

## 5 Diskussion

Aufgrund der hohen Inzidenz und Mortalität maligner Tumorerkrankungen kommt deren Prävention, Diagnose und Therapie ein hoher Stellenwert zu. Allein im Jahr 2001 starben 27% aller Fälle allein an den Folgen bösartiger Neubildungen oder an den Folgen der Therapie.

Innerhalb der multimodalen Therapieprotokolle repräsentiert der Einsatz von Chemotherapeutika einen unverzichtbaren Bestandteil der Behandlung von Krebserkrankungen, und ist gegenwärtig die effektivste Therapieoption für bereits metastasierte Tumore (Gottesman et al., 2002a; Borst et al., 2002). Ein Teil der Patienten kann auf diesem Wege erfolgreich behandelt werden, während andere Patienten nur unzureichend, allenfalls vorübergehend oder gar nicht ansprechen. Deshalb ist die Suche nach neuen potenten zytostatischen bzw. anti-proliferativ wirksamen Substanzen enorm wichtig. Gerade Moleküle aus marinen Organismen spielen in den letzten Jahren eine zunehmend größere Rolle. Dies bestätigen Zahlen aus dem Cancer Chemotherapy National Service Center (CCNSC), eine Einrichtung des United States National Cancer Instituts (NCI), das seit 1955 synthetische und natürliche Moleküle hinsichtlich ihrer tumorwachstumsstoppenden bzw. tumorabtötenden Eigenschaften vor allem präklinisch untersucht. Wurden in den Jahren 1960 bis 1968 nur rund 1000 tierische Extrakte marinen Ursprungs vom CCNSC getestet, waren es in den Jahren bis 1982 schon über 16.000 (Cragg, 1998). Daher betrachten Pharmakologen Meeresorganismen gerne als eine umfassende Bibliothek biologisch wirksamer Naturstoffe mit Arzneipotential (Harvey, 1999).

APIT (*Aplysia punctata* ink toxin) ist ein 60 kDa großes Glykoprotein, das am Max-Planck-Institut für Infektionskrankheiten in der Abteilung Molekulare Biologie aus der Tinte der Meeresnacktschnecke *Aplysia punctata* isoliert wurde. Diese auch „Seehasen“ genannten Organismen sind marine Gastropoden, die als Schutzmechanismus gegen natürliche Feinde purpurfarbene Tinte abgeben.

Da Naturstoffe mit 39% einen großen Anteil aller zwischen 1983 und 1994 zugelassenen Arzneimittel darstellen (Harvey, 1999), weckte dieses Protein großes Interesse. Aus der Literatur sind eine Vielzahl niedermolekularer Substanzen mit einem breiten Spektrum biologischer Aktivitäten aus unterschiedlichen „Seehasen“-Spezies bekannt, die sich besonders durch ihre Spezifität für Tumorzellen auszeichnen (Yamazaki, 1993; Yamada, 1997; Avila, 1995; Carefoot, 1987). Dies ist ein entscheidender Vorteil, da „normale“ Zytostatika alle, sich schnell teilenden Zellen im Körper angreifen und somit auch gesunde Zellen zerstören. Die Wirkung der

Glykoproteine hingegen ist auf die Tumorzellen beschränkt: So sind Tumorzelllinien von der zytolytischen Aktivität betroffen, nicht jedoch normale Körperzellen wie Milz-, Thymo- oder Erythrozyten der Maus bzw. Erythrozyten des Menschen (Yamazaki,1993). Ein Therapieansatz mit derartigen Glykoproteinen würde die Nebenwirkungen, die bei den momentan angewandten Krebstherapien sehr hoch sind, erheblich vermindern.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob APIT ebenfalls tumorizide Wirkung zeigt. Zu diesem Zweck wurde die Empfindlichkeit verschiedener Krebszelllinien gegenüber APIT zunächst in Zellkulturversuchen analysiert. Dabei wurden Krebszelllinien ausgewählt, die besonders häufige Krebserkrankungen (Darmkarzinom, Prostatakarzinom, Leukämie), seltene und schlecht zu therapierende (Rhabdomyosarkom, Ewing Sarkom) und chemotherapieresistente Tumore (Lungenkarzinom (multi-drug-resistent), Brustkarzinom (apoptose-resistent)) repräsentieren. Die Empfindlichkeit der verschiedenen Tumorzelllinien auf die tumorizide Wirkung von APIT wurde mit Hilfe eines Proliferationstests gemessen. In diesem Versuch wird die Stoffwechselaktivität einer Zellpopulation bestimmt, die in einem hohen Maß die Vitalität der Zellen widerspiegelt. Anhand dieser Ergebnisse wurde der  $IC_{50}$ -Wert ermittelt, der die APIT Konzentration definiert, die benötigt wird, um eine Abnahme der Vitalität der Zellen um 50% zu erreichen.

Alle in dieser Arbeit getesteten Tumorzelllinien reagieren auf APIT. Die Zellen reagieren unterschiedlich stark, einige Zellen benötigen zwischen 8 und 12 ng/ml APIT, andere wiederum reagieren stärker gegenüber dem APIT induzierten Zelltod und benötigen unter 5 ng/ml und die empfindlichsten Zellen benötigen sogar nur 3 ng/ml APIT. Somit löst APIT unter *in vitro* Bedingungen den Tod aller getesteten Tumorzellen aus. Sowohl Tumorzelllinien des blutbildenden Systems (Jurkat neo, CEM neo, K562) als auch Tumorzelllinien aus soliden Tumoren (GLC 4, MCF7, SK-BR-3, PC3, DU145, HT29, RD-ES und A673) werden durch die APIT-induzierte Wirkung erfolgreich abgetötet. Prostatazelllinien (PC3 und DU145) haben in der Zellkonzentration von  $0,5 \times 10^5$  Zellen einen  $IC_{50}$ -Wert über 20 ng/ml APIT. Die Leukämie Zelllinien K562 hingegen erreicht den  $IC_{50}$ -Wert bei gleicher Zellkonzentration schon bei 5 ng/ml APIT. Zelllinien des blutbildenden Systems (Jurkat neo und CEM neo) zeigten im Proliferationsassay eine hohe Empfindlichkeit. Der aus dem WST-Test ermittelte  $IC_{50}$ -Wert der Suspensionszellen (Jurkat neo, CEM neo und K562) lag bei einer Zellkonzentration von  $0,5 \times 10^5$  unter 6 ng/ml APIT. Die adhärenenten Zelllinien reagierten in der selben Zellkonzentration ebenfalls auf den APIT-induzierten Zelltod, allerdings

wurden mit Ausnahme der A673 (Weichteilsarkom) und RD-ES (Ewing Sarkom) Zellen höhere APIT Konzentrationen benötigt. Somit konnte zwar für alle Zelllinien eine tumorizide Wirkung von APIT nachgewiesen werden, adhärenente Zellen (Darmkarzinom HT29, Brustkarzinom SK-BR-3, Prostatakarzinom PC3 und DU145) reagieren jedoch weniger empfindlich als Suspensionszellen. Nach Titration der adhärenenten Zellen, d.h. in geringerer Zellkonzentration eingesetzt, zeigten diese zu den Suspensionszelllinien vergleichbare  $IC_{50}$ -Werte.

Die Therapierbarkeit des Tumors im Organismus hängt zum einen von der Versorgung ab. Harte solide Tumore im Gegensatz zu Tumoren des blutbildenden Systems werden von weniger Gefäßen durchzogen, deshalb gelangen die Zytostatika schlechter zum Ziel. Zum anderen sind einzelne Zellen wesentlich besser angreifbar als Zellen im Verband. Dies spielt nicht nur eine Rolle bei der Chemotherapie, sondern auch bei der Bestrahlung und bei der monoklonalen Antikörpertherapie, da auch hier die einzelne Zelle angegriffen und meist durch Apoptose zum Untergang gezwungen wird.

Einige Tumorerkrankungen, wie zum Beispiel Leukämie oder auch metastasierende Tumore, können nur durch eine Chemotherapie geheilt werden. Wobei bei metastasierenden Tumoren zur Zeit nur wenige Patienten einen längeren Zeitraum überleben. Für diese schlechte Prognose stellt das Phänomen der Therapieresistenzen die größte Ursache dar. Obwohl die genaue Ursache der meisten dieser Resistenzen unklar ist, spielen sowohl Apoptose-Resistenzen als auch Multidrug-Resistenzen eine entscheidende Rolle. Gerade die Apoptose-Resistenzen, die durch eine Überexpression des mitochondrialen Bcl-2 Proteins ausgelöst werden, nehmen einen großen Einfluss auf die Tumorbehandlung, da nicht nur die Strahlentherapie, sondern auch traditionelle Zytostatika-Chemotherapien beeinträchtigt sind (Büchtele 2003). Auch die intrinsischen oder erworbenen Multidrug-Resistenzen (MDR) limitieren die Chemotherapie in der klinischen Onkologie. Dieses Phänomen ist sehr komplex und vielseitig und lässt sich nicht ohne weiteres überwinden (Cancer Research, Jurij A. Bogovic, 2004). Um auch für derartige Tumorformen neuen Therapieansätze zu finden, wurde die Wirkung von APIT auch an Zellen mit resistentem Phänotyp untersucht. Die Brustkarzinomzelllinie MCF7Bcl-X<sub>L</sub> ist apoptoseresistent, da in dieser Bcl-X<sub>L</sub> und Bcl-2 überexprimiert sind. Diese beiden Proteine stabilisieren das mitochondriale Membranpotential und verhindern bei einer Überexpression die Mitochondrien-vermittelte Apoptose (Tsujimoto and Shimuzi 2000). Die Lungenkarzinomzelllinie GLC4/ADR weist eine Therapieresistenz auf, die im Fachjargon Multidrug-Resistenz (MDR) genannt wird.

Beide zum resistenten Phänotyp gehörende Zelllinien, sowohl die Lungenkarzinomzelllinie GLC4/ADR als auch die Brustkarzinomzelllinie MCF7Bcl-X<sub>L</sub> reagieren auf den APIT-induzierten Zelltod. Die MCF7-BclX<sub>L</sub> Zellen besitzen im Vitalitätstest einen IC<sub>50</sub>-Wert von 11,5 ng/ml APIT bei einer Zellzahl von 0,125 x 10<sup>6</sup> Zellen. Der IC<sub>50</sub>-Wert der GLC 4 ADR Zellen liegt bei einer Zellzahl von 0,5 x 10<sup>6</sup> bei 9,5 ng/ml APIT. Vergleicht man die Empfindlichkeit dieser Zelllinien mit nicht resistenten (SK-BR-3 und MCF7) benötigen MCF7Bcl-X<sub>L</sub> eine höhere APIT Konzentration, um den IC<sub>50</sub>-Wert zu erreichen. Die Empfindlichkeit gegenüber APIT liegt bei der Lungenkrebszelllinie im Verhältnis zu anderen Tumorzelllinien ungefähr im Durchschnitt. Das bedeutet, dass die Wirkung von APIT unabhängig davon ist, ob eine Zelle eine Chemotherapie-resistenz aufweist oder nicht.

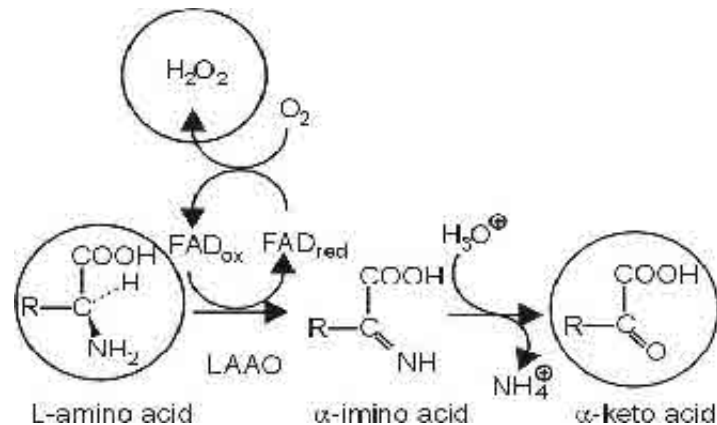
Im Gegensatz zu APIT reduziert Doxorubicin, ein etabliertes Chemotherapeutikum nur geringfügig die metabolische Aktivität in Bcl-2 oder Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierten Zelllinien (Butzke et al., 2004). Butzke et al verglichen die Wirkung von Doxorubicin und APIT auf sowohl mit bcl-2 transfizierten Jurkat Zellen als auch mit bcl-X<sub>L</sub> transfizierten CEM Zellen und den jeweiligen Parenteralzelllinien auf ihre Empfindlichkeit.

Die mit bcl-2/bcl-X<sub>L</sub> transfizierten Zelllinien zeigten nach der Inkubation mit APIT ein niedrigeren IC<sub>50</sub>-Wert als die mit APIT inkubierten durch mock transfizierten Zelllinien. Der IC<sub>50</sub>-Wert der Jurkat bcl-2 Zelllinie liegt bei 2,7 +/- 0,6 ng/ml APIT und der IC<sub>50</sub>-Wert der Jurkat neo Zelllinien liegt mit 3,2 +/- 0,7 ng/ml APIT leicht darüber. Die CEM bcl-X<sub>L</sub> erlangten einen IC<sub>50</sub>-Wert von 4,1 +/- 0,1 ng/ml APIT und die Parenteralzelllinie CEM neo liegt ebenfalls mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 5,6 +/- 0,7 ng/ml APIT leicht über der resistenten Zelllinie. Wurden diese Werte mit Doxorubicin (10µM) behandelten Kontrollzellen (Jurkat neo und CEM neo) verglichen, konnte festgestellt werden, dass auch hier die metabolische Aktivität sinkt, bei den Jurkat neo Zellen auf 32,5 +/- 5,5 % und bei den CEM neo Zellen auf eine Rest-metabolische Aktivität von 27,0 +/- 7 %. Wurden hingegen die mit bcl-2 bzw. bcl-X<sub>L</sub> transfizierten Zelllinien mit 10 µM Doxorubicin inkubiert, nahm die metabolische Aktivität kaum ab. Die metabolische Aktivität der Jurkat bcl-2 Zelllinie sank auf 80,0 +/- 4,0 % und die CEM bcl-X<sub>L</sub> Zelllinie zeigte eine Reduktion der metabolischen Aktivität auf 75 +/- 1,0 %. Im Gegensatz zu den Kontrollzelllinien (Jurkat neo und CEM neo) kann die metabolische Aktivität bei Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> überexprimierten Zelllinien durch Doxorubicin nur geringfügig herabgesetzt werden. Im Gegensatz zu den APIT behandelten Zellen, die bei den resistenten Zelllinien (Jurkat bcl-2 und CEM bcl-X<sub>L</sub>) eine höhere Empfindlichkeit erreicht als bei den Parenteralzelllinien (Jurkat neo und CEM neo).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der APIT-induzierte Zelltod unabhängig vom Bcl-2 bzw. Bcl-X<sub>L</sub> Apoptose Weg abläuft und deshalb im Gegensatz zu Doxorubicin eine erhöhte Wirksamkeit, gegenüber resistenten Phänotypen zeigt.

Aus den Ergebnissen der Vitalitätstests konnte abgeleitet werden, dass die adhärenenten bzw. semi-adhärenenten Zellen (HT29,SK-BR-3, PC-3 und GLC 4) eine deutlich höhere metabolische Aktivität aufweisen, als die Suspensionszellen Jurkat neo, die sehr stark gegenüber dem APIT-induzierten Zelltod reagierten (Tabelle 2). Desweiteren konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Größe einer Zelle und der Empfindlichkeit bezüglich des APIT-induzierten Zelltods hergestellt werden (Abschnitt 3.4.). Ein möglicher Zusammenhang zwischen metabolischer Aktivität, Größe und Empfindlichkeit könnte darin bestehen, dass größere Zellen eine höhere Stoffwechselrate besitzen, so dass APIT schneller abgebaut bzw. auf irgendeine Weise effektiv neutralisiert werden kann.

Größere Zellen besitzen einen höheren Anteil an Proteinen und freien Aminosäuren, die durch ihre antioxidative Kapazität (Droge, 2002) der Wirkung von APIT eventuell entgegen stehen (s.u.). Daher muss bei diesen Zellen für eine adäquate Effizienz mehr APIT eingesetzt werden, um die gleiche Wirkung zu erzielen, die sie bei entsprechenden kleineren Zellen in geringerer Konzentration erreicht. Parallel zu dieser Arbeit wurde von Butzke (2003) der Mechanismus des APIT-induzierten Zelltods analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass es sich bei APIT um eine L-Aminosäure Oxidase handelt (Abbildung 22). Die mit Hilfe von L-Lysin und L-Arginin (aus dem Zellkulturmedium) Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bildet und so die Zellen lysiert (Butzke et al., 2004).



**Abbildung 22:** Schematische Darstellung von der L-Lysin α-Oxidase katalysierten Reaktion (Butzke et al., 2004).

Der Verbrauch von Arginin und Lysin hat langfristig gesehen fatale Auswirkungen auf die Zelle, da Lysin eine für die Zelle essentielle Aminosäure darstellt (Jouanneau, 1985; Murakawa, 2001). Neben dem Entzug dieser essentiellen Stoffwechselsubstrate besteht die unmittelbar schädigende Wirkung von APIT wesentlich in der Produktion von Zellgiften, wie Ammoniak, das bei der oxidativen Desaminierung von Lysin und Arginin entsteht, oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Diese Metaboliten fallen auch unter normalen Bedingungen als Stoffwechselprodukte in der Zelle an, wie z. B. in stoffwechselaktiven Mitochondrien, aber auch im Bereich anderer Membrankompartimente (Lysosomen/Peroxisomen, Plasmamembran, ER) (Fiers 1999). Der Organismus verfügt daher über eine Vielzahl von Systemen - Enzyme wie den Superoxiddismutasen, Katalasen und Peroxidasen über freie Thiole des Glutathion bis hin zu Antioxidantien, wie Vitamin C oder freien Aminosäuren, die in der Lage sind, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abzufangen (Droge, 2002).

Behandelt man Zellen *in vitro* mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, zeigen diese Phänotypen, die in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis stehen. Geringe Mengen stimulieren die Proliferation, größere Mengen induzieren einen temporären bis hin zum dauerhaften Wachstumsstopp. Noch größere Mengen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bedingen Apoptose und schließlich Nekrose (Davies, 1999). In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben über die Höhe der für den jeweiligen Effekt einzusetzenden Konzentrationen (Kumar et al., 2001; Sakamoto et al., 1996; Hampton et al., 1997; Borutaite et al., 2001).

Möglicherweise ist diese Unstimmigkeit auf variierende Induktionszeiten und Zellmodelle zurückzuführen. Einigkeit besteht jedoch über die Aufeinanderfolge der sehr unterschiedlichen Phänotypen. Inkubiert man nun Zellen unter Kulturbedingungen mit APIT, so lassen sich nach dem gesagten eine Proliferationsinhibition und eine Induktion von Zelltod - entweder durch Apoptose oder durch Nekrose (bzw. einer Zwischenform) – prognostizieren (Butzke et al., 2004).

Es lässt sich somit ein Zusammenhang der zellbiologischen Beobachtungen mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen feststellen. Zellen mit einem größeren Zelldurchmesser reagieren weniger empfindlich auf die toxische Wirkung von APIT, daher müssen höhere APIT Konzentrationen eingesetzt werden. Zudem besitzen diese Zellen einen höheren Stoffwechsel, der in der Lage ist, das durch APIT entstandene  $H_2O_2$  bis zu einem gewissen Maße zu verstoffwechseln.

Der durch APIT induzierte Zelltod kann weder der Apoptose noch der Nekrose zugeordnet werden. Mikroskopisch scheint er bei den in dieser Arbeit untersuchten Zellen der Dystrophie (gr. dys = Störung, trophe = Ernährung) (Kitt, 1982) zu ähneln. Mit dem Begriff Dystrophie werden Zustandbilder bezeichnet, die mehr oder weniger spezifische Äquivalente von Stoffwechselstörungen darstellen. In der Pathologie werden Stoffwechselstörungen, die vorwiegend mit intrazellulären degenerativen Veränderungen einhergehen, aufgrund ihrer Ursachen eingeteilt. Die Ursachen der degenerativen Zellveränderungen sind vielfältig: Substratmangel oder Überhäufung mit Metaboliten, Sauerstoffmangel, exogene oder endogene Gifte der verschiedenen Art. APIT löst durch die Bildung von toxischen Metaboliten eine degenerative Zellveränderung aus.

Für die Entstehung degenerativer Zellschädigungen ist eine defizitäre Energiebildung von besonderer Bedeutung. Es kommt erst zur Unterbrechung der ATP-Produktion, die nur vorübergehend ohne Schaden für die Zelle toleriert wird (Stünzi et al., 1990). Es folgen viele Begleiterscheinungen, wie zum Beispiel erste Fetttropfchen in der zytoplasmatischen Grundsubstanz, Zellödem mit degenerativer Kernschwellung bis hin zur Kernwandhyperchromatose, eine typische Kondensierung des Chromatins der inneren Zellmembran, die bei den durch APIT behandelten Jurkat neo Zellen ebenfalls zu erkennen ist. Die Kernwandhyperchromatose ist ein Zeichen für eine schwere Zellschädigung und oft schon für den beginnenden Zelltod (Stünzi et al., 1990).

Die Morphologie des durch APIT-induzierten Zelltods ist in den unterschiedlichen Übergangszuständen sehr spezifisch. Die adhärennten Zellen schrumpfen und lösen sich vom Grund und von anderen Zellen ab. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Suspensionszellen nicht mehr in Kolonien vorliegen, sondern teilweise einzeln

und Vakuolen im Zytoplasma bilden. Diese morphologischen Veränderungen kann man teilweise auch bei Zellen, die eine Apoptose durchlaufen finden. Allerdings fehlen die für Apoptose typische Merkmale wie zum Beispiel die „apoptotischen Körperchen“. Ähnliche morphologische Merkmale wurden bei der Inkubation von Zellen mit „Cyplasin beschrieben“, einem Protein, das auch aus der Tinte der *Aplysia punctata* isoliert wurde (Petzelt et al., 2002). Nach der Inkubation von „Cyplasin“ lösen die Zellen sich untereinander und vom Boden der Kulturflasche ab, sie schrumpfen und zeitweise liegen viele kleine Vakuolen im Zytoplasma vor. Einzelne Zelllinien reagieren unterschiedlich auf Cyplasin, sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig (Petzelt et al. 2002). Der induzierte Zelltod von Cyplasin kann ebenfalls weder der Apoptose noch der Nekrose zugeordnet werden. Diese ähnliche Form des Zelltods wurde von Sperandio et al. (2000) ebenfalls beschrieben und als „paraptosis“ bezeichnet. APIT löst unter *in vitro* Bedingungen den Tod aller getesteten Tumorzellen aus. Sowohl die Tumorzelllinien des blutbildenden Systems (Jurkat neo, CEM neo, K562) als auch die Tumorzelllinien aus soliden Tumoren (GLC 4, MCF7, SK-BR-3, PC3, DU145, HT29, RD-ES und A673) werden durch die APIT induzierte Wirkung erfolgreich abgetötet. Besonders vielversprechend ist die Reaktion der chemotherapieresistenten Zelllinien (GLC4/ADR und MCF7Bcl-X<sub>L</sub>). Der Zelltod ist durch einen schnellen Verlust der Stoffwechselaktivität und der Permeabilisierung der Zellmembran gekennzeichnet. Die in diesem Teil der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind die Voraussetzung für spätere Therapieversuche in den Tumor-Maus-Modellen.

Die Bedeutung von Tierversuchsergebnissen hängt entscheidend von der Wahl eines geeigneten Tiermodells ab. Es gibt keine allgemein gültigen Regeln hinsichtlich der Auswahl des richtigen Tiermodells, noch gibt es Regeln für die Übertragung der Ergebnisse vom Tiermodell auf den Menschen. Aber der Experimentator kann für seine Zwecke das am besten geeignete Modell auswählen, indem er gleichzeitig Vor- und Nachteile eines Tiermodells gegeneinander abwägt.

Um die Wirksamkeit von APIT *in vivo* zu überprüfen, wird ein auf den Menschen möglichst gut übertragbares Tiermodell benötigt. Tiermodelle für die Untersuchungen menschlicher Erkrankungen können in vier Gruppen eingeteilt werden: induzierte Modelle, spontane Modelle, negative Modelle und tierspezifische Modelle (siehe Einleitung). In dieser Arbeit wurde das induzierte Tiermodell ausgewählt. In derartigen Tiermodellen wird eine Erkrankung experimentell erzeugt, entweder chirurgisch oder durch Verabreichung biologisch aktiver Substanzen. Oftmals sind allerdings Tiermodelle mit einem tierischen Tumorsprung nicht ausreichend, d. h. der Tumor



darf nicht auto- oder allogen sein, sondern muss xenogen sein. Dies bedeutet, dass humane Tumorzellen in den murinen Organismus in der Regel subkutan injiziert werden. Diese Applikationsweise besitzt den Vorteil, dass das Tumorwachstum *intra vitam* über einen definierten Zeitraum beurteilt werden kann. Gerade bei Therapieversuchen bietet sich dieses Modell an, da der Erfolg der Therapie, der sich in einer Regression des Tumors widerspiegelt, über den gesamten Versuchszeitraum direkt verfolgt werden kann. Generell verwendet man hierzu immundefiziente Mäuse, weil in gesunden, immunkompetenten Mäusen solche Xenotransplantationen eine starke Abstoßungsreaktion hervorrufen würden.

Alternativ gibt es die Möglichkeit die Tumorzellen in das entsprechende Mausegewebe (orthotop) zu injizieren. Dieses Modell ist nicht nur aufwendiger, auch die Beurteilung des Tumorwachstums kann nur einmal - *post mortem* - vorgenommen werden. *Alisauskus et al.* fand beim Vergleich der Wachstumskurven zwischen orthotop und subkutan implantierten humanen Pankreaskarzinomen keine Unterschiede (Alisauskus et al., 1995). Zudem konnte von Nakajima et al. festgestellt werden, dass die Anwachsrate in beiden Modellen identisch sind (Nakajima et al., 1990).

Eine weitere wichtige Frage zur Beurteilung des geeigneten Modells ist, inwieweit auf immundefizienten Mäusen heterotransplantierte Tumore in ihren Eigenschaften noch mit dem Ausgangsmaterial übereinstimmen. Hierbei sind das histologische und das elektronenoptische Erscheinungsbild stark beachtete Kriterien. In guter Übereinstimmung berichtet eine Vielzahl von Autoren (Polvsen and Rygaard 1971, Polvsen 1981 und Basert 1981) über eine im allgemeinen weitreichende Beibehaltung der im Ausgangstumor zu findenden spezifischen und charakteristischen Struktur auch nach Heterotransplantation auf immundefizienten Mäusen. Diese erstreckt sich hinsichtlich zu beobachtender Zelltypen wie Aufbau des Tumors. Ein subkutanes Xenotransplantat-Modell bietet somit die Reflektion der klinischen Situation (Kubota et al., 1993; Duplan, 1984; Imaizumi et al., 1993) und wurde daher für die ersten *in vivo* Untersuchungen von APIT ausgewählt.

Als erster Schritt für die Etablierung von Xenotransplantatmodellen wurden geeignete Tumorzelllinien ausgewählt. Die Zelllinien sollten sich sowohl in der Empfindlichkeit gegenüber APIT unterscheiden als auch im Zelltyp. Die Lungenkarzinomzellen GLC4/ADR sind semi-adhärenente Zellen mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 8,5 ng/ml APIT und aufgrund ihrer Apoptoseresistenz interessant für weitere Therapieversuche. Zum anderen bot sich die Leukämiezelllinie CEM neo an, Suspensionszellen, die mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 5,6 ng/ml APIT zu den mit am stärksten reagierenden Zellen gehörte.

Die Anwachsrate und das Tumorwachstum spielen eine wichtige Rolle für die Auswertbarkeit und Reproduzierbarkeit eines Tiermodells. Zur Bestimmung der optimalen Zellkonzentration wurden verschiedene Mengen GLC4/ADR und CEM neo subkutan injiziert und das Wachstum der Tumore über einen definierten Zeitraum gemessen. Zur anschließenden Bewertung wurden das Tumolvolumen und die Tumorverdopplungszeit berechnet.

Für beide getesteten Zelllinien konnte gezeigt werden, dass subkutane Tumore ein konzentrationsabhängiges Wachstum aufweisen, d.h. nach Injektion der am niedrigsten eingesetzten Zellkonzentration ( $1 \times 10^6$  Zellen) entwickelten sich wenige Tumore, die bei Versuchsende die kleinsten Tumorumfänge aufwiesen. Die Applikation der höchsten Zellkonzentration ( $1 \times 10^7$  Zellen) führte zu den meisten und größten Tumoren am Ende des Experiments (Abbildung 17). Die Suspension- und die semi-adhärenenten Zellen zeigten keinen Unterschied in der Anwachsrate.

Damit ergab die Evaluierung der optimalen Zellzahl  $1 \times 10^7$  Zellen pro Injektion. Eine tumorspezifische Mindestzahl an Zellen ist Voraussetzung für das Angehen transplantierter Tumoren, da unmittelbar nach der Injektion ein Großteil der injizierten Tumorzellen zugrunde geht (Kindred and Wechsler, 1978). Auf diese erste Periode folgt die Adaptionsphase, in der die am Leben gebliebenen Zellen persistieren, ohne sich wesentlich zu vermehren. Erst in der dritten Phase kommt es dann schließlich zum Wachstum der adaptierten Tumorzellen (Shin et al., 1977). Beobachtet wurde, dass die Adaptionszeiten bei hoher Dichte von Tumorzellen merklich kürzer sind als beim Vorliegen von Tumorzellinseln in ausgedehntem, bindegewebsartigem Stroma (Fortmeyer, 1981). Der anfänglich ausgedehnte Gewebsuntergang ist auf das Fehlen jeglicher Vaskularisation zurückzuführen. Es bleiben lediglich die Zellen am Leben, die sich *per diffusionem* zu ernähren vermögen, vorwiegend also randständige Zellen (Bastert et al., 1981 a). Für das Einsetzen progressiven Wachstums in der dritten Periode ist das Vorhandensein angiogener Faktoren erforderlich (Reid and Shin, 1978; Giovanella and Fogh, 1978), die neoplastische Zellen normalerweise aufweisen (Folkman, J. et al., 1971).

Als weitere Zelllinie wurde für Etablierungsversuche die Sarkoma-Zelllinie A673 gewählt. Mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 5 ng/ml reagieren diese adhärenenten Zellen sehr stark gegenüber APIT. Aufgrund der hohen Inzidenz in der Bevölkerung wurde zu der resistenten Lungenkarzinomzelllinie GLC4/ADR zudem die Parenteralzelllinie GLC4 mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 8,5 ng/ml APIT gewählt. Als dritte Zelllinie wurde das Kolonkarzinom gewählt, das bei einer Konzentration von  $0,125 \times 10^5$  Zellen einen  $IC_{50}$ -Wert von 6 ng/ml APIT aufweist. Das kolorektale Karzinom stellt nach dem

Brustkarzinom die zweithäufigste durch Krebs bedingte Todesursache in Deutschland dar.

Die Anwachsrate lag bei allen injizierten humanen Tumorzelllinien (A673, CEM neo, GLC4, GLC4/ADR und HT29) nach Injektion von  $1 \times 10^7$  Zellen bei mindestens 80%. Das bedeutet, dass alle Zelllinien das definierte Mindestvolumen und die Verdopplungszeit im Rahmen der festgelegten Kriterien erreichten. Bei dem Lungenkarzinom (GLC4/ADR), dem Weichteilsarkom (A673) und dem Darmkarzinom (HT29 in Nude-Mäusen) entwickelten alle Mäuse sogar zwei Tumore, eine Erfolgsrate von 100%. Dies deckt sich auch mit den Daten anderer Autoren, die u.a. die humanen Kolonkarzinomzelllinien KM12C und KM12SM (Ogata et al., 1998) sowie HT29 (Jojovic et al., 2000) subkutan injizierten.

Zu den Charakteristika des kleinzelligen Bronchialkarzinoms gehören unter anderem eine hohe Proliferationsrate und ein schnelles Wachstum. Interessanterweise hatten die Lungenkarzinomzelllinie GLC4 und deren resistente Subform GLC4/ADR unterschiedliche Anwachsrate: Mäusen, denen nicht resistente Zellen (GLC4) injiziert wurden, entwickelten 8 von 10 möglichen Tumoren, während die Anwachsrate der resistenten Tumorzelllinie GLC4/ADR bei 100% lag. Vermutlich kommt diese bessere Anwachsrate der resistenten Zelllinie aufgrund der höheren Malignität und der höheren Aggressivität der Zellen zustande.

Die Leukämiezelllinie CEM neo, die zur Evaluierung der Zellzahl injiziert wurde, wuchs auch bei Wiederholungsversuchen zu 90% an und erreichte die Verdopplung des Mindestvolumens von  $100 \text{ mm}^3$  im Durchschnitt innerhalb von 1,3 Tagen und somit am schnellsten. Gefolgt von dem Rhabdomyosarkom A673, das im Durchschnitt 1,6 Tage zur Verdopplung des Volumens benötigte (Tabelle 3).

Der Körpergewichtsverlauf der Versuchstiere gibt wichtige Hinweise auf den Gesundheitszustand der Tiere. Ein paar Tage nach der Injektion der ausgewählten Zelllinien traten bei einigen Mäusen geringe Gewichtsschwankungen auf. Aber alle Mäuse hatte am Ende des Versuchs mehr Gewicht zu verzeichnen als am Versuchsbeginn. Dies kann als Indiz dafür gelten, dass subkutan wachsende Tumore die Tiere nicht in ihrem Allgemeinbefinden stören. Bei orthotopen Zellinjektionen hingegen kommt es häufig im letzten Versuchsdrittel zu starken Gewichtsverlusten. Diese Beobachtungen machten z.B. *Funahashi et al.* (1999), die nach orthotoper Transplantation von Kolonkarzinomfragmenten den Versuch zwischen Tag 28 und Tag 32 beenden mussten, da die Mäuse eine Kachexie entwickelten. Das Phänomen der

Kachexie ist bei Menschen mit Tumorerkrankungen ein großes Problem. Es ist ein multifaktorielles Geschehen, das zum einen mit einer verringerten Nahrungsaufnahme und zum anderen mit pathologischen Abläufen im metabolischen Stoffwechsel zusammenhängt. Viele unterschiedliche Mediatoren wie Zytokine, Hormone und tumorspezifische Faktoren sind daran beteiligt, allerdings sind die direkten Zusammenhänge bis heute nicht vollständig aufgeklärt (Fearon und Moses, 2002; Strain, 1979). Bei dem etablierten subkutanen Xenotransplantat-Modell hingegen ist die Belastung der Versuchstiere als relativ gering einzustufen.

Vor einer klinischen Erprobung und Einführung eines neuen Medikaments sind Therapieversuche an etablierten Tiermodellen nötig. Sinn und Zweck solcher Versuche ist es, den Nutzen und die Nebenwirkungen eines neuen Behandlungsverfahrens sowie die einzusetzenden Dosierungen und Behandlungsschritte zu überprüfen. Im Vordergrund steht die allgemeine Verträglichkeit des neuen Medikaments. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit bedeutet das die Überprüfung der Toxizität von APIT in verschiedenen Dosierungen und ihre Verteilung und Verstoffwechslung im Organismus (Pharmakokinetik). Die Biokinetik von APIT ist unter physiologischen Bedingungen noch unbekannt, deshalb ist es schwierig einzuschätzen, wie der lebende Organismus auf APIT reagieren wird. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine Indizien, ob und wie körpereigene Substanzen den APIT induzierten Zelltod abschwächen oder potenzieren. Als Anhaltspunkt für eine erste Dosierung dienen die erfolgreichen *in vitro* Daten.

Nachdem alle ausgewählten Zelllinien sowohl *in vitro* sensitiv gegenüber der APIT induzierten Wirkung getestet wurden, als auch erfolgreich *in vivo* etabliert werden konnten, wurde schließlich ein Pilot-Therapieversuch durchgeführt. In dem untersucht wurde, ob eine Tumorentstehung durch eine frühe APIT Therapie verhindert werden kann.

Die Leukämiezelllinie CEM neo und das Weichteilsarkom A 673 boten sich aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit gegenüber der zytotoxischen Wirkung von APIT *in vitro* und der guten Entwicklung *in vivo* besonders für die Therapieexperimente an.

In diesem Pilot-Therapieversuch wurden zwei weibliche RAG<sup>-/-</sup> Mäuse im Alter von 7 Wochen 1 x 10<sup>7</sup> CEM neo Leukämiezellen subkutan in die jeweiligen Flanken injiziert. An Tag 2, 4 und 6 nach Injektion der Tumorzellen wurde eine Maus mit 20 µg APIT und die andere mit 50 µg APIT intraperitoneal behandelt. Die Kontrollgruppe bestand aus 10 weiblichen RAG<sup>-/-</sup> Mäusen, die nach der Injektion von 1 x 10<sup>7</sup> CEM neo Zellen nicht mit APIT behandelt wurden. Sowohl die behandelten als auch die unbehandelten

Mäuse befanden sich bei Versuchsende in einem sehr guten Gesundheitszustand. Dies lässt auf eine sehr gute Verträglichkeit der verabreichten APIT-Dosen schließen (3 x 20 µg bzw. 3 x 50 µg APIT). In der Kontrollgruppe entwickelten sich 18 von 20 möglichen Tumoren, was einer Anwachsrate von 90% entspricht. Wurden die Mäuse hingegen mit APIT behandelt, entwickelten die behandelten Mäuse jeweils nur einen Tumor. Zudem ist das Tumolvolumen der Maus mit der höheren APIT Dosis kleiner als das Tumolvolumen mit der niedrigeren APIT Konzentration. Diese Ergebnisse sind erste vielversprechende Hinweis auf die Wirkung von APIT *in vivo*.

Für die weitere Untersuchung von APIT in Bezug auf seine therapeutische Wirkung *in vivo* ermöglichen die in dieser Arbeit etablierten subkutanen Xenotransplantat-Modelle die besten Voraussetzungen, da Primärtumore präzise zu messen sind und die Belastung für die Tiere gering gehalten werden kann.