Aus der Medzinischen Klinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie der
Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt Universität zu Berlin

Dissertation

Neue Ansätze zur zielgerichteten Behandlung solider Tumoren.

Antisense Oligonukleotide und Immunotoxine zur tumorzellspezifischen Apoptoseinduktion

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt Universität zu Berlin

von Maximilian Posch
aus Freiburg im Br.

Dekan Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter

1. Prof. Dr. K. Possinger

2. Prof. Dr. med G. Ehinger

3. Prof Dr. med. B. Jansen

Datum der Promotion 18.03.02

1. Einleitung 8

1.1 Ziel der Arbeit 8

1.2 Krebs, Chemotherapie und Chemoresistenz 9

1.2.1 Lungentumoren 9

1.2.2 Brustkrebs 10

1.2.3 Kolonkarzinome 11

1.2.4 Chemotherapie und Chemoresistenz 11

1.3 Apoptose 12

1.3.1 Die Bcl-2 Familie 13

1.3.2 APO/Fas-Rezeptoren 15

1.3.3 Caspasen 15

1.4 Neue Therapiemethoden 16

1.4.1 Antisense Nukleotide 16

1.4.1.1 Struktur 17

1.4.1.2 Zelluläre Aufnahme 17

1.4.1.3 Wirkungsmechanismen 18

1.4.2 Immunotoxine 18

1.4.2.1 Struktur 19

1.4.2.2 Zelluläre Aufnahme 19

1.4.2.3 Wirkungsmechanismen 20

2. Materialien 21

2.1 Tumorzellinien 21

2.2 Chemikalien und Reagenzien 21

2.3 Wirkstoffe 22

2.3.1 Zytostatika 22

2.3.2 Antisense Oligonukleotide 23

2.3.3 4D5MOC-B-ETA 23

3. Methoden 24

3.1 In vitro 24

3.1.1 Zellkultur 24

3.1.2 Behandlung mit Zytostatika 24

3.1.3 Transfektion mit 4625 24

3.1.4 Kombinationsbehandlung 25

3.1.5 Behandlung mit 4D5MOC-B-ETA 25

3.1.6 Proliferations (MTT) Assay 25

3.1.7 Trypan Blau Exklusion 25

3.1.8 Durchflusszytometrie (FACS) 26

3.1.8.1 PI-Aufname 26

3.1.8.2 Detektion von Ep-CAM 26

3.1.9 Western-Blot 26

3.1.10 Leucin-Einbautest 27

3.1.11 Statistik 27

3.2 In vivo 28

3.2.1 Art und Haltung 28

3.2.2 Versuchsablauf 28

3.2.3 Statistik 28

4. Ergebnisse Teil 1 29

4.1 In vitro 29

4.1.1 Transfektion mit 4625 29

4.1.1.1 Western Blot 29

4.1.1.2 Proliferationsassays 30

4.1.1.3 Trypan Blau Exklusionstest 30

4.1.2 Behandlung mit Standardtherapien 31

4.1.2.1 Western Blot 32

4.1.2.2 Proliferationsassay 33

4.1.3 Kombinationsbehandlung 34

4.1.3.1 Western Blot 34

4.1.3.2 Proliferationsassay 35

4.1.3.3 PI- Aufnahme 37

4.2 In vivo 38

4.2.1 Behandlung mit Standardtherapien 39

4.2.1.1 MDA-MB-231 Xenotransplantate 39

4.2.1.2 Colo-320 Xenotransplantate 40

4.2.2 Kombinationsbehandlung 41

4.2.2.1 MDA-MB-231 Xenotransplantate 41

4.2.2.2 Colo-320 Xenotransplantate 42

5. Ergebnisse Teil 2 44

5.1 In vitro 44

5.1.1 Ep-CAM Detektion 44

5.1.2 Leucin Einbautest 44

5.1.3 Proliferationsassays 45

5.1.4 Trypan Blau Exklusionstest 46

5.2 In vivo 47

5.2.1 SW2 Xenotransplantate 47

5.2.2 HT-29 Xenotransplantate 48

6. Zusammenfassung und Diskussion 51

6.1 Teil 1 51

6.2 Teil 2 55

7. Referenzen 58

Abkürzungen:

5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
APS	Amoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serum Albumin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsFv	disulfid Fragment variable
ECL	Enhanced Chemiluminiscence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ep-CAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
ER	Östrogenrezeptor
ETA	Pseudomonas Etotoxin A
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
IC50	50% Hemmkonzentration
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mM	mikromolar
nM	nanomolar
fM	femtomolar
pM	pikomolar
MOE	Methoxy-ethoxy
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2.5-diphe-nyltetrazolium-bromid
NSCLC	Non.Small Cell Lung Cancer
PBS	Phosphat bufferd Saline
PI	Propidiumiodid
PMSF	
P/S	Penicillin/Streptomycin
R.E.S	retikulo-endotheliales System
SCFV	single chain Fragment variable
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SDS	Sodiumdodecylsulfate
S.E.M	Standarfehler
SPF	Specified Pathogen Free
TBS	Tris-buffered Saline
TTBS	TBS + Tween
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphatenick end labeling
V H	variable Region der schweren Kette
V L	variable Region der leichten Kette
VLS	Vascular Leak Syndrome
w/w	weight per weight

1 Einleitung

1.1 Ziel der Arbeit

Die Entstehung maligner Tumoren beruht auf einem gestörten Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zelltod. Krebszellen können sich unkontrolliert teilen, ohne durch den programmierten Zelltod (Apoptose) zu Grunde zu gehen. Die derzeit praktisch einzige Therapiestrategie gegen eine weitere Ausbreitung der Tumorzellen im Körper ist die systemische Chemotherapie. Sie wirkt meist unspezifisch antiproliferativ über eine Hemmung des DNA Stoffwechsels bzw. der Zellteilung und stellt gleichzeitig einen Auslöser für das apoptotische Programm dar. Krebszellen entwickeln jedoch Mechanismen, sich vor dem Selbstmordprogramm zu schützen und können sich so trotz Anwesenheit zytostatischer Wirkstoffe weiter ausbreiten. Bei vielen Tumoren etabliert sich im Laufe der Behandlung solch eine Chemoresistenz gegen strukturell unterschiedliche Substanzen. Dieser Vorgang ist häufig therapielimitierend und ein großes Problem in der heutigen Krebstherapie.

Es konnten bereits viele unterschiedliche, molekulare Mechanismen aufgeklärt werden, die Krebszellen vor chemotherapeutischen Wirkstoffen und der Apoptose schützen. Die Tatsache, daß die Entwicklung der Chemoresistenz eines Tumors auf vielen zellulären Ebenen basiert, macht die Entwicklung neuer rationaler Strategien zur effektiveren Krebsbehandlung zu einer besonderen Herausforderung. Durch wachsende Einblicke in die Biologie vieler Tumoren werden Mechanismen und Strukturen gefunden, die nicht oder nur sehr eingeschränkt in gesundem Geweben vorkommen. Es ist so möglich Substanzen zu entwickeln, die selektiv nur auf Krebszellen wirken. Tumorzellspezifische Wirkstoffe könnten in Zukunft alleine oder in Kombination mit etablierten Therapieverfahren effektive und nebenwirkungsarme Behandlungsformen für refraktäre Tumoren darstellen.

In dieser Arbeit sollen zwei neue, rationale Strategien vorgestellt werden, die Tumorzellen selektiv eliminieren bzw. gegenüber Standardtherapien wieder sensitivieren sollen. Es handelt sich um zwei unterschiedliche, neuentwickelte Wirkstoffe, die an verschiedenen Krebszellinien und im Mausmodell untersucht wurden und sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Die Auslösung der Apoptose wird von verschiedenen Proteinen unterschiedlich beeinflusst. Es steht fest, daß Tumorzellen Proteine überexprimieren, die sie vor der Apoptose und somit vor chemotherapeutischen Wirkstoffen schützen. Die Bcl-2 Familie spielt in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle (1). Proteine, die zur Bcl-2 Familie gehören regulieren die Apoptoseauslösung in gegensätzlicher Weise (2). Zwei wichtige Mitglieder dieser Familie sind Bcl-2 und Bcl-xL*, die in unterschiedlichen Krebszellen entscheidend an der Chemoresistenzentwicklung beteiligt sind (3,4). Es wurden bereits erste Erfolge erzielt mittels Antisense Molekülen die Bildung eines dieser beiden Proteine spezifisch zu hemmen (5) und so Tumoren gegenüber

---

* Im folgenden Text werden zwei Schreibweisen für Bcl-2 Familienmitglieder verwendet. Wenn die Proteine gemeint sind, werden diese groß geschrieben. Sind sie kleingeschrieben bezieht es sich auf die Gene bzw. mRNA.

Standardtherapien wieder sensitivieren (6,7). Bcl-2 Antisense Oligonukleotide wurden auch schon in klinischen Studien an Patienten getestet (8,9). Durch Auffinden von Homologieregionen in der mRNA von bcl-2 und bcl-xL, ist es möglich, mit einem dazu komplementär sequenziertem Antisense Oligonukleotid bcl-2 und bcl-xL mRNA gleichzeitig zu degradieren und so die Exprimierung beider Proteine zu hemmen (10).

Die Wirkung des bispezifischen 4625 Antisense, bezüglich Proteindegradierung beider Zielproteine, Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion wurde alleine und in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika in vitro und im Mausmodell untersucht. Fragestellung und Ziel dieser Untersuchung bestand insbesondere darin, ob Tumorzellen unabhängig von ihren Bcl-2/Bcl-xL Expressionsmustern auf das 4625 Antisense ansprechen und/oder gegenüber Zytostatika in vitro und in vivo sensitiviert werden können.

Ep-CAM (17 1-A Antigen oder EGP2) ist ein 38 kDa Oberflächenglykoprotein, das häufig von soliden Tumoren exprimiert wird (11,12). Neben der gesicherten Funktion als Adhäsionsmolekül konnte eine Beteiligung von Ep-CAM an Prozessen wie Invasion und Metastasierung bisher noch nicht ausreichend geklärt werden. Die Karzinomspezifität wurde allerdings in der Vergangenheit sowohl für diagnostische als auch therapeutische Zwecke genutzt (13,14). Ep-CAM stellt u.a. das Antigen für den monklonalen Antikörper 31 (MOC31) dar. Der MOC31 wurde in vorhergehenden Experimenten bereits nach Fusion mit dem Pseudomonas Exotoxin A athymischen Mäusen injiziert und inhibierte so das Wachstum humaner Tumoren (15). Geringe Tumorpenetration, Seruminstabilität bei 37°C und die murine Struktur des MOC31 begründeten weitere Anstrengungen den Antikörper und somit das Immunotoxin zu verkleinern, zu humanisieren und zu stabilisieren. Die variablen Fragmente des MOC31 wurden auf ein humanes Peptidgerüst (4D5) transferiert und nach weiteren Modifikationen entstand der bei 37°C stabile Miniantikörper scFv 4D5MOC-B (16). Durch Fusion mit den zytotoxisch wirksamen Domänen II und III des Pseudomonas Exotoxin A, entstand das Immunotoxin 4D5MOC-B-ETA.

Die zellspezifische Blockierung der Proteinsynthese, Proliferationshemmung, Zytotoxizität und anti-tumorale Wirkung in vivo wurde an verschiedenen Ep-CAM positiven Krebszellinien ermittelt. Von besonderem Interesse war hiebei, ob und inwiefern es gelungen ist die antitumorale Wirkung des 4D5MOC-B-ETA im Vergleich zu dem MOC31-ETA zu steigern.

1.2 Krebs, Chemotherapie und Chemoresistenz

1.2.1 Lungentumoren

Bronchialkarzinome stellen die häufigste Krebs assoziierte Todesursache westlicher Staaten dar (17). Insbesondere Raucher haben durch die Inhalation des Teers und der Mitverbrennstoffe ein signifikant erhöhtes Risiko an Lungenkrebs zu erkranken. Die Inzidenz steigt insbesondere bei Frauen gegenwärtig weltweit.

Klinisch und morphologisch gilt es das kleinzellige (SCLC) vom nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) zu unterscheiden. Histologisch werden diese in weitere Subgruppen unterteilt. Das schnell wachsende und früh metastasierende SCLC macht etwa 20% aller Lungenkarzinome aus. Es spricht initial sehr gut auf

Chemotherapie an und hat trotzdem eine sehr schlechte Prognose. Aufgrund von Rezidiven und Resistenzentwicklungen beträgt die beträgt 5 Jahres Überlebensrate lediglich 5%. Die serologischen Marker beim SCLC, die Neuronen spezifische Enolase, L-Dopa Dekarboxylase, Neurofilamente, etc. und die endokrin bedingten paraneoplastischen klinische Symptomatik deuten auf einen neuroendokrinen Ursprung des SCLC's hin. Allerdings treten sowohl Symptome als auch die neuroendokrine Marker auch bei NSCLC auf und bei manchen Patienten entwickeln sich Kombinationstumoren. Zu den NSCLC Tumoren zählen Adeno-, Plattenepithel- und grosszelliges Bronchialkarzinom, die etwa im Verhältnis 3:3:1 auftreten. Im Allgemeinen haben das Adeno- und das grosszellige Bronchialkarzinom durch ihre ausgeprägtere Angioinvasion und hämatogene Streuung trotz langsameren Wachstums eine schlechtere Prognose als das Plattenepithelkarzinom. Wegen der späteren Metastasierung des NSCLC ist ein chirurgischer Eingriff zum Zeitpunkt der Diagnosestellung häufiger indiziert als beim SCLC. Die 5-Jahre Überlebensrate liegt dann bei etwa 50%.

Die Therapieform von Bronchialkarzinomen hängt bei beiden Formen im Wesentlichen vom Tumorstaging ab. Ein operativ kurativer Eingriff ist wegen der häufig bereits fortgeschrittenen Organmetastasierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung beim SCLC selten sinnvoll. Bei den systemischen Therapieformen sind Kombinationsbehandlungen den Monotherapien meist überlegen. Für fortgeschrittene Tumoren ab Stadium 3 sind Bestrahlung des Primärtumors und der befallenen Lymphknoten und die Hochdosistherapie mit autologer Knochenmarkstransplantation weitere Möglichkeiten einer Behandlung des SCLC's.

1.2.2 Brustkrebs

Brustkrebs ist die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung bei Frauen. Ein erhöhtes Risiko und ein Zeichen gesteigerter Malignität stellen dabei genetische Mutationen in den BRCA1 (18), BRCA2 und im p53 Gen dar, wobei das Risiko an genetisch bedingtem Brustkrebs zu erkranken mit zunehmendem Alter scheinbar abnimmt. Beim Mammakarzinom spielen hormonelle Einflüsse sowie autokrin stimuliertes Wachstum eine größere Rolle als beim Bronchialkarzinom. Es werden die östrogenrezeptorpositiven (ER+) von den östrogenrezeptornegativen (ER-) Mammakarzinomen unterschieden. Ein positiver ER Status wird als gutes prognostisches Zeichen gedeutet, unter anderem weil die pharmakologische Blockierung der Rezeptoren mit Östrogenantagonisten eine Behandlungsmöglichkeit darstellen kann. Auch wenn manche ER-Mammakarzinomzellen aus bisher unbekannten Gründen auch auf Antiöstrogene ansprechen, gelten diese als therapieresistenter. Pathohistologisch existieren unterschiedliche und komplizierte Klassifizierungen von Brustkrebs. Bei den invasiven Karzinomen unterscheidet man das duktale, medulläre, lobuläre, papillär, tubuläre muzinöse, apokrine und adenoidzystische Karzinom, denen noch verschiedene Komponenten zugeordnet werden können. Die Therapieform wird wie beim Bronchialkarzinom wesentlich vom Zeitpunkt der Diagnosestellung bestimmt. Auf einen operativen Eingriff wird bei fortgeschrittenem Tumorstadium häufig verzichtet und auch die Chemotherapie hat dann eine "nur" noch palliative Funktion. Nach wie vor häufig angewandte Systemtherapien bei Brustkrebs sind einerseits anthrazyclinhaltige Schemata und CMF (Cyclophosphamide, Methotrexat und 5-Fluorouracil) Andererseits Hormontherapien, wie Tamoxifen oder Aminoglutethimid. Neuere Wirkstoffe mit einer Response Rate von über 50% sind Taxane, wie beispielsweise Paclitaxel. Zwei für den europäischen Markt insbesondere zur Brustkrebstherapie neu zugelassene Wirkstoffe sind Herceptin und Capecitabine. Hier werden tumorspezifische Antigene bzw. Enzyme benutzt um eine

effektive und nebenwirkungsärmere Wirkung zu erzielen, die allerdings bisher noch nicht durch Langzeitstudien untersucht werden konnte.

1.2.3 Kolonkarzinome

Das kolorektale Karzinom ist die dritthäufigste krebsassozierte Todesursache und betrifft beide Geschlechter gleichermaßen. Risikofaktoren wie fett- und cholesterinreiche Nahrung erklären, daß die höchsten Inzidenzen in den Industrieländern vorkommen. Weitere prädisponierende Faktoren sind in erster Linie genetische Syndrome wie die FAP (Familiäre adenomatöse Polypose) und HNPCC (Heriditäre, nicht polypöse kolorektale Karzinome). Die bei diesen Patienten auftretenden multiplen Adenome des Darmtrakts entarten häufig zu malignen Karzinomen. Chronische Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa und M. Chron, sowie idiopathische, adenomatöse Polypen sind weitere Risikofaktoren. Pathohistologisch sind fast 95% aller kolorektalen Karzinome Adenokarzinome und das histologische Grading korreliert eng mit der prognostischen Überlebenszeit. Den Gradings 1-3 stehen 5-Jahresüberlebenszeiten von 50-100%, 33-80% und 11-58% gegenüber. Folglich wird die Prognose auch hier im Wesentlichen durch die Früherkennung bestimmt. Chirurgische Resektion und postadjuvante Bestrahlung spielen bei dieser Tumorart eine wichtige Rolle. Gegen Ausbreitung und Organmetastasierung wird 5-Fluorouracil seit 50 Jahren noch immer als Monotherapie oder mit Methyl-CCNU und Vincristin eingesetzt.

1.2.4 Chemotherapie und Chemoresistenz

Vor der Entwicklung chemotherapeutischer Wirkstoffe, war Krebs nur lokal durch chirurgische Eingriffe oder Bestrahlung behandelbar. Aufgrund hämatologischer Krebserkrankungen und Metastasierungen solider Tumoren, stellen systemisch wirkende Zytostatika einen wesentlichen Fortschritt in der Tumorbekämpfung dar. Auch wenn die Entwicklung neuer Chemotherapeutika und Kombinationstherapien in den letzten Jahren dieBehandlungssituation bei einigen Tumorarten entscheidend verbesserte, sind insbesondere die häufig vorkommenden und prognostisch schlechten Karzinome, wie Bronchial-, Kolon- und Mammakarzinom, nach wie vor nicht erfolgreich therapierbar.

Man unterscheidet zwischen phasen-spezifischen und phasen-unspezifischen Zytostatika. Zur ersten Gruppe gehören Antimetabolite (wie auch 5-FU), Mitosehemmstoffe (Vinca-Alkaloide) und Paclitaxel. Zu den phasen-unspezifischen (oder zyklusspezifischen) zählen Platinkomplexverbindungen, Alkylantien und zytostatische Antibiotika. Klinisch werden die adjuvante (prae- oder postoperative) und die palliative Chemotherapie unterschieden, wobei erstere auf eine vollständige Tumoreradikation und Heilung, letztere dagegen auf eine Verbesserung der Lebensqualität abzielt. Die vollständige Eliminierung aller Tumorzellen spielt bei der adjuvanten Therapie deshalb eine so wichtige Rolle, weil theoretisch aus jeder Zelle wieder ein Rezidiv entstehen kann. Wenn man von einer initialen Tumormasse von etwa einem Kilogramm (1012 Zellen) ausgeht, ergibt sich eine klinisch vollständige Remission nach einer Zellreduzierung um 99.9%. Dies entspricht einem Tumorgewicht von 1 g und immer noch 109 Krebszellen. Solide Tumoren bestehen einerseits aus einer Wachstumsfraktion und andererseits aus Zellen die sich in der Ruhephase, also der G0 Phase befinden und durch verschiedene Einflüsse wieder zum Wachstum rekrutiert werden können. Das Wachstum eines Tumors

hängt im Wesentlichen von der Grösse der Wachstumsfraktion ab. Die sogenannte Generationszeit (die Dauer des Zellzyklus zwischen zwei Mitosen) spielt dabei eine untergeordnete Rolle und kann zwischen 20 und 100 Stunden schwanken. Insbesondere Tumorzellen der Wachstumsfraktion, die sich in der S oder M Phase des Zellzyklus befinden, sprechen auf Zytostatikatherapie an. Die aus der unspezifischen, antiproliferativen und zytotoxischen Wirkung resultierenden Nebenwirkungen von Chemotherapeutika betreffen vor allem die schnell proliferierenden Gewebe, wie das hämatopoetische Knochenmark, den Magen-Darm Trakt, die Haut und Haarfollikel. Diese unerwünschten Arzneimittelwirkungen beschränken oft die Dosis und Dauer der Therapie. Viele Tumorarten entwickeln während der Chemotherapie Resistenzen gegenüber strukturell unterschiedlichen Zytostatika und es werden zahlreiche Mechanismen diskutiert, die zur Entwicklung dieser Resistenzen beitragen. Viele sind bereits experimentell nachgewiesen und lassen sich auf die Expression inaktivierender Enzyme, wie Glutathion-S-transferase, Glutathionperoxidase oder auf Überexprimierung anti-apoptotischer Proteine zurückführen. Eine wichtige Rolle in der Chemoresistenz spielt auch das mdr-1 Gen, dessen Protein, ein membranständiges Glykoprotein, die antitumoralen Wirkstoffe in einem energieabhängigen Prozess regelrecht aus der Zelle pumpt und somit von ihrem Wirkort entfernt. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß Tumorzellen, welche durch ein Zytostatikum eliminiert werden, überwiegend durch Apoptose zu Grunde gehen. Diese Einsicht macht Apoptose-regulierende Substanzen zu neuen potentiellen Wirkstoffen zur erfolgreicherenKrebstherapie. Auch die Untersuchung pro- und anti-apoptotische wirkender Proteine ist ein wichtiger Bestandteil der gegenwärtigen Krebsforschung. Insbesondere die Bcl-2 Familie scheint eine entscheidende Rolle in der Chemoresistenzentwicklung zu spielen. Auch, wenn gegensätzliche Aufassungen über bcl-2 bezüglich der prognostischen Beurteilung von Tumorleiden existieren (19), so scheint doch die Tatsache gesichert, daß Bcl-2 überexprimierende Tumoren, sich weniger durch ein schnelles Wachstum, als vielmehr durch erhöhte Resistenz gegenüber Chemo- und Radioresistenz ausgezeichnen und als hochmaligne angesehen werden müssen. Die Tatsache, daß Bcl-2 Apoptose von Zellen in Abwesenheit, überlebenswichtiger Zytokine verhindert, könnte auch einen Beitrag zur Metastasierung erklären. Die Überexprimierung des Onkogens könnte einzelne, zirkulierende Tumorzellen vor dem Selbstmordprogramm schützten. Bcl-xL konnte bereits eine an der Metastasierung beteiligte Funktion in Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden (20)

.

1.3 Apoptose

Apoptose (gr. apoptos: Das Herabfallen) ist ein kontrollierter, energieabhängiger, sogenannter “programmierter Zelltod”, der im Laufe der Embryonal- und Organentwicklung von ganzen Zellverbänden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchlaufen werden muß, um die Integrität des Gesamtorganismus nicht zu gefährden. Praktisch jede Körperzelle ist mit dem Programm für die Apoptose ausgestattet und adäquate Stimuli können dieses Programm auslösen. Morphologisch geht die Apoptose mit einer Kondensierung des Chromatins, einer blasigen Veränderung und Schrumpfung von Kern und Zelle (Schrumpfnekrose) einher und endet schliesslich mit der Auflösung der Zelle in viele Zellkörperchen (apoptotic bodies). Die Apoptose läuft im Gegensatz zur Nekrose ohne Entzündungsreaktion ab, weil einzelne Zellkörperchen von Makrophagen phagozytiert werden und so keine inflammatorisch wirkenden zytosolischen Zellbestandteile in den Extrazellulärraum gelangen.

Neben Krebs werden heute eine Reihe verschiedener Erkrankungen auf eine Störung in der Apoptose zurückgeführt. Aus diesem Grund erwarten mehrere Fachrichtungen der Medizin grosse Erfolge von neuen, therapeutischen Apoptose-regulierenden Substanzen, die entweder Apoptose induzieren oder hemmen (21).

Für die Auslösung des programmierten Zelltodes kann man einen rezeptorvermittelten, also exogen ausgelösten und einen mitochondrialen, also endogenen Signaltransduktionweg unterscheiden. Diese beiden "pathways" besitzen eine gemeinsame Endstrecke in der Aktivierung von ICE related Proteasen (Caspasen). ICE steht für Interleukin-1ß Converting Enzyme und bezeichnet eine Familie hochspezifischer Proteasen. Sie liegen intrazellulär als inaktive Proenzyme vor und werden nach proteolytischer Spaltung in die aktive Form überführt. Daraufhin bauen sie zelluläre Bestandteile ab und aktivieren weitere Caspasen, die den programmierten Zelltod vollstrecken.

Die molekularen Mechanismen der Apoptose wurden anfangs am besten an dem Nematoden Caenorhabditis elegans untersucht. Es konnten drei verschiedene Proteine isoliert werden, die für die normale Entwicklung von C. elegans erforderlich sind. Ced-3, Ced-4 und Ced-9. Der Funktionsverlust oder das Fehlen von Ced-3 und/oder Ced-4 erschwert die Auslösung der Apoptose in den betroffenen Zellen. Verlust von Ced-9 führt dagegen zu einer erhöhten Apoptosebereitschaft. Ced-4 kann sowohl an Ced-3 als auch an Ced-9 binden. Im ersten Fall wird die proteolytische Aktivität von Ced-3 aktiviert. Im zweiten Fall hindert Ced-9 Ced-4 an der Aktivierung von Ced-3. Da es sich hierbei um phylogenetisch alte Gene handelt, haben die Proteine des Nematoden eine starke Ähnlichkeit mit denen des Säugerorganismus. Spätere Experimente konnten zeigen, daß Ced-3 den Caspasen der Säugetiere ähnelt. Ced-9 dagegen entspricht dem Bcl-2 Protein (22, 23) und Apaf-1 stellte sich schliesslich als lang gesuchtes Korrelat zu Ced-4 heraus (24).

1.3.1 Die Bcl-2 Familie

Bcl-2 steht für B-cell lymphoma. Bcl-2 ist ein 26 kDa Protein und wurde das erste mal in Lymphomzellen mit einer 14/21 Translokation entdeckt. Hierbei wird das bcl-2 Gen unter die Kontrolle des Immunglobulinpromoters gestellt und überexprimiert, woraufhin die betroffenen Zellen apopotoseresistent werden (25). Mittlerweile sind mindestens 17, sowohl pro-, als auch anti-apoptotisch wirkende Proteine identifiziert worden, die aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur Bcl-2 Familie zusammengefaßt werden. Zu den anti-apoptotischen gehören Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 und NR-13. Bax, Bak, Bad, Bcl-xS und EGL-1 sind die wichtigsten pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie. Alle diese Proteine enthalten zumindest eine der vier konservierten Domänen, die als BH (Bcl-Homology) bezeichnet werden (BH1-BH4). Bcl-2 und Bcl-xL enthalten alle vier homologe Regionen BH1-BH4, wohingegen die proapoptotischen Gegenspieler oft nur BH1, BH2, und/oder nur BH3 enthalten. Inwieweit die einzelnen Domänen in Bindungen mit anderen regulatorischen Proteinen involviert sind, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Der BH3 Domäne scheint allerdings eine besondere Rolle im pro-apoptotischen "signaling" zuzukommen. Dies läßt sich auf jeden Fall annehmen, da einige Proteine isoliert wurden, die ausschließlich BH3 enthalten (BH3-domain-only proteins) und eine pro-apoptotische Wirkung zeigen. Die BH4 Region scheint dagegen eher anti-apoptotische Eigenschaften zu haben und stellt evtl. die Bindungsstelle für die CED4 ähnliche Domäne von Apaf1 dar.

Die verschiedenen Bcl-2 Familienmitglieder interagieren unterschiedlich miteinander und es ergeben sich komplizierte Regulationsmechanismen der Apoptose insgesamt. Generell kann man sich ein rheostatisches Gleichgewicht der verschiedenen pro- und anti-apoptotischen Faktoren vorstellen, welches das Schicksal der Zelle bestimmt.

Bcl-2 und Bcl-xL sind über karboxyterminale, hydrophobe Domänen in der äußeren Mitochondrienmembran, im ER und der Kernmembran verankert (26). Unterschiedliche Experimente konnten zeigen, daß Bcl-2 und auchBcl-xL die Fähigkeit besitzen Apaf1 zu binden und damit diesen Apoptose aktivierenden Faktor zu inaktivieren (27). Dieses sogenannte displacement Modell entspricht den für C. elegans nachgewiesenen Wechselwirkungen der CED-Moleküle miteinander und wird derzeit auch für andere apoptoseregulierende Proteine diskutiert. So wurde beispielsweise gezeigt, daß Bcl-2 und Bcl-xL ihren proapoptotischen Gegenspieler Bax binden und somit inaktivieren können. Die Frage, ob hierbei Bcl-2 und Bcl-xL die pro-apoptotische Wirkung von Bax unterdrücken oder selbst auch anti-apoptotisch wirken, wird laut neueren Erkenntnissen wohl so beantwortet werden, daß beide beides können (28). Die Zucht von knock-out Mäusen ermöglicht tiefere Einblicke in die Regulationsmechanismen der Apoptose und es stellte sich heraus, daß Bax auch in der Abwesenheit von Bcl-2 und Bcl-xL pro-apoptisch wirkt und andersherum (29). Mutanten der Proteine, die trotz dem Verlust der Fähigkeit zu dimerisieren, noch eine anti- bzw pro-apoptotische Wirkung zeigten, konnten dies bestätigen.

Die Bcl-2/Bax bzw. Bcl-xL/Bax Ratio wird gegenwärtig als ein entscheidend für den programmierten Zelltod insbesondere im Rahmen der Chemoresistenzentwicklung angesehen (30). Dabei sollen einige Zytostatika kurzfristig, d.h. innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen die Exprimierung von Bcl-2/Bcl-xL und Bax/Bak gegensätzlich beeinflussen (31, 32). Auch eine Änderung des Membranpotentials der Mitochondrien (y) gilt als ein möglicher Auslöser für Apoptose (33), der durch Bcl-2 und Bcl-xL verhindert wird. Der pH Gradient, durch die Atmungskette aufrecht erhalten, besteht zwischen der intramitochondrialen Matrix und dem intermembranösen Raum. Die äußere Membran ist für Ionen frei permeabel. In der Änderung von pH und Ionenkonzentration während der Apoptose wirken Bcl-2/Bcl-xl und Bax/Bak ebenfalls antagonistisch (34), indem erstere sog. Porin-Proteine oder VDACs (Voltage Dependent Anion Channels) zu schließen und letztere zu öffnen vermögen (35). Einige Untersuchungen gingen sogar noch weiter und zeigten, daß sowohl Bcl-2 und Bcl-xL als auch Bax in vitro Kanäle in biologische Membranen formen können (36-38). Die 3-dimensionale Struktur von Bcl-xL zeigt eine gewisse Ähnlichkeit mit Membranporen bildenden, bakteriellen Toxinen und es ist derzeit noch nicht vollständig geklärt, ob und welche Stoffe durch einen solchen Kanal gelangen können. Anderen Substanzen wird dagegen der Austritt aus dem mitochondrialen Kompartiment durch Bcl-2/Bcl-xL erschwert. In diesem Zusammenhang sollen Bcl-2 und Bcl-xL den Ausstrom von mitochondrialen Cytochrom c verhindern (39). Es wurde gezeigt, daß die aminoterminale Bindungsstelle von Apaf1 (CARD =CAspase Recruitment Domain) unter dem Einfluß von Cytochrom c konfirmatorisch im Sinne einer verstärkten Bindung und somit Aktivierung der Caspase-9 modifiziert wird. Der Komplex aus Apaf1, Caspase-9 und Cytochrom c erhielt wegen seiner entscheidenden Funktion auch den Namen Apoptosom. Cytochrom c ist für die Zelle also ein Signal für die Apoptose. Die Tatsache, daß Bcl-2 überexprimierende Zellen durch Mikroinjektion großer Mengen von Cytochrom c nicht apoptotisch werden, zeigt allerdings, daß dies nicht als isolierter Mechanismusverstanden werden darf und auch nicht der einzige Auslöser für Apoptose sein kann.

In jüngster Zeit konnte immer wieder gezeigt werden, daß manche Bcl-2 Proteine auch einer posttranslationalen Modifizierung unterliegen und die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 durch Phosphorylierung verschieder Threonin Reste abgeschwächt werden kann. Gerade auch im Zusammenhang mit der Wirkung von Paclitaxel wird eine Phosphorylierung und somit Inaktivierung von Bcl-2 und diskutiert (40). Die Relevanz dieser Mechanismen ist jedoch umstritten (41).

1.3.2 APO/Fas-Rezeptoren

Eine Zelle im Gesamtorganismus ist zum Überleben stets auf Reize von außen angewiesen. Im Falle des Kontaktverlusts oder Zytokinentzug kann die apoptotische Maschinerie in Gang gesetzt werden. Im Gegensatz zu diesen negativen Reizen gibt es auch positive, die durch Aktivierung bestimmter Zellrezeptoren Apoptose auslösen können. Hierzu gehören Liganden, wie Glukokorticoide, TNF und Lymphotoxin a.

Die am besten beschrieben Rezeptoren sind der FAS/Apo1/CD95 Rezeptor und der TNFR1/p55/CD120a Rezeptor (42). Rezeptoren der TNF-Familie scheinen eine in sich antagonistische Wirkung zu haben. So wirkt der TNFR1 pro- ,der TNFR3 dagegen überwiegend anti-apoptotisch und der TNFR2 nimmt eine Mittelstellung ein. Die intrazelluläre C-terminale Domäne des CD95 Rezeptors gleicht der des TNFR1 Rezeptors und enthält eine Bindungsstelle für zytoplasmatische Liganden, die sogenannte “Death Domain” (DD). Nach Ligandenbindung des CD95 oder TNFR1 dimerisieren die Death Domains eines Rezeptors, woraufhin das Adapterprotein FADD (Fas-Associated Death Domain) mit einer eigenen DD an den Komplex bindet und mit einer anderen Domäne, der DED (Death Effector Domain) mit dem Zymogen von Caspase 8 (FLICE) dimerisiert. Dabei wird durch die Aktivierung der CARD (CAspase Recruitment Domain), welche in verschiedenen Capasen vorhanden ist, die Protease gespalten und in ihre aktive Form überführt. Caspase 8 aktiviert dann weitere Effektor-Caspasen und die Apoptose wird durchlaufen.

1.3.3 Caspasen

Caspasen erhielten ihren Namen Mitte der neunziger Jahre durch ihre Substratspezifität (Cystein; ASPArtat) und stellen das Korrelat zu CED-3 von C. elegans dar. Mittlerweile sind etwa 13 Isoenzyme identifiziert, welche je nach Entdeckungszeitpunkt von 1-13 durchnumeriert wurden. Es sind Proteasen die bei Entzündungsreaktionen und bei der Apopotose eine wichtige Rolle spielen. Alle Caspasen werden als inaktive Proenzyme exprimiert und bestehen aus drei Domänen. Einer NH2-terminalen, einer Großen und einer Kleinen. Nach proteolytischer Spaltung zwischen der großen (~20 kDa) und der kleinen (~10 kDa) Untereinheit, verbinden sich beide zu einem Heterodimer, woraufhin zwei dieser Heterodimere zum Tetramer fusionieren und die aktive Form der Caspasen, mit zwei unabhängig voneinander funktionierenden aktiven Zentren bilden.

In der Apoptose stellen Caspasen die gemeinsame Endstrecke des extrinsischen und intrinsischen Weges dar, wobei Caspase 8 das Bindeglied für den rezeptorvermittelten und Caspase 9 für den mitochondrial eingeleiteten programmierten Zelltod sind (43). Caspasen werden oft als Vollstrecker der Apoptose angesehen. Dies trifft vor allem auf die Effektor Caspasen 3, 6 und 7 zu. Substrate der Caspasen sind einerseits wiederum andere Caspasen die sich daraufhin gegenseitig im Sinne einer sich selbst verstärkenden Kaskade aktivieren und andererseits verschiedene Endonukleasen, die die genomische DNA zu spalten vermögen. Hierdurch entstehen die nach elektrophoretischer Auftrennung Apoptose typischen DNA Leitern (DNA-laddering). Bei der Substratspezifität

der Caspasen wird insbesondere diskutiert, ob die Proteasen im Rahmen der Apoptose Proteine inaktivieren, die an der Unterdrückung des Zelltodes beteiligt sind (44). Da die Proteolyse ein irreversibler Vorgang ist und eine proteolytische Kaskade, wenn einmal gestartet kaum mehr gestoppt werden kann, müssen Caspasen in besonderem Maße reguliert werden. Dies geschieht einerseits durch zytosolische Proteine (IAP, Survivin) und durch positive und negative Rückkopplung der Substrate.

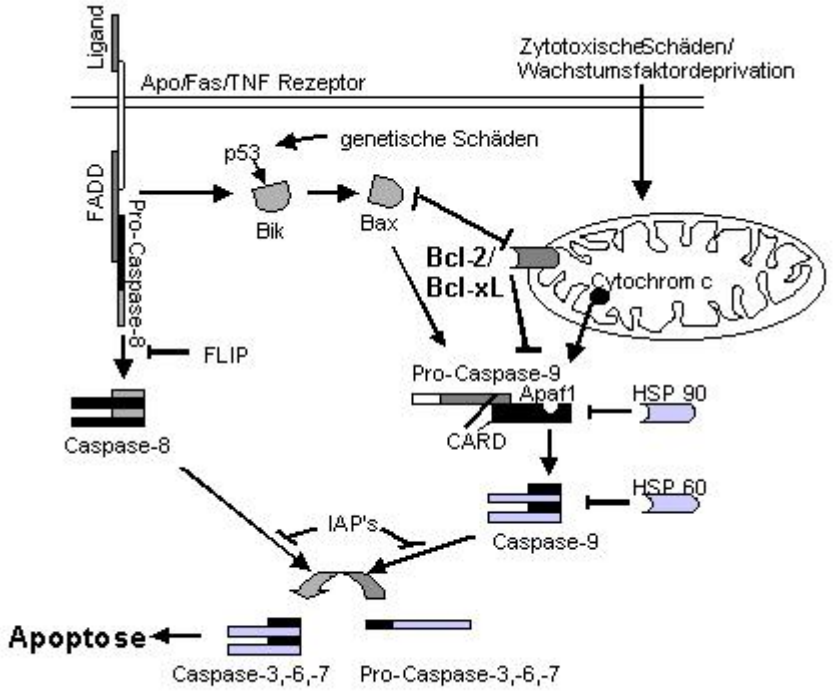

Abb. 1: Abgebildet sind der intrinsische und extrinsische Signaltransduktionsweg der Apoptose,welche in der Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 enden. Die apoptotische Maschinerie wird auf unterschiedlichen Stufen reguliert und gehemmt. P53 und einige Proteine der Bcl-2 Familie bewirken eventuell eine rezeptorvermittelte Aulösung beider Transduktionwege. (HSP = Heat Shock Protein; IAP's = Inhibitors of Apoptosis; Apaf = Apoptosis inducing factor; FADD = Fas Associated Death Domain; CARD = CAspase Recruitment Domain

1.4 Neue Therapiemethoden

1.4.1 Antisense Nukleotide

Antisense Nukleotide sind neuartige pharmakologische Wirkstoffe, deren Effektivität und Sicherheit zum großen Teil noch experimentell ermittelt wird. Es wurden allerdings auch schon klinische Studien mit Mono- und Kombinationstherapien bei unterschiedlichen Krebserkrankungen durchgeführt. Zur antineoplastischen Behandlung befinden sich beispielsweise Bcl-2 Antisense Moleküle gerade in Phase 1 der klinischen Erprobung (45).

Die Idee bei Antisense Oligonukleotiden ist die DNA bzw. mRNA eines krankheitsrelevanten Gens mit dem dazu komplementären Antisense Molekül sequenzspezifisch zu blockieren und somit die Bildung des biologisch

aktiven Proteins zu verhindern. Besondere Herausforderungen sind hierbei zum einen geeignete chemische Modifikationen, um Stabilität und sequenzspezifische Affinität des Oligonukleotids zu erhöhen, und zum anderen die Auswahl effektiver Bindungsregionen auf der Ziel-mRNA (46,47).

1.4.1.1 Struktur

Antisense Nukleotide bestehen aus 8-30 einzelsträngigen Basen, die komplementär zur mRNA-Zielregion des betreffenden Proteins sequenziert sind. Unmodifizierte Phosphodiester DNA/cDNA wird rasch von extrazellulären DNasen noch vor der Zellaufnahme abgebaut. Deswegen existieren heute verschiedene chemische Modifikationen, die vor allem das Gerüst des Nukleotidstranges, das sog. Backbone betreffen. Am besten etabliert sind die Phosphorothioate, bei denen ein Sauerstoffatom im Phosphat durch ein Schwefelatom ersetzt ist. Das Oligonukleotid ist so weitgehend vor dem enzymatischen Abbau geschützt, ohne daß es dabei an RNA Affinität verliert. Phosphorothioate Antisense Nukleotide wurden auch in den klinischen Studien verwendet. Sie können entweder teilweise (am 3' und 5' Ende) oder vollständig modifiziert sein. Mittlerweile existieren Antisense Nukleotide der zweiten Generation, wobei diese zusätzlich zu dem "phosphorothioated backbone" weitere Modifikationen enthalten. Insgesamt ergeben sich viele verschiedene Kombinationen der

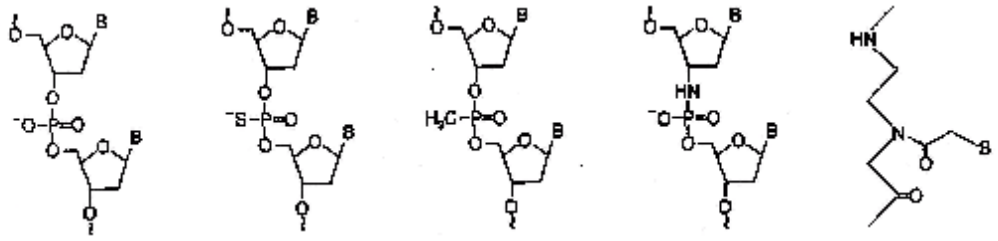

Abb. 2 Verschiedene chemische "backbone" Modifikationen von Antisense Oligonukleotiden (Kronenwett et al. Antisense strategies for the treatment of hematological malignancies and solid tumors Ann. Hematol. 77, 1-12

einzelnen Basen- Phosphat- und Zuckermodifikationen. Bei den Zuckermodifikationen handelt es sich meist um Substituierung des Wasserstoffatoms an 2' Position der Ribose durch Methyl, Propyl-, Pentylreste oder komplexeren Substituenten, wie in unserem Fall ein 2'-O-Methoxy-Ethoxy-Rest (MOE). Es gilt insgesamt die zelluläre Aufnahme, die Aktivierung der Ribonuklease H (RNase H) und Stabilität gegenüber DNasen zu verstärken, ohne dabei etwas von dem spezifischen Antisense Effekt einzubüßen. Durch Zuckermodifikation eines Antisense-Moleküls der zweiten Generation, nimmt beispielsweise das Ausmaß der RNase H Aktivierung zu, dafür allerdings die Sequenspezifität gegenüber der Ziel-mRNA ab. Es existieren deshalb kaum vollständig, sondern vielmehr nur an den 5' und 3' Enden Zucker-modifizierte Oligonukleotide. Solche sogenannten "wingmers".wurden auch in den hier vorgestellten Experimenten verwendet.

1.4.1.2 Zelluläre Aufnahme

Aufgrund der anionischen Natur von Nukleotiden werden nackte Oligonukleotide kaum von Zellen aufgenommen und es existieren verschiedene Methoden die zelluläre Aufnahme von Antisense Molekülen in

vitro zu verstärken. Neben viralen und liposomalen Vektoren stellen lipophile, polykationische chemische Verbindung im Komplex mit dem Nukleotid eine Möglichkeit des effektiven “cell delivery” dar (48). Das negativ geladene Nukleotid bildet einen Komplex mit diesen kationischen Lipiden und ist so erstens gegen extrazelluläre enzymatische Degradation geschützt und wird zweitens 50-1000 mal stärker von Zellen aufgenommen als nackte Nukleotide. Bei der Lipid vermittelten zellulären Aufnahme durch ubiquitäre, membranständige Glykoproteine handelt es sich um eine unspezifische Endozytose, bei der die Wirkstoffe nach Internalisierung aus dem Endosom in das Zytosol freigelassen werden.

1.4.1.3 Wirkungsmechanismen

Es existieren mehrere potentielle Wirkungsmechanismen für Antisense Oligonukleotide. Hybridisierung mit einem einzelsträngigen DNA Strang nach Spaltung durch die DNA Polymerase kann die Genexprimierung auf dem Transkriptionslevel blockieren. Durch Besetzen einer Intron-Exon Verbindungszielregion wird der Spleissvorgang verhindert und durch Binden an Initiationsfaktoren und Ribosomenuntereinheiten wird die Proteinexprimierung auf der Ebene der Translation gestört. Der entscheidende Mechanismus ist allerdings die Hybridisierung mit der einzelsträngigen mRNA und nachfolgender enzymatischer Spaltung. Nach der Zellaufnahme muß das Antisense mit der Zielregion “seines” mRNA Stranges hybridisieren, um dessen enzymatischen Abbau zu provozieren. Hierbei ist es wichtig zu wissen, daß die mRNA in vivo nicht als singulärer Strang, sondern als vielfach in sich hybridisiertes Molekül vorliegt und so nur wenige Sequenzen frei liegen. Dies schränkt die Auswahl von Zielregionen erheblich ein. Im übrigen muß sicher gestellt werden, daß die zu dem Antisense komplementäre Basensequenz in keinem anderen menschlichen Gen vorkommt.

Wenn das Nukleotid seine Zielregion gefunden hat und mit der mRNA Sequenz hybridisiert, wird die RNase H durch die unnatürliche Struktur aktiviert und spaltet die mRNA jedoch nicht das modifizierte Antisense Molekül. Der Antisense Effekt wird in der Tat zum größten Teil von der Aktivierung dieser RNase H bestimmt und es ist im Prinzip möglich, daß ein Antisense-Nukleotid mehrere Ziel-mRNA Stränge zerstört.

Toxizität und Pharmakokinetik von Antisense Nukleotiden konnten in den klinischen Studien bereits bestimmt werden. So weiß man heute, daß nach i.v. Applikation All-Phosphorothioate mit niedriger Affinität an Albumin und andere Serumproteine binden. Sie verteilen sich jedoch in der gesamten Peripherie und akkumulieren in Leber, Niere, Skelettmuskel, Rückenmark und Haut. Phosphorothioate werden je nach Gewebe innerhalb weniger Tage eliminiert und können die Blut-Hirn Schranke nicht überwinden.

Es konnten am Menschen nach mehrwöchiger intravenöser Gabe von 2mg/kg/Tag keine schwerwiegenden Nebenwirkungen festgestellt werden.

1.4.2 Immunotoxine

Immunotoxine bestehen aus einem Rezeptorliganden oder Antikörper und einer zytotoxisch hochwirksamen Substanz, die entweder chemisch oder genetisch rekombinant miteinander fusioniert wurden. Nach Antigenbindung werden die Zellgifte selektiv in Zielzellen eingeschleust. Tumorspezifische Oberflächenmoleküle können so für eine zielgerichtete Krebsbehandlung genutzt werden, indem sie die

Aufnahme von intrazellulär wirkenden Toxinen vermitteln. Gesunde Gewebe, die das Oberflächenantigen nicht tragen, bleiben dabei unversehrt. Heilversuche an Patienten, mit unterschiedlichen, austherapierten, malignen Erkrankungen, konnten in der Vergangenheit bereits öfters zu Erfolgen führen (49,50)

1.4.2.1 Struktur

Es ergeben sich unterschiedliche Herstellungsstrategien, die v.a. durch die chemische Beschaffenheit des Toxins bestimmt werden. Bei Proteinen kann das gesamte Immunotoxin von Bakterien produziert werden. Handelt es sich nicht um Proteine werden Verbindungsmoleküle benötigt, welche die chemisch unterschiedlichen Stoffe miteinander verbinden. Für die Behandlung hämatologischer Tumoren ist das daraus resultierende hohe Molekulargewicht von Vorteil, da das Immunotoxin nur schwer die Blutgefäße verlassen kann und eine lange Plasmahalbwertzeit besitzt.

Zur effizienten Therapie solider Tumoren ist ein geringes Molekulargewicht für die ausreichende Tumorpenetration erforderlich. Dafür entwickelte mAb's (mini Antibodies) bestehen aus den variablen bzw. hypervariablen Fragmenten einer Bindungsdomäne des ursprünglichen Antikörpers und werden, wenn sie aus einer Peptidkette bestehen, als scFv (single chain Fragment variable) bezeichnet. Wenn die Bindungsregionen der VH und VL Region durch eine Disulfidgruppe verbunden sind spricht man von dsFv.

Herausforderungen für die Entwicklung therapeutischer Antikörper sind Verträglichkeit, Schutz vor dem Immunsystem des Patienten und ausreichende Serumstabilität bei 37°C. In diesen Experimenten wurde ein scFv Antikörperfragment benutzt, das durch Transfer der variablen Regionen des Ep-CAM spezifischen MOC31 auf ein 4D5 Gerüst humanisiert werden konnte. Nach Austausch ausgewählter Aminosäuren konnte die Stabilität des 4D5MOC-B in Serum bei Körpertemperatur gewährleistet werden (16). Bei dem Toxin handelt es sich um das Pseudomonas Exotoxin A. Die Domäne 1, welche die Zellaufnahme über den ubiquitären α-Makroglobulinrezeptor vermittelt, wurde durch den 4D5MOC-B ersetzt. So entstand das Ep-CAM spezifische rekombinante scFv 4D5MOCB-ETA252-613 Immunotoxin.

1.4.2.2 Zelluläre Aufnahme

Da der erste Schritt der zellulären Aufnahme von Immunotoxinen die Bindung des Oberflächenantigens ist, wird das Ausmaß der Internalisation im Wesentlichen von der Affinität des Antikörpers und der Dichte des Antigens auf der Zelloberfläche bestimmt. Das Oberflächenmolekül wird dann gemeinsam mit dem Immunotoxin durch Endozytose aufgenommen. Die Translokation durch die Zellmembran wird häufig von anderen molekularen Strukturen mitbestimmt und Verbesserungen der zellulären Aufnahme werden oft empirisch gefunden. Im Weiteren hängt die Aufnahme ins Zytosol beim ETA von dem Transfer durch den Golgi-Apparat und das ER ab. Ein KDEL Rezeptor vermittelt die Translokation von ETA durch das ER ins Zytosol. Durch eine gentechnische Veränderung einer c-terminalen REDLK Region in KDEL kann den Transfer von ETA durch das ER erleichtert und die zytotoxische Wirkung wird so verstärkt werden (51). Solch ein KDEL-ETA wurde auch für das 4D5MOC-B-ETA Immunotoxin verwendet.

1.4.2.3 Wirkungsmechanismen

Die Hauptwirkung von Immunotoxinen wird von der Art des gebundenen Wirkstoffes bestimmt. Bei der Auswahl eines geeigneten Toxins stehen mehrere bakterielle und pflanzliche Gifte zur Verfügung. Es werden insbesondere das Rizinus-, Diphterietoxin und, wie in dem hier beschriebenen Fall das Pseudomonas-Exotoxin A verwendet. Dieses AB-Toxin hemmt die ribosomale Proteinsynthese bereits in extrem geringen Konzentrationen.

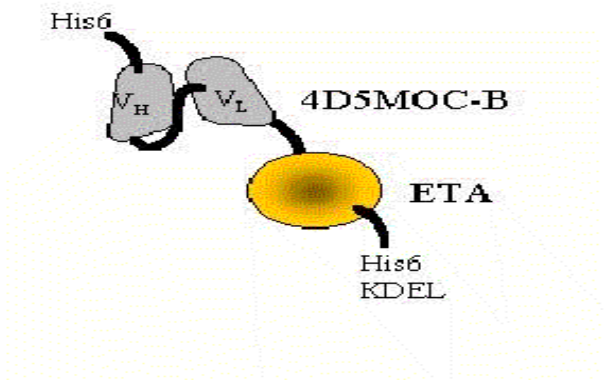

Abb. 3 4D5MOC-B-ETA besteht aus der den variablen Teilen der schweren und leichten Kette (VH und VL) des MOC31. Der Austausch einiger AS gegen Histidin führte zu der hohen Serumstabilität. Das ETA enthält die mutierte KDEL Region.

Die biologisch wirksamen Domänen 2 und 3 (AS. 253 - 364) inaktivieren nach zellulärer Aufnahme und Translokation in die Membran des ER, die zelluläre Proteinsynthese, indem sie den Elongationsfaktor-2 ribosylieren. Nach neuen Erkenntnissen führt dieser Wirkungsmechanismus, der sich grundlegend von den Zytostatika unterscheidet, auch zur Auslösung der Apoptose (52). Nebenwirkungen und Pharmakokinetik von Immunotoxinen wird vor allem von deren Größe bestimmt. Antikörper Fragmente, wie scFv haben eine Plasmahalbwertzeit von etwa 30 Minuten und sollten deshalb öfters oder durch eine Infusion injiziert werden. Untersuchungen bei Mäusen zeigten Anreicherungen in Niere und Leber und langfristig im tumoralen Zielgewebe (75).

2 Materialien

2.1 Tumorzellinien

A-549	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
H-125	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
SW2	Kleinzelliges Bronchialkarzinom
MCF-7	ER positives Mammakarzinom
MDA-MB-231	ER negatives Mammakarzinom
Colo-320	Kolorektales Karzinom
HT-29	Kolorektales Karzinom
LoVo	Kolorektales Karzinom
SQ20B	Larynxkarzinom
RL	B-Zell Lymphom

Die beiden Zellinien SW2 und SQ20B stammen vom Dana Faber Institute (Boston, MA, USA). Alle anderen Zellinien wurden vom American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) bezogen.

2.2 Chemikalien und Reagenzien

DMEM/RPMI Medium	Hyclone Europe (Cramlington, UK)
FCS	Hyclone Europe (Cramlington, UK)
Hepes	Kantonsapotheke (Zürich, CH)
L-Glutamin	Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, UK)
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, UK)
RPMI-1640	Hyclone Europe (Cramlington, UK)
Trypsin/EDT	Biochrom (Berlin, GER)
APS	Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, UK)
BSA	Fluka (Buchs, CH)
DMF	Fluka (Buchs, CH)
DTT	Sigma (St. Louis, MO, USA)
EDTA	Sigma (St. Louis, MO, USA)
HCl	Fluka (Buchs, CH)
Lipofectin	Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, UK)
Methanol	Fluka (Buchs, CH)
MTT	Sigma (St. Louis, MO, USA)
NaCl	Fluka (Buchs, CH)
Trockenmilchpulver	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Paraformaldehyde	Kantonsapotheke (Zürich, CH)
PBS	Kantonsapotheke (Zürich, CH)
PMSF	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Propidiumiodid	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe, GER)
SDS	Fluka (Buchs, CH)
TBS	Kantonsapotheke (Zürich, CH)
TEMED	Fluka (Buchs, CH)
Tris	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Trypan-Blau	Sigma (St. Louis, MO, USA)

Tween 20	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Mercaptoethanol	Sigma (St. Louis, MO, USA)

Antikörper

Anti-Bcl-2 (monoklonal, Maus)	Dako Diagnostics AG (Glostrup, DK)
Anti-Bcl-xL (polyklonal, Kaninchen	ICN Biomedicals Inc. (Aurora, OH, USA)
Anti-Aktin (monoklonal, Maus)	Transduction Lab's (Lexington, KY, USA)
Anti-Hisidin-Tag (monoklonal, Maus)	DKFZ (Heidelberg, GER)
Anti-Maus (Peroxidase konjugiert, Kaninchen)	Sigma, (St. Louis, MO, USA)
Anti-Kaninchen(Peroxidase konjugiert, Ziege)	Sigma, (St. Louis, MO, USA)

Kits

Pierce BCA Kit	Pierce (Rockford, IL, USA)
ECLTM Detection Reagent	Amersham Pharmacia (Dübendorf, CH)

Geräte und Software

Dual Gel Caster (mit Elektrophoresezubehör)	Amersham Pharmacia (Dübendorf, CH)
Polyvinyl Fluorid Membran	Millipore Corp. (Bedford, MA, USA)
Agfa X-Ray Filme	FUJIFILM, Fuji (Zürich, CH)
Entwickler	AGFA Curix 60
Semi-dry Blotting Kammer	Amersham Pharmacia (Dübendorf, CH)
SCANware/Software	HP Intelligent/HP PrecisionScan Pro 2.0
FACScalibur Durchflusszytometer	Becton Dickinson (Mtn. View, CA, USA)
CellQuest Software	Becton Dickinson (Mtn. View, CA, USA)
SPECTRAmax 340 microplate reader	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)
SOFTmax PRO software	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)

2.3 Wirkstoffe

2.3.1 Zytostatika

5-Fluorouracil (Roche Pharma, Reinau, CH) ist ein Pyrimidin Analog und wird im Körper über 5-FUMP zu 5-Fluorodeoxyuridinmonophosphat (FdUMP) umgewandelt, das eine hohe chemische Ähnlichkeit zu Thymidin aufweist. Als Antimetabolit wirkt FdUMP hemmend auf den DNA/RNA-Stoffwechsel. Es bindet die Thymidilat Synthase mit vielfach höherer Affinität als dUMP und blockiert damit den letzten Schritt der zellulären Thymidin Shynthese. Neben der DNA wird auch die RNA Synthese durch 5-FU gestört, indem zuerst gebildetes 5-FUMP in RNA eingebaut wird. Auch, wenn 5-Fluorouracil zu den alten Chemotherapeutika gehört, ist der klinische Einsatz insbesondere bei kolorektalen Tumoren auch heute noch aktuell.

Paclitaxel (Bristol-Myer Squibb AG, Baar, CH) ist die als erste zugelassene Substanz der Taxane, einer neuen Zytostatika Klasse, die als Naturstoff aus der Rinde der pazifischen Eibe gewonnen wird. Durch Hemmung der Tubulindepolymerisierung wird die Organisation des Spindelapparats vor der Mitose verhindert. Der Zyklus der

betroffenen Zellen wird in der G2/M Phase blockiert. Zugelassen ist Taxol insbesondere für therpierefraktäre metastasierende Ovarial-/Mammakarzinom, verspricht allerdings auch bei anderen soliden Tumoren Erfolge (NSCLC, Kaposi Sarkom)

2.3.2 Antisense Oligonukleotide

4625: 5'-AAGGCATCCCAGCCTCCGTT-3' 4626: 5'-CACGTCACGCGCGCACTATT-3'

Die Sequenz des 4625 Antisense Oligonukleotids richtet sich gegen eine Region hoher Homologie in den bcl-2 und bcl-xL mRNAs (10). Die Zielsequenz von bcl-2 (605 - 624) ist zu 100% komplementär zu den 20 Basen des 4625 Antisense Nukleotids. Die bcl-xL mRNA Zielregion (687 - 706) enthält drei "Mismatch" Basen zu 4625. Um die dadurch verminderte Affinität 4625 gegenüber bcl-xL zu erhöhen, wurden beide Oligonukleotide an den 3' und 5' Enden chemisch modifiziert. Die unterstrichenen Nukleotide enthalten an der 2'-Position der Ribose einen MOE Rest. 4625 und 4626 sind vollständige Phosphorothioate. Beide Oligonukleotide wurden mit einem Oligopilot II (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) synthetisiert und durch HPLC aufgereinigt (53). Sie wurden bei -20 °C entweder als Pulver oder in destilliertem Wasser gelöst aufbewahrt.

2.3.3 4D5MOC-B-ETA

4D5MOC-B-ETA wurde als ein rekombinantes Protein in E.coli (SB536) kloniert und die Bakterien in 2dYT Medium (1% Glukose, 30 mg/mL Ampicillin) kultiviert. Die Expression von 4D5MOC-B wurde durch Zugabe von 1mM Isopropyl-D-Galktopyranoside (IPTG, Böhringer Ingelheim) induziert.

Das Bakterienpellet wurde danach in einer French Pressure Zellpresse (SLS Instruments Inc. Urbana Illinois, USA) lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert und gefiltert (0.22 mm), um es zunächst von groben Verunreinigungen zu befreien. Zur endgültigen Purifikation des Proteins wurden die verschiedenen Fraktionen zuerst durch eine Ni2+ IDA-Säule und dann mit Anionen-Austausch Chromatographie aufgetrennt. Die Reinheit wurde anschliessend im Western Blot überprüft und die Konzentration bei 280 nM spektrometrisch gemessen.

3 Methoden

3.1 In vitro

3.1.1 Zellkultur

Kolon- und Lungenkarzinomzellinien wuchsen in RPMI Medium mit 10% FCS, 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) (++Medium) und wurden jeden 3-4 Tag durch Reduzieren auf 1/8 bzw. 1/10 des Zellvolumens in der Wachstumsphase gehalten. MCF-7 Zellen wurden zusätzlich zu FCS, Glutamin und P/S in 1% Temed und 1% Pyruvat haltigem RICH Medium gehalten. MDA-MB-231 Zellinien wuchsen in FCS, Glutamin und P/S haltigem DMEM/High Glucose Medium. Sämtliche Zellen wurden bei 37 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO^2 Atmosphäre kultiviert und einen Tag vor Beginn des Experimentes in die jeweiligen Well-Platten pipettiert. Die Zellzahl pro mL wurde durch Zählen der mit Trypan-Blau gefärbten lebenden Zellen auf einem Neubauer Objektträger ermittelt. Für die Bestimmung wurden insgesamt mindestens 200 Zellen gezählt.

3.1.2 Behandlung mit Zytostatika

5-Fluorouracil bzw. Paclitaxel wurde unmittelbar vor der Behandlung in dem der Zellinie entsprechendem ++Medium auf die doppelte der gewünschten Konzentration verdünnt und dem gleichen Volumen zellhaltigem Medium beigefügt.

3.1.3 Transfektion mit 4625

Zur Transfektion wurden die Zellen in entsprechendem Kulturmedium ohne P/S (+-Medium) ausplatiert, weil Antibiotika die Zellaufnahme von Oligonukleotiden hemmen. Am nächsten Tag wurde zuerst Lipofectin in FCS und P/S-freiem --Medium eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Lösung B). Lösung A bestand aus 6.6 mM Oligonukleotid in --Medium, welches sich über zehn Minuten mit dem 10% Lipofectin in Lösung B verbinden durfte. Danach wurde die für die gewünschte Oligonukleotidkonzentration Menge +-Medium dazugegeben und in die Wells pipettiert. Die Dauer der Transfektion betrug mit Ausnahme der MDA-MB 231 und der nicht adhärent wachsenden SW2 Zellinie, die 8 bzw. 48 Stunden transfiziert wurden, 20 Stunden. Die jeweils angegebenen Transfektionszeiten bezeichnen diese Zeiträumen plus der Zeit, die bis zur Beendigung der Kultivierung gewartet wurde. Das Verhältnis zwischen Lipofectin und dem Nukleotid wurde stets konstant gehalten (w/w). Als Beispiel werden hier die Konzentrationen für eine Endkonzentration von 500 nM und einem Volumen von 1 mL angegeben.

A: 155 µL = 153 µL Medium + 2µL ON stock (500µM)

B: 155 µL = 139.5 µL Medium + 15.5 µL Lipofectin

A + B +690µL Medium = 1mL (1µM ON Lösung)

3.1.4 Kombinationsbehandlung

Es ergeben sich viele verschiedene Möglichkeiten für eine Kombinationsbehandlung von Tumorzellen in vitro mit Standard-, also Chemotherapie und zusätzlichem Wirkstoffen. Im Falle eines bcl-2/bcl-xL Antisense Oligonukleotids, welches die an der Chemoresistenz beteiligten Proteine herunter-regulieren soll, erscheint es sinnvoll die Tumorzellen mit dem Oligonukleotids gegenüber dem Zytostatikum erst zu sensitivieren, also die Zellen vor Zugabe des Chemotherapeutikums mit 4625 zu transfizieren. Nach 20-stündiger Transfektion (8 Stunden für MDA-MB-231) wurde das ON-Medium entfernt. Im Falle der Western-Blot und FACS Analysen wurden die im abgezogenem Überstand enthaltenden Zellen pelletiert, um den Wells in P/S, L-Glu, FCS Medium entweder mit oder ohne Zytostatika wieder zugeführt zu werden. So wurde eine Selektion der ädhärenten Zellen vermieden.

3.1.5 Behandlung mit 4D5MOC-B-ETA

Für den MTT wurden 360.000 Zellen für den Leucin-Einbautest 1.200.000 Zellen in 6 mL ++Medium in eine 96-Well Platte ausplatiert und am nächsten Tag steigende Konzentrationen des 4D5MOC-B-ETA Immunotoxin hinzugefügt. Die Inkubationszeit war für den MTT-Proliferationstest 72h und für den Leucin-Einbautest 24h.

3.1.6 Proliferations (MTT) Assay

Hierfür wurden die Zellen in 96er Well-Platten behandelt und nach Ablauf des Behandlungs-bzw. Transfektionszeitraumes 10 mL MTT Reagenz zu den 100 mL bzw. 200 mL dazugegeben. Das MTT Reagenz stellt ein Substrat für mitochondriale Dehydrogenasen dar. Durch Reduktion entsteht ein in Wasser unlösliches Salz. Nach 90 minütiger Inkubation unter Kulturbedingungen wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 mL MTT-Lysispuffer gestoppt und das Substrat gleichzeitig gelöst. Die Menge des umgesetzten Tetrazoliumsalzes verhält sich proportional zur enzymatisch aktiven Zellzahl. Die Extinktionen wurden am nächsten Tag mit SPECTRAmax 340 microplate reader bei 570 nm gemessen und anschließend mithilfe der SOFTmax PRO Software analysiert. Da davon ausgegangen werden kann, daß nach eineinhalb Stunden sämtliches Substrat umgewandelt wurde, handelte es sich hierbei um eine Endpunktmessung. In sämtlichen Experimenten repräsentiert ein Wert den Mittelwert aus drei Wells. Aus sechs unbehandelten (Kontrolle) und sechs Proben ohne Zellen (Leerwert) wurden der 100% und der 0% Wert bestimmt.

3.1.7 Trypan Blau Exklusion

Behandelte und unbehandelte Zellen wurden mit 0.004% Trypan Blau gefärbt, um anschliessend tote von lebenden Zellen auf dem Neubauer Objekträger unterscheiden und zählen zu können. Die Ergebnisse der Trypan Blau Exklusion sind gut mit denen der PI Aufnahme in der FACS Analyse vergleichbar. Zur Quantifizierung der toten Zellfraktion wurden mindestens 200 Zellen gezählt.

3.1.8 Durchflusszytometrie (FACS)

FACS steht für Fluorescence Associated Cell Sorter und ermöglicht die Fluoreszenz Intensität verschiedener Zellpopulationen (z.B. nach Markierung mit einem fluoreszierenden Antikörper) zu messen. FACS Analysen wurden einerseits zur Bestimmung der Apoptosefraktion nach Propidiumiodidaufnahme und andererseits zur Ep-CAM Detektion auf den Zelloberflächen durchgeführt. Für sämtliche Experimente wurde ein FACScalibur Fluozytometer und CellQuest Software (Beckton Dickinson) verwendet.

3.1.8.1 PI-Aufname

Nach dem Pelletieren und Waschen der behandelten und unbehandelten Zellen mit PBS, wurden diese 10 Minuten in 250 mL PBS mit 0.5 mg/mL Propidiumiodid (PI) inkubiert. PI hat die Eigenschaft mit DNA zu interkalieren, kann aber nur in Zellen mit einer gestörten Membranstruktur eindringen und so tote Zellen markieren. Zellenfraktionen mit erhöhter Fluoreszenz wurden mit dem FACS bestimmt. Zelldebris und Hintergrundfluoreszenz wurde durch angemessenes “light scatter gating” ausgeschlossen.

3.1.8.2 Detektion von Ep-CAM

Für die Zelltypisierung bezüglich Ep-CAM Expression wurde mit der FACS Analyse semiquantitativ der Ep-CAM Status bestimmt. Dazu wurden 500.000 Zellen zunächst mit FACS-Puffer gewaschen um anschliessend in einer 1:50 Verdünnung mit dem murinen monoklonalen anti 40 kDa pan carcinoma Antikörper über 45 Minuten auf Eis inkubiert zu werden. Nach einem weiteren Waschgang wurde der zweite Anti-Maus FITC-markiertem Antikörper (Ziege) in Facs Puffer 1:100 verdünnt, um für 30 Minuten im Dunkeln und auf Eis dem Zellpellet zugefügt zu werden. Die gemessene Fluoreszenz abzüglich der Hintergrundfluoreszenz von nur mit dem zweiten Antikörper inkubierten Zellen wurde bestimmt und der Mittelwert aus drei unabhängig durchgeführten Analysen berechnet.

3.1.9 Western-Blot

Nach Behandlung wurden die Zellen geerntet und nach einmaligem Waschen mit 1 mL PBS in etwa 100 µL kaltem Western-Blot Lysispuffer für 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Anschliessend wurde das lysierte Zellpellet bei 4 °C mit 13.000 U/m für 20 Minuten zentrifugiert, um den Überstand (zytosolische Proteine) vom Sediment (Kerne, Membranen) zu trennen. Die Zellysate wurden entweder sofort verwendet oder bei -70°C aufbewahrt. Nach der Proteinbestimmung mit einem BCA Protein Assay bei 560 nm wurden 20 µg - 30 µg Protein in einem 12% SDS-PAGE Gel über ca. 45 Minuten bei 30 mA (stacking gel) bzw. 40 mA (running gel) aufgetrennt und anschliessend für 60 Minuten in der semi-dry blotting Kammer bei 0.01 mA/mm³ auf eine Polyvinyl Fluorid Membran transferiert. Die Blot-Membranen wurden für eine Stunde in 5% BSA und 5% Trockenmilchpulver enthaltendem TBS geblockt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper fand entweder beiRaumtemperatur während 2 1/2 Stunden oder über Nacht bei 4 °C in einer 1:1000 Verdünnung des AKs in 1% TTBS statt. Nach drei Waschgängen mit TTBS (15, 5, 5 Min.) wurde die Membran in eine 1:10.000

Verdünnung des zweite Peroxidase-konjugierte Antikörper in 1% TTBS, über 2 Stunden gegeben. Nach drei weiteren Waschgängen konnten die Immunkomplexe durch Chemiluminiszenz des ECLTM Kits auf einem x-ray Film sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden unterschiedlich lange Belichtungszeiten (1 Minute - 20 Minuten) verwendet. Die Filme wurden durch eine Kodak Curix 60 Entwicklermaschine entwickelt und die relativen Protein Mengen durch Scion Software (Scion Corporation, Frederick, MD) auf den eingescannten Filmen quantifiziert.

Da Bcl-2 und Bcl-xL ein ähnliches Molekulargewicht besitzen, stellen sie sich nach gelelektropheretischer Auftrennung dicht benachbart dar. Die semiquantitative Analyse macht allerdings einen homogenen Hintergrund der einzelnen Proteinbanden erforderlich. Aus diesem Grunde wurden die Blots nach Visualisierung des einen Proteins gestrippt, um das andere Protein nach erfolgter Markierung mit den zwei Antikörpern auf der selben Membran analysieren zu können. Um die vorherigen Antikörper vollständig zu entfernen, mußten die Membranen in einem Ofen bei 50° C über 30 Minuten in der Stripp-Lösung mit 0.5% ME rotiert werden. Nach drei Waschgängen (10, 10, 10 Minuten) konnte die Membran erneut über 4 Stunden geblockt und in dem neuen Antikörperpuffer inkubiert werden.

3.1.10 Leucin-Einbautest

200.000 Zellen/mL leucinfreien Medium wurden in 96er Well Platten pipettiert. Im Gegensatz zu den Proliferationsassay enthielten hier die Wells 20.000 Zellen in 100 mL Medium. Nach einer Stunde wurden weitere 100 mL leucinfreies Medium mit steigenden Konzentrationen 4D5MOC-B-ETA hinzugefügt und die Platte für 24 Stunden inkubiert.

10 mL von 100 mC/mL [H3]-Leucin haltigem Medium wurden nach dieser Inkubationszeit zu jeder Probe zugegeben. Nach weiteren sechs Stunden wurde das Zellmaterial mit einem Harvester (96 Tomtech) auf ein Filterpapier aufgetragen, auf dem Proteine, jedoch nicht einzelne Aminosäuren hängenbleiben. Dieser Filter wurde nach zweimaligem Waschen für 30 Minuten im Trockenschrank bei 90°C getrocknet. Anschliessend konnte so die in Proteine eingebaute [H3]-Leucinmenge nach Zugabe von 3 mL Szintilationsflüssigkeit im MicroBeta TriLux (Wallac) quantifiziert werden. Die gemessene Menge an H3 markierten Proteinen verhält sich proportional zur Proteinsyntheseaktivität.

3.1.11 Statistik

Die Diagramme sämtlicher in vitro Ergebnisse stellen die Standardabweichung von zwei oder drei unabhängig durchgefürten Experimenten dar. Angegebene p-Werte wurden mit dem zweiseitigem Student t-Test bestimmt. Bei den Western Blot Analysen sind die Banden eines von zwei Experimenten abgebildet.

3.2 In vivo

3.2.1 Art und Haltung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um CD1/nu Nacktmäuse. Diesen Tieren fehlt die zelluläre Immunabwehr und sie werden deshalb auch als athymische Mäuse bezeichnet. Durch die Abwesenheit aktiver T-Lymphozyten werden subkutan transplantierte humane Tumorzellen nicht abgestoßen und können nach einer gewissen Adaptationszeit proliferieren. Nicht mehr als vier Tiere wurden unter SPF (Specified Pathogen-Free) Bedingungen in einem luftgefilterten 300 cm^3 Makrolon Typ II Käfigen nach den Richtlinien des Schweizerischen Veterinäramtes gehalten. Die Tiere erhielten steriles Futter und Wasser ad libitum. Die Käfige wurden einmal wöchentlich gereinigt und mit frischem Streu versehen.

3.2.2 Versuchsablauf

Im Alter von 6-12 Wochen wurde den Mäusen 107 in 100 µL PBS gelöste Zellen unter Äther Anästhesie mit einer 0.7 mm Kanüle subkutan in die linke Flanke injiziert. Die Tumorgröße wurde anschließend alle 4-5 Tage mittels eines Kalipers auf ein Zehntel Millimeter genau bestimmt und das Volumen noch der Formel: $Breite^2(mm) \times Länge(mm)/2 = Volumen(mm^3)$ berechnet. Bei einer Tumorgröße von durchschnittlich 140 mm^3 wurde mit der Immunotoxinbehandlung begonnen. Oligonukleotide und Zytostatika wurden ab einem mittleren Tumorvolumen von 75 mm3 verabreicht. Die Mäuse wurden randomisiert und markiert. Die Markierung bestand aus einem dreieckigem Schnitt in die Ohrmuschel. Da jeder Käfig maximal vier Mäuse enthielt, bekamen die Tiere entweder eine linke, eine rechte, eine beidseitige oder keine Markierung und konnten somit auseinander gehalten werden. Oligonukleotide und Immunotoxin wurden mit 2,5 mRad Kanülen intraperitoneal täglich über 21 bzw. 10 Tage injiziert. Die Behandlung mit Paclitaxel und 5-FU fand pro Maus insgesamt 5 mal etwa jeden vierten Tag über drei Wochen statt. Die Injektionszeitpunkte bzw. Behandlungsende sind in den Diagrammen als Pfeile angegeben. Taxol und 5-FU wurden in 200 mL 0.9% NaCl Lösung, Oligonukleotide und das Immunotoxin in 100 mL destilliertem Wasser bzw. in PBS injiziert.

3.2.3 Statistik

Statistische Aussagen der in vivo Experimente beruhen auf Berechnungen mit Statview 5.0 Software. Die nach der oben angegebenen Formel berechneten Tumorvolumina sind mit Standardfehlern (S.E.M.) und Fallzahlen in den Diagrammen dargestellt. Tumorwachstum beschreibt die relative Größenzunahme der Tumoren im Vergleich zu Tag 1. Die angegebenen p-Werte wurden mit dem unpaired Student t-Test unter Mithilfe von Dr. Burckhardt Seifert (Dept. für Biostatistik der Universität Zürich) bestimmt. $p<0.05$ gilt als statistisch signifikant.

4 Ergebnisse Teil 1

4.1 In vitro

4.1.1 Transfektion mit 4625

4.1.1.1 Western Blot

Da verschiedene Krebszellen Bcl-2 und Bcl-xL unterschiedlich exprimieren, wurden die basalen Proteinlevel mit Western-Blot Analysen ermittelt. Es ergaben sich die in der Tabelle dargestellten Expressionsmuster. SW2 und A-549 Zellen wurden mit 600 nM 4625 bzw. 4626 transfiziert und 72 Stunden später lysiert. 20 mg Protein wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Bcl-2 und Bcl-xL Expression im Immuno-Blot nacheinander auf derselben Membran bestimmt.

Abb. 4 Darstellung der Bcl-2 und Bcl-xL Expression von A-549, Colo-320 und SW2 Zellen im Western Blot 72 Stunden nach Transfektion mit den Oligonukleotiden 4625 und 4626

A-549 Zellen, welche mit dem bispezifischen Antisense behandelt worden waren, zeigten eine deutlich sichtbare Minderexpression von Bcl-xL durch 4625. SW2 Zellen wurden mit 300 und 600 nM Oligonukleotid transfiziert. Es konnte so eine dosisabhängige Runterregulierung beider Proteine durch 4625 sichtbar gemacht werden. Das 4626 Kontrolloligonukleotid zeigte keinen Effekt auf Expression von Bcl-2 bzw. Bcl-xL bei 600 nM.

	SW2	A-549	H-125	MDA-MB-231	MCF-7	Colo-320	LoVo	HT-29
Bcl-2	++	-	+	++	++	++	+	-
Bcl-xL	++	+	++	++	+	+	++	++

++= starke Expression; += normale Expression; -= schwache/keine Expression

4.1.1.2 Proliferationsassays

Bcl-2 und Bcl-xL sind für Tumorzellen wichtige Faktoren, um sich vor dem Selbstmordprogramm zu schützen. Das bispezifische 4625 Antisense hemmt die Exprimierung beider Proteine und kann so die apoptotische Maschinerie von Tumorzellen in Gang setzen, was zu einem langsameren Wachstum führt. Es wurden insgesamt acht verschiedene Zellinien von Bronchial- (SW2, NCI-H125, A-549), Kolon- (LoVo, Colo-320, HT-29) und Mammakarzinomen (MCF-7, MDA-MB-231) auf ihre Sensitivität gegenüber dem 4625 Oligonukleotid im MTT Assay untersucht. Bis auf zwei Ausnahmen wurde das Wachstum aller Zellinien signifikant und dosisabhängig durch das 4625 Oligonukleotid über 72 Stunden gehemmt. Die IC50 variierten von etwa 215 nM für Colo-320 bis 1150 nM für MCF-7 Zellen. Bei Konzentrationen über 600 nM nahm der unspezifische zytostatische Effekt des 4626 Oligonukleotids zu. Die optimale 4625 Konzentration liegt damit unter 600 nM, weil der Unterschied zwischen Antisense und Kontrolloligonukleotid die sequenzspezifische Wirkung des Antisense angibt (p-Werte). Eine Konzentration von 600 nM inhibierte die Proliferation von A-549 um über 90%. HT-29 Zellen reagierten selbst bei 1200 nM weder auf das 4625 noch das 4626 Oligonukleotid. Das Wachstum von Colo-320, LoVo und MDA-MB-231 Zellen wurde bereits durch 75 nM 4625 gehemmt.

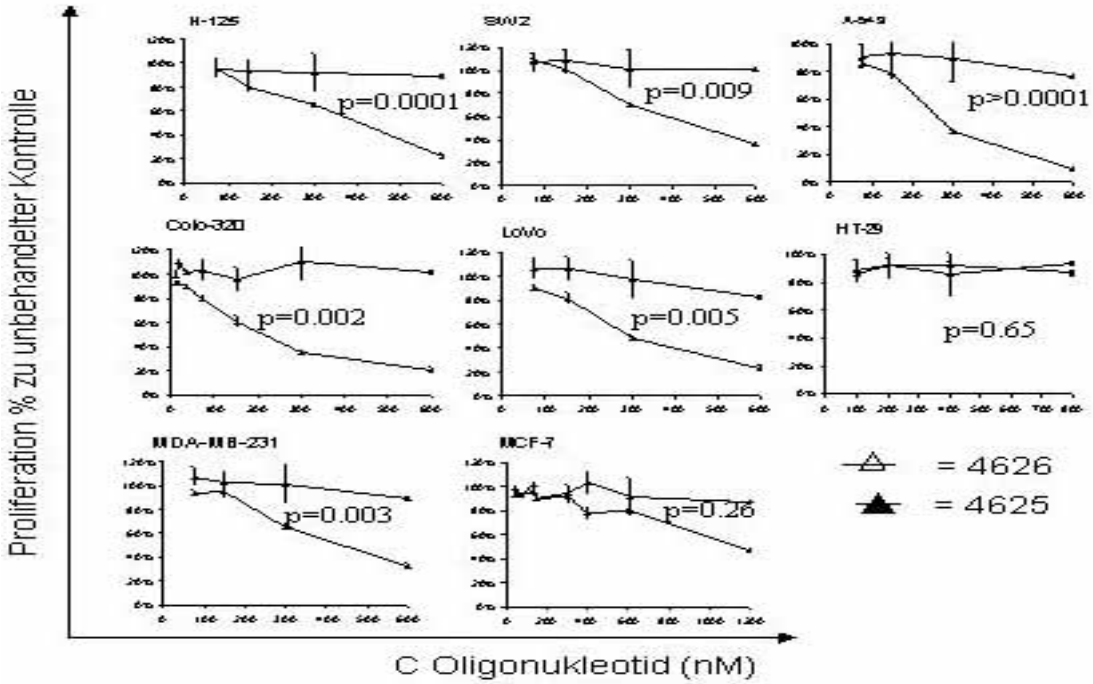

Abb.5 MTT-Assay unterschiedlicher Tumorzellen 72 Stunden nach Transfektion mit den beiden Oligonukleotiden 4626 und 4625. p-Werte wurden mit dem zweiseitigem student-t-test erstellt.

4.1.1.3 Trypan Blau Exklusionstest

Um herauszufinden, wie viele der mit Oligonukleotiden behandelten Tumorzellen auch tatsächlich sterben, wurden transfizierte Zellen mit Trypan Blau gefärbt und die Fraktion der apoptotischen oder zumindest toten Zellen durch Zählen der blau gefärbten Zellen quantifiziert. A-549, H-125 und Colo-

320 Zellen zeigten bei 600 nM etwa 50% Trypan Blau Aufnahme und reagierten somit am empfindlichsten auf das 4625 Antisense Oligonukleotid. Dies entspricht den Ergebnissen des MTT-Assays. Im Gegensatz dazu waren hier nicht MDA-MB-231, sondern LoVo Zellen am stärksten von dem zytotoxischen Effekt des 4626 betroffen. HT-29 Zellen waren auch bei dieser Untersuchung praktisch resistent gegenüber beiden Oligonukleotiden.

Allerdings war das 4625 Antisense dem 4626 Oligonukleotid geringfügig überlegen. Bei MCF-7 Zellen war die sequenzspezifische Wirkung des 4625 ähnlich schwach ausgeprägt wie im Proliferationstest (p=0.056). Insgesamt konnte die unterschiedliche Wirksamkeit des 4625 auf die unterschiedlichen Krebszellinien bestätigt werden. Für LoVo, HT-29 und MCF-7 ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen 4625 und 4626. Die p-Werte lagen bei 0.1, 0.49 und 0.56. Für alle anderen Zellinien war der Unterschied signifikant (p=0.05).

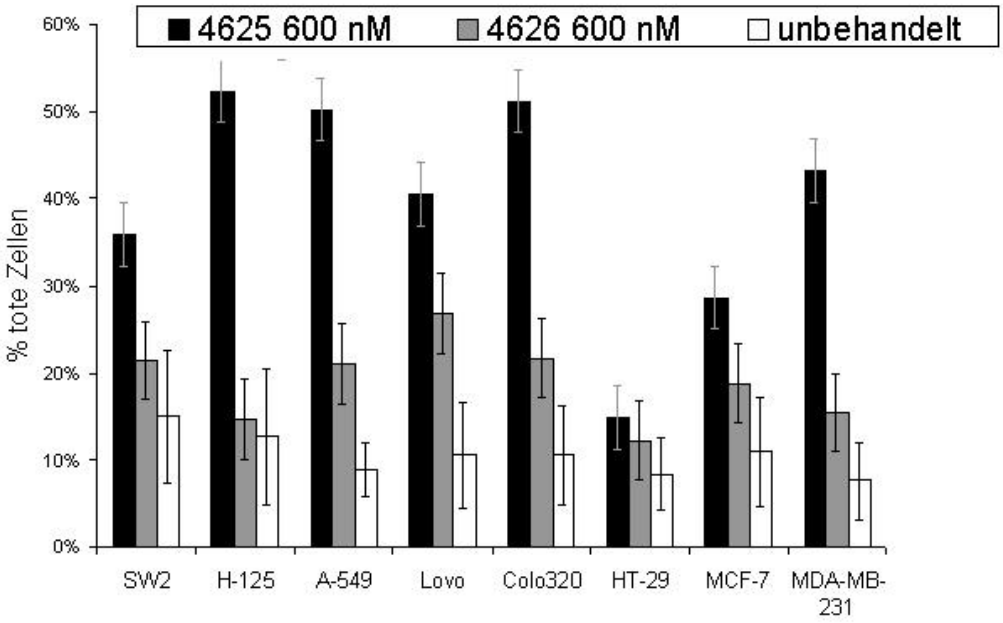

Abb. 6 Trypan-Blau-Aufnahme unterschiedlicher Tumorzellen nach Transfektion mit 600 nM 4625/4626. Die Balken repsräsentieren die Standardabweichungen von drei Analysen.

4.1.2 Behandlung mit Standardtherapien

Die beiden Kolonkarzinomzellinien Colo-320 und HT-29 sprachen einerseits sehr gut, andererseits kaum auf die Transfektion mit dem 4625 Antisense an. Ähnlich verhielt es sich mit den beiden Mammakarzinomzellen MDA-MB-231 und MCF-7. Da viele Bcl-2 und Bcl-xL Antisense Oligonukleotide alleine häufig noch keine antiproliferative oder apoptotische Wirkung auf Krebszellen ausüben, sondern lediglich zytotoxische Wirkung

von Chemotherapie verstärken (54), war die ausgeprägte antitumorale Wirkung durch das 4625 Antisense alleine überraschend. Ob dieses Oligonukleotid auch bei den scheinbar unempfindlichen Zellen einen sensitivierenden Effekt gegenüber Zytostatika zu vermitteln vermag, wurde daraufhin an diesen vier Krebszellen untersucht.

5-Fluorouracil und Paclitaxel sind als Antimetabolit bzw. Mitosehemmstoff beides phasenspezische Chemotherapeutika. Wegen häufiger klinischer Anwendung bei Kolon- bzw Mammakarzinomerkrankungen wurden sie in folgenden Experimenten auch auf unsere Krebszellinien in vitro angewandt.

4.1.2.1 Western Blot

Einige in der Literatur beschriebenen Experimente zeigten, daß sowohl 5-FU als auch Paclitaxel Bcl-2 und Bcl-xL in vitro kurzfristig herunterregulieren bzw. modifizieren können (31,55,56). Um die Wirkung der beiden Zytostatika bezüglich Expression oder postranslationaler Modifizierung von Bcl-2/Bcl-xL zu untersuchen, wurden die mit Chemotherapie behandelten Zellen lysiert und beide Proteine im Western Blot quantifiziert. Da Wirkstoffkonzentration und Dauer der Behandlung hier möglicherweise eine entscheidende Rolle spielen, wurde die Proteinexpression von Bcl-2 und Bcl-xL mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen 5-Fluorouracil

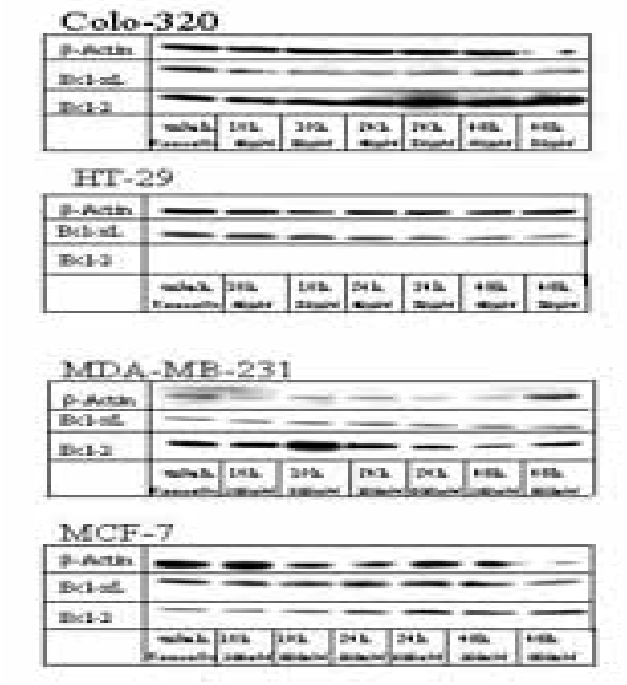

Abb.7 Western Blot Analysen der Bcl-2/Bcl-xL Expression nach Behandlung mit Chemotherapeutika nach 10, 24 und 48 Stunden zu jeweils zwei Konzentrationen.

bzw. Paclitaxel nach drei unterschiedlichen Behandlungszeiträumen untersucht. Colo-320 und MCF-7 Zellen scheinen Bcl-2 bei längeren Inkubationszeiten in 5-FU bzw. Pacitaxel enthaltendem Kulturmedium vermehrt zu exprimieren. Dies konnte in einer zweiten Analyse allerdings nicht bestätigt werden. Fraglich bleibt, ob Bcl-2/Bcl-xL insbesondere unter dem Einfluss von Paclitaxel phosphoryliert werden. Eine Zunahme um nur wenigen Phosphatresten bewirkt eine relativ geringe Gewichtszunahme der Proteine, die womöglich keine sichtbare Änderung in der Bandendarstellung zur Folge hätte.

4.1.2.2 Proliferationsassay

Um geeignete Kombinationsverhältnisse für eine Behandlung von Krebszellen mit dem Antisense Oligonukleotid in Kombination mit der jeweiligen Standardtherapie zu ermitteln, wurde zunächst das Wachstumsverhalten der Zellen in Gegenwart der Zytostatika 5-Fluorouracil bzw. Paclitaxel über verschiedene Zeiträume untersucht.

Colo-320 und HT-29 wurden mit 5-Fluorouracil behandelt. Während eine Konzentration von mehr als 30 mM über 48 Stunden das Wachstum von HT-29 Zellen um 50% inhibierte, erzielten bereits 20 mM 5-FU den gleichen Effekt bei der Colo-320 Zellinie. Behandlung der resistenten HT-29 Zellen mit 5-Fluorouracil zeigte bei 10 und 24 Stunden nahezu keinen proliferationshemmenden, sondern einen eher stimulierenden Effekt. Auch niedrige Konzentrationen hemmten das Wachstum von Colo-320 Zellen stärker als das von HT-29. Auffallend war weiterhin, daß Konzentrationen über 40 mM beide Zellinien nicht wesentlich mehr in ihrem Wachstum beeinträchtigten.

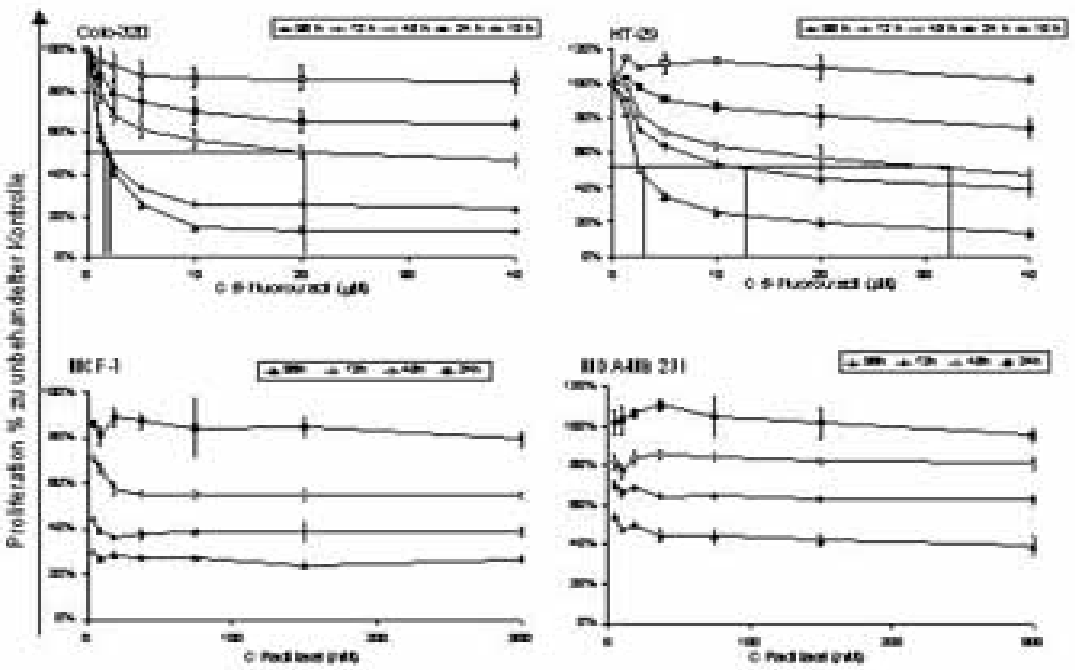

Abb.8 Mtt-Assay von zwei Kolon- bzw Mammakarzinomzellen in Anwesenheit steigender Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten 5-FU bzw. Paclitaxel. Die Diagramme stellen den Mittelwert aus drei Experimenten mit ihren Standardabweichungen dar.

Der Einfluss von Paclitaxel auf das Wachstum der beiden Brustkrebszellinien MDA-MB-231 und MCF-7 war mehr zeit- als konzentrationsabhängig. Eine Bestimmung der IC50 war so nicht möglich. Bei 48 Stunden Behandlungszeit wurde durch keine Konzentration eine Wachstumshemmung um 50% erreicht. Konzentrationen über 600 nM überschreiten die in vivo therapeutisch relevanten Plasmakonzentrationen und bewirkten auch keine stärkere Proliferationsinhibition im MTT. Insgesamt reagierten MCF-7 Zellen empfindlicher auf die Taxantherapie als MDA-MB-231.

4.1.3 Kombinationsbehandlung

Es existieren drei verschiedene Möglichkeiten, wie zwei Wirkstoffe miteinander interagieren können. Eine Kombination aus beiden kann entweder synergistisch, additiv oder antagonistisch sein. Nur eine Kombination definierter, gleichbleibender Verhältnisse beider Stoffe erlaubt Aussagen über Antagonismus, Addition oder Synergismus (57). Für die Kolonkrebszellinien wurden also die Antisense- bzw. Zytostatikakonzentrationen bestimmt, die im Proliferationsassay nach 72 bzw. 48 Stunden das Wachstum um 50% verlangsamten. MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen wurden mit einer Paclitaxel/4625 Ratio von 1:1 behandelt. Es ergaben sich somit die hier angegebenen Ratios:

Kolonkarzinomzellen	4625 (IC50)	Zytostatikum (IC50)	Ratio
Colo-320	200 nM	2.5 mg/mL 5-FU (20	1:100
HT-29	n.d. (400 nM)	3.8 mg/mL 5-FU (30	1:75

Brustkrebszellen

MCF-7	400 nM	400 nM Taxol	1:1
MDA-MB 231	400 nM	400 nM Taxol	1:1

4.1.3.1 Western Blot

Nachdem die Krebszellen über 20 Stunden mit den Oligonukleotiden transfiziert worden waren, wurde das Transfektionsmedium, durch Zytostatika-haltiges Medium ersetzt und für weitere 48 Stunden inkubiert. Eine durch 5-FU oder Paclitaxel alleine induzierte Minderexpression von Bcl-2 oder Bcl-xL konnte, wie beschrieben nicht beobachtet werden. Um eine durch die Kombination mit den Oligonukleotiden veränderte Proteinexpression zu ermitteln, wurden Bcl-2/Bcl-xL Proteinmengen nach kombinierter Behandlung im Western

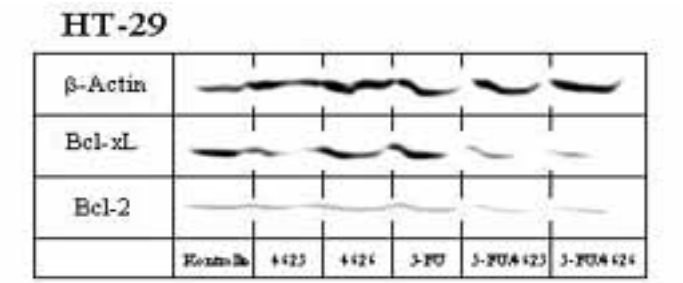

Abb. 9 Western-Blot Analyse von Bcl-2 und Bcl-xL bei HT-29 Zellen nach Transfektion mit 400 nM 4625/4626 alleine und in Kombination mit 30 mM 5-FU

Blot ermittelt. Bei HT-29, die gegenüber dem 4625 zwar hinsichtlich Wachstumshemmung unempfindlich sind, bewirkt das Antisense und die Kombination mit 5-FU eine sichtbare Bcl-xL Degradation. Die Proteinbande von Bcl-2 wurde nach 15 minütiger Belichtungszeit ebenfalls auf dem Film sichtbar. Man erkennt auch hier eine Proteinverminderung der Zellen, die mit dem 4625 transfiziert worden waren. 5-FU und 4626 alleine beeinflußten die Bcl-2/Bcl-xL Expression nicht. Allerdings ist in den Zellen, die mit der Kombination aus 4626 und 5-FU behandelt worden waren, ebenfalls eine Aufhellung beider Proteinbanden erkennbar.

4.1.3.2 Proliferationsassay

Die Tumorzellen wurden wie beschrieben zuerst mit den Oligonukleotiden transfiziert und danach mit Chemotherapie behandelt. Um den sequenzspezifischen, chemosensitivierenden Effekt zu ermitteln, muss die Differenz zwischen Zytostatikum alleine und der Zytostatika/4625 Kombination mit der Differenz zwischen ersterem und der Zytostatika/4626 Kombination verglichen werden. Den am eindeutigsten sequenzspezifisch, chemosensitivierenden Effekt lieferte das 4625 Oligonukleotid auf Colo-320 Zellen (p=0.05).

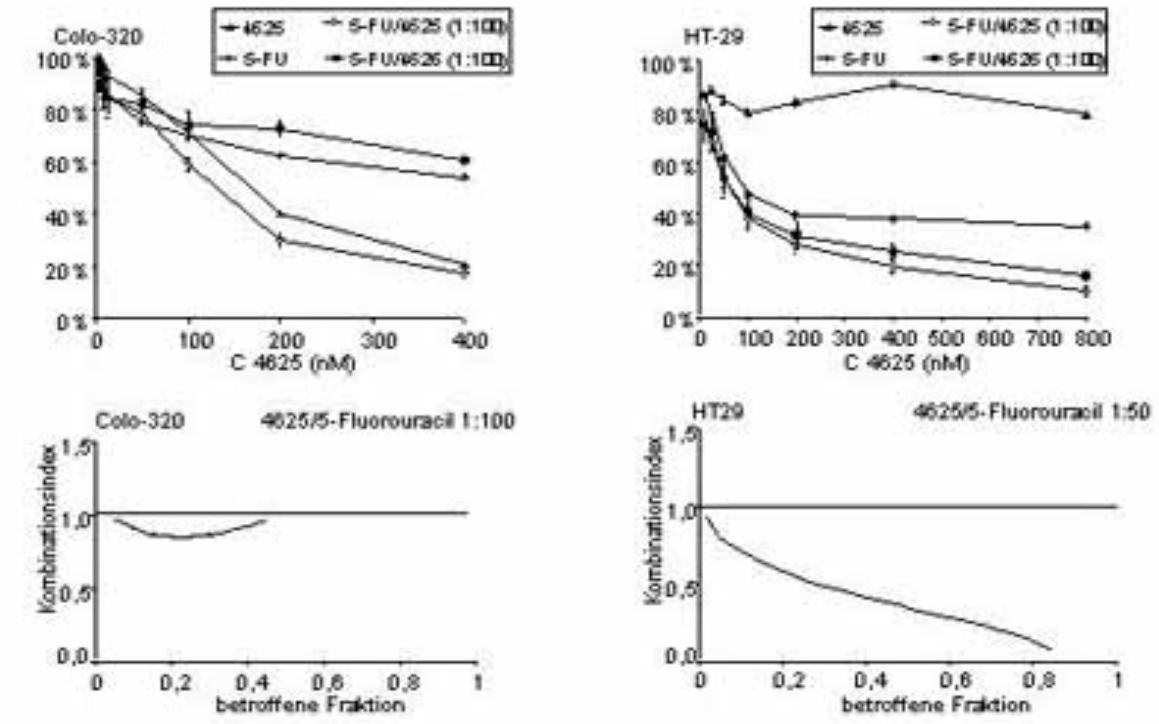

Abb. 10 MTT-Assay und Median Effekt Analysen von Colo-320 und HT-29 Zellen nach Kombinationsbehandlung mit Oligonukleotiden und 5-FU über 68 bzw. 48 Stunden. Die oberen Diagramme zeigen die Zellproliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die unteren Diagramme geben die Art der Wechselwirkung zwischen 4625 und Chemotherapie an. Ein Wert unter 1 steht für eine synergistische Interaktion.

Die Kombination von 4626 mit 5-FU hatte nämlich eine eher antagonistische Wirkung zur Folge. Auch wenn die Proliferationsrate der Zellen, die nur mit 4626 transfiziert wurden, nicht zunahm, schwächte das Kontrolloligonukleotid die Wirkung von 5-FU auf Colo-320 Zellen ab. Eine unspezifisch protektive Wirkung von Oligonukleotiden auf Tumorzellen nach Behandlung mit zytotoxischen Wirkstoffen, in vitro wurde bereits beschrieben (58). Das Wachstum von HT-29 Zellen wurde sowohl durch die 5-FU/4625, als auch durch die 5-FU/4626 Kombinationsbehandlung stärker inhibiert, als durch eine Monotherapie. Die Proliferationsinhibition war allerdings nach 5-FU/4625 Behandlung am stärksten ausgeprägt und der Unterschied zwischen Monotherapie und Kombination nahm bis 800 nM kontinuierlich zu. Der p-Wert der 4625/5-FU Behandlung im Vergleich zur 4626/5-FU Behandlung betrug für diese Zellinie 0.51. Es kann also bei diesen Zellen nicht von einem Antisense-vermitteltem sensitivierendem Effekt im MTT-Assay gesprochen werden.

Die optimale chemosensitivierende Wirkung von 4625, also der Unterschied zwischen alleiniger und kombinierter Behandlung, wurde für Colo-320 Zellen über 200 nM wieder geringer. Die Art der Wechsel-

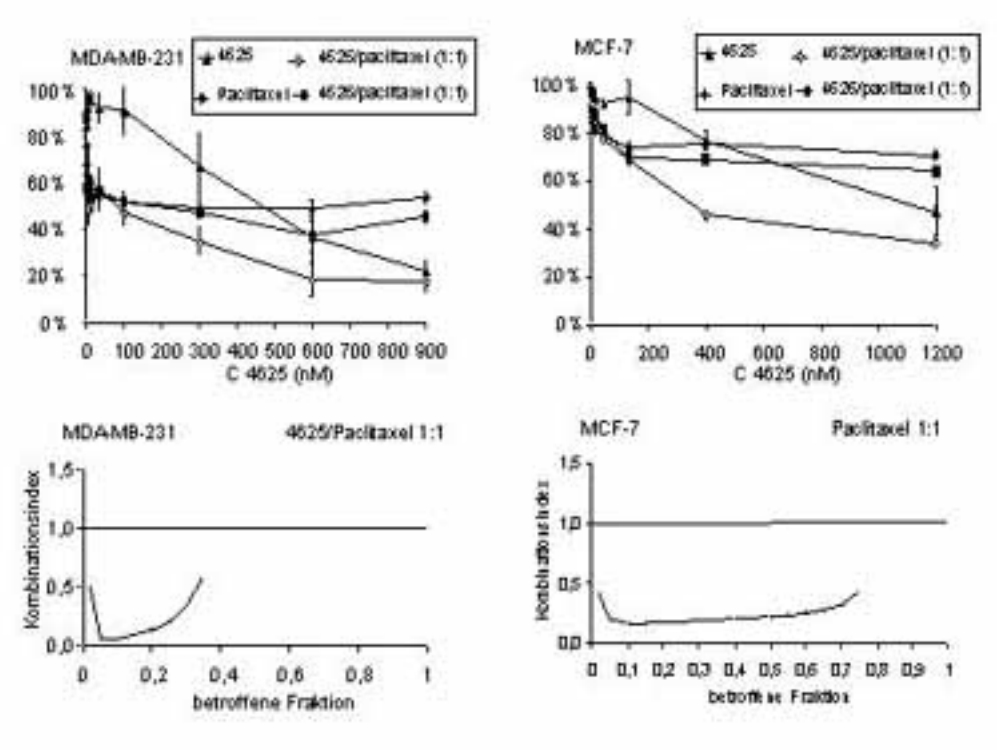

Abb. 11 MTT-Assay und Median-Effekt Analysen von MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen nach Kombinationsbehandlung mit 4625/4626 und Paclitaxel über 68 bzw. 48 Sunden. Taxol und 4625 wirken über einen weiten Bereich synergistisch auf die Proliferation von MCF-7 Zellen (Kombinationsindex < 1).

wirkung zwischen 5-FU und 4625 ist in den unteren Diagrammen dargestellt. Der Kombinationsindex gibt die Art der Interaktion beider Wirkstoffe an. Ist der Wert kleiner als 1, so ist die Wechselwirkung synergistischer Natur. Bei einem Wert gleich 1 additiv und grösser 1 antagonistisch.

Bei beiden Brustkrebszellen war die Verstärkung der zytostatischen Wirkung durch das Antisense, ausgeprägter, als für das Kontrolloligonukleotid. Es ergab sich für beide Zellinien ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit 4625/Paclitaxel und 4626/Paclitaxel (pMDA-MB-231=0.001; pMCF-7=0.0025). Die Wachstumskurve der mit 4626/Paclitaxel behandelten Zellen, verläuft nahezu parallel zu der fast waagerechten, also konzentrationsunabhängigen Paclitaxel Monotherapie. Der Unterschied zwischen beiden Kombinationsbehandlungen nimmt so mit steigenden Konzentrationen zu. Sowohl Antisense alleine, als auch die 4625/Paclitaxel Kombination wirkten in einer konzentrationsabhängigen Weise zytostatisch. Antisense Konzentrationen über 400 nM für MCF-7 Zellen und über 500 für MDA-MB-231 erzielten einen stärkere Wachstumshemmung als Paclitaxel. Bei höheren Konzentrationen nimmt der chemosensitivierende Effekt des 4625 wieder ab. Das Antisense wirkt dann alleine fast genauso stark wachstunshemmend wie in Kombination mit Paclitaxel.

4.1.3.3 PI- Aufnahme

Ähnlich wie Trypan Blau diffundiert auch Propidiumiodid durch gestörte Membranstrukturen toter Zellen und kann diese so markieren. Die Fluoreszenzintensität kann dann mit der FACS Analyse bestimmt werden, was den Zeitaufwand bei vielen Proben im Vergleich zur Zellzählung nach Trypan Blau Färbung erheblich vermindert. Beide Methoden liefern vergleichbare Ergebnisse.

Für beide Kolonkarzinomzellen zeigte sich hinsichtlich Zelltod eine weitaus größerer verstärkender Effekt der Kombinationsbehandlung als im Proliferationsassay. Die Konzentrationen der Oligonukleotide und der Chemotherapeutika entsprechen den im MTT ermittelten IC50.

Über 30% der Colo-320 Zellen sind bei einer 50% Proliferationshemmung im MTT durch das bispezifische Antisense tatsächlich tot. Bei der IC50 von 5-FU (20 mM) sind dagegen lediglich knapp 15% nach 72 Stunden gestorben, was bedeuten kann, daß die zytostatische Wirkung des Antimetaboliten in vitro überwiegend durch Proliferationshemmung bedingt ist.

Die Zelltod-induzierende Wirkung durch 5-FU war für HT-29 Zellen ausgeprägter und erreichte fast 30% bei 40 mM. Dies liegt wahrscheinlich auch der Tatsache zu Grunde, daß unbehandelte Colo-320 Zellen stärker proliferieren und sich so die Wachstumshemmung der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle schon bei geringeren Konzentrationen 5-FU im MTT auswirken konnte. 13.5 % der mit 400 nM Antisense transfizierten HT-29 Zellen starben. Im Vergleich zu 10.8% toten HT-29 Zellen nach Transfektion mit dem 4626 Oligonukleotid ist also die sequenzspezifische Wirkung des 4625 (wie auch schon bei dem Trypan Blau Exklusiontest mit 600 nM) auf HT-29 Zellen falls überhaupt vorhanden nur schwach ausgeprägt. Die Wirkung der 4625/5-FU Kombination ist zumindest additiv, allerdings im Vergleich zur 4626/5-FU Kombinationsbehandlung bei HT-29 praktisch gleich. Das 4625 Antisense vermittelt also für diese Zellinie keine sequenzspezifische sensitivierende Wirkung gegenüber 5-FU in vitro. Bei den Colo-320 Zellen ist der Unterschied zwischen 5-FU alleine und der Kombination mit 4625 deutlich vorhanden ($p=0.006$). Die chemosensitivierende Wirkung von 4625 auf diese Zellen ist auch deutlicher ausgeprägt, als für die 4626/5-FU Kombination.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle waren 20% MCF-7 Zellen 72 Stunden nach Transfektion mit dem bispezifischen Antisense gestorben. Das 4626 Oligonukleotid führte zu keiner eindeutigen Zunahme der toten Zellfraktion. Die Zelltod induzierende Wirkung des 4625 Antisense betrug für MDA-MB-231 Zellen knapp 35%. Die Behandlung mit 600 nM Taxol erreichte bei beiden Zellinien weniger als 10% tote Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der spezifisch chemosensitivierende Effekt des 4625 Antisense war für MCF-7 ausgeprägter als für MDA-MB-231. Auch hier verstärkte das 4626 Kontrolloligonukleotid die Wirkung von Taxol auf beide Zellinien ($p=0.001$).

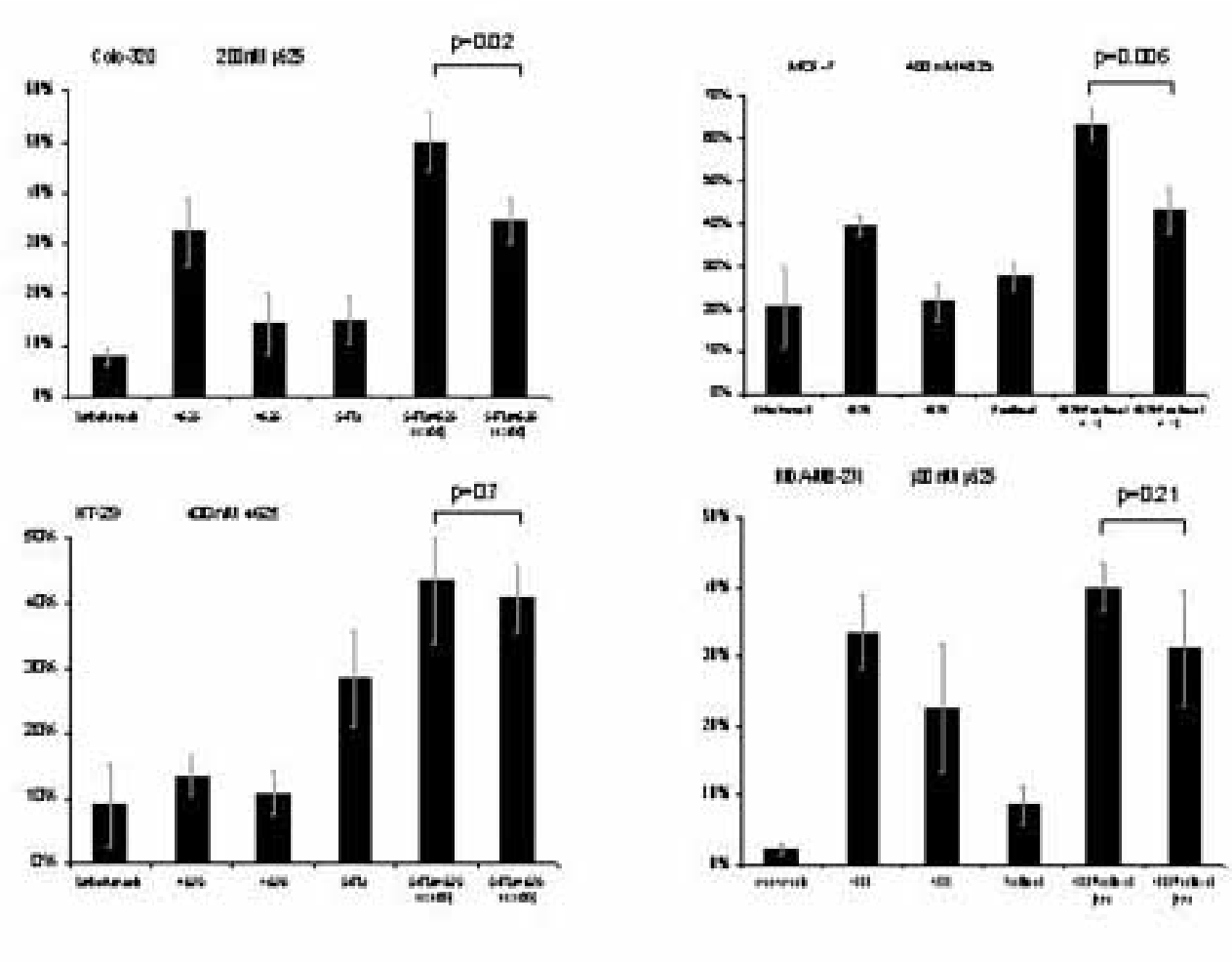

Abb. 12, 13 Propidiumiodid Aufnahme der Kolon- und Mammakarzinomzellen nach Behandlung mit 4625/4626 alleine und in Kombination mit 5-FU bzw. Paclitaxel. Die Konzentrationen entsprechen den im MTT-Assay ermittelten IC50 nach 72 (Oligonukleotid) bzw. 48 Stunden (Chemotherapie). Die Balken repräsentieren die Standardabweichung aus zwei Facs Analysen. Zell Debris wurde durch angepasstes light scatter gating ausgeschlossen.

4.2 In vivo

Um zu untersuchen, ob die chemosensitivierende Wirkung von 4625 in vitro, auch einen therapeutischen Nutzen in vivo besitzt, wurden Experimente an Nacktmäusen durchgeführt. In vorhergehenden Untersuchungen konnte eine statistisch signifikante Wachstumsinhibition von Colo-320 und MDA-MB-231 Tumorxenotransplantaten nach systemischer Applikation von 20mg/kg KG 4625 in Nacktmäusen nachgewiesen werden (59). Dabei wurde die Oligonukleotide täglich über drei Wochen ohne einen Transfektionszusatz intraperitoneal injiziert. Das 4626 Oligonukleotid zeigte im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle keine Wirkung auf das Tumorwachstum.

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob das bispezifische Antisense ebenso die antitumorale Wirkung einer suboptimalen Chemotherapiedosis verstärken kann. Es wurden Experimente mit Colo-

320 und MDA-MB-231 Zellen durchgeführt. Die Tumoren dieser beiden Krebszellinien wuchsen in der Subkutis von Nacktmäusen und sahen sich makroskopisch sehr ähnlich. Colo-320 Tumoren wuchsen wesentlich schneller und zeigten weniger Metastasierungstendenz als MDA-MB-231 Xenotransplantate.

Tumoren derselben Zellinie etablierten sich unterschiedlich schnell und es ließ sich insgesamt ein schnelleres Wachstum bei Tumoren über 100 cm3 beobachten. Die Tatsache, daß kleine Tumoren langsamer wuchsen begründet die Darstellung der Wachstumskurven in relativen Wachstumsdiagrammen. Die einzelnen Tumorgrößen werden relativ zu ihrem Anfangsvolumen an Tag 1 dargestellt (fold increase). Größenänderungen kleiner Tumoren haben in solchen einen stärkeren Einfluß auf die Steigung der Wachstumskurve.

4.2.1 Behandlung mit Standardtherapien

In der Literatur beschriebene Behandlungen von Nacktmäusen mit Paclitaxel bzw. 5-Fluorouracil variieren stark bezüglich Dauer, Dosis und Therapieintervallen. Für die Auswahl einer geeigneten Dosis wurden insbesondere Studien berücksichtigt, in denen Nacktmäuse i.p. Taxol bzw. 5-FU in Kombination mit vergleichbaren experimentellen Wirkstoffen behandelt worden waren (60-64). Um die für unsere Zwecke gewünschte suboptimale Dosis Chemotherapie für eine kombinierte Behandlung zu ermitteln wurden Vorversuche mit einer Monoterapie über drei Wochen durchgeführt. Mäusen mit MDA-MB-231 Tumoren erhielten drei verschiedenen Dosen Paclitaxel. Colo-320 transplantierte Mäuse wurden mit zwei Dosierungen 5-FU behandelt. Der Behandlungszeitraum wurde der Antisense Therapie angepaßt und betrug somit 21 Tage, mit insgesamt 5 Applikationen 5-FU bzw. Taxol.

4.2.1.1 MDA-MB-231 Xenotransplantate

12 Tage nach Implantation der Krebszellen erreichten die Tumoren ein Volumen von etwa 110 mm^3 und die Tiere erhielten die erste Dosis Paclitaxel. Anfangs wurden gleiche Volumina (200 mL) mit unterschiedlichen Konzentrationen Taxol i.p. injiziert. Die in der klinischen Therapie übliche Verdünnung beträgt 1:5 undentspricht einer Konzentration von 2.5 mg/mL. Diese Verdünnung ergab sich nur für die mit 10 mg Taxol behandelten Tiere. Die 20 mg/kg KG Dosis enthielt die doppelte Konzentration Paclitaxel. Dies führte zu lokalen Reizungen an den Bauchdecken der Mäuse, während und unmittelbar nach der Injektion. Deshalb wurden an den letzten drei Behandlungstagen allen Tieren verschiedene Volumina der 1:5 Verdünnung Paclitaxel gespritzt. So betrug die Konzentration stets 2.5 mg Paclitaxel/mL. Die angegebene Menge Taxol wurde an Tag 1, 5, 9, 13 und 17 injiziert. Es konnte insgesamt eine dosisabhängige Wachstumshemmung der subkutanen Tumoren gezeigt werden, wobei 5 mg/kg KG praktisch keine Wirkung hatte. 10 mg bzw. 20 mg Paclitaxel bewirkten eine Wachstumshemmung um 41% bzw. 52%. Zwei von acht Xenotransplantaten der Mäuse, die mit 20 mg/kg behandelt wurden schrumpften über den Zeitraum des Experimentes. In den beiden anderen Behandlungsgruppen nahm das Volumen jeweils eines Tumors ab.

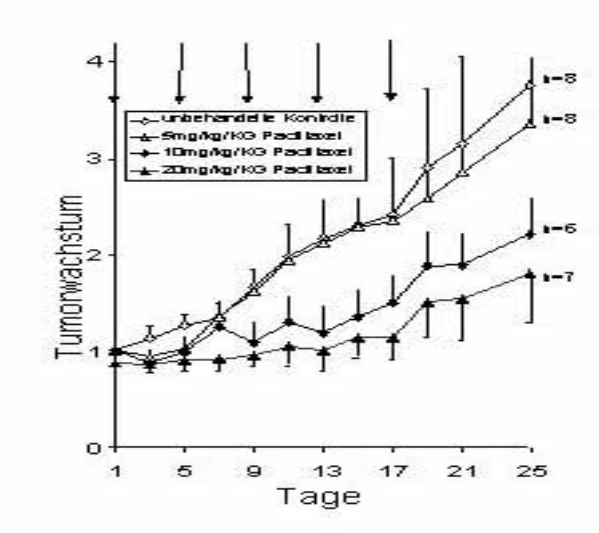

Abb.14 Relative Tumorvolumina subkutan wachsender MDA-MB-231 Xenotransplantate in Nacktmäusen während systemischer Behandlung mit paclitaxel. Im Diagramm sind die Standardfehler der unterschiedlichen Behandlungsgruppen angegeben.

Insgesamt konnten drei Tumoren der Kontrollgruppe ihr Volumen mehr als verfünffachen. Eine vergleichbare Volumenzunahme erreichten zwei der 5 mg und einer der 10 mg Dosierung. 20 mg Paclitaxel reichten nicht aus bei einem Transplantat eine Vergrösserung um das 10fache zu verhindern. Dieser Tumor hatte ein Anfangsvolumen von etwa 180 mm^3 und war damit von Beginn an der größte. Zwei 10 mg Mäuse starben am achten Tag an einer Infektion. Die Tumorvolumina der mit 5 mg behandelten Mäuse wiesen die größte Standardabweichungen auf. Aus der großen Streuung und den relativ langsam wachsenden Tumoren resultieren die geringe Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrolle. Eine statistische Signifikanz ließ sich deswegen nicht nachweisen.

4.2.1.2 Colo-320 Xenotransplantate

Die Colo-320 Tumoren konnten unbehandelt ihr Volumen in 40 Tagen im Durchschnitt verzehnfachen. 20 bzw. 40 mg/kg/KG 5-FU wurden i.p. an Tag 1, 5, 9, 13 und 17 injiziert. Beide Dosierungen 5-FU zeigten insgesamt eine ähnlich ausgeprägte Wachstumshemmung. In der ersten Woche war der zytostatische Effekt am deutlichsten sichtbar. Das Tumorvolumen dreier Mäuse (zwei aus der 20 mg/kg eine aus der 40 mg/kg Gruppe) war vier Tage nach der ersten Injektion kleiner als am Tag eins. Zwei davon konnten allerdings ihr Wachstum daraufhin wieder beschleunigen und ihre Größe bis zum Ende des Experiments vervielfachen. Der dritte Tumor hatte ein Anfangsvolumen von etwa 300 mm3 und lag somit über der Größe, bei welcher ein spontaner Tumorrückgang wahrscheinlich ist. Vier Tage nach Beginn des Experiments also zum Zeitpunkt der zweiten 5-FU Injektion war dieser Tumor kleiner als 100 mm3 und nahm weiterhin an Größe ab. Insgesamt erreichten 40 mg 5-FU keinen stärkere wachstumshemmende Wirkung als 20 mg.

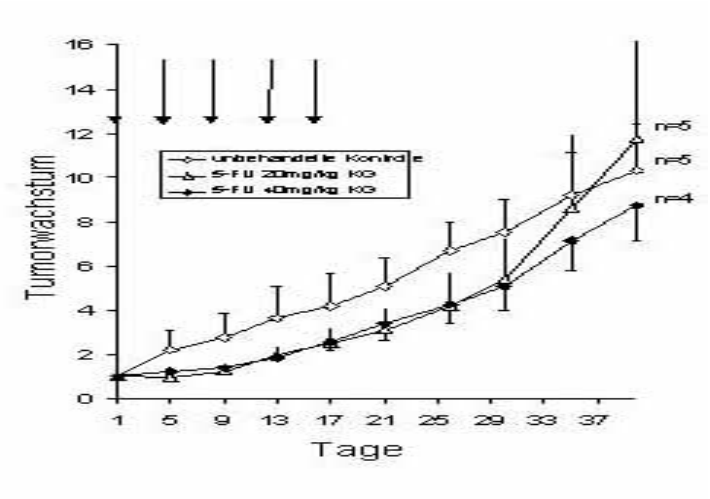

Abb. 15 Tumorwachstum der Colo-320 Xenotransplantate während systemischer Behandlung mit 5-FU über drei Wochen. Die Pfeile markieren die Applikationstage der beiden Dosierungen 5-FU.

Am Tag 21 betrug die Vergrößerung der Tumoren im Vergleich zum ersten Tag 3.13 für die niedrige Dosierung und 3.38 für die hochdosisbehandelten Mäuse. Die Kontrolltumoren hatten zu diesem Zeitpunkt ihre Anfangsgröße mehr als verfünffacht. Auch bei diesem Experiment waren, wegen der kleinen Fallzahlen, die Unterschiede zwischen dem Tumorwachstum in den Gruppen statistisch nicht signifikant.

4.2.2 Kombinationsbehandlung

Für die Kombinationsbehandlung ergeben sich rechnerisch 6 verschiedene Gruppen (5 Behandlungsgruppen + Kontrollgruppe). Auf eine Applikation des Kontrolloligonukleotids 4626 alleine wurde in beiden Experimenten verzichtet. Nach den Ergebnissen der Vorversuche mit Chemotherapie entschieden wir uns für 10 mg Paclitaxel und 20 mg 5-FU als Standardtherapiedosis. Einige Tiere wurden vor und nach Behandlungsbeginn ausselektioniert, um die Tumoren, deren Volumen sich nicht änderte und die auch morphologisch keine lebenden Tumorzellen vermuten ließen, nicht in die Auswertung mit einzuschließen. Den Mäusen, welchen zwei Wirkstoffen appliziert werden mußten, erhielten diese in zwei Injektionen rechts und links in den Bauchraum, um unbekannte frühzeitige Interaktionen zwischen dem Antisense und Paclitaxel bzw. 5-FU zu vermeiden. Sowohl Antisense als auch Standardtherapie wurden gut vertragen. Es konnten keine Oligonukleotid induzierte Entzündungen an den Injektionstellen festgestellt werden.

4.2.2.1 MDA-MB-231 Xenotransplantate

Weil das bispezifische Antisense Oligonukleotid 4625 noch nicht zuvor auf Chemosensitivierung in vivountersucht worden war, wurden für diesen ersten Versuch nur 5 Tiere pro Gruppe gewählt, um einen verstärkten anti-tumoralen Effekt lediglich zu erkennen. Für statistisch signifikante Ergebnisse werden bei dem zu erwartendem Unterschied mindestens 8 Mäuse pro Gruppe benötigt. Nach subkutaner Implantation wurden die Xenotransplantate über sieben Tage bis zu einer durchschnittlichen Grösse von 115 mm3 wachsen gelassen.

Anschliessend wurden 22 von 26 Tieren für eine Behandlung ausgewählt, randomisiert, markiert und erhielten die erste bzw. die ersten beiden Injektionen i.p. Bis zum Tag 15 nahm das Volumen von drei Tumoren ab. Zwei Mäuse aus der 4625/Paclitaxel und eine aus der 4625 Gruppe waren davon betroffen. Bis zum letzten Behandlungstag wurde das Tumorwachstum durch das 4625 Antisense um etwa 30% inhibiert. 10 mg Paclitaxel hatten etwa die gleiche Wirkung. Die Kombinationsbehandlung mit 4625 und Paclitaxel erreichte eine Wachstumshemmung von 40%. Eine 4626/Paclitaxel Therapie verstärkte die Wirkung gegenüber Paclitaxel alleine nicht. Der Unterschied zwischen dem Tumorwachstum der 4625 /Paclitaxel Gruppe und der 4626/Paclitaxel Gruppe erwies sich für den letzten Tag als signifikant (p=0.037). Am Tag der letzten Injektion hatte sich das Volumens eines Tumors der 4625/Paclitaxel Mäuse halbiert. Alle anderen waren größer als am ersten Behandlungstag. Die Tatsache, daß unbehandelte MDA-MB-231 Xenotransplantate sich, wie in dem vorhergehenden Experiment, innerhalb von drei Wochen nur vervierfachen, macht die Unterschiede zu nur langsamer wachsenden und nicht schrumpfenden Tumoren gering. Die Tendenz zu einer zumindest additiven Wirkung von Paclitaxel und 4625 Antisense Oligonukleotid in vivo ist allerdings erkennbar.

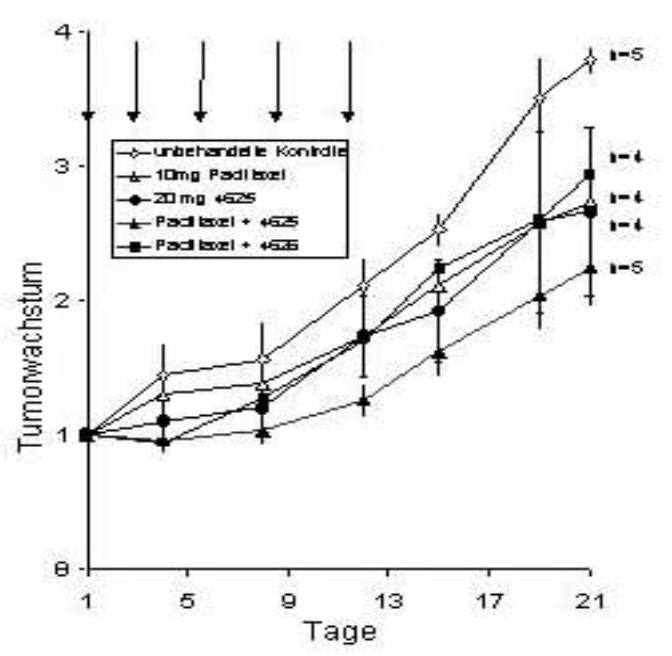

Abb.16 Relative Volumina der MDA-MB-231 Xenotransplantate während 3 wöchiger Kombinationsbehandlung. 0.5 mg Oligonukleotid wurden täglich, Palitaxel nur insgesamt fünf Mal über 21 Tage i.p appliziert.

4.2.2.2 Colo-320 Xenotransplantate

Bei diesem Experiment wurde bereits 6 Tage nach Tumorzelltransplantation das erste Mal behandelt. Die Tumoren hatten zu diesem Zeitpunkt ein mittleres Volumen von knapp 70 mm^3. Einerseits wird dadurch eine mögliche wachstumshemmende Wirkung stärker sichtbar, andererseits läßt es sich bei so kleinen Tumorgrößen kaum sagen, welches Transplantat tatsächlich wachsen wird. Es wurden im nachhinein 5 Tiere aus der Wertung genommen, deren Tumoren während des gesamten Experiments mehr einer Narbe als einem subkutanen Geschwulst glichen. Im Gegensatz zu den MDA-MB-231 transplantierten Mäusen wurden diese bis zum Tag 38

nach Behandlungsbeginn am Leben gelassen, um das Tumorwachstum nach Behandlungsstopp weiter beobachten zu können. Bis zum Tag 22 hemmte das 4625 Antisense das Tumorwachstum um 54% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Kombination aus 5-FU und 4625 erreichte eine Wachstumshemmung um 80% (p=0.008). Bis zum letzten Tag konnte sich die Größe von insgesamt neun Tumoren verzwanzigfachen. Drei aus der unbehandelten Kontrollgruppe, jeweils zwei der 4625 und der 5-FU/4626 Gruppe und jeweils einer aus der 4625/5-FU und 5-FU Gruppe. Bei vier der fünf unbehandelten Mäuse überschritt das Xenotransplantat am Tag 30 das Volumen von 1000 mm3. Etwa zwei Wochen nach Behandlungsende kam es zur Spontanremission einer mit 4625 und 5-FU behandelten Maus, indem die Tumorgröße um über 300 mm^3 schrumpfte. Es war weiterhin langsameres Wachstum der 4625/5-FU Tumoren auch nach Beendigung der Behandlung am Tag 21 zu beobachten. Die p-Werte der Tumorgrößen 4625/5-FU im Vergleich mit der Kontrolle betrugen für Tag 21 bzw. Tag 28 0.03 bzw. 0.017.

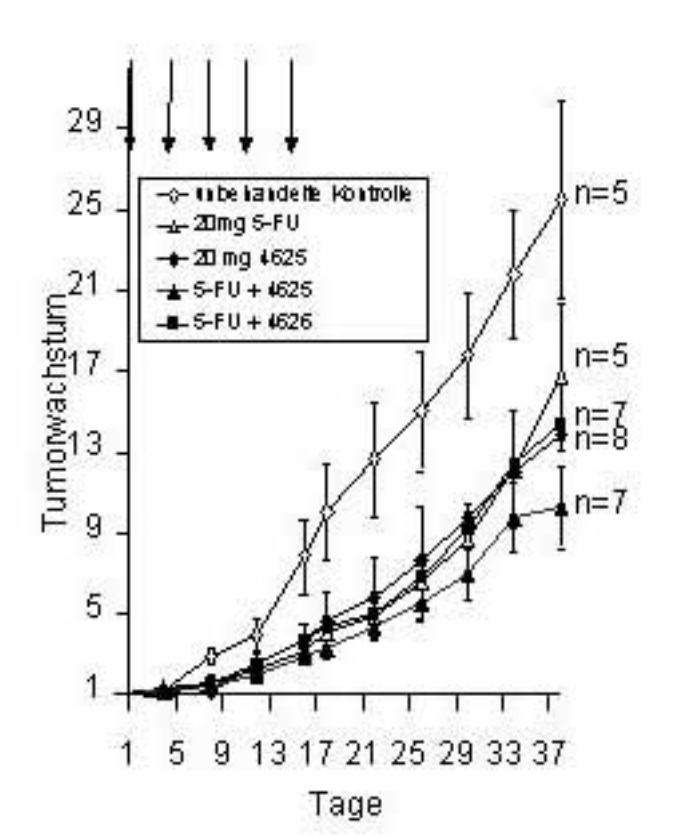

Abb. 17 Wachstum der Colo-320 Tumoren während Kombinationsbehandlung mit Oligonukleotiden und 5-FU. Das durchschnittliche Tumorvolumen betrug an Tag 1 (6 Tage nach Implantation) 75 mm^3.

5 Ergebnisse Teil 2

5.1 In vitro

5.1.1 Ep-CAM Detektion

Vier unterschiedliche Krebszellinien wurden in der Durchflußzytometrie auf Ep-CAM Exprimierung untersucht. Zur negativen Kontrolle wurden Zellen nur mit dem zweiten FITC-markierten Antikörper inkubiert, um die Hintergrundfluoreszenz anschließend vom gemessenen Wert abzuziehen. Die höchste Ep-CAM Dichte wurde in drei unabhängigen Messungen für HT-29 Zellen bestimmt. SQ20B Pharynxkarzinomzellen exprimieren nur geringfügig weniger Ep-CAM. SW2 Zellen stellten sich in der Facs Analyse heterogener dar. Eine Subpopulation dieser Zellen (ca. 10%) exprimiert deutlich weniger Ep-CAM als die Hauptfraktion. RL Zellen stammen von einer Lymphomzellinie und tragen, wegen ihres nicht-epithelialen Ursprungs auch kein Ep-CAM auf ihre Oberfläche.

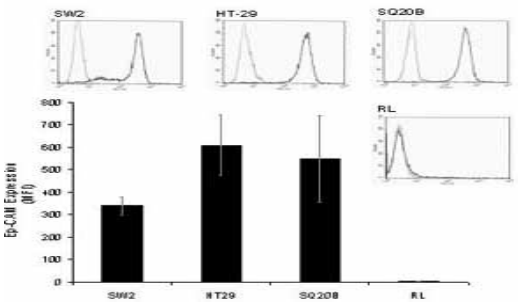

Abb. 18 Ep-CAM-Expression auf drei epithelialen Karzinomen in der Facs Analyse nach Markierung mit einem fluoreszierenden Antikörper. Lymphatische RL Zellen exprimieren praktisch kein Ep-CAM.

5.1.2 Leucin Einbautest

Leucin kann als essentielle Aminosäure nicht von Zellen selbst synthetisiert werden und sie sind auf die Aufnahme von außen angewiesen. Der anschließende Einbau exogenen Leucins in Proteine korreliert mit der zellulären Proteinsyntheseaktivität, weil die Aminosäure relativ gleichmäßig in den meisten Proteinen vorkommt. Das Pseudomonas Exotoxin A blockiert die Proteinsynthese und die betroffenen Zellen bauen so auch kein Leucin mehr ein. SW2 und Ep-CAM negative RL Zellen wurden in Leucin freiem Medium kultiviert und nach 4D5MOC-B-ETA Behandlung [H3] markiertes Leucin hinzugefügt. Anschließend wurde der zelluläre Einbau in Proteine quantifiziert. 4D5MOC-B-ETA Konzentrationen um 20 fM hatten eine um 50% verminderte

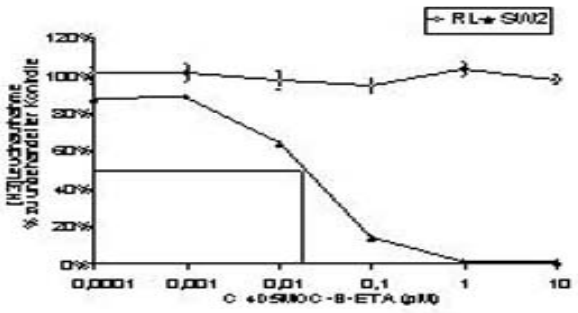

Abb. 19 (H3) Leucin Aufnahme von SW2 Zellen nach 24 stündiger Behandlung mit 4D5MOC-E-ETA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Leucininkorporation der SW2 Zellen zur Folge. 1 pM bewirkte nach bereits 24 Stunden eine vollständige Blockierung der Proteinsynthese. Die Ep-CAM negativen RL Kontrollzellen zeigten sogar bei 10 pM 4D5MOC-B-ETA keinerlei verminderte Leucinaufnahme bzw. Einbau. Die Wirkung des 4D5MOC-B-ETA ist somit stark antigenabhängig.

5.1.3 Proliferationsassays

Die Blockierung der zellulären Proteinsynthese führt zu einer Wachstumshemmung und früher oder später zu Zelltod und Apoptose (65). Mit steigenden Konzentrationen 4D5MOC-B-ETA behandelte Zellen zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, das in den Diagrammen dargestellte Wachstum. Am sensitivsten reagierten SW2 Zellen auf 4D5MOC-B-ETA. Die Wachstumskurve entspricht nahezu den für die Leucinaufnahme nach 24stündiger Behandlung gemessenen Werten. Sie wuchsen bereits bei einer Konzentration von 10 fM 4D5MOC-B-ETA um fast 20% langsamer. Diese Konzentration hatte auf die anderen Ep-CAM positiven Zellen keinen Einfluß. Bei 1 pM betrug die Proliferationshemmung der SCLC Zellen nahezu 100 %. Das Wachstum von SQ20B wurde durch die gleiche Konzentration um nur 50% gehemmt. HT-29 Zellen lagen dazwischen. Auch die höchste Konzentration von 10 nM reichte nicht aus um ihr Wachstum um 100% zu inhibieren. Die kleinen Standardabweichungen der Wachstumskurve bei Immunotoxinkonzentrationen von 10 pM bis 10 nM zeigen, daß in allen drei Experimenten nach 72 Stunden mindestens 6-8% HT-29 Zellen im Vergleich zur Kontrolle noch leben und enzymatisch aktiv sind.

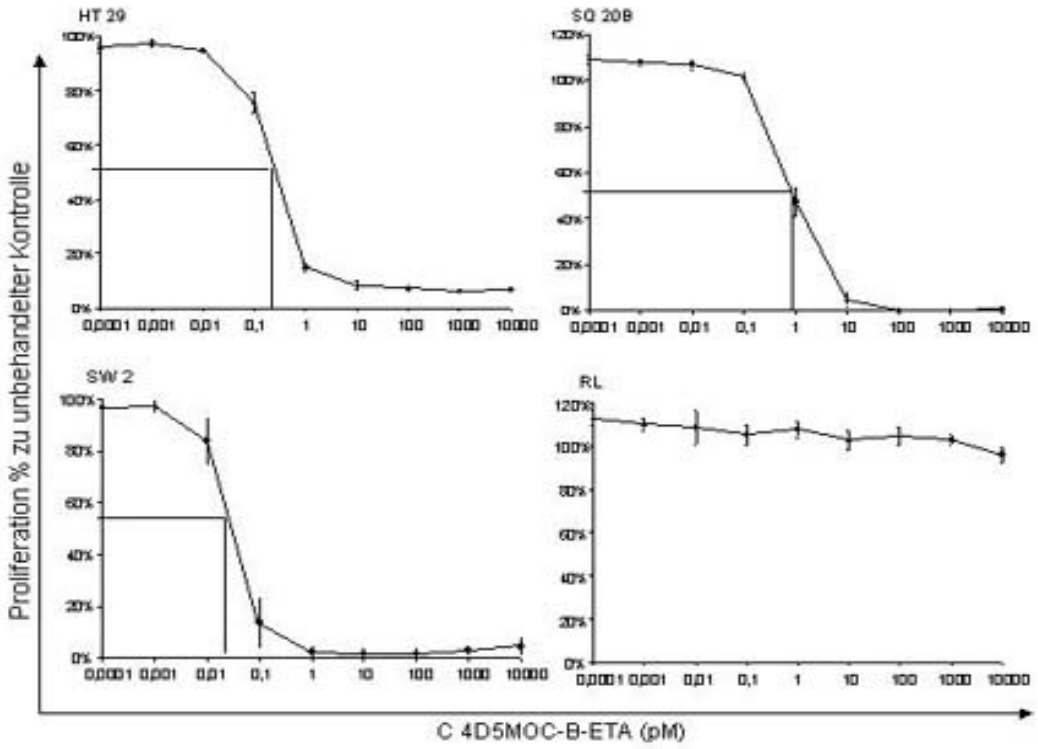

Abb. 20 MTT-Assay von drei Ep-CAM positiven und einer Ep-CAM negativen Zellinien nach 72 stündiger Behandlung mit 4D5MOC-B-ETA. Die Diagramme stellen Mittelwerte aus drei Experimenten mit ihren Standardabweichungen dar.

Ep-CAM negative RL Zellen reagierten, wie auch im Leucineinbautest nicht auf das 4D5MOC-B-ETA Immunotoxin.

5.1.4 Trypan Blau Exklusionstest

Mit Trypan Blau gefärbte Zellen wurden gezählt, um die Fraktion der toten Zellen zu ermitteln. Bei dieser Untersuchung waren HT-29 Zellen am widerstandsfähigsten gegenüber 4D5MOC-B-ETA. Nach 48 Stunden zeigten sie in zwei Experimenten praktisch keine Dosisabhängigkeit und es starben weniger als 10% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach 72 Stunden waren bei 0.1 pM, also einer Konzentration die nur wenig unter der IC50 im MTT-Assay liegt, kaum mehr HT-29 Zellen gestorben. 10 pM reichten nach dieser Zeit immerhin aus um knapp über 30% zu töten. Im Vergleich dazu beträgt die Fraktion toter SW2 oder SQ20B Zellen nach 72 h und 10 pM über 50%. SW2 Zellen reagierten bei der niedrigen Konzentration, wie im MTT-Assay am sensitivsten auf 4D5MOC-B-ETA. Eine Zunahme der toten Zellfraktion war bei den SCLC Zellen am deutlichsten zeitabhängig. SQ20B waren noch empfindlicher und es waren in fast allen Proben mehr blaue Zellen vorhanden, als in denen der anderen beiden Ep-CAM positiven Zellen.

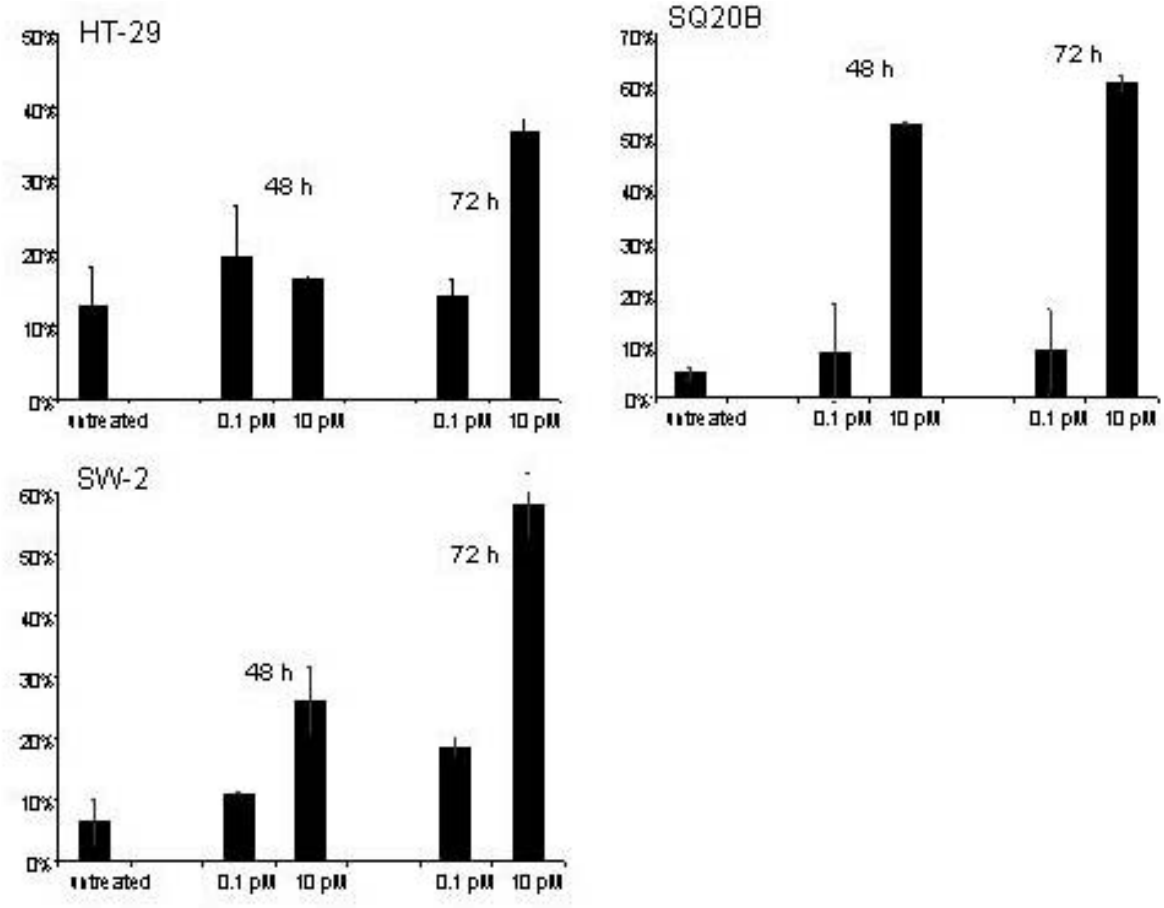

Abb.21 Trypan Blau Aufnahmevon drei Ep-CAM positiven Zellinien nach Inkubation mit zwei Konzentrationen 4D5MOC-B-ETA über zwei Unterschiedliche Zeiträume.

5.2 In vivo

Die zwei Ep-CAM positive Zellinien SW2 und HT-29 wurden in 100 mL PBS subkutan injiziert. SW2 Zellen entwickelten sich zu mäßig schnell wachsenden, festen und gut abgrenzbaren, teils hämmorrhagischen Tumoren. HT-29 zeigten ein noch schnelleres, aggressives und metastasierendes Wachstum. Die Tumorgröße zum Zeitpunkt der ersten Behandlung betrug bei den Immunotoxin Versuchen durchschnittlich 120 mm^3.

Da das 4D5MOC-B-ETA Immunotoxin bisher nicht in vivo untersucht worden war, wurde das Körpergewicht und die Ausscheidung im ersten Experiment protokolliert. Es konnten keine Anzeichen besonderer Toxizität beobachtet werden. Körpergewicht und Verhalten waren unauffällig und über den Zeitraum des Experiments konstant. Insgesamt litten einige Tiere an Diarrhoe. Allerdings waren die Tiere der Kontrollgruppe in gleichem Masse davon betroffen, was eine Immunotoxin bedingte Ursache unwahrscheinlich macht.

5.2.1 SW2 Xenotransplantate

Wegen der zunächst unbekannten Toxizität des 4D5MOC-B-ETA wurden die Tiere erst mit 5 µg/Maus und in einem weiteren Versuch mit 10 mg/Maus über jeweils 10 Tage behandelt. Dies entspricht einer Dosierung von

etwa 250 bzw. 500 mg/kg KG. Die unterschiedliche Entwicklung der Tumorzellen im murinen subkutanen Gewebe hatte zur Folge, daß die SW2 Xenotransplantate im ersten Experiment (5µg 4D5MOC-B-ETA + Kontrolle) langsamer wuchsen und erst nach 16 Tagen eine initiale Behandlungsgrösse von 124 cm^3 erreichten. Im zweiten Experiment wurden die Mäuse bereits ab Tag 12 und mit einem durchschnittlichen Tumorvolumen von 116 cm3 behandelt. Beide Experimente beinhalteten jeweils 8 Kontrolltiere, von denen die resultierenden Mittelwerte mit den Standardfehlern in den Diagrammen dargestellt sind. 10 bzw. 5 in 100 µL PBS gelöstes Immunotoxin wurde täglich über 10 Tage intraperitoneal injiziert. Das Immunotoxin zeigte eine hemmende Wirkung auf das Wachstum der humanen SW2 Tumoren in der Maus. 5µg 4D5MOC-B-ETA bewirkten eine Wachstumshemmung um 20%. In der 10 µg Versuchsgruppe nahm das Volumen von 6 aus 8 Tumoren

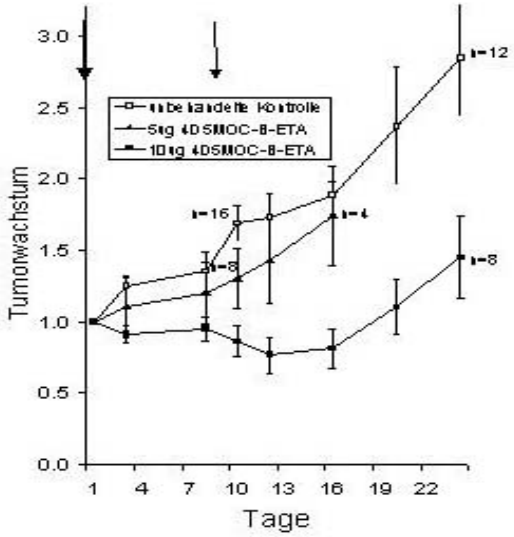

Abb. 22 Wachstum subkutaner SW2 Xenotransplantate während täglicher ip Injektion von 200 bzw 400 mg/kg/KG 4D5MOC-B-ETA über zehn Tage. Die Balken geben den Standardfehler (S.E.M.) an.

vorübergehend ab. Am Tag 24 waren allerdings nur noch 2 Xenotransplantate kleiner als an Tag 1. Bis zum Ende der Behandlung (Tag 10) betrug das Tumorwachstum 46% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (p=0.003). Die Tumoren beider Versuchsgruppen fingen wenige Tage nach Behandlungsstopp wieder an zu wachsen und erreichten nach weiteren zwei Wochen teilweise die Größe der Kontrollgruppentumoren. Zwei Wochen nach Behandlungsende waren die Tumoren der Tiere, denen 5 µg 4D5MOC-B-ETA appliziert worden waren, immer noch halb so groß wie die der unbehandelten Kontrollgruppe (p=0.04).

Vier Kontrolltiere und vier mit 5 µg 4D5MOC-B-ETA behandelte Mäuse wurden am letzten Behandlungstag geopfert, die Tumoren entnommen und mit einem TUNEL Assay auf Apoptose untersucht. Die Schnittfärbungen lieferten jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Tumoren.

5.2.2 HT-29 Xenotransplantate

Die Kolonkarzinomzellen wuchsen in den Nacktmäusen etwa doppelt so schnell wie die SW2 Tumoren. Bereits nach 7 Tagen wurde mit der Behandlung begonnen. Es wurden insgesamt 16 Mäuse über 10 Tage mit 10 µg 4D5MOC-B-ETA behandelt. Sechs Mäuse aus dieser Gruppe, deren Tumoren sich nach Behandlungsende durch

ein beschleunigtes Tumorwachstum auszeichneten, erhielten daraufhin ein zweites Mal 10 µg 4D5MOC-B-ETA über 10 Tage. So war es möglich Resistenzen gegenüber dem Immunotoxin, die insbesondere durch eine Minderexpremierung von Ep-CAM denkbar wären, beurteilen zu können. Insgesamt nahm das Volumen von 15 aus 16 Xenotransplantaten während der ersten Behandlung mit 10 µg 4D5MOC-B-ETA ab. Es ergab sich eine Wachstumshemmung um 80% bis zum Tag 11 (p=0.0001). 14 Tumoren fingen nach Behandlungsende wieder an zu wachsen und überschritten zwei Wochen später die Größe ihres Anfangsvolumens. Ein Tumor der zwei Tage nach Beendigung der ersten Behandlung nicht mehr sichtbar war, also wahrscheinlich nur noch aus wenigen Zellen bestand, konnte sich zehn Tage später wieder entwickeln und wuchs bis zum Ende des Experiments auf das über siebenfache seiner Anfangsgröße von 101 mm^3. Der Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und den mit 5 mg 4D5MOC-B-ETA behandelten Mäusen, war in diesem Experiment weitaus größer als bei den SW2 Xenotransplantaten. Applikationen von 5 µg 4D5MOC-B-ETA hemmten das Tumorwachstum um 64% (p=0.0008). Die hohe Dosierung erzielte einen weniger deutlichen Unterschied im Vergleich zur Behandlung mit 5 mg 4D5MOC-B-ETA pro Maus, als bei den SW2 Tumoren.

Am Tag 28 wurden 6 Mäuse für den zweiten Behandlungszyklus mit 10 µg 4D5MOC-B-ETA ausgewählt. Sie hatten zu diesem Zeitpunkt ein mittleres Tumorvolumen von 200 mm^3, was der 1.5 fachen Grösse ihrer Anfangsvolumina entspricht. Im Vergleich dazu betrug die durchschnittliche Tumorgröße, der nur mit einem Zyklus 10 µg 4D5MOC-B-ETA behandelten 10 Mäuse 295 mm^3 .Die Tatsache, daß das relative Tumorwachstum der letzteren mit 1.2 aber unter 1.5 liegt, zeigt daß es sich hierbei um von Tag 1 an relativ große Tumoren handelte. Die 6 Mäuse sind also ausgewählt worden, um das reaktive Wachstum nach Behandlungsende wieder zu hemmen. Sowohl die Darstellung der absoluten Tumorgrößen (nicht abgebildet) als auch das Tumorwachstums-Diagramm zeigen eine eindeutig erkennbare Wachstumsinhibition, bei der die relative Tumorgrösse der zweimal behandelten Mäuse erstmals unter die der nur einmal behandelten sinkt. Die Xenotransplantate der mit zwei Zyklen 4D5MOC-B-ETA therapierten Mäuse waren am Tag 47 im Durchschnitt halb so groß, wie die der nur einmal behandelten. Während des zweiten Behandlungszyklus schrumpfte allerdings keiner der 6 Tumoren mehr. Ein wachstumshemmender Effekt ist zwar erkennbar, aber längst nicht so ausgeprägt, wie bei der ersten Behandlung. Dies könnte eventuell durch eine verminderte Antigenexprimierung der Tumorzellen begründet sein. Andererseits ist die Effizienz des Immunotoxins bei größeren Tumoren wahrscheinlich ohnehin geringer. Die Tumorzellen sind in der von ihnen geschaffenen extrazellulären Matrix unempfindlicher und der Gesamttumor besteht zu einem geringeren Teil aus Zellen weshalb das Gesamtvolumen weniger von der Wirkung des Immunotoxins beeinflusst wird.

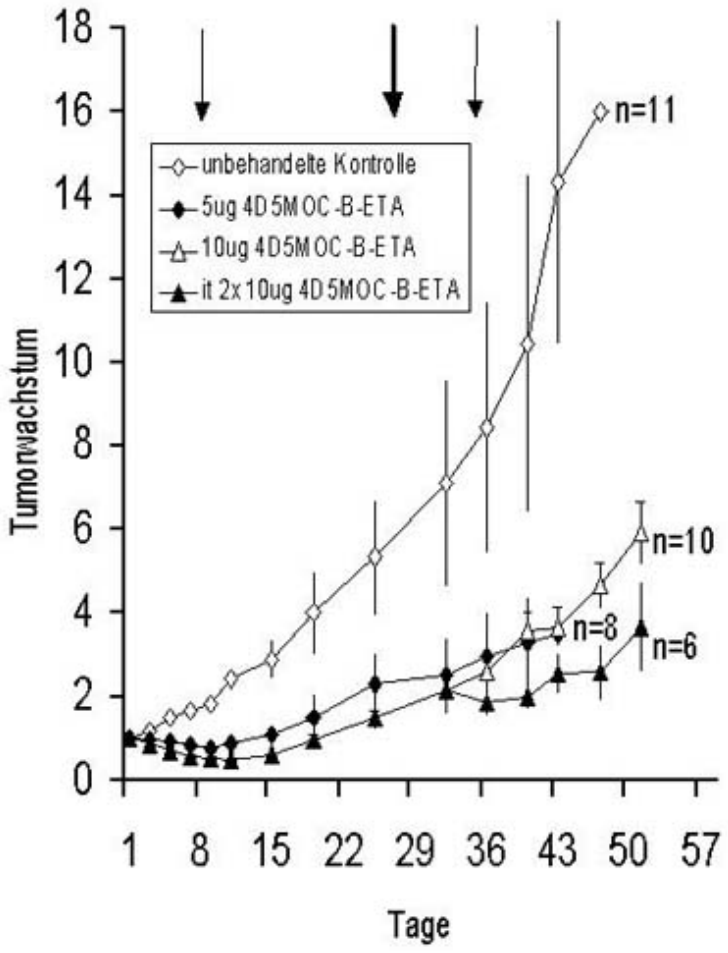

Abb. 23 Wachstum der HT-29 Xenotransplantate über 50 Tage. Die Pfeile markieren Anfang und Ende der beiden Behandlungszyklen mit 10 µg 4D5MOC-B-ETA über 10 aufeinanderfolgende Tage.

6 Zusammenfassung und Diskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden acht Krebszellinien mit dem kürzlich in unserem Labor entwickeltem bcl-2/bcl-xL bispezifischen 4625 Antisense Oligonukleotid transfiziert. Dieses 4625 Antisense zeigte, im Vergleich zum 4626 Kontrolloligonukleotid, Degradation beider Zielproteine, zytostatische Effekte und sequenzspezische Toxizität in vitro. Die systemische Applikation von 4625 in Nacktmäuse führte weiterhin zu einer Verstärkung der wachstumshemmenden Wirkung von Paclitaxel und 5-Fluorouracil auf menschliche Kolon- und Mammakarzinome.

Im zweiten Teil wurde die Wirkung des rekombinanten, Ep-CAM spezifischen Immunotoxins 4D5MOC-B-ETA auf drei unterschiedliche Tumorzellen untersucht. Dieses scFv Immunotoxin wurde zuvor in einer Kollaboration mit dem Biochemischen Institut der Universität Zürich entwickelt. 4D5MOC-B-ETA zeigte eine starke karzinomzellspezifische Blockierung der Proteinsynthese und führte bereits in sehr geringen Konzentrationen zu einer Wachstumshemmung von Tumorzellen in vitro. Weiterhin bewirkte die systemische Applikation von 4D5MOC-B-ETA ein verlangsamtes Wachstum bzw. Schrumpfen von unterschiedlichen Karzinomen in vivo.

6.1 Teil 1

Die beiden anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL werden von vielen soliden Tumoren exprimiert und blockieren unterschiedlich den durch Zytostatika induzierten Zelltod (66). Bei Brustkrebs soll vor allem Bcl-2 mit Chemoresistenz assoziiert sein (67). Dagegen gibt es Hinweise, daß metastatisches Potential und Malignität bei Brust- und Kolonkarzinomen mehr von Bcl-xL bestimmt werden (20,68). Viele Bronchialkarzinome exprimieren beide Proteine.

Die bisher beschriebenen Antisense Oligonukleotide sind entweder für bcl-2 oder bcl-xL monospezifisch und ihre therapeutische Anwendbarkeit ist somit limitiert. Das bispezifische 4625 Antisense Oligonukleotid degradiert sowohl bcl-2 als auch bcl-xL, durch gezielte Hybridisierung mit einer geeigneten Homologieequenz in der bcl-2/bcl-xL mRNA. Zusätzliche Zuckermodifikationen erhöhen sequenzspezifische Affinität und Nukleasenresistenz des 4625 Antisense. Sie bewirken auch weniger “nicht Antisense vermittelte” Toxizität, als Oligonukleotide der ersten Generation. In vitro hemmt 4625 alleine nicht nur die Bildung von Bcl-xL und Bcl-2, sondern induziert auch Apoptose in histologisch unterschiedlichen Tumorzellen und hemmt das Wachstum menschlicher Tumoren in Nackmäusen (59).

Die biologische Wirkung von 4625 auf Krebszellen war praktisch unabhängig von deren basalen Bcl-2/Bcl-xL Expressionsmustern. Die Affinität von 4625 liegt aufgrund der drei “mismatches” gegenüber bcl-xL für die bcl-2 mRNA über der von bcl-xL (10). Trotzdem reagierten A-549 Zellen, welche nur bcl-xL exprimieren, sowohl imMTT-Assay als auch im Trypan-Blau Exklusionstest mit am sensitivsten auf eine Transfektion mit 4625. Krebzellen, die beide Proteine besitzen (SW2, MDA-MB und H-125), wuchsen bei 400-500 nM 4625 um 50% langsamer als die mit 4626 behandelten Tumorzellen. Die Ansprechbarkeit der unterschiedlichen Zellen muß

also von anderen Proteinen abhängen, deren Funktionen sich nach der Transfektion in vitro unterschiedlich auswirken. Das verhältnismäßig schlechte Ansprechen der MCF-7 Zellen auf 4625 kann damit zusammenhängen, daß ihnen das Genprodukt von Caspase 3 fehlt (69) und die Apoptoseinduzierung dadurch insgesamt beeinträchtigt oder verlangsamt ist. Das Kontrolloligonukleotid 4626 hatte im Vergleich zu 4625 insbesondere bei LoVo Zellen einen unspezifischen zytotoxischen Effekt in hohen Konzentrationen. Diese Krebszellinie trägt das wild-Typ p53 Gen (31). Der Zusatz von Lipofectin und Phosphorothioate Oligonukleotiden reicht so schon aus, um eine gewisse Zellfraktion in vitro zu töten.

Das 4625 Antisense verstärkte weiterhin die zytotoxische Wirkung der beiden Zytostatika Paclitaxel und 5-FU in je zwei unterschiedlichen Mamma- bzw. Kolonkarzinomzellinien. Paclitaxel konnten im Laufe der letzten Jahre unterschiedliche molekulare Wirkungsmechanismen nachgewiesen werden. Als erstes wurde es als Mikrotubuli stabilisierender Wirkstoff beschrieben. Hierbei hemmt es die Depolymerisierung des Spindelapparates. Diese Mechanismen gelten auch heute noch als wesentlich. Neben anderen potentiellen Wirkungsmechanismen ist in unserem Fall die Phosphorylierung von Bcl-2 und Bcl-xL besonders interessant. Auch wenn nicht klar ist auf welchem Wege dies geschieht, so soll phosphorylisiertes Bcl-2 die Fähigkeit verlieren mit Bax zu heterodimerisieren (78). Andere Untersuchungen zeigten, daß die Paclitaxel induzierte Phosphorylierung von Bcl-2 dazu führt, daß Bcl-2 mit anderen Proteinen assoziiert und so dessen anti-apoptotische Wirkung verloren geht. Es wurde daraufhin eine Bcl-2 unabhängige Wirkung von Paclitaxel postuliert. Untersuchungen mit Bcl-2 Antisense Oligonukleotiden zeigten aber eine Verstärkung in vivo (79), was eine völlige Unabhängigkeit Paclitaxels von Bcl-2 unwahrscheinlich macht.

MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen sind einerseits ER negative und andererseits ER positive Mammakarzinomzellen. In unterschiedlichen Studien konnte Östrogen eine Steigerung der Chemoresistenz über eine Stimulierung der Bcl-2 Expression in Tumorzellen nachgewiesen werden (67,70). Bcl-2 verhinderte außerdem eine Tumorregression in Nacktmäusen, die durch Östrogen-Entzug induziert wurde (71). MCF-7 Zellen sprachen nur sehr schwach auf eine Transfektion mit dem 4625 Antisense an. Andererseits war die chemosensitivierende Wirkung von 4625 bei dieser Zellinie, sowohl im Proliferationstest als auch in der Facs-Analyse stärker ausgeprägt, als für MDA-MB-231. Der positive Östrogenrezeptorstatus führt eventuell in Kulturmedium (das Östrogen in geringen Mengen enthält) über bcl-2 zur Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika. Die Behandlung von MCF-7 Zellen mit 4625 oder Paclitaxel alleine ist anscheinend nicht ausreichend, um die apoptotische Schwelle der Zellen zu überwinden. Die Kombination aus beiden Stoffen bewirkt über Degradierung von Bcl-2 durch das Antisense womöglich eine Ausschaltung der durch Östrogen vermittelten Chemoresistenz und Paclitaxel ist dann um ein Vielfaches wirksamer.

HT-29 Zellen reagierten sowohl im MTT als auch in der Trypan Blau Aufnahme nicht auf eine Transfektion mit 4625 bzw. 4626. Auch der Unterschied zwischen 4625/5-FU zur 4626/5-FU Kombinationsbehandlung war für diese Zellen minimal, obwohl im Western Blot eine deutlich sichtbare Minderexprimierung von Bcl-2 und Bcl-xL durch 400 nM 4625 in diesen Zellen erreicht wurde. HT-29 Zellen können die Bak Expression in Gegenwart von 5-FU umd das bis zu sechsfache steigern (31). Kombinationsbehandlungen mit dem bispezifischen Antisense und 5-FU müssten also einen verstärkten Anstieg der Bak/Bcl-xL bzw. Bak/Bcl-2 Ratio in HT-29 zur Folge haben. Trotzdem gelang es insgesamt nicht eine deutliche apoptoseinduzierende oder chemosensitivierende Wirkung mit 4625 in diesen Zellen zu erreichen. HT-29 sind folglich nicht so sehr auf bcl-2/bcl-xL, als Überlebensfaktoren angewiesen, wie dies bei den anderen Tumorzellen der Fall ist.

Möglicherweise stellen der Differenzierungsstatus und/oder fehlende genetische Schäden keine ausreichenden Auslöser für das apoptotische Programm dar oder andere Faktoren sind für den Schutz vor Apoptose und Zytostatika in HT-29 Zellen verantwortlich. Gründe für die geringe biologische Wirkung nach Bcl-2 und Bcl-xL Degradation verbleiben zu untersuchen. Die zytostatische Wirkung von 5-FU auf Colo-320 Zellen wurde im Proliferationsassay durch vorhergehende Transfektion mir 4626 vermindert. Es konnte bereits gezeigt werden, daß Oligonukleotide Krebszellen unspezifisch vor unterschiedlichen chemotherapeutischen Wirkstoffen schützen können (58). In der Facs Analyse ist die Wirkung von 4626 und 5-FU jedoch nicht antagonistisch und auch in vivo war keine abschwächende Wirkung von 5-FU durch das Kontrolloligonukleotids sichtbar.

Mit Ausnahme der HT-29 Zellen führte das 4625 Antisense in der Konzentration, welcher der IC50 MTT entspricht, zu mehr toten Zellen in der Facs-Analyse, als 5-FU und Paclitaxel bei diesen Konzentrationen. 400 nM 4625 induzierte mehr als drei Mal so viel Apoptose in MDA-MB-231 Zellen, wie 400 nM Paclitaxel.

Das Tiermodell, als weiteren Schritt zur klinischen Anwendung, ermöglicht die Beurteilung der Wirksamkeit eines Stoffes nach systemischer Applikation. In unserem Fall zeigt die Wachstumshemmung menschlicher Tumoren in der Maus eine ausreichende Stabilität und geringe Immunogenität des 4625 Antisense. Weiterhin ist die Penetration von dichtem Tumorgewebe und somit die Zugänglichkeit vieler Krebszellen durch das 4625 Oligonukleotid gewährleistet. In den vorhergehenden Experimenten konnte eine Minderexpremierung von Bcl-2 und Bcl-xL und Apoptoseinduktion in den Tumorzellen durch das 4625 mit immunhistochemisch gefärbten Schnitten und TUNEL Assays gezeigt werden (59). Da sich das 4625 Oligonukleotid mit je 6 Basen von muriner bcl-2 und bcl-xL mRNA unterscheidet, können über Antisense vermittelte Nebenwirkungen mit diesem Tiermodell keine Aussagen getroffen werden.

Die Kombinationsbehandlung der Versuchstiere mit Chemotherapie und Oligonukleotiden zeigte für MDA-MB-231 und Colo-320 Xenotransplantate ein gegenüber den Monotherapien verlangsamtes Tumorwachstum. Für die Kolonkarzinome war der wachstumshemmende Effekt stärker ausgeprägt. 5-FU bewirkte in den Vorversuchen mit der Monotherapie und in der Kombinationsbehandlung nach Behandlungsende keine Wachstumshemmung mehr auf die Xenotransplantate. Die Kombinationsbehandlung mit 5-FU und dem 4625 Antisense bewirkte einen nachhaltigen wachstumshemmenden Effekt von 74% bis zum Tag 38 ($p=0.029$). Die Wirkung von Kontrolloligonukleotid 4626 und 5-FU beeinflusste das Tumorwachstum im Vergleich zur 5-FU Monotherapie nicht ($p=0.91$). Der sequenzspezifische Antisense Effekt von 4625 ist also auch in vivo entscheidend für die chemosensitivierende Wirkung.

Das Wachstum von MDA-MB-231 Xenotransplantaten wurde durch 4625 in Kombination mit Paclitaxel im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe bis zum Tag 21 um etwa 40% inhibiert. Diese scheinbar schwächere Wirkung ist wahrscheinlich wesentlich durch die nur langsam wachsenden Tumoren bedingt. Es konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Tumorgrößen der Mäuse festgestellt werden, die zum einen mit Paclitaxel und Antisense und zum anderen mit Paclitaxel und Kontrolloligonukleotid über drei Wochen behandelt wurden ($p=0.037$).

Colo-320 Zellen reagieren in vitro mit einer Wachstumshemmung auf geringere Konzentrationen 4625, wie MDA-MB-231 Zellen. Möglicherweise ist für den Therapieerfolg in vivo das Ansprechen der Krebszellen insbesondere bei geringen Konzentrationen entscheidend. Die Menge Oligonukleotid, die letztendich in die xenotransplantierten Tumorzellen in der Maus gelangt, ist wahrscheinlich ebenfalls sehr gering.

Antisense Oligonukleotide gegen unterschiedliche Tumorproteine bzw RNA zeigten in der Vergangenheit wirkungsvolle Effekte in vitro und im Xenografttiermodell (5,54,72). Refraktäre Tumorzellen können mit bcl-2 und bcl-xL Antisense Oligonukleotiden gegenüber chemotherapeutischen Wirkstoffen sensitiviert werden (6,7). Bei der Entwicklung von bcl-xL Antisense Oligonukleotiden ergibt sich ein weiteres Problem. Bcl-xS ist eine Splicevariante von bcl-xL mit einer nicht eindeutig bekannten Wirkung. Einige bcl-xL Antisense-Oligonukleotide besitzen eine Zielsequenz, die in beiden mRNAs vorkommt und degradieren somit neben Bcl-xL auch Bcl-xS. Es konnte aber gezeigt werden, daß Bcl-xS unter bestimmten Umständen Apoptose auslößt (76). Deswegen sollte eine Degradierung der bcl-xS mRNA möglichst vermieden werden. Die Zielsequenz des bispezifischen 4625 Antisense Oligonukleotids befindet sich in einer Spliceregion, die nur in der bcl-xL mRNA vorkommt. So bleibt die Expression des eventuell proapoptotisch wirkenden Bcl-xS vom 4625 Antisense unbeeinflusst.

Das bekannteste bcl-2 Antisense Oligonukleotid ist das G3139 oder Augmerosen der Firma Genta. Es ist ein 18-mer Phoshorothioate Oligonukleotid und richtet sich gegen die ersten 6 Codons in der bcl-2 mRNA. In einerStudie mit non-Hodgkin Lymphom Patienten führte die systemische Applikation von G3139 bei einigen zur Tumorregression, zur Verminderung von Bcl-2 in Lymphomzellen und einer Verbesserung der Blutparameter und des Allgemeinbefindens (8). Weiterhin konnte Augmerosen in einer anderen Studie mit 14 Patienten maligne Melanome gegenüber Dacarbazin sensitivieren (9). Das G3139 Antisense enthält eine, häufig in bakterieller DNA vorkommende Zweiersequenz Cytidin mit darauffolgendem Guanin (CG). Bei Wirbeltieren führt diese Sequenzfolge über bisher nicht bekannte Mechanismen zur Immunstimulation. Die Phosphorothioat Modifikationen (CpGp) verstärken diesen Effekt. Die 4625/4626 Oligonukleotide enthalten keine dieser immunstimulatorischen CG Seguenzen. Der anti-tumorale Effekt in vivo ist somit eventuell mehr auf die Antisense-vermittelte Wirkung zurückzuführen, als dies in Untersuchungen mit G3139 der Fall ist. In der G3139 Studie mit non-Hodgkin Lymphom Patienten wurden bei allen Teilnehmern lokale Inflammationen an den Injektionsstellen beobachtet, die in einem Fall eine Weiterbehandlung ausschloss. Es kam aber zu keinen weiteren schwerwiegenden Nebenwirkungen. Die maximal tolerierte Dosis des G3139 wurde nicht erreicht. Sie lag in einer späteren Studie mit G3139 bei 147 mg/m^2 und führte zu Thrombozytopenie, Müdigkeit und Fieber. Die relativ schwachen, systemischen Nebenwirkung von bcl-2 Antisense Oligonukleotiden in Patienten zeigen, daß das Überleben gesunder Zellen weniger von der Expression dieses Proteins abhängt. Tumorzellen enthalten dagegen viele genetische Schäden, die ein Signal für die Apoptoseauslösung darstellen. Sie durchlaufen den programmierten Zelltod, wenn das Rheostat der pro- und anti-apoptotischen Proteine zugunsten der Apoptose verschoben wird.

Der Einsatz therapeutischer Antisense Oligonukleotide zeigte bereits erste Erfolge bei Patienten mit malignen Erkrankungen. Chemische Modifikationen gewährleisten hohe Nukleasenresistenz und Affinität zur Ziel mRNA. Sie erlauben weiterhin teilweise orale Applikationen (60,80). Unspezifische, also von der Nukleotidstruktur vermittelte Effekte, wie Immunstimulation und Hemmung der Angiogenese machen die Antisense Strategie für die antineoplastische Therapie besonders interessant. Die fortschreitende Entdeckung unterschiedlicher Proteine, die an Prozessen wie Chemoresistenzentwicklung, Entdifferenzierung und Metastasierung beteiligt sind, werden in Zukunft die Auswahl molekularer Zielscheiben zur erfogreicheren Krebsbehandlung entscheidend vergrößern. Es bleibt allerdings fraglich, ob die Degradation eines Proteins zu einem langzeitigen Nutzen für den Patienten werden kann. Bcl-2 und bcl-xL wirken offensichtlich sowohl

redundant als auch pleiotrop und Tumorzellen können unter gewissen Umständen die Expression von Bcl-2 zu Bcl-xL wechseln (73). Innerhalb eines soliden Tumors sind Bcl-2 und Bcl-xL heterogen verteilt und viele Tumoren exprimieren sowohl Bcl-2 als auch Bcl-xL.

Ein bcl-2/bcl-xL bispezifisches Antisense könnte deswegen in Zukunft eine breitere Anwendbarkeit und wirksamere Effekte bei Patienten mit refraktären Tumoren erreichen.

6.2 Teil 2

Das Oberflächenglykoprotein Ep-CAM wird von vielen soliden Tumoren exprimiert. Neben der Rolle als Adhäsionsmolekül, sind weitere Funktionen zur Zeit noch ungeklärt. Eine Beteiligung an Metastasierung und Entdifferenzierung ist zumindest umstritten. Der Grad der Expression von Ep-CAM korreliert allerdings mit einer hohen Proliferationsrate und mit der Minderexpression von Differenzierungsmarkern (10). Die geringe Expression auf gesundem Gewebe machen Ep-CAM zu einem interessanten Antigen für die Antikörper-basierte Krebstherapie.

Das 4D5-MOC-B Antikörperfragment ist 6 mal kleiner, als der ursprüngliche, monoklonale Antikörper MOC-31 und erreichte in Mäusen mit Ep-CAM positiven Xenotransplantaten 24 Stunden nach Applikation noch eine Tumor:Blut Ratio von 5.5 (16).

Das 4D5MOC-B-ETA Immunotoxin enstand durch Fusion dieses scFv Antikörpers mit dem Pseudomonas Exotoxin ohne Domäne 1. Da beide Bauteile einzelsträngige Proteine sind kann 4D5MOC-B-ETA von Bakterien als Gesamtprotein (~ 70 kDa) exprimiert werden. Die geringe Größe und die hohe Affinität gegenüber Ep-CAM bieten optimale Voraussetzung für die Behandlung solider Tumoren.

Die Konzentrationen 4D5MOC-B-ETA, welche im MTT-Assay eine Wachstumshemmung um 50% bewirkten, reichten von 0.02 pM bis 1 pM. Damit ist dieses Immunotoxin in vitro etwa 1000 mal wirksamer, als das MOC31- ETA Immunotoxin (15). SW2 Zellen exprimieren weniger Ep-CAM als HT-29 und SQ20B Zellen und waren trotzdem im MTT am empfindlichsten. Zum einen tragen die unterschiedlichen Generationszeiten der Zellinien zu diesem Ergebnis bei, zum anderen ist denkbar, daß die in Suspension wachsenden SW2 Zellen dem Immunotoxin eine größere zugängliche Zelloberfläche bieten, als adhärent wachsende HT-29 und SQ20B Zellen. Die Trypan Blau Exklusionen zeigen allerdings, daß SQ20B Zellen nach Behandlung mit 4D5MOC-B-ETA in größerem Ausmaß und insbesondere schneller sterben als SW2 und HT-29. Die hohe Zellspezifität und somit auch geringe Toxizität im Organismus, konnte mit nicht epithelialen, Ep-CAM negativen RL Zellen bestätigt werden. Proteinsyntheseaktivität und Wachstum dieser Lymphomzellen blieben sogar bei 10 nM 4D5MOC-B-ETA unbeeinflußt.

Da die in vivo Stabilität von ETA und 4D5MOC-B bereits bekannt war, konnte man davon ausgehen, daß dies auch auf unser 4D5MOC-B-ETA Immunotoxin zutrifft. Das Ep-CAM Oberflächenglykoprotein auf murinen Epithelzellen unterscheidet sich von dem menschlichen, sodass das von uns verwendete Antikörperfragment nicht an Maus-Ep-CAM bindet. Deshalb sind auch bei diesen in vivo Experimenten Aussagen über Toxizität des 4D5MOC-B-ETA nur beschränkt möglich. Das Tiermodell diente in diesem Fall vielmehr der Untersuchung, ob das Immunotoxin in ausreichender Menge das dichte Gewebe solider Tumoren durchdringt und so die Oberfläche vieler Krebszellen erreicht.

Das Wachstum von SW2 Xenotransplantaten in Nacktmäusen wurde dosisabhängig durch 4D5MOC-B-ETAgehemmt. Die systemische Applikation von 5 µg pro Maus/Tag bewirkte ein langsameres Wachstum und 10 µg führten bereits zum Schrumpfen der Tumoren. Die anti-tumoralen Effekte beider Dosierungen, und insbesondere der niedrigeren, waren bei den schneller wachsenden HT-29 Tumoren stärker ausgeprägt. Die Applikation von 5 mg 4D5MOC-B-ETA pro Maus hatte bereits eine Abnahme der durchschnittlichen Tumorvolumina zur Folge. Bei 14 von 16 Mäusen, die 10 µg 4D5MOC-B-ETA erhielten, schrumpften die HT-29 Tumoren über die Dauer der Behandlung. Allerdings wuchsen einige anschließend wieder in der gleichen Geschwindigkeit, wie die der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Tatsache, daß 18 Tage später ein weiterer Behandlungszyklus über 10 Tage wieder eine Wachstumshemmung um über 50 % bewirkte, macht eine Minderexpression von Ep-CAM auf den HT-29 Xenotransplantaten, nach 10-tägiger Applikation von 4D5MOC-B-ETA unwahrscheinlich. Das Immunotoxin erreichte in den über 200 mm3 großen Tumoren beim zweiten Behandlungszyklus auch offensichtlich noch genügend Zellen um das Wachstum des gesamten Tumors deutlich zu inhibieren.

In der Studie mit dem MOC31-ETA Immunotoxin (15) hemmten 10 µg Immunotoxin über 8 Tage (i.p.) das Wachstum von xenotransplantierten Tumorzellen fast vollständig, wenn diese ein Anfangsvolumen von nur 40 mm^3 hatten. Bei Tumoren mit 120 mm3 zum Zeitpunkt des ersten Behandlungstages wuchsen diese nur noch um etwa 25% langsamer. Man kann davon ausgehen, daß subkutan injizierte Tumorzellen sich erst eine Woche nach Transplantation und ab einer Größe von 75 mm^3 ausreichend etabliert haben und so den realistischen Voraussetzungen der Therapie solider Tumoren eher entsprechen. In einigen Studien mit Immunotoxinen wurde bereits am Tag der Tumorzelltransplantation oder einen Tag später mit der Behandlung begonnen. Unter solchen Bedingungen ist die anti-tumorale Wirkung nicht mit fortgeschrittenen malignen Tumoren vergleichbar. Es ist gut vorstellbar, daß durch einen längeren Behandlungszeitraum mit 4D5MOC-B-ETA die Heilung einiger Mäuse möglich gewesen wäre. Eine Therapie mit Immuno-Konjugaten über mehr als 10 Tage ist in der Regel allerdings nicht realistisch. Der Antikörper und der Toxinteil sind immunogene Stoffe, die nach mehrmaligen Applikationen zu schweren Nebenwirkungen führen können. Unerwünschte Wirkungen von Immunotoxinen in Patienten limitierten in der Vergangenheit fast immer die klinische Anwendbarkeit. Die körperfremde Proteinstruktur führt zur Bildung von Antikörpern und zur spezifischen Immunabwehr. In klinischen Studien mit monoklonalen Antikörpern, bildeten fast alle Patienten bereits nach wenigen Tagen Anti-Maus und/oder Anti-Toxin Antikörper. Wenn bereits vorher eine Immunisierung stattgefunden hat, führt das zu einer raschen Inaktivierung des Wirkstoffs durch das R.E.S. Aus diesem Grund ist das ETA dem DT Toxin bei systemischen Applikationen vorzuziehen, weil nur wenige Menschen zuvor mit dem ETA in Kontakt kamen. Eine noch häufigere Nebenwirkung von Immunotoxinen ist das “vascular leak syndrom” (VLS). Es beruht auf einer mehr unspezifsichen Toxizität. Hierbei kommt es zur Endothelzellapoptose, mit darauffolgender

Flüssigkeitsansammlung, Ödementstehung und Hypoalbuminämie. In einer klinischen Studie mit LMB-1 Immunotoxin starb ein Patient an den Folgen des VLS (74). LMB-1 besteht aus einem monoklonalen Antikörper, der über ein chemisches Linkerpeptid mit dem ETA verbunden ist. Aufgrund dieser Tatsache hat LMB-1 ein Molekulargewicht von etwa 180 kDa. Die Auslösung von VLS wird durch große Immunotoxine, die lange in der Blutbahn zirkulieren, begünstigt. Eine sinnvolle Behandlung solider Tumoren erfordert, im Gegensatz zu hämatologischen Erkrankungen, ohnehin ein geringes Molekulargewicht. Wegen ihrer geringen Größe sind rekombinante scFv-ETA

Fusionsproteine für die Behandlung solider Tumoren geeignet. Sie haben eine Plasmahalbwertzeit von etwa 30 Minuten und müssen deshalb öfters oder über eine Infusion langsam appliziert werden. Neben dem hohen Entwicklungsaufwand der für die Herstellung humanisierter scFv Immunotoxine erforderlich ist, erschweren hoher interstitieller Druck und tight junctions die ausreichende Diffusion ins Tumorgewebe und somit den Erfolg der Therapie von soliden Tumoren. Ein Antigenstatus ist durch die begrenzte Zugänglichkeit schwerer erhältlich, und Oberflächenmoleküle sind häufig heterogen verteilt. Die Wahl eines optimalen Tumorantigens und geeignete Applikationsverfahren sind wahrscheinlich entscheidend für eine klinisch erfolgreiche Therapie mit Immunotoxinen. Mit einer speziellen, intrathekalen Infusionstechnik gelang es partielle oder vollständige Remissionen von austherapierten Gehirntumoren in 9 von 15 Fällen zu erreichen (50). Ein aus Transferrin und DT bestehendes Konjugat heilte so zwei Patienten mit einem Glioblastoma multiforme und einem anaplastischem Astrozytom. Das in dieser Studie verwendete Tf-CRM107 Immunotoxin kann wegen dem Molekulargewicht von etwa 200 kDa nur in geringen Teilen die Blut Hirn Schranke überwinden und gesunde Neurone exprimieren den Transferrin-Rezeptor praktisch nicht. Für systemische Applikationen und anti-metastatisches Potential gegen solide Tumoren sind, neben Ep-CAM insbesondere das Her-2 und das Ley Antigen interessant. Nachfolger von LMB-1 sind unter anderem LMB-7 und LMB-8. Beide sind Ley-spezifische, rekombinate scFv bzw. dsFv Immunotoxine und werden zur Zeit an Patienten mit unterschiedlichen soliden Tumoren getestet (78). Das Toxin ist wie bei dem 4D5MOC-B-ETA ein KDEL-mutiertes Pseudomonas Exotoxin. Die katalytische Aktivität dieses mutierten Toxins macht nur wenige tausend Moleküle pro Zelle notwendig, um sie zu töten (75). Die Auswahl eines hochspezifischen Tumorantigens ist somit für den Erfolg der Therapie und das Ausmaß der unerwünschten Nebenwirkungen entscheidend.

Die Tatsache, daß das Ep-CAM Antigen auch von metastatischen Tumorzellen exprimiert wird, könnte möglicherweise die Überlebensrate von Patienten mit malignen Tumoren bei systemischer Gabe von 4D5MOC-B-ETA verbessern. Eine Studie mit intra-tumoraler Applikation an Patienten mit Pharynx- Zungen- und Larynxkarzinomen im UniversitätsSpital, Zürich befindet sich in der Vorbereitungsphase.

7 Referenzen

1. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 Protein family: arbiters of cell survival. Science 281, 1322 (1998).

2. Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. Nature 387, 773-776 (1997).

3. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. Blood 81, 151-157 (1993).

4. Dole MG, Jasty R., Cooper MJ, Thompson CB, Nunez G, Castle VP. Bcl-xL is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Research 55, 2576-2582 (1995).

5. Simoes-Wüst AP, Olie R., Gautschi O, Leech SH, Häner R, Hall J, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. bcl-xL antisense treament induces apoptosis in breast carcinoma cells.International Journal of Cancer 87, 582-590 (2000).

6. Zangemeister-Wittke U, Schenker. T, Luedke GH, Stahel RA. Synergistic cytotoxity of bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides and etoposide, doxorubicin and cisplatin on small-cell lung cancer cell lines. British Journal of Cancer 78, 1035-1042 (1998).

7. Nita ME, Ono-Nita S, Tsuno N, Tominaga O, Takenoue T, Sunami E, Kitayama J, Nakamura Y, Nagawa H. Bcl-xL Antisense sensitize human colon cancer cell line to 5-Fluorouracil. Japanese Journal of Cancer 91, 825-832 (2000).

8. Webb A, Cunningham D., Cotter C, Clarke PA, di Stefano F, Ross P, Corbo M, Dzienwanowska Z. Bcl-2 antisense therapy in patients with non-Hodkin lymphoma. The Lancet 349, 1137-1141 (1997).

9. Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, Hoermann M, Hollenstein U, Wolff K, Pehamberger H. Chemosensitisation of malignant melanoma by bcl-2 antisense therapy. The Lancet 356, 1728-1732 (2000).

10. Zangemeister-Wittke U, Leech S., Olie RA, Simoes-Wüst AP, Gautschi O, Luedke GH, Natt F, Häner R, Martin P, Hall J, Nalin C. M, Stahel RA, A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both bcl-2 and bcl-xL expression efficiently induces apoptosis in tumor cells. Clinical Cancer Research 6, 2547-2555 (2000).

11. Balzar M, Winter. M., de Boer CJ, Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (Ep-Cam). Journal of Molecular Medicine 77, 699-712 (1999).

12. Piythilake JP, Frost A., Weiss H, Manne U, Heimburger DC, Grizzle WE. The expression of Ep-Cam in squamous cell cancers of the lung. Human Pathology 31, 482-487 (2000).

13. Kosternik JG, Jonge MW, Smit EF, Piers DA, Kengen RA, Postmus PE, Shochat D, Groen HJ. Pharmakokinetics and scintigraphy of indium-111-DTPA-MOC-31 in small cell lung cancer. Journal of Nuclear Medicine 36, (1995).

14. Elias DJ, Kline LE., Robins BA, Johnson HC, Pekny K, Benz M, Robb JA, Walker LE, Kosty M, Dillmann RO. Monoclonal antibody KS1/4-methotrexate immuno conjugates studies in non-small cell carcinoma. American Journal of Respiratory Crit. Care Medicine 150, (1994).

15. Zimmermann S, Wels W, Froesch BA, Gerstmayer B, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. A novel immunotoxin recognisng the epithelial glycoprotein-2 has potent antitumoral activity on chemotherapy-resistant lung cancer. Cancer Immunology Immunotherapy 44, 1-9 (1997).

16. Willuda J, Honegger A., Waibel R, Schubiger PA, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U, Plückthun A. High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithehelial glykoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment. Cancer Research 59, 5758-5767 (1999).

17. Greenlee RT, Murray T., Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics 2000. Cancer Journal for Clinicians 50, 7-33 (2000).

18. Miki Y. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptebility gene BRCA1. Science 266 (1994).

19. Zhang GJ, Kimijima I., Tsuchiya A, Abe R. The role of Bcl-2 expression in breast carcinomas. Oncology Reports 5, 1211-1216 (1998).

20. Fernandez Y, Espana L., Manas S, Fabra A, Sierra A. Bcl-xL promotes metastasis of breast cancer by induction of cytokines resistance. Cell Death and Differentiation 7, 350-359 (2000).

21. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutics. Nature 407, 810-816 (2000).

22. Goldstein P. Controlling cell death. Science 175, 1081-1882 (1997).

23. Chinnaiyan AM, O'Rourke. K., Lane BR, Dixit VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: A molecular framework of cell death. Science 275, 1122-1126 (1997).

24. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1 a human protein homologous to C. elegans CED-4 participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell 90, 405-413 (1997).

25. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce C. Involvment of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. Science 228, 1440-1443 (1985).

26. Hockenberry D, Nunez. G., Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 348, 334-336 (1990).

27. Hu Y, Bcl-xL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1 dependent caspase 9 activation. PNAS 95, 4386-4391 (1998).

28. Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: Life-or-death switch. FEBS Letters 466 (2000).

29. Knudson CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. Nature Genetics 16, 358-363 (1997).

30. Tudor G, Aguilera A., Halverson DO, Laing ND, Sausville EA,. Susceptebility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-2 and Bcl-xL protein. Cell Death and Differentiation 7, 574-586 (2000).

31. Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, Fu CG, Takenoue T, Tsuruo T, Muto T. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. British Journal of Cancer 78, 986-992 (1998).

32. Kawakami K, Tsukuda M., Mizuno H, Nishimura G, Ishii A, Hamajima K. Alteration of the Bcl-2/Bax status of head and neck cancer cell lines by chemotherapeutic agents. Anticancer Research 19, 3927-3932 (1999).

33. Gulbins E, Jekle K. Ferlinz K., Grassme H, Lang F. Physiology of apoptosis. American Journal of Renal Physiology 279, 605-615 (2000).

34. Antonsson B, Inhibition of Bax chanell-forming activity by Bcl-2. Science 277, 370-372 (1997).

35. Shimizu S, Nita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. Nature 399, 483-487 (1999).

36. Schendel SL. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. PNAS 94, 5113-5118 (1997).

37. Minn AJ. Bcl-xL forms an ion channel in synthetic lipid membranes. Nature 385, 353-357 (1997).

38. Schlesinger PB. Comparisons of the ion channel characteristics of proapoptotic Bax and antiapoptotic Bcl-2. PNAS 94 (1997).

39. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrom c from mitochondria is blocked. Science 275, 1129-1135 (1997).

40. Haldar S, Croce CM. Taxol induces Bcl-2 phorphorylation and death of prostate cancer cells. Cancer Research 56, 1253-1255 (1996).

41. Blagosklonny M, Fojo T. Molecular effects of paclitaxel: myths and reality. International Journal of Cancer 83, 151-156 (1999).

42. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. Science 281, 1305 (1998).

43. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. Science 281, 1312 (1998).

44. Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. Science 278, 1966-1968 (1997).

45. Yuen AR, Sikic BI. Clinical studies of antisense therapy in cancer. Frontiers in Bioscience, 588-593 (2000).

46. Kuss B, Cotter F. Antisense-time to shoot the messenger. Annals of oncology 10, 495-503 (1999).

47. Reed JC. Promise and problems of Bcl-2 antisense therapy. Journal of the National Cancer Institute 89, 988-990 (1997).

48. Bennett CF, Chiang MY., Chan H, Ellen J, Shoemaker E, Mirabelli CK. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. Molecular Pharmacology 41, 1023-1033 (1992).

49. Sausville EA, Haedlee D, Stetler M, Jaffe ES, Solomon D, Figg WD, Kopp WC, Rager H, Steinberg SM, Gethie V, Schindler J, Uhr J, Wittes RE, Vitetta ES. Continuous infusion with the anti CD-22 Immunotoxin IgG-RFB4-SMPT-dgA in patients with b-cell lymphoma: A phase 1 study. Blood 85, 3457-3465 (1995).

50. Laske DW, Youle RJ., Oldfield YE. Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumor.Nature Medicine 3 *(12)* 1362-1368 (1997).

51. Fitzgerald D, Pastan I. Pseudomonas exotoxin and recombinant immunotoxins derived from it. Annals New York Academy of Sciences, 740-745.

52. Keppler-Hafkemeyer A, Brinkmann U, Pastan I. Role of caspases in Immunotoxin-induced apoptosis of cancer cells. Biochemistry 37, 16934-16942 (1998).

53. Mesmaeker A, Häner R., Martin P, Moser HE. Antisense Oligonucleotides. Accounts of Chemical Research 28, 366-374 (1995).

54. Miyake H, Chi K, Gleave ME. Antisense TRPM-2 Oligodeoxynucleotides chemosensitize human androgen-independent PC-3 cancer cells both in vivo and in vivo. Clinical Cancer Resarch 6, 1655-1663 (2000).

55. Qiang-Yuan L, Stein CA. Taxol and estramustine-induced modulation of human prostate cancer cell apoptosis via alterattion in bcl-xL and bak expression. Clinical Cancer Research, 2039-2046 (1997).

56. Poruchyuske MS, Wang EE, Rudin CM, Blgosklonny MV, Fojo T. Bcl-xL is phosphorylated following microtubule disruption Cancer Research 58, 3331-3338 (1998)

57. Chou T-C, Talalay P. Quantitative Analysis af dose-effect relationships: The combined effect of multiple drugs or enzyme inhibitors. Advances in Enzyme Regulation 22, 27-55 (1983).

58. Blagoskonny MV, Neckers. LM. Oligonucleotides protect cells from the cytotoxity of several anti-cancer drugs. Anti-Cancer Drugs 5, 437-442 (1994).

59. Gautschi O, Tschopp S., Leech SH, Olie RA, Simoes-Wüst AP, Baumann B, Hall J, Odermatt B, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. Potent anti-tumor activity of a Bcl-2/Bcl-xL bispecific antisense oligonucleotide against tumor cell lines of diverse histological origin. Journal of the National Cancer Institute 93, 463-471 (2000).

60. Tortora G, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, De Placido S, Bianco AE, Ciardiello F. Oral Antisense that targets protein kinase A cooperates with taxol and inhibits tumor growth, angiogenesis and growth factor production. Clinical Cancer Research 6, 2506-2512 (2000).

61. Yamori T, Sato S, Chikazawa H, Kadota T. Anti-tumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenografts. Japanese Journal of cancer research 88, 1205-1210 (1997).

62. Kubota T, Matsuzake S., Hoshiya Y, Watanabe M, Kitajima M, Asanuma F, Yamada Y, Koh JI. Antitumor activity of paclitaxel against human breast carcinoma xenografts serially transplanted into nude mice. Journal of surgical oncology 64, 115-121 (1997).

63. Gurnani M, Lipari P., Dell J, Shi B, Nielsen L. Adenovirus mediated p53 gene therapy has greater efficacy when combined with chemotherapy against human head and neck, ovarian, prostate and breast cancer. Cancer chemotherapeutic pharmacology 44, 143-151 (1999).

64. Ogasawara Y, Doihara H., Shiroma K, Kanaya Y, Shimizu N. Effects of experimental chemoendocrine therapy with a combination of a pure antiestrogen an 5-Fluorouracil on human breast cancer cells implanted in nude mice. Japanese Journal of Surgery 29, 149-156 (1999).

65. Keppler-Hafkemeyer A, Brinkmann U., Pastan I. Role of caspases in Immunotoxin apoptosis in cancer. Biochemistry 37, 16934-16942 (1998).

66. Simonian PL, Grillot DM, Nunez G. Bcl-2 and bcl-xL can differentially block chemotherapy-induced cell death. Blood 90, 1208-1216 (1997).

67. Teixeira C, R. J., Pratt MA. Estrogen promotes chemotheraeutic drug resistance by a mechanism involoving bcl-2 protooncogene expression in hman breast cancer cells. Cancer Research 55, 3902-3907 (1995).

68. Maurer CA, Friess H., Bühler S, Wahl B, Graber H, Zimmermann A, Büchler M. Apoptosis inhibiting factor Bcl-xL might be the crucial member of the Bcl-2 family gene family in colorectal cancer. Digestive Diseases and Sciences 43, 2641-2648 (1998).

69. Nieves-Neira W, Pytilake Y. Apoptotic response to camtothecin and 7-Hydroxystaurosporine (Ucn-01) in the human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: Multifactorial relationsship with topoisomerase 1, Protein Kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. International Journal of Cancer 82, 396-404 (1999)

70. Olopade OI, Adeyanju MO, Safa AR, Hagos F, Mick R, Thompson CB, Recant WM. Overexpression of Bcl-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastasis. Cancer Journal Sci. Am. 3, 230-237 (1997).

71. Pratt M. Estrogen withdrawal-induced human breast cancer tumor regression in nude mice is prevented by Bcl-2. FEBS Letters 440, 403-408 (1998).

72. Olie RA, Simoes-Wüst AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. A novel antisense oligonucletide targeting survivin expression induces apoptosis and sentizes lung cancer cells to chemotherapy. Cancer Research 60, 2805-2809 (2000).

73. Han Z, Chatterjee D., Early J, Pantazis P, Hendrickson EA, Wyche JH. Isolation and characerization of an apoptosis-resistant variant of human leukemia HL-60 cells that has switched expression from Bcl-2 to Bcl-xL. Cancer Research 56, 1621-1628 (1996).

74. Pai LH, Wittes. R., Setser A, Willingham C, Pastan I. Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: An antibody linked to pseudomonas extotoxin. Nature Medicine 2, 350-353 (1996).

75. Kreitman RJ, Pastan I. Accumulation of recombinant immunotoxin in a tumor in vivo: Fewer than 1000 molecules per cell are sufficient to complete tumor responses. Cancer Research 58, 968-975 (1998).

76. Fridman JS, Benedict MA, Maybaum J. bcl-xS-induced cell death in 3T3 cells does not require or induce caspase activation. Cancer Research 59, 5999-6004 (1999)

77. Hartmann G, Bidlingmaier M, Eigler A, Hacker U, Endres S. Antisense-Oligonukleotide: Nukleinsäuren zur gezielten Synthesehemmung krankheitsfördernder Proteine Deutsches Ärzteblatt 95, 1524-1530 (1998)

78. URL: www.clinicalTrials.gov Februar 2001
A service of the National Institute of Health (USA)

78. Haldar S, Chintapalli J, Croce CM. Taxol induces Bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells Cancer Research 53, 4978-4989 (1996)

79. Miayake H, Tolcher A, Gleave ME. Chemosensitization and delayed androgen-independent recurrence of prostate cancer cells with the use of antisense bcl-2 oligodeoxynucleotides Journal of the National cancer Institute 5, 34-41 (2000)

80. Wang H, Cai Q, Zeng X, Yu D, Agrawal S, Zhang R Antitumor activity of a mixed-backbone antisense oligonucleotide targeted to the RIα subunit of protein kinase A after oral administration PNAS 96, 13989-13994 (1999)

Mein Dank geht insbesondere an die Mitarbeiter des

Forschungslabor für Onkologie, des Dept. Innere Medizin am

Universitätsspital in Zürich für ihre herzliche Aufnahme,

Kollegialität und hervorragende Zusammenarbeit.

Dr. Robert Olie, Dr. Claudio Di Paolo, Dr. Oliver Gautschi, Jürg Sigrist, Dr. Annemarie Ziegler, Dr. Sally Donaldson, Dr. Andreas Trojan, Dr. Bernhard Odermatt, Dr. Jörg Hummerjohan, Dr. Sian Leech, Dr. Dominique Tschudi, Dr. Paula Simoes-Wüst, Brigitte Sigrist, Florian Baumann, Martina Müller, Thomas Schürpf, Bettina Baumann, Renzo Küttel, Birgit Hofer, Prof. Dr. Rolf Stahel und PD Dr. Uwe Zangemeister-Wittke

des weiteren bedanke ich mich bei Dr. Elena Elstner und Prof. Dr. Possinger für ihre Unterstützung

Lebenslauf von Maximilian Posch

geboren am 19.12.1975 in Freiburg im Breisgau

Adresse: Schröderstrasse 4
10115 Berlin
030/2819027
0177/3813310

E-mail: maxposch@hotmail.com

1982-1986 Einschulung in die Loretto Grundschule, Freiburg

1986-1993 Berthold Gymnasium, Freiburg
(Fremdsprachen: Latein, Englisch, Französisch)

1993-1995 Friedrich Gymnasium, Freiburg
(Leistungskurse: Englisch, Musik)

Juni 1995 Abitur (DN 2,5)

August 1995- Sept. 1996 ziviler Ersatzdienst im Rettungsdienst beim DRK Freiburg, als Rettungshelfer

September 1996 Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität (Charitè) in Berlin

August 1998 Ärztliche Vorprüfung (Physikum) in Berlin, (DN 2,3)

Frühjahr 1999 Famulatur in der Inneren Medizin am Diakonie-Krankenhaus, Freiburg

August 1999 Erster Teil der Ärztlichen Prüfung)
(1. Staatsexamen) in Berlin, (DN 2.0)

März 2000 - Februar 2001 Anstellung als Doktorand im Forschungslabor der Abteilung für Onkologie des Dept. für Innere Medizin am Universitätsspital Zürich, Schweiz unter Leitung von Dr. U. Zangemeister- Wittke und Prof. Rolf Stahel Durchführung von in vitro und in vivo Experimenten zur zielgerichteten Krebsbehandlung

März 2001-März 2002 Studentische Forschungsförderung für die Tätigkeit im Labor der Med. Klinik mit Schwerpunkt Onkolo-logie unter der Leitung von Frau Dr. Elstner

September 2001 Famulatur auf der psychiatrischen Station der Schlossparkklinik in Berlin

Februar 2002 Famulatur im Institut für Radiologische Diagnostik, Freiburg

18.3.2002 Verteidigung der Dissertation

Veröffentlichungen:

Oral Presentation:
A novel bcl-2/bcl-xL bispecific Antisense oligonucleotide that induces tumor cell Apoptosis and synergistically interacts with chemotherapy
Posch M, Gautschi O, Olie RA, Simoês-Wüst AP, Baumann B, Elstner E, Stahel RA and Zangemeister-Wittke
VORGETRAGEN IM NOVEMBER 2000 AUF DER 11TH EUROPEAN STUDENT CONFERENCE IN DER CHARITÉ, BERLIN

Poster:
Targeted therapy of solid tumors with anovel Ep-cam specific immunotoxin obtained by fusion of pseudomonas exotoxin A to the high affinity scFv 4D5MOC-B
Posch M, Olie RA, Müller M, Willuda J, Kubetzko S, Plückthun A, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U
PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH 42, 4151 MARCH 24-28 2001 NEW ORLEANS, LA, USA

Poster:
Effects of PPAR-gamma- and RAR-Ligands on glioblastoma cells
E.Elstner, M wächter, C. Zang, M.G. Posch, J. Reichardt, J. Fritz, A. Klügel, H. Liu, A. von Deimling, K.
Possinger and H.P. Koeffler

Activity of the Bcl-2/Bcl-xL bispecific antisense oligonucleotide 4625 on tumor growth in combination with chemotherapy
Posch M.G., Elstner E., Zangemeister-Wittke U.
BEIDE POSTER PRÄSENTIERT AUF DER GEM JAHRESTAGUNG DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR HÄMATOLOGIE UND ONKOLOGIE IM SEPTEMBER 2001 IN MANNHEIM

Oral Presentation:
Anti-tumor activity of the BCL-2/BCL-XL bispecific antisense oligonucleotide 4625 on tumor growth in vitro and on nude mice xenografts in combination with chemotherapy
Posch M.G., Zangemeister Wittke U., Elstner E.
INTERNATIONAL SOCIETY FOR CANCER GENE THERAPY. TENTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON GENE THERAPY OF CANCER, DECEMBER 13-15 2001, SAN DIEGO, CA, USA

Poster:
Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma ligands induce growth inhibition and apoptosis of human lymphocytic leukemia in vitro
Zang C., Kluegel A., Posch M., Waechter M., liu H., Doudina O., Becker M., Ruthardt M., Possinger K., Elstner E.
AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY. 34RD ANNUAL MEETING AND EXPOSITION, DECEMBER 7-11 2001, ORLANDO, FL, USA

Ich erkläre hiermit an eides statt, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und nur unter der Verwendung der angegeben Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit besteht auch in Teilen nicht aus Kopien anderer Arbeiten.

Maximilian Posch