
6. Diskussion

6.1. Erhöhung der Zytostatikasensitivität

6.1.1. Die Bcl-2-Familie beeinflusst Zytostatika-induzierte Apoptose

Die Mitglieder der Bcl-2-Familie spielen bei der Regulation der Apoptose eine zentrale Rolle. Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, daß diese Proteine aufgrund ihrer pro- und anti-apoptotischen Funktion an der Entwicklung von malignen Zellen beteiligt sind (Allsopp et al., 1993; Oltvai et al., 1993; Boise et al., 1993). Die ersten Nachweise dazu beschränkten sich weitgehend auf das neuronale und B- bzw. T-Zellsystem. So führt z.B. die Überexpression von Bcl-2 im B-Zellsystem transgener Mäuse zu B-Zell-Hyperplasie. Die Fähigkeit von Bcl-2, Apoptose zu verhindern, kann von pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie antagonisiert werden (Simonian et al., 1996). Am Beispiel von bax-Knock-out Mäusen wurde gezeigt, daß Gewebhyperplasie und Tumorprogression durch Inaktivierung solcher Apoptosepromotoren entstehen kann (Knudson et al., 1995). Ebenso wurde z.B. die Degradation von Bak in humanen Papillomavirus-positiven Melanomen beobachtet (Jackson et al., 2000).

In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe wurde in Brustkrebszellen eine defekte Bax-Expression nachgewiesen (Bargou et al., 1995). In den vergangenen Jahren wurde bewiesen, daß die verschiedenen zytotoxischen Therapien über die Induktion von Apoptose wirken. Wir konnten in vorherigen Untersuchungen nachweisen, daß Bik/Nbk die Chemosensitivität bei Überexpression in Glucocorticoid-resistenten T-Non-Hodkin-Lymphom-Zellen erhöht (Daniel et al., 1999). Andere Arbeitsgruppen zeigten, daß nicht nur Bik/Nbk, sondern auch Bax (Strobel et al., 1998a, Wagener et al., 1996) und Bad (Strobel et al., 1998b) die Chemosensitivität in Krebszellen erhöhen können.

Kürzlich wurden Daten veröffentlicht, die zeigen, das Cisplatin Apoptose-induzierende Konformationsänderungen von Bak in humanen Melanom-Zelllinien auslöst (Mandic et al., 2001). Es war jedoch nicht klar, ob die erhöhte Expression dieser Apoptoseeffektoren nicht nur die Apoptosesensitivität erhöhen, sondern auch verschiedene Arten von Zytostatikaresistenz bei der Krebstherapie revertieren können.

1995 wurden die beiden Apoptose-fördernden Mitglieder der Bcl-2-Familie Bak und Bik/Nbk identifiziert. Daraufhin wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Frage

untersucht, ob Bik oder Bak geeignete Targets darstellen, um den Zytostatika-resistenten Phänotyp in Zelllinien zu revertieren. Beide Bcl-2-Homologe werden in epithelialen Zellen und Geweben exprimiert. Während Bak sehr breit exprimiert wird (Kiefer et al., 1995; Krajewska et al., 1996), zeigt Bik/Nbk nur begrenzte Expression und konnte in Nieren, Pankreas, Placenta, Lunge, Leber, Prostata und Testis detektiert werden (Daniel et al., 1999). Die zur Beantwortung der Fragestellung verwendeten Brustkrebszelllinien MT-1 und MT-3 exprimieren nur wenig endogenes Bik und Bak.

6.1.2. Zusammenhang von Zytostatika-Efflux und MDR-1-Expression

Für Adriamycin-resistente Tumore wurden bisher neben dem P-Glykoprotein auch die Glutathion-S-Transferase und die Topoisomerase als Resistenz-assoziierte Proteine sowie die Zellproliferation und die Apoptose als an der Ausbildung von Resistenzen beteiligte Prozesse aufgeführt.

Die Resistenzen in den hier verwendeten Zelllinien MT-1/Adr und MT-3/Adr beruhen auf verschiedenen Ursachen. In den MT-3/Adr-Zellen wird der resistente Phänotyp durch die Überexpression des P-Glykoproteins verursacht. Dies führt zu verstärkter Detoxifizierung durch erhöhten Zytostatikaefflux aus der Zelle und damit zu einem geringeren effektiven Wirkstoffgehalt in der Zelle (Stein et al., 1997).

In den MT-1/Adr-Zellen jedoch konnte weder dieser Mechanismus noch eine erhöhte Expression der Transportproteine MDR-1, MRP und LRP nachgewiesen werden. Außerdem zeigen diese Zellen einen intakten p53/bax-Signalweg. Es konnten keine p53-Mutationen detektiert werden und die Zellen zeigen eine Induktion der p53 Expression infolge der Epirubicin-Inkubation. Vermutlich ist der Defekt für die Zytostatikaresistenz unterhalb in der zur Apoptose führenden Kaskade lokalisiert. Sowohl die Beobachtung, daß Bcl-2 im Vergleich mit den maternalen MT-1-Zellen, in den resistenten MT-1/Adr-Zellen überexprimiert ist, als auch die Revertierung der Epirubicin-Resistenz durch Überexpression pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie unterstützen diese Annahme. Der mitochondriale Signalweg scheint während des DNA-schädigenden Zytostatika-induzierten Zelltods zu dominieren (Daniel, 2001, Wieder, 2001). Das heißt, das refraktäre Ansprechen auf Epirubicin-Inkubation in den MT-1/Adr-Zellen scheint durch die deregulierte Bcl-2-Expression und die defekte Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges hervorgerufen zu werden.

Um potentielle funktionelle Unterschiede im Zytostatika-Efflux in den MT-3/Adr-Zellen als Konsequenz der Transfektion zu analysieren, wurde der Efflux von Rhodamin 123 und Epirubicin untersucht. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß die Transfektion der Apoptosegene *bak* und *bik* weder die P-Glykoproteinexpression, noch die Zytostatikabeladung bzw. deren Efflux beeinflusste. Die Bak- bzw. Bik-Transfektanten nahmen in der gleichen Zeit ähnliche Epirubicinmengen auf und pumpten sie im gleichen Maße aus der Zelle wie die ursprünglich resistenten Linien, jedoch nicht vollständig. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen mit Bax-überexprimierenden und dadurch für Taxol und Vincristin sensitivierten Ovarialkarzinomzellen, in denen eine erhöhte intrazelluläre Taxolakkumulation gezeigt wurde (Strobel et al., 1998a).

6.1. 3. Bik und Bak antagonisieren Resistenz gegenüber

Anthrazyklin-induzierter Apoptose

In den Bik überexprimierenden MT-1/Adr- und MT-3/Adr-Zellen wurde eine signifikante Sensitivierung der Zellen gegenüber Epirubicin-induziertem Zelltod beobachtet, verglichen mit den resistenten parentalen Ursprungszelllinien.

Das pro-apoptotische Protein Bik gehört zu den sogenannten „BH3-only“ Mitgliedern der Bcl-2-Familie, die nur eine der homologen Domänen, die BH3-Domäne enthalten. Die Zelltod-induzierende Aktivität der BH3-only-Proteine hängt von ihrer Fähigkeit ab, mit anti-apoptotischen Familien-Mitgliedern wie Bcl-2 oder Bcl-x_L zu dimerisieren, fungieren also als typische *trans*-dominante Inhibitoren. Die Dimerisierung der „BH3-only“-Proteine erfolgt über die amphipatische α -Helix der BH3-Domäne. Es wurde gezeigt, daß Mutationen in der BH3-Domäne der „BH3-only“-Proteine zur Verhinderung der Apoptoseinduktion führt. Allerdings hat die Dimerisierung der Bcl-2-Proteine nicht immer eine Antagonisierung zur Folge. So wird z.B. Bax nach Dimerisierung mit Bid über die BH3-Domäne aktiviert. Weiterhin existieren „BH3-only“-Proteine, wie z.B. BNIP, in denen der carboxyterminale Bereich für Zelltodinduktion wichtiger ist als die BH3-Domäne.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß die Überexpression von Bak in den MT-3/Adr-Zellen zu einer deutlichen Sensitivierung der Epirubicin-resistenten MT-3/Adr-Zellen führt. In den MT-1/Adr-bak-Transfektanten konnte sogar gezeigt werden, daß diese ebenso sensitiv gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose reagierten wie die unmodifizierten

sensitiven MT-1-Zellen. Das heißt, Bak ist in der Lage, den resistenten Phänotyp in diesen Zellen vollständig zu antagonisieren.

Im Gegensatz zu Bik, enthält Bak eine BH1-, BH2- und BH3-Domäne und ähnelt damit eher Bax, dem bisher am besten untersuchten pro-apoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie. Man könnte deshalb annehmen, daß Bak auf ähnliche Art wie Bax die Apoptosewege reguliert, d.h. über die Aktivierung der Mitochondrien und der Induktion der Cytochrom c-Freisetzung. Andererseits unterscheidet sich Bak in der intrazellulären Verteilung. Während der Hauptanteil von Bax gegen die äußere mitochondriale (Korsmeyer et al., 1993) und zu einem geringeren Teil gegen die äußere Kernmembran und anderen Membranen gerichtet ist (Mandal et al., 1998), ist Bak auch am endoplasmatischen Reticulum lokalisiert und könnte somit zusätzliche von Bax abweichende Apoptosewege aktivieren (Daniel et al., 2000).

Die erhaltenen Ergebnisse der Apoptosemessungen bestätigen, daß die Epirubicin-induzierte Apoptose in Brustkrebszellen durch einen Bcl-2-abhängigen Signalweg kontrolliert wird. Unabhängig von den sich unterscheidenden Resistenzursachen reicht die Beeinflussung der Apoptosesignalwege mittels der erhöhten Expression von Bak bzw. Bik aus, um die Epirubicin-Resistenz in beiden Zelllinien zu brechen. Daraus lässt sich schließen, daß diese Gene den Schwellenwert für die durch einen DNA-Schaden hervorgerufene Apoptose herabsetzen.

Um die Toxizität der pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie in gesunden Zellen zu vermeiden, sind sie entweder transkriptionell ausgeschaltet oder in anderen Teilen der Zelle lokalisiert. Es wurden bereits spezifische Reaktionen auf äußere Stimuli gezeigt, z.B. reagiert Bim auf eine Störung der Mikrotubuli, Bax und Bad auf metabolischen Stress und Bid auf Caspase-8-Aktivierung. Ob spezifische Veränderungen des Signalweges für spezifische Resistenzen gegenüber Zytostatika stehen, bleibt zu untersuchen (Solary et al., 2000).

6.1.4. Beeinflussung der Kreuzresistenz gegenüber Chemotherapeutika

Um zwischen den Apoptosesignalwegen der beim Mammakarzinom eingesetzten Zytostatika differenzieren und die Rolle der Kreuzresistenz gegenüber anderen Chemotherapeutika aufgrund der MDR-1-Funktion genauer verifizieren zu können, wurden außer Epirubicin noch ein weiterer Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid und das Spindelgift

Taxol in die Sensitivitätsuntersuchungen der Zelllinien und deren Transfektanten einbezogen.

In den verwendeten, mit Doxorubicin selektierten resistenten Zelllinien, MT-1/Adr und MT-3/Adr konnte außer der Anthrazyklin-Resistenz auch refraktäres Ansprechen auf Etoposid und Taxol nachgewiesen werden. Allerdings konnte mit der Überexpression der pro-apoptotischen Proteine Bak und Bik keine Sensitivierung gegenüber den mit diesen Chemotherapeutika induzierten Zelltod erreicht werden. Dies bestätigt einerseits die Beobachtung, daß die Induktion des Zelltodförderers Bax Brustkrebszellen gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose sensitiviert (Wagner et al., 1996), widerspricht aber auf den ersten Blick Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die eine erhöhte Apoptosesensitivität von Bak-überexprimierenden FL5.12-Zellen gegenüber Etoposid-, 5-Fluoruracil- und Taxol-induzierter Apoptose nachweisen konnte (Simonian et al., 1997). Weiterhin wurde kürzlich gezeigt, daß die Wiederherstellung der Bak-Expression in Bak defizienten T-Leukämiezellen mittels adenoviralem Gentransfer die Resistenz gegenüber Etoposid aufheben konnte (Wang et al., 2001). Erklären könnte man diese gegensätzlichen Ergebnisse einmal mit der wahrscheinlich grundsätzlich vorhandenen Zelltypspezifität bei der Regulation der Apoptosesignale und der Vermutung, daß verschiedene Zytostatika unterschiedliche Apoptosesignalwege aktivieren. Zum anderen beziehen sich die hier vorliegenden Daten auf den Versuch der Revertierung von Zytostatika-resistenten Zellen, d.h. diese ursprünglich sensitiven Zellen weisen von vornherein einen oder mehrere Defekte auf. Mit der stabilen Überexpression von Bak und Bik in diesen Zellen sollte versucht werden, diese Defekte mittels Manipulierung der „downstream“-Apoptosekaskade zu umgehen.

6.1.5. Mechanismus der Sensitivierung Zytostatika-induzierter Apoptose

Um die Manipulierung der Apoptosesignalwege mit der Überexpression von Bak und Bik und den damit erreichten Effekt der Sensitivierung bei Epirubicin-induzierter Apoptose genauer aufzuklären, wurden einzelne Checkpunkte innerhalb der Signalkaskade getestet. In Bezug auf die fehlende DNA-Fragmentierung in den MT-3/Adr-Zellen und als Nachweis, daß die Zellen über Apoptose und nicht wie kürzlich beschrieben über Nekrose sterben (Blagosklonny, 2000), wurden bestimmte Merkmale der Apoptose wie das mitochondriale Membranpotential und die Caspase-3 Aktivierung untersucht.

6.1.5.1. Erhöhung der Caspase-Aktivität

Die Untersuchung der Caspase-3-Aktivität während Epirubicin-induzierter Apoptose mittels Western-Blot bzw. funktionellem Aktivitätstest ergab, daß die Bak- und Bik-Transfektanten im Vergleich zu den resistenten Zellen deutlich mehr Caspase-3-Aktivierung aufweisen und dadurch ein verstärktes Zelltod-induzierendes Signal an andere Apoptoseeffektoren weitergeben können. Dies bestätigt Ergebnisse von Bax-überexprimierenden COS-7-Zellen, die eine Apoptoseinduktion durch Caspase-3-ähnliche, d.h. das Tetrapeptid DEVD-spaltende Proteasen, aufwiesen (Tsujimoto et al., 1997).

Bisher existieren Daten, die sowohl Caspase-abhängige als auch Caspase-unabhängige Apoptoseinduktion der Mitglieder der Bcl-2-Familie beschreiben. So gibt es z.B. Daten, daß mit bak und bik transient transfizierte MCF-7-Brustkrebs-Zellen eine Caspase-7-Aktivierung zeigen (Orth et al., 1997) und daß Bax- und Bak-Überexpression Zelltod in Anwesenheit von Caspase-Inhibitoren induziert (Xiang et al., 1996; McCarthy et al., 1997; Korsmeyer et al., 1997). Im Zusammenhang mit der Aktivierung von Caspasen wurde von mehreren Arbeitsgruppen bewiesen, daß das anti-apoptotische Protein Bcl-x_L seinen schützenden Effekt bei Etoposid, Taxol, Vinblastin, Cisplatin und Camptotecin induzierter Apoptose oberhalb der Aktivierung von Caspasen (Caspase-3, Caspase-9) ausübt, indem es z.B. die Assoziierung der Caspase-9 in den Zelltod-induzierenden Komplex mit APAF-1 und dadurch auch die anschließende Aktivierung der Caspase-3 inhibiert (Schmitt et al., 1998; Hu et al., 1998). Bcl-2 hemmt ebenfalls die Caspase-3-Aktivierung und die Spaltung nukleärer Substrate wie PARP (Chinnayan et al., 1996).

In Bezug auf Zytostatika-induzierte Apoptose wurde für die Caspase-3 und Caspase-6 eine zentrale Rolle während der Apoptoseinduktion mit Topoisomerase-Inhibitoren beschrieben (Dubrez et al., 1996; Droin et al., 1998). Außerdem wurde in unserer Arbeitsgruppe die Möglichkeit der Resistenzüberwindung gegenüber Epirubicin, Etoposid und Taxol mittels Überexpression der Caspase-3 nachgewiesen (Friedrich, Wieder et al., 2001).

6.1.5.2. Beeinflussung der Mitochondrienaktivität

Im Verlauf der hier vorgelegten Arbeit wurde von anderen Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Ansätzen gezeigt, daß einerseits Mitglieder der Bcl-2-Familie an der Regulation des mitochondrialen Membranpotentials beteiligt sind und andererseits die in dieser Arbeit verwendeten Zytostatika Etoposid und Doxorubicin, einer analogen Substanz des verwendeten Epirubicins, u.a. über die Störung der Mitochondrienfunktion wirken.

Deshalb lag es nahe, bei den Versuchen die Funktion der Mitochondrien zu testen, um die Sensitivierung gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose in den mit bak und bik/nbk transfizierten Adriamycin-resistenten Zelllinien mechanistisch erklären zu können.

Als zusätzliche Apoptosemessung konnte gezeigt werden, daß das mitochondriale Membranpotential in den resistenten Zellen signifikant weniger durch Epirubicin-Behandlung herabgesetzt wird als in den ursprünglich sensitiven und den aufgrund der Bak- bzw. Bik/Nbk-Überexpression sensitivierten Zellen. Die Versuche bestätigten auf der einen Seite die Beteiligung der Mitochondrien bei Epirubicin-induzierter Apoptose und zeigten außerdem, daß beide Proteine, Bak und Bik/Nbk, ihre pro-apoptotische und in diesem Fall Zytostatikaresistenz-revertierende Funktion in der Signalkaskade oberhalb bzw. auf der Ebene der Mitochondrien ausüben.

Wie in Anbetracht der hohen Bcl-2-Expression erwartet, konnte durch die Überexpression von Bak oder Bik/Nbk eine erhöhte Sensitivität gegenüber Epirubicin-induzierten Zelltod und eine Aufhebung der Resistenz in den MT-1/Adr-Zellen erreicht werden. Die der apoptotischen DNA-Fragmentierung vorausgehende mitochondriale „permeability shift transition“ erreichte in den Bak- und Bik/Nbk-Transfektanten ähnliche Niveaus wie die Wildtyp MT-1-Zellen. Das heißt, die Überexpression von Bak oder Bik/Nbk ermöglichte die Revertierung der defekten Mitochondrienaktivierung nach Epirubicin-Inkubation.

In den MT-3/Adr-Zellen verursachten Bak und Bik/Nbk eine signifikante, aber unvollständige Revertierung der Zytostatikaresistenz. Im Gegensatz dazu wurde die Aktivierbarkeit der Mitochondrien vollständig wieder hergestellt. Bei der Caspase-3 Aktivierung wurde beobachtet, daß weder die Bak- noch die Bik/Nbk-Transfektanten das Niveau der Epirubicin-sensitiven MT-3-Zellen erreichten. Die Ursache für diese scheinbaren Widersprüche könnten in zusätzlichen Defekten in der Caspase-Aktivierung in den MT-3/Adr-Zellen liegen. In anderen Modellsystemen existieren Hinweise auf solche Defekte, die sich auf APAF-1 oder die Caspase-9 beziehen.

Die Analyse von Bcl-2-Homologen charakterisiert diese als Regulatoren der mitochondrialen Funktion bei der Kontrolle der Apoptose (Zamzami et al. 1995, Decaudin et al. 1997). Diese Proteine sind an der Regulation von zwei Aspekten der Mitochondrien beteiligt, in erster Linie an der Freisetzung apoptotischer Faktoren ins Zytosol und weiterhin am Öffnen der mitochondrialen „permeability transition“-Pore. Zusätzlich zu Cytochrom c kontrollieren Bcl-2-Homologe auch die Freisetzung und Aktivierung der Caspasen-2, -3 und -9 (Mancini et al., 1998; Krajewski et al., 1999; Susin et al., 1999), den

Apoptose-induzierenden Faktor AIF (Susin et al., 1999) und Smac/Diablo, einem Inhibitor der IAP-Proteine (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000). Viele Mitglieder dieser Familie sind konstitutiv mit den Membranen der Mitochondrien assoziiert. Bcl-2 selbst ist in der äußeren Membran an der Kontaktseite der inneren und äußeren Membran lokalisiert (De Jong et al., 1994), andere Proteine wurden nicht konstitutiv, aber induzierbar mit spezifischen Stimuli an den mitochondrialen Membranen nachgewiesen. So befindet sich über die Hälfte des Bax-Proteins im Zytosol, bis ein Apoptosesignal die Insertion in die mitochondrialen Membranen verursacht (Hsu et al., 1997). Nicht alle Bcl-2-Homologe verfügen über eine Transmembrandomäne in der Nähe des C-Terminus, die eine Assoziation mit intrazellulären Membranen direkt ermöglicht, können aber nach Apoptoseinduktion und daraus entstehender Konformationsänderungen, oder Phosphorylierung, wie im Falle von Bid und Bad (Li et al., 1998; Datta et al., 1999), aus dem Zytosol zu den Mitochondrien translozieren oder durch Dimerisierung mit anderen Homologen ihre regulatorischen Funktionen an den Mitochondrien ausüben. Apoptose-Inhibitoren der Bcl-2-Familie hemmen die Mitochondrienaktivierung. Im Gegensatz dazu können pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie, wie die Mitglieder der Bax-Subfamilie (Bax, Bak und Bok), die Mitochondrien direkt aktivieren (Kroemer and Reed, 2000; Shimizu and Tsujimoto, 2000; Van der Heiden and Thompson, 1999). Zytoprotektive Proteine wie Bcl-2 oder Bcl-x_L erschweren oder verhindern die Freisetzung von Cytochrom c infolge verschiedener Stimuli. Es ist bekannt, daß Bcl-x_L das Membranpotential und die Volumenhomöostase von Mitochondrien reguliert. Bcl-x_L erhält die Impermeabilität der äußeren mitochondrialen Membran und verhindert die Freisetzung von Cytochrom c und spätere Depolarisierung der Mitochondrien während der Apoptose (Van der Heiden et al., 1997).

Die Tatsache, daß die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien dem Öffnen der mitochondrialen „permeability transition“-Pore vorausgeht, wurde auch am Beispiel von Bax bestätigt. Bax induziert in neuronalen Zellen Cytochrom c-Freisetzung, die mit den typischen Veränderungen der Mitochondrien wie dem Schrumpfen der Mitochondrien und der Clusterbildung apoptotischer Mitochondrien um den Zellkern verbunden ist, jedoch nicht durch Cyclosporin A oder andere Inhibitoren der mitochondrialen „permeability transition“ verhindert werden kann (Desagher et al., 1999).

Es gab Hypothesen, daß die Mitglieder der Bcl-2-Familie direkt an der Regulation der PT-Pore beteiligt sind, indem sie selbst Poren oder Ionenkanäle bilden (Antonsson et al. 1997,

Minn et al., 1997; Schendel et al., 1997; Schlesinger et al., 1997; Schendel et al., 1999). Bei diesen Untersuchungen wurden die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak als rekombinante Proteine zu isolierten Mitochondrien gegeben und gezeigt, daß sie den Verlust von Ca^{2+} und die Freisetzung von Cytochrom c induzieren (Jürgensmeier et al., 1998; Narita et al., 1998; Zamzami et al., 1996).

Eine andere diskutierte Möglichkeit besteht in der kürzlich nachgewiesenen Regulierung der Cytochrom c-Freisetzung durch Proteine der Bcl-2-Familie mittels des mitochondrialen Kanals VDAC (Shimizu et al., 1999). Es konnte in Liposomen gezeigt werden, daß rekombinantes Bax- und Bak-Protein die Öffnung des VDAC-Kanals beschleunigen kann, wogegen Bcl-x_L den VDAC-Kanal durch direkte Bindung schließt. Bax und Bak ermöglichen die Cytochrom c-Freisetzung durch den VDAC-Kanal in diesem System. Diese Ergebnisse bestätigten vorherige *in vitro*-Daten dieser Arbeitsgruppe, daß rekombinantes Bax und Bak mitochondriales Anschwellen, Verlust von Ca^{2+} und Cytochrom c-Freisetzung induzieren können. Für diese Effekte wurde die Notwendigkeit der BH3-Region durch Mutationsuntersuchungen nachgewiesen (Narita et al., 1998). Außerdem wurde mittels „yeast two hybrid“-System eine Wechselwirkung zwischen Bax und dem Adenin nukleotid-Translokator (ANT), einem konstitutiven mitochondrialen Protein, das als ATP/ADP-Antiporter agiert, nachgewiesen.

Zu den Zelltodfaktoren, die durch Ca^{2+} Apoptose induzieren, gehören neben Hormonen, Zytokinen, Rezeptoren (Apo-1/Fas), Serum- oder Wachstumsfaktorentzug, Pro-Oxidantien, Strahlung, Viren oder pro-apoptotischen intrazellulären Signalmolekülen, wie z.B. Ceramiden, Staurosporin, p53-Aktivierung und Bax-Überexpression, auch chemotherapeutische Reagenzien. Es wurden für verschiedene Chemotherapeutika Einflüsse auf die Mitochondrienfunktion nachgewiesen (Decaudin et al., 1997).

6.1.5.3. Bildung reaktiver Sauerstoffradikale

In den hier durchgeführten Versuchen waren die Resistenzrevertierung bei der Epirubicin- bzw. Etoposid-induzierten Apoptose aufgrund der Überexpression von Bak und Bik/Nbk und die Bedeutung des oxidativen Stresses in diesem Zusammenhang von Interesse. Es konnte bestätigt werden, daß sowohl Epirubicin als auch Etoposid die Bildung von ROS induzieren und diese durch den Radikalfänger N-Acetylcystein gehemmt werden kann. Allerdings stellte sich heraus, daß die Resistenz gegenüber Epirubicin in dem hier verwendeten Zellsystem aus MT-1- und MT-1/Adr-Zellen in keinem Zusammenhang mit

der Bildung von ROS stehen. Apoptose-sensitive und –resistente Zellen generierten in gleichem Maße Sauerstoffradikale. Im Gegensatz dazu besteht bei Etoposid-induzierter Apoptose ein deutlicher Unterschied. In den gegenüber Etoposid sensitiven MT-1-Zellen wurden wesentlich mehr Superoxidradikale gebildet als in den resistenten MT-1/Adr-Zellen und deren Bak-, Bik- oder Kontroll-Transfektanten. Dieses Ergebnis könnte man so deuten, daß Bak und Bik/Nbk entweder „downstream“ der ROS-Bildung wirken oder aber diesen Signalweg nicht beeinflussen. Außerdem kann geschlossen werden, daß eine Ursache der Resistenz gegenüber Etoposid die Verringerung der ROS und damit die Veränderung des Redoxstatus darstellen.

Ein Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\psi$ infolge einer erhöhten ROS (reactive oxygen spezies)-Produktion und einer Reduktion der mitochondrialen Masse wurde in mehreren Zelltod-Modellen gezeigt (Kroemer, 1997). Oxidantien wie Peroxinitrit und Wasserstoffperoxid induzieren mitochondriale „permeability transition“ und hemmen die mitochondriale Atmungskette (Packer et al., 1995).

Zunächst wurde angenommen, daß Apoptose innerhalb der biologischen Evolution als Mechanismus zur Befreiung der Zellpopulation von für das Gewebe gefährlichen Zellen, z.B. von ROS-überproduzierenden Zellen, entwickelt wurde. Jetzt gibt es mehrere Beweise, daß ein kontrollierter Gehalt an ROIs (reactive oxygen intermediates) verschiedene Aspekte zellulärer Funktionen moduliert und für bestimmte Signaltransduktionswege nötig ist, wie z.B. für die Apoptosesignalkaskade (Susin et al., 1996).

ROS schließen freie Sauerstoffradikale, starke Oxidantien wie Wasserstoffperoxid, außerdem Stickoxide und das Peroxinitritradikal ein. Die Quellen der ROS sind durch physiologische enzymatische Mechanismen repräsentiert.

Das zentrale Ziel vieler Studien ist die Etablierung einer kausalen Kette zwischen physiologischen oder pathologischen Abfall von $\Delta\psi$, der ROS-Bildung, der „permeability transition“-Pore und nachfolgenden apoptotischen oder nekrotischen Zelltod (Skulachev, 1996). Eine Möglichkeit der Lösung solcher Probleme besteht in der Untersuchung von ROS-Antagonisten mit verschiedenen Mechanismen, wie z.B. Radikalfänger wie N-Acetylcystein, 2-Mercaptoethanol, Vitamin E, Antioxidantien und Katalase (Ikeda et al., 1999).

Obwohl der oxidative Stress eine der Ursachen der Porenöffnung ist, scheint die Beteiligung an der Apoptose ein früheres Ereignis zu sein (Susin et al., 1997) und die

Induktion pro-apoptotischer Proteine und die Cytochrom c-Freisetzung scheinen vor dem Abfall des Transmembranpotentials stattzufinden (Yang et al., 1997; Kluck et al., 1997).

Oxidativer Stress ist an verschiedenen Wegen, u.a. bei p53-, Dexamethason-, Etoposid-, Ceramid-, TNF- (Schutze-Osthoff, et al., 1994) und Fas- (Kasahara et al., 1997) induzierter Apoptose beteiligt. Für Adriamycin, dem Epirubicin-Analogon, wurde bereits gezeigt, daß Mangan-Superoxiddismutase in transgenen Mäusen Mitochondrien des Herzmuskels vor Adriamycin-induzierter Apoptose schützt (Yen et al., 1999). Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale sind Mediatoren der Daunorubicin-induzierten Apoptose.

Bcl-2 ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert und kann bei Überexpression Zellen vor Lipidperoxidation und Thioloxydation durch H₂O₂ schützen (Hockenbery et al., 1993). Es wurde gezeigt, daß Überexpression von Bcl-2 die Lipidperoxidation und ROS-Bildung supprimiert (Kane et al., 1993, Hockenbery et al., 1993) und zu einem Anstieg an GSH und Superoxiddismutase führt (Ellerby et al., 1996).

6.1.6. Expression Apoptose-assoziiierter Proteine

Es wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen, daß ein Zusammenhang zwischen der Expression der Mitglieder der Bcl-2-Familie und dem Ansprechen auf Therapie besteht. Die Wiederherstellung der Expression des Apoptoseförderers Bax in Brustkrebszelllinien hemmt die Tumorigenese (Bargou et al., 1996) und steigert die Sensitivität gegenüber Chemotherapie (Wagener et al., 1996; Yin et al., 1997). Bei Brustkrebspatienten korreliert eine reduzierte Bax-Expression mit einem schlechteren Ansprechen auf Chemotherapie und kürzerer Überlebenszeit (Krajewski et al., 1995). In Ovarial- (Tai et al., 1998), Pankreas- (Friess et al., 1998), Ösophagus- und metastasierten kolorektalen Karzinomen (Sturm et al., 1999; Sturm et al., 2001) wurde eine reduzierte bzw. der Verlust der Bax-Expression als negativer prognostischer Faktor für die Tumorthherapie beschrieben. Für das in dieser Arbeit untersuchte Bcl-2-Mitglied Bak wurde ein reduziertes Expressionsniveau in Magen- und Kolorektal-Tumoren (Krajewska et al., 1996; Krajewska et al., 1998), verglichen mit Normalgewebe, sowie Bak-Mutationen in Magen-Darm-Karzinomen nachgewiesen (Kondo et al., 2000). Daraus lässt sich schließen, daß Bak bei der Pathogenese dieser Tumore eine Rolle spielt.

Die hier durchgeführte Untersuchung der Expression Apoptose-assoziiierter Proteine nach Inkubation mit Epirubicin ergab, daß in den auf Apoptoseinduktion am sensitivsten reagie-

renden MT-1-Zellen alle drei untersuchten Apoptoseförderer der Bcl-2-Familie, Bax, Bak und Bik induziert wurden. Als eine mögliche Ursache für die Zytostatika-Resistenz wurde in den MT-1-Zellen außerdem eine deutlich geringere Expression von Bcl-2 als Zelltod-inhibierendem Protein nachgewiesen als in den resistenten MT-1/Adr Zellen. Über die Apoptoseinhibitoren weiß man, daß sich mit Bcl-2 transfizierte Zelllinien resistenter gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika wie Etoposid, Camptothecin oder auch Doxorubicin verhalten (Walton et al., 1993; Miyashita und Reed, 1993). Es wurde auch eine Bcl-x_L-Überexpression in Doxorubicin- bzw. Vincristin-resistenten U937-Zellen nachgewiesen (Datta et al., 1995).

Die Expression von p53 wurde, wie erwartet, in allen Zellen als Antwort auf zellulären Stress induziert, wobei dieser Effekt bei den auf die Apoptoseinduktion mit Epirubicin sensitiv reagierenden MT-1-Zellen und den Bak- und Bik-Transfektanten stärker ausgeprägt war als in den MT-1/Adr-Zellen.

Die Expression der Zelltodinhibitoren Bcl-2 und Bcl-x_L blieb bei den Bak- und Bik-Transfektanten wie bei den MT-1/Adr-Zellen konstant, wurde also durch die Überexpression eines Apoptose-Förderers nicht verändert. Die höhere Bax-Expression im Grundzustand der Bak-Transfektanten wäre eine mögliche Erklärung für das im Gegensatz zu den Bik-transfizierten Zellen bessere Ansprechen auf Epirubicin. Im Vergleich zu den Epirubicin-resistenten MT-1/Adr-Zellen zeigen die Bak- und Bik-Transfektanten bei mindestens einem Apoptose-fördernden Protein sowohl eine höhere Expression im Grundzustand als auch nach Apoptoseinduktion, so daß ein deutlich verstärktes Apoptosesignal weitergegeben wurde. Dies bestätigt Daten in Ovarialkarzinom-Zelllinien gegenüber Cisplatin und Taxol-induzierter Apoptose, in denen die Expression der Zelltodinhibitoren Bcl-2 und Bcl-x_L nach 72 h-Zytostatikainkubation ebenfalls unverändert blieb, wogegen die Bak- und Bax-Expression anstieg (Jones et al., 1998).

Insgesamt sollte man beim Vergleich dieser Expressionsdaten mit anderen Veröffentlichungen bedenken, daß wahrscheinlich eine starke Zellspezifität in der Expression der Mitglieder der Bcl-2-Familie, d.h. eine Gewebe- und Zell-spezifische Kontrolle des Zelltodes besteht. Außerdem können die verschiedenen Zytostatika unterschiedliche Apoptosesignalwege aktivieren, wodurch sich sehr viele Möglichkeiten in der Apoptoseregulation bieten.

6.2. Erhöhung der Thermosensitivität

6.2.1. Bak revertiert Hyperthermie-Resistenz

Hyperthermie, kombiniert mit Strahlen- oder Chemotherapie, ist eine vielversprechende Methode der Krebsbehandlung (Galen et al., 1990; Gonzalez et al., 1995). Hitzebehandlung oder Hyperthermie im Temperaturbereich von 41°C bis 45°C induziert Apoptose in vielen Zelltypen *in vitro* und *in vivo* (Dyson et al., 1986, Barry et al., 1990), während Hitzebehandlung über 45°C nekrotischen Zelltod auslöst (Harmo et al. 1990).

In dem von uns verwendeten Zellsystem war bei einer Hitzebehandlung von 42°C keine Veränderung der metabolischen Funktionen mittels des MTT-Tests meßbar. Erst nach Inkubation der Zellen bei 43°C erfolgte eine Reaktion. Der Unterschied im Ansprechen auf Hyperthermie war zwischen Temperatur-sensitiven und -resistenten Zellen nach 3 h bei 43°C am deutlichsten, wogegen die Bak-überexprimierenden Transfektanten der resistenten Zelllinie bereits nach 1 h bei 43°C eine stark verringerte Viabilität aufwiesen. Bei einer anschließenden Kultivierung der Zellen von 48 h unter den für diese Zellen normalen Bedingungen konnten gut reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. Mit Hilfe der modifizierten Zellzyklusanalyse wurde apoptotische DNA-Fragmentierung gezeigt und somit die Induktion des apoptotischen Prozesses bewiesen, wobei die Bak-Transfektanten einen deutlich höheren Anteil apoptotischer Zellen zeigten als die Temperatur-resistenten Zellen und die Kontrolltransfektanten.

Es existieren bereits Daten, die auf einen Zusammenhang von Hyperthermie und der Bcl-2-Familie hinweisen. Bcl-2-überexprimierende B-Zellen wurden vor Hyperthermie-induzierter Apoptose geschützt (Alvarado et al. 1997). Im allgemeinen gilt Bcl-2 als antiapoptotisches Protein, das Zellen vor vielen Zelltodstimuli einschließlich Zytostatika und Hitze schützt. Bcl-x_L-überexprimierende murine lymphatische Zellen zeigten refraktäres Ansprechen auf Hitze-induzierte Apoptose nach 1 h bei 42°C. Außerdem bewirkte die Bcl-x_L-Überexpression eine Herunterregulation der Bax-Expression und die Induktion des Stressproteins Hsp70 wurde unterdrückt (Robertson et al., 1997).

Die bei der Bewertung der in dieser Arbeit erzielten Resultate sollten auch bezüglich der Hyperthermie die in der Klinik angewendeten Therapien aus einer Kombination von Chemo- und Strahlentherapie beachtet werden. Es wird z.B. einerseits vermutet, daß die Zytostatika aufgrund der höheren Temperatur vor oder während der Chemotherapie

schneller in die Zellen eindringen können. Außerdem werden bei erhöhten Temperaturen die auf DNA-Schäden folgenden Reparaturmechanismen gehemmt (Hettinga et., 1997). Deshalb ist geplant, bei weiterführenden Experimenten jeweils zwei Zelltodstimuli, Hitze und Zytostatika oder Hitze und Bestrahlung, innerhalb des vorhandenen Zellsystems zu testen und die mögliche Sensitivierung der resistenten Zellen aufgrund der Bak-Überexpression zu untersuchen. Eventuell lassen sich auf diese Weise die Apoptose-sensitivierenden Effekte auch bei geringeren Temperaturen erreichen.

6.2.2. Beeinflussung der Expression Hyperthermie- und Apoptose-assoziiierter Proteine

Zur Erklärung der Ursachen oder möglicher Paralleleffekte wurde die Expression Apoptose- und Hitzeschock-assoziiierter Proteine im verwendeten Zellsystem untersucht. Die Bak-Expression wurde nach Hitzeschock sowohl im Kontrollklon als auch im Bak-Klon deutlich vermindert, aber es wird in den thermosensitiven Bak-transfizierten Zellen trotzdem erheblich mehr Bak exprimiert als in den weniger auf Hitzeschock ansprechenden Kontrollzellen, so daß ein wesentlich stärkeres Zelltodsignal weitergegeben wird. Die Wildtyp-p53-Proteinfunktion spielt eine zentrale Rolle beim auf einen DNA-Schaden folgenden Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Kastan et al., 1991). Die Inaktivierung der p53-Funktion schützt Zellen gegen die zytotoxischen Effekte der Hyperthermie (van Bree et al., 1999). Es setzt die Thermosensitivität herab. Dies bestätigte andere Ergebnisse über eine Apoptosestimulation nach Transfektion von wt-p53 in Fibroblasten von p53-Knockout-Mäusen (Matsumoto et al., 1997). Allerdings zeigt auch der Vergleich dieser beiden Veröffentlichungen die Zelltypspezifität der Thermosensitivität als Folge eines komplexen Gleichgewichtes zellulärer Faktoren, denn der gleiche Effekt wurde von der einen Arbeitsgruppe bei 44°C, von der anderen bei 41°C beobachtet.

Die Hitzeschock-Proteine Hsp60 und Hsp70 weisen in den Bak-transfizierten Zellen bereits im Grundzustand ein wesentlich höheres Expressionsniveau auf als die Kontrollzellen. Dies könnte man mit der Reaktion der Zellen auf die verstärkte Expression des pro-apoptotischen Proteins Bak interpretieren, dessen Zelltod-induzierendes Signal im Rahmen der Transfektion und Selektion der Klone die Induktion der Hsp70-Expression begünstigt hat. Alternativ könnte Bak eine Chaperonfunktion für diese Hsp-Proteine besitzen und die Expression der Proteine stabilisieren. Diese Stressantwort und die Hsp-

Expression wird nach Zelltodinduktion durch Hitzebehandlung noch verstärkt, reichte in diesem Fall aber nicht aus, um die Zellen vor Apoptose zu schützen.

Die Hitzeschockproteine gehören zu den hochkonservierten Proteinen hinsichtlich Struktur und Funktion als molekulare Chaperone (Lindquist et al., 1988; Ellis et al., 1996; Arrigo et al., 1998). Wie bei der Bcl-2-Familie, so gehören auch zu den Hitzeschockproteinen pro- und anti-apoptotische Proteine. So wurde für Hsp 60 gezeigt, daß es infolge von Apoptosestimuli aus den Mitochondrien freigelassen wird und die Aktivierung von Procaspasen beschleunigt (Samali et al., 1999; Xanthoudakis et al., 1999). Die Hemmung der Expression oder Neutralisation der Funktion von Hsp70 sensitiviert Zellen extrem gegenüber Hitze (Johnston and Kucey, 1988). Es scheinen somit verschiedene protektive Mechanismen als Antwort auf Hitzestress zu existieren (Mosser et al. 1997). In Hitze-behandelten Zellen unterstützt Hsp70 die Faltung denaturierter Proteine und neutralisiert den toxischen Effekt denaturierter Proteine (Nollen et al. 1999).

Ein anderer Chaperon-bezogener Wirkungsmechanismus von Hsp70 könnte die Bindung an pro-apoptotische Proteine sein. In einigen Zellen wurde eine Assoziation mit p53 und mit dem antiapoptotischen Protein Bag-1 gefunden (Stürzbecher et al., 1988, Takayama et al., 1999). Die genauen molekularen Mechanismen sind allerdings noch unklar. Die Fähigkeit von Hsp70, vor Apoptose durch verschiedene Chemotherapeutika zu schützen, läßt vermuten, daß es die Tumorgenese beeinflußt und die Effizienz von Tumortherapien eingeschränkt. Hitzeschockproteine sind oft in menschlichen Tumoren überexprimiert und ihre Expression korreliert in einigen Tumorarten mit schlechter Prognose und Therapieresistenz. Bei Brustkrebs ist Hsp70 z.B. ein prognostischer Faktor, der signifikant mit einem kürzeren krankheitsfreiem Überleben, erhöhter Zellproliferation, Status der Differenzierung und Lymphknotenmetastasen korreliert (Ciocca et al., 1993, Vargas-Rroig et al., 1998). Deshalb stellt es eine Herausforderung dar, Wege zur Hemmung ihrer Expression zu finden, z.B. durch Antisense-Technologie oder Neutralisation ihrer antiapoptotischen Aktivität durch natürliche Antagonisten wie Bax oder Bak.

Die Hemmung der Aktivität solcher Überlebensproteine kombiniert mit traditionellen Chemotherapeutika könnte somit die Effektivität einer Vielfalt von Tumortherapien verbessern und den Einsatz niedrigerer Dosierungen toxischer Medikamente ermöglichen.