

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte eines der Hauptprobleme der heutigen Krebstherapie bei soliden Tumoren, die im Verlauf einer Therapie auftretende Resistenz gegenüber Zytostatika, untersucht werden. Die Aufgabe lag darin, Apoptoseresistenz- und damit Zytostatikaresistenz-regulierende Signalproteine zu identifizieren.

Dazu standen zwei zelluläre Modellsysteme aus Zytostatika-sensitiven (MT-1 und MT-3) und resistenten (MT-1/Adr und MT-3/Adr) Mammakarzinom-Zelllinien zur Verfügung.

Folgende Ergebnisse wurden in den Modellsystemen erzielt:

1. Der Defekt der MT-1/Adr-Zellen ist innerhalb des Apoptose-Signalweges auf dem Niveau der Mitochondrien lokalisiert und mit einer stark erhöhten Bcl-2-Expression verglichen mit den Zytostatika-sensitiven MT-1-Zellen assoziiert.

Im Gegensatz dazu wird die Resistenz der MT-3/Adr-Zellen durch die Überexpression des MDR-1/P-Glykoproteins hervorgerufen. Dies hat eine verstärkte Detoxifizierung der Zelle durch erhöhten Efflux des Zytostatikums aus der Zelle zur Folge.

2. Es sollte untersucht werden, ob die Resistenz dieser Zelllinien durch Manipulation des Bcl-2-Signalweges überwunden werden kann und welche Rolle einzelne Mitglieder der Bcl-2-Familie dabei spielen. Aus diesem Grund wurden zunächst die beiden Apoptose-fördernden Proteine Bak und Bik/Nbk in den beiden Anthrazyklin-resistenten Zelllinien MT-1/Adr und MT-3/Adr stabil überexprimiert.

3. Die Überexpression von Bik/Nbk sensitivierte MT-1/Adr-Zellen gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose und antagonisierte die Zytostatikaresistenz teilweise. Die Überexpression von Bak führte zur vollständigen Revertierung des resistenten Phänotyps der MT-1/Adr-Zellen und äquivalenter Sensitivität gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose, verglichen mit den maternalen MT-1-Zellen.

4. In den MT-3/Adr-Zellen konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von Bak und Bik/Nbk die Sensitivität gegenüber Epirubicin-induzierter Apoptose erhöhte, jedoch nicht das Niveau der sensitiven Ursprungszellen MT-3 erreichte.

Es konnte nachgewiesen werden, daß Apoptose-fördernde Mitglieder der Bcl-2-Familie nicht nur chemosensitivierend wirken, sondern auch verschiedene, bereits existierende

Defekte innerhalb der Apoptosesignalwege von Zytostatika umgehen können. Das zusätzliche Apoptosesignal reichte aus, den Schwellenwert für die Einleitung der Apoptose herabzusetzen und die Tumorzellen wieder zu sensitivieren. Das heißt, daß die während der Therapie erworbene Resistenz der Krebszellen gegenüber dem Anthrazyklin Epirubicin auf diese Weise antagonisiert werden kann.

5. Die Überexpression dieser beiden Proteine beeinflusste weder die Zytostatika-aufnahme und -efflux von Epirubicin noch die Expression des Transportproteins MDR-1. Die MDR-1-Expression wurde infolge der Transfektion von Bak oder Bik/Nbk nicht verändert.

6. Die nähere Betrachtung des Epirubicin-induzierten Apoptosesignalweges zeigte die Beteiligung der Mitochondrien und die Aktivierung der Effektorcaspase-3. Beide wesentlichen Checkpunkte in der Apoptosekaskade sind im Vergleich zu den ursprünglich sensitiven Mammakarzinom-Zellen bei den Anthrazyklin-resistenten Zellen defekt. In den chemosensitiveren Transfektanten konnte nach Epirubicinbehandlung eine erhöhte Caspase-3-Aktivierung und ein stärker herabgesetztes mitochondriales Membranpotential, das den Verlust der mitochondrialen Membranintegrität zur Folge hat, nachgewiesen werden.

7. Weiterhin wurde die Kreuzresistenz der Zelllinien gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika, die nach unterschiedlichen Mechanismen wirken, untersucht. Durch die Überexpression von Bik/Nbk und Bak konnte die Resistenz gegenüber dem Anthrazyklin Epirubicin gebrochen werden, jedoch wurde die Resistenz gegenüber Etoposid und Taxol nicht verändert.

8. Daraufhin wurden mögliche Unterschiede in den Signalwegen und Resistenzursachen überprüft. Es konnte kein Unterschied in der Bildung freier Sauerstoffradikale zwischen Epirubicin-sensitiven und -resistenten Zellen gemessen werden, aber die Etoposid-sensitiven Zellen bildeten deutlich mehr Sauerstoffradikale als die Etoposid-resistenten maternalen Zellen und Transfektanten. Das heißt, dieser Signalweg ist bei Etoposid-induzierter Apoptose von Bedeutung und kann durch Bik/Nbk oder Bak nicht beeinflusst werden.

9. Weiterhin stellte sich die Frage, ob das Apoptose-fördernde Protein Bak nicht nur Zytostatikaresistenz, sondern auch Thermoresistenz antagonisieren kann. Dazu wurden stabil überexprimierende Bak-Klone in einer thermoresistenten Magenkarzinomzelllinie generiert und deren Apoptoseverhalten mit den ursprünglichen thermosensitiven und thermoresistenten Zellen verglichen. Dabei konnte bestätigt werden, daß Hyperthermie Apoptose induziert und daß der Bcl-2-Signalweg daran beteiligt ist. Bak-Transfektanten reagierten deutlich sensitiver auf Hitzebehandlung, das heißt Bak revertiert auch die in diesem System vorliegende Thermoresistenz.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Bak und Bik/Nbk mögliche Zielproteine für einen gentherapeutischen Ansatz darstellen. Die Untersuchungen, daß die Apoptoseregulation durch Mitglieder der Bcl-2-Familie nicht nur Chemosensitivität sondern auch Resistenzen verschiedener Ursachen wie Chemoresistenz und Thermoresistenz beeinflussen kann, sprechen für die zentrale Bedeutung der Bcl-2-Familie in der Pathogenese des Mammakarzinoms.