Christiane Class

Pflanzliches Vielstoffgemisch unterstützt synthetische Krebstherapie

Padma 28 induziert in der von T-Zellen abgeleiteten lymphozytischen Leukämie (Zell-Linie CEM-C7H2) eine Apoptose

Zellen sterben auf ganz verschiedene Arten: durch Nekrose («Mord») oder Apoptose («Selbstmord»). Bei der Nekrose gehen Zellen in grösseren Zellverbänden durch äussere Einflüsse, z.B. durch Verbrennungen, Vergiftungen, Strahlung oder mechanische Verletzung zugrunde. Dies führt zur Kondensation der Kernsubstanz und zum Anschwellen der Zellorganellen. Die Zelle platzt; es werden Stoffe aus dem Zytoplasma freigesetzt, die Fresszellen anlocken, was eine Entzündungsreaktion hervorruft.

Im Gegensatz dazu läuft bei der Apoptose ein genetisch gesteuertes Programm ohne Entzündungsreaktionen ab. Zellkern, Zytoplasma und Mitochondrien schrumpfen, später zerfällt die Zelle in Membransumgeschlossene, apoptotische Körperchen. Meist sind nur einzelne Zellen betroffen. Die Apoptose ist die häufigere Form des Zelltods. Für alle mehrzelligen Lebewesen ist die Apoptose ein essentieller Vorgang für die körperliche Entwicklung und für das Immunsystem. Einige Beispiele:

Entwicklung, Wachstum und Funktionserhaltung menschlicher Organe:

- Bei der Embryonalentwicklung menschlicher Gliedmassen werden zuerst plattenförmige Gewebeknospen ausgebildet, die an den Finger- und Zehenzwischenräumen absterben müssen, damit die Gliedmassen ihre endgültige Form ausbilden können.
- Entfernen nicht mehr benötigten

Gewebes (Hautzellen, Zellen von Magenwand und Darm).

- Zelltod der Zellen von Glaskörper und Linse, damit die Durchsichtigkeit der Augenlinse bewahrt wird.
- Selektion von Keimzellen (Eizellen, Spermien). 95% unterliegen der Apoptose, da nur 5% den biologischen hohen Ansprüchen der Fortpflanzung genügen.

Selbsttoleranz und Eigenkontrolle des Immunsystems:

- Nach abgelaufener Infektion werden die nicht mehr benötigten B-Lymphozyten durch Apoptose entfernt, wodurch die Immunabwehr abgeschaltet wird.
- Lymphozyten, die sich gegen körpereigenes Gewebe richten würden (Autoimmunkrankheit), werden durch Apoptose unschädlich gemacht.
- Durch virale Infekte oder Mutation geschädigte Zellen werden eliminiert [8].

Täglich werden im Menschen 10 Milliarden Zellen unter kontrollierten Bedingungen eliminiert. Hat sich trotzdem eine maligne Erkrankung bilden können, ist das Ziel jeder Krebstherapie der kontrollierte Zelltod maligner entarteter Zellen. Dass das Leben auf den Tod angewiesen ist, lag lange Zeit selbst für Wissenschaftler jenseits ihres Vorstellungsvermögens. Erst seit wenigen Jahren läuft die Apoptose-Forschung auf Hochtouren [3]. Aber trotz aggressiver Behandlungsmethoden haben viele Krebspatienten wei-

terhin eine schlechte Prognose, da in vielen Tumoren die Apoptose blockiert ist, wodurch solche Geschwülste resistent sind gegenüber herkömmlichen Behandlungsmethoden [2]. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit für neue Therapieansätze.

Biochemie der Apoptose

Der Entzug von Wachstumshormonen führt zu einer passiven Apoptose, während eine Aktivierung von Rezeptoren auf der Zellmembranoberfläche eine aktive Apoptose in Gang setzt. Damit das Programm natürlich abläuft, sind oft zwei Zellen notwendig: Eine Zelle dockt mit einer Art Schlüssel an dem dafür vorgesehenen Schloss einer anderen, unerwünschten Zelle an. Von dort wird das Signal zum Absterben an den Zellkern weitergeleitet. Als Schloss fungiert an der Zelloberfläche das Protein «FAS», der passende Schlüssel der Immunzelle wird «FAS-Ligand» genannt [3]. In der Anfangsphase der Apoptose schrumpfen Zellkern, Cytoplasma und Mitochondrien, die Zellmembran bleibt unbeschädigt. Signale führen dazu, dass Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird und dass Caspasen aktiviert werden. Diese spezifischen Enzyme (Eukleasen) sind in jeder Zelle in einer inaktiven Form vorhanden und müssen erst aktiviert werden; sie wiederum aktivieren die normalerweise inaktive DNase, welche die DNA der sterbenden Zelle in kurze defi-

nierte Stücke zerlegt. Letztendlich schnürt die Zelle nach und nach kleine membranumschlossene Vesikel ab, die durch spezialisierte Phagozyten aufgenommen werden [8] (siehe Abbildung). Apoptose-relevante Proteine sind ausser dem Apoptose-induzierenden Fas/FasLigand (FasL)-System das Tumorsuppressorprotein p53 und das anti-apoptotische Bcl-2-Protein.

Völlig unabhängig vom Immunsystem verfügt jede Zelle über Signalketten und Programme, die zu mehreren Zeitpunkten im Leben der Zelle überprüfen, ob noch alles in Ordnung ist. Eine zentrale Rolle spielt bei diesen Vorgängen das Protein p53. Gegenspieler wirken als Schutz, damit nicht zu viele Zellen in die Apoptose eintreten und nicht unnötig Gewebe zerstört wird. Funktionieren diese körpereigenen Regulationsmechanismen, sprechen die Patienten auf eine Krebstherapie gut an. Gibt p53 Signal, dass ein Schaden durch Chemotherapie eingetreten ist, läuft ein mehrstufiges Programm ab, bei dem unter anderem Caspasen den natürlichen Zelltod in Gang bringen.

Charakteristische Kennzeichen der Apoptose sind die Akkumulation von Zellen in der subG1-Phase, die Verminderung von Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und die Kernkörperbildung.

Bcl-2 ist ein zentrales Mitglied der Genfamilie, das in die Balance zwischen Zelltod und Überleben der Zelle eingebunden ist; hier liegt der entscheidende *switch* in der Tumorgene-se. Bcl-2 wurde aufgrund seiner onkogenen Rolle bei malignen Lymphomen entdeckt. Nach bisherigen Kenntnissen ist es der wirksamste Inhibitor des programmierten Zelltods: Es unterbricht die Aktivierung der mitochondrialen Apoptose-Signalkaskade; es verhindert die Produktion von Löchern in den Mitochondrien, durch die Ca^{++} und destruktive Proteine in die Zelle entweichen können, was eine Apoptose auslösen würde [9].

Die Überexpression von Bcl-2 in geschädigten Zellen kann eine kontinuierliche Teilung der mutierten Zellen und eventuell die Entstehung von Krebs verursachen. Die heute in der Krebstherapie eingesetzten Medika-

mente gehören nicht nur rein chemisch zu verschiedenen Gruppen. Probate Mittel sind Zytostatika und gegebenenfalls Hormone. Manchmal reagieren Krebszellen jedoch nicht mehr ausreichend auf eine Chemotherapie: Die Zellen sterben nicht ab, der Tumor ist resistent geworden [4].

Für eine Resistenz von Tumorzellen gibt es unterschiedliche Ursachen:

- Tumorzellen können bei sich selbst durch genetische Veränderungen eine Art Entgiftungsmechanismus aktivieren, durch die sie Zytostatika mit Hochgeschwindigkeit nach aussen schaffen können, egal, um welches Zellgift es sich handelt (Multi-drug-Resistenz, Nationales Krebsforschungsinstitut der USA August 2004) [4].
- Eine andere Möglichkeit ist, die Wand der Tumorzelle so zu verändern, dass keine Giftstoffe mehr passieren können.
- Oder ein grösserer Tumor ist so schlecht mit Blutgefässen versorgt, dass Zytostatika gar nicht mehr in sein Inneres transportiert werden.

Therapeutische Aspekte in der Krebstherapie

Ziel der Krebstherapie ist das Auslösen einer Apoptose bei entarteten Zellen. Da die Apoptose in mehreren, streng regulierten Schritten abläuft,

versprechen sich die Forscher viel von neuen Lösungsansätzen: Einige Medikamente, die die Menge an Bcl-2 in der Zelle reduzieren können, werden bereits in der Chemotherapie eingesetzt, nicht nur, um die Apoptose zu induzieren, sondern auch um der Medikamentenresistenz von Krebszellen bei zu kommen.

«Differenzierungsauslöser» sollen Krebszellen dazu bringen, wieder «normal» abzusterben: Bei der Gentherapie wird ein gesundes p53-Gen in mutierte Krebszellen eingeschleust. Andere Überlegungen sind, am Ende der Signalkette, bei den Caspasen, anzusetzen, die die eigentliche Zellauflösung bestimmen [4].

Fehler in der Apoptose lassen sich in manchen Situationen mit Abkömmlingen von Vitamin A, den Retinsäuren, korrigieren [4]. Sie werden in Studien bei Patienten mit Vorstufen der Altersleukämie eingesetzt, dem Myelodysplastischen Syndrom, bzw. der Promyelozyten-Leukämie. Auch bei Sonderformen des Schilddrüsenkrebses gibt es ähnliche Ansätze. Andere Differenzierungsauslöser könnten auf der Ebene der biochemischen Signalkette eingreifen, indem sie fehlende Signale überbrücken und bremsende Signale blockieren (Signaltransduktionshemmer). Selbst von einigen Viren ist bekannt, dass eine Infektion die anti-apoptotische Wirkung anderer Viren aufhebt und viral bedingte Tumore wieder empfindlicher gegenüber Chemotherapie oder Bestrahlung macht [4].

Thalidomid, das vor 40 Jahren aufgrund seiner Teratogenität im Rahmen der Contergan-Affäre für Aufregung sorgte, feiert ein erstaunliches Comeback: Es wird bei Patienten mit multiplem Myelom therapeutisch eingesetzt. Dieser Tumor hat wegen seiner Hypervaskularisierung eine ungünstige Prognose; Thalidomid sorgt über eine Hemmung der Angiogenese für eine Tumerverkleinerung und eine Reduktion des Rezidivrisikos. Es scheint auch die Aktivität von $TNF-\alpha$ zu hemmen und wirkt auf zahlreiche Zytokine immunmodulatorisch. Es stimuliert über zytotoxische T-Zellen die Proliferation von $INF-\gamma$ und IL-2. Dadurch scheint es herkömmliche Resis-

tenzprobleme von Zytostatika überwinden zu können, wodurch es sich zur Kombination mit Chemotherapie anbietet [7].

Hilfe aus dem Reich der Pflanzen

Die Mistelpflanze galt im Mittelalter als ein vielseitig zu verwendendes Arzneimittel. Vor allem dem Mistel-Lektin wird die Wirkung zugesprochen, eine Apoptose auszulösen [5].

In der Ulmer Kinderonkologie wurde festgestellt, dass Betulinsäure aus der Birkenrinde eine Resistenz der Tumorzellen durchbrechen kann; das funktionierte besonders gut bei Tumoren des Nervensystems.

Die traditionelle chinesische oder tibetische Medizin benützen seit Jahrhunderten Mischungen aus natürlich vorkommenden Kräutern und Kräuterextrakten erfolgreich in der Krebstherapie. Vor diesem Hintergrund interessierte die Wirkung von Padma 28 auf Leukämiezellen. In vorliegender Studie [1] wurde der Einfluss von Padma 28 auf die Bcl-2-Signalweiterleitung, die die Expression von p53 hemmt, in CEM-C7H2-Leukaemiezellen untersucht. Es wurde eine CEM-Untergruppe herangezogen, die mit dem Bujard System hergestellt wurde. Hierbei handelt es sich um einen «Genschalter», der das Ablesen von in Genen gespeicherten Informationen (Transkription) kontrollieren kann. Dieser Schalter kann durch Anwesenheit oder Entzug von Doxycyclin betätigt werden. So können Gene stufenlos reguliert werden [10].

Methoden

Padma 28, eine Mischung aus 20 verschiedenen Heilkräutern, wird seit 28 Jahren in der Schweiz nach einer seit Jahrhunderten bewährten tibetischen Rezeptur hergestellt (GMP).

Die Stammlösung von Padma 28 wurde in Ethanol 70% v/v, Methanol und Dimethylsulfoxid (DMSO 1:1 mit destilliertem Wasser) vorbereitet und bei -20°C aufbewahrt. Die CEM-C7H2-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Padma 28 behandelt. Parallel dazu wurde die Wir-

kung von reinem Ethanol, Methanol und DMSO, vergleichbar mit den höchsten Konzentrationen von gelöstem Padma 28-Extrakt, untersucht. Danach wurde die Vitalität der Zellen mit der Tryptan-Blau-Ausschlussmethode bestimmt (tote Zellen blau, vitale Zellen farblos). Weitere Kontrollen erfolgten mit der Fluoreszenzmikroskopie und der Durchflusszysometrie. Zusammen mit der Propidium-Iodid-Fluoreszenz wurde auch die Streuung des Laserlichts gemessen. Entsprechend den Werten der Lichtstreuung wurden apoptotische Zellkerne als kleiner (niedrige Vorwärts-Lichtstreuung) und stärker granuliert (grössere Seitwärts-Lichtstreuung) gefunden. Zelltrümmer und kleine Partikel wurden, wie üblich, von der Analyse ausgeschlossen. Letztlich wurde die PARP-Spaltung überprüft. PARP hat eine wichtige Funktion bei der Reparatur von DNA-Strangbrüchen. Es wird während der Apoptose durch Caspasen spezifisch in zwei Fragmente gespalten. Zur gel-elektrophoretischen Untersuchung wurden die Proteine nach Auftrennung auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgte der Nachweis des Proteins mittels Bindung an Anti-PARP-Antikörper. Der gebundene erste Antikörper wurde durch einen zweiten Antikörper, an Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes Anti-Maus IgA, detektiert. Die immunreaktiven Banden wurden durch verstärkte Chemilumineszenz dargestellt.

Ergebnisse

CEM-Zellen (lymphozytische Leukämie) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Padma 28 behandelt. Die Proliferation wurde durch Auszählung in der Zählkammer bestimmt.

Abb. 1 zeigt, dass verschiedene Konzentrationen von Padma 28 (0,4 mg/ml; 1,0 mg/ml) die CEM-Zellproliferation konzentrations- und zeitabhängig hemmte. Das Zufügen von einem in PBS gelösten Padma 28-Extrakt war weniger effektiv als ein alkoholischer Padma 28-Extrakt, was vermuten lässt, dass pharmakologisch aktive Inhaltsstoffe von Padma 28 durch unpolare Lösungsmittel besser extrahiert werden. DMSO allein hatte kei-

nerlei Effekt auf die Zellproliferation. In kultivierten CEM-Zellen, die mit Padma 28 behandelt wurden, wurden für eine Apoptose charakteristische morphologische Veränderungen des Zellkerns sichtbar. Das ist gut in der **Abbildung 2 D** zu sehen.

Padma 28 induziert die subG1-Transition

Die G1-Phase und der G1/S-Transition-Status des Zellzyklus sind kritische Punkte, an denen die Zelle festlegt, ob sie eine weitere vollständige Zellteilung durchmacht, ihr Wachstum stoppt oder stirbt. Die Transition einer Zellpopulation von G1/G0 zur subG1-Phase ist ein häufiges Zeichen für eine Apoptose. Wie **Abbildung 3** zeigt, führt das Zufügen von 1 mg/ml Padma 28 während 48 Stunden zu annähernd 50% zu einer Akkumulation der Zellen in der subG1-Phase.

PARP Spaltungs Kinetik

Caspasen spalten eine Reihe von Proteinen, vor allem Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). PARP spürt DNA Strangbrüche auf, wie sie durch genotoxische Substanzen, z.B. Sauerstoffradikale verursacht werden. PARP wird in einem Zwischenstadium der Apoptose aktiviert und durch proteolytische Spaltung in einem späten Stadium durch Caspase 3 und Caspase 7 inaktiviert.

Die Behandlung der CEM-C7H2-Zellen während 34 Stunden verursachte eine ausgeprägte proteolytische Fragmentierung von PARP mit einer Akkumulation der 89 kDa-Fragmente (niedrige Bänder) und begleitend ein Verschwinden der full-size 113-kDa-Fraktion (obere Bänder) (in **Abbildung 4** slot 4, 6 und 8). Auch hier war der PBS-Extrakt von Padma 28 weniger effektiv als Ethanol-, Methanol- oder DMSO-Extrakt.

Padma 28 interferiert mit der Bcl-2-Signalfunktion

Ob eine Zelle lebt oder stirbt wird weitgehend von der Bcl-2-Funktion bestimmt. Wenn Padma 28 die Apoptose durch Interferenz mit der lebenserhaltenden Bcl-2-Signalfunktionen triggert, sollte es möglich sein, das proapoptotische Signal durch Überex-

pression von Bcl-2 zu vermindern. Wie Abb. 5/6 zeigen, war die von Padma 28 vermittelte Induktion einer Apoptose vermindert (Abb. 5, Balken 6 und 8) durch vorübergehende Überexpression von Bcl-2 in einer CEM-Zellen-Untergruppe, in der die Ausschüttung von korrespondierenden Transgenen durch Entzug von Doxocyclin induziert wurde.

Die Bcl-2-Expression wird teilweise kontrolliert durch Freisetzen vom Th1-Typ Zytokin INF- γ . Es ist wahrscheinlich, dass Padma 28 diesen apoptotischen Weg moduliert.

Diskussion

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Padma 28, das mit von T-Zellen abgeleiteten lymphozytischen Leukämiezellen zusammengebracht wurde, einen ausgeprägten anti-proliferativen Effekt hat. Die Hemmung der Zellproliferation wurde begleitet von einer Kernkörperbildung, einer Akkumulation von Zellen in der subG1-Phase und einer Fragmentation der Poly (ADP-Ribose)-Polymerase, typischen Zeichen einer Apoptose.

Bcl-2 bestimmt das Überleben von Zellen oder den Zelltod. Eine Überexpression des «Überlebens-Proteins» Bcl-2 wirkt der durch Padma 28 induzierten Apoptose entgegen. Dies gibt Anlass zur Vermutung, dass die proapoptotische Wirkung von Padma 28 auf der Interferenz mit Bcl-2-Signalwegen beruht. Die Bcl-2-Expression wird teilweise von INF- γ kontrolliert. Ein Einfluss von Padma 28 auf die INF- γ -Signaltransduktion konnte erst kürzlich in PBMCs bewiesen werden [11], wobei der ausgeprägte Einfluss auf die INF- γ -stimulierte Neopterin-Produktion und Verminderung der Tryptophan-Produktion festgestellt wurde. Der durch INO verursachte Mangel an essentieller Aminosäure Tryptophan scheint eine Apoptose und T-Zell-Toleranz zu induzieren.

Padma 28 scheint pro-apoptotisch die mitochondrialen proteinpermeablen Poren (PTP) zu öffnen. Dadurch können geschädigte Zellen bei Entzündung oder Krebs abgeräumt werden.

Obwohl unter Bedingungen der Zellkultur bewiesen werden konnte, dass Padma 28 die Zellproliferation hemmt

Abb. 4

Abb. 5

Abb. 6

und eine Apoptose verursacht, bleibt die klinische Frage offen, ob Padma 28 als Begleittherapie bei der Behandlung von Leukämie-Patienten eingesetzt werden kann. CURTIS T. KEITH et al. [12] vertreten die Meinung, dass in jedem Fall eine multifaktorielle Therapie notwendig ist in der Behandlung multifaktorieller Krankheiten, wie etwa Krebs. Immerhin fassen Phytotherapeutika zunehmend Fuss in der Begleittherapie des Krebsleidens.

Literatur

1. Jenny M., W. Schwaiger, D. Bernhard, O. Wrulich, D. Cosaceanu, D. Fuchs, F. Ueberall: Apoptosis induced by the Tibetan herbal remedy PADMA 28 in the T-cell-derived lymphocytic leukaemia cell line CEM-C7H2. *J. Carcinog* 2005, Sep 2;4:15
2. Fulda S.: Onkologie – Resveratrol im Rotwein zusätzlich zur Krebstherapie. www.journalonko.de
3. Maier Chr., Apoxis S.A: MegaFasL – Potential einer neuen Krebstherapie. Der programmierte Zelltod. www.apoxis.com
4. Krebsinformationsdienst. Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg. Archiv: Wenn Zellen immer weiterleben. Resistenz gegen Chemotherapie bei Krebs.
5. Medicine-Worldwide.de: Ergänzende Krebstherapie, Misteltherapie. www.onkologie.de
6. Pietschmann P., Universität Ulm: Apoptose aus der Birkenrinde. www.innovations-report.de
7. Dietzfelbinger H., Tumorzentrum München: Thalidomid und andere Therapieansätze. *Manual Multiples Myelom* 2002.
8. Apoptose aus Wikipedia, der freien Enzyklopädie. <http://de.wikipedia.org>
9. Gross M.: Mutationen des bcl-2-Gens als Krebsauslöser. *Presstext austria* 2005
10. Carola R.: Zerronnene Chancen – oder: Kein Traum vom grossen Geld? *Pressestelle der Universität Heidelberg* 2/2004 (Originalartikel H. Bujard)
11. Neurauter G., B. Wirleitner, K. Schroecksnael, H. Schennach, F. Ueberall, D. Fuchs: PADMA 28 modulates interferon-γ-induced tryptophan degradation and neopterin production in human PBMC in vitro. *International Immunopharmacology* 4 (2004) 833–839.
12. Keith CT, Borisy AA, Stockwell BR: Multi-component therapeutics for networked systems. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005; 4:1–8.

Anschrift der Autorin:

Dr. med. Christiane Class
Seestrasse 79, CH-8700 Küsnacht