

2 Literaturübersicht

2.1 Bedeutung der thymusaplastischen Maus für die onkologische Forschung

1961 entstanden in Glasgow infolge einer Spontanmutation in einem Albinostamm thymusaplastische, unbehaarte Mäuse. Diese fortan als Nacktmaus bezeichnete Mutante unterliegt einem autosomal-rezessiven Erbgang, wobei Haarlosigkeit und Thymusaplasie untrennbar verbundene Eigenschaften sind (Panterlouris,1968).

Im Laufe der Jahre stellte sich heraus, daß sich diese Nacktmäuse in einem hohen Maße für heterologe Transplantationen eignen, da die

Thymusaplasie besondere immunologische Eigenschaften bedingt. Während die B-Zellen-Population der Lymphozyten normal ist, fehlen reife, funktionelle T-Lymphozyten (Sprenst, 1974). Somit ist die Nacktmaus ein idealer Wirt für heterologe Transplantate, da mit immunologischen Komplikationen nicht zu rechnen ist. Allerdings hat die fehlende T-Lymphozyten-Population ein hohes Maß an Infektionsgefährdung für die Tiere zur Folge. Dies erfordert besondere Haltungsbedingungen, wie spezielle Nahrung, staubfreie Einstreu, Temperaturen von 25°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 65% und eine möglichst keimarme Umgebung in Laminar-Flow-Käfigen sind vonnöten (Fortmeyer, 1981, Fortmeyer und Bastert, 1977).

1971 berichteten Rygaard und Povlsen erstmals über eine erfolgreiche Transplantation eines humanen Kolonkarzinoms in die Nacktmaus (Rygaard und Povlsen, 1971). Weitere Gruppen konnten die verschiedensten humanen Tumoren erfolgreich transplantieren und in Serienpassage überführen (Sordat et al., 1977; Giovanella et al., 1978). Auch in der Zellkultur wachsende Tumorzelllinien führten in der Nacktmaus zur Ausbildung solider Tumoren (Giovanella et al., 1972). Neben den Untersuchungen über das Wachstumsverhalten unterschiedlicher Tumoren in der Nacktmaus war es auch möglich geworden, die Wirkung verschiedener Substanzen auf das Wachstum solcher Tumortransplantate zu beobachten. Povlsen und Rygaard gelang 1974 erstmals die erfolgreiche Behandlung eines in Serienpassage auf der Nacktmaus gehaltenen Burkitt-Lymphoms (Povlsen und Rygaard, 1974). Damit war ein neues präklinisches Testmodell für die Zytostatikaentwicklung eingeführt worden.

2.2 Subkutane Implantation humaner Tumorexografts

Subkutan implantierte humane Tumorexografts stellen, da sie das Verhalten des Tumors im Patienten besonders genau reflektieren, ein besonders kliniknahes Modell zur Testung neuer antitumoral wirksamer Substanzen dar. Übereinstimmungen zwischen subkutan wachsendem Xenotransplantat und dem Spendertumor wurden unter anderem gefunden beim Vergleich der Histologien (Revasova et al., 1992), der Expression von Tumormarkern (Randt, 1984), der Pharmakokinetik (Kubota et al., 1993) und der Chemosensibilität (Duplan, 1984; Berger et al. 1992).

2.3 klinische Testung antitumoral wirksamer Substanzen

Am Beispiel der Arbeitsgruppe Prof. Fiebig soll an dieser Stelle die Vorgehensweise bei der Etablierung eines humanen Tumorexografts sowie der Einsatz der gängigsten Tumormodelle bei der Testung neuer antitumoral wirksamer Substanzen gezeigt werden.

In Abb.1 wird das in der Arbeitsgruppe Prof. Fiebig übliche Verfahren bei der Etablierung eines Xenografts kurz dargestellt.

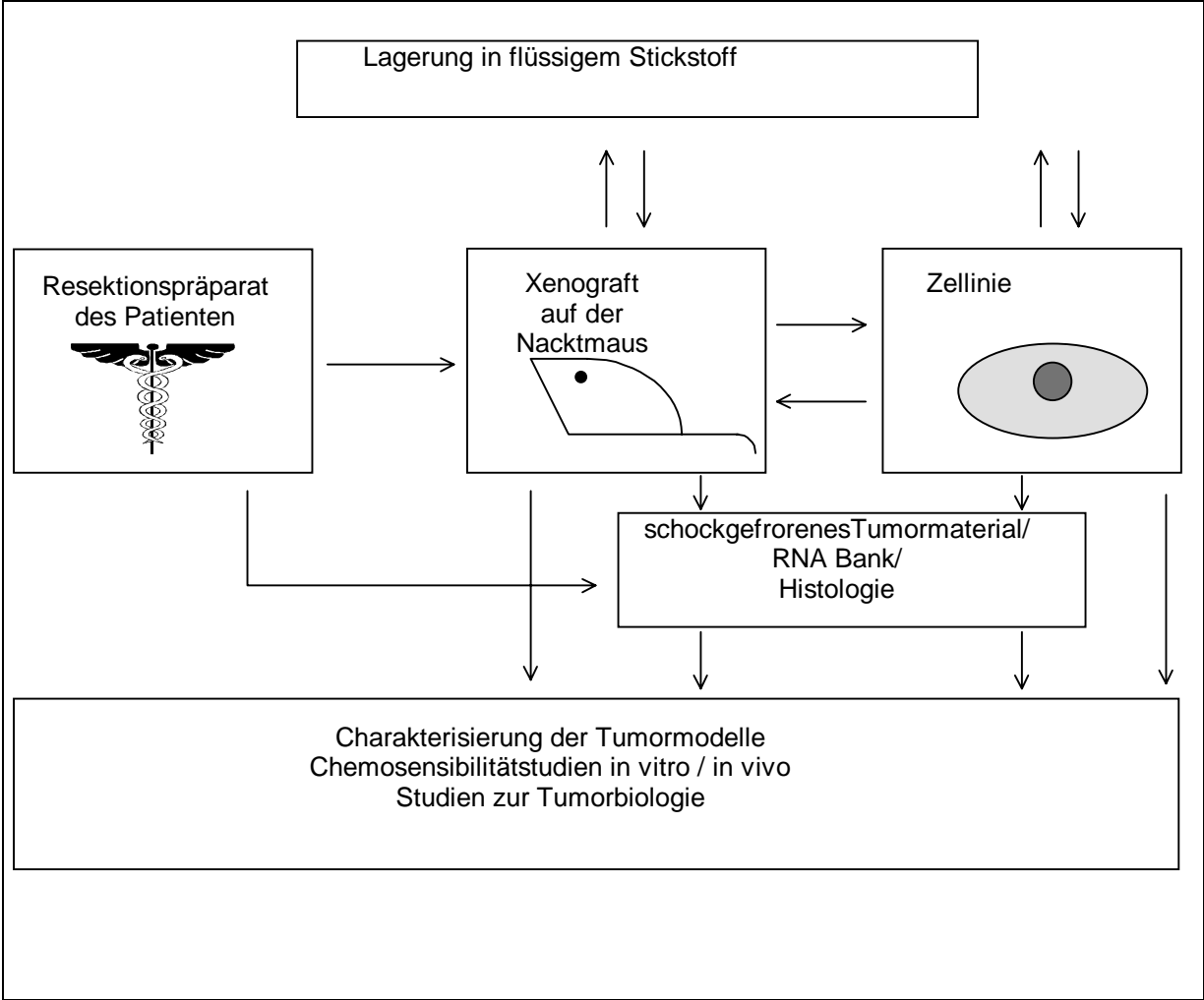


Abb. 1: Verfahrensweise bei der Etablierung eines Xenografts in der Arbeitsgruppe Prof. Fiebig (Berger et al., 1992)

Die Etablierung als Modelltumor umfaßt neben dem regelmäßigen Wachstum auf der Nacktmaus auch die Möglichkeit, Tumorgewebe in flüssigem Stickstoff zu lagern und nach dem Auftauen erneut auf der Nacktmaus wachsen zu lassen.

Darüber hinaus fand eine genaue Charakterisierung der Xenografts statt. Angangsrates, Wachstumsgeschwindigkeit und histologischer Aufbau sind lediglich die Basisdaten eines einzelnen Tumors (Berger et al., 1992). Ausgewählte Tumoren wurden zudem auf Resistenzmechanismen, Chemosensibilität gegenüber Standardzytostatika sowie deren Korrelation mit der Empfindlichkeit des Patiententumors untersucht (Fiebig et al., 1992). Um die Xenografts und Zelllinien eindeutig identifizieren zu können, wurde bei 53 von ihnen ein enzymatisches Profil erstellt, das bei 80% der getesteten Tumoren charakteristisch für den jeweiligen Tumor war (Bender et al., 1992). Zur gezielteren Testung neuer Substanzen wurden mögliche molekulare Angriffspunkte in den Xenografts identifiziert. Die Expression von Faktoren, die z.B. für Angiogenese, Invasion oder Metastasierung verantwortlich sind, wurde bei einer Auswahl von 60 Xenografts bestimmt.

Bei der Untersuchung einer neuen Verbindung auf ihre antitumorale Wirkung wird nach einem 4-stufigen Schema vorgefahren, das die Vor- und Nachteile der einzelnen Modellsysteme berücksichtigt: Zunächst wird die Substanz *in vitro* an einer Auswahl etablierter Tumoren getestet. Dies gewährleistet eine rasche Testung an einer breiten Palette von Tumortypen (primary screening). In diesem Stadium I wird die Substanz an 3 resistenten und 3 sensitiven Tumormodellen in einem modifizierten Tumorkolonie-Assay getestet. In Stadium II erfolgt die Untersuchung an 20 weiteren Tumoren, 6 davon resistent und 14 sensitiv auf Standardzytostatika. Die Ergebnisse der Versuche in der Zellkultur bestimmen den Versuchsablauf *in vivo*: Die zwei empfindlichsten Tumoren aus den Stadien I und II werden in Stadium III, subkutan auf der Nacktmaus wachsend, noch einmal getestet. Mit Hilfe des Tiermodells wird das pharmakologische Verhalten des potentiellen Arzneimittels untersucht. Anhand dieser Daten lassen sich die für die *in vitro*-Testungen relevanten Dosierungen der Testsubstanz ableiten. Kommt es bei den Versuchen in der Nacktmaus zu Wachstumstillstand oder gar Remission des Tumors wird die Entwicklung der Verbindung mit Stadium IV fortgesetzt: Hierbei erfolgt eine breite Testung an 40 bis 60 in der Zellkultur wachsenden Xenografts. Tumormodelle, die in Stadium IV eingesetzt werden, sind in ihrem Chemosensibilitätsprofil der Klinik sehr nahe. Aus den Stadium IV-Daten

lassen sich folglich Tumortypen ermitteln, die für die klinischen Studien aller Voraussicht nach besonders geeignet sind.

Bis dato wurden in der Arbeitsgruppe Prof. Fiebig 6 Xenografts für Stadium I, 20 für Stadium II und III, sowie weitere 60 für die Stadium IV-Testungen ausgewählt (Fiebig et al., 1992).

Um die Aussagekraft der einzelnen Testsysteme besser beurteilen zu können, wurden die einzelnen Xenografts in den unterschiedlichen Modellen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Standardzytostatika hin untersucht.

Die hierfür relevanten Dosierungen wurden zuvor in breit angelegten Dosis-Wirkungs-Studien für jedes Modell ermittelt (Scholz et al., 1990). Folgende Systeme wurden miteinander verglichen:

- Nacktmaus-Modell und Patient
- TCA und Patient
- TCA und Nacktmaus-Modell

Die stärkste Korrelation mit dem Patienten wurde bei den subkutan auf der Nacktmaus wachsenden Xenografts festgestellt. Die korrekte Voraussage für Sensitivität lag bei 90%, diejenige für Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum bei 97%. Die *in vitro/in vivo*-Korrelation betrug für Sensitivität 60% und für Resistenz 90% (Fiebig et al., 1992).

Der subkutan auf der Nacktmaus wachsende Xenograft ist ein Modell, das die Situation in der Klinik besonders gut repräsentiert. Die vorgeschaltete *in vitro*-Testung ermöglicht eine Reduktion der Tierversuche auf das Minimum. Humane Tumorexografts stellen zwar ein kliniknahes Modell dar, sind aber auch kosten-, zeit- und arbeitsintensiv. Sicherlich ist die Vermeidung von Tierversuchen auch unter dem Aspekt des Tierschutzes als positiv zu bewerten.

2.4 Notwendigkeit eines kliniknahen Metastasierungsmodelles

Die Beschäftigung mit dem Metastasenproblem ist ein ständiges Anliegen der Krebsforschung, da durchgreifende Fortschritte in der Therapie der metastatischen Tumorerkrankungen nur ausnahmsweise erreicht worden sind (Schmähl, 1981). In der Bundesrepublik Deutschland stirbt zur Zeit jeder Vierte an einer bösartigen Tumorerkrankung. Damit ist Krebs die zweithäufigste Todesursache nach den Kreislauferkrankungen (Becker und Wahrendorf, 1998). Die Hälfte aller an einer malignen Geschwulst Erkrankten kann heute geheilt werden. Diejenigen, die an diesem Leiden sterben, tun dies überwiegend aufgrund multipler Metastasen, bzw. von Komplikationen, die im Rahmen der Metastasenbehandlung auftraten. Die weitgehende Inkurabilität von Sekundärgeschwulsten liegt in verschiedenen

Tatsachen begründet. Zum einen metastasieren Tumoren recht häufig: 30% aller neudiagnostizierten soliden Tumoren sind bereits metastasiert (Liotta, 1986). Hinzu kommt, daß auch heute noch die Entdeckung einer Metastase ganz entscheidend von ihrer Größe abhängt. Die manchmal schwer zu interpretierenden bildgebenden Verfahren in der Tumordiagnostik reichen für eine Einschätzung des Metastasierungsverhaltens eines Tumors oft nicht aus (Liotta, 1986). Als Folge davon tragen viele Patienten lange unentdeckte Metastasen, die erst dann klinisch auffällig werden, wenn ihre Therapie schwer bis unmöglich geworden ist.

Eine weitere Hürde in der Metastasenbekämpfung ist die Tatsache, daß diese Geschwulste schwer zu therapieren sind: Die chirurgischen Maßnahmen werden meist durch das disseminierte Auftreten und die operativ oft schwer zugängliche Lage beschränkt. Systemische Chemotherapien bringen nicht den erwünschten Erfolg, da die verstreuten Tumorzellpopulationen eine große genetische Heterogenität und Instabilität aufweisen. Zusätzlich beeinflusst die Organumgebung der Geschwulst deren Chemosensitivität erheblich (Fidler et al., 1998).

Für die Klinik können folgende Ziele formuliert werden:

- Das metastastische Potential eines individuellen Tumors muß vorhersagbar werden
- Die Invasion als Vorstufe der Metastasierung muß verhindert werden
- Die sogenannten "stillen" Metastasen müssen detektierbar und heilbar werden (Liotta, 1986).

Um diese Ziele verwirklichen zu können, muß zunächst der Prozess der Metastasierung besser verstanden werden. Eine zentrale Hypothese bezüglich dieser Fragestellung stammt von Paget aus dem Jahre 1889. Nach seiner "seed and soil"-Theorie muß die betroffene Tumorzelle bestimmte Eigenschaften haben, unter anderem die Fähigkeit, sich von ihrem Zellverband zu lösen. Eine Fernmetastase entsteht nur, wenn das Organ, in dem sich die Zellen absiedeln, den richtigen "Boden", sprich das richtige Nährstoffangebot und die für eine Ansiedlung nötigen histologischen Strukturen bietet (Paget, 1889).

Heutzutage betrachtet man den Vorgang der Metastasierung als einen vielstufigen Prozess, der nur dann zur Bildung einer sekundären Geschwulst führt, wenn alle Einzelschritte von der Tumorzelle durchlaufen werden (Hoffman, 1994). Diejenigen entarteten Zellen, die letztlich Metastasen bilden, stellen eine stark selektierte Subpopulation dar, die sich bezüglich Karyotyp, Wachstumsrate, Chemosensibilität, genetischen, immunologischen und vielen anderen Eigenschaften sowohl vom

Primärtumor als auch untereinander stark unterscheiden (Fidler und Hart, 1982). In Abb.2 ist die Pathogenese der Metastasierung dargestellt:

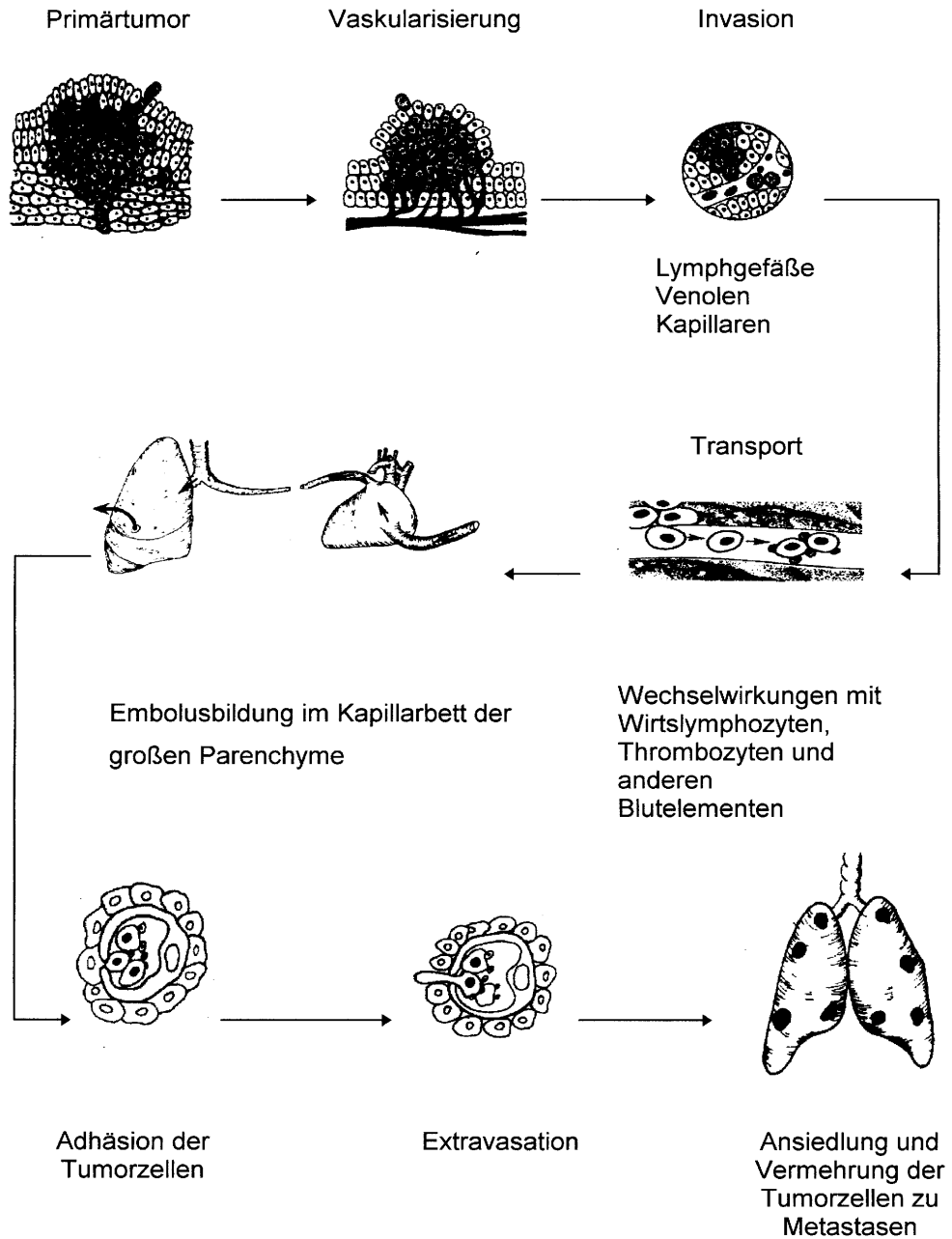


Abb.2: Pathogenese der Metastasierung nach Poste & Fidler, 1980

Viele Einzelaspekte der Metastasierung sind im Laufe der Jahre beleuchtet worden. Unter anderem wurde die Frage untersucht, inwieweit der Prozess der Metastasierung genetischen Steuermechanismen unterliegt. Analog zu den Onko- bzw. Tumorsuppressorgenen, wurden Gene identifiziert, die eine Metastasierung begünstigen oder verhindern (Sobel, 1990). Die Entwicklung sekundärer Geschwulste muß aber immer auch als Ergebnis der Wechselwirkungen zwischen Wirt und Tumorzelle betrachtet werden. Wie stark diese Wechselbeziehungen sich auf das Wachstum der Tumorzellen auswirken, differiert sowohl zwischen den einzelnen Tumortypen als auch innerhalb eines Tumortyps von Patient zu Patient (Fidler et al., 1998).

Ein weiterer klinisch relevanter Aspekt ist die Frage nach dem Metastasierungsort. Diese wurde hauptsächlich mit Hilfe statistischer Studien beantwortet, wobei noch einmal auf die Unzulänglichkeit der diagnostischen Möglichkeiten in der Klinik hingewiesen sei. Nichtsdestoweniger wurde dabei deutlich, daß die Lokalisation sekundärer Geschwulste vor allem von der Histologie und dem Entstehungsort des Ursprungstumors abhängt. Zumeist entwickeln sich Metastasen im ersten Kapillarbett, das dem Primärtumor nachgeschaltet ist. Es besteht auch die Möglichkeit des direkten Einbruches in die nächstgelegene Körperhöhle oder die Wanderung entlang von benachbarten Nervenbahnen oder Faszien. In einigen Fällen lassen sich Metastasen aber nicht anatomisch erklären. Für dieses Phänomen gibt es unterschiedliche Erklärungen:

- Die zirkulierenden Tumorzellen haften nur an Endothelzellen mit einem bestimmten Oberflächenmuster
- Die zirkulierenden Tumorzellen werden durch Chemotaxis in das Zielorgan geleitet
- Die Tumorzellen verteilen sich in allen Organen, finden aber nur in ganz bestimmten Bereichen die Bedingungen vor, die sie zur Ansiedlung und Vermehrung benötigen (Liotta, 1986).

Um solche Theorien und andere ungeklärte Teilaspekte der Metastasenbildung untersuchen zu können, reichen Statistiken aus der Klinik nicht aus. Es besteht die Notwendigkeit, reproduzierbarer Modelle zu finden, die den Metastasierungs Vorgang bzw. Einzelschritte davon so exakt wie möglich simulieren. Die Ergebnisse, die sich aus den Studien an solchen Modellen ergeben, tragen zur Aufklärung des Gesamtproblems bei und liefern wertvolle Hinweise für die Behandlung der betroffenen Patienten. Bis dato wurden zahlreiche Metastasierungsmodelle sowohl *in vitro* als auch *in vivo* entwickelt.

In der Zellkultur wurden vor allem Einzelaspekte untersucht, die für die Ausbildung sekundärer Geschwulste unerlässlich sind. Tumorzellpopulationen wurden unter anderem auf ihre Motilität, Invasivität und Adhärenz hin getestet (Schwartz et al., 1990). Es gilt dabei stets zu beachten, daß künstliche Basalmembranen oder die Adhärenz an beschichteten Objektträgern die Situation im Wirtsorganismus nicht vollständig nachempfinden können. Eine weitere Möglichkeit, ohne Einsatz von Tierversuchen Aufschluss über das Metastasierungspotential bestimmter Tumoren zu erlangen, ist deren Untersuchung auf den Gehalt an Enzymen und Oberflächenmarkern, die in den Prozess der Metastasierung eingebunden sind. Hierbei besteht einerseits die Möglichkeit, Patientenmaterial zu untersuchen, um eine individuelle Prognose machen zu können. Zum anderen können Reihenuntersuchungen an Xenografts und/oder Patientengewebe Aufschluss darüber geben, ob sich in der Expression solcher Metastasierungsmarker bestimmte Muster für die einzelnen Tumorklassen erkennen lassen.

Im Tierexperiment stehen ebenfalls verschiedene Metastasierungsmodelle zur Verfügung. Bei den ersten Modellen handelte es sich um transplantable Tumoren, die spontan in einem Tierstamm entstanden sind. Im syngenem Wirt bilden sie Metastasen, vorzugsweise in der Lunge, unabhängig davon, ob sie subkutan, intramuskulär oder intravenös verimpft werden. Als Weiterentwicklung dieses Modells wurde z.B. aus dem Mausmelanom B16 durch Weiterpassage der Lungenmetastasen eine Subpopulation B16-F10 entwickelt, deren Metastasierungsfähigkeit die der Ursprungszelllinie weit überschreitet (Fidler und Hart, 1982).

2.5 Orthotope Implantation humaner Tumorxenografts

Hofmann beschrieb die Implantation von Tumorfragmenten humanen Ursprungs in das Organ der Nacktmaus, in dem der Tumor beim Patienten einmal entstanden war (Hofmann, 1994). Die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, sowie die Anordnung der Zellen zueinander entspricht nur im Ursprungsorgan des Tumors genau den Bedürfnissen der entarteten Zellen (Fidler, 1990). Die orthotop implantierten Tumoren metastasieren in der Regel, wobei Metastasierungsmuster und -häufigkeit denen des Patienten gleichen (Kiguchi et al., 1998). Nach orthotoper Implantation durchläuft der humane Xenograft die gesamte Metastasierungskaskade vom Wachstum des Primärtumors bis zur Ansiedlung und Vermehrung der abgeschilferten Tumorzellen. Damit bietet er anderen Modellen gegenüber, die zumeist nur

Teilaspekte dieses Vorganges beleuchten, einen klaren Vorteil (Kubota, 1994).