SITZUNGSBERICHTE DER LEIBNIZ-SOZIETÄT

Band 58 • Jahrgang 2003

trafo Verlag Berlin ISSN 0947-5850 ISBN 3-89626-429-X

Inhalt

01 Herbert Hörz: Kompetent, provokant und immer hellwach - Samuel Mitja Rapoport zum 90. –

02 Eberhard Hofmann: Samuel M. Rapoport wird 90

03 Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Samuel M. Rapoport Lebensdaten

04 Tom A. Rapoport: Rede zum 90. Geburtstag von Samuel Mitja Rapoport

05 Charles Coutelle: Möglichkeiten und Grenzen einer in utero Gentherapie genetisch bedingter Erkrankungen

06 André Rosenthal: Die Nutzung des Humangenoms in der Onkologie

07 Gisela Jacobasch: Antiinflammatorische und antikanzerogene Wirkungen von resistenten Stärken und Flavonoiden

08 Tankred Schewe: Enzymatische Lipidperoxidation durch 15-Lipoxygenase-1: Flavonoide als Mikronährstoffe und ihre Wechselwirkungen mit Lipoxygenasen

09 Schlußbemerkungen des Jubilars

Herbert Hörz

Kompetent, provokant und immer hellwach¹ – Samuel Mitja Rapoport zum 90. –

Liebe Mitglieder und Freunde der Leibniz-Sozietät, werte Gäste, verehrter Jubilar,

ich begrüße alle Teilnehmer an dieser Veranstaltung, ganz besonders die Angehörigen der Familie unseres Jubilars. Die Leibniz-Sozietät möchte mit dem Festkolloguium zu aktuellen Aspekten der modernen Biowissenschaften anlässlich seines 90. Geburtstags ihrem Ehrenpräsidenten für die umfangreiche Arbeit danken, die er in schwierigen Zeiten für unsere Wissenschaftsakademie geleistet hat. Als erster Präsident nach ihrer Umstrukturierung aus einer öffentlich-rechtlichen Einrichtung, deren Fortführung durch den Einigungsvertrag gesichert schien, in einen eingetragenen Verein, half er mit, den vom damaligen Berliner Senat geplanten Bruch der akademischen Tradition seit der 1700 begründeten Brandenburgischen Sozietät der Wissenschaften über die Preußische und die Deutsche bis zur Akademie der Wissenschaften der DDR zu verhindern. Mit seiner wissenschaftlichen Reputation, mit vielen neuen Ideen und mit Unterstützung der Vorstandsmitglieder gelang es in den fünf Jahren seiner Präsidentschaft, die Leibniz-Sozietät zu einer angesehenen Gelehrtenvereinigung zu machen. Wir waren und sind froh, dass er, nach seinem gesundheitlich bedingten Ausscheiden als Präsident, dem Präsidium weiter mit Rat und Tat zur Seite stand und steht. Seine Erfahrungen, Gedanken, Vorschläge und konstruktiv-kritischen Hinweise sind wichtiger Bestandteil der Präsidiumssitzungen. Er hilft mit, komplizierte Probleme zu lösen. Manche Initiative geht von ihm aus. Unser Wunsch zu seinem Geburtstag ist, auf seine weitere aktive Mitarbeit rechnen zu können.

Ich danke allen, die sich als Kolleginnen und Kollegen, Schüler und Freunde bereit erklärt haben, mit wissenschaftlichen Beiträgen zum Gelingen

Begrüßung zum Festkolloquium anläßlich des 90. Geburtstages des Ehrenpräsidenten der Leibniz-Sozietät Samuel Mitja Rapoport am 28.11.2002 in Berlin

6 Herbert Hörz

des Kolloquiums beizutragen. Es freut mich, dass Eberhard Hofmann die Laudatio für unseren Jubilar hält. Das Crisantemi-Quartett unterstreicht mit seiner musikalischen Umrahmung den festlichen Charakter des Kolloquiums. Gisela Jacobasch gebührt unser Dank für die umsichtige und aufwendige inhaltliche Vorbereitung des Kolloquiums, der auch die einschließt, die bei der Organisation halfen.

Bei so viel geballter Fachkompetenz zur Ehrung des Verehrungswürdigen bleibt mir die Möglichkeit, etwas zu dem zu sagen, was ein aufmerksamer Beobachter des langen Wirkens von Samuel Mitja Rapoport feststellen kann: Er ist kompetent, provokant und immer hellwach. Diesen Eindruck gewann ich bei meinen Begegnungen mit ihm an der Humboldt-Universität, als wir dort gemeinsam in verschiedenen Leitungsgremien saßen, an der Berliner Akademie in vielen Debatten, in der Zusammenarbeit als sein Nachfolger im Präsidium der Leibniz-Sozietät, und er wird mir immer von Neuem bestätigt.

Wenn ich von Kompetenz rede, dann maße ich mir nicht an, etwas zum Fachverständnis des Jubilars zu sagen. Ich bin kein Biochemiker und Mediziner. Doch als Wissenschaftsphilosoph weiß ich das Wirken von Mitja Rapoport zu den konstruktiven Beziehungen zwischen Biologie, Medizin und Philosophie zu schätzen. Schon am 1959 gegründeten Lehrstuhl Philosophische Probleme der Naturwissenschaften an der Humboldt-Universität waren sein fachkundiger Rat, seine Fragen an die Philosophen, seine Unterstützung junger Wissenschaftler und seine Betreuungsarbeit ein wichtiger Bestandteil des auf interdisziplinärer Zusammenarbeit basierenden Forschungs- und Lehrprogramms. Ich erinnere mich an umfangreiche Debatten zur Biologieprognose, zu den molekulargenetischen Grundlagen von Vererbungsprozessen und zur Rolle der Kybernetik, an denen mich die tiefgründigen Analysen vorliegender Konzeptionen, die Klarheit der eigenen Auffassungen, die Argumentationen zur Initiierung von Vorhaben und die Überlegungen zur weiteren Entwicklung der Wissenschaften faszinierten, ohne mit dem Urheber der Ideen und Vorschläge immer einverstanden zu sein. Manches erschien mir nur naturwissenschaftlich geprägt, einiges zwar als visionär und doch illusionär. Doch auf Rückfragen gab er durchdachte Antworten und mancher Widerspruch, der dann trotzdem blieb, war einfach so lange auszuhalten, bis die Wirklichkeit den einen oder anderen eines besseren belehrte. So habe ich unseren Jubilar auch in kritischen Situationen erlebt, als er unumwunden eingestand, problematische politische Einschätzungen mitgetragen zu haben, die unter neuen Bedingungen nicht mehr aufrecht zu erhalten waren. Kompetenz schützt ja nicht vor Irrtum. Sie wird dann erst fraglich, wenn Vorurteile gepflegt, neue Erkenntnisse nicht aufgenommen und veraltete Ansichten verteidigt werden. Das gilt für Mitja Rapoport nicht. Ich bemerke bei ihm weiterhin die einen echten Wissenschaftler auszeichnende Neugier auf Neues.

Unser Jubilar war und ist provokant im philosophischen Sinne. Durch Fragen, Anmerkungen und Einwürfe will er Nach- und Weiterdenken erreichen. Provokation ist dem Wortsinn nach eine absichtliche und planmäßige Herausforderung von Personen oder Gruppen. In der Wissenschaft ist sie ein Mittel, um die eigenen Auffassungen zu verteidigen, andere in Frage zu stellen, um so den Zugang zu neuen Erkenntnissen zu gewinnen. Schwächen in der Argumentation findet Mitia Rapoport schnell und deckt sie auf. Seine Streitlust war mir schon an der Universität bekannt. Man ging manchmal mit einem gewissen Bangen in die Debatten mit ihm, weil man seine Einwände nicht unbedingt vorhersehen konnte. Er war jedoch nicht festgelegt, bessere Argumente konnten ihn beeindrucken und man bekam dann Unterstützung, die man nicht erwartet hatte. Zwischenrufe von ihm in Versammlungen gab es oft. Er konnte einem auch ins Wort fallen. In den Prognosediskussionen an der Universität griff er mich als einen antiprognostischen Denker an, was ihn bei einem Philosophen besonders wundere. Mein Einwand zu einer vorgetragenen Entwicklungslinie mit vielen Konsequenzen bezog sich, wissenschaftshistorisch belegt, auf die Rolle des Zufalls mit dem Hinweis, das Risiko des Nichtgelingens mit zu berücksichtigen und Spielraum für neue Entwicklungen zu lassen. Das meinte der Prognoseverfasser schon berücksichtigt zu haben. Einwände wies er deshalb konsequent und scharf zurück. Ich hielt dagegen, dass ich meine Auffassung nicht als antiprognostisch, sondern als dialektisch ansah. Rede und Gegenrede gehören zum Streit, wenn er produktiv sein soll. Ich empfand es immer als einen intellektuellen Genuss, mit Mitja Rapoport zu streiten, denn seine Argumente waren und sind überlegenswert. Als es um eine effektivere Ausbildung ging, gab er Größen für Fachrichtungen vor, die für mich als Dekan der Fakultät, in der sich Fächer mit wenig Studenten häuften, wie Indologie und Ägyptologie, nicht einsichtig waren. Kompromisse wurden gefunden. Doch mit dem Alter wird man weiser, heißt es. Weisheit nimmt viel von der Unnachgiebigkeit der Jugend. Vier Jahre sitzen wir nun zusammen im Präsidium der Leibniz-Sozietät und es gab zwar unterschiedliche Auffassungen, doch keinen zugespitzten Streit.

Mancher hat sich schon durch die schläfrig anmutende Haltung, die Mitja Rapoport beim Zuhören meist einnimmt, täuschen lassen. Offensichtlich ist es ein Zeichen der Konzentration, denn die von ihm anschließend gestellten Fragen oder seine Bemerkungen zeigen, dass er immer hellwach ist. Es ist erstaunlich, mit welcher Klarheit er auf wesentliche Problemfelder in den Ausführungen eines Referenten aufmerksam macht. Er stellt Fragen zum Verständnis, deckt kritische Punkte in den Argumenten auf und verweist auch auf neue Forschungsrichtungen, die zu verfolgen wären.

8 Herbert Hörz

Ich wünsche mir, dass dem Jubilar die Darlegungen auf diesem Kolloquium große Freude bereiten und ihm zeigen, dass viele seiner Ideen weiter verfolgt werden. Für die Leibniz-Sozietät bleibt sein Rat unersetzlich. Wir brauchen ihn als erfahrenen und kompetenten Mitstreiter. Deshalb noch einmal vielen Dank an Samuel Mitja Rapoport für das bisher Geleistete, den wir mit der Bitte verbinden, uns auch weiter zu helfen.

Das Festkolloquium ist eröffnet.

Eberhard Hofmann

Samuel M. Rapoport wird 90

Laudatio

gehalten am 28. November 2002 in der Leibniz-Sozietät e.V.



Abb. 1: Samuel Mitja Rapoport

Gestern, am 27. November 2002, beging Samuel Mitja Rapoport, Nestor der Biochemie in der DDR und langjähriger Ordinarius für Biochemie an der Humboldt-Universität zu Berlin, seinen 90. Geburtstag. Mitja gehört zu den herausragenden Gelehrten des wiedervereinigten Deutschlands, er besitzt

große internationale Ausstrahlung und einen weitgespannten Wirkungsradius. Mit Mut und Konsequenz stellte er sich den Herausforderungen seines Jahrhunderts, welches ihm ein erfülltes Leben in der Wissenschaft und im Kreis seiner lieben Frau Ingeborg und seiner vier Kinder brachte, aber auch Bedrohung, Verfolgung, Demütigung und Verleumdung bereit hielt. Geboren in der galizischen Stadt Woloczysk an der russisch-österreichischen Grenze, sollte vor dem Juden und späteren Kommunisten ein ruheloses, mehrfach Zuflucht suchendes Leben liegen. Nach einer in Odessa verlebten Kindheit flüchtete seine Familie 1920 aus Sowjetrußland über Triest nach Wien. Dort studierte Mitja Rapoport Medizin (Dr. med. 1936), schloß sich der sozialistischen Arbeiterjugend an und trat – es war die Zeit des immer bedrohlicher werdenden Faschismus – mit 19 Jahren der Sozialdemokratischen und später der Kommunistischen Partei Österreichs bei. 1934 kämpfte er im Februaraufstand der Arbeiter auf der Seite des sozialistischen Schutzbundes gegen die rechtsradikalen Heimwehren.

Seine ersten wissenschaftlichen Arbeiten im Wiener Medizinisch-chemischen Institut hatten neben analytischen Fragestellungen, z.B. eine Mikroacetylbestimmung (1932) als seine erste wissenschaftliche Arbeit überhaupt, den Stoffwechsel der Phosphorglyzerinsäuren in Hefe und Erythrocyten und die fiebererzeugenden und proteinabbauenden Wirkungen von 2,4-Dinitrophenol zum Gegenstand. Sein Lehrer Otto von Fürth, der ihm die vergleichende Methode als Mittel der Erkenntnisgewinnung in der Biologie nahebrachte, die Mitja auch uns, seinen Schülern prägend vermittelte, befürchtete, daß der junge Rapoport in Wien unter den herrschenden politischen Zuständen keine Zukunft haben würde und war erleichtert, als dieser ein einjähriges Forschungs-stipendium in den USA an der Children's Hospital Research Foundation in Cincinnati erhielt. Als Hitler 1938 in Österreich einmarschierte und den "Anschluß" Österreichs an das Deutsche Reich proklamierte, entschloß sich Mitja Rapoport, in den USA zu bleiben. Er wurde voll naturalisierter amerikanischer Staatsbürger. Mitja Rapoport liebt sein Heimatland Österreich sehr, das spürt man auf Schritt und Tritt, doch hat er auch ein warmes Verhältnis zu den USA, dem Land, das ihm in der Nacht des Faschismus Rettung und Zuflucht gewährte und reichhaltige Forschungstätigkeit bot. Nach den Bekundungen beider Rapoports hätten sie ohne McCarthy's "Committee on Unamerican Activities" die USA niemals wieder verlassen.

In Cincinnati arbeitete er über die säurelöslichen Phosphate der roten Blutkörperchen und über pathologische Veränderungen des Erythrocytenstoffwechsels. 1939 erwarb er den PhD. Während des 2. Weltkrieges erforschte er die biochemischen Kriterien zur Verlängerung der Haltbarkeit von

konserviertem Blut. Er erkannte die Beziehungen zwischen der Zusammensetzung der Konservierungsmedien, den Veränderungen des ATP- und 2.3-Bisphosphoglyceratspiegels in den Erythrocyten während der Konservierung und deren Überlebensfähigkeit im Empfänger. Für diese Arbeiten wurde ihm vom US-Präsidenten Harry S. Truman nach dem Krieg das "Certificate of Merit" verliehen. Danach entdeckte Mitja Rapoport, gemeinsam mit seiner technischen Assistentin Jane Luebering, die 2,3-Bisphosphoglyceratmutase und 2,3-Bisphosphoglyceratphosphatase, die, zusammen mit der Phosphoglyceratkinase, in Erythrocyten einen für den Gesamtorganismus bedeutungsvollen autoregulatorischen Zyklus, den "Rapoport-Luebering-Zyklus" bilden. Weitere Arbeiten waren dem Ca²⁺-Stoffwechsel und der osmotischen Diurese gewidmet. In Japan erforschte er 1947 als Mitglied einer dreiköpfigen amerikanischen Delegation die Kinderkrankheit Ekiri, die jährlich Tausende Todesopfer forderte. Die Gruppe erkannte rasch, daß der Erkrankung ein Ca²⁺-Mangel zugrunde liegt und entwickelte Verfahren, wie man die Kinder mit intravenösen Ca²⁺-Injektionen vor den tödlichen Krämpfen retten kann. Damals begründete Rapoport eine lebenslange Freundschaft mit dem japanischen Biochemiker Haruhisa Yoshikawa, der später oft an den regelmäßig aller vier Jahre von Mitja Rapoport und Fritz Jung durchgeführten "Internationalen Berliner Symposien über die Struktur und Funktion der roten Blutkörperchen" teilnahm.

1974 veröffentlichten Rapoport und Yoshikawa in Baltimore die Monographie "Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes".

Doch die Politik ließ Rapoport auch in Amerika nicht los. Er trat der Kommunistischen Partei der USA bei und war politisch aktiv. Die Presse legte den Rapoports eine subversive Tätigkeit zur Last und Anfang 1950 zeichnete sich ab, daß sie vor das Mc Carthy-Committee geladen werden sollten. In Zürich erhielt er anlässlich seiner und Inges Teilnahme an einem Internationalen Pädiatriekongreß ein diesbezügliches Telegramm. Er entschloß sich, nicht in die USA zurückzukehren. Ein Stellenangebot des Weizmann-Instituts in Rehovot (Israel) schlug er als Nicht-Zionist aus, stattdessen bemühte er sich in Wien um eine Stelle, jedoch – infolge amerikanischer Intervention – erfolglos. Da er "Westemigrant" war, wurde auch seine Bewerbung um eine Anstellung in der Sowjetunion abgelehnt. So standen die Rapoports, Inge hochschwanger und mit drei kleinen Kindern, zwischen zwei feindlichen Welten und suchten erneut Zuflucht. Schließlich wurde ihm, nach dem Wechsel Karl Lohmanns im Jahre 1951 von der Humboldt-Universität nach Berlin-Buch, im Februar 1952 die vakante Professur für Physiologische Chemie und das Direktorat für das gleichnamige Institut an der Medizinischen Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität angeboten. Für die Rapoports wurde die

DDR so zu einem Land, das ihnen Aufnahme, politisches Asyl und berufliche Erfüllung bot.



Abb. 2: In der Vorlesung, 1956

Das Physiologisch-chemische Institut in der Invalidenstraße 103a war damals in einem desolaten personellen, baulichen und apparativen Zustand, doch es standen mehr als 300 Studenten vor der Tür, die neugierig darauf warteten, Vorlesungen bei dem neu angekommenen amerikanischen Professor zu hören. Und dieser Professor schöpfte aus dem Vollen und seine Vorlesungen sprühten vor Geist. Man konnte bei jedem Wort seine Liebe zu den Studenten spüren. Sein österreichischer Dialekt mit amerikanischem Akzent brachte Farbe in das Leben seiner Studenten und der jungen Biochemieadepten, die sich zunehmend um ihn scharten und zu denen auch ich gehörte.

Als mehrjähriger Vorlesungsassistent, der auch Versuche für die große Vorlesung vorzubereiten hatte (eine Experimentalvorlesung in Biochemie gibt es schon lange nicht mehr), glaube ich, das große Vertrauen, das Mitja in seine Studenten setzte und die Verpflichtung, die er der jungen akademischen Generation gegenüber verspürte, richtig einschätzen zu können. Mitja war ein begeisterter und gerade deshalb auch für die studentische Jugend ein begeisternder akademischer Lehrer.

In vielen Institutskonferenzen und Einzelgesprächen legte er seine Forschungspläne dar und diskutierte sie ausgiebig mit uns. Er besuchte uns täglich am Arbeitsplatz, ging anhand hartgebundener Protokollbücher – darauf legte er großen Wert, fliegende Protokollblätter waren verpönt – die Versuchsergebnisse durch, und wir hatten, ob es uns gefiel oder nicht, Rede und Antwort zum nächsten Experiment zu stehen. Immerhin, so erzog er uns zu einer wohlüberlegten und gezielten, zeit- und materialsparenden Experimentierstrategie. Dieser sehr direkte Ideenaustausch führte dazu, daß der zur damaligen Zeit noch übliche Abstand zwischen Professor und Assistent zusammenschmolz und sich rasch ein gegenseitiges Vertrauen entwickelte. Uns faszinierte seine überaus schnelle Reaktionsfähigkeit, seine Freude an geistiger Auseinandersetzung, seine Gabe, rasch das Wesentliche zu erfassen und die Schwachpunkte eines Experimentes oder einer Gedankenführung sofort zu erkennen. Dies machte ihn zu einem zwar nicht immer bequemen, jedoch hervorragenden Lehrer.

Rapoport führte bereits 1953 die regelmäßige Seminartätigkeit für alle Medizinstudenten im Fach Biochemie ein. Hierzu wurde mit dem Anstieg der Studentenzahlen auf etwa 1000 pro Jahr der akademische Mittelbau kräftig ausgebaut. Jeder Assistent hatte zwei bis drei Seminargruppen mit je 20-25 Studenten in einem wöchentlich zweistündigen Seminar und sechsstündigen Praktikum zu betreuen. Den Ernst, mit dem er seine Verantwortung als Hochschullehrer wahrnahm, erwartete er auch von uns. In den wöchentlichen Assistentenversammlungen erläuterte er die Schwerpunkte der Vorlesung, und wir legten gemeinsam die Seminarinhalte fest. Er verband konsequent biochemische Inhalte mit klinischen Fragestellungen und machte die Studenten, einen inhaltlichen Gegensatz zur damaligen Physiologie und klinischen Medizin nicht scheuend, mit modernen Denk- und Arbeitskonzepten vertraut. Seine Schüler konnten von ihm lernen, wie man Studenten zu gründlichem wissenschaftlichem Denken erzieht, wie man als akademischer Lehrer Akzente setzt und den Studenten bleibende Orientierungen für ihre spätere ärztliche Tätigkeit gibt, die sie in ihrem Leben nie wieder vergessen. Ich erinnere mich, als hätte ich sie gestern gehört, an seine nachhaltigen Vorlesungen über Ernährungsbilanzen und Proteinstoffwechsel in Verbindung mit dem Hunger in Welt, über den Säure-Basen- und den Flüssigkeitshaushalt sowie eine gezielte und quantitativ begründete Flüssigkeitstherapie. Seine Vorlesungen über Leonor Michaelis, Peter Rona und Rudolf Schönheimer waren für einen jungen Biochemiker Sternstunden seiner Ausbildung. Mitja machte mich damals auf das Buch von Rudolf Schönheimer aufmerksam "The dynamic state of body constituents", welches in mir einen tiefen Eindruck hinterließ. So etwas vergißt man nicht, ebenso nicht die Warmherzigkeit eines Wiedersehens von Mitja Mitte der 50er Jahre in Mosbach, bei dem ich zugegen war, mit seinem älteren Wiener Freund Zacharias Dische, einem Altmeister der klassischen biochemischen Analytik.

Mitja Rapoport ist Autor des zu seiner Zeit in Ost- und in Westdeutschland sehr geschätzten und verbreiteten, Maßstäbe setzenden Lehrbuches "Medizinische Biochemie" (9. Auflage 1987). Er verfaßte gemeinsam mit Hans-Joachim Raderecht das "Physiologisch-Chemische Praktikum unter Berücksichtigung Biochemischer Arbeitsmethoden und Klinisch-Chemischer Gesichtspunkte" (8. Auflage 1984).



Abb. 3: Erythrozytensymposium, gemeinsam mit Gisela Jacobasch, Anfang der siebziger Jahre

Die wissenschaftlichen Themen in Berlin knüpften an Rapoports bevorzugten Forschungsobjekten, den Erythrozyten und ihren Vorläuferzellen, den Retikulozyten, an. Im Mittelpunkt standen die Regulation der Glykolyse und die Differenzierung und Reifung des erythroiden Systems, insbesondere der mit dem Abbau der Mitochondrien einhergehende Übergang vom Retikulozyten zum Erythrozyten. Gemeinsam mit Reinhart Heinrich, Tom Rapoport und Gisela Jacobasch entwickelte er 1974 ein quantitatives Modell der Regulation der Erythrocytenglycolyse, das zur Grundlage einer allgemeinen Kontrollthe-

orie des Stoffwechsels wurde. Mit Tankred Schewe entdeckte er die Schlüsselrolle der 15-Lipoxygenase beim programmierten Abbau Mitochondrien im Verlauf der terminalen Differenzierung des erythroiden Systems. Diese Arbeiten fanden durch Antje Ostareck-Lederer eine schöne Abrundung. In ihrer Diplom- und Doktorarbeit, die sie unter Betreuung seiner beiden Schüler Schewe und Thiele durchführte, fand sie, daß nicht primär das Enzym 15-Lipoxygenase reguliert wird, sondern die Translation ihrer mRNA. Während eines dreijährigen, von der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina an sie vergebenen Förderstipendiums konnte sie an der University of Washington in Seattle und am European Molecular Biology Laboratory in Heidelberg diese Beziehungen auf molekularer Ebene aufklären und ihre Ergebnisse kürzlich in fünf bedeutenden Arbeiten in erstklassigen Zeitschriften publizieren. Ich glaube, daß Dir, lieber Mitja, damit Deine jüngste Enkelschülerin Antje zu Deinem 90. Geburtstag ein schönes Geschenk machen konnte, gehören doch die Arbeiten über die Reifung des erythroiden Systems zu den Hauptthemen Deines Institutes seit 1952. 1986 erschien in den USA Mitjas Monographie "The Reticulocyte".

Mitja Rapoport verwirklichte das Humboldtsche Ideal von der Einheit von Forschung und Lehre. Darin sollte er der heutigen Generation junger Universitätsprofessoren ein nacheifernswertes Vorbild sein. Er publizierte 666 Arbeiten, die erste 1932 (diese erwähnte ich schon), die bisher letzte 1996. Seine wissenschaftlichen Leistungen wurden durch die Verleihung mehrerer Ehrendoktorate, Akademiemitgliedschaften und staatlicher Auszeichnungen gewürdigt. Sein Name ist untrennbar verbunden mit der Reform des naturwissenschaftlichen Unterrichtes in den allgemeinbildenden Schulen und mit der Reform des Medizinstudiums in der DDR. Beide Aktivitäten trugen nachhaltig zum international guten Ruf des Bildungssystems der DDR bei. Das hohe wissenschaftlich-theoretische und praktische Niveau der Ausund Weiterbildung der Ärzte wurde bei der Wiedervereinigung einfach ignoriert, stattdessen wurde Ostdeutschland das damals bereits obsolete und der öffentlichen Kritik unterworfene westdeutsche System der Ausbildung junger Ärzte stümperhaft übergestülpt.

Eine besondere Würdigung verdient der Einfluß Mitja Rapoports auf das wissenschaftliche Leben in der DDR. Sein Wirken war auf vielen Ebenen zu spüren, ich möchte an dieser Stelle seine Bedeutung für die wissenschaftlichen Gesellschaften herausstellen. Er war, als Nachfolger Karl Lohmanns, nahezu zehn Jahre Präsident der "Gesellschaft für Experimentelle Medizin der DDR" und von 1971 bis 1979 Vorsitzender der Biochemischen Gesellschaft der DDR, zu deren Gründungsmitgliedern er gehörte. Er trug wesent-

lich zur Entwicklung eines reichhaltigen wissenschaftlichen Lebens dieser Gesellschaft bei, die durch ihre Mitwirkung bei der Reform des Medizinstudiums und der Weiterbildung der Fachärzte für Biochemie sowie der postgradualen Ausbildung von Naturwissenschaftlern zu einem unersetzlichen Forum für die Entwicklung der Biochemie und Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses wurde.



Abb. 4: Karl Lohmann und Samuel M. Rapoport, Anfang der siebziger Jahre

Mitja unternahm, zusammen mit Karl Lohmann und Horst Frunder, vielfältige Initiativen zur Aufnahme der Biochemischen Gesellschaft in die 1964 gegründete Föderation Europäischer Biochemischer Gesellschaften (FEBS) und in die seit 1949 bestehende Internationale Union für Biochemie und Molekularbiologie (IUBM). Die Aufnahme gestaltete sich unterschiedlich schwierig, in die FEBS vollzog sie sich problemlos. Wesentlich schwieriger hingegen erwies sich die Aufnahme der Biochemischen Gesellschaft der DDR in die IUBM, da diese ein Zusammenschluß von Staaten und die DDR noch nicht von den westlichen Staaten anerkannt war. Die Gesellschaft für Biochemie der Bundesrepublik Deutschland war zu diesem Zeitpunkt bereits Mitglied. Aufgrund des Verhandlungsgeschicks von Mitja Rapoport und Horst Frunder, aber auch durch das freundschaftliche Entgegenkommen des damaligen IUB-Präsidenten Severo Ochoa, wurde die Biochemische Gesell-

schaft der DDR 1967 in Tokyo in die IUB aufgenommen. Die Aufnahme unserer Gesellschaft wurde durch eine entscheidende Änderung im IUB-Statut auf Vorschlag von Severo Ochoa möglich. Diese bestand in einem Austausch der Bezeichnung "national committee" durch "scientific community".

Mitja Rapoport bekleidete in den beiden internationalen Gesellschaften zahlreiche Funktionen. Erwähnen möchte ich nur, daß er dem FEBS-Kongreß 1978 in Dresden als Präsident vorstand und danach der FEBS zwei Jahre als Chairman diente. Im gleichen Jahr erfolgte seine Emeritierung.

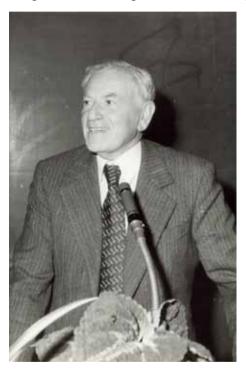


Abb. 5: Emeritierung 1978

Zwei Komplexe, die von großer Bedeutung für das Leben und die Gesundheit der Menschen in der DDR waren, verdienen eine besondere Erwähnung. Es sind dies seine nachhaltigen Initiativen um die Entwicklung des Gesundheitswesens und um die Vertiefung und Intensivierung der klinischen Forschung in der DDR. Bereits Ende der 50er Jahre hat sich Mitja, gemeinsam mit Kol-

legen, um die Entwicklung einer modernen industriellen Plasmafraktionierung und Impfstoffproduktion in der DDR große Verdienste erworben. Diese RGW-weite Aufgabe führte zur industriellen Produktion von Antitetanusund Antitollwutserum sowie zur jährlichen Produktion von 20 000 Liter Infusionsalbumin und 1000 Liter Human-γ-Globulin. Der iährliche Umsatz an Plasmaderivaten, die im Forschungsinstitut für Impfstoffe in Dessau produziert wurden, betrug 250 Millionen Mark. Als Vorsitzender der Gruppe Biologie im Forschungsrat und als Mitglied des Rates für Medizinische Forschung brachte er über Jahrzehnte den Schatz seiner Erfahrungen und Kenntnisse in die Entwicklung umfassender nationaler Forschungsprojekte auf dem Gebiet der Biowissenschaften und klinischer Forschungsvorhaben ein. Halbe Sachen oder Oberflächlichkeiten waren ihm stets fremd und er scheute sich nicht davor, diese ohne Ansehen der Person beim Namen zu nennen. Und das geschah nicht selten. Doch Mitja Rapoport hat Auseinandersetzungen stets offen geführt, meist lenkte er bald auch wieder ein. In vielen Fällen hat er sich schützend vor Kollegen und Mitarbeiter gestellt. Neutral war er nicht, sondern trat stets, auch kritisch, für die zu seiner Wahlheimat gewordene DDR ein, die für ihn die einzige Alternative zu dem Deutschland war, das die Welt in zwei Kriege gestürzt und Millionen Angehörige seines Volkes ermordet hatte. Ich glaube, er ahnte den Zusammenbruch der DDR und als er dann kam, empfand er darüber großen Schmerz.

Mitja Rapoport meistert sein hohes Alter gemeinsam mit seiner Frau Ingeborg, deren Verdienste als Begründerin der Neonatologie in der DDR und Nestorin der Neonatologie in Deutschland vor wenigen Wochen von der Charité und den deutschen Kinderärzten aus Anlaß ihres ebenfalls 90. Geburtstages warmherzig gewürdigt wurden. Inge ist mit großer Liebe an seiner Seite, bewundert seine Stärken und toleriert seine Schwächen. Die Rapoports sind sehr stolz auf ihre Töchter Susan und Lisa, und ihre Söhne Tom und Michael sowie auf ihre neun Enkelkinder. Sie gehören zum Reichtum ihres Lebens. Wir wünschen Inge und Mitja von ganzem Herzen alles Gute sowie noch viele schöne gemeinsame Jahre.

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Samuel M. Rapoport – Lebensdaten

- Geboren am 27. November 1912 in der galizischen Stadt Woloczsyk in einer j\u00fcdischen Familie; Kindheit in Odessa
- 1920 Flucht seiner Familie aus Odessa über Triest nach Wien
- 1930 bis 1936 Medizinstudium in Wien
- 1931 Mitglied der Sozialdemokratischen Partei Österreichs
- Erste wissenschaftliche Arbeit: Mikromethode für die Acetylbestimmung; A. Friedrich und S. Rapoport, Biochem. Z. (1932), Bd. 251, S. 432-446
- 1934 Beteiligung am Februaraufstand der Arbeiterorganisation auf der Seite des sozialistischen Schutzbundes gegen die rechtsradikalen Heimwehren; Mitglied der Kommunistischen Partei Österreichs
- 1936 Promotion zum Dr. med.
- 1937 Forschungsstipendium in den USA an der Children's Hospital Research Foundation in Cincinnati (Ohio); da Österreich von Deutschland
 1938 okkupiert wurde, entschloß sich Rapoport, in den USA zu bleiben und wurde voll naturalisierter amerikanischer Staatsbürger
- 1939 Promotion zum Philosophical Doctor (Chemie)
- im 2. Weltkrieg Arbeiten zur Verlängerung der Aufbewahrungszeit von konserviertem Blut; nach dem Krieg Auszeichnung durch US-Präsident Harry S. Truman mit dem "Certificate of Merit"
- Mitglied der Kommunistischen Partei der USA
- 1946 heiratet er die aus Nazideutschland geflüchtete Kinderärztin Dr. med. Ingeborg Syllm; aus dieser Ehe sind vier Kinder – Tom, Michael, Susan und Lisa – hervorgegangen
- 1947 Forschungsaufenthalt in Japan: Nachweis, daß die Kinderkrankheit

- Ekiri, die jährlich Tausende Todesopfer forderte, auf einem Kalziummangel beruht
- 1950: anlässlich eines Kinderärztekongresses 1950 in Zürich, an dem er und seine Frau teilnahmen, erhielt Mitja Rapoport telegraphisch die Aufforderung, vor dem McCarthy-Tribunal on Unamerican Activities zu erscheinen; er entschließt sich, dieser Aufforderung nicht zu folgen und bleibt in Europa; seine hochschwangere Frau holt ihre drei Kinder aus den USA nach Europa
- 1952 fanden Mitja und Inge Rapoport Zuflucht in der DDR, die ihnen politisches Asyl gewährte; er wurde zum Professor für Physiologische Chemie an der Medizinischen Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität berufen und zum Direktor des gleichnamigen Institutes ernannt; Emeritierung 1978
- 1971–79 Vorsitzender der Biochemischen Gesellschaft der DDR; 1978 Präsident des Kongresses der Föderation Europäischer Biochemischer Gesellschaften in Dresden; 1978–1986/87 Präsident der Gesellschaft für Experimentelle Medizin der DDR
- Mitglied zahlreicher in- und ausländischer wissenschaftlicher Akademien; mehrere Ehrendoktorate; viele Auszeichnungen; Ehrenmitglied der Biochemischen Gesellschaften der DDR und der UdSSR; Herausgeber bzw. Mitherausgeber zahlreicher internationaler und nationaler wissenschaftlicher Zeitschriften; Autor bzw. Mitautor von 666 wissenschaftlichen Arbeiten, Autor des sowohl in Ostdeutschland als auch in Westdeutschland weitverbreiteten Lehrbuches "Medizinische Biochemie" (9. Auflage 1987); Mitautor zahlreicher weiterer Bücher und Monographien; seine bisher letzte wissenschaftliche Arbeit ist:

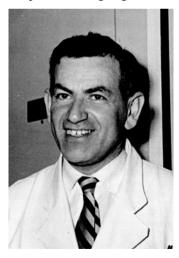
Oxygenation of biomembranes by mammalian lipoxygenases: the role of ubiquinone; Schnurr, Kerstin, Hellwing, Martina, Seidemann, Britta, Jungblut, Peter, Kuehn, Hartmut, Rapoport, Samuel M. und Schewe, Tankred; Free Radical Biology & Medicine (1996), Band 20(1), S. 11-21

Tom A. Rapoport

Rede zum 90. Geburtstag von Samuel Mitja Rapoport

Lieber Daddy, liebe Freunde, meine sehr verehrten Damen und Herren!

Eigentlich habe ich einen wissenschaftlichen Vortrag angekündigt, aber dann habe ich mir gedacht, dass man vom Sohn des Jubilars wohl doch einen mehr persönlichen Vortrag erwartet. Es ist sicher eine ziemlich ungewöhnliche Situation, dass Vater und Sohn gleichzeitig Mitglieder der Akademie waren und jetzt der Leibniz-Sozietät sind, und es ist sicher noch seltener, dass beide dasselbe Gebiet, in diesem Falle die Biochemie, vertreten. Aber es könnte erstmalig sein, dass der Sohn eine Rede zum 90. Geburtstag des Vaters hält. Ich bin mir also der historischen Tragweite dieses Ereignisses bewusst und bin entsprechend aufgeregt.



Mein Vater hat zweifellos auf vielen Gebieten Nachhaltiges geleistet, sei es als Wissenschaftler, als politisch engagierter Mensch, oder als Präsident dieser Sozietät. Andere sind besser berufen, diese Aspekte zu würdigen, und ich möchte mich daher hier nur auf seine Rolle als Lehrer konzentrieren. Bis auf André sind alle heutigen Redner Schüler von ihm, und das schließt mich in besonderem Maße ein. Ich habe von ihm eine ganze Menge mitbekommen. Zum ersten wohl einige Gene. Aber was ich allen besonders voraus habe, ist das Privileg, von ihm direkt wissenschaftlich erzogen worden zu sein, und darüber will ich heute vor allem sprechen.

Als mein Vater 1952 in die DDR kam (das

nebenstehende Bild zeigt ihn ungefähr zu dieser Zeit), da hatte er die deutsche Sprache fast verlernt, bekam von der Universität ein verwahrlostes Gebäude

als Institut zugewiesen, fand Mitarbeiter vor, die von Wissenschaft kaum Ahnung hatten, es gab weder Studenten, noch Chemikalien, noch Geräte. Das erste Photometer kaufte er mit Mitteln aus eigener Tasche im Westen.



Als ich 1969 zur Doktorarbeit in das von ihm geleitete Institut kam, gab es ungefähr 80 Mitarbeiter, untergliedert in mehrere Untergruppen, und es wurden im Jahr 600 Medizinstudenten ausgebildet (das obige Bild zeigt die Mitarbeiter des Instituts).



Es wurden regelmäßig internationale Erythrozytensymposien von meinem Vater mit Unterstützung durch seinen Freund, unser leider verstorbenes Akademiemitglied Fritz Jung (siehe Bild) organisiert, und vor allem gab es eine an internationalen Maßstäben orientierte Forschung. In den 17 Jahren bis zu meinem Beitritt ins Institut war Erstaunliches geleistet worden.

Mit dem Beginn meiner Doktorarbeit begann auch meine wissenschaftliche Lehre bei meinem Vater. Ich will hier die Lehrsätze, die er unausgesprochen verfolgte, frei wiedergeben.

Lehren meines Vaters (nicht befolgbar)

Erster Lehrsatz: Sei streitbar!

Mein Vater war und ist ein Kämpfer. Er ist ein Diskussionspartner, der stets scharf seine Meinung vertritt, aggressiv argumentiert, und eigentlich niemals nachgibt. Bei uns am Familientisch flogen oft die Funken, insbesondere mit meinem Bruder, wenn es um politische Dinge ging, aber mein Vater nahm uns immer für voll, vielleicht sogar zu voll. Da wurde jedes unserer Argumente zur Konsequenz entwickelt und dann für unsinnig erklärt. Er ärgerte sich ständig darüber, dass wir diskutierten, ohne etwas über den Gegenstand gelesen zu haben, aber es war natürlich unmöglich, ihn mit Wissen zu schlagen. Auch in wissenschaftlichen Diskussionen war er unnachgiebig, wenn er einen Schwachpunkt in der Präsentation eines Redners gefunden hatte. Er war ein gefürchteter Anwesender bei wissenschaftlichen Seminaren oder Symposien, der nur Unwissende durch sein scheinbares Schlafen in Sicherheit wiegen konnte.

Ich bin eigentlich in dieser Hinsicht durchaus anders als er, aber die wissenschaftliche Streitkunst habe ich von ihm gelernt. Die Schlüsselepisode, bei der er mich zum Streiten aufforderte, war mein erstes wissenschaftliches Meeting in Reinhardsbrunn, eine Gemeinschaftstagung der Biochemischen Gesellschaften der DDR und UdSSR. Unsere russische Konkurrentin hielt einen Vortrag und präsentierte unpublizierte Resultate, die den unsrigen, ebenfalls noch unpublizierten, diametral entgegenstanden. Während des Vortrags kam mein Vater, der standesgemäß in der ersten Reihe saß, nach hinten, wo ich standesgemäß saß, und forderte mich auf, in der Diskussion etwas zu sagen. Ich wehrte mich, und mein Vater wurde lauter, sodass die daneben Sitzenden es mithören konnten. Das wurde mir peinlich, ich gab nach, und so habe ich meinen ersten wissenschaftlichen Streit, unter Druck und Protest, dazu noch aus dem Stehgreif und auf Englisch, geführt.

Zweiter Lehrsatz: Sei ungeduldig!

Mein Vater hat keine Geduld. Das ist eine gute Eigenschaft. Sie bedeutet, dass man mit der Geschwindigkeit des Fortschritts nicht zufrieden ist, dass man ständig die höchsten Anforderungen an seine Mitarbeiter stellt. Mein Vater war immer sehr fordernd. Er ist sehr schnell im Denken und konnte es nicht ertragen, wenn andere nicht folgen konnten. Er konnte dann sehr unwirsch werden. Die gute Seite der Ungeduld war, dass das gesamte Institut

ständig nach Neuem suchte, dass sich niemand auf Lorbeeren ausruhen konnte.

Diese Eigenschaft habe ich in hohem Maße von ihm übernommen. Meine Mitarbeiter beschweren sich oft darüber, dass ich zu ungeduldig bin. Und meine Frau hat nur einmal mit mir für zwei Stunden zusammengearbeitet – dann wurde es ihr zu viel, dass ich alle fünf Minuten nach den Resultaten fragte. Zum Glück sind meine Studenten weniger aufsässig als meine Frau.

Dritter Lehrsatz: Kritisiere (und akzeptiere Kritik)!

Mein Vater ist zwar nicht so gut im Kritik-Akzeptieren, dafür hat er besonderes Talent im Kritik-Austeilen, unumwunden und brutal. Und doch konstruktiv und hilfreich, wenn man sich über die anfänglichen harten Worte hinübergerettet hat. Ich ging hier durch eine Schule, die ich nicht missen wollte. Die meiste Kritik steckte ich regelmäßig mit meinen Publikationsentwürfen ein. Seine erste Frage war: Warum willst Du das eigentlich publizieren? Der nächste Satz: Das Ganze ist total unverständlich! Dann ging es ins Detail – und da blieb kein Satz unberührt –, seine unleserliche Krickelkrakel-Schrift war überall, zwischen den Zeilen und am Rand – es sah regelmäßig deprimierend aus! Am Ende, nach Stunden der Kritik, sagte er dann: Es ist schon ganz gut, es sind ja nur ein paar kleine Änderungen zu machen! Bis vor sieben Jahren steht für seine kritische Durchsicht des Manuskriptes in jeder meiner Publikationen eine Danksagung an ihn, und die war ehrlich gemeint.

Mein Vater hat ein besonderes Talent zum Schreiben – kurz und prägnant, einfach und ohne Schnörkel. Wenn ich heute vermutlich besser als die meisten Amerikaner schreibe, so ist das ausschließlich auf seine harte Schule zurückzuführen. Und noch etwas, was ich von ihm gelernt habe: Kritik zu ertragen, sei sie noch so hart. Ich habe es immer wieder erlebt, dass meine Mitarbeiter ärgerlich oder beleidigt sind, wenn ein kritischer Leser oder Gutachter Kritik an ihrem Manuskript übt. Immer wieder versuche ich die erlernte Botschaft zu übermitteln, dass Kritik nur hilfreich sein kann, dass es ein Glück ist, wenn man sie offen hört, und dass man froh sein soll, wenn man sie vor dem Erscheinen der Publikation bekommt!

Vierter Lehrsatz: Sei Optimist!

Mein Vater ist ein unverbesserlicher Optimist! Ich wünschte, ich hätte diese Eigenschaft geerbt. Wissenschaftlich gesehen glaubte er immer an einen positiven Ausgang des Experimentes. Oft kam man zu ihm, frustriert, weil nichts funktionierte. Man zeigte ihm sein Protokollheft, das angefüllt war mit scheinbar negativen Resultaten. Er schaute es sich an, und interpretierte den Punktehaufen als eine klare positive Korrelation, sah in den Daten etwas, das man vorher nicht beachtet hatte, und schlug oft Experimente vor, die die ganze Forschungsrichtung änderten. Man ging von ihm mit neuem Elan und neuer Hoffnung fort. Diese Eigenschaft zu stimulieren, aufzurichten, habe ich oft zu spüren bekommen und brauchte sie auch oft.

Das Ergebnis, das hier für mich das Schlüsselereignis wurde, kam auch in einer Periode größter Depression. Ich hatte gerade mit der Doktorarbeit am Institut begonnen, und selbst die einfachste Reaktion klappte nicht. Für Nicht-Experimentatoren sollte ich hinzufügen, dass es sehr häufig vorkommt, dass Dinge die bereits publiziert sind und sogar von vielen reproduziert wurden, nicht immer auf Anhieb im eigenen Labor funktionieren. Da meine Depression für die Familie schwer erträglich war, schlug mein Vater vor, dass wir es gemeinsam versuchen sollten. Wir gingen also an einem Samstagvormittag ins Institut. Ich sollte sagen, wir schlichen hinein, weil mein Vater wohl nicht gesehen werden wollte; er hatte zu diesem Zeitpunkt schon viele Jahre nicht mehr im Labor experimentiert. Wir machten uns auf die Fehlersuche und hatten genau zwei Stunden Zeit – dann sollten wir wieder zum Mittagessen zu Hause sein. Es waren die lehrreichsten zwei Stunden meines Lebens! Wir klärten den Fehler auf, ich lernte, wie man Fehler systematisch sucht, ich lernte, wie man "quick-and-dirty" schnell eine ungefähre Antwort bekommt, und ich lernte, wie wichtig es ist, dass der Professor den Doktoranden direkt am Labortisch anleitet, eine Schlussfolgerung, die ich bis heute durchgehalten habe.

Fünfter Lehrsatz: Sei originell!

In eingefahrenen Bahnen zu laufen bringt nichts in der Wissenschaft. Mein Vater bewegte sich immer auf ungewöhnlichen Wegen, und er hatte auch wenig Sitzfleisch, wenn er etwas in einem Gebiet erreicht hatte. Der 2,3 DPG Nebenweg in Erythrozyten, der Abbau von Mitochondrien, ATP-abhängige Proteolyse, die Lipoxygenase, die Initiierung der mathematischen Modellierung von Stoffwechselwegen – das sind nur Stichpunkte, die für originelle Entdeckungen stehen. Für meine Entwicklung war allerdings eine Idee ausschlaggebend, die nicht von ihm, sondern von meiner Mutter ausging.

Ich war gerade mit meiner Doktorarbeit fertig und saß mit meinen Eltern am Abendbrottisch, als das Telefon läutete. Sinaida Rosenthal, unser leider viel zu früh verstorbenes Mitglied der Akademie, war am Apparat. Sina hatte sich auf die Fahne geschrieben, die Gentechnologie in der DDR aufzubauen.

26 Tom A. Rapoport



Sie fragte meinen Vater, ob er nicht eine Idee für ein Protein mit medizinischer Relevanz hätte, das als Objekt dienen könnte. Sie suchte nach einem Objekt, das Mediziner interessieren und Politiker zur finanziellen Förderung stimulieren könnte. Mein Vater kehrte zum Dinnertable zurück und meine Mutter schoss sofort mit der Idee heraus – Insulin – das Protein, das Diabetikern fehlt und in großen Mengen benötigt wird. Mein Vater sprang wieder auf, schlug sich gegen die Stirn, und rief Sina zurück. So entstand das Insulinprogramm der DDR, an dem Charles Coutelle, Hartmut Liebscher, Volkmar Hahn und ich – alle in Sinas

Gruppe – maßgeblich beteiligt waren.



Im Bild von links nach rechts: der Autor, Charles Coutelle, Sinaida Rosenthal, Volkmar Hahn und Hartmut Liebscher

Das Insulin hat mich auch in die Forschungsrichtung geführt, die mich seit nunmehr 25 Jahren beschäftigt. Wie kommt das Insulin aus der Zelle heraus? Alle Zellen sind durch eine Membran umgrenzt, die Proteine im Inneren zurückhält. Wie ist es möglich, dass einige Proteine, wie das Insulin, doch herauskommen? Die Antwort liegt darin, dass alle Proteine, die exportiert werden sollen, ein Signal tragen, das es von anderen Proteinen unterscheidet.

Diese Signalsequenz kann man als eine Art "Postleitzahl" bezeichnen. Die Signalsequenz bewirkt, dass das Protein durch einen Kanal in der Membran hindurchtransportiert werden kann. Unser letztes Ergebnis, das noch nicht publiziert ist, ist die Aufklärung der Raumstruktur dieses Kanals.

Sechster Lehrsatz: Sei neugierig!

Wissenschaft lebt von Neugier und Wissensdurst. Noch heute sind meine Eltern die personifizierte Neugier. Jede Woche erwarten sie einen Bericht über den Fortschritt im Labor. Trotz der Distanz kennen sie alle meine Mitarbeiter beim Namen und wissen, was jeder tut. Wenn ich nach Berlin komme, muss ich ausführlich Bericht erstatten, muss ich im Detail die Projekte erklären. Meine Mutter machte sogar Vorschläge zur Röntgenkristallstrukturanalyse, die ich leider wegen der Verletzung einiger physikalischer Grundgesetze nicht befolgen kann. Vermutlich ist diese geistige Beweglichkeit und Neugier das Lebenselixier, das sie mit 90 noch so jugendlich hält.

Siebenter Lehrsatz: Professor werden kann jeder!

Das war eigentlich der Merksatz meiner Mutter. Titel sind Schall und Rauch wäre vielleicht eine andere Formulierung. Worauf es wirklich ankommt, sind wissenschaftliche Ergebnisse, und meine Eltern können sich auch über kleine Ergebnisse freuen. Für mich hatte dieser Lehrsatz auch eine wichtige, andere Bedeutung. Ich habe mir immer gesagt, dass Wissenschaft eine zutiefst demokratische Sache ist, bei der der Titel oder das Alter keine Kluft erzeugen darf. Schon in Berlin habe ich mich mit allen geduzt, und diese kameradschaftliche Atmosphäre habe ich natürlich in den USA beibehalten. Es ist meine Überzeugung, dass auch der neuangekommene Student ohne Hemmungen Widerspruch äußern können muss, damit alle Ideen der Gruppe zu einem produktiven Ganzen zusammenfließen können.

Achter und letzter Lehrsatz: Gib den Staffelstab weiter!

So weit ich weiß, hat mein Vater nicht wirkliche Lehrer gehabt. Aber zumindest hatte er ein Ideal: Otto Warburg (im untenstehenden Bild mit meinem Vater und M. Zetkin). Dieser war in seinen Augen der größte Biochemiker des vergangenen Jahrhunderts. Ich kann mich noch erinnern, dass Warburg hier in Berlin einen Vortrag hielt. Er las ihn vor, ohne auch bei der Erläute-

rung der Dias vom Manuskript aufzublicken. Doch der Vortrag war von einer bestechenden Logik.

Mein Vater wiederum hatte viele Schüler, nicht nur wir hier, die wir heute vortragen. Viele erinnern sich noch an seine Vorlesungen, an seine Prüfungen (manche nicht so gern), und viele sind durch sein Lehrbuch indirekt geprägt worden. Letztes Jahr traf ich in Nepal in einem entlegenen Dorf einen Arzt aus Westdeutschland. Er war, wie fast seine ganze Generation, mit dem Biochemielehrbuch meines Vaters ausgebildet worden. Ich war erstaunt, mit welcher Hochachtung er mir begegnete, als er erfuhr, dass ich der Sohn des "großen Rapoport" bin.



Nun bin ich selbst schon viele Jahre in der Position, Studenten und Postdocs auszubilden. Einige meiner Schüler, es sind mittlerweile neun, sind nun auch schon Professoren und bilden ihrerseits wiederum Studenten aus.

Das ist vielleicht das Beglückendste an unserem Beruf, dass wir unsere Leidenschaft und Liebe zur Wissenschaft an die nächste Generation weitergeben. Wir feiern heute das Jubiläum des Großvaters einer großen wissenschaftlichen Familie, in der der Staffelstab von einem zum nächsten weitergegeben wird.

Bleib' uns gesund, lieber Daddy, und bleib' unser streitbarer, ungeduldiger, origineller, und neugieriger Geist!

Charles Coutelle

Möglichkeiten und Grenzen einer in utero Gentherapie genetisch bedingter Erkrankungen

Sehr geehrter Herr Präsident, sehr geehrter Herr Kollege Eichhorn, liebe Gisela, liebe Kollegen und Freunde, liebe Inge und lieber Mitja.

Auf den ersten Blick mag der Zusammenhang zwischen meinem heutigen Thema und meiner Lehrzeit an Mitjas Institut in der Hessischen Straße vor über 30 Jahren kaum offensichtlich sein.

Ich kam damals als junger Arzt mit der Absicht, nur 2-3 Jahre zu bleiben. Es verging aber fast ein Jahrzehnt, bevor ich das Institut, mit Facharzt und B-Promotion, schließlich verließ. Diese Jahre haben meinen weiteren Weg so nachhaltig geprägt, dass ich trotz unterschiedlicher unmittelbarer Forschungsinteressen daraus das Recht ableite, Rapoport-Schüler zu sein.

Ich will hier nur 3 solche Faktoren hervorheben.

1. die Kombination aus wissenschaftlicher Strenge und langer Leine, mit der Mitja unsere Forschungsarbeiten lenkte. Sie hat mein Herangehen an das Aufgreifen und Lösen wissenschaftlicher Probleme bleibend beeinflusst. Die lange Leine führte mich damals von Arbeiten über die Atmungsketten-Hemmung und erythroide Reifung zur molekulargenetischen Gruppe, die durch Mitja initiiert, von Sina Rosenthal aufgebaut wurde.

Die 2. prägende Erfahrung war die Ernsthaftigkeit, mit der Mitja uns die Lehre lehrte. Er zwang uns junge Seminarassistenten dazu, uns ein bleibendes Grundwissen biochemischer Zusammenhänge anzueignen. Das weckte bei mir, aus der Behandlung der inborn errors of metablolism und des diagnostischen und therapeutischen Dilemmas der genetischen Erkrankungen, ein bleibendes Interesse an der Forschung und den ethischen Probleme der Humangenetik.

Und schließlich als 3. Erfahrung: Die ständige aber nicht oberflächliche Offenheit Mitjas zur Anwendungsorientierung unserer Forschung insbesondere in der Medizin und den damit verbundenen gesellschaftlichen und ethischen Fragen.

30 Charles Coutelle

Alle diese Einflüsse haben mich, nicht immer auf gradem Wege, zuerst zur Molekularen Humangenetik und schließlich zur Gentherapie geführt.

Die Möglichkeit, durch Gentherapie dem alten Problem der Behandlung genetisch bedingter Erkrankungen näherzukommen, rückte damit in scheinbar greifbare Nähe. Die folgenden Jahre und Erfahrungen haben diese Hoffnung nicht genommen, wohl aber in realistischere Dimensionen gerückt.

Eine der Erfahrungen war, dass bei vielen dieser Erkrankungen eine sehr frühe Krankheitsmanifestation zu beobachten ist, und dass selbst eine erfolgreiche Gentherapie daher häufig nicht in der Lage sein würde, schwere und irreversible Organschäden zu heilen. Andere Überlegungen führten zur Notwendigkeit eines permanenten Gentransfers in Stammzellpopulationen, um eine dauerhafte Therapie zu erreichen, und schließlich zeigte sich, dass Immunreaktionen gegen Gentransfervektoren und die von ihnen produzierten therapeutischen Proteine zum großen Hindernis in vielen der bisherigen Studien wurden.

Diese Erfahrungen führten uns schließlich zum Konzept der pränatalen Gentherapie. Es beruht einmal auf der Hoffnung, durch intra-uterine Vektorapplikation mit geringer Dosis einen effektiveren Gentransfer in postnatal schwerer zugänglichen Geweben und Organen und insbesondere ihren Stammzellen zu erreichen. Weiterhin geht es von der Hypothese aus, dass die Unreife des sich noch entwickelnden Immunsystems die Ausbildung einer Immuntoleranz gegen Vektor und therapeutisches Protein ermöglichen könnte.

Es handelt sich bei diesem Konzept natürlich nicht um eine Alternative zur postnatalen Gentherapie, sondern um eine Erweiterung der Möglichkeiten der Gentherapie in Richtung auf eine pränatale Prävention schwerer genetisch bedingter Erkrankungen. Sie wäre sicher eine bessere Option als die Schwangerschaftsunterbrechung und auch weniger aufwendig als eine Präimplantationsdiagnostik/-selektion. Indikationen für eine fetale Gentherapie wären in erster Linie lebensbedrohende, monogen bedingte Erkrankungen, die durch das Fehlen oder die Inaktivierung eines bekannten essentiellen Genprodukts verursacht sind. Zu ihnen würden insbesondere solche mit frühkindlicher Manifestation ohne kurative postnatale Therapiemöglichkeiten zählen, für die eine exakte pränatale Diagnose möglich ist.

Auf längere Sicht könnte aber auch die Einfachheit und Sicherheit der Anwendung das Spektrum der Erkrankungsauswahl beeinflussen.

Soviel zur Theorie. In der Praxis ist die pränatale (fetale oder in utero) somatische Gentherapie gegenwärtig ein experimentelles Forschungsgebiet, das an Tiermodellen unterschiedliche Vektorsysteme und Applikationswege untersucht, um möglichst an physiologischen Endpunkten die Effizienz und Sicherheit der Verfahren zu testen und sie einer klinischen Anwendung so nahe wie möglich zu bringen.

Ein idealer Vektor für eine fetale somatische Gentherapie sollte alle relevanten Organe mit einer Applikation erreichen, die therapeutische Gensequenz permanent und orts-spezifisch integrieren und lebenslang, ohne Nebenwirkungen, physiologisch reguliert exprimieren. Leider sind wir von diesem Ideal noch weit entfernt.

Für die Arbeiten, über deren Ergebnisse ich hier berichte, haben wir zwei Vektorsysteme, die ihre besonderen Vor- und Nachteile haben, verwendet. Es sind Adenovirus- und Lentivirusvektoren. Die adenoviralen Vektoren sind nicht-integrierende Vektoren, die daher auch eine nur transiente Persistenz aufweisen. Wir haben sie trotzdem in diesen Studien benutzt, weil sie gut in hohen Titern hergestellt werden können und einen breiten Gewebstropismus haben. Sie sind daher sehr gut zur Untersuchung der Vektorverbreitung im Organismus der verschiedenen Tiermodelle bei Anwendung unterschiedlicher Applikationswege geeignet. Sie sind stark immunogen und können wahrscheinlich auch als Adjuvanz die Immunogenität der durch sie exprimierten Proteine erhöhen. Dieser offensichtliche Nachteil für eine spätere Anwendung macht sie aber in dieser Phase der Forschung zu einem sehr guten Modell für Untersuchungen zur pränatalen Immuntoleranz. Die relativ neu in das Gentherapiearsenal aufgenommenen lentiviralen Vektoren werden im Gegensatz zu den Adenovirusvektoren in das Wirtsgenom integriert und erfüllen damit eine der wesentlichen Voraussetzungen für einen permanenten Gentransfer. Im Gegensatz zu den inzwischen klassischen oncoretroviralen Vektoren haben sie den großen Vorteil, dass ihr Eindringen in den Zellkern nicht von der Teilung der Wirtszelle abhängt.

Wir haben unsere Arbeiten mit Untersuchungen an Mäusen begonnen, weil dieses experimentelle Tiermodell eine Reihe von Vorteilen aufweist: Ihre Züchtung und Haltung ist relativ einfach und billig, wodurch sie sehr gut für Mehrgenerationen-Untersuchungen zur Analyse einer möglichen Keimbahntransmission und anderer unerwünschter Nebenwirkungen geeignet sind. Sie bieten weiterhin den großen Vorteil einer ständig wachsenden Palette gut charakterisierter Modelle für zahlreiche genetische Erkrankungen des Menschen. Wir haben inzwischen Mausmodelle für Hämophilie, Zystische Fibrose, Duchenne Muskeldystrophie und LDL-Rezeptor Mangel in unserem Labor.

Der wesentliche Nachteil des Mausmodells sind die offensichtlichen Unterschiede in Größe und Physiologie im Vergleich zum menschlichen Feten, die z.B. andere Techniken der Vektorapplikation erfordern.

Im Mausmodell ist der Zugang zum Feten immer mit einer Laparotomie zur Freilegung der Uterushörner verbunden. Der Fetus ist im Uterus gut er32 Charles Coutelle

kennbar, was die direkte intra-uterine Injektion ohne Öffnung des Uterus ermöglicht. Die günstigste Applikationszeit ist zwischen dem 13. und 16. Schwangerschaftstag (SST) (Schwangerschaftsdauer 20/21 Tage). Adenovirale Injektionen in den Fruchtwassersack am 13. Schwangerschaftstag führen zu intensivem Gentransfer in die Haut. Ab 15. SST beginnt der Fetus mit Schluck- und Atembewegungen, durch die der in das Fruchtwasser injizierte Vektor in die Atemwege und in den Verdauungstrakt gelangt. Eine Injektion in Dottersackgefäße ist ab 11. Tag möglich (am besten am 15./16. SST). Der Vektor erreicht über die Umbilikalverne das fetale Kreislaufsystem und insbesondere die Leber und das Herz. Eine direkte topische Applikation erlaubt eine Injektion der Skelettmuskeln einschließlich der Interkostalmuskulatur und des Zwerchfells, des Peritoneus und des ZNS.

Um die klinische Anwendung der fetalen Gentherapie vorzubereiten, haben wir in den letzten 4 Jahren eine sehr enge Zusammenarbeit mit der Fetal Medicine Unit von Prof. Charles Rodeck aufgebaut. Für diese Untersuchungen benutzen wir fetale Schafe, die, auf Grund ihrer Ähnlichkeiten mit menschlichen Feten in Größe und Anatomie, etablierte Modelle für die Physiologie der Humanschwangerschaft darstellen. Das Schaf hat eine konstante Schwangerschaftszeit von 147 Tagen mit relativ wenigen Mehrlingsschwangerschaften und sein Immunsystem entwickelt sich ähnlich wie das des Menschen. Zwar gibt es gegenwärtig keine Schafmodelle für genetische Erkrankungen des Menschen, aber es wird, z.B. für Zystische Fibrose durch Anwendung der Zellkerntransplantationstechnik, hieran gearbeitet. Der Schaffetus zeigt eine gute Toleranz gegenüber in utero Manipulationen und erlaubt die Anwendung und Entwicklung minimal invasiver Interventionen unter Ultraschall-Beobachtung und ohne Laparotomie, wie sie auch beim menschlichen Feten durchgeführt werden können.

Die Techniken der Injektion in die Nabelschnurvene und Fruchtwasserhöhle sind etablierte Methoden der fetalen Medizin. Beim Schaf ist die Nabelschnurvenen-Injektion ab dem 102. Schwangerschaftstag möglich und erlaubt einen Gentransfer hauptsächlich in die Leber und in die Nebenniere. Charles Rodecks Gruppe hat inzwischen die Ultraschall kontrollierte Injektion in den Fruchtwassersack, die Bauchhöhle und intramuskulär in der frühen Schwangerschaftsperiode mit geringer fetaler Mortalität etabliert. Leider kann die einfache Vektorapplikation in die Fruchtwasserhöhle, wie wir sie bei der Maus für den Gentransfer in die Atemwege nutzen, beim Schaffetus nicht angewandt werden, da das Fruchtwasservolumen eine zu große Vektorverdünnung bewirkt. Hierfür war die Entwicklung der Ultraschall kontrollierten intra-trachealen Applikation um den 100. SST notwendig. Diese Entwicklung hat es uns ermöglicht, auch am Schafmodell mit Untersuchungen zum Gen-

transfer in die fetalen Atemwege mit dem Ziel einer pränatalen Therapie der Zystischen Fibrose zu beginnen.

Die Zystische Fibrose ist eine der häufigsten autosomal-rezessiven genetischen Erkrankungen in unserer Bevölkerung. Das verantwortliche CFTR-Gen kodiert einen cAMP-abhängigen Chloridkanal an der apikalen Membranoberfläche der meisten Epithelien. Mutationen in diesem Gen führen zu Störungen im Ionen- und Wassertransportsystem an der Epitheloberfläche der meisten sezernierenden Gewebe. Das bewirkt die Bildung zäher Schleimablagerungen und führt durch wiederholte bakterielle Infektionen und Entzündungen bereits in jungen Jahren zu schweren Schädigungen der Atemwege und der Bauchspeicheldrüse. Insbesondere die Lungenmanifestation dieser Erkrankung hat gewöhnlich einen schweren lebensverkürzenden Krankheitsverlauf. Interessanterweise wird das CFTR-Protein bereits sehr frühzeitig in der fetalen Entwicklung exprimiert. Es findet sich bereits in der 7. SSW im Dottersack, in der 12. SSW in den Darmepithelien, in der 13. SSW in Epithelien der Bauchspeicheldrüsengänge, des Dünndarms, des Colons, der Atemwege, des Genitaltrakts, sowie der Gallengänge. Während der 24./25. SSW tritt eine sehr hohe Expression in der fetalen Lunge auf, wie sie später im Leben nicht wieder erreicht wird. Bei vielen CF-Feten kommt es im mittleren Trimester der Schwangerschaft zu einer Blockierung der Pankreasgänge. Eine bekannte perinatale Komplikation dieser Erkrankung ist der als Mekoniumileus bekannte Darmverschluss beim Neugeborenen.

Das Hauptproblem aller bisherigen postnatalen Gentherapieversuche für diese Erkrankung war die mangelnde Effizienz des Gentransfers in die betroffenen Epithelzellen vor allem der Atemwege. In beiden fetalen Tiermodellen können wir jetzt mit hoher Effizienz und Zuverlässigkeit einen Gentransfer in die relevanten Epithelzellen erreichen. In der Maus haben wir mit einer Vektorapplikation am CF-Krankheits-Modell begonnen. Beim Schaffetus werden wir uns mit dem Nachweis einer durch Gentransfer erzielten hohen Expression des menschlichen CFTR begnügen müssen.

Bei einer anderen genetischen Erkrankung, der Hämophilie B, die durch einen Mangel des Blutgerinnungsfaktors IX (FIX) verursacht wird, haben wir bereits die ersten therapeutischen Erfolge im Mausmodell erreicht. Diese X-chromosomal vererbte Erkrankung mit einer Häufigkeit von etwa 1 in 25 000 männlichen Neugeborenen ist durch schwere wiederholte Blutungsepisoden nach Minimaltraumata charakterisiert. Diese können zu schweren Gelenksveränderungen oder zu lebensbedrohlichen inneren Blutungen führen, die einen perinatalen Risikofaktor darstellen. Die Erkrankung erfordert eine lebenslange Faktor-IX-Substitution bei den betroffenen Patienten. Die ist jedoch so teuer, dass sie nur bei Blutungsepisoden oder prophylaktisch vor Operationen erfolgen kann. Zur Behandlung der Hämophilie reicht es aus,

34 Charles Coutelle

5% des normalen Faktor IX Blutspiegels zu erzielen. Selbst 1% wandelt eine schwere Erkrankung in eine milde Hämophilieform um.

Eine der schwerwiegenden Komplikationen der konventionellen Proteinsubstitutionstherapie ist die Entwicklung von Antikörpern, d.h. von Inhibitoren gegen das therapeutische Eiweiß. Wir haben uns in unseren Untersuchungen mit Adenovirusvektoren an normalen Mäusen zuerst dieser Problematik zugewandt: Appliziert man erwachsenen Mäusen wiederholt gereinigtes Human FIX (hFIX), so kommt es nach 5-6-maliger Injektion zur Entwicklung von Antikörpern und zur sofortigen Elimination des initzierten Proteins. Eine noch schnellere und stärkere Antikörperbildung, bereits bei der 2. Injektion, wird beobachtet, wenn ein Adenovirusvektor appliziert wird, um human FIX in vivo zu produzieren. Wenn wir jedoch das gleiche Virus fetalen Mäusen über die Dottersackgefäße injizierten, fanden wir bei der Mehrzahl der Tiere einen postnatal mehrere Monate anhaltenden niedrigen Blutspiegel an hFIX. Bei mehr als 50% dieser Tiere konnte das gereinigte Humanprotein wiederholt ohne beschleunigte Abbaukinetik und eine nur sehr geringgradige Entwicklung von FIX-Antikörpern appliziert werden. Wir haben damit einen ersten Hinweis dafür, dass die pränatale Expression des durch Gentransfer produzierten hFIX tatsächlich zur Ausbildung einer postnatalen Toleranz führen kann. Wir sind jetzt dabei, durch die Anwendung eines integrierenden lentiviralen Vektorsystems, einen anhaltenden therapeutischen FIX Spiegel zu erreichen. Z.Z. haben wir eine Hämophiliemaus in Beobachtung, die jetzt 5 Monate nach fetaler Therapie einen FIX Blutspiegel von 15% der Norm zeigt, also gut im therapeutischen Bereich liegt und auch gemessen an den Gerinnungsparametern eine Heilung aufweist.

Unser Ausgangskonzept kann somit im Tierexperiment grundsätzlich bestätigt werden. Soviel zu den Möglichkeiten, deren Ausmaß noch gar nicht voll abgesteckt ist. Wie sieht es mit den Grenzen aus?

Es werden viele sowohl ernsthafte als auch völlig irrationale Bedenken und Argumente gegen eine pränatale Therapie ins Feld geführt. Ich werde mich hier nur mit denen befassen, die einen rationalen Kern haben. Sie sind der Grund dafür, dass bisher zu Recht keine in utero Gentherapie-Protokolle am Menschen in unmittelbarer Planung sind.

Zu diesen Bedenken gehört die Frage nach einem möglicherweise erhöhten Risiko der Keimbahntransmission, wobei es in diesem Zusammenhang wichtig ist zu betonen, dass entgegen manchen Misskonzeptionen die fetale somatische Gentherapie keine Keimbahnmodifikation beabsichtigt. D.h. die Therapie ist nur für den unmittelbar betroffenen Fetus gedacht, nicht zur Korrektur der Gene künftiger Generationen. Ein unbeabsichtigter Gentransfer in die Keimzellen, der selbst experimentell in vitro schwer zu erreichen ist, sollte nach Kompartmentierung der primordialen Keimzellen in den Gonaden

(beim Menschen bis zur 7. SSW) nur über den Kreislauf möglich sein. Damit unterscheidet sich das Risiko nicht von dem bei einer postnatalen Gentherapie. In allen bisherigen Studien trat weder nach prä- noch nach postnataler Genapplikation eine Keimbahntransmission auf. Natürlich kann sie nicht völlig ausgeschlossen werden. Daher muss, falls wirklich eine Keimbahntransmission in dem einen oder anderen Fall gefunden werden sollte, eine Risiko/ Nutzen Analyse erfolgen. Diese sollte u. a. untersuchen, welche potentielle Gefahr die spezifische Gensequenz in der Keimbahn der behandelten Person für künftige Generationen darstellen könnte und wie sich die Häufigkeit dieses Ereignisses mit den natürlich erfolgenden Keimbahninsertionen von etwa einem neuen Ereignis in acht Individuen [Kazzian] vergleicht. Es sei dazu angemerkt, dass wir seit langem in der konventionellen medizinischen Praxis, z.B. mit Chemo- und Radiotherapie, Keimbahnmutationen hervorrufen. Nur sind diese völlig ungerichtet und daher nicht nachweisbar. Bei der Gentherapie wissen wir dagegen sehr genau, welche Gensequenz wir in den Organismus einbringen. Daher können und sollen wir seine Verteilung im Organismus einschließlich der Keimbahn untersuchen.

Es gibt auch eine Reihe von Risiken, die für die in utero Gentherapie spezifisch sind.

Dazu gehören solche, die sowohl die Schwangere als auch den Fetus unmittelbar betreffen. Dazu zählen z.B. aus den Prozeduren resultierende Verletzungen, Infektionen, vorzeitige Wehen und fetaler Tod.

Dazu gehören auch hypothetische Risiken, die mit der fetalen Entwicklung zusammenhängen, wie beispielsweise eine mögliche Interferenz des in utero exprimierten transgenen Proteins (oder des Gentransfervektors) mit der normalen fetalen Morphogenese oder eine Induktion von Tumoren. Diese Risiken werden, wenn sie denn existieren, wahrscheinlich sehr spezifisch für den jeweiligen Vektor bzw. das Protein sein. Selbst umfangreiche Tierexperimente werden diese hypothetischen Risiken für den Menschen nicht völlig ausschließen und daher wird in der Anfangsphase die pränatale Gentherapie wahrscheinlich nur für sehr schwerwiegende genetische Erkrankungen zur Anwendung kommen.

Fetale Toleranz gegen das Vektorsystem könnte theoretisch auch eine Anfälligkeit gegen spätere Infektionen mit dem Wildtypvirus begünstigen. Daraus leitet sich ab, dass der Vektor genügend unterschiedlich vom Wildtyp sein muss, um diese Komplikation zu vermeiden.

Das größte spezifische Risiko sehe ich allerdings im möglichen Misserfolg, und das macht eine klinische Einführung der in utero Gentherapie ethisch besonders kompliziert: Obwohl bei weitem die Schwangerschaftsunterbrechung nicht optimal ist, ist sie doch eine verhältnismäßig sichere maternale Option des Umgangs mit einer potentiell letalen genetischen Erkran-

36 Charles Coutelle

kung. Postnatal besteht diese Alternative nicht, und jede Erfolg versprechende Therapie wird akzeptabel; selbst mit einem hohen Misserfolgsrisiko.

Dagegen wird von einer in utero Gentherapie als Alternative zur Schwangerschaftsunterbrechung erwartet, dass sie in hohem Maße verlässlich die Erkrankung vermeiden und nicht zusätzlichen Schaden bewirken wird.

In der Einführungsphase der fetalen Gentherapie am Menschen mag es schwierig sein, diese Risiken abzuschätzen Daher wird besondere Sorgfalt hinsichtlich der Zustimmung der Schwangeren zur in utero Gentherapie auf der Grundlage eines detaillierten Verständnisses der potentiellen Vorteile und Gefahren erforderlich sein.

Es gibt auch Probleme des Erfolges. So wird z.B. bei einer erfolgreichen in utero Gentherapie befürchtet, dass sie die freie Entscheidung der Schwangeren über das Schicksal ihrer Schwangerschaft beeinträchtigen könnte. Hierzu haben Fletcher and Richter (Human Gene Therapy 7 (1996) 1605–1614) formuliert: "a previable fetus is totally dependent on a pregnant women's autonomous decision for its status in medicine". Dem entspricht auch unsere Position, dass die Schwangere Entscheidungsträger für alle mit ihrer Schwangerschaft zusammenhängenden Fragen ist. Obwohl in Deutschland kein Recht auf Schwangerschaftsabbruch existiert, sollte der Schwangeren die autonome Entscheidung über das Schicksal der Schwangerschaft überlassen bleiben unabhängig vom Angebot einer prä- oder postnatalen Therapiemöglichkeit. Sie ist auch der legale Partner für die informierte Zustimmung zu einem pränatalen Therapieversuch und hat das Recht, diese Zustimmung jederzeit zurückzuziehen.

Ein anderer umstrittener Bereich der Humangenetik ist das mit den Fortschritten in der Genomanalyse möglich gewordene genetische Screening und insbesondere das pränatale Screening auf schwerwiegende genetisch bedingte Erkrankungen. Eine erfolgreiche in utero Gentherapie würde eine dritte Option zur bisherigen Wahl zwischen Schwangerschaftsabbruch und Akzeptanz eines behinderten Kindes bieten und damit solche Screeningprogramme wahrscheinlich mehr akzeptabel machen.

Und schließlich die alte Debatte um Kosten/Nutzen und Prioritäten im Verhältnis zu anderen medizinischen Notwendigkeiten und um die Berechtigung, Hochtechnologien in der Medizin voranzutreiben, solange noch in der Welt Kinder verhungern. Dies sind zweifellos wichtige Probleme. Sie haben primär gesellschaftliche Ursachen, die politisch gelöst werden müssen, nicht dadurch, dass man auf möglichen wissenschaftlichen und medizinischen Fortschritt verzichtet.

Ich hoffe, dass die Summe dieser Fürs und Widers gezeigt hat, dass die in utero Gentherapie ein hoffnungsvolles, aber nicht risikofreies Konzept zur Prävention genetisch bedingter Erkrankungen darstellt. Nur intensive experimentelle Forschung und eine auf deren Ergebnissen basierende umfassende öffentliche Information über Nutzen und Risiken wird letztendlich darüber entscheiden, ob, wann und wie eine Gentherapie zur Anwendung kommt.

Lieber Mitja, ich habe eingangs einige mehr persönliche Gründe genannt, weshalb ich mich zu Deinen Schülern zähle. Im größeren Zusammenhang gehört zu dieser Schule auch Dein Anteil an der Entwicklung der Biochemie zu einer der entscheidenden Grundlagen der modernen Biowissenschaften und damit der Molekularen Medizin und Gentherapieforschung. Ich wünsche Dir sehr, dass Du noch lange diese aufregende Entwicklung in den Arbeiten Deiner Schüler und deren Schüler mitverfolgen kannst.

Literatur:

- Bigger B, Coutelle C. Perspectives on gene therapy for cystic fibrosis airway disease. BioDrugs. 9 (2001):615–634
- Coutelle C, Bigger B. Gene therapy of cystic fibrosis; review of completed clinical studies. Internist (Berl.)10 (2001): 1346–1350, 1353–1356
- Coutelle C, Rodeck C. On the scientific and ethical issues of fetal somatic gene therapy. Gene Ther. 11 (2002): 670-673
- Coutelle C, Themis M, Schneider H, Kiserud T, Cook T, Douar AM, Hanson M, Pavirani A, Rodeck C. Fetal somatic gene therapy a preventive approach to the treatment of genetic disease: the case for. Ernst Schering Res. Found.Workshop. 33 (2001):99–114
- Jost PJ, Harbottle RP, Knight A, Miller AD, Coutelle C, Schneider H. A novel peptide, THALWHT, for the targeting of human airway epithelia. FEBS Lett. 489 (2001): 263–269
- Schneider H, Adebakin S, Themis M, Cook T, Douar AM, Pavirani A, Coutelle C. Therapeutic plasma concentrations of human factor IX in mice after gene delivery into the amniotic cavity: a model for the prenatal treatment of haemophilia B. J. Gene Med. 6 (1999): 424–432
- Schneider H, Muhle C, Douar AM, Waddington S. Jiang QJ, von der Mark K, Coutelle C, Rascher W. Sustained delivery of therapeutic concentrations of human clotting factor IX a comparison of adenoviral and AAV vectors administered in utero. J Gene Med. 4(2002): 46–53
- Waddington SN, Buckley SM, Nivsakar M, Jezzard S, Schneider H, Dahse T, Kemball-Cook G, Miah M, Tucker N, Gallmann MJ. Themis M, Coutelle C. In utero gene transfer of human factor IX to fetal mice can include postnatal tolerance of the exogenous clotting factor. Blood. (2002) in press

André Rosenthal

Die Nutzung des Humangenoms in der Onkologie

Lieber Mitja, liebe Inge, sehr verehrte Anwesende,

gerne bin ich der Einladung gefolgt, heute anlässlich Deines 90. Geburtstags, lieber Mitja, zu sprechen. Ich möchte aber nicht unerwähnt lassen, dass ich, als ich die Einladung in den Händen hielt, für einige Zeit daran denken musste, dass diese Einladung eigentlich Sina gilt. Ich habe eine besondere Briefmarke auf die Einladung geklebt und sie weitergeschickt, dort wo sie eigentlich hingehört. Es ist sehr schade, dass Sina heute hier nicht sprechen kann. Ich bin mir sicher, sie hätte viel und Spannenderes zu erzählen gehabt, aus Eurer gemeinsamen Zeit in der Hessischen Straße und danach. Viele Jahre habt ihr gemeinsam geforscht und auch manche Wissenschaftspolitik betrieben. Nicht immer ist alles so aufgegangen, wie ihr es erhofft hattet. Ich hoffe, Du gestattest mir, dass ich meinen Vortrag nicht nur Dir, lieber Mitja, sondern auch Sina widme. Mögen Dir noch viele weitere gesunde und produktive Jahre, zusammen mit Deiner lieben Inge, vergönnt sein.

1. Das menschliche Genom – Geschichte und Politik

In den letzten zwei bis drei Jahren wurde viel über das Human Genom Projekt (HGP) in den Medien berichtet. Einige verglichen die Entschlüsselung des menschlichen Genoms mit der Landung von Menschen auf dem Mond, andere mit der Erfindung des Buchdrucks im Mittelalter. Im Kontext mit den genetischen Programmen anderer wichtiger Modellorganismen wie der Labormaus *M. musculus*, der Fruchtfliege *D. melanogaster* und des Rundwurms *C. elegans* ist die Kenntnis der Sequenz des menschlichen Genoms eine einzigartige wissenschaftliche Errungenschaft, für die es keine Parallele gibt. Die vielfältigen Informationen, die im genetischen Programm des Menschen verschlüsselt sind, werden in den nächsten Jahren und Jahrzehnten nach und nach analysiert und verstanden werden. Die mittel- und langfristi-

gen Auswirkungen auf die Wissenschaften, insbesondere auf die Biologie und Medizin, aber auch auf die menschliche Gesellschaft, können zum heutigen Zeitpunkt nur erahnt werden. Sehr wahrscheinlich wird sich unser Leben in der ferneren Zukunft als Folge dieser wissenschaftlichen Großleistung stärker verändern, als wir heute voraussehen können. Wie bei allen großen wissenschaftlichen Durchbrüchen kann es bei der späteren Anwendung dieses neuen Wissens auch zu negativen Konsequenzen für den Einzelnen aber auch für bestimmte Gruppen in der Gesellschaft kommen. Dies hängt jedoch in erster Linie von den jeweiligen politischen Umständen ab und sollte durch kluges, vorausschauendes und verantwortliches Handeln der Gesellschaft und aller ihrer Mitglieder vermieden werden.

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms war, technisch gesehen, extrem herausfordernd und beschäftigte tausende Menschen in sechs Ländern über fast eine Dekade. Der Wettbewerb zwischen dem öffentlichen akademischen HGP Consortium und Celera Genomics beschleunigte das Projekt wesentlich. Im Dezember 1999 wurde die Sequenz des ersten menschlichen Chromosoms – Chromosom 22 – von einem Team unter der Leitung des Britischen Sanger Centres fertig gestellt (1). Im Mai 2000 folgte dann das Chromosom 21, welches von einem Deutsch-Japanischen Konsortium sequenziert wurde (2). Ein großer Teil von Chromosom 21 und von den Chromosomen 8 und X wurde unter meiner Leitung am Institut für Molekulare Biotechnologie in Jena sequenziert und analysiert. Im Dezember 2001 wurde dann das Chromosom 20 wiederum vom Britischen Sanger Centre beendet. All drei Chromosomen wurden in der angesehenen Zeitschrift "Nature" publiziert, wobei Chromosom 21 bezüglich der Vollständigkeit und Qualität der Sequenz sehr wahrscheinlich als Goldstandard dienen wird. Im Chromosom 21 verblieben nur drei Lücken von ungefähr 100 Kilobasen oder etwa 0,3% des langen Arms, während bei Chromosom 22 noch etwa 1 Million Basen oder 3% der Sequenz fehlen. Am 26. Juni 2000 wurde in internationalen Pressekonferenzen rund um den Erdball die Fertigstellung der Rohfassung des Humangenoms angekündigt, die dann am 15. Februar 2001 wiederum in "Nature" publiziert wurde (3).

1.1 Der Wettlauf zwischen dem HGP-Konsortium und Celera

Zwanzig Zentren nahmen an der Sequenzierung des menschlichen Genoms teil (Tab. 1). Sie entwickelten eine hierarchische Kartierungs- und Sequenzierungs-Strategie, die der Komplexität des menschlichen Genoms angepasst wurde. Diese Strategie umfasst mehrere Schlüsselmethoden (Abb. 1). Zunächst wurde die genomische DNA in mehrere hunderttausend kleinere

Fragmente, s.g. BACs ("bacterial artificial clone") und PACs kloniert. Jeder BAC/PAC-Klon enthält ca. 100-200 Kilobasen menschlicher DNA. Verschiedene humane BAC-Bibliotheken (Caltech B. C. D1, RPCI-1, -3, -4, -5 und RPCI-11) mit mehr als 1,4 Millionen individuellen Klonen wurden über die Jahre angelegt. Die DNA stammte von 24 anonymen menschlichen Spendern, wobei verschiedene ethnische Gruppen berücksichtigt wurden. Anschließend wurden 354510 individuelle BAC-Klone, die hauptsächlich von der RPCI-11 und der Caltech D1 Bibliothek stammten, mit Hilfe einer Fingerprinttechnik physikalisch kartiert. Dabei wurde für jeden der ca. 350,000 Klone ein rechter und linker Nachbar identifiziert und alle Klone den 23 Chromosomen genau zugeordnet (4). Dazu verdaut man die DNA jedes BAC-Klons mit dem Restriktionsenzym HindIII und misst die Größe der sich ergebenden Restriktionsfragmente durch Agarose oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Restriktionsmuster sind physikalische Fingerabdrücke für jeden Klon. Der Vergleich aller Fingerabdrücke im Computer erlaubt dann, zehntausende verschiedene BAC-Klone miteinander zu vergleichen. Klone. die identisch sind, haben identische Fingerabdrücke. Klone, die überlappen, haben partiell identische Abdrücke. Zusätzlich wurden die Enden von mehr als 800.000 BAC-Klonen ansequenziert, wobei von mehr als 480.000 BAC-Klonen Sequenzen von beiden Enden (gepaarte Sequenzreads) erzeugt wurden. Diese relativ kurzen Sequenzen erleichterten wesentlich die richtige Zuordnung der BACs. Zum Schluss wurden die BAC-Contigs mit Hilfe von mehreren tausend STS-Marker auf die 23 menschlichen Chromosomen zurück kartiert. Dabei wurde eine Vielzahl von Methoden verwendet, z.B. kann man individuelle BAC's mit Hilfe der fluoreszenten in-situ Hybridisation (FISH) einzelnen Chromosomenbanden zuordnen. Anschließend wurde für iedes menschliche Chromosom ein Satz von BAC/PAC-Klonen ausgewählt, der bei minimaler Überlappung der Einzelklone die gesamte Länge des Chromosoms abdeckt. Man bezeichnet diesen Satz von Einzelklonen als "minimal tiling path" eines Chromosoms. Der "minimal tiling path" des gesamten menschlichen Genoms umfasst ca. 30.000 einzelne Klone. In der Sequenzierungsphase wurden dann für jedes einzelne Chromosom alle BAC/PAC-Klone des "minimal tiling path" des entsprechenden Chromosoms vollständig mit Hilfe der Schrotschussmethode sequenziert. Für das gesamte Genom wurden insgesamt 29.298 individuelle, gut kartierte BAC-Klone (25.241 Klone von RPCI-11 und Caltech D1 und 4.057 Klone anderer Bibliotheken) sequenziert. Über 80% der Rohfassung wurde zwischen Mai 1999 und Juni 2000 generiert (Abb. 2). Zusätzlich wurden noch 5,7 Millionen Sequenzen

von menschlichen Plasmid-Bibliotheken erzeugt, die durch Klonierung der genomischen DNA von 24 anonymen Spendern entstanden. Jeder dieser Plasmide trägt ein humanes DNA-Insert von ca. 1.000 bis 2.000 Basen Länge. Mit Hilfe dieser Sequenzen können Sequenzvariationen und –polymorphismen zwischen den Individuen und ethnischen Gruppen im Genom identifiziert werden. Um eine hohe Genauigkeit zu erzielen, wurden insgesamt 23 Milliarden oder 23 x 10⁹ Basenpaare sequenziert, d.h. jede Base wurde im Durchschnitt 7,5fach unabhängig voneinander bestimmt.

Zum Zeitpunkt der Publikation der Rohfassung im Februar 2001 waren erst 897 Megabasen d.h. 25% des Genoms in hoher Qualität erfasst (3). Zum Zeitpunkt dieses Vortrags sind mehr als 80% des Genoms lückenlos und liegen in hoher Genauigkeit vor (Genauigkeit: 99,99% d.h. weniger als ein Fehler in 10.000 Basen).

Im Gegensatz zum akademischen Consortium verfolgte Celera Genomics eine andere Strategie, die man auch als gesamte Schrotschussmethode ("whole shotgun sequencing strategy") bezeichnet. Mit Hilfe von verschiedenen Restriktionsenzymen wird die genomische DNA zunächst in drei parallelen Ansätzen verdaut, wobei man darauf achtet, dass im Durchschnitt Fragmente von 2 Kilobasen, 10 Kilobasen und 50 Kilobasen Länge entstehen. Die Fragmentgemische werden dann in präparativen Agarosegelen aufgetrennt, und anschließend isoliert man die genomische DNA der gewünschten Länge aus der Agarose und kloniert diese in geeignete Plasmidvektoren. Anschließend wurden insgesamt 13,5 Millionen Klone aus der 2 Kb-Bibliothek, 10,8 Millionen aus der 10 Kb-Bibliothek und 2,8 Millionen Sequenzen aus der 50 Kb-Bibliothek sequenziert. Die 26 Millionen einzelnen Sequenzen sollten dann mit Hilfe einer eigens von Celera entwickelten Software im Computer wieder zusammengesetzt werden. Entsprechend dieser Strategie sollten die Sequenzpaare der größeren 10kb und 50kb-Klone eine eindeutige Assemblierung der 13,5 Millionen kurzen Sequenzen erlauben. Celera publizierte seine Version des menschlichen Genoms am 16. Februar 2001 in der Zeitschrift "Science" (5).

Die Analyse der publizierten Daten hat nun ergeben, dass die Celera-Version des menschlichen Genoms mehr als 60% der Daten des akademischen HGP-Konsortiums enthält. Da das HGP-Consortium im Gegensatz zu Celera seine Daten täglich im Internet publizierte, konnten die Wissenschaftler von Celera diese Daten herunterladen und bei ihrer Assemblierung verwenden. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Celera ohne die Daten des akademischen HGP-Consortiums nicht in der Lage gewesen wäre, das Genom fehlerfrei zu assemblieren. Die Schrotschussmethode von Celera kann zwar bei kleineren Organismen wie z.B. Bakterien, nicht aber beim menschlichen Ge-

nom angewendet werden. Die Genome von Säugetieren enthalten zu über 50% mittel- und hochrepetitive Sequenzen, die im Computer in einem Schrotschuss-Ansatz nicht fehlerfrei zusammengesetzt werden können. Essentieller Bestandteil der Strategie des HGP-Consortiums ist zunächst die Reduktion der Komplexität des menschlichen Genoms um den Faktor 30 x 10⁴. Das wird durch die Aufteilung des Genoms in ca. 30.000 kleinere Fragmente (BAC/PAC-Klone) erreicht. Die Sequenzierung jedes der 30.000 Fragmente erfolgte individuell und unabhängig von den anderen Fragmenten. Durch diese Strategie wurde der enorm störende Einfluss der mittel- und hochrepetiven Sequenzen im Genom erheblich reduziert.

Im Verlauf des Jahres 2003 sollen alle menschlichen Chromosomen publiziert werden. Dazu müssen die noch vorhandenen Kartierungs- und Sequenzierungslücken geschlossen werden. Nimmt man Chromosom 21 als Goldstandard, so sollte die finale Sequenz des menschlichen Genoms nicht mehr als 300 Lücken aufweisen – ein Ziel, das schwer zu erreichen sein wird. Was am Ende des Humangenompojektes zählt, ist nicht der Wettlauf zwischen dem HGP-Konsortium und Celera, sondern die Sequenz des menschlichen Genoms in der höchst möglichen Qualität. Es ist sehr wichtig zu erreichen, dass die Sequenz des menschlichen Genoms zusammen mit den Sequenz-Annotationen (Interpretationen) für jedes Individuum, für jede öffentliche oder private Institution und Firma ohne Restriktionen jedweder Art zugänglich ist und über viele Jahre und Jahrzehnte zugänglich bleiben wird. Es ist wichtig, dass die Annotation, d.h. die Interpretation zusammen mit der Sequenz dem Benutzer dargeboten wird. Erst die Kombination aus Sequenz und Interpretation, die sich im Laufe der Zeit ständig verändern wird, macht das Genom zu einem einzigartigen wissenschaftlichen Schatz.

1.2 Wieviele Gene sind im Genom codiert?

Längere Zeit hatten die Biologen angenommen, dass das genetische Programm des Menschen von mehr als 100.000 Genen gesteuert wird. Zwischen 1996-98 wurde durch Sequenzierung gezeigt, dass die Bäckerhefe *S. cerevisae* ca. 6.000 Gene, der Rundwurm *C. elegans* ca. 19.000 Gene und die Taufliege *D. melanogaster* ca. 16.000 Gene aufweisen. Aufgrund der geringeren Komplexität dieser Organismen gegenüber höheren Säugetieren schlussfolgerte man, dass im menschlichen Genom ein Vielfaches an Genen enthalten sein müsste. Auch die Sequenzierung von kurzen cDNA-Fragmenten s.g. EST-Fragmenten in den 90er Jahren erhärtete scheinbar diese These. Aus vielen menschlichen Geweben hatte man dutzende cDNA-Bibliotheken hergestellt und Millionen EST-Sequenzen generiert. Vor allem die US-Firmen

Incyte Genomics und Human Genome Science hatten in diese Technologie investiert, um auf diese Weise möglichst eine große Zahl der exprimierten Gene oder mRNAs zu gewinnen. Nach Assemblierung dieser Fragmente erhielt man einen Satz von ca. 100.000 bis 200.000 Contigs, der sich nicht weiter reduzieren ließ. Ende der 90er Jahre stützten alle experimentellen Daten scheinbar die Annahme, dass im Kern einer menschlichen Zelle mehr als 100.000 Gene repräsentiert sind. Die Sequenzierung und Analyse der Chromosomen 21 und 22 zeigte dann zu Beginn des 21. Jahrhunderts, dass beide Chromosomen zusammen nur etwa 750 Gene aufwiesen, sehr viel weniger als ursprünglich angenommen. Da beide Chromosomen etwa 2% des gesamten menschlichen Genoms ausmachen, konnte man die Gesamtzahl der menschlichen Gene mit ca. 37.500 abschätzen (2). Diese Hypothese wurde von mir am 13. Mai 2000 auf dem Cold Spring Harbor Symposium "Genome Sequencing & Biology" zum ersten Mal vertreten und löste eine wissenschaftliche Sensation aus. Es zeigte sich dann schnell, dass diese Hypothese auch durch Resultate anderer Gruppen gestützt wurde. Durch vergleichende Analyse des Genoms des Kugelfisches mit dem der Chromosomen 22 und 21 konnte die Gruppe um Jean Weissenbach in Paris eine Gesamtzahl von ca. 30.000 menschlichen Genen ableiten. Eine kritische Analyse der menschlichen ESTs-Daten von Phil Green's Gruppe in Seattle kam ebenfalls auf ca. 30.000-40.000 Gene. Auch die Analyse der Rohfassung des menschlichen Genoms zeigt, dass im menschlichen Genom weniger als 40.000 Gene enthalten sind (3).

Die Frage, wieviele menschliche Gene durch das Genom genau codiert werden, ist nicht leicht zu beantworten. Sehr wahrscheinlich wird es noch viele Jahre dauern, bis wir die Gesamtzahl aller Gene mit großer Genauigkeit bestimmt haben. Zunächst müssen die Sequenzen aller menschlichen Chromosomen möglichst lückenlos vorliegen. Dies wird im Laufe des Jahres 2003 der Fall sein. Gegenwärtig haben wir umfangreiche experimentelle Beweise für ca. 12.000 menschliche Gene. Für diese Gruppe liegen auch komplette menschliche mRNA's vor, so dass wir in der Lage sind, die Exon/Intron-Struktur und die Größe dieser Gene genau zu bestimmen. Weitere ca. 10.000 Gene können mit Hilfe von bioinformatischen Methoden aus der Genomsequenz vorhergesagt werden. Es gibt eine Vielzahl von bioinformatischen Methoden, die einzeln oder in Kombinationen angewendet werden, um Genvorhersagen zu treffen. Die Güte der Vorhersagen kann sehr verschieden sein, je nachdem, welche Methoden bzw. Methodenkombinationen verwendet werden. Oft werden ab-initio Methoden, die auf statistischen Modellen beruhen, mit anderen in-silico Verfahren kombiniert, bei denen das codieren-

de Potential neuer DNA-Sequenzen mit allen bereits bekannten Proteinen und DNA-Sequenzen verglichen wird. Dabei fließen auch Informationen über regulative Sequenzen (Spleißsignale, Promotersequenzen, CpG-Inseln) ein. Die Ähnlichkeit einer unbekannten DNA-Sequenz mit einem bereits experimentell beschriebenen Protein- oder RNA-Abschnitt, dessen Sequenz in den internationalen Datenbanken erfasst ist, erlaubt es dann, ein hypothetisches Genmodell aufzustellen. Diese in-silico Genmodelle erstrecken sich oft nur über einen kleinen Teilbereich des hypothetischen Gens, nämlich über die Regionen, wo es Ähnlichkeiten zwischen den konservierten Proteindomänen gibt. Die in-silico Genmodelle sind zunächst reine Arbeitshypothesen und müssen durch aufwendige experimentelle Methoden (Klonierung, RT-PCR, in-situ Hybridisierung) bewiesen werden. Das heißt, während wir von ca. 22.000 Genen eine recht gute Vorstellung haben, liegen uns von weiteren 10.000-15.000 Genen nur sehr unvollständige und fehlerhafte Genmodelle vor. Menschliche Gene, die keinerlei Ähnlichkeit zu bekannten Genen und Proteinen aufweisen, können durch gängige bioinformatische Methoden nicht vorhersagt werden. Nur ab-initio Methoden erlauben, Modelle solcher hypothetischen Gene vorherzusagen. Diese Methoden weisen jedoch eine hohe Rate von falsch-positiven Vorhersagen auf.

Die Bestimmung der genauen Zahl aller menschlichen Gene ist auch deshalb so schwierig, weil relativ viele Gene nur auf sehr niedrigem Niveau, zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt und nur in bestimmten Zellen bzw. Geweben exprimiert werden. Diese Gene wird man experimentell nur dann finden, wenn cDNA-Bibliotheken dieser Gewebe bzw. Zellen hergestellt und sequenziert bzw. wenn Genmodelle mit Hilfe der RT-PCR in diesen Geweben überprüft werden. Dies ist ein sehr aufwendiges und langwieriges Unterfangen.

1.3 Vergleichende Analyse mit anderen Säugergenomen

Kürzlich wurde in "Nature" die Rohfassung des Mausgenoms publiziert (6). Bald werden auch Rohfassungen der Genome der Ratte und des Schimpansen zugänglich sein. Die vergleichende Analyse der Genome verschiedener Säuger hat eine Reihe von Vorteilen. Nur auf diesem Weg wird man die Zahl und Struktur der menschlichen Gene relativ genau bestimmen können. Die Analyse des menschlichen Genoms im Vergleich mit Genomen von Wirbeltieren und wirbellosen Organismen reicht hierfür nicht aus. Zweitens wird der Vergleich des menschlichen Genoms mit dem von Maus und Ratte erlauben, die Vielfalt der regulativen Sequenzen in Säugergenomen zu entdecken und deren Funktionen aufzuklären. Dadurch wird es auch möglich sein, die prinzi-

piellen Fragen der Regulation der Genexpression besser zu adressieren. Und schließlich wird der Vergleich verschiedener Säugergenome insbesondere der Vergleich von Mensch und Primaten die Rolle von Sequenzvariationen bzw. Polymorphismen in Bezug auf ihre Funktionen aufhellen.

1.4 Von der Sequenz eines Gens zu seiner Funktion

Das HGP Projekt hat sehr viele mittel- und langfristige Implikationen, die weit über das Kernprojekt d.h. die eigentliche Sequenzierung der ca. 3 Milliarden Basen hinausgehen, die das genetische Programm einer menschlichen Zelle ausmachen. Die schwierige Frage war und ist, wie bestimmen wir, ausgehend von der Sequenz, die Funktion aller menschlichen Gene in der gesunden Zelle, aber auch im kranken Organismus. Dabei kann man zwei Wege beschreiten. Entweder versucht man, die Funktion eines Gens im gesunden Gewebe aus seiner Sequenz abzuleiten und tastet sich dann zur veränderten Funktion des mutierten Gens im Rahmen einer erblich bedingten oder mitbedingten Erkrankung vor. Oder man identifiziert zunächst Mutationen in menschlichen Genen, die die genetische Ursache bestimmter monogener Erkrankungen bzw. genetische Teilkomponenten multifaktorieller Erkrankungen darstellen. Nachdem man die Funktion eines Gens über seine verursachende Rolle bei einer Erkrankung eingegrenzt hat, versucht man dann, die Funktion des Gens in der gesunden Zelle aufzuklären. Für die meisten der ca. 30.000-40.000 verschiedenen menschlichen Gene und den daraus ableitbaren Transkripten sind genaue zelluläre Funktionen bisher nicht beschrieben worden. Für etwa eintausend Gene wissen wir, dass sie in mutierter Form monogene Erkrankungen auslösen. Aber auch bei diesen Genen kennen wir meistens nicht die genaue Funktion in der normalen Zelle. Die im Internet verfügbare Sequenz des menschlichen Genoms hat die Identifizierung von Krankheitsgenen für monogene Erkrankungen enorm vereinfacht. Vor zehn, fünfzehn Jahren dauerte die Suche nach einem Krankheitsgen viele Jahre und verschlang enorme Ressourcen. Heute ist das eine Sache von Wochen oder Monaten. Für die meisten der etwa tausend bekannten Krankheitsgene sind dutzende, manchmal auch hunderte Mutationen beschrieben worden. Humangenetiker versuchen, die verschiedenen Mutationen in einem bestimmten Gen mit den beobachteten Phänotypen der Erkrankung zu korrelieren.

1.5 Die Aufklärung der genetischen Ursachen multifaktorieller Erkrankungen erfordert neue Strategien

Sehr viel schwieriger ist es, die Funktion derjenigen menschlichen Gene, Transkripte bzw. Genprodukte zu bestimmen, die nicht mit monogenen Erkrankungen assoziiert sind. Bisher ist es den Wissenschaftlern nicht gelungenetischen Komponenten für die große Gruppe multifaktoriellen Erkrankungen zu identifizieren. Zu dieser Gruppe zählen die meisten Volkskrankheiten wie z.B. Krebs, Diabetes, Alzheimer, Parkinson, Multiple Sklerose und die meisten Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Sie werden durch eine Vielzahl von Faktoren verursacht. Neben vielen verschiedenen genetischen Faktoren (z.B. Mutationen oder Polymorphismen in Genen) spielen vor allem auch bisher nicht verstandene Umweltfaktoren eine wichtige Rolle. Vielversprechend sind experimentelle Strategien, bei denen in Modellorganismen wie z.B. der Maus und der Ratte ein bestimmtes Gen gezielt ausgeschaltet ("knock-out") wird. Anschließend untersucht man den Effekt des fehlenden Gens auf den resultierenden Phänotyp. Man kann auch mehrere Gene gleichzeitig ausschalten, bzw. Gruppen von Genen nacheinander einzeln "ausknocken". Seit kurzem benutzt man kurze RNA-Moleküle, s.g. "antisense RNA" oder "siRNA" zum Ausknocken von Genen. Vor allem die siRNA-Technologie ist sehr vielversprechend. Bei niedrigen Eukaryonten wie der Bäckerhefe, des Rundwurmes und der Taufliege gibt es Forschungsprogramme, bei denen man systematisch alle Gene dieser Organismen einzeln ausschaltet. Ähnliche Programme werden gegenwärtig für die Maus verwirklicht. Man kann aber auch Gene in einem Modellorganismus überexprimieren. Auf diese Weise hergestellte transgene Tiere (Zebrafisch, Maus, Ratte) eignen sich ebenfalls sehr gut, den Effekt einzelner Gene zu studieren.

1.6 Vom Genom zum Proteom und zur Komplexität einer menschlichen Zelle

Die Situation wird noch komplexer, wenn man bedenkt, dass durch gewebsspezifisches Spleißen mehrere mRNA's oder Transkripte aus einem einzigen Gen entstehen können. Bei Säugetieren wie z.B. dem Menschen beobachtet man ca. 3 differentielle Spleißprodukte für jedes Gen. Bei einigen Genen wurden sogar mehrere dutzend verschiedene Spleissvarianten identifiziert. Das menschliche Transkriptom umfasst demnach etwa 100.000–200.000 verschiedene mRNAs, die an den Ribosomen in Proteine übersetzt werden. Im Anschluss an die Proteinsynthese (Translation) kann das Protein zusätzlich

noch durch verschiedene Zucker- oder Phosphatreste modifiziert werden. Diese posttranslationalen Modifikationen sind Signale für den zielgerichteten Transport von Proteinen oder Proteinvarianten an bestimmte zelluläre Orte. Der gesamte Raum aller Proteine (Proteom) umfasst demnach wahrscheinlich eine halbe Million verschiedener Eiweiße, von denen jedoch nur ein Bruchteil in jedem Zell- bzw. Gewebetyp exprimiert ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch die Aufklärung des menschlichen Genoms sehr deutlich geworden ist, dass starre und mechanistische Auffassungen ungeeignet sind, um die Komplexität von Lebensprozessen zu beschreiben. So ist die genetische und zelluläre Komplexität einer Zelle bzw. eines Organismus nicht allein durch die Anzahl der Gene bestimmt, die das Genom dieser Zelle bzw. des Organismus ausmachen. Der Mensch hat nur etwa doppelt so viele Gene wie der Rundwurm C. elegans und etwa dreimal so viele Gene wie die Taufliege D. melanogaster. Die Komplexität einer Säugerzelle muss durch andere Faktoren bestimmt sein. Sie wird auch nicht allein durch die Anzahl der Transkripte und Proteine bestimmt, die z.B. in einer menschlichen Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert werden. Erst wenn man die enorme Zahl der möglichen Protein-DNA- und Protein-Protein-Wechselwirkungen berücksichtigt und die Art und Weise, wie Signale zwischen Zellen und von der äußeren Membran in den Kern geleitet werden, beginnt man, sich schrittweise an die Komplexität von Lebensprozessen anzunähern. Diese wird vor allem durch dynamische Prozesse in Raum und Zeit wie z.B. Gen- und Proteinexpression, Proteintransport, Realisierung der Proteinfunktion in bestimmten zellulären Kompartimenten und Signaltransduktion beschrieben. Komplizierte Wechselwirkungsmechanismen. -netzwerke und -kaskaden sind fast völlig unerforscht. Chip-basierte Technologien zum Profiling der Expressionszustände von RNA's und Proteinen bieten einen ersten Ansatz, sich dieser Komplexität zu nähern.

2. Sequenzvariationen und neue therapeutische Optionen

Prädispositionen zu Erkrankungen sowie beobachtete Nebenreaktionen auf bestimmte Medikamente werden hauptsächlich durch individuelle Unterschiede in der Sequenz unseres Genoms bzw. in der Sequenz bestimmter Gene verursacht. Durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms wissen wir, dass etwa je 1.000 Basen eine einfache Sequenzvariation oder polymorphe Base vorkommt. In unserem Genom gibt es also etwa 3 Millionen solcher polymorpher Basen, die man auch als "Single Nucleotide Polymorphism" (SNP) bezeichnet. Da das HGP-Consortium und Celera Genomics DNA von

anonymen Spendern einsetzte, kann man aus dem Datensatz beider Teams derartige SNP's mit Hilfe geeigneter Softwareprogramme herausfiltern. Das akademische Konsortium poolte die DNA von 24 Spendern und identifizierte ca. 1,4 Millionen verschiedene SNP's (3,7), während die Daten Celera's von 6 Spendern herrührten und insgesamt 2 Millionen SNP's identifiziert wurden (5).

Nur ungefähr 150.000–300.000 dieser SNP's liegen in protein-codierenden Abschnitten menschlicher Gene oder in kritischen Promoterregionen und können deshalb zu Aminosäureaustauschen bzw. zu einer wesentlichen Veränderung der Expressionshöhe des entsprechenden Proteins führen. Mit Hilfe von hochdichten Genchips verschiedener Firmen wie z.B. Affymetrix oder Febit kann man die Verteilung von hunderten oder gar tausenden SNP's zwischen Individuen und bestimmten Patienten, bei denen Nebenwirkungen beobachtet wurden, aber auch zwischen ethnischen Gruppen und Populationen in der Keimbahn aber auch in bestimmten Geweben untersuchen. Wenn man die SNP-Muster dann mit den klinischen Daten z.B. über die Wirkung oder Nichtwirkung eines Medikaments oder über beobachtete Nebenwirkungen korreliert, kann man den Einfluss des Genotyps eines Individuums oder einer bestimmten Subpopulation auf z.B. wichtige therapeutische Medikamente bestimmen. Diese auch als Profiling von Patienten bezeichneten Strategien haben ein sehr großes Potential und ermöglichen in der Zukunft, Medikamente in einem Maße patientenspezifisch zu dosieren, wie es heute nicht möglich ist. Außerdem könnte man vor Beginn einer medikamentösen Therapie diejenigen Patienten identifizieren, die von dem Medikament therapeutisch nicht profitieren oder gar Nebenwirkungen zu erwarten hätten. Für diese Gruppe von Patienten könnten frühzeitig alternative medikamentöse Therapien berücksichtigt werden. Das Profiling von Patienten sollte auch bei den sehr aufwendigen klinischen Prüfungen von neuen Medikamenten in Phase II und III eingesetzt werden, da diese zielgerichteter, schneller und ressourcenschonender durchgeführt werden könnten. Die Stratifikation von Populationen eröffnet auch vielfältige Möglichkeiten beim Design neuer Medikamente und Therapien. Diese neuen Strategien in der Diagnostik, Prävention und Therapie werden in der mittel- und langfristigen Zukunft zu einem radikalen Wandel der Medizin führen (Abb. 3).

3. Krebs und Krebsgene

3.1 Prävalenz von Tumoren

Krebs ist nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. In den westlichen Industrienationen erkranken jedes Jahr ca. 10 Mil-

lionen Menschen an Krebs. Die verschiedenen Formen von Krebs verursachen jährlich ca. 4-5 Millionen Todesfälle in der westlichen Welt. Tab. 2 zeigt die Häufigkeit und die 5-Jahresüberlebensraten für die wichtigsten soliden Tumore für die USA im Jahr 2001. Prostata-, Brust-, Lungen- und Colonkarzinom sind mit ca. 198.000 bis 170.000 Neuerkrankungen pro Jahr in den USA die häufigsten Tumoren. Während Colon-, Brust- und Prostatakrebs 5-Jahresüberlebensraten von ca. 75-90% aufweisen, zeigt das Lungenkarzinom nur eine geringe Überlebensrate von 14%. Das Pankreaskar-zinom ist mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 4% noch tödlicher. 96% aller neu diagnostizierten Patienten mit Pankreaskarzinom versterben in den ersten sechs Monaten nach Diagnose.

Für fast alle soliden Tumore gilt, dass existierende Therapien oft nur eine limitierte Effektivität aufweisen. Speziell für die sehr aggressiven Tumoren der Bauchspeicheldrüse, der Lunge, des Eierstocks, aber auch für bestimmte Gehirntumoren (Gliome) und für das Nierenkarzinoms gibt es keine wirksamen Therapien.

3.2 Gegenwärtiger Stand der Krebs-Therapie

Solide Tumore werden gewöhnlicherweise durch chirurgische Eingriffe entfernt. Im Anschluss wird oft eine Chemotherapie - oft auch in Kombination mit Radiotherapie - durchgeführt. Bei einigen Tumoren erfolgt die Radiooder Chemotherapie auch vor dem chirurgischen Eingriff.

Die Entwicklung eines neuen Medikamentes zusammen mit der präklinischen und klinischen Entwicklung dauert in der Regel 15-20 Jahre und kostet im Durchschnitt 300-500 Millionen US\$ (Abb. 4). Die Medikamenten-Entwicklung stellt eine Pyramide dar. Die Erfolgsrate, gemessen an den ursprünglich initiierten Forschungsprojekten, beträgt ca. 3%.

Im Laufe der letzten drei Jahrzehnte ist eine Vielfalt von chemotherapeutischen Agenzien durch die Pharmazeutische Industrie entwickelt worden (Abb. 5). Darunter befinden sich klassische zytotoxische Medikamente wie alkylierende Agenzien, Anti-Tumor-Antibiotika, Antimetaboliten, Pflanzenalkaloide, chemopräventive Agenzien aber auch verschiedene Hormone (z.B. Antiöstrogene). In den letzten zwanzig Jahren sind auch neue Therapiestrategien wie Immuntherapien und monoklonale Antikörper entwickelt worden. Von besonderem Interesse sind gegenwärtig vor allem humane monoklonale Antikörper (mAB), die durch transgene Mäuse erzeugt werden. Derartige Technologien und Produkte werden durch Firmen wie Abgenix, Medarex, Genmab und andere entwickelt. Aber auch humanisierte Antikörper und chimäre Maus/Mensch-Antikörper haben ein großes Potential und

sind von Firmen wie Genentech und Centocor erfolgreich in den Markt gebracht worden. Von Firmen wie CAT, Morphosys und Dyax werden sehr intensiv auch "Phage Display"-Technologien vorangetrieben, mit denen man hochspezifische Binder, s.g. "single chain" Antikörper (scAB), erzeugen kann. Mit Hilfe einer weiteren Technologie kann man auch bispezifische Antikörper herstellen. Diese docken auf der einen Seite hochspezifisch auf der Tumorzelle an, besitzen am anderen Ende aber noch eine zweite Bindungsstelle für z.B. CD3, über die dann körpereigene Killerzellen wie z.B. Lymphozyten zur Tumorzelle mit dem Ziel rekrutiert werden, diese zu töten. Eine Reihe von Firmen wie z.B. Mikromet entwickeln derartige Strategien. Bispezifische Antikörper befinden sich noch in der Entwicklung und sind nicht im Markt zugelassen.

Circa 14 verschiedene mAB sind gegenwärtig durch die FDA zugelassen. Darunter sind mit Herceptin, Campath, Rituxan und Mylotarg vier Antikörper, die zur Therapie von Leukämien, Lymphomen und einigen soliden Tumoren wie z.B. Her2neu-positiven Mammakarzinomen zugelassen sind (Tab. 3). Vier weitere Antikörper, die hochspezifisch an Tumorzellen binden, diese aber über die mitgebrachte radioaktive Strahlung töten sollen, sind noch in der klinischen Testung.

3.3 Tumorigenese, Genetische Analyse und Krebsgene

Krebs kann sich in fast jedem Teil des Körpers, jedem Gewebe und Zelltyp entwickeln. Krebs ist durch unkontrolliertes Zellwachstum gekennzeichnet. Normalerweise reproduzieren sich Zellen durch Zellteilung mit einer Geschwindigkeit, die im Gleichgewicht mit dem natürlichen Zelltod (Apoptose) ist. Auf diese Weise werden abgestorbene Zellen ersetzt. Tumorzellen haben ihre Fähigkeit zur Apoptose verloren und teilen sich ununterbrochen.

Bei den verschiedenen Krebsformen unterscheidet man familiäre und sporadische Tumoren. Familiäre Tumoren sind relativ selten, machen nur 5% aller Krebserkrankungen aus und werden durch Mutationen in bestimmten Genen in der Keimbahn verursacht. Mutationen in den Genen BrCa1 und BrCA2 bewirken z.B. bestimmte Formen des Mammakarzinoms, die wie andere erblich bedingte Erkrankungen von einer Generation auf die nächste vererbt werden. Man erkennt erblichen Brustkrebs daran, dass in einer Familie mehrere Frauen in verschiedenen Generationen am Mammakarzinom erkrankt bzw. verstorben sind. Es gibt auch eine Reihe von Colonkarzinomen, die erblich sind und durch Läsionen in bestimmten Genen verursacht werden. Im Gegensatz dazu sind sporadische Tumoren mit ca. 95% viel häufiger. Sie werden durch sequentielle Mutationen in Körperzellen in einer Vielzahl von

Genen bewirkt. Zufälligerweise verändert eine dieser Mutationen die Funktion eines kritischen Gens und führt zur Entstehung eines Zellklons, der einen bestimmten Wachstumsvorteil gegenüber den Nachbarzellen aufweist. Das Resultat ist ein expandierender Zellklon (Abb. 6). Weitere Mutationen in anderen Genen führen zu Wellen klonaler Expansionen und zu Zellen, die neben Wachstumsvorteilen zusätzliche Fähigkeiten erwerben. So können diese Zellen durch Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) in die umgebenden Gewebe eindringen, die Basalmembran durchbrechen (Abb. 6) und sich über das Blut- und Lymphsystem an anderen Stellen des Körpers absiedeln, indem sie wiederum Basalmembranen durchdringen und Tochtergeschwülste, s.g. Metastasen bilden. Dieser Prozess wird als Metastasierung bezeichnet und ist durch die Veränderung einer Vielzahl von zellulären Funktionen gekennzeichnet. Bedenkt man die Komplexität dieses Vorgangs, könnten sehr viele verschiedene Gene beteiligt sein.

Genetische Analysen solider Tumoren mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden, die man als Verlust der Heterozygosität ("loss of heterozygosity" oder LOH) und Vergleichende Genomhybridisation ("comparative genome hybridisation" oder CGH) bezeichnet, haben gezeigt, dass viele Regionen des Genoms in Tumoren amplifiziert oder verloren gegangen sind. Hunderte von Genorten (Loci) sind an der Tumorentstehung, -progression und -metastasierung beteiligt. LOH- und CGH- Analysen haben leider den Nachteil, dass ihre Auflösung sehr gering ist. Die Eingrenzung der kritischen Genloci gelingt deshalb leider nur mit einer Auflösung von 5-50 cM. Manchmal sind ganze Chromosomenarme in Tumoren aberrant. Fast ein Drittel des menschlichen Genoms ist in Tumoren genetisch instabil und deshalb in die Karzinogenese involviert. Es hat sich als sehr schwierig erwiesen, Tumorsuppressoren und Onkogene mit Hilfe von Positionalen Klonierungsverfahren auf der Basis von LOH und CGH zu identifizieren, die mit der Entstehung und Progression von sporadischen Tumoren assoziiert sind. Oft sind in der kritischen Region mehrere hundert Kandidatengene. Selbst wenn die kritische Region auf wenige cM reduziert wurde, sind immer noch zu viele Gene auf ihre Assoziation mit Tumorentstehung und -progression zu testen. Man kann versuchen, die Auflösung von CGH zu erhöhen, indem man BAC oder YAC Klone aus den kritischen Chromosomenregionen systematisch auf Objektträger aufspottet, die man für die CGH-Analysen einsetzt. Diese Methode, auch als Matrix-CGH bezeichnet, ist zwar konzeptional elegant, erweist sich aber technisch als sehr schwierig. Eine andere Option ist die Verwendung von hochdichten cDNA-Arrays für die CGH. Aber auch die LOH-Analysen werden von der Verfügbarkeit der Genomsequenz profitieren, da viele neue allelspezifische LOH-Marker leicht identifiziert werden können, die dazu beitragen, die Auflösung in einer kritischen LOH-Region zu erhöhen.

Ein anderes Problem ist, dass viele tumor-assoziierte Gene keine detektierbaren molekularen Läsionen wie z.B. homozygote Deletionen beider Allele oder heterozygote Mutationen aufweisen, die den offenen Leserahmen (ORF) verändern und zu verkürzten nichtfunktionalen Proteinen führen. Ein anderer wichtiger Aspekt moderner Tumorgenetik ist, dass viele tumor-assoziierte Gene einen Verlust der Expression zeigen, der nicht durch Mutationen oder Deletionen bewirkt wird, sondern aufgrund von Hypermethylierungen der Promotoren zustande kommt. Aufgrund epigenetischer Mechanismen sind viele potentielle Krebsgene heute experimentell "unsichtbar" und können nur über aufwendige systematische Methylierungsstudien der Kandidatengene "sichtbar" gemacht werden.

Trotz dieser grundsätzlichen Probleme sind eine Reihe wichtiger Tumorsuppressor-Gene identifiziert worden, wie z.B. p53, p16, RB1, APC, MLH1, MSH2, PTEN, WT1, ATM, BrCa1/2, PTCH, CDH1 und CDKN1C, um nur einige zu nennen. In mutierter Form verursachen einige dieser Gene familiär vererbbare Tumoren. Mutationen in diesen Tumorsuppressoren sind aber auch in sporadischen soliden Tumoren beobachtet worden. Außerdem wurden mehr als 100 dominante Onkogene identifiziert, viele davon in hämatologischen Tumoren wie Lymphomen und Leukämien. Mit Hilfe der fluoreszenten in-situ Hybridisation (FISH) konnten die Bruchpunkte in diesen hämatologischen Tumoren relativ leicht identifiziert und kloniert werden.

Die meisten tumor-assoziierten Gene sind bisher jedoch noch nicht identifiziert worden. Man nimmt an, dass einige hundert Gene in die Tumorigenese involviert sind und potentielle molekulare Angriffspunkte (Targets) in der Onkologie für die Entwicklung neuer Therapeutika darstellen. Diese Schätzung basiert auf der morphologischen, histopathologischen und genetischen Heterogenität solider Tumoren sowie auf der Komplexität zellulärer Prozesse der Tumorprogression und Metastasierung. Nur ein paar Dutzend dieser Gentargets konnten in den letzten Jahren gefunden werden.

4. Einsatz genomischer und genetischer Strategien führt zu neuen Krebs-Therapeutika

Es gibt eine Reihe genomischer Strategien, um neue Targets in der Onkologie zu entdecken. Eine Möglichkeit ist, mit Hilfe der Sequenz des menschlichen Genoms Listen plausibler Kandidatengene zu generieren, indem man nach Paralogen bekannter Krebsgene sucht (8). Man kann aber auch nach Genen suchen, die z.B. in DNA-Reparatur, Zellzyklus und Apoptose involviert sind. Modellorganismen wie die Bäckerhefe und der Rundwurm *C. elegans* sind dafür sehr gut geeignet, da man derartige Gene in diesen Organismen sehr gut

studieren kann. Nachdem Gene in diesen Modellorganismen charakterisiert wurden, sucht man mit Hilfe geeigneter bioinformatischer Verfahren im menschlichen Genom nach den entsprechenden orthologen Genen. Eine weitere wertvolle Strategie ist die Suche nach Genen, die bei der Bildung neuer Blutgefäße beteiligt sind. Dieser Prozess - auch als Angiogenese bezeichnet ist für die Bildung und die Aufrechterhaltung von Tumoren wichtig. Die Blockierung der Angiogenese (Antiangiogenese) stellt einen neuen Ansatzpunkt zum rationalen Design neuer Therapeutika dar.

Die Entwicklung neuer therapeutisch wirksamer Inhibitoren auf der Basis kleiner organischer Moleküle oder auf Antikörperbasis, die entweder die Apoptose in Tumorzellen anschalten oder verstärken oder die Angiogenese unterdrücken, ohne gleichzeitig toxisch zu sein, stellt eine große Herausforderung für die pharmazeutische und biotechnologische Industrie dar.

Eine andere vielversprechende Strategie ist es, Proteintargets zu identifizieren, die in größerer Menge auf der Oberfläche von Tumorzellen oder in der Tumorzelle exprimiert sind, nicht jedoch oder in sehr geringem Umfang auf oder in den normalen Epithelien bzw. Zellen. Die Spezifität der Targetexpression und der Grad der differentiellen Expression zwischen Tumor- und Normalzelle determinieren das therapeutische Fenster eines auf diese Weise identifizierten Targets. Proteintargets, die auf der äußeren Membran der Tumorzelle exprimiert sind, können mit humanen monoklonalen Antikörpern angegriffen werden. Man versucht Antikörper zu entwickeln, die hochspezifisch an den Rezeptor binden, aber gleichzeitig die Signalübertragung ins Innere der Zelle modulieren. Antikörper wie C225/Erbitux gegen EGFR oder Herceptin gegen ErbB2/Her2neu sind Vertreter dieser Klasse und sind gegen verschiedene Vertreter der Tyrosinkinaserezeptoren (TKR) gerichtet. Targets im Zytosol einer Zelle können mit Hilfe von Inhibitoren mit geringer Molekülgröße blockiert werden. Ein Beispiel dieser Klasse ist das neue Medikament "Iressa" von AstraZeneca, das an die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase von EGFR bindet und dadurch die Phosphorylierung von Zielproteinen weiter stromabwärts verhindert. Abb. 7 zeigt neben Iressa eine Reihe weiterer neuer Medikamentenkandidaten auf der Basis kleiner Moleküle, die ebenfalls die Tyrosinkinaseaktivität einiger Mitglieder der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren EGFR und Her1-4 inhibieren und sich gegenwärtig in der klinischen Testung befinden.

Neue Gentargets müssen definitionsgemäß zu bestimmten Proteinklassen gehören, für die in der Vergangenheit der Nachweis erbracht wurde, dass gegen sie wirksame Arzneimittel entwickelt werden konnten. Diese Targets bezeichnet man als "drugable". Dazu gehören bestimmte Transmembranproteine wie die große Familie der G-gekoppelten Rezeptoren, die Familie der Ty-

rosinkinase-Rezeptoren, bestimmte sezernierte Proteine und ihre Rezeptoren, Kinasen (hier wiederum bevorzugt Tyrosinkinasen), Phosphatasen und bestimmte Proteasen wie z.B. Serinproteasen oder Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Ein Gentarget sollte notwendigerweise in einer signifikanten Zahl der Tumorpatienten hochreguliert sein und ein therapeutisch nutzbares Fenster der Expression aufweisen. Der Wert eines Targets steigt jedoch erheblich mit dem Grad seiner Validierung. Es ist notwendig, in zellulären Assays zu zeigen, dass die Herunterregulation eines Targetproteins durch mAB, antisense RNA oder siRNA die Proliferation, Invasion oder Motilität der Zellen beeinflusst. Überexpression eines Targets sollte zu einer Reduktion der Apoptose im zellulären System führen, während Herrunterregulation die Apoptose stimulieren sollte. Die Bindung eines Arzneimittelkandidaten (mAB, Inhibitoren mit kleinem Molekulargewicht, antisense/RNAsi/Ribozym) an das Target sollte in entsprechenden orthotopischen und subkutanen Mausmodellen signifikant das Tumorwachstum inhibieren.

5. Die Vision von metaGen

metaGen ist eine biopharmazeutische Forschungs- & Entwicklungsfirma, die innovative genomische, genetische und molekular-pathologische Technologien für die Entwicklung neuer Verfahren für die Diagnose und Therapie von soliden Tumoren einsetzt. Das F&E Programm von metaGen ist auf das Mamma- und Prostatakarzinom sowie auf Tumore der Lunge und des Colon gerichtet. Außerdem werden noch Eierstock- und Blasentumore bearbeitet.

Das Verfahren von metaGen zur Identifikation und Selektion validierter Targets in der Onkologie umfasst eine Technologieplattform, bei der eine Reihe wichtiger Verfahren und Methoden kombiniert werden. Zunächst wird mit Hilfe eines klinischen Netzwerks, das über ganz Deutschland verteilt ist, in allen sechs Tumorindikationen frisches Tumormaterial und korrespondierendes Normalgewebe zur Verfügung gestellt. Unter Nutzung der Laser-Mikrodissektion, deren Grundprinzip in Abb. 8 dargestellt ist, werden aus den sehr heterogenen Tumoren die Tumorzellen und normale Epithelzellen vom gleichen Patienten gewonnen und angereichert (Abb. 9). Dazu wird in einer Serie von 10-20 Gefrierschnitten, die vom gleichen Patienten stammen und ca. 6 Mikrometer dünn sind, die Tumorfoci bzw. das normale Epithel mit Hilfe einer "Maus" im Mikroskop angezeichnet. Mit Hilfe eines UV-Lasers, der über das Objektiv eines Umkehrmikroskops auf den Schnitt eingekoppelt wird, werden dann alle markierten Tumorfoci bzw. das normale Epithel automatisch ausgeschnitten. Um ca. 50 Tumore und das korrespondierende Normalgewebe zu mikrodissektieren, braucht man mit 2 Laser-Mikrodissek-

tions-geräten ca. ein Jahr. Die Mikrodissektion von normalen Epithelien ist besonders schwierig und dauert in der Regel dreimal länger als die Mikrodissektion von Tumorfoci. Besonders aufwendig und schwierig ist die Mikrodissektion von Epithelien des Pankreas- und Lungenkarzinoms. Bei vielen Tumoren (Mamma-, Ovarial-, Pankreas-, Blasenkarzinom) ist es auch sehr schwierig, Normalepithel vom gleichen Patienten zu gewinnen. Hier muss man sich mit nicht gepaarten Geweben begnügen bzw. verschiedene Tumorstadien miteinander vergleichen, z.B. Tumorzellen von invasiven mit nichtinvasiven Tumoren oder Primärtumore mit Rezidiven oder Metastasen. Anschließend wird die RNA aus den Tumorzellen bzw. aus den Epithelien in parallelen Ansätzen isoliert, amplifiziert und mit Fluroeszenzfarbstoffen markiert. Dann werden mit Hilfe von proprietären hochdichten Genchips RNA-Profile der Tumorzellen und der korrespondierenden Normalzellen erstellt (Abb. 10). Für jedes Indikationsgebiet werden RNA-Profile von 25-50 Patienten erhoben und über eine bioinformatische Plattform miteinander verglichen. Wir benutzen seit über fünf Jahren die Affymetrix Chip Technologie, da sie erlaubt, eigene hochdichte Genchips zu entwerfen, die sich für die gleichzeitige Analyse von 6.000 bis zu 20.000 Genen sehr gut eignen. Die proprietären metaGen Chips zeichnen sich durch ein hohes Discovery Potential aus, da sie auf die Erfordernisse der Targetidentifizierung der Biotechund Pharmazeutischen Industrie spezifisch zugeschnitten sind (9). Kandidatengene, die in einer großen Zahl von Tumorpatienten differentiell exprimiert d.h. z.B. hochreguliert sind, werden durch eine Vielzahl von in-vitro und invivo Assavs validiert, bevor eine Entscheidung über eine mögliche präklinische Entwicklung einzelner Kandidaten getroffen wird.

Literatur

Dunham, I. et al. The DNA sequence of human chromosome 22. Nature 1999; 402: 489–495.

Hattori, M. et al.. The DANN sequence of human chromosome 21. Nature 2000; 405: 311–319.

Lander, E. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001; 409: 860–921.

McPherson, J.D. et al. A physical map of the human genome. Nature 2001: 409: 934–941.

Venter, J.C. et al. The sequence of the human genome. Science 2001; 291: 1304–1351.
Chinwalla A.T. et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature 2002; 420: 520–562.

Sachidanandam, R. et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 2001; 409: 928–933.

Futreal, P.A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J.C., Wooster, R., Stratton, M.R. Cancer and genmics. Nature 2001; 409: 850–852.

Pilarsky, C.P., Schmitt, A.O., Dahl. E., Rosenthal, A. Microarrays – chances and challenges. Current Opinion in Molecular Therapeutics 1999; 1: 727-736.

Tabellen und Abbildungen*

| Sequenzierungs Center | Leiter | Humane Sec | quenz (Mb) |
|---|----------------|------------|------------|
| | | Total | Fertige |
| 1. Whitehead Institute, Cambridge | E. Lander | 1196,8 | 46,5 |
| 2. The Sanger Centre, Hixton | J. Sulston | 970,7 | 284,3 |
| 3. Washington University, St. Louis | R. Waterston | 765,9 | 175,2 |
| 4. DOE JGI, Walnut Creek | T. Hawkins | 377,9 | 78,4 |
| 5. Baylor College of Medicine, Houston | R. Gibbs | 345,1 | 53,4 |
| 6. RIKEN, Tokyo | Y. Sakaki | 203,1 | 16,9 |
| 7. Genoscope, Evry | J. Weissenbach | 85,9 | 48,8 |
| 8. Genome Therapeutics, Waltham | D. Smith | 71,3 | 7,0 |
| 9. IMB, Jena | A. Rosenthal | 49,8 | 17,7 |
| 10. Genomics Institute, Beijing | H. Yang | 42,8 | 6,2 |
| 11. Institute of Systems Biology, Seattle | L. Hood | 31,2 | 9,6 |
| 12. Genome Technology Centre, Stanford | R. Davies | 29,7 | 3,5 |
| 13. Human Genome Centre, Stanford | R. Myers | 28,1 | 9,1 |
| 14. University of Washington, Seattle | M. Olson | 24,1 | 14,6 |
| 15. Keio University, Tokyo | N. Shimizu | 17,3 | 13,0 |
| 16. University of Texas, Dallas | G. Evans | 11,6 | 7,0 |
| 17. University of Oklahoma, Oklahoma | B. Roe | 10,0 | 9,1 |
| 18. MPI Molekulare Genetik, Berlin | J. Ramser | 7,6 | 2,9 |
| 19. GBF, Braunschweig | H. Blöcker | 4,6 | 2,3 |
| 20. Cold Spring Harbor Laboratory | R. McCombie | 4,3 | 2,1 |
| Other | | 59,5 | 35,9 |
| Total | | 4338,2 | 842,0 |

Tab. 1: Humane DNA Sequenz in der HTGS-Abteilung von Genbank im October 2000

^{*} Der Beitrag von André Rosenthal enthält im Original mehrere farbige Abbildungen, deren Erkennbarkeit bei der Graustufen-Wiedergabe beeinträchtigt ist. Interessenten finden die farbigen Abbildungen auf unserer Homepage unter http://www.leibniz-sozietät.de/sb/58.htm (Die Redaktion)

| Tumor | Neue Fälle in 2001 | 5-Jahre Überleben (%) |
|-------------|-----------------------|--------------------------|
| Prostata | 198.000 | 93 |
| Brust (F) | 194.000 | 85 |
| Lunge | 170.000 | 14 |
| Colorectal | 135.000 | 62 |
| Lymphom | 64.000 | 51 |
| Blase | 54.000 | 82 |
| Melanom | 51.000 | 88 |
| Uterus | 51.000 | 84 |
| Leukämie | 32.000 | 43 |
| Niere | 31.000 | 61 |
| Mundraum | 30.000 | 53 |
| Pankreas | 29.000 | 4 |
| Eierstock | 23.000 | 50 |
| Alle Organe | 1,270.000 | 60 |

^{*}Cancer Facts & Figures, the American Cancer Society 2001

Tab. 2: Häufigkeit und 5-Jahresüberlebensraten für die wichtigsten Tumoren in den USA*

| Produkt | Firma | Typ (Target) | Indikation | Jahr der Zulassung | Umsatz/a in Mill \$ |
|-----------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| Campath | ILEX/ Millenium | humanisiert (anti-CD52) | B-Zell CLL | 2001 | - |
| Herceptin | Genentech | humanisiert (anti-ErbB2/Her2) | metastas. Brustkrebs | 1998 | 276 |
| Mylotarg | Celltech/ Wyeth | humanisiert (anti-CD33) | AML | 2000 | |
| Rituxan | Genentech | chimär (anti-CD20) | NHL | 1997 | 444 |
| Zevalin | IDEC (anti-CD20) | Maus) | B-Zell NHL | .2002 | _ |

Tab. 3: Zugelassene humane monoklonale therapeutische Antikörper in der Onkologie

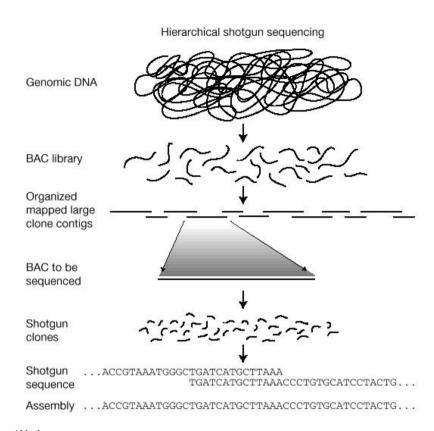


Abb. 1: Sequenzierungsstrategie des HGP-Consortiums

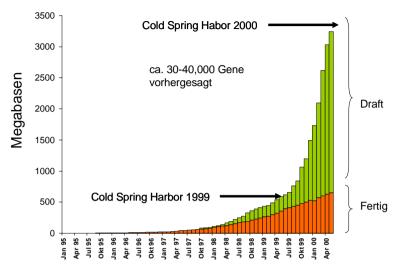


Abb. 2: Zuwachs der Sequenzen zwischen 1995-2000

- Mehrere tausend Medikamente sind im Markt zugelassen
- Sie basieren aber nur auf ca. 500 bekannten Targets
- Medikamente können sein:

kleine Moleküle - Pharma humane rekombinanet Proteine - Biotech's Monoclonale Antikörper - Biotech's antisense DANN/ siRNAs - Biotech's

- Das Genom enthält mehrere tausend neue Targets
- Die Herausforderung besteht, diese Targets zu identifizieren und zu validieren
- Neue Medikamente aus dem Humangenom erreichen Markt erst ab 2010-15
- wesentlich erhöhte F&E Kosten müssen aufgebracht werden, um diese Möglichkeiten zu nutzen

Abb. 3: Humangenom: Hoffnung auf neue Medikamente

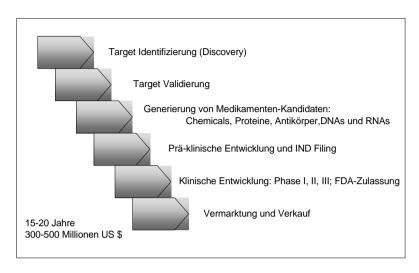


Abb. 4: Wertschöpfungskette bei der Medikamenten-Entwicklung

| Kategorie | Beispiele |
|---|-------------------------------------|
| Antimetaboliten | Methotrexat, 5-FU |
| Monoklonale Antikörper | Herceptin, Zevalin |
| Mitose Inhibitoren | Taxol |
| Steroidhormone | Tamoxifen, Flutamid |
| Alkylierende / vernetzende Medikamente | Endoxan, Cisplatin, Cyclophosphamid |
| Medikamente, die die Signal-Transduktion modulieren | Gleevec, Tarceva, Iressa |
| Angiogenese Inhibitoren | Avastin |
| Telomerase Inhibitoren | BIBR1532 |
| Antitumor Antibiotika | Etoposid, Doxorubicin |

Abb. 5: Gegenwärtig verwendete Chemotherapien bei Krebs

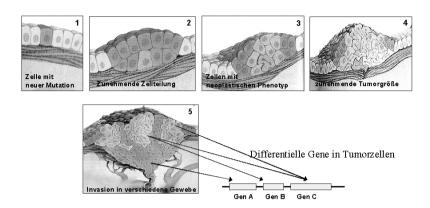


Abb. 6: Wie ein Tumor entsteht

| Neue Medikamente auf Basis kleiner Moleküle gegen Targets der EGF/EGFR Superfamilie | | | |
|--|-----------------------|-----------------|------------|
| <u>Medikament</u> | Firma | klinische Phase | Target |
| OSI-774 (Tarceva) (HER1) | OSI, Roche, Genentech | III | EGFR |
| ZD-1839 (Iressa) (HER1) | AstraZeneca | III | EGFR |
| EKB-569 (HER1) | Wyeth-Ayerst | II | EGFR |
| PKI-166 | Norvartis | 1 | HER1, HER2 |
| CI-1033 | Pfizer | I | HER1-4 |
| GW-2016 | GlaxoSmithKline | 1 | HEr1, Her2 |

Abb. 7: Rationales Drug Design bei Krebs

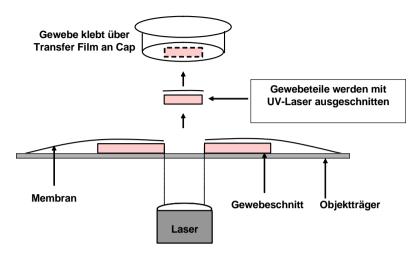


Abb. 8: Prinzip der UV-Laser-unterstützten Mikrodissektion

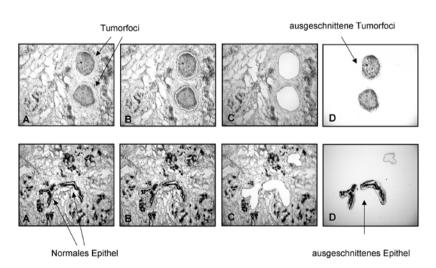


Abb. 9: Laser-Mikrodissektion von Brust-Tumoren

Detektion von differentiell exprimierten Genen mit Affymetrix Chiptechnologie

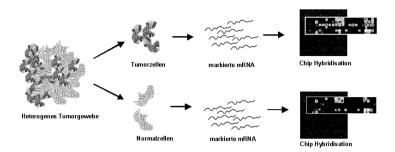


Abb. 10: Bestimmung von Tumorprofilen mit Hilfe von Genchips

Gisela Jacobasch

Antiinflammatorische und antikanzerogene Wirkungen von resistenten Stärken und Flavonoiden

Liebe Inge, lieber Mitja, sehr geehrter Präsident, verehrte Gäste, liebe Kollegen und Freunde,

dass wir in diesem Kreis zu einer großen Geburtstagsrunde für Dich, lieber Mitja, zusammen sind, ist eine große Freude. Die Resonanz, die unsere Einladung gefunden hat, zeigt, wie tief verbunden sich viele Menschen mit Dir fühlen. Viele von uns erinnern sich gerne an die Zeit, in der sie mit Dir gearbeitet und gewirkt haben. Bei Dir lernen zu können, war ein großes, unvergessliches Erlebnis. Im Zusammenhang mit meinem Vortrag, der zugleich meinen Dank und meine Verehrung ausdrücken soll, möchte ich an eine Initiative von Dir, die Biologieprognose erinnern, die Du mit einem enormen Einsatz anpacktest. Die Zielsetzung dazu war, eine höhere Effektivität auf dem Gebiet der Biowissenschaften durch eine engere Verzahnung der einzelnen Disziplinen einschließlich der Medizin und Ernährung zu erreichen. Wie vielschichtig und wichtig dieses Vorhaben war und ist, möchte ich versuchen, anhand einiger Ergebnisse aus meiner Arbeit in den letzten Jahren am Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam-Rehbrücke verständlich zu machen.

Wir hatten uns u.a. die Aufgabe gestellt, neue Strategien zur Prophylaxe von Darmerkrankungen auszuarbeiten und zu erproben. Im Mittelpunkt standen dabei zwei Erkrankungen, die Colitis Ulcerosa und das kolorektale Karzinom. 3 Gründe waren dafür bestimmend: 1. die hohe Inzidenz und Prävalenz der Erkrankung, sowie die hohe Mortalitätsrate bei Patienten mit Dickdarmmalignomen; 2. die vielen offenen wissenschaftlichen Fragen in den Wechselwirkungen zwischen intestinaler Mikroflora und Gesamtorganismus und 3. die Frage, in wie weit diese Wechselwirkungen gezielt durch die Ernährung zu beeinflussen sind. Die Aufgabenstellung berührte zugleich auch die Problematik nach der gesundheitsfördernden Wirkung von Obst und Gemüse.

66 Gisela Jacobasch

Diese Nahrungsmittel sind u.a. reich an Flavonoiden und Ballaststoffen, die gemeinsam in einem Gerüst unterhalb der Zellmembran angeordnet sind. Aus der Vielfalt der Verbindungen wählten wir zwei aus, die wir für die Lösung unserer Aufgabenstellung für wichtig und für methodisch lösbar hielten. Von den Ballaststoffen war es die resistente Stärke und von den Flavonoiden das am häufigsten vorkommende Aglykon Quercetin (Abb. 1). Quercetin ist eine Polyphenolverbindung, die in natürlichen Quellen immer verestert vorliegt. Häufig ist Quercetin an der OH-Gruppe des C-Ringes mit Rutinose zu Rutin verestert.

Abb. 1: Strukturformel von Quercetin, Isoquercitrin und Rutin

Resistente Stärken

Was sind resistente Stärken, wie kann man sie gewinnen und für die aufgezeigte Zielstellung optimieren? Die Bezeichnung leitet sich daraus ab, dass diese Stärken im Dünndarm nicht enzymatisch hydrolysiert werden und deshalb auch keine Glukose resorbiert wird. Nach ihrer strukturellen Anordnung und Angreifbarkeit durch die intestinale Mikroflora unterscheidet man mehrere Typen (1). Uns interessierte ein RS-Typ, der sehr gut fermentiert wird und hohe Butyratausbeuten liefert. Butyrat ist eine kurzkettige Fettsäure, die eine große physiologische Relevanz hat. Aus lebensmitteltechnologischer Sicht sollten die resistenten Strukturen außerdem thermostabil sein. Ein RS-Typ3, der zu 50% eine B-kristalline Form aufweist, erfüllt diese Anforderung

| Ø DP | 10% Gel | 30% Gel | |
|------|-------------------|---------|--|
| | % RS 3 - Ausbeute | | |
| 16 | 63 | 67 | |
| 22 | 87 | 93 | |
| 44 | 66 | 72 | |
| 51 | 49 | 53 | |

Einfluß der Glukankettenlänge auf die RS 3 - Bildung

Abb. 2: Saccharose + Glukose $\xrightarrow{Amylosucrase}$ (Glukose)n + nFruktose In vitro Synthese von α -1,4-D-Glukanen

am besten. Um das herauszufinden, haben wir Glukanketten mit definierter Länge synthetisiert (Abb. 2). Die Synthese erfolgte aus Saccharose, die mit Hilfe einer Amylosucrase gespalten wurde. Die freigesetzte Glukose wurde α-1,4-glykosydisch an ein Startermolekül gebunden. Dadurch wurde eine Kettenverlängerung erreicht. Die freiwerdende Fruktose verschob zugleich das Gleichgewicht der Reaktion nach rechts. Diese Biotransformation wurde nach Optimierung zur Herstellung von Glukanen mit Kettenlängen von 16 bis 100 Glukoseeinheiten eingesetzt. Suspensionen aus diesen Glukanen wurden bei verschiedenen Gelkonzentrationen verkleistert und zur Ausbildung der Kristallstruktur retrogradiert. Aus den in der Abb. 2 ausgewiesenen Ergebnissen ist ersichtlich, dass RS-Ausbeuten von etwa 90% nur bei einer optimalen Kettenlänge, die bei 22 Glukoseeinheiten liegt, erreichbar sind. Darüber und darunter fallen die RS-Ausbeuten ab (2). Röntgenkristallographische Untersuchungen von Prof. Damaschun belegten, dass dieses Präparat ein ideales RS Typ3 Produkt ist. Es weist mit 50% einen maximalen kristallinen Anteil auf, der ausschließlich B-kristallin ist. Das RS-Produkt ist außerdem bis 145°C thermostabil und kann somit Back- und Kochprozessen unterworfen werden. Außerdem ist es ein ausgezeichnetes Präbiotikum. Diese RS3 wird durch die intestinale Mikroflora sehr gut zu kurzkettigen Fettsäuren mit Butyratausbeuten bis zu 60% fermentiert (Abb. 3). Mit diesem RS3-Präparat ha68 Gisela Jacobasch

ben wir eine Reihe von tierexperimentellen Arbeiten durchgeführt, deren Ergebnisse die hohe Qualität dieser RS bestätigten. Leider konnte es bisher nicht im Humanbereich eingesetzt werden, da die Gesetzeslage auf dem Gebiet der Ernährung in Deutschland die Verwendung eines biotechnologisch gewonnenen Enzyms in der Produktion nicht zulässt.

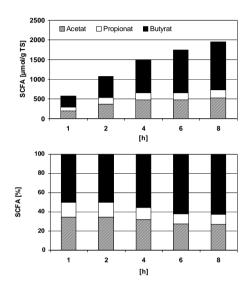


Abb. 3: In-vitro-Fermentation von RS 3 (Poly-1,4-\alpha-D-Glukanprodukt) mit hoher Butyratausbeute, katalysiert durch die Mikroflora frisch entnommener humaner Faeces (FSCFA = kurzkettige Fettsäuren)

Der erreichte Erkenntnisstand konnte jedoch bei der Auswahl von Stärken zur RS-Herstellung aus natürlichen Quellen genutzt werden. Amylosen zu Glukanen mit 20 Glukoseeinheiten zu spalten, gelang nicht befriedigend. Darum konzentrierten wir uns auf sogenannte Waxystärken, d.h. amylopektinreiche Stärken. Der Erfolg dieses Vorgehens hing davon ab, Amylopektinseitenketten von optimaler Länge zu finden. Das war nur selten der Fall. In Zusammenarbeit mit dem MP Institut für Pflanzengenetik in Golm, wurden deshalb die Seitenketten des Amylopektins mit gentechnischen Methoden verlängert. Aus der so gewonnenen Stärke der Kartoffelsorte Desiree ließen sich nach enzymatischer Entzweigung ebenso hochwertige RS3-Produkte herstellen wie aus den in vitro synthetisierten α-1,4-Glukanen (Abb. 4). Diese Kartoffel

wurde von unserem Geldgeber Agrewo im Ausland angebaut und die daraus isolierten Stärken bestätigten, dass die verlängerten Seitenketten im Amylopektin in den nachfolgenden Generationen stabil blieben. Aber den Einsatz von RS-Produkten im Humanbereich, hergestellt aus dieser Stärke, stoppte zunächst das Gentechnikgesetz. Inzwischen ist jedoch die Desiree mit klassischen Methoden nachgezüchtet worden und damit diese Hürde beseitigt.

| Stärke-Quelle | Gel-Konz. | Retrogradation | Tempern |
|---------------|-----------|-------------------|---------|
| | % | % RS 3 - Ausbeute | |
| Gerste | 10 | 31 | - |
| Weizen | 30 | 40 | - |
| Roggen | 40 | 43 | 77 |
| Erbse | 20 | 42 | 74 |
| Banane | 20 | 50 | 84 |
| Kartoffel | 10 | 89 | - |

Abb. 4: RS 3 - Ausbeuten aus entzweigten Stärken wachsiger Varietäten

Der kurz skizzierte experimentale Erfolg motivierte uns zum Screenen natürlicher Stärken aus Waxy-Varietäten von Getreidesorten, Erbsen und Bananen. Einige davon erwiesen sich für die RS-Herstellung als geeignet. Aus den in Abb. 4 aufgeführten Ergebnissen ist ersichtlich, dass RS3-Ausbeuten aus diesen Stärkequellen mit den bisherigen Verfahren nur bis zu maximal 50% möglich sind (3). Deshalb erprobten wir erstmals hydrothermische Verfahren statt an roher Stärke an RS3-Produkten. Durch eine Art von Temperung gelang es, RS-Ausbeuten bis zu über 80% zu erreichen (4,5). Die so gewonnenen Präparate entsprachen zwar in Bezug auf ihre Struktur nicht ganz unseren Idealvorstellungen, lieferten auch etwas weniger Butyrat bei der Fermentation, hatten aber den Vorteil, dass keine gesetzliche Hand Einwände gegen den Einsatz dieser RS-Produkte als eine Art funktionelles Nahrungsmittel erhob.

Stoffwechseleffekte resistenter Stärken

An gesunden Freiwilligen ermittelten wir, dass 15g RS3 pro Tag genügen, um die Mikroflora des Dickdarmes ausreichend mit Substrat zu versorgen. Durch die orale RS-Zufuhr ließ sich auch bei gesunden Personen der luminale Butyratspiegel erhöhen, ebenso die Anzahl von Mikroorganismen, die zu den Butyratbildnern zählen (Abb. 5). Dazu gehören vor allem Spezies der reichlich vorkommenden Eubakterien (6). Um fast eine Größenordnung nahmen die Spezies *E. hadrum* und *E. ramulus* zu. Warum ist die Butyratausbeute aus RS für uns ein wichtiger Parameter? Butyrat ist ein Mittler in den Wechselwirkungen zwischen intestinaler Mikroflora und Dickdarmschleimhaut (Abb. 6). Butyrat wird für eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen benötigt (1). Dieser Metabolit ist das wichtigste Substrat für die aerobe ATP-Gewinnung der Epithelzellen des Dickdarmes und bestimmt dadurch deren gesamten Energiestoffwechsel.

| Fettsäure | 0. Tag | 14. Tag |
|----------------|-------------|-------------|
| | μmol | /g TM |
| Acetat | 253,0 | 264,5 |
| Propionat | 89,8 | 101,6 |
| <u>Butyrat</u> | <u>52,2</u> | <u>70,0</u> |
| ΣSCFA | 393,0 | 436,1 |

| Organismen | 0. Tag | 14. Tag |
|--------------------|---------------|------------|
| | log 10 / g TM | |
| E. rectale cluster | 10,6 | 10,7 |
| E. biforme | 9,3 | 9,6 |
| E. hadrum | <u>8.5</u> | <u>9,1</u> |
| E. ramulus | <u>8,3</u> | <u>9,1</u> |
| ∑ Mikroflora | 11,7 | 11,6 |

Abb. 5: Einfluss einer 14-tägigen oralen Zufuhr von 15 g Erbsenstärke RS 3 auf die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren und die Anzahl butyratbildender Eubakterien in Faecesproben gesunder Probanden (n= 5)

Butyrat übt außerdem Effekte auf die Signaltransduktion aus: es aktiviert im gesunden Epithel die Proliferation durch Stimulierung der Zellteilung im unteren und Unterdrückung im oberen Kryptenbereich. Antiinflammatorische Effekte bewirkt Butyrat durch Hemmung des NF-κB-Systems und damit der Synthese proinflammatorischer Mediatoren. Es trägt außerdem zur Entgiftung mutagener Metabolite bei durch Induktion der Glutathion-S- Transferase, Hemmung der Ornithindecarboxylase und Exprimierung des Histokompatibilitätskomplexes 1. Darüber hinaus wird die Bildung der sekundären Gallensäuren Desoxycholsäure und Lithocholsäure durch Hemmung der bakteri-

ellen 7-α-Dehydroxylase verringert. Butyrat unterdrückt auch die onkogene Wirkung dieser Gallensäuren auf die DNA.

1. Gesundes Kolonepithel:

- · Substrat der aeroben ATP Bildung
- Aktivierung der Proliferation durch:
 - Stimulierung der Zellteilung im unteren und Unterdrückung im oberen Kryptenbereich
- Antiinflammatorische Wirkung durch:
 Hemmung des NF-κB-Systems und der Synthese proinfl
 - Hemmung des NF-κB-Systems und der Synthese proinflammatorischenr Mediatoren
- Entgiftung potentiell mutagener Metaboliten durch: Induktion der Glutathion-S-Transferase (pi)
 - Hemmung der Ornithindecarboxylase
 - Exprimierung des Histokompatibilitätskomplexes I
- Hemmung der bakteriellen 7-α-Dehydroxylase → verminderte Bildung der sek.
 Gallensäuren Desoxychol- und Litocholsäure und ihrer Tumorpromotoreffekte
- · Hemmung der onkogener Wirkung von Desoxycholsäure

Abb. 6:

Gesundheitsfördernde Effekte von Butyrat auf die Dickdarmschleimhaut

2. Neoplastisch verändertes Kolonepithel

- · Aktivierung der Apoptose
- Hemmung der protoonkogenen Wirkung von c-myc, c-ras und c-src, Aktivierung von c-fos und c-jun
- Positiver Effekt auf DNA-Methylierung und Histonazetylierung im Zellkern
- Induktion von p21 → Arrest der Tumorzellen in der G1 Phase des Zellzyklus
- Durch p21 Bindung an PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) → Hemmung der DNA-Replikation und Wachstumsstop

Abb. 7:

Gesundheitsfördernde Effekte von Butyrat auf die Dickdarmschleimhaut

Die Effekte dieser kurzkettigen Fettsäure auf die Signaltransduktion in Tumorzellen unterscheiden sich von denen auf das gesunde Epithel (Abb. 7). In Tumorzellen aktiviert Butyrat die Apoptose, d.h. den Zelltod. Durch Induktion von p21 kommt es zu einem Arrest der Tumorzellen in der G1-Phase und durch Bindung von p21 an PCNA zur Hemmung der DNA-Replikation und zum Wachstumsstop. Diese Vorgänge gehen mit Veränderungen in der DNA-Methylierung und Histonacetylierung einher, wodurch letztlich die proonkogene Wirkung von Genen unterdrückt und Tumorsuppressorgene aktiviert werden.

72 Gisela Jacobasch

Antikanzerogene Wirkungen von RS3 und Flavonoiden

Lassen sich antitumorale Wirkungen auch durch die orale Gabe von RS3 in vivo erreichen? Um diese Frage zu beantworten, nutzten wir das bei Ratten durch Dimethylhydrazin induzierbare Tumormodell. Die Auswertung der Versuche ergab, dass tatsächlich die Entwicklung kolorektaler Tumore durch RS-Gabe vollständig unterdrückt werden kann. Während Tiere, die eine semisynthetische Standarddiät erhielten, durchschnittlich 1 bis 2 Tumore im Dickdarm bildeten, trat bei den Tieren, die zusätzlich RS3 aufnahmen, kein Tumor auf

Ausgehend von der Arbeitshypothese, dass chronische oxidative Einflüsse Entdifferenzierungsvorgänge im Dickdarm initiieren und der Glutathionspiegel in diesem Gewebe gering ist, kommt Enzymsystemen, die oxidativen Schäden vorbeugen, eine besondere Bedeutung zu. Immunhistochemisch wurde das Verhalten von Enzymen, die oxidativen Belastungen entgegenwirken, verfolgt (7). Zu ihnen zählen die spezifische gastrointestinale Glutathionperoxidase, die Isoenzyme der Cyclooxygenasen, die induzierbaren Stickoxidsynthasen und die Glutathion.S-Transferasen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen belegten, dass diese Enzymsysteme besonders stark in den Epithelzellen an der luminalen Oberfläche des Dickdarmes exprimiert werden. Sie bilden eine Art Barriere gegenüber oxidativen Einflüssen, die in Form von Radikalen und Hydro- und Lipidperoxiden aus dem Darmlumen auf die Schleimhaut einwirken.

Wenn oxidative Schäden in der Ätiogenese von kolorektalen Karzinomen von entscheidender Bedeutung sind, müssten auch entsprechende Schutzmechanismen am Kryptengrund existieren, da dort die omnipotenten Epithelzellen lokalisiert sind, in denen die Regulation der Proliferation und Differenzierung eingeleitet wird. Tatsächlich findet man die gastrointestinale GPX am Kryptengrund in noch höherer Konzentration als an der luminalen Schleimhautoberfläche. Im frühen Stadium der Tumorbildung nimmt die Expression diese Enzyms sogar noch am endoplasmatischen Retikulum am Kryptengrund zu, ehe mit fortschreitender maligner Transformation eine strukturelle Desintegration und diffuse Verteilung des Enzyms zu beobachten ist.

Auch Einflüsse von RS3 bzw. Butyrat auf die Signalübertragung lassen sich immunhistochemisch verfolgen. Ein Beispiel dafür ist das Proteinkinase- C-Isoenzym- δ . Es gehört zu den Enzymen der Signalübertragung und kann vom Cytosol in den Kern translozieren. Dieses PK-C-Isoenzym weist die höchste Konzentration in den Epithelzellen an der luminalen Oberfläche auf. Seine Expression nimmt unter RS-Gabe in vivo und unter Butyrat in vitro stark zu.

Aus der Überlegung heraus, dass der Schutz der Epithelzellen am Kryptengrund für eine Tumorprävention besonders wichtig ist, überprüften wir an einem anderen Tumormodell, der apc-gendefekten Maus, den antikanzerogenen Effekt von Flavonoiden durch orale Gabe von geringen Mengen an Quercetin und Rutin (8). Dieses Modell wurde ausgewählt, da Mutationen im apc-Gen bei der Maus nicht wie beim Menschen die Entwicklung einer Polyposis im Dickdarm sondern im Dünndarm initiieren. Dieses Tiermodell zeigte deshalb kaum einen präventiven RS3-Einfluss, erlaubte aber bei Flavonoideffekten zwischen denen, die bakteriell vermittelt werden und solchen, die nach der Resorption von Quercetin systemisch zustande kommen, zu differenzieren.

Eine anaerobe Spaltung des Ringsystems von Quercetin katalysieren erst Bakterien im Dickdarm, die Ouercetinresorption dagegen erfolgt überwiegend im Magen und Dünndarm (9). Dabei wird Quercetin in der Darmschleimhaut zu 5 verschiedenen Verbindungen glukuronidiert, ehe es in die Blutbahn abgegeben wird. Ist das Angebot von Quercetin aus dem Gastrointestinaltrakt relativ hoch, wird ein Teil davon zu dem nicht mehr antioxidativ wirksamen Isorhamnetin methyliert. Dieser Effekt entfällt, wenn statt Ouercetin Rutin oral aufgenommen wird, denn die Deglykosylierung von Rutin erfolgt in der Schleimhaut langsam, wodurch ein wesentlich größerer Anteil an Quercetin insgesamt glukuronodiert werden kann. Daraus resultiert, dass der Blutspiegel an Quercetin sich wesentlich leichter über eine Rutin- als über eine Ouercetinzufuhr einstellen lässt. Verfüttert man Ouercetin oder Rutin in gut resorbierbarer Form in einer Konzentration von 14 mg/g Futter an apcgendefekte Mäuse, ist ein deutlicher antikanzerogener Effekt nachzuweisen (Abb. 8). Die Tumorbildung wird bis zu 90% unterdrückt. Diese antikanzerogene Wirkung erfolgt ausschließlich systemisch.

| Gruppe | ı | II | III | IV |
|------------|--------|----------------|-------|----------------|
| Semisynth. | - | Quercetin | Rutin | RS |
| Diät | | 14 μg/g Futter | | 10 mg/g Futter |
| Polypen | 72 | 8 | 8 | 58 |
| | ± 40,3 | ± 4,2 | ± 5,1 | ± 29,3 |

RS: resistente Stärke Fütterungsperiode: 60 Tage Alter der Tiere: ca. 90 - 110 Tage

Abb. 8:

Antikanzerogene Wirkung von Quercetin bei apc-gendefekten Min +/- Mäusen in Abhängigkeit von der Resorptionsfähigkeit des Flavonoids

74 Gisela Jacobasch

Aus den Ergebnissen unserer experimentellen Arbeiten lässt sich schlussfolgern, dass sowohl RS3 als auch Quercetin antikanzerogen wirken und deshalb präventiv insbesondere für die Ernährung von Risikopersonen zu empfehlen sind.

Einsatz von RS und Flavonoiden in der Prävention und Therapie bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Eine relativ große Risikogruppe für die Entwicklung von kolorektalen Karzinomen stellen Patienten dar, die an einer Colitis Ulcerosa, einer chronischen Dickdarmentzündung leiden. Mit der Dauer der Erkrankung steigt ihr Risiko zur Entwicklung einer kolorektalen Karzinogenese deutlich an (1). Wenn es mit dem Einsatz von RS3 und Rutin gelingt, die Remissionszeiten zu verlängern, ließe sich auch das Krebsrisiko bei diesen Patienten senken. Unsere Arbeitshypothese zum Einsatz von RS3 und Rutin bei Patienten mit Colitis Ulcerosa war folgende: (Abb. 9) Obwohl als Ursache der Erkrankung eine polygenetische Prädisposition zu postulieren ist, die Konsequenzen für das Expressionsmuster von Enzymen des Energiestoffwechsels und für das mukosale Immunsystem hat, ist davon auszugehen, dass für den Ausbruch der Erkrankung Veränderungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora von entscheidender Bedeutung sind. Es siedeln sich verstärkt pathogene Organismen an. Die von ihnen gebildeten und freigesetzten Produkte, zu denen Sauerstoffradikale, Sulfite, Antigene und Zytokine zählen, beeinflussen negativ sowohl den Energiestoffwechsel der Kolonepithelzellen als auch das mukosale Immunsystem. Bereits in den 80er Jahren wies Rödiger nach, dass Kolonozyten bei einer Entzündung weniger Butyrat zu CO2 und Ketonkörpern umsetzen und dass dieser Abbau durch Sulfit noch weiter gedrosselt wird (10). Eine Folge des gestörten Energiestoffwechsels ist eine verringerte Barrierenfunktion der Dickdarmschleimhaut. Dadurch wird die Auswirkung toxischer Effekte begünstigt. Typisch für entzündete und z.T. ulzerierte Schleimhautabschnitte ist eine Einwanderung von Neutrophilen und T-Lymphozyten.

Der Angriffspunkt unseres RS3- und Flavonoidtherapiekonzeptes ist deshalb die intestinale Mikroflora. Beide Verbindungen, RS3 und Rutin, sind Substrate der Mikroflora insbesondere für die große Gattung der *Eubakterien*, von denen viele Butyratbildner sind (11). Unsere Strategie zielt darauf ab, durch RS3- und Rutinzufuhr mit der Nahrung das Substratangebot für die Mikroflora im Dickdarm zu optimieren und dadurch eine nicht pathogene Mikroflora zu stabilisieren. Daraus resultiert eine Zunahme der Butyratbildner,

und im Ergebnis kann mehr Butyrat nach Aufnahme in die Kolonozyten verstoffwechselt werden.

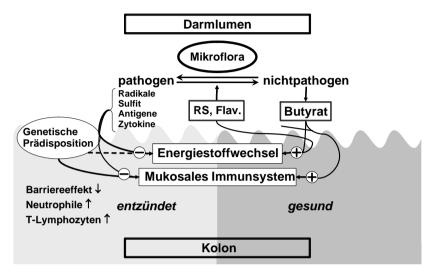


Abb. 9: Prävention und Therapie der Colitis Ulcerosa durch orale Aufnahme von resistenter Stärke und Rutin

Einen positiven Effekt übt Butyrat auch auf das luminale Immunsystem aus, indem es die Aktivierung und Transduktion von NF-κB in den Zellkern unterdrückt und dadurch die Induktion von Genen für die Regulation der Immun- und Entzündungsantwort hemmt. Dieser Effekt wird durch die antioxidative, antiinflammatorische und immunprotektive Wirkung von Quercetin noch verstärkt. Zusätzlich erhöht Quercetin die Wasserresorption im Dickdarm, was einer Diarrhoe entgegenwirkt.

Auch diese Arbeitshypothese wurde zunächst im Tiermodell überprüft (3, 12). Die Colitis wurde bei Ratten durch eine rektale Gabe von Trinitrobenzensulfonsäure induziert. Die Tiere entwickelten eine ulzerierende Entzündung, die nach 14 Tagen in eine Ausheilungsphase überging. Bereits eine Woche vor der Colitisinduktion wurde das entsprechende Futter angeboten, entweder eine semisynthetische Standarddiät ohne Zusätze oder ergänzt durch RS3 bzw. RS3 und Rutin. Abb. 10 zeigt das Verhalten der luminalen Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren. Es ist deutlich zu erkennen, dass die RS3-Gruppe am Tag 0 eine erhöhte Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren aufweist. Dieser hohe Spiegel wird über die gesamte Colitiserkran-

76 Gisela Jacobasch

kung auf einem annähernd gleichen Niveau gehalten, was dafür spricht, dass auch die Resorptionsrate unverändert blieb. Ein anderes Bild zeigten die Tiere, die Standarddiät erhielten. Bei ihnen stieg nach der Colitisinduktion der Spiegel der kurzkettigen Fettsäuren stark an und fiel erst in der Regenerationsphase langsam wieder ab. Dieser Befund spiegelt eine Hemmung der Resorption kurzkettiger Fettsäuren wider. Abb. 11 veranschaulicht das Ausmaß der Resorptionshemmung. Sie war am stärksten für Acetat ausgeprägt, was wahrscheinlich in einem kausalen Zusammenhang mit der auftretenden Mikrozirkulationsstörung steht. Aber auch die Resorption von Butyrat war deutlich herabgesetzt. Erwartungsgemäß erfolgte auch die Regenerationsphase bei diesen Tieren später als bei denen, die RS3 erhielten. Noch überzeugender waren die Resultate, wenn sowohl RS3 als auch Rutin den Tieren gegeben wurde.

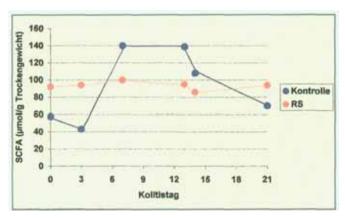


Abb. 10: Konzentration kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) im Lumen des Colons von gesunden Ratten (0. Tag) und bei colitis ulcerosa, induziert durch Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS). Verlauf bei Fütterung von RS-freier (Kontrolle) und RS-haltiger Diät.

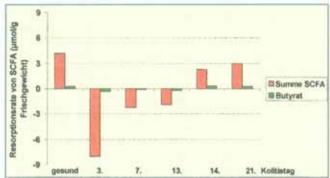
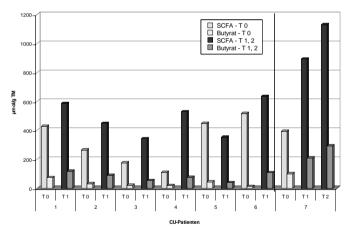


Abb. 11: Hemmung der Absorption kurzkettiger Fettsäuren bei RS-freiem Futter im distalen Kolon von PRatten mit TNBS-Colitis. Die Rate der Absorptionshemmung wurde aus der Differenz der Konzentrationen von kurzkettigen Fettsäuren und Butyrat im proximalen Kolon und in den Faeces abgeschätzt



T 0 - ohne RS; T 1 - 1 J. 15 g RS; T 2 - 2 J. 15 g RS + 30 mg Rutin

Abb. 12: Einfluss einer einjährigen Gabe von 15 g RS-3 auf die Konzentration kurzkettiger Fettsäure in Faecesproben von Colitis Ulcerosa Patienten

78 Gisela Jacobasch

Der positive Colitisbefund bei Ratten ermutigte uns, die Wirkung von RS3 und Rutin auch bei Colitispatienten zu erproben. In Abb. 12 sind die ersten Ergebnisse einer Studie mit Colitispatienten zusammengefasst. Die Patienten wiesen eine unterschiedlich schwere klinische Manifestation der Erkrankung auf. Sie wurden bis dahin mit Mesalazin und immunsuppressiv mit Azathiopurin und Cortikoiden therapiert. Zu Beginn und in halbjährigen Abständen wurde koloskopisch die Schleimhaut beurteilt, wurden Biopsien entnommen und diese histologisch und immunhistochemisch untersucht. Die Befunde bestätigten ein Abheilen der Ulzerationen und ein Abklingen der Entzündung. Die Remissionszeiten verlängerten sich deutlich. In Abb. 12 sind die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren und des Butyrats in Fäcesproben zu Beginn der Studie und nach einem Jahr für 7 Patienten zusammengestellt. Bis auf Patient 5 reagierten alle Patienten auf die RS3-Gabe mit einem Anstieg des Butvratspiegels. Auch der Anteil der Trockenmasse nahm im Fäces deutlich zu. Für den Patienten 7 ist auch das Verhalten der kurzkettigen Fettsäuren- und Butyratkonzentration über den Verlauf von 2 Jahren ausgewiesen. Im ersten Jahr wurde nur RS3 gegeben, im 2. Jahr RS3 und Rutin. In dieser Zeit trat trotz des Absetzens aller Medikamente kein Colitisschub auf.

Diese Befunde belegen sowohl einen präventiven als auch therapeutischen Effekt von RS3 und Rutin bei Colitispatienten. Die Entzündungssymptomatik, die durch die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren initiiert wird, schwächt sich ab. Derartige Mediatoren leiten sich von pathogen wirkenden Bakterien der intestinalen Mikroflora ab. Dazu zählen Endotoxine wie das Lipopolysaccharid (LPS) von gramnegativen und Peptidglukan (PgN) und Lipoteichoinsäure von grampositiven Bakterien. Targetzellen für diese bakteriellen Komponenten sind Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen. Sie reagieren mit der Ausschüttung von TNF- α und den Interleukinen IL-1β und IL-6. Die meisten pathogenen Bakterien, die sich bei Colitispatienten im Dickdarm ansiedeln, greifen in die Signalübertragungsvorgänge ein, in denen der Transkriptionsfaktor NF-κB eine zentrale Rolle spielt (Abb. 13). Dieser Faktor reguliert Gene, die Zytokine, Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle kodieren. Im Cytoplasma gesunder Zellen sind NF-κB-Komplexe in einer transkriptions-inaktiven Form lokalisiert. Durch bakterielle proinflammatorische Mediatoren wird phosphorylierungsabhängig ein proteolytischer Abbau von NF-κB-Hemmfaktoren eingeleitet. Dabei wird NF-κB freigesetzt und in den Zellkern transloziert, wodurch diese spezifischen Gene aktiviert werden, die die Immun- und Entzündungsantwort kontrollieren.

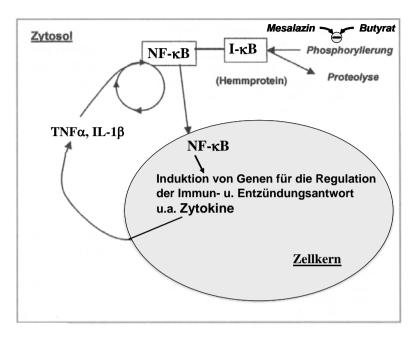


Abb. 13: Schema der durch NF-кВ (induzierbarer Transkriptionsfaktor) vermittelten Autoregulation und der Induktionseffekte bei chronisch entzündlichen Dickdarmerkrankungen

Butyrat verhindert ebenso wie Mesalazin die Translokation von NF-κB in den Zellkern. Deshalb war es gerechtfertigt, Mesalazin, das nicht frei von Nebenwirkungen ist, während der Humanstudie abzusetzen. Der Erfolg dieser ersten klinischen Studie zeigt, dass es sehr gut möglich ist, über die Ernährung eine zielgerichtete Prävention und sogar Therapie der Colitis Ulcerosa vorzunehmen.

Mit einer Euch, lieber Mitja und liebe Inge, gewidmeten Publikation zur Herstellung von RS3 aus Erbsenstärke hoffen wir, Euch eine kleine Geburtstagsfreude bereiten zu können und Euer Interesse an unseren Arbeiten aufrecht zu erhalten.

Literatur:

(1) Jacobasch, G., Dongowski, G.: Ballaststoffe mit spezifischen Wirkungen. Praxishandbuch Functional Food (2000), 1-34. Hrsg. H. E. Erbersdobler, A. H. Meyer BEHR s Verlag

80 Gisela Jacobasch

(2) Schmiedl, D., Bäuerlein, M., Bengs, H., Jacobasch, G.: Production of heat-stable, butyrogenic resistent starch. Carbohydrate Polymers 43 (2000), 183-193

- (3) Jacobasch, G.: Die Bedeutung resistenter Stärken für eine gesundheitsorientierte Ernährung. Ernährungsumschau 49(2002), 4-9
- (4) Lehmann, U., Jacobasch, G. Schmiedl, D.: Characterization of resistent starch type3 from banana (Musa acuminata). J. Agricult. Food Chem. 50 (2002), 5236-5240
- (5) Rössler, C., Jacobasch, G., Schmiedl, D., Gebhard, E: Resistente Stärke Typ 3 aus Roggenstärke, ein funktionelles Lebensmittel. Ernährung/Nutrition 26 (2002), 297-305
- (6) Schwiertz, A., Lehmann, U., Jacobasch, G., Blaut, M: Influence of resistent starch on the SCFA production and cell counts of butyrate-producing Eubacterium spp. in the human intestine. J. Appl. Microbiology 93 (2002), 157-162
- (7) Florian,S., Wingler,K., Schmehl,K., Jacobasch,G., Kreuzer,O.J., Meyerhof,W., Brigelius-Flohe,R.: Cellular and subcellular localisation of gastrointestinal glutathione peroxidase in normal and malignant human intestinal tissue. Free Radical Res. 35 (2001), 655-663
- (8) Jacobasch, G., Florian, S., Pforte, H., Hempel, J., Schmehl, K., Schmiedl, D.: Inhibition of hereditary intestinal carcinoma development by flavonoids. The Royal Soc. Chem.: Dietary Anticarcinogenic and Antimutagens. Chemical and Biological Aspects. (2000), 320-323
- (9) Pforte, H., Näser T., Jacobasch, G., Buhr, H.J.: Absorption and modification of rutin in human stomach. COST Action 916, Bioactive plant cell wall components in nutrion and health . (2001), 151-152
- (10) Roediger, W.E.W., Nance, S.: Selective Reduction of fatty acid oxidation in colonocytes: correlation with ulcerative colitis. Lipids 25 (1990), 646-652
- (11) Simmering,R., Pforte,H., Jacobasch,G., Blaut,M.: The growth of the flavonoid-degrading intestinal bacterium Eubacterium ramulus, is stimulated by dietary flavonoids in vivo
- (12) Jacobasch, G., Schmiedl, D., Kruschewski, M., Schmehl, K.: Dietary resistent starch and chronic inflammatory bowel diseases. Int. J. Colorectal Dis. 14 (1999), 201-211

Enzymatische Lipidperoxidation durch 15-Lipoxygenase-1: Flavonoide als Mikronährstoffe und ihre Wechselwirkungen mit Lipoxygenasen

Zu einigen Aspekten der Biochemie des Sauerstoffs

Als mein verehrter Lehrer, Samuel Mitja Rapoport, 1953 nach Berlin kam, widmete er seine ersten Forschungsarbeiten unter anderem der biologischen Oxidation. Schon zuvor als Student und junger Wissenschaftler begeisterte er sich für die bahnbrechenden Arbeiten von Otto Warburg, Hans A. Krebs, Albert Szent-György und anderen zur Aufklärung der Grundzüge der biologischen Oxidation. Er hat dies später vor seinen Studenten immer wieder betont.

Die Anpassung des Lebens an die Gegenwart von Sauerstoff und die Nutzung O2-abhängiger Reaktionen war ein wesentlicher Fortschritt der Evolution. Nur einige Mikroorganismen sind in der Lage, ohne Sauerstoff zu wachsen und sich zu vermehren. Für alle höher entwickelten Organismen hingegen ist die Bioverfügbarkeit von Sauerstoff eine unabdingbare Voraussetzung des Lebens. Wir wissen seit geraumer Zeit, dass die biologische Oxidation des aus den Nährstoffen stammenden Wasserstoffs über eine Folge von Elektronenübertragungsreaktionen – die Atmungskette – stufenweise auf den molekularen Sauerstoff übertragen wird und dabei Wasser entsteht. Die den einzelnen Schritten innewohnende freie Energie aufgrund entsprechender Differenzen im elektrochemischen Potential wird dadurch konserviert. dass dabei Adenosintriphosphat als universelle "Energiewährungseinheit" synthetisiert wird ("oxidative Phosphorylierung").

Nun ist die Reduktion des molekularen Sauerstoffs durch gebundenen Wasserstoff aus chemischer Sicht nicht so einfach wie man es auf den ersten Blick annehmen könnte. Der Autor erinnert sich an ein Kolloquium im Emil-Fischer-Hörsaal der Chemischen Institute der Humboldt-Universität im Jahre 1967. Der Direktor des 1. Chemischen Instituts und heutige Vizepräsident der Leibniz-Sozietät, Prof. Lothar Kolditz, lud damals Rapoport zu einem Vor-

trag über die biologische Oxidation ein. In der Diskussion wurde Rapoport von Kolditz gefragt, wie denn die Reduktion des Sauerstoffs vor sich gehe, es müssten doch dabei peroxidische Intermediate auftreten. Rapoport antwortete, dass man sehr sorgfältig danach gesucht, aber keine gefunden hätte. Das war damals der aktuelle Wissenstand. Kolditz ließ aber nicht locker und betonte, ohne peroxidische oder andere reaktive Zwischenprodukte sei das für ihn als Chemiker nicht plausibel. Heute wissen wir, dass Kolditz damit durchaus Recht hatte. Später konnten mit speziellen Methoden tatsächlich verschiedene Zwischenprodukte bei der Reaktion des Cytochrom a/a₃-O₂-Komplexes nachgewiesen werden. Diese sind allerdings so kurzlebig, dass es sehr tiefer Temperaturen bedarf, um solche Intermediate sicher nachweisen zu können. Es ist gerade die Besonderheit des strukturell und funktionell ausgeklügelten Cytochrom a/a₃-Systems, die stufenweise Reduktion des Sauerstoffs so auszuführen, dass die reaktiven Zwischenprodukte so gut gegenüber anderen Reaktionspartnern abgeschirmt sind und so schnell weiter reagieren, dass sie keinen Schaden anrichten können. Für die meisten anderen Enzymsysteme, die mit Sauerstoff reagieren, ist das leider nicht der Fall.

Prinzipiell erfolgt die stufenweise Reduktion des Sauerstoffs wie folgt:

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^- (+e^- + 2H^+) \rightarrow H_2O_2 (+e^- + H^+; -H_2O) \rightarrow OH(+e^- + H^+) \rightarrow H_2O$$

Alle diese Zwischenverbindungen konnten in biologischen Systemen mit Sicherheit nachgewiesen werden. Mit Ausnahme des Endproduktes Wasser sind sie ziemlich reaktiv, das Hydroxylradikal ist sogar außerordentlich aggressiv, da es mit nahezu fast jeder anderen chemischen Verbindung zu reagieren vermag. Auch der molekulare Sauerstoff ist keineswegs harmlos; er kann nämlich nicht nur im energiearmen Triplett-Zustand sondern auch in zwei sehr reaktiven angeregten Formen auftreten, die man unter dem Begriff Singulett-Sauerstoff fasst. Die hier genannten und verschiedene andere Verbindungen und freie Radikale werden heute als reaktive Sauerstoffspezies bezeichnet.

Aus diesen Darlegungen folgt, dass der Sauerstoff Lebenselixier und Gift zugleich ist. Daher bestand im Verlaufe der Evolution die Notwendigkeit, neben der Ausbildung der Maschinerie der biologischen Oxidation auch Schutzsysteme gegen die unvermeidlich außerdem entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies zu entwickeln. Für zwei dieser Spezies wurden spezielle Enzyme für deren Beseitigung entwickelt, so die *Superoxid-Dismutasen* für das 'O₂⁻ sowie die Katalase und verschiedene Peroxidasen für das H₂O₂. Enzyme zur Beseitigung des gefährlichen Hydroxylradikals gibt es hingegen nicht. Die Strategie des Organismus zur Abwehr dieser Noxe besteht vielmehr darin, die Vorstufenmoleküle zu beseitigen, die zur Bildung von 'OH

führen können. Zur Entaktivierung des Singulett-Sauerstoffs, der z.B. bei bestimmten Reaktionen stimulierter weißer Blutkörperchen entsteht, dienen niedermolekulare Verbindungen, die in der Nahrung vorkommen. Als besonders wirksam erwiesen sich einige Karotinoide, insbesondere das in Tomaten vorkommende *Lycopin*. Dem Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies dienen außerdem Thiole, darunter das *Glutathion*, das über verschiedene Mechanismen wirkt. Seine Rolle im oxidativen Stoffwechsel wurde auch von S.M. Rapoport frühzeitig erkannt und speziell in unreifen roten Blutzellen untersucht [1].

Das Ensemble der verschiedenen antioxidativen Schutzsysteme gegenüber den reaktiven Sauerstoffspezies ist so ausgerichtet, dass seine Kapazitäten bei einer "normalen" oxidativen Belastung gerade ausreichen, um eine größere Schädigung der Zellen und des Organismus zu verhindern. Sobald die oxidative Belastung aber größer ist, z.B. bei verschiedenen Erkrankungen, genetischen Defekten und bei Aufnahme giftiger Stoffe, werden mehr reaktive Sauerstoffspezies gebildet als beseitigt. Man spricht in einem solchen Falle vom *oxidativen Stress* [2].

Eine Anzahl verschiedener Enzyme ist in der Lage, direkt mit molekularem Sauerstoff zu reagieren. Je nach Art der Reaktion unterscheidet man dabei drei Typen:

- Oxidasen. Hierbei dient der Sauerstoff als Dehydrierungsmittel für Substrate. Je nachdem, ob dem Substrat dabei ein, zwei oder vier Wasserstoffatome bzw. Elektronen entzogen werden, entsteht dabei Superoxid-Anionradikal, Wasserstoffperoxid oder Wasser.
- Monooxygenasen (Hydroxylasen). Hier dient nur eines der beiden Sauerstoffatome als Dehydrierungsmittel, das zweite hingegen wird in das Substrat eingebaut. Aufgrund der Stellung zwischen den Oxidasen und den Dioxygenasen, nannte man diese Enzyme ursprünglich auch "mischfunktionelle Oxidasen".
- 3. *Dioxygenasen*. Hier werden beide Sauerstoffatome in das organische Substrat eingebaut. Dioxygenasen spielen beim Endabbau des Kohlenstoffskeletts der Substrate eine wichtige Rolle, z.B. beim Abbau aromatischer Aminosäuren. Zu den Dioxygenasen gehören auch die *Lipoxygenasen*, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Rapoport und die Entdeckung der 15-Lipoxygenase-1

Die Entdeckung dieses wichtigen Enzyms des Stoffwechsels mehrfach ungesättigter Fettsäuren hat ihren Ursprung in Arbeiten Rapoports über die Reifung roter Blutzellen. Bei seinen Untersuchungen Mitte der Fünfziger Jahre

machte er die Beobachtung, dass die Atmung dieser Zellen in einem biologisch gesehen kurzen Zeitraum von 1 bis 3 Tagen bis auf fast Null absinkt, wohingegen andere Stoffwechselreaktionen aufrechterhalten werden. Er schloss auf die Gegenwart spezifischer Faktoren in diesen Zellen, die für die Abschaltung der Atmung verantwortlich sein müssten. Er suchte nach ihnen in stromafreien Überständen von Kaninchenretikulozyten und wurde fündig. Er konnte 1955 eine Proteinfraktion isolieren, welche die Atmung eines Präparates aus Rinderherzmuskeln hemmte [3]. Die Wirkungsweise dieses "RÜ-Hemmstoffes" blieb noch lange Zeit ungeklärt, bevor dieses Protein schließlich als Lipoxygenase identifiziert werden konnte. Es zeugt aber von der Scharfsinnigkeit des Forschers Rapoport, dass er wichtige Eigenschaften dieser Lipoxygenase bereits vor ihrer eigentlichen Entdeckung richtig erkannte. Er fand nämlich heraus, dass sie Nichthämeisen enthält, mit Phospholipiden reagiert und ungewöhnlich hoch empfindlich gegenüber Oxidanzien ist – ein Umstand, der ihre Erforschung außerordentlich erschwerte. Rapoport glaubte zunächst nicht an eine Enzymwirkung, da die Wirkung nach Bindung an das Herzmuskelpräparat verloren ging. Wir wissen aber heute, dass Lipoxygenasen suizidale Enzyme sind, d. h. sie inaktivieren sich selbst bei ihrer Reaktion mit entsprechenden Substraten.

Übrigens wurde Rapoport im selben Jahr schon vorher auf andere Weise mit der Lipoxygenase aus Kaninchenretikulozyten konfrontiert, ohne das damals schon erkennen zu können. Er beobachtete in Vollbluthomogenaten anämischer Kaninchen eine ungewöhnlich starke Sauerstoffzehrung, die nichts mit der Zellatmung zu tun hatte [4]. Er erkannte richtig, dass es sich um Lipidperoxidation handeln musste. Auch darüber war damals noch wenig bekannt. Er interpretierte dieses Phänomen als hämin-katalysierten Prozess, obwohl er einige Beobachtungen machte, die nicht im Einklang mit einer nicht-enzymatischen Lipidperoxidation standen. So schrieb er in diesem Artikel: "Die bedeutend geringere Aktivität von erhitzten Ansätzen verglichen mit nicht erhitzten wirft auch die Frage einer echten Enzymwirkung auf." Eine zweite Auffälligkeit war die Unwirksamkeit von Vitamin E in diesem System, die nicht zum hämin-katalysierten Prozess passte. Heute wissen wir, dass es sich bei diesen frühen Beobachtungen Rapoports um die Reaktion der 15-Lipoxygenase-1 mit den Lipoproteinen des Plasmas gehandelt haben musste. Man muss aber berücksichtigen, dass damals zwar die Lipoxygenase der Sojabohnen bereits bekannt war, man glaubte aber noch bis Mitte der Siebziger Jahre, dass solche Enzyme nicht in tierischen Materialien vorkämen.

Der Autor dieses Beitrags stieß Ende 1966 als Diplomand der Biochemie zur Arbeitsgruppe von Rapoport (er gehörte übrigens zur ersten Gruppe von Studenten, die in Deutschland den Grad Diplom-Biochemiker erlangt hatten, lange bevor in Tübingen die ersten Diplom-Biochemiker der alten Bundesrepublik ausgebildet wurden). Die Aufgabe bestand in der Aufklärung der Wirkungsweise des RÜ-Hemmstoffes. Bei der Untersuchung der Wechselwirkung mit Elektronentransfer-Partikeln (ETP) stellte sich heraus, dass dieses Protein bestimmte Teilreaktionen der Atmungskette unterdrückte, die auf eine Bindung an Orten auf der Innenseite der Mitochondrieninnenmembran schließen ließ. Daraus ergab sich die Frage, wie denn ein solches Protein mit einer Molmasse von ca. 80 kDa die beiden Mitochondrienmembranen passieren kann. Wir untersuchten die Wirkung von Fraktionen des Retikulozytenhämolysats auf isolierte Rattenlebermitochondrien und beobachteten dabei eine Wirkung, die wir Mitochondrienlysefaktor (MLF) nannten. Sie bestand in drastischen morphologischen Strukturveränderungen mit Freisetzung von Mitochondrienmatrixenzymen [5]. Damit schienen wir die Antwort gefunden zu haben. Wir glaubten zunächst, dass MLF und RÜ-Hemmstoff verschiedene Proteine seien, die sich in ihren Wirkungen ergänzen würden. Später stellte sich aber ihre Identität heraus. Die Auffindung der MLF-Wirkung war schließlich der Schlüssel zur Entdeckung der Lipoxygenase, denn der MLF war kaum anders als über eine Enzymwirkung zu erklären. Die naheliegende Vermutung, dass es sich um ein phospholipid- oder proteinspaltendes Enzym handeln könnte, wurde nicht bestätigt. Uns fiel aber auf, dass die elektronenmikroskopisch nachweisbaren Veränderungen der Mitochondrien sehr ähnlich waren mit denen nach Auslösung einer nicht-enzymatischen Lipidperoxidation durch Eisensalze plus Vitamin C. Also prüften wir mittels des Thiobarbiturtests, ob bei der Wirkung des MLF auf die Mitochondrien Lipid-Peroxide entstehen. Der Test fiel eindeutig positiv aus; Hitzeinaktivierung des Proteins beseitigte die Wirkung. Wir wechselten das Substrat und verwendeten statt der Mitochondrien reine Phospholipide oder Linolsäure – jedesmal mit demselben positiven Ergebnis. Damit bestand kein Zweifel mehr – wir hatten es mit einer Lipoxygenase zu tun, wobei ihre Fähigkeit, au-Ber mit freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch mit Phospholipiden und sogar biologischen Membranen zu reagieren, allerdings recht ungewöhnlich war [6]. Diese Publikation erschien nur wenige Monate nach der Beschreibung der ersten isolierten tierischen Lipoxygenase in Blutplättchen [7]. Letztere wurde jedoch in einem ganz anderen Fahrwasser entdeckt – der damals gerade aufkeimenden Eikosanoidforschung.

Die Entdeckung der Lipoxygenase in Kaninchenretikulozyten war der eigentliche Startpunkt einer bis heute andauernden erfolgreichen Lipoxygenaseforschung am Institut für Biochemie der Charité. Ohne die frühen Vor-

arbeiten Rapoports jedoch wäre es sicherlich nicht dazu gekommen. 1979 wurde die Retikulozyten-Lipoxygenase als erstes gereinigtes mammaliäres Enzym dieser Familie der Fachwelt in einer ausführlichen Publikation vorgestellt [8]. Wie der Autor dieses Beitrags später erfahren konnte, wurde sie von US-amerikanischen Eikosanoid-Experten "the GDR enzyme" genannt.

Lipoxygenasen im Stoffwechsel mehrfach ungesättigter Fettsäuren

Lipoxygenasen sind nichthämeisen-enthaltende Enzyme, die den molekularen Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren einlagern, wodurch ein Hydroperoxid entsteht. Als Beispiel sei die Reaktion der 15-Lipoxygenase mit der Arachidonsäure angeführt:

Arachidonsäure (5Z,8Z,11Z,14Z-Eikosatetraensäure) ist eine für den Säugerorganismus besonders wichtige Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen und vier Doppelbindungen, die isoliert zueinander sind und sich durchweg in cis-Geometrie befinden. Viele ihrer Oxygenierungsprodukte üben wichtige regulatorische Wirkungen auf die Atemwege, auf das Herzkreislaufsystem und viele andere wichtige Organ- und Gewebefunktionen aus. Sie werden unter dem Sammelnamen Eikosanoide zusammengefasst. Während die Prostaglandine und Thromboxane über eine Reaktion der Arachidonsäure mit Cyclooxygenasen gebildet werden, entstehen einige andere Gruppen von Eikosanoiden über lipoxygenase-abhängige Stoffwechselwege. Hier sind vor allem die Leukotriene zu nennen, die aus weißen Blutzellen und anderen Entzündungszellen freigesetzt werden und an einer Reihe von Erscheinungen bei Entzündungen beteiligt sind.

Strukturelle Voraussetzung für ein Lipoxygenase-Substrat ist das Vorhandensein einer 1,4-Pentadien-Struktur. Wie aus der obigen Formel ersichtlich ist, hat die Arachidonsäure dieses Strukturmerkmal gleich dreifach. Außerdem kann die Lipoxygenierung an diesem Strukturelement an zwei verschiedenen Stellen erfolgen, so dass der Sauerstoff an insgesamt 6 verschiedenen Kohlenstoffatomen (in den Positionen 5, 8, 9, 11, 12, und 15) eingebaut werden könnte. Berücksichtigt man noch die Tatsache, dass bei der Lipoxygenierung ein asymmetrisches C-Atom entsteht, wäre unter Einbeziehung der

Stereoisomeren mit 12 verschiedenen primären Lipoxygenaseprodukten der Arachidonsäure zu rechnen. Allerdings werden aufgrund der Enzymspezifitäten beim Menschen nur vier davon über echte Lipoxygenasereaktionen gebildet (die 5*S*-, 12*S*-, 12*R*- und 15*S*-Hydroperoxyeikosatetraensäuren).

Ursprünglich glaubte man, dass für jedes dieser Eikosanoide eine spezielle Lipoxygenase zuständig sei. Dies trifft aber nur eingeschränkt zu, da manche Lipoxygenasen verschiedene Produkte gleichzeitig bilden können, andererseits aber ein bestimmtes Eikosanoid durch verschiedene Lipoxygenasen entstehen kann. Die dadurch ausgelöste Verwirrung konnte durch Analyse der Lipoxygenase-Gene weitgehend beseitigt werden. Demnach besitzt der Mensch mindestens 5 verschiedene Lipoxygenasen: die 5-Lipoxygenase, die 12S-Lipoxygenase (Plättchentyp), die 12R-Lipoxygenase (Epidermistyp), die 15-Lipoxygenase-1 (Retikulozytentyp) und die 15-Lipoxygenase-2 (epidermal-epithelialer Typ). Sie bilden eine Familie strukturell verwandter Proteine, für die ein Stammbaum aufgestellt werden kann. Hinsichtlich der biologischen Funktionen einiger Lipoxygenasen gibt es lediglich Vermutungen. Am deutlichsten hebt sich die Rolle der 5-Lipoxygenase für die Biosynthese der biologisch aktiven Leukotriene und damit für Entzündungsvorgänge heraus.

Einige Lipoxygenasen reagieren nicht nur mit Arachidonsäure, sondern auch mit anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere mit der Linolsäure und der α -Linolensäure. Die entsprechenden Oxygenierungsprodukte werden in Analogie zu den Eikosanoiden als Oktadekanoide bezeichnet. Alle Oxygenierungsprodukte der Fettsäuren zusammen werden Oxylipine genannt; ihre Bildung in Pilzen, Algen und höheren Pflanzen erfolgt ebenfalls über lipoxygenase-abhängige Stoffwechselwege.

Hinsichtlich der Details über Vorkommen, Struktur, Genetik, Nomenklatur und Reaktionsmechanismen von Lipoxygenasen sei auf kürzliche Übersichtsarbeiten verwiesen [9–12].

Die 15-Lipoxygenase-1 – ein einzigartiges Enzym der enzymatischen Lipidperoxidation

Die an der Biosynthese von Oxylipinen beteiligten Lipoxygenasen reagieren ebenso wie die Cyclooxygenasen mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Regel nur in deren unveresterter Form. Das trifft insbesondere auf viele Eikosanoidsynthesen in Zellen des Säugerorganismus zu. Daraus folgt, dass die Arachidonsäure oder andere Fettsäuren erst durch lipidspaltende Enzyme, wie z.B. Phospholipasen, freigesetzt werden müssen. Dies erfolgt meist über rezeptorabhängige Zellaktivierungen. Die dadurch ausgelöste Reaktionsfolge

der Eikosanoidsynthese bezeichnet man als *Arachidonsäurekaskade*. Die Arachidonsäurekaskade hat ein besonderes Interesse der modernen pharmakologischen Forschung erfahren, da in ihr die Angriffspunkte einer Reihe altbekannter (z.B. Aspirin) und neuerer entzündungshemmender Arzneimittel zu suchen sind. Auch mit Hilfe der 15-Lipoxygenasen können über die Arachidonsäurekaskade verschiedene Eikosanoide gebildet werden. Allerdings ist die biologische Bedeutung derselben umstritten, obwohl eine Reihe von biologischen Aktivitäten dieser Verbindungen beschrieben wurden [13].

Die von uns ursprünglich in Kaninchenretikulozyten entdeckte Lipoxygenase wird heute als 15-Lipoxygenase-1 oder 15-Lipoxygenase des Retikulozytentyps bezeichnet. Diese Spezifizierung machte sich erforderlich, weil beim Menschen eine zweite 15-Lipoxygenase vorkommt, die sich aber sowohl molekulargenetisch als auch hinsichtlich der Reaktionsspezifität und in der Gewebeverteilung vom Enzym des Retikulozytentyps deutlich unterscheidet [9]. Das Vorkommen der 15-Lipoxygenase-1 ist beim Menschen nicht auf die Retikulozyten beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf die Epithelien der Atemwege und die eosinophilen weißen Blutzellen. In einigen Zellen, wie z.B. den Monozyten des Blutes und den Lungenmakrophagen, wird die Expression dieses Enzyms durch bestimmte Mediatoren mit Peptidnatur, nämlich den Cytokinen Interleukin-4 und Interleukin-13 induziert [12]. Soweit sich derzeit einschätzen lässt, kommt dieses Enzym vermutlich bei allen Säugern vor; bemerkenswerterweise zeigen aber die entsprechenden Enzyme von Maus, Ratte, Schwein und Rind im Gegensatz zu Mensch und Kaninchen vorwiegend 12-Lipoxygenaseaktivität, wobei die Fähigkeit zur Reaktion mit Phospholipiden und biologischen Membranen trotzdem vorhanden ist.

Bereits in der ersten Publikation über die 15-Lipoxygenase-1 konnte über die Besonderheit berichtet werden, dass sie mit Phospholipiden und biologischen Membranen ohne Mitwirkung einer Phospholipase zu reagieren vermag [6]. Die Charakterisierung der Reaktion mit Arachidonsäure und damit die Klassifizierung als vorwiegend 15-Lipoxygenase erfolgte erst sieben Jahre später in gemeinsamer Arbeit der Berliner und einer Washingtoner Gruppe [14]. Damit hätten eigentlich ähnliche Eigenschaften bei der Lipoxygenase Laus Sojabohnen, dem am besten charakterisierten pflanzlichen Enzym dieser Familie, erwartet werden müssen, die mit unveresterter Arachidonsäure oder Linolsäure ähnlich reagiert. Vergleichende Untersuchungen ergaben jedoch, dass dies nicht der Fall ist; nur unter ganz speziellen Bedingungen, wie z.B. nach Zusatz von Detergenzien, reagiert auch das pflanzliche Enzym mit Phospholipiden. Die 5-Lipoxygenase und die 12-Lipoxygenase sind als typische Enzyme der Arachidonsäurekaskade dazu überhaupt nicht in der Lage.

Später wurde in Berlin auch die Reaktion der 15-Lipoxygenase-1 und verwandter Enzyme mit *Cholesterolestern* und *Lipoproteinen* des Blutplasmas nachgewiesen [15]. Damit wird deutlich, dass die Lipoxygenasen vom Retikulozytentyp im Gegensatz zu den anderen Unterfamilien tierischer Lipoxygenasen mit sehr komplexen Substraten bis hin zu übergeordneten biologischen Strukturen reagieren. Zudem können anscheinend sämtliche natürlich vorkommenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren in freier oder veresterter Form oxygeniert werden. Damit erreichen die Vertreter dieser Enzym-Unterfamilie hinsichtlich ihres Substratspektrums die höchst mögliche Universalität unter allen Lipoxygenasen. Aufgrund dieser Charakteristik erweisen sich die 15-Lipoxygenase-1 und ihre Verwandten als Katalysatoren einer *enzymatischen Lipidperoxidation*.

Die enzymatische Lipidperoxidation ist das Gegenstück zur nicht-enzymatischen Lipidperoxidation. Letztere kann durch reaktive Sauerstoffspezies (siehe oben) und andere freie Radikale, einige Umweltgifte (Xenobiotika) durch Spuren von Übergangsmetallionen (Cu, Fe, Mn u.a.) sowie UV-Strahlen (vor allem in der Haut) ausgelöst werden. Auf den ersten Blick sind der enzymatische und der nicht-enzymatische Prozess einander sehr ähnlich, in beiden Fällen entstehen primär Hydroperoxylipide. Aufgrund der fehlenden Reaktionsspezifität nicht-enzymatischer Reaktionen ist das Produktspektrum bei letzteren jedoch weitaus mannigfaltiger. Ein sicheres Kriterium für die Beteiligung von Lipoxygenasen ist daher das Überwiegen bestimmter optischer Isomeren, die mit speziellen analytischen Verfahren nachgewiesen werden können. So erbrachten H. Kühn und Mitarbeiter über die Identifizierung stereospezifischer Lipidperoxidationsprodukte in intakten Kaninchenretikulozyten den endgültigen Nachweis, dass die 15-Lipoxygenase-1 auch in vivo die Membranphospholipide direkt angreift und damit im Sinne einer enzymatischen Lipidperoxidation wirkt [16]. Diese Untersuchungen deckten aber noch eine weitere Besonderheit auf: Während in den Plasmamembranen der Zellen fast ausschließlich Lipoxygenaseprodukte nachgewiesen wurden, traten in den Mitochondrienmembranen auch Produkte auf, die dem nicht-enzymatischen Prozess zuzuordnen sind. Dies ließ sich auch in vitro mit reiner 15-Lipoxygenase-1 simulieren. Die plausible Erklärung dafür ist, dass die lipoxygenase-vermittelte Lipidperoxidation eine nicht-enzymatische Lipidperoxidation sekundär nach sich zieht. Interessanterweise gilt auch das Umgekehrte: Damit die Lipoxygenase aus ihrem Ruhezustand in das aktive Enzym überführt wird, werden geringe Mengen Hydroperoxylipide benötigt, die durchaus über den nicht-enzymatischen Weg entstehen können. Weiterhin können unspezifische Lipidperoxidationsprodukte über einen Mischtyp von enzymatischer und nicht-enzymatischer Katalyse entstehen, nämlich indem zwar der erste Reaktionsschritt enzymatisch abläuft, die folgenden hin-

gegen nicht-enzymatisch nach Abdissoziation des Zwischenprodukts vom aktiven Zentrum des Enzyms. Diese gegenseitigen Wechselwirkungen zwischen enzymatischer und nicht-enzymatischer Lipidperoxidation, welche unter den Bedingungen des oxidativen Stresses begünstigt sind [12], erschweren natürlich die Untersuchung solcher Vorgänge. Wie bereits erwähnt, ist der Nachweis der entsprechenden spezifischen Produkte ein eindeutiges Kriterium für eine Beteiligung von Lipoxygenasen; umgekehrt schließt aber der Nachweis unspezifischer Lipidperoxidationsprodukte eine solche nicht aus.

Die 15-Lipoxygenase-1 und die Reifung roter Blutzellen

Die Beobachtung, dass außer Lipoxygenaseprodukten auch Produkte einer nicht-enzymatischen Lipidperoxidation in den Mitochondrien, nicht aber in den Plasmamembranen unreifer roter Blutzellen auftreten, ist wohl der Schlüssel zur Antwort auf eine Frage, die sich uns frühzeitig aufdrängte, als Rapoport und der Autor dieses Beitrags über die Rolle der 15-Lipoxygenase-1 beim reifungsbedingten Abbau der Mitochondrien in Retikulozyten nachzudenken begannen [17, 18]: Wie erklärt sich, dass bei der Reifung der Zellen selektiv die Mitochondrien, nicht aber die Plasmamembranen verschwinden, wo doch die 15-Lipoxygenase-1 beide Membrantypen angreift? Die Gegenwart von Cholesterol in den Plasmamembranen erhöht zwar deren Resistenz gegenüber der 15-Lipoxygenase-1, kann dies allein aber nicht befriedigend erklären. Die entscheidende Rolle dürfte eher der lipoxygenase-induzierten nicht-enzymatischen Lipidperoxidation zukommen, die selektiv bei den Mitochondrienmembranen auftritt. Das erhebliche Ausmaß der letzteren konnte nicht nur aus der Menge der entsprechenden Lipidperoxidationsprodukte abgeleitet werden, sondern auch aufgrund des Auftretens eines überschüssigen Sauerstoffverbrauchs sowie einer Kooxidation von Proteinen ausschließlich in den Mitochondrienmembranen; für die mitochondriale Selektivität dieser Prozesse ist allem Anschein nach über seine Semichinonradikalform das Ubichinon verantwortlich [19], das in den Plasmamembranen nicht vorkommt. Bemerkenswerterweise ist das Ubichinon ein essentieller Bestandteil des Elektronentransfersystems der Atmungskette und übt über seine reduzierten Formen auch antioxidative Funktionen aus, indem es bestimmte Formen der nicht-enzymatischen Lipidperoxidation zu hemmen vermag und so die empfindliche Maschinerie der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung schützt. Seine Rolle beim Abbau der Mitochondrien im Wechselspiel mit der 15-Lipoxygenase-1 ist hingegen als prooxidativ einzuordnen.

Nun bestehen Mitochondrien sowohl aus Proteinen als auch aus Lipiden. Primäres Substrat der Lipoxygenase sind ausschließlich die Lipide. Daraus folgt, dass der Abbau der Proteine in den Mitochondrien irgendwie mit dem Angriff der 15-Lipoxygenase-1 auf die Lipide gekoppelt sein muss. Dies konnte Rapoport in Zusammenarbeit mit W. Dubiel und M. Müller direkt nachweisen; eine Reihe von Lipoxygenasehemmern unterdrücken nämlich die ATP- und ubiquitin-abhängige Proteolyse der Mitochondrienproteine, ohne auf dieses proteasomale System direkt zu wirken [8]. Schon zuvor war von anderen Autoren postuliert worden, dass eine Funktion der proteasomalen Proteolyse darin bestehen könnte, fehlerhafte und geschädigte Proteine zu eliminieren. Dabei wurde eher an zufällig entstandene Fehlbildungen der Proteine gedacht. Sie entstehen offenbar aber auch als biologisch programmierter Prozess durch oxidative Modifizierung der Mitochondrienproteine als Folge das Angriffs der 15-Lipoxygenase-1 auf die Mitochondrienlipide und dadurch bedingter sekundärer Kooxidation.

Über eine solche kooxidative Veränderung von Proteinen erklärt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die Inaktivierung des mitochondrialen Elektronentransfersystems – eine Eigenschaft der 15-Lipoxygenase-1, die zu ihrer Entdeckung führte (siehe oben). Eine Reihe von Beobachtungen belegen, dass es sich dabei um einen sekundären Effekt handeln muss. Zum einen schützen bestimmte Komplexbildner wie EDTA vor der Inaktivierung des Elektronentransfersystems, die jedoch ohne Wirkung auf die Lipoxygenaseaktivität selbst sind; aus diesem Grunde zweifelte Rapoport anfangs noch an der Identität von "RÜ-Hemmstoff" und 15-Lipoxygenase-1. Zum anderen verstärken Autoxidationskatalysatoren, wie z.B. Hämoglobin, die Inaktivierung des Elektronentransfersystems durch 15-Lipoxygenase-1 [20].

Der Angriff der 15-Lipoxygenase-1 auf die Mitochondrien in Retikulozyten ist seiner Natur nach eine Lipidperoxidation, die in den Lehrbüchern zumeist als ein unerwünschter Schadprozess definiert wird. Für den reifungsbedingten Abbau der Mitochondrien in Retikulozyten kommt man aber man mit einer Betrachtung als Schadprozess in Schwierigkeiten. Dieser Vorgang ist biologisch programmiert und ähnelt in dieser Hinsicht der heute viel untersuchten Apoptose von Zellen, worunter man den biologisch programmierten Zelluntergang versteht. Der reife Erythrozyt benötigt als hoch spezialisierte Zelle keine Mitochondrien mehr. Die Verzögerung ihres Abbaus würde eher eine Funktionsbeeinträchtigung der roten Blutzelle nach sich ziehen. Außerdem setzt nach dem Angriff der Lipoxygenase auf die Mitochondrien auch ein Abbau der Proteine ein. Dabei werden Aminosäuren freigesetzt, die teils zur Energiegewinnung, teils als Bausteine für die Hämoglobinsynthese in Retikulozyten herangezogen werden. Rapoport nannte einmal diese "nützliche" Art einer Schädigung "teleonomic regulated

damage to mitochondria" und überschrieb so einen Vortrag, den er 1983 auf einem EMBO-Workshop zum Thema "Oxidative damage and related enzymes" hielt. Da die Teilnehmer dieses Workshops aus zumeist westlichen Ländern keine Kenntnisse der Leninschen Philosophie hatten, kannten sie den Begriff "teleonomic" nicht und Rapoport musste ihnen den Unterschied zwischen "teleonomic" und "teleologic" erklären.

15-Lipoxygenase-1 und Atherosklerose

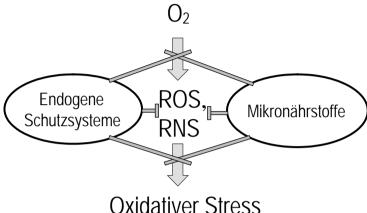
Als Enzym der enzymatischen Lipidperoxidation wurde die 15-Lipoxygenase-1 auch mit der Entstehung der *Atherosklerose* in Verbindung gebracht. Die Entstehungsursachen dieser ziemlich weit verbreiteten Zivilisationskrankheit sind trotz intensiver Forschung noch umstritten. Unter den verschiedenen Vorstellungen findet heute die *Oxidationshypothese* [21] besondere Beachtung. Danach liegt der Schlüssel im Low-density Lipoprotein (LDL), das in Frühstadien der Atherosklerose oxidativ modifiziert wird und dadurch anstatt über die gut regulierten LDL-Rezeptoren über sogenannte Scavenger-Rezeptoren von den Zellen des Aortaendothels aufgenommen wird. Unklar ist jedoch, wodurch das LDL oxidiert wird und wie dieser Prozess ausgelöst wird. Es wurden verschiedene Faktoren herausgefunden, die für die Oxidation des LDL *in vivo* in Frage kommen. Neben Übergangsmetallionen, Thiolen und Peroxynitrit gehören auch einige prooxidative Enzyme dazu, vor allem Lipoxygenasen und die Myeloperoxidase [22].

Die Beteiligung der 15-Lipoxygenase-1 an der Ausbildung der atherosklerotischen Schädigungsariale in den Blutgefäßen wird durch die Arbeiten der Berliner Gruppe von H. Kühn und anderer Autoren stark gestützt. Unklar ist jedoch, ob dieses Enzym ursächlich mit der Entstehung der Atherosklerose in Zusammenhang gebracht werden kann oder eher Ausdruck einer Gegenregulation ist, da die experimentellen Daten sowohl auf proatherogene als auch antiatherogene Wirkungen hindeuten [23]. Die Klärung dieser Frage ist von prinzipieller Bedeutung für die Medizin, denn es kann daraus abgeleitet werden, ob es Sinn hat, spezifische Hemmer der 15-Lipoxygenase-1 für die Prävention und Therapie atherosklerotischer Erkrankungen einzusetzen. Kürzliche Arbeiten an Mäusen, bei denen das Gen für das entsprechende Enzym zerstört wurde ("Knockout-Mäuse") stützen die Annahme der antiatherogenen Wirkung, die aber aufgrund der neuesten Arbeit einer Erfurter Gruppe für den Menschen wieder in Zweifel gestellt werden muss [24].

Die Nahrung als Quelle antioxidativer Schutzstoffe

Wie eingangs erwähnt, gehen die biochemischen Reaktionen des Sauerstoffs mit einer Bildung reaktiver Sauerstoffspezies einher, die bei verstärkter Bildung zum oxidativen Stress führen können. Der oxidative Stress steht im Zusammenhang mit der Genese vieler Krankheiten, darunter den häufigen Herzkreislauferkrankungen. Dass gerade bei der Prävention dieser die Ernährung eine wichtige Rolle spielt, ist seit langem bekannt. Man hat aber neben den Nahrungsfetten zunächst nur den antioxidativen Vitaminen C, E und A besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Wir wissen aber inzwischen, dass gerade in pflanzlichen Nahrungsmitteln außerdem eine Reihe von Polyphenolen unterschiedlicher chemischer Struktur vorkommen, die maßgeblich am antioxidativen Schutz unter den Bedingungen eines oxidativen Stresses beteiligt sind; denn die endogenen antioxidativen Schutzsysteme reichen nicht immer aus, das gestörte Gleichgewicht zwischen Bildung und Beseitigung der reaktiven Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) wieder herzustellen. Hier hilft uns aber die Nahrung, sofern wir uns gesundheitsbewusst ernähren. So enthalten insbesondere pflanzliche Nahrungsmittel eine Vielzahl von natürlichen Antioxidanzien. Sie werden heute unter dem Begriff Mikronährstoffe zusammengefasst. Manche Autoren vergleichen sie sogar mit Arzneimitteln und haben deshalb den Namen "Nutraceuticals" (aus "nutrient" und "pharmaceuticals") geprägt [25]. Die Verhältnisse werden in nachfolgendem Schema dargestellt. Die antioxidativen Schutzsysteme verhindern entweder die Bildung der ROS und RNS (obere Balken), beseitigen sie durch

Abfangreaktionen (mittlere Balken) oder blockieren die schädigenden Wirkungen der ROS und RNS (untere Balken).



Eine wichtige Gruppe dieser Mikronährstoffe sind die Flavonoide (zur chemischen Struktur und Bedeutung der Flavonoide siehe auch den Beitrag von Frau G. Jacobasch in diesem Band). Sie sind neben anderen Polyphenolen (darunter versteht man Verbindungen, die mehr als eine Hydroxylgruppe am aromatischen Ringsystem enthalten) in pflanzlichen Nahrungsmitteln ziemlich weit verbreitet. Die täglich aufgenommene Menge an Polyphenolen ist nicht unbeträchtlich. Eine kürzliche niederländische Studie hat ergeben, dass durchschnittlich 50 mg Flavanole (auch Catechine genannt), 23 mg Flavonole und Flavone (hauptsächlich Quercetin) sowie etwa 500 bis 1000 mg Zimtsäurederivate (Kaffeesäure und verwandte Verbindungen) täglich aufgenommen werden. Damit übersteigt die Zufuhr von Polyphenolen die tägliche Aufnahme der Vitamine C und E um eine Größenordnung. Sie hängt natürlich stark von individuellen Ernährungsgewohnheiten und regionalen Traditionen ab. Wichtigste Quellen für Flavonoide sind roter Traubensaft und Rotwein, grüner und schwarzer Tee, Kakao und Schokolade, diverse Obstarten und Fruchtsäfte sowie grüne Pflanzenteile und Zwiebeln, wohingegen Kaffee und wiederum Tee außerordentlich reichhaltige Quellen für Zimtsäurederivate sind.

Diese Polyphenole entfalten ihre antioxidativen Wirkungen auf drei Ebenen:

1. Abfangen von freien Radikalen sowie von reaktiven O- und N-Spezies;

- 2. Komplexierung von Metallionen (Fe, Cu u.a.) und somit Maskierung ihrer prooxidativen Eigenschaften;
- 3. Hemmung von prooxidativen Enzymen: Lipoxygenasen, PGH-Synthasen, NADPH-Oxidase, Myeloperoxidase, Xanthinoxidase, Cytochrom P-450-Enzyme.

Während die beiden erstgenannten Ebenen sehr intensiv untersucht wurden und Gegenstand zahlreicher Publikationen und Monographien sind [26], besteht hinsichtlich der dritten Ebene noch ein Nachholbedarf. Unsere Arbeitsgruppe in Düsseldorf wandte sich deshalb den Lipoxygenasen und der Myeloperoxidase zu.

Flavanole des Kakaos als Lipoxygenasehemmer

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war ein Bericht in der Literatur, wonach nach Gabe einer besonders flavanolreichen Schokoladensorte bei den Probanden deutliche Veränderungen in den Plasmaspiegeln der Eikosanoide auftraten, und zwar in einer Richtung, die für das Herzkreislaufsystem günstig erschien. Während die Konzentration der sogenannten *Cysteinylleukotriene* erniedrigt wurde, stieg der *Prostacyclinmetabolit* an [27]. Die Leukotriene sind Entzündungsmediatoren und schädlich für das Blutgefäßsystem. Das Prostacyclin hingegen ist ein kurzlebiges Eikosanoid, welches das Gefäßsystem und die Herzfunktionen in mehrfacher Weise schützt. So können z.B. seine Wirkungsmechanismen einem Herzinfarkt vorbeugen. Da das entsprechende Enzym für die Prostacyclinsynthese besonders oxidationsempfindlich ist, kann oxidativer Stress eine verminderte Prostacyclinbildung mit erhöhtem Herzinfarktrisiko zur Folge haben.

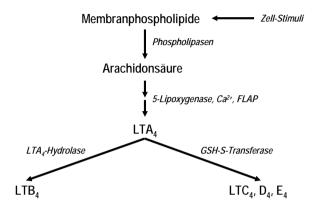
Während der Anstieg des Prostacyclins nach Flavonoidzufuhr vermutlich auf einem antioxidativen Schutz des betreffenden Enzyms beruht, war die Ursache der Erniedrigung der Leukotriene unklar. Wie bereits erwähnt, erfolgt die Biosynthese der Leukotriene über den 5-Lipoxygenaseweg der Arachidonsäurekaskade (siehe nachfolgendes Schema). Die 5-Lipoxygenase katalysiert dabei zwei aufeinanderfolgende Schritte der Umwandlung der durch Phospholipasen freigesetzten Arachidonsäure zu Leukotrien A₄ (LTA₄). Damit drängte sich uns die Frage auf, ob der Anti-Leukotrien-Effekt von flavanolreicher Schokolade die Folge einer Hemmung der 5-Lipoxygenase ist. Wie aus dem Schema ersichtlich ist, kämen prinzipiell auch andere Schritte der Arachidonsäurekaskade als Angriffspunkt der Flavanole in Frage. Wir prüften dies an rekombinanter humaner 5-Lipoxygenase, die bei H. Kühn verfügbar war.

Die Flavanole des Kakaos stellen ein Gemisch von Monomeren und Oligomeren dar. Die Monomerenfraktion besteht hauptsächlich aus (–)-Epicatechin und (+)-Catechin. Die Oligomeren werden auch Procyanidine genannt und entstehen durch kovalente Verknüpfung von Epicatechinmolekülen [28]. Im Gegensatz zu den monomeren Flavanolen und in geringem Maße den Dimeren werden die übrigen Procyanidine anscheinend nicht im Dünndarm resorbiert. Allerdings werden die Procyanidine bei der Magen-Darm-Passage gespalten. Daher findet man im Blutplasma hauptsächlich Metabolite des (–)-Epicatechins.

Tatsächlich konnten wir nachweisen, dass (–)-Epicatechin dosisabhängig beide lipoxygenase-katalysierten Teilschritte der LTA₄-Synthese im vergleichbaren Ausmaß hemmt [29].

Diese Beobachtung sprach dafür, dass das Flavanol direkt mit dem Enzymprotein in Wechselwirkung tritt. Damit war zu vermuten, dass auch andere Lipoxygenasen gehemmt würden. Erwartungsgemäß konnten wir entsprechende Hemmungen der 12-Lipoxygenase der Blutplättchen des Menschen sowie der 15-Lipoxygenase-1 aus Kaninchenretikulozyten nachweisen [30]. Lediglich die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 erwies sich als unempfindlich, wurde aber durch andere Flavonoide wie das im grünen Tee vorkommende (–)-Epigallocatechingallat gehemmt [30].

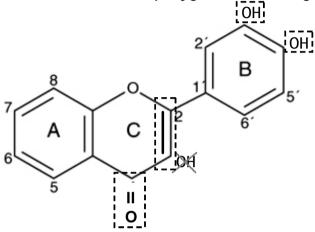
Der 5-Lipoxygenase-Weg



Sehr unterschiedlich verhielten sich die aus den Samen des Kakaobaums isolierten Fraktionen von Procyanidinen. Während die 5-Lipoxygenase nur durch die Dimeren-Fraktion und die anderen kürzeren Oligomeren nennenswert gehemmt wurde [29], nahm die Wirksamkeit auf die 15-Lipoxygenase-1 vom Monomer zu den Tetrameren ebenfalls ab, stieg aber nach Durchlaufen dieses Minimums mit den höheren Oligomeren wieder an, so dass bei der Nonameren- und Dekameren-Fraktion die stärksten Hemmungen beobachtet wurden [30]. Ob dieser Wirkung der höheren Procyanidine eine biologische Bedeutung zukommt, ist unbekannt. Allerdings stellten wir bei Untersuchungen zum Lipoxygenasestoffwechsel intakter Zellen in Übereinstimmung mit anderen Autoren fest, dass die höheren Procyanidine nicht ohne weiteres in die Zellen einzudringen vermögen. Da sie mit Ausnahme einer sehr niedrigen Konzentration an Dimeren auch nicht im Blutplasma zu finden sind, müsste ihre direkte biologische Wirkung auf den gastrointestinalen Raum beschränkt sein, sofern es überhaupt eine gibt.

Um Einblicke darüber zu bekommen, welche strukturellen Merkmale der sehr heterogenen Naturstoffklasse der Flavonoide zur Hemmung von Lipoxygenasen beitragen, untersuchten wir ein repräsentatives Spektrum von Flavonoiden sowohl auf die 15-Lipoxygenase-1 als auch auf die Sojabohnen-Lipoxygenase L-1 [31]. Die aus diesen Daten sich ableitenden Schlussfolgerungen sind im folgenden Schema dargestellt:

Strukturelle Voraussetzungen der Flavonoide für die Lipoxygenasehemmung



Die mit den gestrichelten Kästchen gekennzeichneten Gruppierungen begünstigen die Lipoxygenasehemmung. Es sind dies die Carbonylgruppe am C-4 und die 2,3- Doppelbindung im C-Ring sowie die Catecholgruppierung am B-Ring. Dagegen ist die OH-Gruppe am C-3, die ein Charakteristikum der Flavonole ist, zu der das ubiquitäre Quercetin gehört, eher störend. So erwies sich das zu den Flavonen zählende *Luteolin*, das sich vom Quercetin lediglich durch das Fehlen eben dieser Gruppe unterscheidet, als das wirksamste von uns getestete Flavonoid. Luteolin kommt in Artischocken, Sellerie, Petersilie, Löwenzahn, Rosmarin und einigen Arzneipflanzen (Johanniskraut, Kamille, Melisse, Reseda) vor.

Flavonoide und Myeloperoxidase

Wie bereits erwähnt, ist an der zur Atherosklerose führenden oxidativen Modifizierung des LDL anscheinend auch die *Myeloperoxidase* (MPO) beteiligt. Dieses Enzym kommt in weißen Blutzellen vor und erfüllt eine wichtige Funktion bei der Abtötung von in den Organismus eingedrungenen Fremdorganismen. Bei Entzündungen jedoch wird dieses Enzym aus den Zellen freigesetzt und kann Schädigungen der betroffenen Gewebe verursachen. Bis vor kurzem glaubte man noch, dass die Wirkung der MPO ausschließlich auf der

Bildung von unterchloriger Säure (HOCl) aus Chlorid und Wasserstoffperoxid beruhe. Inzwischen gilt jedoch als sicher, dass dieses Enzym außerdem Nitrit (NO₂⁻) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zum sehr reaktiven NO₂-Radikal oxidiert. Wir konnten zeigen, dass das MPO/Nitrit-System eine Lipidperoxidation im LDL verursacht, wohingegen das entsprechende System mit Chlorid kaum eine Wirkung zeigt. Epicatechin, Quercetin und einige andere Flavonoide hemmten dosisabhängig die MPO/Nitrit-abhängige Lipidperoxidation im LDL [32]. Interessanterweise konnten wir auch zeigen, dass die Flavonoide selbst Substrate der MPO sind. Damit konnten wir erstmals Wechselwirkungen der Flavonoide mit diesem prooxidativen Enzym nachweisen, die zu den gesundheitsfördernden Wirkungen dieser Mikronährstoffe beitragen könnten.

Literatur

- [1] Rapoport, S.M., Müller, M. (1974): The influence of methylene blue on the respiratory metabolism of the reticulocyte. Eur. J. Biochem. 46: 335–340.
- [2] Sies, H. (1985): Oxidative stress: Introductory remarks. In: Oxidative Stress (H. Sies, ed.) Academic Press, London, UK, pp.1–8.
- [3] Rapoport, S., (1955): Biochemische Vorgänge bei der Erythrocytenreifung: Über einen Hemmstoff des Succinatoxydase-Systems in Reticulocyten. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 302: 167–173.
- [4] Rapoport, S., Gerischer-Mothes, W., Nieradt, C. (1955): Hämin-katalysierte Oxydation ungesättigter Fettsäuren im Blut anämischer Kaninchen. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 200: 174–187.
- [5] Schewe, T., Krause, W., Halangk, W., Rapoport, S.M (1975): On a factor lysing mitochondria in rabbit reticulocytes. VII. Internationales Symposium über Struktur und Funktion der Erythrozyten, Berlin, 1973 In: Abhandlungen der Akademie der Wissenschaften der DDR, Akademie-Verlag Berlin, pp. 609–615.
- [6] Schewe, T., Halangk, W., Hiebsch, C., Rapoport, S.M. (1975): A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. FEBS Lett. 60: 149–152.
- [7] Nugteren, D.H. (1975): Arachidonate lipoxygenase in blood platelets. Biochim. Biophys. Acta 280: 299–307.
- [8] Rapoport, S.M., Schewe, T., Wiesner, R., Halangk, W., Ludwig, P., Janicke-Höhne, M., Tannert, C., Hiebsch, C., Klatt, D. (1979): The lipoxygenase of reticulocytes. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte. Eur. J. Biochem. 96: 545–561.
- [9] Brash, A.R. (1999): Minireview: Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. J. Biol. Chem. 274: 23679–23682.

[10]Kühn, H., Thiele, B.J. (1999): Minireview: The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. FEBS Lett. 449: 7–11.

- [11]Kühn, H., Borchert, A. (2002): Regulation of enzymatic lipid peroxidation. The regulatory interplay between lipid peroxidizing and peroxy-lipid reducing enzymes. Free Radic. Biol. Med. 33: 154–172.
- [12]Schewe, T. (2002): 15-Lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme. Biol. Chem. 383: 365–374.
- [13]Kühn, H. (1996): Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(pero)xy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)xy-9Z,11E-octadecadienoic acid. Prog. Lipid Res. 35: 203–226.
- [14] Bryant, R.W., Bailey, J.M., Schewe, T., Rapoport, S.M. (1982): Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. Conversion of arachidonic acid to 15S-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid. J. Biol. Chem. 257: 6050–6055.
- [15]Belkner, J., Wiesner, R., Rathman, J., Barnett, J., Sigal, E., Kühn, H. (1993): Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipoxygenases. Eur. J. Biochem. 213: 251–261.
- [16]Kühn, H., Belkner, J., Wiesner, R. (1990): Subcellular distribution of lipoxygenase products in rabbit reticulocyte membranes. Eur. J. Biochem. 191: 221–227.
- [17]Rapoport, S.M. Schewe, T. (1986): The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. Biochim. Biophys. Acta 864: 471–495.
- [18]Rapoport, S.M., Schewe, T., Thiele, B.J. (1990): Maturational breakdown of mitochondria and other organelles in reticulocytes. In: Blood Cell Biochemistry, Vol. 1: Erythroid Cells (Harris, J.R., ed.), Plenum Press, New York, pp. 151–194.
- [19]Schnurr, K., Hellwing, M., Seidemann, B., Jungblut, P., Kühn, H., Rapoport, S.M., Schewe T. (1996): Oxygenation of biomembranes by mammalian lipoxygenases: the role of ubiquinone. Free Radic. Biol. Med. 20: 11–21.
- [20]Schewe, T., Hiebsch, C., Ludwig, P., Rapoport, S.M. (1983): Haemoglobin potentiates the respiration-inhibitory action of lipoxygenases via its pseudolipohydroperoxidase activity. Biomed. Biochim. Acta 42: 789–803.
- [21]Steinberg, D. (1997): Low-density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. J. Biol. Chem. 272: 20963–20966.
- [22]Berliner, J.A., Heinecke, J.W. (1996): The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. Free Radic. Biol. Med. 20: 707–727.
- [23]Kühn, H., Chan, L. (1997): The role of 15-lipoxygenase in atherogenesis. Proand/or antiatherogenic action. Curr. Opin. Lipidol. 8: 111–117.
- [24]Spanbroek, R., Gräbner, R., Lötzer, K., Hildner, M., Urbach, A., Rühling, K., Cohnert, T.O., Wahlers, T., Zieske, A., Plenz, G., Robenek, H., Salbach, P., Kühn, H., Rådmark, O., Samuelsson, B., Habenicht, A.J.R. (2003): The 5-lipoxygenase pathway constitutes circuits of inflammation during human atherogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, im Druck.

- [25]Krämer, K., Hoppe, P.-P., Packer, L., eds. (2001): Neutraceuticals in Health and Disease. Marcel Dekker, Inc., New York.
- [26]Rice-Evans, C.A., Packer, L., eds. (1997): Flavonoids in Health and Disease. Marcel Dekker, Inc., New York.
- [27]Schramm, D.D., Wang, J.F., Holt, R.R., Ensunsa, J.L., Gonsalves, J.L., Lazarus, S.A., Schmitz, H.H., German, J.B., Keen, C.L. (2001): Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. Am. J. Clin. Nutr. 73: 36–40.
- [28]Haslam, E. (1998): Practical Polyphenolics. From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- [29]Schewe, T., Kühn, H., Sies, H. (2002): Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. J. Nutr. 132: 1825–1829.
- [30] Schewe, T., Sadik C., Klotz L.O., Yoshimoto, T., Kühn, H., Sies, H. (2001): Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. Biol. Chem. 382: 1687–1696.
- [31]Sadik, C.D., Sies, H., Schewe, T. (2003): Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids. Structure-activity relations and mode of action. Biochem. Pharmacol. 65: im Druck.
- [32]Kostyuk, V.A., Kraemer, T., Sies, H., Schewe, T. (2003): Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids. FEBS Lett., im Druck.

Schlußbemerkungen des Jubilars

Lassen Sie mich Dank sagen, vorerst der Leibniz-Sozietät, Wolfgang Eichhorn und vor allem Gisela Jacobasch, die diese wunderbare Zusammenkunft so schön organisiert hat. Ich danke den Vortragenden, die mir auch persönlich nahe stehen, den vielen Gästen aus nah und fern, sowie den Kollegen der Sternwarte, die einen so würdigen und angenehmen Rahmen ermöglichten.



Der Anlaß dieser Veranstaltung führt mich zu vergangenen Zeiten zurück. Als ich im Jahre 1930 die Wiener Universität bezog, existierte das Fach Biochemie noch gar nicht, weder in Wien noch sonstwo in Europa; und doch wußte ich, daß es ein solches Fach geben müsse. Ich suchte und fand eine Heimstatt am Institut für Medizinische Chemie, Währinger Straße 10. Ich hatte das Glück, während des ganzen Studiums, zuerst Chemie dann Medizin,

forschen zu dürfen. Wenn ich an diese Zeit zurückdenke, so ist die ungeheure Entwicklung der Biowissenschaften frappierend, vor allem durch die Entwicklung der Methoden, die, wie ich an anderer Stelle hervorgehoben habe, das revolutionärste Element in der Wissenschaftsentwicklung darstellen. Dazu gehört auch das Eindringen von Mathematik, Physik, Informatik und Automatisierung. Diese Entwicklungen sind nicht problemlos. Mir scheint es in den Biowissenschaften besonders wichtig zu sein, den Kontakt zur Natur zu bewahren und die unmittelbare Neugier wach zu halten, das Gefühl, das Pawlow den "was ist das" Reflex nannte.

Lassen Sie mich einige Worte zur Wissenschaft und zu Wissenschaftlern äußern. Darüber ließe sich viel sagen. Wissenschaft unterscheidet sich von Kunst vor allem in ihrer Strukturiertheit. Wissenschaftler stehen immer auf den Schultern ihrer Vorgänger und Lehrer. Ihre Leistungen sind stärker zeitgebunden und verschmelzen in ein Allgemeinwissen. Das ist natürlich cum grano salis zu verstehen, einige hervorragende Persönlichkeiten überdauern Epochen der kulturellen Entwicklung, aber im Wesentlichen ist der wissenschaftliche Fortschritt eine Gemeinschaftsleistung. Was sind nun die wesentlichen Charakteristika eines Wissenschaftlers? Vorneweg muß man feststellen, daß eine Vielfalt von Persönlichkeiten in der Wissenschaft ihren Platz und ihre Bedeutung finden. Gemeinsam scheint mir und unerläßlich ihre Hingabe und Leidenschaft für Wissenschaften. Sie wird kontrolliert und diszipliniert durch Wahrhaftigkeit und Selbstkritik. Durch übermäßigen Ehrgeiz, Eigennutz und Neid wird sie bedroht.

Der Umfang der Wissenschaften ist gewaltig gewachsen. Umfangreiche wirtschaftliche Interessen sind wichtige Einflußfaktoren geworden und stellen eine Bedrohung des wissenschaftlichen Ethos dar. Um so wichtiger ist es, die ethischen Aspekte bewußt werden zu lassen. Dazu gehört, Anerkennung der Leistung anderer, einen der Wissenschaft innewohnenden Demokratismus zu pflegen, Beiträge der Jugend ebenso wie die historischen Leistungen von Älteren anzuerkennen und ein wahres Gefühl für den internationalen Fortschritt zu haben, kurzum ein Verantwortungsgefühl für die wissenschaftliche Gemeinschaft in der Welt zu entwickeln.

Wovon hängt nun der Einfluß der Wissenschaft ab? Das ist eine schwierige Frage. Sicher gehört dazu Beharrlichkeit, aber auch die Fähigkeit aus einer Sackgasse herauszukommen, ein im Augenblick unlösbares Problem loszulassen, Phantasie und vor allem Glück.

Die größte Befriedigung findet man in der wissenschaftlichen Tätigkeit ungeachtet äußerlicher Erfolge. Ein wichtiger Aspekt ist dabei das Lehrer-Schüler-Verhältnis. Ich empfinde als das größte Glück, Schüler zu haben, die

klüger und tüchtiger sind als ich selbst und von denen ich immer wieder lernen kann, soweit es meine Fähigkeiten zulassen.

Die Wissenschaft ist viel stärker in das Rampenlicht der Öffentlichkeit gerückt als je zuvor. Es gibt ein berechtigtes Interesse der Öffentlichkeit, über Erfolge und Probleme der Wissenschaft informiert zu werden. Die Wissenschaftler sind moralisch und gesellschaftlich verpflichtet, über ihr Tun und Planen Rechenschaft abzulegen. Verantwortungsvolle und gebildete Journalisten haben dabei eine wichtige Mittlerfunktion. Aber das Bild der Wissenschaft in der Öffentlichkeit wird bestimmt durch eine häßliche Karikatur, einen ständigen Medienrummel, eine Sensationslust, die ständige Verbreitung von Ängsten und Panik, ob es sich nun um die Verteufelung der Gentechnik oder die Ausmalung eines biologischen Krieges jenseits aller Erfahrungen und Möglichkeiten handelt.

Die deutsche Wissenschaft hat einen Systembruch erlitten. Eine lebendige Struktur, die Wissenschaft der DDR, wurde zerstört. Mehr als 80% der Wissenschaftler wurden auf verschiedene Weise abgewickelt bzw. entlassen. Die Kontinuität, ein Kennzeichen gedeihlicher Wissenschaft, wurde auf das Gröblichste verletzt. Die Chance einer echten auf positiven Erfahrungen in beiden deutschen Staaten fußenden Integration wurde vertan. Die bürokratische Auflösung der Akademie der Wissenschaften stellt einen Vertragsbruch dar und ist einzigartig in der Geschichte der Akademie.

Die kurze Geschichte der Leibniz-Sozietät ist meiner Meinung nach ein leuchtendes Beispiel in der Wissenschaftsgeschichte. Allein aus privater Initiative der Wissenschaftler ohne jede staatliche Unterstützung wurde eine lebendige, produktive Gemeinschaft geschaffen, die das Bild des wissenschaftlichen Lebens auch außerhalb Berlins in hohem Maße prägt. Die Leibniz-Sozietät ist nicht nur wissenschaftlich hoch produktiv, sie ist auch eine Heimstatt für ältere Wissenschaftler geworden.

Ich habe eine Vision, daß die Wissenschaftler in aller Welt, jenseits aller Einzel- und Gruppeninteressen, das Gefühl einer großen Gemeinschaft entwickeln, entsprechend ihrer Funktion als Verantwortliche für den menschlichen Fortschritt. Das schließt ein die Entwicklung des Friedens und den Schutz der Natur, kluge humanistische Lösungen der Probleme, die das Schicksal der Menschheit bestimmen werden, als da sind Ökologie, Ernährung, Abprodukte. Wir können ein Beispiel heranziehen, den Aufbruch der Atomwissenschaftler nach den Bombenabwürfen auf Hiroshima und Nagasaki. Sie führten zur großartigen Friedensbewegung und zum Stockholmer Appell, was den nochmaligen Einsatz von Kernwaffen verhinderte. Aber die Gefahr ist nicht gebannt. Wir stehen vor einer ungeheuren Kriegsgefahr, gegen die es alle Welt zu mobilisieren gilt.