

VIII. Diskussion

1. Einleitung

Zehn etablierte humane Kolonkarzinomzelllinien mit bekanntem p53-Status, die sich nach SN-38-Behandlung unterschiedlich verhielten, wurden für die vorliegende Arbeit selektiert. Die Abhängigkeit der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung vom p53-Status wurde bereits von anderen Autoren in einigen Kolonkarzinom- [81, 155, 157, 166], Glioblastom- [167] und Mammakarzinom- [168] Zelllinien gezeigt. Beide Zellliniengruppen reagieren zunächst auf die SN-38-induzierte DNA-Schädigung mit einem transienten G₂-Zellzyklusarrest. Die p53^{wt}-Zelllinien gehen in einen lang anhaltenden tetraploiden G₁-Arrest über [169], der vom p16 Protein unabhängig ist [157].

Der G₁-tetraploide Kontrollpunkt wird nach DNA-Schädigung in Tumorzellen mit defektem G₂ bzw. defektem mitotischen Kontrollpunkt aktiviert [79, 169–173]. Die Induktion und die Erhaltung des tetraploiden G₁-Kontrollpunkts erfordert eine intakte p53- und pRb-Funktion [174]. Alle in dieser vorliegenden Arbeit benutzen p53^{wt}-Kolonkarzinomzelllinien machen einen tetraploiden G₁-Zellzyklusarrest (Fig. 10, Seite 44) [157, 169]. Das ist ein weiterer Schutzmechanismus der DNA-geschädigten Zelle. Er erlaubt die Schädigung ggf. zu beheben, um nicht mit der geschädigten DNA die Mitose anzufangen.

Die p53^{mut}-Zelllinien dagegen, nach Verlassen des G₂-Phasenarrestes, führen nicht den tetraploiden G₁-Arrest durch, was eine verfrühte Initiation der Mitose und mitotischen Katastrophe zur Folge hat. In der vorliegenden Arbeit wurden der Zeitverlauf, die morphologischen Stadien und die Regulationsmechanismen der mitotischen Katastrophe untersucht.

2. Morphologische Stadien der mitotischen Katastrophe – mitotische Katastrophe mündet in Apoptose

Die mitotische Katastrophe ist durch das Auftreten von aberranten Mitosen charakterisiert. Sie wird ausgelöst durch verschiedene Stimuli, wie die plötzliche Expression von p21 [175], das den G₁-Arrest auslöst oder die Hemmung von Chk2-Kinase [176], Chk1 oder ATR [96], 14-3-3σ [136], die zur Störungen im G₂/M-Arrest führen. Auch eine Störung des Mitoseablaufes durch die Inhibition von hMps1-Kinase [153], Mad2 [177], Plk1 (*polo-like kinase-1*) [139], Plk2 (*polo-like kinase-2*) [178] oder Survivin [179] kann die mitotische Katastrophe auslösen. Nach DNA-Schädigung sind Zellen mit einem defekten G₁- und G₂-Kontrollpunkt empfänglich für die mitotische Katastrophe. Sie kann durch die Applikation von G₂-Kontrollpunkt-Inhibitoren wie

Caffein, Flavopyridol, Pentoxifyllin oder UCN-01 [180] bei defektem G₁-Kontrollpunkt verstärkt werden. Schädigungen der Mikrotubuli in Zellen mit defektem mitotischen Kontrollpunkt zeigen auch eine Induktion der mitotischen Katastrophe [151, 153, 181–183]. Das vorzeitige Eintreten von beschädigten Zellen in Mitose führt zur abnormalen Chromosomenausrichtung und Überduplikation von Zentrosomen und schließlich zur Multipolarität der Mitosen. Aus aberranten Mitosen können aneuploide Zellen entstehen, die überleben, oder Zellen mit Mikronuklei; diese Zellen sterben durch Apoptose [135, 183–185].

Die detaillierte Beziehung zwischen mitotischer Katastrophe und Apoptose war bisher ungeklärt. Einige Autoren berichten, dass die Kernmorphologie, resultierend aus der mitotischen Katastrophe, unterscheidbar von der der apoptotischen Zellen sei [136, 158]. Apoptose kann durch Bcl-2 [137] oder Caspase 9 [138] inhibiert werden, ohne den mitotischen Zelltod zu inhibieren. Die DNA-schädigungsinduzierte mitotische Katastrophe und Apoptose können somit entkoppelt werden. Die mitotische Katastrophe vermag einen Zelltodsignalweg auszulösen, der nicht mit dem klassischen Apoptoseweg identisch ist. Andererseits deuten die Ähnlichkeit der Kernmorphologie und die gemeinsamen biochemischen Marker der aufeinanderfolgenden Stufen der klassischen Apoptose und der mitotischen Katastrophe-assoziierten Zelltod darauf hin, dass sie möglicherweise einen gemeinsamen Signalweg teilen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei gleichzeitige Prozesse beobachtet, die mit Apoptose enden. Die p53^{mut}-Kolonkarzinomzelllinien konnten den SN-38-induzierten G₂/M-Arrest nicht aufrechterhalten und zeigten einerseits die charakteristischen Merkmale der mitotischen Katastrophe: die Bildung von aberranten Mitosen und Mikronukleationen. Am Ende gehen sie in Apoptose (Fig. 13). Andererseits zeigte sich auch ein Weg ohne Bildung von aberranten Mitosen, der in Apoptose mündete, der dem klassischen Apoptoseweg entspricht.

Aus der vorliegenden Arbeit geht somit hervor, dass die mitotische Katastrophe, wie auch der klassische Apoptoseweg, trotz unterschiedlicher Zwischenphasen mit Apoptose endet (Fig. 19, Seite 55). Die SN-38-induzierte Mitose-unabhängige klassische Apoptose findet vor und die SN-38-induzierte mitotische Katastrophe nach der Prometaphase statt (Fig. 18, Seite 54).

3. p53 reguliert die Expression von hMps1 und Cyclin D1 – modulatorische Wirkung von p21

Mehreren Berichten zufolge ist der CDK-Inhibitor p21 in der Lage, Gene, die an dem mitotischen Kontrollpunkt beteiligt sind, wie CENPE, BubR1, Mad2 [175], und Survivin [186], transkriptionell zu supprimieren. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in Abwesenheit von p21 die hMps1-Kinase-Expression nur geringfügig durch p53 supprimiert wird. Demgegenüber ist

bei Anwesenheit von p21 die hMps1-Kinase-Expression stark supprimiert (Fig. 27, Seite 62). Diese Daten deuten darauf hin, dass im physiologischen Zustand p21 die transkriptionelle Suppressionsfunktion von p53 verstärken kann. Dieses erweitert die bisher bekannten Daten zur transkriptionellen Suppression der mitotischen Kontrollpunktgene durch p21. Diese Befunde wurden in mehreren neueren Veröffentlichungen bestätigt (Vigneron und Spurgers, JBC, 2006) [187, 188]. Darüber hinaus ist die Überexpression von p21 alleine ausreichend für die Suppression von hMps1 (M. R. Bhonde, Dissertation 2005, Charité).

In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass in Abwesenheit von p21 das p53-Protein keinen Einfluss auf die Cyclin-D1-Expression hat, d. h., dass die p53-vermittelte Cyclin-D1-Regulation p21 erfordert. Zusätzlich zeigte ich, dass p21 alleine ausreicht, um Cyclin D1 auf Proteinebene hochzuregulieren (Fig. 26, Seite 62). Diese originellen Beiträge der vorliegenden Arbeit zeigen, dass p21 die Suppressionsfunktion von p53 verstärkt und auch alleine hMps1 supprimieren kann. Eine zweite neue Funktion von p21 ist, dass es alleine Cyclin D1 auf Proteinebene hochregulieren kann und für die p53-vermittelte transkriptionelle Cyclin-D1-Regulation erforderlich ist.

4. hMps1 trägt zur SN-38-induzierten Apoptose bei

Einige Autoren zeigten, dass die Funktion bestimmter Kontrollpunkt-kontrollierender Gene für die Verhinderung der DNA-schädigungsinduzierten mitotischen Katastrophe entscheidend ist. Zum Beispiel trägt die Elimination oder die Inhibition der Gen-Aktivitäten, die den G₂-Kontrollpunkt regulieren, wie p53 [81, 155], Chk2 [176] oder 14-3-3 σ [136], zur mitotischen Katastrophe bei. Dagegen sind die mitotischen Kontrollpunktgene BubR1 oder Mad2 für die DNA-Schädigungsinduzierte mitotische Katastrophe und Apoptose notwendig und ihre Suppression verhindert die Apoptose [189].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die SN-38-induzierte Apoptose in p53^{mut}-Zelllinien mit der Hochregulation von hMps1 einhergeht. Die siRNA-vermittelte Suppression dieses Gens inhibiert Apoptose (Fig.32, Seite 70) und die Überexpression von hMps1 (von M. R. Bhonde durchgeführt) in p53^{wt}-Zellen nach SN-38-Behandlung führt zur Induktion der Apoptose. Die Daten von M. R. Bhonde sowie die der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass hMps1, deren Rolle im mitotischen Kontrollpunkt bekannt ist, auch zur DNA-schädigungsinduzierten Apoptose beiträgt. Die p53-abhängige Suppression von hMps1 hat die Funktion, die DNA-schädigungsinduzierte Apoptose zu verhindern. Folglich schützt p53 die Zelle vor DNA-schädigungsinduzierter Apoptose.

5. hMps1-Kinase reguliert nicht die Zentrosomenzahl nach DNA-Schädigung

Die Funktion der hMps1-Kinase in der Regulation der Zentrosomenzahl wird kontrovers diskutiert. In der Studie von Fisk und Winey [153] wird gezeigt, dass hMps1 die Zentrosomenzahl reguliert und für die Zentrosomenduplikation erforderlich ist. Stucke [151] hingegen zeigte in seiner Studie, dass die Zentrosomenduplikation hMps1-Kinase unabhängig ist. hMps1-Kinase hat nach seiner Studie keinen Einfluss auf die Zentrosomenduplikation. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass nach DNA-Schädigung die Zentrosomenamplifikation in 20 % der p53^{mut}- (in Gegenwart von hMps1) und in 15 % der p53^{wt}-Zellen (bei komplett supprimiertem hMps1) vorliegt (Fig. 31, Seite 68). Wie bei Stucke (2002) komme ich deshalb zu der Schlussfolgerung, dass die Zentrosomenamplifikation hMps1-Kinase-unabhängig ist.

6. Das Konzept der klinischen Antwort im Vergleich zur biologischen Antwort

Das Ziel der Chemotherapie ist die Elimination der Tumorzellen bzw. zumindest die Verlangsamung des Tumorwachstums. Da die Tumorzellen auf die Chemotherapie mit Zellzyklusarrest oder mit Apoptose reagieren können, ist es wichtig zu wissen, welche von den biologischen Reaktionen der klinischen Antwort zu Grunde liegt.

Modulatorische Substanzen, die in Kombination mit CPT-11 oder anderen Topoisomerase-I-Inhibitoren verwendet werden, induzieren Zellzyklusarrest. Zum Beispiel induziert CEP-6800, ein PARP-1 Inhibitor, in Kombination mit Temozolomid, Irinotecan oder Cisplatin in Tumoren einen lang anhaltenden G₂/M-Arrest [190] und ist für Tumoren, die auf Therapie mit Arrest reagieren, als Therapieverstärker geeignet.

Bei Tumoren, die auf Chemotherapie mit Apoptose reagieren, werden Substanzen wie UCN-01 [191], Flavopiridol [192], Gefitinib, ein EGFR Tyrosin-Kinase-Inhibitor [193] oder IMC-C225, ein anti-EGFR monoklonaler Antikörper [194] in Kombination mit CPT-11 verwendet, um die apoptotische Reaktion zu verstärken.

Es ist von großem Interesse, dass die Anwendung von UCN-01 bei Tumorzellen, die auf SN-38 mit Arrest reagieren (p53^{wt}), nicht einen Zytotoxizität-verstärkenden, sondern einen starken protektiven Effekt hat (nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe), d. h., die Anwendung von UCN-01 wird bei diesen Tumoren ihr Wachstum fördern. Eine Verstärkung der therapeutischen Antwort ist somit nur dann möglich, wenn man die Reaktionsmechanismen kennt. Gegenwärtig werden Tumoren nur in klinische *responder* und *nonresponder* eingeteilt. Aus den vorliegenden Ausführungen folgt die Notwendigkeit, die *responder* als Arrest-reagierende oder Apoptose-reagierende Tumoren zu klassifizieren.