signifikant mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben, erhöhter Zellproliferation,

Differenzierung und Lymphknotenmetastasen korreliert (Ciocca et al., 1993). Einige Hitzeschockproteine sind somit wahrscheinlich eine Streßantwort der Zelle, die Apoptose hemmen soll. Die dabei auftretenden molekularen Effekte sind noch weitgehend unbekannt.

1.2.4. Chemotherapieresistenz

1.2.4.1. MDR-1-Phänotyp

Zu den größten Problemen der Krebstherapie zählt die erworbene und die intrinsische Chemotherapieresistenz. Die Kreuzresistenz gegen mehrere Substanzen unterschiedlicher chemischer Struktur und Wirkungsmechanismen bezeichnet man als Multidrug-Resistenz. Zytostatikaentgiftung, Veränderungen von Reparaturenzymen, Ziel- oder Transportproteinen können zur Ausbildung von Multidrug-Resistenz führen. Dabei wird der klassische und der atypische Phänotyp unterschieden. Das Resistenzspektrum der atypischen Multidrug-Resistenz umfaßt, wie auch die klassische Resistenz die Anthrazykline, Taxane und Epipodophyllotoxine wie Etoposid, jedoch nicht die Vinca-Alkaloide Vincristin oder Vinblastin.

Eine Ursache der Multidrug-Resistenz besteht in der Überexpression verschiedener Proteine wie MDR, MRP (Cole et al. 1992) und LRP (Schepper et al. 1993). Das am besten charakterisierte, mit dem Phänotyp der Multidrug-Resistenz im Zusammenhang stehende Protein ist das *mdr1*-Genprodukt P-Glykoprotein. Das humane Genom enthält zwei homologe Gene *mdr1* und *mdr2* auf dem langen Arm von Chromosom 7. In Transfektionsstudien wurde nachgewiesen, daß das *mdr1*-Gen für die Multidrug-Resistenz verantwortlich ist (Pastan et al., 1988; Baldini, 1997). Das P (Permeabilitäts) - Glykoprotein ist ein 170 kD großes membranständiges Transportprotein, das zur ATP-binding-cassette (ABC)-Superfamilie gehört (Roninson et al., 1987). Es besitzt 1280 Aminosäuren und besteht in seiner Quartärstruktur aus zwei nahezu identischen Hälften, die aus je sechs hydrophoben, membranüberspannenden Domänen und einer hydrophilen, zytoplasmatisch gelegenen Region mit potentiellem ATP-Bindungsort aufgebaut sind. Das Protein transportiert energieabhängig verschiedene lipophile Substanzen mit mittlerem Molekulargewicht aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum. Der erhöhte Bedarf der Zelle an ATP wird teilweise durch Glycolyse gedeckt (Schinkel et al 1993). In Zellen mit Mehrfachresistenzen kann eine größere Menge an Transportprotein durch Amplifizierung

des dafür kodierenden *mdr1*-Gens bereitgestellt werden. Die meisten vom P-Glykoprotein transportierten Substanzen sind hydrophob und gelangen über die Plasmamembran in die Zelle. Die verschiedenen zu transportierenden Moleküle konkurrieren um die Bindung an das P-Glykoprotein.

Die P-Glykoprotein-Pumpe dient dem Körper als Detoxifizierungssystem. Es wird in normalen Geweben wie der Leber, der Niere oder dem Dünndarm in großen Mengen gebildet, also in Organen, die toxische Substanzen aus dem Körper eliminieren. Zu den physiologischen Substraten zählen beispielsweise Steroidhormone, Peptide und Bilirubin. Aber auch Vergiftungen mit Tetrachlorkohlenstoff oder Arsen induzieren das *mdr1*-Gen.

Die Beteiligung des P-Glykoproteins an der Chemotherapie-Resistenz als zytoplasmatischer Entgifter überlappt mit der normalen physiologischen Funktion. *In vitro*-Untersuchungen zeigten weitere mögliche Funktionen des P-Glykoproteins, wie z.B. subzelluläre Zytostatikaverteilung, Volumenregulation und ATP-Kanal-Aktivität. Das P-Glykoprotein kann bifunktional als Transporter für Zytostatika oder als Anionenkanal wirken. Als Mechanismus der Multidrug-Resistenz wird eine reduzierte zelluläre Akkumulation und eine veränderte subzelluläre Verteilung der Zytostatika, wahrscheinlich in Folge der gesteigerten Entgiftung durch die MDR-1-Pumpe, beschrieben (Baldini, 1997). Der exakte Resistenzmechanismus aufgrund der Regulation der intrazellulären Zytostatikalevel durch die P-Glykoproteinexpression ist noch nicht geklärt. Transportexperimente zeigten, daß sowohl verringerter Influx als auch erhöhter Efflux für die geringen Level der Chemotherapeutika in der Zelle verantwortlich sein können. Generell bewirkt die Überexpression des P-Glykoproteins, daß die für den Zelltod nötige Wirkstoffkonzentration der Zytostatika erhöht werden muß (Gottesman und Pastan, 1993).

In den letzten Jahren wurden mit Pharmaka, monoklonalen Antikörpern, Immuntoxinen, bispezifischen Antikörpern, Antisenseoligonukleotiden oder Ribozymen verschiedene Strategien verfolgt, um den MDR1-Phänotyp zu revertieren (Volm, 1998).

1.2.4.2. Überwindung der MDR-1-Resistenz

Die Aktivität der P-Glykoproteinpumpe läßt sich durch pharmakologische Modulatoren beeinflussen. Zu den *in vitro* untersuchten Modulatoren zählen Kalziumkanalblocker, Calmodulin-Antagonisten, Cyclosporine und Anti-Östrogene. Die aktiven Substanzen haben häufig eine ähnliche Grundstruktur. Sie sind protonierbare, amphiphilische Verbindungen mit aromatischer Grundstruktur und ein oder mehr Aminoalkylgruppen

(Volm, 1990). Die klinisch größte Beachtung fanden die Cyclosporine oder Kalziumkanalblocker wie Verapamil, die in der Lage sind, kompetitiv an das P-Glykoprotein zu binden. Dadurch kann der Transport der zytotoxischen Substanzen aus der Zelle verhindert und somit eine effektive intrazelluläre Wirkstoffkonzentration wiederhergestellt werden. Allerdings wird die *in vivo*-Anwendung der Modulatoren durch verschiedene Faktoren begrenzt. Die Modulation der P-Glykoproteinexpression im Normalgewebe hat eine zusätzliche Toxizität zur Folge und verändert die Pharmakokinetik der Zytostatika. Im Falle der Kalziumkanalblocker limitiert die Kardiotoxizität die Anwendung. Trotz einiger vielversprechender Erfolge besonders bei hämatologischen Erkrankungen blieb der Erfolg bei soliden Tumoren weitgehend aus.

Zu den malignen Erkrankungen, für die der MDR-1-Phänotyp beschrieben wurde, gehören neben den Nieren-, Leber-und Kolonkarzinomen u.a. auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mammakarzinome. In normalen humanen Brustepithelialzellen wird kein MDR-1 exprimiert (Bittl et al., 1995; Sanfilippo et al., 1991). Im Allgemeinen sprechen Brustkrebstumore zunächst auf Chemotherapie an und werden infolge der Behandlung resistent. Es wurde eine MDR-1-Überexpression in 30-40 % bei primärem und 50 % bei metastatischem Brustkrebs beschrieben (Lehnert, 1998).

Die geringen Erfolge bei der Resistenzrevertierung mit den bisher beschriebenen Möglichkeiten lassen sich dadurch erklären, daß der MDR-Phänotyp bei weitem nicht die einzige Ursache für Therapie-refraktäre Tumorzellen ist. Für Adriamycin-resistente Tumore wurden P-Glykoprotein, Glutathion-S-Transferase, Topoisomerase, Thymidylat-synthase, Metallothionin und Hitzeschock-Proteine als Resistenz-assoziierte Proteine beschrieben (Volm, 1998). Außerdem sind Zellproliferation, Vaskularisierung und Apoptose an der Ausbildung von Resistenzen beteiligt.

1.3. Apoptose

1.3.1. Apoptose und Nekrose

Bei einem erwachsenen Menschen sterben jeden Tag ungefähr 50 bis 70 Milliarden Zellen durch programmierten Zelltod. Der Begriff „Apoptose“ beschreibt die morphologischen und biochemischen Veränderungen, die bei diesem kontrollierten Absterben von Zellen auftreten (Kerr, 1972).

Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose ein aktiver Prozeß, der mehrere aufeinanderfolgende Phasen durchläuft, in denen sich die Zelle selbst zerstört (Abb. 5). Zu den klassischen Merkmalen gehören das sogenannte Membran-„Blebbing“, das Zellschrumpfen und die Chromatinkondensation. Laminspaltung und die Zerstörung des Zytoskeletts führen zunächst zur Ausbildung von Ausstülpungen an der Zelloberfläche, die später als apoptotische Körperchen, bestehend aus Zell- und Kernfragmenten, abgeschnürt werden. Es werden Endonukleasen aktiviert, die chromosomale DNA in oligonukleosomale Fragmente, mit einer Größe von ca. 180 bp - 200 bp, oder ganze Vielfache davon, verdauen (sogenannte DNA-Leiter). Anders als bei der Nekrose desintegrieren apoptotische Zellen erst zu einem späteren Zeitpunkt. Apoptotische Zellen werden über Phagozytose entfernt (Wyllie et al., 1980; Walker et al.; 1988; Arends und Wyllie, 1991).

Der nekrotische Zelltod wird oft von Entzündungserscheinungen begleitet. Dabei beginnen zunächst die Zellen und Zellorganellen infolge von stark erhöhter Membranpermeabilität zu schwellen. Die Zerstörung der Membranintegrität führt zur Freisetzung lysomaler Enzyme, die den Desintegrationsvorgang beschleunigen (Kerr et al., 1994, Wyllie et al., 1980).

Apoptose ist ein wesentlicher physiologischer Prozeß zur selektiven Eliminierung von Zellen. Er spielt in der Embryonalentwicklung, der Entwicklung, Differenzierung und Homöostase von Gewebe und der Reaktion auf Pathogene eine wesentliche Rolle. Störungen bei der Regulation der Apoptose können in verschiedenen Erkrankungen resultieren. Zu viel Apoptose kann zum Beispiel zu T-Zelldepletion bei HIV-Infektionen oder zu neurodegenerativen Erkrankungen (Alzheimer-Erkrankung) führen (Kroemer et al., 1997). Wird der Prozeß inhibiert, so können Krebserkrankungen entstehen, wobei der

Prozeß der Apoptose sowohl mit der Tumorgenese als auch mit dem Therapieansprechen und der Bildung von Metastasen assoziiert ist.

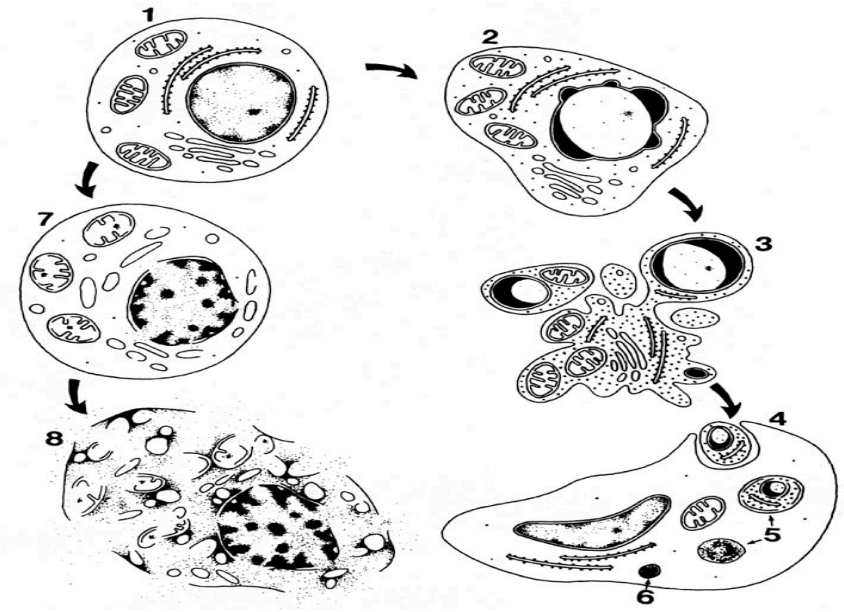

Abb.5: Strukturelle Veränderungen im Prozeß der Apoptose (2-6) und der Nekrose (7-8):
(1) normale Zelle; (2) Chromatin kondensiert und segregiert an der Kernhülle, Veränderungen von Kern-und Zellgrenzen; (3) Kernfragmentierung; (4) Phagozytose der apoptotischen Körperchen von benachbarten Zellen und Degradation innerhalb von Lysosomen (5) zu reduzierten Resten (6); Zusammenklumpen des Chromatins ohne wesentliche Veränderung in der Verteilung (7); Zerstörung der Membranen, Desintegration von Organellen und Membranen (8) (Kerr et al., 1997)

Viele Komponenten der Apoptosemaschinerie und ihre Konservierung innerhalb der Evolution wurden in den letzten Jahren mittels genetischen und biochemischen Experimenten in Säugern und den Nematoden *Caenorhabditis elegans (C.elegans)* identifiziert.

1.3.2. Apoptosesignalwege

Man unterscheidet bisher drei, parallel induzierbare Apoptosesignalwege (Abb. 4), die durch Rezeptoren (death receptors), den Mitochondrien oder dem endoplasmatischen Reticulum kontrolliert werden. Die Analyse dieser verschiedenen Signalwege führte zu der Definition des Zelltod-induzierenden Komplexes (DISC: death-inducing signaling complex) und dem mitochondrialen Apoptosom.

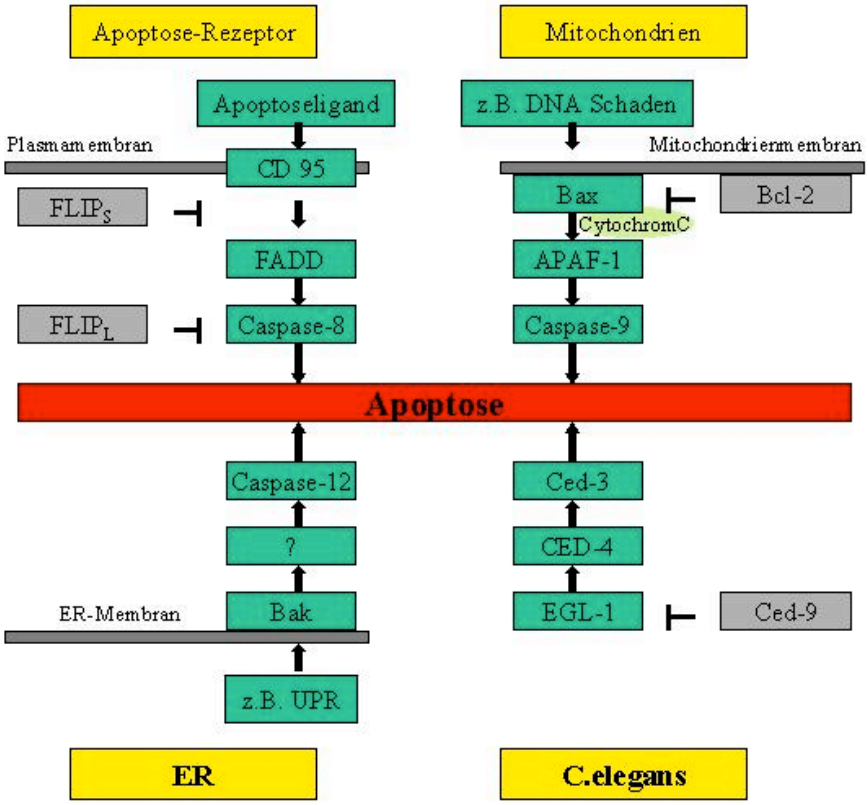

Abb.6: Apoptosesignalwege: *Verschiedene Zelltodsignale resultieren in gleiche morphologische und biochemische Merkmale der Apoptose (UPR: unfolded protein response, ER: Endoplasmatisches Retikulum).*

1.3.2.1. Rezeptor-vermittelte Apoptose

Verschiedene Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie können nicht nur die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Zellen sondern auch Zelltod auslösen, indem sie zytotoxische Signale von der Zelloberfläche ins Zytoplasma übertragen (Schultze-Osthoff 1998). Die Bildung eines DISC wird durch einen Apoptose-Promotor, wie z.B. einem Apoptoseliganden, ausgelöst. Trimere Liganden wie Fas (CD95), TRAIL oder TNF binden an die Todesdomäne (DD: death domain) ihrer Rezeptoren und induzieren, über die Rekrutierung von Adaptermolekülen wie FADD, innerhalb des TNF- und Fas-Signalweges, Apoptose (Cohen, 1997; Nagata, 1997). Die Adaptermoleküle rekrutieren Procaspasen, die auf diese Weise zu enzymatisch aktiven Heterotetrameren aktiviert werden. Bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose spielt vor allem die Caspase-8 eine zentrale Rolle. Sie wird innerhalb der CD95/Fas-, TNF-R1- und TRAIL (DR3 und DR4)-Signalwege in den DISC aus DD-Domäne des Rezeptors und Adaptermolekül aufgenommen und aktiviert.

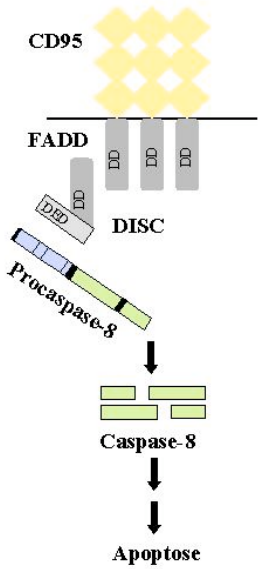

Abb. 7: CD95/Fas-Signalweg:
Nach der Rezeptortrimerisierung werden Adaptermoleküle wie FADD rekrutiert. Die Bindung der Procaspasen in den DISC ermöglicht deren Autokatalyse und die folgende Aktivierung von Effektorcaspasen (DD: death domain, DED: death effector domain, DISC: death inducing signalling complex).

1.3.2.2. Mitochondrien-vermittelte Apoptose

Einen entscheidenden Schritt bei der Apoptoseinduktion stellt die Störung der Mitochondrienfunktion dar. Infolge verschiedener Stimuli ist die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran nicht mehr gegeben. Die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytosol geht dem „permeability shift transition", dem Öffnen von Kanälen (PT-Poren), dem Ionenflux und der Ansäuerung des Zytoplasmas voraus.

Cytochrom c bildet im Zytosol mit dATP, APAF-1 und der Procaspase-9 einen DISC (Li et al., 1997). Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) ist funktionell homolog zu *C. elegans*-CED-4 (Yuan und Horvitz, 1992; Zou-H et al., 1997). Es wurden drei funktionale Domänen identifiziert, eine lange WD-40-Repeat-Domäne, eine zentrale CED-4-homologe Domäne, einschließlich einer konservierten P-Loop-Domäne, und eine kurze N-terminale CARD-Domäne (caspase recruitment domain), (Hofman et al., 1997). Die Multimerisierung von APAF-1, in der Anwesenheit von Cytochrom c und dATP ermöglicht aufgrund einer Konformationsänderung von APAF-1 die Bindung der CARD-Domäne an das korrespondierende Motif in der Prodomäne der Procaspase-9. Innerhalb der Apoptosesignalwege fungieren die CARD-Domänen als Wechselwirkungsmotive für die Rekrutierung von Caspasen in Zelltod-induzierende Komplexe (Kischkel et al., 1995). Die Rekrutierung der Procaspase-9 in den APAF-1 Komplex resultiert in der Aktivierung des Zymogens Procaspase-9 (Li et al., 1997b). Der APAF-1-Komplex verursacht die Autokatalyse der Procaspase-9 infolge der Oligomerisierung (Srinivasula et al., 1998). Die

aktivierte Caspase-9 wird freigesetzt, kann weitere Effektorcaspasen aktivieren und letztendlich Apoptose und die damit verbundenen Vorgänge, wie z.B. die Fragmentierung der DNA, auslösen.

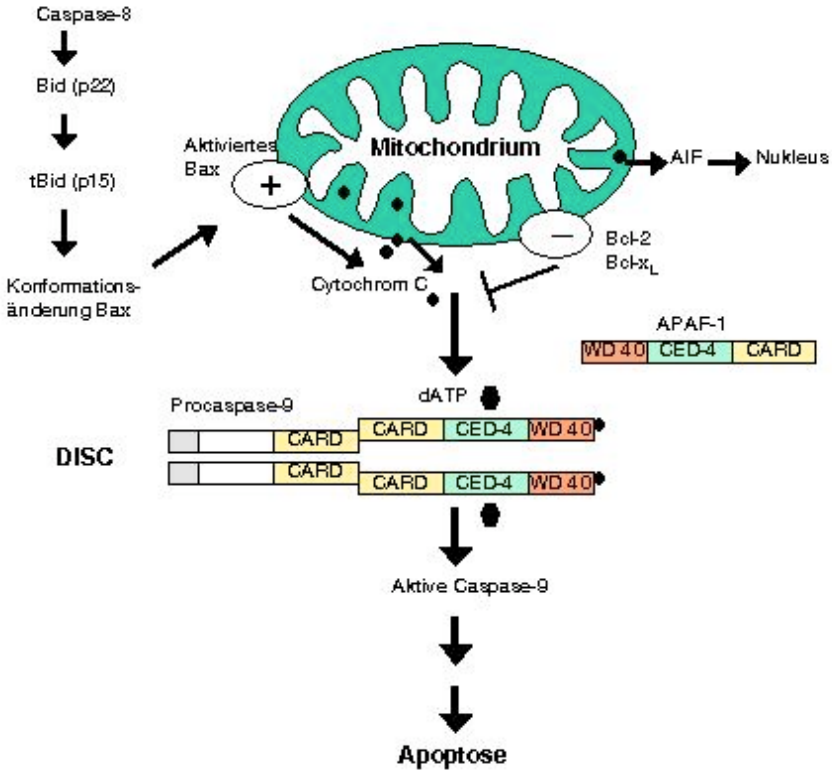

Abb. 8: Mitochondrialer Apoptose-Signalweg
Während der Mitochondrien-vermittelten Apoptose kommt es zur Ausbildung eines Zelltod-induzierenden Signalkomplexes (DISC). Die daraus entstehende aktive Caspase-9 kann weitere Effektor-Caspasen aktivieren und Apoptose induzieren. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie spielen bei der Regulation der mitochondrialen Apoptose-Signale (Freisetzung von Cytochrom c, Ausbildung der PT Poren) eine zentrale Rolle.

Die infolge verschiedener Faktoren entstehenden sogenannten PT (Permeability transition)-Poren wirken als Ca^{2+}, Spannungs-, pH-und Redoxgleichgewicht regulierende Kanäle. Ein solcher Kanal besteht aus einem dynamischen Multiproteinkomplex, der an Kontaktstellen zwischen innerer und äußerer mitochondrialer Membran lokalisiert ist. Obwohl die exakte Zusammensetzung der PT-Poren noch nicht bekannt ist, weist eine Vielzahl von Daten auf die Assoziation von Cyclophilin D, einem wasserlöslichen Matrixprotein, Innermembran-proteinen wie den ANT (adenine nucleotide translocator) und auch Proteinen der äußeren Membran wie Porin und den VDAC (voltage-dependent anion channel) hin. Die Öffnung einer PT-Pore hat einen plötzlichen Anstieg in der Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran für Moleküle mit einer Masse kleiner

1,5 kDa zur Folge. Dieses Ereignis, der sogenannte „permeability shift transition“, resultiert in einem sofortigen Zusammenbruch des Membranpotentials (Crompton, 1999).
Eine wesentliche Rolle bei der Regulation des mitochondrialen Apoptosesignalweges spielt die *bcl-2*-Genfamilie, die in Apoptose fördernde und hemmende Faktoren unterteilt werden kann (Tab.1).
In der Vergangenheit wurde zunächst zwischen Typ 1-Zellen, bei denen die Apoptose über den Rezeptor-vermittelten Signalweg induziert wird, und Typ 2-Zellen, deren Apoptose-Signalweg von der Freisetzung mitochondrialen Cytochrom c und dem „permeability shift transition gekennzeichnet ist, unterschieden (Schmitz-Iet al., 1999). Kürzlich wurde eine Verbindung zwischen diesen beiden Signalwegen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, daß Bid, ein Bcl-2-homologes Protein, durch die aktive Caspase-8 gespalten wird. Das carboxyterminale Fragment von Bid, tBid, transloziert zu den Mitochondrien und bindet dort an Bax. Infolgedessen wird Bax mittels Konformationsänderung aktiviert und induziert die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Li et al., 1998; Desagher et al., 1999).

1.3.2.3. Endoplasmatisches Reticulum-induzierte Apoptose

Die Beteiligung des endoplasmatischen Reticulums (ER) an der Apoptose wurde erst vor kurzem beschrieben. Die Caspase-12 ist die Initiator-Caspase in diesem Signalweg, der durch den „unfolded protein response“ (UPR), z.B. bei Inhibition des Proteinexports aus dem ER, aktiviert werden kann. Die Caspase-12 gehört zur Caspase-1-Subfamilie und ist an der ER-Membran lokalisiert. Die Aktivierung der Caspase-12 wird durch ER-Streß-Signale ausgelöst. Experimente mit Caspase-12-Knock-out-Mäusen zeigten, daß die Aktivierung der Caspase-12 unabhängig vom Rezeptor-vermittelten und Mitochondrien-induzierten Signalweg erfolgt (Nakagawa et al., 2000).

1.3.3. Die Bcl-2-Familie

Die Proteine der Bcl-2-Familie sind innerhalb der Evolution hochkonserviert. Es wurden Homologe sowohl in Säugetieren und Fischen als auch in Invertebraten wie *C. elegans* und *Drosophila,* oder in Viren identifiziert (Reed, 2000).
Beim Menschen wurden bisher 20 Mitglieder der Bcl-2-Familie beschrieben (Tabelle 1). Man unterscheidet zwei Hauptgruppen, die pro-apoptotischen und die anti-apoptotischen Proteine. Einige Gene der *bcl-2*-Familie produzieren zwei oder mehr Proteine durch

alternatives RNA-Splicen, wobei diese auch gegensätzliche Zelltodfunktionen ausüben können (z.B. Bcl-x_L und Bcl-x_S).

Tab. 1: Mitglieder der humanen Bcl-2-Familie

anti-apoptotisch	**pro-apoptotisch**
Bcl-2 (Tsujimoto et al., 1985) **Bcl-x_L** (Boise et al., 1993) **Bcl-w** (Gibson et al., 1996) **Mcl-1** (Kozopoas et al., 1993) **A1/Bfl-1** (Lin et al., 1996) **Boo/Diva** (Song et al., 1999)	**Bax** (Oltvai et al., 1993) **Bak** (Chittenden et al., 1995, Kiefer et al., 1995) **Bok/Mtd** (Hsu et al., 1997) **Bik/Nbk** (Boyd et al., 1995),(Han et al., 1996) **Bid** (Wang et al., 1996) **Bad** (Yang et al., 1995) **Hrk/DP5** (Inohara et al., 1997) **Bim/Bod** (O'Connor et al., 1998) **Noxa/APR** (Oda et al., 2000) **Bnip** (Matsushima et al., 1998) **Bcl-x_S** (Boise et al., 1993) **Bcl-rambo** (Kataoka et al., 2001) **Bcl-G** (Guo et al., 2001)

1.3.3.1. Struktur der Proteine der Bcl-2-Familie

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie sind dadurch gekennzeichnet, daß sie in mindestens einer der vier definierten Bcl-2 homologen Domänen BH1, BH2, BH3 und BH4 Sequenzähnlichkeiten aufweisen (Abb. 9).

Hinsichtlich ihrer Struktur unterscheidet man drei Gruppen Bcl-2-homologer Proteine, die sich in ihrem Anteil homologer Sequenzen unterscheiden. Die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine verfügen über die homologen Domänen BH1-4. In der zweiten, durch Bax charakterisierten Untergruppe besteht sehr hohe Sequenzhomologie zu Bcl-2 in den Regionen BH1-3, es existiert keine BH4-Domäne. In der dritten Subfamilie, der sogenannten „BH3-only"-Gruppe existiert nur eine sehr kurze homologe Sequenz, die BH3-Region. Deren Proteine kann man zusätzlich nach dem Fehlen oder Vorhandensein des hydrophoben C-Terminus unterteilen. Die Transmembrandomäne spielt bei der Assoziation mit intrazellulären Membranen eine Rolle.

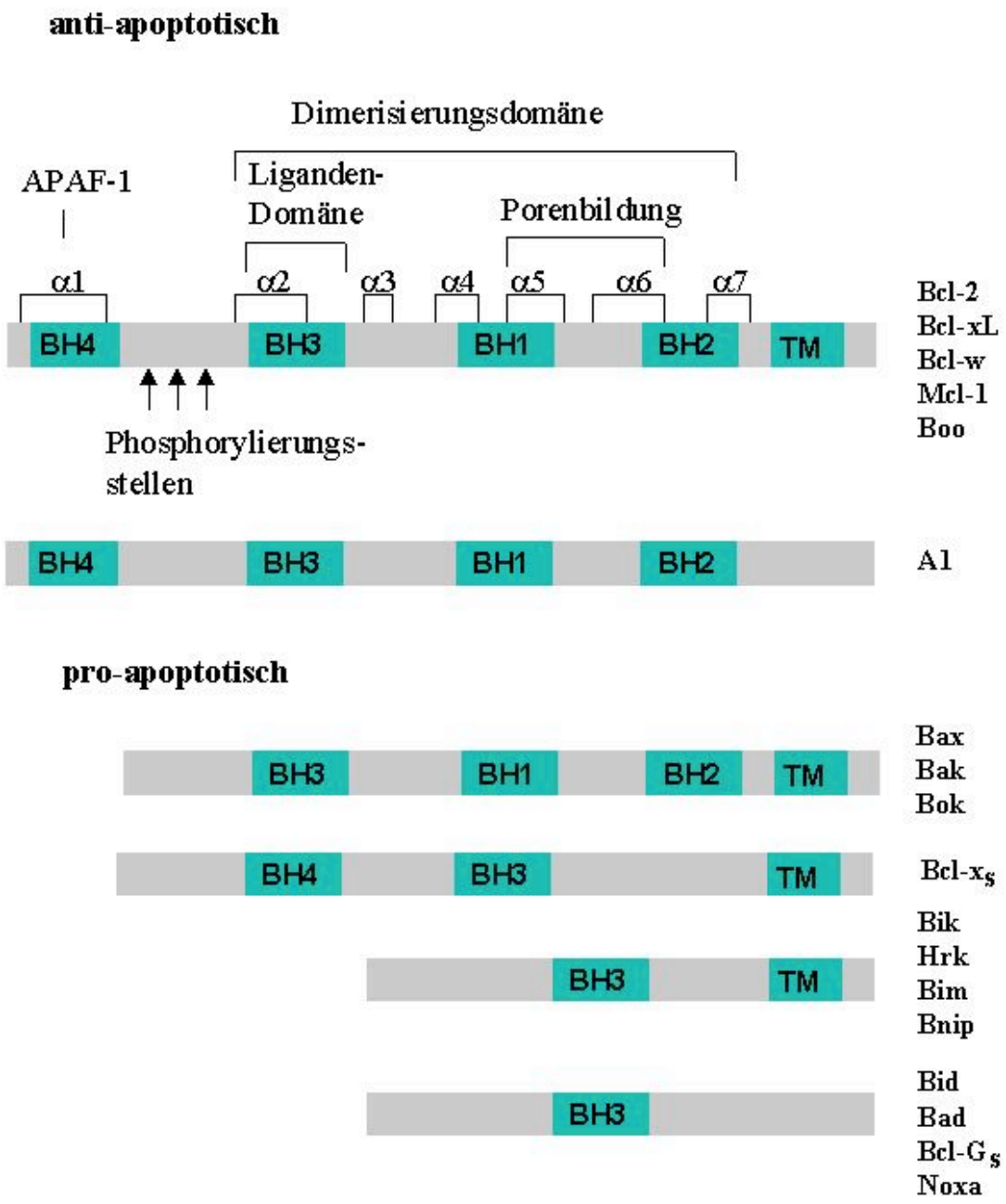

Abb. 9: Schema der Domänenstruktur der Proteine der Bcl-2-Familie
Es ist die Anordnung der Bcl-2-homologen Domänen (BH1-4) der humanen Mitglieder der Bcl-2-Familie schematisch dargestellt. BH: Bcl-2 homologe Domäne, TM: Transmembrandomäne (modifiziert nach Reed, 2000).

Die BH4-Domäne ist für die antiapoptotische Aktivität, z.B über die Bindung der raf-1-Kinase, erforderlich. Dagegen spielt die BH3-Region bei der Zelltod-fördernden Funktion der pro-apoptotischen Proteine eine wesentliche Rolle.

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, bestimmen. Die BH3-Domäne weist eine duale Funktion auf, den Zelltod zu induzieren und Heterodimerisierung zu ermöglichen. Die molekulare Grundlage der Heterodimerisierung konnte durch Strukturanalysen des löslichen Komplexes zwischen Bcl-x_L und 16 Aminosäuren der BH3-Region von Bak veranschaulicht werden. Bei der dreidimensionalen Darstellung von Bcl-x_L sind zwei zentrale hydrophobe α-Helices von fünf amphipathischen Helices umgeben (Muchmore, 1996). Die BH1-, BH2- und BH3-Region von Bcl-x_L bilden einen hydrophoben Spalt an der Moleküloberfläche. Daran kann die amphipatische Helix der BH3-Domäne von Bak durch hydrophobe und elektrostatische Kräfte binden.

Mutationen in der BH3-Domäne von Bad, Bim, Hrk und Bik verhindern die Fähigkeit dieser Proteine, mit Bcl-2 oder Bcl-x_L zu heterodimerisieren und Apoptose zu induzieren. Die BH3-Region von Bak erwies sich als ausreichend für die Zelltodinduktion und Heterodimerisierung mit Bcl-x_L (Boyd et al., 1995; Chittenden et al., 1995; Zha et al., 1996). Es existieren Daten aus MCF-7-Zellen, daß Bik zusätzlich zur BH3-Domäne eine nicht in Bax, Bak, Bid enthaltene C-terminale Sequenz benötigt, um effizient Zelltod auszulösen. Dieser Bereich ist jedoch nicht für die Heterodimerisierung mit anti-apoptotischen Proteinen notwendig (Elangovan und Chinnadurai, 1997).

Es konnte gezeigt werden, daß zur BH3-Domäne korrespondierende Oligopeptide von Bax und Bak fähig waren, Apoptose zu induzieren (Chittenden et al., 1995). Weiterhin bewirkt der Austausch der BH3-Domäne von Bcl-2 gegen die von Bax eine Umkehrung von Bcl-2 zu einem Zelltod-Agonisten. Im Gegensatz zur BH1- und BH2-Region scheint eine kritische Sequenzdifferenzierung zu existieren, die zwischen der BH3-Domäne von pro- und anti-apoptotischen Proteinen unterscheidet (Hunter und Parslow, 1996).

Die Bereiche α1-α7 stellen abgegrenzte Regionen dar, die zu den α-Helices in der Tertiärstruktur von Bcl-x_L korrespondieren. Die Helices α5 und α6 sind an der Bildung von Poren durch die äußere Mitochondrienmembran beteiligt. Es wurde nachgewiesen, daß diese Bereiche für die Zelltod-hemmende Funktion von Bcl-2 notwendig sind und deren Deletion bei Bax zwar die proapoptotische Funktion reduziert, aber nicht völlig verhindert. Ein Austausch von α5 und α6 in Bax gegen die gleiche Region von Bcl-2 und umgekehrt antagonisiert nicht deren ursprüngliche Funktion.

1.3.3.2. Funktion der Proteine der Bcl-2-Familie

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie können auf verschiedene Arten den Prozeß der Apoptose regulieren. Einerseits können sie die Funktion der Mitochondrien, des Zellkerns und des ER beeinflussen, andererseits treten sie untereinander in Wechselwirkung und können sich gegenseitig regulieren. Posttranslationale Modifikationen resultieren in Konformationsänderungen der Proteine, die Protein-Protein-Wechselwirkungen und die darausfolgende pro- oder anti-apoptotische Aktivität beeinflussen.

Über die Transmembran-Domäne lokalisieren sich die Proteine der Bcl-2-Familie vorwiegend an intrazellulären Membranen von Mitochondrien, Zellkern und endoplasmatischen Reticulum (ER). Der prinzipielle Mechanismus, durch den die Mitglieder der Bcl-2-Familie den Prozeß der Apoptose steuern, scheint in der Regulation der Cytochrom cFreisetzung aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytosol zu bestehen. Die Bildung von Ionenkanälen insbesondere in der Mitochondrien-Membran und die Steuerung sogenannter „Mega-Channels“ wird ebenfalls diskutiert. Diese Megakanäle werden im Rahmen des apoptotischen Zelltods geöffnet und vermitteln den Permeabilitäts-Transition-Shift, wodurch z.B. pro-apoptotische Faktoren aus den Mitochondrien ins Zytosol freigesetzt werden. Dazu zählen verschiedene Caspasen (Caspase-2, -3 und –9), der Apoptose-induzierende Faktor AIF, der an Caspase-unabhängiger Apoptoseinduktion beteiligt ist, und Smac/Diablo, der Inhibitor der IAP-Proteine (Susin et al., 1999, Du and Fang, 2000, Verhagen et al., 2000).

Innerhalb des mitochondrialen Apoptosesignalweges wurde gezeigt, daß Bcl-2 und Bcl-x_L ihre anti-apoptotische Funktion dadurch ausüben, daß sie die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol blockieren. Sie verhindern das Öffnen der mitochondrialen „permeability transition“-Pore infolge vieler Stimuli. Für rekombiniertes Bax und Bak wurde gezeigt, daß sie den Verlust von □□ (mitochondriales Membranpotential) und die Freisetzung von Cytochrom c induzieren (Jürgensmeier, 1998; Narita, 1998).

Die nur die BH3-Domäne enthaltenen Proteine der Bcl-2-Familie sind in ihrer Funktion pro-apoptotisch und ihre Zelltod-induzierende Aktivität ist von der Fähigkeit der Dimerisierung mit anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 oder Bcl-x_L abhängig. Für Bik wird eine *trans*-dominant negative Funktion diskutiert, in dem Bik an Bcl-x_L bindet und somit dessen anti-apoptotische Funktion antagonisiert (Hu, 1998).

Im Gegensatz zu den Mitochondrien-assoziierten Bcl-2-Homologen verfügen Bid, Bim und Bad nicht über eine Transmembrandomäne, liegen im Zytosol vor und translozieren während der Apoptose zu den Mitochondrien. Diese Proteine spielen bei der Übertragung von Apoptosesignalen aus dem Zytosol zu den Mitochondrien eine wichtige Rolle, wo sie die Aktivität anderer Bcl-2-Proteine regulieren und die Freisetzung von Cytochrom c kontrollieren. Die Translokation dieser Proteine wird durch spezifische posttranslationale Modifikationen ausgelöst. Im Zytosol vorhandenes p22-Bid wird von aktiver Caspase-8 gespalten, das entstandene aktive p15-tBid transloziert zu den Mitochondrien und bindet dort an Bax oder Bak, wodurch diese oligomerisieren (Li et al., 1998, Luo et al., 1998, Eskes et al., 2000). Das in gesunden Zellen an die Mikrotubuli gebundene Bim (Bim L, Bim EL) wird infolge vieler Stimuli, z.B. Serumentzug, aktiviert, transloziert zu den Mitochondrien, bindet dort an Bcl-2 und Bcl-x_L und neutralisiert deren anti-apoptotische Aktivität (Puthalakath et al., 1999). Bad wiederum wird durch Phosphorylierung reguliert. Durch verschiedene Proteinkinasen wie z.B. Akt liegt phosphoryliertes Bad im Zytosol vor. Dephosphorylierung von Bad hat die Aktivierung und Translokalisierung und anschließende Dimerisierung mit Bcl-2 oder Bcl-x_L zur Folge (Franke and Cantley, 1997).
Das pro-apoptotische Protein Bax verfügt wahrscheinlich über eine maskierte C-terminale Transmembrandomäne, wodurch Bax im Zytosol lokalisiert ist. Erst verschiedene Stimuli verursachen eine Konformationsänderung, die mit einer Translokation zu den Mitochondrien mit anschließender Insertion in mitochondriale Membranen assoziiert ist.
Untersuchungen bezüglich der Bcl-2-Lokalisation am ER zeigten, daß Bcl-2 den mit der Apoptose assoziierten Efflux von Ca^{2+} durch die ER-Membranen ins Zytosol blockieren kann (Baffy et al., 1993). Spätere Untersuchungen wiesen die Assoziation von Bcl-2 und Bcl-x_L mit einem 28 kDa-integralen Protein des ER nach, das als Bap31 bezeichnet wurde. Bap31 verfügt über drei Transmembransegmente und zwei potentielle Caspase-Spaltstellen im C-terminalen Bereich. In Folge der Spaltung von Bap31 durch die Caspase-8 entsteht ein p20-Fragment, das bei Überexpression Zellen töten kann (Ng et al., 1997). Genauere Erkenntnisse über die Apoptosesignalwege im Zusammenhang mit dem Zellkern und dem ER, und welche Rolle die Bcl-2-Familie dabei spielt, fehlen bisher.
Ein wichtiges Merkmal der Mitglieder der Bcl-2-Familie besteht in der Fähigkeit, untereinander Homo- und Heterodimere zu bilden. Es wurde angenommen, daß das relative Verhältnis von pro-apoptotischen zu anti-apoptotischen Proteinen über Sensitivität oder Resistenz gegenüber dem Zelltodsignal entscheidet. Jedoch konnten für Bcl-2, Bax

und Bcl-x_L die jeweilige pro-bzw. anti-apoptotische Wirkung auch unabhängig von ihrer Homo- und Heterodimerisierung nachgewiesen werden (Knudson und Korsmeyer, 1997).

Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2 gene)

Während der Embryonalentwicklung wird Bcl-2 in fast allen Geweben exprimiert (Veis-Novack und Korsmeyer, 1994), beim Erwachsenen hauptsächlich in langlebigen oder stark proliferierenden Zellen (Krajewski et al., 1999, Nunez et al., 1994). Das *bcl-2*-Gen wurde ursprünglich als Onkogen in humanen follikulären B-Zell-Lymphomen beschrieben (Tsujimoto et al., 1985). Dabei bewirkt eine chromosomale Translokation (t(14;18)) bei etwa 90 % dieser Lymphome eine konstitutive Überexpression von Bcl-2. Mittlerweile konnte eine starke Bcl-2 Expression auch in weiteren hämatologischen Neoplasien nachgewiesen werden. Spätere *in vivo*-Versuche zeigten, daß die Überexpression von Bcl-2 im B-Zellkompartment transgener Mäuse zu follikulärer Hyperplasie führt (Mc Donnell und Korsmeyer, 1991). Anders als bei anderen bis dahin beschriebenen Onkogenen stimuliert *bcl-2* nicht die Proliferation, sondern verbessert das Zellüberleben durch Hemmung der Apoptose. Es wurde gezeigt, daß bcl-2 mit dem Onkogen c-myc durch Hemmung von c-myc-induzierter Apoptose kooperiert. Doppelt transgene Mäuse, die sowohl bcl-2 als auch c-myc überexprimieren, entwickeln verstärkt maligne Lymphome (Vaux et al., 1988; Bissonette et al., 1992). Das heißt, ein zweites onkogenes Signal ist für die Tumorbildung notwendig.

Bcl-2-Knock-out-Mäuse durchliefen bis zu den ersten Tagen nach der Geburt eine fast normale Entwicklung. Danach kam es zu massiven Störungen in der Zellentwicklung mit erhöhter Apoptose besonders in den Epithelzellen der Nieren (Korsmeyer, 1995).

Bcl-2 ist in der Zelle mit den äußeren Membranen des endoplasmatischen Reticulums, des Kerns und der Mitochondrien assoziiert (Reed, 1994; Yang und Korsmeyer, 1996). Es schützt gegen verschiedene zytotoxische Signale wie □- und UV-Strahlung, Zytokinentzug, Dexamethason, Staurosporin und zytotoxische Chemotherapeutika (Young und Korsmeyer, 1996).

Aufgrund signifikanter Sequenzhomologien zu Bcl-2 wurden später mittels des „yeast two hybrid“-Systems bzw. PCR-Reaktion mit degenerativen Primern weitere Proteine identifiziert und der sogenannten Bcl-2-Familie zugeordnet, die ebenfalls Zelltod-regulierende Funktion haben.

Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit, Zytostatikaresistenz in Tumorzellinien zu antagonisieren, wurden die beiden zu verschiedenen Subfamilien gehörenden pro-apoptotischen Proteine Bak und Bik/Nbk ausgewählt, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer)

Das Bcl-2-Homologe Bak wurde 1995 parallel von drei Arbeitsgruppen aufgrund der Wechselwirkung mit dem E1B-19k-Protein bzw. PCR mit degenerativen Primern identifiziert, kloniert und charakterisiert (Kiefer et al., 1995; Chittenden et al., 1995; Farrow et al., 1995). Bak gehört zu den Apoptosepromotoren, ist in den meisten Geweben exprimiert und verfügt über eine BH1-, BH2- und BH3-Domäne (Chittenden et al., 1995). Bak kann anders als der bisher am häufigsten untersuchte Apoptose-Promotor Bax, der hauptsächlich an der äußeren Kern- und äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, zusätzlich zum mitochondrialen, auch den Apoptosesignalweg des endoplasmatischen Reticulums beeinflussen (Zou et al., 1997).

Bik/Nbk1 (Bcl-2 interacting killer)

Bik, ein weiteres Zelltod-förderndes Protein, wurde 1995 mittels des Yeast Two Hybrid Systems identifiziert. Es kann mit den Apoptoseinhibitoren Bcl-2, Bcl-x_L und den viralen Proteinen BHRF1 und E1B-19 kDa in Wechselwirkung treten (Han et al., 1996) und deren anti-apoptotische Funktion antagonisieren (Boyd et al., 1995). Bik verfügt nur über eine BH3-Domäne. Es wurde nachgewiesen, daß Bik zwar mit anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 über die BH3-Region interagiert, aber nicht mit Zelltodförderern wie Bax.

Im Gegensatz zu Bak wird Bik nur begrenzt in Geweben exprimiert, hauptsächlich in epithelialen Zellen. Mittels Northern Blot Analyse wurde hohe Bik Expression in Niere und Pankreas, sowie geringere Expression in Placenta, Lunge und Leber nachgewiesen (Daniel et al., 1999).

1.3.4. Caspasen (Cysteinyl Aspartat-specific Proteases)

An den biochemischen Veränderungen der Zelle während des komplexen Signalweges der Apoptose ist eine Familie von Cysteinproteasen beteiligt, die als Caspasen bezeichnet werden. Die Beteiligung von Cysteinylaspartasen in der Apoptose wurde erstmals mit dem Nachweis der Homologie von CED-3, einem für den Zelltod in den Nematoden *Caenorhabditis elegans* notwendigen Genprodukt, mit dem humanen ICE (interleukin-1β-converting enzyme) gezeigt (Thornberry et al., 1992). Die derzeit bekannten humanen Caspasen sind eine Familie von Cysteinproteasen, die man in Effektor- und Inducer-Caspasen unterteilen kann. Sie weisen Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifizität auf (Nicholson und Thornberry, 1997).

1.3.4.1. Struktur und Aktivierung der Caspasen

Caspasen spalten ihre Substrate spezifisch nach Aspartatsäureresten (Jacobson und Evan, 1994; Alnemri et al., 1996; Chinnaiyan und Dixit, 1996). Sie können autokatalytisch oder innerhalb einer Kaskade untereinander aktiviert werden.

Jede Caspase wird als inaktives Zymogen (Procaspase) von 30-50 kDa synthetisiert, bestehend aus 3 Domänen: einer NH_2-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit (ungefähr 20 kDa) und einer kleinen Untereinheit (ungefähr 10 kDa). Bei der Aktivierung von Caspasen werden durch die sequentielle Spaltung des Proenzyms nach spezifischen Aspartat-Resten die kleine (p10) und die große (p20) Untereinheit freigesetzt. Diese proteolytische Prozessierung zwischen den Domänen hat die Bildung eines Heterodimers aus der großen und kleinen Untereinheit zur Folge. Kristallstrukturen zeigen, daß zwei Heterodimere assoziieren und ein Heterotetramer (2x p20, 2x p10) mit zwei katalytischen Stellen für Substratbindung und Katalyse bilden (Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994; Rotonda et al., 1996).

Die in ihrer Sequenz und Länge variablen NH_2-terminalen Prodomäne ist an der Regulation der Aktivierung beteiligt. Das bevorzugte Tetrapeptid Erkennungsmotiv unterscheidet sich signifikant unter den Caspasen und erklärt die Vielfalt ihrer biologischen Funktionen und Substratspezifitäten (Thornberry et al., 1997).

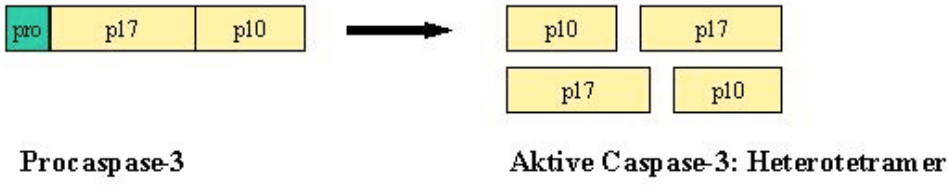

Abb.10: Struktur und Aktivierung der Caspasen am Beispiel der Caspase-3
Die inaktiven Procaspasen sind durch eine NH_2-terminale Prodomäne und eine große und kleine Untereinheit gekennzeichnet. Eine aktive Caspase besteht aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten.

1.3.4.2. Caspase-Substrate

Es wurden bisher ungefähr 100 unterschiedliche Substrate der Caspasen nachgewiesen. Dazu gehören Bestandteile des Zytoskeletts (nukleäres Lamin, Aktin), Regulatoren der DNA-Reparatur (PARP, DNA abhängige Proteinkinase), der DNA-Replikation und des RNA-Splicing (U1) (Lazebnik et al., 1995; Nicholson et al., 1995; Tewari et al., 1995; Casciola-Rosen et al., 1996). Die Spaltung der Laminstruktur an der Innenseite der Kernmembran trägt zur Chromatinkondensation bei. Außerdem können Caspasen Proteine inaktivieren, die Zellen vor Apoptose schützen. Ein Beispiel dafür stellt die Spaltung von ICAD/DFF45 dar, einem Inhibitor der für die DNA-Fragmentierung verantwortlichen Nuklease. In nichtapoptotischen Zellen liegt CAD (Caspase-activated deoxyribonuklease) als inaktiver Komplex mit ICAD vor. Infolge der Inaktivierung von ICAD durch Caspasen während der Apoptose wird CAD freigesetzt, kann als Nuklease fungieren und zur Chromatindegaradation in nukleosomale Fragmente, einem Merkmal der Apoptose beitragen (Liu et al., 1997).

1.3.4.3. Caspase-Signalwege

In Abhängigkeit vom Zelltod-Stimulus werden verschiedene Caspase-Signalwege aktiviert. Das komplexe proteolytische System beinhaltet eine Kombination aus regulierenden Proteasen, Kofaktoren, Feedbacks und Schwellenwerten. Die Aktivierung von Initiator-Caspasen erfordert die Bindung an Kofaktoren über bestimmte Strukturregionen, die sowohl in der Caspase-Prodomäne als auch im korrespondierenden Kofaktor enthalten sind. Die Caspasen mit einer langen Prodomäne verfügen über zwei für die Protein-Protein-Wechselwirkung wesentliche Regionen: der DED- (death effector) und der CARD- (Caspase-recruitment) Domäne.

Beim apoptotischen Signalweg über Fas und TNFR1 binden die zytoplasmatischen Teile der Rezeptoren nach Trimerisierung mit den Liganden über die DD (death domain) an Adapterproteine (FADD, RAIDD). Die Bindung von FADD über die DED-Domäne an die Prodomäne der Caspase-8 liefert die Verbindung von Fas und TNFR1 und den Caspasen innerhalb eines Zelltod-induzierenden Komplexes (Boldin et al., 1996). Die aus diesem Komplex hervorgehende aktivierte Initiator-Caspase-8 ist in der Lage weitere Effektorcapasen zu prozessieren.

Im Gegensatz dazu erfolgt die Autokatalyse der Caspase-9 innerhalb des mitochondrialen Apoptosesignalweges über die CARD-Domäne durch Komplexierung mit APAF-1 in Anwesenheit von Cytochrom c und dATP.

Zu der Vielfalt regulatorischer Proteine innerhalb des zur Apoptose führenden Systems der Proteasen zählen auch Inhibitoren. Zu den bisher beschriebenen viralen Inhibitoren gehören CrmA, das als Mitglied der Serpinfamilie Initiatorcaspasen inhibiert (Ray et al., 1992), p35 und die Familie der IAP-Proteine (Bump et al., 1995; Deveraux et al., 1997). Von den IAP`s (inhibitors of apoptosis proteins) wurden neben den humanen Homologen auch Homologe in *Drosophila*, *C. elegans*, Mäusen und Viren identifiziert. Es konnte eine Bindung und Hemmung der Initiatorcaspase Caspase-9 und der Effektorcaspasen-3 und-7 nachgewiesen werden (Reed, 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation der Capasekaskade besteht in der Wechselwirkung zwischen Procaspasen und ihren Kofaktoren. Die FLIP-Proteine (FADD-like ICE inhibitory protein) weisen bis auf das Fehlen katalytischer Regionen eine ähnliche Sequenz wie die Caspase-8 auf und können deshalb mit der Procaspase-8 um die Bindung an den Kofaktor FADD konkurrieren und die Caspaseaktivierung verhindern (Irmler et al., 1997).

1.3.5. Apoptose und Zellzyklus

Mutationen oder Deletionen in Zellzyklusregulatoren wie p53 sind in vielen Tumoren nachweisbar. Genetische Untersuchungen von Tumorgewebe zeigten, das Mutationen im p53-Gen zu den häufigsten genetischen Veränderungen in Krebszellen im Vergleich zu Normalgewebe gehören (Hollstein et al., 1996). In normalem Gewebe besteht ein Gleichgewicht aus Proliferation und Apoptose. Beide sind eng verknüpfte, sich teilweise gegenseitig regulierende Prozesse. Eukaryontische Zellen haben ein Netzwerk

hochkonservierter Überlebensmechanismen entwickelt, die sicherstellen, das geschädigte Chromosomen vor der Replikation repariert werden. Diese Mechanismen sind für den Erhalt der Genomintegrität und Zellviabilität wesentlich. Das läßt sich besonders gut am Beispiel von p53 veranschaulichen. Der Tumorsuppressor p53 ist einer der kritischen Mediatoren der Zellantwort auf verschiedene Arten von genotoxischen Stress (Hall et al., 1996) und wirkt an verschiedenen Kontrollpunkten während des Zellzyklus. P53 ist ein Transkriptionsfaktor und fungiert als Sensor der Genomintegrität. Die normale Aufgabe der aufgrund ihrer Funktion als Tumorsuppressoren definierten Proteine besteht im Schutz der Zelle vor maligner Entartung (Vogelstein, 1990). Voraussetzung für die Entstehung eines Karzinoms ist der vollständige Funktionsverlust eines Tumorsuppressor-Gens. Wird ein Allel des Tumorsupppressor-Gens in der Keimbahn oder durch somatische Mutation inaktiviert, dann führt eine spontane Mutation im zweiten Allel zur Aufhebung der Tumorsuppression und begünstigt die Transformation der Zelle.

In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, daß p53 ein zentraler Regulator bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse, einschließlich Zellzykluskontrolle, DNA Reparatur, Genomstabilität, Differenzierung und programmierten Zelltod, ist (Rotter et al., 1995). Außerdem ist p53 die Hauptkomponente im auf DNA-Schaden aktivierten Signalweg. Solche DNA-Schäden lösen die Akkumulation und Aktivierung von p53 aus (Nelson und Kastan, 1994).

Es gibt zwei Hauptwege zur Aktivierung von p53. Diese umfassen die Aktivierung durch genotoxischen Stress oder durch Onkogenaktivierung ein. Als Antwort auf Zellschäden wird p53 als Transkriptionsfaktor über spezifische post-translationale Modifikationen durch Phosphorylierung und Acetylierung aktiviert. Das p53-Protein wird innerhalb seiner Transaktivierungsdomäne durch DNA-Proteinkinasen, ATM, JNK und MAP-Kinasen und innerhalb des C-Terminus durch Cyclin-abhängige Kinasen (Martinez et al., 1997) phosphoryliert. Die verschiedenen Proteinkinasen können die Sequenz-spezifische DNA-Bindungsaktivität von p53 modifizieren und dadurch die relative Effizienz der Aktivierung verschiedener Zielgene von p53 modulieren (Hecker et al., 1996; Wang und Prives, 1995). Die Phosphorylierung der DNA-Proteinkinasen verhindert außerdem die Wechselwirkung mit MDM2, einem wichtigen Faktor in der Negativregulation der Transkriptionsaktivität und dem Expressionsniveau von p53 (Lane und Hall, 1997).

Die Fähigkeit von p53 downstream Zielgene zu transaktivieren resultiert in Zellzyklusarrest an spezifischen Punkten des Zellzyklus. Als eine Konsequenz stoppt der

Zellzyklus entweder vor der DNA-Replikation in G1, oder vor der Mitose in G2, was zu einem Abfall von Zellen in der S-Phase führt. Die Hochregulation von Genen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind (z.B. gadd45-Gen) ist ein erster Schritt zur Initiierung der DNA-Reparatur (Kastan et al., 1992). P53 interagiert spezifisch mit Komponenten des DNA-Reparaturmechanismus. Ein wichtiger biochemischer Punkt bei der Beteiligung von p53 an der DNA-Reparatur ist die Fähigkeit, an Doppelstrang- und Einzelstrang-DNA zu binden.

Es besteht die Möglichkeit, die geschädigte DNA während des Zellzyklusarrestes zu reparieren oder die geschädigten Zellen durch Apoptoseinduktion zu eleminieren. Bei Verlust der p53-Funktion und dem daraus resultierenden Verlust des G1-Arrestes der Zelle für die DNA-Reparatur führt zur Replikation geschädigter DNA und infolgedessen zum unkontrolliertem Wachstum von mutierten Zellen.

Es ist noch nicht vollständig geklärt, welche Faktoren die Entscheidung entweder zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose nach p53-Aktivierung beeinflussen. Auch die Induktion von Apoptose durch p53 ist komplex und noch nicht bis ins Detail klar. Die transkriptionale Aktivierung verschiedener an der Regulation der Apoptose beteiligten Gene (bax, Fas/Apo, Noxa, Puma) und Redox-regulierende Gene scheinen der Hauptmechanismus p53-induzierter Apoptose zu sein (reviewed in Bates und Vousden, 1999, Oda, 2000). P53 verfügt über Bindemotive in den Promotoren der Apoptosegene *bax* und *bcl-2* und ist somit direkt an deren Expressionregulation beteiligt (Reed, 1995). Dabei scheint p53 ein positiver Regulator der *bax-*□ Expression zu sein. Im *bcl-2* Gen wurde ein p53-abhängiges Negativ-responsives Element identifiziert (Miyashita et al., 1994b).