

# 1 Einleitung

## 1.1 Entstehung des kolorektalen Karzinoms

### 1.1.1 Mehrschrittkanzerogenese

Kolorektale Karzinome sind die dritthäufigsten malignen Erkrankungen in den westlichen Industriestaaten. Sie betreffen Männer und Frauen nahezu gleichermaßen, am häufigsten zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr. In den meisten Fällen tritt der Tumor sporadisch auf, aber auch hereditäre Syndrome mit Disposition zu kolorektalen Karzinomen mit überwiegend autosomal-dominantem Erbgang sind bekannt.

Kolorektale Karzinome können auf verschiedenen Wegen entstehen. Die meisten Tumoren entwickeln sich schrittweise über adenomatöse Vorstufen. Das maligne Potential der Adenome steigt mit zunehmender Größe, der Erhöhung des villösen Anteils und dem Grad der Dysplasie. Dieser Entstehungsweg wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet (1, 2). Weiterhin wurde eine *de novo* Genese ohne adenomatöse Vorstufen beschrieben (3). Die phänotypischen Veränderungen einer malignen Transformation der Kolonmukosa bei der Adenom-Karzinom-Sequenz werden anhand des genetischen Mehrschrittkanzerogenesemodells erklärt (4).

Eine frühe genetische Veränderung bei der Tumorentstehung ist die Mutation eines Allels des Tumor-Suppressorgens APC (*adenomatous polyposis coli*), die die Proliferation des Dickdarmepithels stimuliert (5). Das APC-Gen befindet sich auf Chromosom 5q und ist bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) bereits in den Keimzellen auf einem Allel mutiert (6, 7). Bei Patienten ohne FAP finden sich in etwa 60% der sporadischen Adenome und Karzinome Mutationen im APC-Gen (8). Zusätzlich wird in 30% der Adenome und in 20-25% der Karzinome ein Verlust des nicht mutierten Allels gefunden (4, 9). Die Funktion des APC-Proteins besteht unter anderem aus der Regulation des *wnt*-Signaltransduktionsweges, der eine Rolle bei Zellproliferation und möglicherweise -motilität spielt (10).

Hypomethylierung der DNA (11), in einigen Regionen jedoch auch Hypermethylierung (12), Aktivierung des Proto-Onkogens *ras* durch eine Mutation (13) und ein Allelverlust des DCC-

Gens (*deleted in colon carcinoma*) (14) tragen zur weiteren Entwicklung zum benignen Adenom bei.

Mutationen des Proto-Onkogens *ras* auf Chromosom 12p finden sich in 50% der über 10 cm großen Adenome und in 40% der Karzinome (15, 16). Bei dem *ras*-Protein handelt es sich um eine GTPase, die über eine Kaskade von Signaltransduktionskinasen die Proliferation der Zelle auslöst (17). Eine Mutation im *ras*-Proto-Onkogen führt über eine andauernde Aktivierung des *ras*-Proteins zu einem stetigen Proliferationsstimulus und damit zu unkontrollierter Zellproliferation.

Der zweithäufigste Allelverlust im kolorektalen Karzinom findet sich beim Karzinom in mehr als 70% der Fälle und beim Adenom in 50% der Fälle auf Chromosom 18q (15). Liegt ein Allelverlust auf 18q vor, ist in 90% der Karzinome auch das DCC-Gen betroffen (4). Es kodiert ein Protein, das Homologien mit den an der Zelladhäsion beteiligten Zelloberflächenglykoproteinen aufweist. In 50% der Primärkarzinome wurde ein Verlust oder eine Verringerung der DCC mRNA gefunden (18). Für eine wichtige Rolle von DCC spricht auch die Beobachtung, dass Patienten mit einem kolorektalen Karzinom im Stadium II bei einem Allelverlust auf 18q eine 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 54% aufweisen, während diese Rate bei Patienten ohne Verlust des Allels 93% beträgt.

Der Verlust einer Region, die sich auf Chromosom 17p befindet, ist für spätere Stadien der Tumorentwicklung bedeutsam (14). Er wird in mehr als 75% der kolorektalen Karzinome festgestellt (15) und betrifft in den meisten Fällen das Tumor-Suppressorgen p53 (19). Der Verlust eines p53-Allels ist häufig mit Punktmutationen in den *hot spots* des verbliebenen p53-Allels kombiniert (19). Das p53-Gen ist in 50-60% der kolorektalen Karzinome mutiert (20). Das Genprodukt des nicht mutierten p53-Gens ist ein Transkriptionsfaktor. Es bindet unter anderem an die Promoterregion des p21-Gens, das einen Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinasen kodiert.

Die Akkumulation dieser genetischen Veränderungen und nicht deren Reihenfolge ist entscheidend für die Entstehung eines Malignoms (4).

### 1.1.2 Mikrosatelliteninstabilität und *mismatch repair* System

Nicht korrigierte Basenfehlpaarungen, die während der DNA-Verdopplung vor der Mitose auftreten und normalerweise durch das *mismatch repair* System berichtigt werden, führen zu unterschiedlicher Länge von kurzen repetitiven Regionen (Mikrosatelliten). Die Variabilität der Mikrosatellitenlänge innerhalb der Region wird als Mikrosatelliteninstabilität (MSI) bezeichnet.

Bei den Mikrosatelliten handelt es sich um kurzstreckige DNA-Fragmente mit einfachen Wiederholungen (A)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>, wobei n zwischen 5 und 30 beträgt (21, 22). Der Mikrosatellitenstabilitätsstatus kann durch den Vergleich von PCR-amplifizierten Mikrosatellitensequenzen in Tumor-DNA und normaler DNA desselben Patienten bestimmt werden. Normalerweise werden 5 bis 10 verschiedene Mikrosatellitenmarker mit Mono-, Di- und Trinukleotidwiederholungen untersucht.

Erstmals wurden in Untersuchungen von HNPCC-Tumoren mit Mikrosatellitenmarkern längenveränderte Amplifikate im Vergleich zur konstitutionellen DNA nachgewiesen (23, 24). Eine Mikrosatelliteninstabilität findet sich in 90% der Fälle bei HNPCC-Tumoren (25) und in 15% aller kolorektalen Karzinome (24, 26, 27). Diese Tumoren weisen zahlreiche Insertionen oder Deletionen an Mikrosatellitensequenzen auf (24).

Beim *mismatch repair* System handelt es sich um ein multimolekulares Reparatursystem, das zuerst in *E. coli* beschrieben wurde (28). Bakterien, die nicht über dieses Reparatursystem verfügen, weisen eine hohe Mutationsfrequenz auf. Das System besteht aus einem Erkennungsprotein (MutS), einer Endonuklease (MutH), einem komplexbildenden Protein (MutL), einer DNA-Helicase (MutU), einer Exonuklease, einer Polymerase, einem Einzelstrang-bindenden Protein sowie einer DNA-Ligase (28). Entsprechende Gene des *mismatch repair* Systems wurden beim Menschen identifiziert: hMSH2 und GTBP/P160 sind homolog zum MutS; hMLH1, hPMS1 und hPMS2 sind homolog zu MutL. Einige Läsionen werden von hMSH2 allein erkannt, während andere durch ein Heterodimer aus hMSH2 und GTBP/P160 oder durch Kombination mit einem unbekanntem Protein identifiziert werden (29). Das hMLH1 Protein ist wie hMSH2 stets notwendig bei der Reparatur. Es kann auch als Heterodimer mit hPMS2 vorliegen. Die Entfernung der Fehlpaarung mit nachfolgender Resynthese und Ligation vervollständigt den Reparaturprozess. Das *mismatch repair* System ist nicht nur an der Reparatur der bei der Replikation auftretenden Fehler beteiligt, sondern wird auch durch chemisch verursachte DNA-Schäden aktiviert.

Die molekulare Basis von MSI ist ein Defekt des *mismatch repair* Systems. Mikrosatelliteninstabilität ist meistens mit einem Verlust der DNA-Reparaturgene hMLH1 oder hMSH2 assoziiert (30). Als mögliche Ursache für eine fehlende hMLH1-Proteinexpression wurde eine Hypermethylierung der Promoterregion des hMLH1-Gens gefunden (31), die in Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität und hMLH1-Proteinexpressionsverlust nachweisbar war.

### 1.1.3 Erbliche Karzinome

#### 1.1.3.1 Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)

Tumor-Suppressorgene wie APC oder p53 kontrollieren die entscheidenden Schritte in der Karzinogenese und werden deshalb als Pförtnergene (*gatekeeper*) bezeichnet. Sie regulieren die Zellproliferation, indem sie das Wachstum inhibieren (APC) oder den Zelltod auslösen (p53). Deshalb führt die Inaktivierung eines *gatekeeper*-Gens zur malignen Transformation. Dazu müssen meist beide Allele mutiert sein. Menschen mit erblicher Mutation eines *gatekeeper*-Gens haben nach der Hypothese von Knudson ein über  $10^3$ -faches Risiko, Tumoren zu entwickeln (32). Ein Beispiel dafür ist, dass bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis coli (FAP) das Karzinomrisiko fast 100% beträgt.

Bei der familiären adenomatösen Polyposis handelt es sich um eine autosomal-dominante Erbkrankheit mit einer Inzidenz von etwa 1:10 000. Die Patienten entwickeln während des zweiten Lebensjahrzehnts zahlreiche Polypen im Kolon und im Rektum, die in der Regel im vierten Lebensjahrzehnt karzinomatös entarten. Disponierend für diese Krankheit ist eine Mutation im APC-Gen (5). Bisher wurden über 250 verschiedene APC-Mutationen beschrieben (33).

#### 1.1.3.2 Hereditäres kolorektales Karzinom ohne Polyposis (HNPCC)

Gene, die für die Proteine des *mismatch repair* Systems kodieren, sind für die Intaktheit des Genoms verantwortlich und werden als Wärtergene (*caretaker*) bezeichnet. Inaktivierung eines *caretaker*-Gens führt nicht direkt zur Tumorentstehung, sondern zu genetischer Instabilität, was zu einer erhöhten Mutationsrate aller Gene inklusive der *gatekeeper*-Gene führt. Das Tumorrisiko ist im Fall der erblichen Mutation eines Allels eines *caretaker*-Gens im Vergleich zur normalen Bevölkerung nur 5- bis 50-fach erhöht (34), da eine weitere

Mutation im anderen *caretaker*-Allel und Mutationen in zwei *gatekeeper*-Allelen zur Tumorentstehung notwendig sind.

Bei Tumoren mit defekten *caretaker*-Genen besteht eine zusätzliche therapeutische Angriffsmöglichkeit, weil sie gegenüber Therapeutika sensibel sind, die den Schaden induzieren, der normalerweise durch das betroffene *caretaker*-Protein detektiert oder repariert wird.

Ein Beispiel für die Folgen eines Defektes in *caretaker*-Genen sind Patienten mit hereditärem kolorektalem Karzinom ohne Polyposis (HNPCC). HNPCC ist eines der häufigsten erblichen Krebs syndrome, welches einen autosomal-dominanten Erbgang aufweist. Es wird angenommen, dass etwa 3% der Kolonkarzinome auf dieses Syndrom zurückzuführen sind (35, 36). HNPCC geht mit einer familiären Prädisposition für Kolonkarzinome ohne Polypen einher (37). In Familien mit HNPCC zeigt sich ebenfalls eine erhöhte Inzidenz von anderen Karzinomen, insbesondere von Ovarial-, Magen- und Endometriumkarzinomen.

#### **1.1.4 Phänotypische und genotypische Unterschiede zwischen nicht-muzinösen und muzinösen Karzinomen**

Bei den kolorektalen Karzinomen lassen sich zwei Phänotypen unterscheiden, nicht-muzinöse Tumoren in 85-90% der Fälle und muzinöse Tumoren in 10-15% der Fälle.

Muzinöse Kolonkarzinome sind phänotypisch durch eine starke Muzinbildung und Schleimseen in der Schnittfläche des Tumors gekennzeichnet. Das intestinale Muzin MUC2 wird in 100% der muzinösen und in 59% der nicht-muzinösen kolorektalen Karzinome überexprimiert (38).

Genetisch unterscheiden sich muzinöse und nicht-muzinöse Tumoren durch die Häufigkeit bestimmter Läsionen. Eine p53-Mutation wird in etwa 50-60% der nicht-muzinösen (39) und in 25-30% der muzinösen (40) Karzinome gefunden. Die Häufigkeit einer *ras*-Mutation beträgt 65% in nicht-muzinösen und 33% in muzinösen Karzinomen (41). Der Verlust eines Allels des DCC-Gens findet sich in 14% der muzinösen und in 86% der nicht-muzinösen Tumoren (42). Ein weiterer Unterschied liegt in der Frequenz von Mikrosatelliteninstabilität, die in 15% der nicht-muzinösen und in 65% der muzinösen Tumoren beschrieben wird (26, 43). In muzinösen Kolonkarzinomen wird im Gegensatz zu nicht-muzinösen Kolonkarzinomen eine erhöhte Expression von p21<sup>CIP1</sup> beobachtet (44).

## 1.2 Mechanismus der zytotoxischen Wirkung ausgewählter Chemotherapeutika auf Epithelzellen

### 1.2.1 5-Fluorouracil (5-FU)

5-Fluorouracil (5-FU) ist das Medikament der ersten Wahl beim kolorektalen Karzinom. Es wurde 1957 erstmals synthetisiert (45). 5-FU ist ein Antimetabolit, der wie Uracil in die Zellen aufgenommen und dort durch Addition von Ribose und Deoxyribose in seine aktive Nukleosidform umgewandelt wird. Es werden drei aktive Metaboliten beschrieben (46, 47): 5-Fluorodeoxyuridinmonophosphat (**5-FdUMP**) inhibiert irreversibel die Thymidylatsynthetase (TS). Die Enzyminhibition hat eine Verminderung von Thymidinmonophosphat (dTMP) zur Folge, welches für die DNA-Synthese notwendig ist. 5-Fluorouridintriphosphat (**5-FUTP**) wird anstelle von Uridintriphosphat (UTP) in die RNA inkorporiert, was zu einer Inhibition der weiteren Modifizierung der RNA führt. 5-Fluorodeoxyuridintriphosphat (**5-FdUTP**) oder Deoxyuridintriphosphat (**dUTP**) werden statt Deoxythymidintriphosphat (dTTP), dem normalen Substrat der DNA-Polymerase, in die DNA inkorporiert. Dort werden sie von einem Reparatursystem erkannt und entfernt, wobei Doppelstrangbrüche verursacht werden können.

Der jeweilige Beitrag zur Zytotoxizität dieser drei Mechanismen ist nicht vollständig geklärt. Neben den intrazellulären Angriffsorten spielen auch genetische Polymorphismen im 5-FU-Metabolismus eine Rolle für die Sensitivität von Zellen gegenüber dem Medikament. Beispielsweise wird 5-FU durch die Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) zu Dihydrofluorouracil metabolisiert. Die Aktivität der DPD ist individuell verschieden, weshalb es bei einigen Patienten zu sehr hohen Spiegeln und einer verlängerten Aufenthaltsdauer von 5-FU und damit zu toxischen Wirkungen kommt.

Bei der Therapie wird häufig versucht, den Effekt von 5-FU durch verschiedene Dosen, Kombination mit anderen Chemotherapeutika, Zusätze wie Folsäure sowie durch unterschiedliche Applikationsmodi und -dauer zu verstärken.

Eine Resistenz gegenüber 5-FU lässt sich durch folgende Mechanismen erklären: a) Erhöhung der Thymidylatsynthetaseaktivität im Tumor, b) Suppression der Expression von Enzymen, die 5-FU in seine aktive Form umwandeln, c) Erhöhung der Metabolisierungsrate von 5-FU und d) Erhöhung der Menge an Deoxyuridinmonophosphat (dUMP), dem normalen Substrat der Thymidylatsynthetase (48).

### 1.2.2 Irinotekan (CPT-11)

Das Camptothecinmolekül wurde um 1965 als aktives Alkaloid aus Extrakten des chinesischen Baumes *Camptotheca acuminata* isoliert (49). Etwa 10 Jahre später wurde seine Wirkung entdeckt. Folgende Camptothecinderivate sind bisher untersucht worden: Topotekan, 9-Amino-Camptothecin (9-AC) und Irinotekan (CPT-11). Die Derivate weisen unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften auf.

CPT-11 wird als *first-* und *second-line* Medikament in der Therapie des kolorektalen Karzinoms eingesetzt. Klinische Studien weisen in 20% der 5-FU refraktären kolorektalen Karzinome eine Wirkung von CPT-11 mit einem verlängerten Überleben und ähnlicher oder verbesserter Lebensqualität nach (50). An Patienten mit neu diagnostiziertem metastasierenden kolorektalen Karzinom ohne vorherige Chemotherapie lassen sich die Resultate einer CPT-11-Behandlung mit denen einer 5-FU-Therapie vergleichen (50). Die Kombination von CPT-11 und 5-FU mit Leukovorin wurde im Jahr 2001 als *first-line* Therapie bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom anerkannt (51).

Bei CPT-11 handelt es sich um ein *prodrug* mit einer Piperidinoseitenkette an der C-10 Position des Camptothecin Moleküls. Die Abspaltung dieser Seitenkette durch die endogene Carboxylesterase ist notwendig, um den aktiven Metaboliten SN-38 zu bilden, der für die Inhibition der Topoisomerase I verantwortlich ist. Die Anti-Tumoraktivität von CPT-11 hängt deshalb von der Aktivität dieser Carboxylesterase (CPT-CE) und vom zellulären Pegel des Zielenzym Topoisomerase I ab. Die Konversion von CPT-11 in SN-38 erfolgt im Blut, in der Leber und zum Teil auch durch lokale Aktivierung im Tumorgewebe.

Der wichtigste Schritt für die Camptothecinwirkung ist die Bildung eines charakteristischen spaltbaren Komplexes (*cleavable complex*). Dieser Komplex besteht aus einem durch das Enzym Topoisomerase I hervorgerufenen DNA-Einzelstrangbruch und dem kovalent an die gespaltene DNA gebundenen Enzym. Die Topoisomerase I ist ein nukleäres Enzym, das unter anderem transiente Einzelstrangbrüche hervorruft, wodurch die Torsionsspannung der DNA reduziert wird. CPT-11 induziert DNA-Schäden während der Replikation durch die Stabilisierung der *cleavable complexes*. Kollisionen zwischen der voranschreitenden Replikationsgabel und diesen Komplexen werden als Hauptursache für die Zytotoxizität von CPT-11 angesehen und führen zu DNA-Gabelbrüchen und DNA-Doppelstrangbrüchen. Dieser Mechanismus der DNA-Schädigung ist für ein Maximum an Toxizität von CPT-11 während der S-Phase verantwortlich. Die Stabilisierung der Komplexe geht mit einem Stopp

der Zellen in der G2/M-Phase und einer erhöhten Apoptoserate einher. Die durch CPT-11-induzierte Apoptose konnte in Kolonkarzinomzellen durch Spaltung von Poly-(ADP-Ribose-) Polymerase (PARP) *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (52). *In vivo* wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Zytotoxizität und der Menge der spaltbaren Komplexe gefunden (53). Die Zytotoxizität der Topoisomerase I Inhibitoren scheint mit dem Aktivitätspegel von Topoisomerase I zu korrelieren. Eine hohe Enzymaktivität führt zu einer erhöhten Sensitivität, die nicht auf der direkten Inhibition der katalytischen Aktivität beruht, sondern durch die Stabilisierung der spaltbaren Komplexe erklärt werden kann. Je mehr Topoisomerase I Enzym vorhanden ist, desto größer ist die resultierende DNA-Schädigung. Hohe Aktivitäten der Topoisomerase I wurden in Kolon-, Prostata- und Ovarialkarzinomen beschrieben (54). Die selektive Zytotoxizität der Camptothecine gegenüber Tumorzellen ist nicht geklärt, denn Topoisomerase I findet sich mit identischer Proteinsequenz auch in gesunden Zellen (54).

Der Zusammenhang zwischen der Carboxylesterase-Aktivität und der Sensitivität gegenüber CPT-11 ist ebenfalls unklar. Von Guichard et al. wird ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Carboxylesterase-Aktivität und erhöhter Sensitivität gegenüber CPT-11 beschrieben. Die Autoren schlagen vor, Carboxylesterase-DNA vom Menschen oder Kaninchen gleichzeitig mit CPT-11 zu applizieren (55). Andere Studien fanden jedoch keinen Hinweis auf eine Wechselbeziehung zwischen der Carboxylesterase-Aktivität in der Zelle und der Sensitivität von Kolonkarzinomzellen gegenüber CPT-11 (56).

Auch der Zusammenhang zwischen der Expression von Topoisomerase I und der Sensitivität gegenüber CPT-11 wird diskutiert. Die Expression von Topoisomerase I mRNA erlaubte jedoch keine Voraussage über die Zytotoxizität von CPT-11 (56). Das Ausmaß der Proteinexpression ließ ebenfalls keine Aussage über den antiproliferativen Effekt nach CPT-11 zu (57). Eine positive Korrelation zwischen der Enzymaktivität und der Sensitivität gegenüber CPT-11 konnte in anderen Untersuchungen gezeigt werden (56).



### 1.2.3 7-Hydroxystaurosporin (UCN-01)

Das Staurosporinmolekül wurde bei der Suche nach Inhibitoren der Proteinkinase C (PKC) aus Extrakten des Bakteriums *Streptomyces sp.* identifiziert (58). 7-Hydroxystaurosporin (UCN-01) wurde 1987 als selektiver aber nicht-spezifischer Inhibitor von PKC isoliert (59).

UCN-01 befindet sich zur Zeit in den Vereinigten Staaten von Amerika sowie in Japan in der Phase I klinischer Studien. Folgende Effekte von UCN-01 sind bekannt: Inhibition der PKC Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (60-62) und die Inhibition der Zyklin-abhängigen Kinasen CDK2, CDK4 und CDK6 (62, 63). Die Inhibition erfolgt sowohl direkt als auch indirekt über die Induktion von p21<sup>CIP1</sup> und p27. Durch die Hemmung von CDK2 wird die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRB) verhindert (61), wodurch ein G1-Zellzyklusstopp ausgelöst wird (62, 64). Die Erhöhung der Menge an hypophosphoryliertem pRB führt zu einer vermehrten Bindung von Transkriptionsfaktor E2F-1 zum pRB-E2F-1-Komplex und hemmt damit die Progression in die S-Phase (65). Der Transkriptionsfaktor E2F-1 ist an der Regulation verschiedener Gene wie beispielsweise der Thymidylatsynthetase, die für die DNA-Synthese notwendig sind, beteiligt (66). Neuere Studien weisen darauf hin, dass durch UCN-01 statt eines Zellzyklusstopps in der G1-Phase auch Apoptose ausgelöst werden kann (67). Das führt zu der Schlussfolgerung, dass die Funktion des G1-Kontrollpunktes ein wichtiger Faktor für die Sensitivität von Zellen gegenüber UCN-01 ist und dass in resistenten Zellen statt Apoptose eine Akkumulation in der G1-Phase verursacht wird. Die Inhibition von CDK2 scheint wichtig für diese Akkumulation zu sein und führt bei Versagen zur UCN-01-induzierten Apoptose (67).

Neben zytotoxischen Konzentrationen von UCN-01 zur Monotherapie von Tumoren spielen nicht zytotoxische Konzentrationen im nanomolaren Bereich eine Rolle, bei denen eine Verstärkung der Wirkung anderer Zytostatika zu beobachten ist. Diese Wirkungsverstärkung beruht vermutlich zum einen auf einer Aufhebung des G2-Kontrollpunktes und zum anderen auch auf einer Verkürzung der S-Phase (67). Die Zielgene von UCN-01 sind bisher nicht genau bekannt. Es wird angenommen, dass UCN-01 die G2-Kontrollpunktfunktion durch eine frühzeitige Aktivierung von Cdc2 verhindert. Cdc2-regulierende Proteine sind unter anderem Wee1, Myt1 und Cdc25C. Myt1 und Wee1 gehören nicht zu den Zielmolekülen von UCN-01. Ohne Zugabe von UCN-01 befindet sich Cdc25C in phosphoryliertem Zustand und

ist an 14-3-3 Proteine gebunden. Die Zugabe von UCN-01 führt zu einem Verlust der Phosphorylierung und zur Dissoziation der Komplexe. Chk1- und Chk2-Proteinkinasen phosphorylieren Cdc25C an Serin 216. UCN-01 inhibiert die Chk1-Autophosphorylierung und die Cdc25C-Serin-216-Phosphorylierung bei etwa 25 nM (68), während Chk2 kein Ziel von UCN-01 zu sein scheint. Chk1 spielt allerdings keine Rolle bei der Regulation der S-Phase. Cdc2 wird weiterhin durch die Assoziation mit den Zyklinen vom Typ B reguliert. In der späten G2-Phase wird Cdc2 durch die Cdc25C-Phosphatase dephosphoryliert, was zur Aktivierung des Cdc2-Zyclin-B1-Komplexes führt. Für den Eintritt in die Mitose sind sowohl die Aktivierung von Cdc2 durch Cdc25C als auch die Ansammlung von aktiven Cdc2-Zyclin-B2-Komplexen im Zellkern notwendig.

Die Verstärkung der Zytotoxizität durch UCN-01 wird vor allem für Zellen ohne funktionelles p53 beschrieben. Normalerweise arretieren die Zellen nach einer Schädigung in der G1-Phase und haben somit die Möglichkeit zur Reparatur. Die p53<sup>mut</sup>-Zellen gelangen in die G2-Phase, in der UCN-01 den G2-Kontrollpunkt aufhebt. Dieser Abbruch des G2/M-Kontrollpunkts wird schon bei nicht zytotoxischen Konzentrationen von UCN-01 zwischen 10-100 nM (69) beobachtet. Die Anwendung von UCN-01 in diesen Konzentrationen scheint daher zur Kombination mit anderen Chemotherapeutika geeignet.

### **1.3 Veränderungen des Zellzyklus in Kolonkarzinomzellen: potentielle Relevanz für Chemotherapie**

#### **1.3.1 Bedeutung von p21<sup>CIP1</sup>**

In gesunden Zellen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Proliferation, Wachstumshemmung und Verlust von Zellen durch Apoptose. In Tumorzellen funktionieren die notwendigen Regulationsmechanismen nicht mehr, die Zellen zeichnen sich durch unkontrolliertes Wachstum aus. Der Zellzyklus wird von Zyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) kontrolliert. Ihre Aktivität ist durch die Bindung von Zyklinen (70, 71), durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung und durch die Assoziation mit verschiedenen negativ regulierenden Proteinen, bekannt als Zyclin-Kinase-Inhibitoren (*cyclin-kinase-inhibitors*, CKIs), reguliert. Es sind zwei CKI-Familien bekannt: Die erste Gruppe beinhaltet unter anderem p21<sup>CIP1</sup>, p27 und p57, die eine weitreichende Spezifität für

CDKs zeigen. Die zweite Gruppe besteht aus p16, p15, p18 und p19 und besitzt eine eingeschränktere Spezifität gegenüber CDKs.

Ein Stopp des Zellzyklus nach einer Schädigung der DNA verhindert die Replikation von beschädigter DNA. Das p21<sup>CIP1</sup>-Protein inhibiert den Zellzyklus auf zwei unabhängigen Wegen: Inhibition von Zyklin-CDK-Komplexen und Inhibition von PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). PCNA ist ein normaler Bestandteil der Zyklin-abhängigen-Kinasen-Komplexe, der an der DNA-Replikation und -Reparatur beteiligt ist. Die Fähigkeit zur PCNA-Bindung ist eine spezifische Fähigkeit von p21<sup>CIP1</sup>, die es von den anderen CKIs unterscheidet. Während eines normalen Zellzyklus ohne Überexpression von p21<sup>CIP1</sup> bindet PCNA an die DNA-Polymerase  $\delta$  und  $\epsilon$ , die für die DNA-Replikation und -Reparatur notwendig sind. In Zellen mit einer modifizierten p21<sup>CIP1</sup>-PCNA-Bindungsdomäne wird die Reparatur der DNA durch den Schaden nicht stimuliert. Aus diesem Grunde wird angenommen, dass die Interaktion von p21<sup>CIP1</sup> und PCNA eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden spielt. Der G1/S-Zellzyklusstopp resultiert hauptsächlich aus der p53-regulierten Transkription von p21<sup>CIP1</sup>-Protein, das zu einer Inhibition der Komplexe Zyklin D-CDK4, Zyklin D-CDK6 und Zyklin E-CDK2 führt, die für den Übergang von der G1- zur S-Phase notwendig sind. Der G2/M-Arrest resultiert aus der Inhibition des Zyklin-B1-CDK1(=cdc2)-Komplexes, der die Zelle vom Eintritt in die Mitosephase nach einer DNA-Schädigung abhält.

### 1.3.2 Bedeutung von p53

In Tumoren wurden nur selten Mutationen des p21<sup>CIP1</sup>-Gens gefunden. P21<sup>CIP1</sup> ist jedoch durch seine Regulation durch das Tumor-Suppressor-Protein p53, dessen Gen in kolorektalen Karzinomen häufig mutiert ist, indirekt an der Tumorgenese beteiligt. P53-Mutationen werden mit einer schlechten Prognose assoziiert (72, 73) und mit einer erhöhten zellulären Resistenz gegenüber verschiedenen chemotherapeutischen Agenzien in Zusammenhang gebracht.

P53-Mutationen stellen einen selektiven Wachstumsvorteil für die Zelle dar. Wenn der wichtige, von p21<sup>CIP1</sup> kontrollierte Zellzyklusstopp nach DNA-Schädigung entfällt, repliziert die Zelle ihr Genom mit den vorhandenen DNA-Schäden. P53 ist der Hauptregulator von p21<sup>CIP1</sup>. Daneben gibt es p53-unabhängige Wege für die Induktion von p21<sup>CIP1</sup>, die bei Schädigung der DNA durch Mitomycin C, Etoposid und UV-Strahlung aktiv sind (74-76).

## 1.4 Verschiedene Formen der zellulären Reaktion auf Chemotherapeutika

### 1.4.1 Apoptose

Apoptose stellt eine wichtige regulatorische Funktion zum Erhalt der Gewebe dar. Sie gibt dem Organismus die Möglichkeit, funktionsunfähige und geschädigte Zellen zu eliminieren. Charakteristische morphologische Veränderungen grenzen die Apoptose von der Nekrose ab. Bei der Nekrose gehen Zellen durch äußere Einflüsse wie beispielsweise durch Verbrennung oder mechanische Verletzungen zugrunde. Dies führt in den betroffenen Zellen zur Kondensation der Kernsubstanz und zum Anschwellen der Zellorganellen. Als Folge platzt die Zelle aufgrund einer Schädigung der Plasmamembran und der Ausschüttung von Zellinhalt in den Interzellularraum, wodurch eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich bei der Apoptose um einen programmierten Zelltod. Im Jahr 1972 wurde durch die Beschreibung der morphologischen Veränderungen während dieser Form des Zelltodes (77) die physiologische Zellelimination als eigenständige, genetisch kontrollierte Form des Zelltodes erkannt und der Begriff Apoptose geprägt.

Apoptose wird in eine Initiations-, Effektor- und Exekutionsphase unterteilt (78). Der Beginn wird durch interne oder externe Signale ausgelöst. In der Anfangsphase schrumpfen Zellkern, Zytoplasma und Mitochondrien, während die Zellmembran unbeschädigt bleibt. Die Zelle verliert ihren Kontakt zu den Nachbarzellen und das Chromatin verdichtet sich. Schließlich zerfällt die Zelle in membranumschlossene apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*), die von Nachbarzellen und Makrophagen eliminiert werden.

Beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wurden 1977 die ersten Gene entdeckt, die für die Apoptose verantwortlich sind (79). Bisher sind drei Signalwege zur Einleitung der Apoptose bekannt. Ihr gemeinsames Ziel ist die Initiierung der Caspase-Kaskade (80, 81). Auf einem extrinsischen Weg werden Rezeptoren der Zellmembran aktiviert. Die Bindung von Liganden wie Fas-Ligand oder TNF an Fas oder TNF-Rezeptor führt über einen Komplex zur Aktivierung der Initiator-Caspasen -8 und -10. Für den intrinsischen Weg spielen die Mitochondrien mit Cytochrom C als auslösender Faktor eine zentrale Rolle. Membranporen in der äußeren Mitochondrienmembran werden geöffnet und setzen Cytochrom C ins Zytoplasma frei, wo Cytochrom C, Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*) und die Pro-Caspase-9 zusammen mit dATP die Caspase-9 aktivieren. Bei einem dritten Signalweg wird Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt und die Caspase-12 aktiviert.

Bei den Caspasen handelt es sich um Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Polypeptide hinter der Aminosäure Aspartat schneiden (Cysteiny-Aspartasen). Die aktivierten Caspasen spalten verschiedene Proteine im Zellkern und im Zytosol, was zu den morphologischen Änderungen und zum Tod der Zelle führt (82). Durch die Hemmung der Caspasen kann das Apoptoseprogramm unterbrochen werden. Ein Zielprotein der Caspasen ist die Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase (PARP), ein Reparaturenzym, das spezifisch an DNA-Strangbrüche bindet, wie sie unter anderem durch die Einwirkung der Nukleasen bei beginnender Apoptose entstehen. PARP wird durch Caspasen in zwei inaktive Bruchstücke von 89 und 24 kD gespalten. Diese für die Apoptose spezifische Spaltung kann mit Antikörpern gegen PARP im Western Blot nachgewiesen werden. Da die proteolytische Spaltung von PARP nur beim apoptotischen Zelltod auftritt, kann Apoptose eindeutig von Nekrose unterschieden werden.

#### **1.4.2 Seneszenz**

Normale Zellen weisen in der Kultur nur eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen auf und unterliegen danach einem physiologischen Prozess, der Seneszenz oder Zellalterung genannt wird. Dieser Vorgang unterscheidet sie von Keimzellen und Tumorzelllinien, die aufgrund einer genetischen Veränderung nicht altern. Der Alterungsprozess einer Zelle ist durch eine Verlangsamung und letztendlich durch einen Stopp der Proliferation und einen irreversiblen Eintritt der Zellen in die G<sub>0</sub>-Phase gekennzeichnet. Diese Vorgänge werden unter anderem durch die Telomere, den repetitiven DNA-Sequenzen am Ende der Chromosomen, geregelt. Telomere bestehen aus Wiederholungen von 5000 bis 15000 Basenpaaren, die die Sequenz (TTAGGG)<sub>n</sub> enthalten, und dem sogenannten Telomerbindungsprotein. Bei jeder Zellteilung gehen 50 bis 100 Basenpaare dieser Sequenz verloren. Die Seneszenz wird mit der fortschreitenden Verkürzung der Telomere assoziiert. Verantwortlich für die Replikation der Telomere ist die Telomerase. Diese Enzym findet sich in Keimzellen und pluripotenten Stammzellen, seine Aktivität wird jedoch durch den Differenzierungsprozess einer Zelle beendet. Die meisten Tumorzellen besitzen die Möglichkeit, die Telomerase zu reaktivieren und so die Fähigkeit zur Proliferation wiederzuerlangen.

Seneszenz wurde zuerst in Fibroblasten beschrieben. Seneszente Zellen zeigen folgende morphologische und molekulare Veränderungen: vergrößerte und abgeflachte Zellen, erhöhte

Granulation, Verkürzung der Telomere und eine Ansammlung karyotypischer Abnormalitäten (83). Als Marker der Seneszenz wird die Aktivität der SA- $\beta$ -Gal (*senescence-associated  $\beta$ -galactosidase*) betrachtet. SA- $\beta$ -Gal-Expression findet sich normalerweise nur in 1-3% der proliferierenden Zellen (83). In einigen Zelllinien wie MCF-7 Brustkarzinomzellen waren proliferierende Zellen jedoch in über 10% der Fälle positiv (83).

Es werden zwei Formen der Seneszenz unterschieden: die replikative und die beschleunigte Form (84). Replikative Seneszenz geht mit einer Verkürzung der Telomere einher und ist eine Eigenschaft normaler Zellen, die während der malignen Transformation verloren geht. Beschleunigte Seneszenz scheint eine programmierte protektive Antwort des Organismus auf potentiell karzinogene Schäden zu sein (83), bei der keine Verkürzung der Telomere stattfindet.

Die Ergebnisse verschiedener Studien deuten darauf hin, dass die Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika die beschleunigte Seneszenz in Tumorzellen induzieren kann (83). In der Klinik wird eine Stabilisierung des Tumorwachstums (*stable disease*) nur als Teilerfolg einer zytostatischen Therapie beurteilt. Eine Behandlung, die zu einem dauerhaften Proliferationsstopp beziehungsweise zur Seneszenz der Tumorzellen führt, bedeutet jedoch einen Therapieerfolg mit langfristiger Wirkung (85).