

Tumorthherapie

Tumorbesiedelnde Bakterien als Verbündete im Kampf gegen Krebs

KATHRIN WESTPHAL-DANIEL, SARA LESCHNER, SIEGFRIED WEIB
HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR INFEKTIONSFORSCHUNG (HZI), BRAUNSCHWEIG

Bakterien, die gezielt in festen Tumoren wachsen, stellen ideale Transporter für therapeutische Wirkstoffe dar. Die genetische Veränderung dieser Bakterien sollte sie zu hochwirksamen Verbündeten im Kampf gegen Krebs machen.

Bacteria that specifically target and proliferate in solid tumors represent ideal vehicles for anticancer therapeutics.

■ Bereits Anfang des 19. Jahrhunderts beobachtete Vautier, dass Krebspatienten mit Gasgangrän, also Infektionen durch *Clostridium perfringens*, häufig geheilt wurden^[1]. Mediziner begannen deshalb, lebende Bakterien einzusetzen, um Tumorpatienten von Krebs zu heilen. Die erste dokumentierte Behandlung eines Krebspatienten mit Bakterien führte 1868 der deutsche Arzt Wilhelm Busch durch. Er infizierte eine Patientin mit einem inoperablen Sarkom absichtlich mit *Streptococcus pyogenes*, indem er die Frau in das Bett eines an Wundrose leidenden Patienten legte^[2]. Tatsächlich erkrankte die Frau, und es

kam zu einer Tumorregression. Neun Tage später starb sie an den Folgen der Infektion. Trotz des fatalen Ausgangs konnte Busch zeigen, dass Bakterien feste Tumoren besiedeln und diese zum Schrumpfen bringen können.

In den folgenden Jahrzehnten versuchten verschiedene Ärzte, Bakterien oder deren Bestandteile für die Tumorthherapie einzusetzen. Das Coley-Toxin, eine Mischung aus inaktivierten *Streptococci* und *Serratia marcescens*, ist aus dieser Periode immer noch ein Begriff^[3]. Leider endete die Behandlung meist mit Sepsis, sodass diese Heilmethode in Vergessenheit geriet. Erst Ende der 1980er-Jahre flammte das Interesse an tumorbesiedelnden Bakterien wieder auf. Man hatte festgestellt, dass Bacillus Calmette-Guérin (BCG) – ursprünglich als Impfstoff gegen Tuberkulose entwickelt – in zwei Dritteln aller Fälle das Wiederauftreten von therapiertem Blasenkrebs verhindert. Seitdem wird BCG erfolgreich zur Behandlung von Blasenkrebs eingesetzt, obwohl der Wirkmechanismus noch weitgehend unklar ist^[4].

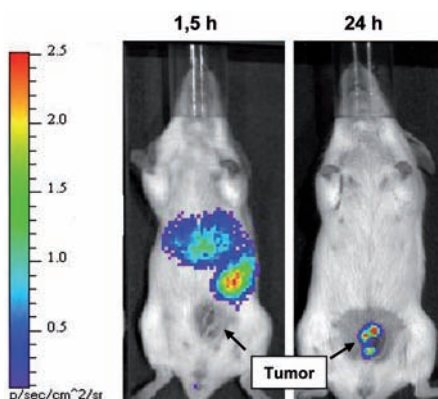
Bakterielle Tumorbesiedlung

Experimentell wird neben BCG heute eine Vielzahl weiterer Bakterien auf ihre Fähigkeit getestet, gezielt in solide Tumoren einzuwandern und sich dort zu vermehren. Ziel ist es, Bakterien zu finden, die sich möglichst ausschließlich im Tumorgewebe anreichern, im gesunden Gewebe dagegen nicht. Dies soll gewährleisten, dass die Belastung für den Organismus möglichst gering ausfällt.

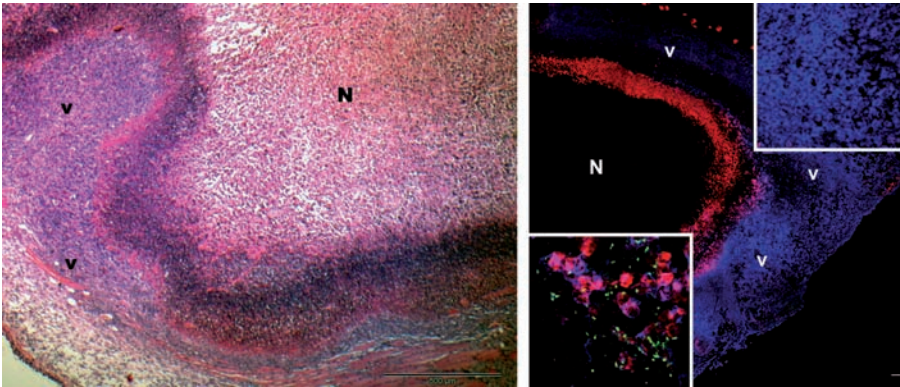
Bisher wurde der Großteil dieser Experimente mit obligat anaeroben Spezies der Gattung *Clostridium* und fakultativ anaeroben Spezies der Gattung *Salmonella* durchgeführt. Anaerob wachsende Bakterien bieten sich besonders für eine bakterienvermittelte Krebstherapie an. Da sich die Blutgefäße im Tumor sowohl strukturell als auch funktionell von normalen Blutgefäßen unterscheiden, kommt es zu einer ungleichmäßigen Blutversorgung des Geschwürs. Bestimmte Bereiche des Tumors werden nur schlecht oder gar nicht mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Diese hypoxischen Bereiche stellen ein Problem bei der Chemo- oder Radiotherapie dar, bieten aber optimale Wachstumsbedingungen für anaerobe Bakterien.

Clostridien werden im Tierversuch normalerweise als Sporen verabreicht und sind daher ungefährlich für den Organismus. Auf noch ungeklärtem Weg, wahrscheinlich über die vergleichsweise „löchrigen“ Blutgefäße im Tumor, gelangen die Sporen in das hypoxische Zentrum des Tumors. Dort gehen sie in die vegetative Form über, wachsen und vermehren sich. Da Clostridien obligat anaerob sind, wachsen sie tatsächlich nur im Tumor, in anderen Organen nicht. Ein großer Nachteil von Clostridien ist aber, dass sie aufgrund ihrer strikten Anpassung an sauerstofffreie Lebensräume nur das sauerstoffarme Tumorzentrum besiedeln^[5]. Dies hemmt zwar das Tumorstadium vorübergehend, doch der unbesiedelte Tumorrand wird von den Bakterien kaum beeinflusst und wächst unbegrenzt weiter.

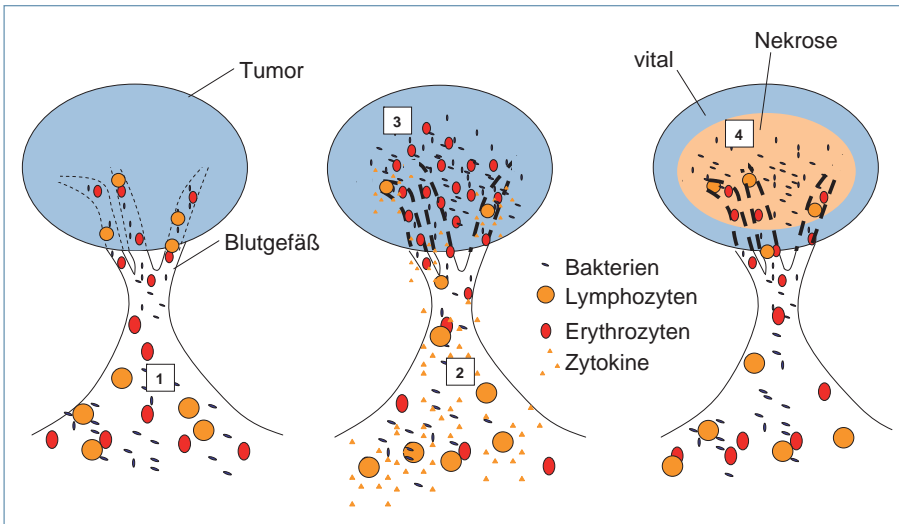
Im Gegensatz zu den strikt anaeroben Clostridien sind fakultativ anaerobe Salmonellen in der Lage, sowohl mit als auch ohne Sauerstoff zu wachsen. Sie reichern sich im Tierversuch bevorzugt in soliden Tumoren an. Anders als bei den Clostridien findet man Salmonellen nach der Infektion aber auch in anderen Geweben wieder (Abb. 1). Dadurch wird die bakterielle Belastung für das Tier größer. Fakultativ anaerobe Bakterien sind theoretisch in der Lage, den kompletten Tumor gleichmäßig zu besiedeln. In der Pra-



▲ **Abb. 1:** Lumineszenzmarkierte Salmonellen wurden einer tumortragenden Maus verabreicht. 1,5 h und 24 h nach der Infektion wurde die Maus im narkotisierten Zustand nicht-invasiven Biolumineszenzmessungen unterzogen. Der Ort der Lumineszenz korreliert mit dem Aufenthaltsort der Bakterien zum jeweiligen Zeitpunkt.



▲ **Abb. 2:** Hämatoxylin/Eosin-gefärbter Paraffinschnitt (links) und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbter Gefrierschnitt (rechts) durch einen mit Salmonellen infizierten Tumor drei Tage nach der Infektion. Der sauerstoffarme, abgestorbene (nekrotische) Bereich (N) ist von Salmonellen (grün) besiedelt, die in dem Einschub links unten im Gefrierschnitt bei stärkerer Vergrößerung neben den neutrophilen Granulozyten (rot) zu erkennen sind. Der vitale Bereich (v) des Tumors ist nicht besiedelt (siehe Einschub oben rechts). Dieser Bereich wächst trotz der Infektion weiter.



▲ **Abb. 3:** Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der bakteriellen Tumorbesiedlung. Durch die Infektion (1) setzen Blutzellen Zytokine (immunologische Botenstoffe) frei (2), die den Einstrom von Blut und Bakterien in den Tumor veranlassen (3). Eine Nekrose entsteht; die Bakterien vermehren sich in der Nekrose, der vitale Tumorrandschicht wächst ungehemmt weiter (4).

xis findet man aber auch Salmonellen fast ausschließlich im sauerstoffarmen Tumorzentrum^[6].

Auf der Suche nach der Ursache hierfür fanden wir heraus, dass die bakterielle Besiedlung von Tumoren zu einer starken Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in den Tumor führt (Abb. 2). Neutrophile Granulozyten sind Zellen des angeborenen Immunsystems und helfen unter anderem bei der Identifizierung und Zerstörung von Mikroorganismen. Diese Zellen bilden im Tumor eine Barriere um den mit Bakterien besiedelten, sauerstoffarmen Bereich und verhindern so die Ausbreitung der Bakterien in „gesundes“ Gewebe. Verhindert man die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten,

so können sich Salmonellen besser und gleichmäßiger im Tumor verteilen und führen dann häufig zu einem kompletten Rückgang des Tumors^[7].

Optimierung tumorbesiedelnder Bakterien

Da die alleinige Tumorbesiedlung durch Bakterien in der Regel nicht ausreicht, um den Tumor zu vernichten, ist es sinnvoll, Bakterien einzusetzen, die zusätzliche natürliche oder rekombinante Eigenschaften besitzen. Es wurden z. B. Sporen von *Clostridium novyi*-NT zusammen mit dem in Liposomen eingeschlossenen Chemotherapeutikum Doxorubicin verabreicht. Im Tumor sezernieren die keimenden Bakterien ein Enzym, das die

Liposomen öffnet, wodurch der Krebs gezielt abgetötet wird^[8]. Einen ähnlichen Effekt versucht man mit rekombinanten *Salmonella typhimurium* zu erzeugen. Dabei werden die Bakterien mit *prodrug-converting enzymes* ausgestattet, also mit Enzymen, die nicht giftige Vorstufen in Chemotherapeutika umwandeln. Ein Protobeispiel ist das ungiftige Fluorocytosin, das durch das Enzym Cytosindeaminase aus *Escherichia coli* in das Cytostatikum Fluorouracil umgewandelt wird. Da sich *S. typhimurium* im Tumor anreichert, beschränkt sich die Wirkung hauptsächlich auf dieses Gewebe, und gesunde Organe werden nur gering belastet^[9]. Alternativ werden derzeit auch Bakterien getestet, die Angiogenese-Inhibitoren oder Immunmodulatoren ausscheiden^[10, 11].

Trotz ihrer tumorspezifischen Anreicherung ist es bei genetisch manipulierten Bakterien zwingend notwendig, dass die Therapeutika nur im Tumor aktiv werden. Wir charakterisieren deshalb tumorspezifische Kontrollelemente von Salmonellen, die es gestatten, therapeutische Gene nur im Tumor zu exprimieren. Dadurch sollten auch fakultativ anaerobe Bakterien gezielt Tumoren angreifen können, ohne andere Organe zu belasten.

Die Etablierung neuer Bakterienstämme, die Erforschung des Mechanismus der bakteriellen Tumorbesiedlung und die Entwicklung neuer Kontrollsysteme können in Zukunft dazu führen, Bakterien alternativ zu oder in Kombination mit Chemo- oder Radiotherapie im Patienten zur Krebsbekämpfung einzusetzen. ■

Literatur

- [1] Barbe, S., Van Mellaert, L., Anne, J. (2006): The use of clostridial spores for cancer treatment. *J. Appl. Microbiol.* 101: 571–578.
- [2] Pawelek, J. M., Low, K. B., Bermudes, D. (2003): Bacteria as tumour-targeting vectors. *Lancet Oncol.* 4: 548–556.
- [3] Coley, W. B. (1991): The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 262: 3–11.
- [4] Meyer, J. P., Persad, R., Gillatt, D. A. (2002): Use of bacille Calmette-Guerin in superficial bladder cancer. *Postgrad. Med. J.* 78: 449–454.
- [5] Lambin, P., Theys, J., Landuyt, W., Rijken, P., van der Kogel, A., van der Schueren, E., Hodgkiss, R., Fowler, J., Nuyts, S., de Bruijn, E., Van Mellaert, L., Anne, J. (1998): Colonisation of *Clostridium* in the body is restricted to hypoxic and necrotic areas of tumours. *Anaerobe* 4: 183–188.
- [6] Forbes, N. S., Munn, L. L., Fukumura, D., Jain, R. K. (2003): Sparse initial entrapment of systemically injected *Salmonella typhimurium* leads to heterogeneous accumulation within tumors. *Cancer Res.* 63: 5188–5193.
- [7] Westphal, K., Leschner, S., Jablonska, J., Loessner, H., Weiss, S. (2008): Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils. *Cancer Res.* 68: 2952–2960.
- [8] Cheong, I., Huang, X., Bettegowda, C., Diaz, L. A. Jr., Kinzler, K. W., Zhou, S., Vogelstein, B. (2006): A bacterial protein enhances the release and efficacy of liposomal cancer drugs. *Science* 314: 1308–1311.

[9] Pawelek, J. M., Low, K. B., Bermudes, D. (1997): Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer Res.* 57: 4537–4544.

[10] Lee, C. H., Wu, C. L., Shiau, A. L. (2005): Systemic administration of attenuated *Salmonella choleraesuis* carrying thrombospondin-1 gene leads to tumor-specific transgene expression, delayed tumor growth and prolonged survival in the murine melanoma model. *Cancer Gene Ther.* 12: 175–184.

[11] Loeffler, M., Le'Negrate, G., Krajewska, M., Reed, J. C. (2008): *Salmonella typhimurium* engineered to produce CCL21 inhibit tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother.* DOI 10.1007/s00262-008-0555-9.

Korrespondenzadresse:

Dr. Kathrin Westphal-Daniel
Sara Leschner
Dr. Siegfried Weiß
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)
AG Molekulare Immunologie
Inhoffenstraße 7
D-38124 Braunschweig
Tel.: 0531-6181-5100
Fax: 0531-6181-5002
sle04@helmholtz-hzi.de
siw@helmholtz-hzi.de

AUTOREN



Sara Leschner, Kathrin Westphal-Daniel,
Siegfried Weiß (v. l. n. r.)

Kathrin Westphal-Daniel

Jahrgang 1979. 1998–2004 Studium der Biotechnologie an der TU Braunschweig. 2003–2007 Diplomarbeit und Promotion am HZI, Braunschweig, Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie.

Siegfried Weiß

Jahrgang 1949. 1970–1974 Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin. 1973–1974 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin. 1974–1978 Doktorarbeit am Basel Institut für Immunologie. Seit 1990 Arbeitsgruppenleiter Molekulare Immunologie, HZI, Braunschweig.

Sara Leschner

Jahrgang 1981. 2000–2005 Studium der Biologie an der Universität Stuttgart-Hohenheim. 2004–2008 Diplom- und Doktorarbeit am HZI, Braunschweig, Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie.