

# krebs:hilfe!

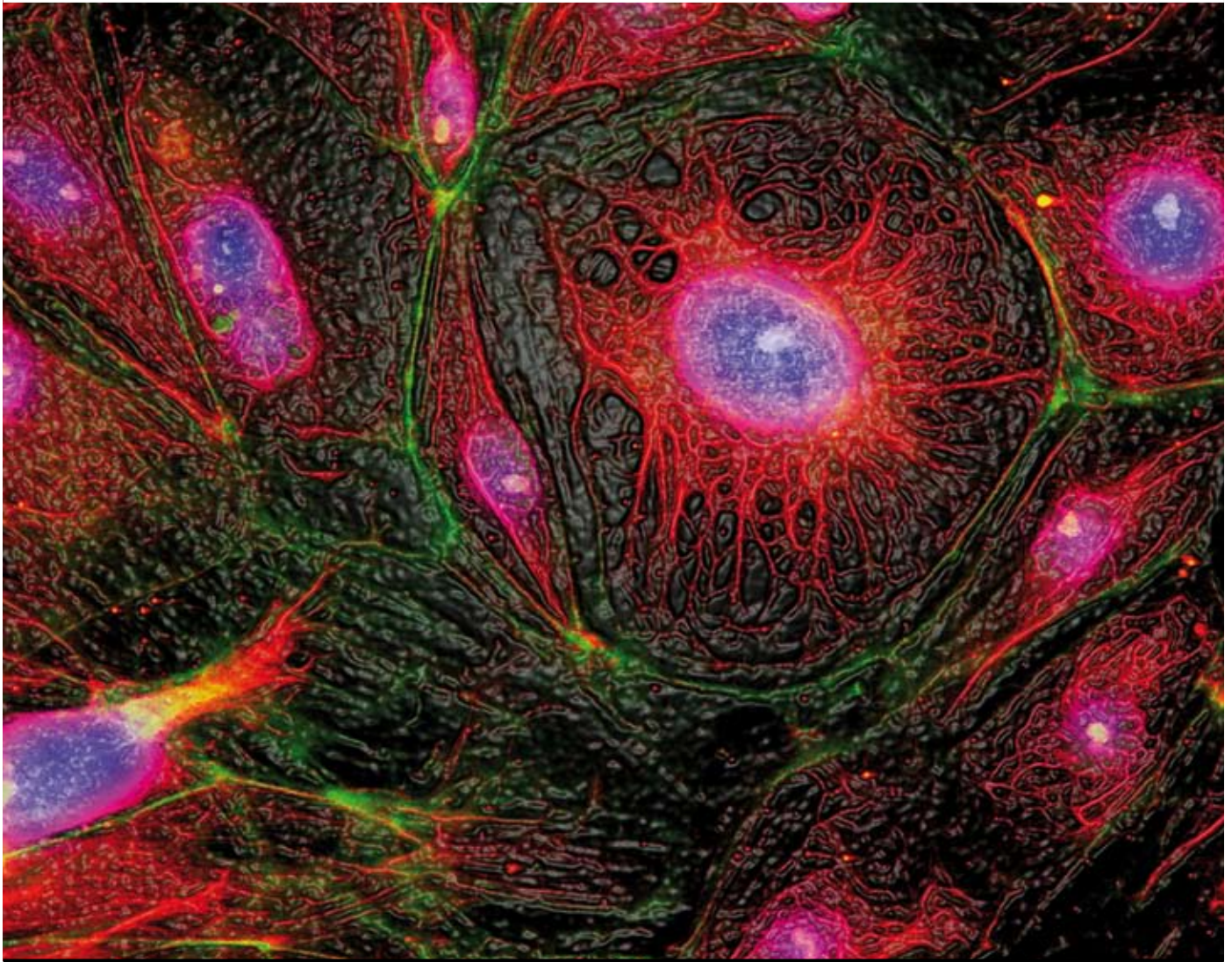


AUSTRIAN BREAST CANCER STUDY GROUP



ÖSTERREICHISCHE KREBSHILFE

HEFT 6:2009



## Stammzellen in der Onkologie

Zusammengestellt von Univ.-Prof. Dr. Michael Gnant und Univ.-Prof. Dr. Christoph Zielinski

### III Neue Erkenntnisse in der Tumorstammzellforschung

von Univ.-Prof. Dr. Heidrun Karlic, Dr. Harald Herrmann, Univ.-Prof. Mag. Dr. Thomas W. Grunt und Univ.-Prof. Dr. Peter Valent

### V Technologien zur Gewinnung von Tumorstammzellen

von Dr. Marija Balic

### VII Immuntherapie und Tumorstammzellen

von Univ.-Prof. Dr. Josef Friedl

### IX ABCSG-28: Tumorstammzellkonzept als Target

von Univ.-Prof. Dr. Florian Fitzal

### XI Stammzelltransplantation als Therapiekonzept

von Univ.-Prof. Dr. Peter Kalhs

### XIII Technologie der Stammzellgewinnung

von Dr. Konrad Namberger und Univ.-Prof. Dr. Richard Greil

### XIV Forschung mit embryonalen Stammzellen: ethische Konzepte

von Dr. Christiane Druml

## Liebe LeserInnen!

Stammzellen von Tumoren sind in den letzten wenigen Jahren deutlich in den Aufmerksamkeitsbereich onkologischer Forschung gerückt: Vom Konzept einer Tumorstammzelle ausgehend, die sowohl zur Entstehung eines Tumors als auch zu dessen Rezidiv führen könnte, sind Überlegungen angestellt worden, wie deren Biologie erforscht werden könnte. Erste Laborergebnisse zeigen, dass Tumorstammzellen tatsächlich nicht nur bei hämatologischen, sondern auch bei soliden Tumoren für die Malignomentstehung relevant sein könnten.

Nach aktuellen Forschungsergebnissen haben Stammzellen eine Reihe von Eigenschaften, die sie einerseits als Target für zukünftige Therapieansätze attraktiv erscheinen lassen, andererseits aber auch beträchtliche therapeutisch-konzeptionelle Schwierigkeiten verursachen, wie

z.B. die Fähigkeit zum „Self-Renewal“; zur Resistenzentwicklung und zur „Dormancy“.

Diese vermuteten Eigenschaften der gerade im Frühstadium der Erkrankung immer noch geheimnisvollen Wirkungsweise von Tumorstammzellen führen dazu, dass ihre therapeutische Beeinflussbarkeit mit derzeit verfügbaren Mitteln nur beschränkt gelingen dürfte. Auch ist die Identifikation und Charakterisierung sowie der Nachweis von Tumorstammzellen immer noch eine wissenschaftliche Herausforderung.

Erste Ergebnisse zeigen, dass manche bereits verfügbaren Therapien dazu beitragen könnten, diese Zellpopulation in ihrer Biologie zu beeinflussen und damit Tumorrezidive zu verhindern. Dies gelingt möglicherweise nicht nur über direktes „Attackieren“, sondern gerade auch im Frühstadium über Veränderungen des Microenvironments, in dem sich („schlafende“) Tumorstammzellen aufhalten.

Es muss nun das Ziel sein, die Relevanz der Tumorstammzellen in den dargestellten Zusammenhängen zu untersuchen, von klinischer Seite aber insbesondere auf die therapeutische Nutzbarkeit der erforschten Konzepte zu überprüfen. Die nachfolgenden Seiten beschäftigen sich mit diesen Aspekten. Wir hoffen, damit zur Darstellung dieses neuen und zukunftsreichenden Konzepts in der Onkologie beizutragen.

*Univ.-Prof. Dr. Michael Gnant*

*Klinische Abteilung für Allgemeinchirurgie, Universitätsklinik für Chirurgie, Wien*

*Univ.-Prof. Dr. Christoph Zielinski*

*Klinische Abteilung für Onkologie, Universitätsklinik für Innere Medizin I, Wien*





# Neue Erkenntnisse in der Tumorstammzellforschung

VON UNIV.-PROF. DR. HEIDRUN KARLIC, DR. HARALD HERRMANN, UNIV.-PROF. MAG. DR. THOMAS W. GRUNT UND UNIV.-PROF. DR. PETER VALENT

Tumorstammzellen (Cancer Stem Cells, CSC) werden als Ausgangspunkt und Wurzeln von malignen Erkrankungen angesehen. Gegenwärtige Forschungsprojekte zielen vor allem darauf ab, diese Zellen als Angriffspunkte (Targets) für zielgerichtete Therapien zu visualisieren und zu nutzen, um zielgerichtete Therapien noch wirksamer zu gestalten (Eradikation der Neoplasie – kurativer Ansatz).

Die Schwierigkeit bei der Suche nach typischen Oberflächenmarkerprofilen in diesen Zellen ergibt sich aus der Ähnlichkeit mit gesunden Gewebs- bzw. Vorläufer- oder Stammzellen, aus denen diese Tumorstammzellen möglicherweise im Rahmen der malignen Transformation hervorgegangen sind. Die Unsterblichkeit der CSC ist eine einzigartige und wichtige Eigenschaft dieser Zellen, welche sich über die Repopulation (Nachbildung) der entsprechenden Neoplasie in immunsupprimierten Mäusen darstellen lässt.

## Eigenschaften von CSC

CSC zeichnen sich durch drei wichtige Eigenschaften aus:

**erstens** die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Proliferation ohne Ausreifung bzw. ohne Verlust der proliferativen Kapazität),

**zweitens** Selbstregulation der Anzahl der Stammzellen durch Erhaltung eines Gleichgewichts von differenzierenden und „nur proliferierenden“ Tochterzellen, und

**drittens** die Fähigkeit zur Differenzierung und Ausreifung, um die Rekonstitution und das Langzeitüberleben von allen relevanten funktionellen Elementen eines Zellverbands zu gewährleisten.

Es gibt keinen optimalen Ansatz, der diese Funktionen experimentell untersuchen kann, da systemische Aspekte der Primärumgebung und oft auch die Zeitspanne (chronische Neoplasien) nicht simuliert werden können. Derzeit gilt die Xenotransplantation der Tumorzellen (Leukämiezellen) in der immundefizienten Maus als bestes „Näherungsmodell“ zum Nachweis und zur Erforschung der Biologie und Funktion der CSC. Allerdings gibt es auch hier ein limitierendes Potenzial: Vor allem fehlt die tumorspezifische Primärumgebung, welche in manchen Neoplasien einen entscheidenden Einfluss auf die Biologie der CSC haben kann. Abgesehen davon dauert die Entwicklungsphase der Neoplasie und ihrer CSC (in Subklonen) oft wesentlich länger als die Lebenserwartung der Versuchstiere. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das Fehlen eines funktionstüchtigen Immunsystems.

## → Beispiele für Stammzell-assoziierte Oberflächenmarker

Marker	Funktionelle Zuordnung
CD33	Adhäsionsmolekül von Zellen der myelomonozytären Linie. Da es Sialinsäuren bindet, gehört es zur SIGLEC-Familie der Lektine.
CD34	kommt auf hämatopoetischen Stamm und Progenitorzellen, endothelialen Progenitorzellen sowie vaskulär-endothelialen Zellen vor und fungiert als Adhäsionsmolekül.
CD44	hat neben seiner Bedeutung für die Zelladhäsion auch eine Rezeptorfunktion, wobei Hyaluronat und das Zytokin Osteopontin als Liganden dienen. CD44 kann in lymphatischen, myeloischen und erythroiden Zellen sowie mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden.
CD123	ist die [alpha] Untereinheit des Interleukin-3-Rezeptors (IL-3R-alpha). Hämatopoetische Zellen sowie Neutrophile, Basophile und Megakaryozyten nicht aber periphere T-Zellen, Natural-Killer-Zellen, Thrombozyten und Erythrozyten tragen diesen Marker.
CD133	Transmembran-Molekül, das sich auf hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, auf zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen, neuralen Stammzellen sowie Nieren- und Prostatastammzellen findet.
CD166	gilt als mesenchymaler Stammzellmarker, der ein heterogenes Expressionsmuster auf epithelialen Zellen von kolorektalen Karzinomen haben kann.
CD326	auch bekannt als EpCAM = Epithelial Cell Adhesion Molecule, kommt als panepitheliales Differenzierungsantigen auf der basolateralen Oberfläche von Karzinomen verschiedener Entwicklungsstufen vor. Es spielt eine Rolle bei den Cadherin-Catenin- und WNT-Signaltransduktionswegen.
ABCB1(MDR1) und ABCG2	sind Angehörige der ABC-Transporter-Familie. Als Produkte der MDR-Gene bewirken sie die „Multidrug Resistance“, indem sie z.B. Chemotherapeutika aus den Zellen herauspumpen.

## Gemeinsamkeiten von CSC und normalen Stammzellen

In beiden Fällen sorgen Stammzellen für dauernden Nachschub an neu gebildeten ausdifferenzierenden Zellen. Die „Unsterblichkeit“ von Tumorstammzellen wird durch mehrere spezifische Eigenschaften gewährleistet: Abgesehen von der Selbsterneuerung und steten Proliferation wird angenommen, dass die Stammzellen (normale und CSC) über Mechanismen verfügen, welche das Eindringen und Verbleiben von bestimmten Toxinen verhindern. Leider betreffen diese Mechanismen wahrscheinlich auch viele Medikamente, was zur intrinsischen Resistenz der CSC beitragen dürfte. Was das Muster von Zelloberflächenmoleküle betrifft, bestehen ebenfalls augenscheinliche Parallelen und Gemeinsamkeiten zwischen CSC und gesunden Stammzellen (siehe auch Tabelle 1). Zum Beispiel tragen normale und neoplastische Stammzellen der Myelopoese die Oberflächenmarker CD34 und CD44.

## Moleküle im Zusammenhang mit Wachstum oder Überleben

**Telomerase.** Das Potenzial zur Selbsterneuerung in normalen Stammzellen wie auch in CSC ist mit der Aktivität der Telomerase assoziiert, deren Bedeutung für die unbegrenzte Teilungsfähigkeit von malignen Zellen seit vielen Jahren bekannt ist. Zunächst kann der Abbau der Telomere während der Alterungsprozesse oder im Rahmen von chronischen Erkrankungen eine Destabilisierung der Chromosomen induzieren, die sich dann durch dauerhafte Aktivierung der Telomerase in aberranter Weise regenerieren und damit die Entstehung von Malignomen begünstigen.

**Regulatoren** des Zellzyklus und der Apoptose spielen im Wachstum, in der Proliferation und im Überleben der CSC eine bedeutende Rolle. Der regulierte Zelltod wird durch Moleküle wie z.B. die Gruppe der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren gesteuert. P53, aber auch zahlreiche mitochondriale Gene regeln extrinsische und intrinsische Signalwege. Außerdem spielen bei der Organisation der Zellteilung beispielsweise die zahlreichen Proteine des Cyclin-CDK-Komplexes, die Tumorsuppressorgene der INK4a (ARF-Familie, zu denen die P15 (=CDKN2B) und P16 (=CDKN2A) zählen, sowie der „Checkpoint-Regulator“ P53 eine bedeutende Rolle.

**Moleküle, die die inter- und intrazelluläre Kommunikation steuern.** Die zelluläre Differenzierung wird durch intrinsische oder extrinsische Signale reguliert. Besonders Signale aus der Umgebung – wie z.B. Hormone – können CSC aktivieren und auf diese Weise die Entstehung von Tumoren begünstigen oder unterdrücken. In einem gesunden Organismus können daher auch kaum Neoplasien entstehen. Außer den genannten Apoptoseregulationswegen betreffen die wichtigsten dieser Signalwege erstens den Phosphoinositide-(PI)-3-Kinase-mTOR-Signalübertragungsweg, zweitens den MAPK/RAS/RAF/MEK/ERK-Si-

gnalübertragungsweg, drittens den JAK/STAT-Signalübertragungsweg sowie viertens den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalübertragungsweg.

## Das „Umfeld“ der CSC

Derzeit existieren viele Beispiele dafür, dass das Feedback aus der unmittelbaren Umgebung einer CSC deren Funktionen inklusive Wachstum, Selbsterneuerung und Überleben entscheidend prägen kann. Diese Stammzellnische kann mit verschiedenen Zellarten wie Makrophagen, Mastzellen, Fibroblasten besiedelt sein, wobei vor allem sogenannte nutritive Stromazellen eine Rolle spielen. Die genannten Nischenzellen produzieren wahrscheinlich auch eine Reihe von CSC-regulierenden Molekülen inklusive Zytokine, Matrixproteine, Enzyme und spielen daher auch eine entscheidende Rolle in der Krebsentstehung.

## Zielgerichtete (= „Targeted“) Therapien

Folgende Moleküle eignen sich als diagnostische oder therapeutische Targets:

- 1) Oberflächenmoleküle
  - 2) spezifische Onkoproteine
  - 3) signalübertragende Moleküle und assoziierte Reaktionsketten
- Eine Voraussetzung dafür ist die biologische und molekulare Charakterisierung dieser sogenannten Targets (Zielmoleküle).

**Antikörpertherapien.** Es gibt vielversprechende Ansätze bei der Anwendung von Antikörpern vor allem in der Behandlung von Lymphomen und in der Therapie der AML. Im Falle der Lymphome könnten vor allem CD20-Antikörper und CD52-Antikörper dazu beitragen, dass mehr CSC eliminiert werden. Das gegen CD33 gerichtete Antikörperkonjugat Mylotarg kann sowohl reifere AML-Zellen als auch AML-Stammzellen vernichten. Mylotarg besteht aus der zytotoxischen Droge Calicheamicin und einem humanisierten CD33-Antikörper (hP67) und wird bereits in der AML eingesetzt.

**Pharmakologische Inhibitoren.** Als geeignete Angriffspunkte für gezielte Therapien mit sogenannten Small Molecules haben sich spezifische Onkoproteine erwiesen. Wichtige Beispiele dafür sind HER2/neu, AXL das mutierte Ras, das mutierte KIT oder Bcr/Abl, die mit spezifischen Agentien und neuen Tyrosinkinaseinhibitoren erreicht werden können. Weitere therapeutische Ansätze richten sich auf tumorspezifische Signalübertragungswege. Derartige Ansätze sind weniger spezifisch, treffen aber – im Unterschied zu den Therapien, die auf Onkoproteine abzielen – auf verschiedene Subklone von Stammzellen.

**Neue Ära.** Zusammenfassend kann man sagen, dass die Beforschung der Tumorstammzellen in naher Zukunft eine neue Ära in der Krebstherapie einleiten könnte. Die Voraussetzungen dafür wären eine präzise Charakterisierung der Markermoleküle und der Target-Expressionsprofile in diesen Zellen. Ebenso wichtig scheint es zu sein, dass man Unterschiede zwischen normalen

Stammzellen und CSC in Bezug auf die Targetexpression herausarbeiten kann, um eine selektive Vernichtung dieser Zellen (CSC) zu gewährleisten. Die kommenden Jahre und Jahrzehnte werden in präklinischen und klinischen Studien zeigen, ob diese Modelle und Ansätze zu einer Verbesserung der kurativen Therapie in diversen Neoplasien führen werden.

### Zusammenfassung

Die Tumorstammzellhypothese basiert auf der Beobachtung, dass das dauerhafte Wachstum von Tumoren und Leukämien von einer kleinen Population unreifer neoplastischer Zellen (Tumorstammzellen) abhängt, während reifere neoplastische Zellen nach mehreren Zellteilungen absterben. Die Selbsterneuerungsfähigkeit der Tumorstammzellen spielt dabei eine zentrale Rolle, und es ist klar, dass jede antineoplastische Therapie nur dann ein kuratives Potenzial hat, wenn Tumorstammzellen getroffen werden.

Ein wichtiger Aspekt ist deren intrinsische Resistenz gegenüber diversen Medikamenten. Daher versucht man, molekulare Zielstrukturen zu erkennen und therapeutisch zu nutzen. Ob die Anwendung der Tumorstammzellkonzepte zu einer nachhaltigen Verbesserung der Therapie von Leukämien und Tumorerkrankungen führen wird, werden die nächsten Jahrzehnte zeigen.



*Univ.-Prof. Dr. Heidrun Karlic (Foto), Ludwig Boltzmann Cluster Oncology (Ludwig Boltzmann Institut für Leukämieforschung) Hanusch Krankenhaus, Wien*

*Dr. Harald Herrmann, Ludwig Boltzmann Cluster Oncology, Wien  
Univ.-Prof. Mag. Dr. Thomas Grunt, Abteilung für Klinische Onkologie, Klinik für Innere Medizin I, Medizinische Universität Wien  
Univ.-Prof. Dr. Peter Valent, Abteilung für Hämatologie und Hämostaseologie, Klinik für Innere Medizin I, Medizinische Universität Wien*

# Technologien zur Gewinnung von Tumorstammzellen

VON DR. MARIJA BALIC

Als Stammzellen werden Zellen bezeichnet, welche im Allgemeinen durch die Eigenschaft der Selbsterneuerung gekennzeichnet sind. Weiters, je nach der genaueren Art der Zellen, können sie in unterschiedliche Zelltypen und Gewebe differenzieren. Prinzipiell unterscheidet man zwischen den embryonalen Stammzellen, die in frühen Entwicklungsstadien vorhanden sind, und Erwachsenenstammzellen, die im erwachsenen Organismus vorhanden sind. Nach dem Potenzial für weitere Differenzierung bezeichnet man die Stammzellen als totipotent, pluripotent oder multipotent. Pluripotente Stammzellen können letztendlich in unterschiedliche Gewebe ausdifferenzieren, und Organstammzellen können sich zu unterschiedlichen Zellen eines Organs entwickeln.

Analog zu den Organstammzellen des erwachsenen menschlichen Körpers glaubt man, dass sich auch bei den Tumoren an der Spitze der Hierarchie der Tumorzellen die Tumorstammzellen befinden. Diese Zellen machen nur einen kleinen Prozentsatz in der Gesamtheit der Tumorzellen aus. Dadurch, dass sie so selten sind und keine nur für die Tumorstammzellen spezifischen Merkmale zur Verfügung stehen, ist es eine besondere Herausforderung, diese anzureichern.

### Voraussetzung

Um jedoch eine weitere Charakterisierung entweder auf der molekulargenetischen Ebene oder auf der Proteinebene vorzu-

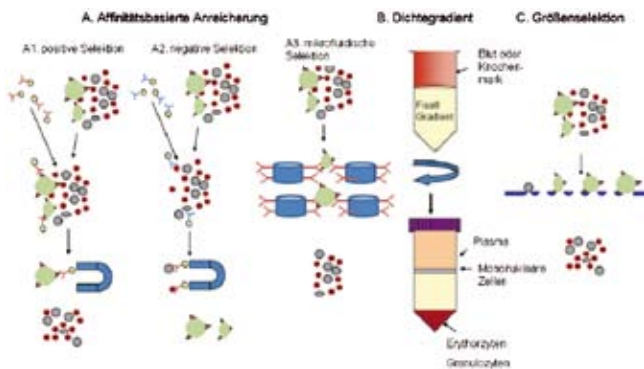
nehmen, ist es unbedingt notwendig, die Tumorstammzellen so stark wie möglich anzureichern. Es stehen einige Anreicherungsverfahren zur Verfügung, jedoch auch nach der erfolgten Prozedur gewinnt man keine reine Stammzellpopulation.

Aus den experimentellen Daten ließ sich jedoch für einige solide Tumore die Existenz der Tumorstammzellen nachweisen, wie zum Beispiel für Hirntumore, Brustkrebs, Dickdarmkrebs etc. Trotz der technischen Herausforderung und Einschränkung in der Fähigkeit, die Tumorstammzellen als reine Population anzureichern, sind einige Methoden etabliert worden, die aktuell zur Anreicherung und Analyse der Tumorstammzellen eingesetzt werden. Der Einfachheit halber werden die Anreicherungsverfahren hier am Beispiel des Brustkrebses beschrieben.

### Durchflusszytometrie

Eine der Methoden zur Anreicherung der Tumorstammzellen ist der Einsatz der Durchflusszytometrie, auch unter dem Akronym FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) bekannt. In diesem Verfahren werden die Zellen anhand unterschiedlicher Expression der Proteine auf der Zelloberfläche oder in der Zelle voneinander abgegrenzt und gegebenenfalls sortiert. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission optischer Signale seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. In einer Lösung befindliche Zellen werden dabei durch eine Kapillare angesaugt

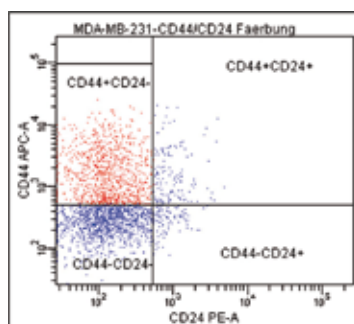
## → TUMORSTAMMZELLFORSCHUNG



Schematische Darstellung der Anreicherungsverfahren für disseminierte Tumorzellen. Ein wichtiger Bestandteil der disseminierten Tumorzellen sind Brustkrebsstammzellen.

und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, das mittels Detektoren nachgewiesen wird. Im abgewandelten Verfahren können die Zellen eines bestimmten Phänotyps aussortiert werden. Zur Anreicherung der Brustkrebsstammzellen wurden Proteine oder Zelloberflächenmerkmale CD44 und CD24 verwendet, wobei die Brustkrebsstammzellen mit dem Phänotyp CD44+CD24- assoziiert sind. Weiters konnte auch Enzymaktivität zur Anreicherung von interessanten Zellen verwendet werden, wie dies bei der Anreicherung der Aldehyddehydrogenase-aktiven Zellen im Aldehyd-Kit gezeigt wurde. Es ist selbstverständlich, dass alleine die Anreicherung der Zellen nach beschriebenen Merkmalen nicht ausreicht, um Zellen als Tumorstammzellen zu bezeichnen. Ob die aussortierte Fraktion der Tumorzellen tatsächlich die Tumorstammzellen beinhaltet, wird dann mit funktionellen Verfahren, wie mit speziellen Zellkulturen zur Analyse der Fähigkeit der Zellen zum Wachstum unter bestimmten Kulturbedingungen (siehe unten) oder mit tierexperimentellen Verfahren, nachgewiesen.

In der Abbildung oben ist vereinfacht das Verfahren der Brustkrebsstammzellenanreicherung aus den Brustkrebszellkulturen dargestellt. Um die Brustkrebsstammzellen aus dem Patientematerial anzureichern, werden auch noch sogenannte Lineagefaktoren eingesetzt, damit die Zellen, die in gewisse Zellarten ausdifferenziert haben, wegsortiert werden.



Repräsentatives FACS-Bild, welches die Expression der CD24- und CD44-Oberflächenmarker innerhalb der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 zeigt. Durch die Zugabe dieser Oberflächenmarker

könnte jene Population, der Stammzellcharakter (= CD44+CD24-/low) zugeschrieben wird, identifiziert werden (rot markiert). Die Markerlegung erfolgte anhand parallel durchgeführter Analysen von Kontrollen, welche ungefärbte Zellen, Einzelfärbungen und Isotypkontrollen beinhalteten.

## Brustkrebsstammzellen in Kultur

Die Zellkultur der Karzinomzelllinien, die eine epitheliale Zellkultur darstellt, wird unter adhärennten Bedingungen herangezogen. Der Grund dafür ist, dass Zellen epithelialen Ursprungs zur Anhaftung an eine Oberfläche neigen und auch nur unter diesen Bedingungen überleben und sich teilen können. Das Verfahren des Anzüchtens der Brustkrebszellen unter anderen Bedingungen, wo die Zellen in nicht adhärennten Kulturbedingungen überleben können, sich teilen und Mammosphären bilden (siehe Abbildung unten), wird zum einen zum Nachweis der Präsenz der Brustkrebsstammzellen verwendet und kann alternativ auch als eine Methode zur Anreicherung der Brustkrebsstammzellen eingesetzt werden.

Wenn Tumorzellen in dazu geeignete Kulturflaschen gebracht werden (ultra low attachment flasks), wo sie sich nicht anhaften können, untergeht die Mehrzahl der ausdifferenzierten Tumorzellen der Apoptose (dem programmierten Zelltod). Die überlebenden Zellen, die sich zu teilen beginnen, sind Brustkrebsstammzellen. Es ist noch nicht gänzlich erforscht, aber man glaubt, dass eine Mammosphäre nicht nur Brustkrebsstammzellen beinhaltet, sondern auch Progenitorzellen (Zellen, die bereits einem Funktionsbereich zugeteilt sind und stärker als die Stammzellen proliferieren). Dieser Vorgang wurde auch zur Anreicherung und Kultivierung der Tumorstammzellen von anderen Tumorentitäten verwendet.

## Disseminierte Brustkrebsstammzellen

Es wird zunehmend angenommen, dass die Brustkrebsstammzellen nicht nur für die Tumorentstehung der Primärtumore, sondern auch für die Metastasierung verantwortlich sind. Erste Evidenz dafür wurde 2006 publiziert (Balic et al. Clin Can Res, 2006). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Mehrheit der disseminierten Tumorzellen den beschriebenen Brustkrebsstammzellphänotyp trägt. Die disseminierten Tumorzellen sind sowohl im peripheren Blut als auch in Knochenmarksaspiraten detektierbar. Die Frequenz der disseminierten Tumorzellen ist sehr niedrig (0–50 Zellen/ml Blut). Besonderes Augenmerk wurde deshalb der Anreicherung der disseminierten und zirkulierenden Tumorzellen geschenkt, die die Zellen für weitere molekulargenetische Charakterisierung schonend anreichert. Diese können entweder anhand der Oberflächenmerkmale oder anhand der physikalischen Merkmale angereichert werden.

Obenstehende Abbildung zeigt unterschiedliche Verfahren, die als Ansatz zur Anreicherung der disseminierten Tumorzellen eingesetzt werden. Im Anschluss werden dann die angereicherten Zellen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen und charakterisiert. In der weiteren Charakterisierung können auch Brustkrebsstammzellmerkmale wie CD44, CD24 und ALDH eingesetzt und mittels Immunfluoreszenz detektiert werden. Weiteres Ziel ist es, das biologische Potenzial der Einzelzellen zu erforschen, die Techniken, die solche Analysen ermöglichen werden, sind jedoch erst in einer frühen Phase der Entwicklung. Erst mit neuen Techniken wird es möglich sein, dissemi-





## → TUMORSTAMMZELLFORSCHUNG

periphere Toleranz ermöglicht und aufrechterhalten. Die Aufrechterhaltung dieser peripheren Toleranz ist ein aktiver Prozess, der nur unter distinkten Voraussetzungen durchbrochen werden kann. Da TSZ zu Beginn in ihrer Antigenstruktur sich nur unwesentlich von normalen Zellen unterscheiden, werden sie als selbst erkannt und nicht eliminiert.

Auch wenn sich über die Zeit aufgrund genetischer Ursachen (intrinsische Kanzerogenese) unter anderem die Antigenstruktur (tumorassoziierte oder tumorspezifische Antigene) des Tumors ändert, wird dieses „veränderte Selbst“ (altered self) meistens nicht erkannt, weil diese veränderten Antigene von DCs als „nicht gefährlich“ präsentiert werden. Diese periphere natürliche Toleranz ist einer der wesentlichen Gründe, weswegen der adaptive Schenkel (DCs, T-Zellen) einer Immunantwort überhaupt nicht, spät oder nur insuffizient gegenüber entstehende TSZ aktiviert wird und TSZ somit ignoriert werden (tumor ignorance).

### Aussicht auf neue Therapiemöglichkeiten

Die Identifizierung von TSZ sowie die Möglichkeit, diese zu isolieren, eröffnen aus immunologischer Sicht vielversprechende neue und verbesserte Therapiemöglichkeiten. Einerseits durch die Verfügbarkeit von TSZ und damit TZS-Antigenen, andererseits basierend auf der Tatsache, dass es mittlerweile möglich ist, den adaptiven Schenkel der Immunantwort (Drei-Signal-Modell) gegen diese Antigene zu richten. Dadurch können die natürliche Toleranz aufgehoben und tumorinduzierte Toleranzmechanismen umgangen werden. DCs (z.B. sind Monozyten in vitro durch bestimmte Wachstumsfaktoren zu immaturren DCs differenzierbar) sind in der einzigartigen Lage, als immature, und nur als solche, Tumorantigene, -peptide und -proteine aufzunehmen, intrazellulär zu prozessieren und als Tumorantigene sowohl in den Gewebshistokompatibilitäts-I-Komplex (MHC) (cross presentation) als auch in den MHC-II-Komplex zu schleusen.

Die duale Expression dieser MHC-Komplexe ist eine Voraussetzung (Signal eins) für eine Tumorantigenerkennung via T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen, wodurch T-Zellen gegen diese Antigene spezifiziert (antigen recognition) und aktivierbar werden. Nicht antigen präsentierende Zellen – und somit auch Tumorstammzellen – exprimieren, wenn überhaupt, nur MHC-Klasse-I-Antigene und sind somit nicht in der Lage, die für eine zytotoxische T-Zell-Antwort (CD8, MHC I restringiert) notwendige Unterstützung von T-Helfer-Zellen (CD4) zu liefern, welche nur über MHC-II-Komplex aktiviert werden (MHC II restringiert). Durch inflammatorische Signale, z.B. Tumornekrosefaktor (TNF) oder auch Bakterienbestandteile (LPS), reifen die immaturren DCs aus. Während dieser Phase werden sogenannte „Second signal“-Moleküle (CD80/CD86) an die DC-Zelloberfläche transportiert. CD80/CD86 werden jedoch ebenfalls nur an antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. Erst wenn diese an der Zelloberfläche vorhanden sind, können T-Zellen über deren dazugehörigen Liganden (CD28/CTLA4) an diese binden. Dadurch wird in diesen T-Zellen intrazellulär sowohl die Prolifera-

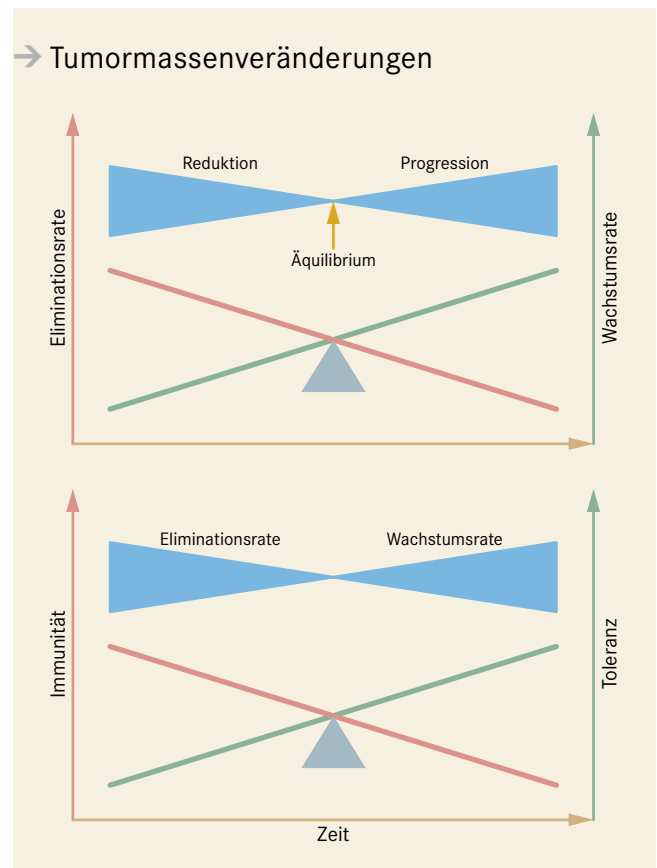
tionssignalkaskade als auch die antiapoptotische Signalkaskade reguliert (Signal zwei).

Wenn Tumorantigene den T-Zellen in Anwesenheit von Signal eins jedoch ohne Signal zwei präsentiert werden, werden in diesen antigenspezifischen T-Zellen die antiproliferative und proapoptotische Signalkaskade angeschaltet, wodurch T-Zellen, wo auch immer sie auf diese Antigene treffen, nicht reagieren oder apoptotisch werden (Anergie). Dieser Mechanismus erklärt auch, warum DC, die im Tumor nachgewiesen werden, zur Tumortoleranz beitragen können: Sie präsentieren zwar Tumorantigene, jedoch bleiben sie durch das im Tumor vorherrschende und erzeugte Milieu unreif, z.B. durch Hypoxie.

Zusätzlich sezernieren Tumorzellen selbst Proteine, die aktiv die Maturierung und die CD80/CD86-Expression verhindern (z.B. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Interleukin 10). Des Weiteren wird durch von Tumorzellen produziertem Tumor-derived Growth Factor (TGF) die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (T regs) ermöglicht, die eventuell vorhandene tumorspezifische zytotoxische T-Zellen inhibieren.

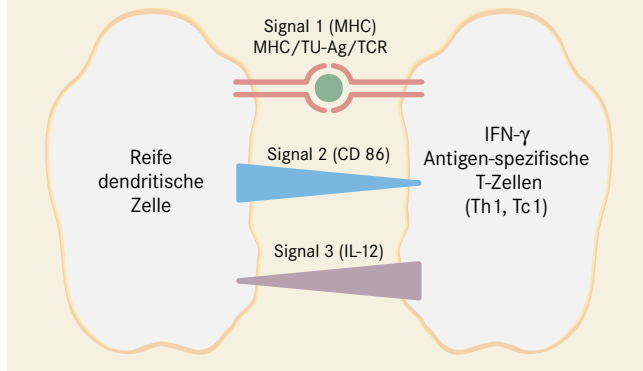
### Zytotoxische Immunantwort

Damit gegen TSZ-Antigene eine zytotoxische CTL-vermittelte Immunantwort induziert wird, bedarf es nicht nur der adäquaten Antigenpräsentation von reifen DCs, sondern diese DCs müssen in den mit ihnen interagierenden CD4- und CD8-Zellen die Produktion von  $\gamma$ -Interferon induzieren. Dies allerdings ist nur durch reife DCs möglich, wenn sie sich zu Interleukin 12





## → Signalwege der reifen dendritischen Zelle



(IL-12) sezernierenden DCs polarisieren (Signal drei, auch als danger signal bezeichnet). Interleukin 12 ist das bis dato potenteste Zytokin, das die Differenzierung von  $\gamma$ -IFN-positiven CD4/CD8 ermöglicht. Es besteht aus zwei Untereinheiten (p35 und p40) und muss, um biologisch aktiv zu sein, in derselben Zelle produziert und als Heterodimer IL-12p70 sezerniert werden.

Die p35-Untereinheit wird in vielen Zellen konstitutiv exprimiert. Im Gegensatz dazu wird die p40-Untereinheit nur in hämatopoetischen Zellen wie z.B. B-Zellen-Makrophagen, Granulozyten und DCs exprimiert. IL-12 bindet an den IL-12-Rezeptor, der im CD4-Kompartiment nur auf  $\gamma$ -IFN-positiven CD4-Zellen vorhanden ist. Diese Tatsache verdeutlicht, wie streng innerhalb des immunologischen Systems die IL-12 mediierten Effekte reguliert werden. Als wesentliche Faktoren, die die Produktion des funktionell aktiven IL-12 anregen, ist  $\gamma$ -IFN selbst, welches während der DC-T-Zell-Interaktion entsteht, aber auch von natürlichen Killer-(NK)-Zellen bereitgestellt wird. Bestandteile von Bakterien (LPS, DNA) und Viren binden über sogenannte Toll-like-Rezeptoren (TLR) an DCs und stimulieren ebenfalls die Produktion von IL12p70.

## Klinische Studien

An unserer Abteilung wurden im letzten Jahrzehnt mehrere klinische Studien durchgeführt, in denen das DC-basierende, adaptive zelltherapeutische Konzept angewendet wurde. In diesen Studien konnten sogar beim inoperablen soliden Karzinom im Stadium vier (Pankreas-, Leber-, medulläres Schilddrüsenkarzinom, cholangiozelluläres Karzinom, Melanom) zum Teil erstaunliche klinische Responderaten beobachtet werden, ohne Nebenwirkungen zu verzeichnen. Es ist mehr als wahrscheinlich, dass die Effektivität dieser auf DC basierenden Therapie in einer Situation mit geringer Tumormasse (das heißt nach erfolgreicher chirurgischer Therapie als auch nach erfolgreicher adjuvanter Chemotherapie) höher sein wird als in der Situation, in der das Immunsystem propter Tumormasse gleichsam paralysiert ist. Trotz erfolgreicher chirurgischer oder chemotherapeutischer Eradikation ist das Tumorrezidiv und die Metastasierung leider eine häufige und oft nicht zu ändernde Tatsache, die einen kausalen Zusammenhang mit Chemotherapie-resistenten und auch für das Immunsystem nicht detektierbaren TSZ haben.

Die Verfügbarkeit von TSZ und die Möglichkeit der Vakzination mit DCs, die in vitro zu reifen, IL12p70-sezernierenden und TSZ-Ag-präsentierenden DCs ausdifferenziert wurden, erlaubt die Balance zwischen Tumortoleranz und Tumormunität zugunsten der Letzteren zu verschieben und damit eine zytotoxische T-Zell-Antwort gegen TSZ in vivo zu induzieren. Es ist von enormer wissenschaftlicher und klinischer Relevanz, im Rahmen von Studien zu beweisen, dass die Vakzinierung von Patienten mit diesem Konzept im adjuvanten Setting dazu beiträgt, das Überleben der Patienten zu verlängern.



Univ.-Prof. Dr. Josef Friedl

Abteilung für Allgemeinchirurgie, Universitätsklinik für Chirurgie, Wien

# ABC SG-28: Tumorstammzellkonzept als Target

VON UNIV.-PROF. DR. FLORIAN FITZAL

In den 70er Jahren wurde in Amerika „The War against Cancer“ mit einer enormen Finanzspritze für die nationalen Forschungseinrichtungen deklariert. In den 90er Jahren zeigte die Statistik eine steigende Inzidenz und nur eine marginale Reduktion der Mortalität trotz Investitionen in Milliarden-Dollar-Höhe. Bis zur Jahrtausendwende zeigt sich dieser Trend,

wobei die einzelnen Krebsarten unterschiedlich betroffen sind. Trotz vieler bahnbrechender palliativer und adjuvanter Therapien, die überlebensverlängernd wirken, haben wir scheinbar immer noch nicht das richtige Ziel gefunden. In diesem Zusammenhang hat die Forschung der Karzinogenese einen besonders hohen Stellenwert.

### Seeding und Self-Seeding

Eines dieser möglichen neuen Ziele zukünftiger prospektiver Studien sind die kürzlich entdeckten Tumorstammzellen, wobei das Wort „kürzlich“ nicht wirklich zutrifft, gibt es doch schon Publikationen im Jahr 1968, wobei 6.338 Arbeiten in der PubMed gefunden werden können, die den Terminus „Cancer Stem Cell“ im Titel oder im Abstract beinhalten.

Trotzdem hat die Tumorstammzelle das Denken erst im jetzigen Jahrtausend aufgrund besserer experimenteller Nachweisverfahren geändert und zum Beispiel die Theorie des „seedings and self-seedings“ aufkommen lassen, welche von Larry Norton (Nat-Med 2006) weitverbreitet und propagiert wird.

Dieser Hypothese nach kommt es durch Entsendung von Tumorstammzellen vom Primärtumor nicht nur zur Metastasenbildung, sondern auch zum weiteren Wachstum der Metastasen (seeding) und vor allem auch des Primärtumors selbst (self-seeding), da die Tumorstammzellen nach einiger Zeit wieder am Rand des Primärtumors gefunden werden konnten, wobei das Zentrum nekrotisch war.

Da Tumorstammzellen auf herkömmliche systemische aber auch lokale Therapie wie Strahlentherapie resistent sein dürften, ist eine chirurgische Entfernung ein naheliegender therapeutischer Ansatzpunkt. Die Ursache hierfür sind erhöhte Anti-apoptose-Proteine in diesen Zellen wie bcl2, bcl-x oder XIAP, welche die Tumorstammzelle gegen Chemotherapeutika resistent machen könnten.

### Tumorstammzelle und Mammakarzinom

In diesem Zusammenhang ist es auch weiters gelungen, im Mammakarzinom Krebsstammzellen zu entdecken, die entgegen Nicht-Krebsstammzellen aus demselben Karzinom Metastasen bilden können. Diese Stammzellen wiesen den Phänotyp CD44+CD24-/ESA auf, deren Metastasen wiesen aber auch andere Phänotypen auf, wodurch bewiesen werden konnte, dass diese Zellen sich selbst, aber auch andere Zellformen bilden können. Daher definierten die Autoren diesen Phänotypus als Tumorstammzelle. Nach derzeitigem Wissenstand sind ungefähr zehn Prozent aller Mammakarzinomzellen in einem Primärtumor Tumorstammzellen.

### ABCSG 28 – POSYTIVE Trial

Die Überlegungen und Hypothesen über Krebsstammzellen beim Mammakarzinom sind bis jetzt nur experimenteller Natur. Klinische Studien konnten noch keine Beweise finden. Patientinnen mit einem synchron metastasierten Mammakarzinom wären am ehesten geeignet, um an ihnen die Hypothese der Tumorstammzellen zu untersuchen.

Mit dieser Überlegung hat die Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group (ABCSG) für diese doch sehr selten anzutreffenden Patientinnen (vier Prozent aller Mammakarzinompatientinnen) eine Studie konzipiert, um das theoretische Wissen über Tumorstammzellen diesen Patientinnen zunutze zu machen und gleichzeitig die Theorie im Ansatz zu überprüfen.

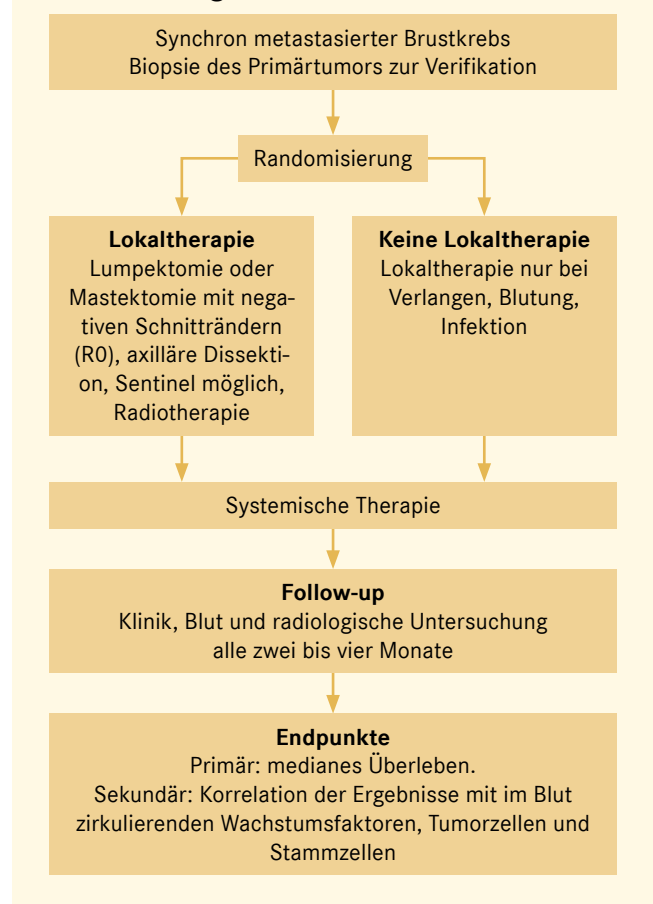
### Hypothese

Die Entfernung des Primärkarzinoms bei primär synchron metastasierten Patientinnen mit einem Mammakarzinom könnte durch die chirurgische Reduktion von Tumorstammzellen einen theoretischen Überlebensvorteil aufweisen. Bis dato gilt als Standard eine reine systemische Therapie ohne Operation.

Es gibt sogar experimentelle Hinweise, dass eine Operation durch weiteres Zellseeding die Metastasenentstehung und deren Wachstum fördern könnte. Klinische Daten zu dieser Hypothese gibt es kaum, wenngleich die Zahl an zirkulierenden Zellen nach Operationen ansteigt. Ähnliches gilt aber auch für die Tumorzellverschleppung nach Nadelbiopsie, welche in 50 Prozent der Fälle histologisch verifiziert werden kann, einen Einfluss auf das Lokalrezidiv scheint dies allerdings nicht zu haben. Die Ursache dafür dürfte in der Tatsache liegen, dass bei der Tumorzellverschleppung eine kritische Zellzahl überschritten werden muss, damit sich kleinere Mammosphären, also 3D-Tumor mit Anbindung an das umgebende Gewebe, bilden können, die dann zu einem klinisch sichtbaren und symptomatischen Karzinom heranwachsen können.

Eine derzeit laufende Studie mit ähnlichem Design konnte nach sechs Monaten Nachbeobachtungszeit keine wachstumsbeschleunigende Wirkung der Operation des Primärkarzinoms auf die Metastasen nachweisen.

### ➔ Studiendesign von ABCSG 28 – POSYTIVE



## Design

Die Patientinnen werden nach Stratifikationskriterien in eine von zwei Gruppen randomisiert. Die eine Gruppe erhält eine systemische Therapie, wobei die andere vor der systemischen Therapie eine Entfernung des Primärkarzinoms erfährt. Da die komplette lokale Therapie eine große Rolle für das onkologische Ergebnis spielt, wird eine Lymphadenektomie sowie Strahlentherapie ebenfalls durchgeführt.

Um die grundlegende Hypothese der Tumorstammzellen bzw. zirkulierenden Tumorzellen als Ursache für eine mögliche Überlebensverbesserung nachzuweisen, werden in regelmäßigen Abständen Blutabnahmen durchgeführt. Hierbei werden Wachstumsfaktoren, zirkulierende Tumorzellen und Tumorstammzellen im Blut gesucht und deren Anstieg bzw. Abfall mit dem onkologischen Resultat korreliert.

## Datenlage

Retrospektive Studien konnten bei mehr als 27.000 Patientinnen insgesamt einen deutlichen Vorteil für die Operation des Primärkarzinoms feststellen. Obgleich sich die beiden Gruppen in den retrospektiven Analysen bezüglich der Tumorbiologie und des Tumorstadiums doch deutlich unterschieden, zeigten multivariate Analysen, dass die Operation ein unabhängiger prädiktiver Faktor für ein signifikant besseres Überleben zu sein scheint. Prospektive Daten sind derzeit nicht publiziert.

Zwei Studien rekrutieren seit 2006 (Indien und Türkei).



*Univ.-Prof. Dr. Florian Fitzal*

*Abteilung für Allgemeinchirurgie, Universitätsklinik für Chirurgie, Wien*

# Stammzelltransplantation als Therapiekonzept

VON UNIV.-PROF. DR. PETER KALHS

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen ist heute eine Behandlungsmethode für viele schwere Erkrankungen des blutbildenden Systems sowie für ausgewählte solide Tumore. Prinzipiell ist eine solche Transplantation entweder mit patienteneigenen (autologen) Stammzellen oder mit Zellen eines passenden Spenders (allogen) möglich, wobei als Spender HLA-kompatible Geschwister oder Fremdspender infrage kommen. In Fällen, in denen kein passender Spender zur Verfügung steht, kann bei entsprechenden Voraussetzungen auch Nabelschnurblut, das sehr reich an hämatopoetischen Stammzellen ist, verwendet werden.

## Prinzip

Das Prinzip der autologen Transplantation besteht darin, dem Patienten mit chemosensitiver Erkrankung eine extrem hochdosierte, myeloablative Chemotherapie zu verabreichen und anschließend seine autologen Stammzellen als hämatopoetischen „rescue“ zu transfundieren. Diese Form der Transplantation hat zwar relativ wenige schwere Nebenwirkungen, ist aber mit einem erheblichen Rezidivrisiko verbunden.

Im Gegensatz dazu steht bei der allogenen Transplantation der immunologische Effekt der transplantierten Zellen gegen die bestehende Grundkrankheit (beschrieben als Graft-versus-Leukämie- sowie als Graft-versus-Lymphoma-Effekt) als therapeutisches Hauptprinzip im Vordergrund. Die beste Voraussetzung für eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation ist

eine genetische Identität der HLA-Antigene. Da in den meisten Fällen ein gesamter Haplotyp vom Vater und der Mutter vererbt wird, besteht eine ca. 25-prozentige Wahrscheinlichkeit, dass zwei Geschwister genotypisch HLA-ident sind. Hat ein Patient kein HLA-identen Geschwister, so sollte eine Fremdspendersuche initiiert werden; dabei besteht derzeit eine Chance von ca. 85 Prozent, einen HLA-kompatiblen Spender zu finden.

## Risikobeurteilung

Eine zunehmend wichtige Rolle im Rahmen der Planung einer Stammzelltransplantation stellt die Risikobeurteilung dar. Je nach Alter des Patienten, Stadium der Erkrankung und Komorbiditäten kann heute zwischen unterschiedlichen Konditionierungsschemata für eine allogene SZT ausgewählt werden. Die Risikobeurteilung vor einer SZT sollte daher so frühzeitig wie möglich in enger Zusammenarbeit mit einem Transplantationszentrum erfolgen.

## Durchführung

Für die Durchführung der eigentlichen Stammzelltransplantation wird der Patient schließlich an einer speziell ausgerüsteten Station aufgenommen; er erhält dort zunächst einen zentralvenösen Katheter. Im Anschluss daran wird die schon erwähnte Konditionierungstherapie verabreicht, gefolgt von der Transplantation der Stammzellen. Zur Vermeidung einer Abstoßung sowie einer sogenannten Graft-versus-Host-Erkrankung erhalten die



## → TUMORSTAMMZELLFORSCHUNG

Patienten spezielle Immunsuppressiva, die je nach Art der Transplantation zwischen sechs Monate und einem Jahr nach Transplantation verabreicht wird.

Speziell in den ersten drei Monaten nach Transplantation ist eine engmaschige ambulante Betreuung der PatientInnen in einer entsprechenden Spezialambulanz notwendig. Anschließend sollten alle allogenen Transplantierten lebenslang an einem Transplantationszentrum auf ambulanter Basis weiterbetreut werden, um eventuell auftretende Spätkomplikationen rechtzeitig erkennen und behandeln zu können.

### Indikationen

Quelle: Handbuch „Haemopoietic Stem Cell Transplantation“, herausgegeben von der ESH (European School of Haematology) und der EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation, 2008 Revised Edition)

### Akute myeloische Leukämie

1. CR (komplette Remission): allogene, außer zytogenetische „Good risk“-Patienten (t (15,17), t (8, 21), inv (16)); bei vorhandenem Geschwisterspender

2. CR: allogene bei vorhandenem Geschwisterspender oder bei vorhandenem Fremdspender

keine CR oder im Rezidiv: allogene (Geschwister- oder Fremdspender)

Patienten mit Komorbiditäten sowie Patienten zwischen 55 und 65 Jahren: dosisreduzierte Konditionierungen

Autolog: wenn, dann nur in erster CR; ist der konventionellen Chemotherapie nicht gesichert überlegen

### Akute lymphatische Leukämie

1. CR: allogene bei vorhandenem Geschwister- oder Fremdspender; autolog bei fehlendem Spender

2. CR: allogene bei vorhandenem Spender

therapierefraktäre Patienten: keine Indikation für Stammzelltransplantation

### Non-Hodgkin-Lymphome

#### Hochdosistherapie und autologe Transplantation:

Standard für Rezidive nach CHOP oder einer gleichwertigen Chemotherapie, wenn Chemosensitivität vorliegt.

Bei Rituximab-CHOP oder gleichwertiger Chemotherapie: nur

Patienten mit niedrigem internationalem altersadaptiertem prognostischem Index (aaIPI)

Patienten mit hohem aaIPI: allogene Transplantation (im Rahmen von Studien)

### Morbus Hodgkin

### Myelodysplastische Syndrome

Intermediate – high risk MDS

### Schwere aplastische Anämie (SAA)

Bei vorhandenem Geschwisterspender und Alter <40 Jahre: so rasch wie möglich

Fremdspender: bei Rezidiv nach immunsuppressiver Therapie und Alter <40 bis 45 Jahre

### Multiples Myelom

Autolog:

Bei >PR (partielle Remission) nach Initialtherapie

Bei <PR nach Initialtherapie: Doppeltransplantation

Allogene: Derzeit nur bei ausgewählten Patienten

### CML

Chronische Phase:

Imatinib-Versagen bzw. suboptimaler Response auf initiale Imatinib-Therapie

Akzelerierte Phase

Blastenkrise (nach Zytoreduktion)

### CLL

Autologe und allogene SCT nur im Rahmen von klinischen Studien

Transplantationen mit alternativen Spendern (Nabelschnurblut, haploidente Transplantationen)

Bei ausgewählten Patienten mit hämatologischen Neoplasien, für die kein passender Familien- oder Fremdspender in einem für die Behandlung der Grundkrankheit akzeptablen Zeitraum identifiziert werden kann.



Univ.-Prof. Dr. Peter Kalhs

Abteilung für Knochenmarktransplantation

Universitätsklinik für Innere Medizin I, Wien

# Technologie der Stammzellgewinnung

VON DR. KONRAD NAMBERGER UND UNIV.-PROF. DR. RICHARD GREIL

Die Transplantation von Stammzellen ist inzwischen fester Bestandteil der Therapie hämatologischer Erkrankungen und verschiedener solider Tumore. Stammzellen können entweder mit einer Knochenmarkspunktion unter Vollnarkose oder mittels geeigneter Zellseparatoren aus dem peripheren Blut gewonnen werden.

Stammzellpräparate sind Arzneimittel im Sinne des Arzneimittelgesetzes. Vor diesem Hintergrund kommt der qualitätsgesicherten Herstellung eine wesentliche Bedeutung zu.

## Indikationen und Möglichkeiten der Stammzell-sammlung

Die Indikation einer Stammzelltherapie wird an einem Zentrum für Hämatologie und Onkologie gestellt. Wann braucht man nun eine Stammzelltransplantation?

Wir unterscheiden dabei die autologe von der allogenen Transplantation:

**Bei der autologen Transplantation** werden die Stammzellen dem Patienten selbst entnommen und nach einer aggressiven Therapie wieder zurückgegeben. Sie ermöglichen daher eine Intensivierung der Chemo- oder Strahlentherapie.

**Bei der allogenen Transplantation** stammen die transplantierten Blutstammzellen nicht vom Patienten selbst, sondern von geeigneten, sogenannten HLA-identen Spendern. Dabei ist die Stammzelltransplantation von Familienspendern verträglicher als die von Fremdspendern.

Bei autologen wie allogenen Transplantationen sollen die Stammzellen das nach der Therapie zerstörte Knochenmark wieder aufbauen.

Bei der allogenen Transplantation können Stammzellen darüber hinaus fehlende bzw. defekte Blutzellen oder Enzyme ersetzen und ein sogenannter Graft-versus-Leukemia-Effekt als Therapie genutzt werden.

Bis Anfang der neunziger Jahre war das Knochenmark die einzige Quelle für die Gewinnung von Stammzellen sowohl für autologe als auch allogene Transplantationen. Hierbei werden Stammzellen unter operativen Bedingungen durch mehrfache Punktionen des Beckenkamms in ca. 500 bis 1.500ml Knochenmarkblut gewonnen. Die Prozedur setzt eine Vollnarkose voraus und ist nicht beliebig wiederholbar.

Allerdings können Stammzellen auch aus dem Blut mithilfe von speziellen Zellseparatoren ohne Vollnarkose und meist unter ambulanten Bedingungen gewonnen werden. Dies stellt die häufigste Form der Stammzellgewinnung heutzutage dar.

## Vorbereitung des Patienten zur Stammzell-sammlung

Stammzellen zirkulieren normalerweise in sehr geringer Anzahl im peripheren Blut, weswegen eine Stimulation mit Chemotherapie und/oder sogenannten Wachstumsfaktoren (granulocyte-colony stimulating factors G-CSF) erfolgen muss. Eine Stammzellen mobilisierende Chemotherapie wird ca. zehn Tage vor der geplanten Stammzellsammlung verabreicht.

Mögliche Kombinationen mit Cyclophosphamid, Ara-C oder Etoposid haben sich bewährt. Die Chemotherapie kann die Stammzellmenge im Blut, die unter normalen Bedingungen 0,05 Prozent der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) ausmacht, auf das Fünf- bis Fünfzehnfache erhöhen, zusammen mit den Wachstumsfaktoren sogar auf bis zu sechs Prozent der gesamten weißen Blutkörperchen.

Ab einer Konzentration von über zehn Stammzellen pro Mikroliter Blut kann eine Stammzellkollektion durchgeführt werden. Muskel- und Knochenschmerzen sind häufige Nebenwirkungen der Stammzellenmobilisation, die meist aber unter Analgetika beherrschbar bleiben. Allerdings sind in seltenen Fällen Milzrupturen unter G-CSF beschrieben.

Bei sogenannten schlechten Mobilisierern kann zusätzlich zu G-CSF mit dem Medikament Plerixafor nachgeholfen werden, das Stammzellen aus ihrer Verankerung im Knochenmarksmilieu herauslösen kann.

Die Eignung des Patienten zur Blutstammzellmobilisation und -apherese wird durch den betreuenden Hämatonkologen und dem für die Apherese zuständigen Arzt mittels Anamnese und klinischer Untersuchung festgestellt. Entsprechende Laboruntersuchungen zum Ausschluss möglicher Übertragungsrisiken für Hepatitis, Lues und HIV müssen innerhalb von 30 Tagen vor der Stammzellsammlung aktuell vorliegen. Ergänzend müssen zumindest ein vollständiges Blutbild, Elektrolyte, Blutzucker, Gerinnungsparameter und die Blutgruppe des Patienten vor der Apherese vorliegen. Eventuell müssen weitere laborchemische oder konsiliarische Untersuchungen zur Beurteilung der Apherese-fähigkeit ergänzt werden.

Eine sorgfältige mündliche und schriftliche Aufklärung schließt die Indikation der Stammzelltherapie, Ablauf/Nebenwirkungen von Chemotherapien und Wachstumsfaktoren ein. Die Patientenaufklärung umfasst ferner das genaue Vorgehen der Stammzellsammlung (Apherese), die Verarbeitung und das Einfrieren (Kryokonservierung) der gewonnenen Stammzellprodukte. Aufklärung über die Möglichkeit der Beschädigung oder des Verlusts

➔ Tabelle 1: Wichtige Indikationen der Stammzellentherapie

Autologe Stammzelltransplantationen	Allogene Stammzelltransplantationen
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rezidierte/refraktäre Non-Hodgkin- und Hodgkin-Lymphome</li> <li>- Multiples Myelom und AL-Amyloidose</li> <li>- Autoimmunerkrankungen</li> <li>- Einzelne Tumore wie Ewing-Sarkome, Keimzelltumore</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Akute myeloische und lymphatische Leukämien</li> <li>- Chronisch myeloische Leukämie (nur noch selten)</li> <li>- Autoimmunerkrankungen</li> <li>- Multiples Myelom</li> <li>- Refraktäre/Rezidierte Non-Hodgkin- und Hodgkin-Lymphome</li> <li>- Aplastische Anämie, PNH, Fanconi-Anämie, Hämoglobinopathien</li> <li>- Myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome</li> <li>- Severe combined immune defect SCID</li> </ul>

tes gewonnener Produkte sind Pflicht. Auch die Dauer der Lagerzeit sollte vereinbart werden.

Im Rahmen der Voruntersuchungen ist noch zu entscheiden, ob ein peripherer oder zentralvenöser Zugang für die Stammzellseparation notwendig ist.

**Ablauf der Stammzellsammlung (Apherese)**

Voraussetzungen zur Arbeit sind:

- ein Hygieneplan zur Reinigung der Räume und Geräte;
- Notfall- und Alarmpläne;
- Gerätesicherheit, Personalqualifikation, adäquate Raumbeschaffenheit;
- detaillierte Dokumentation aller Vorgänge;
- regelmäßige Schulungen und Selbstaudits;
- alle Arbeitsvorgänge gestalten sich nur gemäß erprobter und standardisierter Arbeitsanleitungen.

Der Leiter muss Facharzt für Transfusionsmedizin oder Internist mit der Schwerpunktbezeichnung Hämatologie/Onkologie oder Facharzt für Kinderheilkunde mit gleichwertigen Sachkenntnissen sein. Ferner muss der verantwortliche Arzt eine mindestens einjährige Erfahrung in Hämaapherese und Kryokonservierung von Zellen sowie besondere Kenntnisse in der Gewinnung, Präparation, Lagerung und Qualitätssicherung von Blutstammzellprodukten nachweisen. Der zuständigen Behörde sind sogenannte sachkundige Personen zu nennen, welche die Herstellung und Qualitätssicherung überwachen.

Vor Beginn der Apherese muss tagesaktuell die Eignung des Patienten festgestellt und dokumentiert werden. Damit das Blut in der Apherese-maschine nicht gerinnt, ist eine Blutverdünnung mit einem sogenannten Antikoagulans nötig. Im Regelfall ist dies Zitrat, eventuell ergänzt mit Heparin. Um Blutungsrisiken während

der Apherese zu vermeiden, müssen Blutbild und Gerinnungsparameter auch während der Apherese überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden.

Die Thrombozytenwerte sollen deswegen bei Stammzellapherese über 50/nl liegen. Sind hierzu Transfusionen erforderlich, so müssen diese Präparate mit 30 Gy vor Verabreichung bestrahlt werden. Unter Zitrat kann es zu Missempfindungen (Kribbeln, Ameisenlaufen) bzw. Muskelkrämpfen kommen.

Die Stammzellapherese erfolgt in einer für den Patienten bequemen Position über ca. vier bis fünf Stunden. Mehrmals müssen die Patienten/Spender nach dem Befinden gefragt und die Kreislaufparameter sowie Temperatur und die venösen Zugänge kontrolliert werden. Auch nach der Apherese bleibt der Patient/Spender noch mindestens eine halbe Stunde unter Aufsicht.

Im Zellseparator wird das Blut in einem Kanal in drei Schichten getrennt, oben das Plasma, dann der sogenannte Buffy Coat und unten die Erythrozyten.

Innerhalb des Buffy Coat befinden sich auch die Stammzellen. Dort wird eine möglichst ergiebige Schicht abgesaugt und in einem Beutel gesammelt, während das restliche Blut dem Patienten zurückgegeben wird. Die Konzentration mitgesammelter Granulozyten/Lymphozyten/Monozyten und Erythrozyten sollte innerhalb bestimmter Grenzen liegen.

Das Blutvolumen, das durch die Pherese-maschine geleitet wird, soll in der Regel pro Apherese das Vierfache des jeweiligen Körperblutvolumens nicht übersteigen. Es gibt jedoch die Möglichkeit, bei kreislaufstabilen Patienten/Spendern mit niedriger Stammzellzahl im peripheren Blut eine sogenannte Large Volume Apherese (LVL) mit einem höheren Blutvolumen durchzuführen, um die Anzahl der Stammzellen im Apheresat (gesamt-

➔ Tabelle 2: Voraussetzungen zur Stammzellapherese

Klinisch/laborchemisch	Organisatorisch/formal
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ausreichende Stammzellmenge im Blut</li> <li>- Thrombozyten in der Regel &gt;50/nl, ggf. Substitution. Vollständiges Blutbild, Gerinnungsparameter, Blutzucker, Elektrolyte</li> <li>- Blutgruppenbefund</li> <li>- Infektionsmarker (innerhalb von 30 Tagen vor Apherese)</li> <li>- Apherese-tauglichkeit bescheinigt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aufklärung des Patienten über Vorbereitung und Durchführung der Apherese, Chemotherapie/Wachstumsfaktoren, ggf. ZVK-Anlage, Nachsorge</li> <li>- Aufklärung über Verarbeitung, Kryokonservierung, Lagerdauer und Auftauen der Produkte sowie Transplantation</li> <li>- Aufklärung über mögliche Übertragung von Blutprodukten</li> <li>- Möglichkeit zur getrennten Lagerung potenziell infektiöser Produkte</li> <li>- Eventuell ergänzende laborchemische Untersuchungen oder konsiliarische Untersuchungen (z.B. Kardiologie) vor der Stammzellsammlung</li> <li>- Gegebenenfalls ZVK-Anlage</li> </ul>



melte Stammzellenmenge) zu erhöhen. Pro Tag sollte das Entnahmevermögen einschließlich des zusätzlich gewonnenen Plasmas maximal 15 Prozent des Körperblutvolumens betragen. Dies entspricht ca. 500ml bei normalgewichtigen Erwachsenen.

Für eine Stammzelltransplantation sollten im Regelfall mindestens zweimal  $10^6$  Stammzellen pro kg Körpergewicht des Empfängers gesammelt werden.

### Weitere Verarbeitung

Stammzellpräparate sollten innerhalb von 72 Stunden nach Apherese transfundiert oder aufbereitet und dann sofort kryokonserviert werden. Für den Einfriervorgang muss das Präparat zuvor mit einer geeigneten Gefrierschutzlösung gemischt werden. Ferner werden kleine Probenröhrchen hergestellt, aus denen vor dem Auftauen der eigentlichen Produkte die Zahl tauglicher Stammzellen gemessen werden. Sie dienen der Kontrolle. Präparate und Pilotröhrchen lagern unter denselben Bedingungen in der Gas- oder Flüssigkeitsphase von Stickstoff. Sämtliche Abläufe erfolgen nach standardisierten Arbeitsvorgängen und werden detailliert dokumentiert. Sie sind somit jederzeit nachprüfbar.

### → Zellseparator

Spezielle Zellseparator führen die Blutstammzellapherese durch. Sie besitzen ein selbstkontrolliertes Überwachungssystem, um ...

- ... Zu- und Rückfluss,
- ... Unterdruck und Luft im System,
- ... Dosierung der Antikoagulanzen,
- ... Hämolysen,
- ... Undichtigkeiten,
- ... Temperatur in der Zentrifuge,
- ... Pumpgeschwindigkeit und Gesamtdurchflussvolumen ...
- ... zu kontrollieren



Zusammenfassend stellen die Gewinnung, Verarbeitung/Kryokonservierung, Lagerung und Transplantation von Stammzellen eine wichtige und interessante medizinische Herausforderung dar, die nur unter Einhaltung höchster Qualitätskriterien durchgeführt werden darf.



Dr. Konrad Namberger (Foto)

Univ.-Prof. Dr. Richard Greil

Universitätsklinik für Innere Medizin III der Salzburger Landeskliniken

# Forschung mit embryonalen Stammzellen: ethische Konzepte

VON DR. CHRISTIANE DRUML

Die österreichische Bioethikkommission hat am 16. März dieses Jahres mit großer Mehrheit eine Empfehlung zur Liberalisierung der Forschung an humanen embryonalen Stammzellen abgegeben. Humane embryonale Stammzellforschung wird darin als wissenschaftlich relevant, moralisch grundsätzlich legitim und förderungswürdig erachtet.

Forschung mit embryonalen Stammzellen findet auf der ganzen Welt in vielen Zentren statt. Es gibt internationale Kooperationen, Netzwerke und zahlreiche Organisationen, die koordinierend tätig sind, die wissenschaftliche und ethische Richtlinien verfasst haben. Dieser Forschungszweig gibt zu großer Hoffnung Anlass. Es wird erwartet, dass sich aus ihm Möglichkeiten zur Behandlung von Krankheiten entwickeln, die wir derzeit nicht heilen können. Neue Therapieansätze sind möglich, wenn spezifische Probleme, die jetzt noch existieren, gelöst werden können.

Anwendungsgebiete, auf denen geforscht wird, sind u.a. Kardiologie, M. Parkinson, Diabetes, Rückenmarksverletzungen.

In Österreich ist die Forschung an humanen embryonalen Stammzellen nicht ausdrücklich geregelt, sondern nur implizit aus dem Fortpflanzungsmedizingesetz (FMedG). Aus diesem folgt, dass die Gewinnung embryonaler Stammzellen aus befruchteten Eizellen verboten ist. Dies betrifft aber nicht die Forschung mit pluripotenten embryonalen Stammzellen, wenn diese aus dem Ausland importiert werden.

Die Empfehlung der Kommission ist nach langer und ausführlicher Beratungen sowie Konsultation externer Experten und Institutionen getroffen worden. Letztlich ist dieses Dokument der konsequente Abschluss einer Diskussion, die schon 2001 kurz nach der Gründung der Bioethikkommission begonnen hatte und die zu Empfehlungen zu Themen wie der Unterzeichnung

## → TUMORSTAMMZELLFORSCHUNG

der Biomedizinkonvention des Europarats, zur EU-Biotechnologie-Richtlinie; zur embryonalen Stammzellforschung im Rahmen der EU-Forschungsfinanzierung im Sechsten Rahmenprogramm; zum reproduktiven Klonen und zur Präimplantationsdiagnostik – um nur einige zu nennen – geführt hat.

### Der europäische Vergleich

Ein Vergleich mit den anderen europäischen Mitgliedsstaaten zeigt Folgendes: In elf Mitgliedsstaaten der EU ist es gesetzlich gestattet, überzählige Embryonen aus der In-vitro-Fertilisation (IVF) für die embryonale Stammzellforschung zu verwenden: in Tschechien, Dänemark, Griechenland, Finnland, Frankreich, den Niederlanden und Portugal. Die Mitgliedsländer Belgien, Großbritannien, Spanien und Schweden gehen darüber weit hinaus: Diese Länder haben die liberalsten Regelungen in Europa, die Erzeugung von Embryonen ist dort auch für Forschungszwecke erlaubt. Ein Verfahren, das von der Bioethikkommission klar abgelehnt wird. Deutschland und Italien haben eine restriktive Position betreffend embryonaler Stammzellforschung: Dort dürfen keine Stammzelllinien hergestellt werden, Import ist aber möglich, wobei Wissenschaftler in Deutschland diese aus anderen Ländern importieren dürfen, wenn sie vor dem „Stichtag“ 1. Mai 2007 hergestellt wurden. In den restlichen EU Mitgliedsstaaten gibt es keine spezifische Regelungen.

Die Mehrheit der österreichischen Kommission empfiehlt in ihrem Dokument, befruchtete Eizellen, die nicht mehr für die Fortpflanzung verwendet und die damit der Vernichtung preisgegeben werden, für hochrangige, streng kontrollierte Forschungsvorhaben einzusetzen. Streng abgelehnt wird es, Eizellen rein für die Forschung herzustellen, da das im Wesentlichen die Frau und den weiblichen Körper belastet und überdies gegen das Verbot der Kommerzialisierung des Körpers verstößt. Im Übrigen haben alle weiblichen Mitglieder der Kommission für die Liberalisierung gestimmt, und in der Empfehlung wurde ein eigenes Kapitel der „Gewinnung embryonaler Stammzellen aus der Perspektive der Frau“ gewidmet.

### Wertekonflikt

Embryonale Stammzellforschung ist ein klassisches Beispiel eines Wertekonflikts in der Bioethik. Im Zentrum dieses Konflikts steht die Diskussion über den moralischen Status des Embryos, die von divergierenden, kaum zu vereinenden Meinungen geprägt ist. Bioethische Themen spannen einen weiten Bogen, der von den Fragestellungen den Lebensbeginn betreffend wie Abtreibung, Pränataldiagnostik, medizinisch unterstützte Fortpflanzung bis zu den Fragestellungen des Lebensendes wie Organtransplantation, Sterbehilfe etc. reicht.

Ein zusätzliches Argument, das von Gegnern der humanen embryonalen Stammzellforschung verwendet wird, ist jenes, dass dieser Forschungszweig deshalb nicht verfolgt werden soll, weil er bis dato keine klinische Anwendungsmöglichkeit für Patienten gebracht hat. Dieses Argument verliert jedoch seine Stärke, da es sich um eine relativ junge Forschung handelt, die erstmals

1998 von James Thomson beschrieben wurde. Selbst auf dem Gebiet der pharmazeutischen Forschung sehen wir – wie eine kürzlich erschienene Publikation in „Science“ gezeigt hat – eine durchschnittliche Zeitspanne von 24 Jahren von der ersten Beschreibung einer Substanz in einer wissenschaftlichen Zeitschrift bis zur ersten Publikation einer klinischen Anwendung.

Zu Beginn dieses Jahres hat die amerikanische Zulassungsbehörde klinische Studien mit einem Medikament der US Firma GIRON, das aus humanen embryonalen Stammzellen gewonnen wird und für die Anwendung an Patienten mit neu diagnostizierten Rückenmarksverletzungen bestimmt ist, bewilligt. Der Beginn dieser klinischen Studien wurde in der Folge im August von der FDA mit der Auflage zur Erhebung weiterer Daten gestoppt, da sich im Tierversuch mikroskopische Zysten gebildet hatten. Die ersten erfolgreichen klinischen Versuche am Menschen würden weltweit eine komplette Änderung der derzeitigen Diskussion über die Zulässigkeit der Forschung an humanen embryonalen Stammzellen bewirken.

### Notwendigkeit rechtlicher Rahmenbedingungen

Forschung wie auch moderne Medizin machen vor Ländergrenzen keinen Halt. Die Grundlage jeglicher biomedizinischen Forschung ist Austausch, Zusammenarbeit und Mobilität der Wissenschaftler – international und auch besonders innerhalb der europäischen Forschungsprogramme. Neue Erkenntnisse in der Forschung sind innerhalb kürzester Zeit durch moderne Technologien wie dem World Wide Net überall verfügbar.

Sollen Ergebnisse humaner embryonaler Stammzellforschung einmal auch in Österreich den Menschen zugute kommen, dann muss sich auch hier die Forschung an solchen Projekten beteiligen können. Für das Wohl der künftigen Generationen sind adäquate rechtliche Rahmenbedingungen notwendig, damit die Ergebnisse dieses Forschungszweigs auch den österreichischen Staatsbürgern offen stehen. Denn es wäre ethisch nicht zu rechtfertigen, die heimische Forschung von einem vielversprechenden Forschungszweig auszuschließen und somit zu benachteiligen, um dann die Früchte der Forschung aus dem Ausland zu importieren! Selbst ein traditionell katholisches Land wie Irland anerkennt therapeutische Hoffnungen, die von der humanen embryonalen Stammzellforschung ausgehen, und diskutiert das Dilemma, das entsteht, wenn die diesbezügliche Forschung im Land verboten ist, Therapien aber im Ausland zur Verfügung stehen.

Die Bioethikkommission hat ihre Empfehlung zur Forschung an humanen embryonalen Stammzellen im März dieses Jahres abgegeben. Ob diese Empfehlung ihren Niederschlag im österreichischen Recht finden wird, ist derzeit noch nicht abzusehen.



*Dr. Christiane Druml*

*Vorsitzende der Bioethikkommission beim Bundeskanzleramt*