

Strahleninduzierte Apoptose – Mechanismen und Bedeutung für den klonogenen Zelltod

Justine Rudner, C. Belka

Kurzfassung

Die Induktion von Apoptose ist eine mögliche Reaktionsform von Zellen nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung. Durch die molekulare Untersuchung von Zelltodwegen können Resistenzmechanismen aufgeklärt werden und so neue Zielstrukturen für die Modulation von Strahlenantworten gefunden werden. Unter Verwendung des anti-apoptotischen Bcl-2 Proteins konnte gezeigt werden, dass Apoptoseinduktion nach Bestrahlung weitgehend über mitochondriale Apoptosewege führt. Neu ist, dass neben der Schlüsselfunktion des Mitochondriums auch das endoplasmatische Retikulum bei der Modulation von Apoptosevorgängen eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine Bcl-2 Variante, die nur am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, genau wie mitochondriales Bcl-2 vor strahleninduzierter Apoptose schützt. Die Bedeutung von Bcl-2 als Modulator von Radioresistenzen bleibt weiterhin unklar, da zumindest in unseren Zellsystemen das klonogene Überleben nach Bestrahlung durch Bcl-2 nicht beeinflusst wird.

Radiation induced apoptosis – mechanisms and relevance for eradication of clonogenic tumor cells

Ionizing radiation is known to induce apoptosis in several cell systems. Analyzing the molecular mechanisms of programmed cells death will lead to the dissection of defined resistance mechanisms and will guide the development of new treatment strategies. Using Bcl-2 as positional marker we were able to show that radiation induced apoptosis is mostly executed by mitochondrial death pathways. However, using a Bcl-2 mutant with an expression restricted to the endoplasmic reticulum we were able to show that the endoplasmatic reticulum is also critically involved in the modulation of radiation responses. The role of Bcl-2 for the modulation of radiation resistance remains unclear since in our cell system Bcl-2 overexpression does not interfere with clonogenic cell death after radiation.

Bei der Behandlung von Tumoren spielt die Strahlentherapie eine wesentliche Rolle. Trotz nachgewiesener Effektivität radioonkologischer Behandlungsverfahren kommt es in Abhängigkeit von der Histologie und der TumorgroÙe zu Lokalrezidiven. Zu einem Teil können diese auf eine hohe intrinsische Radioresistenz der Tumorzellen zurückgeführt werden. Bislang ist nur wenig über die molekularen Resistenzmechanismen gegenüber ionisierender Strahlung bekannt.

Die wissenschaftliche Zielsetzung unserer Arbeit war daher die Aufklärung molekularer Zelltodwege nach Bestrahlung mit dem Ziel, Resistenzmechanismen zu identifizieren und Strategien zu deren Modulation zu entwickeln.

Mit dem Begriff Apoptose wird der morphologische Endzustand des physiologischen Selbstmordprogramms einer Zellen bezeichnet. Charakteristisch für die Apoptose ist die Zellschrumpfung, Bildung sog. apoptotischer Bläschen an der Membranoberfläche, Chromatinkondensation und internukleosomale DNA-Fragmentierung sowie die Umverteilung von Phosphatidylserin von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der Plasmamembran.

Apoptose kann zum einen durch Aktivierung spezieller Rezeptoren an der Oberfläche der Zelle ausgelöst werden. Daneben führen Wachstumsfaktorentzug, Hypoxie, Hitzeshock, verschiedene zytotoxische Substanzen, ionisierende Strahlung und Kinaseinhibitoren zur Apoptoseinduktion.

Verantwortlich für die apoptotische Morphologie ist die Aktivierung intrazellulärer Proteasen, der sog. Caspasen (Cystein-Proteasen, die Proteine nach einem Asparatrest schneiden), da diese zur Degradierung zellulärer Strukturen führen. Initial wird zunächst eine „apikale“ Caspase autoproteolytisch (Caspase-2, -8, -9, -10) aktiviert. Dieser Vorgang bewirkt die Prozessierung weiterer, sog. Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) die dann zur Ausprägung der apoptotischen Morphologie der Zelle führen.

Die Regulierung der Aktivität der Initiatorcaspasen -8 und möglicherweise auch Caspase-10 findet nach Stimulierung von Zelltodrezeptoren wie CD95, TNFR1, TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 direkt an dem aktivierten Rezeptorkomplex an der intrazellulären Seite statt [7].

Alle anderen apoptotischen Stimuli bewirken zunächst eine Schädigung des Mitochondriums, die zur Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum führt. Unter diesen Faktoren befindet sich Cytochrom c, welches zusammen mit dATP an das Adaptermolekül Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) bindet. Dieser als Apoptosom bezeichnete Komplex kann dann die inaktive Proform der Caspase-9 rekrutieren und aktivieren [5].

Bisher war unklar, wie apoptotische Prozesse nach Bestrahlung reguliert werden. In vorangegangenen Experimenten konnte eine Aktivierung von Caspase-8 sowie die Heraufregulierung von Zelltodliganden und Rezeptoren wie z.B. CD95/Fas/APO-1 nach Bestrahlung und Behandlung mit Zytostatika gezeigt werden. Diese Ergebnisse legten nahe, dass die Caspasenaktivierung nach Bestrahlung durch Aktivierung von Zelltodrezeptoren erfolgt [2].

Unter Verwendung von Caspase-8 negativen Zellen und Zellen bei denen der mitochondriale Apoptoseweg durch das Bcl-2 Protein blockiert ist, konnte nachgewiesen werden, dass Strahlung nicht primär zur Aktivierung von rezeptorvermittelten Apopto-

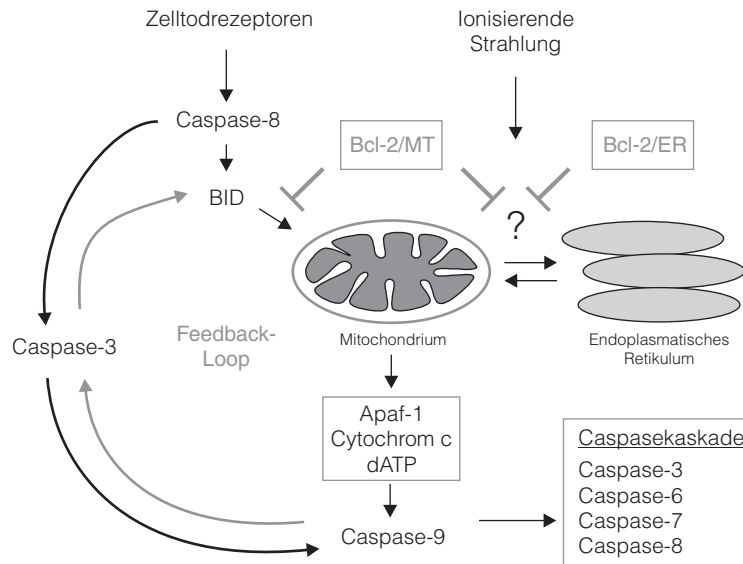


Abb. 1: Modell der apoptotischen Signaltransduktion.

Stimulierung der Zelltodrezeptoren führt zur direkten Aktivierung von Caspasen. Initial wird Caspase-8 am Rezeptorkomplex autoproteolytisch aktiviert, die anschließend Caspase-3 und diese weitere Caspasen prozessieren kann. Alternativ kann Caspase-8 Bid spalten und über den mitochondrialen Weg die Caspasenkaskade aktivieren. Mitochondriales Bcl-2 kann den letzteren Weg blockieren. Nach Bestrahlung kommt es zu einem Crosstalk zwischen dem Mitochondrium und dem endoplasmatischen Retikulum. Die Störung der Homeostase dieser Organellen resultiert im $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch. Die daraus resultierende Freisetzung von Cytochrom c führt im Zytosol zur Rekrutierung von Prosapase-9 zum oligomeren Komplex (Apoptosom). Nach der Spaltung der Initiatorcaspase-9 aus Apaf-1, Cytochrom c und dATP bestehenden Komplex werden Effektorcaspasen aktiviert. Bcl-2 schützt sowohl in der mitochondrialen als auch in der endoplasmatischen Position vor Apoptose, die durch ionisierende Strahlung induziert wurde. Über eine Feedbackschleife kann die mitochondriale Schädigung sowohl nach Bestrahlung als auch nach Stimulierung der Zelltodrezeptoren beschleunigt werden.

sewegen führt, sondern im Wesentlichen über mitochondriale Zelltodwege vermittelt wird [3] (Abb. 1).

Proteine der Bcl-2-Familie sind die wichtigsten apoptoseregulierenden Proteine in höheren Eukaryonten. Die Proteingruppe umfasst Apoptose hemmende (z.B. Bcl-2, Bcl-x_L) sowie pro-apoptotische Mitglieder (z.B. Bax, Bid, Puma, Noxa). Viele Mitglieder der Bcl-2-Familie werden konstitutiv am Mitochondrium exprimiert oder translokalisieren während der Apoptose an das Mitochondrium.

Wie schon erwähnt, ist das Mitochondrium eine Schlüsselorganelle für die Integration von pro- und antiapoptotischen Signalen. So verhindert die Überexpression der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$), die Freisetzung von Cytochrom c und die Caspasenaktivierung nach vielen verschiedenen Stimuli. Im Unterschied dazu führen die pro-apoptotischen

Proteine der Bcl-2 Familie allesamt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials und zur Freisetzung von Cytochrom c.

Bcl-2 wird jedoch nicht nur am Mitochondrium sondern auch perinukleär und insbesondere am endoplasmatischen Retikulum exprimiert [1, 6]. Es wurde bisher jedoch nicht untersucht, inwieweit Bcl-2 am endoplasmatischen Retikulum strahleninduzierte Apoptose beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurden Jurkat T-Zellen verwendet, die sowohl nach Stimulierung des Zelltodrezeptors CD95/Fas als auch nach Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 10 Gy apoptotisch sterben.

Durch die stabile Überexpression von Bcl-2 oder Bcl-x_L wird die Caspasenaktivierung und Chromatinkondensation, die als Apoptosemarker verwendet wurden, blockiert, wohingegen Apoptose nach Stimulierung des Zelltodrezeptors CD95/Fas lediglich verzögert wird [3, 9]. Die anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine blockieren den $\Delta\Psi_m$ -Zusammenbruch nach Bestrahlung, jedoch nicht nach Stimulierung des Zelltodrezeptors. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Regulierung des Zelltodprogramms durch Bestrahlung auf der mitochondrialen Ebene erfolgt, während bei der CD95 Rezeptor induzierten Apoptose mitochondriale Wege umgangen werden können (Abb. 1).

Die spezifische subzelluläre Verankerung des Bcl-2 Moleküls am Mitochondrium, dem endoplasmatischen Retikulum und der Kernmembran erfolgt durch die sog. Transmembrandomäne. Durch Austausch der physiologischen Bcl-2-Transmembrandomäne durch unterschiedliche andere Verankerungsdomänen, ist es gelungen, Bcl-2 spezifisch nur am Mitochondrium bzw. nur am endoplasmatischen Retikulum zu exprimieren [9, 10]. Unter Verwendung von Zellen, die Bcl-2 nur am Mitochondrium oder nur am endoplasmatischen Retikulum exprimieren, konnte gezeigt werden, dass endoplasmatisches Bcl-2 genauso effizient Apoptose, mitochondriale Schädigung und Caspasenaktivierung nach Bestrahlung verhindert wie mitochondriales Bcl-2 oder Bcl-2 mit dem physiologischen Membrananker.

Die Deletion der Membranverankerungsdomäne führte dagegen zum vollständigen Verlust der protektiven Wirkung [9]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass neben dem Mitochondrium das endoplasmatische Retikulum eine Schlüsselfunktion bei der Vermittlung von programmierten Zelltodvorgängen nach Bestrahlung übernimmt.

Die exakte Funktion von Bcl-2 am endoplasmatischen Retikulum ist allerdings vollständig unklar. Wir nehmen an, dass ein Einfluss auf intrazelluläre Ionenflüsse, insbesondere von Calcium, in diesem Zusammenhang von erheblicher Bedeutung ist, da bekannt ist, dass Bcl-2 als Ionenkanal fungieren kann und Veränderungen von Calciumkonzentrationen von hoher Relevanz für den Ausstrom von pro-apoptotischen Molekülen aus dem Mitochondrium sind.

Obwohl Bcl-2 sehr effektiv strahleninduzierte Apoptose blockiert, ist die Frage, ob Bcl-2 auch längerfristig zu einem Überlebensvorteil führt, bisher umstritten.

In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Bcl-2 allein die Zellen nicht dauerhaft vor strahleninduziertem Zelltod schützt [8]. Diese Form von Zelltod weist jedoch nicht mehr die Charakteristika der Apoptose auf. Die Radiosensitivität hängt vermutlich vielmehr von der Expression weiterer bekannter

(z.B. andere pro- und anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie) oder bisher noch nicht identifizierter Faktoren ab, die von Zellsystem zu Zellsystem differieren können.

Eine bessere Einschätzung der Prognose und das Ansprechen auf eine Strahlentherapie könnte durch Analyse mehrerer dieser Faktoren erzielt werden. Hierfür ist die Verwendung von Genchips zukunftsweisend.

Zusammengefasst zeigt sich, dass die Induktion von Apoptose ein hochkomplexer Prozess ist, der aus dem Zusammenspiel von verschiedenen Molekülen am Mitochondrium und dem endoplasmatischen Retikulum resultiert und durch die Aktivierung von Caspasen ausgeführt wird. Die Bedeutung von Apoptoseprozessen für die Strahlenresistenz bleibt unklar. Es ist jedoch sicher, dass die molekulare Analyse von Zelltodwegen zu neuen Therapieansätzen führen kann [4].

Literatur

- [1] Akao, Y.: Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 54 (1994) 2468–2471
- [2] Belka, C.: Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes and lymphoma cells critically relies on the up-regulation of CD95/Fas/APO-1 ligand. *Radiat. Res.* 149 (1998) 588–595
- [3] Belka, C.: Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene* 19 (2000) 1181–1190
- [4] Belka, C.: Sensitization of resistant lymphoma cells to irradiation-induced apoptosis by the death ligand TRAIL. *Oncogene* 20 (2001) 2190–2196
- [5] Hakem, R.: Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94 (1998) 339–352
- [6] Krajewski, S.: Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53 (1993) 4701–4714
- [7] Muzio, M.: FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85 (1996) 817–827
- [8] Rudner, J.: Radiation sensitivity and apoptosis in human lymphoma cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 77 (2001) 1–11
- [9] Rudner, J.: Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis. *J. Cell Sci.* 114 (2001) 4161–4172
- [10] Zhu, W.: Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *Embo. J.* 15 (1996) 4130–4141