

4 Ergebnisse

4.1 In vitro Untersuchung des *Aplysia punctata* ink toxin (APIT) induzierten Zelltods

Dieses 60 kDa große Glykoprotein wurde aus der Meeresschnecke *Aplysia punctata* aufgereinigt und als APIT (*Aplysia punctata* ink toxin) bezeichnet.

Erste Experiment konnten zeigen, dass APIT sowohl mikrobielle als auch zytotoxische Eigenschaften besitzt (Butzke, 2003). In dieser Arbeit sollen unterschiedliche humane Tumorzellen auf die tumorlytische Wirkung von APIT untersucht werden. Dabei soll getestet werden ob alle Tumorzellen gleich auf APIT reagieren oder ob es Unterschiede gibt die beeinflussbar sind. Diese *in vitro* Ergebnisse sollen für spätere *in vivo* Therapieversuche die Basis bilden.

4.2 Auswahl von geeigneten menschlichen Tumorzelllinien

Bei der Wahl der Tumorzelllinien wurden Tumorarten berücksichtigt, die häufig in der Bevölkerung vorkommen, die schlecht oder gar nicht therapierbar sind oder sich durch seltenes Vorkommen und schlechte Prognosen auszeichnen.

Eine der am häufigsten, vor allem bei Kindern und Jugendlichen auftretenden Krebsarten ist Leukämie. Leukämie ist eine Erkrankung, die durch maligne Transformation hämatopoetischer oder lymphatischer Zellen entsteht. Die in dieser Arbeit verwendeten Jurkat neo und CEM neo Zellen sind leukämische Zelllinien, die aufgrund der hohen Prävalenz auf ihre Empfindlichkeit gegenüber dem APIT-vermittelten Zelltod untersucht werden sollten. Diese Zelllinien sind isolierte T-Lymphozyten und mit dem Neomycin-Phosphotransferase-Gen (Neo-Gen)) transfiziert, wobei auf antibiotikaresistente Zellen selektioniert wurde. Außer den beiden akuten Leukämiezelllinien wurde auch eine chronisch myeloide Leukämiezelllinie verwendet die K562 Zelllinie.

Das Mammakarzinom ist in den westlichen Industrieländern das häufigste Karzinom bei Frauen. Die Zelllinie MCF7 wurde aus einem Mammakarzinom isoliert und mit Bcl-xL (MCF7-Bcl-xL) transfiziert. An den Mitochondrien stabilisiert Bcl-xL zusammen mit Bcl-2 das mitochondriale Transmembranpotential und verhindern die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranenraum der Mitochondrien (Shimizu et al., 1996 a, Shimizu et al., 1996 b). Durch die Überexpression des Bcl-XL Proteins in MCF7-Bcl-XL

wird somit die Mitochondrien-vermittelte Apoptose verhindert (Tsujiimoto and Shimizu, 2000) und die Zellen zeigen einen apoptoseresistenten Phänotyp. Als weitere Brustkrebszelllinie wurde die SK-BR-3-Zelllinie ausgewählt, die aus einem Brust-Adenokarzinom isoliert wurde.

Die am häufigsten diagnostizierte Tumorerkrankung des Mannes ist das Prostatakarzinom. Für die *in vitro* Versuche zur Ermittlung der Zytotoxizität von APIT wurden die PC3 und die DU145 Prostatazelllinien ausgewählt, wobei die PC3 Zellen aus einer Knochenmetastase und die DU145 Zelllinie aus einer Gehirnetastase isoliert wurde.

Das Bronchialkarzinom unterteilt man morphologisch in zwei verschiedene Arten von Lungentumoren: das kleinzellige und das großzellige Karzinom. Die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien GLC4 und GLC4 ADR gehören zu dem kleinzelligen Bronchialkarzinom, ein sehr bösartiger Tumor. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind in ca. 80 % der Fälle bereits Metastasen gebildet, daher geht die Erkrankung mit einer sehr geringen Lebenserwartung einher. Die Zelllinie GLC4 ADR ist eine Subzelllinie der kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie GLC4, die durch eine *in vitro* Selektion auf Doxorubizin, ein zu den Adriamyzinen gehörendes Chemotherapeutikum, gewonnen wurde. Die Überexpression von speziellen Membranpumpen, wie z.B. des Multidrug Resistenz Proteins (MRP), ist sehr häufig für Resistenzen gegen Chemotherapeutika in der Krebsbehandlung verantwortlich. Multidrug-Resistenz (MDR) beschreibt eine Kreuzresistenz von Zellen oder Mikroorganismen gegen verschiedene, strukturell oder chemisch nicht verwandte zytotoxische Substanzen. Die Lungenkrebszelllinie GLC4 ADR ist somit nicht nur gegen Doxorubizin resistent, sondern zeigt diesen Multidrug-resistenten Phänotyp.

Das Kolonkarzinom gehört zu den am häufigsten vorkommenden Krebsarten weltweit. Als Prototyp für eine Dickdarmkrebszelllinie wurden HT29 Zellen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber APIT untersucht.

Eine sehr seltene Tumorart ist das Ewing Sarkom. Es handelt sich hierbei um eine bösartige Knochen- und Weichteilgeschwulst, welche aus undifferenzierten Mesenchymalzellen des Knochenmarks hervorgeht. Für diese Tumorart gibt es noch keine erfolgreiche Therapieform. Einen Vertreter des Ewing Sarkom stellt die RD-ES Zelllinie dar. Ebenfalls zu den eher seltenen, bösartigen Tumorerkrankungen gehört auch das Rhabdomyosarkom, ein Weichteilsarkom. Zu ihm werden zahlreiche verschiedene Tumorarten gezählt, die im Fettgewebe, im faserreichen Stützgewebe, in den Muskeln sowie in den Blut- und Lymphgefäßen entstehen. Weichteilsarkome

werden derzeit durch Chemotherapie mit mäßigem Erfolg behandelt. Die Zelllinie A-673 ist ein Weichteilsarkom aus dem Muskelgewebe.

4.3 Empfindlichkeit verschiedener humaner Tumorzelllinien auf APIT

Um die tumorizide Wirkung von steigenden APIT-Konzentrationen auf bestimmte Tumorzelllinien zu untersuchen, wurde die Vitalität der verschiedenen Krebszelllinien in einem Proliferationstest gemessen. Da die Stoffwechselaktivität einer Zellpopulation in einem hohen Maß die Vitalität der Zellen widerspiegelt, lässt sie sich über den Umsatz des chromogenen Substrates WST-1 (Tetrazoliumsalz) quantifizieren.

Für erste *in vitro* Versuche wurden nicht adhärenenten Leukämiezellen gewählt. Diese humanen Suspensionszelllinien sind Zellen des Immunsystems oder deren Vorläufer und zirkulieren *in vivo* im Blutstrom. Suspensionszellen wurden daher als erstes getestet, damit APIT die Zellen von allen Seiten umspülen kann und somit eine möglichst große Angriffsfläche geboten wird.

Für die Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von APIT wurden Jurkat neo, CEM neo und K-562 in einer 96-Loch Mikrotiterplatte in einer Konzentration von $0,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch in RPMI mit 10% FCS ausgesät. In der obersten Reihe blieben die Zellen unbehandelt. Ab der zweiten Reihe folgte die APIT Behandlung in absteigenden Konzentrationen und in der untersten Reihe wurden die Zellen mit 5 % Triton x-100 als Negativkontrolle lysiert. Die 96-Loch Mikrotiterplatte wurde dann bei 37 C° und 5 % CO₂ für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurde ein WST-1 Test gemäß Herstellerangaben (Roche) durchgeführt. Die 96-Loch Mikrotiterplatte wurde erneut bei 37 C° und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach vier Stunden wurde das entstandene Formazan im Photometer bestimmt.

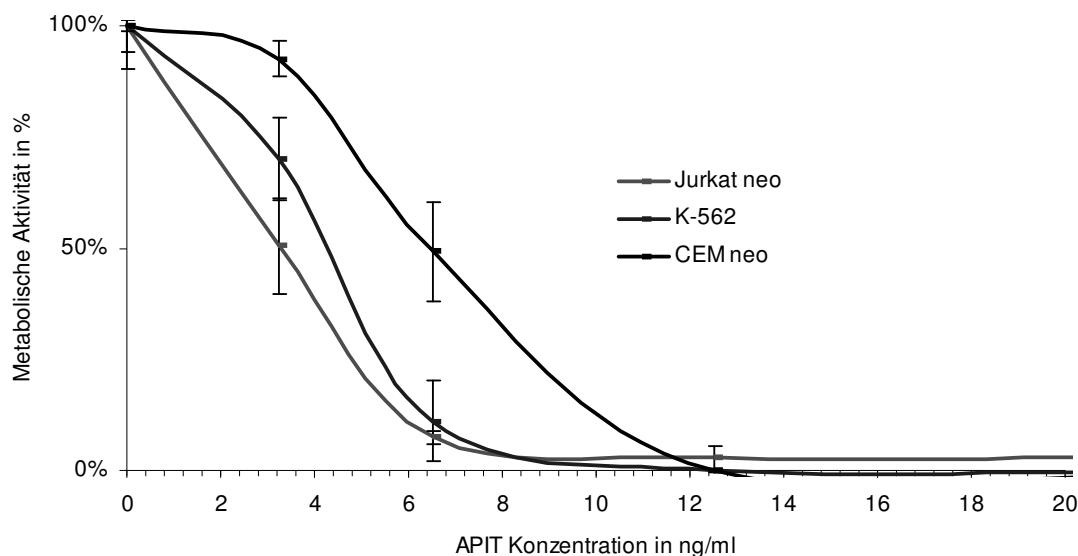


Abbildung 5: Unterschiedliche Sensitivität von Suspensionszellen gegenüber APIT.

In jede Vertiefung einer 96 Loch Mikrotiterplatte wurden 50.000 Zellen der jeweiligen Tumorzelllinien (Jurkat neo; K562 und CEM neo) zu steigenden APIT-Konzentrationen (120 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml 7,5 ng/ml 3,75 ng/ml) gegeben und 16 h inkubiert. 3-4 h nach Zugabe von WST-1 wurde die metabolische Aktivität photometrisch bestimmt. Als Kontrolle dienten entsprechende Ansätze ohne APIT-Behandlung. In der Graphik wurde die OD der unbehandelten Zellen gleich 100% vital gewertet. (Mittelwerte aus drei Replikaten +/- Standardabweichung)

Abbildung 5 zeigt die Reaktion der drei getesteten Leukämiezelllinien Jurkat neo, K562 und CEM neo auf steigende APIT-Konzentrationen. Alle drei Zelllinien reagieren sehr empfindlich auf den durch APIT induzierten Zelltod. Dabei ist die akute lymphoide Leukämiezelllinie Jurkat neo die die am empfindlichsten reagiert, gefolgt von der chronisch myeloiden Leukämie K-562 Zelllinie. Die akute lymphoblastische Leukämie CEM neo reagiert zwar von den drei Zelllinien am wenigsten, ist aber ebenfalls sehr empfindlich gegenüber dem APIT induzierten Zelltod. Anhand dieses Vitalitätstests wurden die einzelnen IC_{50} -Werte bestimmt. Der IC_{50} -Wert beschreibt die APIT Konzentration, die benötigt wird, um eine Abnahme der Vitalität der Zellen um 50 % zu erreichen. Die CEM neo Zelllinie erreicht den IC_{50} -Wert bei einer APIT-Konzentration von 6,5 ng/ml, die K-562 Zelllinie erreicht die halbmaximale Vitalität sogar schon bei einer APIT-Konzentration von 4,5 ng/ml. Die Jurkat neo Zelllinie reagiert sehr empfindlich, mit einem durchschnittlichen IC_{50} -Wert von 3,2 ng/ml und wurde daher für zukünftige Tests als Positivkontrolle eingesetzt (Abbildung 1).

Mit diesen positiven Ergebnissen, in denen die Empfindlichkeit von Suspensionszelllinien gegenüber APIT gezeigt wurde, und erste Richtwerte der einzusetzenden APIT-Konzentrationen, sollten auch adhärenente Zellen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber APIT getestet werden. Adhärenente Zellen wachsen an inerten Oberflächen als Monolayer oder Multilayer. Sie bilden zusammenhängende Zellschichten, wobei ihr Wachstum dichteabhängig gehemmt wird (Kontaktinhibition). Adhärenente Zellen leiten sich von Geweben wie Muskel, Nerven oder auch epitheliale Gewebe (z.B. Darm oder Bronchien) ab.

Als Vertreter adhärenenter Zelllinien wurden Brustkrebszellen (SK-BR-3), Prostatakrebszellen (PC-3), Darmkrebszellen (HT29) und Ewing-Sarkomzellen (RD-ES) verwendet.

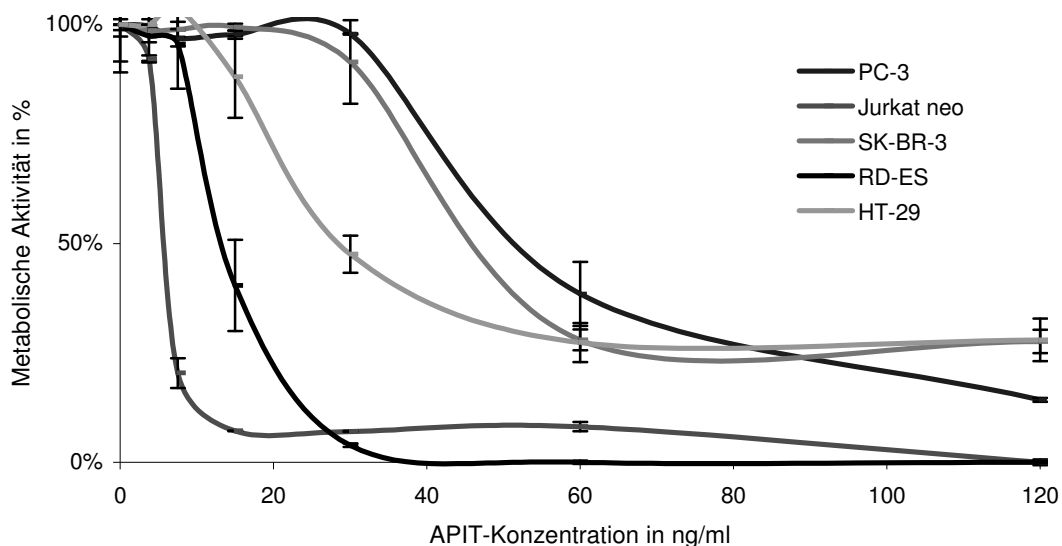


Abbildung 6: Unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen adhärenenten Tumorzelllinien. In jede Vertiefung einer 96 Loch Mikrotiterplatte wurden 50.000 Zellen der jeweiligen Tumorzelllinien (Jurkat neo; PC-3, SK-BR-3, RD-ES und HT-29) zu steigenden APIT-Konzentrationen (120 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml 7,5 ng/ml 3,75 ng/ml) gegeben und 16 h inkubiert 3-4 h nach WST-Zugabe wurde die metabolische Aktivität photometrisch bestimmt. Als Kontrolle dienten entsprechende Ansätze ohne APIT-Behandlung. In der Graphik wurde die OD der unbehandelten Zellen gleich 100 % vital gewertet. (Mittelwerte aus drei Replikaten +/- Standardabweichung)

In Abbildung 6 ist die metabolische Aktivität von fünf verschiedenen Tumorzelllinien gegen steigende APIT Konzentrationen dargestellt. Sehr empfindlich reagiert wiederum die Suspensionszelllinie Jurkat neo, die als Positivkontrolle diente.

Von den adhärennten Zellen reagiert die RD-ES Ewing Sarkomazelllinie sehr empfindlich. Weniger empfindlich reagieren die Darmkrebszelllinie HT-29 und die Prostatakrebszelllinie PC-3. Die Prostatakrebszelllinie PC-3 zeigt die geringste Empfindlichkeit gegenüber dem durch APIT induzierten Zelltod. So ist außer der stark reagierenden Jurkat neo Zelllinien auch das Ewing Sarkom RD-ES mit einem IC_{50} -Wert von 14 ng/ml sehr empfindlich gegenüber dem APIT induzierten Zelltod. Die Darmkrebszelllinie HT-29 reagiert mit 50 %-iger Einbußen ihrer Vitalität bei einer APIT Konzentration von 28 ng/ml. Die Prostatazelllinie PC-3 verliert ihre halbmaximale Vitalität ab einer APIT Konzentration von 44 ng/ml und die Brustkrebszelllinie SK-BR-3 erreicht ihren IC_{50} -Wert erst bei einer APIT Konzentration von 46 ng/ml.

Somit zeigen alle getesteten Tumorzelllinien eine Empfindlichkeit gegenüber APIT, die IC_{50} -Werte liegen bei jeder Zelllinie unter 50 ng/ml APIT. Allerdings wird deutlich, dass im Gegensatz zu Tumorerkrankungen des blutbildenden Systems höhere APIT Konzentrationen nötig sind.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, warum zum Erreichen des IC_{50} -Wertes bei adhärennten Zellen, außer dem Ewing Sarkom (RD-ES) eine höhere APIT-Konzentration nötig ist als bei Suspensionszelllinien. Im WST-1-Test konnte beobachtet werden, dass die folgenden, getesteten, unbehandelten, adhärennten Zelllinien, HT29, SK-BR-3 und PC3 bei 50.000 Zellen eine deutlich höhere metabolische Aktivität pro Zelle aufwiesen als die unbehandelte Suspensionszelllinie Jurkat neo.

Um zu überprüfen, ob bei geringeren Zellkonzentrationen die zytotoxische Wirkung von APIT einen größeren Effekt erzielt, wurden die weniger sensitiven Zelllinien, wie HT29 und PC3 Zellen in einem nächsten Schritt in kleineren Titrationsstufen erneut getestet.

4.4 Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber APIT von der Zellkonzentration

Da die IC_{50} -Werte der Darmkrebszelllinie HT29 und der Prostatazelllinie PC3 (Abbildung 6) über einer APIT-Konzentration von 20 ng/ml lagen, wurde untersucht, ob die eingesetzte Zellzahl für den APIT vermittelten Tod der Krebszelllinien kritisch ist. Hierzu wurden die Darmkrebszelllinie HT29 und die Prostatakrebszellen PC3 in drei absteigenden Konzentrationen ($0,5 \times 10^5$, $0,25 \times 10^5$ und $0,125 \times 10^5$) in eine 96 Loch Mikrotiter-Platte titriert und über Nacht (16 h) mit unterschiedlichen APIT-Konzentrationen (120 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml, 7,5 ng/ml und 3,75 ng/ml)

inkubiert. Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte der unterschiedlichen Zellkonzentrationen wurde die metabolische Aktivität mittels WST-1 Test bestimmt und graphisch gegen steigende APIT-Konzentrationen aufgetragen. Hierbei wurden die OD-Werte der unbehandelten Zellen gleich 100 % vital gewertet (Abbildung 3).

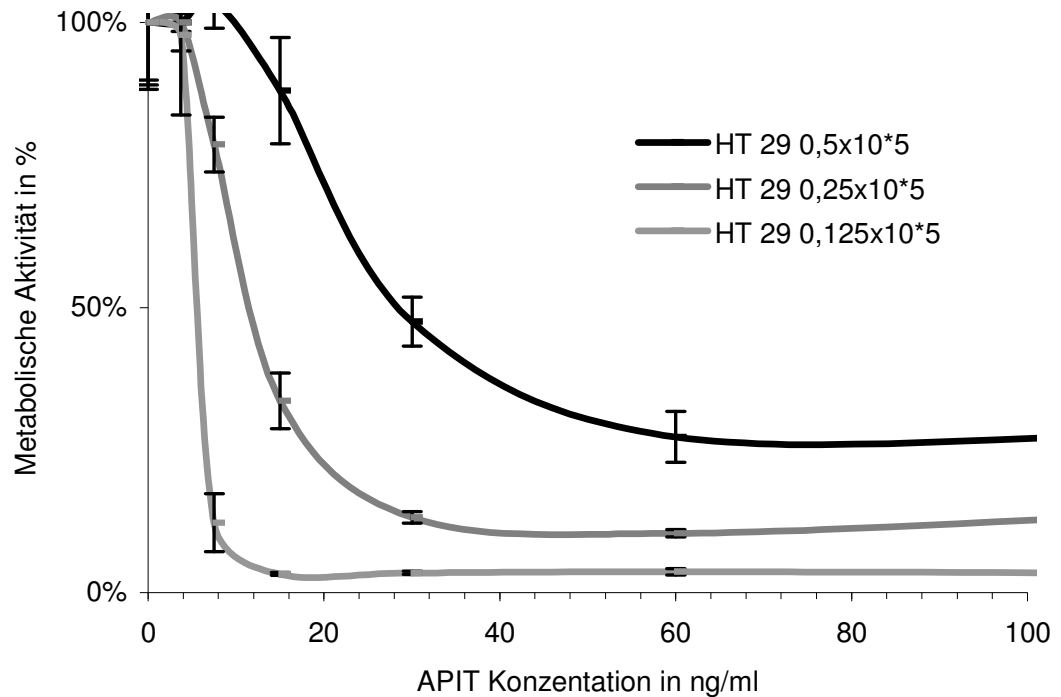


Abbildung 7: Unterschiedliche Zellkonzentrationen von HT29 Zellen (Darmkrebs) in absteigenden APIT-Konzentrationen.

Die Zellen wurden in der entsprechenden Konzentration ($0,5 \times 10^5$, $0,25 \times 10^5$, $0,125 \times 10^5$) in $50 \mu\text{l}$ RPMI/10% FCS ausgesät und 16 h mit verschiedenen APIT-Mengen (120 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml, 7,5 ng/ml, 3,75 ng/ml) inkubiert. 3-4 h nach $10 \mu\text{l}$ WST-Zugabe in $25 \mu\text{l}$ RPMI /10%FCS wurde die metabolische Aktivität bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzlänge von 650 nm photometrisch bestimmt. (Mittelwerte aus drei Replikaten +/- Standardabweichung)

Die Darmkrebszelllinie HT29 zeigt bei abnehmender Zellkonzentration eine höhere Empfindlichkeit gegenüber dem APIT-induzierten Zelltod. Während der IC_{50} -Wert bei der höchsten Zellzahl der Darmkrebszelllinie HT29 noch bei 29 ng/ml APIT liegt, sinkt er bei $0,25 \times 10^5$ Zellen schon auf 11,5 ng/ml APIT und befindet sich bei $0,125 \times 10^5$ Zellen bei 5,5 ng/ml APIT (Abbildung 7). Die abnehmenden IC_{50} -Werte bei geringeren Zellzahlen sprechen eindeutig für einen Zusammenhang zwischen Zellkonzentration und zytotoxischer Wirkung des APIT.

Indem eine weitere adhärenzte Zelllinie in unterschiedlichen Verdünnungsstufen gegen APIT aufgetragen wurde, sollte getestet werden, ob alle adhärenzten Zelllinien, die vorher bei einer Zellzahl von $0,5 \times 10^5$ einen IC_{50} -Wert über 20 ng/ml APIT hatten, bei geringeren Zellkonzentrationen empfindlicher auf den APIT induzierten Zelltod reagieren.

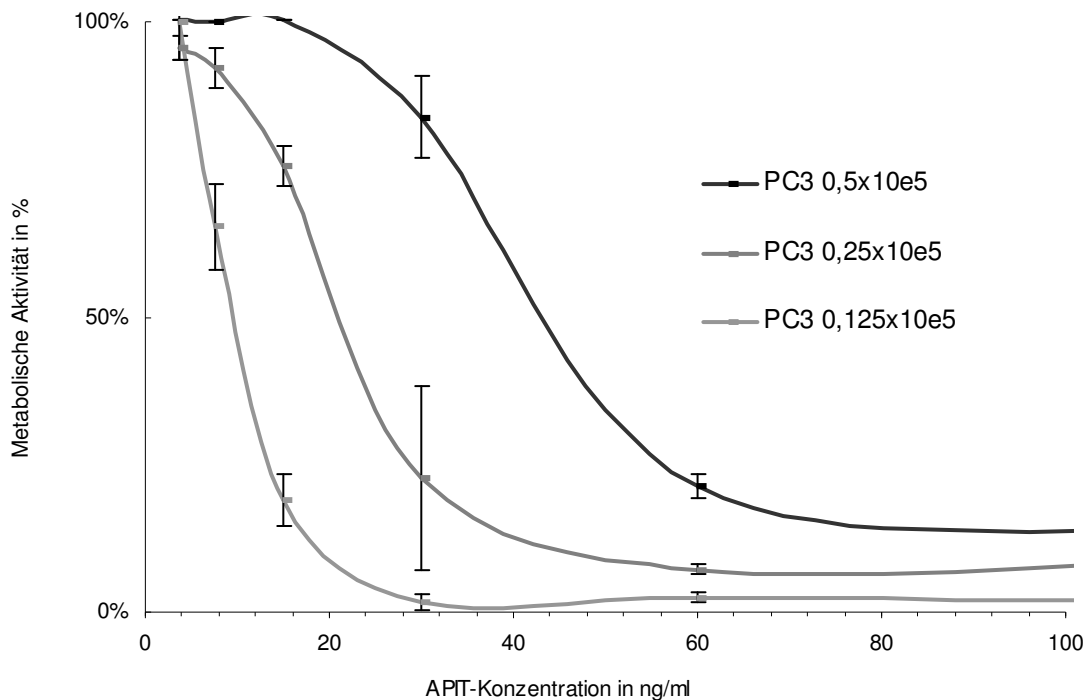


Abbildung 8: Unterschiedliche Zellzahlen von PC3 Zellen (Prostatakarzinom) in absteigenden APIT-Konzentrationen.

Die Zellen wurden in der entsprechenden Konzentration ($0,5 \times 10^5$, $0,25 \times 10^5$, $0,125 \times 10^5$) in $50 \mu\text{l}$ RPMI / 10 % FCS ausgesät und 16 h mit verschiedenen APIT-Mengen (120 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml, 7,5 ng/ml, 3,75 ng/ml) inkubiert. 3-4 h nach WST-Zugabe wurde die metabolische Aktivität photometrisch bestimmt. (Mittelwerte aus drei Replikaten +/- Standardabweichung)

Wie die Abbildung 8 demonstriert, sank auch bei der Prostatakarzinomzelllinie PC3 mit abnehmender Zellzahl der IC_{50} -Wert. Zellen mit der niedrigsten Zellzahl von $0,125 \times 10^5$ pro Loch wurden durch Inkubation mit 30 ng/ml APIT getötet. In der höchsten Zellkonzentration von $0,5 \times 10^5$ erreichen die PC3 Zellen den IC_{50} -Wert bei 44 ng/ml APIT. Jedoch liegt die für den IC_{50} -Wert benötigte APIT-Konzentration bei einer Zellzahl von $0,125 \times 10^5$ Zellen pro Loch für die Prostatakrebszelllinie nur noch bei 9 ng/ml APIT (Abbildung 8). Das bedeutet, dass der APIT-induzierte Zelltod von der

Zellkonzentration abhängig ist. Die Untersuchungen der Protatakarzinomzelllinie DU145 ergab vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Die Empfindlichkeit der adhärennten Zelllinien in geringeren Konzentrationen gleicht also den IC_{50} -Werten der Suspensionzellen.

Es stellt sich die Frage, warum die adhärennten Zellen mit Ausnahmen des Ewing Sarkoms RD-ES und A673 (nicht gezeigt) eine höhere APIT-Konzentration pro Zelle benötigen als die Suspensionszelllinien. Was unterscheidet die beiden Zelltypen neben dem Wachstumsverhalten voneinander? Eventuell spielt die Größe der einzelnen Zellen eine Rolle. Adhärennte Zellen besitzen durch ihre Ausläufer eine größere Oberfläche und können somit resistenter gegen APIT sein. Um diese Frage zu klären, wurde die Größe der Zellen bestimmt.

4.5 Der Zusammenhang zwischen der benötigten APIT Konzentration und dem Zelldurchmesser

Wie im Abschnitt 4.4 untersucht wurde, spielt die ausgesäte Zelldichte der einzelnen Tumorzelllinien eine große Rolle bei dem APIT-induziertem Zelltod. Dabei stellt sich die Frage, wieso einige Zelllinien stärker reagieren als andere. Welche Parameter beeinflussen die APIT-induzierte Wirkung - die unterschiedliche Stoffwechselaktivität der Zellen oder eventuell die Masse oder die Größe der Zellen. Um dies zu klären, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob sich die Zelllinien im Durchmesser unterscheiden. Dabei sollte festgestellt werden, ob eine Korrelation zwischen der benötigten APIT-Konzentration und dem mit Hilfe des Zellanalysegerätes (Schärfe System) ermittelten Zelldurchmesser besteht.

Um zu sehen, ob auch ein Zusammenhang zwischen der Wachstumsform und der Größe der Zellen besteht wurden adhärennte-, Suspensions- und semi-adhärennte Zellen eingesetzt. Als Suspensionszelllinien wurden die Leukämiezellen Jurkat neo und CEM neo verwendet, als semi-adhärennte Zelllinie wurde das Lungenkarzinom GLC4 verwendet und als Vertreter der adhärennten Zell das Weichteilsarkom A673. Vorher wurden die Zelllinien mit Hilfe von Trypanblau in der Neubauerzählkammer gezählt und unter dem Mikroskop auf ihre Vitalität überprüft. Anschließend wurde der Zelldurchmesser jeder Zelllinie im Zellanalysegerät bestimmt und ausgewertet (Abbildung 9).

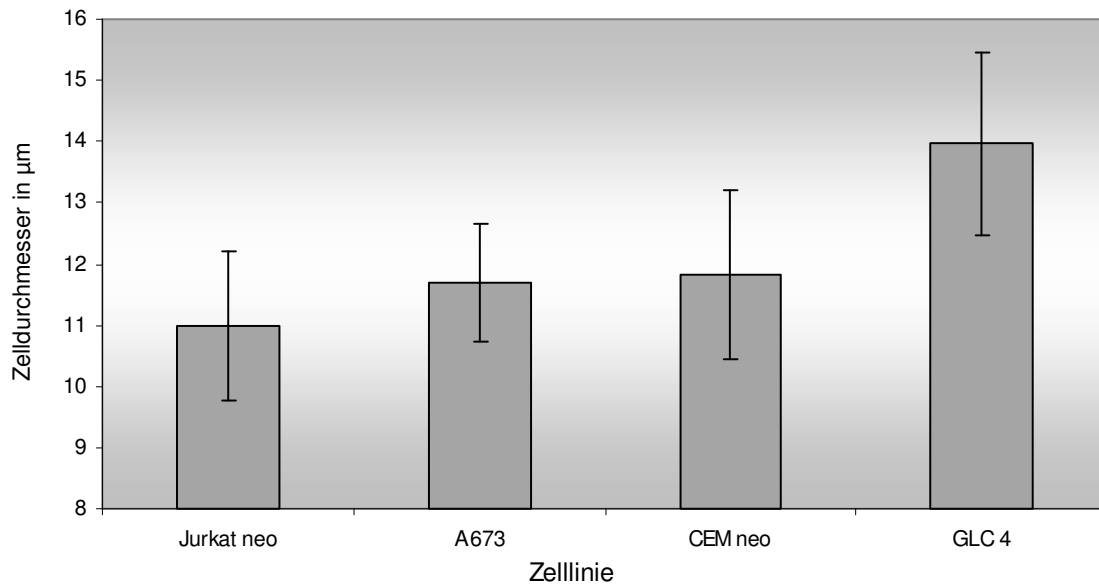


Abbildung 9: Messung des Zelldurchmessers von vier Tumorzelllinien. Der Zelldurchmesser wurde für Jurkat neo, A673, CEM neo und GLC 4 Krebszelllinien im Zellanalysegerät (Schärfe System) bestimmt und in μm angegeben (Mittelwerte aus drei Replikaten +/- Standardabweichung).

Jurkat neo Zellen sind mit einem Durchmesser von $11 \mu\text{m}$ die kleinsten Zellen. Gefolgt von A673 und CEM neo, die mit einem Durchmesser von $11,6 \mu\text{m}$ und $11,8 \mu\text{m}$ dicht beieinander liegen. GLC 4 Zellen sind mit einem Durchmesser von $14 \mu\text{m}$ mit Abstand die größten gemessenen Tumorzellen (Abbildung 9). Die relativ großen Standardabweichungen der Durchmesser, lassen sich dadurch begründen, dass es sich bei den Messungen um lebende Zellen handelt, die sich in Proliferation befinden. Die Zellteilung läuft nicht simultan ab, so dass sich die Zellen zu einem definierten Zeitpunkt in unterschiedlichen Proliferationsstadien in unterschiedlichen Größen befinden.

Um untersuchen zu können, ob eine Korrelation zwischen Größe und der Empfindlichkeit gegenüber APIT besteht, wurde als nächstes die Reaktion der einzelnen Zelllinien gegenüber dem APIT-induzierten Zelltod überprüft. Dazu wurden die IC_{50} -Werte von Jurkat neo, A673, CEM neo und GLC 4 im WST-1 Test bestimmt. Um die ermittelten IC_{50} -Werte miteinander zu vergleichen, wurden die vier Zelllinien im Säulendiagramm dargestellt (Abbildung 10).

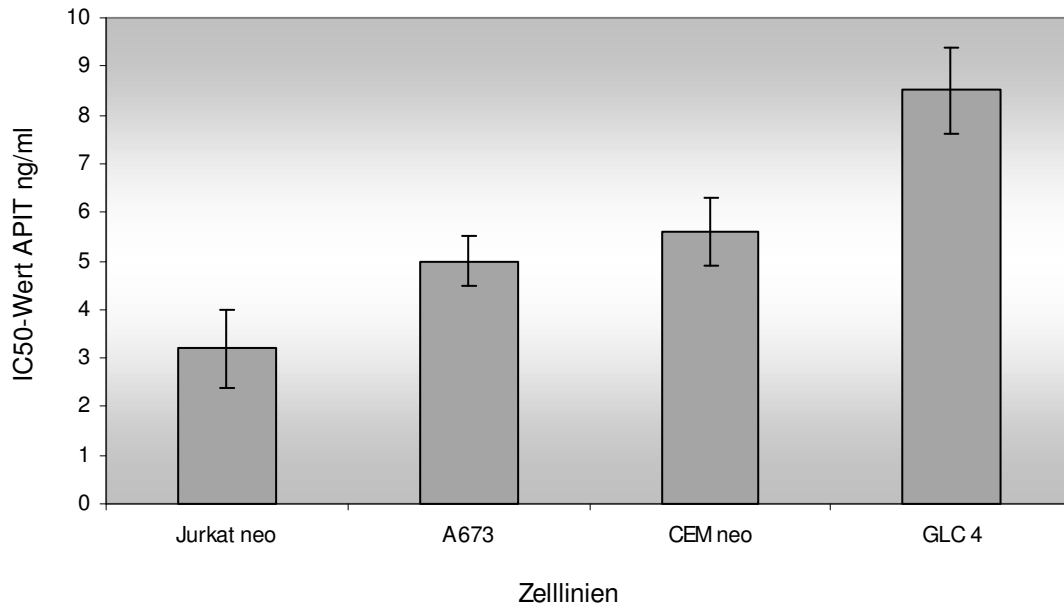


Abbildung 10: Unterschiedliche Sensitivität der vier Tumorzelllinien. In jede Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte wurden 50.000 Zellen der jeweiligen Tumorzelllinien (Jurkat neo; A673, CEM neo und GLC 4) zu unterschiedlichen APIT-Konzentrationen (120 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml, 7,5 ng/ml und 3,75 ng/ml) gegeben und 16 h inkubiert. 3-4 h nach Zugabe von WST-1 wurde die metabolische Aktivität photometrisch bestimmt. Als Kontrolle dienten entsprechende Ansätze ohne APIT Behandlung. In der Graphik stellen die Balken den IC₅₀-Wert der entsprechenden Zelllinie dar. (Mittelwerte aus drei Replikaten +/- Standardabweichung).

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, hatte die Leukämiezelllinie Jurkat neo einen IC₅₀-Wert von 3,2 ng/ml APIT, die Weichteilsarkomzelllinie A673 einen IC₅₀-Wert von 5 ng/ml APIT, die Leukämiezelllinie CEM neo einen IC₅₀-Wert von 5,6 ng/ml APIT und die Lungenkarzinomzelllinie GLC4 einen IC₅₀-Wert von 8,5 ng/ml APIT. Das bedeutet, dass der Mittelwert vom IC₅₀, von den Jurkat neo Zellen über die A673 Zellen und die CEM neo Zellen bis zu den GLC4 Zellen ansteigt. Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen den bestimmten IC₅₀-Werte und den Ergebnissen der Größenmessung (Abbildung 9). Somit nimmt die Reaktion der gemessenen Zelllinien auf APIT bei zunehmendem Zelldurchmesser ab. Jurkat neo Zellen sind mit einem IC₅₀-Wert von 3,2 ng/ml APIT nicht nur die sensitivsten, sondern mit einem Durchmesser von 11 µm auch die kleinsten Zellen. Gefolgt von den A673 Zellen mit einem IC₅₀-Wert von 5 ng/ml APIT und den CEM neo Zellen mit einem IC₅₀-Wert von 5,6 ng/ml APIT. Die weit weniger sensitiven GLC4 Zellen mit einem IC₅₀-Wert von 8,5 ng/ml APIT besitzen mit einem Mittelwert von 14 µm den größten Zelldurchmesser.

Die Suspensionszellen Jurkat neo und CEM neo zeigen hier eine hohe Sensitivität gegenüber APIT, die zwar über die semi-adhärenenten Zellen GLC 4 abnimmt, jedoch zeigen die adhärenenten A673 Zellen wieder eine höhere Sensitivität gegenüber dem APIT-induzierten Zelltod als die semi-adhärenenten GLC 4 Zellen. Die A673 Zellen reagieren sogar sensitiver als die Suspensionszelllinie CEM neo. Aufgrund der Tatsache, dass die adhärenente Zelllinie A673 sowohl sensitiver als die semi-adhärenenten GLC4 als auch die Suspensionszellen Cem neo reagieren, ist ein Zusammenhang zwischen der Wuchsform der Zelllinie und der Sensitivität gegenüber APIT unwahrscheinlich.

4.6 Wirkung von APIT auf Chemotherapeutika-resistente Zellen

Innerhalb der multimodalen Therapieprotokolle repräsentiert der Einsatz von Chemotherapeutika einen unverzichtbaren Bestandteil der Behandlung von Krebs-erkrankungen und ist gegenwärtig die effektivste Therapieoption für bereits metastasierende Tumore (Gottesman et al., 2002a; Borst et al., 2002). Ein Teil der Patienten kann auf diesem Wege erfolgreich behandelt werden, während andere Patienten auf dieselbe Behandlung nur unzureichend, vorübergehend oder gar nicht ansprechen. Somit ist der Erfolg oft durch Resistenzen gegenüber den eingesetzten Zytostatika limitiert (Abolhoda et al., 1999; Gottesman, 2002b). In diesem Zusammenhang spielen Apoptose-Resistenzen und Multidrug-Resistenzen (MDR) eine entscheidende Rolle. Erstere können beispielsweise auf einer Überexpression anti-apoptotischer Moleküle der Bcl-2 Familie beruhen. Die anti-apoptotischen (Bcl-2 und Bcl-X_L) Moleküle regulieren die Induktion des mitochondrialen Apoptosewegs. Somit sind die eingesetzten Chemotherapeutika nicht in der Lage, einen Apoptose-vermittelten Zelltod auszulösen, die Zellen werden nicht abgetötet und können weiter proliferieren.

In den letzten zwei Dekaden erlangte der Mechanismus der Arzneimittel-Vielfachresistenz oder Multidrug-Resistenz (MDR) eine außergewöhnliche Bedeutung. Um nun zu überprüfen, ob APIT auch in der Lage ist, Multidrug-resistente Zellen ebenso effizient abzutöten, wurde die Wirkung von APIT an der Lungenkarzinomzelllinie GLC4 ADR getestet. Diese Zelllinie ist eine Subzelllinie der kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie GLC4, die durch *in vitro* Selektion mit Doxorubicin, einem zu den Adriamycinen gehörenden Chemotherapeutikum, gewonnen wurde. Die GLC4 ADR Zellen weisen eine multifaktorielle Multidrug-Resistenz auf, die

unter anderem auf eine Überexpression des MRP-1 (Multidrug-Resistance-Protein) zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden beide Lungenkarzinomzelllinien GLC4 und die Subzelllinie GLC4 ADR im Vergleich auf ihre Empfindlichkeit gegenüber dem APIT-induzierten Zelltod getestet (Abbildung 11).

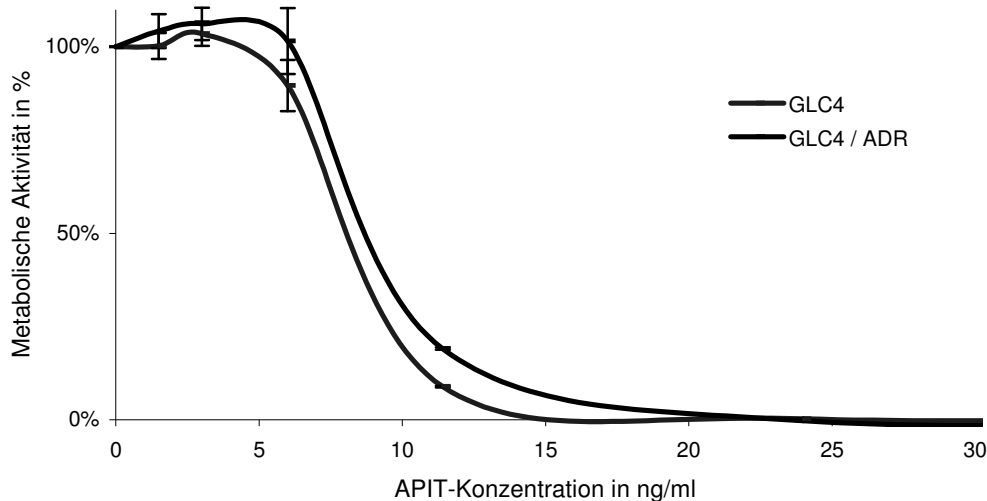


Abbildung 11: Wirkung von APIT auf die metabolische Aktivität von Multidrug-resistenten Lungenkarzinomzelllinien. Die Lungenkarzinomzelllinien GLC 4 und GLC 4 ADR (MDR) sowie die Leukämiezellen Jurkat neo wurden in einer Konzentration von $0,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät und 16 h mit absteigenden Mengen an APIT (120 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml, 7,5 ng/ml, 3,75 ng/ml) inkubiert. 3-4 Stunden nach Zugabe von WST-1 wurde die metabolische Aktivität photometrisch bestimmt. (Mittelwert aus drei Replikaten +/- Standardabweichung)

Die in Abbildung 11 dargestellte Dosis-Wirkungskurve zeigt für die Lungenkarzinomzelllinien GLC 4 und GLC 4 ADR einen ähnlichen Kurvenverlauf. Bei 6 ng/ml APIT nimmt die metabolische Aktivität der Lungenkarzinomzelllinien deutlich ab. Eine Reduktion der Vitalität auf 50 % wird für die GLC 4 ADR Zellen bei 9,5 ng/ml APIT und für die GLC 4 Zellen bei 8,5 ng/ml APIT erreicht. Eine vollständige Hemmung der Vitalität findet ab einer Konzentration von 16 ng/ml APIT statt. Die Multidrug-resistente Lungenkarzinomzelllinie GLC 4 ADR besitzt eine mit der Parentalzelllinie vergleichbare Empfindlichkeit gegenüber der Wirkung von APIT. Diese Multidrug-resistenten Zellen können somit *in vitro* durch APIT effizient abgetötet werden.

Eine weitere Chemotherapie-resistente Zelllinie stellt die Brustkrebszelllinie MCF7 Bcl-X_L dar. Diese Zelllinie wurde *in vitro* transfiziert, so dass es zur Überexpression des Bcl-X_L Proteins kommt. Durch die Anwesenheit dieses anti-apoptotischen Proteins sind die Zellen Apoptose-resistent. Diese Form der Resistenz blockiert ein breites Spektrum der Behandlungsmöglichkeiten, wie zum Beispiel die Strahlentherapie und die

Chemotherapie. Es wurde deshalb untersucht, ob APIT in der Lage ist, diese Apoptose-resistente Brustkrebszelllinie zu töten. Dazu wurden die MCF7 Bcl-X_L Zellen wie oben beschrieben im Vitalitätstest getestet. Die Zelllinie wurde in unterschiedlicher Zellzahl ausgesät.

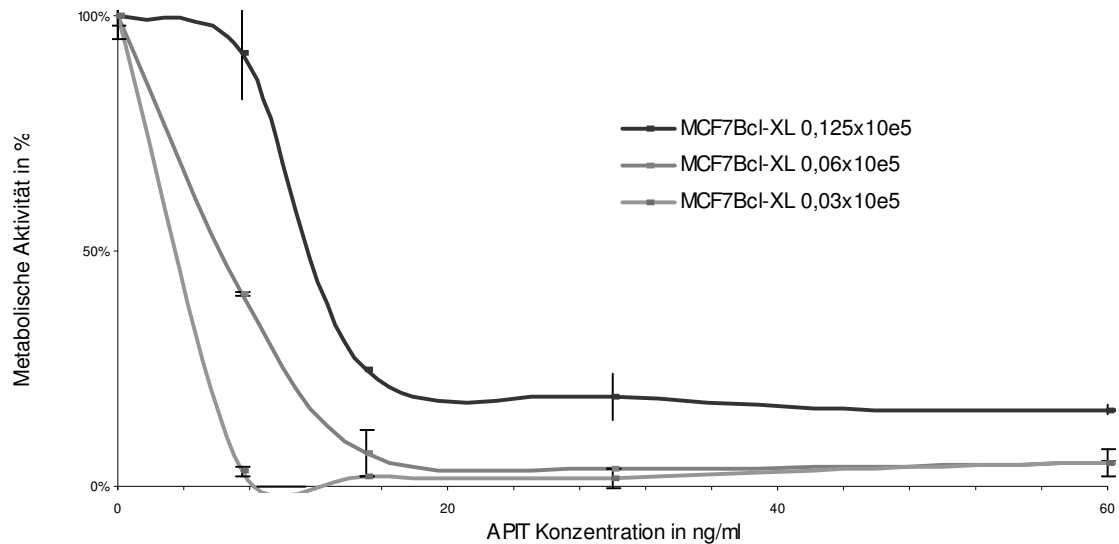


Abbildung 12: Wirkung von APIT auf die metabolische Aktivität von Brustkrebszelllinien. Die Brustkrebszelllinie MCF7Bcl-XL wurde in den Titrationsstufen 0,125 x 10⁵, 0,06 x 10⁵ und 0,03 x 10⁵ Zellen pro Loch ausgesät. Die Zelllinie inkubierten 16 h mit steigenden Mengen an APIT (120 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml, 7,5 ng/ml). 4 h nach Zugabe von WST-1 wurde die metabolische Aktivität photometrisch bestimmt. (Mittelwerte aus drei Replikaten +/- Standardabweichung)

Die Dosis-Wirkungskurven der Brustkrebszelllinie in Abbildung 12 reagierten in den unteren Verdünnungsstufen deutlich stärker gegenüber APIT als in der Standardkonzentration von 0,5 x 10⁶ Zellen. Während die höchste Zellkonzentration der MCF7Bcl-X_L Zellen noch einen IC₅₀-Wert von circa 11,5 ng/ml APIT hat, sank der IC₅₀-Wert mit abnehmender Zellzahl auf 3,5 ng/ml bei 0,03 x 10⁵ Zellen pro Loch. Nach Inkubation mit 30 ng/ml APIT wurden die Zellen der niedrigsten Zellzahlen getötet und bei 0,125 x 10⁵ Zellen pro Loch sank die metabolische Aktivität auf 25 % ab. Eine Verringerung der Zellkonzentration der MCF7Bcl-X_L Zellen zeigt auch hier deutlich, dass die Effizienz von APIT zunimmt. Dadurch kann sogar eine Apoptose-resistente Brustkrebszelllinie wie die MCF7Bcl-X_L durch APIT erfolgreich abgetötet werden.

4.7 Zytotoxische Aktivität

In den bisherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Zellen an Vitalität bzw. an metabolischer Aktivität abnehmen. Inwieweit APIT membranschädigend wirkt und es tatsächlich zur Zellyse kommt sollen die folgenden Versuche klären.

Um den Tod der Zellen auf einfache Weise quantitativ feststellen zu können, wurden einige, im WST-1 Test empfindlich reagierende Zelllinien, Jurkat neo Zellen mit einem durchschnittlichen IC_{50} -Wert von 3,2 ng/ml APIT; CEM neo Zellen mit einem mittleren IC_{50} -Wert von 5,6 ng/ml APIT und A673 Zellen mit einem durchschnittlichen IC_{50} -Wert von 5 ng/ml APIT erneut mit absteigenden APIT Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Lactatdehydrogenase (LDH) Menge im Überstand der Zellen gemessen. Im Überstand vorliegende Lactatdehydrogenase ist in einer normal proliferierenden Zellkultur nur in sehr geringem Maße vorhanden, da sich dieses Enzym im Zytoplasma befindet. Durch Membranschädigung jedoch wird das Enzym in den Überstand freigesetzt, kann zugegebenes NAD^+ zu $NADH + H^+$ reduzieren und dabei Laktat zu Pyruvat oxidieren. Im zweiten enzymatischen Schritt werden zwei H^+ von $NADH + H^+$ zum zugegebenen gelben Tetrazoliumsalz transferiert und es entsteht rotes Formazan. Dieser rote Farbumschlag korreliert mit der Anzahl an toten Zellen. Für diesen Versuchsansatz wurden die drei Zelllinie (Jurkat neo, CEM neo und A673) mit einer Zellzahl von $0,5 \times 10^5$ Zellen in 50 μ l RPMI mit 10 % FCS in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät. Dazu wurde APIT in unterschiedlichen Konzentrationen (120 ng/ml; 60 ng/ml; 30 ng/ml; 15 ng/ml; 7,5 ng/ml) in 50 μ l RPMI mit 10 % FCS gegeben. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit 5 % Triton X-100 inkubiert, welches Zellen lysiert. Die 96-Loch Mikrotiterplatte wurde 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde eine LDH-Messung gemäss Herstellerangaben (Roche) durchgeführt. Die gemessene optische Dichte korreliert direkt mit der Menge an Lactatdehydrogenase, die hier ein Maß für die Anzahl an toten Zellen widerspiegelt.

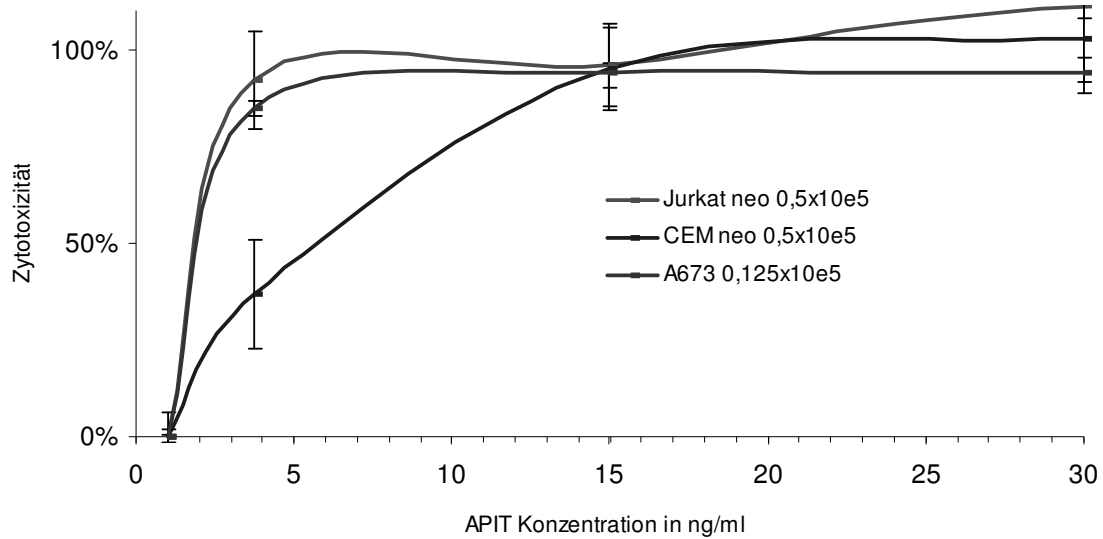


Abbildung 13: APIT-Wirkung auf unterschiedliche Zelllinien. Jurkat neo und CEM neo Zellen wurden in der Konzentration von $0,5 \times 10^5$ A673 Zellen in der Konzentration von $0,125 \times 10^5$ ausgesät und 16 h mit unterschiedlichen APIT-Mengen (120 ng/ml, 60 ng/ml, 30 ng/ml, 15 ng/ml, 7,5 ng/ml, 3,75 ng/ml) inkubiert. 4 h nach Zugabe des LDH-Substrats wurde die Menge an umgesetztem rotem Formazan photometrisch bestimmt. (Mittelwerte aus drei Replikaten +/- Standardabweichung).

Schon bei geringen APIT-Konzentrationen erhielten wir eine hohe LDH-Freisetzung sowohl bei den Leukämiezelllinien Jurkat neo und CEM neo als auch bei dem Weichteilsarkom A673, das bedeutet eine hohe Permeabilisierung ihrer Zellmembran. Die Jurkat neo Zellen reagieren mit einem IC_{50} -Wert von 1,8 ng/ml APIT am stärksten, gefolgt von den A673 Zellen, die den IC_{50} -Wert bei 2 ng/ml erreichen. 50 % der CEM neo Zellen sterben bei einer APIT-Konzentration von 5,6 ng/ml. Die A673 Zellen wurden mit einer Zellzahl von $0,125 \times 10^5$ ausgesät und zeigen deshalb auch eine weit höhere Empfindlichkeit gegenüber APIT als im WST-1 Test (Daten nicht gezeigt), bei dem sie bei einer Zellzahl von $0,5 \times 10^5$ einen durchschnittlichen IC_{50} -Wert von 5 ng/ml APIT erhielten. Die CEM neo Zellen wurden wie bei den WST-1 Versuchen mit einer Zellzahl von $0,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät und erreichen den IC_{50} -Wert bei 5,6 ng/ml APIT. Dieser Wert stimmt mit dem Durchschnittswert der Vitalitätstests überein. Das bedeutet, dass die gleiche APIT Konzentration nötig ist um zum einen die Hälfte der metabolischen Aktivität der einzelnen Zelllinien zu verlieren (WST-1) und zum anderen die Hälfte der Zellen durch Membranschädigung (LDH-Kit) zu töten. APIT wirkt somit nicht nur hemmend auf die Proliferation, indem es den Stoffwechsel der Zellen negativ beeinflusst, sondern zugleich membranschädigend auf die Zellen. Diese

Testergebnisse zeigen, dass die APIT-induzierte Wirkung die Zellmembranen irreversibel schädigt und die Zellen somit abtötet.

4.8 Morphologische Zellveränderungen durch APIT

Da anhand der LDH-Freisetzung eine Schädigung der Membran nachgewiesen werden konnte, wurden als nächstes die morphologischen Charakteristika des APIT-Zelltods untersucht.

Um zu untersuchen, welchen morphologischen Effekt APIT auf die Tumorzelllinien hat, wurden während des Vitalitätstests mikroskopische Aufnahmen von den mit APIT inkubierten Zellen gemacht. Dabei sollte beobachtet werden, wie die Suspensions- bzw. adhärenenten Zellen auf den APIT-induzierten Zelltod reagieren. Für diesen Versuch wurde zum einen die adhärenente Brustkrebszelllinie MCF7 verwendet und zum anderen die Leukämiesuspensionzelllinie Jurkat neo. Die unbehandelten MCF7- und Jurkat neo Zellen wurden in einer 96-Loch Mikrotiterplatte 5×10^5 Zellen pro Loch in RPMI/10 % FCS ausgesät. Zusätzlich wurden 5×10^5 MCF7- und Jurkat neo Zellen ausgesät und anschließend mit 30 ng/ml APIT behandelt. Nach dreistündiger Inkubation wurden mikroskopische Aufnahmen von den behandelten und unbehandelten Zellen gemacht.

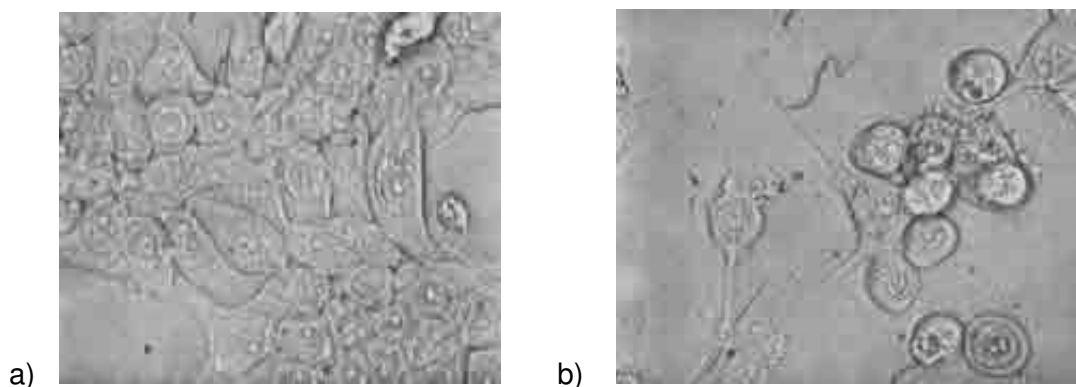


Abbildung 14: a) Mikroskopische Aufnahme adhärenenten MCF7 Zellen, die in RPMI mit 10 % FCS bei 37 C° und 5 % CO₂ ohne Zugabe von APIT gehalten wurden. b) Mikroskopische Aufnahme von adhärenenten MCF7 Zellen nach dreistündiger Inkubation in 30 ng/ml APIT bei 37 C° und 5 % CO₂.

Wie in der Abbildung 14a zu beobachten ist gleiten die unbehandelten Brustkrebszellen MCF7 nicht frei im Medium, sondern setzten sich fest und adhärenieren an der Kulturf lasche. Die Zellen sind abgeflacht, ihr Zytoplasma breitet sich zu den Seiten aus

und sie zeigen Fortsätze. Die Zellen liegen nahe beieinander, der Zellkörper sieht eher dreieckig bis polygonal aus und besitzt ausgeprägte Ausläufer. Die Ausläufer treten mit den anderen Zellen in Verbindung. Die Zellkerne sind deutlich zu erkennen, teilweise mit mehreren Nukleoli. Die Zellen liegen mit einer 70 - 80 % igen Konfluenz relativ dicht. Dies ist ein typisches Erscheinungsbild für „gesundes“ Wachstum adhärenter Krebszellen.

Die Abbildung 14b zeigt die mit APIT behandelten MCF7 Zellen. Diese runden sich nach dreistündiger Inkubation mit APIT ab. Die Zellkerne sind nicht mehr zu erkennen, die Ausläufer werden spindelförmig und der Grad der Konfluenz nimmt ab. Zusätzlich lösen sich die adhärenen Zellen von der Unterlage und von benachbarten Zellen ab, da die extrazellulären Elemente, wie Faser- und Basalmembrankollagene sowie Elastin eine Auflösung ihrer spezifischen Ordnungsstruktur erleiden (Kitt, 1982). Es kommt zu Vakuolenbildung im Zytoplasma und zum vollständigen Stillstand der intrazellulären Plasma- und Organellenbewegung. Im Vergleich zu den adhärenen Zellen wurde die Suspensionszelllinie Jurkat neo getestet.

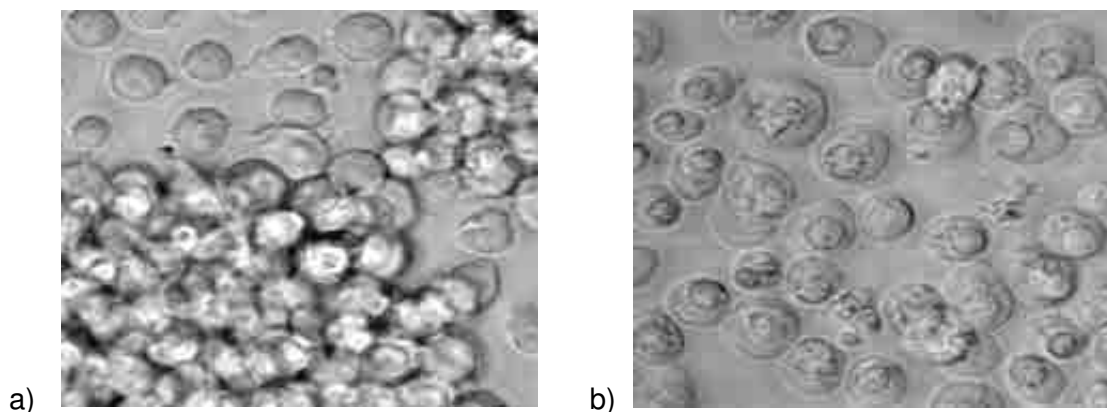


Abbildung 15: a) Mikroskopische Aufnahme von Jurkat neo Zellen, die in RPMI mit 10 % FCS bei 37 C° und 5 % CO₂ ohne Zugabe von APIT gehalten wurden. b) Mikroskopische Aufnahme von Jurkat neo Zellen nach dreistündiger Inkubation in 30 ng/ml APIT bei 37 C° und 5 % CO₂.

In Abbildung 15 a) zeigen die unbehandelten Leukämiezellen Jurkat neo die für sie typische Kolonienbildung, die auf eine gesunde Proliferation der Zellen schließen lässt. Nach dreistündiger Inkubation mit APIT in einer Konzentration von 30 ng/ml ist keine Kolonienbildung mehr zu erkennen. Da die Zellen nicht mehr proliferieren, löst sich der Zell- Zellkontakt auf, bis die Zellen schließlich, wie in Abbildung 15 b) zu sehen

ist, einzeln vorliegen. Mikroskopisch sehen die Zellen insgesamt umfangsvermehrt mit großem Kern und trübkörnigem oder feinvesikulärem Zytoplasma. Eine intensive Bildung von Vakuolen lässt das Zytoplasma außerdem granulär erscheinen. Durch den APIT-induzierten Zelltod, der nach circa acht Stunden Inkubation eintritt, erscheinen die Zellen kleiner und verlieren ihre klare, abgerundete Form.

4.9 Zusammenfassung der *in vitro* Ergebnisse

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Empfindlichkeit humaner Tumorzellen gegenüber APIT *in vitro*. Dabei beziehen sich die Konzentrationen von APIT für den IC₅₀Wert in der ersten Spalte auf die Ausgangskonzentration von $0,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch. In der nächsten Spalte stehen die ermittelten IC₅₀-Werte der Krebszelllinien, die in den Zellkonzentrationen von $0,125 \times 10^5$ Zellen getestet wurden.

IC₅₀-Werte der ausgewählten Tumorzelllinien gegenüber dem APIT induzierten Zelltod

Name	Typ	IC ₅₀ -Wert (ng/ml) +/- SD bei $0,5 \times 10^5$ Zellen	IC ₅₀ -Wert (ng/ml) +/- SD bei $0,125 \times 10^5$ Zellen	Wachstum
Jurkat neo	Akute lymphoide Leukämie (ALL)	3,2 +/- 0,8	NT	Suspension
CEM neo	Akute lymphoblastische Leukämie (ALL)	5,6 +/- 0,7	NT	Suspension
K562	Chronische myeloide Leukämie (CML)	5 +/- 0,6	NT	Suspension
GLC 4 ADR	Kleinzelliges Lungen-Karzinom (MDR)	9,5 +/- 0,5	NT	semi-adhären
GLC 4	Kleinzelliges Lungenkarzinom	8,5 +/- 0,9	NT	semi-adhären
MCF7	Brustkarzinom	> 20	NT	adhären

MCF7 X _L	Bcl- Brustkarzinom Apoptose-Resistent	> 20	11,5 / +/- 0,6	adhärent
SK-BR-3	Brustkarzinom	> 20	NT	adhärent
PC 3	Prostatakarzinom	> 20	8,5 +/- 0,8	adhärent
DU 145	Prostatakarzinom	> 20	6,5 +/- 0,9	adhärent
HT29	Kolonkarzinom	> 20	6 +/- 0,6	adhärent
RD-ES	Ewing- Sarkom	5 +/-0,5	NT	adhärent
A-673	Rhabdomyosarkom	5 +/-0,5	NT	adhärent

Tabelle 2: Dargestellt sind Durchschnittswerte +/- Standardabweichungen der IC₅₀ -Werte ausgewählter Tumorzelllinien gegenüber APIT, sowohl in der Standard Konzentration von 0,5 x 10⁵ Zellen, als auch weniger empfindliche Zelllinien in geringerer Konzentration von 0,125 x 10⁵ Zellen. Der IC₅₀ -Werte beschreibt die APIT Konzentration, die benötigt wird, um eine Abnahmen der Vitalität der Zellen um 50 % zu erreichen. Zusätzlich wird die Wuchsform der einzelnen Zelllinien angegeben (NT= Nicht getestet).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle dreizehn in dieser Arbeit getesteten Tumorzelllinien auf die tumorizide Wirkung von APIT reagieren. APIT löst unter *in vitro* Bedingungen den Tod aller getesteten Tumorzellen aus, auch bei chemotherapieresistenten Zellen (Apoptose oder MDR) (Tabelle 2). Dieser ist durch einen schnellen Verlust der Stoffwechselaktivität (WST-1Test) und der Permeabilisierung der Zellmembran (LDH-Test) gekennzeichnet. Morphologisch zeigen die adhären- und Suspensionszellen nach der Inkubation mit APIT enorme Veränderungen sowohl im Zytoplasma als auch am Zellkern. Die in diesem Teil der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Zelllinien sind die Voraussetzung für die Etablierung der Maus-Modelle.

4.10 Xenograft Tumor Maus Modell

Um die Wirksamkeit eines neuen Medikaments oder Therapieverfahrens zu überprüfen, wird ein auf den Menschen möglichst gut übertragbares Tiermodell benötigt. Dabei sind für eine Vielzahl von Fragestellungen Tiermodelle mit einem tierischen

Tumorursprung ausreichend, d. h. der Tumor ist auto- oder allogon. Bei Fragestellungen, die wie hier auf die Pharmakologie oder das biologische Verhalten eines neuen Medikaments abzielen, ist es jedoch erforderlich, dies nicht an Tumoren tierischen Ursprungs, sondern an menschlichen Tumorzellen *in vivo* zu studieren. Hierzu bieten sich die xenotransplantierten Tiermodelle an.

Bei der Etablierung eines Xenograftmodells ist eine entscheidende Grundvoraussetzung, dass das Immunsystem der Maus die humanen Tumorzellen nicht als fremd erkennt und es somit nicht zu einer Abstoßungsreaktion kommt. RAG-1^{-/-} Mäuse, die oft in Xenograftmodellen Verwendung finden, besitzen einen Defekt im „Recombination activating gene-1“ (RAG), das für die korrekte Rekombination der V(D)J-Ketten verantwortlich ist. Da das Immunsystem die erstaunliche Fähigkeit besitzt, mit einer spezifischen Immunantwort auf einen Kontakt mit einer Vielzahl verschiedener Mikroorganismen zu antworten, trägt jeder einzelne Lymphozyt des Immunsystems einen Rezeptor (Antigen-Rezeptor) auf der Zelloberfläche, der nach Bindung eines Antigens zur Aktivierung des Lymphozyten führt. Die enorme Vielfalt der Antigenrezeptoren auf den Lymphozyten wird durch Umlagerung von verschiedenen Gensegmenten, die für die variablen Regionen der Antigenrezeptoren kodieren, erzeugt. Der Mechanismus der Umlagerung der variablen Gensegmente der Immunglobulin- und T-Zellrezeptor Gene wird V(D)J-Rekombination oder somatische Rekombination genannt. Durch das Ausbleiben der somatischen Rekombination, besitzen Rag-1^{-/-} Mäuse kein funktionelles adaptives Immunsystem mehr und eignen sich deshalb als Modellsystem für die Etablierung humaner Tumore.

4.10.1 Adaptiver Transfer humaner Tumorzelllinien in RAG-1^{-/-} Mäusen

Nachdem die Empfindlichkeit verschiedener humaner Tumorzelllinien aus unterschiedlichen Tumorerkrankungen gegen APIT *in vitro* gezeigt wurde, sollte nun ein Tumormodell in Mäusen etabliert werden, um die Wirkung von APIT auch *in vivo* zu untersuchen.

Ein entscheidendes Kriterium bei der Etablierung von subkutanen Tumor-Xenotransplantaten ist, dass *intra vitam* eine genaue Bestimmung der Tumorgöße während der gesamten Entwicklungszeit möglich ist. Deshalb wurden die Zellen nicht orthotop (in das Organ) implantiert, sondern subkutan injiziert. Vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse rasiert, um die sich bildenden soliden Tumore im weiteren Verlauf mit Hilfe einer Schieblehre genau evaluieren zu können. Um unspezifische

Immunreaktionen (vor allem durch NK Zellen) auf die injizierten Tumorzellen zu verhindern, erfolgte vor der Tumorzellinjektion eine Bestrahlung. Diese Bestrahlung tötet die natürlichen Killerzellen (NK) ab und schaltet somit eine wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems aus.

Die Mäuse wurden alle zwei Tage nach dem Protokoll von Morton und Griffith (1985) untersucht und gewogen. Morton und Griffiths schlugen Richtlinien zur Erkennung von Schmerzen, Qualen und Leiden bei Versuchstieren vor, die auf erkennbaren Veränderungen im Verhalten und Aussehen der Tiere sowie auf anderen klinischen Zeichen beruhen. Diese werden mit einer Schweregrad-Skala von 1-4 bewertet (Abschnitt 2.2.5.).

Zusätzlich wurden folgende Kriterien definiert, die einen vorzeitigen Versuchsabbruch erfordern:

- Tumorgöße über 1,5 cm Durchmesser
- Ulzerierende Tumore
- Gewichtsverlust von über 20% gegenüber dem Anfangsgewicht
- Apathie
- Auffallende Aggressivität beim Palpieren der Tumore
- Motorische Ausfallserscheinungen
- Abnorme Körperhaltung
- Auffällige Atemstörung (Exspirationsgeräusch)
- Ungewöhnliche Laute

4.10.2 Evaluierung der zu injizierenden Mindestzellzahl

Eine tumorspezifische Mindestzahl an Zellen ist Voraussetzung für die Anwachsrate transplantierte Tumoren (Kindred und Wechsler, 1978). Dieser Schritt ist von großer Wichtigkeit, da ein Großteil der injizierten Zellen schon anfangs zugrunde geht.

In ersten Experimenten sollte daher die erforderliche Zellzahl ermittelt werden, die nötig ist, um innerhalb weniger Wochen einen soliden Tumor zu etablieren.

Für die ersten *in vivo* Versuche wurden Tumorzelllinien ausgewählt, die *in vitro* unterschiedlich stark gegenüber APIT reagieren (Tabelle 2). GLC4 ADR Lungenkarzinomzellen zeigten *in vitro* einen IC_{50} -Wert von 8,5 ng/ml APIT, CEM neo Leukämiezellen einen IC_{50} -Wert von 3,2 ng/ml APIT. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal dieser Zellen ist, dass GCL4 ADR Zellen semi-adhären sind und CEM neo Suspensionszellen. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden die Tiere rasiert

und bestrahlt. Den verschiedenen Gruppen ($n=5$) wurden drei unterschiedliche Zellkonzentrationen (1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7) der zu testenden Tumorzelllinien unter Narkose in jede Flanke injiziert. Daher ergibt sich pro Tier die Möglichkeit, zwei Tumore zu etablieren. Als Kontrolle zu den Tumormodellen wurden bestrahlte Tumorzellen, die nicht mehr teilungsfähig sind in der gleichen Weise injiziert (Daten nicht gezeigt). Damit wurde ausgeschlossen, dass die beobachteten Effekte unspezifisch waren und lediglich durch die Injektion an sich bzw. durch die Injektion körperfremder Zellen verursacht wurden.

Der Tag der Zellinjektion wurde als Tag 0 definiert; der Endpunkt war abhängig vom Tumolvolumen. Dreimal pro Woche wurden die Tiere untersucht, gewogen und die Tumore gemessen.

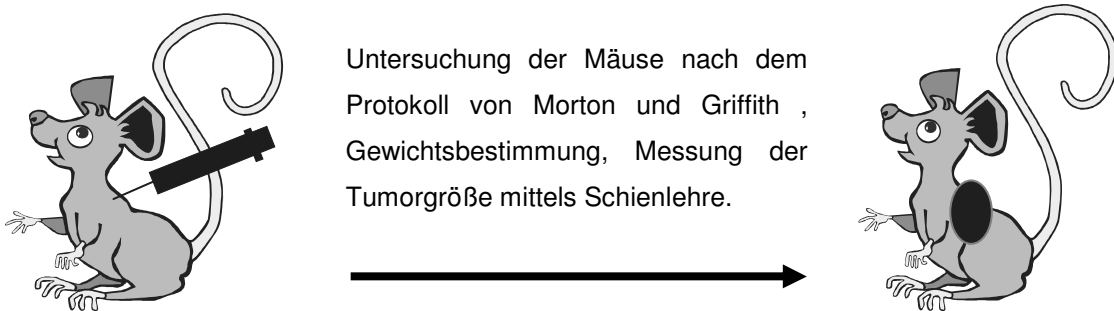


Abbildung 16: Xenograft - Etablierung. An Tag 0 wurde den Mäusen eine definierte Menge (1×10^6 , 5×10^6 und 1×10^7 Zellen in $100 \mu\text{l}$) an GLC4 ADR bzw. CEM neo Zellen jeweils beidseitig subkutan injiziert.

Unmittelbar nach der Injektion der Tumorzellen war eine relativ große Umfangsvermehrung zu erkennen, die sich noch im Laufe des gleichen Tages reduzierte, da sich die Injektionslösung (PBS) verteilt und ein Grossteil der Tumorzellen zugrunde geht. Während der nächsten vier bis sechs Wochen wurden die Mäuse jeden zweiten Tag untersucht, gewogen und die Flanken auf Umfangsvermehrungen überprüft. Nach 5 - 7 Tagen zeigten sich erste Papillome, die auf ein Tumorwachstum hinwiesen, die Größe wurde mit Hilfe einer Schieblehre gemessen. Dabei wurde zweidimensional verfahren. Der größte Durchmesser entspricht der Länge, im rechten Winkel dazu gemessen ergibt sich die Breite des Tumors.

4.10.3 Etablierung der Lungenkarzinomzelllinie und der Leukämiezelllinie in RAG-1^{-/-} Mäusen

Zur Evaluierung der zu injizierenden Zellzahl wurden den Mäusen sowohl GLC4 ADR Zellen als auch CEM neo Zellen in drei unterschiedlichen Konzentrationen (1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7) beidseitig subkutan injiziert.

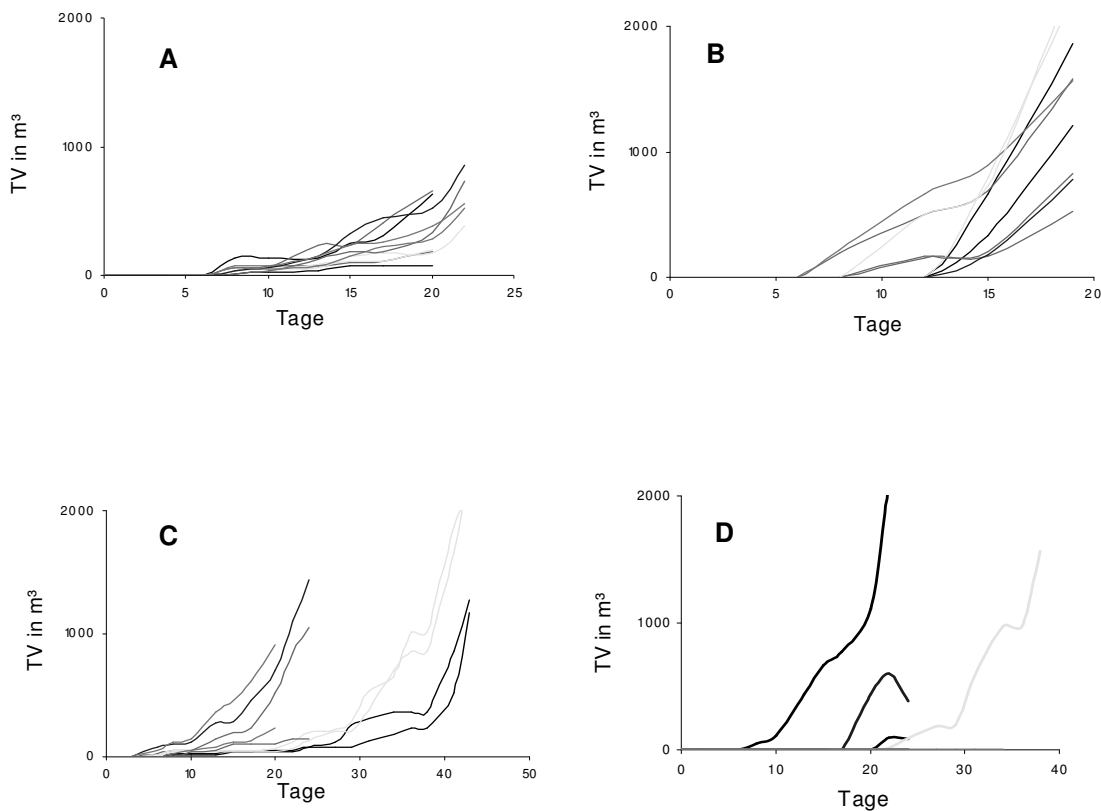


Abbildung 17: Tumorwachstumskurven von subkutan injizierten Tumorzellen in RAG-1^{-/-} Mäusen. A: GCL/ADR Zellen (1×10^7) B: CEM neo Zellen (1×10^7) C: GCL/ADR Zellen (5×10^6) D: CEM neo Zellen (5×10^6). Das Tumorwachstum wurde 20 bis maximal 50 Tage gemessen, abhängig vom Befinden der Maus und der Tumorwachstumsgeschwindigkeit. Gruppengröße $n = 5$, jede Maus ist durch eine eigene Farbe dargestellt. Die Messung der subkutanen Tumore erfolgte mit einer elektronischen Schieblehre dreimal pro Woche.

Alle Tiere, denen die Lungenkarzinomzelllinie subkutan appliziert wurde, entwickelten mindestens einen Tumor (Abbildung 17 A und C). Vergleicht man die unterschiedlichen Zellkonzentrationen in ihrem Wachstumsverlauf miteinander, ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Anwachsrate und der Zellkonzentration zu erkennen.

Allen Tieren, denen 1×10^7 Zellen injiziert wurden (Abbildung 17 A), wuchs auf jeder Seite ein Tumor, d. h. die Anwachsrate betrug 100 %. Bei einer Zellkonzentration von 5×10^6 Zellen entwickelten bis auf eine Maus ebenfalls alle einen Tumor pro Seite und somit eine Anwachsrate von 90 %. In der geringsten Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen (Daten nicht gezeigt), wuchsen nur zwei von zehn Tumoren an, diese Zellkonzentration ist somit zu niedrig. Des Weiteren besteht eine Korrelation zwischen der Tumorstadiumsgeschwindigkeit und der injizierten Zellmenge. Zudem lässt sich beobachten, dass die Volumenzunahme der einzelnen Tumore in einem zeitlichen gleichen Abschnitt, synchron mit der Zellkonzentration zunimmt.

Bei der Leukämiezelllinie CEM neo entwickeln alle Mäuse - mit Ausnahme von einer - zwischen dem siebten und zehnten Tag nach Injektion der höchsten Zellzahl von 1×10^7 Zellen zwei Tumore. Vergleicht man die unterschiedlichen Zellkonzentrationen im Hinblick auf ihr Wachstumsverhalten miteinander, so zeigt sich auch hier eine Korrelation zwischen Anwachsrate und Zellmenge. In der kleinsten Zellkonzentration (1×10^6 Zellen) wuchs kein Tumor an (Daten nicht gezeigt), während nach Injektion von 5×10^6 Zellen vier von zehn möglichen Tumoren anwuchsen und nach Transfer von 1×10^7 Zellen sogar 90% der möglichen Tumore entwickelten. Auch bei dieser Zelllinie nimmt das synchrone Tumorstadium mit der Zellzahl zu.

4.11 Körpergewichtsentwicklung während des Versuchs

Das Gewicht ist im Gegensatz zu den eher subjektiv zu beurteilenden Hauptmerkmalen für Schmerzen, Leiden und Schäden ein quantitatives Merkmal, das eine Reaktion des Tieres deutlich widerspiegelt.

Nach Injektion der humanen Tumorzellen wurden die Tiere dreimal pro Woche gewogen, um sicher zu stellen, dass kein Tier mehr als 20% seines Ursprungsgewichtes im Versuchsverlauf verliert, was in dieser Arbeit als Abbruchkriterium definiert wurde. Als Ursprungsgewicht wurde das Gewicht definiert, das die Maus am Tag der Zellinjektion hatte (Tag 0).

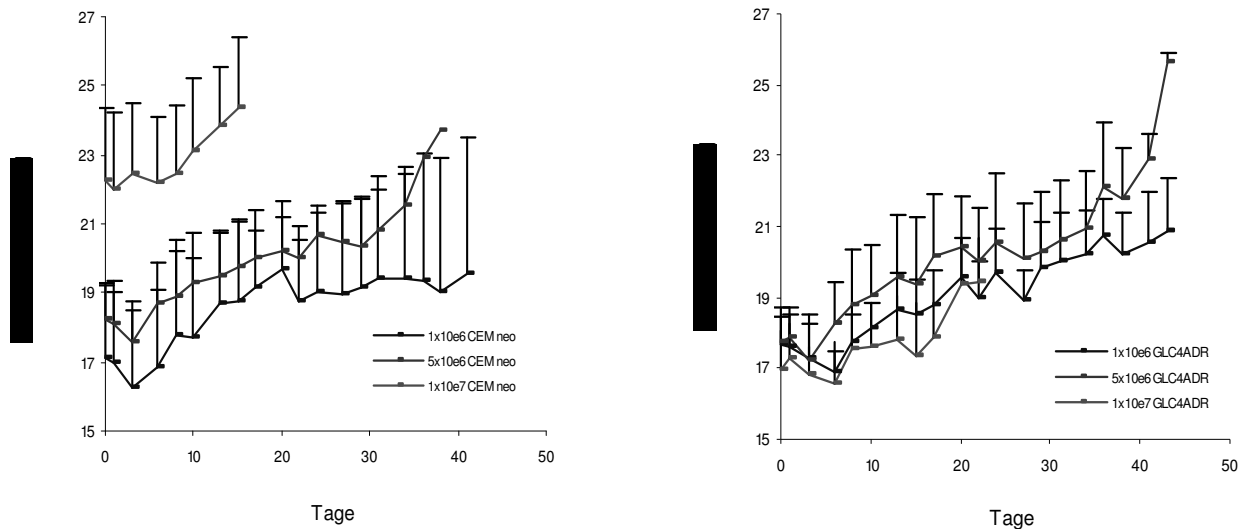


Abbildung 18: Körpergewichtsverlauf weiblicher RAG-1^{-/-} Mäuse nach subkutaner Zellinjektion von GLC4ADR (A) bzw. CEM neo (B). Angegeben sind Mittelwerte samt Standardabweichungen der Gruppen in g Körpergewicht.

Bis zum Tumorwachstum, maximal bis zum siebten Tag nach der Narkose und der Zellinjektion kam es teilweise zum leichten Gewichtsverlust einzelner Tiere. Dieser Gewichtsverlust ist vermutlich auf den Narkosestress zurückzuführen. Die Mäuse erholten sich schnell und gewannen im weiteren Versuchsablauf wieder an Gewicht. Daher ist davon auszugehen, dass die Volumenzunahme der Tumore keinen negativen Einfluss auf den Gesamtzustand der Maus hat. Die Mausgewichte der höchsten Tumorzell-Konzentration (rote Kurven) ergeben in Abbildungen 18 A + B die jeweils kürzeste Kurve, da diese Tiere sehr früh die erforderlichen Tumorumfänge erreichen (Abbruchkriterien Abschnitt 3.9.1). Festzuhalten bleibt, dass keine Maus wegen einer übermäßigen Gewichtsreduktion frühzeitig getötet werden musste. Diese Erkenntnis ist für spätere Therapieversuche sehr wichtig, da die Verträglichkeit von APIT unter anderem anhand des Kriteriums Mausgewicht beurteilt wird.

Durch die Charakterisierung der unterschiedlichen Merkmale, wie Anwachsrate, Volumina, synchrones Wachstum und Wachstumsgeschwindigkeit wird deutlich, dass die Zellzahl von 1×10^7 Zellen nötig ist, um ein zu vergleichendes, präklinisches Tiermodell zu erstellen. Die Versuche zur Evaluierung der Tumorzellzahl haben daher ergeben, dass die optimale Zellzahl für die verwendeten Tumorzellen in RAG-1^{-/-} Mäusen bei 1×10^7 Zellen liegt.

Mit der festgelegten Zellkonzentration sollen nun weitere Xenotransplantate aus unterschiedlichen Krebszelllinien etabliert werden.

4.12 Etablierung eines Rhabdomyosarkoms, eines Bronchial- eines Kolonkarzinoms

Die A673 Zelllinie, eine Unterart des Sarkoms, wurde als erste für Etablierungsversuche gewählt, da sie sich *in vitro* mit einem IC_{50} -Wert von 5 ng/ml sehr sensitiv gegenüber APIT zeigte und dadurch für spätere Therapieversuche als äußerst interessant galt. Ein weiteres Kriterium bei der Wahl dieser Zelllinie war der Zelltyp. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden den Mäusen nur Suspensions- bzw. semiadhärente Zellen injiziert, diese stellt im Gegensatz dazu eine adhärente Zelllinie dar.

Das Bronchialkarzinom stellt statistisch den häufigsten Tumor der Welt dar, deshalb wurde zusätzlich versucht, zu der bereits etablierten, resistenten (GLC4 ADR) Krebszelllinien auch die Parenteralzelllinie GLC4 zu etablieren. Diese semiadhärente Zelllinie hat einen IC_{50} -Wert von 8,5 ng /ml APIT.

Um die statistisch gesehen wichtigsten Tumore abzudecken, wurde als dritte Zelllinie das kolorektale Karzinom HT29, das nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste durch Krebs bedingte Todesursache in Deutschland darstellt, gewählt. Diese adhärente Zelllinie hat bei einer Zellkonzentration von $0,125 \times 10^6$ Zellen einen IC_{50} -Wert von 6 ng/ ml APIT.

Die drei Zelllinien wurden in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen jeweils einer Gruppe von fünf bzw. drei Mäusen beidseitig subkutan injiziert.

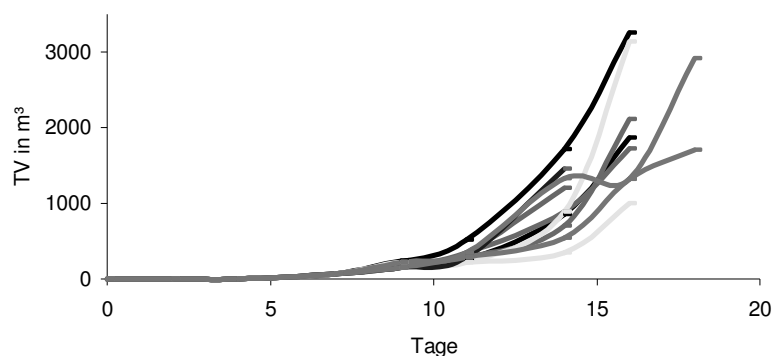


Abbildung 19: Tumorwachstumskurven der Tumorzellen in RAG-1 Mäusen. Am Tag 0 wurden A673 (A), GLC4 (B) und HT29 (C) -Zellen in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen in einem Volumen von 100 μ l PBS den Mäusen in jede Flanke subkutan injiziert. Die Gruppen bestanden aus fünf (A und B) bzw. drei Mäusen (C), jede Farbe stellt eine andere Maus dar. Das Tumorwachstum wurde bis maximal zum 25. Tag nach der Injektion gemessen, abhängig vom Befinden der Maus und der Tumorumfänge. Die Messung der subkutanen Tumore erfolgte dreimal pro Woche mit einer elektronischen Schieblehre.

Alle Zelllinien konnten mit einer Anwachsrate von mindestens 80 % bestimmt werden. Vergleicht man das Wachstumsverhalten der unterschiedlichen Zelllinien miteinander, stellt man fest, dass zwar alle Tumore um den siebten Tag anfangen zu wachsen, die Wachstumsrate und Endvolumen jedoch deutlich unterschiedlich sind. Im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien zeigen die A673 Zellen innerhalb von zehn Tagen nach dem ersten messbaren Tumor, ein synchrones Wachstum aller Tumore. Das Wachstum der GLC4-Tumore ist zeitlich verzögert, erst um den 15. Tag sind messbare Tumore zu detektieren. Die Wachstumsrate der acht Tumore steigt jedoch danach rapide an und die Volumina erreichen die geforderte Größe.

Wenn man den Stellenwert des Kolonkarzinoms in der Krebsstatistik berücksichtigt wird deutlich wie wichtig ein neues Therapeutikum für diese Erkrankung ist. Deshalb wurde im Folgenden versucht, die HT29 Zelllinie im Xenograftmodell zu optimieren. Wie in Abbildung 15 zeigt die HT29 Zelllinie in Rag-1^{-/-} Mäusen ein verlangsamteres Tumorstadium und eine nicht sehr ausgeprägte Synchronität der Volumina. Weil gerade in späteren Therapieversuchen synchrones und schnelles Tumorstadium eine entscheidende Rolle spielen, sollte untersucht werden, ob diese Parameter durch die Verwendung eines alternativen Tiermodells optimiert werden können. Hierzu wurden sogenannte ‚Nacktmäuse‘ (nude-mice) verwendet, unbehaarte Mäuse ohne Thymus, die nur sehr vermindert T-Lymphozyten produzieren.

Zur Evaluierung der Nude-Mäuse als alternatives Xenograft-Modell, wurden HT29 Zellen in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen beidseitig 3 Nude Mäusen subkutan injiziert.

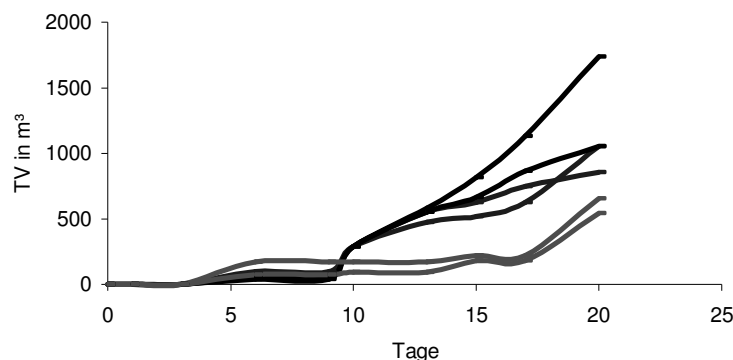


Abbildung 20: Tumorstadiumskurven der HT29 Zellen in Nude Mäusen. Am Tag Null wurden HT29 -Zellen in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen in einem Volumen von 100 μ l PBS den Mäusen in jede Flanke subkutan injiziert. Die Gruppen bestanden aus drei Mäusen, jede Farbe stellt eine andere Maus dar. Das Tumorstadium wurde bis zum 20. Tag nach der Injektion gemessen.

Das Tumorstadium beginnt um den 8 Tage nach Zellinjektion. Das in dieser Arbeit definierte Tumorstadium, samt Verdopplungszeit wurde innerhalb kürzester Zeit erreicht. Die Tumore wachsen sehr synchron sowohl innerhalb einer Maus als auch innerhalb der Gruppe. Nach 20 Tagen konnte der Versuch erfolgreich beendet werden. Hinsichtlich der Anwachsrate, der Wachstumsgeschwindigkeit und des synchronen Wachstums der Tumore ist dieses Modell besser geeignet für Therapieversuche als die HT29 Zellen in den RAG-1^{-/-} Mäusen.

4.13 FACS – Analyse stichprobenartiger Tumorgewebeprobe

Um den humanen Ursprung der etablierten Tumoren zu bestätigen, wurde Gewebe aus einzelnen Tumoren isoliert. Hierzu wurden einige RAG-1^{-/-} Mäuse, denen nach Injektion von 1×10^7 (GLC4 ADR, GLC4, CEM neo und A673) Zellen ein Tumor gewachsen war, euthanasiert und Tumorgewebe entnommen. Das Tumorgewebe wurde aus der Kapsel gelöst und die Zellen wurden in Einzelsuspension mit fluorochrom FITC-markierten Antikörpern (anti-HLA-ABC) gefärbt und im FACS analysiert. Als Positivkontrolle wurden humane PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) verwendet und als Negativkontrolle murine Milzzellen.

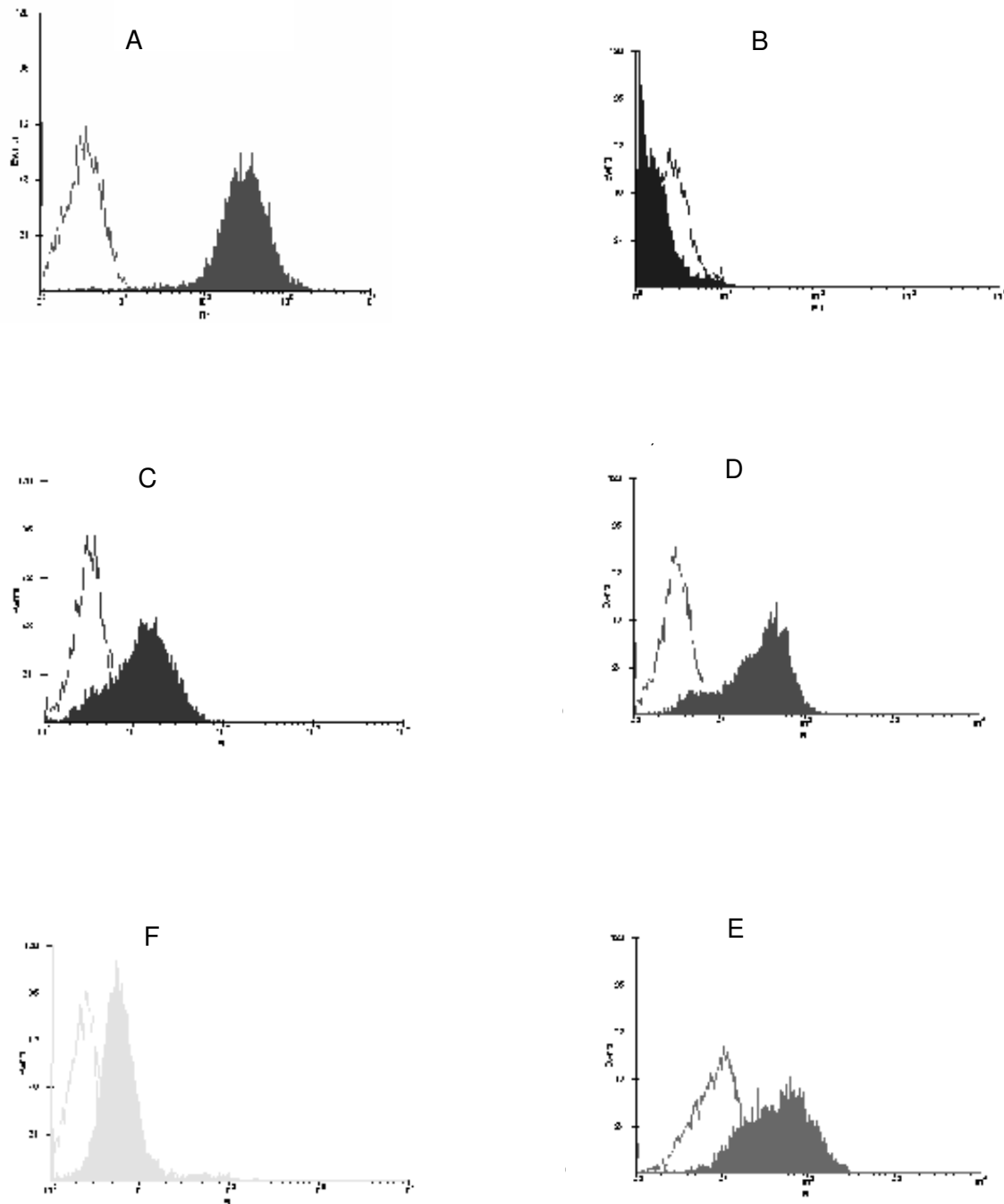


Abbildung 21: Für die Gewebekontrolle wurden vier gewachsene Tumore aus RAG-1/- Mäusen isoliert, humane PBMCs als Positivkontrolle (A) und murine Milzzellen als Negativkontrolle (B) jeweils mit FITC- markiertem HLA ABC Antikörper für 20 Minuten inkubiert und im Durchflußzytometer analysiert. Zu jedem Versuch (C: GLC 4 ADR, D: GLC 4, E: CEM neo F: A673) wurde eine Isotypenkontrolle (offener Peak) erstellt.

Die humanen PBMC's zeigen ungleich der Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle (offener Peak), dass die Population MHC Klasse I exprimiert (Positivkontrolle, Abbildung 21 A). (Isotypenkontrollen laufen parallel um unspezifische Bindungen ausschließen zu können.) Die murinen Milzzellen hingegen exprimieren keine humanen MHC Klasse I Moleküle (Negativkontrolle, Abbildung 20 B). Alle isolierten Zellpopulationen, GLC 4 (Abbildung 20 D), GLC 4 ADR (Abbildung 20 C), CEM neo (Abbildung 20 E) und A673 (Abbildung 20 F), die in der Maus zu soliden Tumoren herangewachsen waren, exprimieren humane MHC Klasse I Moleküle und sind somit eindeutig humanen Ursprungs.

4.14 Vergleich der etablierten Xenotransplantate

Um einen besseren Überblick über die erhobenen Daten zu erlangen, gibt der folgende Abschnitt eine Zusammenfassung der untersuchten *in vivo* Modelle.

Alle subkutan injizierten Tumorzelllinien erfüllen die vorher festgelegten Kriterien für ein erfolgreich etabliertes Xenotransplantatmodell. Die Anwachsrate lagen bei mindestens 80 % und die Zeitdifferenz zwischen den einzelnen Tumoren einer Gruppe weit unter 12 Tagen. Das Kolonkarzinom HT29 (in Nude-Mäusen), das Weichteilsarkom A673 und das Lungenkarzinom GLC4 ADR wiesen eine Anwachsrate von 100 % auf, das heißt bei allen Versuchstieren war pro Seite ein Primärtumor unter der Haut festzustellen. Bei der Parenteralzelllinie GLC4 lag die Anwachsrate bei 80 %. Die Leukämiezelllinie CEM neo zeigt sogar bei mehrfacher Wiederholung konstante 90 %.

Zelllinie	Tiere	Tumorzahl	Anwachsrate	Tumolvolumen	Induktions- und Tumorverdopplungszeit	
	R = RAG N = Nude	n	%	TV in mm ³	in Tagen	
GLC 4 ADR	5 R	10/10	100	100	8,5	1,9
GLC 4	5 R	8/10	80	100	11,4	3,2
CEM neo	15 R	28/30	90	100	12,7	1,3
A673	5 R	10/10	100	100	7,7	1,6

HT29	3 R	5/6	90	100	10,6	5
HT29	3 N	6/6	100	100	7,5	2,1

Tabelle 3: Maus-Tumormodelle

In Tabelle 3 sind die erfolgreich etablierten Modelle zusammengefasst. Die Tabelle beinhaltet die eingesetzte Tierzahl pro Tumorart, die Anzahl der in einer Gruppe solide gewachsenen Tumore mit einem Mindestvolumen von 100 mm³ (Anwachsrate), die Induktionszeit (die Zeit die benötigt wird vom Tag der Zellinjektion bis zum Erreichen des Mindestvolumens) und die Tumorverdopplungszeit.

Der Wachstumsverlauf der Xenotransplantate wurde maximal 45 Tage verfolgt. Die Induktionszeit betrug im allgemeinen zwischen 7 und 12 Tagen. Die meisten Versuche konnten nach spätestens 25 Versuchstagen erfolgreich beendet werden.

Die Verdopplungszeiten der einzelnen Xenotransplantate sind in der Tabelle 3 aufgeführt. Die kürzeste Verdopplungszeit besitzen die Tumore der Leukamiezelllinie CEM neo. Nach 1,3 Tagen hatte der Tumor im Durchschnitt bereits 200 % seines Ausgangsvolumens von 100 mm³ erreicht. Gefolgt von den Tumoren des Weichteilsarkoms A673 mit einer Verdopplungszeit von durchschnittlich 1,6 Tagen. Die Lungenkarzinomzelllinien benötigen in der Regel 2 - 3 Tage länger, bis sich das Volumen verdoppelt. Das Kolonkarzinom HT29 erreichte in den RAG-1^{-/-} Mäusen nach 5 Tagen 200 % seines durchschnittlichen Ausgangsvolumens und in den Nude-Mäusen 2,1 Tage.

Für weitere Analysen von APIT unter physiologischen Bedingungen, stehen die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Tumor-Maus-Modelle zu Verfügung. Gerade im Hinblick der Tumorthherapie bietet das subkutane Xenotransplantat-Modell die Möglichkeit, Rezessionen des Gewebes sofort zu erkennen. Die Tumore sind nicht nur genau und leicht zu messen, sondern belasten zu dem den tierischen Organismus minimal. Mit diesen etabliert Modellen, wurde eine Reihe repräsentativer Krebserkrankungen der Bevölkerung abgedeckt.