

2 Literaturübersicht

2.1 Entstehung von Tumoren

Der Tumor ist eine allgemeine Bezeichnung für jede bösartige Neubildung von Zellen, die durch unkontrolliertes Wachstum (Proliferation) und zerstörendes Eindringen in umliegendes Gewebe gekennzeichnet ist. Die Ursachen hierfür sind erhöhte Zellteilungsraten oder eine Störung der Zellreifung. Hierbei versagen körpereigene, regulierende Systeme, die unter physiologischen Bedingungen normalerweise Zellteilung, Zell-, Gewebedifferenzierung und -regeneration aufeinander abstimmen. Infolgedessen kommt es zu einer unkontrollierten Zellproliferation und es entstehen Primärtumore, in die Blutgefäße einspießen, die für die Ernährung des Tumorgewebes sorgen (Folkman, 1996). Einzelne Tumorzellen können sich ablösen, über die Blutgefäße oder Lymphe in andere Organe gelangen und dort als Tochtergeschwülste (Metastasen) weiterwachsen. Fast jedes Gewebe des menschlichen Körpers kann entarten. In der Regel geht diese Veränderung von einer einzigen Zelle aus. Man unterscheidet zwei große Gruppen bösartiger Neubildungen: die soliden, harten Tumore und die bösartigen Erkrankungen des blutbildenden Systems (Hämatoblastosen) wie z.B. Leukämien. Tumore werden entsprechend ihres Ausgangsgewebes klassifiziert. Man unterscheidet zwischen Karzinomen, die aus Deck- oder Epithelzellen entstammen und Sarkomen, die aus Binde- oder Stützgewebe hervorgehen (Wittekind et al., 1997). Die häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland sind beim Mann Prostatakarzinom, Lungenkarzinom und Kolonkarzinom, bei der Frau sind es Brustkarzinom, Lungenkarzinom und Kolonkarzinom.

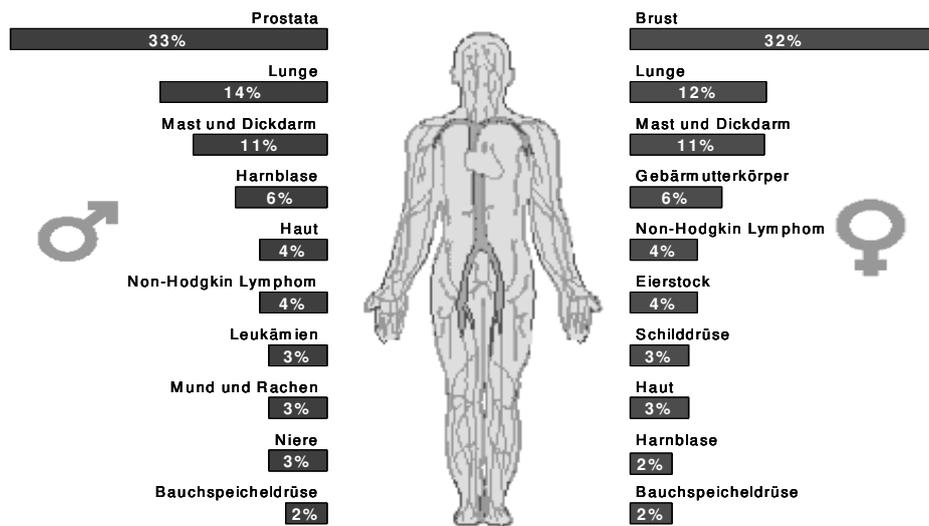


Abbildung 1: Neuerkrankungen: Prozentuale Anteile der häufigsten Tumorformen an der Gesamtzahl 2003 in den USA © 2003, American Cancer Society, Inc., Surveillance Research

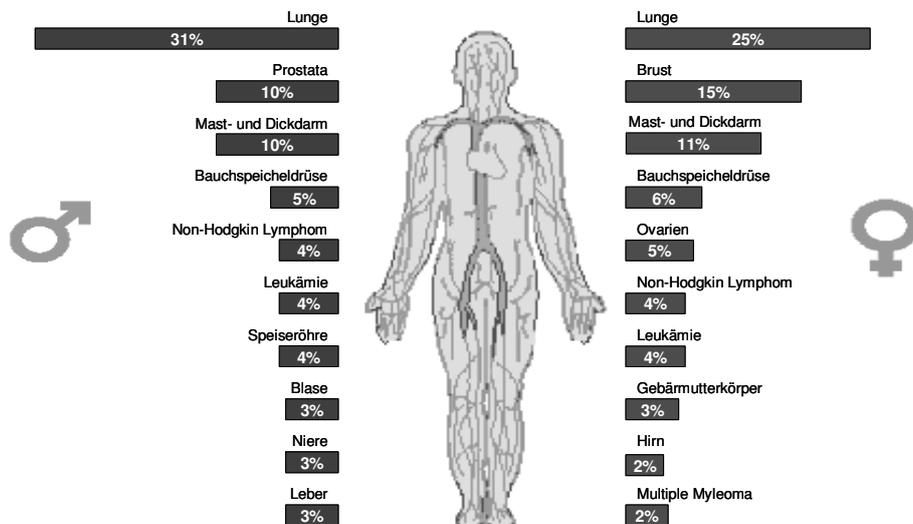


Abbildung 2: Todesfälle: Prozentuale Anteile der häufigsten Tumorformen an der Gesamtzahl 2003 in den USA © 2003, American Cancer Society, Inc., Surveillance Research

In unterschiedlichen Ländern lassen sich verschiedene Häufungen von Tumorerkrankungen erkennen. Dies hängt mit dem Vorhandensein spezifischer Risikofaktoren (z.B. Ernährung, Umwelt, Lebensweise, hygienische Standards), sowie mit der erblichen

Disposition in der jeweiligen Region zusammen. Die aktuellste Krebsstatistik (Abbildung 1 und 2) bezieht sich auf Amerika. Wichtig ist, dass die Zahl der Neuerkrankungen nicht mit der Zahl der Todesfälle gleich zu setzen ist, dies spiegeln auch europäische Krebsstatistiken wider. Hier spielt sicherlich der Zeitpunkt der Diagnose eine bedeutende Rolle, aber ein entscheidender Punkt ist die richtige Therapie für den entsprechenden Tumortyp.

Jeder Tumor geht auf eine einzelne Zelle zurück, die durch Summation spezifischer Mechanismen zur Tumorzelle geworden ist und sich danach stark vermehrt hat. Zwei wesentliche Veränderungen zeichnen jede Tumorzelle aus (Wagner, G. und Hermanek, P.):

- a) Eine Tumorzelle verliert ihre Eigenschaft, im Ruhezustand zu bleiben. Sie beginnt, sich unaufhörlich zu teilen. Während gesunde Zellen aller Säugetiere sich im Laufe des Lebens maximal ca. 50- bis 60-mal teilen können, wird eine Tumorzelle unsterblich, d.h. "immortalisiert". Je "aggressiver" ein Tumor ist, desto schneller teilen sich seine Zellen. In manchen Tumoren brauchen sie nur wenige Stunden, in anderen Tage, Wochen oder gar Monate, um sich einmal zu teilen.
- b) Eine Tumorzelle verändert ihre Eigenschaften derart, dass sie sich aus ihrem normalen Verband herauslöst und in das umgebende Gewebe auswandert. Sie kann durch die Lymphbahnen oder Blutgefäße ausgeschwemmt werden und an anderen Stellen Metastasen bilden. Eine solche veränderte Zelle, die in der Lage ist, aus ihrem Zellverband auszubrechen, bezeichnet man als transformierte Zelle. Viele ihrer biochemischen Eigenschaften haben sich geändert, so dass sie sich von einer gesunden Zelle stark unterscheidet.

Wie oben erwähnt, ist der Verlust ihrer Teilungs- und Differenzierungskontrolle eine wesentliche Eigenschaft von Tumorzellen in einem Organismus. All diese Eigenschaften werden durch die auf den Chromosomen der Zellen befindlichen Gene kontrolliert. Diese Gene können durch Mutationen verändert werden, die die wünschenswerten Funktionen der Gene zerstören.

Mindestens zwei Kategorien von Genen sind heute bekannt, die bei der malignen Transformation der Zelle eine wichtige Rolle spielen: *Proto-Onkogene* und *Suppressorgene*.

Die normale Funktion der wachstumsfördernden Gene besteht darin, eine Zelle anzuregen, aus dem Ruhezustand in die Wachstums- oder Teilungsphase einzutreten. In einem normalen Gewebe sind die meisten Zellen im Ruhezustand. Die genannten wachstumsfördernden Gene sind hier also inaktiv (Vogelstein and Kinzler 1998). Sie werden aktiv, wenn absterbende Zellen ersetzt oder Wunden geschlossen werden müssen oder wenn sich das Gewebe vergrößern muss, wie z.B. das Gewebe der Brustdrüsen während des monatlichen Zykluses oder in der Schwangerschaft.

Die zweite Gruppe von Genen hat eine gegenteilige Funktion. Ihre Aufgabe besteht darin, das Wachstum im Normalfall zu verhindern. Sie sind also im Ruhezustand der Zelle aktiv, sie sind die "Bremsen" des Wachstums. Zu den *Suppressorgenen* werden folgende Gene gerechnet: Regulatorgene, die die Expression anderer Gene kontrollieren, DNA Reparaturgene, deren Produkte in der Lage sind, DNA-Schäden zu reparieren, Gene, deren Produkte Zellkontakte vermitteln und damit das korrekte Verhalten der Zelle im Rahmen der Gewebearchitektur sichern und Gene, deren Produkte für den Empfang und intrazellulären Transport von proliferationshemmenden Signalen verantwortlich sind.

Da Störungen in den beiden genannten Gengruppen zu einem Wachstumsstimulus führen können, sind beide in der Lage, bei der Tumorbildung entscheidend mitzuwirken.

Proto-Onkogene sind also keine fremden, unerwünschten „Eindringlinge“ der Zelle, sondern normale, lebenswichtige Gene der Zelle. Sie spielen eine essentielle Rolle zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase. Ihre Expression ist entwicklungs- und gewebespezifisch und für die normale Entwicklung einer Zelle notwendig.

Onkogene entstehen durch Veränderung von *Proto-Onkogenen* z.B. durch Punktmutation, Translokation, Amplifikation aufgrund chemischer, physikalischer oder viraler Einflüsse, die eine wichtige Rolle bei der physiologischen Regulation des Zellzyklus (Proliferation) und der Differenzierung der Zelle spielen. Jegliche Veränderungen in den *Proto-Onkogenen* können somit fatale Folgen für die Zelle haben. Fundamentale Zellprozesse (wie z.B. Differenzierungsvorgänge) können irreversibel gestört werden und ursächlich mit einer Tumorgenese einhergehen (Bast et al. 2003).

Die heute bekannten, mehr als 50 Protoonkogene können aufgrund der Funktion der Produkte, für die sie kodieren, eingeteilt werden (Heim, S. and Mitelman, F.):

- 1) Wachstumsfaktoren,
- 2) Wachstumsfaktor-Rezeptoren,
- 3) G-Proteine,

- 4) Nichtrezeptor-Proteinkinasen (Tyrosinkinase, Serin-/Threoninkinase)
- 5) nukleäre Proteine, Transkriptionsfaktoren,
- 6) tumorspezifische Chromosomenrearrangements, virale Onkogene.

Ein Tumor entsteht demzufolge, wenn diese Onkogene in ihrer normalen Funktion gestört werden. Da aber immer mehrere Funktionen der Zellen verändert werden müssen, bevor sich ein bösartiger Tumor entwickeln kann, sind auch immer mehrere Onkogene beteiligt, die die Immortalisierung der Zelle bzw. ihre Transformation verursachen. Meist sind in einem Tumor mindestens ein Tumor-Suppressorgen mutiert und ein oder mehrere dominante Onkogene durch Mutation unumkehrbar aktiviert.

Konsequenterweise verlieren derart immortalisierte Zellen ihre natürliche Kontaktinhibition zur nächsten Zelle und teilen sich infolge dessen ungehindert weiter. Durch Entstehung eines Primärgeschwulst verlieren die Zellen ihre charakteristische Struktur bis hin zur Aufhebung der Besonderheiten der Mutterzelle, wie z.B. Zellkernveränderungen und Differenzierungsverlust bis hin zur Aplasie. In sehr schnell wachsenden Tumoren finden sich vermehrt Zellen in mitotischen Zellteilungen. In weiteren Stadien kommt es zudem zum Einwachsen in die Umgebung, später auch über die Organgrenzen hinaus (Invasion), dann zur Zerstörung des gesunden Organgewebes (Destruktion) und nach Ablösung einzelner wuchernder Zellen aus dem Verband zur Bildung von Metastasen. Durch hohen Energieverbrauch und vermehrte Abgabe von Stoffwechselschlacken kommt es zur körperlichen Auszehrung (Kachexie). Das raumfordernde und gefäßzerstörende Wachstum führt zu Kompression und Verschluss von Hohlorganen. Auftreten können Blutungen durch Schädigungen größerer Gefäße oder Spontanbrüche bei Knochenzerstörungen.

Tumorzellen vermehren sich also unbegrenzt und unabhängig, da sie aufgrund von Genmutationen sowohl den oben genannten Kontrollsignalen als auch dem programmierten Zelltod (Apoptose) entgehen können. Der programmierte Zelltod ist ein lebenswichtiger Mechanismus für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines vielzelligen Organismus. Nur wenn die Neubildung und Eliminierung der Zellen im Gleichgewicht stehen, bleibt der Organismus gesund. Gerät dieses Gleichgewicht außer Kontrolle, sind krankhafte Erscheinungen die Folge.

2.2 Apoptose und Nekrose

Apoptose ist eine Art des Zelltods, die unter physiologischen und unter nicht-physiologischen Bedingungen ausgelöst werden kann und unweigerlich zum Absterben der betroffenen Zelle führt. Unter physiologischen Bedingungen tritt sie bei normaler Zellerneuerung im Gewebe, der Entstehung des Nervensystems und auch während der Induktion und Aufrechterhaltung der Immunhomöostase auf (Dent et al. 1990; Steller 1995). Die physiologischen Auslöser (durch veränderte Genexpression, Hormon- bzw. Proteinschwankungen oder Wachstumsfaktoren) binden entweder an Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Adenosin-Rezeptoren, TNF- Rezeptoren, CD95-Rezeptoren), an zytoplasmatischen Rezeptoren (Glucocorticoide), oder aktivieren direkt intrazelluläre Enzyme (z.B. Granzym B). Die „unphysiologischen“ Auslöser (Toxine, Chemotherapeutika, DNA-modifizierende Enzyme) umgehen die Rezeptorbindung und aktivieren intrazellulär den Zelltod über Induzierung der Signalwege, indem sie entweder den Kalzium-Spiegel erhöhen oder Proteinkinasen aktivieren (Boobis et al., 1989; Kischkel et al., 1995; White, 1996; Schwartzmann and Cidlowski, 1993). Morphologisch sind apoptotische Zellen an einem Schrumpfen der Zelle und der Kondensierung und Zerlegung des Chromatins in oligonukleosomale Fragmente zu erkennen. Desweiteren kommt es zu Abschnürung der Membran und im späteren Verlauf zur Bildung von apoptotischen Körperchen, die zytoplasmatische Bestandteile und kondensierte Chromatinfragmente enthalten (Kerr et al., 1972).

Grundsätzlich kann die Apoptose über zwei Wege ausgelöst werden. Entweder über den „Todesrezeptor“ an der Zelloberfläche (äußerer Signalweg) oder intrinsisch über die Mitochondrien (innerer Signalweg). In beiden Wegen werden Initiator-Caspasen aktiviert. Der äußere Signalweg läuft über die Caspase 8 bzw. 10. Der innere Signalweg läuft über die Pro-Caspase 9, Apaf-1 und Cytochrom C, die einen als Apoptosom bezeichneten Holoenzymkomplex bilden, wodurch die Pro-Caspase 9 aktiviert wird. Diese Caspasen (8, 10 und 9) aktivieren die Effektor-Caspasen (3, 6 und 7), die wiederum durch Prozessierung spezifischer Substrate die Zelle zum Absterben führen. Zwischen diesen beiden Signalwegen gibt es eine Verbindung. In dem die Caspase 8, Bid (BH3- interacting domain) spaltet ein Protein, das zur Bcl-2 Familie gehört, wird der mitochondrialen Signalweg ausgelöst und es kommt zur Signalverstärkung (Igney and Krammer, 2002).

Bei einer weiteren Form des Zelltods, der Nekrose kommt es im Gegensatz zur Apoptose zum Anschwellen und Aufreißen der Zelle, wodurch zytoplasmatische Bestandteile ins Gewebe abgegeben werden. Dies führt zu Entzündungen und einer

enormen Beeinträchtigung des Gewebes. Eine Nekrose tritt auf, wenn Zellen extremen physikalischen und/ oder chemischen Änderungen des Milieus ausgesetzt werden (z.B. Hyperthermie, Hypoxie).

Apoptose und Nekrose unterscheiden sich auch dadurch, dass für die Apoptose Energie in Form von ATP benötigt wird. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass es auch alternative und Mischformen des programmierten Zelltods gibt, die z. B. Merkmale beider Zelltodformen aufweisen (Leist and Nicotera 1997; Leist et al. 2001).

2.3 Behandlung von Tumorerkrankungen

2.3.1 Chemotherapie

Die Chemotherapie ist neben Operation und Bestrahlung das Hauptverfahren bei der Behandlung von Tumorerkrankungen. Grundsätzlich versteht man unter Chemotherapie die medikamentöse Behandlung mit verschiedenen chemischen Substanzen, die schädigend auf Tumorzellen einwirken.

Die in der Chemotherapie eingesetzten Präparate heißen Zytostatika. Es handelt sich hierbei um eine Reihe von pflanzlichen und/oder chemisch hergestellten Substanzen, die eine hemmende Wirkung auf die Zellteilung haben. Sie können verschiedene Zellen durch eine Beeinflussung ihres Stoffwechsels zerstören und deren Vermehrung verhindern bzw. erheblich verzögern. Die Wirksamkeit beschränkt sich dadurch auf proliferierende, also sich teilende Zellen. Zellen in der Ruhephase werden nicht angegriffen. Je schneller sich Zellen teilen können, desto stärker ist die Zytostatikawirkung. Je nach Tumorart und Ausbreitung wird entweder eine Monotherapie mit einer einzigen Substanz oder eine Kombination mehrerer Zytostatika gegeben. Durch die Kombination mehrerer Zytostatika, die unterschiedliche Angriffspunkte im Verlauf des Zellzyklus haben, wird die Effektivität erhöht. Zusätzlich versucht man, den Teilungsvorgang der Tumorzellen zu synchronisieren. Wenn sich alle Tumorzellen in Proliferation befinden, können in dieser Phase, die verabreichten Zytostatika besonders gut angreifen (Roth, H.J. und Fenner, H.).

Angriffspunkte der Zytostatika sind vor allem die DNA-Replikation oder -Transkription und die Hemmung der dabei beteiligten Zellorganellen, wie der Aufbau des Spindelapparats, der bei der Zellteilung die Verlagerung der Chromosomen in die jeweiligen Zentren der beiden neu entstehenden Zellen bewirkt.

Das Wachstum mancher Tumorformen steht direkt unter dem Einfluss von Hormonen. Gelingt es, die Hormonzufuhr zu unterbinden, kann man in einigen Fällen einen

Rückgang der Tumorbildung erzielen. Voraussetzung für eine Hormontherapie von Tumoren ist die Expression des entsprechenden Hormonrezeptors. Das heißt, die Entdifferenzierung der Krebszellen darf noch nicht so weit fortgeschritten sein, dass sie die Expression des Hormonrezeptors bereits verloren haben. Hormonrezeptornegative Tumore sind daher bösartiger als hormonrezeptorpositive und sind einer Hormonbehandlung nicht mehr zugänglich.

Heutzutage gibt es weit über 30 verschiedene Zytostatika. Sie gehören zu unterschiedlichen Substanzklassen und haben verschiedene Wirkweisen. Nach dem jeweiligen Angriffspunkt bzw. Wirkmechanismus werden die Zytostatika in folgende Hauptgruppen eingeteilt:

1. Alkylanzien

Synthetisch hergestellte Alkylanzien stören das normale Bindungsverhalten der Nukleotidbasen, aus denen die DNA aufgebaut ist. Dabei übertragen sie eine Alkylgruppe auf Guanin in der DNA. Dies hat zur Folge, dass sich Guanin nicht mehr mit Cytosin paaren kann. Es kann zu abnormen Basenpaarungen, Brüchen der DNA-Helix und Vernetzung von DNA-Strängen, eine Art "Verkleben" kommen. In der Folge kann die Erbinformation nicht mehr repliziert werden. Die Zelle teilt sich nicht mehr und stirbt ab. In diese Substanzgruppe gehören z.B. Cisplatin, Cyclophosphamid, Dacarbazin und Nitrosoharnstoffverbindungen (Bast *et al.*, 2003).

2. Antimetabolite

Synthetische Antimetabolite haben große Ähnlichkeit mit körpereigenen Stoffen. Daher werde diese anstelle der körpereigenen Bausteine eingebaut. Die produzierten Stoffe können in weiteren Stoffwechselprozessen nicht umgesetzt werden. Vertreter dieser Gruppe sind einerseits Substanzen wie die Folsäureantagonisten (z.B. Methotrexat), die durch die Hemmung bestimmter Enzyme (Dihydrofolatreduktase, DNS-Polymerase) die Bildung neuer Nukleinsäuren und damit neuer Erbsubstanz verhindern (Koubenec, 2000).

Andere Substanzen dieser Gruppe sind die Pyrimidinanaloga (z.B. Fourouracil, ARA C = Cytosin-Arabinosid) und Purinanaloga (z.B. Thioguanin, Azathioprin, Mercaptopurin). Diese können als falsches Molekül in die neu gebildeten Nukleinsäuren mit eingebaut werden, da sie den eigentlichen Purin- und Pyrimidinbasen, aus denen sich die DNA zusammensetzt, strukturell ähneln.

3. Mitosehemstoffe / Pflanzliche Zytostatika

In diese Gruppe gehören die Vinca-Alkaloide (*Vincristin*, *Vinblastin*), die aus dem Madagaskar-Immergrün (*Vinca rosea* / *Catharanthus roseus*) hergestellt werden. Sie inhibieren die Zellen bei der Zellteilung, indem sie durch die Bindung an Tubulin den Aufbau des Spindelapparats verhindern und zudem verschiedene wachstumsfördernde Vorgänge in der Zelle hemmen. Ebenfalls auf den Spindelapparat wirkt das Paclitaxel, welches aus der Eibe (*Taxus brevifolia*) hergestellt wird und zur Bildung abnormer Mikrotubuli führt.

Weitere Vertreter dieser Gruppe sind die Epipodophyllotoxine (Etoposid, Teniposid), welche aus Podophyllotoxin hergestellt werden, einem Mitosehemstoff aus den Wurzeln der immergrünen Pflanze *Podophyllum peltatum*. Das Etoposid ist selbst kein Mitosehemmer, vielmehr hemmt es ein Enzym (Topoisomerase III), welches bei der Replikation der DNA beteiligt ist. Durch die Blockierung dieses Enzyms kommt es zu irreparablen Brüchen im DNA-Strang und infolge dessen zur Verhinderung der Zellteilung und zum Zelltod. Darüber hinaus kann die Gabe dieser Substanzen zur Bildung zellschädigender freier Radikale führen (Yang et al 1985).

Die Camptothecine (Topotecan, Irinotecan) werden aus der Muttersubstanz, dem natürlichen Alkaloid Camptothecin, hergestellt, welches in der Rinde, den Wurzeln und den Früchten des asiatischen Baums *Camptotheca acuminata* vorkommt. Sie wirken prinzipiell wie die Epipodophyllotoxine. Ihr Angriffspunkt ist die Topoisomerase I, die ebenfalls für eine korrekte DNA-Topologie verantwortlich ist (Bast et al 2000).

4. Antibiotika

Antibiotika sind ursprünglich natürliche Stoffwechselprodukte von Kleinstorganismen wie Pilzen, Bakterien, Algen und höheren Pflanzen. Diese Stoffwechselprodukte und ihre synthetischen Nachbildungen werden aufgrund ihrer wachstumshemmenden und zellschädigenden Wirkung auf verschiedene Krankheitserreger häufig zur Behandlung von Infektionskrankheiten eingesetzt. Einige wirken aber so stark zytostatisch, dass sie auch im Rahmen der Chemotherapie verwendet werden.

Einige dieser Substanzen hemmen die Neubildung von RNA und DNA, indem sie die Transkription und Replikation durch Bindung an die Doppelhelix oder durch Beeinflussung der Enzyme (RNA-Polymerase bzw. Transkriptase, Topomerase) behindern. Zusätzlich kann es zu Brüchen der Doppelhelix kommen. Darüber hinaus führt die Gabe dieser Substanzen zur Bildung zellschädigender freier Radikale bei gleichzeitiger Hemmung von Reparaturmechanismen. Vertreter dieser Gruppe sind z.B. Actinomycin D, Bleomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Idarubicin und Mitomycin.

5. Enzyme

In der Chemotherapie kommt die sog. Asparaginase (auch: L-Asparaginamidohydrolase) zum Einsatz, welche von verschiedenen Bakterien produziert und unter physiologischen Bedingungen während der Zellteilung für die Produktion neuer Proteine benötigt wird. Einige Krebszellen, vor allem bei Leukämien und manchen Lymphomen, können selbst nicht genügend Asparagin bilden, einen Baustein, der für sie überlebensnotwendig ist. Der notwendige Asparagin-Nachschub aus dem Blut kann durch Gabe von Asparaginase vermindert werden, welche das vorhandene Asparagin in Asparaginsäure und Ammoniak zerlegt (Amylon et al 1999).

6. Hormontherapeutika

Für hormonsensible Tumore ist der Einsatz von Hormonen und Antihormonen geeignet. Hierzu gehören Östrogene (z.B. Polyestradiol), Antiöstrogene (z.B. Tamoxifen), Gestagene (z.B. Medroxyprogesteron, Megestrol, Hydroxyprogesteron), Androgene (z.B. Testolacton), Antiandrogene (z.B. Flutamid) sowie GnRH (GonadotropinReleasingHormone)-Agonisten (z.B. Leuprorelin), welche zentral die Produktion von Sexualhormonen in den Keimdrüsen reduzieren ("chemische Kastration"). Zu den eingesetzten Hormonen gehören auch die Glukokortikoide (z.B. Prednison, Methylprednison, Dexametason), die neben einer entzündungshemmenden und antiödematösen Wirkung die Zahl der zirkulierenden Leukozyten durch Umverteilung und Stimulation des natürlichen Zelltodes reduziert.

Durch eine Kombination verschiedener Zytostatika mit unterschiedlichen Angriffspunkten (Polychemotherapie) und durch eine fortlaufende Therapieplanung kann bei Dosisreduktion der Einzelsubstanzen insgesamt eine Steigerung der Wirkung bei gleichzeitiger Reduzierung der Nebenwirkungen erreicht werden.

2.3.2 Nebenwirkungen und Resistenzen

Zytostatika schädigen neben den Tumorzellen stets auch normale Zellen. Sie besitzen eine relative Spezifität, indem Tumorzellen stärker geschädigt werden als das gesunde Gewebe. Abgesehen von einer möglichen, aber seltenen sehr akuten allergischen Reaktion erklären sich die Nebenwirkungen einer Chemotherapie weitgehend durch ihre zellschädigende Wirkung auf Gewebe mit raschem Zellumsatz: Blutbildendes

Knochenmark, lymphatisches Gewebe, Schleimhaut des Verdauungstraktes, Keimdrüsen, Haut und Hautanhangsgebilde.

Die Zytostatika wirken somit nicht nur auf die entarteten Zellen, sondern schädigen auch den gesunden Organismus und es kommt zu gefährlichen bis lebensbedrohlichen immunsuppressiven Auswirkungen auf den gesamten Körper. Diese Form der Therapie schwächt den ohnehin schon ausgezehrtten, kranken Patient häufig so stark, dass eine Chemotherapie bei fortgeschrittener Erkrankung oft in Frage gestellt wird.

Zusätzlich zu diesen Nebenwirkungen stellt die Entwicklung von Resistenzen ein großes Problem der Chemotherapie dar. Als Hauptresistenzen sind hier die Apoptose-Resistenz (Johnstone et al., 2002) und die „Multi Drug Resistance“ (MDR) zu nennen. Erstere kann beispielsweise auf einer Überexpression anti-apoptotischer Moleküle der Bcl-2 Familie beruhen. Die pro-apoptotischen (Bax, Bak und Bcl-X_s) und die anti-apoptotischen (Bcl-2 und Bcl-X_L) Moleküle balancieren den mitochondrialen Apoptoseweg. An den Mitochondrien stabilisieren Bcl-X_L und Bcl-2 das mitochondriale Transmembranpotenzial und verhindern somit die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranenraum der Mitochondrien (Shimizu et al., 1996 a; Shimizu et al., 1996 b; Tsujimoto and Shimizu, 2000).

Die MDR beruht auf der Überexpression spezieller Membranpumpen, die in die Zelle eingedrungenen Fremdstoffe, unter Energie-Verbrauch (ATP) aus der Zelle hinaus transportieren. Diese Membranpumpen gehören zu den so genannten ABC-Transportern (ATP-binding cassette transporter). Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das P-Glykoprotein und das Genprodukt des MDR1-Gens. Dieses P-Glykoprotein zeichnet sich durch eine besonders breite Substratspezifität aus. Es transportiert lipophile, neutrale und kationische Moleküle (Chaudhary and Roninson, 1991) Das Multidrug Resistenz Assoziierte Protein (MRP), das aus mindestens sechs verschiedenen Proteinen besteht, transportiert organische Anionen wie Glutathion, glucuronat- oder sulfatkonjugierte Substanzen (Vergote et al., 1998). Dies sind nur zwei Beispiele von möglichen Resistenzen. Hinzukommen noch unspezifische Resistenzen, deren Mechanismen noch nicht geklärt sind.

Verschiedene Tumorerkrankungen sprechen sehr unterschiedlich auf eine Chemotherapie an. Im Allgemeinen sind die Erfolgschancen jedoch wesentlich besser als noch vor einigen Jahren. Beispiele für Tumorarten, bei denen eine Chemotherapie zu einer dauerhaften Heilung führen kann, sind Morbus Hodgkin, maligne Lymphome, Hodentumoren oder das Chorionkarzinom der Frau. Besonders gut sind die Ergebnisse auch bei der Behandlung von Tumoren im Kindesalter. Hier sind bei akuten

Leukämien, die vor Einführung der Chemotherapie unausweichlich tödlich verliefen, dauerhafte Heilungen bei weit über 70 Prozent der Kinder möglich (*Krebs-Kompass 1997-2003 - Volker Karl Oehlrich-Gesellschaft e.V.*).

Bei Tumoren (z.B. Brustkrebs, Prostatakrebs oder Eierstockkrebs), die bereits metastasiert sind, ist eine komplette Heilung meist nicht mehr möglich. Hier kann der Verlauf der Erkrankung aber oftmals gebremst werden. Es gibt jedoch auch verschiedene Tumorerkrankungen, die bisher auf eine Chemotherapie weniger gut ansprechen, wie z. B. Melanome, Kolonkarzinome oder das (nicht kleinzellige) Lungenkarzinom (Morrow and Cowan 1993).

2.3.3 Alternativen

Die verschiedenen im Rahmen einer Chemotherapie eingesetzten Medikamente können eine Vielzahl unerwünschter Wirkungen haben. Diese Nebenwirkungen sind unter anderem von den eingesetzten Zytostatika, ihrer Dosis sowie der Dauer der Verabreichung abhängig. Der Allgemeinzustand des Patienten spielt hierbei ebenfalls eine wesentliche Rolle. Zu den häufigsten akuten Nebenwirkungen, die bei sehr vielen Zytostatika auftreten können, zählen Übelkeit und Erbrechen, Müdigkeit, Schleimhautentzündungen, Fieber, Haarausfall und Blutbildveränderungen durch Schädigung des Knochenmarks. Besonders betroffen sind die weißen Blutkörperchen. Sinkt ihre Zahl stark ab, macht dies die Patienten vorübergehend anfällig für Infektionen (Mutschler, E., et al.).

Basierend auf diesen schweren Nebenwirkungen, die durch die herkömmliche Chemotherapie entstehen können und verschiedenartiger Resistenzen gegenüber unterschiedlichen Therapeutika ergibt sich die Notwendigkeit der Erforschung alternativer, verträglicher Substanzen. In diesem Zusammenhang gewinnen so genannte „natürliche Wirkstoffe“ immer mehr an Bedeutung (Cragg, 1998). Dies sind Substanzen, die aus pflanzlichen oder tierischen Stoffen gewonnen wurden und die tumorizide bzw. statische Wirkung gezeigt haben. Bekannte und bereits eingesetzte „natürliche“ Chemotherapeutika, sind die oben bereits erwähnten Vinblastin und Vincristine aus der *Vinca rosea* (Madagaskar-Immergrün) oder Paclitaxel (Taxol®) aus der Eibe. Weitere Wirkstoffe aus verschiedenen marinen Organismen wie z.B. *Bugula neritina* einem Moostierchen, *Dolabella auricularia* ein Seehase oder *Halichondria okadae* ein japanischer Schwamm oder das Toxin aus der Seescheide, zeigen tumorizide Wirkung und befinden sich bereits in der ersten bzw. klinischen Phase:

Dolastiatrin 10, Ecteinascidin, Bryostratin und Halichondrin B. Bei der weitergehenden Suche nach potenten zytostatischen bzw. anti-proliferativ wirksamen Substanzen spielen Produkte aus marinen Organismen eine zunehmend größere Rolle. Die Pharmakologen betrachten Meeresorganismen gerne als eine umfassende Bibliothek biologisch wirksamer Naturstoffe mit Arzneipotential (Harvey, 1999).

2.4 Wirkstoff aus dem Meer – APIT

Eine interessante Entdeckung war hier die Aufspürung einer antitumoriziden Substanz aus der Gattung *Aplysia*, einer Meeresnacktschnecke, die heute unter anderem als Paradeobjekt der neurophysiologischen Forschung dient.

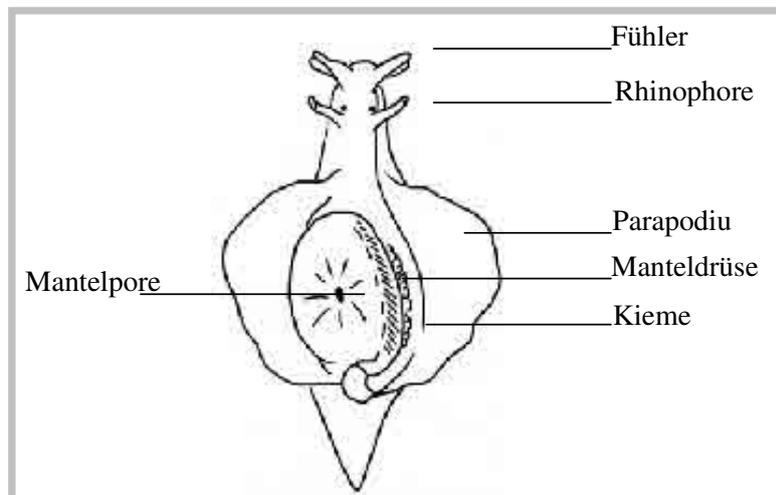


Abbildung 3: Skizze der *Aplysia punctata*. Den Namen „Seehase“ verdankt sie den an Hasenohren erinnernden Rhinophoren. Die Tinte wird in der Manteldrüse gebildet und zur Abwehr durch ein „Siphon“ freigesetzt.

Die Meeresnacktschnecke *Aplysia punctata* ist im Mittelmeer verbreitet und setzt als Abwehrreaktion gegen ihre natürlichen Feinde (Seesterne, Krebse sowie einige Seeanemonen und Schnecken) purpurfarbene Tinte frei. Die Meeresschnecken, die auch unter dem Namen „Seehase“ bekannt waren, galten bis Ende des 19. Jahrhunderts für den Menschen als außerordentlich giftig. Seit Anfang des 20. Jahrhunderts wurden systematische toxikologische Studien mit den sekretorischen Flüssigkeiten von Aplysien durchgeführt (Flury, 1915). Unter anderem konnte durch Verabreichung eines Mitteldarmstückes aus einer *Aplysia* an Mäuse eine Säugetiertoxizität festgestellt werden (Winkler, 1961).



Abbildung 4: Abwehrreaktion einer *Aplysia* - Purpurfarbene Tinte wird abgegeben (Foto: Genevieve Anderson).

Das tintenartige Sekret wird in so genannten *Tintendrüsen* produziert, die sich am Rand des Mantels befinden (Johnson, 1999). Über einen *Siphon*, eine blasrohrartige, häutige Struktur ist die *Aplysia* in der Lage, die Tinte gezielt in Richtung Angreifer abzugeben. Man nimmt an, dass diese chemische Art der Verteidigung so erfolgreich ist, dass die „Seehasen“ deshalb gänzlich auf ihre harte äußere Schale verzichten konnten. Experimente, bei denen Fischen und Anemonen Stücke von „Seehasen“ oder mit Tinte behandelte, normalerweise essbare Fischteile angeboten wurden, legten nahe, dass in den Geweben und Sekretionen ungenießbare Stoffe enthalten sein mussten (Russel, 1966; Johnson, 1999; Nolen, 1995). Seitdem sind eine Vielzahl niedermolekularer Substanzen mit einem breiten Spektrum biologischer Aktivität aus unterschiedlichen „Seehasen“ Spezies isoliert worden (Yamada, 1997; Avila, 1995; Carefoot, 1987).

Es wurden bereits einige „Seehasen-Proteine“ mit tumorizider bzw. bakterizider Wirkung entdeckt (Nolen, et al., 1995; Walter and Erickson, 1986; Yamazaki, 1993;

Petzelt et al., 2002). Bei allen bisher isolierten Glykoproteinen wird die halbmaximal zytotoxische Aktivität (d.h. die Menge, die bei einmaliger Gabe benötigt wird, um den Tod von 50 % der Zellen hervorzurufen) bereits bei Konzentrationen im Nanogrammbereich erreicht.

Die Arbeitsgruppe für neue Signalwege des tumor-spezifischen Zelltods in der Abteilung Molekulare Biologie am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin beschäftigt sich mit der Wirkungsweise und dem potenziellen therapeutischen Einsatz eines aus dem *Aplysia punctata* Tintensekret aufgereinigten Proteins.

In ersten Experimenten mit der nativen Tinte von *A. punctata* wurde zunächst geklärt ob auch diese Glykoproteine enthält, die Bakterien abtöten und wenn, in welcher Konzentration eine eventuelle toxische Aktivität nachweisbar ist.

In einem Agar-Diffusionstest, wurde die antimikrobielle Wirkung der nativen Tinte von *Aplysia punctata* untersucht (Butzke 2003). Dazu wurde diese in verschiedenen Verdünnungen auf Filterpapier-Scheibchen aufgetragen und auf mit *E. coli* infizierte Nährböden aufgelegt. Bei antibiotischen Eigenschaften wies der nach Inkubation entstandene Bakterienrasen freie „Höfe“ um die Filterpapiere auf. Native Tinte ruft bei unverdünnter Anwendung einen deutlichen Hof im Zellrasen hervor, bei fünffacher Verdünnung ist ein Effekt gerade noch erkennbar. Die Tinte von *Aplysia punctata* hat also antimikrobielle Eigenschaften (Butzke, 2003).

Im Folgenden wurden die zytotoxischen Eigenschaften der Tinte überprüft. Dafür wurden in einem Vorversuch humane Tumor-Zellen mit nativer Tinte behandelt. Jurkat-T-Lymphozyten wurden mit nativer Tinte inkubiert und die Letalität anschließend durch eine klassische Anfärbung mit Trypanblau bestimmt. Dieser Farbstoff kann nur in tote Zellen eindringen, deren Plasmamembran keine Barriere mehr darstellt. Nach einigen Stunden war eine eindeutige Anfärbung der Zellen zu erkennen. Die Tinte von *A. punctata* wirkt also auf Tumorzellen zytotoxisch (Butzke, 2003).

Aufgrund dieser ersten viel versprechenden antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften der Tinte und einer voraussichtlich spezifischen Proteinbeteiligung wurden erste Schritte der Aufreinigung vorgenommen. Eine Proteinbeteiligung wurde vermutet, da nach Erhitzung der Tinte über 50°C eine Abnahme der Toxizität zu erkennen war.

Zunächst wurde die native Tinte durch Filtrierung von groben Verunreinigungen befreit und mittels Säulenzentrifugation konzentriert. Dabei zeigten parallel durchgeführte Kontrolllexperimente, dass die Zytotoxizität qualitativ und quantitativ mit dem Vorhandensein eines 60 kDa-Proteins verbunden war. Fraktionen, die nur dieses

Protein enthielten, wurden deshalb als reines APIT (*Aplysia punctata* ink toxin) betrachtet (Butzke, 2003).

Um die lytische Wirkung von APIT auf humane Tumorzellen *in vivo* untersuchen zu können wird ein geeignetes Tiermodell benötigt.

2.5 Tumor-Maus-Modell

Die Bedeutung von Tierversuchsergebnissen hängt entscheidend von der Wahl eines geeigneten Tiermodells ab.

Tiermodelle für die Untersuchung menschlicher Erkrankungen können in vier Gruppen eingeteilt werden: **induzierte Modelle**, **spontane Modelle**, **negative und tier-spezifische Modelle**. In **induzierten Tiermodellen** wird eine Erkrankung experimentell erzeugt, entweder chirurgisch oder durch Verabreichung biologisch aktiver Substanzen, während **spontane Tiermodelle** natürlich vorkommende, genetische Varianten menschlicher Erkrankungen darstellen, wie die angeborenen Stoffwechsell-entgleisungen. **Negative Modelle** sind Tierarten, Zuchten oder Stämme, bei denen sich eine bestimmte Krankheit nicht entwickelt. **Tierspezifische Tiermodelle** sind Modelle, bei denen anfänglich eine Erkrankung bei einer Tierart erkannt und untersucht wird, mit der Überlegung, dass eine vergleichbare Erkrankung zu einem späteren Zeitpunkt eventuell beim Menschen identifiziert werden kann. Das Papilloma-Virus bei bösartigen, epithelialen Tumoren im Gebärmutterhals und die Marek-Virus-Erkrankung als lymphoproliferative Erkrankung sind zwei Beispiele eines tierspezifischen Tiermodells (Zutphen van et al., 1995).

Um eine entsprechende Vergleichbarkeit hinsichtlich der erwarteten Symptome und Ätiologie zu erreichen, wurde für die *in vivo* Charakterisierung der tumorlytischen Wirkung von APIT ein induziertes Tiermodell aufgebaut.

Ein Tumormodell, mit dem unterschiedliche Tumorarten getestet werden können, stellt das subkutane Xenotransplantatmodell dar. In diesem Modell werden, artfremde, also xenogene, humane Tumorzellen subkutan in immundefiziente Mäuse injiziert. Anschließend durchlaufen die injizierten Zellen folgende Phasen: In der ersten Phase persistieren die überlebenden Zellen, in der zweiten Phase kommt es zur Adaption und in der dritten Phase kommt es dann zum Tumorwachstum. Man verwendet in diesem Modell generell immundefiziente Mäuse, weil in gesunden, immunkompetenten Mäusen solche Xenotransplantationen eine starke Abstoßungsreaktion hervorrufen würden. Die subkutan injizierten Xenotransplantate stellen, da sie das Verhalten des

Tumors im Patienten gut reflektieren, ein besonders kliniknahes Modell zur Testung neuer antitumoral wirksamer Substanzen dar. Übereinstimmungen zwischen subkutan wachsendem Xenotransplantat und dem Spendertumor wurden unter anderem beim Vergleich der Histologie (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) gefunden.

Schon seit Anfang der 60er Jahre sind immundefiziente Mäuse bekannt und werden für verschiedenartige Forschungsansätze verwendet. Die ersten immundefizienten Mäuse waren Nacktmäuse (nude-mice). 1961 entstanden in Glasgow infolge einer Spontanmutation in einem Albinostamm thymusaplastische, unbehaarte Mäuse. Diese Mutante unterliegt einem autosomal-rezessiven Erbgang, wobei die Haarlosigkeit und Thymusaplasie untrennbar verbundene Eigenschaften sind (Panterloures, 1968). Diesen Nacktmäusen fehlen reife funktionelle T-Lymphozyten (Sprent, 1974). Infolgedessen kann implantiertes fremdes Gewebe vom körpereigenen Immunsystem nicht erkannt werden und eine normalerweise zu erwartende Abstoßungsreaktion bleibt aus. Von Rygaard und seinen Mitarbeitern konnte 1969 gezeigt werden, dass auf Nacktmäuse transplantierte Rattenhaut auf Dauer akzeptiert und nicht abgestoßen wird. Dies ermutigte Rygaard und Povlsen bereits im gleichen Jahr zu einem ersten Versuch der Transplantation eines menschlichen Tumors („Bibliography of the Nude Mouse 1966-1976“ Rygaard and Povlsen 1977). Weitere Gruppen konnten die verschiedensten humanen Tumore erfolgreich transplantieren und in Serienpassagen 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 ist es seitdem möglich, die Wirkung verschiedener Substanzen auf das Wachstum solcher Tumortransplantate zu beobachten. Nachdem ihnen dies gelang, hatten sich die Möglichkeiten der experimentellen Onkologie auf einen Schlag beträchtlich erweitert. Nun bedurfte es zur Vermeidung oder Verzögerung von Abstoßungsreaktionen bei Allo- und Heterotransplantaten keine Thymektomie oder immunsuppressiven Behandlungen von Versuchstieren, Maßnahmen von eingeschränkter Wirkung oder mit unwägbar Nebenwirkungen. Mittlerweile sind weitere immundefiziente Mausstämme etabliert, wie z.B. SCID, RAG oder SCID-NOD Mäuse. Die hier eingesetzten RAG-1^{-/-} defizienten Mäuse, besitzen einen Defekt im „Recombination activating gene-1“, das bedeutet, dass die für das V Rearrangement verantwortliche Rekombinase RAG-1 fehlt. Dieses Gen ist für die Rekombination der verschiedenen Segmente und letztendlich für die

Expression von T- und B- Rezeptoren und somit für die Entwicklung von funktionellen B- und T- Lymphozyten verantwortlich (Mombaerts *et al.*, 1992).

SCID ist das Akronym für den Begriff "severe combined immunodeficiency" (schwere kombinierte Immundefizienz). SCID-Mäuse können durch den Mangel an dem Enzym Adenosindeaminase keine peripheren T- und B-Zellen entwickeln (Bosma and Carroll, 1991). SCID-NOD Mäuse hingegen sind eine Kreuzung aus SCID und NOD Mäusen, wobei NOD für Nonobese diabetic steht und bedeutet, dass sie spontan insulinabhängiges Diabetes entwickeln, da sie eine genetische Prädisposition am Genotyp des Haupthistokompatibilitätsantigenkomplex (MHC; major histocompatibility complex) auf Chromosom 6p für diese Krankheit besitzen (Makino *et al.*, 1985; Wicker *et al.*, 1987). Diese Prädisposition ist an die Gene des MHC's gekoppelt (Hattori *et al.*, 1986). Das bedeutet, durch die veränderten MHC-Moleküle werden Antigene, die bei der Pathogenese des Typ-1-Diabetes eine Rolle spielen, gebunden und den Rezeptoren der T-Zellen präsentiert, die für den destruktiven Autoimmunprozess verantwortlich sind. Zusätzlich können Epitope nicht mehr durch die Moleküle des MHC Komplexes auf antigen-präsentierenden Zellen erkannt werden. Es kommt somit zu keiner Antigenpräsentation mehr und infolgedessen auch zu keiner Induktion von T Zellantworten.

Um natürlichen Killerzellen (NK Zellen), die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Transplantatabstoßung spielen (Christianson *et al.*, 1996), zu eliminieren, werden die Mäuse in der Regel zudem als weitere immunsuppressive Maßnahme bestrahlt (Cavacini *et al.*, 1992). Dieser immundefiziente Status erhöht das Infektionsrisiko dieser Tiere enorm. Daher sind besondere Haltungsbedingungen erforderlich, wie spezielle Nahrung, staubfreie Einstreu, konstante Temperaturen von 25 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 65 % und eine möglichst keimarme Umgebung (Fortmeyer, H.P.; 1981, Fortmeyer, H.P.; und Bastert, G. 1977). Immunsuppressive Tiere in einer kontrollierten Umgebung zu halten, was durch die Verwendung von einzeln belüftbaren Käfigen (individually ventilated cages (IVC-Käfigen)) gewährleistet werden kann, ist aus gesundheitlichen Gründen sehr wichtig.

Bei der Erforschung von Ätiologie und Therapie von Erkrankungen ist die Übertragbarkeit vom Tiermodell größer, wenn die untersuchten Erkrankungen beim Menschen und beim Versuchstier eine gemeinsame Ursache haben. Somit bieten sich immundefiziente Mäuse idealerweise zur Etablierung subkutaner Xenotransplantate an.

Dieses Transplantationsmodell ermöglicht die Untersuchung der Wirkungsweise von APIT an humanen Tumoren direkt *in vivo*. Dazu werden die Tumorzellen beidseitig

subkutan in die Maus injiziert. Eine tumorspezifische Mindestzahl an Zellen ist Voraussetzung für das Angehen transplantierter Tumoren (Kindred und Wechsler, 1978), da unmittelbar nach der Injektion ein Großteil der Tumorzellen zugrunde geht. Anschließend können die subkutanen Tumore nur dann über einen kritischen Durchmesser von 1-2 mm hinaus wachsen, wenn sie eine Neovaskularisierung induzieren können. Die neu gebildeten Gefäße versorgen den Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff (Folkman, 1995; Strömblad, and Cherech, 1996). Durch intraperitoneale oder auch lokale Verabreichung von APIT können Veränderungen des Tumolvolumens und der Allgemeinzustand (Fellbeschaffenheit, saubere Körperöffnungen, Sozialverhalten etc.) der Versuchstiere sofort untersucht werden.