

3 Literaturübersicht

3.1 Multizelluläre Tumorsphäroide (MCTS)

In vivo sind Gewebszellen in dreidimensionale Strukturen eingebunden, wodurch sie in vielerlei Hinsicht beeinflusst werden. Insofern stellen dreidimensionale Zellkulturen das *in vivo* Geschehen nach und können als Bindeglied zwischen soliden Tumoren und Monolayerkulturen angesehen werden.

Die Idee der Multizellulären Tumorsphäroide (MCTS) ist keine neue. In den 70er Jahren begannen Sutherland und Team die systematische Forschung und Arbeit an MCTS. Diese Arbeiten zeigten, dass starke Ähnlichkeiten zwischen Sphäroiden und soliden Tumoren *in vivo* bestehen, was das Potenzial für die Forschung mit dieser dreidimensionalen Zellkultur aufzeigt (Sutherland et al., 1971).

Das Modell des multizellulären Sphäroids kommt der *in vivo* Situation, nämlich dem soliden Tumor, sehr viel näher als die Monolayerkulturen.

Histologisch betrachtet handelt es sich bei Sphäroiden um die Inversion nicht vaskularisierter Mikrometastasen in der Umgebung von Kapillaren. Die Zellen der äußeren Schicht sind in der Regel stoffwechsel- und teilungsaktiv. Nach innen nimmt diese Aktivität immer weiter ab, bis hin zu ruhenden Zellen mit arretiertem Zellzyklus, deren Stoffwechsel teilweise aufgrund des veränderten Nährstoffangebotes verändert ist. Je nach Durchmesser der Zellkugel schließt sich eine weitere apoptotisch-nekrotische Zone an. Diese Zellen sterben durch Nährstoffmangel. Auch nicht vaskularisierte Mikrometastasen weisen ein solches Zellbild auf.

Im Gegensatz zu Monolayerkulturen, bei denen in der Regel jede Zelle direkten Zugang zum Medium und den darin enthaltenen Nährstoffen hat, ist dieser Vorteil bei Sphäroiden nur der äußeren bzw. bei Mikrometastasen nur den der Kapillare anliegenden Zellen vorbehalten. Die Aufnahme und Abgabe von Stoffen (auch Chemotherapeutika) ist also verändert (Kunz-Schughart et al., 1999, 2000). Dies kann zu einer reduzierten Wirksamkeit von angewandten Chemotherapeutika führen (Tunggal et al., 1999).

Ein weiterer Vorteil des dreidimensionalen Wachstums sind Differenzierungsprozesse. Zellen, die im Verbund gezüchtet werden, differenzieren in der Regel und erhalten dadurch sowohl morphologische als auch funktionelle Charakteristika des Ursprungsgewebes zurück, die häufig bei der Kultivierung als Einzelzellen verloren gehen (Kunz-Schughart 1999, Jianmin et al., 2002).

3.1.1 Methoden zur Herstellung von MCTS

3.1.1.1 Liquid-Overlay-Technik

Die Bildung von Sphäroiden setzt voraus, dass die adhäsiven Kräfte zwischen den Zellen größer sind als jene zwischen den Zellen und dem Material, auf dem sie kultiviert werden.

Bisher waren vor allem zwei Verfahren zur Kultivierung von MCTS gebräuchlich: Zum einen die sogenannte Liquid-Overlay-Technik, bei der Suspensionen der entsprechenden Zellen auf einer nicht adhäsiven Oberfläche (z. B. Agarose) inkubiert werden. Unter diesen Umständen bilden viele Zellarten, darunter vor allem aus Tumoren gewonnene Zelllinien, spontan Sphäroide. Nachteil bei dieser Technik ist, dass die Zellen großen Sedimentationskräften ausgesetzt sind. Vorteile bestehen auf der anderen Seite in der guten Steuerbarkeit dieser Methode im Hinblick auf die Größe und Anzahl der Sphäroide.

3.1.1.2 Spinner-Flask-Methode

Eine weitere für die Sphäroidherstellung angewendete Methode ist die „Spinner-Flask“-Technik. Hierbei wird die Zellsuspension durch einen magnetischen Rührer in Bewegung gehalten, sodass sich die Zellen ständig in der Schwebelage befinden und keine „Gelegenheit“ haben, eine Bindung mit dem Kulturgefäß einzugehen. Hierfür eignen sich wiederum nicht alle Zellen, da die auftretenden Scherkräfte recht groß sind und nicht alle Zellen sie überwinden können. Aus diesem Grund wird oft eine Kombination aus beiden Techniken angewandt, das heißt die initiale Aggregation der Zellen wird durch die Liquid-Overlay-Technik erreicht, die weitere Zucht in der Spinner-Flask. Vorteil letzterer Technik ist die Möglichkeit, sehr viele Sphäroide herzustellen, und das Fehlen der Sedimentation. Nachteile sind die schon genannten Scherkräfte und der geringe Einfluss auf die Größe der Sphäroide.

3.1.1.3 Neue Möglichkeiten der Sphäroidkultur

Seit einiger Zeit wird neben den oben genannten Techniken auch die Sphäroidbildung unter simulierter Mikrogravität mit Hilfe von Bioreaktoren erforscht (Battle et al., 1999, Hedlund et al., 1999, Khaoustov et al., 1999, Yoffe et al., 1999, Ingram et al., 1997). Dies alles sind

Erweiterungen der bekannten Techniken, die bereits jetzt vielversprechende Ergebnisse geliefert haben und möglicherweise weitere Erkenntnisse liefern können.

3.2 Das Zytoskelett der Zelle

Dem Zytoskelett der Zelle wird neben der namentlich schon implizierten Stütz- und Stabilisierungsfunktion eine Rolle bei der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum, der Zellbeweglichkeit und der Apoptose zugewiesen. Neben diesen Funktionen schreibt man dem Zytoskelett außerdem die Funktion eines Schwerkraftsensors zu, was für diese Arbeit interessant sein sollte. Man nahm an, dass eine Zelle vor allem aus dem viskösen Zytosol und der begrenzenden elastischen Zellmembran besteht. Stattdessen geht man neuerdings von einem stark untereinander verknüpften System aus Mikrotubuli und Mikrofilamentbündeln, kontraktile Mikrofilamenten und intermediären Filamenten aus. Dieses verbindet in einer Art Netzwerk die Rezeptoren der Membranoberfläche mit Kontaktpunkten am Kern (Ingber, 1999). So ist es nicht weiter verwunderlich, dass allein durch die Veränderung der Form einer Zelle und der damit einhergehenden mechanischen Veränderung des Zytoskeletts die Zelldifferenzierung durch die Verformung transmembraner Adhäsionsrezeptoren an der Zelloberfläche beeinflusst wird (Ingber, 1999).

In dieser Studie werden Vimentin, Tubulin und Zytokeratin als Teile des Zytoskeletts untersucht. Vimentin ist ein intermediäres Filament, das in vielen Zellen mesenchymaler Herkunft wie Fibroblasten und Endothelzellen oder mesodermaler Herkunft wie Granulosazellen exprimiert wird. Man findet es außerdem in einer Vielzahl von Tumoren, so auch in Karzinomen, was für diese Studie interessant ist. Vimentin wird eine Rolle beim Metastasierungspotenzial von Tumoren zugeschrieben (Huang et al., 2004). Es gehört zu den intermediären Filamenten. Der Name intermediäres Filament bezieht sich auf den Durchmesser (10-12 nm), der zwischen Mikrotubuli (25 nm) und den Mikrofilamenten (7-10 nm) liegt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Vimentin an vielen Vorgängen in der Zelle beteiligt ist. So weisen Vimentin-arme Zellen und Gewebe eine verminderte Motilität, chemotaktische Wanderung und eine verlängerte Wundheilung auf (Eckes et al, 1998). Scherkräfte werden nach neueren Erkenntnissen über Vimentinfilamente zum Zellkern und zu benachbarten Zellen geleitet (Helmke et al, 2001). Außerdem dient Vimentin als Dehnungsrezeptor der Zelle.

α - und β -Tubulin sind Proteindimere, die die Hauptbestandteile der Mikrotubuli repräsentieren. Mikrotubuli sind Teile des Zytoskeletts. Sie sind involviert in Vorgänge wie Zellteilung, Stofftransport in der Zelle und Kommunikation des Zellinneren mit der Zelloberfläche. Die Entstehung von Mikrotubuli teilt man in zwei Phasen ein, die sogenannte

„Nucleation“, also die Bildung eines Kernelements, und die „Elongation“, also die Verlängerung des Kernelements. Während der Nucleation verbinden sich jeweils ein Alpha- und ein Beta-Tubulin-Molekül und bilden so ein Heterodimer. Dreizehn solcher Heterodimere verbinden sich wiederum und bilden eine ringförmige Anordnung mit einem Durchmesser von 25 nm. An dieses Kernstück lagern sich weitere aus Alpha- und Beta-Tubulin bestehende Heterodimere an und verlängern den so neu geformten Mikrotubulus. Dies bezeichnet man wie bereits erwähnt als „Elongation“. In der Zelle finden diese Vorgänge in der Nähe des Nukleus statt und zwar im so genannten „Microtubule Organizing Centre“ (MTOC). Jeder Mikrotubulus besitzt ein Plus-Ende (schnelles Wachstum) und ein Minus-Ende (langsames Wachstum). Polymerisierung und damit Wachstum von Mikrotubuli wird *in vivo* von der Hydrolyse von GTP zu GDP begleitet und vorangetrieben. Elongation findet *in vitro* aber auch ohne diese Hydrolyse stattfinden (www.cytochemistry.net/Cell-biology, Downing KH et al., 1999).

Besondere Beachtung hat die Beteiligung von Tubulinen an der Zellteilung erhalten, da ungebremste Zellteilung Ausgangslage für die Entstehung von Neoplasien ist. Tubuline sind Teil des Spindelapparats, der für die Mitose essentiell ist. Verschiedene Chemotherapeutika binden an Beta-Tubulin und stabilisieren dadurch die Tubulinpolymere. Dies verhindert weitere Aktivität, die auf Auf- und Abbau dieser Polymere beruht und verhindert so Zellteilung (Verrills NM et al., 2005, Islam MN et al., 2004).

Zytokeratine sind Intermediärfilamente (IF) und bilden den größten Teil des Zytoskeletts epithelialer Zellen. Ihre Aufgaben und Eigenschaften gehen jedoch weit über die einer bloßen Stützkonstruktion der Zelle hinaus, so werden den Zytokeratinen Einfluss auf Faktoren der Apoptose, Signalmoleküle, Heat-Shock Proteine und anderer regulierender Moleküle zugeschrieben. Sie spielen eine Rolle in der Reaktion der Zelle auf Stress und in diesem Zuge auch bei der Therapieresistenz einiger Tumorarten. Die Familie der Zytokeratine umfasst mehr als 20 Mitglieder, was sie zu einer der komplexesten Proteinfamilien unter den Intermediärfilamenten macht. Ähnlich wie bei der Bildung von Mikrotubuli assoziieren Zytokeratinmoleküle zu Heterodimeren, die wiederum zu Protofilamenten polymerisieren und durch weitere Anlagerung von Zytokeratinmolekülen verlängert werden. Auch wenn der filamentöse Zustand *in vitro* der bevorzugte und weitaus stabilere zu sein scheint (Filamente lassen sich nur schwer abbauen), sind die Vorgänge in der Zelle *in vivo* sehr dynamisch und ein ständiger Auf- und Abbau ist im Gange (Chu PG et al., 2002).

Für die Tumorbilogie sind Zytokeratine aus mehreren Gründen interessant. So könnten sie zum Beispiel als Tumormarker dienen. Man hat herausgefunden, dass Zytokeratin 19 bei verschiedenen Tumorerkrankungen vermehrt in extrazellulären Flüssigkeiten vorkommt. Dies

wird auf eine vermehrte Spaltung von Zytokeratin in den Tumorzellen zurückgeführt (Erickson LA et al., 2004).

Im Weiteren wird mehr und mehr versucht, Zytokeratin als immunhistochemischen Marker zur Differenzierung verschiedener Tumorarten heranzuziehen. So haben Cameron et al., 2003 einen Weg dargestellt, die follikuläre Variante des Papillären Schilddrüsenkarzinoms von anderen Schilddrüsentumoren follikulärer Architektur zu unterscheiden. Sie untersuchten die jeweilige Expression verschiedener Zytokeratine und fanden heraus, dass zumindest in ihren Versuchspräparaten ein Verteilungsmuster zu erkennen war, das eine Differenzierung zumindest erleichtern sollte.

3.3 Die Extrazelluläre Matrix (EZM)

Unter extrazellulärer Matrix versteht man ein von der Zelle sezerniertes, kompliziertes Netzwerk, bestehend aus Kollagenen, Glykoproteinen und Proteoglykanen. Jede Zellart produziert eine für sie spezifische EZM. Die Vernetzung der Komponenten stattet die Zelle mit der notwendigen Stabilität und Elastizität für Adhäsion und Migration aus. Mittlerweile ist man sich sicher, dass die EZM neben der schon lange bekannten Rolle eines „Außenskeletts“ eine Schlüsselrolle im Zell- und Gewebsverhalten spielt.

Die genannten Wirkungen werden durch verschiedene Mechanismen bewirkt. Einer dieser Mechanismen ist die Bindung an verschiedene Rezeptortypen wie Integrine und Syndekane. Aus diesen Bindungen resultieren Veränderungen im Zytoskelett, die das Zellverhalten beeinflussen können (z. B. Induktion von Apoptose). Außerdem zieht die Aktivierung dieser Rezeptoren verschiedene Signaltransduktionsketten im Zellinneren nach sich, die wiederum eine Reihe von Zellfunktionen wie Sekretion oder Gentranskription beeinflussen.

Die EZM dient auch als Speicher für Wachstumsfaktoren und Zytokine, die an Polysaccharid- oder Proteinanteile der EZM gebunden sein können.

Die Komposition der EZM ist sehr dynamisch. Dies liegt daran, dass EZM-kodierende Gene gespliced werden und außerdem vielen posttranskriptionalen Prozessen unterliegen. Dadurch können die Funktionen der einzelnen EZM-Komponenten ständig modifiziert werden.

3.3.1 Kollagen Typ I und III

Zurzeit sind ungefähr 20 verschiedene Proteine der Familie der Kollagene bekannt. Kollagene vom Typ I und III gehören beide zu den fibrillären Proteinen und kommen in

großen Mengen in der EZM einer Reihe von Geweben wie Haut, Sehnen, Knochen, Herz, Schilddrüse usw. vor. Kollagen Typ I bildet den Grundstoff für Kollagenfasern, die den Zellen und Geweben Zugfestigkeit verleihen. Kollagen Typ I polymerisiert hierzu zu Kollagenfibrillen, die sich wiederum zu Kollagenfasern verbinden. Kollagen III bildet hingegen den Grundstock für retikuläre Fasern. Diese bilden Netze um Zellen und Gewebe und sind Namensgeber für das retikuläre Bindegewebe, in dem sie vorherrschende Komponente der EZM sind.

Kollagene sind allerdings nicht nur für die mechanische Stabilität von Zellen verantwortlich, sondern stellen auch Signalmoleküle dar.

Für die Signaltransduktion sind drei Rezeptortypen bekannt, an die Kollagene binden können: Integrine, Glykoprotein IV und der „Disoidin Domain Rezeptor“.

3.3.2 Fibronektin

Fibronektine sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 235 und 270 kDa, die man in den meisten EZM findet. Tumorzellen besitzen in der Regel geringere Mengen an Fibronektin. Bei Vorgängen wie Wundheilung und Fibrose findet man häufig eine erhöhte Expression. Den Fibronektinen werden außerdem fördernde Wirkungen auf die Zelladhäsion an andere Zellen, Unterlagen oder die EZM zugesprochen, und sie haben Einfluss auf die Zellmorphologie, -migration und -differenzierung sowie auf die Organisation des Zytoskeletts. Sie entfalten diese Wirkung wiederum durch Bindung an Integrin-Rezeptoren.

3.3.3 Laminin

Laminine kommen vorwiegend in der Basallamina von Zellen vor. Es handelt sich um ein großes (400-600 kDa) heterotrimeres Glykoprotein, das aus α -, β - und γ -Einheiten besteht, die sich zu einer kreuzähnlichen Struktur zusammenfügen. Ursprünglich hatte man lediglich ein Laminin identifiziert und ihm nur strukturelle Funktionen zugewiesen. Heute sind mindestens 11 Laminine bekannt. Alle gemein sind so genannte G-Domänen am Ende der Heterodimere, die wichtig für die Interaktion mit der Zelle und anderen Matrixproteinen sind. Neben der bereits bekannten Beteiligung der Laminine an der Architektur der EZM und ihrer Beeinflussung von Zelladhäsion und -migration, gibt es heutzutage mehr und mehr Hinweise darauf, dass Laminine über Zelloberflächenmoleküle und -rezeptoren auch in der Lage sind, Zellproliferation und -differenzierung zu steuern.

3.3.4 Osteopontin

Osteopontin ist ein Glykoprotein der EZM mit einem Molekulargewicht von 44 kDa. Es wurde zunächst in Knochen und Knorpelgeweben gefunden, ist aber nun auch in vielen anderen Gewebsarten nachgewiesen worden. Wie viele andere EZM-Proteine kann es Zellen durch Bindung an Integrine beeinflussen. Hierbei kann es das Migrations- und Adhäsionsverhalten von Zellen verändern. Man schreibt ihm eine Schlüsselrolle in verschiedenen Fibrosierungsvorgängen, so z.B. in der Niere und im Herzen, zu (Schnee et al., 2000).

3.3.5 Chondroitinsulfat

Chondroitinsulfat ist ein Glykosaminoglykan der ECM, das vor allem in Knorpel- und Knochengewebe vorkommt. Es ist an vielen krankhaften Vorgängen wie Entzündung, Infektion oder auch Krebs beteiligt, die zumindest teilweise durch eine gestörte Zell-Zell-Erkennung zustande kommen. Die Rolle von Chondroitinsulfat bei Zell-Zell-Interaktionen wurde in den letzten Jahren zunehmend untersucht. So stellte man bei verschiedenen Tumorarten eine positive Korrelation zwischen der Menge des in der ECM gebundenen Chondroitinsulfats und der Rückfallrate nach Therapie fest. Das Chondroitinsulfat wird dabei von Zelloberflächenproteinen gebunden. Man rät deshalb auch in verschiedenen Fällen von der oralen Supplementierung von Chondroitinsulfat ab, da dies krebsfördernd wirken könnte (Nadanaka 1999).

3.3.6 Integrine

Integrine sind hauptverantwortlich für die Interaktion von EZM und intrazellulären Strukturen. Es handelt sich um eine Familie transmembraner Zelloberflächenmoleküle, bestehend aus einer alpha- und einer beta-Kette. Integrine sind in der Lage, EZM Proteine zu binden. Die Affinität zum Liganden ist hierbei im Vergleich zu anderen Rezeptortypen (z.B. Hormonrezeptoren) gering. Dies scheint für die Zelle sinnvoll zu sein, da sie sonst in ihrer Verbindung zur EZM zu unflexibel würde. Viele Matrixproteine werden von mehreren verschiedenen Integrinen gebunden. So hat z.B. Fibronectin mindestens acht Bindungspartner und Laminin mindestens fünf.

Integrine fungieren so als Vermittler zwischen EZM und Zytoskelett, bzw. dem intrazellulären Raum. Nach der Bindung eines Matrixproteins bildet der zytoplasmatische Anteil der beta-

Kette des Integrins eine Verknüpfung mit Talin und α -Aktin aus, die sich ihrerseits über weitere Bindungsproteine an Aktinfilamente anlagern. Diese transmembrane Anheftung ist für die Zell-Zell- und die Zell-Matrix-Adhäsion notwendig.

Neben den rein mechanischen Auswirkungen werden weitere Vorgänge in Gang gesetzt. Nahe liegend ist die Beeinflussung des Zytoskellets über Aktin und damit die Beeinflussung der Zellform, der Zellflexibilität und –motilität. Neuere Forschung weist darauf hin, dass Integrine auch in der Lage sind, über ihre Verbindung zu Matrixproteinen intrazelluläre Signalwege zu aktivieren und damit in den Stoffwechsel der Zelle einzugreifen (Molecular Biology of the Cell, 3rd Edition 1994).

Für die Herstellung von Bindungen von Bedeutung ist unter anderem Talin. Hierbei handelt es sich um ein 270 kDa großes Protein, das wie oben bereits beschrieben bei der Verbindung von Integrin zu Aktin beteiligt ist. Außerdem kann es Integrine in bestimmten Zellmembranbereichen induzieren und die Affinität der Integrine modulieren (Calderwood 2003).

Vinculin ist ein weiteres Protein, das an den Bindungsvorgängen über Integrine beteiligt ist. Es besteht aus einer 90 kDa schweren runden Kopfreion und einer 27 kDa schweren Schwanzregion. Vinculin spielt vor allem eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion, die bei Vinculinverlust erheblich gestört ist.

3.3.7 Transforming Growth Factor- β

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ist ein ubiquitäres Signalmolekül. Es kommt in drei verschiedenen Isoformen TGF- β I-III vor, wobei TGF- β III das weit verbreitetste ist. TGF- β ist an vielen Regulationsprozessen in der Zelle beteiligt wie z.B. an Proliferations-, Differenzierungs-, Migrations-, und Angiogenesevorgängen sowie am generellen Überleben der Zelle. Seine Wirkung entfaltet TGF- β über drei Rezeptoren (T β R I-III). Es aktiviert T β R II durch direkte Bindung oder indirekt durch Bindung an T β R III. In dieser Konformation wird T β R I phosphoryliert, sodass über die ihm eigene Phosphokinase intrazelluläre Proteine phosphoryliert werden, die in dieser aktivierten Form in den Zellkern wandern. Hier greifen sie zellspezifisch in Transkriptionsvorgänge ein.

Da TGF- β in so viele Vorgänge involviert ist, kann eine Störung weitreichende Folgen haben. So wird eine gestörte Funktion in vielen krankhaften Prozessen gefunden, unter anderem auch bei neoplastischen Erkrankungen. Hier sind Mutationen von TGF- β für erhöhte Proliferationsraten verantwortlich. Außerdem werden Veränderungen von TGF- β für die Angiogenese verantwortlich gemacht und damit für die Blutversorgung von Tumoren sowie für die Resistenz von Tumoren gegenüber dem Immunsystem (Elliot et al., 2005).

3.3.8 Einfluss der Extrazellulären Matrix auf die Zelle

Das Überleben vieler Zellen im Allgemeinen und damit auch das von Tumorzellen hängt unter anderem von ihrer Verbindung zur Extrazellulären Matrix ab (Rozzo et al., 1997, Aoshiba et al., 1997, Scott et al., 1997, Fukai et al., 1998). Die Tatsache, dass die Unterbrechung der Zell-Matrix-Verbindung in vielen Zellen Apoptose auslöst (Frisch et al., 1994), zeigt, wie wichtig diese Interaktion für das Überleben der Zelle ist. Dieser Vorgang, der von Frisch et al. mit dem Begriff Anoikis (aus dem Griechischen „Heimatlos“) bezeichnet wurde, wird durch sogenannte Integrine vermittelt, deren Liganden verschiedene Komponenten der EZM sind. Dabei sind bestimmte Integrine spezifisch für bestimmte Proteine der EZM, wobei ein Integrin in der Lage ist, mehrere Arten von EZM-Proteinen zu binden. Die Wirkung der Integrine beruht einerseits auf ihrer Interaktion mit Wachstumsfaktoren, andererseits auf der Aktivierung verschiedener Kinasen und des PI3-Weges (Borges et al., 2000, Schwartz et al., 2001). Während also die Trennung von Zelle und EZM negative Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit hat, ist die Verbindung zwischen EZM und Zelle über Integrine in der Lage, die Zelle weniger empfänglich für apoptotische Stimuli wie zytotoxische Substanzen, Strahlung oder Entzug von Serum (Wachstumsfaktoren) zu machen. So können Integrine sowohl Expression als auch Aktivität verschiedener Mitglieder der Bcl-2 Familie und p53 beeinflussen und die Zelle dadurch weniger empfindlich gegenüber negativen Einflüssen machen (Matter et al., 2001, Strömblad et al., 1996).

Neben der Interaktion zwischen Zelle und EZM kommunizieren Zellen auch direkt miteinander. Dies geschieht über Zelladhäsionsmoleküle (CAM), zu denen wiederum die Integrine, die Selektine und die Cadherine gehören. Auch diese Moleküle sind am Anoikisphänomen beteiligt, wobei den letztgenannten Cadherinen besondere Bedeutung zukommt. Hierbei handelt es sich um Transmembranglykoproteine, die sowohl bei der Entscheidung über Leben und Tod einer Zelle, als auch bei Differenzierung (Redfield et al., 1997), Zellform, Reaktion auf Hormone (Harandian et al., 1998) und Migrationseigenschaften der Zelle eine Rolle spielen. Sie bilden direkte Brücken zwischen zwei Zellen an Zellverbindungen wie z.B. den Desmosomen.

Neben der Änderung der Überlebensfähigkeit von Zellen spielen Integrine und Cadherine außerdem eine Rolle bei der Fähigkeit von Tumoren, Metastasen zu bilden (Goodsell, 2002) bzw. Gefäße einsprossen zu lassen (Bischoff, 1997). Zur Bildung von Metastasen müssen Tumorzellen in der Lage sein, sich aus dem Verband des Ursprungsgewebes zu lösen, was einen Funktionsverlust der Cadherine voraussetzt. Gefäßeinsprossung in Tumore verläuft nicht spontan. Metastasen ohne Gefäßversorgung sind nicht in der Lage, über eine kritische Größe hinaus zu wachsen, da trotz möglicherweise hoher Teilungsrates die Anzahl der gebildeten Zellen und der absterbenden Zellen im Gleichgewicht ist. Erst die Induktion neuer

Gefäße durch Cadherine, andere CAM und weitere Faktoren wie z.B. TGF- β ermöglicht die Entwicklung großer solider Tumore.

Unter dem Phänomen der sogenannten „Multizellulären Resistenz“ versteht man eine erhöhte Resistenz von Zellen, die im Verbund wachsen, gegenüber denen, die vereinzelt wachsen. Dieses Phänomen wurde in vielen Studien beschrieben, in denen Monolayerkulturen Sphäroiden gegenübergestellt wurden (Graham et al., 1994, Jianmin et al., 2002, Kobayashi et al., 1993). Diese Phänomene erklären auch, warum Versuche an Monolayerkulturen keine nachhaltigen Ergebnisse liefern, da diese nur in geringem Ausmaß die *in vivo* Situation simulieren können. Sphäroide sind nicht in der Lage, alle Faktoren zu simulieren, da verschiedene Einflüsse wie Hormone oder Kontakt zum umliegenden Gewebe in ihrer Komplexität nicht ohne weiteres nachzuempfinden sind. Sie bieten aber ein Modell, das viel näher an der Realität liegt und durch weitere Entwicklung wie z.B. Kokultivierung mit anderen Zellen noch ausbaufähig ist.

3.4 Apoptose

Der Untergang von Zellen kann grundsätzlich auf zwei Arten erfolgen: Nekrose oder Apoptose. Unter Nekrose versteht man den Tod einer Zelle aufgrund schwerer mechanischer oder chemischer Schädigung oder völligen Fehlens von Energiereserven. Die Zellmembran verliert ihre Integrität, platzt und das Zytoplasma strömt in den Zellzwischenraum, wo es in der Regel eine Entzündung auslöst. Beispiele hierfür sind Verbrennungen, Verätzungen und das Absterben von Zellen durch Hypoxie bei Minderversorgung mit Blut.

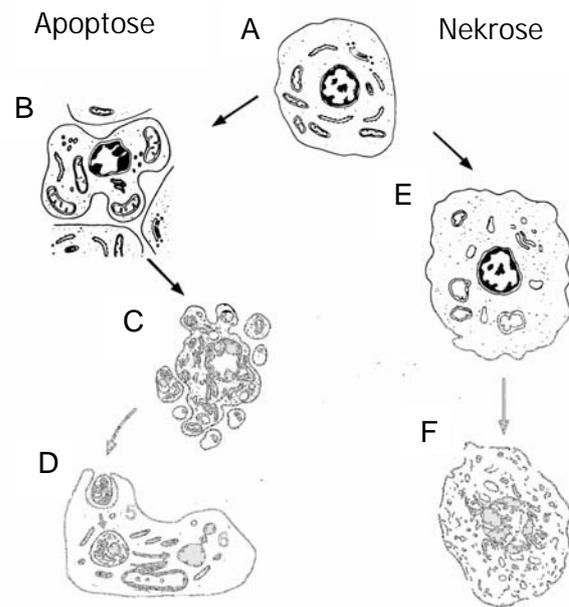


Abb. 1: Morphologie der Apoptose und Nekrose: A: Normale Zelle, B: Kernkondensation, Membraneinstülpungen, C: Apoptosekörperchen, D: Phagozytose, E: angeschwollene nekrotische Zelle und F: Zell-Lyse. Graphik modifiziert nach Kerr (1995)

Apoptose hingegen ist ein aktiver Prozess, bei dem die Zelle einem Programm folgt, das zum geregelten Untergang der Zelle und der Beseitigung ihrer Reste führt. Sie ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase während der Entwicklung von Organismen (Zuzart-Luis et al., 2002) und auch später in Geweben mit hohen Teilungsraten, zur Beseitigung beschädigter Zellen, die potentiell onkogen sind, und für die gezielte Eliminierung infizierter Zellen. So werden 95 % der gebildeten Thymozyten auf diese Weise während der Reifung im Thymus aussortiert (Nagata, 1997).

Der programmierte Zelltod scheint nicht erst eine „Erfindung“ mehrzelliger Lebewesen zu sein, vielmehr deutet einiges darauf hin, dass schon Einzeller diesen Mechanismus genutzt haben. Der Sinn hierbei kann natürlich nicht im Selbstschutz bestanden haben, sondern liegt vielmehr darin, die Population vor negativen Einflüssen zu schützen. So gibt es Bakterien, die, sobald sie einen Bakteriophagen entdecken, Selbstmord begehen und dadurch die Ausbreitung der Infektion verhindern (Vaux et al., 1996).

Die morphologischen Veränderungen der Zelle sind einheitlich, unabhängig davon, welchen Auslöser die Apoptose hatte. Die Zellmembran stülpt sich aus (sogenanntes „membrane blebbing“), die DNA wird durch Nukleasen gespalten, es kommt zur Kondensation des Chromatins, der Kern zerfällt in kleine Bruchstücke und die Zelle schrumpft insgesamt. Im weiteren Verlauf zerfällt die Zelle selbst und wird von umgebenden Zellen oder Makrophagen phagozytiert und damit aus dem Gewebe entfernt (Abb. 1).

Die Auslöser der Apoptose werden in der Regel in extrinsische und intrinsische Faktoren unterteilt.

3.4.1 Extrinsische Faktoren

3.4.1.1 Fas (CD95)/Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1

Unter extrinsischen Faktoren versteht man im Allgemeinen die so genannten Todesrezeptoren der Tumornekrosefaktorrezeptorfamilie. Der am besten erforschte ist Fas, an dessen Beispiel hier der Mechanismus der Rezeptoren erklärt werden soll. Fas ist ein Typ-I-Transmembranprotein (c-Terminus zytosolisch, N-Terminus extrazellulär), dessen extrazelluläre Domäne cysteinreich ist, was zur Interaktion von Ligand und Rezeptor notwendig ist, da diese gestört ist, sobald die Cysteinanteile zerstört sind (Orlinick et al., 1997). Von einer ganzen Reihe normaler Zellen wird Fas immer exprimiert, so zum Beispiel Lymphozyten, Hepatozyten und von Epithelzellen der Ovarien (Lombard et al., 2003). Von einer regulierten Expression in anderen Geweben wird ausgegangen. Auch in Tumorgewebe wurde Fas entdeckt, doch sind Angaben über Vorkommen und Funktion hier widersprüchlich (Abrahams et al., 2003, Houston et al., 2004). Fas-Ligand ist der entsprechende Ligand, dessen Bindung Apoptose auslöst. Es handelt sich hierbei um ein Typ-II-Transmembranprotein, dessen Expression im Gegensatz zum Rezeptor selbst beschränkt ist. Zellen, die über Fas-Ligand verfügen, sind aktivierte T-Zellen (Suda et al., 1995), Natürliche Killerzellen (Oshimi et al., 1996) und sogenannte immunprivilegierte Gewebe wie Sertolizellen (Bellgrau et al., 1995) sowie Kornea und Retina des Auges (Griffith et al., 1995). Wiederum haben einige Tumorzellen die Fähigkeit erworben, den Liganden auszubilden (Hahne et al., 1996, Strand et al., 1996). Bindet Fas-Ligand an Fas, so bewirkt das eine Trimerisierung von Fas. Dies befähigt die zytoplasmatischen Todesdomänen (death domains, DD) zur Bindung von Adaptermolekülen (Fas associated death domain, FADD). Diese besitzen Todeseffektordomänen (death effector domain, DED), mit denen die DED von Procaspase 8 und Procaspase 10 eine Bindung eingehen, was in diesen Proteinen zur Konformationsänderung und anschließenden autoproteolytischen Spaltung und Aktivierung führt. Den Komplex aus Fas-Trimer, FADD und Procaspasen bezeichnet man als „Todesinduzierenden Signalkomplex“ (death inducing signaling complex, DISC) (Sharma et al., 2000, Nagata 1997).

Da das Substrat der Caspasen 8 und 10 die Procaspasen 2, 3, 4, 6, 7 und 9 sind, bezeichnet man Caspase 8 und 10 als Initiatorcaspasen. Am anderen Ende der Kette stehen die

Caspasen 3 und 7, die sogenannten Effektorcaspasen. Ihr Substrat sind zelluläre Proteine, darunter Enzyme, die sie aktivieren und damit die Apoptose vorantreiben (Thornberry et al., 1998). Caspase 3 ist zusätzlich in der Lage, die Procaspasen 6 und 7 zu spalten, die so wiederum in der Lage sind, Procaspase 3 zu aktivieren, was zu einer Verstärkung des Todessignals führt und sicherstellt, dass die durch Fas eingeleitete Apoptose ausgeführt wird (Abb. 2).

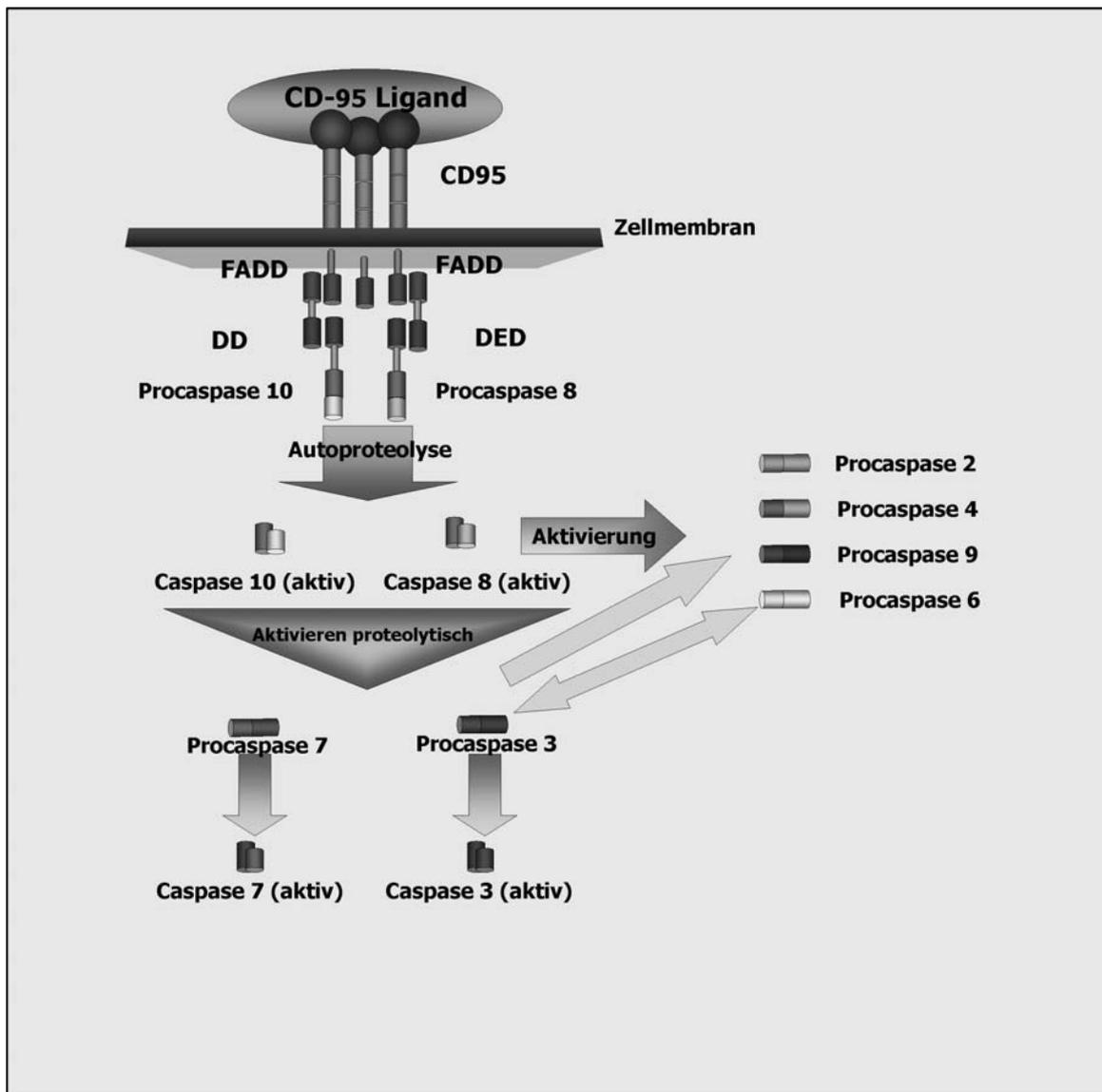


Abb. 2: Schematische Darstellung der Vorgänge nach der Bindung des Fas-Liganden am Fas Rezeptor

3.4.1.2 Die Bedeutung von Fas im Körper

Ist die Interaktion zwischen Fas und seinem Liganden gestört, so hat das schwerwiegende Folgen für die Zellhomöostase. Fas-Knockoutmäuse entwickeln Lymphadenopathien, Splenomegalie, Hypergammaglobulinämie und sterben frühzeitig (Singer et al., 1994, Orlinick et al., 1997). Auch das ALPS (autoimmune lymphoproliferative syndrome) bei Menschen beruht auf einer Mutation des Fas-Systems, wobei bei Patienten Mutationen an verschiedenen Loci des Fas-Gens gefunden wurden, was darauf hindeutet, dass jegliche Mutation das Syndrom auslösen kann (Straus et al., 1999, Martin et al., 1999).

Im menschlichen Immunsystem sorgt Fas für eine Abschwächung der Immunantwort, indem aktivierte periphere Lymphozyten zerstört werden, was einerseits eine überschießende Immunreaktion verhindert und andererseits zum Erhalt der Selbsttoleranz, also der Toleranz körpereigener Proteine, beiträgt (Griffith et al., 1995, Nagata, 1996). Ein Verlust dieser Funktion kann Autoimmunerkrankungen zur Folge haben.

Auch in der Tumorabwehr spielt Fas eine Rolle. Der Körper ist normalerweise in der Lage, entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Dabei ist der Fas-Signaltransduktionsweg nur einer von mehreren Wegen, in diesen Zellen Apoptose auszulösen. Entartete Zellen werden vom Körper aufgrund von veränderter Zusammensetzung der Oberflächenproteine als „fremd“ erkannt und wirken somit immunogen, was sie zum Ziel von zytotoxischen T Lymphozyten (CTL), Natürlichen Killerzellen (NK) und Granulozyten macht. Finden die entarteten Zellen einen Weg, der Immunantwort zu entkommen, so entstehen Malignome. Es gibt mehrere Mechanismen, die das Fas-System betreffen. Zunächst ist hier der Verlust von Fas zu nennen. Dieses Phänomen wurde bei der Untersuchung verschiedener Tumore gefunden, deren Ursprungsgewebe Fas exprimierten, so zum Beispiel Hauttumore (Chappell et al., 1999) und Lebertumore (Strand et al., 1996), Adenokarzinome (Nambu et al., 1998) und Schilddrüsenknoten und -karzinome (Andrikoula et al., 2001, Basolo et al., 2000). Eine weitere Möglichkeit, den Todesrezeptor auszuschalten ist die Produktion löslicher Fas Proteine, die in der Lage sind, Fas-Ligand zu blockieren und so unschädlich zu machen. Dies wurde von Owen-Schaub et al. 1995 bei Osteosarkomen nachgewiesen. Bei anderen Tumoren wiederum ist der Signalweg gestört. Das bedeutet Fas wird zwar exprimiert und die Bindung mit Fas-Ligand findet statt, aber die Signaltransduktion wird im weiteren Verlauf an anderer Stelle unterbrochen. Die Möglichkeiten hierfür sind vielfältig. So kann es sich um Mutationen in der DD (Muschen et al., 2000) oder erhöhte Expression eines antiapoptotischen Proteins FLIP handeln (Scaffidi et al., 1999). Die Struktur dieses Proteins ähnelt Procaspase 8 und wie dieses bindet es an FADD, ohne aber dessen Aktivität zu haben und verhindert so die Aktivierung. Beide oben genannten Varianten verhindern die Bildung von DISC, was zum Abbruch der Signalkette führt. Einige Tumoren haben dagegen auf Angriff gesetzt. Sie scheinen einerseits resistent gegen Fas-vermittelte Apoptose zu sein, haben aber zusätzlich die Fähigkeit, Fas-Ligand zu exprimieren, eine Eigenschaft, die wie oben beschrieben normalerweise nur sogenannten immunprivilegierten Geweben vorbehalten ist (Hahne et al., 1996, Saas et al., 1997, Mitsiades et al., 1999, Strand et al., 1996). Somit sind diese Zellen in der Lage, sich gegen Fas+ Zellen des Immunsystems zu verteidigen, indem sie in ihnen selbst Apoptose auslösen.

Fas spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung einiger Schilddrüsenerkrankungen wie Morbus Basedow und Hashimoto Thyreoiditis (Immunthyreoiditis). Seine herausragende Rolle bei Schilddrüsenkarzinomen ist unbestritten, wenn auch nicht völlig geklärt, da man keinen einheitlichen Mechanismus finden konnte, der Schilddrüsenkarzinome immun gegen Fas vermittelte Apoptose macht. Man geht mittlerweile davon aus, dass von Fall zu Fall unterschiedliche Mechanismen vorliegen. So wird sowohl von einer Minderexpression oder Mutation von Fas bzw. einer Expression von Fas-Ligand gesprochen, als auch eine Beteiligung anderer an der Apoptose beteiligten Proteine postuliert (Andrikoula et al 2001, Mitsiades et al 2001, Tsatsoulis 2002, Mitsiades et al 2003).

3.4.2 Intrinsische Faktoren

3.4.2.1 Die Bcl-2 Familie

Eine weitere wichtige Kontrollstation im Verlauf der Todeskaskade sind die Proteine der Bcl-2 Familie. Diese Proteine sind nach dem zweiten gefundenen Gendefekt des „B cell lymphoma“ benannt, bei dem es zu einer erhöhten Expression von Bcl-2 kommt (Tsujiimoto et al., 1985). Heute zählt man zu dieser Familie mindestens 15 Proteine, die man nach ihrer Wirkung in pro- und antiapoptotisch unterteilt. Unabhängig davon, ob es sich um pro- oder antiapoptotische Proteine handelt, besitzen alle Familienmitglieder mindestens eine von vier Bcl-2-Homologiedomänen (BH1-BH4) (Huang et al., 1998). Bei proapoptotischen Verwandten ist die Homologie in der Regel in allen vier Domänen, mindestens aber in BH1 und BH2 ausgebildet. Die proapoptotischen, deren prominentester Vertreter Bax ist, werden noch einmal in zwei Gruppen eingeteilt, nämlich jene, die noch die Domänen BH1-BH3 besitzen, und die so genannten „BH3-only“ Proteine, die bis auf BH3 keine Homologie mit Bcl-2 aufweisen. Die Tatsache, dass alle der BH3-Gruppe angehörenden Proteine proapoptotisch sind, hat zu der Annahme geführt, dass BH3 essenziell für die proapoptotische Eigenschaft ist (Zha et al., 1997). Bax und Bcl-2 sind in der Lage, sich in intrazelluläre Membranen zu integrieren und dort ionendurchlässige Kanäle zu formen, was für ihre Funktion wichtig ist. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist die Fähigkeit der Bcl-2 Proteinfamilie, miteinander Homo- oder Heterodimere bzw. -oligomere zu bilden (Huang et al., 1998). In nicht apoptotischen Zellen befindet sich Bax in Membranen von Mitochondrien des Endoplasmatischen Retikulums und des Kerns (Germain et al., 2003). Der Großteil der proapoptotischen Proteine befindet sich im Zytosol der Zelle. Dies ändert sich, sobald ein apoptotisches Signal die Zelle trifft. Dann ändert Bax seine Konformation, wodurch es in der

Lage ist, sich zur äußeren Mitochondrienmembran zu begeben und sich in diese zu integrieren, was für seine Funktion ausschlaggebend ist (Wolter et al., 1997).

Erhält die Zelle ein Apoptosesignal, so begibt sich Bax wie oben beschrieben zur Mitochondrienmembran und bildet dort Kanäle, wozu es Homodimere oder –oligomere formt (Antonsson et al., 2000, 2001). Diese Kanäle verändern das Membranpotenzial und bewirken neben der Freisetzung anderer Stoffe die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Cytochrom c bindet an Apaf-1 (apoptotic protease activating factor) und bildet zusammen mit Caspase 9 das sogenannte Apoptosom (Coultas et al., 2003, Burlacu 2003, Borner 2003). Dieses ist in der Lage, Caspase 3 zu aktivieren, eine der Effektorcaspasen, nach deren Aktivierung die Apoptose induziert und nicht mehr zu stoppen ist.

Bax kann als Tumorsuppressorgen angesehen werden, da der Verlust von Bax die Entstehung von Tumoren beschleunigen kann (Knudson et al., 2001, Shibata et al., 1999). Außerdem erzeugt eine verringerte Expression von Bax eine Resistenz gegen Chemotherapeutika (McCurrach et al., 1997).

Bcl-2 kann in diesen Ablauf an verschiedenen Stellen eingreifen. Einmal ist Bcl-2 in der Lage, ein Heterodimer mit Bax zu bilden. Dies verhindert die Integration von Bax in die Mitochondrienmembran und damit die Freisetzung von Cytochrom c (Sedlak et al., 1995). Des Weiteren ist Bcl-2 in der Lage, die Aktivierung von Caspase 9 und damit auch von Caspase 3 zu verhindern, indem es eine Bindung mit Apaf-1 eingeht, was die katalytische Aktivität des Komplexes zunichte macht (Pan et al., 1998). Beide Funktionen werden noch durch weitere Proteine der Bcl-2 Familie entweder imitiert oder modifiziert (Borner, 2003, Coultas et al., 2003, Burlacu et al., 2003).

Seit der Entdeckung des Bcl-2-Gens im Zusammenhang mit B-Zelllymphomen ging man davon aus, dass eine hohe Aktivität von Bcl-2 und seinen Homologen die Entstehung von Tumoren begünstigt. Man hat inzwischen herausgefunden, dass Bcl-2 keine sehr starke tumorigene Wirkung besitzt (Strasser et al., 1993), sondern vor allem die Entstehung von Karzinomen dadurch begünstigt, dass es die Apoptose von normalerweise kurzlebigen Zellen verhindert und diese dadurch anfälliger für Mutationen macht. So ist also Bcl-2 eher ein Wegbereiter für Onkogene wie c-myc (Strasser 1990), pim-1 (Acton et al., 1992, Adams et al., 1992) und v-abl (Kumar et al., 1999).

3.4.2.2 p53 und Apoptose

Die Aktivierung dieses Proteins hat vor allem zwei wesentliche Effekte: die Blockade des Zellzyklus in den Stadien G1 und G2 und Apoptose (Gualberto et al., 1998). Während die durch p53 vermittelte Arretierung des Zellzyklus durch Induktion von p21^{Cip1/Waf1} recht eindeutig und gut beschrieben ist (Gottifredi et al., 2003), scheint der genaue Weg, über den p53 Apoptose vermittelt, noch nicht vollkommen geklärt. P53 löst die Induktion einer ganzen Reihe von Genen aus, von denen sich bis dato allerdings keines als essenziell für die durch p53 ausgelöste Apoptose erwiesen hat. In der nicht apoptotischen Zelle wird p53 ständig abgebaut und damit auf einem konstant niedrigen Niveau gehalten. Es geht dazu eine Bindung mit Mdm-2 ein, was einerseits p53 inaktiviert und es andererseits zum Ziel proteolytischen Abbaus durch Ubiquitin macht. Diese p53 Homöostase wird gestört, wenn in diesen Abbau eingegriffen wird. Bei DNA-Schädigungen werden sowohl MDM-2 als auch p53 phosphoryliert und gehen dadurch keine Bindung mehr miteinander ein, was sowohl den Abbau als auch die Inaktivierung durch die Bindung aufhebt. Neben DNA-Schädigungen können auch andere schädliche Einflüsse wie Metabolitenentzug, physikalische Beschädigung, Hitzeschock, Hypoxie oder Expression von Onkogenen zur Stabilisierung und damit Akkumulation von p53 führen. Diese Akkumulation bewirkt die vermehrte Transkription von Bax und Fas und vermindert die Transkription von Bcl-2, womit sich der Kreis schließt. Es sind bislang noch nicht alle Mechanismen und Ebenen geklärt, durch die p53 seine Wirkung entfaltet.

Eine Mutation von p53 wird in 50 % aller Tumore gefunden. Da p53 durch DNA-Schädigung aktiviert wird, kann ein Funktionsverlust weitreichende Folgen haben. p53 stoppt den Zellzyklus und beseitigt falls nötig die beschädigte Zelle durch Apoptose. Geschieht dies nicht, hat das folgende Konsequenzen: Die DNA wird nicht repariert und die Zelle teilt sich weiter mit der beschädigten oder mutierten DNA. Es entsteht eine entartete Zelle mit verändertem Erbgut.

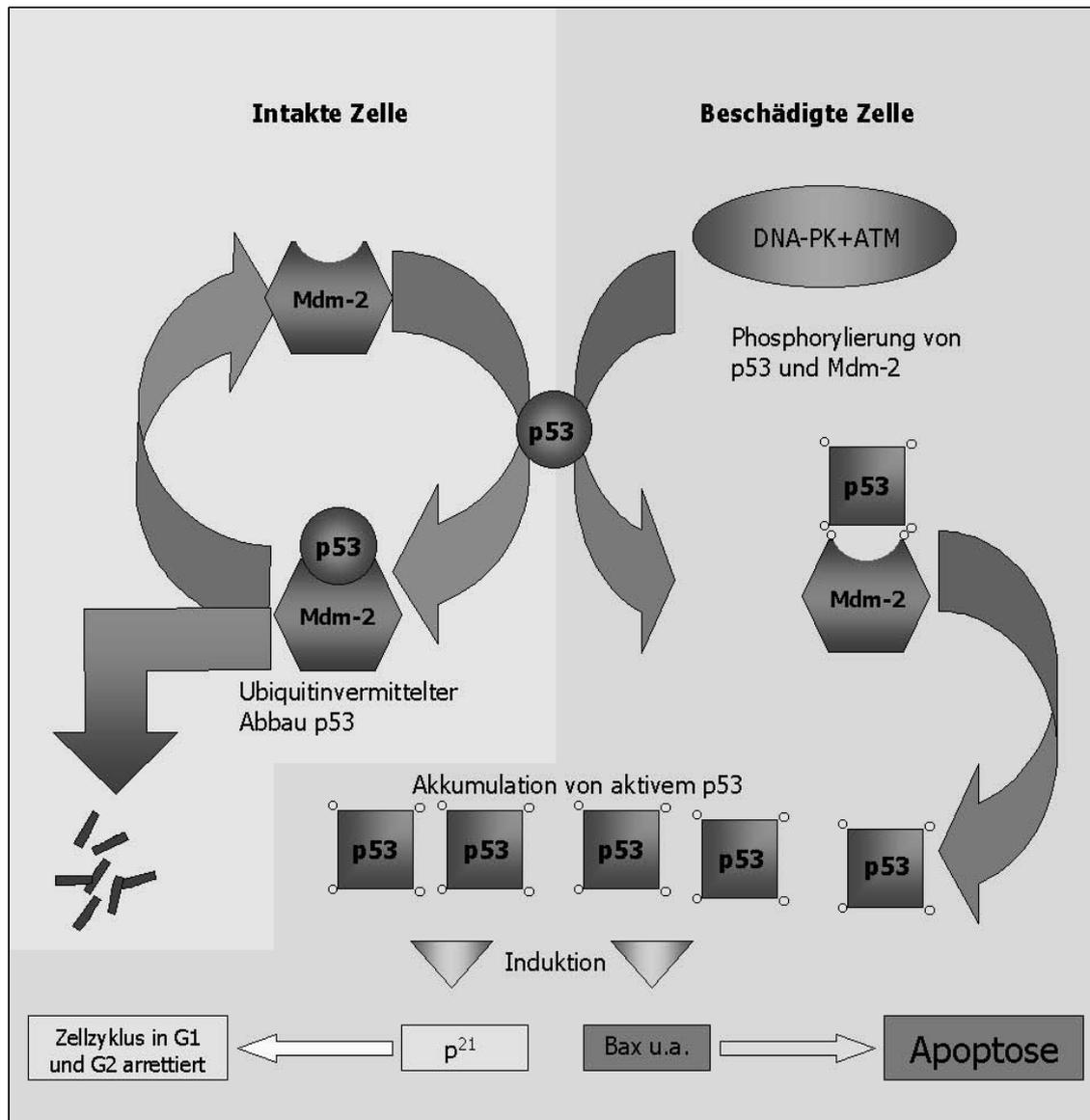


Abb. 3: Interaktion von p53 und Mdm-2 in intakten und in beschädigten Zellen.

3.4.3 Apoptose als Angriffspunkt von Medikamenten

Chemotherapeutika erzielen ihre Wirkung in der Regel, indem sie in ihren Zielzellen, den Tumorzellen, Apoptose auslösen. Da viele Tumorzellen gerade dadurch charakterisiert sind, dass sie nicht mehr auf normale Signale zur Einleitung der Apoptose reagieren und damit viele Medikamente nicht mehr wirksam sind, tut sich besonders hier ein interessanter Ansatz auf. Durch das immer tiefer werdende Verständnis der molekularen Mechanismen des programmierten Zelltodes sind neue viel versprechende antineoplastische Substanzen in der Entwicklung. So wurden bereits Versuche durchgeführt, synthetisch hergestellte Liganden der oben beschriebenen Todesrezeptoren anzuwenden. Zwar gab es hierbei Rückschläge

bei TNF und Fas-Ligand, aber ein weiteres Mitglied der Tumornekrosefaktorfamilie „TNF-related-apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL) zeigt in Studien an Mäusen und Affen viel versprechende Ergebnisse.

Caspasen sind schon seit längerer Zeit Gegenstand der Forschung, allerdings bisher vor allem auf dem Gebiet der Caspaseinhibitoren. Caspase 3, die bedeutendste Effektorcaspase, wäre ein perfekter Angriffspunkt, da ihre Aktivierung oder die Erleichterung der Aktivierung sehr effektiv Apoptose auslösen würde.

Bcl-2 ist ein weiteres Protein, das für die Krebstherapie, vor allem für die Behandlung von Lymphomen, von Bedeutung ist. Auf der Ebene der Transkription wird RNA eingeschleust, die der mRNA von Bcl-2 gegensinnig ist. Dadurch wird die Bildung von Bcl-2 verhindert (Los et al., 2003).

Neben neuen Medikamenten wird mittels Gentherapie versucht, die Funktion von p53 wieder herzustellen (Lebedeva et al., 2003).

Noch viele weitere Entwicklungen auf diesem Gebiet sind im Gange (Los et al., 2003), sodass die Behandlung von Tumoren in Zukunft effizienter und individueller wird, da man spezifischer auf die bei den einzelnen Tumoren vorliegenden Eigenschaften eingehen können wird.

3.5 Schilddrüsenkarzinome

Schilddrüsenkarzinome, die häufigste endokrine Neoplasie, machen ungefähr 1 % aller neuen Krebsfälle aus, wobei etwa doppelt so viele Frauen wie Männer betroffen sind. Bei mindestens 94 % der Fälle handelt es sich um differenzierte Karzinome, die sich dann wiederum in papilläre und follikuläre Tumore aufteilen. Weitere 5 % sind medulläre Schilddrüsenkarzinome, die aus den C-Zellen der Nebenschilddrüsen entstehen. Bei 1 % handelt es sich um anaplastische Schilddrüsenkarzinome. Diese entstehen in der Regel durch Dedifferenzierung aus differenzierten Karzinomen (Sherman, 2003). Die Inzidenz steigt erheblich nach dem 45. Lebensjahr. Gehäuftes Vorkommen von Schilddrüsenneoplasien entdeckt man in Jodmangelgebieten, bei Personen, die erhöhten Strahlungswerten ausgesetzt waren (z.B. durch Reaktorunfälle wie Tschernobyl oder Bestrahlung aufgrund anderer Neoplasien) (Tuttle et al., 2000, Mihailescu et al., 2002), und bei gehäuftem Vorkommen in der Familie (Musholt et al., 2000, Alsanea, 2000).

3.5.1 Papilläre Schilddrüsenkarzinome (PTC)

PTC sind nicht eingekapselt und häufig multifokal. Sie metastasieren bevorzugt über die Lymphbahnen zunächst in die regionalen Lymphknoten, dann in den ganzen Körper, vor allem in Knochen und Lunge. Histologisch weisen die Tumore sowohl papilläre als auch follikuläre Strukturen auf. Weitere Hinweise geben optisch leere Kerne (Milchglaskerne), die bei ca. 50 % vorkommen, dicht gepackte oder überlappende Kerne, Psammom-Körperchen und Längsfurchen in den Kernen. Makroskopisch erscheinen papilläre Schilddrüsenkarzinome als solitäre oder multifokale Geschwülste, die Zysten, Vernarbungen und Verkalkungen enthalten können. Dabei kann das Karzinom entweder gut abgegrenzt sein oder in die Umgebung infiltrierend wachsen. PTC produzieren in der Regel keine Schilddrüsenhormone. Sie sind non-funktionell. Die Prognose des PTC ist bei jungen Patienten sehr gut. Hohes Alter und Fernmetastasen sind prognostisch ungünstig (Brandt-Mainz K et al., 2001).

3.5.2 Follikuläre Schilddrüsenkarzinome (FTC)

FTC sind in der Regel eingekapselt und singulär. Ihre Verbreitung erfolgt zumeist hämatogen, was bedeutet, dass Lymphknoten in der Regel zunächst nicht betroffen sind. Sie weisen, wie der Name schon andeutet, follikuläre Strukturen auf. Des Weiteren lassen sie sich von anderen Karzinomen vor allem durch die Abwesenheit der für diese spezifischen Merkmale abgrenzen, so z.B. von papillären Strukturen, durch das Fehlen von Psammom-Körperchen und überlappenden Zellkernen. Wichtig ist bei der histologischen Untersuchung, Malignitätskriterien zu finden, um maligne von benignen Tumoren (Follikuläre Adenome) abzugrenzen. Dazu gehört vor allem das Vorhandensein von Metastasen, das Einsprossen von Gefäßen und der Austritt aus der Kapsel (Brandt-Mainz et al., 2001).

Nicht immer ist es einfach, die verschiedenen differenzierten Formen von Schilddrüsentumoren zu unterscheiden, da es natürlich auch Mischformen gibt.

3.5.3 Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen

Bisher werden Schilddrüsenkarzinome in der Regel wie folgt behandelt. Steht die Diagnose papilläres bzw. follikuläres Schilddrüsenkarzinom fest, so steht am Anfang der Therapie eine

Operation. Hierbei werden Schilddrüse, zentrale Lymphknoten und wenn nötig weiteres befallenes Gewebe entfernt.

Im Anschluss daran folgt eine Radiojodtherapie. Hierbei wird dem Patienten nach 6 Stunden Nahrungskarenz eine Kapsel mit radioaktivem Jod appliziert. Eine Ganzkörperszintigraphie wird nach frühestens 72 Stunden durchgeführt. Diese Maßnahmen sollen einerseits möglicherweise vorhandenes Restschilddrüsengewebe zerstören. Ferner können jodspeichernde Lymphknoten- und Fernmetastasen nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden.

In Fällen, in denen eine komplette Entnahme des Tumors von vornherein nicht möglich ist, bei Tumoren, die die Fähigkeit verloren haben, Jod aufzunehmen oder bei Rezidiven wird eine so genannte perkutane Strahlentherapie durchgeführt. Diese kann entweder als Ergänzung dienen, nach bereits erfolgter Operation und Radiojodtherapie oder als alleinige Therapieform, wobei ihr dabei nur ein palliativer Effekt zugesprochen wird.

Im Anschluss an diese initiale Behandlung erfolgt häufig eine Behandlung mit T4 in suppressiver Dosierung, da dies die Produktion von TSH unterdrückt. TSH fördert das Wachstum von Schilddrüsenzellen. Eine Verminderung des TSH-Spiegels sollte daher das Wachstum eventuell verbliebener Tumorzellen verhindern.

Sollten alle bisher angeführten Behandlungsvorschläge ausgeschöpft sein, ohne die erwünschten Erfolge zu erzielen, bleibt als letzte Möglichkeit die Chemotherapie. Es werden hierzu vor allem Doxorubicin und Cisplatin verwendet.

Im weiteren Verlauf werden Nachuntersuchungen angeschlossen, um ein erneutes Ausbrechen der Erkrankung frühzeitig zu erkennen und schnell behandeln zu können.

Die Kombination und Verfeinerung dieser Behandlungsstrategien hat dazu geführt, dass die allgemeine Überlebensrate für die ersten 10 Jahre 80-90 % beträgt. Diese hat sich allerdings trotz der Entwicklungen in der Chirurgie und den anderen Methoden in den letzten Jahrzehnten kaum verändert.

Immer noch ist es schwierig, aggressivere Formen von Tumoren zu heilen, z.B. jene, die die Fähigkeit zur Jodaufnahme verloren haben. Hierbei handelt es sich vor allem um Tumore, die ihre Differenzierung verloren haben, d.h. keine Eigenschaften des Ursprungsgewebes mehr aufweisen. Dies macht einen spezifischen Angriff über die Jodaufnahme oder den TSH-Rezeptor schwierig. Für diese letzten 10-20 % und zur Verbesserung der bereits bestehenden Therapieformen müssen neue Behandlungsstrategien gesucht werden (Schlumberger, 1998; Brandt-Mainz et al., 2001; DeGroot et al., 2001).

3.5.4 Onkogene und die Entstehung von Malignomen

Neben der Apoptose als Mechanismus des Zelluntergangs existiert parallel der Prozess der Proliferation. Die an der Apoptose beteiligten Proteine, auch Tumorsuppressorgene genannt, erleiden in der Regel einen Funktionalitätsverlust, d.h. sie können ihrer Aufgabe, das ungebremste Wachstum zu verhindern, nicht mehr nachkommen. So genannte Onkogene hingegen sind Proteine, deren Funktionen auf die eine oder andere Weise mit der Proliferation zusammenhängen. Sie liegen in normaler Form ständig in der Zelle als Proto-Onkogene vor. Statt eines Aktivitätsverlustes erfahren sie eine Aktivitätssteigerung, sei es durch verstärkte Expression oder Mutation. Bis heute sind mehr als 100 Onkogene entdeckt worden, und mit den schnellen Fortschritten der Biotechnologie werden es ständig mehr. Man ist sich heute einig, dass für den Übergang von einer normalen Zelle zu einer transformierten Zelle kein einzelnes Gen verantwortlich ist, sondern mehrere Gendefekte notwendig sind (Vogelstein et al., 1993).

Die nachfolgend besprochenen Onkogene bieten keine vollständige Auflistung, sondern sollen beispielhaft klar machen, welche Mechanismen für die Entstehung von Karzinomen verantwortlich sein können.

Das Ras-Proto-Onkogen kodiert p21, ein G-Protein, das eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Tyrosinkinaseaktivität verschiedener Rezeptoren wie z.B. des EGF-Rezeptors spielt. Am Ende dieser Signalkette stehen Transkriptionsfaktoren wie c-fos und c-jun (Marshall, 1996). Eine vermehrte Expression des Ras-Proto-Onkogens führt damit zu einem abnormalen Wachstumsstimulus. Eine Mutation dieses Gens liegt in ca. 30 % aller Tumore vor (Bos 1989), wobei sie in etwa 20 % der papillären und in 53 % der follikulären Schilddrüsenkarzinome gefunden wurde (Wright et al., 1989). Weitere Belege für die Bedeutsamkeit dieses Onkogens für die Entstehung von Schilddrüsentumoren bieten verschiedene Studien an Zelllinien (Heldin et al., 1988, Fusco et al., 1982).

Beim Met-Protein handelt es sich um einen Transmembranrezeptor mit intrazellulärer Tyrosinkinase. Seine Aktivierung bewirkt eine vermehrte Zellteilung und Beweglichkeit. Zellen mit einer Met-Mutation sind eher in der Lage, sich aus dem Zellverband zu lösen und somit eher in der Lage zu metastasieren (Birchmeier et al., 2003). Außerdem wird Met eine Rolle bei Angiogenese und Anti-Apoptose zugeschrieben.

Abbild des Ret-Onkogens (RET) ist ein transmembraner Rezeptor für Wachstumsfaktoren, der eine intrazelluläre Tyrosinkinase besitzt und dessen Aktivität im Normalzustand auf eine Teilmenge embryonaler Zellen der Neuralleiste beschränkt ist. RET wird eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Nervenzellen zugeschrieben, und Veränderungen werden im

Allgemeinen bei endokrinen Tumoren gefunden (Santoro et al., 1992). Dies ist auch bei Schilddrüsentumoren der Fall, wo RET als Ursache für die meistens erblichen medullären Schilddrüsenkarzinome angesehen wird (Mulligan et al., 1993), wobei eine spezifische Mutation auch bei vielen papillären Karzinomen vorliegt.

c-myc kodiert ein Protein, das durch seine Bindung an die DNA Transkription und Differenzierung beeinflusst. Im normalen Zellzyklus vermindert sich die Expression von c-myc immer weiter und wird schließlich vollkommen eingestellt. Geschieht dies nicht, so kann es zu Veränderungen beim Wachstum und der Differenzierung und damit zu Entartung kommen (Eilers et al., 1991, de Nigris et al., 2003).

3.5.5 Gentherapie von Schilddrüsenkarzinomen

Das ständig wachsende Wissen um die molekularen Vorgänge bei der Entstehung von Neoplasien und die Vorgänge in der Zelle an sich haben in letzten Jahren zu neuen Strategien in der Bekämpfung von malignen Tumoren geführt. Dabei sind die Ansatzpunkte Tumorsuppressorgene, Onkogene und Differenzierungsmechanismen.

3.5.5.1 p53 als Angriffspunkt

Da p53 an ca. 50 % aller Neoplasien beteiligt ist, scheint es ein perfekter Angriffspunkt für die Gentherapie zu sein. In der Regel ist p53 sowohl in gutartigen Erkrankungen der Schilddrüse als auch in differenzierten Karzinomen intakt. Das bedeutet, dass die Mutation erst im fortgeschrittenen Stadium der Entartung auftritt, nämlich eben bei dedifferenzierten, mit herkömmlichen Methoden ohnehin schwer behandelbaren Karzinomen (Fagin et al., 1993, Salvatore et al., 1996). Erste Versuche, das mutierte oder fehlende Gen wieder einzuführen, wurden an Zelllinien und Tiermodellen durchgeführt und haben zum Teil vielversprechende Erfolge erbracht (Moretti et al., 2000, Nagayama et al., 2000).

3.5.5.2 Selbstmordgene

Die Strategie ist bei diesem Prinzip sehr einfach. Ein Gen, das ein Enzym kodiert, wird durch einen Vektor (in der Regel ein Virus) in die Zielzelle eingeschleust. Hier wird das vom Gen

kodierte Enzym exprimiert. Dann verabreicht man die Vorstufe eines Chemotherapeutikums, das von oben genanntem Enzym in die aktive, wirksame Form umgewandelt wird und dadurch Zellen, die das Enzym besitzen, zerstört. Ein gewollter Nebeneffekt ist, dass auch umgebende Zellen absterben, weil das Zellgift aus den zerfallenden Zellen auf sie einwirkt. Häufig angewendet wird die Kombination aus Herpes Simplex Typ I Thymidinkinase und Ganciclovir (Nishihara et al., 1997, Patterson et al., 2003).

3.5.5.3 Immuntherapie

Wie schon erwähnt versucht der Körper entartete Zellen zu beseitigen, um das Entstehen von Tumoren zu verhindern. Tumorzellen überleben aber gerade dadurch, dass sie es auf die eine oder andere Weise schaffen, der Immunantwort des Körpers zu entkommen (siehe auch Kapitel 3.4 Apoptose). Interleukin-2 ist ein Wachstumsfaktor für T-Zellen, der sich insbesondere positiv auf die Proliferation von Natürlichen Killerzellen, CD4⁺-Zellen und zytotoxischen T-Zellen auswirkt. Mit ihm wird versucht, eine Immunantwort wiederherzustellen (Zhang et al., 1998).

3.5.5.4 Jodtransporter

Schilddrüsenzellen sind in der Lage, Jod zu akkumulieren, eine Eigenschaft, die sonst keine Zellart des Körpers in diesem Ausmaß besitzt. Das macht eine Radiojodtherapie so spezifisch und effektiv. Verliert die entartete Zelle die Fähigkeit, Jod aufzunehmen, geht dieser Ansatzpunkt verloren. Nachdem es gelungen ist, den Natrium-Jodid-Symporter des Menschen zu klonen, hat man versucht, diesen wieder einzuführen und die Jodaufnahme zu reetablieren. Dieser Ansatz wird nicht nur bei Schilddrüsenzellen verfolgt, sondern auch bei anderen Malignomen. Andere Zellen exprimieren ähnliche Natrium-Symporter, was den Schluss nahe legt, dass diese Zellen in der Lage sind, den Transporter zu replizieren. Als Vektoren werden üblicherweise Adenoviren eingesetzt (Shimura et al., 1997, Mandell et al., 1999, Kakinuma et al., 2003, Spitzweg et al., 2000, Boland et al., 2000).

3.5.5.5 Antisense

In einem weiteren Ansatz wird versucht, die verstärkte Expression von Onkogenen zu blockieren. Hierzu wird so genannte „Antisense-DNA“ verwendet, die die Transkription von Proteinen wie z.B. c-myc, Bcl-2 oder anderen verhindert (Fei et al., 2002).

3.5.5.6 Retinsäure

Unter dem Begriff Retinsäure werden alle biologisch aktiven Metaboliten von Vitamin A zusammengefasst. Verschiedene Studien belegen, dass Retinsäure einen positiven Einfluss auf den Differenzierungsgrad verschiedener Tumorzellen besitzt. So hat sich der Einsatz von Retinsäure bei Schilddrüsentumoren positiv auf Merkmale wie Jodaufnahme, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion, Wachstum, die Expression verschiedener Proteine anhand derer der Differenzierungsgrad gemessen wird, das Tumorstadium und die Fähigkeit von Tumorzellen, neue Tumore zu produzieren, ausgewirkt (Simon et al., 1998, Grunwald et al., 1998, Schmutzler et al., 2000, Kurebayashi et al., 2000, Havekes et al., 2000). Noch eindrucksvoller sind die Erfolge mit Retinsäure bei Promyeloischer Leukämie. Hier kann eine bis zu 90 %ige Remission erzielt werden (Chomienne et al., 1996, Avvisati et al., 2003).

3.6 Der Klinostat

Klinostaten wurden bereits im frühen 17. Jahrhundert, also lange vor den ersten Weltraumflügen, zur Erforschung des Einflusses der Schwerkraft auf das Pflanzenwachstum eingesetzt (Klaus, 2001). Heute gibt es neben den damals verwendeten zweidimensionalen Klinostaten den in dieser Dissertation verwendeten dreidimensionalen Klinostaten (Cogoli 1992). Außerdem wurden noch einige weitere Geräte zur Simulation von Mikrogravität entwickelt, wie zum Beispiel das so genannte „Rotating Wall Vessel“, oder die „Free Fall Machine“.

Zwar kann keine dieser Maschinen alle Aspekte der Mikrogravität nachahmen, doch stimmen die gefundene Effekte mit den Resultaten, die bei Weltraumflügen gewonnen werden, häufig überein. Klinostaten sind heute ein sinnvolles Mittel, um Bodenexperimente durchzuführen (Schwarzenberg et al., 1999, Ayed et al., 1992, Hoson et al., 1997). Natürlich müssen diese Versuche unter realer Schwerelosigkeit im Weltraum geprüft werden.

Die Vorteile dieser Bodenexperimente liegen auf der Hand. Der Klinostat bietet die Möglichkeit der Vorauswahl, die Plattform, um Hypothesen zu testen. Durch ihn werden

aktuell und in absehbarer Zukunft grundlagenorientierte Versuche möglich. Er gilt als so genannte „ground-based facility“.

Natürlich ist es, wie schon erwähnt nicht möglich, alle Parameter der Schwerelosigkeit zu simulieren. Diffusionsverhältnisse, Durchmischung durch Konvektion, hydrostatischer Druck (Albrecht-Buehler, 1992) bleiben auch auf dem Klinostaten unberührt, sprich den „normalen“ Erdbedingungen gleich. Vom Standpunkt der Zelle aus rotiert der Schwerkraftvektor ständig und zwar in allen drei Dimensionen, sodass sich seine Summe über die Zeit eliminiert. Damit wird mindestens ein Aspekt der Schwerkraft, nämlich die Sedimentation, ausgeschaltet.

Der Begriff Mikrogravität statt Schwerelosigkeit ist genau genommen korrekter, da Schwerelosigkeit im engeren Sinne (0g) auch (oder gerade) auf einer Erdumlaufbahn nicht erreicht werden kann, denn auch hier wirken Kräfte, die den Körper auf der Umlaufbahn halten. Um diesen theoretischen Zustand zu erreichen, müsste ein Körper völlig außerhalb jeglicher Gravitationsquelle sein. Was hingegen bei Weltraumflügen erzielt wird, sind ungefähr 10^{-5} g (Albrecht-Buehler, 1992, Klaus, 2001).

Seit längerer Zeit stehen die Effekte von Schwerelosigkeit im Mittelpunkt des Interesses. Es ist allgemein bekannt, dass Weltraumflüge meist nachteilige Effekte auf Organismen haben. Diese rühren oft von den Veränderungen der verschiedenen Zellen einzelner Gewebe und den dadurch entstehenden Veränderungen in deren Stoffwechsel.

Welchen Einflüssen unterliegt die Zelle bei 1 g?

- ? Hydrostatischer Druck
- ? Unterschiedliche „Beschleunigung“ unterschiedlich dichter Organellen
- ? Eigenes Gewicht
- ? Konvektionsströme in der umgebenden Flüssigkeit

Bei 1 g erfährt jede Zelle Kompression aufgrund des hydrostatischen Drucks, was sich auf den Stützapparat der Zellen auswirkt. Fällt diese Kompression weg, wie es bei Mikrogravität der Fall ist, kommt es zu Veränderungen des Zytoskeletts (Vassy et al., 2001, Tabony et al., 2001, Schatten et al., 2001).

Die unterschiedliche Beschleunigung verschieden dichter Organellen wurde vor allem an Pflanzenzellen im Rahmen von Gravitropismusstudien erforscht. Pflanzenzellen enthalten so genannte Statolithen, die dichter sind als der Rest des Zytoplasmas und daher bei 1 g zum „Boden“ der Zelle sedimentieren. Die Zelle kann die Position der Statolithen erfassen und richtet das Wurzelwachstum in Richtung Erdzentrum, was allgemein als Gravitropismus

bezeichnet wird (Kiss, 2000, Sievers, 1991). In allen eukaryotischen Zellen ist der Zellkern etwa 20 % dichter als der Rest der Zelle und kann somit theoretisch als Schwerkraftsensor dienen. Bei Erdbeschleunigung neigt der Kern zum „Boden“ der Zelle zu sinken, wird aber durch das Zytoskelett daran gehindert, auf das somit ein gewisser Zug ausgeübt wird. Auch dies könnte ein Weg für die Zelle sein, Stärke und Ausrichtung des Schwerkraftfeldes zu ermitteln (Todd, 1989).

Außerdem werden Zellen durch ihr eigenes Gewicht und den hydrostatischen Druck auf Oberflächen oder andere Zellen gedrückt. Zelladhäsion unter Bodenbedingungen funktioniert über spezielle Adhäsionsmoleküle (Integrine), die als Zwischenstück zwischen Zytoskelett und Extrazellulärer Matrix fungieren.

Bei 1 g steigen wärmere Flüssigkeiten aufgrund ihrer geringeren Dichte nach oben und kältere nach unten. So entsteht ein Strom, in dem sehr schnell Wärme, Nährstoffe und Abfälle ausgetauscht werden. Dieser Faktor wird dann interessant, wenn keine andere Form von Flüssigkeitsstrom wie z. B. der Blutstrom besteht und nur langsame Diffusionsprozesse den Austausch von Wärme und Nährstoffen gewährleisten (Stout et al., 2001).

Diese physikalischen Faktoren können die Zelle beeinflussen. Es gibt Anzeichen dafür, dass Mikrogravität viele weitere auf diesem Weg nicht erklärbare Auswirkungen hat. So werden z.B. in dieser Arbeit vor allem Apoptose, morphologische Veränderungen und Veränderungen im Zytoskelett untersucht, die nicht direkt mit der Veränderung der physikalischen Faktoren erklärbar sind.

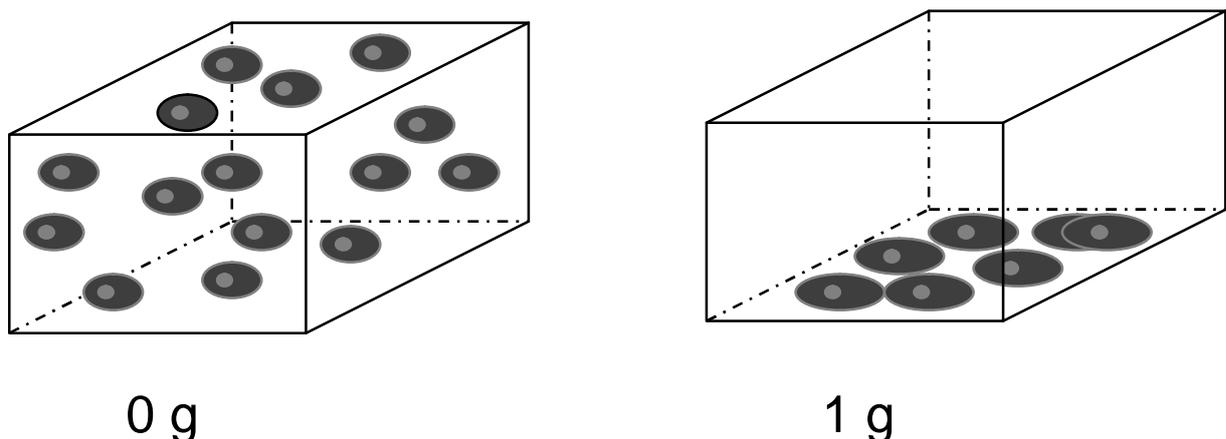


Abb. 4: Modell für das Verhalten von Einzelzellen bei Schwerelosigkeit (0 g) und bei normalen Bedingungen (1 g)