

1.0 Einleitung

1.1 Neue Wirkstoffe aus dem Meer

„Marine Natural Products Chemistry is a child of the 1970's that developed rapidly during the 1980's and matured in the last decade“, stellt D. John Faulkner, einer der Pioniere auf diesem Gebiet, in seinem Milleniumreview (Faulkner, 2000) rückblickend fest. Und tatsächlich lässt sich das zunehmende Interesse an den „neuen Stoffen aus dem Meer“ auch in den steigenden Zahlen der auf eine Antitumorwirkung getesteten Tierextrakte mariner Herkunft ablesen: Das *Cancer Chemotherapy National Service Center (CCNSC)*, eine Einrichtung des *United States National Cancer Instituts (NCI)*, bietet seit 1955 die Ressourcen für eine präklinische Analyse von synthetischen oder natürlichen Molekülen hinsichtlich ihrer tumorwachstumsstoppenden bzw. tumorabtötenden Eigenschaften. 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).

Einer der Hauptgründe für diese Steigerung liegt in der schier unerschöpflichen Zahl unterschiedlicher, oft einzigartiger chemischer Strukturen und funktioneller Gruppen, die das marine System hervorbringt (Faulkner, 2000). Pharmakologen betrachten Meeresorganismen gerne als eine umfassende Bibliothek biologisch wirksamer Naturstoffe mit Arzneipotential (Harvey, 1999). Deren Mannigfaltigkeit ist Voraussetzung für den Erfolg gängiger Ansätze zur Arzneientwicklung: In großen Testreihen werden Substanzen auf spezifische Eigenschaften, z.B. antimikrobielle Aktivität, untersucht; ihre Auswahl geschieht dabei rein zufällig. Das heißt aber, umso größer die Zahl der unterschiedlichen Substanzen ist, desto größer ist auch die Chance auf einen Treffer. Zwar eröffnet die kombinatorische Chemie die Möglichkeit, eine große Zahl variabler chemischer Strukturen synthetisch herzustellen, trotzdem hat die „natürliche Bibliothek“ Meer einige entscheidende Vorteile (Harvey, 1999). Neben der bereits erwähnten strukturellen Diversität erfüllen viele Naturstoffe pharmakologische Grundvoraussetzungen – sie werden aufgenommen und verstoffwechselt. Außerdem treten sie oft in Familien verwandter Moleküle auf, so dass eine Strukturanalyse verschiedener Homologe eine Aussage über Struktur-Funktions-Zusammenhänge erlaubt.

Die Nachteile gegenüber einer „synthetischen Bibliothek“ der kombinatorischen Chemie liegen in der oft beeindruckenden Komplexität der natürlichen Moleküle und deren Verfügbarkeit. So mussten zur Gewinnung von 18 g *Bryostatin 1*, eines 1969 erstmalig beschriebenen Antitumorwirkstoffs, die enorme Menge von 13.000 kg Biomasse des

Bryozoens *Bugula neritina* abgeerntet werden (Cragg, 1998). Solche groß angelegten Sammlungen sind natürlich mit irreversiblen Eingriffen in das betroffene Ökosystem verbunden. Gelingt es nicht, den produzierenden Organismus zu kultivieren (wie es im Fall von *B. neritina* gelungen ist) bzw. das natürliche Molekül synthetisch nachzubauen, ist die mangelnde Verfügbarkeit einer noch so aussichtsreichen Substanz zwangsläufig mit dem Abbruch der Studie verbunden.

Trotz dieser Nachteile stellen Naturstoffe mit 39% einen großen Anteil aller zwischen 1983 und 1994 zugelassenen Arzneimittel dar (Harvey, 1999). Bei den antibakteriell und antineoplastisch wirksamen Substanzen sollen sie sogar 60 bis 80% ausmachen.

Das eben erwähnte Beispiel *Bryostatin 1* zeigt neben gängigen Problemen auch die Langatmigkeit der Arzneimittelentwicklung auf (Cragg, 1998): Eine erste Sammlung von *B. neritina* war bereits 1966 an der Westküste von Florida erfolgt. Drei Jahre später zeigte ein wässriger Isopropanolauszug der Organismen dann eine gewisse antineoplastische Aktivität in einem Maus-Leukämie-Modell. Weitere Sammlungen in den Jahren 1970 und 1971 zeigten keine Aktivität. Erst eine Serie von Sammlungen im Golf von Kalifornien in den Jahren 1976 und 1980 erbrachte Material mit ausreichender Aktivität, so dass eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung im Jahre 1981 zur Isolierung des Moleküls führte. Zunächst wurde die weitere klinische Entwicklung wegen mittelmäßiger Ergebnisse bei anderen Tumormodellen eingestellt. Neuerliche Tests mit insgesamt 60 humanen Tumorzelllinien zeigten 1987 jedoch eine potente selektive Wirkung von *Bryostatin 1*, die eine klinische Weiterentwicklung rechtfertigte. Nach der beschriebenen Verfügbarkeitsproblematik, die im Jahre 1995 nach mehrjähriger Entwicklungsarbeit durch eine Aquakultur des Organismus gelöst wurde, befindet sich *Bryostatin 1* seit 1998 endlich in Phase II der klinischen Studien – 32 Jahre nach der ersten Sammlung.

Jeder neue Wirkstoff durchläuft vor seiner Zulassung als Arznei eine präklinische und insgesamt drei klinische Phasen. Die präklinische Phase beinhaltet zielgerichtete Suche und Analyse, erste *in vitro*- (Zellkultur) und *in vivo*- (Tiermodelle) Studien zu Wirkspektrum und Toxizität und schließlich die Definition der Darreichungsform. In der ersten klinischen Phase wird ein Wirkstoff an gesunden Testpersonen auf seine Verträglichkeit und eventuelle Nebenwirkungen untersucht. Es folgt die zweite klinische Phase, eine erste Erprobung der Wirksamkeit an Patienten neben einer Einstellung der Dosierung. Die dritte klinische Phase umschließt einen Vergleich der Wirksamkeit und der Verträglichkeit mit Alternativ- und

Placebopräparationen. Dieser findet in umfangreichen Tests mit der endgültigen Formulierung des Wirkstoffs statt (Schwarz, 2000; Bahnsen, 2002).

Auch *Dolastatin 10*, ein antineoplastisches Depsipeptid, das bereits 1965 in geringen Spuren (0,000001 bis 0,0000001%) aus dem „Seehasen“ *Dolabella auricularia* isoliert wurde, befindet sich zur Zeit in der zweiten klinischen Phase. Es soll sich hierbei um den potentesten Antitumor-Wirkstoff handeln, der zur Zeit verfügbar ist. Seine Wirkung besteht in einer spezifischen Inhibition der Polymerisierung von Tubulin.

1.2 „Seehasen“ als Wirkstoffquelle

„This hare doth cause terror in the sea; on land he is as the poor little hare, fearful and atrembling.“ (Olaus Magnus, 1555)



Abb. 1.2: *Aplysia punctata* (aufgenommen von Erwin Köhler, Darmstadt)

Dolastatin 10 ist nur eine von vielen biologisch aktiven Substanzen, die aus verschiedenen Genera von „Seehasen“ isoliert wurden (Yamada, 1997). „Seehasen“ sind marine Schnecken (*Gastropoden*) mit weltweiter Verbreitung. Sie gehören der Unterklasse *Ophistobranchia* an und bilden in der Ordnung *Anaspidea* die Familien *Aplysiidae* und *Akeridae* mit insgesamt neun Genera: *Akera*, *Aplysia*, *Dolabella*, *Dolabrifera*, *Petalifera*, *Phyllaplysia*, *Notarchus*, *Stylocheilus* und *Bursatella* (Johnson, 1999). Spätestens seit den neurophysiologischen Arbeiten zu Lernen und Gedächtnis von E.R. Kandel, die ihm 2000 den Nobelpreis für

Medizin einbrachten, sind Aplysien jedem naturkundlich Interessierten bekannt. Erste schriftliche Erwähnungen der Tiere datieren aber wesentlich früher: Schon Plinius der Ältere gab den Schnecken im ersten Jahrhundert nach Christus in seiner *naturalis historia* wegen ihrer auffallenden, an Hasenohren erinnernden Rhinophoren den Namen *Lepus marinus*, „Seehase“. Noch bis Ende des 19. Jahrhunderts galten Seehasen als für den Menschen außerordentlich giftig. Mit Extrakten der Tiere sollen Herrscher des Altertums ihre politischen Feinde ermordet haben, der Kontakt mit Sekretionen von Aplysien führte angeblich zu Urtikaria und schweren Entzündungen (Halstead, 1988).

Erst Anfang des 20. Jahrhunderts wurden systematische toxikologische Studien mit den Sekretionen von *Aplysia depilans* durchgeführt (Flury, 1915). Alle Seehasen besitzen eine sogenannte Tinten-Drüse am Rand des Mantels und sind in der Lage, bei Gefahr eine Tinte unterschiedlicher Farbe (Violett, Weiß, Schwarz) abzugeben (Johnson, 1999). Mit einer blasrohrartigen, häutigen Struktur, dem Siphon, können sie die Tinte sogar gezielt auf den Angreifer richten. Eine weitere Drüse im Bereich des Mantelhöhlenbodens, die sogenannte Opalin-Drüse, produziert ein weißliches, zähflüssiges Sekret.

Die Berichte über heftige Hautreaktionen bei Kontakt mit den Aplysia-Sekretionen bestätigten sich nicht, ebenso zeigten Kaninchen, denen 1 ml der weißlichen Sekretion von *A. depilans* (es ist umstritten, ob Flury weiße Tinte oder Opalin eingesetzt hat) injiziert wurde, keinerlei Reaktion. Dagegen entwickelten unterschiedliche Coelenteraten, Anneliden, Echinodermen, Mollusken, Arthropoden, Fische und Frösche nach einer Injektion der Sekretion eine Muskelparalyse bis hin zum Tod. Eine einmalige Injektion von 0,1 ml in Frösche hatte zunächst eine Steigerung der Reflexe und eine anschließende ausgeprägte Muskelparalyse innerhalb von 25 Minuten zur Folge. Die Tiere starben innerhalb von zwei bis vier Stunden (Flury, 1915). Eine erkennbare Säugetiertoxizität wiesen krude Präparationen der Mitteldarmdrüse (auch als Verdauungsdrüse bezeichnet) von *A. californica* bei intraperitonealer Verabreichung auf (Winkler, 1961): Die LD₅₀ für so behandelte Mäuse lag zwischen 0,0028 und 0,036 g Drüsenpräparation/g Körpergewicht.

Wer sich mit den Tieren beschäftigt, bekommt rasch den gängigen Witz zu hören, „Seehasen“ hätten keine natürlichen Feinde – außer Neurobiologen... Das stimmt so nicht wirklich (Johnson 1999), trotzdem fällt die geringe Zahl von Räubern auf, die „Seehasen“ regulär erbeuten - einige Seeanemonen, Seesterne, räuberische Schnecken und Krebse. Experimente, bei denen Fischen und Anemonen Stücke von „Seehasen“ (Russel, 1966), deren Eigelege (Pennings, 1994) oder mit Tinte behandelte, normalerweise essbare Fischteile (Nolen, 1995)

angeboten wurden, legten nahe, dass in den Geweben und Sekretionen ungenießbar machende Stoffe enthalten sein mussten. Ungenießbar übrigens auch für den menschlichen Geschmack, wie einige Autoren nach Selbstversuchen gerne feststellen (z.B. Nolen, 1995). Diese chemische Art der Verteidigung muss nun so erfolgreich sein, dass sie den Schutz, den eine harte äußere Schale bietet, vollständig ersetzen kann. „Seehasen“ haben diese nämlich fast vollständig aufgegeben, im Mantel ist nur ein etwa fingernagelgroßes Rudiment erhalten geblieben.

All diese Faktoren - von der Legende der Gefährlichkeit der Tiere bis hin zu der wirkungsvollen chemischen Verteidigung - haben recht bald das Interesse der „Marine Naturstoffe“-Forscher auf sich gezogen.

In den Jahren 1959 bis 1963 wurden unabhängig voneinander verschiedene Moleküle aus den Mitteldarmdrüsen von *A. californica* (Winkler, 1961) und *A. kurodai* (Tanaka, 1959; Yamamura, 1963) isoliert und als *Aplysin* bezeichnet. Winkler charakterisierte sein *Aplysin*, nichts über dessen stoffliche Natur wissend, hinsichtlich seiner pharmakologischen Effekte als cholinomimetisch. Die japanische Arbeitsgruppe hatte ihr *Aplysin* als bromiertes Sesquiterpen identifiziert, wusste aber nichts über dessen Toxikologie. Einige Jahre später wurden weitere toxische Faktoren in der Mitteldarmdrüse von *A. pulmonica* identifiziert und zunächst als wasserlösliches Toxin sowie als etherlösliches Toxin bezeichnet (Watson, 1973). Ein Vergleich der pharmakologischen Eigenschaften von wasserlöslichem Toxin und Winklers *Aplysin* zeigte viele Ähnlichkeiten (Watson, 1973). Letzteres wurde 1975 als Urocanylcholin identifiziert, das zur Familie der toxischen Murexine gehört (Blankenship, 1975). Das etherlösliche Toxin stellte sich 1974 als Mischung terpenoidartiger Substanzen heraus, zum Teil bromiert (Kato, 1974), entsprechend dem *Aplysin* von *A. kurodai*.

Seitdem sind eine Vielzahl niedermolekularer Substanzen mit einem breiten Spektrum biologischer Aktivitäten aus unterschiedlichen „Seehasen“-Spezies isoliert worden (Yamada, 1997; Avila, 1995; Carefoot, 1987). Die meisten, vielleicht sogar alle, stammen aus der Nahrung der Tiere und werden von ihnen in der Mitteldarmdrüse und der Haut angereichert. So wurde das bromierte Sesquiterpen *Aplysin* in der Rotalge *Laurencia*, einer gängigen Nahrungsquelle von „Seehasen“, nachgewiesen (Irie, 1969). Der oben erwähnte, sehr potente Antitumorwirkstoff *Dolastatin 10* stammt aus der Blaualge *Symploca* (Luesch, 2001). Setzt man z.B. *A. californica* auf eine Grünalgen-Diät, verwehrt ihnen also die Aufnahme der sekundären Rotalgenstoffe, dann verlieren sie schnell ihren unangenehmen Geruch und Geschmack (Nolen, 1995). Auch der Farbstoff der violetten Tinte, es handelt sich dabei um

Phycoerythrobilin (65% der Trockenmasse; Troxler, 1981), ist pflanzlicher Herkunft. „Seehasen“, die sich ausschließlich von Grünalgen ernähren, dies ist bei *A. juliana* der Fall, bilden weder eine violette Tinte, noch ist ihr Laich rötlich gefärbt (Johnson, 1999).

Rätsel gab lange Zeit die Ungenießbarkeit des „Seehasen“-Laichs und tintenbehandelter Fischteile auf, denn beides ist frei von den bislang isolierten niedermolekularen Metaboliten (Johnson, 1999).

1.3 Aplysianine, Julianine und andere bioaktive Glykoproteine

Die Analyse der eiweißartigen Bestandteile von marinen Organismen ist von den „Marine Natural Products“-Chemikern lange Zeit sehr stiefmütterlich behandelt worden (Keefe, 2001). Das liegt wohl daran, dass die Isolation eines aktiven Proteins im allgemeinen als schwierig und zeitaufwendig betrachtet wurde, insbesondere weil viele Proteine während der Aufreinigung ihre Stabilität verlieren. Außerdem waren Techniken zur Charakterisierung, wie Aminosäureanalyse, Massenspektrometrie oder Sequenzierung, bislang nicht allgemein verfügbar. Auch der Einsatz von eiweißartigen Therapeutika birgt viele Risiken, wie eine mögliche Immunantwort und die Unsicherheit der molekularen Zusammensetzung gentechnisch hergestellter Präparationen (Bahnsen, 2002).

Es war eine Arbeitsgruppe der *Teikyo Universität* in Japan, die im Jahre 1984 die antibakteriellen und zytolytischen Eigenschaften eines Faktors beschrieb, der im Laich von *A. kurodai* enthalten sein sollte (Kamiya, 1984; Yamazaki, 1984). In den darauf folgenden Jahren gelang dieser Gruppe die Isolierung und Charakterisierung dreier hochmolekularer, zytolytischer Glykoproteine aus dem Laich, der Albumen Drüse und der Tinte von *A. kurodai*. Diese Proteine wurden entsprechend ihrer jeweiligen Herkunft als *Aplysianin E* (eggs; Kisugi, 1987), *Aplysianin A* (albumen gland; Kamiya, 1986) und *Aplysianin P* (purple fluid; Yamazaki, 1989) bezeichnet.

Aplysianin E ist ein Trimer mit einem Gesamtmolekulargewicht von 250 kD und einem Zuckeranteil von 8%. *Aplysianin A* weist eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung auf wie die E-Form und zeigt außerdem eine Kreuzreaktion mit einem anti-*Aplysianin E* Antikörper. Es scheint sich daher bei *Aplysianin A* möglicherweise um eine Vorstufe des Letztgenannten zu handeln (Yamazaki, 1989). Abweichend von der E-Form besteht die A-Form allerdings aus vier gleichen Untereinheiten mit einem Gesamtmolekulargewicht von 320 kD, der Zuckeranteil liegt bei 9,8%. Die P-Form zeichnet sich gegenüber den beiden anderen durch

eine völlig andere Aminosäurezusammensetzung, einen höheren Zuckeranteil von 18% und dem Vorliegen als Monomer von 60 kD aus (Yamazaki, 1989).

Alle drei Glykoproteine zeigen die gleichen antibakteriellen und antineoplastischen Eigenschaften: Sie inhibieren reversibel die DNA-Synthese aller getesteten Bakterien - sowohl grampositiver wie *Staphylococcus aureus* als auch gramnegativer wie *Escherichia coli* - innerhalb weniger Minuten nach Zugabe. Weder Zellwandsynthese noch Proteinsynthese der Prokaryonten wird beeinträchtigt, der Effekt ist bakteriostatisch (Yamazaki, 1993).

Auch die Nukleinsäuresynthese von Tumorzellen wird durch die Aplysien-Glykoproteine gestoppt (Yamazaki, 1989), allerdings bleibt es nicht dabei. So wird auch die Synthese von Proteinen nach Behandlung mit den zytotoxischen Faktoren eingestellt und die Zellen sterben innerhalb von 15 Stunden auf zytolytische Art und Weise, nicht jedoch apoptotisch (Yamazaki, 1993). Besonders interessant werden die Aplysien-Glykoproteine durch ihre Spezifität für Tumorzellen. So sind zwar alle getesteten Maus- und Menschen-Tumorzelllinien von der zytolytischen Aktivität betroffen, nicht jedoch normale Körperzellen wie Milz-, Thymo- oder Erythrozyten der Maus bzw. Erythrozyten des Menschen (Yamazaki, 1993). Das Interesse wird noch gesteigert durch den Befund, dass sogar therapieresistente Tumore (z.B. TNF-resistente) der antineoplastischen Wirkung erliegen.

Ein Schlüsselschritt beim Ablauf des zytolytischen Programms scheint in einer Wechselwirkung zu liegen, an der Sialinsäure, ein negativ geladener Bestandteil von Zuckerseitenketten, beteiligt ist. Zugabe dieses Moleküls in großen Mengen bzw. Verdau der Tumorzelloberflächenzucker mit Glykosidasen inhibiert den Zelltod (Yamazaki, 1989).

Die biologische Funktion der zum Beispiel im Laich umfangreich enthaltenen Glykoproteine ist ungeklärt. Zwar deuten die oben erwähnten Fraßstudien - die Ablehnung von Fischen und Seeanemonen gegenüber dem Laich und tintenbehandelten Fischteilen - eine Beteiligung der Glykoproteine an der chemischen Abwehr von „Seehasen“ an. Bestätigende Experimente, etwa die Inaktivierung der Glykoproteine durch Erhitzen und anschließende Wiederholung der Fraßstudien, wurden bislang jedoch nicht durchgeführt. In Betracht wurde darüber hinaus auch eine die Embryogenese von „Seehasen“ regulierende Wirkung gezogen (Yamazaki, 1993).

Auch aus anderen „Seehasen“ wurden mittlerweile entsprechende Glykoproteine isoliert und charakterisiert (*Julianin E, G* und *S* [entspricht der P-Form]; *Dolabellanin A, C* und *P*;

Dactylomelin P und *Cyplasin L* [entsprechend der gängigen Nomenklatur *Punctatin A*] (Yamazaki, 1993; Melo, 2000; Petzelt, 2002). Während Abweichungen in der Zahl und der Größe der einzelnen Untereinheiten bei den A-, E-, G- (genital mass) und C- (coelomic fluid) Formen die Regel sind, bleiben diese Parameter bei allen P-Formen konstant: eine Untereinheit von etwa 60 kD (Yamazaki, 1993; Melo, 2000). Dafür zeigen die P-Glykoproteine eine größere Variabilität hinsichtlich ihrer Glykosilierung und Aktivität: *Aplysianin P* ist mit einem Zuckeranteil von 18% des Molekulargewichtes am ausgeprägtesten modifiziert. *Dolabellanin P* und *Dactylomelin P* dagegen weisen nur einen Zuckeranteil von 0,8% bzw. 0,05% auf. Alle drei unterscheiden sich in ihren antibakteriellen und zytolytischen Eigenschaften: *Aplysianin P* wirkt bakteriostatisch und lysiert spezifisch Tumorzellen im oben genannten Zeitraum von 15 Stunden. *Dolabellanin P* zeigt keine antibakterielle Wirkung, lysiert dafür ausnahmslos alle kernhaltigen Zellen innerhalb von zwei Stunden. Dieses Glykoprotein betreibt als einziges eine temperaturunabhängige Zytolyse (Yamazaki, 1993). *Dactylomelin P* besitzt zwar bakteriostatische Aktivität, jedoch keine zytolytische. Dafür zeigt sich eine hämagglutinierende Wirkung, die vor allem Kaninchenerythrozyten betreffen soll (Melo, 2000).

Der Exot unter den A-Formen ist sicherlich *Cyplasin L*, das aus Schleimabsonderungen der Albumen Drüse von *A. punctata* isoliert wurde (Petzelt, 2002). Zum einen liegt es mit einer Molekülmasse von 56 kD deutlich unter dem gängigen Format der anderen A-Glykoproteine, deren Untereinheiten sich alle bei 70 bis 85 kD bewegen. Zum anderen besteht sein Effekt nicht in der üblichen Zytolyse, sondern vielmehr in einer irreversiblen Depolymerisierung des Aktinskeletts der Zellen.

Allen „Seehasen“-Glykoproteinen ist gemein, dass sie ihre halbmaximale zytotoxische Aktivität bereits bei 1 – 100 ng Protein/ml erreichen (Yamazaki, 1993), also bei einer Konzentration von oft weniger als 1 nM.

1.4 Die Wege einer Zelle in den Tod

Lange Zeit galt der Tod einer Körperzelle als Resultat eines „katastrophalen Versagens ihrer Homöostase“ (Raffray, 1997), ausgelöst durch schädigende Noxen oder Traumata und verbunden mit entzündlichen Prozessen im umliegenden Gewebe. Als im Jahre 1972 Arbeiten veröffentlicht wurden, welche die Apoptose, eine gewollte Form des Todes, als fundamentalen zellulären Mechanismus der Gewebeerneuerung beschrieben (Kerr, 1972), änderte sich dieses Bild schlagartig. Schnell wurde klar, dass die kontrollierte Rückbildung

von Gewebe oder die Eliminierung schadhafter Zellen eine Grundvoraussetzung für die Differenzierung und Homöostase eines Organismus darstellt und ein Misslingen mit abnormer Entwicklung oder Krebs verbunden ist.

Der Term „programmierter Zelltod“ betont die genetische Determinierung bestimmter Zellen zu ihrem Untergang. So werden beispielsweise während der Embryogenese überflüssig gewordene Zellen mittels Apoptose bzw. einer Art Nekrose, gekennzeichnet durch autophagische Vakuolen, und einer anderen Art Nekrose ohne dieselben, eliminiert (Schweichel, 1973). Erste programmbestimmende Faktoren auf molekularer Ebene enthüllten „knock out“-Mutationen zweier Gene des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Ellis, 1996). Dieses „Haustier“ der Genetiker bildet im Laufe seiner Ontogenese exakt 1090 Körperzellen aus, von denen 131 im Zuge seiner Differenzierung den programmierten Zelltod sterben. Durch die bereits erwähnte Technik ist es möglich, Nematoden mit funktionslosen Produkten der Gene *ced-3* (*C. elegans* death-3) und *ced-4* (*C. elegans* death-4) zu erzeugen. Das Resultat: der 131-fach programmierte Zelltod blieb aus, die Genprodukte mussten also für seinen Ablauf unabdingbar sein.

Seit diesen ersten Erkenntnissen sind eine Vielzahl von Faktoren bekannt geworden, die in produktiver oder inhibierender Weise am apoptotischen Geschehen beteiligt sind. Grob lassen sie sich in Sensoren, Zentren der Integration und Effektoren unterteilen. Sensoren sind zum einen Todesrezeptoren der Plasmamembran, wie Fas/CD95 oder TNF α -Rezeptor, um nur die bekanntesten zu nennen. Zum anderen sind es aber auch kleine, intrazelluläre Proteine der BCL-2-Familie, wie Bim, das die Integrität des Zytoskeletts überwacht, oder Faktoren wie p53, das die Unversehrtheit der genomischen DNA überprüft. Wird einer dieser Sensoren aktiviert, kommt es zu einer Integration von pro- und antiapoptotischen Signalen in Form weiterer BCL-2-Familienmitglieder (Bid, Bad, Bcl-2 usw.), an deren Ende die Entscheidung für oder gegen den Fortbestand der Zelle steht. Diese Entscheidung kommt in der Translokation der proapoptotischen BCL-2-Familienmitglieder Bax und Bak zu den Mitochondrien, ihrer Konformationsänderung und Einbau in die Membran zum Ausdruck (Kaufmann, 2001). Es folgt die Freisetzung der proapoptotischen Faktoren Cytochrom C, AIF, Diablo/SMAC und Endo G ins Cytoplasma. Über die Bildung eines ATP-abhängigen Komplexes aus Cytochrom C, Apaf-1 und Procaspase 9, des sogenannten Apoptosoms, kommt es dann zu einer Aktivierung der Effektoren der Apoptose, den Caspasen.

Caspasen sind Cystein-Proteasen, die bestimmte Motive in ihren Substraten erkennen und an diesen Stellen proteolytisch schneiden. Dieser Schnitt kann zu einer Inaktivierung oder zu

einer Aktivierung des betroffenen Proteins führen. So können Caspasen andere Caspasen proteolytisch aktivieren, was zu einer regelrechten proteolytischen Kaskade führt. Inaktiviert eine Caspase ein inhibitorisches Protein, kommt es zu einer Aktivierung eines anderen. Bekanntestes Beispiel hierfür ist die proteolytische Befreiung der CAD (caspase activated DNase) von ihrem Inhibitor ICAD. CAD soll für die internucleosomale Fragmentierung der genomischen DNA während der Apoptose verantwortlich zeichnen, einem klassischen Indiz beim Nachweis der Zelltodform: Die so zerstückelte DNA zeigt auf einem nach Größe trennenden Agarosegel ein typisches Leitermuster.

Die Zelle wird regelrecht in ihre Einzelteile zerlegt. Dabei wird jedoch besonders darauf geachtet, dass die Integrität der Plasmamembran erhalten bleibt, also keine lytischen Enzyme ins umgebende Gewebe abgegeben werden. Auch die apoptotischen Körperchen, in welche die Zelle schließlich (mundgerecht für Phagozyten) zerfällt, sind durch die Aktivität einer Transglutaminase gegen unbeabsichtigte Desintegration stabilisiert. So wird gewährleistet, dass es im Umfeld der zugrunde gehenden Zelle nicht zu entzündlichen Prozessen kommt.

Nicht alle Zellen verfahren so kompliziert wie die eben beschriebenen Typ II-Zellen. Die so definierten Typ I-Zellen lassen die Zentren der Integration, BCL-2-Proteine und Mitochondrien, einfach „links liegen“ und starten bei Todesrezeptoraktivierung direkt die Effektorphase.

Die klassischen Kennzeichen einer Apoptose sind eine frühe „Blasenbildung“ der Plasmamembran, eine Externalisierung des negativ geladenen Membranphospholipids Phosphatidylserin und ein Schrumpfen der Zelle. Außerdem kondensiert die genomische DNA noch in der Zellkernperipherie, bevor dieser in einzelne Teile zerfällt. Diese Fragmentierung wird schließlich auch von der gesamten Zelle nachvollzogen. Neben den hydrolytischen Produkten der oben erwähnten CAD-Aktivität, DNA-Fragmenten von ~180 bp und deren Vielfache, reichern sich auch die proteolytischen Produkte der Caspasen in der Zelle an. Zu ihnen gehören PARP (Poly-ADP-Ribosylpolymerase), Lamine der Kernhülle, Bestandteile des Zytoskeletts wie Aktin, aber auch Proteinkinasen wie PAK 2 (P21 activated kinase) und viele andere. Ein interessantes Detail ist die Abhängigkeit dieser Form des Zelltodes von ATP. So kommt es bei ATP-depletierten Typ II-Zellen zwar noch zu einer Freisetzung von Cytochrom C nach Fas-Induktion, eine weitere Caspasenaktivierung und die folgenden Schritte werden jedoch nicht mehr initiiert (Eguchi, 1999).

Ganz anders verhält es sich bei der Nekrose. Auch bei dieser kann man zwar eine frühe „Blasenbildung“ der Plasmamembran beobachten (Boobis, 1989), doch die weiteren Abläufe lassen sich nicht so einheitlich charakterisieren, wie es bei der Apoptose möglich ist. Kennzeichnend ist der unmittelbare Integritätsverlust der Plasmamembran nach einem schädigenden Stimulus, dem eine Abgabe von Zellbestandteilen ins umgebende Gewebe und eine lokale Entzündungsreaktion folgt (Raffray, 1997).

Die Membranschädigung soll vier Komponenten beinhalten (Buja, 1993), die je nach noxischer Aktivität in unterschiedlichem Maße ausgeprägt sein können:

1. Phospholipasen werden aktiviert, die Phospholipide der Plasmamembran zu freien Fettsäuren und Lysophospholipiden zersetzen,
2. diese Produkte und andere amphipatische Lipide üben eine surfactantartige, die Oberflächenspannung herabsetzende Wirkung aus,
3. es kommt zu einer Degradation des membranassoziierten Zytoskeletts und
4. die Bestandteile der Membran werden direkt von ROS (reaktiven Oxygen Spezies), freien Radikalen und Lipidperoxiden angegriffen.

Mit der Integrität der Plasmamembran bricht auch die Homöostase der Zelle vollständig zusammen. Interessanterweise sollen Zellen (z.B. Thymozyten), die eine Nekrose iniszierende Schädigung erfahren haben, durch Faktoren wie Annexin 1, die die Aktivität der Phospholipase A2 beeinträchtigen, dazu veranlasst werden, trotzdem Apoptose zu vollziehen (Sakamoto, 1996). Analog den Mitochondrien bei der Apoptose könnten also die Plasmamembran und ihre Bestandteile als ein Zentrum der Integration bei Nekrose fungieren, das letztlich über die Form des Zelltodes entscheidet.

Nekrotische Zellen schwellen klassischerweise an, bevor ihre Membran perforiert. Auch bei ihnen lässt sich oft die Aktivität einer Cysteinprotease, nämlich Calpain, nachweisen. Diese hat Substrate, die teilweise auch von den Caspasen umgesetzt werden (z.B. Proteine des Zytoskeletts). Neben anderen wird auch PARP während der Nekrose proteolytisch fragmentiert, allerdings unterscheiden sich diese Spaltprodukte von den in der Apoptose generierten in ihrer Größe (Raffray, 1997). Während die oligonucleosomale Degradation der genomischen DNA ein klassisches Motiv der Apoptose ist, findet man bei Nekrose entweder gar keine DNA-Hydrolyse oder die Degradation trifft willkürlich alle Bereiche des Chromatins.

In einem orthodoxen Modell der dosisabhängigen Steigerung von Zellschädigung (Raffray, 1997) folgt Nekrose der Induktion von Apoptose bei weiter steigender Dosis einer Noxe. Bei geringer Intensität können Zellen einer Schädigung (z.B. Hitze) zunächst die zelleigenen Schutzmechanismen entgegen setzen (z.B. Hitzeschockproteine), sie können adaptieren. Bei allmählicher Steigerung der Intensität folgen dann sublethale Zellschäden, die reversibel sind (z.B. Abbau geschädigter Proteine durch das Proteasom; Neusynthese). Übersteigen die Schädigungen die zelleigenen Adaptations- und Reparaturkapazitäten, wird der kontrollierte Abbau der Zelle via Apoptose eingeleitet. Auch dieser Weg ist noch im Rahmen der Homöostase. Am Ende dieser Reihe steht schließlich die Nekrose, ein „katastrophales Versagen der Homöostase“. Ob sich Apoptose und Nekrose eventuell einige molekulare Pfade teilen oder aber essentiell verschiedene Zelltodformen darstellen, ist umstritten.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, das P-Glykoprotein der europäischen „Seehasen“-Art *Aplysia punctata* aus dessen Tinte zu isolieren und proteinbiochemisch/molekularbiologisch zu definieren. Um die Verfügbarkeit für weitere Studien sicherzustellen, sollte APIT (*Aplysia punctata* ink toxin) in einem heterologen System in großem Maßstab exprimiert werden. In zellbiologischen Experimenten sollte darüber hinaus der zytolytische Mechanismus, wenn vorhanden, aufgeklärt werden. Eine mögliche Tumorspezifität von APIT und *in vivo*-Studien (Maus) seiner Toxizität und Wirksamkeit sind Inhalt einer anderen Doktorarbeit in derselben Arbeitsgruppe am MPIIB.