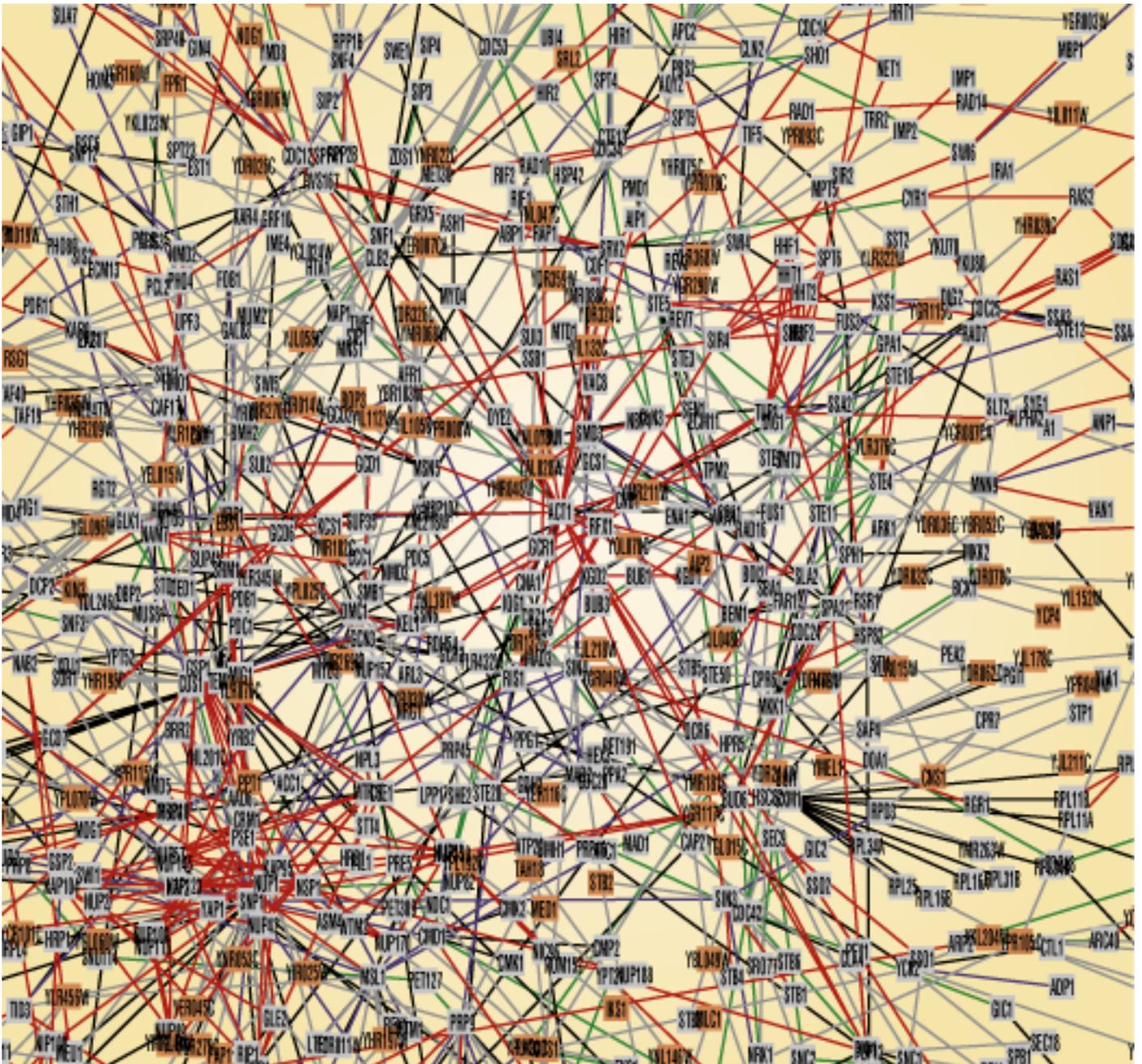




Forschungszentrum Karlsruhe  
in der Helmholtz-Gemeinschaft

# NACHRICHTEN



Jahrgang 34 • 1/2002

Biomedizin

---

**Im Inhaltsverzeichnis verwendete  
Abkürzungen:**

ITG                    Institut für Toxikologie  
                          und Genetik

**Herausgeber:**

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640 · D-76021 Karlsruhe  
Telefon-Nr. (07247) 82-0

**Redaktion:**

Dr. Klaus Körting

**Redaktionsbeirat:**

Prof. Dr. Johannes Blümer  
Dr. Wolfgang Breitung  
Prof. Dr. Eckhard Dinjus  
Dr. Jürgen Gspann  
Dr. Joachim Hoffmann  
Dr. Heiko Kleykamp  
Dr. Rolf Krieg  
Prof. Dr. Ulrich Schurath (Vorsitzender)  
Dr. Karl-Friedrich Weibezahn

**Grafik und Satz:**

Stolz Grafisches Atelier · Karlsruhe

**Layout:**

Tassilo Schnitzer

**Druck:**

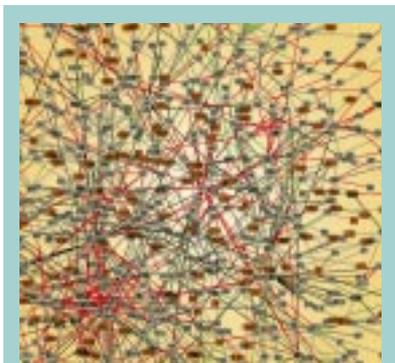
Wilhelm Stober GmbH · Eggenstein

Nachdruck mit Genehmigung des  
Forschungszentrums Karlsruhe GmbH  
unter Nennung der Gesellschaft und  
des Autors gestattet. Beleg erbeten.

Die NACHRICHTEN  
können kostenlos über die  
Hauptabteilung Bibliothek und Medien  
des Forschungszentrums bezogen  
werden.

Printed in the Federal Republic of  
Germany

Gedruckt auf chlorfrei gebleichtem  
Papier



Proteomik: Die Suche nach dem Ariadne-Faden im Labyrinth der zellulären Proteinwechselwirkungen. Das Titelbild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus dem Zentrum der Abbildung 2 im Beitrag von P. Uetz auf Seite 55.

---

# Inhalt / Contents

## ■ **Biomedizinische Forschung am Forschungszentrum Karlsruhe** 5 **Biomedical Research at Forschungszentrum Karlsruhe**

P. Herrlich, ITG

In this issue of Nachrichten we document some of the recent success obtained by the laboratories of the Institute of Toxicology and Genetics. Research is driven predominantly by young researchers who are given a tenure-track position, technical assistance and access to the core budget of the Institute. These researchers are selected on the basis of their major research interest, their past track record, their personality and with the help of outside advice. They develop their research topic by building a team of scientists through the acquisition of external funding. Currently eleven groups are established at the Institute and four scientists are in the process of starting their own independent research. The concept of the Institute and its current research success promises an exciting and productive future for biomedical research at Forschungszentrum Karlsruhe.

## ■ **Genetische Kontrolle der Asymmetrie bei Wirbeltieren** 11 **Genetic Control of the Asymmetry of Vertebrates**

M. Blum, A. Fischer, C. Karcher, A. Schweickert, ITG

The inner organs of the vertebrates assume an asymmetric position within the body cavity. Symmetry of the bilateral symmetrical embryo is broken by an unknown mechanism, which results in asymmetric gene activity on the left side. The gene *Pitx2* plays a pivotal role in this process. It gets activated on the left side very early during pattern formation and stays on during organ placement and differentiation. Misexpression of *Pitx2* in frog embryos results in an inversion of organ placement. The early processes in the generation of laterality differ between vertebrates. The mouse may not be a valid model for human development. We have therefore started to establish the rabbit as a second mammalian model system.

## ■ **Essentielle Rolle des Rel/NF- $\kappa$ B Familienmitgliedes RelB bei der Entwicklung lymphoider Organe: spezifische Aktivierung durch den Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptor** 22 **Essential Role of the Rel/NF- $\kappa$ B Family Member RelB in Lymphoid Organ Development: Specific Activation through the Lymphotoxin $\beta$ Receptor**

Z. B. Yilmaz, D. S. Weih, F. Weih, ITG

The adaptive immune system is characterized by the specific recognition of foreign antigens and requires highly specialized lymphoid organs to exert its function. Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors regulate immune and inflammatory responses and we found that mice with a targeted disruption of the family member RelB show impaired development of lymphoid organs. RelB-deficient mice have thymic atrophy, a disturbed spleen architecture and completely lack lymph nodes as well as Peyer's patches (gut-associated lymphoid follicles). Our finding that RelB can specifically be activated through the lymphotoxin  $\beta$  receptor indicates that this signal transduction pathway plays a crucial role in the development of lymphoid organs.

---

---

■ **Zwischen Genen, biologischer Komplexität und Krankheiten:  
Alternatives Spleißen von Botenmolekülen**

26

**In-between Genes, Organismal Complexity and Disease:  
Alternative Pre-mRNA Splicing**

H. König, ITG

Evolution of human organismal complexity from a relatively small number of genes – only approximately twice that of worm or fly – is mainly explained by mechanisms generating multiple proteins from a single gene, the most prevalent of which is alternative pre-mRNA splicing. Mis-regulation of alternative splicing can cause human diseases, including cancer. We intend to identify factors governing alternative splicing in physiological and pathological conditions and aim at exploring pathways by which environmental and cellular signals address such splice regulatory factors. This shall contribute to an understanding of how alternative splicing of medically relevant genes is regulated in response to physiological and disease-associated cues.

■ **Genetik der Tumormetastasen**

31

**The Genetics of Tumor Metastasis**

J. P. Sleeman, P. Baumann, N. Novac, W.-G. Thies, A. Nestl, O. von Stein, M. Hofmann, ITG

Metastasis is the lethal component of cancer. Tumor cells need many properties in order to metastasize. The properties a cell possesses are determined by the profile of genes it expresses. Thus, to understand metastasis, one needs to know which genes are responsible for providing tumor cells with metastatic properties. We therefore compared the gene expression profiles of metastatic and non-metastatic cell lines and thereby identified a panel of 268 genes specifically expressed in metastatic cells. Analysis of these genes has and will further illuminate cellular and molecular processes which lead to metastasis, in addition to providing possible avenues for therapeutic intervention.

■ **Stop or Go – CD44 als Regulator essentieller zellulärer Entscheidungen**

36

**Stop or Go – CD44 Regulates this Central Cellular Decision**

H. Ponta, V. Orian-Rousseau, L. Chen, H. Morrison, P. Herrlich, ITG

CD44v proteins are involved in the metastatic spreading of tumor cells. A functional understanding of their role in metastasis formation might be the discovery. Recently we have shown that they can act as coreceptors for growth factor receptors thereby regulating cell proliferation, migration and invasion. Interestingly, CD44 can also stop cells from proliferation upon contact inhibition. Key players in these processes are anchor-proteins and their antagonists.

---

---

■ **Warum scheitert die Antihormontherapie bei fortgeschrittenem Prostatakrebs?** 41  
**Why Is Advanced Prostate Cancer Non-Responsive to Antihormone Therapy?**

A. C. B. Cato, L. Shatkina, A. Nestl, ITG; S. Mink, G2M Cancer Drugs AG

Patients with advanced prostate cancer in most cases initially respond to the androgen ablation therapy which includes the use of anti-androgens. However, the tumours eventually become independent of androgens, rendering anti-androgen therapy ineffective. There are several mechanistic explanations that potentially account for the acquisition of androgen independence by prostate cancers. Here we discuss several of them. We believe that a better understanding of the mechanism or pathways leading to androgen independence will later pave the way to the discovery of effective treatment for advanced prostate cancer.

■ **Mutanten, Moleküle und Mikroarrays** 49  
**Dem Appetit auf der Spur ...**  
**Mutants, Molecules And Microarrays**  
**Tracking Hunger ...**

M. Bauer, J. Katzenberger, I. Zinke, C. Melcher, C. Schütz, A. Gähler, M. Ritter, M. Pankratz, ITG

The physiological and biochemical mechanisms which are driven upon feeding and nutrient uptake seem to be very simple, e.g. every animal shows a reaction to hunger. Therefore the biological principles behind these mechanisms are in lower and higher organisms very similar. Knowledge about these items could help us understand the development of diseases or malfunctions like diabetes or obesity. We use the fruitfly as a model organism to address different questions about gene regulation due to different nutrient conditions. As a technical method we use self-made microarrays for expression profiling. As an additional approach to understand signaling pathways in the organism, we are looking for specifically expressed neuro-components, which should give us an idea how, for example, nutrient supply and feeding behavior are linked.

■ **Proteomik: Proteine im (Hefe-)Kontext** 55  
**Proteomics: Proteines within (a Yeast-)Context**

P. Uetz, ITG

Tens of thousands of proteins are now known from genome sequencing projects but most researchers still focus on one or a few of them. However, the vast majority of proteins act together with many other proteins, either in stable complexes or via transient interactions. Studying multiple proteins and their interactions not only allows their placement in a biological context but also can increase experimental throughput dramatically. For example, we have automated the so-called two-hybrid system and other techniques to identify and characterize interactions among yeast proteins with a special focus on protein domains and complexes.

---

---

■ **Todessignale durch Umweltchemikalien**  
**Death Signals by Environmental Pollutants**

61

H.F. Krug, ITG

Life and death are directly involved in the normal development of all multicellular organisms. Defects in the regulation of the mechanism of programmed cell death (apoptosis) contribute to many diseases as well as in the toxic effects of xenobiotics. Here it is described which elements of the apoptotic machinery are possible targets of hydrocarbons and metal compounds, prominent environmental pollutants. Moreover, it is shown that cytotoxic rather than cytostatic therapies might be most effective in treatment of cancer.

■ **Molekulare Toxikologie der Valproinsäure:**  
**Von der Schädigung der Embryonalentwicklung zur Therapie von Krebs**  
**Molecular Toxicology of Valproic Acid:**  
**Disruption of Proper Embryonic Development and Therapy of Cancer**

69

M. Göttlicher, P. Zhu, U. Werling, J. Sleeman, ITG; O. Krämer, T. Heinzel, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt

Valproic acid (VPA) is an antiepileptic drug with one major side effect. Children from treated mothers show neural tube closure defects. The search for the mechanism behind the side effect revealed that VPA alters packing of the genetic material, DNA, with histone proteins into chromatin. VPA inhibits enzymes, so-called histone deacetylases, and thereby induces activity of critical genes during neural tube closure. This discovery met the worldwide quest for histone deacetylase inhibitors because they are high potential candidates for cancer therapy. The track record of safe medical use allowed to initiate trials of VPA as cancer drug. Future work has to identify genetic markers for those forms of cancer that respond to VPA.

■ **Krank durch Nanopartikel**  
**Health Effects by Nanoparticles**

75

S. Diabaté, K. Völkel, R. Wottrich, ITG

Fine and ultrafine particulate air pollution is in the focus of scientific investigations since it was identified by epidemiological studies to cause increased morbidity and mortality in the general population. Most relevant anthropogenic sources are combustion processes in industry and traffic. Different in vitro test systems and model particles were used to measure cytotoxic and inflammatory effects due to particles in target cells of the lung. The results support the hypothesis that particulate matter, in particular in the ultrafine size range, may contribute to the aggravation of lung diseases.

# Biomedizinische Forschung am Forschungszentrum Karlsruhe

P. Herrlich, ITG

## Einführung

Das technisch-physikalische Forschungszentrum Karlsruhe und seine kleine biologische Einheit, das Institut für Toxikologie und Genetik (ITG), hatten es nicht immer leicht miteinander. Mit seinem Gründungsauftrag als Institut für Strahlenbiologie hatte das heutige ITG noch deutlichen Bezug zur Hauptwidmung des früheren Kernforschungszentrums. Durch die fulminante Entwicklung der biologischen Wissenschaften nach 1980 und die gleichzeitige Diversifizierung des aus dem Kernforschungszentrum hervorgegangenen Forschungszentrums Karlsruhe nahm das ITG, wie auch andere Einrichtungen im Zentrum, eine eigenständige Entwicklung. In derselben Zeit nahm die Bedeutung der biologischen Wissenschaften für die Gesellschaft insgesamt so stark zu, dass vielerorts über neue Schwerpunkte der Forschung nachgedacht wird. In diesem Sinne verstehen wir die Präsentation dieses Hefts der „Nachrichten“. Es soll nicht nur einen Einblick in die Arbeit des ITG geben, sondern auch mit Arbeitsweise und Methoden der Biologen bekannt machen.

## Das derzeitige Themenkonzept des ITG

Krankheit entsteht manchmal durch einen eindeutigen und einfachen Umstand, zum Beispiel einen Skiunfall, eine akute Vergiftung oder eine ererbte Eigenschaft. Viel häufiger ist eine komplexe Kombination von Einflüssen dafür verantwortlich, ob eine Person gesund („im Gleichge-

wicht“) ist oder krank wird. Sogar der Beinbruch beim Skiunfall könnte komplexere Ursachen haben als oben angenommen. Langdauernde Behandlung mit Cortison könnte zu Osteoporose, Knochenbrüchigkeit, geführt haben. Eine erblich bedingte Schwäche von Gerüstbausteinen könnte den Beinbruch provoziert haben. Solche pathologische Entwicklungen nennt man multifaktoriell. Die große Mehrzahl aller menschlichen Krankheiten gehören dazu, von Diabetes mellitus (der Zuckerkrankheit) über Bluthochdruck, chronische Entzündungen und Krebs bis zu Alzheimer'scher Krankheit. Nicht alle ursächlichen Beiträge zu diesen Krankheiten sind bis heute bekannt. Die Überzeugung ist trotzdem breit akzeptiert, dass genetische, verhaltensbedingte und umweltbedingte Ursachen zusammenwirken.

Das ITG nahm sich bisher einen kleinen Ausschnitt (siehe Tabelle) aus der Vielfalt der komplexen Gesundheitsbedrohungen vor. Im Mittelpunkt standen neue Mechanismen toxischer Wirkungen und bestimmte Aspekte der Krebsentwicklung, insbesondere die Frage: „Welche Mechanismen lassen eine Krebszelle bösartig metastatisch werden?“. Erst jüngst kamen benachbarte Themen dazu. Das vorliegende Heft der „Nachrichten“ präsentiert die Interessen und Ergebnisse der letzten Jahre und die heutigen Schwerpunkte. Im Gebiet toxischer Wirkungen zielen wir auf Verständnis der Toxizität von Organometall-Verbindungen, von Dioxinen und Valproinsäure, von Strahlung und von Nanopartikeln.

Der zweite Fokus adressiert die Entwicklung metastatischer Tumoreigenschaften und ihrer physiologischen „Blueprints“. Tumorzellen mit metastatischen Eigenschaften können in andere Gewebe hineinwachsen, infiltrieren, von einem Ort im Körper zu einem anderen wandern, und – als metastatische Zellkolonie – die Bildung von Blut- und Lymphgefäßen zur eigenen Versorgung anregen. Normale Zellen im erwachsenen Organismus zeigen sehr selten solche Eigenschaften. Ausnahmen sind die weißen Blutzellen (Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen), die zumindest einen Teil der Fähigkeiten metastatischer Tumorzellen besitzen. Mehrere Versuche im ITG beschäftigen sich mit den molekularen Eigenschaften dieser normalen Zellen. Invasivität und Wanderfähigkeit sind allerdings viel häufiger im entwickelnden Embryo zu finden als im Erwachsenen. Deshalb arbeiten mehrere Arbeitsgruppen des ITG an Verständnis der Regulation der entsprechenden Prozesse im Embryo, zum Beispiel der Wanderung von Zellen zu asymmetrischen Positionen, um das Herz auf der linken Seite, die Leber auf der rechten Seite zu bilden. Die Arbeitsgruppen lernen voneinander – die Embryologen von den Tumorbiologen und umgekehrt – weil eben ähnliche Mechanismen für Invasivität und Wanderung im Tumor und im Embryo verantwortlich sind.

Zwar kann ein erheblicher Teil der Forschung an Zellen in Kulturschalen durchgeführt werden. Für manche Experimente zur Metastasierung von Tumoren oder

zur Wirkweise von toxischen Agentien im Organismus sind jedoch Tierversuche notwendig. Metastasierung kann in der Kulturschale nicht nachgestellt wer-

den und die Erfassung toxischer Wirkungen auf verschiedene Organe gelingt nur im Tier. Gerade multifaktorielle Krankheiten müssen in raffiniert konstruierten Tier-

modellen studiert werden. Jüngere Entwicklungen haben gezeigt, dass sich auch Taufiegen und Fische zur Einrichtung von Modellen für menschliche Krankheiten

## Entdeckungen des ITG

- Antirestriktion, ein Trick bakterieller Viren
- Identifizierung der DNA-Elemente, über welche Steroidhormonrezeptoren Gene auswählen
- Wirkungsweise der Hormone: Rap 46 als negativer Kontrollfaktor
- Die sog. Cross-talk-Funktion des Glucocorticoidrezeptors, über den Entzündung und Tumorwachstum gehemmt wird
- AP-1, erster erkannter Transkriptionsfaktor, der auf extrazelluläre Signale aktiv wird – seine Rolle bei Krebs
- Aktivierung von Genen durch Bestrahlung mit UV, Röntgen, Gamma- oder Alpha-Mechanismus der Strahlenantwort
- Faktoren gewebespezifischer Genregulation in der Leber
- Mechanismus der Lymphombildung durch einen intrazellulären Parasiten, *Theileria parva*
- Insektenstadien-spezifische Genexpression von Trypanosomen
- Mechanismen komplexer Krankheiten: Glomerulosklerosis, Spastische Lähmungen, Kennedy's Krankheit, atopische Dermatitis, Reifenstein-Syndrom
- Mechanismen komplexer Krankheiten: Isolierung eines Gens mit kausaler Rolle in metastatischen Tumorzellen
- Neue Metastasengene
- Mechanismen komplexer Krankheiten: CD44 in Immunsystem und Hämoipoese
- Embryologie und Krebs: Molekularer Mechanismus der epithelial-mesenchymalen Interaktion im Embryo; Links-Rechts-Asymmetrie; Wilms Tumor-Gen steuert die Milzentwicklung; Regulation der Nahrungsaufnahme
- Mechanismen komplexer Krankheiten: Wirkungsweise des Gens Neurofibromatose Typ 2
- Mechanismus der Dioxintoxizität, Zelltod durch organische Metallverbindungen, Embryo-Toxizität von Valproat
- Regulation des alternativen Spleißens durch Onkogene

(Literaturhinweise beim Autor erhältlich)

hervorragend eignen. Außerdem sind „Genomik“ und „Proteomik“ ins ITG eingezogen. Jüngere thematische Fragestellungen benötigen die Anwendung neuer Robotik für sogenannte genom-weite Array-Hybridisierungen und Protein-Protein-Interaktions-Screens.

Neben den Ergebnissen, die hier im Heft geschildert werden, ist eine Reihe wichtiger Entdeckungen mit dem ITG verbunden. Darunter ist die Entdeckung eines zentral bedeutsamen regulatorischen Proteins, des Transkriptionsfaktors AP-1, der in Menge und Aktivität von außerhalb der Zelle, beispielsweise durch UV-Strahlung, beeinflusst wird. Seine diversen Rollen im Organismus sind immer noch Thema am ITG. Ein neuer, völlig unerwarteter Mechanismus der Wirkung von Steroidhormonen wurde erstmals für Glucocorticoide am ITG entdeckt. Das ITG dachte zur Zeit der Entdeckung nicht an Patentschutz. Heute ist gerade dieser Mechanismus Anlass eines heftigen Patentstreits zwischen dem kalifornischen Salk-Institut und europäischen Firmen. Die Details dieses für die Regulation des Immunsystems wichtigen Hormonregulationsmechanismus werden weiter im ITG erforscht, um z.B. die schädlichen Nebenwirkungen einer Langzeit-Cortison-Therapie (Cortison ist das wichtigste Glucocorticoide zur Therapie von Entzündungen) von den gewünschten Effekten trennen zu können.

Mit der Isolierung eines Gens, welches Metastasierung von Tumoren maßgeblich beeinflusst, ist eine neue Forschungslinie eröffnet worden, die unerwartete Wei-

terungen nach sich zog (siehe Beitrag Ponta). Eine Chronik wichtiger Entdeckungen des ITG ist in der Tabelle zusammengestellt.

Gibt es auch Fehlentwicklungen, nicht erreichte Ziele am ITG? Natürlich! Dafür wollen wir keine Tabelle zusammenstellen, aber ein Beispiel benennen: Eine mehrjährige Anstrengung hatte die Isolierung zweier Gene zum Ziel, deren Proteinprodukte die DNA-Schäden nach UV- bzw. nach Gamma-Bestrahlung reparieren. Die Anstrengungen waren nicht von Erfolg gekrönt. Interessanterweise hatte eine japanische Arbeitsgruppe einen längeren Atem. Mit derselben Methodik isolierte sie das sog. XPA-Gen. Andere Reparaturgene wurden besonders in Holland und Großbritannien gefunden und charakterisiert. Weniger gravierend, aber auch bedauerlich: Resultate wurden am ITG erzielt und publiziert, aber aus verschiedenen Gründen nicht rigoros genug weiterverfolgt, so dass andere Laboratorien den „Credit“ vereinnahmen konnten.

### Organisationsstruktur und wissenschaftlicher Erfolg

Interessant ist es, zu analysieren, wo und wie besonders erfolgreiche biologische Wissenschaft gemacht wird. Weltweit entsteht der Erfolg vor allem in kleinen Einheiten. Große erfolgreiche Gruppen mit mehr als 30 Wissenschaftlern sind die seltene Ausnahme. Vielmehr kommt es auf Interaktionen von vielen kleinen Einheiten am gleichen Forschungsplatz an. Die

Zusammensetzung des Forschungsplatzes ist dabei keineswegs auf Dauer angelegt, sondern ständigem Wechsel unterworfen. Diese Philosophie prägt den Erfolg von Einrichtungen wie Massachusetts Institute of Technology (MIT), Cambridge, USA, Europäisches Molekular-Biologie Laboratorium (EMBL), Heidelberg, Zentrum für Molekulare Biologie (ZMBH) der Universität Heidelberg und andere. Harvey Lodish, als Mitglied des ZMBH Beirats, bringt es – wenn auch mit Übertreibung – auf den Punkt: „Wenn wir am MIT erkannt haben, „hier ist ein Forefront Gebiet“, besetzen wir 15 neue Professorenstellen gleichzeitig für dieses neue Feld“. Das Statement sagt trotz der Übertreibung etwas Wesentliches aus: Der Impetus für eine neue Entwicklung wird durch mehrere Arbeitsgruppen im gleichen Gebäude erzeugt.

Wie kann ein biomedizinisches Institut in der „Isolierung“ auch nur annähernd diese Vorbedingungen für Erfolg erfüllen? Das heutige ITG versuchte, sich diese Bedingungen zu schaffen, indem es mit den limitierten Möglichkeiten des Stellenplans so viele kleine selbständige Einheiten wie möglich kreierte. Beginnend 1980 mit Nancy Hynes und Bernd Groner, wurde ein ständiger Stab von unabhängigen Gruppen aufrecht erhalten (derzeit elf etablierte Gruppen; vier unabhängige Wissenschaftler, z.B. Habilitanden, bereiten weitere Gruppen vor), welcher immer wieder durch Anwerben unabhängiger Geister aufgefüllt wurde. Der Erfolg zeigte sich bald in Wegrufen der

Gruppenleiter wie auch in Publikationen. Das ITG kann sich nicht mit den oben genannten Einrichtungen messen, hat aber im Bereich des Möglichen einen so guten Stand erreicht, dass es das Konzept aggressiv als Modell auch für andere HGF-Einrichtungen verteidigen kann.

### Enge politische Vorgaben konterkarieren das Erreichen der Forschungsziele

Die HGF-Einrichtungen stehen in einem besonderen Maße zwischen politischen Wünschen und Forschungswirklichkeit. Sollen sie doch, anders als die Universitäten, große und teure Ziele in die Praxis umsetzen. Inzwischen haben sich die Unterschiede verwischt, da Universitäten vermehrt das Ziel wirtschaftlichen Nutzens vorgehalten wird, da Forschungsverbände und Schwerpunktprogramme politisch gefördert werden, national wie auch auf dem Niveau der Europäischen Forschungspolitik. Ob die von Vorgaben getriebene Forschung tatsächlich den gewünschten Erfolg bringt, wird nicht rigoros nachgefragt. Das Nachfragen ist, zugegebenermaßen, nicht trivial, da lange Perioden abgewartet und in die Details geguckt werden müsste.

Biomedizinische, ja jede biologische Forschung leidet besonders am Auseinanderklaffen zwischen politischen Vorgaben und Realisierbarkeit. Es hat sich erwiesen, dass durch großzügige finanzielle Förderung oder politischen Druck erzwungene enge Zielvorgaben den Erfolg in Frage stellen und

sogar verhindern. Ohne augenblicklich tätigen Wissenschaftspolitikern auf die Füße treten zu müssen, kennen aktive Wissenschaftler ausreichend viele Beispiele aus der Vergangenheit, um die Frage zu stellen, warum Politiker aus diesen nicht lernen. Die Absicht von US-Präsident Richard Nixon und zwei seiner Senatoren, Krebs innerhalb weniger Jahre um 25 % zu reduzieren, ja ganz auszurotten, wenn nur genügend Geld in die Krebsforschung gesteckt würde, diene hier als Musterbeispiel. Das Geld floss. Die echten Fortschritte jedoch kamen nicht aus den geförderten Institutionen, sondern aus Arbeitsgruppen, die nicht unter Krebsforschung firmierten. Die Onkogene und Tumorsuppressorgene, veränderte Regulation durch chromosomale Translokationen, genomische Instabilität – alles Entdeckungen aus „Ecken“, die man nicht vorhersehen konnte.

Da dies immer so sein wird, dass originelle Entdeckungen nicht vorausplanbar sind, gibt es nur eine politische Lösung: Nicht Programme müssen ausgeschrieben werden, sondern in großer Breite muss in „Köpfe“, in die besten Wissenschaftler, investiert werden. Aus deren Themen ergeben sich erforderliche Methoden, die orientiert an den Problemstellungen bereitgestellt werden. Umgekehrt wird kein Schuh daraus. In Programme passen viele, noch mehr in der Forschung Tätige behaupten, einem Programm zu folgen. Die Forderung der „Passgenauigkeit“ verführt zu weniger genauem Hinsehen, was die Qualität und

Originalität betrifft. Gerade wir Angehörige einer HGF-Einrichtung wissen, dass Qualitätsverbesserungen dringend notwendig sind. Was diesem Ziel dient, werden wir immer begrüßen und kräftig unterstützen. Große Programme sind es nicht. Fällt uns zu Richard Nixon's Vorgehen und Versagen Ähnliches aus jüngeren europäischen, gar nationalen Vorkommnissen ein?

Müssen aber nicht auch Baustellen erfolgreich errichtet werden? Natürlich ja, wenn die Vorbedingungen für ihre Errichtung gegeben sind. Die Vision, das menschliche Genom zu sequenzieren, lässt sich mit einer Baustelle vergleichen. Es gibt solche Gelegenheiten. Sie sind eher selten und sie werden nur erfolgreich sein, wenn die Problemstellung im Vordergrund steht. Das Mithalten der originellen Ideen ist der limitierende Parameter.

Im berechtigten Wunsch, die wirtschaftliche Entwicklung eines Landes langfristig zu sichern, wird heute auf „Anwendungsorientierung“, auf „Vernetzung“, auf Baustellenorganisation gedrängt. Das Führungspersonal aus der Wirtschaft, das diese Forderungen formuliert, muss gefragt werden, warum sie dieses „Erfolgsrezept“ in ihren eigenen oft sehr großen Forschungsabteilungen nicht verwirklichen konnten. Aus der oben aufgeführten Argumentationslinie ergibt sich: Originelle Grundlagenforschung ist der einzige Weg zu grundlegendem wirtschaftlichem Erfolg. Die bescheidenen Beispiele aus dem ITG illustrieren dies (siehe Beiträge Göttlicher und Ponta).

## Biomedizin als Standbein für die Zukunft des Forschungszentrums

Kann sich ein technologisch ausgerichtetes Zentrum leisten, die Entwicklung im Bereich der biomedizinischen Forschung außen vor zu lassen? Diese Frage darf man natürlich nicht an die Wissenschaftler in der Biologie richten. Und wenn doch, fällt die Antwort erwartungsgemäß aus. Die

Frage muss sich aber das Zentrum im Ganzen stellen.

Als Eckpfeiler der Diskussion über die Zukunft muss dienen: Die Genomprojekte eröffnen eine Fülle von Möglichkeiten zukünftiger Forschung. Aus den Genomdaten originelle neue Ansätze abzuleiten, wird viele Einrichtungen beschäftigen. Insbesondere in der Gesundheitsforschung ist der Markt offen für Ideen, wie die großen multifaktoriellen Krank-

heiten verstanden werden können. Das Zusammenwirken externer Angriffe, wie zum Beispiel Strahlung, mit der individuellen Suszeptibilität verlangt organismische Studien mit allen verfügbaren gentechnischen Tricks. Nicht nur gilt es, zu verstehen, wie in der einzelnen Zelle ein Agens die Kommunikationsstrukturen zwischen Zelloberfläche und Zellkern beeinflusst (Abb. 1). Die Reaktion der einzelnen Zelle

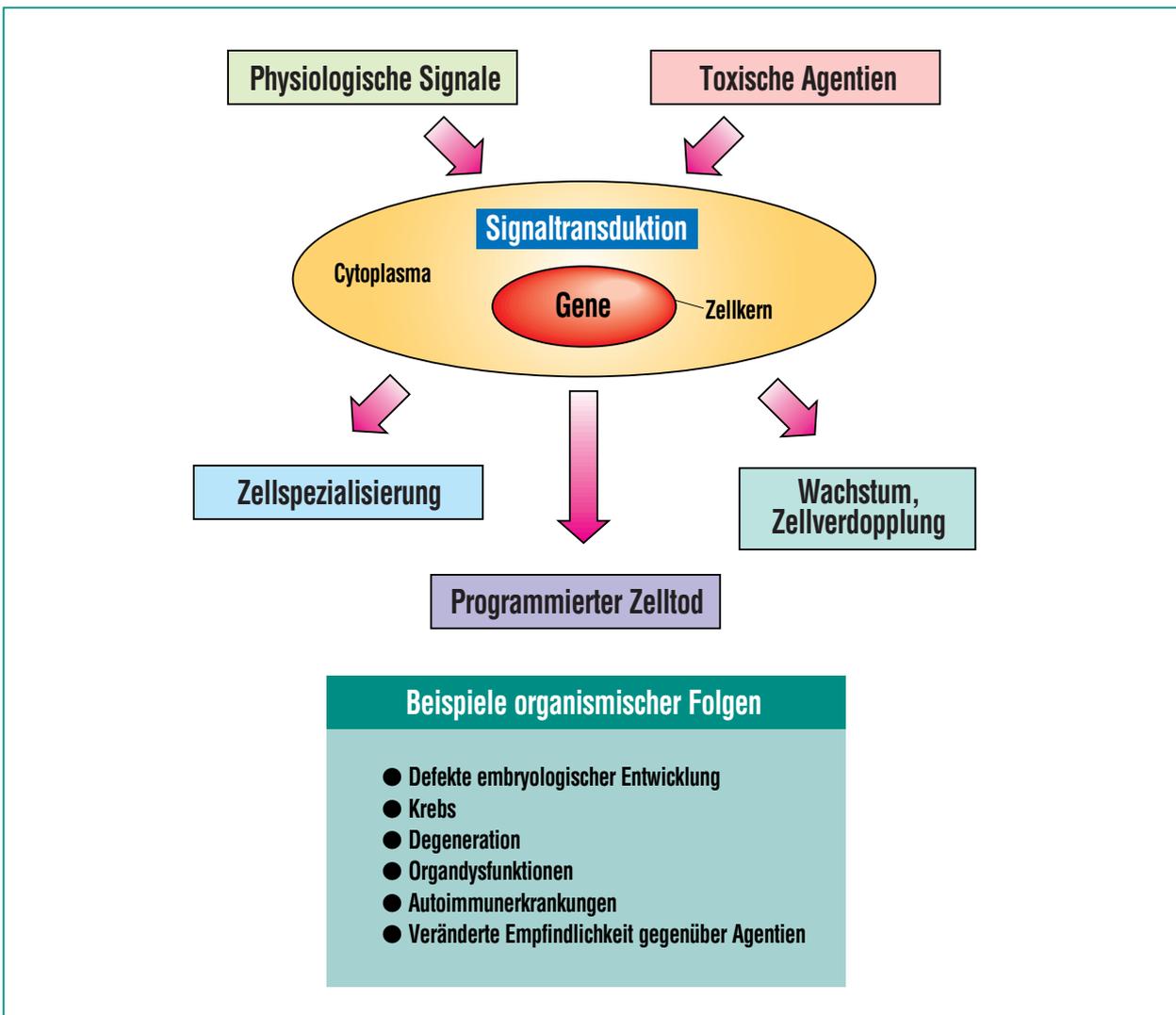


Abb. 1: Signale von außerhalb der Zelle werden an den Zellkern übermittelt und lösen dort verschiedenartige Reaktionen aus.

---

---

wirkt sich in vielfältiger Weise im Organismus aus.

Wie könnte das biomedizinische Standbein für die Zukunft geschaffen und stabilisiert werden? Vorrangig ist, neue „Köpfe“ mit Ideen zu rekrutieren und mit diesen ein Thema der Gesundheitsforschung zu besetzen, z.B. im Bereich Degeneration/Regeneration oder Toxikologie, wie dies in der Strukturkommission diskutiert wurde. Es ist vorhersehbar, dass eine gestärkte Biologie vermehrt

Tiermodelle für die gewählten Krankheitssituationen kreieren wird, aber auch die Struktur von Makromolekülen, die Ziele toxischer Angriffe oder Ursachen pathologischer Reaktionen sind, erforschen will. Der technologische Hintergrund des Forschungszentrums mit der Synchrotronstrahlungsquelle ANKA, dem geplanten Aufbau eines NMR-Labors und der Informatik wird dadurch die benötigten Kunden erhalten. So oder so ähnlich wünschen sich die in diesem Heft vertrete-

nen Wissenschaftler die Zukunft. Sie begrüßen die Anstrengungen des Vorstands, der Berater und Kommissionsmitglieder um die neue Schwerpunktbildung und sie sind sich sicher, dass diese dem Forschungszentrum Karlsruhe im Rahmen der „Programmorientierten Förderung“ einen Platz erobern wird.

# Genetische Kontrolle der Asymmetrie bei Wirbeltieren

M. Blum, A. Fischer, C. Karcher, A. Schweickert, ITG

*manche leute glauben,  
daß man lechts und rinks  
nicht velwechsern könnte.  
werch ein illtum!*

*ernst jandl*

## Einleitung

Symmetrie als ein Grundprinzip der ästhetischen Perfektion in Kunst und Architektur ist seit der Steinzeit überliefert. Die erstaunliche bilaterale Symmetrie des menschlichen Körpers hat Leonardo Da Vinci in seinen „Proportionen des menschlichen Körpers“ aus dem Jahr 1492, das heute die Chipkarten der Krankenkassen ziert, exemplarisch dargestellt. Allerdings

zeigt bereits ein einfaches Photoshop-Experiment, dass die linke Körperhälfte tatsächlich keine perfekte Spiegelung der rechten Seite darstellt und umgekehrt. Abb. 1a zeigt die normale Ansicht des Homo sapiens geneticus, wie er im (Kern-)Forschungszentrum seit 1978 angetroffen wird. Eine pure Spiegelung (Inversion) erzeugt keine besonderen Auffälligkeiten (Abb. 1b). Konstruieren wir hingegen Bilder, die aus zwei linken (Abb 1c) oder zwei rechten (Abb 1d) Hälften bestehen (Isomerismen), so offenbaren sich Asymmetrien, die charakteristisch für den menschlichen Gesichtsausdruck sind.

Deutlicher asymmetrisch ist die Lage der Organe des Brust- und Bauchraums ausgeprägt. Das Herz liegt links, und der linke und rechte Lungenflügel unterscheiden sich in der Zahl der Loben.

Magen und Milz sind ebenfalls links angeordnet, die Leber dagegen liegt rechts, und Dünn- und Dickdarm winden sich asymmetrisch, so dass der Wurmfortsatz (Zäkum, „Blinddarm“) auf der rechten Seite liegt. Diese Anordnung wird als Situs solitus bezeichnet. In seltenen Fällen kommt es zu einer vollständigen Umkehr dieser Anordnung, wie in dem in Abb. 2 dargestellten Präparat. Ein solcher Situs inversus totalis beeinträchtigt die Gesundheit nicht. Zu schweren Entwicklungsstörungen kommt es jedoch, wenn der Situs nicht eindeutig definiert ist (Heterotaxien), ganz besonders bei spiegelbildlichen Verdopplungen nur einer Körperseite (Isomerismen).

Eine genetische Ursache von Lateralitätsdefekten beim Menschen wurde in zahlreichen Familienstudien nachgewiesen. Erb-

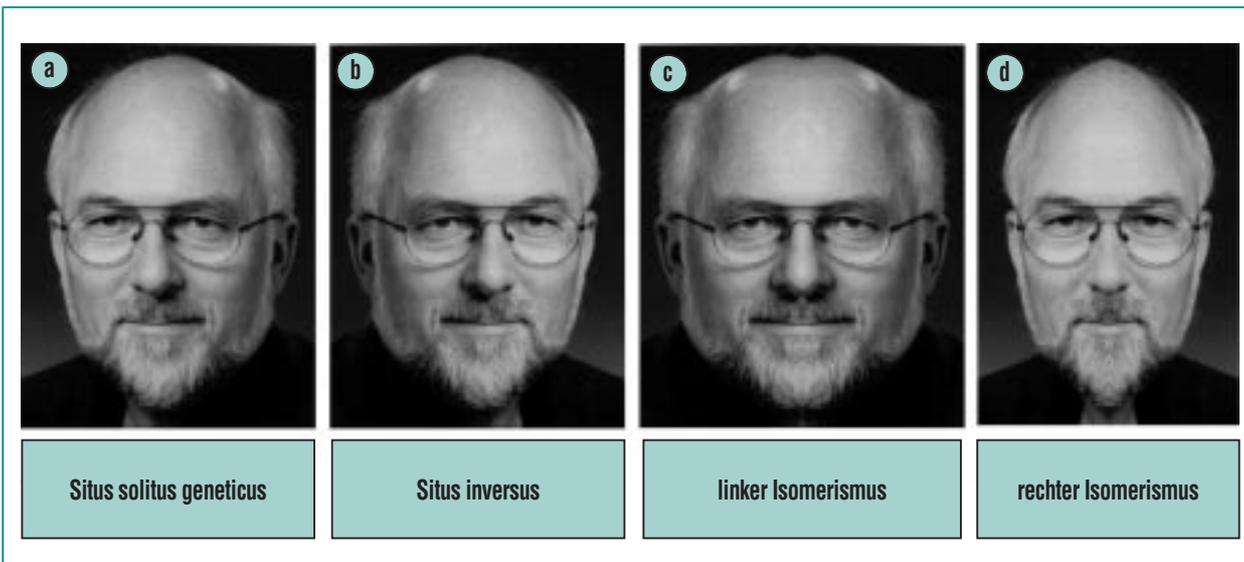


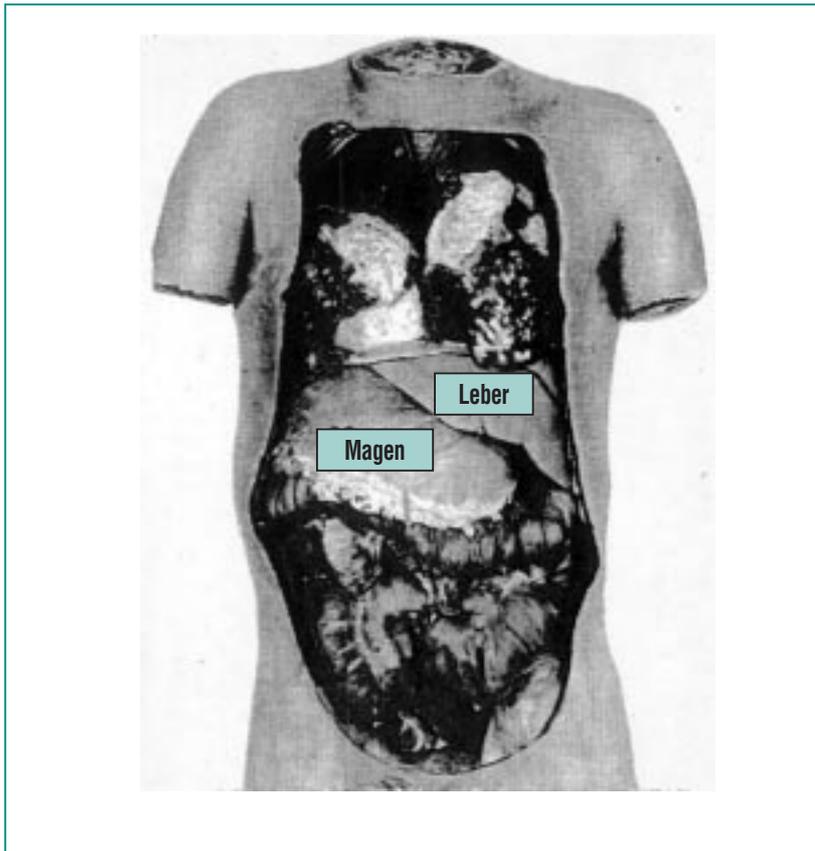
Abb. 1: Asymmetrische Gesichtsformen am Beispiel des „homo geneticus“ Peter Herrlich.

(a) Normale Ansicht (Situs solitus).

(b) Inverse Ansicht (Situs inversus).

(c) Spiegelbildliche Verdoppelung der linken Hälfte (linker Isomerismus).

(d) Spiegelbildliche Verdoppelung der rechten Hälfte (rechter Isomerismus).



**Abb. 2: Situs inversus totalis beim Menschen. Etwa jeder 5 000 bis 15 000 Mensch weist eine vollständige Inversion der Lagebeziehung der inneren Organe auf (Situs inversus totalis) wie das hier dargestellte Präparat aus dem anatomischen Museum in Basel. So liegt die Leber hier links und der Magen rechts. Daraus resultieren keinerlei Gesundheitsschäden.**

gänge können rezessiv oder dominant, autosomal oder geschlechtsgebunden sein. Auch Halpainsuffizienzen wurden berichtet. Bei der Maus gibt es neben einer Reihe von spontanen Mutationen inzwischen immer mehr sog. Knockout-Mäuse mit Störungen der Links-Rechts-Entwicklung (Übersichtsartikel der jüngeren Zeit: [1, 2]). Die Aufklärung der zugrunde liegenden molekulargenetischen Wirkungsmechanismen verspricht neue Erkenntnisse nicht nur für

die Grundlagenforschung. Angeborene Missbildungen, z. B. des Herzen beim Menschen, lassen sich zu einem nicht unerheblichen Teil auf Fehlbildungen bei der Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie zurückführen. Und schließlich hat sich herausgestellt, dass die meisten Gene, die für korrekte Entstehung von Lateralität verantwortlich sind, bei Fehlsteuerung nicht nur Links-Rechts-Defekte, sondern eine Vielzahl von Krankheiten verursachen können, nicht zuletzt Krebs.

### Klassische Experimente

Die experimentelle Analyse von Lateralität reicht ins 19. Jahrhundert zurück [3]. Darestes beschrieb 1877, dass eine unilaterale Erwärmung des Hühnereis auf der linken Seite zu Situsstörungen führte [3]. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts waren es Hans Spemann und seine Mitarbeiter, die durch definierte Manipulationen den Organsitus in Amphibien voraussagbar verändern konnten [3]. Umdrehen des mittleren Teils der Neuralplatte einer frühen Unken-Kaulquappe, deren Erfolg in der invertierten Form der Rückenflosse sichtbar war, führte zu einer Umkehr des Organsitus (Abb. 3). Interessanterweise blieb die Herzanlage durch die Operation unberührt. Spemanns Mitarbeiter Meyer schloss daraus, dass ein Mediator die im gedrehten Gewebestück enthaltene Information in die Organe transportieren muss. Ablationsexperimente von Hilde Wilhelmi [3] zeigten schließlich, daß eine entscheidende Determinante für die Entstehung von Lateralität auf der linken Seite des Embryos lokalisiert ist. Wenn sie einen kleinen Bereich auf der linken Seite eines frühen Molchembryos entfernte, führte das zu Situsinversion. Hilde Wilhelmi schloss aus ihren Experimenten, dass „die linke Seite des Keims etwas hat was die rechte Seite nicht hat“. Was dieses „etwas“ sein könnte beginnt sich allerdings erst seit Mitte der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts abzuzeichnen.

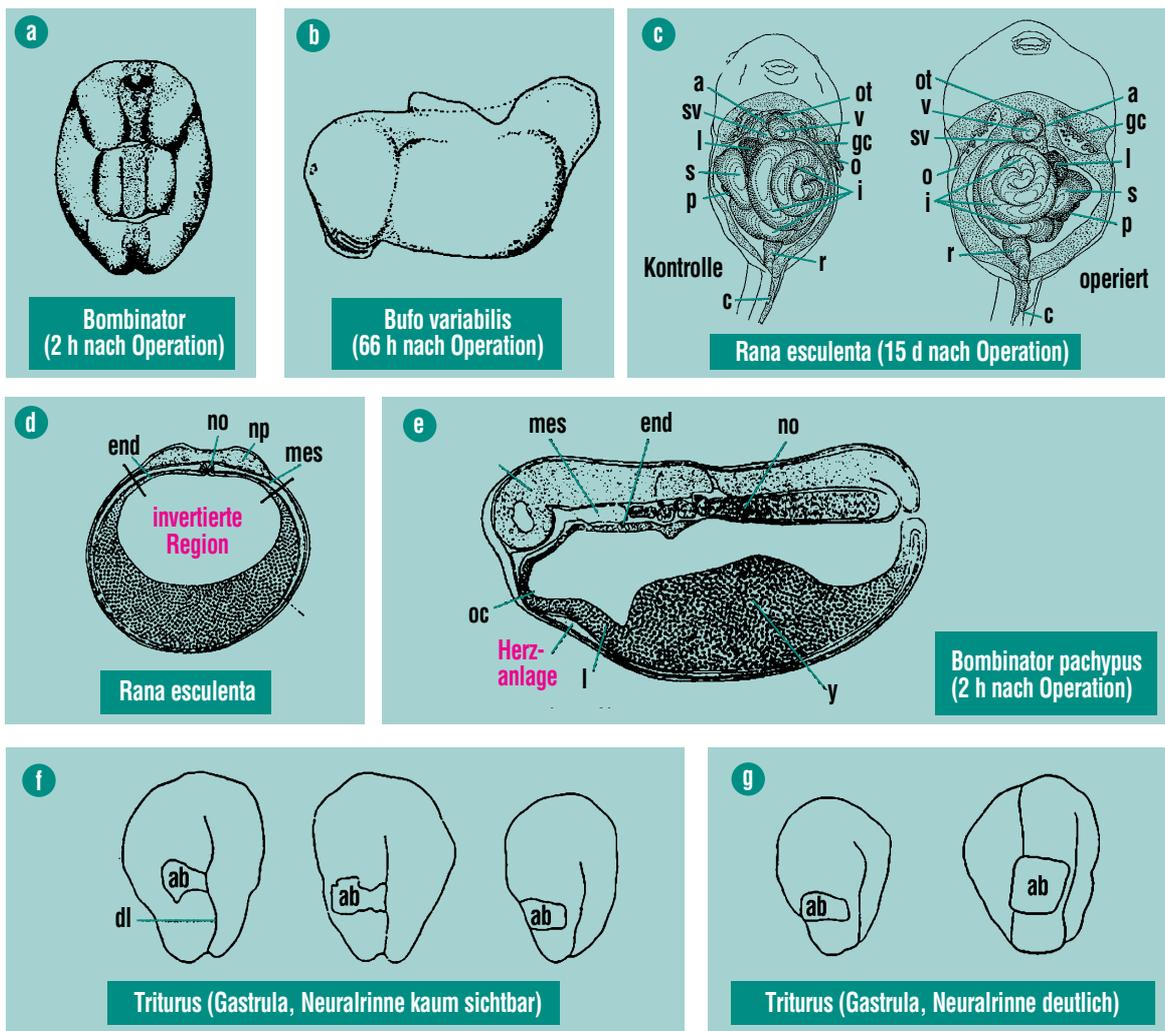


Abb. 3: Experimente zur Links-Rechts-Asymmetrie aus der Schule des Nobelpreisträgers Hans Spemann.

(a-e) Umdrehen des mittleren Teils der Neuralplatte in Amphibien führt zu Situs-Inversion.

(a) Früher Unkenembryo, Ansicht von oben (dorsal). Auf der Rückenseite haben sich die Neuralwülste gebildet, die sich wenig später zum Neuralrohr schließen, aus dem das gesamte Nervensystem entsteht. (b) Wird der mittlere Teil dieser Region umgedreht, führt dies in der Kaulquappe zunächst zu einer inversen Orientierung der Rückenflosse. (c) Einige Tage später zeigt sich die vollständige Umkehr der Lagebeziehung der Organe. (d) Ein Querschnitt durch einen frühen Froschembryo zeigt, dass bei diesem Experiment nur ein kleines Fragment auf der Rückenseite betroffen ist. (e) Insbesondere blieb die künftige Herzanlage, die sich auf der künftigen Bauchseite befindet, unangetastet. Spemann schloss daraus, dass ein Mediator die Positionsinformation aus dem invertierten Fragment in die entstehenden Organe transportieren muss.

(f, g) Entfernen eines kleinen Gewebestücks auf der linken Seite der Neuralplatte eines Molchs (ab) führt in einem Stadium, in dem die Neuralrinne deutlich sichtbar ist, zu Situsinversion.

## Die Entstehung von Asymmetrie während der Embryogenese

Während der Embryogenese kann man die in Abb. 4 skizzierten drei Phasen unterscheiden. Auf eine erste Phase des Symmetriebruchs folgt eine zweite Phase, die durch asymmetrische Genexpression gekennzeichnet ist. In der dritten Phase kommt es schließlich zu Asymmetrien der sich entwickelnden Organe. Die Arbeiten in unserem Labor beschäftigten sich in den vergangenen 5 Jahren mit den Schnittstellen zwischen diesen Phasen, dem Transfer des durch den Symmetriebruch erzeugten Signals auf die linke Seite (Phase I/II), und dem Übergang zwischen asymmetrischer Genexpression und Organaussprägung (Phase II/III).

Abb. 4 zeigt einen stilisierten Wirbeltierembryo in einer frühen Entwicklungsphase (Gastrula-/Neurulastadium). Beim Menschen wird dieses Stadium ca. 15 Tage nach der Befruchtung erreicht, beim Huhn ca. 30 Stunden nach der Befruchtung (10 Stunden nach der Eiablage), und bei Maus und Kaninchen nach 6-7 Tagen. Der Embryo hat zu diesem Zeitpunkt die Form einer flachen Scheibe (Keimscheibe). Vom künftigen hinteren Ende ist der sog. Primitivstreifen ausgewachsen, so dass vorn und hinten, rechts und links definiert sind. Dieser Embryo ist bilateral symmetrisch; die linke und die rechte Seite sind zwar definiert, aber äquivalent. Der Symmetriebruch (Abb. 4, Phase I) erfolgt am vorderen Ende des Primitivstreifens, im Bereich des sog. Primitivknotens. Der molekulare

Mechanismus dieses Vorgangs ist noch nicht aufgeklärt. Die asymmetrische Aktivität von Wachstumsfaktoren (*shh*, *FGF8*) im Bereich des Primitivknotens führt zur Definition der linken Körperseite [4, 5]. Das manifestiert sich in der Expression eines weiteren Wachstumsfaktors, *nodal*, im linken Seitenplattenmesoderm [6].

Abb. 5 zeigt *nodal* Genaktivitäten in fünf Wirbeltierembryonen. Der Fischembryo und die Keimscheiben von Huhn und Kaninchen betrachten wir von dorsal, der Mausembryo wurde in ventraler Ansicht fotografiert, und von der Frosch-Kaulquappe sehen wir nur die linke Seite. In allen Fällen ist die asymmetrische Expression von *nodal* auf der linken, nicht aber auf der rechten Körperseite sichtbar. *Nodal* ist allerdings nur

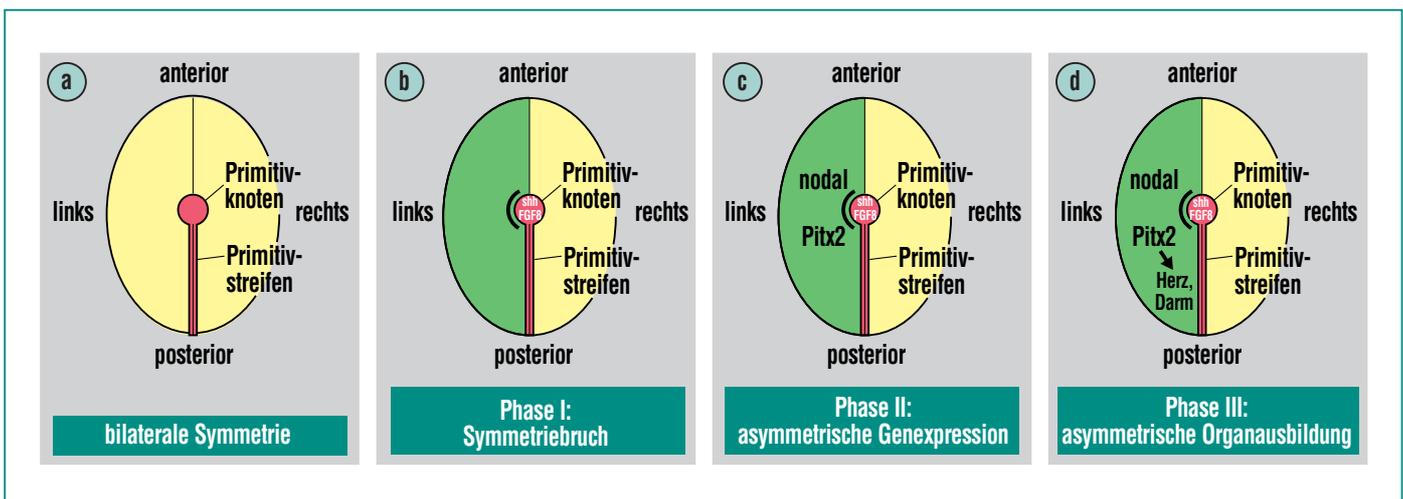


Abb. 4: Entstehung von Asymmetrie während der Embryonalentwicklung am Beispiel eines schematisch gezeichneten Wirbeltierembryos, der aus einer flachen Scheibe besteht.

(a) Vom künftigen Schwanzende (posterior) hat sich eine Verdickung, der sog. Primitivstreifen ausgebildet, an dessen vorderen Ende sich der sog. Primitivknoten befindet. Dadurch ist auch der vordere Pol (anterior) definiert. Wir betrachten diesen Embryo von oben (dorsal). Links und rechts sind klar definiert, stellen aber äquivalente (spiegelbildlich symmetrische) Hälften dar. (b) Der Symmetriebruch erfolgt durch die asymmetrische Aktivität von Wachstumsfaktoren im Bereich des Primitivknotens. (c) Er manifestiert sich in asymmetrischer Genexpression, (d) und führt schließlich zu asymmetrischer Organausbildung.

sehr kurze Zeit im Embryo aktiv und verschwindet bereits vor der Ausbildung der Organanlagen wieder (Abb. 5). Damit stellt

sich die Frage, wie das asymmetrische *nodal* Signal in die Organe übertragen wird. Diese Mittlerfunktion könnte das Gen

*Pitx2* wahrnehmen, das wir aus Zebrafisch, Frosch, Kaninchen und Maus isoliert haben [7, 8].

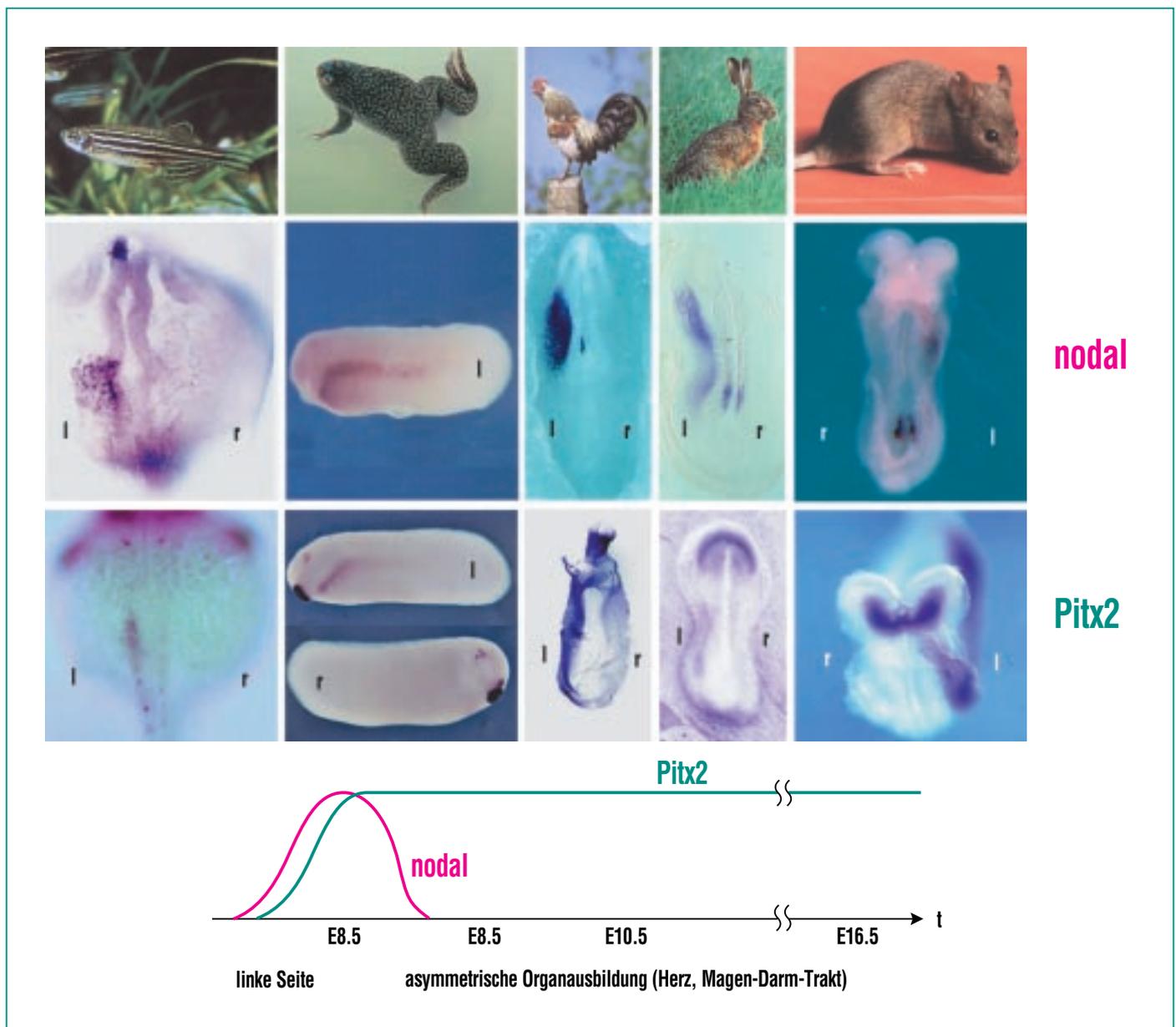


Abb. 5: Asymmetrische Genexpression von *nodal* und *Pitx2* auf der linken Seite von Wirbeltierembryonen. Die Keimscheiben von Zebrafisch, Huhn und Kaninchen sind von oben (dorsal) fotografiert, die Kaulquappen des Krallenfroschs sind von links (*nodal*) oder beiden Seiten (*Pitx2*) dargestellt, und der Mausembryo ist von der Ventralseite (Bauch) zu sehen. In allen Fällen sieht man deutlich die asymmetrische Genaktivität. Allerdings ist *nodal* nur sehr kurzzeitig im Embryo aktiv, und verschwindet bereits deutlich vor Ausbildung der Organe. *Pitx2* dagegen bleibt während der Organmorphogenese aktiv. In Spemanns Inversionsexperiment (Abb 3A-E) wurde die *nodal*/*Pitx2* Domäne umgedreht; *Pitx2* könnte die von ihm postulierte Mittlerfunktion wahrnehmen.

### **Pitx2 setzt das Herz auf den rechten (= linken) Fleck**

*Pitx2* ist ein sog. Homeoboxgen, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert. Ein Transkriptionsfaktor bindet an DNA und reguliert die Aktivität von Genen. Wie *nodal* wird *Pitx2* auf der linken Seite, im sog. Seitenplattenmesoderm, exprimiert. Im Unterschied zu *nodal* bleibt *Pitx2* jedoch während der Organogenese aktiv, und zwar strikt asymmetrisch in der linken Lungenknospe, und auf der linken Seite von Herz, Magen und Darmschlauch (schematisch dargestellt in Abb. 6a-c). Weitere Hinweise für eine Funktion von *Pitx2* bei der Entstehung von Lateralität gibt das Rieger Syndrom, eine dominante menschliche Erbkrankheit, die durch Mutationen in *Pitx2* verursacht wird [9]. Das Syndrom ist charakterisiert durch Defekte der vorderen Augenkammer und durch fehlende Zähne. Häufig treten Herzdefekte auf. Ein vorstehender Nabel, der stets zu finden ist, deutet auf eine gestörte Darmdrehung hin.

Doch *Pitx2* korreliert nicht nur mit Organasymmetrie, sondern kann aktiv den Situs verändern. Das haben wir in Experimenten im Frosch *Xenopus* gezeigt [8], von denen eines in Abb. 6d-h dargestellt ist. Synthetische Boten-RNA wurde in rechte Zellen injiziert, und die Lage und Ausprägung der Organe wurde nach Aufzucht der Embryonen im Kaulquappenstadium analysiert. Durch die Fehlexpression von *Pitx2* wurde tatsächlich der Herz- und Darm-Situs invertiert (Abb. 6e-h). Ähnliche Befunde

wurden in anderen Labors für den Hühnchenembryo erhoben [10]. Funktionverlustexperimente in Knockout-Mäusen untermauerten die Rolle von *Pitx2* als Schlüsselgen der asymmetrischen Organmorphogenese [11]. Mutante Embryonen sind u. a. durch Herz- und Darmdefekte und durch einen rechten Lungenisomerismus gekennzeichnet [2].

In weiteren Experimenten haben wir die Beziehung zwischen *nodal* und *Pitx2* untersucht (Abb. 6i). Wir konnten zeigen, dass *nodal* einer positiven Autoregulation unterliegt, wodurch sich das *nodal* Signal nach seiner ursprünglichen asymmetrischen Aktivierung sehr rasch über die gesamte linke Flanke ausbreitet. Gleichzeitig aktiviert *nodal* *Pitx2*. *Pitx2* wiederum reprimiert *nodal*, bleibt aber durch eine positive Rückkopplungsschleife auch nach Abschalten von *nodal* während der Lungen-, Herz- und Darmausbildung aktiv [7].

Unklar bleibt, durch welche Prozesse Organanlagen asymmetrisch werden. Interessanterweise entstehen Herz und Darm, und auch das Nervensystem, das zumindest beim Menschen ebenfalls deutliche strukturelle und funktionelle Asymmetrien aufweist, während der Embryonalentwicklung aus linearen Röhren (Neuralrohr, Herz- und Darmschlauch). Denkbar sind zwei Szenarien. Einmal könnte die Zellteilungsrate auf der rechten und auf der linken Seite dieser Schläuche zeitweise unterschiedlich sein. Oder aber es kommt zu asymmetrischen biomechanischen Prozessen, z. B. Kontraktion von Glattmuskulatur, die die

Röhren aktiv verbiegen. Die weitere Untersuchung der Rolle von *Pitx2* könnte den Weg weisen. Sie könnte insbesondere Gene identifizieren, die durch *Pitx2* reguliert werden.

Weitere offene Fragen betreffen neben dem Symmetriebruch in erster Linie den Transfer des ursprünglichen asymmetrischen Signals vom Primitivknoten in die linke Seitenplatte.

### **Signaltransfer von der Mitte in die Peripherie: wie wirkt FGF8?**

Widersprüchlich diskutiert wird vor allem die Funktion der Wachstumsfaktoren *shh* und *FGF8*, die im Knotenbereich aktiv sind und die die Asymmetrie in die Peripherie, also zur Seitenplatte transportieren. Im Huhn wird *shh* auf der linken Seite des Knotens exprimiert [4], *FGF8* auf der rechten Seite des Knotens und im Primitivstreifen [5]. Fehl-expressionsexperimente zeigten, dass *shh* auf der rechten Seite *nodal* außerplanmäßig (ektopisch) aktiviert, und nach Blockierung von *shh* auf der linken Seite *nodal* nicht aktiviert wird. Somit ist *shh* im Huhn eine linke Determinante [4]. Umgekehrt reprimiert *FGF8* auf der rechten Seite die Expression von *nodal*, wirkt also als rechter Faktor [5].

Anders in der Maus. Hier wirkt *FGF8* auf der linken Seite, d. h. Fehlexpression rechts induziert *nodal* [12]. Und eine *shh* Knockout-Maus zeigt eine bilaterale Expression von *Pitx2*, deutet also auf eine rechte Funktion [13]. Was könnte der Grund für diese

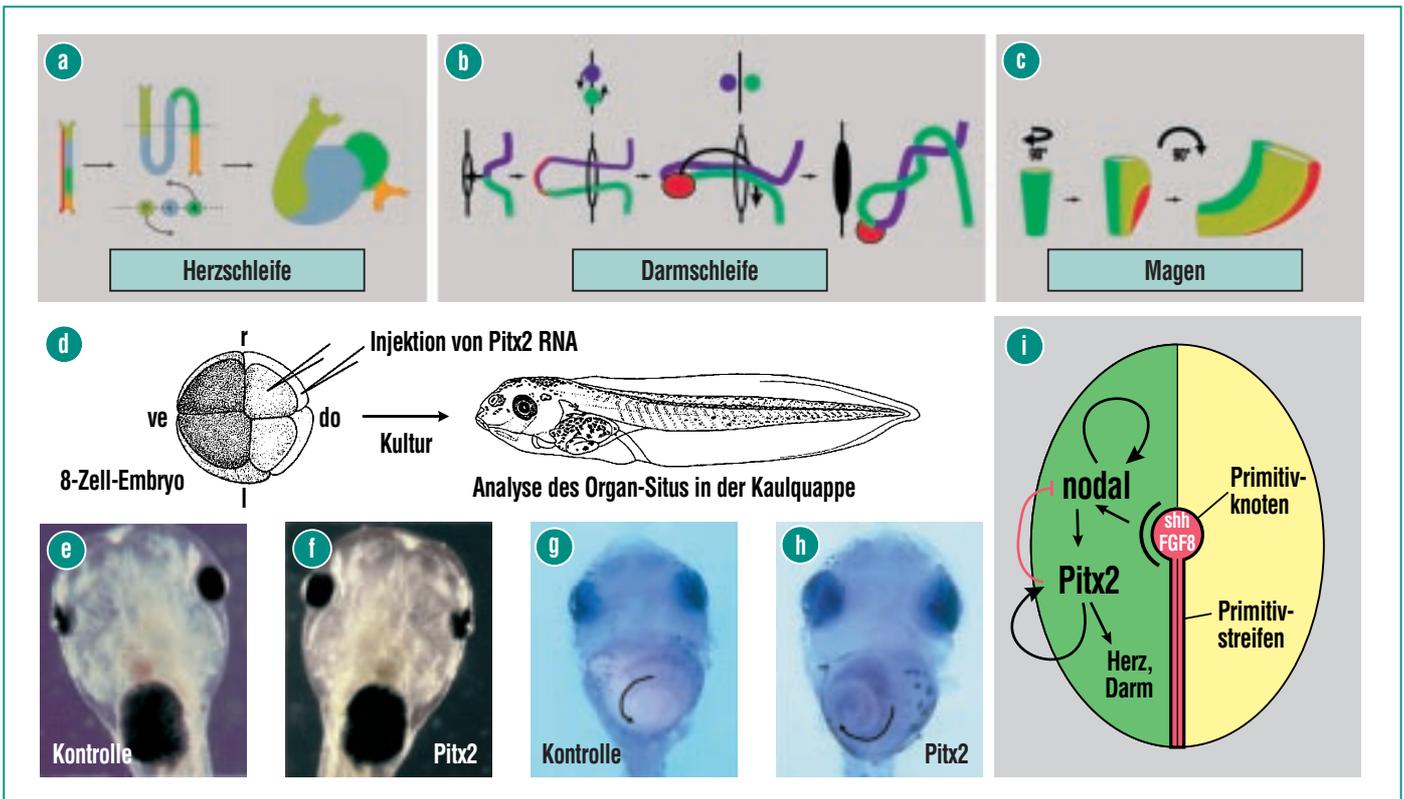


Abb. 6: Die *Pitx2* Aktivität korreliert mit asymmetrischer Organbildung und kann den Situs aktiv beeinflussen.

- (a) Bildung der Herzschleife. Das Herz bildet sich aus einem linearen Schlauch, auf dessen linker Seite *Pitx2* aktiv ist. Dieser Schlauch wird S-förmig. Durch Drehung, Wachstum und Septenbildung entsteht das gekammerte Wirbeltierherz.
- (b) Das zunächst ebenfalls lineare Darmrohr wird während der Embryogenese zwischenzeitlich durch eine Öffnung der Körperwand (Nabelbruch) partiell ausgelagert. Außerhalb des Körpers kommt es zu Drehungen, das Zäkum (Blinddarm, rot) entsteht, und beim Zurückverlegen schlägt der Darm nochmals um 180° um, wodurch die typische Anordnung von Dün- und Dickdarm entsteht. *Pitx2* ist bei der Schleifenbildung und im Zäkum aktiv.
- (c) Der Magen entsteht aus einer aufrechten Röhre, die sich dreht und absenkt. *Pitx2* ist auf der linken Seite des Magens aktiv.
- (d-h) Eine Fehlexpression von *Pitx2* auf der rechten Seite von Froschembryonen führt zu Inversion von Herz und Darm in der Kaulquappe.
- (d) Schematische Darstellung des Experiments.
- (e) Normale Ausbildung des Herzens.
- (f) Inverse Ausbildung des Herzens.
- (g) Normale Windung der Darmschleife (gegen Uhrzeigersinn).
- (h) Inverse Windung der Darmschleife (mit Uhrzeigersinn).
- (i) Interaktionen zwischen *nodal* und *Pitx2*. *Nodal* wird durch Signale, die vom Primitivknoten in der Mittellinie des Embryos ausgehen, asymmetrisch auf der linken Seite aktiviert. Durch eine positive Rückkopplungsschleife von *nodal* auf sich selbst breitet sich das *nodal* Signal sehr rasch über die gesamte linke Flanke aus. Gleichzeitig aktiviert *nodal* *Pitx2*. *Pitx2* reprimiert *nodal*, bleibt aber während der Organbildung aktiv, wofür eine positive Rückkopplungsschleife von *Pitx2* auf sich selbst verantwortlich ist.

Widersprüche sein? Zum einen betrachten wir ja Vögel und Säuger, d. h. es könnte evolutionäre Gründe geben. Andererseits ist der Hühnerembryo eine flache Keimscheibe, während der Mausembryo in diesem Stadium zylinderförmig organisiert ist, d. h. es könnte etwas mit der unterschiedlichen Architektur des frühen Embryos zu tun haben.

Wir haben uns daher entschlossen, das Kaninchen zu untersuchen, einen weiteren Säuger, der sich aber wie das Hühnchen, und übrigens auch der Mensch, über eine flache Keimscheibe entwickelt. Um diese Experimente durchführen zu können, haben wir etwa 20 Markergene aus dem Kaninchen kloniert und ihre Expression analysiert, außerdem ein *in vitro* System etabliert, das die gezielte Manipulation und Kultur früher Kaninchenembryonen erlaubt. Entsprechende Experimente mit Mausembryonen lassen sich nicht durchführen, da sie zu diesem Zeitpunkt bereits im Uterus implantiert sind.

Wie in der Maus fanden wir eine bilateral symmetrische Expression von *shh* und *FGF8* im Knotenbereich, während *nodal* und *Pitx2*, wie in allen Wirbeltierembryonen, links-asy-mmetrisch aktiv sind (Fischer und Blum, unveröffentlicht). Unser Kultursystem haben wir an Hand der *nodal-Pitx2* Kaskade überprüft. Eine *nodal*-getränkte Mikroperle, auf die rechte Seite eingebracht, führte zu ektopischer Induktion von *nodal* und *Pitx2* im rechten Seitenplattenmesoderm. Der *nodal-Pitx2* Signalweg ist also im Kaninchen konserviert, und die rechte Seite besitzt die Kompe-

tenz, auf ein zusätzliches *nodal*-Signal die linke Kaskade auf der rechten Seite zu aktivieren.

In einer größeren Versuchsreihe haben wir uns um *FGF8* gekümmert. Dabei haben wir die Perlen links oder rechts platziert, drei verschiedene *FGF8* Konzentrationen verwendet, und die Perlen dicht am Knoten oder in die Seitenplatte gesteckt. Das von uns

verwendete *FGF8* war vom selben Hersteller wie das in Huhn und Maus benutzte, und wir haben die Aktivität in Tests im Frosch *Xenopus* überprüft. In keinem einzigen Fall fanden wir rechtsseitige ektopische Aktivierung von *nodal*. Daraus schließen wir, dass sich *FGF8* im Kaninchen – anders als in der Maus – nicht als linke Determinante ver-



**Abb. 7** Die Rolle des Wachstumsfaktors *FGF8* beim Signaltransfer von der Mitte in die Peripherie.

Im Huhn wirkt *FGF8* als rechte Determinante und verhindert die rechtsseitige Aktivierung von *nodal*. In der Maus ist *FGF8* nötig für die Aktivierung von *nodal* auf der linken Seite. Neben evolutionären Unterschieden zwischen Vögeln und Säugern unterscheiden sich die frühen Embryonen von Huhn und Maus in ihrer Topologie. Im Kaninchen, einem Säuger, der sich über ein Keimscheibenstadium entwickelt, wirkt *FGF8* wie im Huhn als rechte Determinante. Eine mit *FGF8* beladene Mikroperle verhindert die Aktivität von *nodal* auf der linken Seite. Auf der rechten Seite hat *FGF8* keinen Einfluss auf die *nodal* Aktivität.

hält. Umgekehrt führte im Kaninchen eine linksseitige Plazierung der Perlen in jedem Fall zu einer Repression von *nodal* und *Pitx2*, genauso wie im Huhn. Eine rechte Funktion von *FGF8* im Kaninchen konnte wir durch Funktionsverlustexperimente untermauern. Nach Blockierung des FGF-Signalwegs durch Plazierung eines Inhibitors auf der rechten Seite fanden wir ektopische Aktivierung von *nodal* im rechten Seitenplattenmesoderm, während der Inhibitor auf der linken Seite keinen Effekt hatte.

Was lernen wir aus diesen Experimenten? (a) Die Unterschiede zwischen Maus und Huhn scheinen nicht evolutionär bedingt zu sein. Im Kaninchen (Säuger) wirkt *FGF8* wie im Huhn (Vogel) als rechte Determinante. (b) Asymmetrische Genexpression ist keine Voraussetzung für asymmetrische Funktion. In Kaninchen und Maus wird *FGF8* im Knotenbereich asymmetrisch exprimiert. (c) Der entscheidende Parameter scheint die Topologie des frühen Embryos zu sein. In Huhn und Kaninchen (flache Keimscheiben) wirkt *FGF8* auf der rechten Seite, indem es *nodal* reprimiert, im Unterschied zur Maus (Eizylinder), wo *FGF8* *nodal* auf der linken Seite aktiviert.

Die Maus ist ganz ohne Zweifel das am besten untersuchte genetische Modellsystem für den Menschen. Eine Vielzahl von Mausmutanten, spontan entstanden oder durch genetische Manipulationen im Labor erzeugt, dienen der Untersuchung grundlegender Mechanismen von z. B. Krankheit und Krebs. Unsere Experimente

im Kaninchen geben allerdings einen Hinweis darauf, dass frühe Entwicklungsprozesse in Säugern unterschiedlich gesteuert sein könnten, und dass dafür topologische Gründe maßgebend sein könnten. Da menschliche Embryonen sich wie Huhn und Kaninchen über eine flache Keimscheibe entwickeln, könnte sich das Kaninchen als ein wichtiges zweites Modellsystem der Säuger neben der Maus etablieren, zumindest was die frühen Musterbildungsprozesse betrifft.

### Zusammenfassung

Die äußere Erscheinungsform der Wirbeltiere ist bilateral-symmetrisch. Im Gegensatz dazu nehmen die meisten inneren Organe eine definierte asymmetrische Lage ein. Dieser als „Situs solitus“ bezeichnete Zustand bildet sich – unter genetischer Kontrolle – während der Embryonalentwicklung aus. Fehlsteuerungen führen zu schwerwiegenden Defekten der inneren Organe, vor allem des Herzens. Wie die ursprüngliche Symmetrie des frühen Embryos gebrochen wird ist nach wie vor unklar. In allen Wirbeltierembryonen finden wir bereits in einem sehr frühen Stadium, das beim Menschen einem ca. 2-3 Wochen alten Fötus entspricht, asymmetrische Genaktivitäten auf der linken Seite. Zu diesem Zeitpunkt gibt es noch keine Organe. Die linksseitigen Signale müssen daher in die entstehenden Organe transportiert werden. Dabei spielt das von uns aus Frosch, Zebrafisch, Kaninchen und Maus isolierte Gen *Pitx2* eine entscheidende Rolle. *Pitx2* kodiert für einen sog. Trans-

kriptionsfaktor, ein Eiweiß, das seinerseits andere Gene in ihrer Aktivität steuert. Wenn wir es z. B. im Frosch auf der rechten Seite fehlsteuern, kommt es zur Umkehr der Plazierung der Organe (Situsinversion). Während die asymmetrische Organausbildung bei Wirbeltieren stets nach demselben Muster abzulaufen scheint, gibt es in den frühen Phasen offensichtlich z. T. erhebliche Unterschiede. Diese könnten mit der unterschiedlichen Architektur der frühen Embryonen zu tun haben. Die meisten Säuger entwickeln sich über ein Zwischenstadium, das eine flache Scheibe darstellt (Keimscheibe), während Mausembryonen zylinderförmig aussehen. Unsere Untersuchungen an Kaninchenembryonen, die Keimscheiben ausbilden, haben gezeigt, dass es erhebliche Unterschiede zur Maus gibt, weshalb die Maus für frühe Entwicklungsstadien u. U. kein geeignetes genetisches Modellsystem für den Menschen darstellt.

## Glossar

<b>Ablation</b>	Entfernen eines Gewebestücks	<b>Organogenese/ Organmorpho- genese</b>	eine Phase der Embryonal- entwicklung, in der sich aus primitiven Anlagen die Organe bilden
<b>autosomal</b>	nicht auf einem Geschlechts- chromosom lokalisiertes Gen	<b>Primitivstreifen</b>	Verdickung in der Mittellinie früher Embryonen
<b>dominant</b>	kommt bereits zur Ausprägung, wenn nur eine Genkopie defekt ist	<b>reprimieren</b>	eine Genaktivität unterdrücken
<b>dorsal</b>	auf der Seite, auf der sich der Rücken bildet	<b>rezessiv</b>	kommt nur zur Ausprägung, wenn beide Genkopien defekt sind
<b>FGF8</b>	Fibroblastenwachstumsfaktor Nr. 8	<b>Seitenplatten- mesoderm</b>	beidseitig von der Mittellinie angeordnetes Gewebe eines frühen Embryos, aus dem das Herz und der Magen-Darmtrakt entsteht
<b>ektopisch</b>	an einem Ort, an dem ein Gen normalerweise nicht aktiv ist	<b>shh</b>	sonic hedgehog, bezeichnet einen Wachstumsfaktor
<b>geschlechts- gebunden</b>	auf einem Geschlechts- chromosom (X oder Y) lokalisiertes Gen	<b>Situs inversus</b>	spiegelbildliche Umkehr der Lage- beziehung der asymmetrischen Organe des Brust- und Bauch- raums
<b>Haploinsuffizienz</b>	nicht nur die Gegenwart, sondern auch die Menge eines Genpro- dukts (Eiweiß) ist für die korrekte Funktion notwendig	<b>Situs solitus</b>	normale Anordnung der Organe des Brust- und Bauchraums
<b>Heterotaxie</b>	nicht eindeutige Definition des Situs	<b>Transkriptions- faktor</b>	Eiweiß, das an DNA bindet und die Aktivität von Genen steuert
<b>Isomerismus</b>	spiegelbildliche Verdoppelung ei- ner Seite eines Organs auf der anderen Seite, z. B. der Lunge	<b>ventral</b>	auf der Seite, auf der sich der Bauch bildet
<b>kodieren</b>	Gene bestehen aus DNA, in der die Information zur Synthese von Eiweißen (Proteinen) festgelegt oder kodiert ist	<b>Wachstumsfaktor</b>	Eiweiß, das Signale zwischen Zel- len, z. T. über größere Entfernun- gen, vermittelt. Die Zelle, die das Signal erhält, bindet den Wachs- tumsfaktor über eine Antenne (Rezeptor) auf der Zelloberfläche, von wo aus die Nachricht in den Zellkern vermittelt wird. Dort kommt es zur spezifischen Akti- vierung oder Repression von Gen- en
<b>Knockout-Maus</b>	Maus, die in einem Gen durch ge- zielte gentechnische Manipulation defekt ist		
<b>Lateralität</b>	Gesamtheit der asymmetrischen Organausbildung		
<b>Mutation</b>	Veränderung eines Gens		
<b>Neuralplatte</b>	eine Verdickung auf der Rücken- seite eines frühen Embryos, aus der sich das Neuralrohr bildet. Aus dem Neuralrohr wird das ge- samte Nervensystem		

## Literatur

- [1] J. Capdevila, K. J. Vogan, C. J. Tabin, J. C. Izpisua Belmonte, *Cell* 101(1), 9-21 (2000)
- [2] C. V. E. Wright, *Dev Cell* 1, 1-20 (2001)
- [3] M. Blum, H. Steinbeisser, M. Campione, A. Schweickert, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45(5), 505-16 (1999)
- [4] M. Levin, R. L. Johnson, C. D. Stern, M. Kuehn, C. Tabin, *Cell* 82(5), 803-14 (1995)
- [5] T. Boettger, L. Wittler, M. Kessel, *Curr Biol* 9(5), 277-80 (1999)
- [6] L. A. Lowe, D. M. Supp, K. Sampath, T. Yokoyama, C. V. Wright, S. S. Potter, P. Overbeek, M. R. Kuehn, *Nature* 381(6578), 158-61 (1996)
- [7] A. Schweickert, M. Campione, H. Steinbeisser, M. Blum, *Mech Dev* 90(1), 41-51 (2000)
- [8] M. Campione, H. Steinbeisser, A. Schweickert, K. Deissler, F. van Bebber, L. A. Lowe, S. Nowotschin, C. Viebahn, P. Haffter, M. R. Kuehn, M. Blum, *Development* 126(6), 1225-34 (1999)
- [9] E. V. Semina, R. S. Reiter, J. C. Murray, *Hum Mol Genet* 6(12), 2109-16 (1997)
- [10] M. Logan, S. M. Pagan-Westphal, D. M. Smith, L. Paganessi, C. J. Tabin, *Cell* 94(3), 307-17 (1998)
- [11] A. K. Ryan, B. Blumberg, C. Rodriguez-Esteban, S. Yonei-Tamura, K. Tamura, T. Tsukui, J. de la Pena, W. Sabbagh, J. Greenwald, S. Choe, D. P. Norris, E. J. Robertson, R. M. Evans, M. G. Rosenfeld, J. C. Izpisua Belmonte, *Nature* 394(6693), 545-51 (1998)
- [12] E. N. Meyers, G. R. Martin, *Science* 285(5426), 403-6 (1999)
- [13] S. Izraeli, L. A. Lowe, V. L. Bertness, D. J. Good, D. W. Dorward, I. R. Kirsch, M. R. Kuehn, *Nature* 399(6737), 691-4 (1999)

# Essentielle Rolle des Rel/NF- $\kappa$ B Familienmitgliedes RelB bei der Entwicklung lymphoider Organe: spezifische Aktivierung durch den Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptor

Z. B. Yilmaz, D. S. Weih, F. Weih, ITG

## Adaptive Immunantworten benötigen sekundäre lymphoide Organe

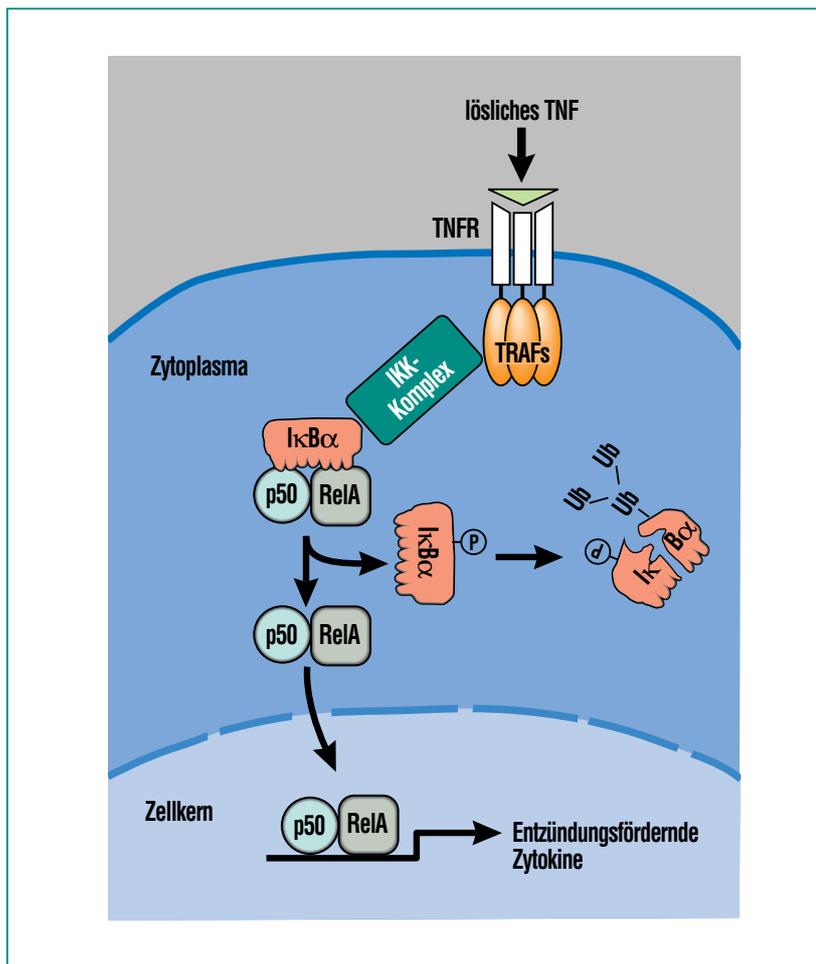
Abwehrreaktionen des Immunsystems in Säugetieren lassen sich grob in angeborene und erworbene Immunantworten unterteilen. Im Gegensatz zur angebore-

renen Immunität, die vor allem von sog. Fresszellen vermittelt wird, zeichnet sich die erworbene (adaptive) Immunität unter anderem durch die hochspezifische Erkennung von Krankheitserregern bzw. Fremdanthigenen und durch ein immunologisches Gedächtnis aus. Eine effiziente adaptive Immunantwort gegen ein-

dringende Krankheitserreger wird von T- und B-Lymphozyten vermittelt, die in spezialisierten sekundären lymphoiden Organen, wie z.B. der Milz, den Lymphknoten und den Peyerschen Plaques, von professionellen antigenpräsentierenden Zellen aktiviert werden. In primären lymphoiden Organen, wie z.B. Thymus und Knochenmark, hingegen findet die Entwicklung und Reifung, aber keine Aktivierung von Lymphozyten statt.

## Die Rel/NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren

Die Rel/NF- $\kappa$ B Proteine spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Genen, die Immunantworten, Stress- und entzündlichen Reaktionen steuern. In Säugetieren wurden bisher fünf Rel/NF- $\kappa$ B Familienmitglieder beschrieben: die p50 Untereinheit, die durch Abspaltung von dem Vorläufermolekül p105 entsteht, die p52 Untereinheit mit dem Vorläufermolekül p100, sowie die Untereinheiten RelA, RelB und c-Rel. Die Bindung der Rel/NF- $\kappa$ B Proteine an regulatorische Gensequenzen wird durch Mitglieder der inhibitorischen I $\kappa$ B Familie moduliert. Durch die Interaktion mit den I $\kappa$ B Molekülen werden Rel/NF- $\kappa$ B Komplexe inaktiviert und im Zytoplasma zurückgehalten. Allerdings kann eine Vielzahl extrazellulärer Signale den I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK) aktivieren, was über eine Reihe von Zwischenschritten letztendlich den Abbau der inhibitorischen Proteine bewirkt (siehe Abb. 1). Die Freisetzung der Rel/NF- $\kappa$ B Komplexe führt nun zu deren Wanderung in den Zellkern



**Abb. 1: Klassische Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalübertragungsweges durch den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR). Die Bindung von löslichen Liganden führt zur Aktivierung des Rezeptors und der TRAFs (TNFR associated factors). Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  durch den aktivierten IKK-Komplex führt zur Ubiquitinierung des Inhibitormoleküls und zu dessen Abbau durch das 26S Proteasom. Die freigesetzten p50-RelA Heterodimere wandern in den Zellkern und regulieren die Synthese von z.B. entzündungsfördernden Zytokinen.**

und zur Aktivierung von  $\kappa$ B-regulierten Genen [1, 2].

Die „klassische“ NF- $\kappa$ B Aktivität besteht aus p50-RelA Heterodimeren, aber viele andere homo- und heterodimere Komplexe können abhängig von Zelltyp und Stimulus auftreten. Die RelB Unter-einheit bildet eine Ausnahme, da sie ausschließlich mit p50 oder p52 interagiert, um aktivierende Heterodimere auszubilden. In der Maus findet man das RelB Protein nur in bestimmten Bereichen lymphoider Organe. So besteht beispielsweise die basale NF- $\kappa$ B Aktivität in Abwesenheit eines pathogenen Krankheitserregers in lymphoiden Organen hauptsächlich aus p50-RelB und p52-RelB Heterodimeren, was auf eine Rolle von RelB bei der konstitutiven Expression von  $\kappa$ B-regulierten Genen in diesen Geweben hinweist [3, 4].

### RelB-defiziente Mäuse haben eine gestörte Entwicklung der Milz

Durch moderne molekulargenetische Methoden wurden einzelne Mitglieder der Rel/NF- $\kappa$ B Familie in der Maus gezielt zerstört [5]. So zeigen beispielsweise RelB-defiziente Tiere (*relB*<sup>-/-</sup>) neben einer eingeschränkten Immunität und Defekten im blutbildenden (hämatopoetischen) System auch deutliche pathologische Veränderungen, die verschiedenen Entzündungskrankheiten und Autoimmunreaktionen beim Menschen ähneln [6, 7]. Bei der Analyse der histopathologischen Veränderungen in der Milz von *relB*<sup>-/-</sup> Mäusen konnten wir zeigen, dass diese Tiere nicht in der

Lage sind Keimzentren oder Netzwerke aus follikulären dendritischen Zellen auszubilden. Keimzentren lymphoider Organe sind Orte starker B-Zellvermehrung und -auslese während einer adaptiven Immunreaktion [8]. Die in den Keimzentren von follikulären dendritischen Zellen gebildeten Netzwerke fangen fremde Antigene ein und präsentieren sie für eine lange Zeit an ihrer Oberfläche, was für die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses wichtig ist. RelB wird auch für die Ausbildung der marginalen Randzone benötigt [8]. Diese Struktur ist quasi der Haupteingang für Antigene, antigenpräsentierende Zellen und Lymphozyten in die Milz. Interessanterweise wurde ähnliche Defekte auch in p52-defizienten Mäusen beobachtet [9], während Mäuse, in denen die p50-Untereinheit von NF- $\kappa$ B zerstört wurde, eine weitgehend normale Milzstruktur haben.

Mit Hilfe von Knochenmarktransfers konnte nachgewiesen werden, dass RelB in strahlungsresistenten stromalen Zellen, wie z.B. den follikulären dendritischen Zellen, und nicht in strahlungssensitiven hämatopoetischen Zellen für die Ausbildung von Keimzentren benötigt wird. Für die Ausbildung des marginalen Randsinus und dessen Besiedlung mit spezialisierten Fresszellen (Makrophagen) wird RelB ebenfalls in stromalen Zellen benötigt. Auch die B-Lymphozyten der marginalen Randzone sind von dem Verlust von RelB betroffen. Diese speziellen B-Zellen spielen insbesondere bei der Produktion von Antikörpern ge-

gen bakterielle Krankheitserreger eine wichtige Rolle, eine Immunantwort, die in *relB*<sup>-/-</sup> Mäusen deutlich abgeschwächt ist [10]. Für die Entwicklung dieses Zelltyps konnten wir nun zeigen, dass RelB in hämatopoetischen Zellen benötigt wird [8]. Ähnliche Ergebnisse wurden von einer anderen Arbeitsgruppe auch für p50-, RelA- und c-Rel-defiziente Mauslinien erhalten [11]. Das Zusammenspiel verschiedener NF- $\kappa$ B-Komplexe in hämatopoetischen Vorläuferzellen ist demnach essentiell für die normale Entwicklung von B-Lymphozyten der marginalen Randzone.

### Die Ausbildung der darmassoziierten Peyerschen Plaques ist abhängig von p52 und RelB

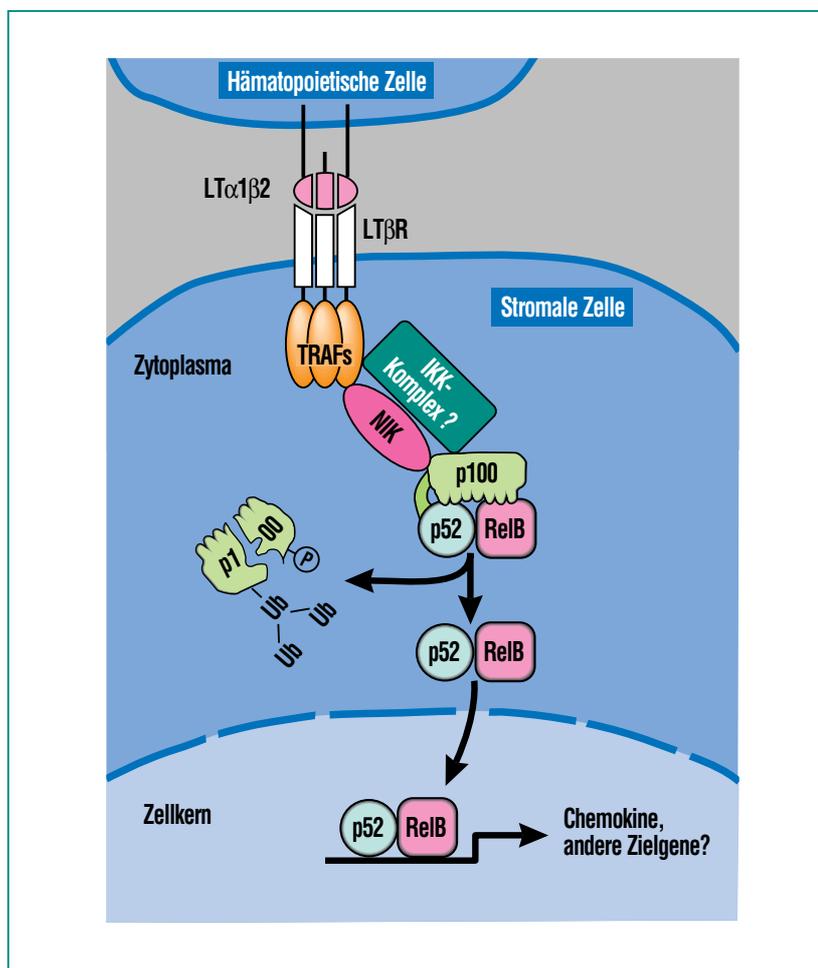
Die Peyerschen Plaques sind spezielle Lymphfollikel des Dünndarms, die durch die Resorption von Nahrungsantigenen eine besondere immunologische Aufgabe wahrnehmen. Da IgA Antikörper die Schleimhaut durchwandern und infektiöse Mikroorganismen im Darmlumen neutralisieren können, werden von Peyerschen Plaques ausgehende humorale Immunantworten meist von IgA Immunglobulinen vermittelt.

Unsere histologischen Untersuchungen ergaben, dass Peyersche Plaques in erwachsenen p52- und RelB-defizienten Mäusen vollständig fehlen, während Tiere mit einer zerstörten p50 Untereinheit im Vergleich zu Kontrolltieren weniger und kleinere Peyersche Plaques haben. Die-

ses Ergebnis stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass sich frühe Peyersche Plaque Organanlagen in p50-defizienten Embryonen normal entwickeln, in p52- und RelB-defizienten Embryonen hingegen abwesend sind. Das Fehlen von Peyerschen

Plaques ist eine mögliche Erklärung für die dramatisch reduzierte IgA-Konzentration im Kot p52- und RelB-defizienter Mäuse. Von anderen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass die durch das Zytokin IL-7 induzierte Expression des Liganden Lymphotoxin

und die Aktivierung des Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptors während der Embryonalentwicklung unabdingbar für eine normale Entwicklung der Peyerschen Plaques ist [12, 13]. Unsere Untersuchungen ergaben, dass dieser molekulare Mechanismus in *relB*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht defekt ist.



**Abb. 2: Aktivierung von p52-RelB Heterodimeren durch den Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptor.** Membrangebundene Lymphotoxin Liganden auf hematopoietischen Zellen aktivieren den Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptor auf stromalen Zellen. Das Signal wird durch die NF- $\kappa$ B-induzierende Kinase (NIK) weitergegeben, was zu Phosphorylierung und Abbau des inhibitorischen C-Terminus des p100 Vorläufermoleküls führt. Die genaue Funktion des IKK-Komplexes ist noch nicht bekannt, aber sehr wahrscheinlich spielt die IKK $\alpha$  Untereinheit dabei eine wichtige Rolle. Die freigesetzten p52-RelB Heterodimere können nun die Expression von Chemokinen und anderen (noch unbekannt) Zielgenen aktivieren.

### Spezifische Aktivierung von p52-RelB-Komplexen durch den Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptor

Daraufhin stellte sich die Frage, ob RelB stromabwärts des Lymphotoxin Signalübertragungsweges liegt und ob die Aktivierung des Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptors zu einer Induktion von RelB-Komplexen führt. In der Tat konnten wir mit Hilfe von embryonalen Bindegewebszellen zeigen, dass die Signalübertragung durch den Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptor zu einer spezifischen Aktivierung von p52-RelB Heterodimeren führt, während z.B. nach Stimulation mit dem Tumor-Nekrose-Faktor ausschließlich der „klassische“ p50-RelA NF- $\kappa$ B Komplex zu beobachten ist.

Neben den defekten Milzstrukturen und der völligen Abwesenheit von Peyerschen Plaques wurde in *relB*<sup>-/-</sup> Mäusen auch eine dramatische Verkleinerung der Lymphknoten beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diese massiv gestörte Entwicklung sekundärer lymphoider Organe ist, dass die Synthese von bestimmten Botenstoffen (Chemokinen), welche die Wanderung und Verteilung lymphoider Zellen steuern, in *relB*<sup>-/-</sup> Mäusen beeinträchtigt ist. In der Tat wurde in Milzen

RelB-defizienter Mäuse eine deutliche Abnahme des Chemokins BLC (B lymphocyte chemo-attractant) festgestellt [8].

## Zusammenfassung

Unsere Ergebnisse deuten auf eine essentielle Funktion von RelB-Komplexen bei der Entwicklung der Milz, der Peyerschen Plaques

und auch von anderen lymphoiden Organen hin. Sehr wahrscheinlich bewirkt die Bindung der Lymphotoxin Liganden, die sich auf der Oberfläche von hämatopoietischen Zellen befinden, an den Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptor eine Aktivierung der p52-RelB Heterodimere in stromalen Zellen (siehe Abb. 2). Unser besonderes Interesse gilt nun der Frage, wel-

che Komponenten des IKK-Komplexes für die Aktivierung der p52-RelB Heterodimere benötigt und welche Zielgene von RelB reguliert werden.

## Literatur

- [1] S. Ghosh, M. J. May, E. B. Kopp, *Annu. Rev. Immunol.*, 16, 225-260 (1998)
- [2] M. Karin, *Oncogene*, 18(49), 6867-6874 (1999)
- [3] T. Lernbecher, U. Müller, T. Wirth, *Nature*, 365, 767-770 (1993)
- [4] F. Weih, D. Carrasco, R. Bravo, *Oncogene*, 9, 3289-3297 (1994)
- [5] S. Gerondakis, M. Grossmann, Y. Nakamura, T. Pohl, R. Grumont, *Oncogene*, 18(49), 6888-6895 (1999)
- [6] L. Burkly, C. Hession, L. Ogata, C. Reilly, L. A. Marconi, D. Olson, R. Tizard, R. Cate, D. Lo, *Nature*, 373, 531-536 (1995).
- [7] F. Weih, D. Carrasco, S. K. Durham, D. S. Barton, C. A. Rizzo, R.-P. Ryseck, S. A. Lira, R. Bravo, *Cell*, 80, 331-340 (1995)
- [8] D. S. Weih, Z. B. Yilmaz, F. Weih, *J. Immunol.*, 167(4), 1909-1919 (2001)
- [9] L. Poljak, L. Carlson, K. Cunningham, M. H. Kosco-Vilbois, U. Siebenlist, *J. Immunol.*, 163(12), 6581-6588 (1999).
- [10] F. Weih, G. Warr, H. Yang, R. Bravo, *J. Immunol.*, 158, 5211-5218 (1997).
- [11] A. Cariappa, H.-C. Liou, B. H. Horwitz, S. Pillai, *J. Exp. Med.*, 192(8), 1175-1182 (2000)
- [12] H. Yoshida, K. Honda, R. Shinkura, S. Adachi, S. Nishikawa, K. Maki, K. Ikuta, S. I. Nishikawa, *Int. Immunol.*, 11(5), 643-655 (1999).
- [13] K. Honda, H. Nakano, H. Yoshida, S. Nishikawa, P. Rennert, K. Ikuta, M. Tamechika, K. Yamaguchi, T. Fukumoto, T. Chiba, S.-I. Nishikawa, *J. Exp. Med.*, 193(5), 621-630 (2001)

# Zwischen Genen, biologischer Komplexität und Krankheiten: Alternatives Spleißen von Botenmolekülen

H. König, ITG

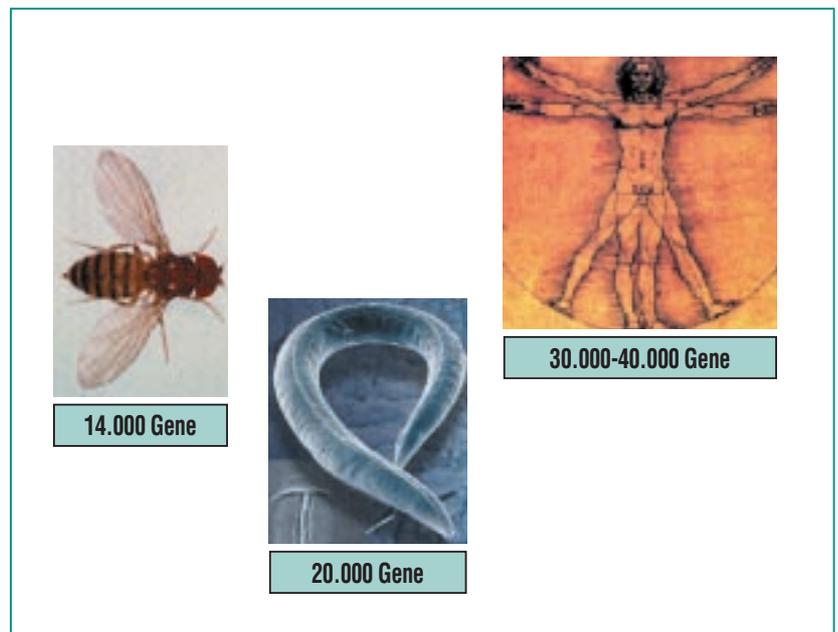
Eine der größten Überraschungen bei der Analyse des menschlichen Erbgutes war die Identifizierung von nur 30.000-40.000 proteinkodierenden Genen [1, 2] – nur circa zweimal mehr als bei der Fliege oder einem einfachen Fadenwurm (s. Abb.1). Die Entwicklung der hohen biologischen Komplexität des Menschen (und wahrscheinlich auch anderer Säugetiere), basierend auf einer solch relativ kleinen Zahl von Genen, erklärt sich hauptsächlich durch zelluläre Mechanismen, über die aus einem einzigen Gen verschiedene Proteine (Eiweiße) hergestellt werden können.

Der weitaus häufigste dieser Mechanismen ist alternatives prä-mRNA-Spleißen [3, 4] (s. Abb. 2). Es beruht auf der Eigenschaft von Genen aller Organismen (außer Bakterien) die Information zur Herstellung eines Proteins in kleinen Stücken (Exons) zu enthalten, die voneinander durch lange nichtkodierende Genbereiche (Introns) getrennt sind. Während der Reifung eines Vorläufer-Botenmoleküls (prä-mRNA) zum funktionellen Botenmolekül (mRNA) müssen die Introns herausgeschnitten werden und die Exons zu einer zusammenhängenden, proteinkodierenden RNA-Sequenz zusammengefügt werden. Man bezeichnet dies als Spleißen. Exons können dabei in unterschiedlicher Weise miteinander kombiniert werden, wodurch aus einem Gen bzw. Vorläufer-Botenmolekül unterschiedliche mRNAs und Proteine hergestellt werden können. Dies wird als alternatives Spleißen bezeichnet. Nach gegenwärtigen Schätzungen spielt alternatives

Spleißen bei der RNA- und Proteinbildung von mindestens 60% aller menschlichen Gene eine Rolle [1]. Proteinformen, die durch alternatives Spleißen hergestellt werden (sog. Spleißvarianten) spielen in der normalen Entwicklung von Organismen und – wenn zur falschen Zeit oder in der falschen Zelle hergestellt – bei der Entstehung menschlicher Krankheiten, wie neurodegenerativen Erkrankungen oder Krebs, eine wichtige Rolle [5, 6]. Damit Zellen am richtigen Ort im Organismus zur richtigen Zeit Spleißvarianten herstellen kön-

nen, müssen sie entsprechende Signale (z.B. Wachstumsfaktoren oder entwicklungssteuernde Substanzen) aus ihrer Umgebung detektieren und über zelluläre Signalwege die Spleißmaschinerie entsprechend instruieren. Wie solche extrazellulären Signale alternative Spleißprozesse steuern können ist weitgehend unbekannt.

Das Ziel unserer Arbeiten ist es Eiweißstoffe zu identifizieren, welche alternatives Spleißen in normalen Körperfunktionen und bei der Entstehung von Krebs



**Abb.1:** Die Analyse des menschlichen Erbgutes ergab überraschenderweise nur 30.000 bis 40.000 Gene (Abschnitte auf der Erbsubstanz, DNA, welche Eiweiße kodieren). Das sind nur ungefähr zweimal mehr Gene als bei der Fruchtfliege oder bei einem einfachen Fadenwurm. Die erhebliche Diskrepanz zwischen biologischer Komplexität und unserer Genzahl wird durch die Existenz und die häufigere Verwendung von Mechanismen erklärt, durch die aus einem einzigen Gen verschiedene Proteine (Eiweiße) hergestellt werden können. Somit können wir trotz nur wenig mehr Genen eine größere Zahl verschiedener Proteine (also der Moleküle, welche den Körperfunktionen und -formen zugrundeliegen) herstellen als z.B. ein Wurm.

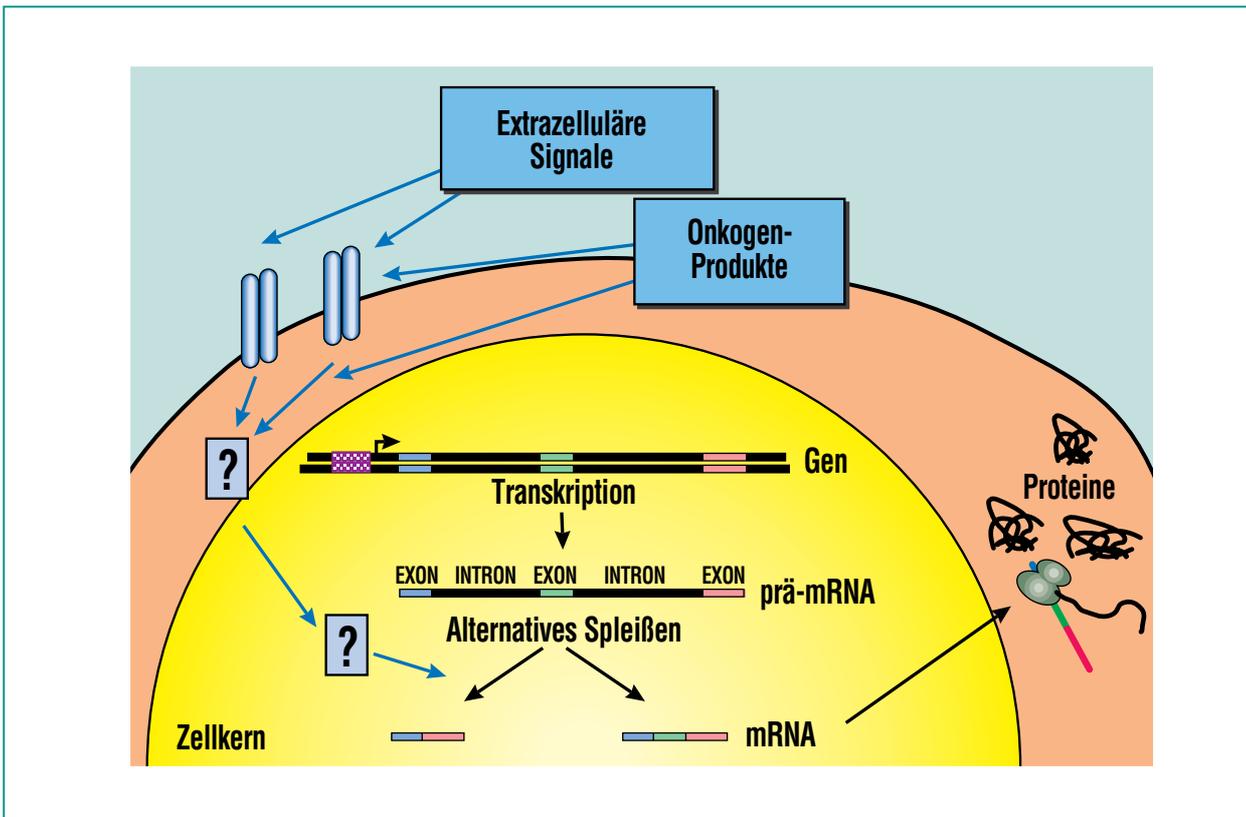
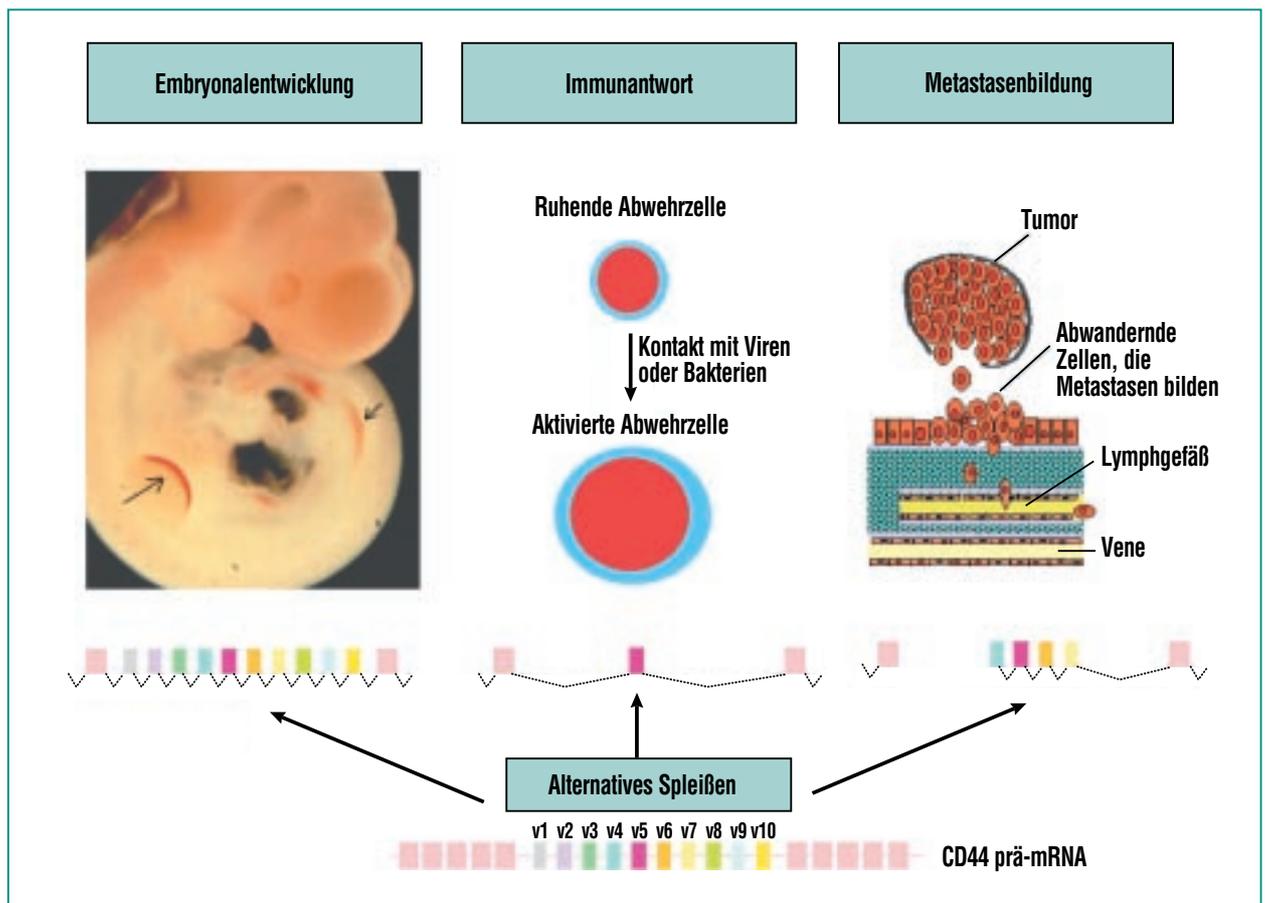


Abb. 2 : Die Information für die Herstellung eines Proteins liegt in unseren Genen nicht als kontinuierliche Informationsabfolge vor, sondern ist auf kurze Stückchen (sog. Exons) verteilt. Diese sind voneinander durch lange nicht-kodierende Genbereiche (sog. Introns) voneinander getrennt. Diese gestückelte Natur der Erbinformation bleibt bei der Abschrift (Transkription) des Gens in ein Vorläufer-Botenmolekül (prä-mRNA) zunächst erhalten. Um ein proteinkodierendes, reifes Botenmolekül (mRNA) zu erhalten, müssen die Intronbereiche herausgeschnitten und die Exonsequenzen zusammengefügt werden. Dieser Vorgang wird als Spleißen bezeichnet. In mindestens 60% aller menschlichen Gene können die proteinkodierenden RNA-Stücke (Exons) in unterschiedlicher Weise zusammengefügt werden. Hierdurch können aus einem Gen bzw. einem Vorläufer-Botenmolekül unterschiedliche mRNAs und damit Proteine (Eiweiße) hergestellt werden können. Man bezeichnet dies als alternatives Spleißen. Alternatives Spleißen wird durch instruierende Signale aus der Umgebung der Zelle oder durch zelluläre Signalmoleküle, zu denen viele Onkogen-Produkte (Produkte von Genen, deren Veränderung Zellen zu Krebszellen machen können) reguliert. Es spielt in der Embryonalentwicklung und bei der Entstehung von Krankheiten, wie neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. bestimmte Formen der Alzheimerschen Krankheit) oder Krebs eine wichtige Rolle.

steuern. Darüberhinaus wollen wir die zellulären Signalrouten finden und erforschen, die es Zellen ermöglichen Spleißmuster in Antwort auf äußere Signalstoffe oder nach Veränderung bestimmter Gene (z.B. Krebsgene) über diese Eiweißstoffe zu verändern.

Das „Modell-Gen“ mit Hilfe dessen wir solche Proteine und Signalwege finden und untersuchen wollen, ist das CD44-Gen. Es kodiert ein Zelloberflächenmolekül von dem durch alternatives prä-mRNA-Spleißen verschiedene Formen, sog. CD44-Varianten

entstehen (s. Abb. 3). Diese varianten CD44-Formen sind in der Embryonalentwicklung, bei der Immunantwort und bei der Bildung vieler bösartiger Tumore von entscheidender Bedeutung [7, 8, 9]. Die Identifizierung von Proteinen, welche alternatives



**Abb. 3 : Verschiedene Proteinformen des Zelloberflächenmoleküls CD44 entstehen durch alternatives Spleißen unter Verwendung von bis zu zehn sog. varianter Exonsequenzen (v1-v10). Die daraus resultierenden varianten CD44-Formen spielen in der Embryonalentwicklung, bei der Aktivierung körpereigener Abwehrmechanismen (Immunantwort) und bei der Entstehung von Krebsmetastasen (tödliche Tochtergeschwülste) eine wichtige Rolle.**

Spleißen von CD44 in diesen Prozessen steuern, wird es uns ermöglichen, die Rolle dieser Eiweißstoffe im Organismus zu studieren und mögliche Funktionen dieser Proteine in der Regulation anderer medizinisch relevanter Gene zu finden.

Kürzlich konnten wir einen in allen Lebewesen (außer Bakterien) vorkommenden Signalweg identifizieren (den sog. MAP-Kinase-Weg) über den Signalstoffe Spleißmuster regulieren [10]. Er wird durch das Produkt des *ras*-

Krebsgenes, einem zentralen Signalmolekül der Zelle (das in vielen Tumoren unkontrolliert aktiv ist), aktiviert und steuert Prozesse in der Embryonalentwicklung, in unseren körpereigenen Abwehrreaktionen (Immunantwort) und in der Entstehung von Tumoren [11, 12, 13]. Als weiteren entscheidenden Schritt konnten wir Eiweiße identifizieren, die an RNA-Exon-Sequenzen [14] in der Vorläufer-Boten-RNA des CD44-Gens binden [15, 16]. Eines dieser Eiweiße wird von die-

sem Signalweg direkt angesteuert (s. Abb. 4). Dabei wird es durch das zentrale Effektormolekül des MAP-Kinase-Weges chemisch verändert (phosphoryliert), wodurch das Exon für die Spleißmaschinerie zum Verbleib in der reifen Boten-(m)RNA markiert wird [16]. Damit konnte zum erstenmal ein spleißregulatorisches Protein identifiziert werden, das Signale aus der Umgebung von Zellen und bei der Krebsentwicklung aktivierte zelluläre Signalwege an die Entste-

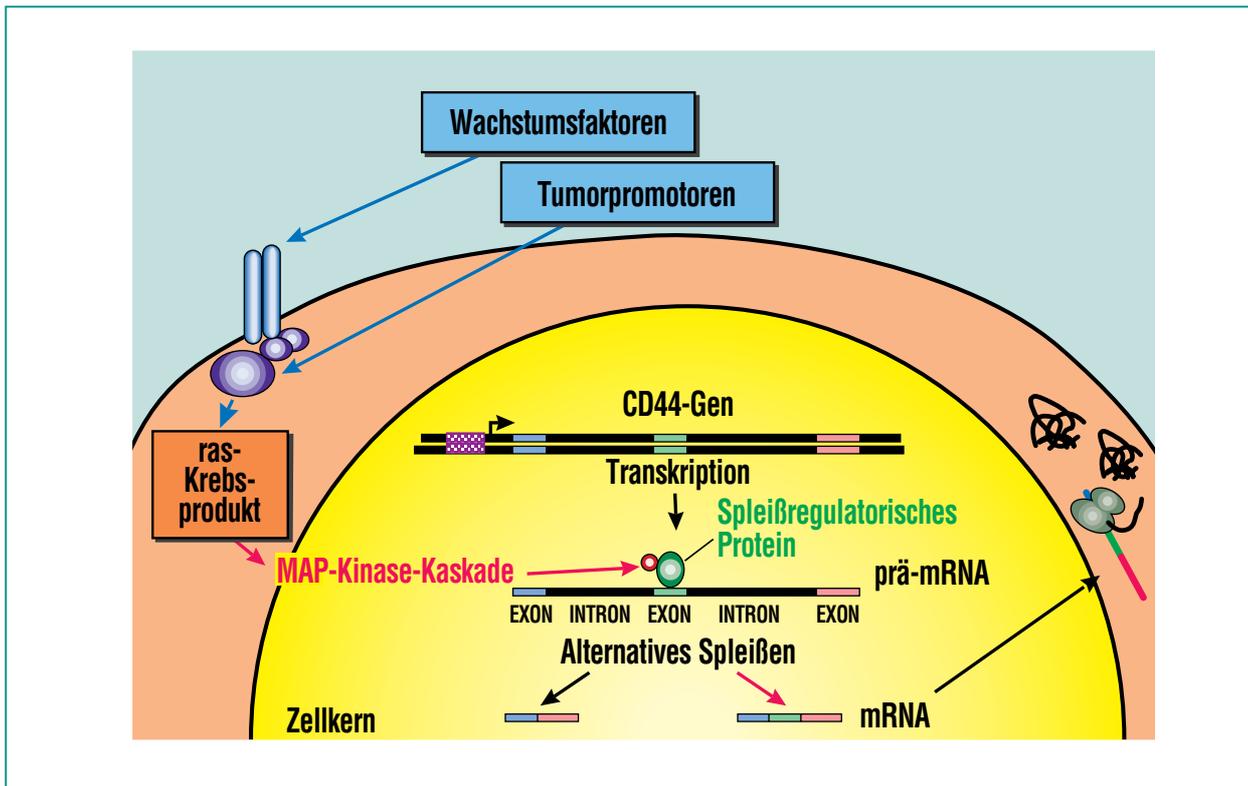


Abb. 4: Wir konnten einen in fast allen Lebewesen vorkommenden zellulären Signalübertragungsweg identifizieren (die sog. MAP-Kinase-Kaskade) über den äußere Signale wie z.B. Wachstumsfaktoren, aber auch bestimmte krebsauslösende Substanzen (Tumorpromotoren) alternatives Spleißen des CD44-Vorläufer-Botenmoleküls (prä-mRNA) regulieren. Der gefundene Signalweg beinhaltet das Produkt des *ras*-Krebsgenes, ein zentrales Signalmolekül der Zelle, welches in vielen Tumoren unkontrolliert aktiv ist. Der Signalweg spielt in der Embryonalentwicklung, in der Immunantwort und in der Tumorentstehung eine Rolle. Desweiteren konnten wir ein Eiweiß identifizieren, das an eine variante Exonsequenz im Vorläufer-Botenmolekül des CD44-Gens bindet. Es wird von der MAP-Kinase-Kaskade direkt angesteuert und chemisch verändert (phosphoryliert). Diese signal-induzierte Veränderung des spleißregulatorischen Eiweißes führt zu dessen Aktivierung und, auf noch nicht verstandene Weise, zum Verbleib des gebundenen Exons in der reifen CD44-mRNA und damit zur Bildung varianter CD44-Formen. Eine wichtige Aufgabe unserer zukünftigen Arbeit wird es sein zu verstehen wie solche signal-induzierten Veränderungen von regulatorischen Eiweißstoffen die Spleißmaschinerie aktivieren und welche Rolle solche regulatorischen Eiweißstoffe in der normalen Entwicklung des Organismus und bei der Entwicklung von Krebs spielen.

hung von Spleißvarianten koppelt. Eine solche Kopplung über eine chemische Veränderung von spleißregulatorischen Eiweißstoffen könnte ein allgemeines Prinzip für die Regulation bzw. die Veränderung von Spleißmustern in normalen und krankhaften Prozessen sein. Wichtige Aufgaben

unserer zukünftigen Arbeit werden deshalb sein zu verstehen wie solche signal-induzierten Veränderungen spleißregulatorischer Proteine die Spleißmaschinerie aktivieren und welche Rolle solche regulatorischen Eiweißstoffe im gesunden und im kranken Organismus spielen.

### Zusammenfassung

Alternatives Spleißen von Botenmolekülen ist ein wichtiger Mechanismus für die Entwicklung der biologischen Komplexität höherer Organismen und für die Herstellung von wichtigen Eiweißformen in den Zellen unse-

res Organismus. Wir haben einen zentralen zellulären Signalübertragungsweg gefunden, der die Herstellung von Metastasen-assoziierten Formen des Zelloberflächenmoleküls CD44 durch alternatives Spleißen steuert. Darüberhinaus konnten wir das erste

spleißregulatorische Eiweiß identifizieren, das auf instruierende Signale aus der Zellumgebung und auf in Krebszellen aktivierte zelluläre Signalmoleküle reagiert. Diese Entdeckung eröffnet die Möglichkeit die Rolle dieses und verwandter Eiweißstoffe im Orga-

nismus zu studieren und mögliche Funktionen dieser Proteine in der Regulation anderer medizinisch relevanter Gene zu finden.

## Literatur

- [1] *International human genome sequencing consortium. Nature 409, 860-921 (2001).*
- [2] J. C. Venter, et al. *Science 291, 1304-1351 (2001).*
- [3] P. A. Sharp, *Cell 77, 805-815 (1994).*
- [4] B. R. Graveley, *Trends Genet. 17, 100-107 (2001).*
- [5] T. A. Cooper, W. Mattox, *Am. J. Hum. Genet. 61, 259-266 (1997).*
- [6] B. K. Dredge, A. D. Polydorides, R. B. Darnell, *Nat. Rev. Neurosci. 2, 43-50 (2001)*
- [7] R. Arch, et al., *Science 257, 682-685 (1992).*
- [8] D. L. Cooper, G. J. Dougherty, *Nat. Med. 1, 635-637 (1995).*
- [9] L. Sherman, D. Wainright, H. Ponta, P. Herrlich, *Genes Dev. 12, 1058-1071 (1998).*
- [10] S. Weg-Remers, H. Ponta, P. Herrlich, H. König, *EMBO J. 20, 4194-4203 (2001).*
- [11] D. Cantrell, *Ann. Rev. Immunol. 14, 259-274 (1996).*
- [12] L. Chang, M. Karin, *Nature 410, 37-40 (2001).*
- [13] J. S. Sebolt-Leopold, et al., *Nat. Med. 5, 810-816 (1999).*
- [14] H. König, H. Ponta, P. Herrlich, *EMBO J. 17, 2904-2913 (1998).*
- [15] N. Matter, et al., *J. Biol. Chem. 275, 35353-35360 (2000).*
- [16] N. Matter, P. Herrlich, H. König, *Manuscript submitted.*

# Genetik der Tumormetastasen

J. P. Sleeman, P. Baumann, N. Novac, W.-G. Thies, A. Nestl, O. von Stein, M. Hofmann, ITG

## Einleitung

Die neuesten Statistiken für Deutschland zeigen, dass ca. eine von vier Personen an Krebs sterben wird [1]. Im Jahr 1997 belief sich die Zahl der Krebstoten auf 209.000. Jedoch wurden 338.000 neue Krebserkrankungen diagnostiziert, was klar zeigt, dass mehr als ein Drittel der Patienten nicht an ihrer Erkrankung stirbt. Warum? Die Antwort auf diese Frage wird im Falle der Hautkrebserkrankungen deutlich. Als größtes Organ des Körpers und direkt einer Reihe von schädlichen Agentien ausgesetzt, ist es nicht überraschend, dass die Hälfte aller neu diagnostizierten Fälle Hautkrebs sind. Von diesen sind ca. 80% Basalzellen- oder Schuppenzellkarzinome, die aus epidermalen Keratinozyten hervorgehen. Diese Tumore können in 95% der Fälle geheilt werden. Auf der anderen Seite tragen maligne Transformationen von Melanozyten zu nur 4% der Hautkrebsfälle bei, jedoch werden 79% der Krebstoten durch Melanome verursacht. Das auffallend unterschiedliche Resultat dieser verschiedenen Typen von Hautkrebs kann fast ausschließlich ihrem unterschiedlichen metastatischen Potential zugeschrieben werden. Zum Beispiel können Basalzellkarzinome unbehandelt zu großen, klinischen Proportionen anwachsen, metastasieren aber nur selten. Im Gegensatz dazu metastasieren Melanome sehr aggressiv, während der primäre Tumor noch klein ist. Deshalb ist die metastatische Ausbreitung von Tumorzellen letztendlich verantwortlich für die

große Mehrheit der Todesfälle durch Hautkrebs. Dies gilt auch für die meisten anderen Krebsarten. Die Pathobiologie der Sterblichkeit bei Krebs bezieht sich daher weitestgehend auf die Prozesse, die zur Bildung von Metastasen führen.

## Was ist Metastasierung?

Das Wort Metastasierung wurde vom Griechischen „meta“ Wandel und „stasis“, Stand abgeleitet. Es beschreibt die Ausbreitung von Tumorzellen von einem Tumor durch den Körper und die nachfolgende Besiedlung an sekundären Schauplätzen und das Wachstum an diesen. Der Ausdruck Metastasierung wurde zuerst von Joseph Claude Recamier benutzt, um das Wachstum von nicht in der direkten Nachbarschaft des primären Tumors wachsenden sekundären Tumoren zu beschreiben. Die Weiterentwicklung der Mikroskopie und die Entwicklung von operativen Techniken im letzten Jahrhundert führten zu den Beobachtungen, die die Basis für unsere aktuellen Vorstellungen über die zelluläre Basis der Metastasierung bilden. Während der letzten 30 Jahre hat die Anwendung molekularbiologischer Techniken in der Metastasierungsforschung viel zu diesen Grundlagen beigetragen; bis zu dem Punkt, an dem wir damit beginnen können, zelluläre und molekulare Ereignisse, die zur Metastasierung führen, zu beschreiben [2].

Tumorzellen metastasieren bei direkter Ausbreitung in Körperhöhlungen und durch den Blut- und Lymphkreislauf. Metastasie-

rung durch direkte Ausdehnung in Körperhöhlungen ist ein Charakteristikum nur weniger Tumorarten. Daher sind die zwei Komponenten des Kreislaufs, das Blut- und das Lymphsystem, die Haupttrouten über die sich die Tumorzellen ausbreiten.

Eine Kombination von zellulären und molekularen Ereignissen sind während der anfänglichen Schritte der Tumormetastasierung notwendig (Abb. 1). Die Tumorzellen müssen ihre adhäsiven Eigenschaften ändern. Sie müssen fähig sein, sich von den sie innerhalb des primären Tumors umgebenden Zellen zu lösen. Es ist auch wichtig, dass die Tumorzellen Proteasen produzieren, induzieren oder aktivieren, um Hindernisse zu überwinden, um in das darunterliegende Gewebe eindringen zu können. Tumorzellen müssen auch in der Lage sein, an neue Substrate wie zum Beispiel die Bestandteile der extrazellulären Matrix, die Basalmembran oder an andere Zellen, nämlich jene, die die Gefäße (Endothelzellen) bilden, zu binden. Sie müssen auch beweglich sein, um in das Kreislaufsystem einzudringen.

Nach Eintritt und während des Transports im Kreislaufsystem werden von den Tumorzellen auch eine Vielzahl an zellulären und molekularen Eigenschaften benötigt, um Metastasen zu bilden (Abb. 1). Im Blutstrom müssen sich die Tumorzellen an das Endothelium anheften und den Rückzug der Endothelzellen induzieren. Zusätzlich müssen sie Proteasen produzieren, induzieren oder aktivieren, die fähig sind,

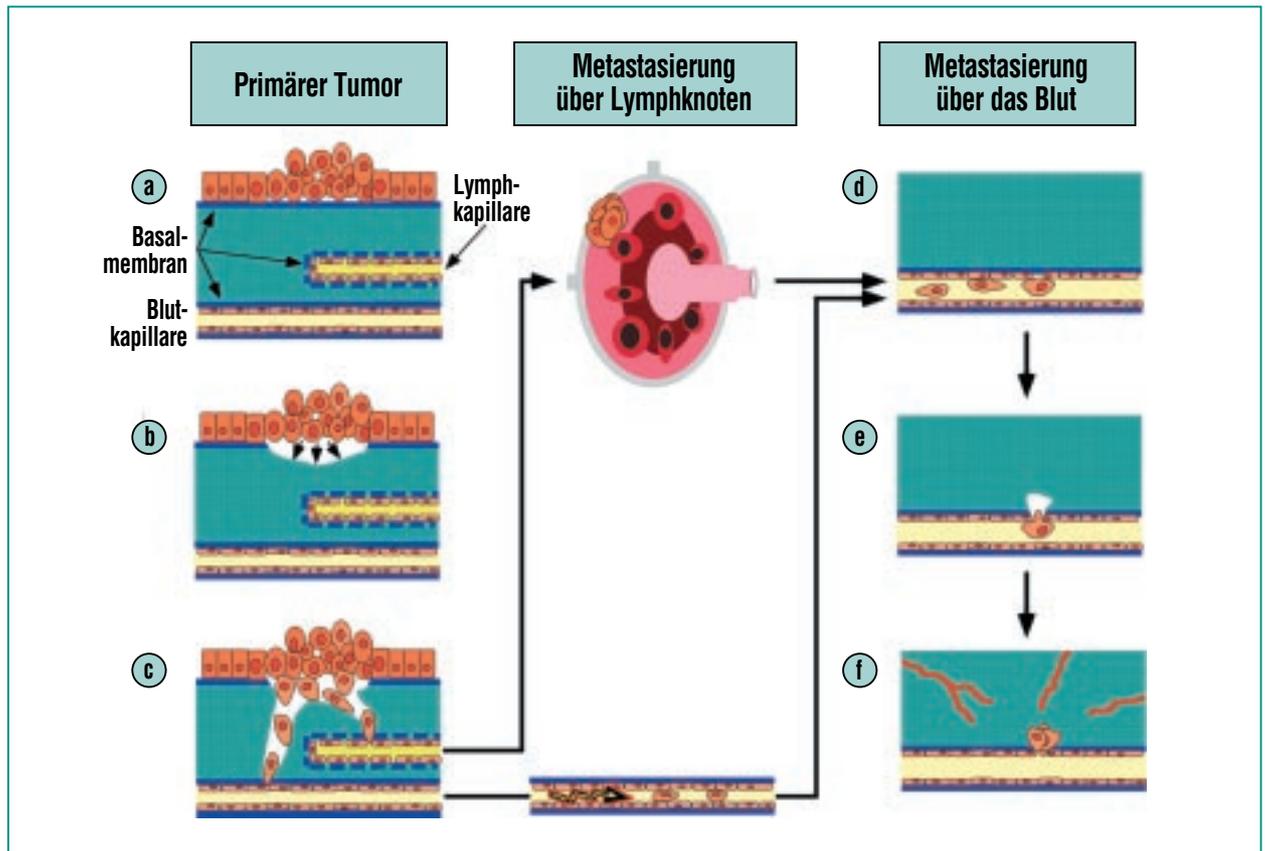


Abb. 1: Darstellung der wichtigen, während der Metastasierung auftretenden zellulären und molekularen Prozesse. Geänderte adhäsive Eigenschaften (a), die Sekretion, Induktion und Aktivierung von Proteasen (b) und der Erwerb von Bewegungsfähigkeit (c) tragen alle zum Eindringen der Tumorzellen in die Blut- oder Lymphkapillaren bei. Die losen zellulären Verbindungen und unvollständigen bzw. fehlenden Basalmembranen machen die Lymphkapillaren für die in das Kreislaufsystem eindringenden Tumorzellen zu einem einfacheren Angriffspunkt als die Blutkapillaren. Innerhalb des Lymphsystems können sich Metastasen bilden, wenn sich die Tumorzellen in den subcapsulären Sinusoiden der Lymphknoten ansiedeln. Diese Metastasen können sekundäre Ansiedelungen bilden oder über den Blutstrom in andere Organe gelangen. Die Schlüsselereignisse in der Bildung von aus dem Blutstrom hervorgehenden Metastasen sind die Adhäsion an und die Ablösung vom Endothelium (d), die Sekretion, Induktion oder Aktivierung von Proteasen zusammen mit der Bewegungsfähigkeit (e) und die Induktion von Angiogenese (f).

die darunterliegende Basalmembran abzubauen, um dann in die darunterliegenden Gewebe einwandern zu können. Andererseits sind Tumorzellen häufig nach Eindringen in die lymphatische Gefäße im Lymphknoten gefangen und bilden dort Metastasen. Wenn sich Tumorzellen an einem entfernten Ort etabliert haben,

muss es ihnen möglich sein, progressiv zu wachsen, sonst bleiben sie Mikrometastasen. Man nimmt an, dass dabei Eigenschaften, wie die Fähigkeit, Angiogenese (neue Bildung von Blutgefäße) zu induzieren oder auf lokal produzierte Wachstumsfaktoren zu reagieren, sehr wichtig sind.

**Veränderte Genexpression:  
Die treibende Kraft hinter der Metastasierung.**

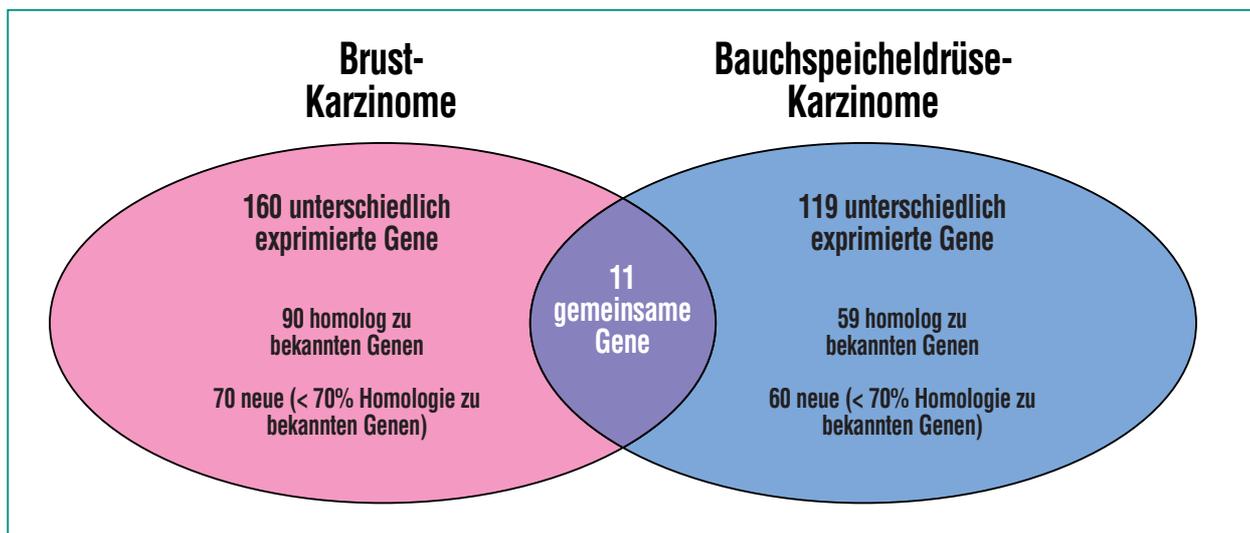
Es ist klar, dass Tumorzellen viele Eigenschaften erwerben müssen, wenn sie fähig sein sollen, zu metastasieren. Wie entstehen im primären Tumor Zellen, die die

Eigenschaft zur Metastasierung besitzen? Die Eigenschaften einer Zelle wird bestimmt durch die Gene (diskrete Abschnitte der DNA, die Einheiten von genetischer Information kodieren), die sie exprimieren. Genexpression bedeutet, dass eine Zelle die molekulare Maschinerie anschaltet, die benötigt wird, um genetische Information, die in einem Gen kodiert ist, in ein Protein umzuwandeln. Verschiedene Proteine haben verschiedene Funktionen und genau welche Reihe von Proteinen eine Zelle besitzt, bestimmt ihr Verhalten. Im Falle von Tumoren würde man somit erwarten, dass sich die Expression vieler Gene quantitativ und qualitativ verändern muss, um die Tumorzellen mit Eigenschaften auszustatten, die für den komplexen Prozess der Metastasierung nötig sind.

Es ist nicht überraschend, dass während des Studiums der Metastasierung, die differenzielle Expression einer Reihe von Genen mit einem metastasierenden Phänotypen assoziiert worden sind. Was jedoch ungeklärt bleibt ist, wie viele Gene genau ihr Expressionsmuster verändern, wenn Tumorzellen die Fähigkeit entwickeln zu metastasieren. Mehr noch ist irgend eines dieser Gene absolut notwendig für die Ausbildung von Metastasen, oder kann die gleichen Eigenschaften, die notwendig für Metastasierung ist, durch einige verschiedene Gene oder Gengruppen besorgt werden? Bis zu welchem Ausmaß werden Gene, die keine Rolle in der Metastasierung spielen, während der Entwicklung in einen metastasierenden Phänotypen, hochreguliert? Um Antworten auf diese wichtigen Fragen zu finden,

wäre es nötig, das Repertoire von Genen, die spezifisch in metastasierenden Zellen, aber nicht in ihren nicht-metastasierenden Genstücken exprimiert werden, zu beschreiben und zu vergleichen.

Unterschiedliche Testmethoden sind verwendet worden, um Gene zu überprüfen, die während des Fortschreitens zu metastatischer Kompetenz hoch- und herunterreguliert werden und jede dieser Studien hat ein oder mehrere solcher Gene identifiziert. Keine dieser Studien war jedoch fähig, die Unterschiede in den Genexpressionsprofilen von metastasierenden im Vergleich zu nicht-metastasierenden Zellen effektiv und vollständig zu analysieren. Wir haben uns dieser Frage zugewendet, indem wir die Suppression Subtractive Hybridisation



**Abb. 2:** Zusammenfassung der Gene, die durch SSH identifiziert wurden, welche unterschiedlich in metastasierenden Zellen im Vergleich zu ihren verwandten, nicht metastasierenden Zellen exprimiert sind. Im Brustkarzinom-SSH-Test wurden MTPa-Zellen (nicht-metastatisch) mit MTLy-Zellen (metastatische Zellen) verglichen. Im Bauchspeicheldrüsekarzinom-SSH-Test wurden 1AS-Zellen (nicht metastatisch) mit ASML (metastatische Zellen) verglichen. Insgesamt wurden 268 unterschiedlich exprimierte Gene identifiziert, von denen 11 in beiden Brust- und Bauchspeicheldrüsekarzinom-SSH-Tests nachgewiesen wurden. Für weitere Details siehe [3].

(SSH) verwendeten, in der Erwartung vollständiger die globalen Veränderungen der Genexpression beschreiben zu können, die sich ereignen, wenn Tumore metastatische Eigenschaften entwickeln [3]. Speziell verglichen wir die Genexpressionsprofile von genetisch verwandten metastatischen und nicht-metastatischen Zellen.

Unsere SSH-Tests weisen darauf hin, dass der genetische Hintergrund der Tumormetastasierung ziemlich komplex ist (Abb. 2). Wir isolierten 268 unabhängige, unterschiedlich exprimierte Gene, zirka die Hälfte von ihnen sind bereits bekannte Gene (vollständige Information über diese Gene sind erhältlich unter <http://igtmv1.fzk.de/www/itg/sleeman/sleeman.html>). Die Expression einiger dieser bekannten Gene, ist schon mit Metastasierung assoziiert worden. Die verbleibenden Gene, die wir isoliert haben, sind neue vorher nicht publizierte Sequenzen. Nur 11 dieser Gene wurden in beiden SSH-Tests isoliert und somit wurde die Mehrzahl der Gene in nur einem der Tests, aber nicht in dem anderen, isoliert. Als wir jedoch zufällig die Expression der Gene überprüfen, die in nur einem der SSH-Tests isoliert wurden, wurde beobachtet, dass eine große Anzahl von ihnen differentiell in Metastasen verwandten Brust- und Bauchspeicheldrüsenkarzinom-Modellen exprimiert sind [3]. Dies weist auf zwei Dinge hin. Erstens: der Vorrat an Genen, die differentiell in Brust- und Bauchspeicheldrüsenkarzinom-Modellen exprimiert werden, ist viel größer als die 11 Gene, wel-

che in beiden SSH-Tests isoliert wurden. Zweitens: die Anzahl von Genen, die unterschiedlich in den von uns verwendeten metastasierenden und nicht-metastasierenden Zellen exprimiert sind, müssen bedeutend höher sein als die 268 unabhängigen Sequenzen, die wir erhalten haben.

### Warum verändert sich das Genexpressionsmuster in Tumoren?

Unsere Daten zeigen, dass während des metastatischen Fortschreitens viele Gene ihr Expressionsmuster verändern. Genomische Instabilität ist möglicherweise die genetisch treibende Kraft hinter diesen Veränderungen. Die Genome von Tumorzellen sind instabil, aufgrund von Mutationen und dem Ausfall von Genen wie z.B. p53, die eine entscheidende Rolle spielen in der Zellantwort auf DNA-Zerstörung. Dies hat zur Folge, dass Zellen mit geschädigter DNA überleben und proliferieren, mit der Gefahr, dass Veränderungen bestehen und/oder Gene amplifiziert werden. Diese Mutationen und chromosomalen Veränderungen, die so entstehen, sind zellspezifisch und werden in einem sich entwickelnden Tumor zu einem heterogenen Genexpressionsmuster führen. Während der Tumorausbreitung werden nur solche Tumorzellen die zahlreichen Selektionsdrücke überleben und zu progressiven sekundären Tumoren wachsen, die Veränderungen in der Genexpression erworben haben, die ihnen Eigenschaften verleihen, die sie für die Metastasierung benötigen. Viele Veränderungen in der Genexpression,

die aus genomischer Instabilität resultieren, haben jedoch keine funktionelle Relevanz für die Metastasierung, da in Folge der genomischen Instabilität nicht nur das Expressionsmuster der Gene verändert wird, die relevant für Metastasierung sind, sondern auch Gene, welche keine oder eine nur untergeordnete Rolle in der Metastasierung haben. Mehrnoch, nicht alle Gene, die unterschiedlich in metastasierenden Zellen exprimiert werden, sind tatsächlich notwendig für den Prozess der Metastasierung.

### Welche der Gene, die wir identifiziert haben, sind wichtig für die Metastasierung?

Um solche Gene zu identifizieren, die die stärkste Relevanz in Bezug auf Metastasierung besitzen, haben wir eine Vielzahl von Testmethoden verwendet. Erstens, haben wir Northern Blots verwendet, um solche Gene zu identifizieren, deren Expression in vielen Tumormodellen mit Metastasierung assoziiert ist. Zu solchen Genen zählen CD24 und das ribosomale Protein S7 [3]. Wir haben gezeigt, dass CD24 und S7 auch in humanen metastasierenden Tumoren hochreguliert sind. Ihre funktionelle Bedeutung für die Metastasierung wird gerade durch Geninaktivierung und durch ecotopische Expression getestet. Zweitens, verstärkte Beweglichkeit ist oft eine Eigenschaft von metastatischen Zellen, deshalb haben wir in unseren Tests auch nach Genen gesucht, die in aktivierten Lymphozyten und in Makrophagen (bewegliche Zellen des Immunsystems) exprimiert sind. Da-

---

---

bei identifizierten wir das unmittel-  
bar frühe Gen Pip92 und ein neu-  
es Gen, welches bis jetzt noch  
nicht beschrieben ist. Wiederum  
waren diese Gene in bestimmten  
humanen Tumoren hochreguliert  
und momentan überprüfen wir, ob

ihre Expression eine wichtige  
Funktion für Metastasierung be-  
sitzt. Weiterführende Studien mit  
unseren Genen, die mit Metasta-  
sierung assoziiert sind, werden  
weitere wichtige Einblicke in die  
genetischen Grundlagen der Tu-

mormetastasierung geben und  
vielleicht Zielobjekte für therapeu-  
tische Ansätze in der Metastase-  
nerkrankung identifizieren.

## Literatur

- [1] *Deutsche Krebshilfe.*  
Siehe [http://www.krebshilfe.de/  
neu/medieninfos/stat.html](http://www.krebshilfe.de/neu/medieninfos/stat.html)
- [2] J.P. Sleeman,  
*The lymph node as a bridgehead in  
the metastatic dissemination of  
tumors.*  
*Recent Results Cancer Res 2000;*  
*157: 55-81*
- [3] A. Nestl, O.D. von Stein, K. Zatloukal,  
W.-G. Thies, P. Herrlich, M. Hofmann,  
J.P. Sleeman ,  
*Gene expression patterns associated  
with the metastatic phenotype in  
rodent and human tumors.*  
*Cancer Res 2001; in press*

---

# Stop or Go – CD44 als Regulator essentieller zellulärer Entscheidungen

H. Ponta, V. Orian-Rousseau, L. Chen, H. Morrison, P. Herrlich, ITG

Ein Schalter: Ein/Aus – das ist uns geläufig. Das gibt es nicht nur bei technischen Geräten, sondern auch in menschlichen Zellen. Eine Immunantwort muss angestellt und später wieder abgestellt werden. Wir mobilisieren Glukose in der Leber, wenn wir Energie für einen Marathonlauf benötigen, und schalten die Freisetzung ab, wenn wir es endlich geschafft haben und uns von den Strapazen erholen. Aber es gibt bei technischen Geräten auch kompliziertere Schalter, denken wir an den Programmschalter bei Radio- oder Fernsehgeräten, der uns erlaubt, zwischen verschiedenen Programmen zu wählen. Wir haben einen solchen biologischen Schalter, der unterschiedliche genetische Programme ansteuert, identifiziert. Seine Funktion wird hier geschildert.

Es ist nun schon 15 Jahre her, dass uns der damalige Mitarbeiter des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg, Prof. Siegfried Matzku, mit seinen Anstrengungen, metastatische Tumoreigenschaften zu identifizieren, konfrontierte. Daraus wurde eine Kollaboration und schließlich ein Projekt mit dem Ziel, Proteine zu identifizieren, die entscheidende Funktionen im Prozess der Metastasierung von Tumorzellen ausüben. Nach anfänglichen Fehlschlägen haben wir schließlich mit der Beschreibung eines der ersten metastasenspezifischen Proteinen mit dem Namen CD44v in der Metastasenforschung einen entscheidenden Durchbruch erzielt [1]. Ein Indikator für die Bedeutung von CD44 ist die Publikationsstätigkeit seit unserer Erst-Beschreibung, die exponentiell zugenommen hat und inzwischen bei mehr als 5.000 Artikeln liegt. Ein wesentlicher Grund für dieses breite Interesse liegt im Bedarf an geeigneten Metastasenmarkern, die für Diagnose und/oder Therapie eingesetzt werden können. Die ersten klinischen Studien zum Einsatz von Antikörpern, die spezifisch menschliche CD44v Proteine erkennen, laufen bereits seit einem Jahr und scheinen erfolgversprechend zu sein.

Eines unserer zentralen Ziele nach der Identifizierung von CD44v als metastasenspezifisches Protein war, seine Funktion in diesem Prozess zu verstehen. Dass dies ein schwieriges Unterfangen wurde, hängt mit drei Faktoren zusammen. Zum einen konnten wir aus der Primärsequenz, also der Abfolge von Aminosäuren, die das Protein aufbauen und die wir aus der Nukleotidsequenz ableiten konnten, keine Schlüsse auf seine Funktionen ziehen, etwa auf Grund ähnlicher Sequenzen mit Proteinen, deren Funktion man bereits kennt. Die Primärsequenz ließ lediglich den Schluss zu, dass es sich um ein Transmembranprotein handelt, mit einem intrazellulären, zytoplasmatischen Proteinanteil, einem Transmembranabschnitt und einem relativ großen extrazellulären Proteinanteil (Abb. 1). Zum anderen ist der Metastasierungsprozess äußerst komplex: Tumorzellen müssen aus dem Primärtumor absiedeln, durch Bindegewebe wandern, in Lymph- oder Blutgefäße eindringen, wieder auswandern und in neuem Gewebe überleben und wachsen. In all diesen Schritten,

die in der Summe nur im Tier nachvollzogen werden können, kann CD44v wichtig und entscheidend sein. Und schließlich ist CD44v die Umschreibung eines komplexen Tatbestandes. CD44v bezeichnet nämlich eine ganze Familie von Proteinen, die aus der Kombination von 10 Genabschnitten durch einen Prozess, den man „alternatives Spleißen“ bezeichnet, hervorgehen (siehe den Beitrag von Harald König). Nur einige der Proteine dieser CD44v Familie sind an der Metastasierung beteiligt, andere haben wahrscheinlich Funktionen in anderen physiologischen oder pathologischen Prozessen. Das bedeutet aber, dass unterschiedliche Funktionen durch die unterschiedlichen CD44v's ausgeübt werden. Da aber die meisten Tumorzellen mehrere CD44v's tragen, fällt die Analyse und Zuordnung schwer.

Ein entscheidender Durchbruch bezüglich der Funktion von CD44v gelang über die Kartierung von CD44v in normalem Gewebe. Die Lokalität suggerierte Funktionen. Als prominentestes Vorkommen von CD44v's fiel der Übergang von epitheliale zu mesenchymalem Gewebe ins Auge. Während der Embryonalentwicklung tragen zum Beispiel die Randleistenzellen im Gliedmaßenfeld CD44v. Die Funktion dieser Randleistenzellen (epitheliale Zellen) besteht darin, dass darunterliegende (mesenchymale) Zellen zur Vermehrung und damit zur Ausbildung einer Gliedmaßenknospe angeregt werden. Wenn man die Funktion von CD44v auf diesen Randleistenzellen (durch inhibierende Anti-

36

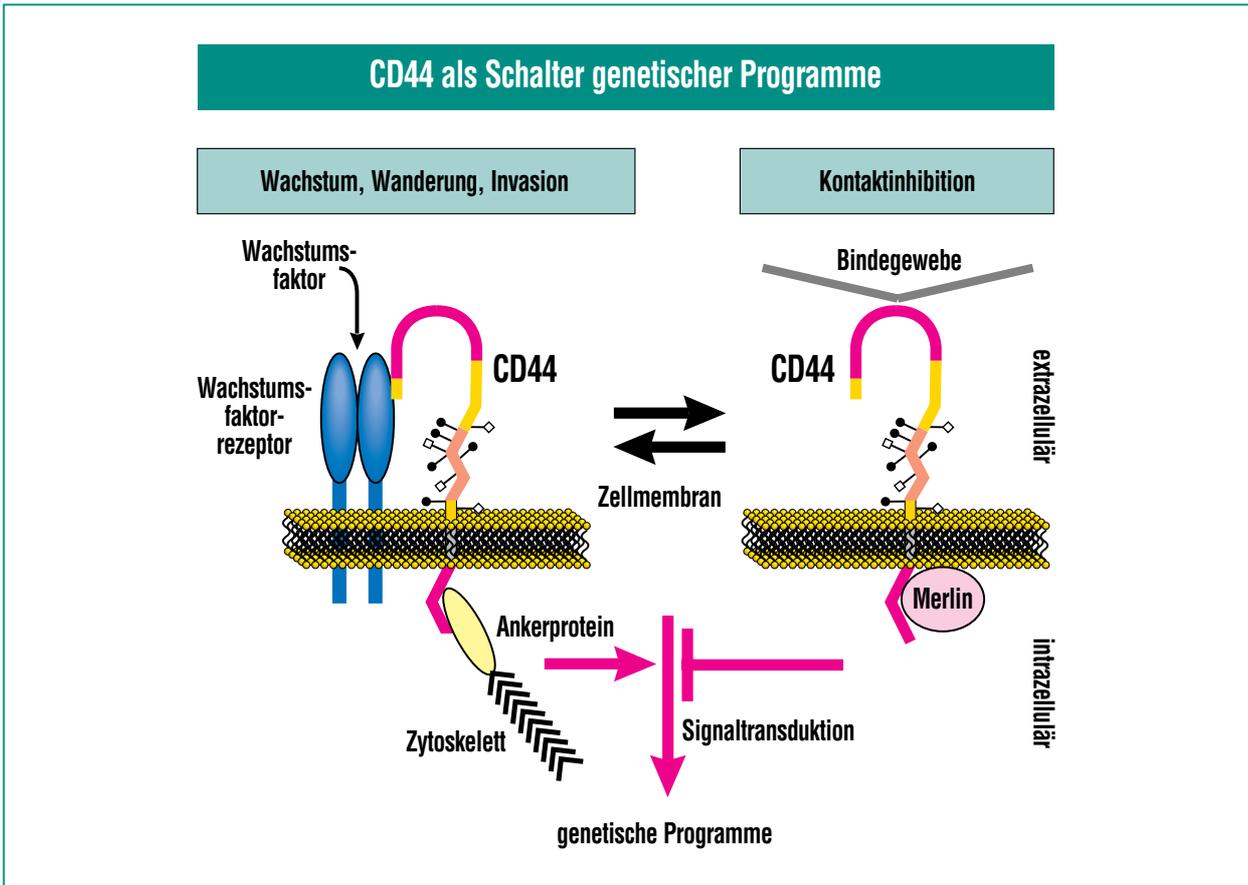


Abb. 1: Schematische Darstellung der Funktion von CD44 als Korezeptor und Vermittler von Kontaktinhibition. Das Bild zeigt einen Ausschnitt aus einer Zelle. Der Extrazellulärbereich ist vom Intrazellulärbereich (Zytoplasma) durch eine Zellmembran (Lipiddoppelschicht) getrennt. In der Zellmembran sind Transmembranproteine verankert. CD44 ist als buntes, ein Wachstumsfaktorrezeptor ist als blaues Transmembranprotein dargestellt. Die meisten Wachstumsfaktorrezeptoren kommen als Dimere vor. Die schwarzen „Seitenketten“ an CD44 symbolisieren Zuckerketten. Der linke Teil der Abbildung zeigt CD44 als Teil eines ternären Komplexes, der zur Aktivierung von Signalketten führt. Die Signalketten gehen vom Wachstumsfaktorrezeptor aus (sie sind nicht gezeigt). Die Aktivierung der Signalketten setzt Bindung eines „Ankerproteins“ an CD44 voraus, das das Zytoskelett (Aktinfilamente) an die Membran verankert. Der rechte Teil zeigt den Konformationszustand von CD44 (der Übergang ist durch die schwarzen Pfeile dargestellt), der nach Bindung einer Bindegewebssubstanz zur Rekrutierung von Merlin führt. Merlin unterbindet Signaltransduktion, weshalb die genetischen Programme für Zellvermehrung, Wanderung und Invasion nicht aktualisiert werden können.

körper) inaktiviert, können sich die mesenchymalen Zellen nicht mehr vermehren. In aufwendigen Experimenten, in denen wir diesen Wachstumsstimulus im Reagenzglas nachgestellt und so der Manipulation und Analyse zu-

gänglich gemacht haben, konnten wir die Funktion von CD44v in diesem Prozess entschlüsseln: Die mesenchymalen Zellen tragen auf ihrer Oberfläche einen Wachstumsfaktorrezeptor, der über die Bindung eines Wachs-

tumsfaktors aktiviert werden muss, damit es zur Zellvermehrung kommt. Dieser Wachstumsfaktor wird von den Randleistenzellen produziert. Er kann nun aber nicht direkt an seinen Rezeptor binden, sondern benötigt

die Hilfe eines zweiten Proteins, CD44v, das ihn dem Rezeptor in geeigneter Form anbietet. Auch die molekularen Details dieser Ko-Rezeptorfunktion wurden von uns aufgedeckt [2]. Es ist eine spezifische Modifikation von CD44v durch Zuckerseitenketten (Heparansulfat), die eine entscheidende Rolle spielt. Damit war es das erste Mal gelungen, den Beitrag eines CD44v Proteins zum Mechanismus eines physiologischen Prozesses funktionell zu verstehen.

Dieser Erfolg legte die Überlegung nahe, dass CD44v vielleicht auch auf metastasierenden Tumorzellen eine ähnliche Ko-Rezeptorfunktion erfüllen könnte. Natürlich sind die Gegebenheiten auf Tumorzellen gänzlich andere als im Gliedmaßenfeld. Der Rezeptor und sein Ko-Rezeptor (CD44v) müssten auf der gleichen Zelle vorkommen. Außerdem sind die CD44v-Proteine, die in der Metastasierung wichtig sind, andere als diejenigen, die auf den Randleistenzellen vorkommen. Andererseits gibt es viele unterschiedliche Wachstumsfaktorrezeptoren (und entsprechend Wachstumsfaktoren), deren Aktivität durchaus durch unterschiedliche Mechanismen reguliert werden könnte. Ein Rezeptor an der Oberfläche, der Zellwanderung, Invasivität, Vermehrung beeinflusst, könnte der richtige Kandidat für die Wirkweise von CD44v sein. Aus Daten eines U.S. Labors (van der Woude) und des Max Delbrück Zentrums in Berlin (Carmen Birchmeier) ist ein solcher Rezeptor plausibel: cMet. cMet kommt einerseits auf den metastasierenden Tumorzellen,

auf denen wir ursprünglich CD44v identifiziert hatten, vor und wird andererseits auf Dickdarmtumoren vermehrt produziert, für die das Auftreten von CD44v ein Indikator für aggressives Wachstum und Metastasierung ist. Für eine humane Dickdarmzelllinie war ein Beitrag von CD44v zur Metastasierung von einer anderen Arbeitsgruppe dokumentiert worden.

Tatsächlich war in beiden Zelllinien die Aktivierung des cMet-Rezeptors völlig von der Präsenz von CD44v abhängig. Der Mechanismus, wie CD44v in die cMet-Aktivierung eingreift, unterscheidet sich allerdings wesentlich von demjenigen der Gliedmaßenentwicklung. Auf den Tumorzellen ist es ein CD44v, das nicht durch Heparansulfat modifiziert ist und es findet keine Präsentation von Zelle zu Zelle statt. Vielmehr bildet CD44v mit cMet und seinem Liganden einen ternären Komplex, über den erst die Aktivierung des cMet-Rezeptors erfolgen kann. Wie sich dieser Komplex bildet und welche Proteinteile von CD44v und des cMet-Rezeptors und seines Liganden genau für die Ausbildung des Komplexes benötigt werden, ist Teil unserer gegenwärtigen Untersuchungen. Diese Untersuchungen sind auch von direkter praktischer Relevanz, weil man aus dem Wissen die genaue Interaktion mit niedermolekulare Moleküle ableiten kann, die diese Interaktion verhindern und so vielleicht die Metastasierung blockieren können.

Es genügt natürlich nicht, dass ein Wachstumsfaktorrezeptor an der Zelloberfläche aktiviert wird,

damit die Zelle sich vermehrt oder Wanderung und Invasion ausgelöst wird. Vielmehr muss das Signal – Aktivierung des Rezeptors – in den Zellkern gelangen, wo das genetische Programm auf Vermehrung etc. umgeschaltet wird. Diese „Signaltransduktion“ erfolgt über eine Reihe von intrazellulären Proteinen, die ein Netzwerk von Verschaltungen bildet. Eine Komponente nach der anderen wird aktiviert (in den meisten Fällen durch Modifikation durch Phosphorylierung). Am Ende des Netzwerks wird ein Kernprotein aktiviert, das je nach Rezeptor die Regulation von Genen steuert, welche Zellbeweglichkeit, Wanderung, Invasivität oder Vermehrung bewirken. Die Signaltransduktionskaskade, ausgehend vom aktivierten cMet-Rezeptor, ist gut bekannt. Welche Rolle spielt dabei CD44v? Für die cMet-Aktivierung genügte eine CD44v-Mutante, welche nur die extrazellulär-liegende Domäne enthält. Ein solches Protein reicht aus, um den ternären Komplex zu bilden. Eine Überraschung erlebten wir, als wir die vom aktivierten cMet-Rezeptor ausgelöste Signalkaskade untersuchten. In der durch die CD44v-Mutante ausgelösten cMet-Rezeptor-Aktivierung brach die Signalweiterleitung ab und das Signal gelangte nicht in den Kern. Dies bedeutet, dass CD44v noch eine zweite Rolle in der cMet-Signalkette spielt, für die der intrazelluläre Teil von CD44v benötigt wird. Wir nehmen an – und testen dies –, dass an die intrazelluläre Domäne von CD44v ein Protein binden muss, über das dann die Signalkaskade läuft. Ein wahrscheinlicher Kandidat ist

ein Protein, das das Zytoskelett der Zelle an der Zellmembran über Bindung an Transmembranproteine wie CD44 verankert (Abb.1). Eine Mutante von CD44v, in der diese Bindefähigkeit gestört ist, kann ebenfalls das Signal nicht weiterreichen, wie die Mutante ohne intrazelluläre Domäne, ein Indiz, dass die Bindung des „Ankerproteins“ entscheidend für die Signalweiterleitung ist.

Die Ko-Rezeptorfunktion von CD44v für Wachstumsfaktorrezeptoren wie cMet, die Zellwanderung und Invasivität vermitteln, könnte eine gute Erklärung bieten, warum CD44v auf metastasierenden Tumorzellen vorkommt. Interessanterweise gibt es aber Tumore, z. B. Neuroblastome, Prostatakarzinome, einige Lymphome, in denen CD44 die genau gegenteilige Rolle zu spielen scheint: Diese Tumore entwickeln sich nur, wenn CD44 nicht auf den Zellen vorkommt. Man bezeichnet solche Gene, deren Genprodukte (Proteine) auf Tumoren abwesend sein müssen, damit sich der Tumor entwickelt, als Tumorsuppressorgene. In einer menschlichen Erbkrankheit namens Neurofibromatose Typ II (NFII) kommt es bei den betroffenen Patienten zum Auftreten von Tumoren des Nervensystems, überwiegend sogenannte „Schwannome“. In diesen Tumoren ist das Tumorsuppressorgen Merlin nicht mehr aktiv (siehe oben). Folgerichtig führt die Aktivierung von Merlin in diesen Tumorzellen zur Unterdrückung der Krebsbildung. Die Verbindung zu CD44 besteht nun darin, dass Merlin, ähnlich dem

„Ankerprotein“, an Transmembranproteine binden kann. Wir untersuchten zwei Fragen: 1. Kann Merlin auch an CD44 binden? 2. Wenn ja, ist diese Bindung für die tumorsuppressive Wirkung von Merlin wichtig? Das Bild, das diese Untersuchungen lieferten, ist folgendes [3]: Merlin kann tatsächlich, ähnlich dem „Ankerprotein“, an CD44 binden, allerdings nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen, nämlich dann, wenn die Zellen „ausreichend dicht“ in Kultur gewachsen sind. Dann werden Phosphatmodifikationen am Protein entfernt, Merlin bindet an CD44 und unterbricht die Signaltransduktion in der Zelle. Als Konsequenz wird das genetische Programm der Zelle zur Vermehrung nicht aktiv und die Zelle stoppt ihr Wachstum. Diesen Prozess bezeichnet man als Kontaktinhibition – ein Vorgang, dem Krebszellen nicht mehr unterliegen, sie können „unkontrolliert“ wachsen. Woher „wissen“ die Zellen, dass sie dicht gewachsen sind (im Tier ist dies wahrscheinlich das Erkennen von Gewebegrenzen)? Auch hier spielt CD44 die entscheidende Rolle. Eine Komponente, die an den extrazellulären Teil von CD44 binden kann, ist eine Bindegewebssubstanz. Die Konzentration dieser Substanz, die von den Zellen selbst produziert wird, ist entscheidend. Ist diese Konzentration hoch genug (bei hoher Zelldichte), besetzt diese Substanz alle CD44-Proteine, die Bindung führt zu Konformationsänderung von CD44, in der Folge zur Bindung von Merlin etc., siehe oben. Über diesen Mechanismus könn-

te CD44 als Tumorsuppressor wirken.

Wenn Merlin in Zellen nicht produziert wird (z.B. in NFII-Patienten), dann ist klar, dass Kontaktinhibition nicht funktioniert und die Zellen zu Tumorzellen entarten können. In vielen Tumorzellen wird aber Merlin produziert, trotzdem unterliegen sie nicht der Kontaktinhibition und sind transformiert. Warum? Eine Erklärung könnte darin liegen, dass in normalen Zellen bei Erreichen von „dichtem Wachstum“ Merlin nicht nur über Bindung an CD44 aktiviert wird, sondern auch die Mengen an Merlin in der Zelle um das Drei- bis Vierfache ansteigt. In Tumorzellen bleibt die Merlinkonzentration immer auf niedrigem Niveau. Zu verstehen, wie diese Mengenregulation von Merlin erfolgt, könnte ein Schlüssel dafür sein, die tumorsuppressive Wirkung von Merlin in Tumorzellen zu aktivieren und dadurch deren Wachstum zu hemmen.

Jüngste Untersuchungen einer amerikanischen Arbeitsgruppe (McClatchey) zeigen, dass Merlin nicht nur entscheidend für die Krebsentstehung, sondern auch für die Bildung von Metastasen ist. In Mäusen, in denen das NF2-Gen verändert ist und die kein Merlin bilden können, entwickeln sich nicht nur mehr Tumore, sondern diese Tumore wachsen wesentlich aggressiver und bilden vermehrt Metastasen. In diesem Sinne könnte Merlin im Zusammenwirken mit CD44 als „Metastasensuppressor“ wirken.

CD44 kontrolliert also gegensätzliche Prozesse in der Zelle (Abb. 1). Einerseits Vermehrung, Wan-

derung und Invasivität der Zellen (was zum Beispiel während der Embryogenese oder während der Wundheilung wichtig ist), als Ko-Rezeptor für Wachstumsfaktorrezeptoren. Andererseits Vermehrungsstopp und Wanderungsarrest (wenn Gewebegrenzen erreicht sind oder Zellen in vitro dicht genug gewachsen sind)

durch Bindung einer Bindegewebssubstanz und Rekrutierung von Merlin. Wenn einer der Mechanismen aus dem Lot gerät, kann es zur Tumorentstehung und Metastasierung kommen. Die molekularen Details dieser beiden Prozesse werden uns zeigen, an welchen Stellen in transformierten Zellen am einfachsten

Umpolung zur „Normalität“ in einer Tumorzelle erreicht werden kann und so das Tumorwachstum und Absiedlung von Metastasen gehemmt oder sogar unterbunden werden kann.

## Literatur

- [1] U. Günthert, M. Hofmann, W. Rudy, S. Reber, M. Zöller, I. Haußmann, S. Matzku, A. Wenzel, H. Ponta, P. Herrlich, *A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells.* *Cell* 65, 13-24 (1991).
- [2] L. Sherman, D. Wainwright, H. Ponta, P. Herrlich, *A splice variant of CD44 expressed in the apical ectodermal ridge presents fibroblast growth factors to limb mesenchyme and is required for limb outgrowth.* *Genes Dev.* 12, 1058-1071 (1998).
- [3] H. Morrison, L. S. Sherman, J. Legg, F. Banine, C. Isacke, C. A. Haipek, D. H. Gutmann, H. Ponta, P. Herrlich, *The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44.* *Genes Dev* 15, 968-80 (2001).

# Warum scheitert die Antihormontherapie bei fortgeschrittenem Prostatakrebs?

A. C. B. Cato, L. Shatkina, A. Nestl, ITG; S. Mink, G2M Cancer Drugs AG

## Einleitung

In den letzten Jahren hat die Diagnose „Prostatakrebs“ in der westlichen Welt beständig zugenommen. Heute stellt das Prostatakarzinom die zweithäufigste, zum Tode führende Krebsart bei Männern dar [1]. Die Anfangstherapie besteht gewöhnlich in einer Entfernung der Prostata oder einer Bestrahlung, um die entarteten Zellen zu entfernen, die sich immer noch eingekapselt in der Prostata befinden. Während solche, lediglich auf die Prostata beschränkten Tumore durch eine Operation erfolgreich behandelt werden können, ist das fortgeschrittene oder metastasierende Prostatakarzinom nur durch eine lindernde Hormontherapie zu behandeln. Diese Behandlung basiert auf der seit 1941 bestehenden Erkenntnis, dass die Reduzierung der im Blut zirkulierenden Testosteronmenge die Krankheitssymptome bei Prostatakrebspatienten abschwächt [2]. Ursprünglich wurde diese Verringerung der Testosteronmenge durch eine operative Kastration erreicht (beidseitige Entfernung der Hoden). Später wurden andere, chemische Arten der Kastration eingeführt, die keine Operation erforderlich machten. So kam es zum Einsatz von Diethylstilbesterol oder Östrogenen, um über den Hypothalamus die Ausschüttung des luteinisierenden Hormons (LH) in der Hypophyse zu verhindern [3]. Das luteinisierende Hormon regt beim Mann die Bildung von Testosteron in den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens an. Diese Behandlung hatte allerdings gravierende Nebenwirkungen; in erster Linie ein erhöh-

tes Risiko für Thrombosen und Infarkte [4, 5]. Daher setzte man später Peptide als verträglichere Mittel zur chemischen Kastration ein. Ähnlich wie die operative, blockiert die chemische Kastration aber nur die Ausschüttung von Testosteron im Hoden; sie verhindert jedoch nicht die Ausschüttung von Dehydroepiandrosteron oder Dehydroepiandrosteron-sulphat in der Nebenniere [6].

Bis zu 40% des Dihydrotestosterons in der Prostata kommt aber aus den Nebennieren. Dies bedeutet, dass eine kombinierte Therapie eingesetzt werden muss, um die Aktivität der männlichen Geschlechtshormone, die auch Androgene genannt werden, vollständig zu hemmen. Dieses Konzept einer totalen

Blockade der Androgene beinhaltet die Kombination aus operativer oder chemischer Kastration mit Antiandrogenen [7]. Androgene binden normalerweise in der Zelle an ein spezialisiertes Protein, das ihre Wirkung vermittelt und Androgenrezeptor genannt wird. Antiandrogene sind Moleküle, die eine ähnliche Struktur haben wie die Androgene, ebenfalls an den Androgenrezeptor binden können aber die Aktivierung des Androgenrezeptors durch Androgene verhindern. Dies bedeutet, dass die Androgenwirkung nicht weitervermittelt werden kann.

Die heute verfügbaren Antiandrogene sind Cyproteronacetat (CPA), Hydroxyflutamid, Nilutamid und Bicalutamid (Casodex) (Abb. 1). Diese hemmen die Aktivität al-

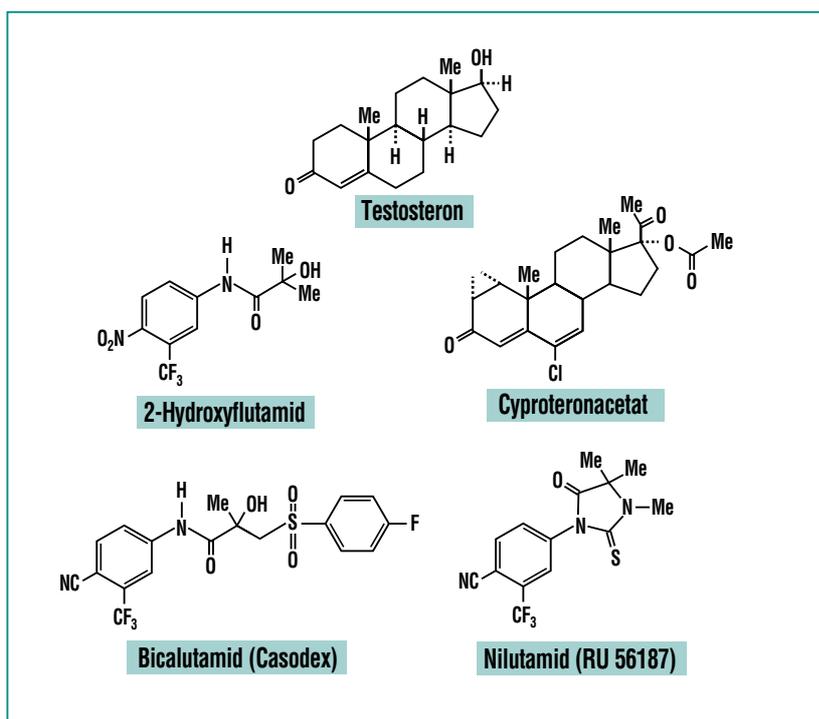


Abb. 1: Darstellung der Struktur des Androgens Testosteron und der steroidalen (CPA) und nicht steroidalen Antiandrogene (Casodex, Hydroxyflutamid und Nilutamid).

ler Androgene im ganzen Körper und gehen in ihrer Wirkung deshalb über operative und chemische Kastration hinaus, welche die Androgene aus der Nebenniere nicht erreicht [8]. Allerdings kann die Hormontherapie den fortgeschrittenen Prostatakrebs nicht heilen. Die Behandlung bewirkt zunächst eine antiandrogenabhängige Hemmung des Tumorzustands. Nach durchschnittlich zwei Jahren können die Antiandrogene aber das Wachstum der Tumorzellen aus unzureichend verstandenen Gründen nicht mehr bremsen [9]. Die Erforschung der Ursache dieser Unempfindlichkeit von Prostata-tumoren gegenüber der Antiandrogen-therapie stellt heutzutage eine der Herausforderungen der Krebsforschung dar. Dies ist auch einer der Schwerpunkte un-

serer Forschungsgruppe am Institut für Toxikologie und Genetik.

### Ursachen für das Scheitern der Antihormontherapie

Es gibt mindestens vier Erklärungen für das Scheitern der Antihormontherapie bei fortgeschrittenem Prostatakrebs, die alle zu der Insensitivität gegenüber der Antiandrogen-therapie beitragen könnten (Abb. 2):

1. Mutationen im Androgenrezeptor, die das Verhalten dieses Proteins gegenüber Antiandrogenen verändern
2. Eine von Androgenen unabhängige Aktivierung des Androgenrezeptors
3. Eine neue Wirkungsweise des Androgenrezeptors, welche

nicht der klassischen entspricht und nicht durch Antiandrogene gehemmt werden kann

4. Eine Veränderung der Wirkungsweise des Rezeptors durch assoziierte Proteine, die seine Aktivität modulieren

### Mutationen des Androgenrezeptors bei Prostatakrebs

Der Androgenrezeptor befindet sich im Zytoplasma der Androgen-Zielzellen in einem inaktiven Zustand. Wenn Androgene im Blutkreislauf vorhanden sind, können sie wie alle Steroidhormone problemlos die Zellmembran durchdringen und im Zytoplasma an den Androgenrezeptor binden. Diese Bindung bewirkt, dass der Androgenrezeptor aus

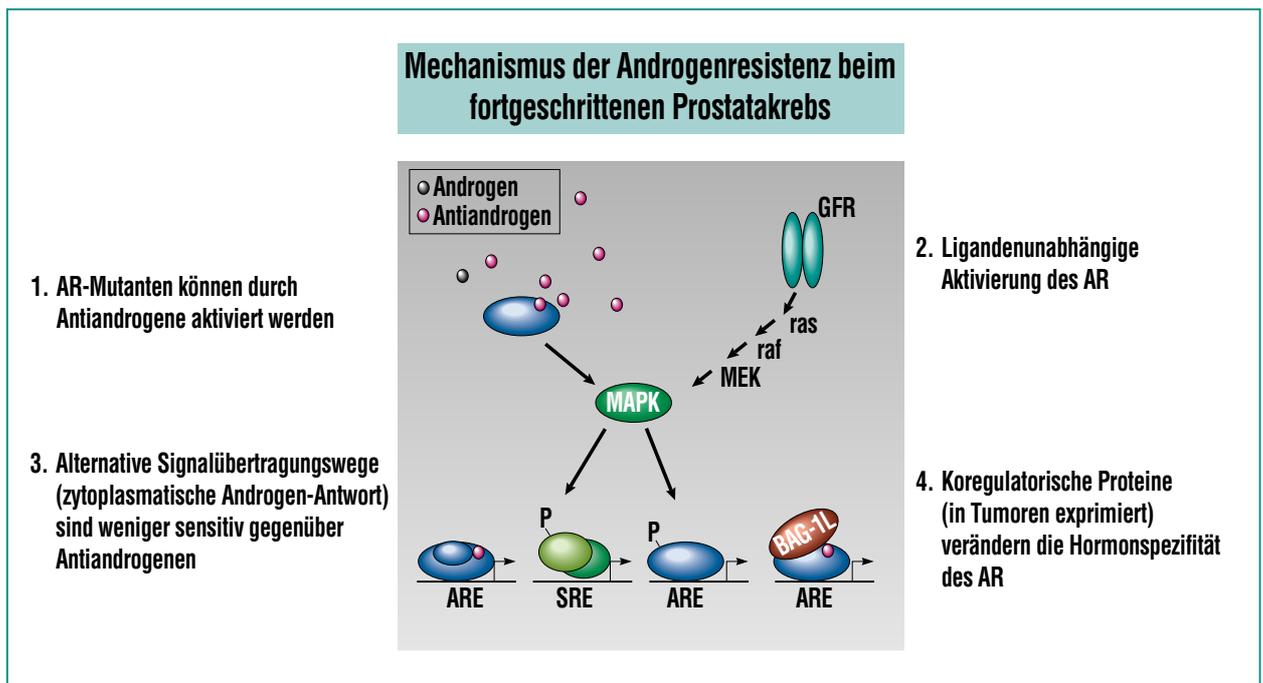


Abb. 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege des Androgenrezeptors, welche möglicherweise an der Entwicklung der Androgeninsensitivität bei der Antiandrogen-Behandlung beim fortgeschrittenen Prostatakrebs beteiligt sind.

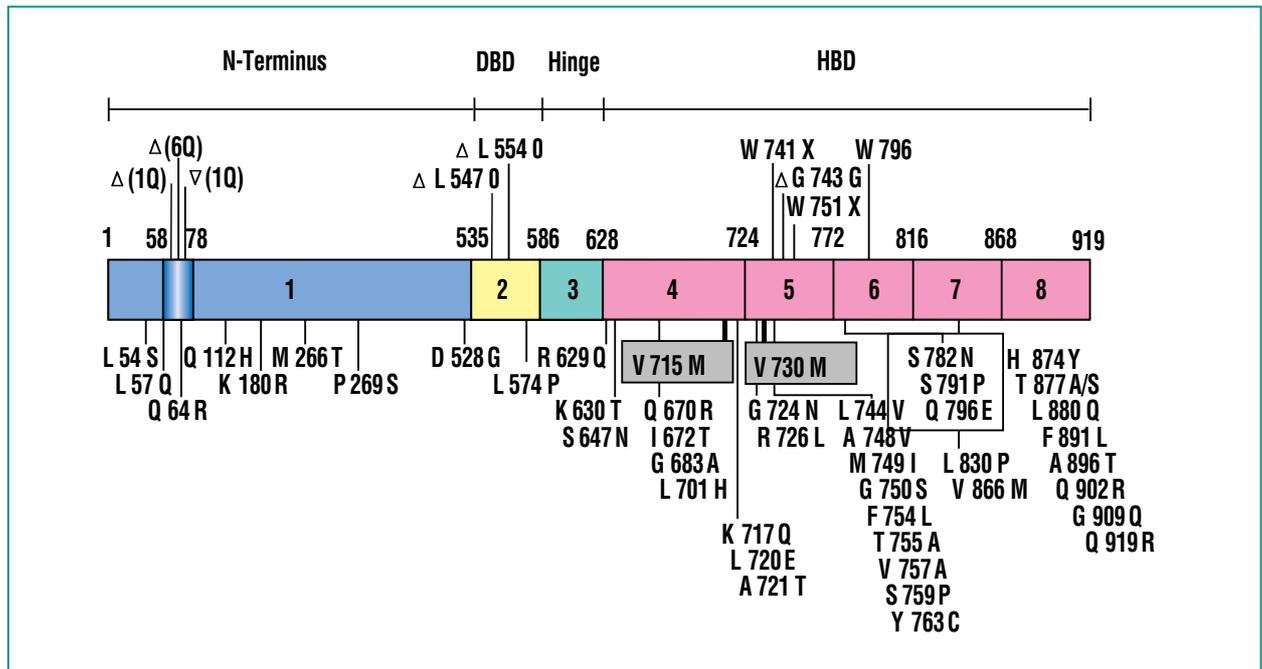
dem Zytoplasma in den Zellkern transportiert wird. Dort bindet er an das Erbmaterial DNA und aktiviert die Ablese bestimmter Gene [10]. Antiandrogene binden ebenfalls an den Rezeptor und verhindern dadurch seine Aktivierung durch seinen eigentlichen Bindungspartner (Liganden). Ausgehend davon nahm man an, dass die Menge des Androgenrezeptors bei Fortschreiten des Prostatakarzinoms erniedrigt wird und das Wachstum der Tumorzellen nicht mehr durch den Rezeptor gesteuert werden kann. Immunologische Analysen von Gewebeschnitten haben aber gezeigt, dass der Androgenrezeptor in allen Stadien des Prostatakarzinoms vorhanden ist [11]. Dies deutet darauf hin, dass die Insensitivität gegenüber der Antiandrogentherapie nicht in einem Verlust des Rezeptors begründet sein kann. Genetische Studien haben gezeigt, dass 30% aller hormoninsensitiven Prostatakarzinome sogar mehrere Gene für den Androgenrezeptor enthalten. Dies war in den Ausgangstumoren vor der Antihormontherapie noch nicht der Fall [12, 13]. Die Vervielfachung der Gene ist möglicherweise das Ergebnis einer Selektion von Tumorzellen, die besonders viel Androgenrezeptor enthalten und auch bei sehr geringen, aber trotzdem noch wirksamen Androgenmengen wachsen können.

Eine weitere Anpassung an eine Umgebung mit geringer Androgenmenge stellen Mutationen im Androgenrezeptor dar, die es erlauben, die normale Wachstumsregulation durch Androgene zu umgehen. Bei diesen Mutationen

handelt es sich normalerweise um den Austausch von einzelnen Aminosäuren. Dies erniedrigt die Spezifität der Ligandenbindung und erlaubt die Aktivierung des Rezeptors durch verschiedene, nicht androgene Steroide und sogar durch Antiandrogene. Generell kann man sagen, dass die Häufigkeit von Androgenrezeptor-Mutationen in Tumoren nach der Antihormontherapie gegenüber primären Tumoren vor der Therapie signifikant erhöht ist. Dies bedeutet nicht, dass die Therapie die Mutationsrate erhöht sondern, dass solche Zellen einen Selektionsvorteil haben, die eine Mutation im Androgenrezeptor-Gen tragen. Mutationen spielen deshalb höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Insensitivität gegenüber Antiandrogenen.

Die erste Mutation dieses Typs, die bei einem Patienten identifiziert wurde, war eine Mutation im Androgenrezeptor-Gen, die zu einem Austausch der Aminosäure Threonin gegen Alanin an der Position 877 (T877A) des Androgenrezeptor-Proteins führt [14]. Molekulare Studien haben gezeigt, dass Progesteron, Östrogene und Antiandrogene an diesen mutierten Rezeptor binden, ihn aktivieren und das Wachstum der ihn enthaltenden Tumorzellen stimulieren. Kristallographische Untersuchungen der Ligandenbindungsdomäne des Wildtyp-Rezeptors, d.h. des normalen Androgenrezeptors und seiner T877A-Variante zeigten, dass durch die Mutation die Tasche, welche das Hormon aufnimmt, derart verändert wird, dass nun auch Progesteron, Östrogene

und Antiandrogene hineinpassen [15]. Prostatakarzinomzellen, die im Androgenrezeptor zusätzlich zu der T877A-Mutation die Mutation L701H (Austausch der Aminosäure Leucin gegen Histidin an der Position 701) tragen, können sogar durch Glukokortikoide wie Cortisol aktiviert werden [16]. Da die zirkulierende Menge an Glukokortikoiden relativ hoch ist, wird dieser mutierte Rezeptor auch bei extrem niedrigen Androgenkonzentrationen aktiviert. Abb. 3 zeigt eine Zusammenfassung der Mutationen, die bisher in Androgenrezeptorgen von Prostatakrebspatienten gefunden wurden (<http://ww2.mcgill.ca/androgenb/prost.gif>). Die meisten dieser Mutationen sind noch nicht funktionell untersucht worden, so daß der Effekt, den sie auf das Fortschreiten des Prostatakarzinoms ausüben, noch unbekannt ist. Eine begrenzte Anzahl von Studien, darunter unsere in Kollaboration mit der urologischen Abteilung der Universitätsklinik Innsbruck durchgeführten Untersuchungen an den mutierten Rezeptoren V715M und V730M, bestätigen eine breitere Steroidspezifität der veränderten Rezeptoren [17]. Anhand der hier beschriebenen Rolle der Mutationen im Androgenrezeptor beim androgeninsensitiven Prostatakarzinom, muss klargestellt werden, dass derartige Mutationen keineswegs alle Fälle von antiandrogenresistenten Prostatatumoren erklären können. Da nicht alle fortgeschrittenen Tumore Mutationen im Androgenrezeptorgen tragen, muss es andere Mechanismen geben, die zur Resistenz gegen die Antiandrogentherapie führen.



**Abb. 3:** Auflistung bekannter Mutationen des Androgenrezeptors, welche bei Prostatakrebspatienten gefunden wurden. Beschreibung der Nomenklatur dieser Mutationen: Der erste Buchstabe, dem eine Nummer folgt, bezeichnet die Aminosäure mit der entsprechenden Position in der Sequenz des Androgenrezeptors. Der letzte Buchstabe steht für den Aminosäureaustausch, welcher bei der Mutation stattgefunden hat. So bedeutet die Bezeichnung „L701H“, daß die Aminosäure Leucin an der Position 701 gegen die Aminosäure Histidin ausgetauscht wurde. Die umrandeten Mutationen wurden in unserem Labor analysiert [17]. Weitere Informationen sind über <http://ww2.mcgill.ca/androgenb/prost.gif> erhältlich.

### Die ligandenunabhängige Aktivierung des Androgenrezeptors

Der Androgenrezeptor ist ein Protein, das an DNA binden und die Ablesung (Transkription) von Genen regulieren kann. Solche Proteine bezeichnet man als Transkriptionsfaktoren. Wie andere Steroidrezeptoren ist der Androgenrezeptor ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der nur in Anwesenheit von Androgenen aktiv wird. Neuere Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass der Androgenrezeptor in bestimmten Fällen auch in Abwesenheit seines Liganden

(Androgen) als Transkriptionsfaktor wirken kann. Solche ligandenunabhängigen Aktivierungen sind für den sogenannten Wildtyp-Rezeptor, d.h. den normalen Androgenrezeptor, beschrieben worden; eine Veränderung des Rezeptorproteins stellt hierfür also keine Voraussetzung dar. Die Aktivierung erfolgt durch bestimmte Wachstumsfaktoren, wie den insulinähnlichen Wachstumsfaktor (IGF, für englisch: insulin like growth factor), den Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) oder den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) [18]. Bei diesen Wachstumsfaktoren handelt es sich um Peptide, die an

spezialisierte membranständige Rezeptoren binden. Wie solche Wachstumsfaktorrezeptoren den Androgenrezeptor in Abwesenheit von Androgenen aktivieren können, ist im Detail noch nicht geklärt. Die Tatsache, dass die beschriebenen Wachstumsfaktoren über ihre Rezeptoren sogenannte MAP-Kinasen (für englisch: mitogen activated protein kinase) aktivieren, legt aber die Vermutung nahe, dass eine Phosphorylierung des Androgenrezeptors zu seiner Aktivierung führen könnte. Tatsächlich konnten Untersuchungen, die wir kürzlich in unserem Labor durchgeführt haben, zeigen, dass der

Androgenrezeptor ein Zielprotein für MAP-Kinasen ist. Zwei Serin-Seitenketten in dem Teil des Rezeptors, der für die Aktivierung von Genen verantwortlich ist, können durch die MAP-Kinase Erk-2 phosphoryliert werden. Die Mutation dieser Serin-Positionen hat *in vitro* einen Verlust der Phosphorylierbarkeit zur Folge und *in vivo* eine teilweise Hemmung der ligandenunabhängigen Aktivierung des Rezeptors durch Wachstumsfaktoren. Die Tatsache, daß die Mutationen die ligandenunabhängige Aktivierung aber nicht komplett blockieren können, läßt vermuten, dass der Signalweg, der von den Wachstumsfaktoren ausgeht, neben der Aktivierungsdomäne des Rezeptors noch andere Ziele hat. Dabei könnte es sich um mit dem Androgenrezeptor assoziierte Proteine handeln.

Zwei Eigenschaften der wachstumsfaktorvermittelten Aktivierung des Androgenrezeptors machen sie für die Erklärung der Androgeninsensitivität bei Prostatakrebs interessant. Zum einen werden einige Wachstumsfaktoren von fortgeschrittenen Prostatatumoren verstärkt produziert und zum anderen konnten wir bisher mit keinem der therapeutisch eingesetzten Antiandrogene die Aktivierung des Androgenrezeptors durch Wachstumsfaktoren hemmen. Dies deutet darauf hin, dass dieser weitere Mechanismus wahrscheinlich daran beteiligt sein könnte, dass fortgeschrittene Prostatatumore auch in Gegenwart von Antiandrogenen weiterwachsen können.

### Die zytoplasmatische Androgenantwort

Der Androgenrezeptor wird in der Literatur als ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor beschrieben, der seine Wirkung im Zellkern entfaltet, indem er an die regulatorischen Sequenzen bestimmter Gene bindet und deren Transkription aktiviert. In den letzten Jahren häufen sich aber die Indizien, dass ein hormonbeladener Androgenrezeptor bereits im Zytoplasma schon Signalwege aktiviert. Unsere eigenen Untersuchungen zeigen, daß Prostatakarzinomzellen bereits 2 min nach der Behandlung mit dem Androgen Dihydrotestosteron (DHT) eine Phosphorylierung der zytoplasmatischen MAP-Kinasen Erk-1 und Erk-2 zeigen [19]. Durch die Phosphorylierung werden diese Enzyme aktiviert, ihrerseits Phosphatreste auf andere Proteine zu übertragen. Diese Aktivierung ist aber nur von beschränkter Dauer, denn sie hält nur für etwa 60 min an. Sie setzt die Anwesenheit des Androgenrezeptors voraus und ist zelltypspezifisch, denn in anderen Zellen als Prostatakarzinomzellen kann diese Kinaseaktivierung nicht beobachtet werden. Da die Aktivität des Androgenrezeptors als Transkriptionsfaktor erst Stunden nach Hormonbehandlung beobachtet werden kann, bezeichnen wir die Kinaseaktivierung wenige Minuten nach Hormongabe als schnelle Androgenantwort. Die Proteine Erk-1 und Erk-2 können die Zellteilung in Gang setzen. Daher ist es möglich, daß ihre Aktivierung durch Androgene zumindest zum Teil für die fördernde Wirkung von

Androgenen auf das Tumorstromwachstum verantwortlich ist. Überraschenderweise aktivieren auch verschiedene Antiandrogene wie Hydroxyflutamid oder Casodex ebenfalls Erk-1 und Erk-2; sie hemmen die Aktivierung von zytoplasmatischen Kinasen durch Dihydrotestosteron also nicht [19].

Es gibt aber Substanzen, welche die schnelle Androgenantwort hemmen können. Es handelt sich dabei um bekannte Hemmstoffe für zytoplasmatischen Kinasen. Substanzen, die alle Proteinsynthesevorgänge der Zelle blockieren, hemmen die schnelle Androgenantwort dagegen nicht. Dies spricht dafür, dass es sich bei der schnellen Androgenantwort um eine rein zytoplasmatische Wirkungsweise des Androgenrezeptors handelt, die keine neue Synthese von Proteinen benötigt. Dieser Befund wird unterstützt durch die Tatsache, dass in unserem Labor hergestellte Mutanten des Androgenrezeptors, die entweder rein zytoplasmatisch oder membranständig lokalisiert sind, ebenfalls zu einer hormonabhängigen Kinaseaktivierung fähig sind.

Es handelt sich hier also um eine neue, d.h. nicht klassische Wirkungsweise des Androgenrezeptors, die nicht durch eine Antiandrogenbehandlung zu hemmen ist und deshalb an der Entwicklung einer Androgeninsensitivität beteiligt sein könnte.

Der genaue Signalweg dieser zytoplasmatischen Androgenantwort ist noch nicht geklärt, ebenso sind die Zielproteine der Kinasekaskade unklar. Von den Ziel-

genen, die schlussendlich durch die zytoplasmatische Androgenantwort aktiviert werden, kennen wir bisher nur eines. Es handelt sich um das c-fos Gen [19], das auch durch viele andere wachstumsinduzierende Stimuli aktiviert wird.

Ein Zielprotein der Phosphorylierungskaskade könnte der Androgenrezeptor selbst sein. Über eine positive Rückkopplung könnte die zytoplasmatische Androgenantwort so eine ligandenunabhängige Genaktivierung durch den Androgenrezeptor vorbereiten.

Wie bereits dargestellt, beruht die ligandenunabhängige Wirkung des Androgenrezeptors nicht al-

lein auf einer Phosphorylierung des Rezeptors selbst, sondern schließt höchstwahrscheinlich mit dem Rezeptor assoziierte Proteine mit ein.

Solche koregulatorischen Proteine haben eine wichtige Funktion in der klassischen Wirkungsweise des Androgenrezeptors im Zellkern.

### Koregulatorische Proteine

Verschiedene Proteine, die in Prostatakarzinomzellen vorhanden sind, binden an den Androgenrezeptor und verstärken seine Aktivität sogar bei niedrigen Androgenmengen oder in der Ge-

genwart von Antiandrogenen. Eine besonders hohe Konzentration solcher koregulatorischen Proteine kann also einen ähnlichen Effekt wie eine Mutation im Androgenrezeptor haben. Abb. 4 zeigt einige dieser koregulatorischen Proteine, die als Partner des Androgenrezeptors identifiziert wurden (<http://ww2.mcgill.ca/androgenb/ARIPmap.gif>). Einige dieser Proteine wurden bisher nur als Interaktionspartner des Androgenrezeptors beschrieben, d.h., sie können zwar an den Rezeptor binden; die funktionelle Konsequenz dieser Bindung ist dennoch unklar. Die Wirkung weiterer koregulatorischer Proteine wurde intensiv untersucht, wie zum Beispiel die Funktion der

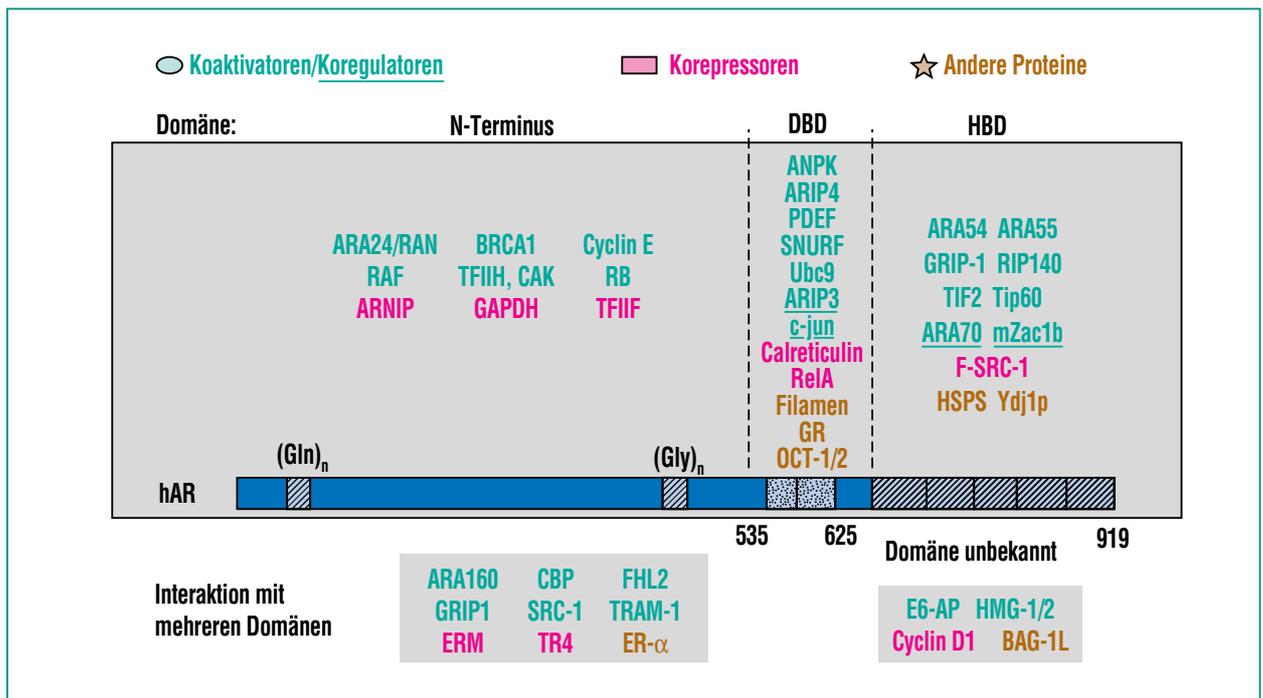


Abb 4.: Auflistung der Faktoren, deren Bindung an das Androgenrezeptorprotein bekannt ist. Diese Faktoren können die Wirkung des Androgenrezeptors entweder in positiver oder in negativer Weise regulieren. Anhand der schematischen Darstellung des Androgenrezeptors sind die Domänen, die bei den jeweiligen Interaktionen eine Rolle spielen, ersichtlich. Rechts unten sind die Faktoren aufgelistet, bei denen nicht bekannt ist, mit welcher Domäne des Androgenrezeptors sie interagieren. Weitere Informationen sind über <http://ww2.mcgill.ca/androgenb/ARIPmap.gif> erhältlich.

Proteine TIF-2 und SRC-1, deren Konzentration in einigen fortgeschrittenen Prostatatumoren erhöht ist [20]. Sie können die Aktivität des Androgenrezeptors auch in Gegenwart der physiologischen Konzentration der Androgene aus der Nebenniere verstärken. In einer anderen Studie wurde beschrieben, dass der Koaktivator ARA70 in der Prostatatumor Zelllinie DU 145 nicht nur die Aktivität des Androgenrezeptors verstärkt, sondern auch die antagonistische Wirkung einiger Liganden in eine agonistische umwandeln kann [21].

Wir haben uns in den letzten Jahren mit einem anderen koregulatorischen Faktor des Androgenrezeptors beschäftigt, dem Bag-1L Protein. Auch dieses Protein verstärkt die Aktivität des Androgenrezeptors; sowohl in Gegenwart von Dihydrotestosteron, als auch von Antiandrogenen. Analysen von Gewebeschnitten, die wir zusammen mit unseren Kollegen an der Universitätsklinik Innsbruck durchgeführt haben, haben gezeigt, dass das Bag-1L-Protein in der Prostata immer produziert wird; der genaue Ort dieser Produktion ändert sich hingegen während der Tumorprogression. In der normalen Prostata ist Bag-1L in den basalen Zellen vorhanden, im Prostatakarzinom findet sich Bag-1L in den sekretorischen Epithelzellen. Diese letzteren Zellen enthalten auch den Androgenrezeptor und es ist daher wahrscheinlich, dass Bag-1L nur im Tumorstadium seine Wirkung auf den Androgenrezeptor entfalten kann. Bezüglich einer therapeutischen Anwendung ist es für uns wichtig herauszufin-

den, ob die Unterbrechung der Interaktion des Androgenrezeptors mit Bag-1L das Tumorwachstum bremsen kann. Im Vorfeld müssen aber noch einige Fragen beantwortet werden. Erstens: wie wird die örtliche Verlagerung der Bag-1L Produktion während der Tumorprogression kontrolliert und wie kann sie verhindert werden? Zweitens: Wie genau sieht die physische Interaktion zwischen Androgenrezeptor und Bag-1L aus? Die entsprechenden Experimente werden zur Zeit in unserem Labor durchgeführt und wir hoffen, dass sie es uns ermöglichen werden, die Interaktion zwischen Bag-1L und dem Androgenrezeptor zu unterbrechen. Dabei gehen wir von der Annahme aus, dass diese Interaktion zu der Antiandrogeninsensitivität bei Prostatakrebs beiträgt.

### Perspektiven

Die Untersuchung verschiedener Entstehungsmöglichkeiten der Insensitivität gegenüber der Antihormontherapie bei Prostatakrebs haben zur Entdeckung wichtiger neuer Mechanismen in der Wirkungsweise des Androgenrezeptors geführt. Es gelang uns herauszufinden, daß maligne Zellen alternative Signaltransduktionswege entwickeln und das Hormonsystem dazu benutzen, therapeutische Versuche zu unterlaufen, welche das Zellwachstum durch Androgenentzug bremsen sollen.

Dennoch gehen wir davon aus, dass die vier Mechanismen, die in diesem Artikel beschrieben wurden, nicht alle Möglichkeiten

ausschöpfen, dem therapeutischen Androgenentzug zu entkommen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß weitere Studien zusätzliche Mechanismen aufdecken werden. Höchstwahrscheinlich ist eine einzelne Krebszelle sogar in der Lage, verschiedene Mechanismen zur Erreichung der Insensitivität gegenüber Antiandrogenen zu benutzen. Trotzdem sind wir davon überzeugt, dass eine Hierarchie der benutzten Signalwege existieren muss. Eine Entschlüsselung dieser Hierarchie und der dazugehörigen Mechanismen wird uns einen weiteren Schritt in die Richtung der Entwicklung von Medikamenten führen, welche das Tumorwachstum anhaltend bremsen können.

## Literatur

- [1] S. L. Parker, et al.  
*C. A. Cancer J. Clin.* 46, 5 (1996).
- [2] C. V. Huggins, C. V. Hodgess,  
*Cancer Res* 1, 293 (1941).
- [3] *Veteran's Administration Co-operative Urological Research Group.*  
*Surg. Gynecol. Obstert.* 124, 1011 (1967).
- [4] D. P. Byar,  
*Cancer* 32, 1126 (1973)
- [5] H. J. De Voogt, et al.  
*J. Urol.* 135, 303 (1986).
- [6] J. Geller, et al.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 46, 440 (1978).
- [7] F. Labrie, et al.  
*Prog. Clin. Biol. Res.* 262, 11 (1988).
- [8] S. Goktas, et al.  
*Sem. Oncol.* 26, 162 (1999).
- [9] G. H. Ripple, G. Sem. Wilding,  
*Oncol.* 26, 217 (1999).
- [10] M. Beato, et al.  
*Cell* 83, 835 (1995).
- [11] T. Van der Kwast, et al.  
*Int. J. Cancer* 48, 189 (1991).
- [12] P. Koivisto, et al.  
*Cancer Res.* 57, 314 (1997).
- [13] T. Visakorpi, et al.  
*Nature Genet.* 9, 401 (1995).
- [14] J. Veldscholte, et al.  
*J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 41, 665 (1992)
- [15] P. M. Matias, et al.  
*J. Biol. Chem.* 275, 26164 (2000).
- [16] X.Y. Zhao, et al.  
*Nature Med.* 6, 703 (2000).
- [17] H. Peterziel, et al.  
*Int. J. Cancer* 63, 544 (1995).
- [18] Z. Culig, et al.  
*Cancer Res.* 54, 5474 (1994).
- [19] H. Peterziel, et al.  
*Oncogene* 18, 6322 (1999).
- [20] C. W. Gregory, et al.  
*Cancer Res.* 61, 4315 (2001).
- [21] H. Miyamoto, et al.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7379 (1998).

# Mutanten, Moleküle und Mikroarrays Dem Appetit auf der Spur ...

M. Bauer, J. Katzenberger, I. Zinke, C. Melcher, C. Schütz, A. Gähler, M. Ritter, M. Pankratz, ITG

## Hunger?

Haben Sie gerade Hunger während Sie diesen Artikel lesen? Kennen Sie die Warteschlangen in der Kantine? – Keine Angst, wir wollen an dieser Stelle nicht über die Essgewohnheiten der FZK-Mitarbeiter referieren.

Das Hunger-Gefühl ist ein physiologischer Mechanismus, der im ersten Moment sehr rudimentär und einfach erscheint. Bei näherer Betrachtung jedoch sind die Steuerung der Nahrungsaufnahme und die Verwertung der Nährstoffe komplizierte und in hohem Maße regulierte biochemische Vorgänge. Die Erforschung dieser Prozesse können wichtige Erkenntnisse der Wechselwirkungen zwischen physiologischen Zustand des Gesamtorganismus und der Genkontrolle einzelner Zellen und Geweben bringen. Das Verständnis dieser biochemischen Koordination kann in der Bekämpfung verschiedener Krankheiten und Gesundheitsstörungen, wie beispielsweise Diabetes, Fettleibigkeit oder auch in der Krebs-Diagnose und -Therapie, neue Ansätze liefern.

## Fruchtfliegen

Nahrungsaufnahme und die damit verbundenen biologischen Prozesse sind bei einfachen und höher entwickelten Organismen sehr ähnlich. Deshalb wird in unserer Arbeitsgruppe die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus eingesetzt. Sie ist im Haushalt weit weniger beliebt als sie es im wissenschaftlichen Sinne ist. Die Fruchtfliege wurde von vielen verschiedenen

Forschern seit dem Beginn der genetischen und molekularbiologischen Untersuchungen eingesetzt [1]. Das biologische Hintergrundwissen ist entsprechend umfangreich. Eine der bekanntesten Arbeitsgruppen um die Tübinger Biologin Prof. Nüsslein-Volhard wurde für ihre Ergebnisse in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* 1995 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet [2, 3].

Das Genom der Fruchtfliege wurde bereit vollständig entschlüsselt. Die DNA-Sequenz aller Gene ist somit bekannt. Dies beinhaltet jedoch nicht, dass alle genetischen Funktionen bekannt und daraus abgeleitet, dass alle funktionalen Gene bereits als solche erkannt wurden. Ein weiterer Punkt, der die Fruchtfliege gerade für die Erforschung im Feld der Nahrungsaufnahme und damit verbundenen Kontrollmechanismen interessant macht, ist ihr Entwicklungszyklus in mehreren Stadien. 21 Stunden nach der Eiablage beginnt eine dreistufige Larven-Entwicklung, an deren Ende, 117 Stunden nach Eiabla-

ge, sich die Larven verpuppen und 213 Stunden nach Eiablage die Fliegen schlüpfen. Der Zeitpunkt der Verpuppung ist davon abhängig, ob sich die Larve einen ausreichenden Nährstoffvorrat anfrassen konnte. Dieser Umstand zeigt, dass an diesem Punkt eine enge Kopplung zwischen Nahrungsaufnahme und Entwicklung vorliegt.

## Beginn der Suche

Die Suche nach Kontaktpunkten in der genetischen und biochemischen Kontrolle des Fressverhaltens begann in unserer Arbeitsgruppe vor 4 Jahren mit der systematischen Untersuchung von *Drosophila*-Mutanten, deren Larve ein gestörtes Fressverhalten zeigten. In diesen Mutanten wurden verschiedene Gene durch Einfügen von DNA-Elementen außer Funktion gesetzt. Dabei wurde unter anderem das „Rotkehlchen“-Gen entdeckt. Sein Ausschalten bewirkt, dass die Larven ihre Nahrung zwar aufnehmen jedoch nicht in den Ma-



**Abb. 1: *Drosophila-melanogaster*-Larven, die mit rotgefärbten Futter gefüttert wurden. Die mit „wt“ gekennzeichneten Fliegen sind genetisch unverändert (Wildtyp). In den übrigen Larven ist das „Rotkehlchen-Gen“ („rot“-Gen) genetisch inaktiviert worden. Unvollständige Nahrungsaufnahme, verzögertes Wachstum und Abbruch der Larvenentwicklung sind die Folgen.**

gen befördern. Dabei treten keine gewebe- oder organspezifischen Veränderungen auf. Vielmehr scheint es eine grundlegende Veränderung in der Steuerung der Nahrungsaufnahme zu bewirken (Abb. 1). Die Analyse des Gens identifizierte das davon kodierte Protein als sogenannten Transkriptionsfaktor. Dies ist eine zelluläre Komponente, die als Schalter zur Aktivierung anderer Gene fungiert. Das „Rotkehlchen“-Protein scheint ein Teil eines regulatorischen Netzwerks zu sein, das die Nahrungsaufnahme steuert.

In der ersten Suche, aus der auch das „Rotkehlchen“-Gen hervorging, wurden weitere Gene gefunden, die eine Rolle in einem solchen Netzwerk spielen können. Detaillierte Untersuchungen einzelner Gene zeigten, dass die

weiteren Forschungsarbeiten einen umfassenderen Ansatz verfolgen mussten, um die Komplexität des Kontrollsystems erfassen zu können.

### Technologische Weiterentwicklung: Mikroarrays

Aus dieser Intention heraus wuchs auch der Beschluss, eine neue Technologie für unsere Arbeitsgruppe und das Institut zu erschließen. Es handelt sich dabei um die Mikroarray-Technik [4]. In diesem Verfahren werden zunächst Teil-DNA-Stücke bekannter und unbekannter Gene hergestellt. Die DNA kann dabei entweder *de-novo* in einer chemischen Reaktion synthetisiert werden oder durch Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase

Chain Reaction, PCR) von genomischer DNA erhalten werden. Die PCR ist eine etablierte molekularbiologische Methode, bei der durch eine mehrstufige Reaktion von DNA-Molekülen als Vorlage definierte Teilstücke vervielfältigt werden können [5]. Die Start- und End-Sequenz des vervielfältigten DNA-Bereichs wird durch die Wahl von sogenannten Primern definiert. Primer sind kurze synthetisch hergestellte, einzelsträngige DNA-Moleküle. Das *Drosophila*-Genom ist, wie bereits oben erwähnt, vollständig sequenziert. Deshalb ist es möglich für alle bekannten und potenziellen Gene spezifische PCR-Primer zu entwerfen. Anhand eines umfassenden Primer-Satzes konnten wir 14.151 unterschiedliche Teil-Sequenzen von *Drosophila*-Genen durch PCR herstellen. Die Reaktionen wurden im 100µl-Maßstab in Mikrotiter-Platten durchgeführt, bei denen 96 Ansätze parallel gehandhabt werden können. Das Verwenden des Mikrotiter-Formats mit hohem Probendurchsatz (engl. high-throughput) brachte auch Neuerungen in der Arbeitsmethodik. So konnte und musste der Automatisierungsgrad mit Hilfe von Robotern erhöht werden, um den zeitlichen Aufwand des Gesamtprojekts eingrenzen zu können.

Die DNA-PCR-Produkte werden bei der Herstellung der Mikroarrays mit Hilfe eines Roboters auf 26 x 76 mm große, beschichtete Glas-Objektträger transferiert (Abb. 2). Am Roboterkopf befestigte Stahlnadeln, an deren Spitze eine Mikrokapillare eingearbeitet wurde, werden zunächst in die DNA-Lösung getaucht. Da-

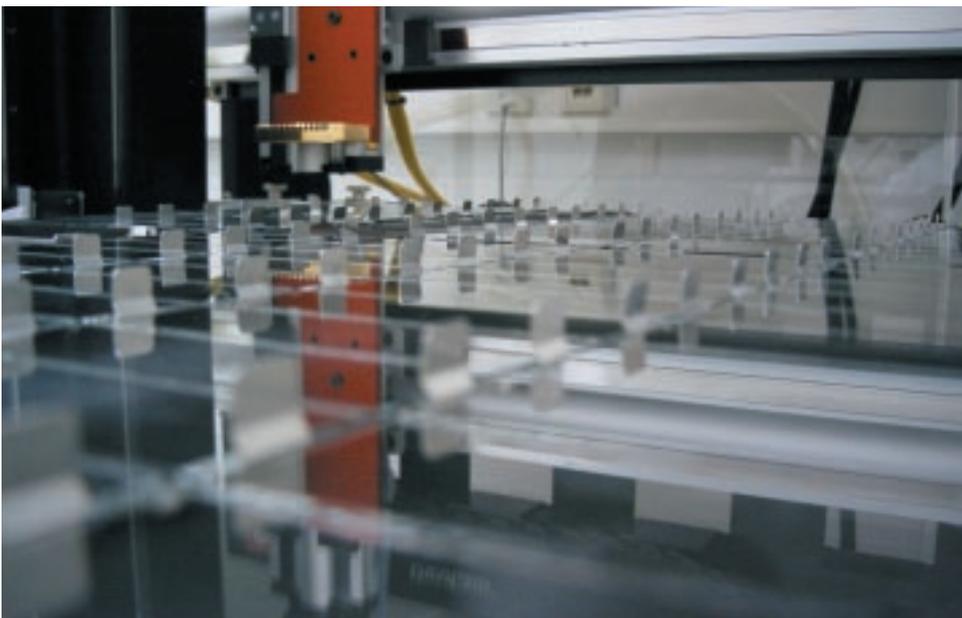
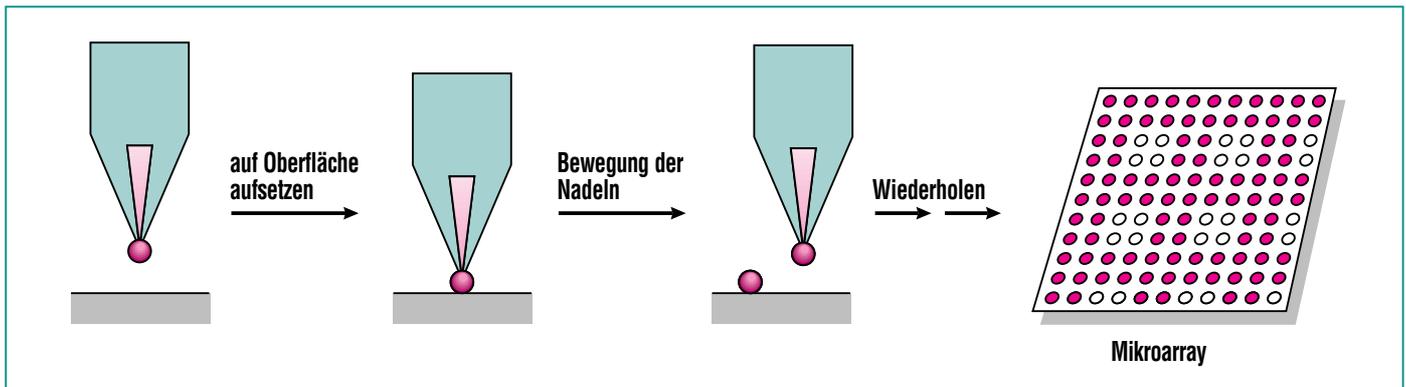


Abb. 2: Blick über den Arbeitstisch des Mikroarray-Roboters mit dem die DNA-Proben aus Mikroplatten auf beschichtete Objektträger übertragen werden. Die eingespannten Objektträger sind im Vordergrund, der rote Roboterarm mit goldfarbigem Halter der Nadeln zum Transfer der Lösungen ist im Hintergrund erkennbar.



**Abb. 3:** Der Transfer der DNA-Lösungen mit Hilfe der Nadeln erfolgt nach einem einfachen Prinzip. Die Nadelspitzen sind mit einem etwa 50 µm breiten Spalt versehen. Die Lösungen werden durch die Kapillarkraft aufgenommen. Beim Kontakt der Nadeln mit der Oberfläche der Objektträger wird eine geringe Menge abgegeben, die einen Tropfen von etwa 100 µm Durchmesser bildet. Durch Wiederholen des Vorgangs werden alle (in unserem Falle ca. 14.000) Proben auf jeden Mikroarray aufgebracht.

bei werden etwa 0,25 µl Flüssigkeit aufgenommen. Durch kurzes Aufsetzen der Nadeln auf die Objektträger wird eine geringe Menge abgegeben, die einen Tropfen von etwa 100 µm Durchmesser bildet. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis alle Proben auf die Mikroarrays aufgebracht sind (Abb. 3). Vor der Aufnahme neuer Lösung werden die Nadeln im Ultraschallbad und in einem Durchflussbecken gereinigt und in einem Luftstrom getrocknet. Der von uns verwendete Roboter kann mit bis zu 48 Nadeln und 100 Objektträgern gleichzeitig arbeiten [6]. Die aufgebrachte DNA wird durch Wärme denaturiert, d.h. die gegenläufigen helikalen Stränge werden getrennt und durch eine chemische Reaktion mit der Beschichtung der Objektträger fest an die Oberfläche gebunden.

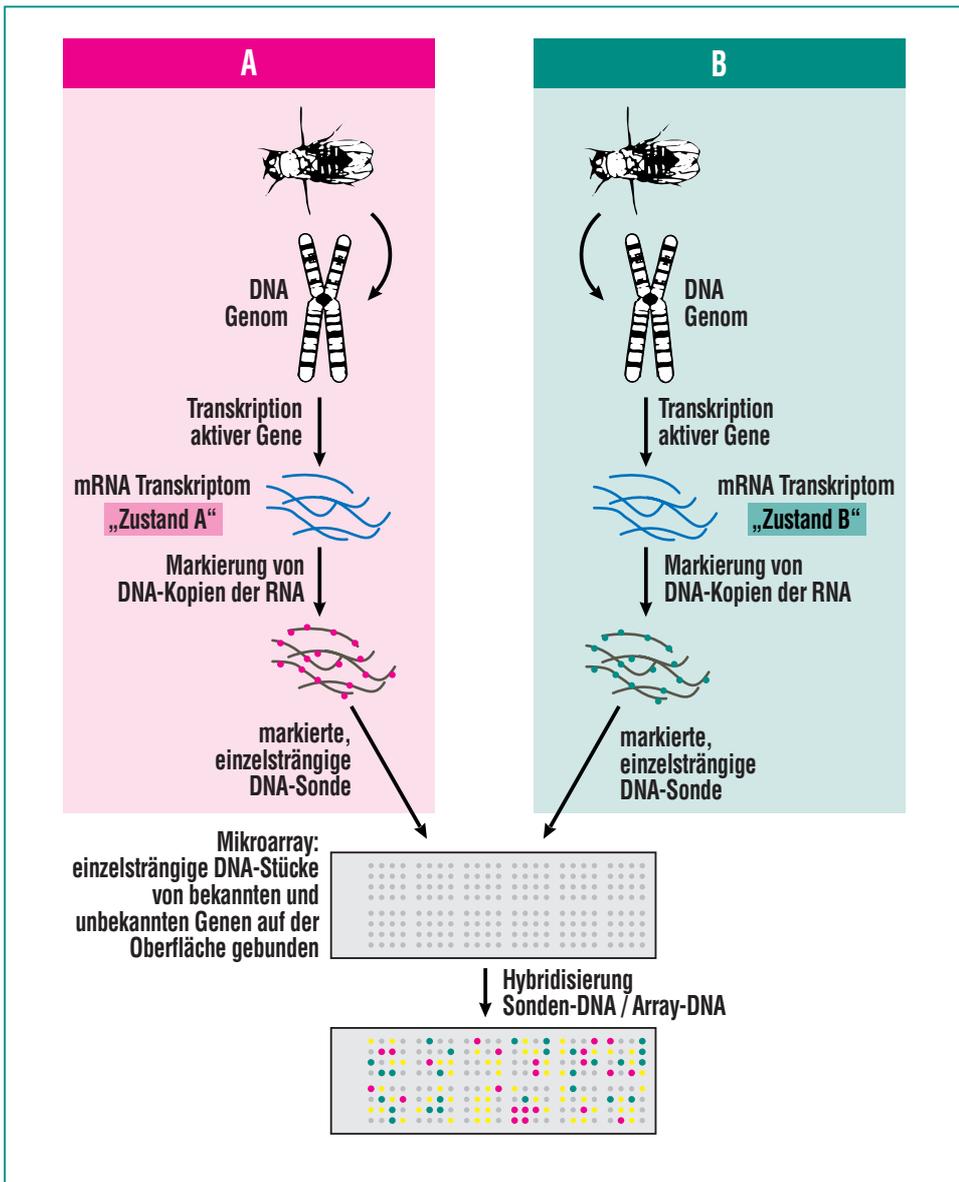
### Mikroarray-Experimente

Die Verwendung der Mikroarrays ist in Abb. 4 schematisch dargestellt. Zunächst wird aus experi-

mentell behandelte Fliegen, Larven oder Geweben RNA isoliert. Bei aktiven Genen wird im Zellkern eine einzelsträngige mRNA-Kopie (engl. messenger RNA, Boten-RNA) des Abschnitts der genomischen DNA hergestellt, die als Matrize für die zelluläre Proteinsynthese dient. Proteine vermitteln nahezu alle zellspezifischen Funktionen. Die mRNA- und nachfolgende Proteinsynthese eines aktivierten Gens wird als Gen-Expression bezeichnet. Das Transkriptom einer Zelle, eines Gewebes oder Organismus, als Summe aller mRNA-Moleküle, repräsentiert somit die Gesamtheit aller aktiven Gene. Nach der Isolierung der mRNA werden zu deren Sequenz komplementäre DNA-Kopien *in vitro* hergestellt und dabei mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Diese ebenfalls einzelsträngigen DNA-Moleküle werden auch als Sonden bezeichnet. Die DNA-Sonden werden auf einen Mikroarray gegeben und verbinden sich spezifisch mit den komplementären DNA-Stücken auf der Oberfläche,

also an den Punkten, an denen die entsprechende PCR-DNA aufgebracht wurde. Dabei bilden sich Hybride aus dieser DNA und den Molekülen der Sonde auf dem Mikroarray (Hybridisierung). Unspezifische Bindung, die zu starken Hintergrundsignalen führen könnte, wird durch die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen und nachfolgender Waschschriffe unterbunden. Die Hybridisierung wird gleichzeitig mit verschiedenen Sonden-Typen vorgenommen, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert wurden. Die ursprünglichen mRNA-Proben können beispielsweise einerseits von gentechnisch veränderten (Mutanten) („Zustand A“) und andererseits von unveränderten, sog. Wildtyp-Fliegen („Zustand B“) stammen.

In einem Scanner werden die Farbstoffe durch Laserlicht angeregt und die Fluoreszenz gemessen. Anhand der verschiedenen Signalstärken kann für jeden Zustand ein Expressionsprofil aller auf dem Mikroarray erfassten Ge-



**Abb. 4: Schematische Darstellung eines Mikroarray-Experiments.** Die dargestellten Fliegen stehen stellvertretend für Organismen (Fliegen, Larven oder Embryos) oder Gewebe aus Tieren. Von aktiven Genen des Genoms (Summe aller Gene) werden in der Zelle während der Transkription mRNA-Kopien hergestellt. Die Summe aller mRNA-Moleküle (Transkriptom) kann somit als Abbild aller aktiven (exprimierten) Gene betrachtet werden. Je Zustand werden von den isolierten mRNA-Molekülen in vitro markierte DNA-Kopien (Sonden) hergestellt. Die Sonden der zu vergleichenden Zustände werden auf den selben Mikroarray gegeben und koppeln sich dort an die bei der Herstellung des Arrays aufgebracht und gebundenen DNA-Proben verschiedener bekannter und unbekannter Gene. Die Kopplung (Hybridisierung) erfolgt dabei sequenzspezifisch, also nur wenn die Basenabfolge von Sonden- und Array-DNA übereinstimmen.

ne erstellt werden (Abb. 5). Durch Vergleich der Profile kann eine quantitative Aussage über die Veränderung der Genaktivitäten zwischen den beiden Zuständen gemacht werden.

In einer Serie von Mikroarray-Experimenten wurden Fliegen-Larven unter verschiedenen Bedingungen wachsen gelassen. Dabei wurden unter anderem die Veränderungen des Expressionsprofils in Abhängigkeit unterschiedlicher Zucker-Konzentrationen im Futter getestet. Dabei konnte ein Gen identifiziert werden, dessen Funktion in nachfolgenden Experimenten näher charakterisiert wurde. Es handelt sich, wie bei „Rotkehlchen“, um einen Transkriptionsfaktor, der offensichtlich eine wichtige Regulationsfunktion im Fettstoffwechsel erfüllt. Es wurden transgene Fliegen hergestellt deren „Rotkehlchen“-Gen ständig und verglichen zum ursprünglichen Wildtyp-Zustand auf einem höheren Niveau aktiviert ist. Diese Situation wird auch als Überexpression des Gens bezeichnet. Mit Hilfe der Mikroarray-Technik konnte das Expressionsprofil diese Tiere wiederum analysiert und weitere Gene identifiziert werden, die durch das veränderte Gen reguliert werden. In dieser Weise soll in Zukunft Stück für Stück eine Karte des regulatorischen Netzwerks der Nahrungsaufnahme und davon beeinflusster Mechanismen erarbeitet werden. Die Knotenpunkte des Netzes werden von Genen gebildet, deren Charakterisierung durch ergänzende Experimente und verschiedene Methoden bewerkstelligt werden muss.

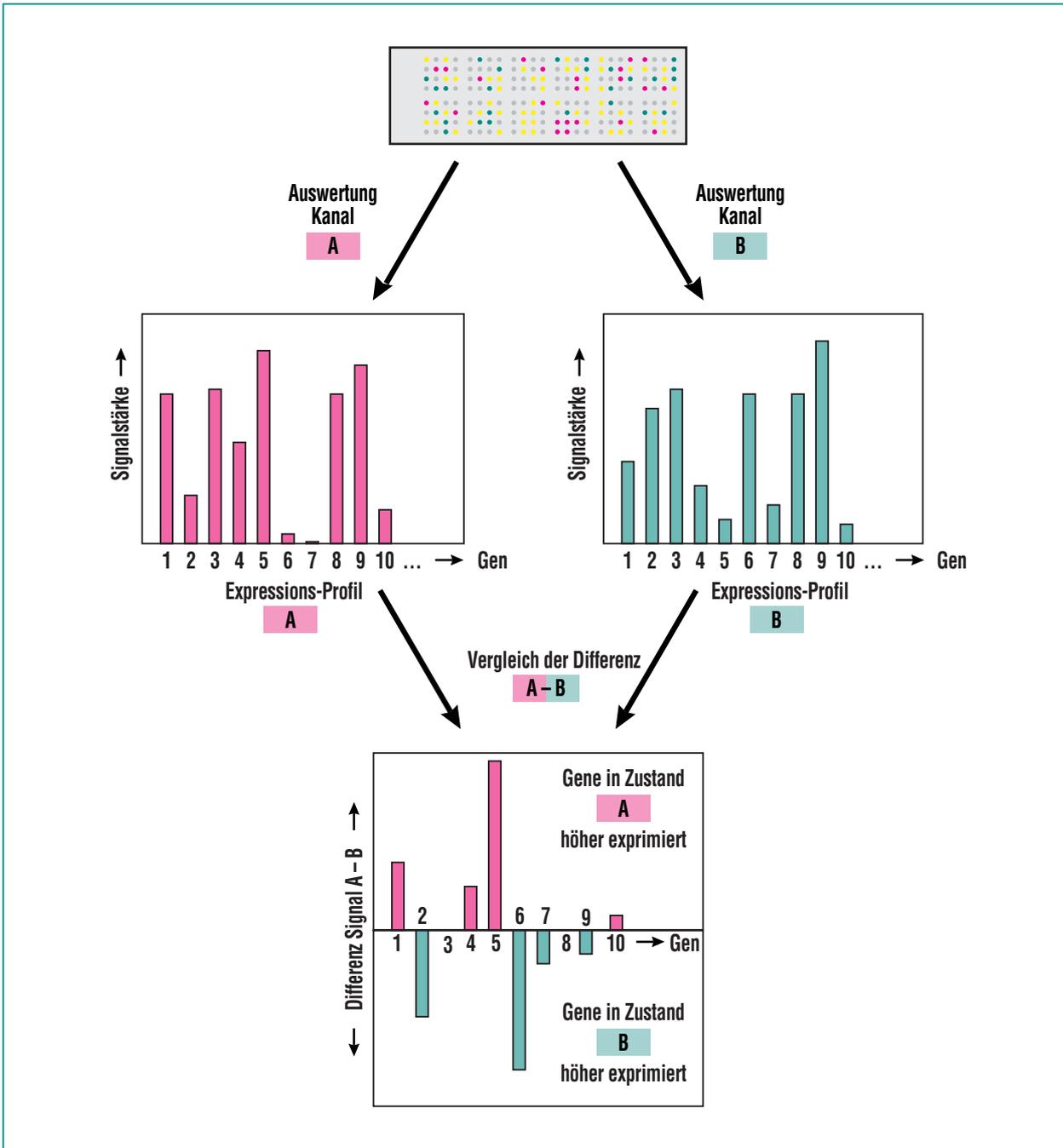
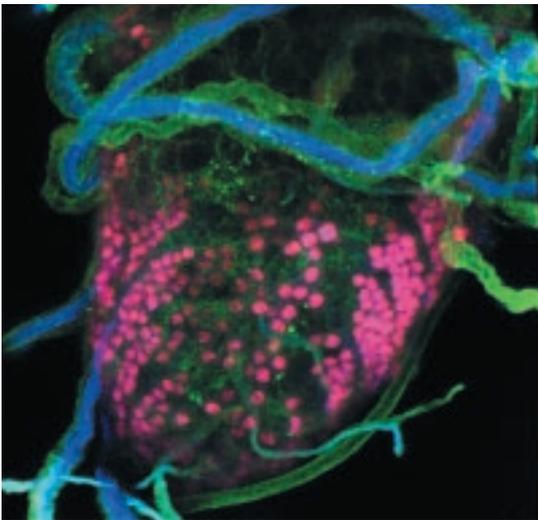


Abb. 5: Die spezifisch gebundene, markierte Sonden-DNA wird mit Hilfe eines Scanners detektiert. Die Signalstärke korrespondiert dabei mit der Anzahl der gebundenen Sonden-Moleküle, damit lässt sich auf die Konzentration der mRNA im verwendeten Gewebe rückschließen. Da die Identität der einzelnen Punkte der gebundenen Array-DNA bekannt ist, kann für jedes Gen, das auf dem Array repräsentiert wird, eine spezifische Signalstärke zugeordnet werden. Die Gesamtheit aller Signale ergibt ein Profil aller aktiven Gene (Expressionsprofil) des untersuchten Organismus bzw. Gewebes für beide verglichenen Zustände. Die Analyse der Signalstärken zeigt die regulatorische Veränderung der Genexpression zwischen diesen Zuständen.

## Neuronale Signale

Als einen weiteren Ansatz zur Beschreibung übergeordneter regulatorischer Zusammenhänge verfolgen wir die Erforschung



**Abb. 6:** Ein Teil des Nervensystems einer *Drosophila*-Larve wurde mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Das Bild wurde auf drei (Farben) Kanälen mit Hilfe eines Konfokalen-Laserscanning-Mikroskops aufgenommen. Das Laserlicht des Mikroskops regt in verschiedenen Fokusebenen und verschiedenen Wellenlängen die Farbstoffe zur Fluoreszenz an und zeichnet die Bilder auf. In der Darstellung sind Axone (Nervenbahnen) mit blau, Neuronen (Nervenzellen) mit rot und Zellmembranen mit grün fluoreszierendem Farbstoff markiert.

bekannter und potentieller Neuropeptide. Es handelt sich dabei um Botenstoffe, die Signale zwischen neuronalem System und verschiedenen Geweben übermitteln. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es Neuropeptide gibt, die bei der Steuerung des Fressverhaltens eine Rolle spielen. Die Expression der Neuropeptid-Gene wird dabei ebenfalls durch Mikroarray-Experimente analysiert. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei jedoch auch in welchen Zellen oder Geweben die Neuropeptid-Gene aktiviert werden. Dies kann durch histologische Färbung mit spezifischen Sonden erfolgen. Im konfokalen Laserscanning-Mikroskop werden die gefärbten Gewebeproben in verschiedenen Fokusebenen abgetastet. Für jede Ebene wird dabei ein Bild aufgezeichnet, auf denen die Positionen der angeregten Fluoreszenzfarbstoffe zu erkennen sind. Aus vielen Bildern kann nachfolgend eine dreidimensionale Darstellung rekonstruiert werden (Abb. 6).

In Zukunft soll die Maus als zusätzlicher Modellorganismus hinzugezogen werden, um die mit *Drosophila* erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen. Die Maus ist als Säugetier evolutiv näher mit

dem Menschen verwandt als die Fruchtfliege. Sie kann deshalb als wichtiges Bindeglied in der Nutzung des erlangten Grundlagenwissens für Fragestellungen in der human Medizin dienen. Mäuse werden am ITG bereits zu Versuchen eingesetzt, so dass die entsprechende Infrastruktur vorhanden ist. In unserer Arbeitsgruppe hergestellte Mikroarrays zur Analyse von Maus-Genen befinden sich in der Entwicklung.

## Literatur

- [1] Francois Jacob  
*Die Maus, die Fliege und der Mensch*,  
Berlin-Verlag, Berlin, 1998
- [2] <http://www.nobel.se>
- [3] Keller,  
*Drosophila embryos as transitional objects: the work of Donald Poulson and Christiane Nusslein-Volhard*,  
*Historical studies in the physical and biological sciences*,  
1996;26(2):313-46
- [4] Philip Ball,  
*Gen-Chips*,  
*Der Tagesspiegel*, 14.02.2001
- [5] Hubert Rehm, Friederike Hammar:  
*Biochemie light*,  
Verlag Harri Deutsch, 2001
- [6] <http://www.genemachines.com/OmniGrid/OmniGrid.html>

# Proteomik: Proteine im (Hefe-)Kontext

P. Uetz, ITG

## Einleitung

Proteine sind die aktiven Bestandteile aller lebenden Zellen. Als Enzyme katalysieren sie fast alle Reaktionen eines Organismus. Als Strukturproteine prägen sie dessen Gestalt von der Zelle bis zum kompletten Lebewesen. Dazu kommen noch regulatorische Proteine, welche die Dynamik lebender Systeme steuern und einige andere.

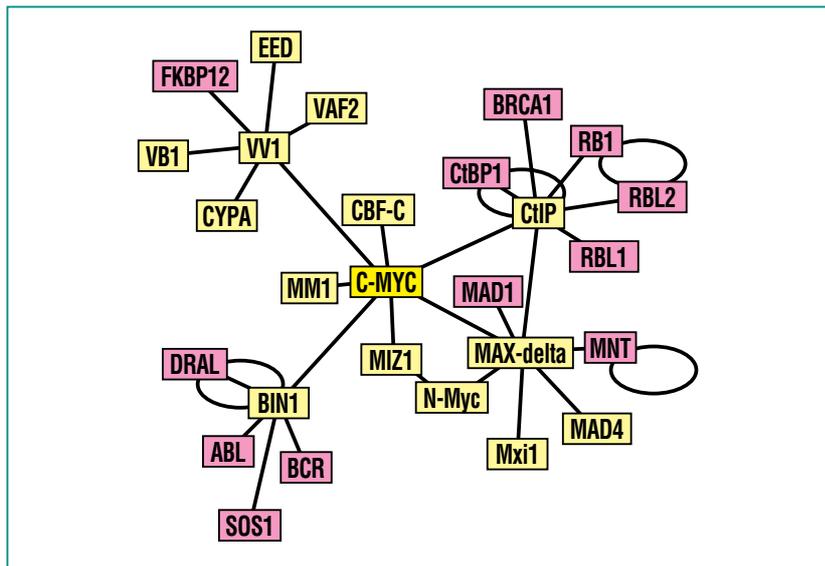
Traditionell werden Proteine einzeln untersucht, oft ein Protein von mehreren Arbeitsgruppen zugleich. Die Analyse von Proteinen ist mühselig, weshalb in Einzelfällen Tausende von Wissenschaftlern an einem oder wenigen Proteinen arbeiten. Allein zum Thema HIV (= Human Immunodeficiency [= AIDS] Virus, das aus nur ca. 10 Proteinen besteht) werden pro Jahr Tausende von Arbeiten veröffentlicht. Dabei entsteht eine seltsame Diskrepanz: *wenige*, als wichtig erachtete Proteine werden von *sehr vielen* Molekularbiologen untersucht und *sehr viele* Proteine von *wenigen* oder gar keinen Wissenschaftlern. Sicher wird man mehr Ehrgeiz darauf verwenden, wichtige Proteine mit mehr Personalaufwand zu untersuchen als vergleichsweise unwichtige. Nur: woher weiß man, ob ein Protein wichtig ist, solange man es noch nicht untersucht hat? Selbst wenn man weiß, dass ein bestimmtes Protein wichtig ist, reicht es meistens trotzdem nicht aus, nur das eine Protein zu untersuchen. Illustrieren lässt sich das gut an einem Protein namens „Myc“, das u.a. eine Form des Knochenmarkkrebses verursacht

(und schon dadurch „wichtig“ ist). Der Name „Myc“ stammt von den im Knochenmark vorkommenden „Myelocyten“, aus denen sich bestimmte weiße Blutzellen bilden.

## Ein Beispiel: das Krebsprotein Myc

Das Myc Protein ist eines der meiststudierten Ursachen von Krebs. Allerdings war es ein langer Weg bis man die Funktion des Proteins geklärt hatte [1]. Myc bindet als Transkriptionsfaktor an DNA und schaltet dabei andere Gene an, die wiederum eine wichtige Rolle bei der Zellteilung spielen. Als man diese DNA-Bindungsaktivität 1991 entdeckte [2], waren bereits mehr als 2000 wis-

senschaftliche Artikel über Myc veröffentlicht worden! Die wichtigste Funktion wurde in diesen 2000 Studien nicht erkannt: Myc braucht einen Partner, um an DNA zu binden, nämlich ein anderes Protein namens Max. Beide Proteine bilden einen Komplex, der im Gegensatz zu den einzelnen Proteinen an DNA binden kann. Damit ist die Geschichte aber noch nicht zu Ende: die Aktivität von Max wird durch ein drittes Protein reguliert, das vielleicht nicht unpassend Mad getauft wurde und das wiederum eine Bindung mit Max eingeht um den Komplex Mad-Max zu bilden. Die Geschichte ist damit aber immer noch nicht zu Ende – weitere Proteine binden an Myc und Max



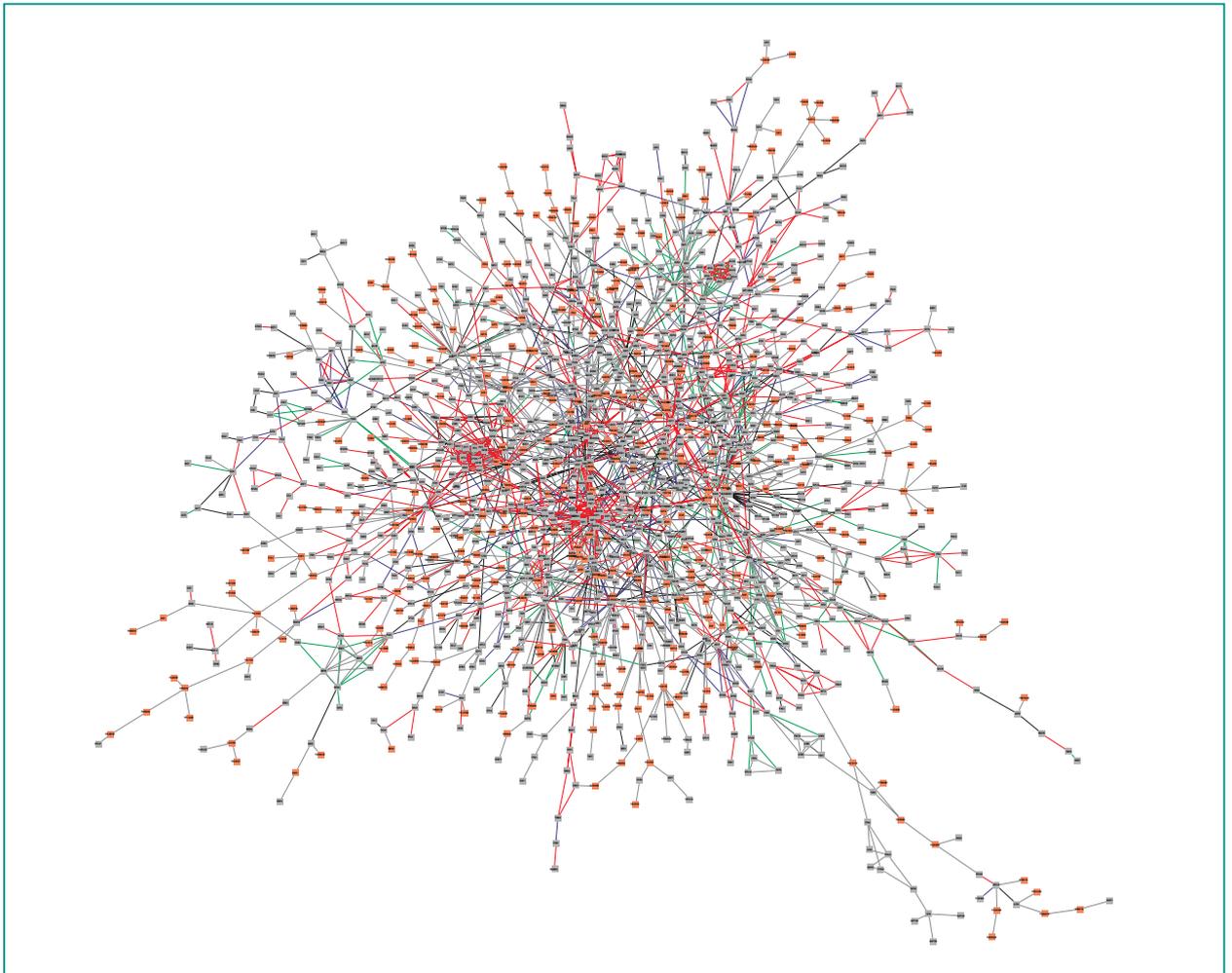
**Abb. 1:** Das c-Myc-Interaktions-Netzwerk. c-Myc (gelb) und seine Interaktionspartner (das „c“ steht für „cellulär“ im Gegensatz zu „v-Myc“ oder „N-Myc“, die in Viren bzw. Nervenzellen gefunden wurden). Beachte, dass c-Myc nur mit einem Interaktionspartner wie Max an DNA binden kann (Details im Text). Protein-Protein-Interaktionen sind hier als gerade Verbindungslinien dargestellt. Ovale deuten an, dass das Protein links oben am Oval mit sich selbst interagieren kann (also ein Homodimer bildet). Alle hier rot gezeigten Proteine haben wiederum weitere Interaktionspartner etc. (Daten und Diagramm aus [8]).

und an diese binden wiederum andere (Abb. 1). Wenn aber Myc für seine Aufgabe Max braucht und Max braucht Mad, und Mad wiederum andere Proteine, dann kann man Proteine wie Myc (oder Max oder Mad oder...) auch nur im Kontext ihrer Interaktionen verstehen. Tatsächlich stellte es sich erst vor 1-2 Jahren immer mehr heraus, dass die meisten Proteine einer Zelle über solche Protein-Protein-Interaktionen in komplexen Netzwerken miteinander verbunden sind (s. Abb. 2).

### Myc-Mad-Max: Krebsproteine ... und Hefe?

Offensichtlich reicht es nicht, wenn man nur einzelne Proteine untersucht, seien sie auch noch so wichtig (obwohl viele Krebsproteine *per definitionem* wichtig sind, lösen ihre ebenso wichtigen Bindungspartner oft keinen Krebs aus). Aus diesem Grund haben wir beschlossen, Protein-Protein-Interaktionen im „Gesamtkontext“ zu untersuchen, also am besten gleich Proteom-weit, d.h. *alle*

Proteine eines Organismus umfassend. Begonnen habe ich damit bereits als Postdoc in Seattle, wo wir 1997 angefangen haben alle Proteine der Bäckerhefe auf Ihre Interaktionen zu testen [3]. Aber warum gerade Hefe? Es gibt verschiedene gute Gründe und nur einer davon ist: Die Hefe war und ist *der* Modellorganismus schlechthin: die Hefe war der erste höhere Organismus, dessen Gene alle bekannt wurden, der erste Organismus, für den man DNA-Chips hergestellt hat, der



**Abb. 2: Proteinnetzwerk in Hefe. Ein Netzwerk verbindet 1548 Proteine über 2358 Interaktionen. Proteine bekannter Funktion sind hier in Grau, Proteine unbekannter Funktion in Rot dargestellt. Beachte, dass hier nur ein Teil aller Hefeproteine dargestellt ist! (nach [7]).**

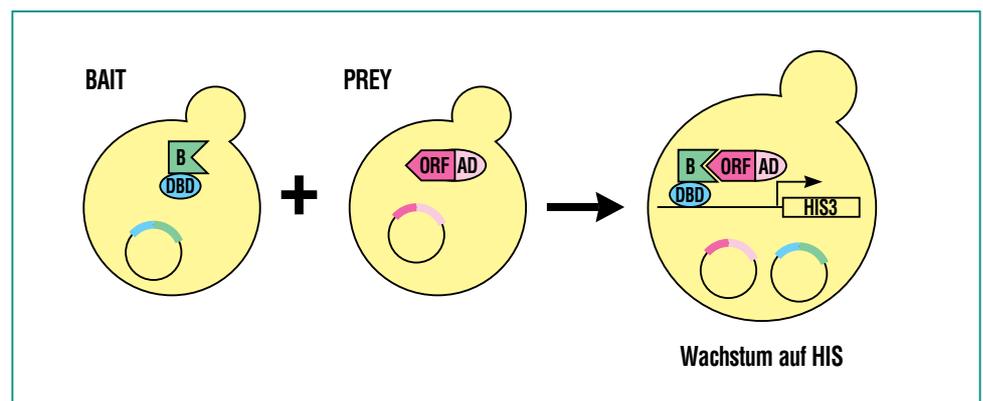
erste bei dem systematische Studien an allen Proteinen durchgeführt wurden und so weiter. Und immerhin rund ein Viertel der 6000 Hefegene haben verwandte Gene beim Menschen und sind somit auch ein sehr gutes Modell für zahlreiche Prozesse, wie sie sich auch in menschlichen Zellen abspielen. Man kann mit Fug und Recht sagen, dass alle wichtigen Prozesse bei Hefezellen und menschlichen Zellen gleich oder sehr ähnlich ablaufen. Die gestörte Zellteilung, wie sie bei menschlichen Tumoren auftritt, wurde beispielsweise zunächst bei der Hefe untersucht. Drei Pioniere der *Hefegenetik*, Leland Hartwell, Tim Hunt und Paul Nurse, wurden dafür 2001 mit dem Medizin-Nobelpreis ausgezeichnet!

### Wie man komplexe Proteinnetzwerke untersucht

Nachdem das Hefegenom vollständig sequenziert war, kannte man zwar die darin kodierten 6000 Proteine, aber nicht deren Funktion und Anordnung in der Zelle. Oft gibt die Sequenz eines Proteins bereits einen Hinweis auf die Funktion oder den Ort innerhalb der Zelle. Beispielsweise enthalten mehr als 1000 Hefeproteine hydrophobe Aminosäure-Abschnitte und deuten damit an, dass sie in einer der ebenso hydrophoben Membranen stecken. Aber in welchen Membranen und in welcher Anordnung ist daraus meistens nicht ersichtlich. Eine Möglichkeit die Umgebung eines Proteins aufzuklären, besteht z.B. darin, alle damit zusammenhängenden Proteine in Form eines „Proteinkomplexes“ zu isolie-

ren und dann ihre Zusammensetzung mit Hilfe der Massenspektrometrie zu bestimmen. Aus der Genomsequenz kann man ja die genauen Massen aller darin kodierten Proteine vorhersagen und mit den experimentell ermittelten Massen vergleichen. Seit kurzem gibt es Projekte, die solche Analysen von Proteinkomplexen systematisch im Hochdurchsatzverfahren durchführen. Auch hier war die Hefe wieder der wichtigste Modellorganismus, bei dem diese Methoden entwickelt und dadurch auch zuerst angewandt wurden [4]. Leider liefert die Massenspektrometrie keine Information über die Anordnung der Proteine in einem Proteinkomplex. Es gäbe natürlich die Möglichkeit, die Struktur der Komplexe mit kristallographischen Methoden zu

untersuchen; auf Grund ihrer Größe ist dies bei vielen Proteinaggregaten aber nicht möglich. Wir verwenden daher das sogenannte *Two-hybrid-System*, eine Methode, die auf einem genetischen Trick basiert: man kann eine Zelle dazu veranlassen nur dann zu wachsen, wenn zwei bestimmte Proteine interagieren (Abb. 3). Damit kann man eine Proteininteraktion an einer simplen Hefekolonie gleichsam „ablesen“. Da man alle Proteine in der Hefe kennt, kann man auch alle Proteine systematisch paarweise auf solche Interaktionen testen – bei der Hefe sind dies rund 6000 mal 6000 = 36 Millionen Paare (wenn man alle Kombinationen testen will)! Freilich ist dies mit einem ziemlich großen Aufwand verbunden, aber glückli-



**Abb. 3: Prinzip des Two-hybrid-Systems.** Das Two-hybrid-System beruht auf der Expression zweier Fusionsproteine in einer Zelle, die in diesem Fall durch die Verpaarung von zwei haploiden Hefezellen erreicht wird, von denen jede ein anderes Fusionsprotein exprimiert. Eines der Fusionsproteine besteht aus einer DNA-bindenden Domäne (DBD), die an den Promoter eines Reportergens (hier: His3) binden kann, und einem Protein „B“ (für „bait“ = Köder). Das zweite Fusionsprotein besteht aus einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD) und einem Protein ORF (für *open reading frame* = offenes Leseraster, also ein beliebiges Protein. *Prey* = Beute). Interagiert B mit ORF wird ein Transkriptionsfaktor gebildet, der das Reporterogen anschalten kann. Dadurch kann die Zelle auf Histidin-freiem Medium wachsen. Eine wachsende Hefekolonie zeigt damit an, dass die beiden Proteine interagieren (Details auf unserer Webseite [9]).



**Abb. 4: Roboter, wie er von uns für automatisierte Two-hybrid-Screens verwendet wird.**

cherweise lassen sich solche Tests automatisieren und damit für recht große Proteinzahlen realisieren (Abb. 4).

### Was lernt man nun daraus ... und was nicht?

Die Analyse von Proteininteraktionen hat natürlich zum Ziel, die Funktion einzelner Proteine zu verstehen. Da ein Protein seine Aufgaben aber fast immer in Zusammenarbeit mit anderen Proteinen erfüllen kann, sind seine Interaktionen von zentraler Bedeutung für dessen Funktion – genauso wie die Teile eines Automotors nicht alleine arbeiten können um einen Wagen zu bewegen. Wie bei einem Auto ist das Schlüsselwort aber auch hier „bewegen“. Proteininteraktionen werden meistens zuerst als *Zustände* beschrieben und nicht als *Aktionen* (auch wenn das Wort

*Aktion* in *Interaktion* drin steckt!). Und eine solche Zustandsbeschreibung sagt meistens nicht viel über die Konsequenzen einer Interaktion aus, die man deshalb im nachhinein noch gezielter untersuchen muss! In unserem Beispiel mit Myc bewirkt die Bindung von Max, dass der Komplex Myc-Max *an DNA binden* kann, was wiederum eine weitere *Aktion* nach sich zieht, nämlich das *Anschalten* eines Gens (also dessen Transkription), was wiederum weitere Effekte zur Folge hat. Umgekehrt verhindert die Bindung von Mad an Max, dass Max an Myc binden kann, womit die Aktivität von Myc *reguliert* werden kann.

Man kann also über Proteininteraktionen viel über die Funktion einzelner Proteine lernen, wobei die Interaktion aber nur der erste Schritt zum Verständnis eines Proteins sein kann. Nun erfordern

Experimente, welche die funktionellen Konsequenzen solcher Interaktionen erforschen, einen weit größeren Aufwand als die Identifikation der Interaktion an sich. Damit wird man vor das Dilemma gestellt, entweder viele Interaktionen zu identifizieren (ohne jedoch viel über die Funktionen zu lernen) oder wenige einzelne Interaktionen genauer zu studieren – mit der Hoffnung, ihre Funktion genau zu verstehen. Im Moment konzentrieren wir uns noch darauf, möglichst viele Interaktionen zu finden, schlicht weil bisher nur ein Bruchteil aller Proteininteraktionen bekannt ist (in der Hefe ca. 8000 von bis zu 30.000 [5,6] – beim Menschen ist das Verhältnis zwischen bekannten und allen Interaktionen sicher noch viel kleiner). Je mehr Interaktionen aber bekannt sind, desto klarer wird auch der Kontext, in dem ein Protein seine Funktion entfaltet und desto gezielter lassen sich wiederum Experimente zu seiner genauen Funktion anstellen. Ein weiteres Ziel unserer Arbeit ist es nicht zuletzt, solche „gezielten“ Experimente für eine größere Anzahl von Proteinen parallel durchzuführen, also auch schwierigere Experimente zu automatisieren.

Aus größeren Datensätzen lassen sich aber nicht nur Einsichten in die Funktion einzelner Proteine gewinnen, sondern auch ein Verständnis der Zusammenhänge auf „höherer“ Ebene. So konnten wir mit einer theoretischen Analyse aller bekannten Proteininteraktionen in der Hefe zeigen, wie verschiedene Funktionen in einer Zelle vernetzt sind [7]. Beispielsweise interagieren Proteine des

Zellzyklus mit vielen anderen Proteinklassen – was darauf hindeutet, dass letztere im Lauf des Zellzyklus (also während der Teilung) gezielt reguliert werden. Andere Prozesse wie der Proteintransport zwischen einzelnen Organellen werden offensichtlich nicht vom Zellzyklus beeinflusst. Man kann daraus z.B. schließen, dass solche Prozesse für die Krebsentstehung keine maßgebliche Rolle spielen sollten, wo Zellzyklusproteine ja *immer* beteiligt sein *müssen*.

### Epistemologischer Epilog – Prinzipien versus Details in der Biologie

Das vorher genannte Dilemma, entweder einzelne Details sehr gründlich oder größere Zusammenhänge eher oberflächlich zu studieren, führt zu einer fundamentalen Frage: reicht es für das Verständnis eines biologischen Organismus aus, anhand einer kleinen Anzahl von Proteinen dessen Funktions*prinzipien* zu verstehen?

Die Biologie und besonders die Molekularbiologie haben sich in den letzten 40 Jahren vor allem um die Aufklärung von Mechanismen gekümmert, also zum Beispiel „Wie funktioniert der genetische Code?“ oder „Wie werden Nervensignale übertragen?“. Ernüchternd ist, dass selbst ein gutes Verständnis dieser Mechanismen die realen Organismen nicht wirklich erklärt. Es gibt zwei Gründe für diese Diskrepanz: erstens berücksichtigen Prinzipien nicht die Komplexität eines Lebewesens. Beispielsweise sind die

Mechanismen der Signalübertragung im Nervensystem relativ gut verstanden, aber zur Informationsspeicherung reicht eben eine Synapse nicht aus – man braucht davon sehr viele, komplex verschaltete Synapsen. Zweitens unterliegen Prinzipien zahlreichen Variationen, so wie die Synapsen im Gehirn viele verschiedene Transmitter, Signaltransduktionswege, und physiologische Zustände besitzen. Diese mehr oder weniger großen Variationen erklären wiederum *im Prinzip* die Unterschiede zwischen Arten, also z.B. zwischen Rattenhirn und Menschenhirn, aber eben nur im Prinzip. Man ist sich dieser Variationen gewiss, ohne jedoch viele konkrete Details zu kennen.

Die Schlussfolgerung daraus ist, dass wir nicht nur die Mechanismen verstehen, sondern die *Details* kennen müssen, die Ratten- und Menschenhirn unterscheiden. Man muss aber nicht einmal bis zur Hirnforschung gehen: selbst um eine einzelne Hefezelle zu verstehen, reicht es nicht, wenn man die Details der Transkription, der Replikation etc. kennt. Man müsste wissen, wie *jedes einzelne* Gen transkribiert wird, wie *jedes einzelne* Protein gefaltet wird, wie stabil *jede einzelne* mRNA und *jedes einzelne* Protein ist, ihre Funktion, Struktur *et cetera*. Prinzipien erklären zwar *virtuelle* Zellen aber keine *realen*. Aus diesem Grund kommen wir nicht umhin, *alle* Gene, Transkripte und Proteine zu untersuchen. Dies erfordert den massiven Einsatz von parallelen Untersuchungsverfahren, d.h. letztendlich Automatisierung und

Robotik – die Alternative wäre langweilige, vermutlich jahrzehntelange Routinearbeit.

Gene oder Proteine auf Eigenschaften zu untersuchen, auf die man schon Dutzende oder Hunderte andere Gene oder Proteine untersucht hat, mag nicht besonders originell sein – vor allem weil die Wahrscheinlichkeit dramatisch abnimmt, neue „Prinzipien“ und damit aufregende neue Mechanismen zu finden. Aber diese Art von Forschung ist trotzdem von entscheidender Bedeutung in der Biologie, die nun einmal von *wenigen* Prinzipien und endlos *vielen* Variationen über diese Themen geprägt ist – erst dadurch kommt ja auch die unglaubliche Vielfalt an Lebewesen zustande – obwohl es nur ein paar Dutzend „Hauptbaupläne“ gibt. Die Herausforderung wird deshalb darin bestehen, biologische Phänomene aus einer Unzahl von „Faktoiden“ zu erklären und gleichzeitig aus der Masse an Daten wiederum „emergente“ Prinzipien herauszufiltern, die eher Systemeigenschaften denn Eigenschaften einzelner Bauteile sind. Das wird die Hauptaufgabe der „Systembiologie“ im 21. Jahrhundert sein, der wir uns stellen müssen.

---

---

## Literatur

- [1] B. Lüscher,  
*Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network.*  
*Gene* 277 (2001) 1
- [2] E.M. Blackwood, R.N. Eisenman,  
*Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc.*  
*Science* 251 (1991) 1211
- [3] P. Uetz, et al.  
(2000) *A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae.*  
*Nature* 403 (2000) 623
- [4] A.-M. Gavin, et al.  
*Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes.*  
*Nature* 415 (2002) 141
- [5] C.L. Tucker, et al.  
*Towards an understanding of complex protein interaction maps.*  
*Trends in Cell Biology* 11 (2001) 102
- [6] A. Kumar, M. Snyder,  
*Protein complexes take the bait.*  
*Nature* 415 (2002) 123
- [7] B. Schwikowski, et al.  
*A network of interacting proteins in yeast.* *Nature Biotechnology* 18 (2000) 1257
- [8] <http://pronet.doubletwist.com/>  
Datenbank wurde Anfang Februar geschlossen
- [9] <http://itgmv1.fzk.de/www/itg/uetz/>

# Todessignale durch Umweltchemikalien

H.F. Krug, ITG

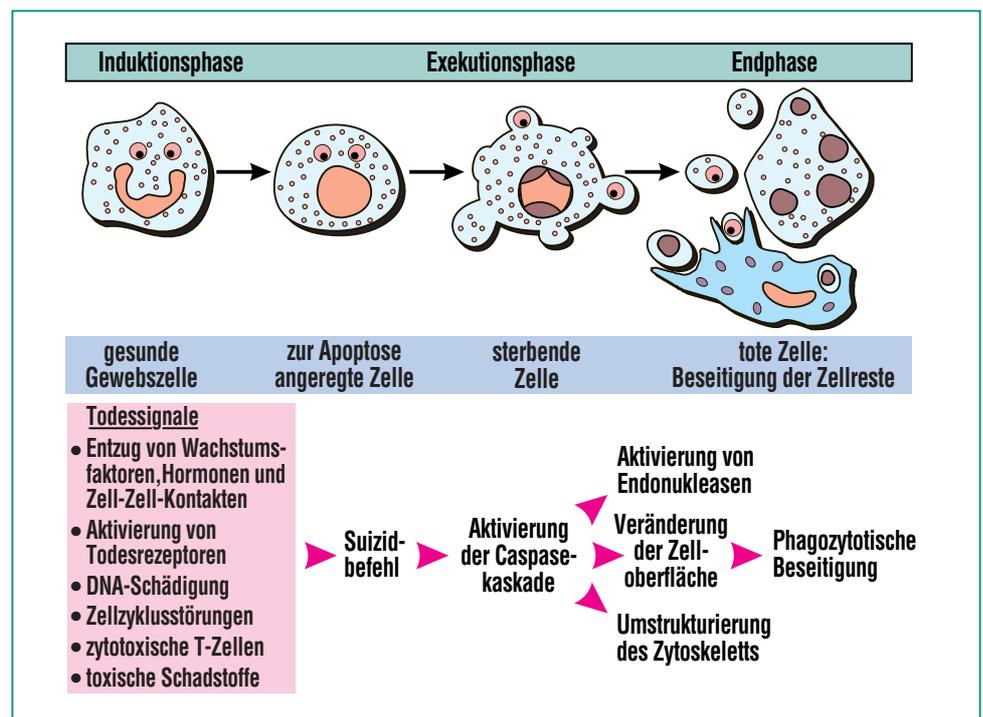
Leben und Tod sind zwei ständige Begleiter, die bereits während der Entwicklung eines neuen Organismus im Ei oder im Mutterleib Hand in Hand arbeiten. Ohne gezieltes Absterben einzelner Zellen bzw. Zellgruppen nach einem festgelegten „Programm“, kommt es unweigerlich zu Fehlentwicklungen und somit zu einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität. Die genetisch festgelegte Form des Zelltodes wurde in dieser Form erst in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts erkannt. An einfachen Organismen, wie dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, wurden diejenigen Gene gefunden, die für diesen Prozess der Apoptose verantwortlich sind. Als nachfolgend beschrieben wurde, dass die Überexpression eines bestimmten Gens diesen Zelltod verhindern kann und somit zur Krebsentstehung beiträgt [1], war ein wissenschaftliches Feld eröffnet, das bis heute viele 10.000 Veröffentlichungen hervorgebracht hat (vgl. unsere Arbeiten: [2]).

Die Apoptose ist für einen vielzelligen Organismus eine unerlässliche Möglichkeit, sich selbst zu organisieren und zu erhalten (Abb. 1). Wie bereits erwähnt, spielt der gezielte apoptotische Tod bestimmter Zellen bereits während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle. Die Formgebung von Körper und Organen geschieht durch Apoptose. So werden zum Beispiel die Häute zwischen Zehen und Fingern in der menschlichen Embryonalentwicklung apoptotisch entfernt. Auch die Metamorphose der Kaulquappe zum Frosch, im Spe-

ziellen die Rückbildung des Schwanzes, ist solch ein typisches Beispiel (für einen Überblick siehe: [3]).

Eine ganz besondere Rolle spielt die Apoptose aber bei Vorgängen, die der Vererbung dienen, so die Bildung und Selektion von Keimzellen (Ei- und Samenzellen). Jeder Fehler im genetischen Material dieser Zellen würde sich unweigerlich auf die Nachkommen übertragen. Daher wird auf dieser Stufe ganz besonders intensiv kontrolliert und bis zu 95% der angelegten Keimzellen werden vor der Reifung apoptotisch eliminiert. Das gleiche gilt für Immunzellen, deren Auslese eben-

falls für das Überleben sehr wichtig ist, und für alle Gewebe, die eine besonders hohe Wachstumsrate besitzen, wie die Haut, die Epithelien des Magen-Darm-Traktes oder das Knochenmark. Hier können bei der Zellteilung wesentlich häufiger Fehler bei der Verdopplung der DNA auftreten und solche Zellen, die fehlerhafte DNA besitzen, werden normalerweise umgehend zur Apoptose angeregt und somit „ausgelen“. Fehler oder Schäden in einzelnen Zellen können aber auch die Folge von äußeren Einflüssen sein. Virale Infektionen, DNA-schädigende Stoffe oder Stoffe, die in die Signalübertra-



**Abb. 1:** Die verschiedenen Phasen der Apoptose. Durch sehr unterschiedliche Auslöser kann der programmierte Zelltod herbeigeführt werden. Nachdem ein solcher „Suizidbefehl“ gegeben wurde, werden in der Zelle bestimmte Exekutions-Enzyme, die Caspasen, aktiv, die sämtliche wichtigen Funktionen der Zelle ausschalten. Die Zelle löst sich dabei nicht einfach auf, sondern bildet kleine „Pakete“, die apoptotischen Körperchen, die dann von umliegenden Zellen aufgenommen (phagozytiert) werden.

gungswege der Zelle eingreifen [4], können ebenfalls dazu führen, dass die betroffenen Zellen „eliminiert“ werden.

Wie wichtig der Vorgang des programmierten Zelltodes für einen Organismus ist, wird durch diese Beispiele deutlich. Gleichzeitig

kann dieser Prozess auch von Schadstoffen und anderen äußeren Einflüssen ausgelöst werden. Somit ist die Homöostase (Stoffwechselgleichgewicht) eines Organs bzw. eines Organismus von vielen Faktoren abhängig, die den Prozess der Apoptose steuern (Abb. 2).

Bleibt der den Zelltod auslösende Effekt von toxischen Stoffen auf einzelne Zellen beschränkt, so stellt das für den Organismus kein großes Problem dar. Erstreckt sich der schädigende Einfluss aber auf ganze Gewebebereiche oder wichtige regulatorische Zellen in Schlüsselpositionen, dann hat das u.U. negative Folgen für das ganze Lebewesen. Bei nicht angepasster Apoptose kann sich ein Organ nicht mehr regenerieren und verliert die Fähigkeit, seine Funktion auszuüben. Bei einer Verhinderung der Apoptose kann es dagegen zu krebsartigen Wucherungen kommen, die sich bei Anhäufung bestimmter Mutationen dann zu einem bösartigen Tumor wandeln können (Tab. 1).

Für den biomedizinischen Schwerpunkt im Forschungszentrum Karlsruhe ergeben sich zwei wichtige Gesichtspunkte aus diesen Überlegungen:

- Die Untersuchung technischer Stoffe, denen der Mensch ausgesetzt ist.
- Die Optimierung der Materialentwicklung für künstliche Implantate und medizinische Geräte.

Beiden Gesichtspunkten ist der direkte Kontakt von Körperzellen mit Fremdstoffen oder synthetischen Oberflächen gemeinsam, der eine Veränderung des Verhaltens der betroffenen Zellen nach sich ziehen kann [vgl. 5].

Ausgeklammert werden soll bei den nachfolgenden Betrachtungen die akut-toxische Form des Zelltodes, die Nekrose. Da diese nicht regulierte Form immer dann

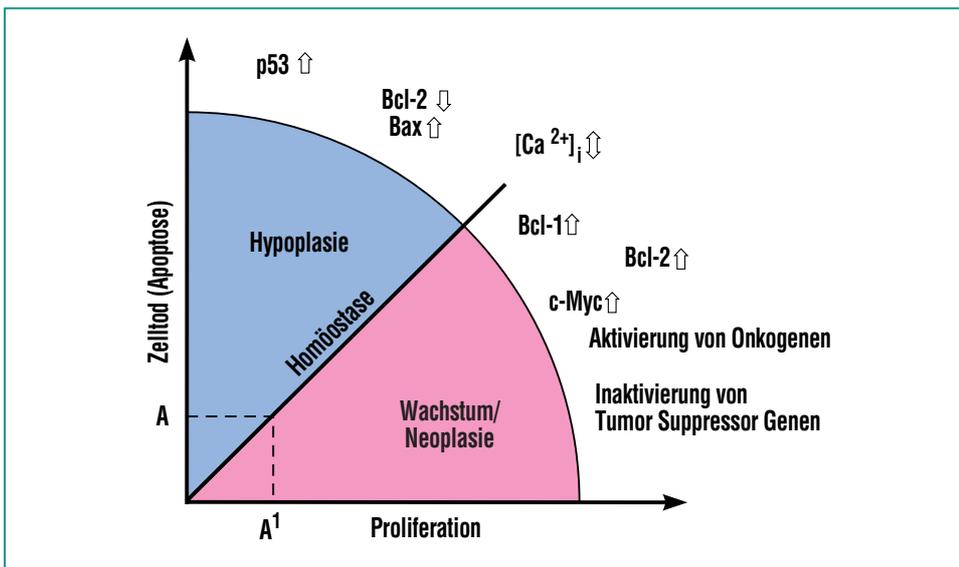


Abb. 2: Die Regulation der Organhomöostase.

Das Wachstum und die Regeneration von Organen ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, die ein vermehrtes Wachstum (Neoplasie) oder einen vermehrten Zelltod (Hypoplasie) auslösen können. Proteine (p53, Bcl-x, Bax, c-Myc), regulatorische Ionen (Ca<sup>2+</sup>) und die Aktivierung oder Hemmung verschiedener Gene können dieses Gleichgewicht in die eine oder andere Richtung verschieben.

Apoptoserate zu niedrig	Apoptose zu hoch
Burkitt-Lymphom	Abstoßung transplanterter Organe
Diabetis	AIDS
Krebs	Alzheimer Erkrankung
Nierenerkrankungen (SLE*)	BSE / Creutzfeld-Jakob
Pfeiffersches Drüsenfieber	Chronische Hepatitis
Syndactylie (Einzigigkeit)	Morbus Parkinson
	Schlaganfall / Herzinfarkt

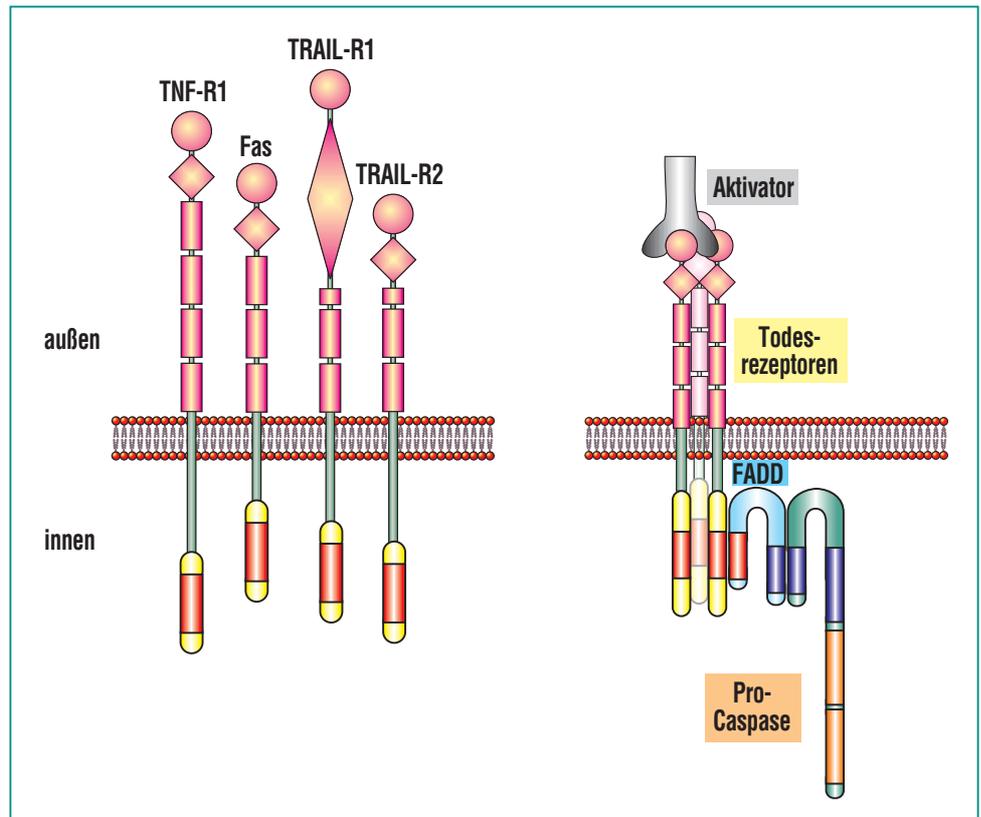
\*SLE: Systemischer *Lupus Erythematosus*;

Tab. 1: Beispiele für den Zusammenhang zwischen Apoptose und Krankheiten.

auftritt, wenn z. B. eine Verletzung vorliegt oder eine sehr hohe Konzentration eines Schadstoffes einwirkt, soll sie bei den Betrachtungen biologischer Mechanismen an dieser Stelle außer Acht gelassen werden.

Wie wird der programmierte Zelltod reguliert und welche Elemente könnten direkt durch Fremdstoffe beeinflusst werden? Vermittler sind hierbei verschiedene Rezeptoren in der Zellmembran, die bei entsprechender Aktivierung die apoptotische Signalkette in Gang setzen (Abb. 3).

In der Phase der Aktivierung bildet sich der als DISC bezeichnete „Death-inducing signalling complex“ [7], der aus mind. 4 verschiedenen Proteinen besteht, dem Aktivator, dem Rezeptor, dem Adaptorprotein und der Initiatorcaspase. Der nächste Schritt besteht wahrscheinlich in einer autokatalytischen Spaltung der benachbarten Caspasemoleküle, die dadurch eigenständig aktiv werden können, d.h. sie lösen sich vom DISC und bauen in der Zelle verschiedene Proteine ab. Außerdem zerschneiden diese molekularen Scheren auch weitere Caspasen, was zu deren Aktivierung führt (Caspase-Kaskade). Nun gibt es kein Zurück mehr. Wichtige Reparaturenzyme, aber auch Strukturproteine des Zytoskeletts werden abgebaut und letztlich sind auch im Zellkern Enzyme dabei, die DNA zu zerschneiden. All dies geschieht unter Energieaufwendung, d.h. die Zelle führt noch in einem bestimmten Ausmaße einen Stoffwechsel zur Energiegewinnung durch, sie lebt noch! Erst, wenn sie in mehrere kleine-

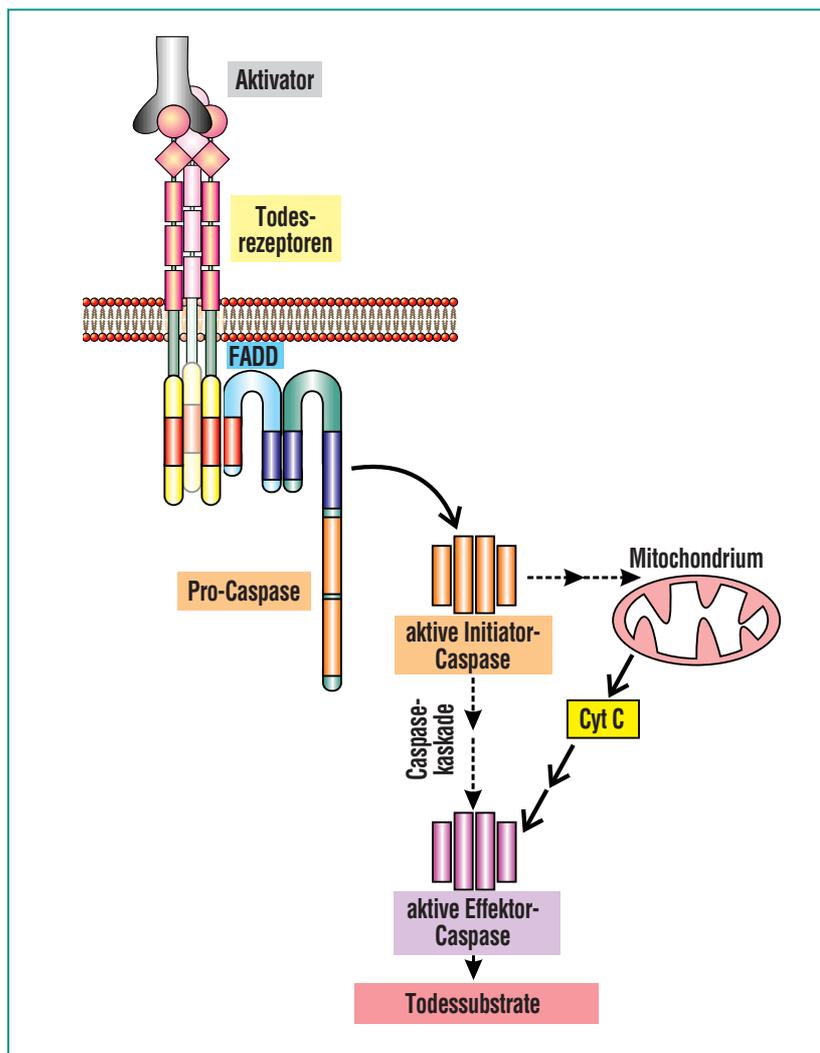


**Abb. 3: Die Elemente der apoptotischen Signalkette.**

Schematisch gezeigt sind die 4 wichtigsten „Todesrezeptoren“ (linke Seite). Allen gemeinsam ist ein Proteinteil auf der Innenseite der Zelle, die im Bild rot markierte sogenannte „Todesdomäne“ [6]. Nach Aktivierung aggregieren mehrere Rezeptormoleküle miteinander (rechte Seite) und dann können bestimmte Adaptor-Proteine (FADD) an der Todesdomäne andocken. Sie stellen eine Verbindung mit Enzymen her (Pro-Caspase), die nachfolgend den gesteuerten Abbau der Zelle durchführen.

re Teile zerfällt und von benachbarten Zellen aufgenommen und rezykliert wird, ist sie tot (vgl. Abb. 1). In diesem Netz von Signalen spielen auch die Mitochondrien, die Kraftwerke der Zellen, eine herausragende Rolle. Zum einen müssen sie die notwendige Energie bereitstellen, um die Abbauprozesse zu ermöglichen, zum anderen aber können sie selbst in das Geschehen der Apoptose eingreifen, sowohl auslösend als auch hemmend. In verschiedenen Zellen müssen sie

sogar das Apoptosesignal der Rezeptoren verstärken, da dieses selbst nicht stark genug wäre, um den Zelltod herbeizuführen (Abb. 4). Diese Funktion der Mitochondrien wird sehr genau durch verschiedene Regulatorproteine der Bcl-2 Proteinfamilie überwacht [8]. Als verstärkendes Signal wird von den Mitochondrien das Protein Cytochrom C abgegeben, das im Zytosol der Zelle zur Aktivierung der Caspase-9 und somit ebenfalls zur Apoptose führt.



**Abb. 4: Die Signalwege zum regulierten Zelltod.**  
 Der vollständige Signalweg vom Rezeptor bis zum Auftreten der Todessubstrate beginnt am DISC (vgl. Abb. 3) und führt in manchen Zellen zur direkten Stimulierung der Caspase-Kaskade, wobei mehrere verschiedene Caspasetypen nacheinander aktiviert werden und schließlich die Zelle zerstört wird. In anderen Zellen jedoch ist dieser direkte Weg verbaut. In diesen werden daher vorher die Mitochondrien insoweit beeinflusst, dass in deren Membranen Löcher auftreten, durch die Cytochrom C (Cyt C) austreten kann. Dieses Cytochrom C verstärkt die Aktivität von Caspasen und dies resultiert dann im Tod der Zelle.

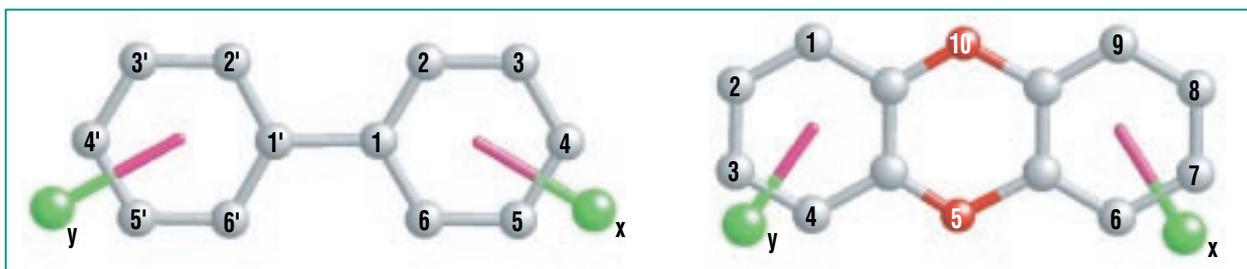
Alle genannten Elemente der apoptotischen Signalwege können natürlich unter bestimmten Bedingungen ein Angriffsziel für schädigende Einflüsse, wie z. B.

Umweltschadstoffe oder Viren, aber auch für Medikamente sein. Im weiteren sollen diese Möglichkeiten an einigen Beispielen diskutiert werden.

### Halogenierte Kohlenwasserstoffe (PAKs, PCBs und Dioxine)

Die Stoffgruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAKs) sowie die halogenierten Kohlenwasserstoffe PCB (polychlorierte Biphenyle) und Dioxine (Abb. 5) sind Umweltschadstoffe, die ausschließlich durch den Menschen in die Umwelt eingebracht werden.

All diese Kohlenwasserstoffe können in die Regulation genetischer Programme der Zelle eingreifen (siehe nachfolgenden Bericht von M. Göttlicher). Für ganz spezielle Zellen des Immunsystems wird diskutiert, dass dadurch auch die Apoptose dieser Zellen eingeleitet wird und somit z.B. durch Dioxin das Immunsystem seine Aufgabe nicht mehr erfüllen kann [9]. Beispielhaft seien die Fälle von Robbensterben, u.a. in der Nordsee, genannt, die der immuntoxischen Wirkung verschiedener chlorierter Kohlenwasserstoffe zugeschrieben werden [10,11]. Die so geschwächten Tiere sind dann ein leichtes Opfer einer Morbillivirus-Infektion geworden. Nach wie vor ist jedoch der Beweis nicht erbracht, dass die Schwächung des Immunsystems durch die Apoptose der Thymozyten (Thymusatrophie) eine Voraussetzung für einen tödlichen Verlauf der Infektion mit Morbillivirus ist [12,13]. Dennoch sind gerade in jüngster Zeit wieder Experimente veröffentlicht worden, die gezeigt haben, dass über die Aktivierung des Ah-Rezeptors durch PAKs Zellen in die Apoptose getrieben werden [14].



**Abb. 5: Allgemeine Strukturen der polychlorierten Biphenyle (links) und Dioxine (rechts).** Während die PCBs technisch eingesetzte Substanzen darstellen und daher in großen Mengen produziert wurden, sind die Dioxine reine Umweltschadstoffe, die hauptsächlich bei Verbrennungsprozessen entstehen. Beide Stoffgruppen gibt es in verschiedener Anzahl (Kongener), da sie unterschiedlich chloriert sein können (Clx und Cly). PCBs haben daher 209 (Cly + Clx = 1 bis 10) und Dioxine 75 (Cly + Clx = 1 bis 8) verschiedene Erscheinungsformen, von denen aber nur wenige wirklich umweltrelevant sind. Sauerstoffatome sind rot, Kohlenstoffatome sind grau und die Chloratome sind grün dargestellt. Die Zahlen innerhalb der gezeigten Strukturen bezeichnen die Positionsnummern der Ringatome. Das bekannteste und giftigste Dioxin ist z. B. das 2,3,7,8-Tetrachlor-Dibenzodioxin (TCDD).

## Metalle: Ionen und Organometalle

In der Ausgabe 4/2001 der „Nachrichten“ wurde bereits auf die besondere Bedeutung der Metalle in der Umwelt hingewiesen [15]. Sie werden am häufigsten und mengenmäßig am bedeutendsten freigesetzt. Weiterhin werden sie in vielen medizinischen Bereichen eingesetzt, sowohl als Implantate als auch in Medikamenten. Die Exposition aller Lebewesen gegenüber den Metallen ist daher ein intensiv bearbeitetes Gebiet [Übersichten bei: 16,17].

Die verschiedenen Metalle und Metallspezies unterscheiden sich meist auch in ihren Wirkungen. So gibt es keinen gemeinsamen Mechanismus, über den sie den Zelltod auslösen, aber es gibt einige Gemeinsamkeiten, die an dieser Stelle besonders hervorgehoben werden sollen. So ist für Cadmium beschrieben worden, dass es den Ionenhaushalt der

Zelle, insbesondere für Calcium, verändert, aber auch die Mitochondrien stark beeinflusst [18]. Calcium ist aber ein wichtiges Ion für die Signalprozesse in der Zelle und eine unkontrollierte Veränderung seiner Konzentration führt leicht zum Tod der Zelle [19]. Ein Beweis für die Beteiligung der Mitochondrien kommt aus den Versuchen zur Rolle des Bcl-2 Proteins. Dieses anti-apoptotische Protein verhindert die Freisetzung des Cytochrom C aus den Mitochondrien und unterbricht somit an dieser Stelle die todbringende Signalkette (vgl. Abb. 4). Wird dieses Protein in Zellen überexprimiert, d.h. weit über das normale Maß hinaus produziert, dann kann die Apoptose durch Cadmium nicht mehr oder nur noch schwach ausgelöst werden [20]. Andere Metalle führen über eine Caspase-Aktivierung zur Apoptose, die möglicherweise ebenfalls von toxischen Effekten auf die Mitochondrien abhängt. So wurde

Apoptose in Zellen beobachtet, die mit Arsentrioxid behandelt wurden [21]. Durch Bleinitrat hervorgerufene Sauerstoffradikalbildung in den Mitochondrien leitet diesen Prozess ebenfalls ein [22]. Durch Veränderungen im Immunsystem können Metalle ebenfalls nachhaltig in die Signalprozesse der Zelle eingreifen und zum Zelltod führen. Das wird vor allem als Antwort des Organismus auf Metalloberflächen bei Implantaten [23] oder Spurenelementen aus Stahl-Stents [24] beobachtet.

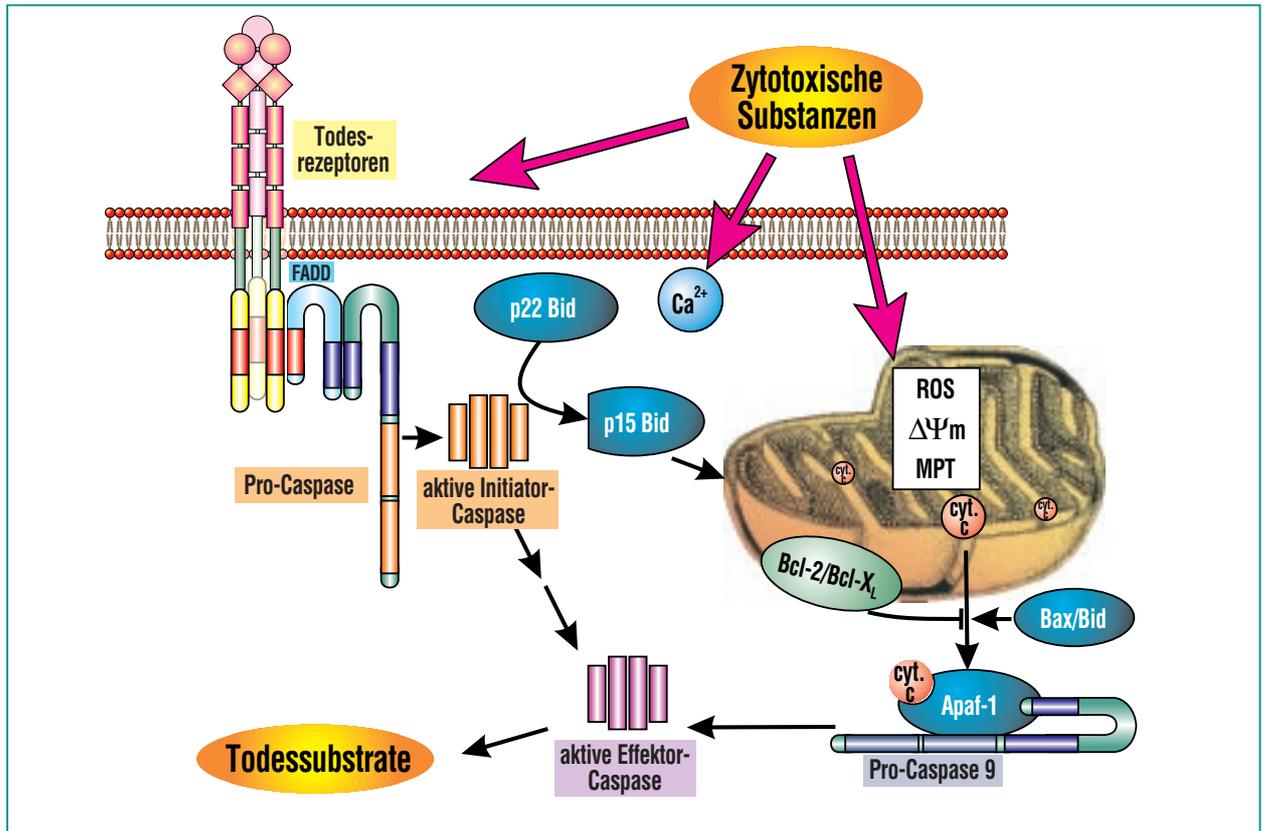
Eine besondere Stellung nehmen die organischen Metallverbindungen ein. Durch ihre hohe Fettlöslichkeit können z. B. Methylquecksilber aber auch organische Zinn- oder Bleiverbindungen durch die Zellmembran hindurch wandern. Dadurch ergeben sich für verschiedene Quecksilberspezies erhebliche Unterschiede in ihrer Wirkung. Während Methylquecksilber in viel geringeren Konzentrationen bereits zu einer Aktivierung der

Todesrezeptoren [25] als auch der Mitochondrien führt, werden von Quecksilberchlorid deutlich höhere Mengen benötigt, um in den Zellen oxidativen Stress und Zelltod auszulösen [26]. Für trialkylierte Zinnverbindungen konnte gezeigt werden, dass sie zu einem Verlust des Membranpotentials der Mitochondrien beitragen und nachfolgend die mitochondriale Permeabilitätspore

geöffnet wird, wodurch Cytochrom C freigesetzt und die Caspase-Kaskade ausgelöst wird [27]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zusätzlich beweisen, dass diese Verbindungen auch einen Anstieg der Calciumkonzentration in der Zelle herbeiführen [28] und in sehr niedrigen Konzentrationen direkt auf Todesrezeptoren einwirken und diese aktivieren können [29]. Damit sind auch die

wichtigsten Parameter genannt, die von toxischen Substanzen in der Zellen angegriffen werden können, um die Apoptose auszulösen (Abb. 6).

Unsere neuesten Ergebnisse deuten eine Beteiligung einer ganz bestimmten Initiatorcaspase an, die erst vor Kurzem als rezeptor-gebunden beschrieben worden ist, der Caspase-10 [30].



**Abb. 6: Angriffsorte toxischer Substanzen, die zur Auslösung der Apoptose führen.** Umweltschadstoffe können die Calciumkonzentration in der Zelle erhöhen aber auch den Energiehaushalt durch Hemmung der Mitochondrien negativ beeinflussen. Insbesondere Metalle sind an der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt. Dies zusammen kann das Membranpotential an den Mitochondrien ( $\Delta\Psi_m$ ) zusammenbrechen lassen und die mitochondriale Permeabilitätspore (MPT) öffnen. Dadurch dringt Cytochrom C nach außen und aktiviert den Apoptose-auslösenden Faktor-1 (Apaf-1), der wiederum die Caspase-Kaskade stimuliert. Andere Verbindungen können aber auch direkt die Todesrezeptoren aktivieren, ohne dass der physiologische Ligand anwesend ist und somit die Apoptose über den „normalen“ Weg bewirken. Bid, Bcl-2, Bcl-XL und Bax sind regulatorische Proteine, die aktivierend ( $\rightarrow$ ) oder hemmend ( $\perp$ ) in diese Mechanismen eingreifen können.

Durch Tributylzinn (TBT) wird in menschlichen Zellen des Immunsystems die Apoptose ausgelöst. Eine direkte Wirkung über die Todesrezeptoren konnte mit genetisch veränderten Zellen bereits nachgewiesen werden [29] und in Abb. 7 wird gezeigt, dass die Aktivierung der Caspase-10 für diesen Vorgang unerlässlich ist. Die Vorbehandlung der Zellen mit einem spezifischen Hemmstoff der Caspase-10 kann die Zellen vor einer TBT-Vergiftung retten. Alle untersuchten Parameter können durch den mit AEVD bezeichneten Inhibitor verhindert werden.

### Apoptose als therapeutisches Ziel

Apoptose kann aber auch die Rettung für ein Individuum bedeuten, wenn sie spezifisch in entarteten Zellen ausgelöst wird. Krebszellen können meist nicht mehr von Immunzellen oder durch andere Mechanismen eliminiert werden. Die klassische Chemotherapie oder die Strahlentherapie führen zur Apoptose der Zellen durch direkte DNA-Schädigung. Auf der anderen Seite wird aber auch die DNA gesunder Zellen geschädigt, was

nach Ablauf einiger Jahre wieder zu einer sekundären Krebserkrankung führen kann. Daher wird nach anderen Wegen gesucht, die keine irreparablen DNA-Schäden hervorrufen. Dabei steht die Auslösung des programmierten Zelltodes mittlerweile an erste Stelle [31,32]. Das ITG untersucht zusammen mit der Tumorklinik in Freiburg eine Substanzklasse synthetischer Lipide, von denen inzwischen nachgewiesen werden konnte, dass die Behandlung von Tumorzellen tatsächlich deren Apoptose zur Folge hat [2,33].

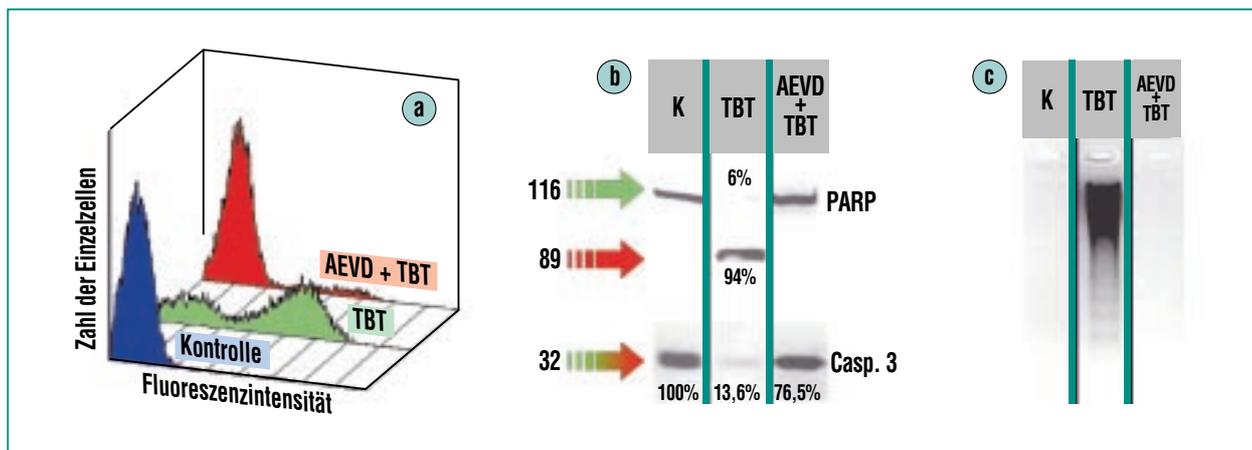


Abb. 7: Ein Inhibitor der Caspase-10 verhindert die Apoptose durch Tributylzinn.

In menschlichen Jurkat-Zellen (T-Zelllinie) beginnt die Apoptose nach Behandlung mit 1  $\mu$ M Tributylzinn (TBT) nach nur 4 h. Verschiedene Reaktionen der Zellen lassen sich im Versuch bestimmen. a): Die Veränderung der Zusammensetzung der Zellmembran kann mit Hilfe eines Einzel-Zell-Analysators (FACS) und vorheriger Fluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden. Während in den unbehandelten Kontrollen keine erhöhte Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes zu erkennen ist, ist nach TBT-Behandlung die Mehrzahl der Zellen nach rechts verschoben (grüne Fläche).

b): Proteine können mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Zwei Proteine, die bei der Apoptose zerschnitten werden, sind hier dargestellt. PARP ist ein DNA-Reparaturenzym und hat ein ungefähres Molekulargewicht von 116 kDa (grüner Pfeil). Nach TBT-Behandlung verschwindet diese Proteinbande nahezu vollständig und das kleinere Bruchstück bei 89 kDa ist erkennbar. Das Verschwinden der Bande ist auch bei der Caspase 3 beobachtbar.

c): Nach TBT-Behandlung wird auch die DNA zersetzt, wie im Vergleich zur Kontrolle (K) am Auftreten der DNA-Leiter deutlich wird.

Alle drei Effekte lassen sich durch einen Hemmstoff für die Caspase-10 (AEVD) verhindern, was klar auf die Beteiligung dieser Initiator-Caspase bei der rezeptorgekoppelten Signalübertragung hinweist.

## Zusammenfassung und Ausblick

Wie gezeigt werden konnte, hat die Apoptose zwei Seiten: bei ihrer Auslösung durch Umweltschadstoffe oder z. B. durch Kontakt von Zellen mit synthetischen Oberflächen kann ein Zuviel zu nachteiligen Wirkungen für den Organismus führen. Es kann die

Immunantwort reduziert werden und damit die Abwehr von Krankheitskeimen deutlich abgesenkt sein oder aber eine Abstoßungsreaktion gegenüber Implantaten erfolgen. Daher muss das Wissen um diese Mechanismen verbessert werden, um gefährliche Schadstoffe zu erkennen oder um die medizinische Entwicklung neuer Oberflächen, deren Bio-

kompatibilität verbessert ist, voranzutreiben. Andererseits ist die gezielte Auslösung der Apoptose ein neuer therapeutischer Ansatzpunkt mit geringen Nebenwirkungen, um Krebserkrankungen zu behandeln.

## Literatur

- [1] T.J. McDonnell, G. Nunez, F.M. Platt, D. Hockenberry, L. London, J.P. McKearn, S.J. Korsmeyer, *Mol. Cell. Biol.* 10, 1901 (1990)
- [2] A. Matzke, H.F. Krug, U. Massing, *Nachrichten* 32 (1/2), 105 (2000)
- [3] M.D. Jacobson, M. Weil, M.C. Raff, *Cell* 88, 347 (1997)
- [4] H.F. Krug, T. Ade, A. Käfer, B. Walser, F. Zaucke, *Nachrichten* 2/3, 73 (1995)
- [5] A. Welle, *Nachrichten* 33 (4), 295 (2001)
- [6] A. Ashkenazi, V.M. Dixit, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11, 255 (1999)
- [7] C. Scaffidi, S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K.-M. Debatin, P. H. Krammer, M. E. Peter, *EMBO J.* 17: 1675 (1998)
- [8] A. Gross, J.M. McDonnell, S.J. Korsmeyer, *Genes Dev.* 13: 1899 (1999)
- [9] D.J. McConkey, P. Hartzell, S.K. Duddy, H. Håkansson, S. Orrenius, *Science* 242, 256 (1988)
- [10] P. Ross, R. De Swart, R. Addison, H. Van Loveren, J. Vos, A. Osterhaus, *Toxicology* 112, 157 (1996)
- [11] H. Van Loveren, P.S. Ross, A.D. Osterhaus, J.G. Vos, *Toxicol. Lett.* 112-113, 319 (2000)
- [12] T.J. O'Shea, *Science* 290, 1097 (2000)
- [13] P.S. Ross, J.G. Vos, L.S. Birnbaum, A.D. Osterhaus, *Science* 290, 1878 (2000)
- [14] T. Matikainen, G.I. Perez, A. Jurisicova, J.K. Pru, J.J. Schlezinger, H.Y. Ryu, J. Laine, T. Sakai, S.J. Korsmeyer, R.F. Casper, D.H. Sherr, J.L. Tilly, *Nat. Genet.* 28, 355 (2001)
- [15] H.F. Krug, S. Diabaté, S. Strack, *Nachrichten* 33 (4), 305 (2001)
- [16] M.P. Waalkes, D.A. Fox, J.C. States, S.R. Patierno, M.J. McCabe, *Toxicol. Sci.* 56, 255 (2000)
- [17] J.D. Robertson, S. Orrenius, *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 609 (2000)
- [18] M. Li, T. Kondo, Q.L. Zhao, F.J. Li, K. Tanabe, Y. Arai, Z.C. Zhou, M. Kasuya, *J. Biol. Chem.* 275, 39702 (2000)
- [19] S.P. Yu, L.M. Canzoniero, D.W. Choi, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 405 (2001)
- [20] M. Biagioli, W. Watjen, D. Beyersmann, R. Zoncu, C. Cappellini, M. Raghianti, F. Cremisi, S. Bucci, *Arch. Toxicol.*, 75, 313 (2001)
- [21] X.J. Huang, P.H. Wiernik, R.S. Klein, R.E. Gallagher, *Med. Oncol.* 16, 58 (1999)
- [22] A. Shabani, A. Rabbani, *Toxicology* 149, 109 (2000)
- [23] P. Thomas, B. Summer, B. Przybilla, *Deutsches Ärzteblatt* 98, 1699 (2001)
- [24] R. Koster, D. Vieluf, M. Kiehn, M. Sommerauer, J. Kahler, S. Baldus, T. Meinertz, C.W. Hamm, *Lancet* 356, 1895 (2000)
- [25] S. Pheng, S. Chakrabarti, L. Lamontagne, *Toxicology* 149, 115 (2000)
- [26] B.J. Shenker, T.L. Guo, I.M. Shapiro, *Environ. Res.* 84, 89 (2000)
- [27] H. Stridh, I. Cotgreave, M. Müller, S. Orrenius, D. Gigliotti, *Chem. Res. Toxicol.* 14, 791 (2001)
- [28] F. Zaucke, H. Zöltzer, H.F. Krug, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 361, 386 (1998)
- [29] H.F. Krug, P.-C. Klöhn, M. Göttlicher, P. Herrlich, *Cell. Biol. Mol. Lett.*, 6, 406 (2001)
- [30] F.C. Kischkel, D.A. Lawrence; A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott, A. Ashkenazi, *J. Biol. Chem.* 276, 46639 (2001)
- [31] J.C. Reed, *Trends Mol. Med.* 7, 314 (2001)
- [32] P. Huang, A. Oliff, *Trends Cell Biol.* 11, 343 (2001)
- [33] A. Matzke, U. Massing, H.F. Krug, *Eur. J. Cell Biol.*, 80, 1 (2001)

# Molekulare Toxikologie der Valproinsäure: Von der Schädigung der Embryonalentwicklung zur Therapie von Krebs

M. Göttlicher, P. Zhu, U. Werling, J. Sleeman, ITG; O. Krämer, T. Heinzl, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt

## Einleitung

Valproinsäure (VPA) ist seit drei Jahrzehnten als Medikament zur Behandlung von Krampfleiden („Epilepsien“) im Einsatz. Das VPA-Molekül ist verglichen mit anderen Medikamenten sehr einfach aufgebaut: es ist eine verzweigte Carbonsäure mit 5 Kohlenstoffatomen in der Haupt- und drei Kohlenstoffatomen in der Seitenkette (Abb. 1). Trotz der einfachen Struktur hat das Molekül mehrere Wirkungen im Organismus. Zur Therapie von Krampfleiden genutzt wird die auf das zentrale Nervensystem wirkende antiepileptische und dämpfende Komponente. Zusätzlich hat das Medikament eine wesentliche Nebenwirkung: es induziert Missbildungen im Embryo wie zum Beispiel fehlerhafter Schluss des Rückenmarkskanals oder unproportionierte Ausbildung des Gesichtsschädels. Aufgrund dieser Nebenwirkung sollte VPA auch nicht während der Schwangerschaft eingesetzt werden. Da aber bisher keine guten Alternativen verfügbar sind, kommt es immer wieder vor, dass Epileptikerinnen unter Behandlung mit VPA schwanger werden, und dass bei wenigen Prozent dieser Schwangerschaften die genannten Fehlbildungen auftreten. Unsere Fragestellung war, warum Valproinsäure solche Fehlbildungen induzieren kann. Wir erwarteten, etwas Grundsätzliches über die Regulation des Schicksals von Zellen während der Embryonalentwicklung zu lernen, und herauszufinden, wie ein so einfaches Molekül wie die Valproinsäure die komplexen Vorgänge während der Embryonalentwicklung stören kann. Um das Wesentliche vorweg zu

nehmen: Wir konnten zeigen, dass Valproinsäure in einen ganz wesentlichen Prozess der Steuerung der Genaktivität eingreift, nämlich die Enzymsysteme, die den Acetylierungsgrad von Histonen und damit die Zugänglichkeit von Genen steuern. Valproinsäure ist ein Hemmstoff der Histondeacetylasen, also ein Enzym, das Acetylreste von Histonen entfernt. Histondeacetylierung ist ein physiologischer Mechanismus, über den Genexpression gehemmt wird, und deshalb führt die Hemmung dieser Enzyme zur Aktivierung bestimmter Gene. Offensichtlich ist die Embryonalentwicklung besonders anfällig gegen Störungen in diesem Prozess. Störungen in diesem Kontrollmechanismus spielen auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebs, und viele aktuelle Arbeiten deuten darauf hin, dass die Hemmung von Histondeacetylasen auch in Tumorzellen besonders kritisch ist. Im Kontext solcher Arbeiten konnten wir zeigen, dass VPA in Leukämiezellen oder Tumorzellen aus dem Dickdarm oder der Brust eine Spezialisierung vermutlich zurück zur normalen Funktion oder Absterben induziert. Damit scheint dieselbe Wirkungskomponente der VPA, nämlich die Hemmung von Histondeacetylasen, die unerwünschte Induktion von Fehlbildungen des Embryos zu erklären und zugleich ein neuartiges Konzept der Krebstherapie zu begründen.

## Konzept der Wirkung von Medikament und Giftstoff

Jede chemische Substanz, die im Organismus eine Wirkung erzielt, muss in irgendeiner Form An-

schluss an die bestehenden physiologischen Signalsysteme von Zelle und Organismus finden. Dies gilt gleichermaßen für Medikamente und fast alle Giftstoffe, es sei denn letztere führen unspezifisch zur Zerstörung von Zellen. Diese Signalsysteme und Netzwerke von Signalwegen kontrollieren, welche genetischen Programme zu einer bestimmten Zeit an einem bestimmten Platz im Organismus und unter den jeweils vorliegenden Bedingungen

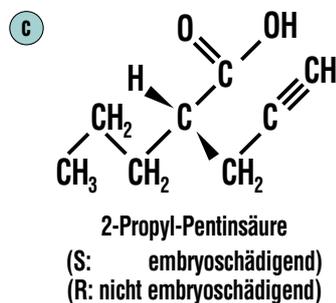
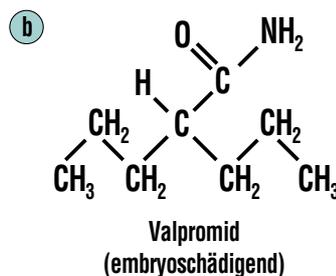
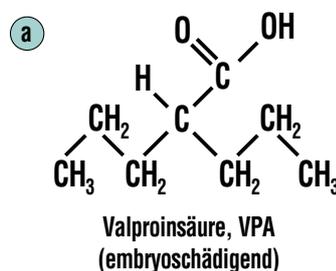


Abb. 1: Valproinsäure (a) und davon abgeleitete Verbindungen Valpromid (b) und 2-Propyl-4-Pentinsäure (c).

ausgeführt werden. Deshalb bestehen Signalnetzwerke und die durch sie kontrollierten genetischen Programme aus physiologischer Notwendigkeit, denn ohne sie gäbe es keine geordnete Entwicklung unseres Körpers oder kein Bestehen in der Umwelt. Genauso wie das Betriebssystem und die „Hardware“ eines Computers noch nicht darüber entscheiden, welche Programme ein Computer letztlich ausführt, genauso bestimmen die bestehenden Signalnetzwerke und genetischen Programme noch nicht welche Funktionen eine spezifische Zelle im Organismus zu einer gegebenen Zeit erfüllt. Es sind die kontextabhängige Aktivierung und Repression von genetischen Programmen durch Signale von zumeist außerhalb der Zelle, die die spezifische Funktion einer einzelnen Zelle steuern und dadurch erst die Integrität und Lebensfähigkeit des Gesamtorganismus ermöglichen. Gewisse Fehler im Signalnetzwerk kann der Organismus ausgleichen. Wenn diese Kapazität allerdings erschöpft ist, entstehen Krankheiten. Viele Krankheiten, wie zum Beispiel Krebs, haben ihre Ursache in genetisch bedingten oder im Lauf des Lebens erworbenen Fehlern im zellulären Programm. Ziel der Therapie mit Pharmaka ist eine Kompensation dieser Defekte durch gezielte Eingriffe in die Regelsysteme. Umgekehrt interessiert den Toxikologen, dass Giftstoffe Komponenten der bestehenden Signalnetzwerke und genetischen Programme stören und dadurch erst Krankheiten auslösen können. Damit lassen sich aus der Sicht des Toxikologen oder Pharmako-

logen zwei komplementäre Ansichten desselben Grundprozesses zeichnen: Der Organismus mit seinen Zellen und deren Signalsystemen und genetischen Programmen steht gegenüber dem gewaltigen Raum denkbarer oder bestehender chemischer Verbindungen. Es ist die kontextabhängige Funktion von Signalsystemen und genetischen Programmen sowie deren Kontrolle durch die chemisch (und physikalisch) definierte Umwelt der Zelle, die über Gesundheit und Krankheit entscheiden.

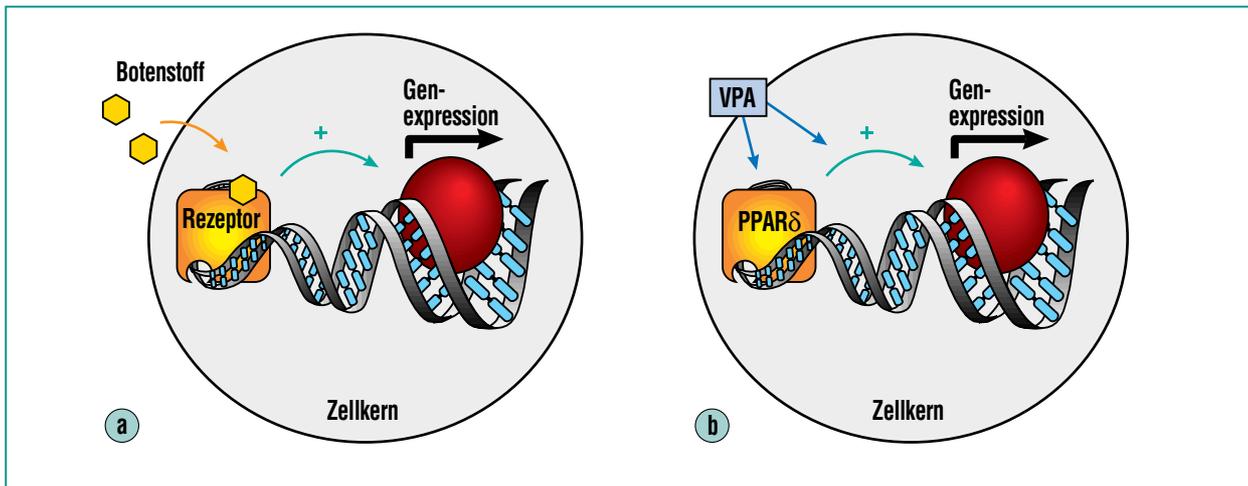
Die Analyse der Interaktion zwischen Organismus und chemischem Raum hat sich zu einem komplexen wissenschaftlichen Ansatz entwickelt, der neben klassischer Toxikologie und Pharmakologie erheblich durch Zellbiologie, Genetik, Modellsystem für menschliche Krankheiten in Tieren, die Genomforschung und, zumindest aus dem medizinisch-therapeutischen Blickwinkel, durch eine moderne synthetische Chemie bestimmt wird.

### Mechanismus der Wirkung von Valproinsäure

#### *Aktivierung von Genaktivität durch VPA über einen intrazellulären Rezeptor*

Unsere Suche nach dem Mechanismus der embryoschädigenden Wirkung von VPA konzentrierte sich zunächst auf die Suche nach einem Surrogat-Marker der Reaktion des zellulären Signalnetzwerks auf Valproinsäure. Unser Ausgangspunkt war der Vergleich

einer Serie von Substanzen, die von der Valproinsäure abgeleitet sind: Valpromid (Abb. 1) wirkt zum Beispiel antiepileptisch, schädigt aber den Embryo nicht. 2-Propyl-Pentinsäure (Abb. 1) ist eine chirale Verbindung, d.h. sie existiert in R und S Enantiomeren (links- bzw. rechts-drehend). Beide Enantiomeren sind schwach antiepileptisch. Den Embryo schädigt allerdings nur das S-Enantiomer, während durch das R-Enantiomer keine Schädigung nachgewiesen wurde. Diese Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigte uns, dass die therapeutisch genutzte Wirkung zur Unterdrückung von Krampfanfällen einem anderen Mechanismus folgt, als die Störung der Embryonalentwicklung. Unsere Frage nach einem Surrogatmarker wurde also dahingehend präzisiert, ob wir eine Komponente im zellulären Signalnetzwerk finden können, die durch VPA aktiviert wird, und die „richtig“ zwischen den Embryo-schädigenden und den nicht schädigenden Derivaten unterscheidet. Unsere Suche begann bei den intrazellulären Hormonrezeptoren, von denen Mitglieder eine ganze Familie auf jeweils unterschiedliche zelluläre Botenstoffe wie Hormone oder Vitamine reagieren. Diese Rezeptoren binden im „Vorspann“ (= Promoter) von bestimmten Genen an die DNA und schalten je nachdem, ob ein Botenstoff für den Rezeptor vorhanden ist, die Aktivität des folgenden kodierenden Bereichs von Genen an oder ab (Abb. 2a). Wir konnten zeigen, dass ein solcher Rezeptor, der PPAR $\delta$ , durch VPA geschaltet wird (Abb. 2b). Offen blieb zunächst die Frage, über welchen Mechanismus VPA den Rezeptor aktiviert.



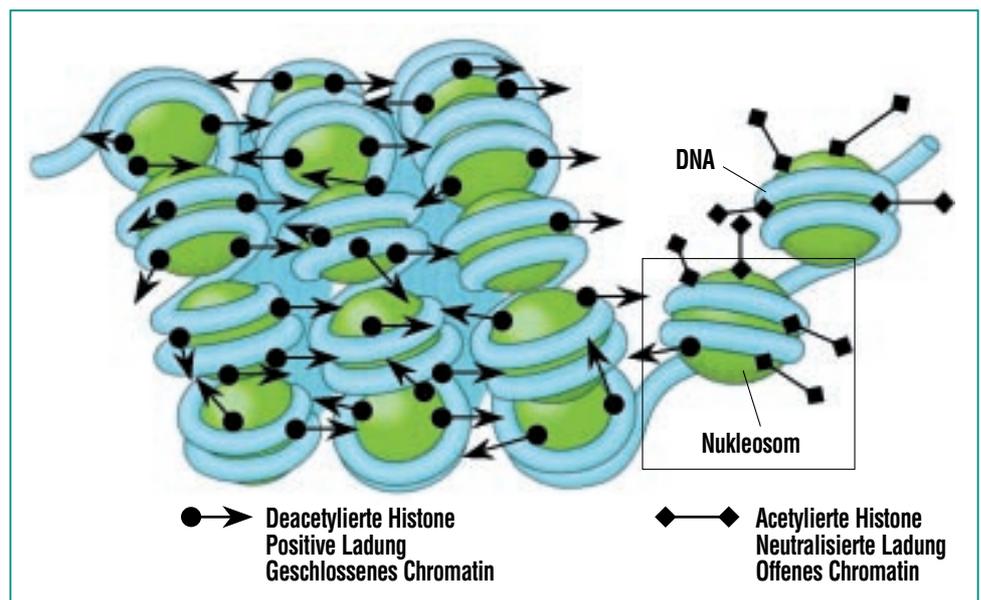
**Abb. 2:** Regulation von Genaktivität durch „Rezeptoren“ (a) und Steuerung des PPAR $\delta$ -Rezeptors durch VPA (b).

*DNA ist im Chromatin gepackt und die Packungsdichte des Chromatins reguliert die Aktivität von Genen*

Die Regulation von Genaktivität durch intrazelluläre Rezeptoren erfolgt im Grundkonzept über zwei Mechanismen: Ohne Ligand reprimiert (unterdrückt) der Rezeptor die Genaktivität, und mit Ligand stimuliert er die Genaktivität. Ein wesentlicher Aspekt dieser Regulation liegt darin, dass DNA in der Zelle nicht als wirrer langer Faden vorliegt, sondern zusammen mit Proteinen im Chromatin organisiert ist. Zunächst einmal ist DNA perlschnurartig in sogenannten Nukleosomen gepackt. Jeweils etwa 200 Basenpaare der DNA sind um einen Kern aus 8 Histonproteinen „gewickelt“. (Abb. 3). Die „Enden“ der Histonproteine ragen aus dem Nukleosom heraus und können modifiziert werden. Histonacetyltransferasen können die positiv geladenen Lysinreste der Histonen acetylieren und damit deren

Ladung neutralisieren. Histondeacetylasen können diese Acetylreste wieder entfernen, und damit die positive Ladung wieder freilegen. Da jeder Baustein der DNA eine negative Ladung trägt, geht

man davon aus, dass die Ladung der Histone einen erheblichen Einfluss auf die Packungsdichte von Chromatin hat und damit über die Zugänglichkeit für die aktive Genexpression oder deren Re-



**Abb. 3:** DNA ist zusammen mit Proteinen im Chromatin organisiert. DNA ist um Histone (grüne „Kugeln“) gewickelt, und eine Einheit aus etwa 200 Basenpaaren DNA und 8 Histonen wird als Nukleosom bezeichnet. Acetylierte Histone führen zu einer offenen Form des Chromatins, die Genaktivität begünstigt (rechte Hälfte), und fehlende Acetylierung bedingt eine dichte Packung des Chromatins, die Genaktivität verhindert (linke Hälfte).

pression entscheidet: Acetylierte Histone begünstigen offensichtlich die Aktivität von Genen, d.h. Expression und Abschrift in Boten-RNA (Abb. 3). Fehlende Acetylierung hemmt die Aktivität von Genen.

Ein Rezeptor im Kern kann lokal an der Stelle des jeweils zu regulierenden Gens als „Schalter“ zwischen acetylierten und nicht

acetylierten Histonen und damit zwischen Aktivierung und Repression der Genaktivität wirken. Ohne Botenstoff bindet der Rezeptor weitere Proteine an das betreffende Gen. In diesen rekrutierten Proteinkomplexen finden sich Histondeacetylasen, die Chromatin in die reprimierte Form überführen können (Abb. 4a). In der Gegenwart von Botenstoff tauscht der Rezeptor die gebun-

denen Proteinkomplexe aus: die reprimierenden Proteinkomplexe werden durch aktivierende Komplexe ersetzt, die als wesentliche Komponenten Histonacetyltransferasen enthalten. Diese Acetyltransferasen können Chromatin in die aktive Form überführen und begünstigen deshalb die Aktivität des folgenden Gens (Abb. 4b). Eine dritte Art der Regulation kann dadurch erfolgen, dass Komponenten der Repressionsmaschinerie gehemmt werden. Die Enzymaktivität von Histondeacetylasen kann durch niedermolekulare Substanzen gehemmt werden (Kreuz in Abb. 4c). Dies führt auch zu einer (gegebenenfalls nur partiellen) Aktivierung der Genaktivität, könnte aber korrekter als „Derepression“ bezeichnet werden. Histondeacetylase-Hemmer sind zum Beispiel Buttersäure oder der bakterielle Giftstoff Trichostatin A.

*VPA ist ein Histon-deacetylase-Hemmer und moduliert Genaktivität über den Acetylierungsgrad von Histonen*

Ausgehend von unserem Leitbefund, dass VPA die PPAR $\delta$ -abhängige Aktivität von Genen steuert, haben wir überprüft, welcher Typ der Regulation von Genaktivität über intrazelluläre Rezeptoren durch VPA ausgelöst wird. Als zentralen Befund konnten wir zeigen, dass VPA über die Hemmung von Histondeacetylasen wirkt, d.h. dass VPA genommen die Aktivität von Genen dereprimiert. Es ist davon auszugehen, dass PPAR $\delta$ -abhängige Genexpression zwar ein gut geeigneter Leitbefund in unseren

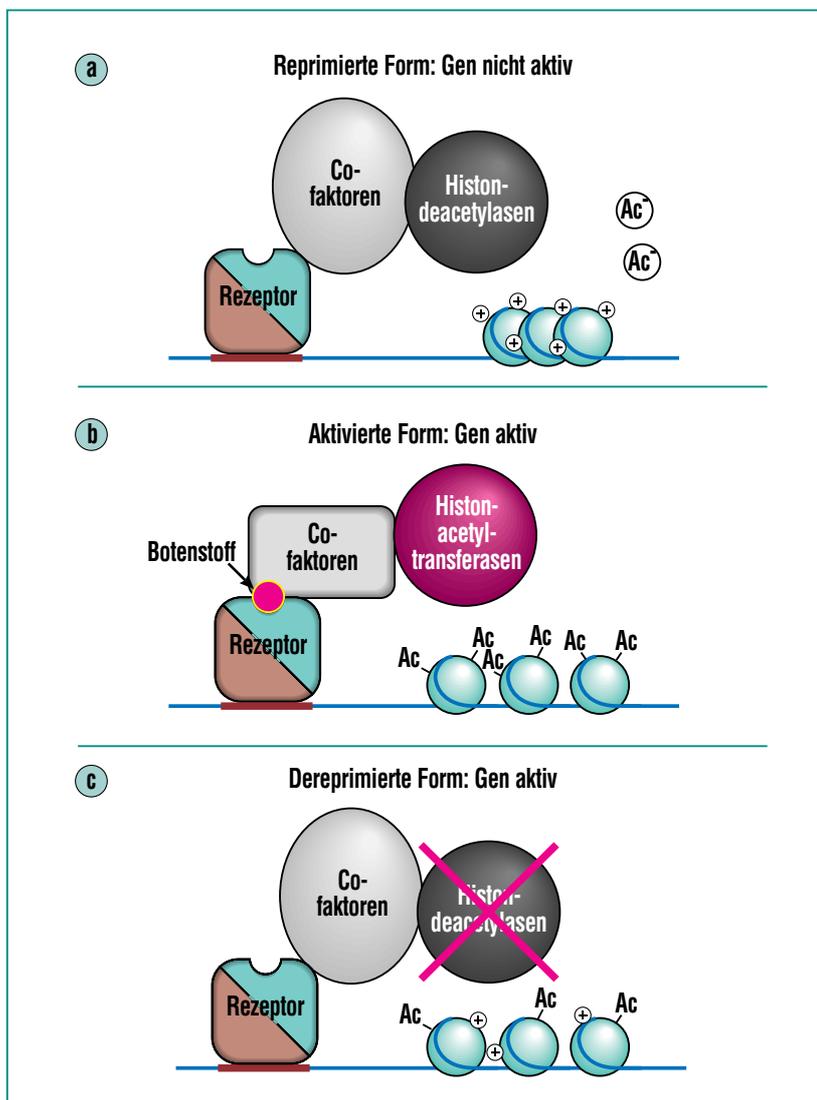


Abb. 4: Drei Arten der Regulation der Genexpression durch intrazelluläre Rezeptoren: a) Reprimiert, b) Aktiviert, c) „Dereprimiert“ = Aktiv.

Studien war, dass VPA aber über den gezeigten Mechanismus eine ganze Reihe von intrazellulären Rezeptoren dereprimieren und damit de facto aktivieren wird. Die zentralen Ergebnisse, die diese These stützen, sind im folgenden dargestellt.

Histonacetylierung und Histondeacetylierung sind offensichtlich an der Regulation vieler Gene beteiligt. Deshalb führt die Behandlung von Zellen mit einem Histondeacetylase-Hemmer dazu, dass sich ein ausreichender Anteil von Histonen in der acetylierten Form ansammelt und mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht werden kann. Dieser Nachweis ist uns nach VPA-Behandlung sowohl in kultivierten Zellen als auch in den Immunzellen der Maus gelungen.

Die Histondeacetylaseaktivität lässt sich auch im Reagenzglas messen. Histondeacetylase können mit spezifischen Antikörpern aus Zellextrakten isoliert werden. Im Reagenzglas werden solche Histondeacetylasepräparationen mit Histonen inkubiert, die Tritium-markiertes Acetat tragen. Die Freisetzung des Acetats und damit die Histondeacetylierung kann im Scintillationszähler gemessen werden (Abb. 5a). Ergebnisse eines typischen Experiments sind in Abb. 5b gezeigt. Ohne die Zugabe von Hemmstoffen lässt sich die Histondeacetylaseaktivität der Präparation messen (100%). Die Zugabe des etablierten Histondeacetylase-Hemmers TrichostatinA (TSA) hemmt diese Aktivität um mehr als 80%. Ähnlich wirkt VPA schon bei einer Konzentration von 0,5 mM. Im

Serum von Patienten, die VPA zur Vermeidung von Krampfanfällen einnehmen, werden Konzentrationen von bis zu 1 mM erreicht, was durchaus im zur Histondeacetylasehemmung erforderlichen Bereich liegt.

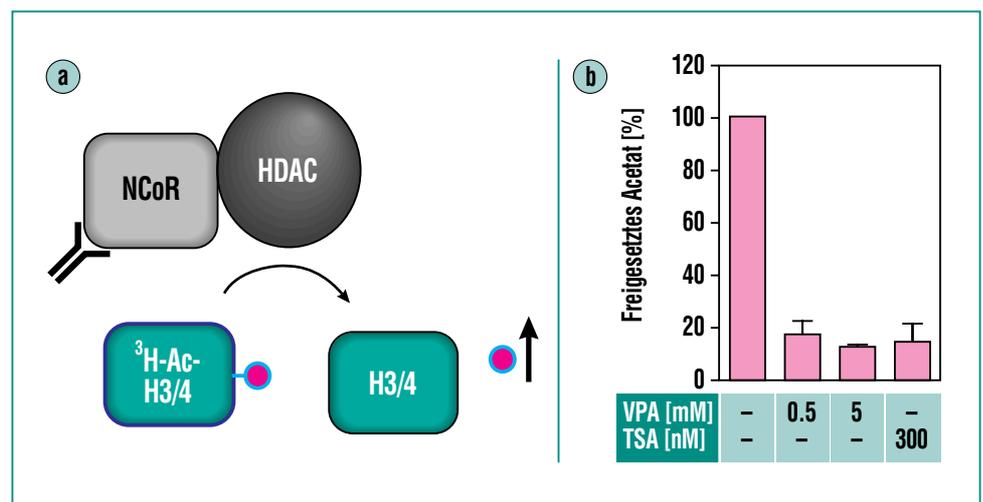
Bleibt die Frage, wie VPA Histondeacetylase hemmt. Mittels radioaktiver VPA konnten wir zeigen, dass VPA selbst an das katalytische Zentrum des Enzyms bindet und dadurch offensichtlich den Zugang für das eigentliche Substrat, das acetylierte Histon blockiert.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass VPA ein Hemmer von Histondeacetylase ist. Struktur-Aktivitätsbeziehungen deuten darauf hin, dass dies der Grund für die Störung der Embryonalentwicklung ist. Erstaunlicherweise toleriert der erwachsene Organismus VPA sehr gut, obwohl davon auszugehen ist, dass auch hier Histondeacetylase gehemmt werden. Offensichtlich ist das zelluläre Signalsystem im Er-

wachsenen im Gegensatz zu einem kritischen Stadium der Embryonalentwicklung so flexibel, dass es diese Störung kompensieren kann. Mit dieser Schlussfolgerung wäre ein Abschluss des Projekts erreicht, wenn nicht Histondeacetylase als sehr vielversprechende Kandidaten der zukünftigen Krebstherapie weltweit diskutiert und entwickelt würden.

### HDAC-Inhibitoren als Krebstherapeutika

Krebs hat wesentliche Ursachen in der fehlerhaften Expression genetischer Information. Erst in den letzten Jahren ist klar geworden, dass die fehlerhafte Repression von Genexpression durch Histondeacetylase die Ursache für Krebs sein kann. Bei bestimmten Formen von Leukämie sind Chromosomen so verändert, dass zwei Stücke von DNA zusammengeführt wurden, die normalerweise nicht zusammen gehören. Solche fehlerhafte



**Abb. 5: Messung der HDAC-Aktivität mittels Immunkomplexenzymassay. Das Prinzip der Analyse ist im Text beschrieben und schematisch dargestellt (a). Ein typisches Experiment ist im Diagramm gezeigt (b).**

Chromosomen kodieren für chimäre Proteine, die fehlerhaft Histondeacetylasen binden und Genaktivitäten hemmen, die für die normale Entwicklung von Blutzellen nötig wären. Bei solchen Formen der Leukämie können Histondeacetylase-Hemmer die fehlerhafte Funktion des chimären Proteins aufheben und einen zumindest partiellen Heilungserfolg bewirken. Interessanterweise können Histondeacetylase-Hemmer aber auch in Krebszellen Differenzierung zu normalen Zellen oder Zelltod auslösen, in denen kein Chromosomenbruch offensichtlich ist. Obwohl noch nicht klar ist, welche Gene in diesen Zellen dereprimiert werden müssen, wird große Hoffnung auf Histondeacetylase-Hemmer gesetzt, die für den Einsatz bei Krebspatienten geeignet sind und mit denen Studien an großen Patientengruppen durchgeführt werden können. Die bisher verfügbaren Substanzen sind nur unzureichend geeignet. VPA ist dagegen seit Jahrzehnten als Medikament im Einsatz und wird abgesehen von den Störungen in der Embryonalentwicklung sehr gut vertragen. Aufgrund unserer Daten zur Histondeacetylase-Hemmung muss man erwarten, dass VPA zur Krebstherapie geeignet ist. Diese Hypothese ha-

ben wir zunächst in Zellkulturen und in einem Tiermodell mit Brustkrebszellen bestätigt. Zusammen mit der Universität Rom konnte in Leukämiezellen aus Patienten entweder die Spezialisierung (Differenzierung) zu offensichtlich normalen Immunzelle oder der kontrollierte Zelltod induziert werden. Damit sind die Vorarbeiten geleistet, VPA in der Klinik an Patienten mit Leukämie, Brust- oder Dickdarntumoren zu testen. Solche Studien haben wir zusammen mit dem Europäischen Institut für Onkologie in Mailand begonnen.

### Zusammenfassung und offene Fragen

Histondeacetylasen nehmen zentrale Rollen bei der Kontrolle der Genexpression in der Zelle ein. Mit VPA konnten wir eine Substanz identifizieren, die als Histondeacetylase-Hemmer diese für das Schicksal von bestimmten Zellen offensichtlich kritischen Komponenten im zellulären Signalsystem beeinflussen kann. Dabei kann VPA nicht zwischen verschiedenen Zellen im Erwachsenen oder im Embryo bzw. zwischen normaler oder Krebszelle unterscheiden. Es ist der spezifische Zustand der jeweiligen Zelle, der über die Konsequenzen

der VPA-Wirkung entscheidet. Bestimmte Zellen im Embryo und Krebszellen sind offensichtlich besonders empfindlich auf die Störung von Histondeacetylasen. Je nach Bedingung im Embryo bzw. in der Krebszelle zeigen sich unterschiedliche Konsequenzen der gleichen primären molekularen Wirkung: Fatale Störung der Entwicklung des Embryos oder erwünschte Abtötung von Tumorzellen. Aufgabe der Zukunft wird sein, diejenigen Gene zu finden, die kritisch durch VPA reguliert werden und die die Empfindlichkeit gegenüber VPA bestimmen. Damit könnten Krebsformen erkannt werden, die besonders für die Therapie mit VPA oder anderen Histondeacetylase-Hemmern geeignet sind. Bessere von VPA abgeleitete Substanzen müssen entwickelt werden, die entweder die Schädigung des Embryos während der Therapie von Krampfleiden vermeiden oder die gezielt für die Therapie von Krebs geeignet sind. Hierbei werden Genom- und Transkriptomforschung eine entscheidende Rolle an der Schnittstelle zwischen Genom und chemischem Raum spielen.

### Literatur

M. Göttlicher, S. Minucci, P. Zhu, O.H. Kramer, A. Schimpf, S. Giavara, J.P. Sleeman, F. Lo Coco, C. Nervi, P.G. Pelicci, T. Heinzel, *Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. Embo J 2001; 20: 6969-6978.*

O.H. Krämer, M. Göttlicher, T. Heinzel, *Histone deacetylase as a therapeutic target. Trends Endocrinol Metab 2001, 12, 294-300.*

P.A. Marks, V.M. Richon, R. Breslow, R.A. Rifkind, *Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. Curr Opin Oncol 2001, 13, 477-483.*

# Krank durch Nanopartikel

S. Diabaté, K. Völkel, R. Wottrich, ITG

## Einleitung

Die Lunge ist unser größtes Organ, das mit der Umwelt in ständigem Kontakt steht. Der Luftaustausch von 10.000 bis 20.000 Litern pro Tag findet über eine Fläche von etwa 100 m<sup>2</sup> statt. Da mit der lebensnotwendigen Luft auch Verunreinigungen wie Xenobiotika\* und Mikroorganismen in die Lunge gelangen, müssen Abwehrmechanismen dafür sorgen, dass eingeatmete Stoffe keinen Schaden anrichten können. In dieser Hinsicht ist der Atemtrakt nicht nur als physikalische Barriere anzusehen, er spielt auch eine wichtige Rolle bei der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr und der Entgiftung von Xenobiotika. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahmen ist unsere Lunge zunehmend verletzbarer geworden, wie Lungenexperten auf dem 4. Deutschen Lungentag am 15. September 2001 mit dem Schwerpunktthema „Umwelt und Lunge“ berichten [1]. Für Atemwegserkrankungen wie Asthma, chronische Bronchitis, Lungenentzündung und Lungenkrebs wird in Deutschland bis zum Jahr 2010 eine Zunahme um 25% prognostiziert. Sie belasten Deutschlands Volkswirtschaft schon heute mit jährlichen Kosten von ca. 37 Milliarden DM für direkte (Medikamente, Krankenhausaufenthalte) sowie indirekte Ausgaben (Arbeitsunfähigkeit, Umschulungen). Es besteht daher großes Interesse an der Aufklärung der Ursachen für diese Entwicklung.

Während die natürlichen Umweltfaktoren wie z.B. Pollenflug oder

die genetische Veranlagung für bestimmte Lungenkrankheiten (z.B. Mukoviszidose) nur wenig beeinflussbar sind, kann man bei den anthropogen verursachten Schadstoffen regulierend eingreifen. Bekannt sind Schimmelpilze, Tabakrauch oder Stäube am Arbeitsplatz für die Innenraumbelastung, sowie Emissionen aus der Verbrennung fossiler Brennstoffe in Verkehr und Industrie für die Außenraumbelastung. In der epidemiologischen Literatur findet man zahlreiche Veröffentlichungen zum Einfluss der klassischen Luftschadstoffe SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, CO, Ozon und Schwebstaub auf die Gesundheit der allgemeinen Bevölkerung, die übereinstimmend zu dem Ergebnis kommen, dass Schwebstaub die stärkste Korrelation mit der Erkrankungshäufigkeit (Morbidität) und der Todesfallrate (Mortalität) zeigt, während die Korrelation bei den Gasen deutlich geringer ist [2, 3]. Die beobachteten Wirkungen traten jedoch nicht bei gesunden Menschen auf, sondern bei Personen, die entweder durch ihre genetischen Veranlagung oder eine bestehende Erkrankung der Atemwege oder des Herz-Kreislauf-Systems besonders empfindlich waren.

Bisher konnte noch keine epidemiologische Studie bestimmte chemische Bestandteile als potentiell verursachendes Agens der Stäube identifizieren, jedoch gibt es deutliche Hinweise, dass die sehr kleinen Partikel im Schwebstaub gesundheitsschädlicher als die größeren Partikel sind [4]. Aus diesem Grund wird an den Messstationen zur Überwachung der

Luftqualität neben dem Gesamtstaub (TSP, total suspended matter) auch PM<sub>10</sub> (particulate matter < 10 µm, lungengängiger Staub) gemessen. Zu Forschungszwecken werden auch die Fraktionen PM<sub>2,5</sub> (alveolengängiger Staub) sowie PM<sub>0,1</sub> (ultrafeine Partikel, UFP) bestimmt.

Die Ursachen für die schädlichen Wirkungen der besonders kleinen Partikel liegen einerseits in der größenabhängigen Eindringtiefe in die Atemwege, andererseits sind viele biologische Effekte um so stärker, je größer die Anzahl und die Oberfläche der Partikel sind. Bei gleicher Massenkonzentration haben kleinere Partikel eine größere Anzahl und eine größere Oberfläche. An einer größeren Oberfläche können sich z.B. mehr Substanzen anlagern, die sonst nicht bis in die Alveolen vordringen könnten. Die Hypothese der ultrafeinen Partikel wird auch durch Inhalationsexperimente an Versuchstieren und durch in vitro Tests mit Zellkulturen unterstützt, wobei die Wirkungen synthetischer Modellpartikel verschiedener Größenklassen untersucht wurden [5, 6, 7].

Der anthropogen verursachte Anteil in Umweltstäuben wird im wesentlichen durch Emissionen aus der Industrie und aus dem Verkehr verursacht. Die Forschungsarbeiten konzentrieren sich auf Aerosole, die bei der Verbrennung von Kohle, Öl und Dieselmotoren entstehen, wobei neben der Hypothese der ultrafeinen Partikel auch die Wirkungen der Metalle (Eisen, Nickel, Zink) und der organischen Verbindungen (z.B. polyaromati-

\*) Die mit \* gekennzeichneten Begriffe werden im Glossar erläutert.

sche Kohlenwasserstoffe) untersucht werden. Auch Partikelbestandteile biologischen Ursprungs könnten eine Ursache der beobachteten Gesundheitseffekte sein, wie z.B. Endotoxine\*, deren Rolle bei arbeitsplatzbedingten Erkrankungen z.B. in Schweine- und Geflügelzuchtanlagen, Müllsortieranlagen oder Getreidemühlen gut untersucht ist. All diese Substanzen und physikalischen Parameter können synergistisch wirken.

Forschungsbedarf besteht nun darin, diejenigen Komponenten der Stäube zu identifizieren, die für das Gesundheitsrisiko relevant sind, damit man mit gezielten Maßnahmen entgegenwirken kann. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden biologi-

schen Mechanismen würde es ermöglichen, Erkrankungen besser zu erkennen und zu behandeln.

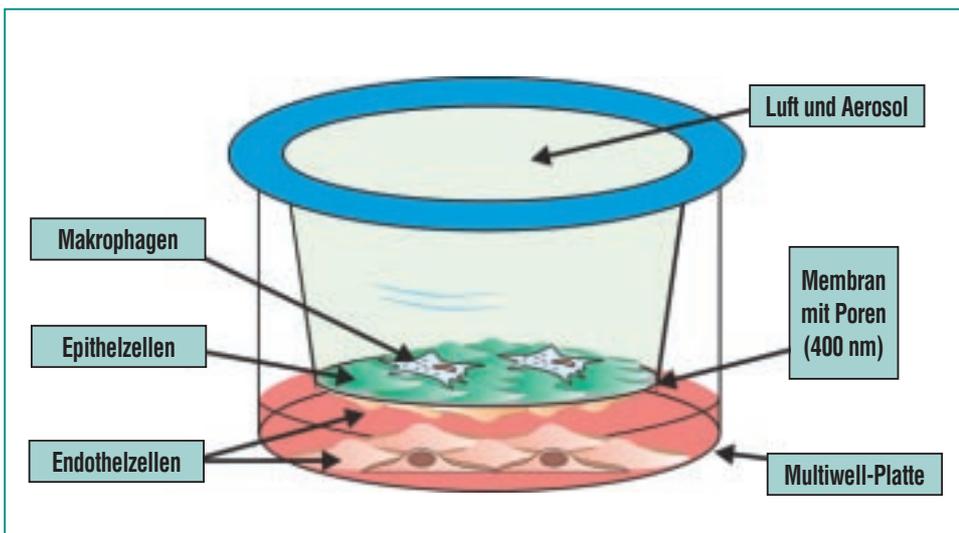
### Auswahl eines biologischen Testsystems

Da die Auswirkungen auf den Menschen im Mittelpunkt der umweltmedizinischen Forschung stehen, sind klinische Untersuchungsreihen und die Untersuchung von humanen Primärzellen von besonderer Bedeutung. Es gibt jedoch auch große Nachteile. Jeder Patient hat eine individuelle Vorgeschichte und eine individuelle genetische Prädisposition. Die erhaltenen Ergebnisse unterliegen oft großen Schwankungen und sind schlecht vergleichbar.

Zudem ist die Verfügbarkeit von humanen Primärzellen oft eingeschränkt. Ähnliches gilt auch für Tierversuche.

Die Verwendung von Zellkulturen bietet hingegen ein einfaches Modell und einfache Handhabung bei kontrollierten Expositionsbedingungen. Eine Standardisierung ermöglicht eine gute Vergleichbarkeit von Ergebnissen. Die Versuchsaufbereitung gestaltet sich effizient und ermöglicht umfangreiche Serienuntersuchungen bei Zugriff auf sehr viele Parameter, da sich der Zugriff auf zellulärer Ebene durch molekularbiologische Methoden vergleichsweise einfach verwirklichen lässt. Auch lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Methoden sind möglich. Jedoch darf man die Grenzen solcher Zellkulturmodelle nicht aus den Augen verlieren. Man arbeitet in einem artifiziiellen System und muß deshalb auch mit Artefakten bei den Ergebnissen rechnen. Zellkulturmodelle entsprechen nur in einer Annäherung der physiologischen Realität. Deshalb ist die Rückkehr vom vereinfachten System zum komplexen System zur Überprüfung der Ergebnisse notwendig.

Um die Wirkung von Partikeln zu untersuchen, werden Zellen aus der Lunge eingesetzt; entweder nur ein Zelltyp oder mehrere Zelltypen in einer Kokultur. Letzteres soll die Situation in der Lunge realitätsnah simulieren. Das in Abb. 1 gezeigte System berücksichtigt die wichtigsten Zelltypen, die in jedem der etwa 300 Millionen Lungenbläschen an der Austauschfläche von Sauerstoff und Kohlendioxid zwischen dem Blut



**Abb. 1: Transwell®-Membransystem zur Herstellung eines Kokultursystems.** Der Einsatz trennt das System durch die Membran in ein unteres und oberes Kompartiment auf, die nur durch die Poren in der Membran ( $\varnothing = 400 \text{ nm}$ ) verbunden sind. Die Poren sind groß genug, um Partikel, nicht aber Zellen einen Übergang zwischen den Kompartimenten zu ermöglichen. Die Membran wird von unten mit humanen Endothelzellen und von oben mit humanen Epithelzellen besiedelt. Zudem werden humane Makrophagen auf den Epithelzellen ausgebracht. Das ganze Kokultursystem gleicht der Luft/Blut Schranke in den Lungenbläschen und eignet sich sowohl für submerse Expositionen als auch für direkte Aerosol-Expositionen.

und der Atmosphäre beteiligt sind. Da dieser Austausch durch Diffusion stattfindet, sind die Wände der Alveolen sehr dünn. Die Wandstärke der Alveolen beträgt ungefähr 0,001 mm, ihr Durchmesser ungefähr 0,25 mm. Sie bestehen aus einer Lage Epithelzellen\* auf der Luftseite und einer Lage Endothelzellen\* auf der Blutseite, dazwischen befindet sich die Basalmembran aus extrazellulärer Matrix. Auf den Epithelzellen sitzen Makrophagen (Fresszellen) für die Immunabwehr.

### Auswahl relevanter biologischer Endpunkte

Partikel, die kleiner als 2 µm sind, können bis in den Alveolarbereich vordringen und sich auf der großen Lungenoberfläche, die mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm (Surfactant) bedeckt ist, ablagern (Abb. 2). Wasserlösliche Verbindungen lösen sich auf und unlösliche Partikel werden von den Alveolarmakrophagen erkannt und phagozytiert. Bei hohen Partikelkonzentrationen ist

diese erste Abwehrlinie jedoch überfordert. Dann können Partikel auch von den Epithelzellen, welche die Lungenbläschen auskleiden, aufgenommen werden. Über das weitere Schicksal dieser Partikel ist noch nichts bekannt. Der Körper wehrt sich gegen die potentielle Gefährdung von außen mit einer lokalen Entzündungsreaktion. Dabei reagieren vor allem die Makrophagen mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, um Mikroorganismen abzutöten, sowie mit der Bil-

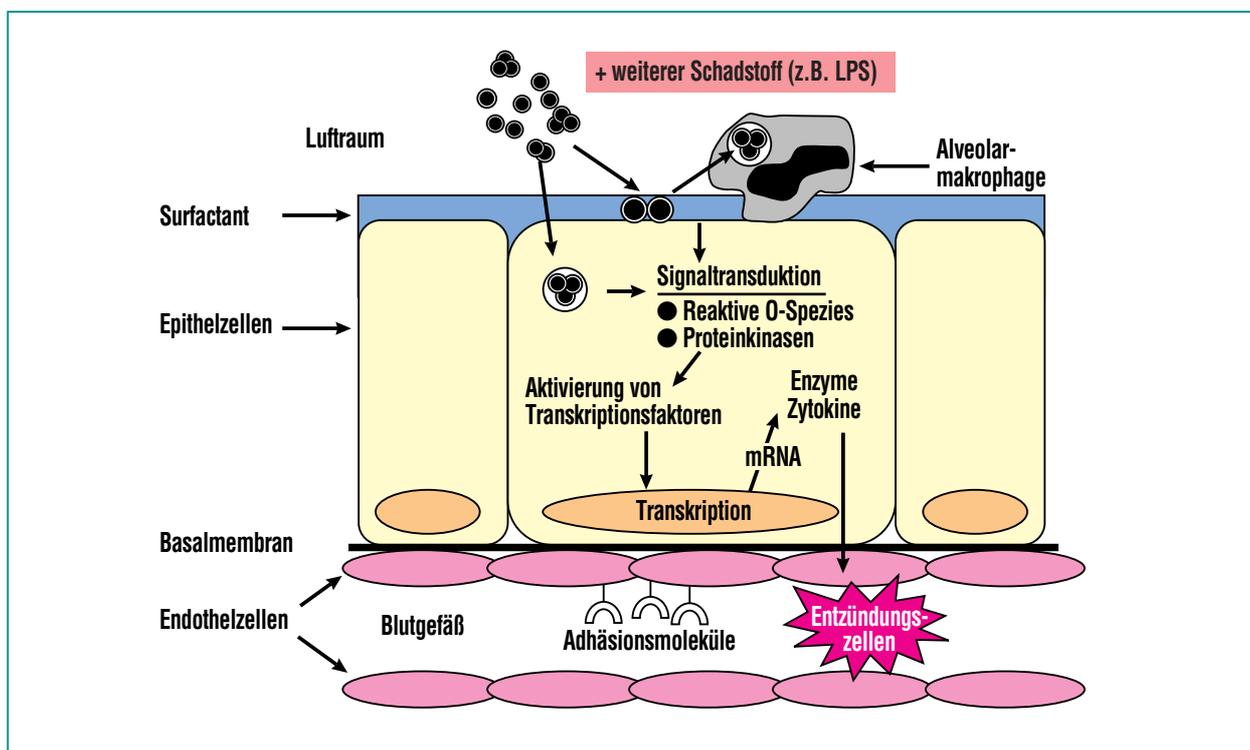


Abb. 2: Akute Wirkungen von Partikeln in Lungenzellen, die zu einer lokalen Entzündung führen. Nach Aufnahme in die Zelle lösen Partikel eine Signaltransduktion durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies sowie Aktivierung von Proteinkinasen aus. In der Folge werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die in den Zellkern wandern, um an die DNA zu binden und die Ablese bestimmter Gene zu induzieren. Die daraufhin gebildete mRNA wandert ins Zytoplasma, wo die entsprechenden Proteine synthetisiert werden z.B. die Zytokine IL-6 und IL-8. Zytokine induzieren die Bildung spezieller Adhäsionsproteine an der Oberfläche der Blutgefäßzellen, die es den Leukozyten des Blutes erlauben, hier anzudocken, um anschließend an den Ort der Gefährdung einzuwandern. IL-8 wirkt dabei chemotaktisch, es weist den Leukozyten den Weg entlang eines Konzentrationsgradienten.

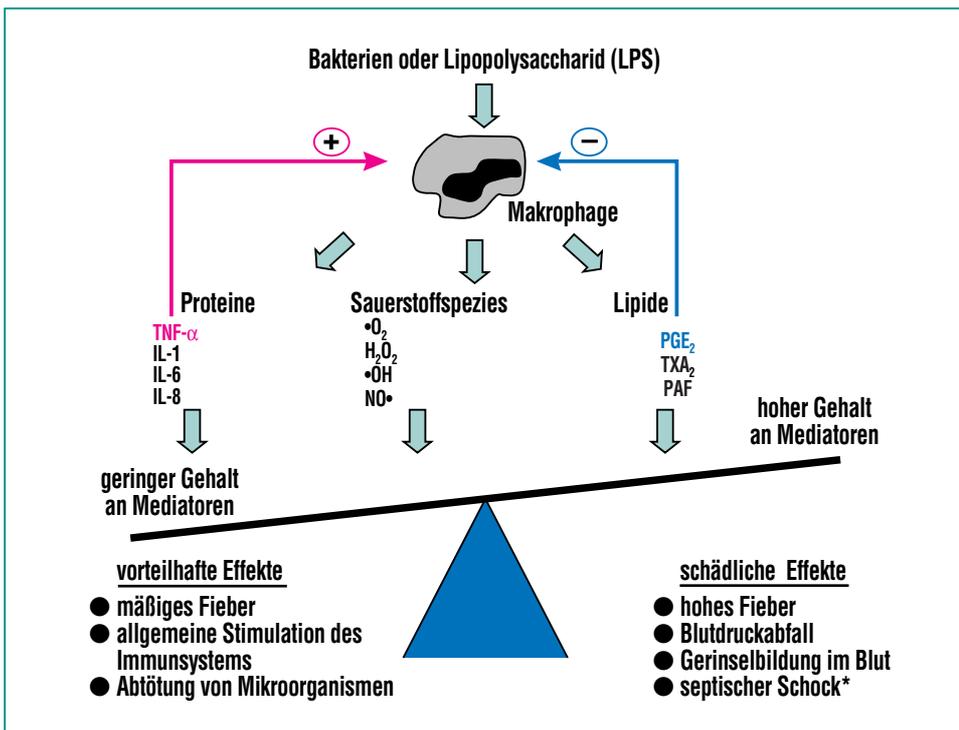
derung von Proteinen und Lipiden, die als chemische Botenstoffe (Mediatoren) für andere Zelltypen wirken (Abb. 3). Die Protein-Botenstoffe, auch Zytokine\* genannt, dienen der Kommunikation zwischen den aktivierten Makrophagen am Ort der Gefährdung und den Leukozyten (weiße Blutzellen), die normalerweise nur im Blut oder in Depots (Milz, Lymphknoten, Knochenmark) vorkommen, bei Bedarf jedoch an den Entzündungsherd rekrutiert werden. Auch die Zellen des Gewebes (in der Lunge Epithelzel-

len, Fibroblasten\* und Endothelzellen) reagieren auf die von den Makrophagen freigesetzten Zytokine und setzen ihrerseits Wirkstoffe frei, die mithelfen, dass Leukozyten in den Ort der Gefährdung einwandern, um dann in einer konzertierten Aktion die Keime zu töten und zu beseitigen und deren Ausbreitung ins System vorzubeugen. Bei diesem Vernichtungsprozess wird auch gesundes Gewebe zerstört. Die Feinregulation des Netzwerks von Zytokinen sorgt jedoch dafür, dass die entzündete Stelle wieder

abheilt. Wenn dieser Prozess durch Über- oder Unterregulation der verschiedenen Mediatoren gestört ist, kann noch mehr gesundes Gewebe zerstört werden, führt also zur Verschlimmerung einer Erkrankung. Einige Mediatoren gelangen in den Blutkreislauf und wirken systemisch\* auf andere Organe. In der Folge kann es zu Fieber und Gerinselbildung im Blut kommen, was die Effekte erhöhter Partikelkonzentrationen auf das Herz-Kreislaufsystem bei epidemiologischen Studien erklärt [8], ohne jedoch den Wirkungsmechanismus bis ins Detail zu kennen.

In der Zellkultur kann die Reaktion von Makrophagen auf bakterielle Erreger durch Zugabe von Lipopolysaccharid\* (LPS oder Endotoxin) simuliert werden (Abb. 3). LPS, bestehend aus einem Lipid- und einem Kohlenhydratanteil, kommt in der äußeren Membran bestimmter Bakterien vor und wird bei der Zellteilung und beim Absterben der Bakterien freigesetzt. Makrophagen tragen auf ihrer Oberfläche einen Rezeptor für LPS, nach dessen Aktivierung Prozesse in Gang gesetzt werden, die zu einer Entzündung führen können. Da der Kontakt der verschiedenen Zelltypen untereinander sowie die gegenseitige Beeinflussung von enormer Wichtigkeit bei einer Entzündungsreaktion sind, ist es sinnvoll, auch in der Zellkultur mit verschiedenen Zelltypen zu arbeiten.

In diesem Beitrag sollen die Ergebnisse von in vitro Studien mit Flugstaub aus einer Hausmüllverbrennungsanlage und mit synthetischen Modellpartikeln vorge-



**Abb. 3: LPS oder bestimmte Bakterien regen Makrophagen zur Produktion und Freisetzung von Vermittlermolekülen in Form von Proteinen (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, Interleukin-1, -6, -8, induzierbare NO-Synthase), reaktiven Sauerstoffspezies (Sauerstoffanionradikal, Wasserstoffperoxid, Hydroxyradikal, Stickstoffmonoxid) und Lipiden (Prostaglandin E<sub>2</sub>, Thromboxan A<sub>2</sub>, Plättchen-aktivierender Faktor) an. Diese sogenannten Mediatoren sind sehr empfindlich aufeinander abgestimmt und können verschiedene vorteilhafte oder schädliche Effekte auslösen. Die freigesetzten Stoffe wirken teilweise auf die Makrophagen zurück. TNF- $\alpha$  erhöht die Produktion von Mediatoren (roter Pfeil) und PGE<sub>2</sub> hemmt sie (grüner Pfeil).**

stellt werden, die potentielle Bestandteile der Flugasche sein können. Im Allgemeinen werden für Toxizitätsstudien Zellkulturen submers in flüssigen Kulturmedien mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt. Die Dosis der Substanzen bezieht sich dabei auf ihre Konzentration im Medium. Zur Untersuchung von Partikeln ist dieser Versuchsansatz jedoch nur bedingt geeignet, da die physiko-chemischen Eigenschaften der Partikel und die Zelloberflächen in der flüssigen Phase andere Eigenschaften als in der Gasphase aufweisen. Ein realitätsnahes Modell für die in vivo Situation ist die Exposition von Zellen an der Gas/Flüssigkeits-schicht, die allerdings technisch sehr aufwendig ist und daher nur

selten eingesetzt wird. Es muss ein definiertes Aerosol erzeugt werden, das in einer geeigneten Weise über Testzellen geleitet wird, und die Zellkulturen müssen durch geeignete Trägersysteme über den Testzeitraum funktionell lebensfähig erhalten werden. Hier wurden die Zellen auf eine poröse Membran ausgesät (Abb.1), die es den Zellen erlaubt, sich während der Luftexposition durch die Poren mit Flüssigkeit und Nährstoffen zu versorgen. Bei dieser Methode ist die Erarbeitung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen meist schwierig, da die quantitative Bestimmung der Ablagerung von Partikeln aus der Gasphase auf die Zellen nur berechnet oder geschätzt werden kann.

### System zur Exposition von Zellen an der Luft

Als Beispiel für potentielle Umweltpartikel wurde Flugstaub aus einer industriellen Hausmüllverbrennungsanlage ausgewählt, der aus feinen und ultrafeinen Partikeln besteht. Diese Flugasche wird mit einem Bürstendosierer resuspendiert und in die mit gefilterter Frischluft durchströmte Aerosol-Laboranlage AEOLA dosiert (Abb. 4) [9]. Bei einem Volumenstrom von 500 Nm<sup>3</sup>/h können Massenkonzentrationen von 1 - 100 mg/Nm<sup>3</sup> eingestellt werden. Durch weitere Verdünnung mit Luft kann bis auf Umweltkonzentrationen 1 - 10 µg/Nm<sup>3</sup> verdünnt werden. Das Aerosol wird mit 5% CO<sub>2</sub> zur

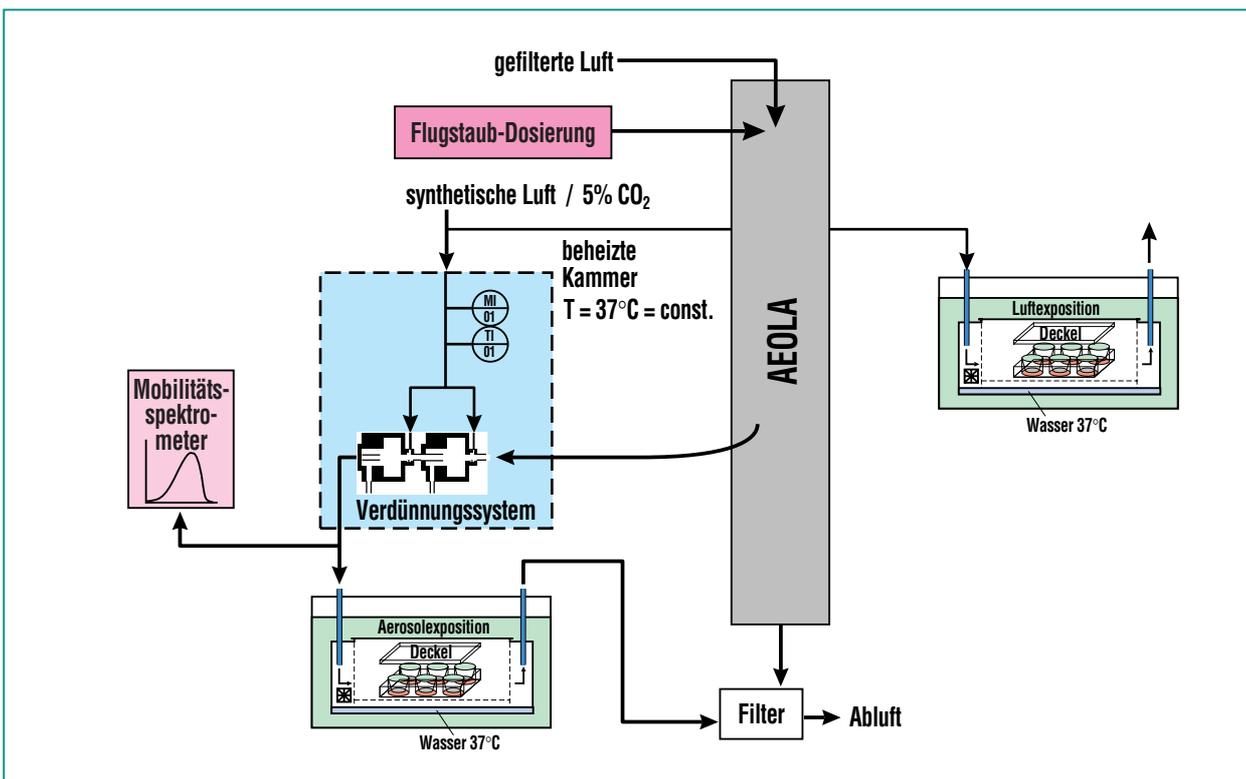


Abb. 4: Versuchsaufbau zur Dispersion von Flugasche und Herstellung verschiedener Verdünnungen zur in vitro Exposition von kultivierten Lungenzellen an der Aerosol-Laboranlage AEOLA.

Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Wertes im Zellkulturmedium angereichert, befeuchtet und auf 37°C temperiert, bevor es in die Expositions-kammer mit den Zellen eingeleitet wird. Die Konzentration und Größenverteilung des verdünnten Aerosols wird vor und nach der Expositions-kammer durch einen Differentiellen Mobilitätsanaly-sator (DMA) bestimmt. Dabei werden die elektrostatisch aufgeladenen Partikel aufgrund ihrer ladungsabhängigen Beweglichkeit im elektrischen Feld nach Größenklassen fraktioniert, deren jeweilige Anzahl mit einem optischen Messverfahren im Kondensationskernzähler (CPC, Condensation Particle Counter) ermittelt wird. Aus der Differenz der Partikelkonzentrationen vor und nach der Kammer kann der Anteil der deponierten Partikel in der Kammer und damit die Dosis für die exponierten Zellen abgeschätzt werden. Die Partikel-

größenverteilung der verwendeten Flugasche ist in [10] dargestellt.

Die Expositions-kammer nach dem Prinzip von Voisin [11] besteht aus einer luftdicht verschraubten Kammer (13 l), die vollständig in ein 37°C warmes Wasserbad eingetaucht wird. In die temperierte Kammer werden zuvor die Zellkulturschalen auf eine Lochplatte gestellt. Das unter der Lochplatte befindliche Wasser dient zur Erzeugung einer hohen Luftfeuchtigkeit, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die Exposition beginnt, wenn mit einer Pumpe Aerosol bzw. Luft/5% CO<sub>2</sub> in einer baugleichen Kontrollkammer, angesaugt wird. Die Testatmosphäre durchströmt dann die Kammer horizontal, und ein Ventilator an der Einströmungsöffnung sorgt für eine gleichmäßige Durchmischung des Aerosols. Die bisher durchgeführten Tests haben gezeigt, dass die Exposition von

Zellen an der Gasphase über mehrere Stunden ohne Veränderungen der Vitalität und der Zellfunktionen möglich ist. Nach der Exposition mit zunächst niedrigen Aerosolkonzentrationen und kurzen Expositionszeiten war lediglich bei den Makrophagen (NR8383) eine leichte Erhöhung der metabolischen Aktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen messbar [12].

### Ergebnisse aus der Submerskultur

In vitro Tests mit synthetisch hergestellten feinen und ultrafeinen Partikeln aus Eisen-III-Oxid sowie Siliziumdioxid in verschiedenen Größenklassen unterstützten die Hypothese, dass bei Partikeln gleicher chemischer Zusammensetzung die ultrafeinen Partikel toxischer sind als größere (Abb. 5). Allerdings scheint auch die chemische Zusammensetzung eine Rolle zu spielen, da die

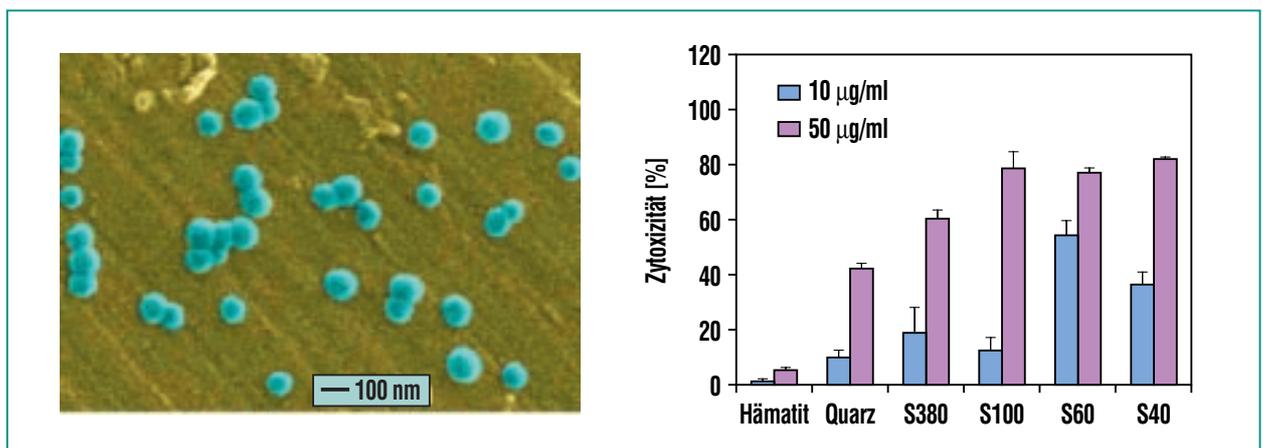


Abb. 5: Links: Darstellung von ultrafeinen Silicasol-Partikeln, mittlerer Durchmesser 60 nm im Raster-Elektronenmikroskop (B. Neufang, HVT-HZ). Rechts: Messung der Zytotoxizität\* von Hämatit ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ~ 70 nm) und Silicasol (amorphes SiO<sub>2</sub>, 380, 100, 60 und 40 nm) (beide synthetisch hergestellt von W. Ferstl, ITC-WGT) sowie Quarzstaub (< 5 µm) in Maus-Makrophagen (RAW234.7). Die kleineren Silicasolpartikel sind toxischer als die großen. Hämatit im gleichen Größenbereich ist dagegen praktisch untoxisch.

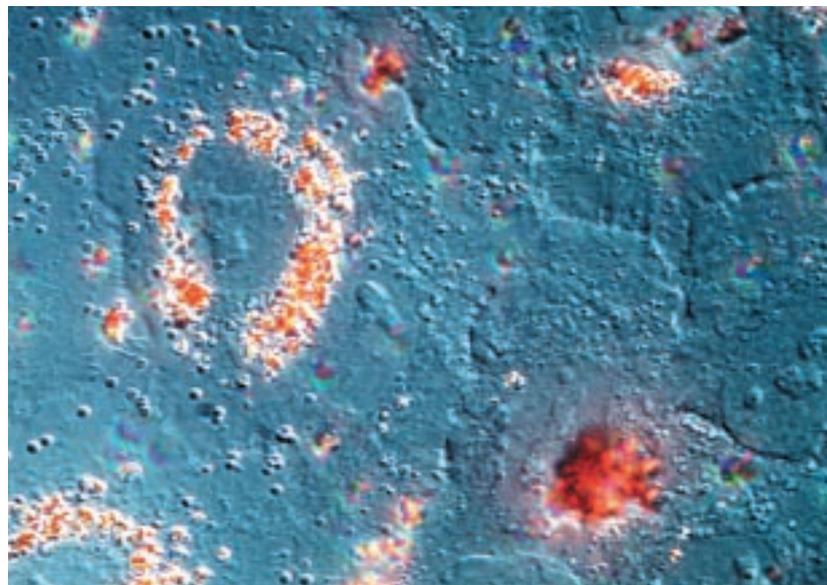
Hämatitpartikel in der gleicher Größenordnung wie das ultrafeine Silicasol praktisch untoxisch waren [7]. Nicht nur die professionellen Fresszellen wie die Makrophagen nehmen Partikel in das Zellinnere auf, sondern auch Epithelzellen besitzen die Fähigkeit, ultrafeine Partikel durch Endozytose aufzunehmen, wie in Abb. 6 zu sehen ist. Die ultrafeinen Hämatitpartikel werden im Lichtmikroskop erst dann sichtbar, wenn mehrere Partikel in den Lysosomen\* kompaktiert werden.

Bei subtoxischen Konzentrationen von Flugaschepartikeln konnten biologische Wirkungen lediglich in solchen Makrophagen beobachtet werden, die gleichzeitig mit LPS stimuliert wurden (Abb. 7). Die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und MIP-2 war deutlich erhöht, was im Organismus einer Verstärkung der Entzündungsreaktion entsprechen würde. Gleichzeitig wurde die Bildung des NO-Radikals unterdrückt, d.h. die Abwehr gegen Bakterien wäre dadurch beeinträchtigt. Beide Effekte würden im Organismus zu einer Verschlimmerung einer bakteriellen Erkrankung führen [12].

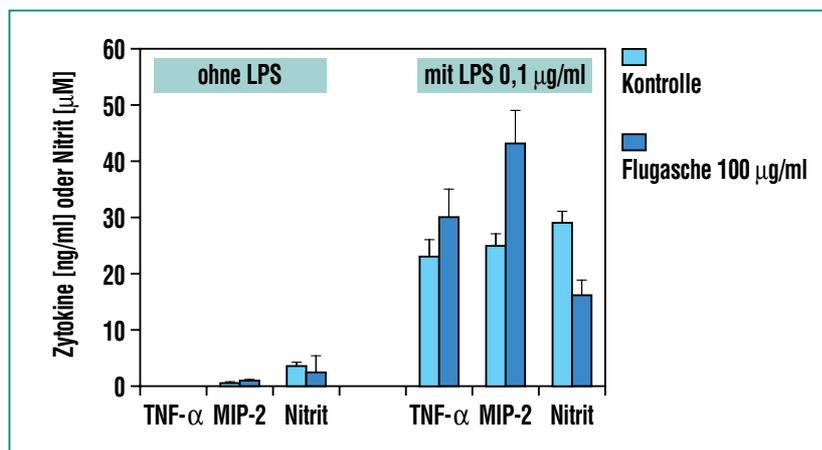
Bei in vitro Versuchen mit Makrophagen und Epithelzellen aus der Ratte ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen Experimenten mit jeweils nur einem Zelltyp bzw. mit der Kokultur aus beiden Zelltypen (Abb. 8). Flugascheexposition allein induzierte keine auffallende Freisetzung des Zytokins MIP-2, welches funktionell dem humanen IL-8 entspricht. Dies gilt sowohl für die Epithelzellen (Alveolarepithelzellen Typ II, RLE-6TN) als auch die Alveolar-

makrophagen (NR8383). Eine verstärkte MIP-2-Freisetzung wird erst in der Kokultur beobachtet, wenn sie mit LPS kostimuliert worden sind, und in diesem Fall ist sie zudem abhängig von der

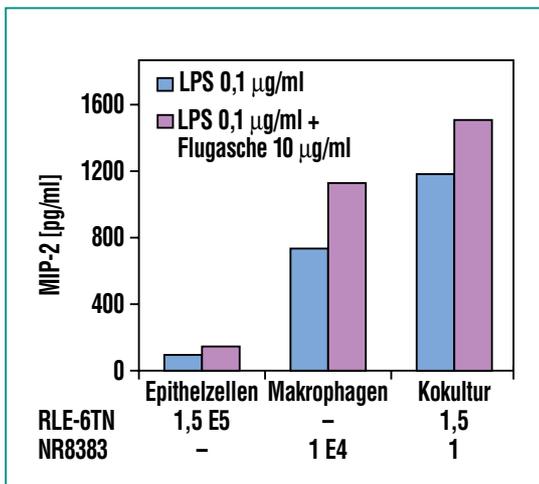
Konzentration der eingesetzten Flugasche. In den Kokultursystemen aus beiden Zelltypen ist die Zytokin-Antwort deutlich stärker im Vergleich zu den Monokulturexperimenten. Dabei handelt es



**Abb. 6: Epithelzellen (humane Alveolarepithelzellen Typ II, A549) nach Endozytose von Hämatitpartikeln ( $\varnothing \sim 70$  nm). Die Hämatitpartikel sind erst nach Aggregation innerhalb der Zellen (rot) zu erkennen. (630fache Vergrößerung, Ölimmersion, DIC.)**



**Abb. 7: In Alveolarmakrophagen der Ratte (NR8383) bewirkte die untersuchte Flugasche bei subtoxischer Konzentration nur in LPS-stimulierten Zellen eine Veränderung immunologischer Parameter. Die LPS-induzierte Freisetzung der Mediatoren TNF- $\alpha$  und MIP-2 wurde durch Flugasche verstärkt und die Freisetzung von NO, gemessen als Nitrit, wurde gehemmt.**



**Abb. 8: Vergleich der MIP-2-Freisetzung bei Monokulturen aus Epithelzellen (RLE-6TN, 1,5 E5 Zellen) bzw. Makrophagen (NR8383, 1 E4 Zellen) und der Kokultur aus beiden Zelltypen im Verhältnis 15:1. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf eine Exposition mit LPS (0,1 µg/ml) sowie gleichzeitiger Stimulierung mit der subtoxischen Flugasche-Konzentration von 10 µg/ml.**

sich nicht um einen einfachen additiven, sondern einen synergistischen Effekt, der auf die gegenseitige Beeinflussung der Zellen durch Mediatoren zurückzuführen ist (positive Rückkopplung).

## Zusammenfassung und Ausblick

Feine und ultrafeine Umweltstäube sind aufgrund von epidemiologischen Studien als Verursacher einer erhöhten Morbidität und Mortalität in der Bevölkerung in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen gelangt. Mit Hilfe von in vitro Tests wurde gezeigt, dass ultrafeine synthetische Partikel stärker zytotoxisch wirken als größere Partikel gleicher chemischer Zusammensetzung. Flugstaub aus einer Hausmüllverbrennungsanlage, der auch Partikel im Nanometer-Bereich enthält, bewirkt in Lipopolysaccharid-stimulierten Makrophagen eine verstärkte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine sowie eine Inhibierung der Bildung des NO-Radikals. In Kokulturen aus Makrophagen und Lungenepithelzellen wurde gezeigt, dass diese mehr Zytokine freisetzen als die Summe der entsprechenden Einzelzellkulturen. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass erhöhte Schwebstaubkonzentrationen bei besonders empfindlichen Personen

(z.B. an einer chronischen Bronchitis oder Lungenentzündung erkrankte) zu einer Verschlimmerung der bestehenden Erkrankung führen, indem das empfindliche Netz der Abwehrreaktionen gestört wird. In den weiteren Arbeiten soll geprüft werden, ob tatsächlich der ultrafeine Anteil der Flugasche für die schädlichen Wirkungen verantwortlich ist, oder ob auch andere Wirkparameter wie z.B. Metalle eine Rolle spielen. Durch gezielte Maßnahmen in der Verbrennungs- und Rauchgasreinigungstechnik müssen diese Parameter dann gemindert werden.

## Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei S. Mülhopt und H.R. Paur (ITC-TAB) für die Möglichkeit der Aerosolexposition an der AEOLA-Anlage sowie für die kooperative Zusammenarbeit.

## Literatur

- [1] <http://www.lungentag.de>
- [2] D.W. Dockery, C.A. Pope, *Ann. Rev. Public Health* 15: 107-132 (1994)
- [3] C.A. Pope, D.W. Dockery, *In: Air Pollut. Health, Holgate et al. (eds.), Academic Press, San Diego, 673-705 (1999)*
- [4] H.E. Wichmann, C. Spix, T. Tuch, G. Wölke, A. Peters, J. Heinrich, W.G. Kreyling, J. Heyder, *Health Effects Institute, Cambridge, USA, Report 98, 2000*
- [5] G. Oberdörster, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74, 1-8 (2001)
- [6] D.M. Brown, V. Stone, P. Findlay, W. MacNee, K. Donaldson, *Occup. Environ. Med.* 57, 685-691 (2000)
- [7] S. Diabaté, H.F. Krug, *Europ. J. Cell Biol.* 79, 97 (2000)
- [8] A. Peters, D.W. Dockery, J.E. Muller, M.A. Mittleman, *Circulation* 103, 2810-2815 (2001)
- [9] S. Mülhopt, *Diplomarbeit am ITC-TAB (2000)*
- [10] H.F. Krug, S. Diabaté, S. Strack, *Nachrichten* 33, Heft 4 (2001)
- [11] C. Voisin, C. Aerts, E. Jakubczak, A.V. Tonnel, *Bull. Europ. Physiopath. Resp.* 13, 69-82 (1977)
- [12] S. Diabaté, S. Mülhopt, H.-R. Paur, H.F. Krug, *Ann. Occup. Hygiene (zur Veröffentlichung akzeptiert)*

## Glossar

<b>Endothelzellen</b>	Endothelzellen kleiden die Blutgefäße aus.	<b>Zytokine</b>	Zytokine sind Vermittler (Mediatoren) oder Signalproteine, die von Zellen produziert werden und auf Zielzellen wirken, indem sie an spezifische Rezeptoren binden. Sie dienen der Kommunikation zwischen benachbarten Zellen und lösen entweder direkt biologische Prozesse aus (Aktivierung, Inhibierung) oder veranlassen Zielzellen zur Bildung weiterer Zytokine, die wiederum andere Zellen beeinflussen (Zytokin-Kaskade). Eine Über- oder Unterproduktion von Zytokinen ist oft mit bestimmten pathophysiologischen Prozessen assoziiert (Autoimmunerkrankungen, chronische Entzündungen).
<b>Endotoxin</b>	Endotoxine (Synonym = Lipopolysaccharid) sind Bestandteile der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien (z.B. Escherichia coli). Die hitzestabile Substanz wird bei der Zellteilung sowie beim Absterben der Bakterien freigesetzt. Die Makrophagen-aktivierende Wirkung geht überwiegend vom Lipid A-Anteil aus, einem sehr wirksamen Pyrogen (Fieber-her-vorrufende Substanz).	<b>Zytotoxizität</b>	Eine Substanz wirkt zytotoxisch, wenn sie zum Absterben der Zelle führt.
<b>Epithelzellen</b>	Epithelzellen bilden den äußeren Abschluss von Organen.		
<b>Fibroblasten</b>	Fibroblasten sind Bindegewebszellen, die u.a. Proteine wie Kollagen zur Gewebereparatur sezernieren.		
<b>Lipopolysaccharid (LPS)</b>	siehe Endotoxin		
<b>Lysosomen</b>	Vakuolen innerhalb der Zelle, in der sich Verdauungsenzyme befinden.		
<b>septischer Schock</b>	Ein septischer Schock kann sich nach einer massiven Infektion entwickeln, vermittelt durch TNF- $\alpha$ und sekundäre Mediatoren. Als Folge erweitern sich die Gefäße, der Blutdruck sinkt, es kommt zu Organschäden, Organversagen und schließlich zum Tod.		
<b>systemische Wirkung</b>	eine Wirkung, die sich im ganzen Körper entfaltet.		
<b>Xenobiotika</b>	(xenos (gr.) = fremd, andersartig): Als Xenobiotika werden nur jene anthropogene Fremdstoffe bezeichnet, die der Natur fremd und in biologischen Systemen kreislauffremd sind. Sie kommen in Wasser, Luft und Lebensmitteln natürlicherweise nicht vor.		