

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

Institut für Physiologie

Untersuchung neuartiger Substanzen auf antineoplastische und antiangiogene Eigenschaften beim testikulären Keimzelltumor

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Bianca Nitzsche (geb. Schmidt)

aus Hennigsdorf

2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2008 bis September 2012 unter der Leitung von PD Dr. rer. nat. Michael Höpfner im Institut für Physiologie (CBF) der Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

1. Gutachter: PD Dr. Michael Höpfner

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am : 25.07.2013

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	TESTIKULÄRER KEIMZELLTUMOR	1
1.1.1.	<i>Definition und Einteilung</i>	1
1.1.2.	<i>Ursachen und Genese</i>	5
1.1.3.	<i>Inzidenz und Therapie</i>	6
1.2.	ANGIOGENESE UND IHRE BEDEUTUNG BEIM TUMORWACHSTUM	9
1.2.1.	<i>Mechanismen der Blutgefäßbildung</i>	9
1.2.1.1.	<i>Vaskulogenese</i>	10
1.2.1.2.	<i>Angiogenese</i>	10
1.2.1.3.	<i>Intussuszeption</i>	11
1.2.2.	<i>Tumorangiogenese</i>	12
1.2.3.	<i>Das VEGF-Rezeptorsystem</i>	14
1.3.	ANGIOGENESEINHIBITION IN DER UROONKOLOGIE	16
1.3.1.	<i>Therapeutische Beeinflussung der Angiogenese</i>	16
1.3.2.	<i>in silico Screening</i>	19
1.3.2.1.	<i>Ablauf des in silico Screenings mit Vatalanib als Leitstruktur</i>	20
1.4.	ZIELSTELLUNG	23
2.	MATERIAL & METHODEN	24
2.1.	MATERIAL	24
2.1.1.	ZELLINIEN	24
2.1.2.	<i>Medien, Lösungen und Chemikalien</i>	24
2.1.3.	<i>Eier</i>	26
2.1.4.	<i>Antikörper</i>	26
2.1.5.	<i>Primer für die Polymerase-Kettenreaktion</i>	27
2.1.6.	<i>Kommerzielle Kits</i>	27
2.2.	METHODEN	28
2.2.1.	<i>Zellbiologische Methoden</i>	28
2.2.1.1.	<i>Kryokonservierung</i>	28
2.2.1.2.	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	28
2.2.1.3.	<i>Zellquantifizierung mittels Kristallviolett-Methode</i>	29
2.2.1.4.	<i>Zytotoxizitätsnachweis durch LDH-Aktivitätsmessung</i>	30
2.2.1.5.	<i>Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS)</i>	31
2.2.1.6.	<i>Apoptosenachweis mittels fluorometrischer Bestimmung der Caspase-3-Aktivität</i>	32
2.2.1.7.	<i>Tube Formation Assay</i>	32

2.2.1.8.	Migrationsassay	34
2.2.2.	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	35
2.2.2.1.	Präparation von Gesamt-RNA	35
2.2.2.2.	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	36
2.2.2.3.	Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	38
2.2.2.4.	cDNA Mikroarray.....	38
2.2.3.	<i>Proteinchemische Methoden</i>	40
2.2.3.1.	Herstellung von Proteinlysaten	40
2.2.3.2.	Bestimmung des Proteingehaltes.....	40
2.2.3.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
2.2.3.4.	Western Blot	42
2.2.3.5.	Immunodetektion	42
2.2.4.	<i>Chorioallantoismembran (CAM) Modell</i>	43
2.2.4.1.	Angiogenese-Hemmtest.....	44
2.2.4.2.	Untersuchungen zum Tumorwachstum	45
2.2.4.3.	Immunhistochemie	46
2.2.5.	<i>Statistik</i>	47
3.	ERGEBNISSE	48
3.1.	MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON HP-2 UND HP-14	48
3.1.1.	<i>mRNA-Expression des VEGFR-2 in Endothel- und Tumorzellen</i>	48
3.1.2.	<i>Antiproliferative Wirkung von HP-2 und HP-14</i>	49
3.1.3.	<i>Bestimmung der unspezifischen Zytotoxizität von HP-2 und HP-14</i>	53
3.1.4.	<i>Einfluss von HP-2 und HP-14 auf die Zellzyklusregulation und Apoptose</i>	53
3.1.5.	<i>Einfluss von HP-2 und HP-14 auf die Signaltransduktion</i>	57
3.1.6.	<i>Kombinationstherapeutische Ansätze von HP-2 und HP-14 mit Cisplatin</i>	59
3.1.7.	<i>Genexpressionsanalyse in cisplatinsensitiven und cisplatinresistenten TKZT Zellen</i>	61
3.2.	ANTIANGIOGENE WIRKUNG NEUARTIGER SUBSTANZEN	64
3.2.1.	<i>Tube Formation</i>	64
3.2.2.	<i>Einfluss auf die Migration von Endothelzellen</i>	66
3.2.3.	<i>In vivo-Evaluierung am Chorioallantoismembranmodell (CAM)</i>	67
3.3.	UNTERDRÜCKUNG DES TUMORWACHSTUMS UND DER ANGIOGENESE IN VIVO	69
3.3.1.	<i>Untersuchungen zum Tumorwachstum im Chorioallantois-membranmodell</i>	69
3.3.2.	<i>Unterdrückung der tumorversorgenden Gefäßneubildung (Tumorangiogenese)</i>	71
4.	DISKUSSION	74
4.1.	ZIELGERICHTETE THERAPIE DES TESTIKULÄREN KEIMZELLTUMORS	74
4.1.1.	<i>Wachstumsstudien</i>	76

4.1.2.	<i>Kombination von HP-2 und HP-14 mit Cisplatin</i>	<i>78</i>
4.1.3.	<i>Veränderung der Genexpression nach Kombinationsbehandlung.....</i>	<i>79</i>
4.1.4.	<i>Molekulare Grundlagen der wachstumshemmenden Effekte.....</i>	<i>80</i>
4.1.5.	<i>Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus und proliferativer Signalwege</i>	<i>81</i>
4.1.6.	<i>In vivo Untersuchungen der antiangiogenen Eigenschaften</i>	<i>83</i>
4.2.	ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNG	85
5.	ZUSAMMENFASSUNG	86
6.	SUMMARY	88
7.	LITERATURVERZEICHNIS	90
8.	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	108
8.1.	ORIGINALARBEITEN.....	108
8.2.	KURZVERÖFFENTLICHUNGEN	109
8.3.	AUSZEICHNUNGEN UND PREISE	109
9.	DANKSAGUNG	110
10.	ANHANG	111

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

AM	Acetomethylester
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	bichionic Acid, Bicinchoninsäure
Bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
CAM	Chorioallantoismembran
CDC42	Zellteilungs-regulierendes Protein 42
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
c-Kit	Cellular KIT, CD117, Tyrosinkinaserzeptor
CO ₂	Kohlendioxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Nukleotidtriphosphat
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK1/2	Extrazelluläre-signalregulierte Kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FKS	fötales Kälberserum
Flk-1	Fetal liver kinase 1
Flt-1	Fms-related tyrosine kinase 1
GAPDH	Glycerinaldehyd – 3 – phosphat Dehydrogenase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HCl	Salzsäure
Hepes	N-(2-hydroxyethyl) piperazin-N'-2-ethan-sulonsäure
HIF-1 α	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration

IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin-G
IU	International Unit, Internationale Einheit (Stoffmenge)
kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
KDR	Kinase insert domain receptor 1
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK	MAP-kinase kinase
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
n	Anzahl, Zahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OCT	Oktamer bindender Transkriptionsfaktor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGFR	Plättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
Rac	kleines GTP bindendes Protein
Raf	rapidly growing fibrosarcoma, Proteinkinase
RNase	Ribonuklease
Rpm	revolutions per minute, Umdrehung pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S6K	S6 Kinase
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SEM	Standardfehler
Src	Sarcoma, Tyrosinkinase

t	Zeit
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T _m	Primer-Schmelztemperatur in C°
TNM	Tumor; Nodi (Lymphknoten); Metastasen
Triton X-100	t-Octylphenoxyethoxyethanol
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan
U	Unit, Einheit
UICC	Union internationale contre le cancer,
UTF1	undifferenzierter Transkriptionsfaktor embryonaler Zellen 1
UTP	Uraciltriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor
Vgl.	Vergleich
v/v	Volumen/Volumen
w/v	weight volume (Gewicht/Volumen)

1. EINLEITUNG

1.1. TESTIKULÄRER KEIMZELLTUMOR

1.1.1. DEFINITION UND EINTEILUNG

Die Hoden (Testes) zählen zu den äußeren Geschlechtsorganen des Mannes und erfüllen im Wesentlichen zwei Aufgaben: Zum einen dienen sie der Reproduktion durch die Bereitstellung der männlichen Gameten, zum anderen synthetisieren und sekretieren sie die männlichen Geschlechtshormone.

Zusammen mit den Nebenhoden liegen die Hoden im Hodensack (Skrotum) und sind durch eine bindegewebsartige Scheidewand voneinander getrennt (Abbildung 1-1). Die Nebenhoden liegen eng an den Hoden an und sind mit ihnen verbunden. Jeder Hoden ist in circa 200 Hodenläppchen untergliedert, welche durch Scheidewände getrennt sind und ein mit Keimepithel ausgekleidetes Hodenkanälchen enthalten. Dieses Keimepithel besteht überwiegend aus Keimzellen, Keimzellvorstufen und Sertoli-Zellen.

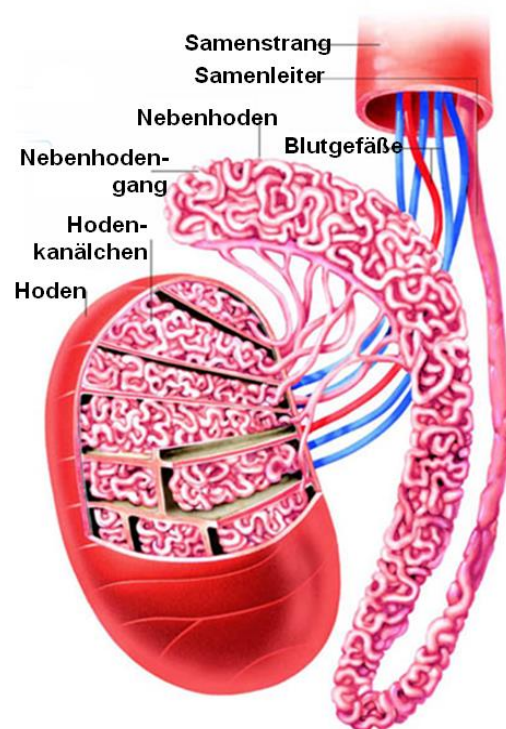


Abbildung 1-1: Darstellung des Hodens
(mit freundlicher Genehmigung der
wissmedia GmbH)

Zwischen den Hodenkanälchen, im so genannten Interstitium, sind die Leydig-Zellen lokalisiert, welche für die Bildung des männlichen Geschlechtshormons Testosteron verantwortlich sind. Die Entwicklung der Keimzellen aus den Keimzellvorstufen wird mit Unterstützung der Sertoli-Zellen bewerkstelligt.

Der Hodenkrebs ist eine maligne Erkrankung, die in einem der beiden Hoden beginnt und im weiteren Verlauf die Nebenhoden und den Samenleiter erfassen kann. Man unterscheidet nach dem Zelltyp, aus dem der Tumor entsteht in germinative und nicht-germinative Hodentumore. Circa 10% der malignen Tumore haben ihren Ursprung in den Leydig- oder Sertoli-Zellen (nicht-germinative Tumore). Der größte Anteil von etwa 90% aller Hodentumore geht von den Keimzellen aus (germinative Tumore). Man spricht daher auch von testikulären Keimzelltumoren (TKZT).

TKZT werden in zwei Hauptgruppen unterteilt, die in etwa gleich häufig auftreten: Die Seminome und die Nicht-Seminome (Oosterhuis & Looijenga 2005). Die Seminome bestehen aus primitiven unipotenten Keimzellen und haben ein einheitliches Erscheinungsbild. Nicht-Seminome hingegen bestehen aus undifferenzierten multipotenten Keimzellen und werden, je nach Differenzierungsgrad, in vier Gruppen unterteilt: Embryonalkarzinome, Teratome, Dottersacktumoren und Chorionkarzinome (Abbildung 1-2). Die Embryonalkarzinome können sich entweder zu extraembryonalen Geweben (Dottersacktumor, Chorionkarzinom) oder auch zu embryonalen Geweben mit mesenchymalen, epithelialen oder neuronalen Komponenten (Teratome) differenzieren.

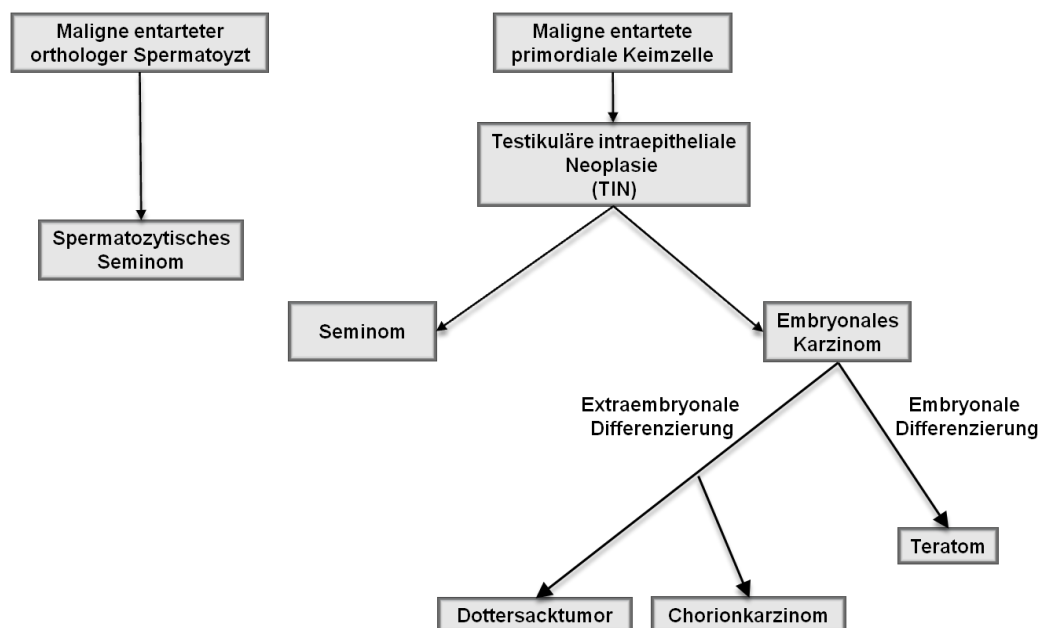


Abbildung 1-2: Entwicklung verschiedener Typen des testikulären Keimzelltumors (modifiziert nach Heidenreich et al. 1998).

Die World Health Organisation (WHO) führte im Jahre 2004 ein allgemein anerkanntes Klassifikationssystem aller Keimzelltumore ein (Woodward et al. 2004). Dieses basiert auf histologischen, epidemiologischen und klinischen Erkenntnissen, sowie auf chromosomalen Charakteristika. Die TKZT umfassen drei von insgesamt fünf Keimzelltumorentitäten. Typ-I-Tumoren bezeichnen die Teratome und Dottersacktumoren von Neugeborenen und Kindern. Typ II-Tumoren sind die am häufigsten auftretenden TKZT und umfassen alle Seminome und Nicht-Seminome von Jugendlichen und jungen Erwachsenen. Typ III-Tumoren sind die spermatozytischen Seminome des älteren Mannes. Typ IV- und Typ V-Tumoren bilden die Gruppe der Keimzelltumoren, die nicht den Hoden betreffen.

Neben der allgemeinen Einteilung nach Gewebetyp und entsprechend der WHO Richtlinien, werden testikuläre Keimzelltumoren auch gemäß des TNM Klassifikationssystem (**T**umor, **N**odes (Lymphknoten), **M**etastasen) (Tabelle 1-1) in drei unterschiedliche Stadien eingeteilt (Tabelle 1-2). Dabei werden die Ausdehnung des Primärtumors (T), das Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) berücksichtigt. Beim TKZT werden zusätzlich die Serumentumormarker (S): alpha-Fetoprotein (AFP), Beta-Humanes-Choriongonadotropin (β -HCG) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) bestimmt und bei der Stadieneinteilung (Staging) berücksichtigt. Das Staging wird unmittelbar nach der Diagnosestellung durchgeführt, um das Ausmaß der Tumorerkrankung zu bestimmen und gilt als Basis für die Festlegung einer individuellen Behandlungsstrategie.

Für Patienten mit metastasiertem TKZT wurde von der International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG) ein zusätzliches Klassifikationssystem erstellt (International Germ Cell Cancer Collaborative Group 1997) (Tabelle 1-3). Dabei wird eine Einordnung des Tumors in eine Prognosegruppe (in „gut“, „mittel“ oder „schlecht“) vorgenommen. In dieser Prognoseklassifikation sind die histologische Beurteilung nach Seminom oder Nichtseminom, Lokalisationen des Primärtumors und der Metastasen, sowie die Werte der Serumentumormarker zusammengefasst.

Tabelle 1-1: Klinische Stadieneinteilung des testikulären Keimzelltumor

T – Primärtumor

- T0: kein Anhalt für Primärtumor
- Tis: testikuläre intraepitheliale Neoplasie
- T1: Tumor beschränkt auf Hoden und Nebenhoden, ohne Gefäß- oder Lymphgefäßinvasion
- T2: Tumor beschränkt auf Hoden und Nebenhoden, mit Gefäß- oder Lymphgefäßinvasion, oder Infiltration der Tunica vaginales
- T3: Invasion des Samenstrangs
- T4: Invasion des Skrotums

N – Regionäre Lymphknoten

- N0: kein befallener Lymphknoten
- N1: radiologisch vergrößerte Lymphknoten <2 cm, Metastasen in maximal 5 Lymphknoten <2 cm (pN1)
- N2: radiologischer Lymphknotendurchmesser zwischen 2 und 5 cm, oder mehr als 5 befallene Lymphknoten unter 2 cm Größe (pN2) oder extranodale Infiltration der Lymphknotenmetastase (pN2)
- N3: Lymphknotenmetastasen größer als 5 cm

M – Fernmetastasen

- M0: keine Fernmetastasen
- M1: Fernmetastasen
 - M1a: nicht regionale Lymphknotenmetastasen, Lungenmetastasen
 - M1b: andere Lokalisationen als M1a

S – Serumtumormarker

- S0: alle Tumormarker im Normbereich
- S1:
 - AFP <1000 ng/ml und
 - β-HCG <5000 IU/l und
 - LDH <1,5-fache der Norm
- S2:
 - AFP 1000-10000 ng/ml und
 - β-HCG 5000-50000 IU/l oder
 - LDH 1,5-10-fache der Norm
- S3:
 - AFP >10000 ng/ml und
 - β-HCG >50000 IU/l oder
 - LDH >10-fache der Norm

(aus: TNM-Classification of Malignant Tumours, 7. Auflage; [Sobin et al. 2009])

Tabelle 1-2: Stadiengruppierung des testikulären Keimzelltumors

Stadium I	Stadium II	Stadium III
keine Metastasen nachweisbar	Lymphknotenmetastasen retroperitoneal unterhalb des Zwerchfells	Fortgeschrittene Lymphknotenmetastasen
<ul style="list-style-type: none"> • IA: T1, N0, M0, S0 • IB: T2-4, N0, M0, S0 • IC: T1-4, N0, M0, S1-3 	<ul style="list-style-type: none"> • IIA: T1-4, N1, M0, S0-1 • IIB: T1-4, N2, M0, S0-1 • IIC: T1-4, N3, M0, S0-1 	<ul style="list-style-type: none"> • IIIA: T1-4, N1-3, M1a, S0-1 • IIIB: T1-4, N1-3, M0-1a, S2 • IIIC: T1-4, N1-3, M0-1b, S3

(Sobin et al. 2009)

Tabelle 1-3: Prognosegruppen beim metastasierten Keimzelltumor

Prognosegruppe	Seminom	Nicht-Seminom	5-Jahres Überleben
Gut	Keine nichtpulmonalen viszerale Metastasen, unabhängig von der Höhe der Tumormarker	Tumormarker S0–S1 und keine nichtpulmonalen viszerale Metastasen	90%
Mittel	Vorhandensein von nichtpulmonalen viszerale Metastasen, unabhängig von der Höhe der Tumormarker	Tumormarker S2 und keine nichtpulmonalen viszerale Metastasen	70 – 80%
Schlecht	Keine Einteilung von Seminomen in dieser Gruppe	Tumormarker S3 oder Vorhandensein von nichtpulmonalen viszerale Metastasen (Leber, ZNS, Skelett)	50%

(Albers et al. 2011)

1.1.2. URSACHEN UND GENESE

Die genauen Ursachen zur Entwicklung eines TKZT sind bis heute nicht geklärt, es konnten aber verschiedene Risikofaktoren identifiziert werden, die mit einer erhöhten Auftretenswahrscheinlichkeit einhergehen. Die bekanntesten Risikofaktoren sind der Kryptorchismus, also die Lageanomalie des Hodens sowie die familiäre Prädisposition (Gundy et al. 2004). Aber auch andere Faktoren, die mit Infertilität assoziiert sind, wie z.B. das Klinefelter-Syndrom, gelten als Risikofaktoren. Weitere Faktoren sind Chemikalien, virale oder bakterielle Infektionen, ein Östrogenüberschuss in der frühen Schwangerschaft oder auch ein Trauma des Hodens (McGlynn & Cook 2009).

Niels E. Skakkebaek war der Erste, der im Jahre 1972 die Entstehung des TKZT beschrieben hat (Skakkebaek 1972). Er nannte als Vorläuferläsion des TKZT die intratubuläre Keimzellneoplasie. In der heutigen Literatur wird diese auch als testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN), unklassifizierte intratubuläre Keimzellneoplasie (IGCNU) oder Carcinoma *in situ* (CIS) bezeichnet (Almstrup et al. 2004, Biermann et al. 2007, Sheikine et al. 2012). Wobei der letztere Begriff umstritten ist, denn Carcinoma *in situ* ist die Bezeichnung für eine neoplastische Zelle epithelialen Ursprungs. Die Vorläuferzellen des TKZT liegen aber intraepithelial, d. h. im Kompartiment der epithelialen Sertoli-Zellen und sind nicht immer epithelialer Herkunft (Wittekind 2008).

Bis heute gibt es keine allgemein gültige Erklärung zur Genese des Keimzelltumors. Es ist aber akzeptiert, dass die TIN die Vorläuferläsion nahezu aller postpubertären Keimzelltumoren ist und ihre Entstehung bereits vorgeburtlich stattfindet. Während der frühen embryonalen Entwicklungsphase kommt es zu einer Störung der Entwicklung der undifferenzierten Keimzellen (Gonozyten) entweder durch einen erhöhten mütterlichen Östrogenspiegel oder durch Substanzen mit östrogener Aktivität (Swerdlow et al. 1987, Høie-Hansen et al. 2005). Diese Unterbrechung der Keimzellentwicklung durch Östrogen resultiert in einem Arrest der fötalen Keimzellen im Stadium der Gonozyten. Fötale Gonozyten sind während der Zellteilung, aufgrund ihrer genomischen Prägung sehr empfänglich für Mutationen. Durch ein Zusammenspiel aus onkogen aktivierenden Mutationen und hemmenden Mutationen von Tumorsuppressorgenen transformieren Gonozyten zu TIN Zellen (Dieckmann & Skakkebaek 1999, Honecker et al. 2004). Im Kindesalter ruhen die TIN Zellen und persistieren in den Gonaden. Erst während der Pubertät und des frühen Erwachsenenalters kommt es wahrscheinlich aufgrund des veränderten hormonellen Milieus zu einer malignen Transformation der TIN zu invasiven testikulären Keimzelltumoren (Meyts 2006, Kristiansen et al. 2012).

1.1.3. INZIDENZ UND THERAPIE

Insgesamt erkrankten im Jahre 2006 in der Bundesrepublik Deutschland 4960 Männer an Hodenkrebs. Auch wenn diese Erkrankung in Bezug auf die Gesamtzahl aller Krebserkrankungen mit einem Anteil von 2% eher zu den seltenen Krebsarten gehört, so ist sie dennoch in der Altersklasse der 25- bis 45-jährigen Männer mit Abstand die häufigste maligne Tumorentität (Husmann & Robert-Koch-Institut 2010). Des Weiteren hat sich die weltweite Inzidenz des Auftretens von Hodentumoren in den letzten 40 Jahren verdoppelt (Huyghe et al. 2003).

Es wird grundsätzlich versucht, den Primärtumor durch eine Operation zu entfernen. Anschließend erfolgt die histologische Einteilung des Tumors in Seminom bzw. Nicht-Seminom und in das entsprechende Stadium. Für die Behandlung aller Keimzelltumoren wird in den europäischen Leitlinien das risikoadaptierte Vorgehen empfohlen (Krege et al. 2008).

Darunter versteht man die Einteilung der Patienten in Risikogruppen mit abschätzbarer Prognose und die Einstellung einer entsprechenden Therapiestrategie.

Die Standardtherapie des Seminoms in allen drei Stadien besteht nach der operativen Entfernung des Hodentumors aus einer zusätzlichen Bestrahlung oder einer Chemotherapie (Schrader 2010). Beim Nichtseminom stehen nach der operativen Entfernung des Hodentumors insgesamt drei Therapiestrategien zur Verfügung: Die Chemotherapie, die retroperitoneale Lymphadenektomie (Ausräumung von Lymphknoten im hinteren Bauchraum) und das aktive Zuwarten.

Die Chemotherapie bei Keimzelltumoren ist platinbasiert und richtet sich nach dem so genannten PEB Schema (**P**latin, **E**toposid, **B**leomycin). Dies ist eine Kombinationschemotherapie bestehend aus Cisplatin, Etoposid und Bleomycin. Cisplatin (Cis-Diammindichlorplatin) wird intravenös verabreicht und bleibt als neutraler und wenig reaktiver Komplex im Serum. Durch passive Diffusion gelangt Cisplatin in die Zellen und hat die Fähigkeit mit nukleophilen Gruppen der DNA, RNA, von Proteinen und thiolgruppenhaltigen Molekülen Addukte zu bilden. Dabei entstehen Vernetzungen von Basenpaaren innerhalb der DNA-Stränge aber auch intermolekulare Addukte von DNA und Proteinen die Strangbrüche induzieren, die Replikation der DNA verhindern und somit zum Zelltod führen (Pinto & Lippard 1985). Eine Verbesserung der Wirkung der Chemotherapie mit Cisplatin konnte durch die Kombination mit den Zytostatika Etoposid und Bleomycin erreicht werden. Beide Substanzen zeigten eine synergistische Wirkung in Kombination mit Cisplatin und setzten sich als Standardtherapie beim TKZT durch. Diese Cisplatin basierte Kombinationstherapie erzielt beim metastasierten Keimzelltumor Heilungsraten von über 80% (Williams et al. 1987). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Heilungschance von der histologischen Einteilung, dem Grad der Metastasierung und von den Tumormarkern abhängig ist. Seminome reagieren sehr sensitiv auf Strahlen- bzw. Chemotherapie, während Nicht-Seminome weniger auf die Strahlentherapie, aber hochsensibel auf Chemotherapie ansprechen.

Trotz des Erfolgs tritt in etwa 20% der Fälle eine intrinsische oder erworbene Chemotherapieresistenz auf. Daraus resultiert eine sehr schlechte Prognose für die Therapierbarkeit und Heilung. Die Ursachen die der Chemotherapieresistenz beim TKZT zugrunde liegen sind bis heute weitestgehend unklar (Masters & Köberle 2003). Deshalb ist die Untersuchung neuer zielgerichteter Medikamente mit alternativen zellulären Angriffspunkten ein wichtiger Schritt, um Wirkansätze zu identifizieren und neue Therapiestrategien zu entwickeln. Zahlreiche neue Substanzen wurden bereits innerhalb von Studien getestet, wobei einige teilweise Aktivität zeigten. Jedoch verbleibt die Prognose weiterhin sehr schlecht, die meisten Patienten mit einem cisplatinrefraktären TKZT können nicht geheilt werden (Veenstra & Vaughn 2011).

1.2. ANGIOGENESE UND IHRE BEDEUTUNG BEIM TUMORWACHSTUM

1.2.1. MECHANISMEN DER BLUTGEFÄßBILDUNG

Das Blutgefäßsystem ist das erste Organsystem, das sich während der Embryonalentwicklung ausbildet und ist von fundamentaler Bedeutung für die Entwicklung und Funktion aller Organe und Gewebe. Die Blutgefäße spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Versorgung einzelner Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen, sondern sie sorgen darüber hinaus auch für den Abtransport von Kohlendioxid und anderen Abfallprodukten des Stoffwechsels. Auch die Verteilung von Botenstoffen wie z.B. Wachstumsfaktoren findet über den Blutkreislauf statt.

Histologisch gesehen besitzen alle Blutgefäße eine grundlegende Gemeinsamkeit: Sie bestehen aus einer einzigen Schicht von Endothelzellen. Bei den Kapillaren gibt es zusätzlich eine Basalmembran und akzessorische Bindegewebszellen (Perizyten), während Arterien und Venen darüber hinaus glatte Muskelzellen und eine angrenzende Schicht aus Bindegewebe besitzen. Für die Bildung neuer Blutgefäße sind im Wesentlichen drei Mechanismen verantwortlich: die Vaskulogenese, die Angiogenese und die Intussuszeption. Diese sind in Abbildung 1-3 dargestellt und werden nachfolgend im Einzelnen beschrieben.

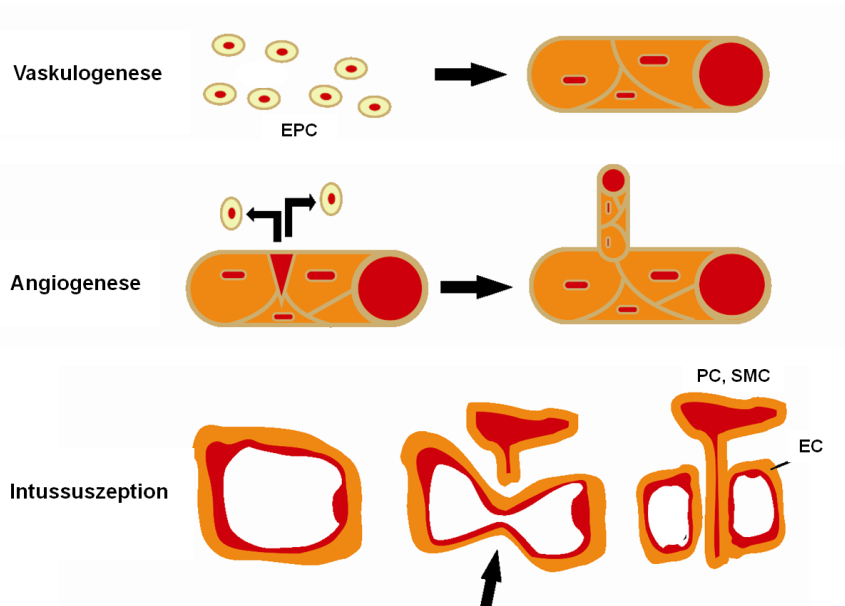


Abbildung 1-3: Mechanismen der Blutgefäßbildung (EC = Endothelzellen, PC = Perizyten, SMC = glatte Muskelzelle, EPC = endotheliale Progenitorzellen). (modifiziert nach Mross et al. 2007)

1.2.1.1. Vaskulogenese

Die Vaskulogenese bezeichnet die Neubildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten) und findet hauptsächlich bei der Embryonalentwicklung statt (Patan 2000). Im ersten Schritt ordnen sich die Angioblasten zu so genannten „Blutinseln“ an. Hierbei kommt es zur Differenzierung der äußeren Zellen zu Endothelzellen und der inneren Zellen zu hämatopoetischen Zellen. Anschließend bilden die Endothelzellen einen primitiven Plexus, der in Folge stabilisiert wird und an Komplexität zunimmt. Die Bildung der Gefäßwand erfolgt durch die Rekrutierung von ortsständigen akzessorischen Vorläuferzellen. Wenn diese gereift sind, kommt es abschließend zur Anlagerung von Perizyten und glatten Muskelzellen (Risau & Flamme 1995).

1.2.1.2. Angiogenese

Unter dem Begriff Angiogenese wird die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Gefäßen verstanden. Die Angiogenese ist im gesunden erwachsenen Organismus abgeschlossen. Physiologische Prozesse der Angiogenese spielen dann nur noch bei der Wundheilung und bei Frauen während des Ovarialzyklus eine Rolle. Diese Vorgänge werden von pro- und antiangiogenen Faktoren gesteuert und stehen im gesunden Erwachsenen in einem ausgeglichenen Verhältnis (Folkman 1995, Frank et al. 1995, Hanahan & Weinberg 2000).

Zu einem der wichtigsten proangiogenen Faktoren gehört der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF (Italiano et al. 2008). Die Expression von VEGF ist sauerstoffabhängig und wird reguliert durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 α . Unter hypoxischen Bedingungen ist die HIF-1 α Konzentration erhöht und es kommt zu einer verstärkten Expression von VEGF. Dadurch verschiebt sich das Gleichgewicht angiogener Faktoren und die einzelnen Schritte der Angiogenese finden statt.

Im ersten Schritt werden Plasmaproteine (Matrixmetalloproteinasen, Plasminogenaktivatoren) aus den Endothelzellen und den Perizyten freigesetzt, welche für eine proteolytische Degradierung der Basalmembran, sowie für den Abbau der extrazellulären Matrix sorgen. Mit Hilfe von Makrophagen und anderen myeloischen Zellen werden die Abbauprodukte verdaut und abtransportiert.

Dies schafft den nötigen Raum und Platz für die Ausbreitung proliferierender Endothelzellen. Die Auswanderung der Endothelzellen wird erleichtert durch die Ablösung glatter Muskelzellen aus der Gefäßwand, gesteuert über eine Blockade des endothelialen Tyrosinkinase Rezeptors Tie-2 durch seinen Antagonisten Angiopetin-2 (Ang-2) (Carmeliet 2003). Im folgenden Schritt wandern die Endothelzellen in das aufgelockerte umgebende Bindegewebe ein. Dabei wird die Migrationsrichtung der Endothelzellen durch die VEGF-Konzentration bestimmt (positive Chemotaxis). Gefolgt von proliferierenden Zellen kommt es so zu einer Verlängerung des endothelialen Zellstranges und zur Ausbildung eines Lumens. Im Anschluss fusioniert der wachsende Kapillarspross durch Anastomose mit einer postkapillaren Venole (arteriovenöse Anastomose). Die Migration und Proliferation der Endothelzellen kommt zum Stillstand und glatte Muskelzellen und Perizyten sorgen für eine Verstärkung und Stabilisierung der Gefäßwand. Außerdem werden die Basalmembran, sowie die extrazelluläre Matrix wiederhergestellt.

Auch während der Ruhephase unterliegen die Gefäße einer ständigen strukturellen Veränderung. Dieses so genannte „vaskuläre Remodelling“ umfasst Prozesse wie z.B. Zellproliferation und Apoptose und führt zu einer Anpassung des Gefäßsystems an den jeweiligen Bedarf (Risau 1997, Carmeliet 2005, Pries et al. 2009).

1.2.1.3. Intussuszeption

Die intussuszeptive Angiogenese bezeichnet die Neubildung von Blutgefäßen durch Teilung eines bestehenden Gefäßes (Mross et al. 2007). Im Gegensatz zur klassischen Angiogenese bleibt bei diesem Vorgang die Basalmembran erhalten. Durch luminale Einstülpung von zwei sich gegenüber liegenden Gefäßwänden kommt es zu einem Kontakt zwischen den Endothelzellschichten und anschließend zu einer Teilung des Gefäßes (Djonov et al. 2003, Makanya et al. 2009).

Zusätzlich zu den drei Hauptmechanismen gibt es zwei weitere, bis heute sehr kontrovers diskutierte Sonderformen, die bei der Entwicklung von Blutgefäßen vorkommen können: die vaskuläre Mimikry und die Reparaturangiogenese. Bei der vaskulären Mimikry werden, bei malignen Erkrankungen, Teile der Gefäßwand von Tumorzellen gebildet.

Bei der Reparaturangiogenese werden Endothelzellen, die sich durch Apoptose oder andere Ursachen aus dem Verband gelöst haben, durch zirkulierende Vorläuferzellen ersetzt. (McDonald et al. 2000, Gunsilius et al. 2001, Folberg & Maniotis 2004).

1.2.2. TUMORANGIOGENESE

Bereits in den 60er Jahren beschäftigte sich der Mediziner Judah Folkman mit der Frage der Gefäßneubildung in Tumoren (Folkman et al. 1963). Er konnte nachweisen, dass nur sehr kleine Tumorzellverbände über Diffusion vom umliegenden Gewebe mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Ab einer Größe von ca. zwei Kubikmillimetern ist ein weiteres Wachstum nur noch durch eine entsprechende Gefäßversorgung des Tumors gewährleistet (Folkman 1971, Bergers & Benjamin 2003, Moserle et al. 2009).

Wie bereits in Kapitel 1.2.1.2 beschrieben, wird die Angiogenese unter physiologischen Umständen durch eine Balance von proangiogenen und antiangiogenen Faktoren reguliert. Zu den proangiogenen Faktoren gehören z.B. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) und der Wachstumsfaktorrezeptor (VEGFR), sowie Angiopoetin-1 und HIF-1 α . Antiangiogene Faktoren, die zu einer Inhibition der Angiogenese führen, sind u.a. Angiopoetin-2 und Angiostatin, aber auch Endostatin und Thrombospondin-1. Durch die fortlaufende Produktion proangiogener Faktoren verschieben Tumoren diese Balance in Richtung Angiogenese, ein Prozess, der auch als *angiogenic switch* bezeichnet wird (Bergers & Benjamin 2003, Moserle et al. 2009).

Der Grund für die andauernde Freisetzung angiogener Faktoren durch Tumoren liegt darin, dass Mutationen in Genen aufgetreten sind, die für die Kontrolle der Zellteilung, aber auch für die Freisetzung und Regulation von Wachstumsfaktoren verantwortlich sind. So sind Tumorzellen zum einen in der Lage sich permanent sehr schnell zu teilen, was zur Entstehung hypoxischer Bereiche innerhalb des Tumors führt, und zum anderen sezernieren sie selbst Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF zur autokrinen Wachstumsstimulation. Die erhöhte VEGF-Konzentration führt zur Aktivierung der Endothelzellen und zur Induktion der Tumorangiogenese (Abbildung-1-4), (Wernert et al. 1999).

Hierbei werden die einzelnen Schritte der Angiogenese durchlaufen. Ist der Tumor an das Gefäßsystem angebunden, wird er mit den zum Wachsen benötigten Nährstoffen und mit Sauerstoff versorgt (Cavallaro & Christofori 2000).

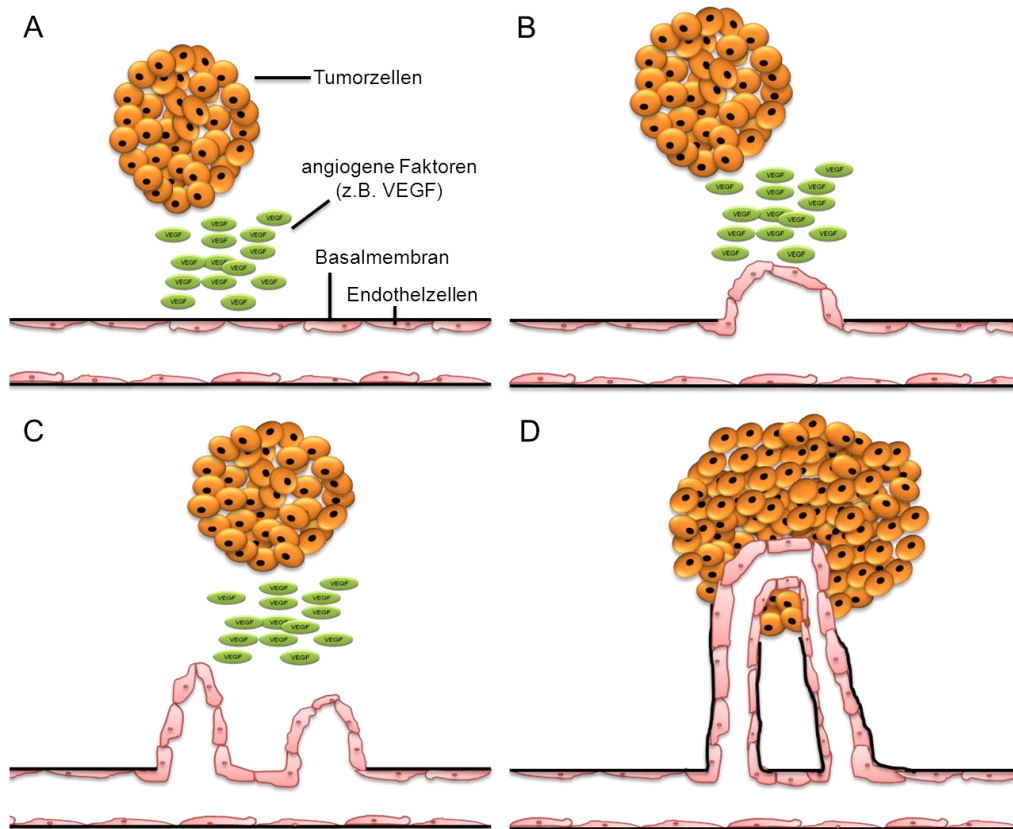


Abbildung-1-4: Die einzelnen Schritte der Tumorangiogenese. **A:** Freisetzen angiogener Faktoren durch den Tumor und Aktivierung der Endothelzellen **B:** Auflösung der Basalmembran der Gefäße durch Proteinasen (Kollagenasen, Plasminogenaktivatoren) **C:** Migration und Proliferation der Endothelzellen in Richtung angiogener Faktoren. Matrix-Metalloproteinasen sorgen für den Umbau der extrazellulären Matrix **D:** Aufbau einer neuen Basalmembran und Verbindung der Enden von zwei wachsenden Gefäßen (Anastomose). (Modifiziert nach Wernert et al. 1999.)

Die dabei entstehenden Tumorgefäße unterscheiden sich maßgeblich von normalen Blutgefäßen (Jain 1988). Durch die hohe Proliferationsrate der Endothelzellen kommt es zu einer Anhäufung vieler unreifer Endothelzellen in den Tumorgefäßen, mit Auswirkungen auf wichtige Prozesse, wie z.B. Entzündung und Gerinnung.

Gleichzeitig ist die Architektur des Gefäßnetzwerkes ungeordnet und willkürlich. Die Gefäße verlaufen geschlängelt, weisen Unterschiede im Gefäßdurchmesser auf und sind nicht konstant mit Endothelzellen ausgekleidet. So genannte shunts, also

funktionelle Kurzschlüsse zwischen den einzelnen Gefäßen treten häufig auf und führen zu einem insgesamt chaotischen Blutfluss, der dazu führt, dass bestimmte Tumorbereiche nicht ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden (Pries et al. 2010). Diese Heterogenität der Tumorperfusion geht mit dem Auftreten von Hypoxie, Übersäuerung und Tumorzellnekrosen einher und hat damit auch Auswirkungen auf die Verteilung von Medikamenten bei der Chemotherapie. Gleichzeitig wird, durch die gesteigerte Permeabilität neu gebildeter Gefäße die Migration von Tumorzellen in den Blutstrom erleichtert und somit eine schnellere Metastasierung ermöglicht (Feng et al. 2000, Dvorak 2003).

1.2.3. DAS VEGF-REZEPTORSYSTEM

Das VEGF-Rezeptorsystem ist nach derzeitigem Kenntnisstand das wichtigste System zur Regulation der Angiogenese. Hierbei handelt es sich um den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und seinen Rezeptor (VEGFR). VEGF gehört zu einer Familie bestehend aus fünf Glykoproteinen (VEGF-A – VEGF-E), von denen VEGF-A den wichtigsten und für die Angiogenese essentiellen Wachstumsfaktor darstellt (Ferrara 2005). Es gibt verschiedene Protein-Isoformen von VEGF-A mit abweichenden Molekulargewichten (VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₂, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉, VEGF-A₂₀₆). Alle entstehen durch unterschiedliches Spleißen während der mRNA Synthese und wirken proangiogen, vasodilatierend und permeabilitätssteigernd (Perrin et al. 2005, Nowak et al. 2008). Die am häufigsten vorkommenden Isoformen sind VEGF-A₁₂₁ und VEGF-A₁₆₅ (Carmeliet et al. 1999).

Die VEGFs binden an Rezeptor-Tyrosinkinassen (RTK). RTK sind Transmembranproteine, die aus einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer glykosylierten extrazellulären Domäne bestehen. Durch das Binden von VEGF an die extrazelluläre Rezeptordomäne des VEGFR kommt es zu einer Rezeptordimerisierung und zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne.

Dort liegen die Tyrosinreste in charakteristischen Aminosäuresequenzmotiven vor und werden autophosphoryliert. Über verschiedene Protein-Protein-Interaktionen kommt es zur Einleitung einer Reihe von komplexen Signalkaskaden, die zu einer

Erhöhung der Genexpression führen (Grünewald et al. 2010, Koch & Claesson-Welsh 2012).

Insgesamt gibt es drei strukturell ähnliche Rezeptoren: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) und VEGFR-3 (Flt-4). Während der VEGFR-1 eine wichtige Rolle bei der frühen Embryogenese spielt, ist der VEGFR-3 hauptsächlich an der Lymphangiogenese beteiligt. Der VEGFR-2 fungiert als wichtigster positiver Signalübermittler für die endotheliale Zellproliferation und Zelldifferenzierung während der Angiogenese.

Die Abbildung 1-5 zeigt beispielhaft einige Signalwege, die durch die Aktivierung des VEGFR-2 angeschaltet werden. Der Mitogen aktivierte Proteinkinase Signalweg (MAPK) führt zum Beispiel über die Aktivierung der Proteine Raf (rapidly growing fibrosarcoma), MEK (MAP-kinase-ERK-kinase) und ERK (extracellular signal regulated kinase) zu einer erhöhten endothelialen Zellproliferation. Die Aktivierung des Phosphatidyl-inositol-3-Kinase (PI3K)-Akt-Signalweges resultiert in einem verlängerten Zellüberleben, wohingegen die Aktivierung des Cdc42 (Zellteilungs-regulierendes Protein 42) und p38 MAPK Signalweg die Zellmigration erhöht. Über die Aktivierung der Proteine Src (Sarcoma) und Rac (kleines GTP bindendes Protein) sowie über die Erhöhung der Stickstoffproduktion über eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) wird die Gefäßpermeabilität gesteuert (Fujio & Walsh 1999, Takahashi & Shibuya 2005).

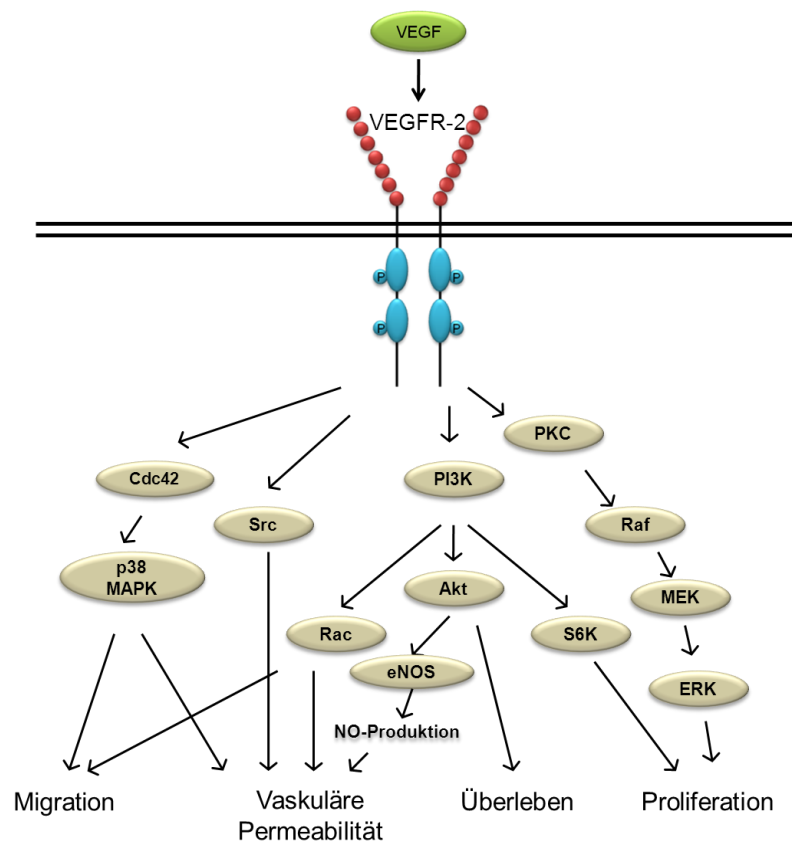


Abbildung 1-5: Signalkaskaden des VEGFR-2 (modifiziert nach Takahashi and Shibuya, 2005).
Erläuterungen und Abkürzungen im Text.

1.3. ANGIOGENESEINHIBITION IN DER UROONKOLOGIE

1.3.1. THERAPEUTISCHE BEEINFLUSSUNG DER ANGIOGENESE

Wie bereits in 1.2.2 beschrieben ist der Anschluss eines Tumors an das Gefäßsystem des umgebenden Gewebes eine notwendige Voraussetzung für das Tumorwachstum, die Tumorausbreitung und Metastasierung. Die antiangiogenetische Therapie hat zum Ziel diese Blutgefäßbildung zu unterdrücken und damit eine Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff zu unterbinden. Bereits 1971 stellte Judah Folkman die Hypothese auf, dass die Inhibition der Tumorangiogenese eine effektive Behandlungsmöglichkeit von Krebserkrankungen sein könnte (Folkman 1971). Doch die zugrunde liegenden Mechanismen der Angiogenese wurden zu Beginn nicht verstanden. Erst die Entdeckung des Wachstumsfaktors VEGF durch Ferrara im Jahre 1989 trug zur Aufklärung bei (Leung et al. 1989). In den folgenden Jahren wurden die molekularen Mechanismen der Angiogenese besser aufgeklärt und verstanden.

Dies führte zu intensiven Anstrengungen, antiangiogenetische Therapieansätze zu entwickeln. Bereits im Jahre 1993 konnte die Unterdrückung des Tumorwachstums durch einen VEGF-Antikörper bewiesen werden (Kim et al. 1993). Im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen stand immer das VEGFR-System, denn durch seine zentrale Schlüsselrolle in der Angiogenese ist es zu einem attraktiven Target in der Tumorthherapie geworden. Inzwischen haben viele Studien gezeigt, dass die Hemmung der Angiogenese ein viel versprechender Ansatz in der Behandlung von soliden Tumoren, inkl. urologischer Tumoren darstellt (Chow & Eckhardt 2007, Höpfner et al. 2008). Einige Substanzen haben bereits Einzug in die klinische Anwendung gefunden (Motzer et al. 2007, Eisen et al. 2008).

Hier ist zuerst der monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab zu nennen. Dieser Ansatz zur Inhibition von VEGF ist einer der am besten untersuchten und am weitesten entwickelten Ansätze. Bevacizumab ist ein humanisierter, spezifisch gegen VEGF-A gerichteter, monoklonaler Antikörper. Er bindet gezielt biologisch aktives VEGF und neutralisiert es (Abbildung 1-6). So wird die Bindung von VEGF an seinen Rezeptor unterbunden und die Gefäßneubildung im Tumorgewebe blockiert. Einen Durchbruch in der Behandlung brachte dieser Ansatz beim metastasierten Nierenzellkarzinom. Hier ist die Kombinationstherapie aus Bevacizumab und IFN- α seit 2009 als Erstlinientherapie in Deutschland zugelassen und führt zu einer deutlichen Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (Rini et al. 2008).

Eine weitere viel versprechende Klasse der Angiogeneseinhibitoren stellen die Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) dar. Das sind niedermolekulare, membrangängige Substanzen mit einem Molekulargewicht von bis zu 500 kDa von weniger als 800 g/mol. Sie werden deshalb auch als „small molecules“ bezeichnet. Im Gegensatz zu den Antikörpern interagieren die TKIs auf intrazellulärer Ebene mit der Tyrosinkinase-Domäne eines Wachstumsfaktorrezeptors (Abbildung 1-6). Auf Grund ihrer geringen Größe können sie ungehindert die Zellmembran passieren und an Ihren Wirkort, die ATP-Bindungsstelle der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne gelangen. Dort binden sie kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle und führen zu einer Unterbrechung der Signaltransduktion nach Ligandenbindung (Müller-Tidow et al. 2007).

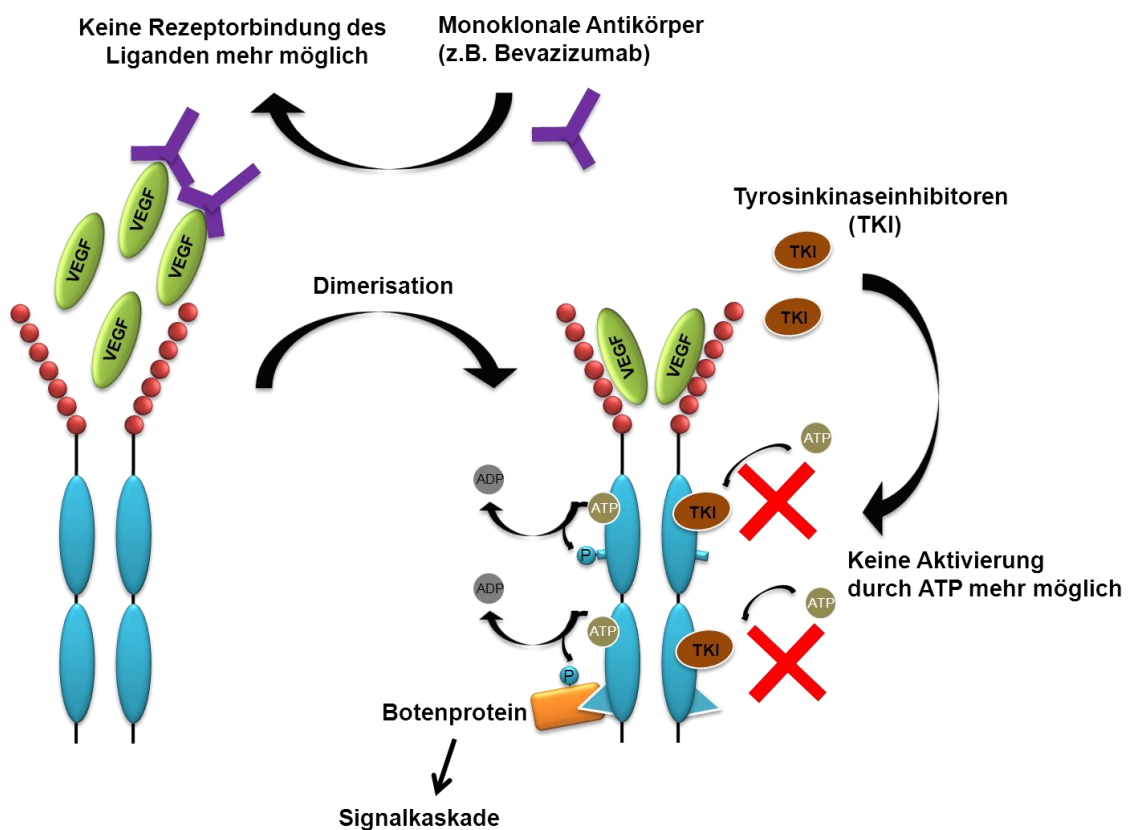


Abbildung 1-6: Unterbrechung der Signaltransduktion des VEGFR - 2 durch monoklonale Antikörper oder durch Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI). (Modifiziert nach Müller-Tidow et al., 2007.)

Zu den bereits bei urologischen Tumoren in der Klinik eingesetzten TKIs gehören Sunitinib und Sorafenib. Beide Substanzen zählen zu der Gruppe der Multikinaseinhibitoren und hemmen neben dem VEGFR-2 noch weitere Tyrosinkinasen, wie z.B. den VEGFR-1, VEGFR-3 und den PDGFR (platelet derived growth factor receptor). Sie sind seit 2006 zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms in Europa zugelassen. Für die Untersuchung der Wirksamkeit von Sunitinib zur Behandlung des TKZT gibt es bis heute Daten aus zwei Phase II Studien, in denen keine bzw. nur eine moderate Aktivität festgestellt werden konnte (Feldman et al. 2010, Oechsle et al. 2011a). Für Sorafenib als Monosubstanz zur Behandlung des cisplatinrefraktären Keimzelltumors läuft seit 2008 eine Phase II Studie. Daten zur Wirksamkeit liegen bis heute nicht vor (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00772694>).

1.3.2. *IN SILICO* SCREENING

Das *in silico* screening ist eine Methode der Medikamentenentwicklung, bei der in einem computerbasierten Verfahren, potenziell medizinisch wirksame Substanzen identifiziert werden können. Dabei wird anhand einer Leitstruktur, in frei zugänglichen Datenbanken, nach strukturell ähnlichen Substanzen gesucht. Das Ziel ist es, ähnliche und möglichst wirksamere Substanzen zu identifizieren. Durch diese Möglichkeit der rechnerbasierten Vorauswahl von Wirkstoffen können experimentell aufwändige und kostenintensive Hochdurchsatzmethoden eingespart werden.

Im Folgenden sind die einzelnen Schritte dieser Suche näher beschrieben (Abbildung 1-7).

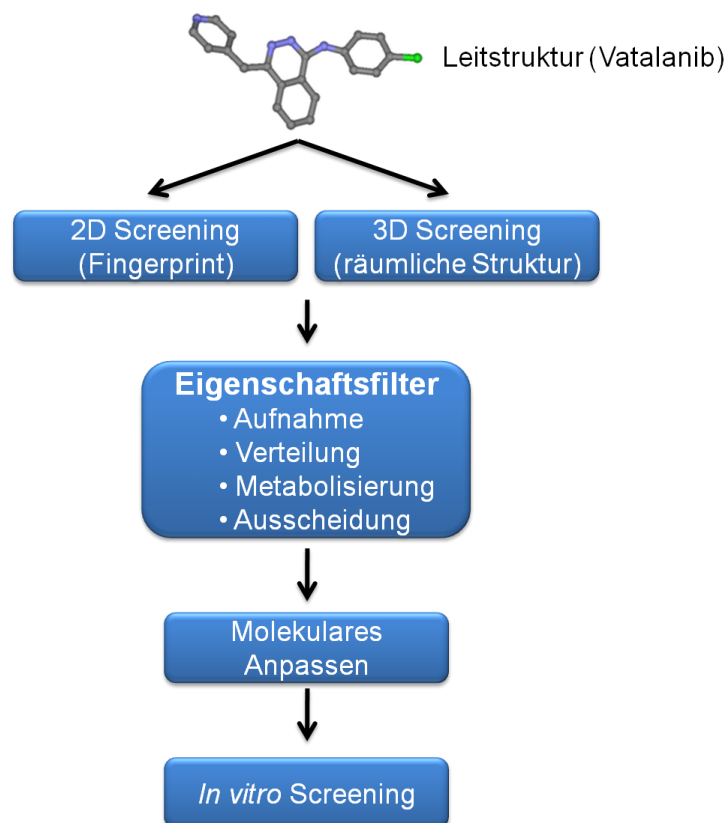


Abbildung 1-7: Die einzelnen Schritte des *in silico* Screenings am Beispiel von Vatalanib als Leitstruktur.

1.3.2.1. Ablauf des *in silico* Screenings mit Vatalanib als Leitstruktur

Vatalanib, auch PTK/ZK genannt ist eine antiangiogenetisch wirksame Substanz, die in vielen klinischen Studien untersucht und beschrieben wurde. In der Klinik findet Vatalanib aber noch keine Anwendung, da in Phase III Studien eine effiziente Wirkungssteigerung von Vatalanib gegenüber bestehenden Therapieformen, z.B. beim kolorektalen Karzinom nicht gezeigt werden konnte (Wood 2000, Sobrero & Bruzzi 2011). Auf Grund der viel versprechenden vorklinischen Ergebnisse wurde Vatalanib als Leitstruktur ausgewählt, mit dem Ziel potentere und möglichst wirksamere Substanzen zu identifizieren.

Im ersten Schritt wurde unter Vorlage der Leitstruktur Vatalanib eine zweidimensionale Ähnlichkeitssuche in einer frei zugänglichen Datenbank durchgeführt. Hierfür die Abfolge von Atomen sowie deren Bindungen betrachtet und die chemische Ähnlichkeit zwischen den Substanzen, über so genannte Fingerprints, berechnet. Diese Fingerprints dokumentieren die An- bzw. Abwesenheit von funktionellen Gruppen eines Moleküls und ermöglichen die Suche in großen Datenmengen. Die zu diesem Zweck durchsuchten Datenbanken beinhalten über 8-10 Millionen Substanzen und mehr als 140 Millionen Konformere. Davon sind etwa 95% kommerziell verfügbare Substanzen. Es handelt sich um bestehende Substanzen, die in diesem Zusammenhang bislang nicht untersucht wurden.

Im Anschluss an das zweidimensionale Screening erfolgte eine dreidimensionale Suche. Hierbei wurde nun auch die räumliche Struktur des Moleküls berücksichtigt. Es konnten Substanzen identifiziert werden, die sich in ihrer dreidimensionalen Raumstruktur ähnlich sind. Neben ähnlichen physikochemischen Eigenschaften, sollten diese Moleküle im günstigsten Fall auch ähnliche biologische Aktivitäten aufweisen. Um die Medikamententauglichkeit der 2D/3D Suchergebnisse zu überprüfen, wurden die Substanzen anhand molekularer Eigenschaften, durch die Anwendung der „Lipinski rule of five“ gefiltert (Lipinski et al. 2001, Butina et al. 2002).

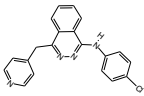
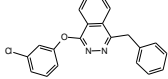
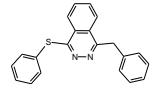
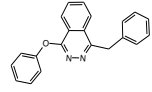
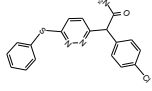
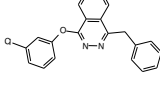
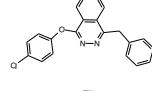
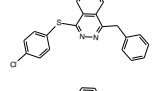
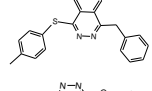
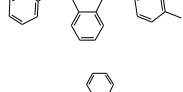
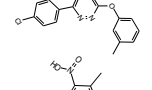
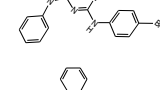
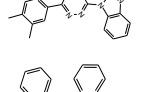
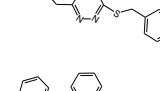
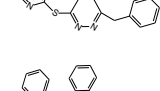
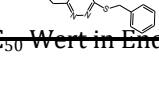
„Lipinski rule of five“ sind empirische Regeln und beschreiben Anforderungen die eine Substanz erfüllen muss um ein Arzneimittel zu werden. Folgende Kriterien werden dabei festgelegt:

- Molekulargewicht < 500 g/mol
- Protonendonatoren < 5
- Protonenakzeptoren < 10
- Log P < 5 (Oktanol/Wasserverteilungskoeffizient Maß für Lipophilie)

Wenn nicht alle Kriterien zutreffen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Substanz ein Medikament wird, geringer. Aus diesem Grund wurden nur Substanzen berücksichtigt, die mindestens drei Kriterien erfüllen.

Abschließend wurde die ATP-Bindetasche des VEGFR-2 am Computer rekonstruiert und überprüft ob die Substanzen in ihre potenzielle Zielstruktur passen. Die für diese Arbeit durchgeführte Suche ergab insgesamt 15 Treffer und sind in Tabelle 1-4 dargestellt (Schmidt et al. 2008). Die 15 Substanzen wurden hinsichtlich ihrer wachstumsinhibierenden Wirkung getestet. Die beiden wirksamsten Substanzen, HP-2 und HP-14, wurden ausgewählt und einer genaueren experimentellen Analyse unterzogen.

Tabelle 1-4: Eigenschaften und 2D Strukturen der neuen Substanzen

2D Struktur	Formel	Molekulargewicht	IC ₅₀ (µM)*	Bezeichnung
	C ₂₀ H ₁₅ ClN ₄	346,82	> 10	Vatalanib (Leitstruktur)
	C ₂₁ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	381,26	> 10	HP-1
	C ₂₁ H ₁₆ N ₂ S	328,44	3,2	HP-2
	C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O	312,37	7,3	HP-3
	C ₁₈ H ₁₄ ClN ₃ OS	355,85	> 10	HP-4
	C ₂₁ H ₁₅ ClN ₂ O	346,82	> 10	HP-5
	C ₂₁ H ₁₅ ClN ₂ O	346,82	6,4	HP-6
	C ₂₁ H ₁₅ ClN ₂ S	362,88	5,7	HP-7
	C ₂₂ H ₁₈ N ₂ S	342,46	4,1	HP-8
	C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O	326,40	> 10	HP-9
	C ₂₁ H ₁₅ ClN ₂ O	346,82	6,3	HP-10
	C ₁₈ H ₁₇ BrN ₅ O ₂	415,28	> 10	HP-11
	C ₂₂ H ₁₇ N ₅	351,41	> 10	HP-12
	C ₂₂ H ₁₇ ClN ₂ S	376,91	> 10	HP-13
	C ₂₀ H ₁₅ N ₃ S	329,42	5,4	HP-14
	C ₂₂ H ₁₈ N ₂ S	342,46	> 10	HP-15

(* IC₅₀ Wert in Endothelzellen bestimmt nach 96 Stunden)

1.4. ZIELSTELLUNG

Hodentumoren gehören zu den häufigsten bösartigen Erkrankungen junger Männer. Zur verbesserten Therapie, gerade beim Auftreten einer Cisplatinresistenz, ist die Entwicklung neuer Behandlungsansätze notwendig.

Das therapeutische Konzept der Antiangiogenese ist hierbei ein viel versprechender Ansatzpunkt. Durch die Unterdrückung der Blutgefäßneubildung kommt es zu einer Unterversorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen und dadurch zum Stillstand des Wachstums. Darüber hinaus exprimieren einige Tumorentitäten wichtige Wachstumsfaktorrezeptoren wie z.B. VEGFR-2 und machen sich im Zuge der Karzinogenese von diesem Rezeptorsystem abhängig. Diese Tumoren werden zusätzlich direkt durch die antiangiogenetisch wirksamen Substanzen in ihrem Wachstum gehemmt. Bis heute ist aber die Zahl der verfügbaren Substanzen eher gering und die Anwendung beim Hodenkrebs noch nicht viel versprechend.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit sind daher:

1. neuartige Substanzen, die in einem *in silico* Verfahren identifiziert wurden, hinsichtlich ihrer antiangiogenen Aktivität bei endothelialen Zellmodellen (primäre und permanente Zellkulturen) mittels zellbiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden zu charakterisieren.
2. die antineoplastische Wirkung dieser Substanzen bei testikulären Keimzelltumoren (cisplatinsensitive, cisplatinresistente Zellkulturmodelle) mit Hilfe zellbiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden zu evaluieren.
3. in Kombinationsversuchen mit dem klinisch relevanten Chemotherapeutikum Cisplatin funktionssteigernde und/oder resensibilisierende Effekte zu überprüfen, da dies für die Entwicklung neuer kombinationstherapeutischer Ansätze von Bedeutung wäre.
4. die Verifizierung der *in vitro* Ergebnisse an einem *in vivo* Modell – der Chorioallantoismembran befruchteter Hühnereier (CAM-Modell).

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. ZELLINIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2-1: Übersicht Zelllinien

Zelllinie	Morphologie	Herkunft	Referenz
HUVEC	Endothel	Nabelschnur	(Chlench et al. 2007)
EA.hy926	Epithel/ Endothel	Lungenkarzinom fusioniert mit Gefäßendothel	(Edgell et al. 1983)
2102EP	Epithel	Embryonales Karzinom	Dr. F. Honecker*
2102EP-R	Epithel	cisplatinresistente Subzelllinie (2102	Dr. F. Honecker *
Tera-1	Epithel	Embryonales Karzinom	ATCC (HTB-105)
Tera-2	Epithel	Embryonales Karzinom	ATCC (HTB-106)
A-498	Epithel	Nierenzellkarzinom	ATCC (HTB-44)
Caki-1	Epithel	Nierenzellkarzinom	ATCC (HTB-46)

(*Medizinische Klinik II des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Arbeitsgruppe Experimentelle Onkologie)

2.1.2. MEDIEN, LÖSUNGEN UND CHEMIKALIEN

Für die Zelllinien wurden spezielle Nährmedien eingesetzt, welche im Folgenden beschrieben sind. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Nährmedien von der Firma Biochrom (Berlin, D) bezogen:

HUVEC

Die Primärzellen wurden in speziellem endothelialen Zellwachstumsmedium (ECGM MV, PromoCell, Heidelberg, D) kultiviert. Dies wurde zusätzlich mit 5% FKS, 4 µg/ml endotheliales Zellwachstumssupplement, 10 ng/ml epidermale Wachstumfaktor, 22,5 µg/ml Heparin, 1 µg/ml Hydrocortison sowie 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt.

EA.hy926

Das Nährmedium der EA.hy926 Zellen war Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) versetzt mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin.

2102EP und 2102EP-R

Die Zelllinie 2102EP entstammt einem Primärtumor, der als Embryonalkarzinom klassifiziert wurde. Die cisplatinresistente Subzelllinie 2102EP-R wurde durch Langzeitkultivierung mit ansteigender Dosierung von Cisplatin etabliert. Dafür wurden die Zellen mit einer Cisplatinkonzentration behandelt, die eine 10%ige Wachstumsinhibition nach zwei Tagen hervorruft. Die Zugabe von Cisplatin wurde bei Erreichen einer Letalität von 50% gestoppt und die Zellen konnten sich über drei Passagen regenerieren, bevor der nächste Inkubationsschritt durchgeführt wurde. Beide Zelllinien wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. F. Honecker, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt (Port et al. 2011, Ruf et al. 2010, Wang et al. 1980).

Beide Zelllinien wurden in einer 1:1 (v/v)-Mischung, bestehend aus DMEM und Ham's - F12 Medium kultiviert, die mit 10% FKS sowie 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Die Cisplatinresistenz der 2102EP-R Zellen wurde durch zweitägige Inkubation mit 1 µM Cisplatin alle zwei Monate aufrechterhalten.

Tera-1, Tera-2, A498 und Caki-1

Das Kulturmedium dieser Tumorzellen war RPMI 1640 Medium versetzt mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin.

Lösungen und Chemikalien

Salze, Puffersubstanzen, Lösungsmittel und Alkohole wurden in analytischer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt, D), Sigma-Aldrich (München, D) oder Carl Roth (Karlsruhe, D) bezogen. Spezielle Chemikalien sind in der Tabelle 2-2 aufgelistet.

Tabelle 2-2 Herkunft der Chemikalien

Artikel	Hersteller	Artikel	Hersteller
Ac-DEVD-AMC	Calbiochem, D	Magermilchpulver	Merck, D
Aprotinin	Roth, D	Matrigel	Becton Dickinson, USA
Biotin-16 UTP	Roche, D	Nonidet P-40	Sigma, D
Bromphenolblau	Sigma, D	Natriumdesoxycholinsäure	Sigma, D
BSA	Sigma, D	Pepstatin A	Sigma, D
Desoxycholinsäure	Sigma, D	Phosphataseinhibitor Cocktail II	Sigma, D
Dithiothreitol	Sigma, D	PMSF	Sigma, D
DMSO	Sigma, D	Propidiumiodid	Sigma, D
Glutaraldehyd	Sigma, D	Sodium Dodecyl Sulfat	Sigma, D
Glycerin	Sigma, D	Triton X-100	Sigma, D
Kristallviolett	Sigma, D	Trypanblau	Sigma, D
Leupeptin	Sigma, D	Tween 20	Sigma, D
β -Mercaptoethanol	BioRad, D	VEGF	Sigma, D

2.1.3. EIER

In dieser Arbeit wurden befruchtete Valo SPF (special pathogen free) Hühnereier der Rasse „White Leghorn“ verwendet. Sie wurden von der Firma Lohmann Tierzucht bezogen (Cuxhafen, D).

2.1.4. ANTIKÖRPER

Tabelle 2-3 Im Western Blot verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Zielprotein	Herkunft	Art des Antikörpers	Verdünnung	Bezugsquelle
Primärantikörper				
β -Aktin	Maus	monoklonal	1:2000	Sigma-Aldrich, D
ERK 1/2	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Santa Cruz, USA
pERK 1/2	Maus	monoklonal	1:500	Santa Cruz, USA
p21 ^{Waf1/CIP1}	Maus	monoklonal	1:2000	Cell Signaling, USA
p27 ^{Kip1}	Kaninchen	polyklonal	1:200	Santa Cruz, USA
Sekundärantikörper				
Kaninchen-IgG-POD	Esel	polyklonal	1:10000	GE Healthcare, D
Maus-IgG-POD	Schaf	polyklonal	1:10000	GE Healthcare, D

2.1.5. PRIMER FÜR DIE POLYMERASE-KETTENREAKTION

Die Primerpaare wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) bezogen und sind in der Tabelle 2-4 aufgelistet. Der Primer für das 5'-Ende des PCR-Produkts wurde als *forward*(F)-Primer und der für das 3'-Ende, als *reverse*(R)-Primer bezeichnet.

Tabelle 2-4 Primerpaare

Gen	Primer (5'-3')	Genbank Nr.	Basenpaare
VEGFR-2	F:GTGACCAACATGGAGTCGTG	NM_002253	660
	R:CCAGAGATTCCATGCCACTT		
GAPDH	F:CCTGACCTGCCGTCTAGAAA	NM_002046	276
	R:TACTCCTTGGAGGCCATGTG		

2.1.6. KOMMERZIELLE KITS

Tabelle 2-5 Übersicht der kommerziell erworbenen Kits

Artikel	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
Cytotoxicity Detection Kit	Roche Applied Science, D
ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, D
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, D
Superscript™ First Strand Synthesis System	Invitrogen, USA
Array Grade Total RNA Isolation Kit	SABiosciences, USA
Oligo GEArray Reagent Kit	SABiosciences, USA
Oligo GEArray DNA Microarray	SABiosciences, USA

2.2. METHODEN

2.2.1. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Plastikkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ein- bis zweimal wöchentlich wurden die Zellen in einem definierten Verhältnis passagiert und in frischem Medium aufgenommen. Für die Subkultivierung mussten die adhärennten Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Anschließend wurden die Zellen in entsprechender Verdünnung in neue Zellkulturflaschen ausgesät und mit frischem Kulturmedium versorgt.

2.2.1.1. Kryokonservierung

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zelllinien kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen abtrypsiniert und in eiskaltem Einfriermedium (20% FKS, 10% DMSO) resuspendiert. Nachdem die Zellen in 2 ml Kryoröhrchen aliquotiert und in einer Isopropanol-Einfrierbox über Nacht bei -80°C tiefgefroren wurden, konnten sie anschließend in die Gasphase des Stickstofftanks bei -196°C zur Langzeitkonservierung überführt werden. Für die erneute Kultivierung wurden die Zellen nach dem Auftauen in 5 ml warmem Medium aufgenommen, zentrifugiert und das Pellet in frisches Kulturmedium überführt.

2.2.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen einer Zellkultur erlaubt nicht nur die Prüfung von Kulturbedingungen, sondern ermöglicht auch das Einsetzen definierter Zellzahlen zur Standardisierung und Vergleichbarkeit von *in vitro* Experimenten. Die Bestimmung wurde mit Hilfe des Vitalfarbstoffes Trypanblau durchgeführt. Trypanblau (synonym: Benzaminblau) ist ein saurer Farbstoff aus der Gruppe der Azofarbstoffe und besitzt eine molekulare Masse von 960,8 g/mol. Er bindet als Anion leicht an Proteine und kann auf Grund seiner Größe die Zellmembran lebender Zellen nicht passieren. Die Membran von toten Zellen hingegen ist porös und durchlässig geworden, so dass der Farbstoff ins Zytoplasma gelangen kann.

Dies lässt sich im Lichtmikroskop gut beobachten. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit 4%igem Trypanblau. Anschließend wurde die Anzahl vitaler Zellen in einer Neubauer – Zählkammer bestimmt.

2.2.1.3. Zellquantifizierung mittels Kristallviolett-Methode

Die Kristallviolett-Methode zur Zellquantifizierung beruht auf der spektrophotometrischen Messung des Farbstoffs Kristallviolett (N-Hexamethyl-Pararosanilin). Dieser passiert die Zellmembran und lagert sich an die DNA der zu untersuchenden Zellen an (Gillies et al. 1986). Innerhalb einer Zelldichte von 500 – 50.000 Zellen/mm² besteht zwischen der gemessenen Farbstoffintensität und der zugrunde liegenden Zellzahl eine lineare Korrelation. Diese Korrelation erlaubt es, Veränderungen des Zellwachstums als Zu- bzw. Abnahme der gemessenen Farbstoffintensität von Kristallviolett quantitativ darzustellen.

Für die Proliferationsstudien wurden die Zellen auf 96 Loch-Platten mit einer Dichte von 1000 – 3000 Zellen/Loch ausgesät und nach 24 – 72 Stunden mit den jeweiligen Substanzen in Mehrfachansätzen beimpft. Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1% Glutaraldehyd fixiert.

Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit Kristallviolett (0,1% in PBS). Der ungebundene und überschüssige Farbstoff wurde durch 30-minütiges Spülen in einem perfundierten Becherglas (Durchflussrate 500 ml H₂O/min) entfernt. Anschließend wurde das DNA-gebundene Kristallviolett durch eine 24-stündige Inkubation mit 100 µl Triton X – 100 (0,2% in PBS) bei 37 °C herausgelöst, um eine spektrophotometrisch bestimmbare, homogene Farblösung zu erhalten. Abschließend wurde die Kristallviolettlösung photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm in einem ELISA-Reader (MRX 2, Dynex Technologies, Denkendorf, D) gemessen.

2.2.1.4. Zytotoxizitätsnachweis durch LDH-Aktivitätsmessung

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein intrazelluläres Enzym, das den letzten Schritt der anaeroben Glykolyse katalysiert und in vitalen Zellen im Zytoplasma vorkommt. Der Zytotoxizitätsnachweis mittels Bestimmung der LDH-Freisetzung beruht darauf, dass bei einer unspezifischen Schädigung der Zellen die Integrität der Zellmembran verloren geht. Infolgedessen wird sie für große Moleküle permeabel, LDH wird extrazellulär freigesetzt und kann im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der LDH-Aktivität stellt damit eine Möglichkeit für die Bestimmung der unspezifischen Zytotoxizität von Testsubstanzen dar.

Die Messung der LDH-Aktivität erfolgte mit dem *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, D). Dafür wurden die Zellen in 96 Loch-Platten ausgesät und nach 72 Stunden mit den jeweiligen Arzneistoffen versetzt. Die Freisetzung der LDH wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Inkubation gemessen. Die LDH-Freisetzung unter Kontrollbedingungen wurde im Überstand un behandelter Kontrollzellen und die maximale LDH-Aktivität nach Zellyse mit Triton X – 100 (2% in Kulturmedium) behandelter Zellen bestimmt. Zur LDH-Bestimmung wurden jeweils 100 µl des Kulturüberstands in eine neue 96 Loch Platte überführt. Zu jedem Ansatz wurden 100 µl Reaktionsmix aus dem *Cytotoxicity Detection Kit* hinzugefügt und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm im ELISA-Reader (MRX-2, Dynex Technologies, Denkendorf, D) gemessen (Glösenkamp et al. 2012b).

Die Berechnung der Zytotoxizität erfolgte durch Quotientenbildung aus der maximalen LDH-Aktivität eines Ansatzes mit der im Überstand gemessenen LDH-Aktivität. Die Leerwerte, bei denen anstatt Zellen nur Medium verwendet wurde, mussten zuvor entsprechend von allen Messwerten abgezogen werden.

2.2.1.5. Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Die Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) erlaubt das Messen einzelner fluoreszenzmarkierter Zellen aus einer gemischten Zellpopulation. In einem FACS-Messgerät werden die Zellen mit Hilfe eines Drucksystems gesammelt, fokussiert und hintereinander durch eine sehr enge Messkammer geschleust.

Dabei durchlaufen nur einzelne Zellen die Messkammer des Gerätes. Diese werden mit einem Laserstrahl angeleuchtet. Das dabei entstehende Streulicht wird durch verschiedene Detektoren registriert, welche die Größe der Zellen und deren Granularität messen. Die Granularität einer Zelle ist abhängig von der Größe und der Struktur des Zellkerns, sowie von der Menge der Zellvesikel. Zusätzlich kann das von markierten Zellen emittierte Fluoreszenzlicht gemessen werden.

Zur Zellzyklusanalyse mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nutzt man die Eigenschaft des Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumjodid, sich interkalierend in die DNA Doppelhelix einzulagern. Dadurch kann der DNA-Gehalt einer Zelle bestimmt werden. Mithilfe der Informationen über den DNA-Gehalt einer Zelle, der Zellgröße und der Zellgranularität kann die Zellzyklus-Phase (G₀/G₁, S, G₂/M), in der sich eine Zelle gerade befindet, bestimmt werden. So ist es möglich, zu bestimmen, zu welchen Teilen sich eine Gesamtpopulation in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befindet (Höpfner et al. 2006b, Darzynkiewicz 1994, Fried et al. 1976).

Für die Messungen wurden die Zellen in der Plastikkulturflasche abtrysiniert und gezählt. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden für den Versuch entnommen. Nach der Zentrifugation (1200 rpm, 5 min, 4°C) wurden die pelletierten Zellen in 200 µl PBS/2% Formaldehyd aufgenommen und in 96 U-Loch Platten überführt. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit der Formaldehydlösung für 30 min, um die Zellen gleichmäßig zu fixieren. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 100% Ethanol aufgenommen. Um mögliche störende RNA-Kontaminationen zu beseitigen, wurde der Ansatz einer RNase A Behandlung unterzogen (40 µg/ml RNase A). Anschließend wurden die Zellen durch Aufnahme in 200 µl Propidiumjodid (50 µg/ml) gefärbt. Die Proben wurden im Durchflusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) gemessen (mind. 10.000 Zellen pro Messung) und die Zellzyklusverteilung mit dem Programm FlowJo (Treestar, USA) ausgewertet.

2.2.1.6. Apoptosenachweis mittels fluorometrischer Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Die Caspase-3 ist beim programmierten Zelltod ein Schlüsselenzym: Als Effektorcaspase führt sie nach ihrer Aktivierung zu einer nicht mehr umkehrbaren Einleitung des Apoptoseprogramms. Die Zunahme ihrer Aktivität kann mittels des Caspase-3-Assays bestimmt werden. Dabei wird die Aktivität durch die Spaltung des Substrates Ac-DEVD-AMC bestimmt (Höpfner et al. 2006a). Dieses Substrat besteht aus dem acetylierten Peptid Ac-DEVD (N-acetyl-Aspartat-Glutamin-Valin-Aspartat), welches an das Fluorophor AMC (7-amino-4-methylcumarin) gekoppelt ist. Aktive Caspase-3 sorgt für die Spaltung von Ac-DEVD-AMC hinter dem zweiten Aspartat und ermöglicht somit die Fluoreszenz des freigesetzten AMC, welches bei 380 nm angeregt und bei 420 – 460 nm emittiert wird. Zunächst wurden zytosolische Zellextrakte durch Inkubation mit 400 µl Lysepuffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 130 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH 7,5) gewonnen. Anschließend wurde der Proteingehalt der Lysate mittels der BCA-Methode bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.2). Zur semiquantitativen Bestimmung der Caspase-3-Aktivität wurden die Lysate mit 100 µl Substratlösung (20 µg/ml Ac-DEVD-AMC in 20 mM HEPES, 10% Glycerin, 2 mM Dithiothreitol [DTT]) versetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenzemission des freigesetzten AMC wurde dann in einem Fluorometer (VersaFluor-Fluorometer, BioRad, München, D) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm bestimmt. Die Endmesswerte wurden auf die im BCA Assay (siehe Kap. 2.2.3.2) bestimmten Proteingesamt mengen der Lysate normalisiert. Als Leerwert diente ein Duplikat aus reinem Lysepuffer.

2.2.1.7. Tube Formation Assay

Zur Überprüfung der antiangiogenen Aktivität der untersuchten Substanzen wurde ein *in vitro* Angiogeneseassay, der Tube Formation Assay durchgeführt (Grant et al. 1990, Arnaoutova et al. 2009).

In vivo grenzt ein mit Endothelzellen ausgekleidetes Blutgefäß an die Basalmembran an. Dabei handelt es sich um eine spezialisierte extrazelluläre Matrix, welche der Stabilisierung und dem Erhalt eines Gefäßes dient. Zudem ermöglicht diese Matrix während der Angiogenese ein gerichtetes Wandern der Endothelzellen und ein Ausbilden der Gefäße.

In vitro können Endothelzellen auf einer künstlichen Basalmembran dreidimensionale kapillarähnliche Strukturen (Tubes) ausbilden (Kubota et al. 1988). Diese Eigenschaft macht man sich im Tube Formation Assay zunutze. Hierbei besteht die Möglichkeit, mehrere Schritte der Angiogenese wie z.B. Adhäsion, Migration, Proteaseaktivität sowie die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen zu untersuchen. Die Gesamtlänge der Tubes, die Anzahl der gebildeten Verzweigungen sowie die Anzahl der gebildeten Tubes gelten dabei als Maß für die Angiogenese. Frühere Studien konnten zeigen, dass verschiedene proangiogene Faktoren, wie zum Beispiel VEGF, die *in vitro* Tube Formation fördern, während die Behandlung mit Angiogenese-inhibitoren die Bildung endothelialer Röhren beeinträchtigt (Ingber & Folkman 1989, DiPietro et al. 1994)

Im Versuchsverlauf wurden primäre Endothelzellen (HUVEC) in ihrem Wachstumsmedium auf einer künstlichen Basalmembran (Matrigel™) ausgesät und ihre Fähigkeit zur Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen unter dem Einfluss der Testsubstanzen untersucht. Bei dem extrazellulären Matrix Präparat Matrigel handelt es sich um ein gelöstes Extrakt aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus Sarkom. Dieses Gel ist reich an extrazellulären Matrixproteinen wie z.B. Laminin, Kollagen IV, Heparinsulfat, Proteoglycane und anderen Faktoren. Es ist in DMEM-Medium gelöst und liegt bei 4°C in flüssiger Form vor. Eine Erhöhung der Temperatur auf 22-37°C führt zur Polymerisierung des Gels.

Für die Beschichtung von 96 Loch Platten wurden jeweils 50 µl Matrigel verwendet. Die Polymerisierung erfolgte für 30 min bei 37°C. Anschließend wurden die Endothelzellen in einer Konzentration von 50.000 Zellen/Loch auf die Matrix aufgetragen und zusammen mit den Testsubstanzen, sowie 30 ng/ml VEGF, zur Stimulation der VEGFR-2 vermittelten Bildung kapillarähnlicher Strukturen, inkubiert. Nach 6 Stunden wurde die Anzahl und Qualität der kapillarähnlichen Strukturen fotografisch erfasst. Die Auswertung erfolgte automatisch mit der Analysesoftware der Firma Wimasis (Wimasis GmbH, München, D).

2.2.1.8. Migrationsassay

Die Migration bzw. Wanderung von Endothelzellen hat eine Schlüsselstellung bei der Angiogenese inne. Die Quantifizierung der Migrationsfähigkeit von Endothelzellen kann mit Hilfe des hier eingesetzten Migrationsassays untersucht werden (Hohberg et al. 2011). Dafür wurden HUVEC Zellen in 6 Loch Zellkulturschalen ausgebracht und bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Daraufhin wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein Strich durch den Zellrasen gezogen und die abgelösten Zellen durch einen Mediumwechsel entfernt. Anschließend wurden die zu untersuchenden Substanzen auf die Zellen aufgebracht und die Wanderung der Zellen in die Lücke hinein unter dem Mikroskop photographisch festgehalten. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Auswertung erfolgte mit der Software TScratch (Gebäck et al. 2009).

2.2.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.2.1. Präparation von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen wurde ein kommerziell erhältlicher RNA-Isolierungs-Kit (*RNeasy Mini-Kit*, QIAGEN, Hilden, D) verwendet. Das Isolierungsprinzip beruht auf der Nukleinsäurebindung der RNA an eine Silikagelmembran. Zuerst wurde die Gesamt-RNA aus 1×10^7 Zellen isoliert. Dafür wurden die Zellen in einem stark denaturierenden Guanidinisothiocyant-haltigem Puffer lysiert und auf eine Silikagelmembran übertragen. Durch mehrmaliges waschen mit einem Salz-Ethanol Puffer wurden überschüssige Substanzen ausgewaschen. Die Elution der RNA erfolgte in $40 \mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser.

Zur Konzentrationsbestimmung der RNA wurde die optische Dichte (OD) der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, und bei 280 nm (OD_{280}), dem Absorptionsmaximum von Proteinen gemessen. Aus dem Verhältnis der beiden Werte kann die Proteinkontamination der Probe berechnet werden. Reine RNA besitzt ein Verhältnis von ungefähr 2, deshalb wurden in dieser Arbeit nur Proben mit einem Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 verwendet. Die Nukleinsäurekonzentration der Probe errechnet sich aus der OD bei 260 nm, der eingesetzten Verdünnung und dem RNA spezifischen Multiplikationsfaktor (siehe Formel 2-1). Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Isolate bei -80°C gelagert.

Formel zur Berechnung der RNA-Konzentration einer Probe:

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times V \times F$$

c = Konzentration der Ausgangslösung

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor: 40 für RNA

OD_{260} = Absorption bei 260 nm

Formel 2-1: Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen

2.2.2.2. Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zum Nachweis und vervielfältigen geringer Mengen an DNA. Sie wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt und vorgestellt (Saiki et al. 1985). Dabei wird ein DNA-Doppelstrang durch Erwärmen denaturiert und mit zwei kurzen Oligonukleotiden, welche die gesuchte Sequenz begrenzen, hybridisiert. Anschließend wird der einsträngige Bereich aufgefüllt, so dass im Resultat zwei identische DNA-Doppelstränge entstehen.

Das wichtigste Enzym der PCR ist die thermostabile DNA-Polymerase. Diese verlängert den, mit Oligonukleotiden hybridisierten Bereich, zu einem vollständigen neuen DNA-Doppelstrang. Trotz großer Temperaturschwankungen, während der einzelnen PCR-Zyklen, behält die DNA-Polymerase ihre vollständige Enzymaktivität. Ein Zyklus eines PCR-Programms besteht aus folgenden Schritten:

- Denaturierung: thermische Denaturierung des DNA-Doppelstrang bei 94°C
- Annealing: Hybridisierung der Primer an die DNA-Zielsequenz (55 – 72°C)
- Elongation: auffüllen des DNA-Doppelstranges durch die DNA-Polymerase

Die Anzahl der entstehenden DNA-Moleküle wird in jedem durchlaufenen Zyklus verdoppelt. Dabei entstehen in 30 – 40 Zyklen ca. 10^5 – 10^8 Kopien der DNA-Zielsequenz.

Mit der klassischen PCR kann nur DNA amplifiziert werden, um RNA nachzuweisen muss zuerst von der RNA-Vorlage eine DNA-Kopie (cDNA) erstellt werden. Dieser Vorgang heißt reverse Transkription (RT). Die Grundlage dieser Methode bilden RNA-abhängige DNA-Polymerasen. Diese sind in der Lage, an einzelsträngige RNA zu binden und aus ihr einen RNA-DNA Hybridstrang zu synthetisieren. Anschließend wird der RNA-Anteil durch RNase H abgebaut und der DNA-Einzelstrang durch eine DNA-abhängige Polymerase zu einem Doppelstrang vervollständigt. Die Kombination der reversen Transkription und der Polymerase-Kettenreaktion ist die so genannte RT-PCR.

Für die RT-PCR wurde der kommerziell erhältliche Kit „Superscript™ First Strand Synthesis System“ (Invitrogen, CA, USA) verwendet. Dieser Kit beinhaltet die reverse Transkriptase Superscript II, eine RNA abhängige DNA-Polymerase mit einem Temperaturoptimum von 42°C und einer reduzierten RNase H Aktivität. Als Primer wurden Oligo(dT₁₂₋₁₈)-Primer verwendet. Dies sind 12-18 Thymidine, die im Bereich des Poly(A)-Schwanzes der eukaryotischen mRNA hybridisieren. Da nur die mRNA diesen Poly(A)-Schwanz aufweist, werden selektiv aus der Gesamt-RNA nur mRNA-Moleküle in cDNA umgeschrieben. Für den Ansatz wurden 2 µg RNA mit 10 mM dNTP Mix und den Primern in einen Reaktionsansatz pipettiert, bei 65°C für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Durch Zugabe des RT-Puffers und der reversen Transkriptase wurde die cDNA Synthese bei 42°C für eine Stunde durchgeführt. Abschließend wurde zum Reaktionsansatz RNase H gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Dieser Ansatz konnte direkt in einer PCR weiter verwendet werden.

Für die PCR wurde von jeder Probe der folgende Reaktionsansatz hergestellt: 2 µl cDNA, 10 µl PCR-Puffer (10x), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), je 2 µl forward- bzw. reverse-Primer (5 µM), 0,4 µl DNA-Polymerase (0,5 U/µl) und 36,6 µl DEPC-H₂O. Die PCR wurde in einem Peltier-Thermocycler (PTC-200, MJ-Research Inc., MA, USA) durchgeführt. Das PCR-Programm wurde für das jeweilige Primerpaar optimiert, um eine maximale Sensitivität und Spezifität der PCR zu erreichen. Die optimierten Bedingungen für die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 2-6 aufgeführt. Als Negativkontrolle wurde im PCR-Reaktionsansatz Wasser anstatt der cDNA verwendet. Im Anschluss an die PCR wurden 10 µl des Reaktionsansatzes mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese (Kapitel 2.2.2.3) aufgetrennt. Als Größenmarker diente der Bench Top 100 bp DNA Ladder (Promega, Wi, USA).

Tabelle 2-6 verwendete PCR Programme

Primer	VEGFR-1, VEGFR-2	GAPDH
Denaturierung	94°C (60 s)	94°C (15 s)
Annealing	65°C (45 s)	55°C (30 s)
Elongation	72°C (120 s)	68°C (60 s)
Zyklenzahl	35	35
Pause	4°C	4°C

2.2.2.3. Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente wurden in 1%igen Agarose-Horizontalgelen in 1 x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer aufgetrennt. DNA-Proben wurden mit 2 µl Bromphenolblauhaltigem Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen eingefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt bis die Laufstrecke des Bromphenolblaus maximal 2/3 der Gellänge betrug. Zur Dokumentation und Auswertung wurden die Gele auf einem UV Vilber Lourmat Transilluminator fotografiert (MWG Biotech, Ebersberg, D).

2.2.2.4. cDNA Mikroarray

Mit Hilfe eines cDNA Mikroarrays kann die Genexpression von Zellen, die unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden, analysiert werden. So ist es möglich nicht nur auf einzelne Gene zu schauen, sondern eine Vielzahl an Genen zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Mikroarrays verwendet. Der Oligo GEMArray® DNA Human Angiogenesis Mikroarray (OHS 024, SABiosciences, MD, USA) wurde verwendet, um die Expression von Angiogenese-relevanten Genen zu untersuchen. Mit dem Oligo GEMArray® DNA Human Cancer Pathway Finder Mikroarray (OHS 033 SABiosciences, MD, USA) wurde das Expressionsprofil von Genen untersucht, die eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese spielen. Der dritte Mikroarray, der Oligo GEMArray® DNA Human Toxicology and Drug Resistance Microarray (OHS 401, SABiosciences, MD, USA), gibt einen Überblick über das Expressionsmuster von Genen, die an der Regulation zellulärer Prozesse wie z.B. Wachstum, Stress, Zelltoxizität und Arzneimittelresistenz beteiligt sind.

Die Arrays enthalten auf Nylonmembranen immobilisierte genspezifische 60mer Oligonukleotide, die als Sonden dienen. Durchgeführt wurde der Array anhand des Oligo GEMArray® System Benutzerhandbuches Version 3.2 (SABiosciences™). Als erstes wurde die RNA mit dem kommerziell erhältlichen Kit „ArrayGrade Total RNA Isolation“ nach Anleitung des Herstellers isoliert (siehe Kap. 2.2.2.1).

Für die anschließende cDNA-Synthese wurden 1,5 µg RNA zusammen mit den TrueLabeling Primern in einen Reaktionsansatz pipettiert und bei 70°C für 10 min denaturiert. Nach Zugabe des Synthesepuffers, des Synthese Enzymmix, sowie eines RNase Inhibitors wurde die cDNA Synthese bei 42°C für 50 min durchgeführt. Es folgte die cRNA Synthese, sowie die entsprechende Markierung. Dazu wurde ein Amplifikations-Master-Mix hergestellt. Dieser besteht aus einem 2,5fachen RNA-Polymerase Puffer, biotinylierten UTP und dem RNA-Polymerase Enzym. Dieser Amplifikationsmix wurde dann direkt zu dem cDNA Ansatz gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die neu synthetisierte cRNA aufgereinigt, um die Vielzahl an Proteinen, Salzen und nicht eingebauten Nukleotiden zu entfernen. Dazu wurde die cRNA an eine Silikagelmembran gebunden und in mehreren Waschschritten von Verunreinigungen befreit.

Für die Hybridisierung der cRNA mit der Mikroarraymembran wurden 4 µg markierte cRNA eingesetzt. Um optimale Reaktionsbedingungen herzustellen, wurde die Membran mit einer 60°C warmen Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Anschließend wurde die cRNA hinzugefügt und die Membran in einem Hybridisierungsofen (Fa. Biometra OV1) über Nacht bei 60°C und konstanten 5 – 10 Umdrehungen pro min inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Detektion der cRNA markierten Spots mit Hilfe der Chemilumineszenz-Detektion (siehe Kap. 2.2.3.4.).

Für die Auswertung der Arrays wurden die Signalintensitäten der einzelnen Spots auf den Röntgenfilmen zwischen behandelter und unbehandelter Probe verglichen. Die Schwärzung der einzelnen Punkte wurde mit Hilfe des Computerprogramms GEArray Expression Analysis Suite (SABiosciences) ermittelt. Zur Auswertung der Daten wurden eine Hintergrundkorrektur und eine Normalisierung der Signale mit Hilfe der auf der Membran gespotteten Referenzgene: ribosomales Protein 27a (RPS27A), Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), β -2-Microglobulin (B2M), β -Hitzeschock-protein 90 (HSPCB) und β -Actin (ACTB) durchgeführt. Als differenziell exprimiert wurden Gene angesehen, welche gegenüber der unbehandelten Kontrolle mindestens 1,5-fach stärker exprimiert wurden (Überexpression) oder deren Expression nur noch das 0,5-fache oder weniger (Suppression) betrug (Glösenkamp et al. 2012a).

2.2.3. PROTEINCHEMISCHE METHODEN

2.2.3.1. Herstellung von Proteinlysaten

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurden die Zellen mit 200-400 µl Radio-Immuno-Präzipitations-Assay-Puffer (RIPA; 1% Nonidet P-40, 0,5% Natriumdesoxycholinsäure, 0,1% SDS) versetzt, 15 min auf Eis lysiert und anschließend mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Um eine Degradation der Proteine zu verhindern wurde der RIPA Puffer zusätzlich mit Proteinase- und Phosphataseinhibitoren (0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Pepstatin A, 0,02 mM Leupeptin, 1 mM Phosphataseinhibitor Cocktail II) versetzt. Die Proben wurden dann in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (14000 rpm, 15 min, 4°C). Unlösliche Bestandteile wie z.B. Zellkerne, Zytoskelett und Zellmembranen wurden in diesem Schritt abgetrennt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und eine Proteinbestimmung nach der BCA-Methode (s.u.) durchgeführt.

2.2.3.2. Bestimmung des Proteingehaltes

Zur Proteinbestimmung wurde der *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet. Bei diesem Test nutzt man die Eigenschaft der Proteine in alkalischer Lösung Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen zu reduzieren (Biuret-Reaktion). Die einwertigen Kupferionen gehen mit der Bicinchoninsäure (*engl.: bicinchoninic acid*, BCA) Komplexe ein. Dabei entsteht eine violette Farbe die kolorimetrisch bestimmt werden kann.

Als Referenzprotein wurde bovines Serumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 0 – 2 mg/ml verwendet. Dazu wurde eine Proteinstandardreihe aus einer BSA-Stammlösung (2 mg/ml) hergestellt. In eine 96 Loch Platte wurden je 20 µl der Proteinlysate und 20 µl der Standardreihe aufgetragen. Anschließend wurden 100 µl der Reaktionslösung aus dem *BCA Protein Assay Kit* zu den Proben gegeben, für 30 min bei 37°C inkubiert und dann bei 570 nm im ELISA-Reader (MRX 2, Dynex Tech., Denkendorf, D) gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden nach Erstellen einer Kalibrierungsgeraden mit Hilfe der Gleichung der Regressionsgeraden berechnet (Abbildung 2-1).

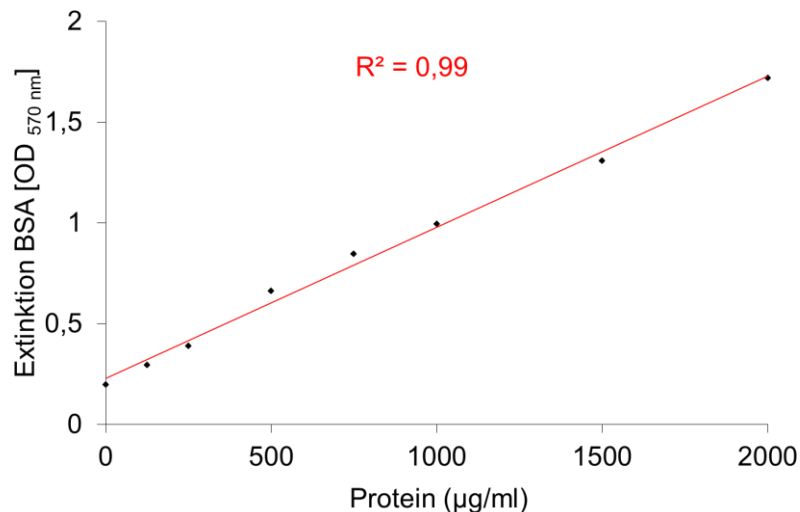


Abbildung 2-1: Darstellung einer repräsentativen Kalibrierungsgeraden der Proteinbestimmung. Die Standardkurve wurde mittels linearer Regressionsanalyse mit der Gleichung $y = 0,0007x + 0,2287$ berechnet. R^2 = Regressionskoeffizient.

2.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Während der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wandern Proteine durch ein elektrisches Feld in einem Polyacrylamid-Netzwerk (Acrylamid/Bisacrylamid). Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet dabei an die Proteine und überdeckt ihre Eigenladung. Die Proteine werden daher nicht auf Grund ihrer Ladung, sondern nur ihrer Größe nach aufgetrennt. β -Mercaptoethanol stabilisiert den denaturierten Zustand der Proteine, indem es die Bildung von Disulfidbrücken reduziert.

In der vorliegenden Arbeit wurden kommerziell erhältliche Polyacrylamidgele (7,5%, 12%) der Firma Lonza verwendet. Die Proteinproben wurden mit RIPA-Puffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und mit 4 x Probenpuffer (250 mM Tris-HCl, 40% Glycerol, 4% SDS, 0,005% Bromphenolblau, 10% β -Mercaptoethanol) versetzt. Die Denaturierung der Proben erfolgte bei 95°C für 10 min. Anschließend konnten die Proben in die Geltaschen pipettiert werden. Zur Bestimmung der Größen einzelner Proteinbanden wurde ein Größenstandard (ColorPlus Prestained Protein Ladder, NEBioLabs, Frankfurt a.M., D) mit auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bis zum Verlassen des Sammelgels bei 100 V, anschließend bei 200 V. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblaubande den unteren Gelrand erreicht hatte.

2.2.3.4. Western Blot

Nach der SDS-PAGE werden die im Gel aufgetrennten Proteine durch ein vertikal angeordnetes elektrisches Feld auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF-)Membran (PerkinElmer, MA, USA) übertragen (*blotting*). Für den elektrischen Transfer wurde die Blot-Einrichtung *Mini Trans Blot Cell* der Firma BioRad (München, D) verwendet. Da die PVDF-Membran von wässrigen Lösungen nicht benetzt werden kann, musste die PVDF-Membran kurz in Ethanol quellen. Anschließend wurden die Elektrodenschwämme, Filterpapiere und die PVDF-Membran für 5 min in Transferpuffer (25 mM Tris, 50 mM Glycin, 20 % Methanol) äquilibriert und auf die Blot-Kassette, zusammen mit dem Gel, als ein „Sandwich“ geschichtet. Die Blot-Kassette wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Blot-Kammer überführt. Bei zu hohen Temperaturen kommt es zur Verformung des Gels und zur ungleichmäßigen Übertragung der Proteine. Deshalb wurde innerhalb der Blot-Kammer ein Kühlelement eingerichtet. Zusätzlich wurde die gesamte Apparatur auf Eis gestellt, um eine übermäßige Wärmeproduktion innerhalb der Blot-Kammer zu unterbinden. Der Transfer erfolgte je nach Größe des gesuchten Proteins für 90-120 min bei 100 V.

2.2.3.5. Immunodetektion

Dieser Schritt diente der Visualisierung des gesuchten Proteins mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei werden einzelne Proteine auf der Membran durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers detektiert. Im Anschluss erfolgt der Nachweis der Antikörperbindung durch eine Chemilumineszenzmessung eines markierten, zweiten Antikörpers. Durch den Vergleich mit einem mitgeführten Größenmarker kann die Größe des identifizierten Proteins bestimmt werden (Rehm & Letzel 2009).

Um zunächst unspezifische Bindungsstellen der mit Proteinen beladenen Membran zu blockieren, wurde die Membran 1 Std. bei Raumtemperatur in einer Magermilchlösung (5% Magermilchpulver in TBS-Tween) inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper in TBS-Tween (Verdünnungen siehe: Kap. 2.1.4) über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für je 5 min mit TBS-Tween (0,1% Tween in TBS) gewaschen.

Anschließend wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:10000 in TBS-Tween) eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin erneut gewaschen. Zur Detektion der Immunreaktion diente ein Chemilumineszenz-Substrat (ECLPlus Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Uppsala, S), in dem die Membran für 5 min inkubiert wurde. Als nächstes wurde die Membran kurz zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Durch Auflegen der Membran auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Uppsala,S) wurden die Proteine visualisiert.

Zur mehrmaligen Verwendung der Membran wurden die Antikörper nach der Detektion von den Proteinen abgetrennt (*Stripping*). Die PVDF-Membran wurde dazu für 6 Minuten bei Raumtemperatur in Stripping-Puffer (0,2 M NaOH) inkubiert und anschließend drei Mal für je 10 Minuten in TBS-Tween gewaschen. Nach dem Strippen wurde die Membran einer weiteren Detektion mit Antikörpern unterzogen.

2.2.4. CHORIOALLANTOISMEMBRAN (CAM) MODELL

Die Chorioallantoismembran (CAM) des bebrüteten Hühnereis wird zur Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenese verwendet (Ausprunk et al. 1975). Sie dient dem Hühnerembryo in erster Linie als Gasaustauschfläche, ist aber auch für den Kalziumtransport von der Schale in den Embryo verantwortlich (Rizzo & DeFouw 1993). Im Rahmen der Genese des Hühnerembryos entwickeln sich insgesamt vier Fruchthüllen: Amnion, Dottersack, Allantois und Chorion. Die Allantois des Hühnerembryos wird ab dem dritten Bebrütungstag als Ausstülpung des Endoderms sichtbar. Ab dem vierten Bebrütungstag entwickelt sich die Allantois zur Allantoisblase. Diese fusioniert anschließend mit dem Chorion zur Chorioallantoismembran. In dieser doppelten Mesodermschicht entwickelt sich bis zum 11. Bebrütungstag ein Netzwerk von Gefäßen. Dieses steht über die Arterien und Venen mit dem Gefäßsystem des Hühnerembryos in Verbindung.

Die Chorioallantoismembran eignet sich sehr gut zur Untersuchung der Angiogenese und wurde deshalb als so genanntes CAM-Modell in der Wissenschaft bereits für viele Studien verwendet. So dient es z.B. zur Untersuchung von Ionentransportern (Ausprunk et al. 1975), für Experimente mit

Tumortransplantaten (Okamura et al. 1995), aber auch zur Bewertung von Angiogenese- und Antiangiogenese-Molekülen (Ribatti et al. 1997, Deryugina & Quigley 2008). Zusätzlich kann die CAM als Nährsubstrat für Tumorzellen verwendet werden (Kunzi-Rapp et al. 2001, Azoitei et al. 2010). Hierbei werden *in ovo* Tumorzellen auf die CAM appliziert und ihr Wachstums-, Invasions- und Angiogeneseverhalten untersucht.

Aufgrund seiner einfachen Handhabung, seines kurzen Bearbeitungszeitraumes und seiner vielfältigen Einsatzmöglichkeiten ist das CAM-Modell heute ein häufig eingesetztes und praktikables Tierversuchersersatzmodell. In dieser Arbeit wurde das CAM Modell zur Überprüfung zweier Fragestellungen eingesetzt.

- Einfluss der Testsubstanzen auf die sich entwickelnden Blutgefäße (Angiogenese-Hemmtest)
- Effekte der Testsubstanzen auf das Tumorwachstum und der Tumorangiogenese

2.2.4.1. Angiogenese-Hemmtest

Die Bebrütung der Hühnereier erfolgte in einem Flächenbrüter (Modell 3000, Fa. Brutmaschinen-Janeschitz, Hammelburg, D) bei 37-38 °C und konstanter Luftfeuchtigkeit. Nach drei Tagen wurden die Hühnereier geöffnet. Zunächst wurden 5 ml Ovalbumin durch die Luftkammer des Hühnereies mit Hilfe einer 20-Gauge Nadel und einer Spritze abgesaugt. Im nächsten Schritt wurden die Hühnereier vorsichtig gedreht, sodass sich die Chorioallantoismembran (CAM) von der Eierschale ablösen konnte. Anschließend konnte auf der Oberseite der Schale ein 1 x 1,5 cm großes Fenster ausgeschnitten werden. Um ein Austrocknen der Hühnereier sowie bakterielle Kontamination und Pilzbefall zu verhindern wurde das Fenster mit Tesafilm zugeklebt und die Eier wurden weiterhin im Flächenbrüter bis zum 11. Bebrütungstag inkubiert. Anschließend erfolgte die topische Applikation der Substanzen direkt auf die CAM. Um ein Verlaufen der Testsubstanzen zu verhindern wurde ein Silikonring mit einem Durchmesser von 1 cm auf die CAM aufgetragen. In diesen wurden, die in PBS gelösten Substanzen, appliziert. Als Kontrolle wurde PBS verwendet. Die Veränderungen auf der CAM wurden nach 48 Std. mit Hilfe eines Binokulars (12-fache Vergrößerung) und einer

Kappa Digital Kamera (Modell: PS4 Fa. Kappa optronics, Gleichen, D) fotografisch dokumentiert (siehe Abbildung 2-2). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Zeiss Axioplan Mikroskops, welches mit einem MBF BioScience Kamera System ausgestattet war. Zur Quantifizierung wurden in jedem Bild die Blutgefäße in vier Feldern ($2,24 \text{ cm}^2$) gezählt. Durch den Vergleich mit der unbehandelten CAM konnte die Hemmung der Angiogenese durch die Testsubstanzen bestimmt werden (Nitzsche et al. 2010).

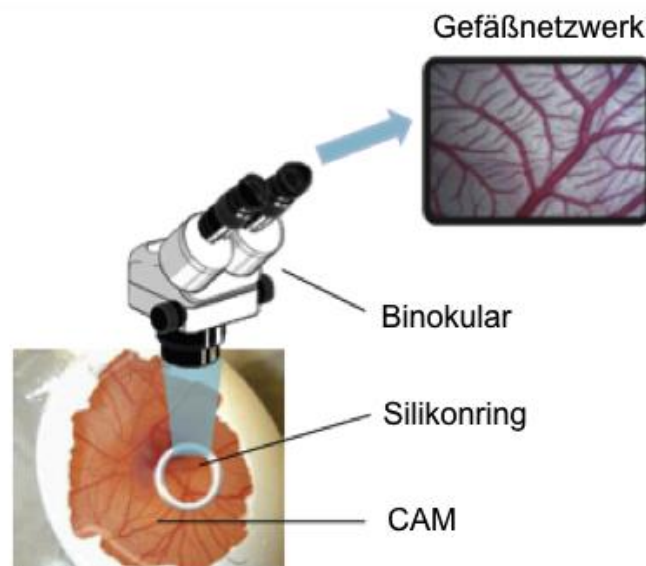


Abbildung 2-2: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Beobachtung der Chorioallantoismembran

2.2.4.2. Untersuchungen zum Tumorwachstum

Nach dem Öffnen der Eier (siehe Kapitel 2.2.4.1) erfolgte am 8. Bebrütungstag die Applikation der Tumorzellen auf die Chorioallantoismembran. Dafür wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben kultiviert, abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Je nach Zelllinie wurden pro Ei 1×10^6 bis 2×10^6 Zellen in $10 \mu\text{l}$ Zellkulturmedium resuspendiert und mit $10 \mu\text{l}$ Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel (BD Biosciences, MA, USA) versetzt. Dieses Tumorzell-Matrigelgemisch wurde anschließend in einen Silikonring ($\varnothing 5 \text{ mm}$) auf der CAM appliziert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung der Tumoren mit jeweils $20 \mu\text{l}$ der Testsubstanzen. Diese wurden in PBS gelöst und topisch auf die Tumoren gegeben. Als Negativkontrolle diente PBS. Anschließend wurde das Überleben der Hühnereier täglich kontrolliert und die Tumoren ggf. erneut mit den Substanzen

beimpft. Am 12. Bebrütungstag wurde ein Teil der CAM mit dem Silikonring und dem Tumor präpariert und anschließend unter einem Stereomikroskop, ausgestattet mit einem digitalen Kamerasystem (Modell: PS40 Fa. Kappa optronics, Gleichen, D), fotografiert. Die Größe der Tumoren wurde ausgemessen. Zur Bestimmung des Tumorwachstums wurde die Fläche des Tumors (mm²) innerhalb des Silikonringes berechnet und die Veränderung des Tumorwachstums gegenüber der Kontrollgruppe ausgewertet (Nitzsche et al. 2012, Azoitei et al. 2011).

2.2.4.3. Immunhistochemie

Zur semiquantitativen Bestimmung der Blutgefäßbildung innerhalb des Tumors wurden die in Paraffin eingebetteten CAM-Präparate geschnitten und immunhistologisch ausgewertet. Die Immunhistochemie ermöglicht dabei eine Identifikation und Charakterisierung spezifischer Proteine innerhalb des Tumors. In dieser Arbeit wurden folgende drei Antikörper verwendet:

- Ki-67: Dieser wurde zum Nachweis proliferierender Tumorzellen verwendet. Ki-67 färbt den Zellkern ausschließlich mitotischer Zellen an und gibt Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors (Beilke et al. 2010).
- Desmin: Dieser Antikörper diente der Detektion von Gefäßen im Tumor. Desmin ist ein Intermediärfilament, welches von den Perizyten der Blutgefäße exprimiert wird. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper ist ebenfalls spezifisch für Desmin in den Perizyten der Chorioallantoismembran (Kurz et al. 2008).
- Zytokeratin: Um den Unterschied zwischen den epithelialen Tumorzellen und den CAM-eigenen Zellen darzustellen, wurde der Zytokeratin Antikörper verwendet (Azoitei et al. 2010).

Für die histologische Aufarbeitung wurden die CAM-Präparate in neutral gepuffertem 4%igem Formalin für 96 Std. fixiert. Anschließend erfolgte die Dehydrierung der Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie deren Einbettung in Paraffin. Von den Paraffinblöcken wurden jeweils 5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf silanisierte Objektträger aufgebracht und entparaffiniert.

Nach der Färbung mit Hämatoxylin-Eosin erfolgte eine lichtmikroskopische Beurteilung. Daraufhin wurden die in gleicher Weise vorbehandelten Schnitte mithilfe der monoklonalen Primärantikörper (Tabelle 2-7) und eines Streptavidin-Peroxidase-Nachweisverfahrens (HistoStain plus, Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA) gemäß den Vorgaben des Herstellers immunhistochemisch gefärbt. Zur Bestimmung des Proliferationsindex' und zur Quantifizierung der Gefäßneubildung in den Tumoren wurde in jedem Präparat der Anteil positiv gefärbter Zellen in 16 zufällig ausgewählten, gleich großen Feldern (1,72 mm²) ausgezählt und die Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe berechnet.

Tabelle 2-7 Konzentrationen der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Produktnummer	Konzentration	Firma
Ki-67	MIB, No. M7240	1 : 100	Dako, Hamburg, D
Desmin	D33, No. M0760	1 : 100	Dako, Hamburg, D
Zytokeratin	AE1/AE3, No. M3515	1 : 1000	Dako, Hamburg, D

2.2.5. STATISTIK

Die Berechnung der statistischen Parameter erfolgte unter Verwendung der Software Microsoft® Office Excel Version 2010.

3. ERGEBNISSE

3.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON HP-2 UND HP-14

Für die Untersuchungen wurden zwei Endothelzelllinien und sechs urologische Tumorzelllinien verwendet. Die immortalisierte Endothelzelllinie EA.hy926 und die aus der Nabelschnur isolierte Primärzelllinie HUVEC dienten dazu, die Wirkung von HP-2 und HP-14 auf der Ebene des tumorversorgenden Gefäßsystems zu untersuchen. Die urologischen Tumorzellen Tera-1, Tera-2, 2102EP, 2102EP-R Caki-1 und A498 wurden verwendet, um die direkte Tumorstoffwirkung der Substanzen zu untersuchen.

3.1.1. mRNA-EXPRESSION DES VEGFR-2 IN ENDOTHEL- UND TUMORZELLEN

Die VEGFR-2 Expression der verwendeten Zelllinien wurde mittels RT-PCR-Analyse evaluiert. Unter Verwendung der in Kapitel 2.1.5 dargestellten Primer konnte in den getesteten endothelialen und TKZT-Zellen die Expression des VEGFR-2 nachgewiesen werden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate wurden Einzelbanden mit der erwarteten Größe von 660 Basenpaaren detektiert. Im Gegensatz dazu konnte bei den Nierenzellkarzinomzelllinien A498 und Caki-1 keine VEGFR-2 mRNA detektiert werden. Diese Zellen wurden in dieser Arbeit als Negativkontrollen verwendet. Die Abbildung 3-1 zeigt ein repräsentatives RT-PCR-Ergebnis für die getesteten Zelllinien.

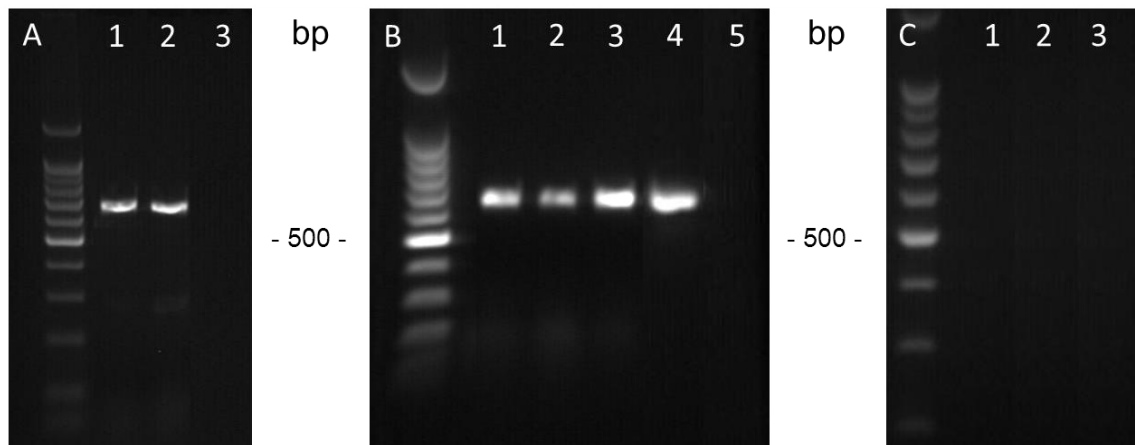


Abbildung 3-1: Nachweis der VEGFR-2 Expression in Endothelzellen und urologischen Tumorzellen. VEGFR-2 mRNA wurde in den Endothelzellen **(A)** HUVEC (A, Spur 1) und EA.hy 926 (A Spur 2) sowie in den testikulären Tumorzellen **(B)** Tera-1 (B, Spur 1), Tera-2 (B, Spur 2), 2102EP (B Spur 3), 2102EP-R (B Spur 4) durch RT-PCR nachgewiesen. In den Nierenzellkarzinomzellen **(C)** A498 (C, Spur 1) und Caki-1 (C, Spur 2) konnte keine VEGFR-2 mRNA nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne cDNA (A Spur 3, B Spur 5, C Spur 3). Als Größenmarker diente eine 100 bp Leiter (Promega, Wi, USA).

3.1.2. ANTIPROLIFERATIVE WIRKUNG VON HP-2 UND HP-14

Die wachstumshemmende Wirkung von HP-2 und HP-14 bei Endothel- und TKZT-Zellen wurde mit Hilfe der Kristallviolett-Methode untersucht. Zuerst wurde die Wirkung beider Substanzen auf Endothelzellebene überprüft. Es zeigte sich, dass beide Substanzen in den eingesetzten Konzentrationen von 0-10 μM nach 96 Stunden Inkubation dosisabhängig die Proliferation der Endothelzellen, EA.hy926 und HUVEC, inhibierten. Die halbmaximale Wachstumsinhibition (IC_{50} -Wert nach 96 Std.) von HP-2 betrug 3,2 μM (+/-0,4) in HUVEC Zellen und 3,5 μM (+/-0,1) in EA.hy926 Zellen. Die IC_{50} -Werte von HP-14 lagen bei 6,2 μM (+/-0,5) für HUVEC-Zellen (ermittelt nach 48 Std.) und bei 3,3 μM (+/-0,3) für EA.hy926-Zellen. Die halbmaximale Wachstumsinhibition der Leitstruktur Vatalanib, die als Vorlage zur Identifikation der neuartigen Substanzen diente, lag bei über 10 μM für EA.hy926 und bei über 20 μM für HUVEC Zellen und damit weit über den Werten von HP-2 und HP-14. In der Abbildung 3-2 ist beispielhaft die antiproliferative Wirkung von HP-2, HP-14 und Vatalanib bei den EA.hy926 Zellen dargestellt.

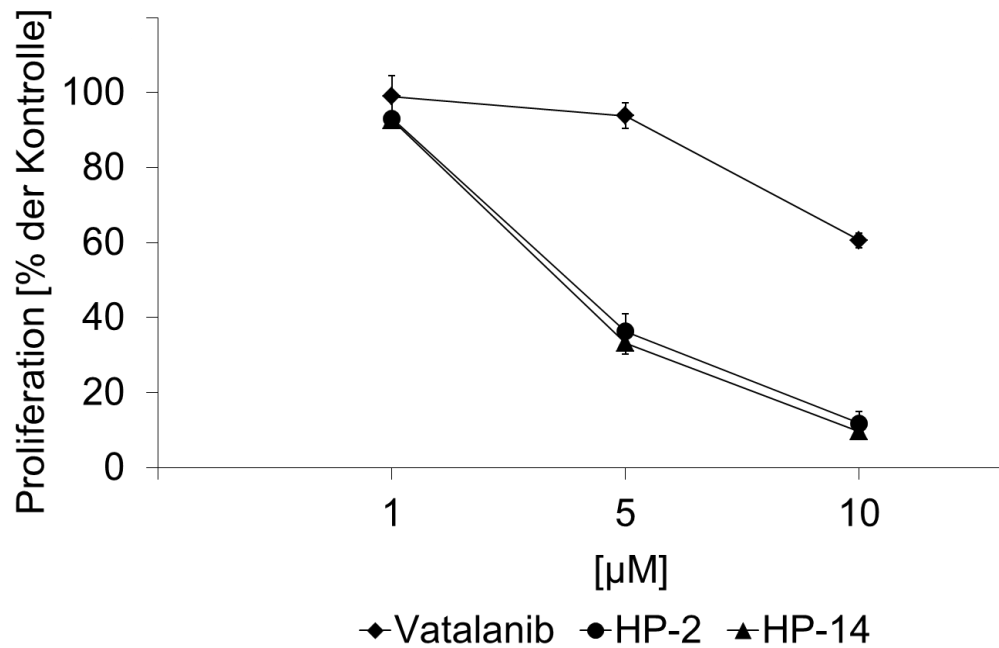


Abbildung 3-2: Antiproliferative Effekte von HP-2 HP-14 und Vatalanib auf Endothelzellen. Dargestellt ist die prozentuale Proliferation von Ea.hy926 Zellen nach 96 Std. Dauerinkubation gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n \geq 4$ unabhängigen Versuchen. Wenn keine Streuung zu erkennen ist, war der SEM kleiner als die Symbole.

Der VEGFR-2 hat bei dem Therapieprinzip der Antiangiogenese eine Schlüsselrolle inne. Zum einen fungiert er bei den Endothelzellen als Sensor zur Detektion der Gefäßneubildung und zum anderen ermöglicht er den Tumorzellen eine autokrine Stimulation des Wachstums.

Um zu überprüfen ob die Wachstumsinhibition, die durch die HP-Substanzen hervorgerufen wurde, vom VEGFR-2 abhängig ist, wurden die VEGFR-2 negativen Zelllinien A498 und Caki-1 verwendet. Bei beiden Zelllinien wurden, selbst in hohen Konzentrationen, nur marginale antiproliferative Effekte beobachtet. So konnte in der höchsten eingesetzten Konzentration (20 μ M) nach 96 Std. bei den A498-Zellen lediglich eine Wachstumsinhibition von $2\% \pm 4$ (HP-2) bzw. $15\% \pm 8$ (HP-14) und $0\% \pm 3$ (Vatalanib) festgestellt werden. Auch das Wachstum der Caki-1 Zellen konnte durch HP-2 und HP-14 nicht wesentlich gehemmt werden (Abbildung 3-3 A, B).

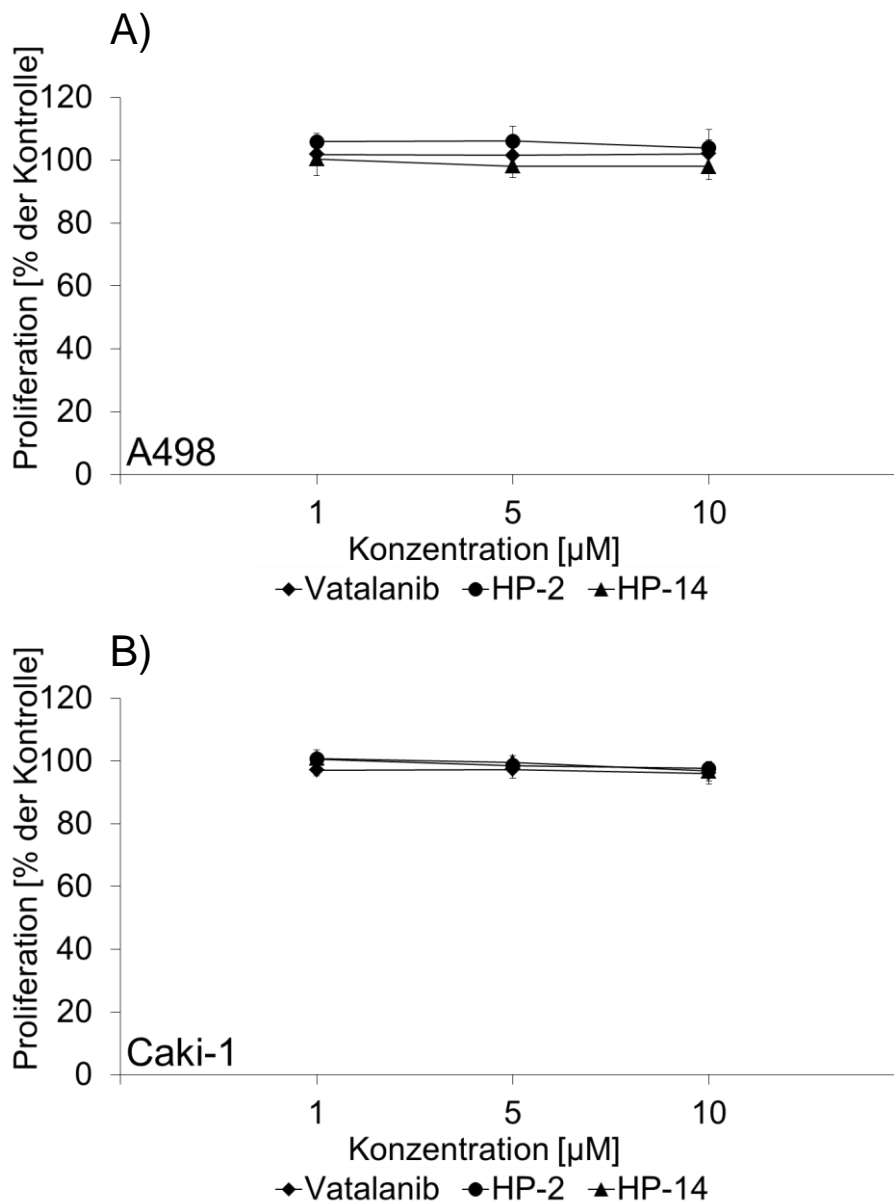


Abbildung 3-3: Antiproliferative Effekte von HP-2, HP-14 und Vatalanib auf VEGFR-2 negative Tumorzellen nach 48 Std. Inkubation. Das Wachstum der VEGFR-2 negativen Zelllinien A498 (A) und Caki-1 (B) wurde nicht inhibiert. Abgebildet ist das prozentuale Wachstum gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n \geq 4$ unabhängigen Versuchen. Wenn keine Streuung zu erkennen ist, war der SEM kleiner als die Symbole.

Die direkte Wirkung der Substanzen auf Tumorzellen wurde mit den testikulären Keimzelltumorzellen Tera-1, Tera-2 und 2102EP-R überprüft. Hierbei führten HP-2 und HP-14 zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellzahl um bis zu $>90\%$. Bei den eingesetzten TKZT Modellen kam es zu individuell unterschiedlichen IC_{50} Werten, die in Tabelle 3-1 zusammengefasst sind. Im Vergleich zeigt sich, dass HP-2 und HP-14 das Wachstum der TKZT-Zellen deutlich besser inhibieren als die Leitstruktur Vatalanib.

Tabelle 3-1 IC₅₀-Konzentrationen von HP-2, HP-14 und Vatalanib nach 96 Std. Inkubation

	HUVEC	EA.hy926	A498	Caki-1	Tera-1	Tera-2	2102EP	2102EP-R
Vatalanib	>20 μ M	>10 μ M	>25 μ M	>20 μ M	17,3 μ M	11,2 μ M	13,3 μ M*	15,9 μ M*
HP-2	3,6 μ M	3,5 μ M	>25 μ M	>20 μ M	8,7 μ M	8,9 μ M	10 μ M*	11,3 μ M*
HP-14	6,2 μ M*	3,3 μ M	>25 μ M	>20 μ M	5,6 μ M	3,6 μ M	4,8 μ M*	5,8 μ M*

*IC₅₀-Werte ermittelt nach 48 Std.

Die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Cisplatin ist ein großes Problem in der Behandlung von TKZT Tumoren. Deshalb war es sehr wichtig, zu untersuchen, ob HP-2 und HP-14 auch auf cisplatinresistente Zellmodelle eine wachstumsinhibitorische Wirkung ausüben. Für diesen Versuch wurden die Zelllinie 2102EP und die cisplatinresistente Variante 2102EP-R eingesetzt. Es zeigte sich, dass auch bei den cisplatinresistenten Tumorzellen eine Wachstumsinhibition durch HP-2 und HP-14 erzielt werden konnte. Die IC₅₀-Konzentration für HP-2 lag hier bei 11,3 μ M und für HP-14 bei 5,8 μ M. Diese Konzentrationen waren in etwa vergleichbar mit den Werten, die bei der 2102EP Zelllinie erhoben wurden (Abbildung 3-4).

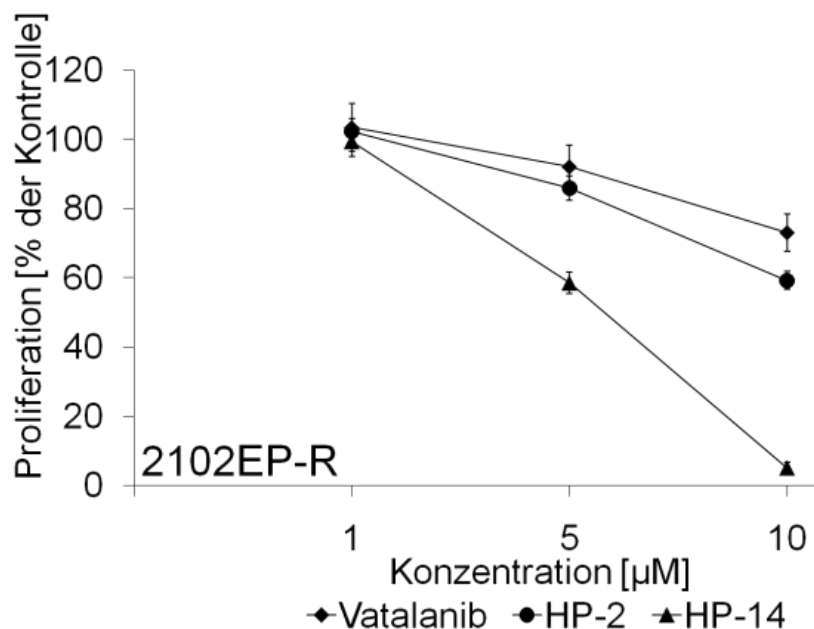


Abbildung 3-4: Antiproliferative Effekte von HP-2, HP-14 und Vatalanib cisplatinresistenten Tumorzellen nach 48 Std. Inkubation. HP-2, HP-14 und Vatalanib hemmten dosisabhängig die Proliferation der cisplatinresistenten Zellen 2102EP-R. Abgebildet ist das prozentuale Wachstum gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n \geq 4$ unabhängigen Versuchen. Wenn keine Streuung zu erkennen ist, war der SEM kleiner als die Symbole.

3.1.3. BESTIMMUNG DER UNSPEZIFISCHEN ZYTOTOXIZITÄT VON HP-2 UND HP-14

Der Verlust der Membranintegrität ist ein Zeichen für die unspezifisch toxische Wirkung von Substanzen, die bei der Suche nach neuen Tumorthapeutika möglichst nicht auftreten soll. Zur Bestimmung der generellen Zytotoxizität von HP-2 und HP-14, diente der sog. LDH-Test, bei dem die Freisetzung zytoplasmatisch lokalisierter Laktatdehydrogenase (LDH) in das Kulturmedium behandelter Zellen als Ausdruck einer unspezifischen Schädigung der Zellmembran gemessen wird (vgl. Kapitel 2.2.1.5). Nach 24 stündiger Behandlung von endothelialen EA.hy926 Zellen wurde jedoch weder für HP-2 noch für HP-14 eine erhöhte LDH Freisetzung detektiert (Abbildung 3-5).

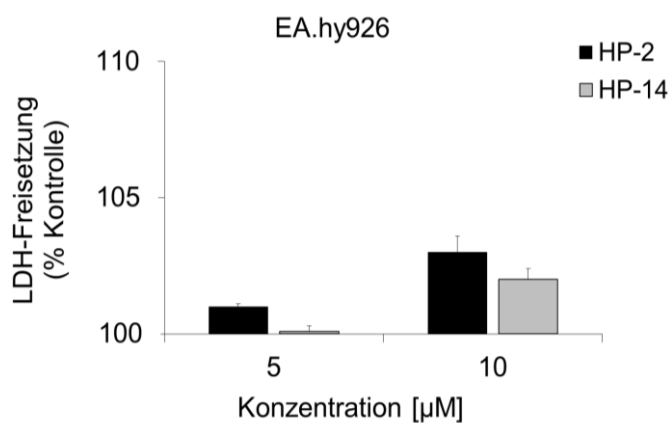


Abbildung 3-5 Zytotoxizität von HP-2 und HP-14. EA.hy926 Zellen, die 24 Std. mit HP-2 oder HP-14 behandelt wurden, zeigten verglichen mit unbehandelten Zellen keine erhöhte Freisetzung der Laktatdehydrogenase in den Zellkulturüberstand. Deshalb haben HP-2 und HP-14 keine unspezifische zytotoxische Wirkung auf humane Endothelzellen.

3.1.4. EINFLUSS VON HP-2 UND HP-14 AUF DIE ZELLYKLUSREGULATION UND APOPTOSE

Normalerweise steht ein gesunder Zellverband in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Zellproliferation durch mitotische Teilungen und Zelltod durch Apoptose. In Tumorzellen ist dieses fein geregelte Gleichgewicht gestört. Bei den TKZT Zellen erleichtern sowohl die unkontrollierte Aktivierung von Zellzyklus stimulierenden Signalwegen (z.B. CDK2) als auch die Hemmung von Apoptose fördernden Signalwegen (z.B. p53) die Tumorbildung und führen unter anderem zu einer exzessiven und unkontrollierten Proliferation (Houldsworth et al. 1997, Bartkova et al. 2003).

Für einige Angiogenesehemmer, wie z.B. Sorafenib (Nexavar®) konnte bereits eine inhibitorische Wirkung auf den Zellzyklus von Tumorzellen nachgewiesen werden (Plastaras et al. 2007). Auch für Vatalanib wurde diese Eigenschaft bereits beschrieben (Roorda et al. 2009). Im Folgenden wurden daher die Effekte der HP-Substanzen auf den Zellzyklus und die Apoptose von TKZT Zellen untersucht.

3.1.4.1. Durchflusszytometrische Untersuchung des Zellzyklus und der Apoptose

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Wirkung von HP-2 und HP-14 auf den Zellzyklus und die Apoptose von TKZT Zellen (Tera-1) überprüft. Hierbei führte eine Inkubation mit HP-14 für 24 Std. zu einer signifikanten Zunahme der Zellpopulation in der S-Phase des Zellzyklus. Während bei den Kontrollen der Anteil der Zellen in der S-Phase bei $17,2\% \pm 0,2$ lag, stieg der Anteil bei den mit HP-Substanzen behandelten Zellen auf $21,4\% \pm 0,4$ (HP-2) bzw. $24,4\% \pm 1,5$ (HP-14) an. Parallel dazu kam es zu einer Abnahme der Zellen in der G2-Phase von $22,1\% \pm 0,1$ bei den Kontrollzellen auf $20,5\% \pm 0,8$ (HP-2) bzw. $17,8\% \pm 3,6$ (HP-14), (Abbildung 3-6).

Durch die Messung der subG1-Population konnte eine Aussage über den Anteil apoptotischer Zellen in der jeweiligen Behandlungsgruppe getroffen werden. Beide Substanzen führten zu einem sehr geringen Anstieg der subG1-Zellen von $10,4\% \pm 0,1$ auf $11,9\% \pm 0,1$ (HP-2) bzw. $12,0\% \pm 2,0$ (HP-14). Zusätzliche Messungen der Caspase-3 Aktivität von Tumorzellen nach der Behandlung mit HP-2 und HP-14 dienten der Überprüfung der durchflusszytometrischen Untersuchungen. Dabei bestätigte sich, dass weder HP-2 noch HP-14 eine nennenswerte Zunahme der Caspase-3-Aktivität in Tumorzellen induzieren und somit keine Apoptose auslösen (Abbildung 3-7).

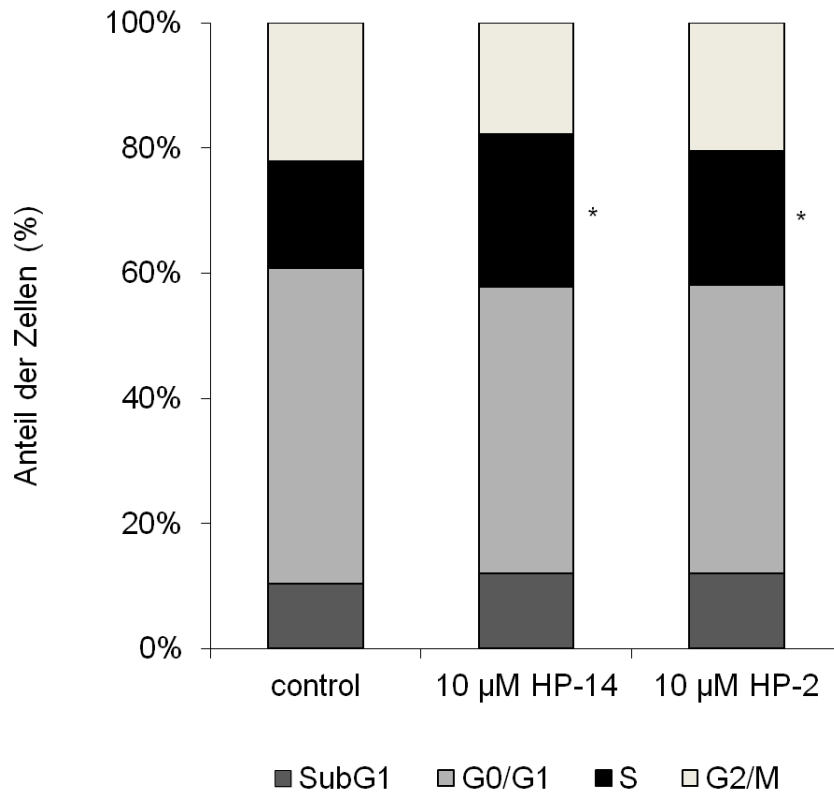


Abbildung 3-6: Zellzyklusregulation durch HP-2 und HP-14. Nach 24 Std. Inkubation der TKZT Zellen Tera-1 mit HP-2 und HP-14 akkumulierten die Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. Der Anteil der Zellen in der G2-Phase nahm parallel dazu ab. Die Zunahme apoptotischer Zellen in der subG1-Population war sehr gering. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n = 3 Messreihen. * $p < 0,05$

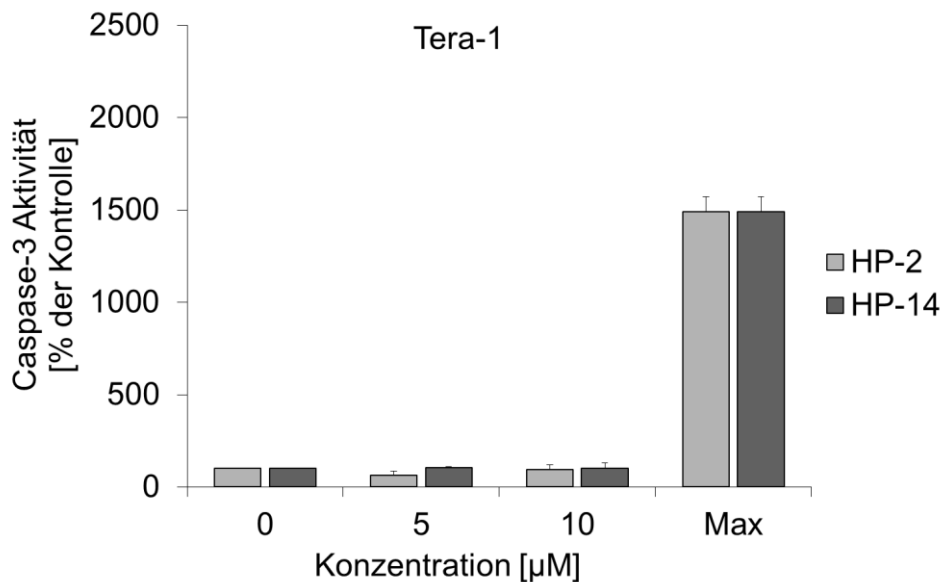


Abbildung 3-7: Caspase-3-Aktivierung durch HP-2 und HP-14. Tera-1 Zellen wurden mit HP-2 und HP-14 für 24 Std. inkubiert. Beide HP-Substanzen führten verglichen mit der Positivkontrolle zu keinem Anstieg der Caspase-3 Aktivität. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) aus drei unabhängigen Versuchen. Die Caspase-3-Aktivität des Kontrollansatzes wurde auf 100% gesetzt. Max = maximale Aktivierung durch Behandlung der Zellen mit 2 µM Camptothecin.

3.1.4.2. Transkriptionelle Effekte von HP-14 auf Zellzyklus relevante Gene

Die transkriptionelle Regulation Zellzyklus-relevanter Gene wurde mit Hilfe eines Mikroarrays untersucht. Verwendet wurde der *Oligo GEArray® DNA Human Cancer Pathway Finder* cDNA Mikroarray der Firma SABiosciences (Maryland, USA) (Abbildung 3-8).

Für die Behandlung der verwendeten Zellen wurde HP-14 in einer Konzentration von 15 μM und eine Inkubationsdauer von 48 Std. ausgewählt, da die wachstumshemmende und zellzyklusregulierende Wirkung bei dieser Substanz unter diesen Bedingungen am stärksten ausgeprägt war.

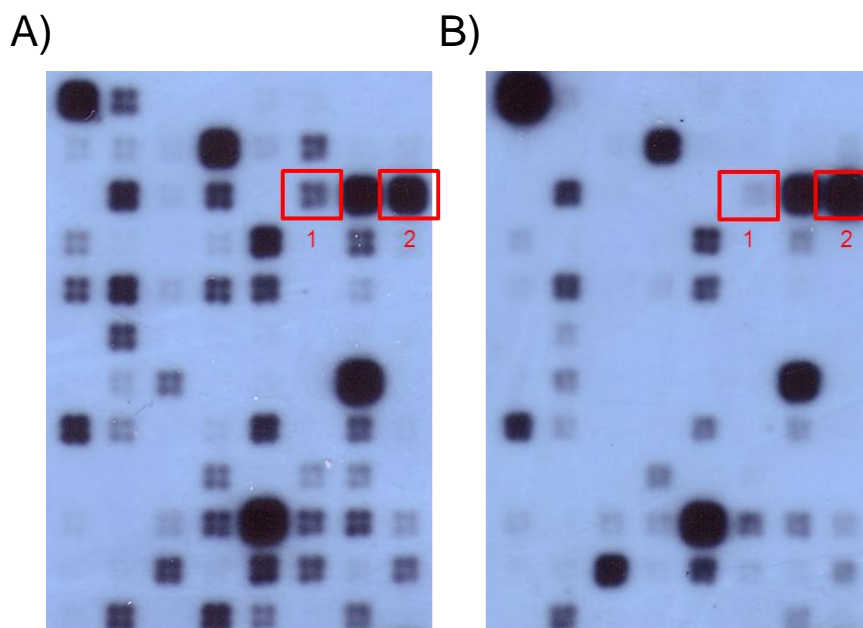


Abbildung 3-8: Mikroarray-gestützte Untersuchung der transkriptionellen Veränderungen in HP-14 behandelten TKZT Zellen. Gezeigt ist ein Ausschnitt von 96 Genen, die mit Zellzyklusregulation, Signaltransduktion und Angiogenese assoziiert sind. **(A)** unbehandelte Zellen, **(B)** HP-14 (15 μM) behandelte Zellen. 1 = *CDK2*, 2 = *CDKN1A(p21_{waf/kip1})*. Abbildung zeigt beispielhaft das Ergebnis eines Experiments an Tera-1 Zellen.

In den TKZT Zellen wurden insgesamt 40 Genen gefunden, die im Vergleich zu unbehandelten Tumorzellen differenziell exprimiert wurden (siehe Anhang Tabelle 10-2). Diese Gene sind mit unterschiedlichsten zellulären Funktionen wie z.B. Wachstum, Signaltransduktion, Zellzyklusregulation und Angiogenese assoziiert. Gene, welche für die Progression des Zellzyklus verantwortlich sind, wie z.B. *CDK2*, *CDC25A* wurden stark herunter reguliert und die Expression des Zellzyklusinhibitors *CDKN1A (p21_{waf/kip1})* war erhöht.

3.1.4.3. Bestimmung der Expression zellzyklus-relevanter Proteine mittels Western Blot

Um die Ergebnisse aus dem Mikroarray zu überprüfen wurden Expressionsanalysen der Hauptzellzyklusproteine, den cyclinabhängigen Kinase-Inhibitoren p21_{waf/kip1} und p27_{kip1} mittels Western Blot durchgeführt. HP-2 und HP-14 führten zu einem Anstieg der Expression von p21_{waf/kip1}.

Wohingegen die Expression von p27_{kip1} nur durch HP-14 erhöht wurde. Vatalanib führte in den eingesetzten Konzentrationen zu keiner signifikanten Erhöhung der Expression beider Zellzyklusproteine (Abbildung 3-9).

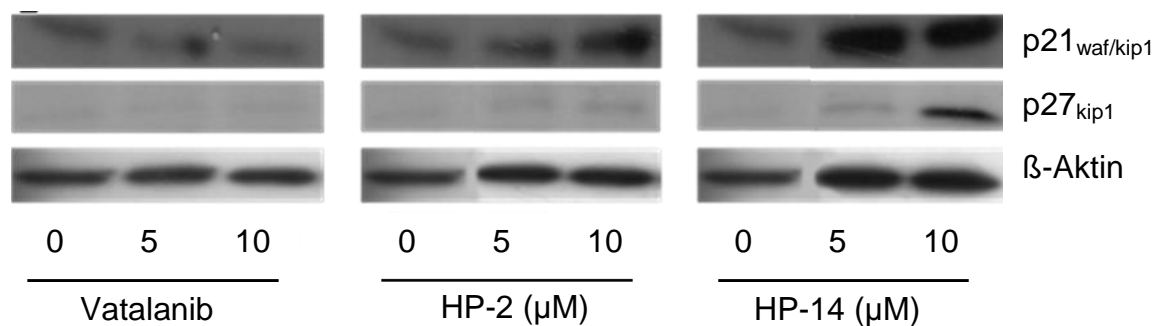


Abbildung 3-9: Expression der Zellzyklusinhibitoren p21_{waf/kip1} und p27_{kip1}. Der Einfluss der Behandlung mit HP-2 und HP-14 auf die Expression der Zellzyklusinhibitoren p21_{waf/kip1} und p27_{kip1} in TKZT Zellen wurde im Western Blot untersucht. Tera-1 Zellen wurden mit Vatalanib, HP-2 und HP-14 für 24 Std. inkubiert und anschließend die Zellextrakte im Western Blot untersucht. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot aus n = 3 Versuchen.

3.1.5. EINFLUSS VON HP-2 UND HP-14 AUF DIE SIGNALTRANSDUKTION

Mittels Mikroarray Analysen konnten Gene identifiziert werden, die an der Signaltransduktion des VEGFR-2 Signalwegs beteiligt sind und durch HP-14 verändert exprimiert werden (siehe Anhang Tabelle 10-1 und Tabelle 10-2). Zum einen führte HP-14 direkt zu einer Reduktion der VEGFR-2 Expression in TKZT Zellen (Tera-1) und Endothelzellen (HUVEC). Zum anderen wurde in beiden Zellmodellen die Expression von *AKT* unterdrückt. Dies ist ein Signalmolekül des VEGFR-2 Signalwegs, welches unterhalb des VEGFR-2 an der Signaltransduktion beteiligt ist.

Um die Aktivität von Proteinen zu überprüfen, die an der VEGFR-2 Signaltransduktion beteiligt sind, wurde die MAPKinase Aktivität anhand der Expression von ERK1/2 untersucht. Dies ist eine zytoplasmatisch lokalisierte Proteinkinase, die u. a. durch den VEGFR-2 aktiviert wird. Im aktivierten Zustand liegt ERK1/2 in phosphorylierter Form vor (Rubinfeld & Seger 2005). Für den Versuch wurden EA.hy926 Zellen für 24 Std. mit ansteigenden Konzentrationen von HP-2, HP-14 und Vatalanib inkubiert. Alle Substanzen inhibierten dosisabhängig die Phosphorylierung von ERK1/2. (Abbildung 3-10). Dabei blieb die Gesamtmenge an ERK1/2 Protein unverändert. Die stärksten Effekte wurden dabei durch 10 μ M HP-14 erzielt.

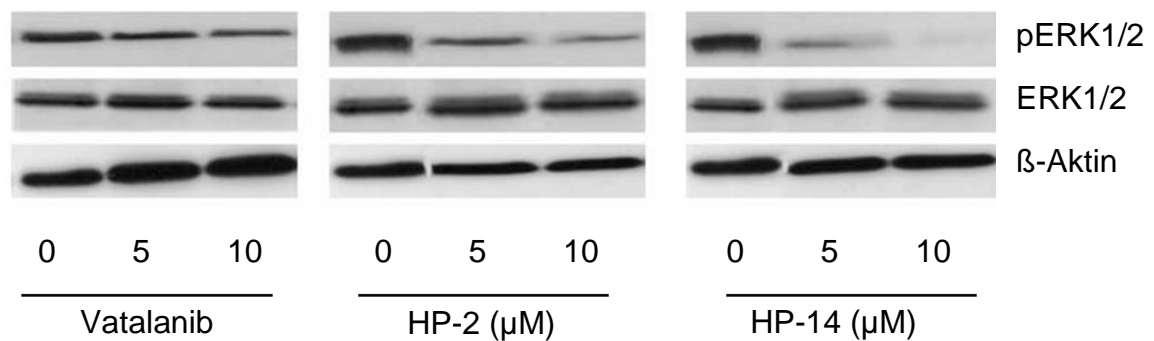


Abbildung 3-10: Unterbrechung des MAPKinase Signalwegs durch HP-2, HP-14 und Vatalanib. Die Behandlung von EA.hy926 Zellen mit den HP-Substanzen und Vatalanib führte zu einer dosisabhängigen Verringerung der ERK1/2 Phosphorylierung. Dabei blieb die Gesamtmenge an ERK1/2 Protein gleich. EA.hy926 Zellen wurden mit Vatalanib, HP-2 und HP-14 für 24 Std. inkubiert, anschließend wurden die Zellextrakte im Western Blot untersucht. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western Blot aus n = 3 Versuchen.

3.1.6. KOMBINATIONSTHERAPEUTISCHE ANSÄTZE VON HP-2 UND HP-14 MIT CISPLATIN

Kombinationsexperimente sollten zeigen, ob die antiproliferative Wirkung konventioneller Zytostatika wie z.B. Cisplatin durch den Einsatz der neuen HP-Substanzen verstärkt werden kann und ob eine Sensibilisierung von cisplatinresistenten Zellen gegenüber der Chemotherapie durch die neuen HP-Substanzen möglich ist.

Dafür wurden cisplatin-sensitive (2102EP) und cisplatin-resistente TKZT Zellen (2120EP-R) für 48 Std. mit steigenden Konzentrationen der HP-Substanzen und gleich bleibender Konzentration Cisplatin (1 μ M) behandelt. Bei den cisplatin-sensitiven Zellen führte die Behandlung mit Cisplatin als Monosubstanz zu einer Reduktion des Wachstums um bis zu 42%, während das Wachstum der cisplatin-resistenten Zellen lediglich um bis zu 19% reduziert wurde (Abbildung 3-11 A, C).

Die Kombination der HP-Substanzen mit Cisplatin führte bei der cisplatin-sensitiven Zelllinie zu einer additiven Wachstumshemmung um bis zu 97% (Abbildung 3-11 A, B). In den cisplatin-resistenten Zellen führte die Kombination der HP-Substanzen mit Cisplatin ebenfalls zu einer dosisabhängigen und additiven Wachstumshemmung um bis zu 92% (Abbildung 3-11 C, D).

Durch den Einsatz einer VEGFR-2 negativen Zelllinie (Caki-1) sollte überprüft werden, ob die beobachtete additive Wachstumsinhibition VEGFR-2 abhängig oder unabhängig ist. Hierbei zeigte sich, dass die Behandlung mit steigenden Konzentrationen von HP-2 oder HP-14 in Kombination mit Cisplatin (1 μ M) zu einer Wachstumsinhibition von lediglich 15% führte. Dies spiegelt hauptsächlich die alleinige Wirkung von Cisplatin auf die Caki-1 Zellen wider (Abbildung 3-11 E, F).

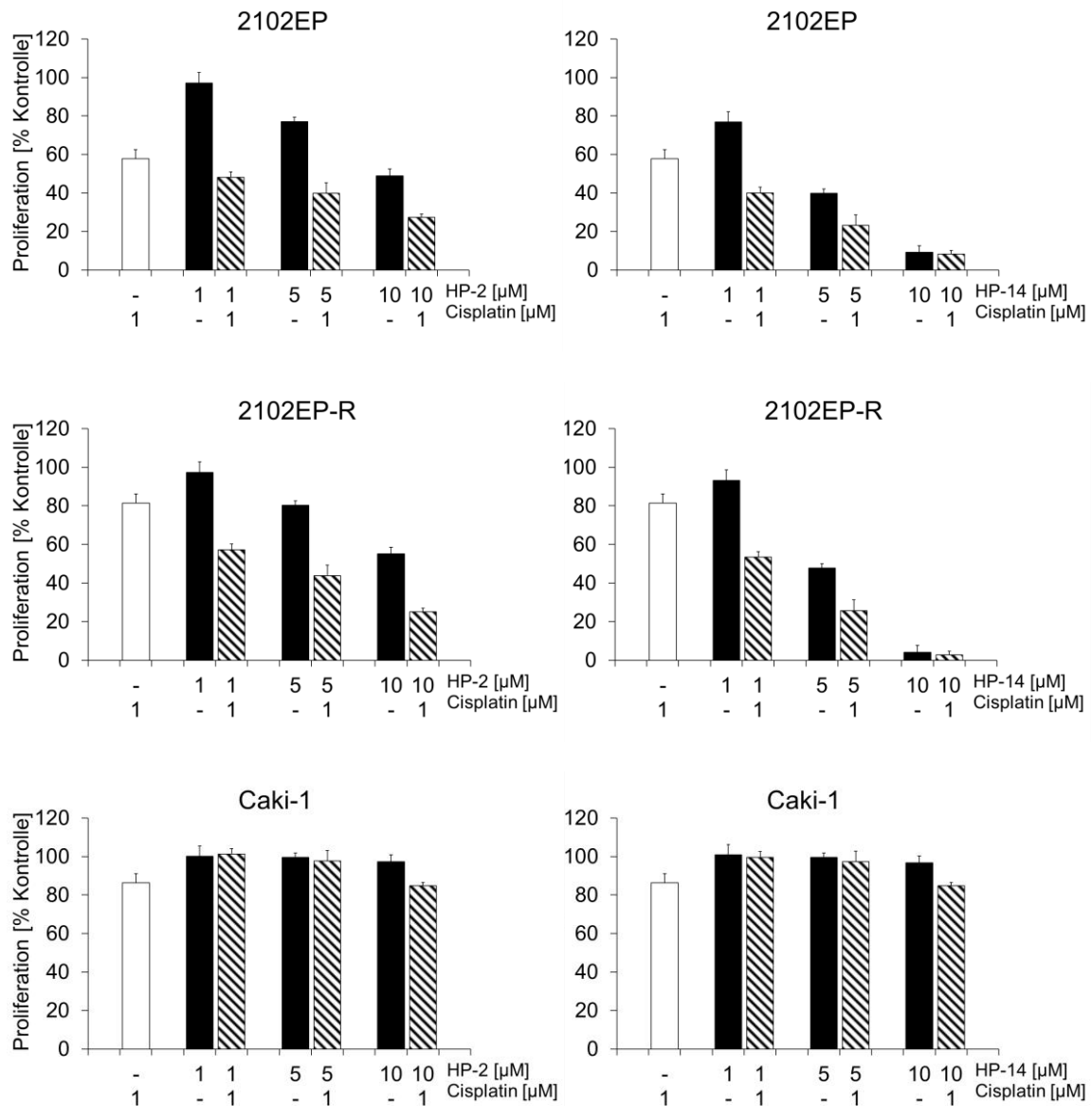


Abbildung 3-11: Kombinationsbehandlung von HP-2 und HP-14 mit Cisplatin.

Cisplatin-sensitive und cisplatin-resistente Tumorzellen wurden mit HP-2 oder HP-14 und 1 μM Cisplatin behandelt. Nach 48 Std. wurde die Zellzahl der 2102EP (A, B), den 2102EP-R (C, D) und den Caki-1 Zellen (E, F) gemessen. Die Kombination von HP-2 und HP-14 mit Cisplatin führt bei den VEGFR-2 exprimierenden Zelllinien zu additiven wachstumsinhibitorischen Effekten, wohingegen die VEGFR-2 negativen Zellen keine Hemmung des Wachstums zeigten. Abgebildet ist das prozentuale Wachstum gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n \geq 4$ unabhängigen Versuchen.

3.1.7. GENEXPRESSIONSANALYSE IN CISPLATINSENSITIVEN UND CISPLATINRESISTENTEN TKZT ZELLEN

Mit dem Ziel, differenziell exprimierte Gene zu identifizieren, die in den cisplatin sensitiven und cisplatinresistenten Tumorzellen nach der Behandlung mit HP-14 und Cisplatin, allein und in Kombination auftreten wurden cDNA Mikroarray Analysen durchgeführt. Es wurde das Expressionsniveau von 263 Genen untersucht, die an zellulären Prozessen wie z.B. Wachstum, Toxizität, Stress und Arzneimittelresistenz beteiligt sind. Dafür wurden cisplatin sensitive (2102EP) und cisplatinresistente (2102EP-R) Zellen entweder mit HP-14 (1 μ M) bzw. Cisplatin (1 μ M) oder aber mit der Kombination aus HP-14 (1 μ M) und Cisplatin (1 μ M) für 48 Std. behandelt.

Cisplatin als Monosubstanz (1 μ M) führte zu einer Wachstumsreduktion um 42% bei den cisplatin sensitiven und um 19% bei den cisplatinresistenten Tumorzellen. Die alleinige Behandlung mit 1 μ M HP-14 führte zu keiner signifikanten Wachstumsreduktion beider Zelllinien.

Die Kombinationsbehandlung aus HP-14 (1 μ M) und Cisplatin (1 μ M) führte zu einer Wachstumsreduktion beider Zelllinien 2102EP und 2102EP-R von 60% bzw. 45% (Abbildung 3-11 B, D). Dabei wurde in den cisplatin sensitiven Zellen die Expression von stressinduzierten Genen wie z.B. *BRCA1*, *ERCC3*, *DNAJB11*, *HMOX2* und *GADD45A/B* erhöht. Aber auch Gene, die am Zellzyklus beteiligt sind, wurden differenziell exprimiert. Dazu gehörten die Gene für den Transkriptionsfaktor E2F1 und für das Retinoblastomprotein RB1. Weitere interessante Gene, die bei den cisplatin sensitiven Zellen nach der Kombinationsbehandlung mit HP-14 und Cisplatin identifiziert werden konnten, waren z.B. *CCT4*, *RXRA* und *TPST1* (siehe Tabelle 3-2).

Bei den cisplatinresistenten Zellen (2102EP-R) führte die Kombinationsbehandlung aus HP-14 (1 μ M) und Cisplatin (1 μ M) zu einer Veränderung der Expression der Gene, die am Zellwachstum und am Zellzyklus beteiligt sind: *CDK2*, *AKT1*, *DHFR*, *ERBB2* und *TOP1*. Des Weiteren wurden die Gene für das stressinduzierte Protein ERCC3, für das Tumorprotein p53 und für den Transkriptionsfaktor *EGR1* differenziell exprimiert (siehe Tabelle 3-3).

Tabelle 3-2 Differenziell regulierte Gene in 2102EP-Zellen nach 48 Std. Behandlung mit HP-14 (1 µM) und Cisplatin (1 µM) allein und in Kombination.

<i>Symbol</i>	<i>Genbezeichnung</i>	<i>verändert regulierte Gene (Wert)</i>		
		1 µM Cisplatin	1 µM HP-14	Kombination
<i>Apoptose</i>				
<i>BRC</i>	Breakpoint cluster region		0,06	0,25
<i>CLU</i>	Clusterin	0,41		0,42
<i>Zellzyklus relevante Gene</i>				
<i>CCNG1</i>	Cyclin G1		0,03	0,30
<i>E2F1</i>	E2F transcription factor 1	0,45		0,43
<i>RB1</i>	Retinoblastoma 1		8,33	5,01
<i>Arzneimittelverstoffwechslung</i>				
<i>ACAT1</i>	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	17,39	12,82	
<i>CHST1</i>	Carbohydrate sulfotransferase 1		3,57	1,77
<i>CHST7</i>	Carbohydrate sulfotransferase 7		0,04	0,21
<i>CYP2D6</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily D	0,28	2,45	
<i>GSR</i>	Glutathione reductase	2,05		2,40
<i>GSTP1</i>	Glutathione S-transferase pi		0,21	0,29
<i>MGST1</i>	Microsomal glutathione S-transferase 1		0,36	0,21
<i>NAT5</i>	N-acetyltransferase 5	2,68		2,73
<i>TPST1</i>	Tyrosylprotein sulfotransferase 1	2,65		5,71
<i>Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung</i>				
<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor		6,51	8,16
<i>DHFR</i>	Dihydrofolate reductase		6,92	5,36
<i>IL1B</i>	Interleukin 1, beta		10,10	6,15
<i>FGF2</i>	Fibroblast growth factor 2 (basic)	5,23	4,84	4,11
<i>TOP1</i>	Topoisomerase (DNA) I	9,00		
<i>Stressantwort</i>				
<i>MGMT</i>	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase		0,22	0,29
<i>MSH2</i>	MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1		0,43	0,45
<i>ERCC3</i>	DNA Excision repair Protein 3	3,08	23,87	24,15
<i>GADD45</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	20,60		12,86
<i>GADD45</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	1,58		1,89
<i>HMOX1</i>	Heme oxygenase (decycling) 1	2,54	3,26	3,14
<i>HMOX2</i>	Heme oxygenase (decycling) 2			10,58
<i>TYMS</i>	Thymidylate synthetase	1,99	2,48	2,10
<i>Chaperone und Hitzeschockproteine</i>				
<i>CCT4</i>	Chaperonin containing TCPI1, subunit 4 (delta)	10,21	12,65	2,81
<i>HSP90B1</i>	Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1		0,44	0,47
<i>DNAJB11</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11	7,72		15,67
<i>DNAJB5</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5		0,02	0,22
<i>SERPINH</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade H	0,36	0,02	0,02
<i>Transkriptionsfaktoren und -regulatoren</i>				
<i>BRCA1</i>	Breast cancer 1, early onset	4,77	12,19	7,26
<i>FOS</i>	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene		0,04	0,05
<i>RARA</i>	Retinoic acid receptor, alpha		4,14	2,20
<i>RXRA</i>	Retinoid X receptor, alpha		13,38	16,67

Tabelle 3-3 Differenziell regulierte Gene in 2102EP-R Zellen nach 48 Std. Behandlung mit HP-14 (1 μ M) und Cisplatin (1 μ M) allein und in Kombination.

<i>Symbol</i>	<i>Genbezeichnung</i>	<i>verändert regulierte Gene (Wert)</i>		
		1 μ M Cisplatin	1 μ M HP-14	Kombination
<i>Apoptose</i>				
<i>BAG1</i>	BCL2-associated athanogene	1,60	0,03	0,03
<i>CLU</i>	Clusterin		0,47	0,23
<i>Zellzyklus relevante Gene</i>				
<i>ABL1</i>	V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene	2,96	0,07	
<i>CDK2</i>	Cyclin-dependent kinase 2	9,62		4,47
<i>E2F1</i>	E2F transcription factor 1	2,52	2,03	2,28
<i>Arzneimittelverstoffwechslung</i>				
<i>ACADSB</i>	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched	3,52		1,79
<i>Crat</i>	Carnitine acetyltransferase		0,10	0,39
<i>CYP2D6</i>	Cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide	0,45	1,53	
<i>GSR</i>	Glutathione reductase		6,38	3,42
<i>Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung</i>				
<i>AKT1</i>	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1		0,08	0,08
<i>DHFR</i>	Dihydrofolate reductase	18,24	19,06	21,75
<i>ERBB2</i>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene	1,58		1,72
<i>FGF2</i>	Fibroblast growth factor 2 (basic)	0,10	1,65	1,80
<i>TOP1</i>	Topoisomerase (DNA) I		0,13	0,51
<i>Stressantwort</i>				
<i>CTPS</i>	CTP synthase	2,95	2,66	2,78
<i>ERCC3</i>	DNA Excision repair Protein 3	4,73	4,38	4,75
<i>GADD45B</i>	Growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	0,40	0,38	0,44
<i>TYMS</i>	Thymidylate synthetase	1,92	1,69	1,84
<i>Chaperone und Hitzeschockproteine</i>				
<i>CCT4</i>	Chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)		10,80	9,71
<i>DNAJB11</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11	0,37	0,57	
<i>DNAJB5</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5	0,48	0,36	0,55
<i>HSPH1</i>	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	3,03	1,78	2,33
<i>HSP90B1</i>	Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1		0,49	0,45
<i>SERPINH1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade H		0,03	0,03
<i>Transkriptionsfaktoren und -regulatoren</i>				
<i>BRCA1</i>	Breast cancer 1, early onset		14,06	3,53
<i>EGR1</i>	Early growth response 1		27,28	31,15
<i>FOS</i>	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene	0,03	0,31	0,36
<i>NFKBIA</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	1,80	1,99	1,84
<i>NFKB2</i>	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	0,24		0,22
<i>RXRA</i>	Retinoid X receptor, alpha	0,34		0,34
<i>RXRB</i>	Retinoid X receptor, beta	0,31	0,06	0,06
<i>TP53</i>	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	0,08	0,06	0,06

3.2. ANTIANGIOGENE WIRKUNG NEUARTIGER SUBSTANZEN

Die antiangiogenen Auswirkungen von HP-2 und HP-14 wurden zuerst *in vitro* anhand verschiedener funktioneller Assays an Endothelzellen überprüft.

3.2.1. TUBE FORMATION

Für den Versuch wurden HUVEC Zellen in ihrem Wachstumsmedium auf Matrigel ausgesät und die dreidimensionale Ausbildung von Endothelzellröhren durch Zugabe von VEGF₁₆₅ unterstützt (Abbildung 3-12). Gleichzeitig wurden die Zellen entweder mit PBS (Kontrolle), 20 μ M HP-2 oder 10 μ M HP-14 behandelt.

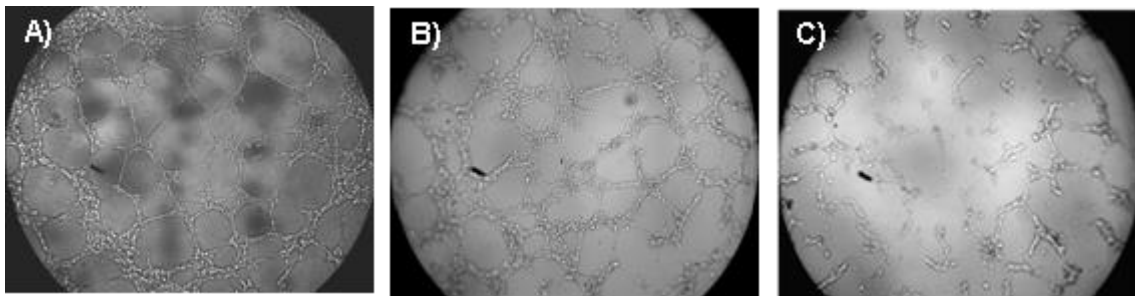


Abbildung 3-12: Einfluss von HP-2 und HP-14 auf die Tube Formation. Im Vergleich zu der Kontrolle (A) führt die Zugabe von HP-2 (20 μ M) (B) zu keiner Veränderung der Tube Formation. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von HP-14 (C) zu einer deutlichen Hemmung der Tube Formation von HUVEC Zellen. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus n = 4 Versuchen.

HUVEC Zellen bildeten unter Kontrollbedingungen im Matrigel ein Netzwerk mit Quervernetzungen und einer großen Anzahl röhrenähnlicher Strukturen aus. HP-2 führte zu keiner messbaren Veränderung der Tube Formation. Im Gegensatz dazu war die Ausbildung des Röhrennetzwerkes durch Zugabe von HP-14 deutlich gestört. Die computerunterstützte Auswertung, durch Quantifizierung der Pixel (px) in jedem Bild, ergab für die HUVEC Kontrollkulturen eine Tubegesamtlänge von $16680 \text{ px} \pm 1632 \text{ px}$. Die Behandlung mit HP-14 führte zu einer signifikanten Hemmung der Gesamttubelänge um bis zu 39% (Abbildung 3-13:). Der Effekt auf die Ausbildung der Tubes ist dabei noch ausgeprägter. Hier bildeten die HUVEC Zellen unter Kontrollbedingungen 42 ± 7 Tubes aus, während die mit HP-14 behandelten Zellen lediglich $3 \pm 0,6$ vollständige Tubes ausbilden konnten. Dies ist eine signifikante Verringerung um 93%. Auch die Anzahl der Verzweigungen nahm unter Einfluss von HP-14 signifikant ab.

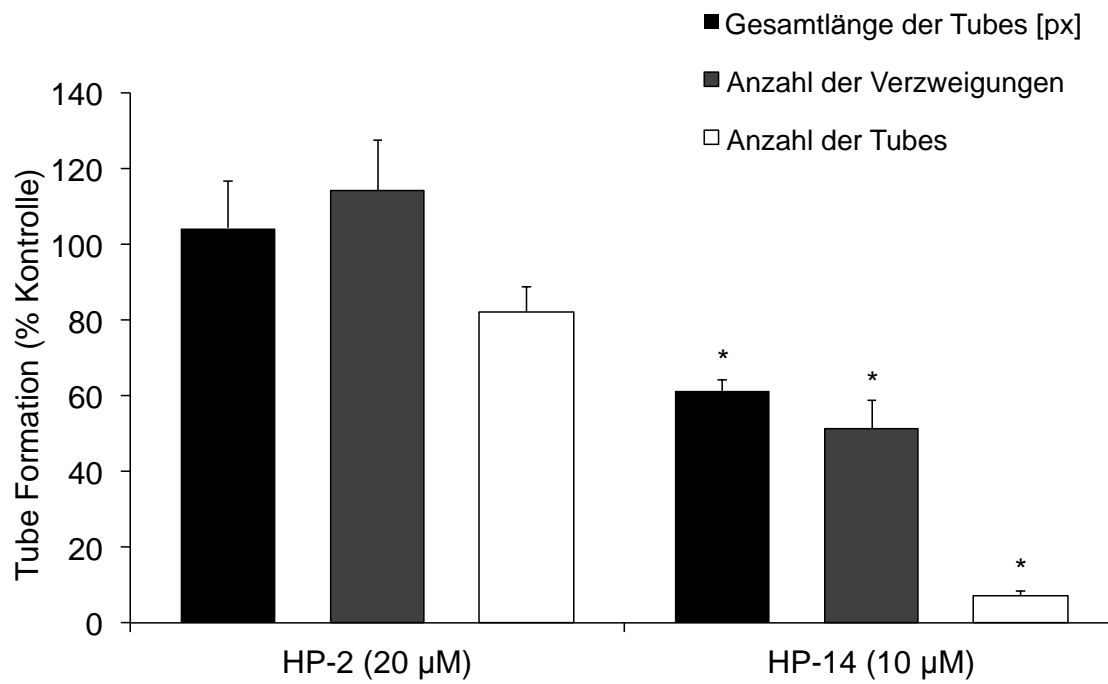


Abbildung 3-13: HP-14 hemmt die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen. Die Behandlung von HUVEC Zellen mit 10 µM HP-14 führt im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Hemmung der Ausbildung von Endothelzelltubes, während mit HP-2 keine nennenswerte Hemmung der Tubeausbildung erfolgte (* $p < 0,05$). Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler aus $n = 4$ Versuchen

3.2.2. EINFLUSS AUF DIE MIGRATION VON ENDOTHELZELLEN

Die Fähigkeit von Endothelzellen zu einem angiogenen Stimulus zu wandern, wird als Zellmigration bezeichnet und ist ein essenzieller Schritt der Angiogenese. Mit dem sogenannten Scratch Assay sollte die Fähigkeit zur Hemmung der Endothelzellmigration durch Behandlung mit HP-2 und HP-14 untersucht werden. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigten Zellen, die mit HP-2 und HP-14 behandelten waren eine verminderte Fähigkeit zur Migration. Diese Migrationshemmung der HP-Substanzen erreichte ein Maximum von 38% nach 24 Stunden (Abbildung 3-14).

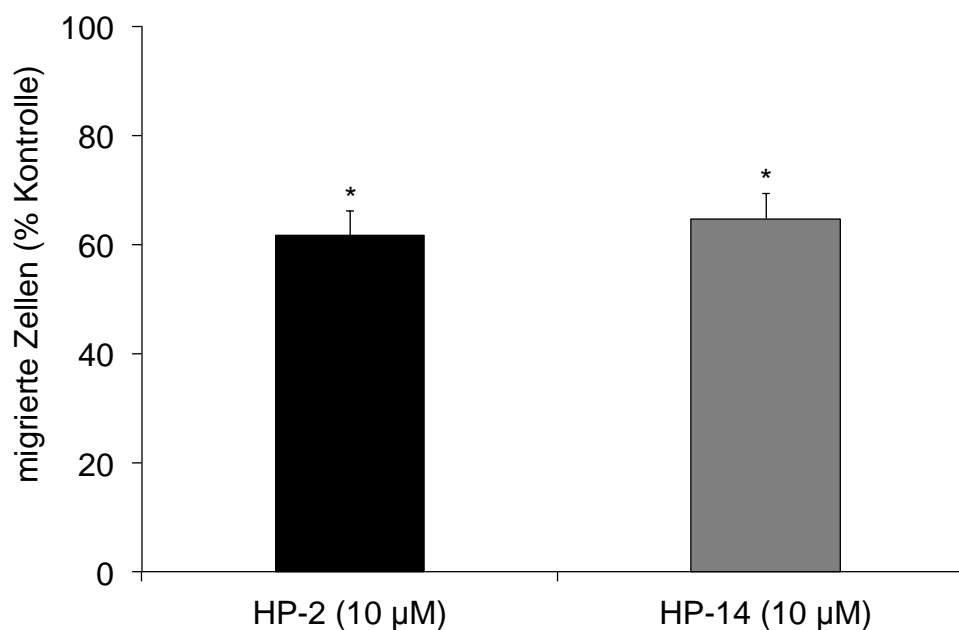


Abbildung 3-14: Migrationshemmende Effekte von HP-2 und HP-14 nach 24 Std. Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle nahm die Fähigkeit zur Migration unter dem Einfluss der HP-Substanzen um bis zu 38% ab. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler aus $n = 3$ Versuchen. (* $p < 0,05$)

Ergänzend zur antiangiogenen Wirkweise von HP-14 sind in der Tabelle 10-1 im Anhang Angiogenese-assoziierte Gene zusammengefasst, die bei den Mikroarray-Untersuchungen von HP-14 bei den Endothelzellen verändert reguliert wurden. Insgesamt waren 34 Gene, die eine Rolle bei der Angiogenese spielen, in den HUVEC Zellen verändert reguliert. Unter anderem zeigten die angiogenesefördernden Gene *IL1B* und *IL8* eine besonders stark verminderte Expression, während die Expression des Angiogeneseinhibitors Endostatin (*COL18A1*) stark hochreguliert wurde.

3.2.3. IN VIVO-EVALUIERUNG AM CHORIOALLANTOISMEMBRANMODELL (CAM)

Antiangiogene Effekte von HP-2 und HP-14 auf die Mikrogefäßbildung wurden *in vivo* im Chorioallantoismembranmodell ermittelt. Zu Beginn der Experimente, am Tag 11 der Embryonalentwicklung des Hühnchens, bestand die Chorioallantoismembran aus einem Netzwerk von großen und kleinen, teilweise noch nicht fertig ausgereiften Blutgefäßen (Arteriolen und Venolen). Zwei Tage später, am 13. Bebrütungstag, waren in den Kontroll-CAMs ausgereifte Gefäße sowie ein ausgeprägtes Gefäßnetzwerk vorhanden.

Die topische Applikation von HP-2 und HP-14 führte zu einer Veränderung in der Entwicklung des Mikrogefäßnetzwerkes. Mit 10 μ M HP-2 kam es zu einer Erhöhung des Anteils nicht perfundierter Bereiche, wobei hier besonders die kleineren Gefäße beeinflusst wurden. HP-14 hatte den stärksten Effekt auf die Entwicklung der CAM, hier führte die Behandlung mit 10 μ M HP-14 für 48 Std. zu einer deutlichen Erhöhung nicht perfundierter Bereiche und zu einer sichtbaren Degeneration der Gefäße und des Kapillarbettes (Abbildung 3-15).

Darüber hinaus ergab die Quantifizierung der Gefäße eine deutliche Reduktion der Anzahl an Blutgefäßen durch HP-2 und HP-14 (Abbildung 3-16). Während in den Kontroll-CAMs im Durchschnitt $17 \pm 0,6$ Gefäße gezählt wurden, waren es bei den mit HP-2 behandelten CAMs noch $13 \pm 0,3$ Gefäße und bei HP-14 nur noch $7 \pm 1,9$ Gefäße. Damit führte HP-14, mit einem Rückgang der Gefäßbildung um 51%, zur stärksten Reduktion der Angiogenese im Chorioallantoismembranmodell.

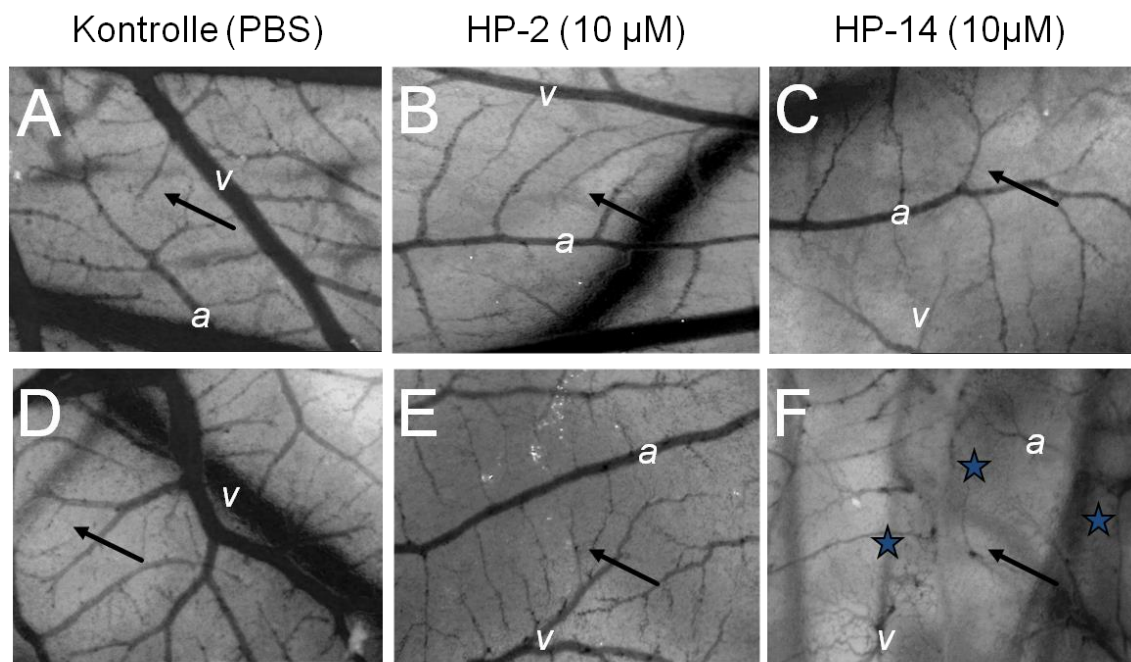


Abbildung 3-15: Antiangiogene Aktivität von HP-2 und HP-14. Der obere Teil der Grafik (A-C) zeigt mikroskopische Bilder der CAMs vor der Behandlung mit den HP-Substanzen. Im unteren Teil sind die Effekte auf den CAMs nach topischer Applikation mit PBS (Kontrolle) (D) HP-2 (10 µM) (E) oder HP-14 (10 µM) (F) dargestellt (a = Arterie, v = Vene). In den unbehandelten Membranen ist ein symmetrisch aufgebautes Mikrogefäßnetzwerk aus größeren und kleineren Gefäßen (Pfeil) zu erkennen. HP-2 führt zu einem Stillstand der Perfusion und zu einer schwachen Veränderung der Gefäßmorphologie. Die Applikation von HP-14 führt zu den stärksten Effekten auf der CAM. Es kommt zu einer Degeneration des Gefäßnetzwerkes (Stern) und zu einem Verlust der Gefäßsymmetrie. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus n = 3 CAMs.

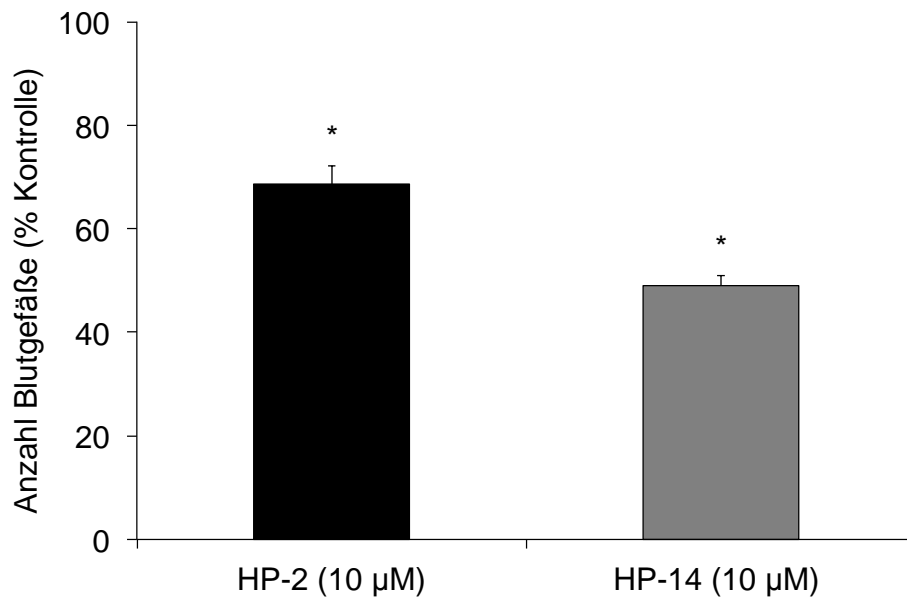


Abbildung 3-16: Quantifizierung der Blutgefäße. Die Anzahl aller Blutgefäße wurde in vier Feldern (2,24 cm²) eines CAM Bildes gezählt. Die Änderungen sind im Verhältnis zur Kontrolle abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler aus n = 3 CAMs. *p<0,05

3.3. UNTERDRÜCKUNG DES TUMORWACHSTUMS UND DER ANGIOGENESE *IN VIVO*

Im Gegensatz zu den bisher *in vitro* erhobenen Daten wurden im Folgenden die Effekte von HP-2 und HP-14 auf das Tumorstadium und die Tumorstadium an inokulierten Tumoren auf der CAM *in vivo* untersucht.

3.3.1. UNTERSUCHUNGEN ZUM TUMORWACHSTUM IM CHORIOALLANTOIS- MEMBRANMODELL

Die testikulären Keimzelltumorzelllinien 2102EP und 2102EP-R wurden auf die CAM acht Tage alter befruchteter Hühnereier aufgebracht. Nach 24 Stunden wurden HP-2 (20 µM), HP-14 (10 µM) oder Cisplatin (1 µM) topisch appliziert. Als Kontrolle diente PBS.

Abbildung 3-17 zeigt die gebildeten Mikrotumore auf der CAM nach 72 Stunden. Die Behandlung mit HP-14 (10 µM) führte bereits zu einer sichtbaren Abnahme der Tumorstadium auf der CAM. Im Gegensatz dazu konnte bei HP-2 keine nennenswerte Größenabnahme registriert werden.

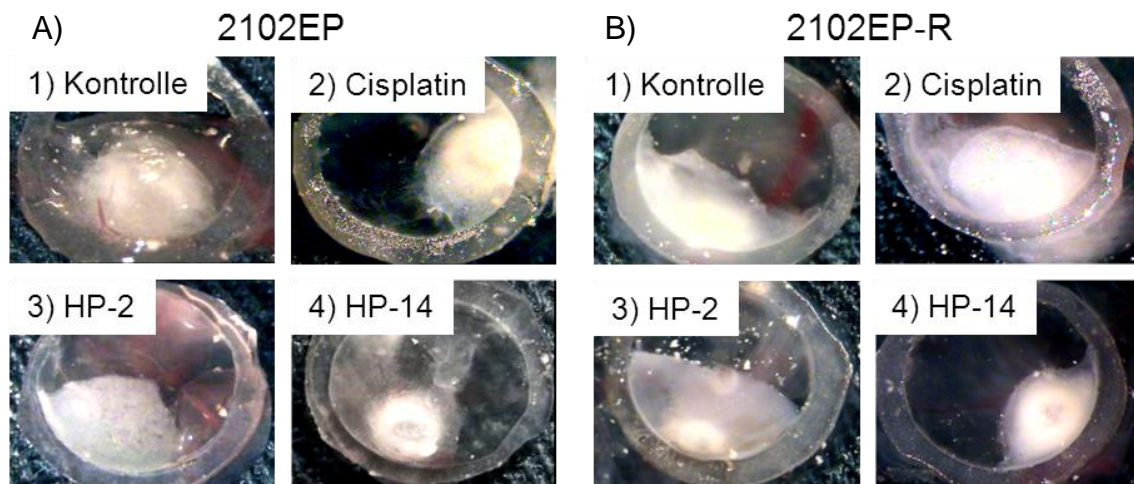


Abbildung 3-17: Unterdrückung des Tumorwachstums im CAM Assay. 2102EP (A) und 2102EP-R (B) Matrigelplugs wurden in einen Silikonring auf die CAM aufgebracht. Nach 24 Stunden entwickelten sich solide Tumoren, die mit HP-2 (A Bild 3, B Bild 3), HP-14 (A Bild 4, B Bild 4) oder Cisplatin (A Bild 2, B Bild 2) für 72 Stunden behandelt wurden. Als Kontrollsubstanz diente PBS (A Bild 1, B Bild 1). Anschließend wurde die Tumorfläche (mm²) bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Bilder der Tumoren aus jeweils n = 6 Tumoren.

Die Quantifizierung des Tumorwachstums im CAM-Modell zeigte, dass beide Zelllinien nach drei Tagen ausgeprägte Mikrotumoren mit einer Durchschnittsfläche von 7,66 mm² (2102EP) und 8,01 mm² (2102EP-R) bildeten. Die Behandlung mit HP-2 (20 µM) führte lediglich zu einer 7%igen Tumorreduktion, der cisplatinempfindlichen Tumoren. Bei den cisplatinresistenten Tumoren wurde eine Wachstumshemmung um bis zu 16% detektiert (Abbildung 3-18).

Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit HP-14 (10 µM) zu einer Reduktion der Tumorgröße um 57% bei den cisplatinempfindlichen und um 64% bei den cisplatinresistenten Tumoren. Cisplatin wurde eingesetzt, um die Cisplatinempfindlichkeit der inokulierten Tumorplugs aus resistenten und nicht resistenten TKZT auch *in vivo* darzustellen und führte zu einer Wachstumsreduktion um 47% (2102EP) bzw. 8% (2102EP-R).

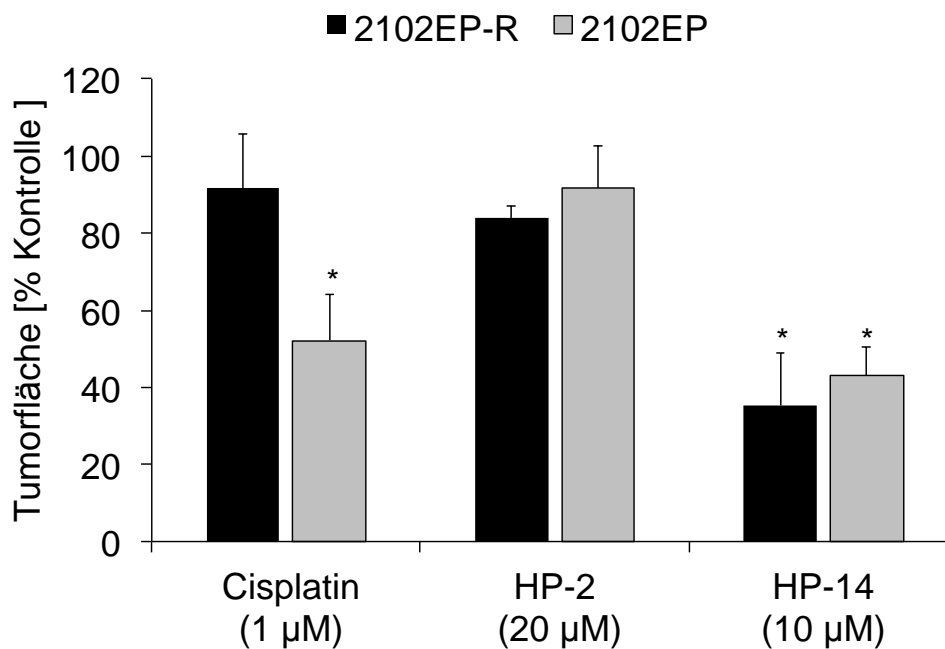


Abbildung 3-18: Quantifizierung des Tumorwachstums im CAM Assay. Dargestellt ist die Ausdehnung der Tumorfläche der 2102EP und der 2102EP-R Tumoren innerhalb des Silikonrings nach 72 Stunden Behandlung mit Cisplatin (1 µM), HP-2 (20 µM) und HP-14 (10 µM). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler aus n = 6 Tumoren (*p<0,05).

3.3.2. UNTERDRÜCKUNG DER TUMORVERSORGENDEN GEFÄßNEUBILDUNG (TUMORANGIOGENESE)

Im Folgenden wurde der Proliferationsindex der behandelten Tumoren mit Ki-67 überprüft (Abbildung 3-19). Es zeigte sich, dass HP-2 die Anzahl proliferierender Tumorzellen nur um 20% (2102EP) bzw. 30% (2102EP-R) reduzieren konnte. Im Gegensatz dazu reduzierte HP-14 die Zahl proliferierender Tumorzellen um 80% bei den cisplatinsensitiven bzw. 56% bei den cisplatinresistenten Tumoren (Abbildung 3-19).

Zur Darstellung neugebildeter Blutgefäße, die den Tumor durchziehend und versorgend, wurden Desminfärbungen durchgeführt. Hierbei wurde eine 30%ige (2102EP) bzw. 10%ige (2102EP-R) für HP-2 und eine 77%ige (2102EP) bzw. 86%ige (2102EP-R) Abnahme der versorgenden Gefäße im Tumor für HP-14 festgestellt (Abbildung 3-20). Bei beiden Tumormodellen, cisplatinsensitiv und cisplatinresistent war die Wirkung von HP-14 am stärksten ausgeprägt.

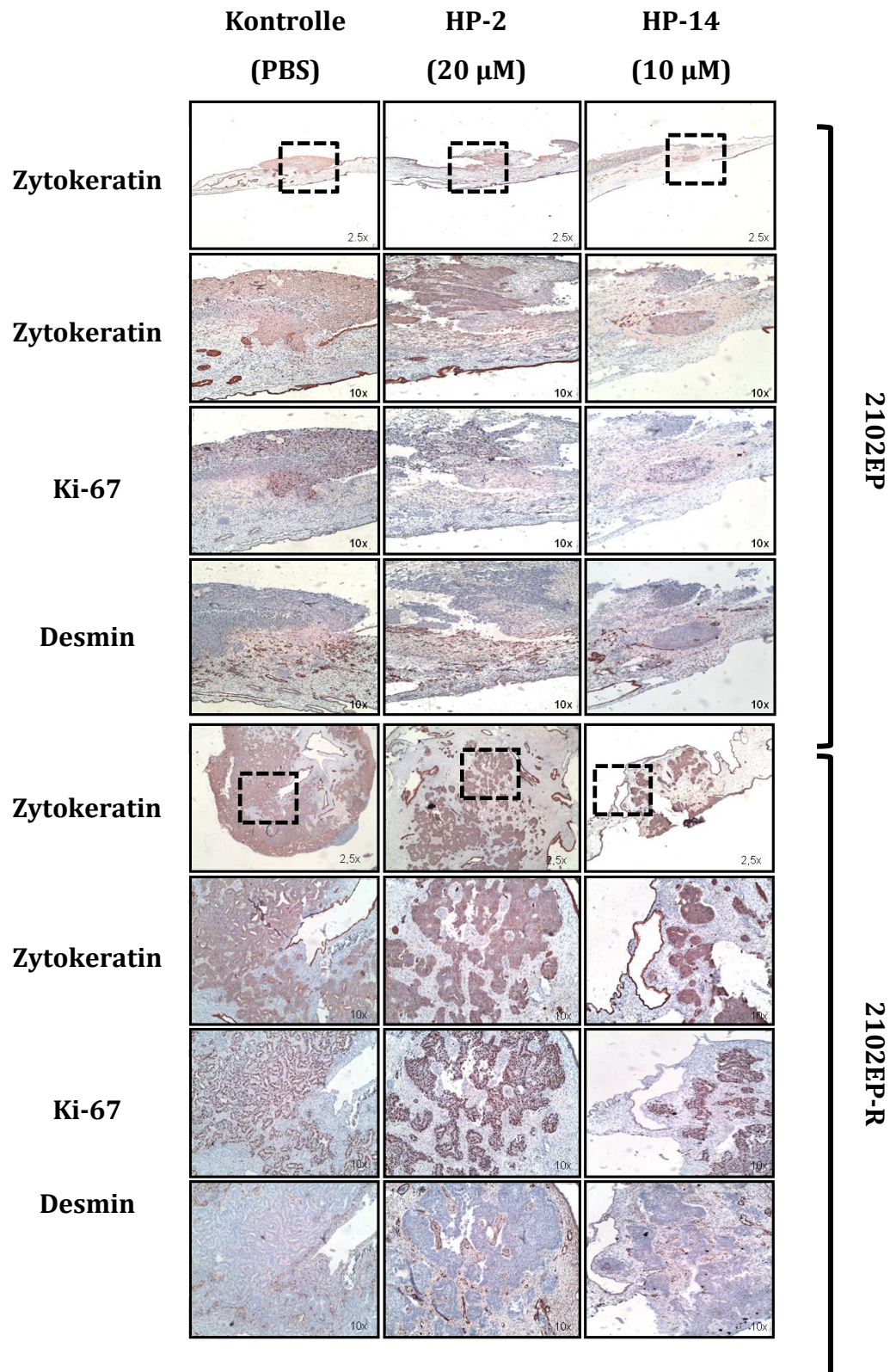


Abbildung 3-19: Desmin und Ki-67 Expression in TKZT im CAM-Modell. Paraffinschnitte von TKZT Tumoren (2102EP, 2102EP-R), behandelt für 72 Std. mit HP-2 (20 μ M) und HP-14 (10 μ M) wurden immunhistochemisch für Zytokeratin, Desmin und Ki-67 angefärbt (rotbraune Färbung). Dargestellt ist jeweils ein für die Gruppe repräsentatives Bild aus n = 3 Tumorpräparaten.

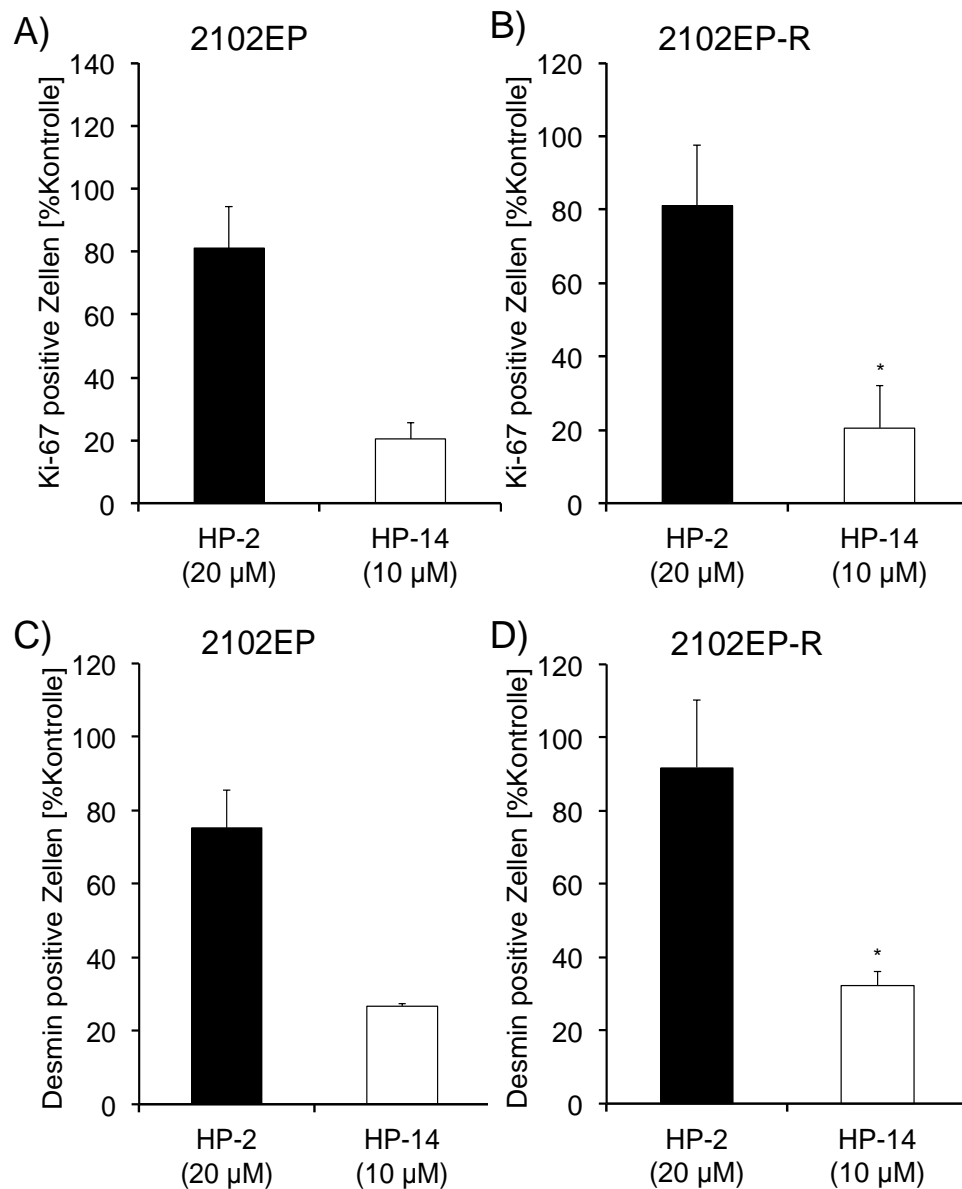


Abbildung 3-20: Quantifizierung der Proliferation von TKZT sowie der Tumorangiogenese im CAM-Modell. Mit der Ki-67-Färbung wurde die Proliferation der mit HP-2 (20 µM) und HP-14 (10 µM) behandelten 2102EP (A) und 2102EP-R (B) Tumoren bestimmt. Zur Darstellung der Tumorangiogenese wurden Desminfärbungen an den mit HP-Substanzen behandelten 2102EP (C) und 2102EP-R (D) Tumoren durchgeführt. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung gegenüber der Kontrolle (Mittelwerte ± SEM aus 3 Tumoren pro Behandlung). *p<0,05

4. DISKUSSION

Keimzelltumoren sind seit der Einführung der cisplatinbasierten Chemotherapie zu einer nahezu heilbaren Erkrankung geworden. Trotz dieses Erfolges ist der Hodentumor bedeutsam, weil er vor allem junge Männer zwischen 25 und 45 Jahren betrifft und in dieser Patientengruppe die Spättoxizitäten der chemotherapeutischen Behandlung eine große Belastung darstellen können. Außerdem sind gerade bei therapieresistenten Verlaufsformen die medikamentösen Therapieoptionen nach wie vor unzureichend und neuartige Ansätze zur Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten dringend notwendig. Vor diesem Hintergrund und mit Blick auf die Tatsache, dass eine Unterdrückung der Tumorangio-genese durch Blockade von Rezeptor-Tyrosinkinase bestimmter Wachstumsfaktoren bei einigen Tumorentitäten zur Wachstumshemmung führt, wurden in der vorliegenden Arbeit die zwei neuartigen antiangiogenetischen Substanzen HP-2 und HP-14 auf ihre antineoplastische Potenz bei Hodentumoren überprüft.

4.1. ZIELGERICHTETE THERAPIE DES TESTIKULÄREN KEIMZELLTUMORS

Ungeachtet der allgemein erfolgreichen platinbasierten Therapiemöglichkeiten für Patienten mit metastatischen testikulären Keimzelltumoren gibt es in 20% der Fälle Verlaufsformen, die aufgrund von Therapieresistenzen mit einer schlechten Prognose einhergehen. Zum Beispiel ist der Einsatz einer Hochdosistherapie bei Patienten mit einer reduzierten Kreatinin-Clearance problematisch bzw. wegen des steigenden Risikos des Nierenfunktionsverlustes sogar unmöglich. Ein weiteres Problem ist das verringerte Ansprechen von Rezidiven auf die Zweitlinientherapie sowie Dosisbegrenzungen, welche zu einem Abbruch der Rezidivtherapie mit Hochdosis-Polychemotherapie führen. So sind alternative Behandlungsmöglichkeiten dringend notwendig, gerade z.B. bei Patienten mit primärer Platinresistenz und/oder einem Tumorrezidiv sowie bei Patienten, die nicht einer systemischen cisplatinbasierten Chemotherapie unterzogen werden können (Lorch et al. 2007, Schrader et al. 2009). Auf der Suche nach neuen nicht platinbasierten medikamentösen Behandlungsansätzen wurde in der vorliegenden Arbeit die antiangiogene und antiproliferative Wirksamkeit von zwei neuen

niedermolekularen Inhibitoren, HP-2 und HP-14, analysiert und charakterisiert. Diese Substanzen wurden in einem *in silico* Screening, ausgehend von dem klinisch relevanten VEGFR Tyrosinkinaseinhibitor Vatalanib als Leitstruktur, abgeleitet. Der Grund für die Wahl eines VEGFR Tyrosinkinaseinhibitors als Leitstruktur ergab sich aus den Beobachtungen, dass proangiogene Faktoren, wie z.B. VEGF in Patienten mit TKZT erhöht sind und mit einem Anstieg des metastatischen Potenzials von TKZT einhergehen (Fukuda et al. 1999, Bentas et al. 2003, Aigner et al. 2003). Darüber hinaus steht die Expression des VEGFR-2, dem wichtigsten angiogenen Wachstumsfaktorrezeptor, in Verbindung mit der Pathogenese des TKZT (Jones et al. 2000, Devouassoux-Shisheboran et al. 2003).

In den letzten Jahren hat die zielgerichtete Therapie bei der Behandlung von urologischen Tumoren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Seit der Einführung des monoklonalen Antikörpers Bevacizumab zur Behandlung des fortgeschrittenen metastasierten Nierenzellkarzinoms, wurden zahlreiche neue Medikamente entwickelt und für die Behandlung urologischer Tumoren zugelassen (Escudier et al. 2007). Doch die Entwicklung und Austestung neuer Behandlungsmethoden für die oben genannten Risikopatienten testikulärer Keimzelltumoren des Hodens war bislang nicht erfolgreich (Voigt et al. 2006, Fenner et al. 2008, Castillo-Ávila et al. 2009).

Eine Phase II Studie mit dem Multikinaseinhibitor Sunitinib, der neben dem VEGFR-2 auch weitere Tyrosinkinasen wie z.B. PDGFR, c-KIT und RET blockiert, zeigte eine gute Verträglichkeit bei Patienten mit rezidivierendem oder refraktären Keimzelltumor des Hodens (Feldman et al. 2010). Jedoch war der klinische Behandlungserfolg eher gering. Dennoch lässt der beobachtete Rückgang angiogener Tumormarker während der Behandlung mit Sunitinib vermuten, dass Signalwege, wie z.B. der VEGF Signalweg, eine große Rolle bei der Keimzelltumorbiologie spielen. Doch weil diese angiogenen Signalwege wahrscheinlich nicht ausreichend durch Sunitinib blockiert wurden, zumindest in den Dosen, die in der Studie verwendet wurden, sollten möglichst wirksamere Inhibitoren identifiziert werden, die stärkere antiangiogene Effekte als die Leitstruktur hervorrufen.

4.1.1. WACHSTUMSSTUDIEN

HP-2 und HP-14 unterdrückten das Wachstum von Endothelzellen mit hoher Wirksamkeit, und bei geringeren IC_{50} Werten als jener der Leitstruktur Vatalanib. Die VEGFR Spezifität der Substanzen wurde durch den Einsatz VEGFR negativer Zellen (A498, Caki-1) überprüft. Diese Zellen sprachen auf eine Behandlung mit Vatalanib bzw. den HP-Substanzen nicht an (vgl. Kapitel 3.1, Abbildung 3-3).

Die inhibitorische Wirkung der Substanzen auf Endothelzellebene spielt bei der Entwicklung neuer antiangiogenetisch wirksamer Medikamente eine große Rolle. Zum einen wird der VEGFR-2 vornehmlich von Endothelzellen exprimiert und bei der Angiogenese aktiviert (Plate et al. 1994) und zum anderen sind Endothelzellen die gefäßbildenden Zellen bei der Tumorangio-genese und bieten daher als Angriffsziel einige Vorteile gegenüber den Tumorzellen (Li et al. 2002, Kerbel & Folkman 2002).

- Endothelzellen kleiden das Blutgefäßsystem aus und sind daher für antiangiogenetische Substanzen leichter zu erreichen
- Resistenzen gegenüber Zytostatika können durch das Angreifen auf Endothelzellen umgangen werden
- Endothelzellen sind genetisch stabil, so dass ein Auftreten von Mutationen, die zu einer Resistenz führen unwahrscheinlich ist
- durch den Angriff von vaskulären Endothelzellen entsteht ein Multiplikationseffekt, da ein Gefäß sehr viele Tumorzellen versorgt
- im Erwachsenenalter ist die Anzahl an aktivierten proliferierenden Endothelzellen eher gering, da Angiogenese nennenswert nur im weiblichen Reproduktionszyklus und bei der Wundheilung stattfindet.

Die Angiogeneseinhibitoren wirken aber nicht nur auf der Ebene der Endothelzellen. Einige Tumorentitäten, darunter auch der testikuläre Keimzelltumor, exprimieren ebenfalls Wachstumsfaktorrezeptoren wie z.B. VEGFR-2 und machen sich dann im Zuge der Karzinogenese von diesem

Wachstumsfaktorrezeptorsystem abhängig (Spannuth et al. 2009, Castillo-Ávila et al. 2009, Silva et al. 2011). Diese Tumoren werden dann zusätzlich direkt durch die antiangiogenetisch wirksamen Substanzen in ihrem Wachstum gehemmt. Deshalb wurde die Wirkung von HP-2 und HP-14 auch auf Tumorzellebene untersucht. Dabei zeigte sich, dass die beiden neuen Substanzen, HP-2 und HP-14 die Proliferation VEGFR-2 positiver testikulärer Keimzelltumorzellen dosisabhängig inhibierten, wobei die Wirkung von HP-14 auf die eingesetzten TKZT Zellen mit einem mittleren IC₅₀ Wert von 4,67 µM die stärkste Substanz war (siehe Kapitel 3.1.2).

Die Wirkung der HP-Substanzen auf die cisplatinresistenten Hodentumoren ist von besonderem Interesse. Bis heute wurde eine Vielzahl an Chemotherapeutika evaluiert, um den cisplatinresistenten Phänotyp von Keimzelltumoren zu behandeln. Aber nur eine partielle oder transiente klinische Aktivität konnte für die meisten Agenzien nachgewiesen werden. Kombinationsansätze mit Gemcitabin-Oxaliplatin oder Paclitaxel-Gemcitabin, aber auch dreifach Kombinationen aus Gemcitabin-Oxaliplatin-Paclitaxel sind die am häufigsten eingesetzten Chemotherapieregime für cisplatinrefraktäre TKZT-Patienten. Diese Ansätze haben aber nur eine geringe bis moderate Ansprechrate von 25% - 40%. Verbesserungen im Langzeitüberleben (> 2 Jahre) ergeben sich nur bei 10%-15% der Patienten (Oechsle et al. 2011b, Bokemeyer et al. 2008, Kollmannsberger et al. 2006). Deshalb wurde in dieser Arbeit ein TKZT Zellmodell ausgewählt, dass für vergleichende Untersuchung durch Langzeitkultivierung mit Cisplatin in eine cisplatin-sensitive und cisplatinresistente Fraktion separiert werden konnte (Port et al. 2011). Mit diesem Ansatz sollte die inhibitorische Potenz der neuen Substanzen auch bei cisplatinresistenten TKZT Zellen untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass zumindest eine der beiden Substanzen, HP-14 in der Lage ist, das Zellwachstum cisplatinresistenter TKZT Zellen um bis zu 95% zu inhibieren. Die hohe antiproliferative Wirksamkeit von HP-14 macht diese Substanz zu einem interessanten Kandidaten für dringend benötigte Ansätze außerhalb der cisplatinbasierten Chemotherapie von TKZT. Aus den vielversprechenden Ergebnissen zur Wirksamkeit von HP-14 als Monosubstanz bei cisplatinresistenten TKZT leitete sich die Idee ab zudem zu überprüfen, ob die Kombination mit Cisplatin zu einer Steigerung der antineoplastischen Wirkung von HP-14 führt.

4.1.2. KOMBINATION VON HP-2 UND HP-14 MIT CISPLATIN

Die Kombination der HP-Substanzen mit Cisplatin führte bei den cisplatin sensitiven und den cisplatin resistenten Zellen zu einer additiven antineoplastischen Wirkungssteigerung (siehe Kap. 3.1.6). Diese gesteigerte antineoplastische Effektivität könnte durch die unterschiedliche Wirkweise der eingesetzten Substanzen hervorgerufen werden. Während Cisplatin durch das Auslösen von DNA Strangbrüchen eine zytotoxische Wirkung ausübt, beeinflussen die HP-Substanzen das Wachstum u.a. durch die Inhibition des VEGF-Signalwegs, wodurch es möglicherweise zu einer Arretierung der Zellen im Zellzyklus kommt.

Die antiangiogenetische Therapie wird in zunehmendem Maße in Kombination mit der Standardchemotherapie eingesetzt und in einer Vielzahl von klinischen Studien untersucht (Teng et al. 2010). So führt z.B. der monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom zu einer signifikanten Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und ist deshalb seit Dezember 2011 als Primärtherapie zugelassen (Burger et al. 2011). Ebenso konnte in einer Phase III Studie gezeigt werden, dass die Kombination von Bevacizumab mit Irinotecan, Fluoruracil und Leukovorin signifikant das Überleben von Patienten mit metastasierten Kolorektalkarzinom verlängerte (Hurwitz et al. 2004).

Die Vorteile des Kombinationsansatzes liegen in der Wirkweise der eingesetzten Kombinationspartner, welche den Tumor auf unterschiedlichen Ebenen angreifen und dadurch additive antineoplastische Effekte hervorrufen können. Zusätzlich können durch die Kombinationsbehandlungen die Wirkstoffkonzentrationen der zytotoxischen Chemotherapeutika reduziert werden, was zum einen die Entstehung von Resistenzen vermindert und zum anderen das Nebenwirkungspotenzial der Behandlung herabsetzt und damit zu einer besseren Patientenverträglichkeit beiträgt. Es wird vermutet, dass durch antiangiogenetische Therapieansätze die chaotische Struktur von Tumorgefäßnetzwerken und die Durchlässigkeit bereits ausgebildeter Blutgefäße normalisiert werden kann, wodurch die in Kombination eingesetzten Chemotherapeutika besser den Tumor erreichen und somit gezielter wirken (Secomb et al. 2012).

Vielversprechende Aussichten zeigten sich auch bei Studien an testikulären Keimzelltumoren. Studien von Ramasubbaiah et al. und Suddek belegen, dass die Kombination von antiangiogenen Substanzen, wie z.B. Sunitinib oder Bevacizumab zusammen mit der Standardchemotherapie (Cisplatin, Oxaliplatin) zu einer additiven oder sogar synergistischen antineoplastischen Wirkungssteigerung bei therapierefraktären TKZT führt (Ramasubbaiah et al. 2010, Suddek 2011). Ähnliche Beobachtungen machten auch Castillo-Ávila et al. in ihren Untersuchungen mit Sunitinib und Cisplatin an einem cisplatinrefraktären TKZT Tumor Mausmodell. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination beider Substanzen zu einer höheren Steigerung der Wachstumsinhibition führte, als die Addition der Einzeleffekte jeder Substanz hätte vermuten lassen (Castillo-Ávila et al. 2009). Suddek berichtet ebenfalls von einer verbesserten Ansprechrate durch die Kombination von Sunitinib mit Cisplatin bei der Behandlung nicht urologischer refraktärer solider Tumoren (Suddek 2011).

Die besondere Bedeutung des VEGFR-Signalweges bei der HP-vermittelten antiproliferativen Wirkung bei cisplatinresistenten TKZT wird dadurch belegt, dass bei den in dieser Arbeit zusätzlich durchgeführten Kombinationsuntersuchungen aus HP-Substanzen und Cisplatin keinerlei Wachstumsreduktion bzw. additive oder synergistische Effekte festgestellt werden konnten (vgl. Abbildung 3-11 Kapitel 3.1.6). Die zugrunde liegenden molekularen Grundlagen dieser Wirkungsverstärkung gegenüber den Monosubstanzen müssen zukünftig untersucht werden. Die Genexpressionsanalyse mittels cDNA Array (vgl. Kapitel 3.1.7) lässt einen dualen Effekt von HP-14 vermuten, bei dem der Verlust von apoptotischen Signalwegen kompensiert und die Folgen durch hoch regulierte protektive Faktoren in den cisplatinresistenten TKZT Zellen aufgehoben werden.

4.1.3. VERÄNDERUNG DER GENEXPRESSION NACH KOMBINATIONSBEHANDLUNG

In dieser Arbeit wurden eine Reihe von unterschiedlich exprimierten Genen nach der Behandlung mit HP-14 und Cisplatin identifiziert, die eine wichtige Rolle im Zellwachstum und bei zellulären Stressantworten spielen (siehe Kap. 3.1.7). So wurden in den cisplatin sensitiven Zellen z.B. die stressinduzierten Gene *BRCA1*, *ERCC3* oder *DNAJB11* nach der Kombinationsbehandlung von HP-14 und Cisplatin verändert exprimiert. Diese Gene sind in die Regulation der DNA Reparatur und der Stressantwort eingebunden. Dies könnte bedeuten, dass HP-14 und Cisplatin in

den sensitiven Zellen zu einer synergistischen DNA Schädigung und damit verbunden zu einer erhöhten Proliferationshemmung führen.

Interessanterweise wurden gegenteilige Effekte in der Kombination aus HP-14 und Cisplatin bei den cisplatinresistenten Zellen 2102EP-R beobachtet. Hier wurde die Expression der an der DNA Reparatur beteiligten Gene *TOP1*, *GADD45b* und *DNAJB11* herunter reguliert (Belova et al. 2001, Cretu et al. 2009). Grundsätzlich wurden in den 2102EP-R Zellen aber eher Gene reguliert, die eine Rolle bei der Regulation des Zellwachstums und der Proliferation spielen sowie Transkriptionsfaktoren. Zum Beispiel war die Expression von *AKT-1* (Proteinkinase B) herunter reguliert, ein Signaltransduktionsmolekül, welches im VEGFR-2 nachgeschalteten Signalweg eine Rolle spielt. Des Weiteren war die Expression des Zellwachstumsregulators Dihydrofolatreduktase deutlich stärker bei den 2102EP-R Zellen exprimiert als bei den 2102EP Zellen. Die Dihydrofolatreduktase katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat, welches bei der Purin- und Pyrimidinsynthese gebraucht wird und beim Zellzyklus eine wichtige Rolle spielt (Chen et al. 1984, Jensen et al. 1997).

Zusätzlich war bei den cisplatinresistenten Zellen eine Reduktion des Tumorsuppressorgens p53, nach der Behandlung mit HP-14 und Cisplatin sowie der Kombination aus beiden, zu beobachten. Dies legt folgenden Schluss nahe: Die fehlende Hochregulation von p53, welche normalerweise die Zellzyklus Kontrollpunkte aktiviert und einen Zellzyklusarrest bei DNA Schäden induziert, könnte ein Grund dafür sein, dass die Zellzyklusarretierung bei den cisplatinresistenten Zellen nicht stattfindet (Fan et al. 1995, di Pietro et al. 2012).

Nach der Cisplatinbehandlung wurden z.B. die stressinduzierten Gene *GADD45a* (Growth Arrest and DNA Damage) und *GADD45b* bei den cisplatin sensitiven Zellen hochreguliert. Diese Proteine sind an der Stressantwort gegen DNA schädigende Substanzen beteiligt und führen entweder zum Zellzyklusarrest, zur DNA Reparatur oder zur Apoptose (Wang et al. 1999, Zhan 2005).

4.1.4. MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER WACHSTUMSINHIBITORISCHEN EFFEKTE

Um die molekularen Grundlagen der neuen Substanzen genauer zu untersuchen, wurden cDNA Mikroarrays mit den Endothel- und TKZT-Zellen durchgeführt.

Dabei wurde gezeigt, dass HP-14 eine Reihe von Genen reguliert, die eine Rolle bei zellulären Prozessen wie z.B. Wachstum, Signaltransduktion, und Zellzyklusregulation spielen (siehe Kap. 3.1.4.2.). Durch HP-14 konnte eine signifikant verminderte Expression des *VEGFR-2* sowohl in den endothelialen HUVEC-Zellen als auch im TKZT-Modell (Tera-1) beobachtet werden. Zudem wurde in beiden Zellmodellen nach der Behandlung mit HP-14 eine verminderte Expression von *AKT-1* (Proteinkinase B), einer dem VEGFR-2-Signalweg nachgeschalteten Proteinkinase, detektiert (Takano et al. 2008). Anderson *et al.* konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass AKT-1 zellproliferative Effekte durch den VEGFR-2 über Proteinkinase C abhängige Signalwege ausübt (Anderson et al. 2008).

Darüber hinaus inhibierte HP-14 die Expression weiterer angiogener Wachstumsfaktoren wie z.B. *PDGFA*, *PDGFB* oder *FGF-2* (siehe Tabelle 10-1). All diese Faktoren sind auch an der Promotion des Wachstums von TKZT beteiligt (Peltomäki et al. 1991, Bentas et al. 2003). Ein weiterer supprimierter angiogener Faktor war das HIV-1 Tat interaktive Protein (HTATIP2). Dieser proangiogene Faktor besitzt eine ähnliche Aminosäuresequenz wie der Wachstumsfaktor VEGF-A. Er bindet und aktiviert den VEGFR-2 und vermittelt somit die endotheliale Zellproliferation, Zellmigration und das Zellüberleben (Albini et al. 1996).

Die Behandlung mit HP-14 führte nicht nur zu einer Unterdrückung der Genexpression, sondern auch zu einer Erhöhung der Expression einzelner antiangiogener Faktoren wie z.B. den Angiogeneseinhibitor Endostatin (*COL18A1*). Endostatin ist ein Protein, welches die VEGF-A vermittelten Effekte wie z.B. endotheliale Zellmigration, Gefäßneubildung und auch Gefäßpermeabilität unterdrückt (Yamaguchi et al. 1999, Takahashi et al. 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Endostatin das Tumorwachstum durch eine Verringerung der Blutgefäßbildung reduzieren kann (Folkman 2002). Es ist vorstellbar, dass diese Hochregulation für die antiangiogene Aktivität von HP-14 verantwortlich ist.

4.1.5. EINFLUSS AUF DIE REGULATION DES ZELLZYKLUS UND PROLIFERATIVER SIGNALWEGE

HP-14 reguliert auch VEGFR-2 unabhängige Signalwege, die für die Regulation zellulärer Funktionen wie z.B. Wachstum, Signalweiterleitung und Regulation des

Zellzyklus zuständig sind. Dabei sind die Effekte auf die Genregulation von Proteinen des Zellzyklus von besonderer Bedeutung. Die Regulation des Zellzyklus beruht auf einer Balance zwischen Zellzykluspromotoren und Zellzyklusinhibitoren (Baeriswyl & Christofori 2009). Eine fehlerhafte Regulation und eine Verschiebung des Gleichgewichts von Zellzyklusregulatoren ist eine der Hauptursachen für Tumorentstehung und Tumorentwicklung. Ein Beispiel für den TKZT ist die Überexpression des Zellzykluspromoters Cyclin D2 und die Suppression des cyclinabhängigen Kinaseinhibitors p21 (Chaganti & Houldsworth 2000). Dieses Ungleichgewicht führt zu einer vermehrten Zellteilung und zu einem unkontrollierten Tumorwachstum. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HP-14 bei testikulären Keimzelltumorzellen zu einer Erhöhung der Expression des Zellzyklusinhibitors *p21* führt und daraus ein Arrest der Tumorzellen in der S-Phase des Zellzyklus resultiert (Kap. 3.1.4). Diese Beobachtung steht im Einklang mit einigen Studien, die zeigen konnten, dass die *p21* Hochregulation in nicht urologischen Zellen mit einem S-Phasen Zellzyklusarrest verbunden ist (Ogryzko et al. 1997, Zhu et al. 2004, Radhakrishnan et al. 2004)

Die *p21* Expression korreliert auch mit einer Reduktion des Zellzyklusregulators *CDC25A* (cell division cycle 25 homolog A), ein Protein; welches ebenfalls durch HP-14 in den TKZT Zellen herunterreguliert wurde (de Oliveira et al. 2009). Gleichzeitig ist die Suppression von *CDC25A* auch an der Inhibition der Tumorpromotion fördernden MAP-Kinase Aktivität beteiligt (Wang et al. 2008). Das MAP-Kinase Protein ERK1/2 ist ein wichtiger Mitspieler des Ras/Raf/Erk1/2-MAP-Kinase Signalwegs, welcher direkt durch die Aktivierung des VEGFR-2 angeschaltet wird (Rubinfeld & Seger 2005, Narasimhan et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Abnahme der ERK1/2 Aktivität nach Behandlung mit HP-14 beobachtet, welche im Einklang mit der postulierten VEGFR-2 Spezifität steht (Kap. 3.1.4).

Überraschenderweise wurde unter Behandlung mit HP-14 auch ein Anstieg der *p27* Expression beobachtet. Im Allgemeinen ist *p27* mit einem Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus verbunden. Es gibt aber auch Studien, die zeigen, dass *p27* einen S-Phasen Arrest in hepatozellulären Tumorzellen induziert (Fuke et al. 2007). Der exakte Mechanismus der dem zu Grunde liegt, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Es gibt Studien von Sa und Stacey, die zeigen, dass

Wachstumssignalwege, wie z.B. der AKT-Weg; die Expression von p27 in einer vom Zellzyklus unabhängigen Art und Weise regulieren können. Dabei führt die Inhibition von AKT zu einem Anstieg der p27 Expression in den Zellen, die in der S-Phase des Zellzyklus arretiert sind (Sa & Stacey 2004). In den Mikroarray Experimenten konnte nach Behandlung mit HP-14 ebenfalls eine AKT Inhibition beobachtet werden. Daher ist es möglich, dass der S-Phasen Arrest, der mit HP-14 behandelten TKZT Zellen; hauptsächlich durch einen Anstieg der p21 Expression ausgelöst wird, wohingegen die gleichzeitig auftretende AKT Inhibition zu einem Anstieg der p27 Expression in der S-Phase arretierten Zellen führte. Allerdings sind weitere Untersuchungen nötig, um die exakte Rolle von p27 während des durch HP-14 induzierten Zellzyklusarrests der TKZT Zellen zu klären.

Die Migration der Endothelzellen ist ein weiterer Schlüsselfaktor in der VEGFR-2 vermittelten Angiogenese (Shibuya 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HP-2 und HP-14 die endotheliale Migration, aber auch die Neubildung von Gefäßen im Chorioallantoismembranmodell, unterdrücken. Aus den vielversprechenden Ergebnissen zur Wirksamkeit der HP-Substanzen *in vitro* leitete sich die Idee ab: zudem zu überprüfen, ob die Wirksamkeit von HP-2 und HP-14 mit *in vivo* Versuchen bestätigt werden kann.

4.1.6. *IN VIVO* UNTERSUCHUNGEN DER ANTIANGIOGENEN EIGENSCHAFTEN

Für die *in vivo* Untersuchungen wurde das Chorioallantoismembranmodell (CAM) ausgewählt und etabliert. Dieses Modell wird seit langem für Überprüfungen zum Tumorwachstum und der Tumorangiogenese eingesetzt (Ribatti et al. 1997, Ausprunk et al. 1975, Kunzi-Rapp et al. 2001). Während des Versuchs ist das Immunsystem des Hühnerembryos noch nicht voll entwickelt, Abstoßungsreaktionen, die bei anderen *in vivo* Systemen Probleme bereiten, treten daher nicht auf (Jeurissen et al. 1992). Schwierigkeiten, die bei der Auftragung von Tumorzellen gelöst im Kulturmedium auftraten, konnten durch die Etablierung eines CAM-Matrigel-Assays umgangen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellmodelle, die cisplatinempfindlichen und die cisplatinresistenten Zellen, waren tumorigen. Die Tumorplaques wuchsen schnell und bildeten, unabhängig vom

Resistenzphänotyp auf der Chorioallantoismembran solide vaskularisierte Tumoren (siehe Kapitel 3.3.1).

Die Behandlung der Tumoren erfolgte durch topische Applikation mit HP-2 und HP-14. Die gezielte Platzierung der Substanzen am Wirkort konnte so gesichert werden. In den *in vitro* Versuchen inhibierten HP-2 und HP-14 das Wachstum testikulärer Keimzelltumorzellen unterschiedlich stark, während HP-2 einen mittleren IC₅₀ Wert von 9,2 µM hatte, war der von HP-14 mit 4,6 µM deutlich niedriger (siehe Kapitel 3.1.2). Die *in vivo* Untersuchungen zeigten, dass zumindest eine der beiden Substanzen (10 µM HP-14) zu einer deutlich ausgeprägten Reduktion des Tumorwachstums auf der CAM führte. Dabei waren die Konzentrationen sogar vergleichbar mit denen der Zellkultur. Diese unterschiedliche Aktivität könnte an der Fähigkeit der HP-Substanzen zur Unterdrückung angiogeneserelevanter Prozesse liegen. *In vitro* konnte nur HP-14 angiogeneserelevante Prozesse wie z.B. die Tube Formation unterbinden (siehe Kapitel 3.2.1). Ebenso konnte die Gefäßbildung auf der Chorioallantoismembran durch HP-14 am stärksten unterdrückt werden (siehe Kapitel 3.3.1.). Auch die Untersuchungen zur Vaskularisierung innerhalb der behandelten Tumoren zeigten, dass in den mit HP-2 behandelten Tumoren nur ein sehr leichter Rückgang der Vaskularisierung zu erzielen war, während HP-14 zu einer starken Reduktion der Gefäße führte (siehe Kapitel 3.3.2). Der Gefäßrückgang innerhalb der Tumoren könnte zu einer schlechteren Versorgung des Tumors und damit zu einem geringeren Tumorwachstum führen. Die immunhistologischen Aufnahmen zeigten auch, dass HP-14 eine stärkere Reduktion proliferierender Tumorzellen (Ki-67) bewirkt als HP-2. Dieser antiproliferative Effekt könnte zum einen durch die verminderte Vaskularisierung und zum anderen durch die direkte wachstumsinhibitorische Wirkung von HP-14 hervorgerufen werden.

In den Untersuchungen zum Tumorwachstum zeigte sich auch, dass HP-14 nicht nur das Wachstum der cisplatinsensitiven Tumoren verringern, sondern auch das Wachstum cisplatinresistenter Tumoren unterdrücken konnte. Angesichts dieser vielversprechenden *in vitro* und *in vivo* Daten erscheint zumindest HP-14 als äußerst interessanter Kandidat für die Behandlung von testikulären Keimzelltumoren, dessen Effektivität und Sicherheit in klinischen Studien überprüft werden sollte.

4.2. ABSCHLIEßENDE BETRACHTUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass neuartige, potenziell antiangiogenetische Substanzen, die mittels des sog. *in silico* Screening Verfahrens gewonnen wurden, die Proliferation und Tumorangiogenese bei testikulären Keimzelltumorzellen hochwirksam inhibieren können. Dabei waren die wachstumsinhibitorischen Effekte deutlich ausgeprägter, als die des klinisch relevanten VEGFR Tyrosinkinaseinhibitors Vatalanib, welcher als Leitstruktur zur Identifikation der neuen Substanzen eingesetzt wurde. Die zugrunde liegenden Signalwege und Wirkmechanismen der vorgestellten HP-Substanzen sind sehr komplex und beinhalten zellzyklusarretierende Effekte sowie Verschiebungen des Expressionsverhältnisses von proangiogenen und antiangiogenen Genen.

Zusätzlich konnte herausgearbeitet werden, dass die HP-Substanzen auch eine ausgeprägte wachstumsinhibitorische Aktivität gegenüber cisplatinresistenten TKZT Zellen *in vitro* und *in vivo* besitzen, und dass die Kombination mit Cisplatin die antineoplastische Aktivität im Vergleich zur Wirkung der Einzelsubstanzen steigern konnte. Dies von besonderer Bedeutung, weil gerade für die cisplatinresistenten Keimzelltumoren bis heute keine adäquate Standardtherapie zur Verfügung steht und die Entwicklung neuer Behandlungsansätze für diese Patientengruppe dringend notwendig ist.

Damit stellen die neuartigen HP-Substanzen und vor allem die Variante HP-14 eine interessante Möglichkeit für innovative pharmakologische Therapieansätze bei testikulären Keimzelltumoren dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden eine viel versprechende Basis für weitere *in vivo* Überprüfungen einer therapeutischen Eignung von HP-14 bei Hodenkrebs.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der testikuläre Keimzelltumor ist die häufigste maligne Tumorerkrankung junger Männer im Alter zwischen 25 und 45 Jahren. Durch die stete Verbesserung der chemotherapeutischen Behandlungsmöglichkeiten gilt der testikuläre Keimzelltumor heute als Paradebeispiel einer heilbaren Tumorerkrankung. In etwa 20% der Fälle kommt es jedoch zu einer Entwicklung einer Cisplatinresistenz, welche mit einer schlechten Prognose einhergeht und den Einsatz höher dosierter Chemotherapien erfordert. Gerade für diese, meistens sehr junge Patientengruppe, ist die Entwicklung neuartiger Therapieansätze daher von großer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels einer computerbasierten Methode völlig neue und bislang unbekannte Substanzen (HP-2, HP-14) identifiziert und deren Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass HP-2 und HP-14 nicht nur die Proliferation von Endothelzellen, sondern auch von VEGFR-2 exprimierenden testikulären Keimzelltumorzellen dosisabhängig um bis zu 90% inhibieren, während sie das Wachstum von VEGFR-2-negativen Zelllinien nicht beeinflussen. Anhand verschiedener Angiogenesemodelle ließ sich zeigen, dass HP-2 und HP-14 in der Lage sind, angiogeneserelevante Endothelzellfunktionen zu inhibieren. So wurden sowohl die VEGF-vermittelte Zellmigration als auch die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen von Endothelzellen durch die Substanzen deutlich reduziert. Zusätzliche *in vivo* Überprüfungen im Chorioallantoismembranmodell bestätigten das antiangiogenetische Potential und die gute Verträglichkeit der neuen Substanzen.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass HP-2 und HP-14 auch direkt eine wachstumsinhibitorische Wirkung auf Tumorzellen ausüben. Der Einfluss von HP-2 und HP-14 auf zellbiologisch wichtige Prozesse, wie z.B. den Zellzyklus, bei Tumorzellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass HP-2 und HP-14 zu einem S-Phasen Arrest der TKZT Zellen führen. Im Western Blot bestätigte sich, dass Proteine, die beim Zellzyklus eine wichtige Rolle spielen, wie z.B. p21 und p27 verändert reguliert waren und zu einem S-Phasen Arrest der testikulären Keimzelltumorzellen führten.

Die Resistenz gegenüber cisplatinbasierter Chemotherapie geht mit einer schlechten Prognose in testikulären Keimzelltumoren einher. Daher wurde großer Wert darauf gelegt, die Effektivität der beiden neuen HP-Substanzen auch bei cisplatinresistenten testikulären Keimzelltumoren zu evaluieren. Beide Substanzen inhibierten auch hier dosisabhängig das Wachstum cisplatinresistenter TKZT Zellen. In Kombinationsexperimenten mit Cisplatin erzielten HP-2 und HP-14 additive wachstumsinhibitorische Effekte in testikulären Keimtumorzellen unabhängig von der Cisplatinresistenz. Unter Verwendung von testikulären Keimzelltumorzellen, die auf die Chorioallantoismembran befruchteter Hühnereier appliziert wurden, konnte das antineoplastische Potenzial zumindest von HP-14 auch *in vivo* aufgezeigt werden. Genexpressionsanalysen ergaben, dass die Behandlung von HP-14 und Cisplatin, allein oder in Kombination, zu einer Änderung des Genexpressionsmusters von Genen führt, die den zellulären Funktionen der Erkennung und Reparatur von DNA Schäden, aber auch des Wachstums, zugeordnet werden.

Insgesamt kann daher festgehalten werden, dass mit der Identifikation der HP-Substanzen interessante Kandidaten für die zielgerichtete Therapie von Hodenkrebs, besonders für jene, die resistent gegenüber der konventionellen cisplatinbasierten Chemotherapie sind, gefunden wurden. Die Antitumoraktivität von HP-14 konnte bereits durch *in vivo* Überprüfungen bestätigt werden. Weitere Untersuchungen sind nötig, um eine abschließende Bewertung der hier vorgestellten Möglichkeit zur Behandlung von Hodenkrebs vorzunehmen. Die erhobenen Daten bilden dafür eine entsprechende Basis.

6. SUMMARY

Testicular cancer is one of the most common malignancies in young men between the ages of 25 and 45. Due to the improvement of chemotherapeutic treatment options, today the testicular germ cell cancer (TGCT) represents a curable disease. However, 20% of the patients with cisplatin-resistant or -refractory disease have an unfavorable prognosis which requires the use of a high dose chemotherapy. Therefore, it is very important to identify new treatment options in order to develop therapies with minimal side effects to improve the quality of life of these mostly young patients.

In the present study, previously unknown compounds with putative antiangiogenic and antiproliferative properties (HP-2 and HP-14) were identified by an *in silico* screening approach and their efficiency was verified *in vitro* and *in vivo*. It has been shown that HP-2 and HP-14 reduced the growth of endothelial cells and VEGFR-2 expressing testicular germ cell tumor cells by up to 90%, while they failed to suppress the growth of VEGFR-2 lacking tumor cells. It was demonstrated that HP-2 and HP-14 reduced endothelial cell functions relevant to angiogenesis, as they inhibited the VEGF induced endothelial cell migration. Additional *in vivo* evaluations by using the chick chorioallantoic membrane model confirmed the antiangiogenic potency and good tolerability of the novel substances.

HP-2 and HP-14 also have direct inhibitory effects on growth of testicular germ cell tumor cells. The antiproliferative mode of action of the novel compounds was analyzed using flow cytometry and western blot analyzes. Treatment of TGCT cells with HP-compounds raised the expression of the cell cycle-inhibiting molecule p21, which resulted in an S-phase arrest of the cell cycle.

Resistance to cisplatin-based chemotherapy is associated with poor prognosis in testicular cancer. In this respect, the efficiency of the HP-2 and HP-14 in platinum resistant TGCT tumors was also evaluated. Both compounds inhibited the growth of cisplatin-resistant TGCT cells in a dose-dependent manner. In combination experiments with cisplatin, HP-14 revealed additive growth inhibitory effects in TGCT cells irrespective of the level of cisplatin resistance. Using TGCT cells inoculated on the chorioallantoic membrane of fertilized chicken eggs, the

antineoplastic potency of HP-14 was also demonstrated *in vivo*. Gene expression profiling revealed changes in the expression pattern of genes related to cellular functions such as DNA damage detection and repair, as well as in cellular growth after treatment with both cisplatin and HP-14, alone or in combination.

In summary, this study shows that the identified novel compound HP-14 effectively inhibits the growth of cisplatin-resistant TGCT cells and suppresses tumor growth and tumor angiogenesis. Thus, HP-14 may be qualified as a new candidate for targeted treatment of testicular cancer, particularly those showing resistance to the conventionally applied platinum-based chemotherapies.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Aigner, A., P. Brachmann, J. Beyer, R. Jager, D. Raulais, M. Vigny, A. Neubauer, A. Heidenreich, S. Weinknecht, F. Czubayko & G. Zugmaier, 2003. Marked increase of the growth factors pleiotrophin and fibroblast growth factor-2 in serum of testicular cancer patients. *Ann Oncol*, 14: 1525–1529.

Albers, P., W. Albrecht, F. Algaba, C. Bokemeyer, G. Cohn-Cedermark, K. Fizazi, A. Horwich & M. P. Laguna, 2011. EAU Guidelines on Testicular Cancer: 2011 Update. *European Urology*, 60: 304–319.

Albini, A., R. Soldi, D. Giunciucchio, E. Girauo, R. Benelli, L. Primo, D. Noonan, M. Salio, G. Camussi, W. Rock & F. Bussolino, 1996. The angiogenesis induced by HIV-1 Tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med*, 2: 1371–1375.

Almstrup, K., C. E. Hoei-Hansen, U. Wirkner, J. Blake, C. Schwager, W. Ansorge, J. E. Nielsen, N. E. Skakkebaek, E. Rajpert-De Meyts & H. Leffers, 2004. Embryonic stem cell-like features of testicular carcinoma in situ revealed by genome-wide gene expression profiling. *Cancer Research*, 64: 4736–4743.

Anderson, J. C., B. C. McFarland & C. L. Gladson, 2008. New Molecular Targets in the Angiogenic Vessels of Glioblastoma Tumors. *Expert reviews in molecular medicine*, 10: e23.

Arnautova, I., J. George, H. K. Kleinman & G. Benton, 2009. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis*, 12: 267–274.

Ausprunk, D. H., D. R. Knighton & J. Folkman, 1975. Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels. *The American Journal of Pathology*, 79: 597–618.

Azoitei, N., A. Kleger, N. Schoo, D. R. Thal, C. Brunner, G. V. Pusapati, A. Filatova, F. Genze, P. Möller, T. Acker, R. Kuefer, J. Van Lint, H. Baust, G. Adler & T. Seufferlein, 2011. Protein kinase D2 is a novel regulator of glioblastoma growth and tumor formation. *Neuro-Oncology*, 13: 710–724.

Azoitei, N., G. V. Pusapati, A. Kleger, P. Möller, R. Küfer, F. Genze, M. Wagner, J. van Lint, P. Carmeliet, G. Adler & T. Seufferlein, 2010. Protein kinase D2 is a crucial regulator of tumour cell-endothelial cell communication in gastrointestinal tumours. *Gut*, 59: 1316–1330.

Baeriswyl, V. & G. Christofori, 2009. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19: 329–337.

Bartkova, J., E. Rajpert-De Meyts, N. E. Skakkebaek, J. Lukas & J. Bartek, 2003. Deregulation of the G1/S-phase control in human testicular germ cell tumours. *APMIS*, 111: 252–266.

Beilke, S., F. Oswald, F. Genze, T. Wirth, G. Adler & M. Wagner, 2010. The zinc-finger protein KCMF1 is overexpressed during pancreatic cancer development and downregulation of KCMF1 inhibits pancreatic cancer development in mice. *Oncogene*, 29: 4058–4067.

Belova, G. I., R. Prasad, S. A. Kozyavkin, J. A. Lake, S. H. Wilson & A. I. Slesarev, 2001. A type IB topoisomerase with DNA repair activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 6015–6020.

Bentas, W., W.-D. Beecken, W. Glienke, J. Binder & H. Schuldes, 2003. Serum levels of basic fibroblast growth factor reflect disseminated disease in patients with testicular germ cell tumors. *Urological Research*, 30: 390–393.

Bergers, G. & L. E. Benjamin, 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews. Cancer*, 3: 401–410.

Biermann, K., L. C. Heukamp, D. Nettersheim, K. Steger, H. Zhou, F. E. Franke, I. Guetgemann, V. Sonnack, R. Brehm, J. Berg, P. J. Bastian, S. C. Müller, L. Wang-Eckert, H. Schorle & R. Büttner, 2007. [Embryonal germ cells and germ cell tumors]. *Verhandlungen Der Deutschen Gesellschaft Für Pathologie*, 91: 39–48.

Bokemeyer, C., K. Oechsle, F. Honecker, F. Mayer, J. T. Hartmann, C. F. Waller, I. Böhlke & C. Kollmannsberger, 2008. Combination chemotherapy with gemcitabine, oxaliplatin, and paclitaxel in patients with cisplatin-refractory or multiply relapsed germ-cell tumors: a study of the German Testicular Cancer Study Group. *Annals of Oncology*, 19: 448–453.

- Burger, R. A., M. F. Brady, M. A. Bookman, G. F. Fleming, B. J. Monk, H. Huang, R. S. Mannel, H. D. Homesley, J. Fowler, B. E. Greer, M. Boente, M. J. Birrer & S. X. Liang, 2011. Incorporation of Bevacizumab in the Primary Treatment of Ovarian Cancer. *New England Journal of Medicine*, 365: 2473–2483.
- Butina, D., M. D. Segall & K. Frankcombe, 2002. Predicting ADME properties in silico: methods and models. *Drug Discovery Today*, 7: S83–88.
- Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9: 653–660.
- Carmeliet, P., 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438: 932–936.
- Carmeliet, P., Y. S. Ng, D. Nuyens, G. Theilmeier, K. Brusselmans, I. Cornelissen, E. Ehler, V. V. Kakkar, I. Stalmans, V. Mattot, J. C. Perriard, M. Dewerchin, W. Flameng, A. Nagy, F. Lupu, L. Moons, D. Collen, P. A. D'Amore & D. T. Shima, 1999. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nature Medicine*, 5: 495–502.
- Castillo-Ávila, W., J. M. Piulats, X. Garcia del Muro, A. Vidal, E. Condom, O. Casanovas, J. Mora, J. R. Germà, G. Capellà, A. Villanueva & F. Viñals, 2009. Sunitinib Inhibits Tumor Growth and Synergizes with Cisplatin in Orthotopic Models of Cisplatin-Sensitive and Cisplatin-Resistant Human Testicular Germ Cell Tumors. *Clinical Cancer Research*, 15: 3384–3395.
- Cavallaro, U. & G. Christofori, 2000. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression. *Journal of Neuro-Oncology*, 50: 63–70.
- Chaganti, R. S. K. & J. Houldsworth, 2000. Genetics and Biology of Adult Human Male Germ Cell Tumors. *Cancer Res*, 60: 1475–1482.
- Chen, M. J., T. Shimada, A. D. Moulton, A. Cline, R. K. Humphries, J. Maizel & A. W. Nienhuis, 1984. The functional human dihydrofolate reductase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 259: 3933–3943.

Chlench, S., N. Mecha Disassa, M. Hohberg, C. Hoffmann, T. Pohlkamp, G. Beyer, M. Bongrazio, L. Da Silva-Azevedo, O. Baum, A. R. Pries & A. Zakrzewicz, 2007. Regulation of Foxo-1 and the angiopoietin-2/Tie2 system by shear stress. *FEBS Letters*, 581: 673–680.

Chow, L. Q. M. & S. G. Eckhardt, 2007. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25: 884–896.

Cretu, A., X. Sha, J. Tront, B. Hoffman & D. A. Liebermann, 2009. Stress sensor Gadd45 genes as therapeutic targets in cancer. *Cancer therapy*, 7: 268–276.

Darzynkiewicz, Z., 1994. Simultaneous analysis of cellular RNA and DNA content. *Methods in cell biology*, 41: 401–420.

De Oliveira, P. E. Q., L. Zhang, Z. Wang & J. S. Lazo, 2009. Hypoxia-mediated regulation of Cdc25A phosphatase by p21 and miR-21. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8: 3157–3164.

Deryugina, E. I. & J. P. Quigley, 2008. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochemistry and Cell Biology*, 130: 1119–1130.

Devouassoux-Shisheboran, M., C. Mauduit, E. Tabone, J. P. Droz & M. Benahmed, 2003. Growth regulatory factors and signalling proteins in testicular germ cell tumours. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, 111: 212–224; discussion 224.

Di Pietro, A., R. Koster, W. Boersma-van Eck, W. A. Dam, N. H. Mulder, J. A. Gietema, E. G. E. de Vries & S. de Jong, 2012. Pro- and anti-apoptotic effects of p53 in cisplatin-treated human testicular cancer are cell context-dependent. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11: 4552–4562.

Dieckmann, K. P. & N. E. Skakkebaek, 1999. Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features. *International Journal of Cancer*, 83: 815–822.

DiPietro, L. A., D. R. Nebgen & P. J. Polverini, 1994. Downregulation of endothelial cell thrombospondin 1 enhances in vitro angiogenesis. *Journal of Vascular Research*, 31: 178–185.

Djonov, V., O. Baum & P. H. Burri, 2003. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell and Tissue Research*, 314: 107–117.

Dvorak, H. F., 2003. Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. *The American Journal of Pathology*, 162: 1747–1757.

Edgell, C. J., C. C. McDonald & J. B. Graham, 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 3734–3737.

Eisen, T., S. Oudard, C. Szczylik, G. Gravis, H. Heinzer, R. Middleton, F. Cihon, S. Anderson, S. Shah, R. Bukowski & B. Escudier, 2008. Sorafenib for older patients with renal cell carcinoma: subset analysis from a randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 100: 1454–1463.

Escudier, B., A. Pluzanska, P. Koralewski, A. Ravaud, S. Bracarda, C. Szczylik, C. Chevreau, M. Filippek, B. Melichar, E. Bajetta, V. Gorbunova, J.-O. Bay, I. Bodrogi, A. Jagiello-Gruszfeld & N. Moore, 2007. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*, 370: 2103–2111.

Fan, S., M. L. Smith, D. J. Rivet 2nd, D. Duba, Q. Zhan, K. W. Kohn, A. J. Fornace Jr & P. M. O'Connor, 1995. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer research*, 55: 1649–1654.

Feldman, D., S. Turkula, M. Ginsberg, N. Ishill, S. Patil, M. Carouso, G. Bosl & R. Motzer, 2010. Phase II trial of sunitinib in patients with relapsed or refractory germ cell tumors. *Investigational New Drugs*, 28: 523–528.

Feng, D., J. A. Nagy, A. M. Dvorak & H. F. Dvorak, 2000. Different Pathways of Macromolecule Extravasation from Hyperpermeable Tumor Vessels. *Microvascular Research*, 59: 24–37.

Fenner, M. H., G. Beutel & V. Grünwald, 2008. Targeted therapies for patients with germ cell tumors. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17: 511–522.

Ferrara, N., 2005. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3: 11–16.

Folberg, R. & A. J. Maniotis, 2004. Vasculogenic mimicry. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, 112: 508–525.

Folkman, J., 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*, 285: 1182–1186.

Folkman, J., 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, 1: 27–31.

Folkman, J., 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology*, 29: 15–18.

Folkman, J., D. M. Long & F. F. Becker, 1963. Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer*, 16: 453–467.

Frank, S., G. Hübner, G. Breier, M. T. Longaker, D. G. Greenhalgh & S. Werner, 1995. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 12607–12613.

Fried, J., A. Perez & B. Clarkson, 1976. Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data. *J. Cell Biol.*, 71: 172–181.

Fujio, Y. & K. Walsh, 1999. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 16349–16354.

Fuke, H., K. Shiraki, K. Sugimoto, J. Tanaka, T. Beppu, K. Yoneda, N. Yamamoto, K. Ito, M. Masuya & Y. Takei, 2007. Jak inhibitor induces S phase cell-cycle arrest and augments TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363: 738–744.

Fukuda, S., Tsutomu Shirahama, Yoshiharu Imazono, Tomoyasu Tsushima, Hiroyuki Ohmori, Tsuneyoshi Kayajima, Saburou Take, Kenryu Nishiyama, Suguru Yonezawa, Suminori Akiba, Shin-ichi Akiyama & Yoshitada Ohi, 1999. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with testicular germ cell tumors as an indicator of metastatic disease. *Cancer*, 85: 1323–1330.

Gebäck, T., M. M. P. Schulz, P. Koumoutsakos & M. Detmar, 2009. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *BioTechniques*, 46: 265–274.

Gillies, R. J., N. Didier & M. Denton, 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry*, 159: 109–113.

Glösenkamp, C., B. Nitzsche, A. R. Lim, E. Normant, E. Vosburgh, M. Schrader, M. Ocker, H. Scherübl & M. Höpfner, 2012a. Heat shock protein 90 is a promising target for effective growth inhibition of gastrointestinal neuroendocrine tumors. *International journal of oncology*, 40: 1659–1667.

Glösenkamp, C. R., B. Nitzsche, M. Ocker, P. Di Fazio, K. Quint, B. Hoffmann, H. Scherübl & M. Höpfner, 2012b. AKT inhibition by triciribine alone or as combination therapy for growth control of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *International journal of oncology*, 40: 876–888.

Grant, D. S., H. K. Kleinman & G. R. Martin, 1990. The role of basement membranes in vascular development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 588: 61–72.

Grünewald, F. S., A. E. Prota, A. Giese & K. Ballmer-Hofer, 2010. Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochimica et biophysica acta*, 1804: 567–580.

Gunsilius, E., H.-C. Duba, A. L. Petzer, C. M. Kahler & G. A. Gastl, 2001. Contribution of Endothelial Cells of Hematopoietic Origin to Blood Vessel Formation. *Circ Res*, 88: e1.

Hanahan, D. & R. A. Weinberg, 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57–70.

Heidenreich, A., M. Kuczyk & P. Albers, 1998. Molecular pathogenesis and molecular prognosis factors of the testicular tumor. *Der Urologe A*, 37: 593–608.

Hoei-Hansen, C. E., K. Almstrup, J. E. Nielsen, S. Brask Sonne, N. Graem, N. E. Skakkebaek, H. Leffers & E. Rajpert-De Meyts, 2005. Stem cell pluripotency factor NANOG is expressed in human fetal gonocytes, testicular carcinoma in situ and germ cell tumours. *Histopathology*, 47: 48–56.

Hohberg, M., J. Knöchel, C. J. Hoffmann, S. Chlench, W. Wunderlich, A. Alter, J. Maroski, B. J. Vorderwülbecke, L. Da Silva-Azevedo, R. Knudsen, R. Lehmann, K. Fiedorowicz, M. Bongrazio, B. Nitsche, M. Hoepfner, B. Styp-Rekowska, A. R. Pries & A. Zakrzewicz, 2011. Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries. *Journal of Cellular Physiology*, 226: 350–361.

Honecker, F., J. W. Oosterhuis, F. Mayer, J. T. Hartmann, C. Bokemeyer & L. H. J. Looijenga, 2004. New insights into the pathology and molecular biology of human germ cell tumors. *World journal of urology*, 22: 15–24.

Höpfner, M., V. Baradari, A. Huether, C. Schöfl & H. Scherübl, 2006a. The insulin-like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in neuroendocrine gastrointestinal tumours. *Endocrine-Related Cancer*, 13: 135–149.

Höpfner, M., A. Huether, A. P. Sutter, V. Baradari, D. Schuppan & H. Scherübl, 2006b. Blockade of IGF-1 receptor tyrosine kinase has antineoplastic effects in hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 71: 1435–1448.

Höpfner, M., D. Schuppan & H. Scherübl, 2008. Treatment of gastrointestinal neuroendocrine tumors with inhibitors of growth factor receptors and their signaling pathways: Recent advances and future perspectives, 14: 2461–2473.

Houldsworth, J., V. Reuter, G. J. Bosl & R. S. Chaganti, 1997. Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 8: 293–299.

Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross & F. Kabbinavar, 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 350: 2335–2342.

Husmann, G. & <Berlin> Robert-Koch-Institut, 2010. Krebs in Deutschland: 2005/2006 ; Häufigkeiten und Trends ; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.7. Ausg. Robert Koch-Inst, Berlin.

Huyghe, E., T. Matsuda & P. Thonneau, 2003. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *The Journal of Urology*, 170: 5–11.

Ingber, D. E. & J. Folkman, 1989. How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell*, 58: 803–805.

International Germ Cell Cancer Collaborative Group, 1997. International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 15: 594–603.

Italiano, J. E., J. L. Richardson, S. Patel-Hett, E. Battinelli, A. Zaslavsky, S. Short, S. Ryeom, J. Folkman & G. L. Klement, 2008. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*, 111: 1227–1233.

Jain, R. K., 1988. Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Research*, 48: 2641–2658.

Jensen, D. E., A. R. Black, A. G. Swick & J. C. Azizkhan, 1997. Distinct roles for Sp1 and E2F sites in the growth/cell cycle regulation of the DHFR promoter. *Journal of Cellular Biochemistry*, 67: 24–31.

Jeurissen, S. H., E. Claassen & E. M. Janse, 1992. Histological and functional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen. *Immunology*, 77: 75–80.

Jones, A., C. Fujiyama, K. Turner, S. Fuggle, D. Cranston, H. Turley, R. Valtola, R. Bicknell & A. L. Harris, 2000. Angiogenesis and lymphangiogenesis in stage 1 germ cell tumours of the testis. *BJU International*, 86: 80–86.

Kerbel, R. & J. Folkman, 2002. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature Reviews. Cancer*, 2: 727–739.

Kim, K. J., B. Li, J. Winer, M. Armanini, N. Gillett, H. S. Phillips & N. Ferrara, 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 362: 841–844.

Koch, S. & L. Claesson-Welsh, 2012. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2: a006502.

Kollmannsberger, C., C. Nichols & C. Bokemeyer, 2006. Recent advances in management of patients with platinum-refractory testicular germ cell tumors. *Cancer*, 106: 1217–1226.

Krege, S., J. Beyer, R. Souchon, P. Albers, W. Albrecht, et al., 2008. European consensus conference on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the second meeting of the European Germ Cell Cancer Consensus group (EGCCCG): part I. *European Urology*, 53: 478–496.

Kubota, Y., H. K. Kleinman, G. R. Martin & T. J. Lawley, 1988. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *The Journal of Cell Biology*, 107: 1589 –1598.

Kunzi-Rapp, K., F. Genze, R. Küfer, E. Reich, R. E. Hautmann & J. E. Gschwend, 2001. Chorioallantoic membrane assay: vascularized 3-dimensional cell culture system for human prostate cancer cells as an animal substitute model. *The Journal of Urology*, 166: 1502–1507.

Kurz, H., J. Fehr, R. Nitschke & H. Burkhardt, 2008. Pericytes in the mature chorioallantoic membrane capillary plexus contain desmin and alpha-smooth muscle actin: relevance for non-sprouting angiogenesis. *Histochemistry and Cell Biology*, 130: 1027–1040.

Leung, D. W., G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel & N. Ferrara, 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science (New York, N.Y.)*, 246: 1306–1309.

Li, Y., M.-N. Wang, H. Li, K. D. King, R. Bassi, H. Sun, A. Santiago, A. T. Hooper, P. Bohlen & D. J. Hicklin, 2002. Active Immunization Against the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor flk1 Inhibits Tumor Angiogenesis and Metastasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 195: 1575 –1584.

Lipinski, C. A., F. Lombardo, B. W. Dominy & P. J. Feeney, 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46: 3–26.

- Lorch, A., C. Kollmannsberger, J. T. Hartmann, B. Metzner, I. G. H. Schmidt-Wolf, W. E. Berdel, F. Weissinger, J. Schleicher, G. Egerer, A. Haas, R. Schirren, J. Beyer, C. Bokemeyer & O. Rick, 2007. Single versus sequential high-dose chemotherapy in patients with relapsed or refractory germ cell tumors: a prospective randomized multicenter trial of the German Testicular Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25: 2778–2784.
- Makanya, A. N., R. Hlushchuk & V. G. Djonov, 2009. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis*, 12: 113–123.
- Masters, J. R. W. & B. Köberle, 2003. Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer*, 3: 517–525.
- McDonald, D. M., L. Munn & R. K. Jain, 2000. Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? *The American Journal of Pathology*, 156: 383–388.
- McGlynn, K. A. & M. B. Cook, 2009. Etiologic factors in testicular germ cell tumors. *Future oncology (London, England)*, 5: 1389–1402.
- Moserle, L., A. Amadori & S. Indraccolo, 2009. The angiogenic switch: implications in the regulation of tumor dormancy. *Current Molecular Medicine*, 9: 935–941.
- Motzer, R. J., T. E. Hutson, P. Tomczak, M. D. Michaelson, R. M. Bukowski, O. Rixe, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, S. T. Kim, I. Chen, P. W. Bycott, C. M. Baum & R. A. Figlin, 2007. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 356: 115–124.
- Mross, K., H. Augustin & S. H. Bartling, 2007. Angiogeneseinhibition in der Onkologie. Uni-Med, Bremen.
- Müller-Tidow, C., U. Krug, U. Brunnberg, W. E. Berdel & H. Serve, 2007. Tyrosinkinase als Ziele neuer onkologischer Therapien. *Dtsch Arztebl*, 19: 1312–9.
- Narasimhan, P., J. Liu, Y. S. Song, J. L. Massengale & P. H. Chan, 2009. VEGF Stimulates the ERK 1/2 Signaling Pathway and Apoptosis in Cerebral Endothelial Cells After Ischemic Conditions. *Stroke*, 40: 1467–1473.

Nitzsche, B., C. Glösenkamp, M. Schrader, B. Hoffmann, F. Zengerling, S. Balabanov, F. Honecker & M. Höpfner, 2012. Anti-tumour activity of two novel compounds in cisplatin-resistant testicular germ cell cancer. *British journal of cancer*, 107: 1853–1863.

Nitzsche, B., C. Glösenkamp, M. Schrader, M. Ocker, R. Preissner, M. Lein, A. Zakrzewicz, B. Hoffmann & M. Höpfner, 2010. Novel compounds with antiangiogenic and antiproliferative potency for growth control of testicular germ cell tumours. *British journal of cancer*, 103: 18–28.

Nowak, D. G., J. Woolard, E. M. Amin, O. Konopatskaya, M. A. Saleem, A. J. Churchill, M. R. Ladomery, S. J. Harper & D. O. Bates, 2008. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *Journal of cell science*, 121: 3487–3495.

Oechsle, K., F. Honecker, T. Cheng, F. Mayer, P. Czaykowski, E. Winqvist, L. Wood, M. Fenner, S. Glaesener, J. T. Hartmann, K. Chi, C. Bokemeyer & C. Kollmannsberger, 2011a. Preclinical and clinical activity of sunitinib in patients with cisplatin-refractory or multiply relapsed germ cell tumors: a Canadian Urologic Oncology Group/German Testicular Cancer Study Group cooperative study. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*.

Oechsle, K., C. Kollmannsberger, F. Honecker, F. Mayer, C. F. Waller, J. T. Hartmann, I. Boehlke & C. Bokemeyer, 2011b. Long-Term Survival After Treatment with Gemcitabine and Oxaliplatin With and Without Paclitaxel Plus Secondary Surgery in Patients with Cisplatin-Refractory and/or Multiply Relapsed Germ Cell Tumors. *European Urology*, 60: 850–855.

Ogryzko, V. V., P. Wong & B. H. Howard, 1997. WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 17: 4877–4882.

Okamura, K., Y. Tsuji, T. Shimoji & K. Miyake, 1995. Growth of human tumor xenografts on chorioallantoic membrane of chick embryo. *Hinyokika Kyo. Acta Urologica Japonica*, 41: 163–170.

Oosterhuis, J. W. & L. H. J. Looijenga, 2005. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nature Reviews. Cancer*, 5: 210–222.

Patan, S., 2000. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *Journal of Neuro-Oncology*, 50: 1–15.

Peltomäki, P., O. Alfthan & A. de la Chapelle, 1991. Oncogenes in human testicular cancer: DNA and RNA studies. *British Journal of Cancer*, 63: 851–858.

Perrin, R. M., O. Konopatskaya, Y. Qiu, S. Harper, D. O. Bates & A. J. Churchill, 2005. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia*, 48: 2422–2427.

Pinto, A. L. & S. J. Lippard, 1985. Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA. *Biochimica et biophysica acta*, 780: 167–180.

Plastaras, J. P., S.-H. Kim, Y. Y. Liu, D. T. Dicker, J. F. Dorsey, J. McDonough, G. Cerniglia, R. R. Rajendran, A. Gupta, A. K. Rustgi, J. A. Diehl, C. D. Smith, K. T. Flaherty & W. S. El-Deiry, 2007. Cell Cycle-Dependent and Schedule-Dependent Antitumor Effects of Sorafenib Combined with Radiation. *Cancer Research*, 67: 9443–9454.

Plate, K. H., G. Breier, H. A. Weich, H. D. Mennel & W. Risau, 1994. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *International Journal of Cancer*, 59: 520–529.

Port, M., S. Glaesener, C. Ruf, A. Riecke, C. Bokemeyer, V. Meineke, F. Honecker & M. Abend, 2011. Micro-RNA expression in cisplatin resistant germ cell tumor cell lines. *Molecular Cancer*, 10: 52.

Pries, A. R., A. J. M. Cornelissen, A. A. Sloot, M. Hinkeldey, M. R. Dreher, M. Höpfner, M. W. Dewhirst & T. W. Secomb, 2009. Structural Adaptation and Heterogeneity of Normal and Tumor Microvascular Networks. *PLoS Comput Biol*, 5: e1000394.

Pries, A. R., M. Höpfner, F. le Noble, M. W. Dewhirst & T. W. Secomb, 2010. The shunt problem: control of functional shunting in normal and tumour vasculature. *Nature Reviews. Cancer*, 10: 587–593.

Radhakrishnan, S. K., C. S. Feliciano, F. Najmabadi, A. Haegebarth, E. S. Kandel, A. L. Tyner & A. L. Gartel, 2004. Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle. *Oncogene*, 23: 4173–4176.

Ramasubbaiah, R., J. Brames, E. L. Johnston, L. H. Einhorn, D. Jaughn & S. M. Perkins, 2010. Phase II study of oxaliplatin (O) and bevacizumab (B) chemotherapy in refractory germ cell tumors (GCT). *ASCO Meeting Abstracts*, 28: e15054.

Rehm, H. & T. Letzel, 2009. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics* 6. Aufl. 2010. Spektrum Akademischer Verlag.

Ribatti, D., A. Gualandris, M. Bastaki, A. Vacca, M. Iurlaro, L. Roncali & M. Presta, 1997. New model for the study of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane: the gelatin sponge/chorioallantoic membrane assay. *Journal of Vascular Research*, 34: 455–463.

Rini, B. I., S. Halabi, J. E. Rosenberg, W. M. Stadler, D. A. Vaena, S.-S. Ou, L. Archer, J. N. Atkins, J. Picus, P. Czaykowski, J. Dutcher & E. J. Small, 2008. Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26: 5422–5428.

Risau, W., 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386: 671–674.

Risau, W. & I. Flamme, 1995. Vasculogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11: 73–91.

Rizzo, V. & D. O. DeFouw, 1993. Macromolecular selectivity of chick chorioallantoic membrane microvessels during normal angiogenesis and endothelial differentiation. *Tissue & Cell*, 25: 847–856.

Roorda, B. D., A. Ter Elst, S. H. Diks, T. G. J. Meeuwssen-de Boer, W. A. Kamps & E. S. J. M. de Bont, 2009. PTK787/ZK 222584 inhibits tumor growth promoting mesenchymal stem cells: kinase activity profiling as powerful tool in functional studies. *Cancer Biology & Therapy*, 8: 1239–1248.

Rubinfeld, H. & R. Seger, 2005. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Molecular Biotechnology*, 31: 151–174.

- Ruf, C., M. Port, F. Honecker, S. Glaesener, A. Riecke, V. Meineke, C. Bokemeyer & M. Abend, 2010. MicroRNA expression in paternal and cisplatin-resistant germ cell tumor cell lines. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*, 28: e15029.
- Sa, G. & D. W. Stacey, 2004. P27 expression is regulated by separate signaling pathways, downstream of Ras, in each cell cycle phase. *Experimental Cell Research*, 300: 427–439.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich & N. Arnheim, 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*, 230: 1350–1354.
- Schmidt, U., J. Ahmed, E. Michalsky, M. Höpfner & R. Preissner, 2008. Comparative VEGF receptor tyrosine kinase modeling for the development of highly specific inhibitors of tumor angiogenesis. *Genome Informatics. International Conference on Genome Informatics*, 20: 243–251.
- Schrader, M., 2010. Keimzelltumoren – ein Update. *Der Urologe*, 49: 166–168.
- Schrader, M., C. Kempkensteffen, F. Christoph, S. Hinz, S. Weikert, M. Lein, H. Krause, C. Stefan, K. Jung, M. Höpfner, P. Albers, K. Miller & M. Schostak, 2009. Germ Cell Tumors of the Gonads: A Selective Review Emphasizing Problems in Drug Resistance and Current Therapy Options. *Oncology*, 76: 77–84.
- Secomb, T. W., M. W. Dewhirst & A. R. Pries, 2012. Structural adaptation of normal and tumour vascular networks. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 110: 63–69.
- Sheikine, Y., E. Genega, J. Melamed, P. Lee, V. E. Reuter & H. Ye, 2012. Molecular genetics of testicular germ cell tumors. *American Journal of Cancer Research*, 2: 153–167.
- Shibuya, M., 2006. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E. *Endothelium: Journal of Endothelial Cell Research*, 13: 63–69.

Silva, S. R., K. A. Bowen, P. G. Rychahou, L. N. Jackson, H. L. Weiss, E. Y. Lee, C. M. Townsend Jr & B. M. Evers, 2011. VEGFR-2 expression in carcinoid cancer cells and its role in tumor growth and metastasis. *International journal of cancer*, 128: 1045–1056.

Skakkebaek, N. E., 1972. Possible carcinoma-in-situ of the testis. *Lancet*, 2: 516–517.

Sobin, L. H., M. K. Gospodarowicz & C. Wittekind (Eds.), 2009. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th edition. Wiley-Blackwell.

Sobrero, A. F. & P. Bruzzi, 2011. Vatalanib in Advanced Colorectal Cancer: Two Studies With Identical Results. *Journal of Clinical Oncology*, 29: 1938–1940.

Spannuth, W. A., A. M. Nick, N. B. Jennings, G. N. Armaiz-Pena, L. S. Mangala, C. G. Danes, Y. G. Lin, W. M. Merritt, P. H. Thaker, A. A. Kamat, L. Y. Han, J. R. Tonra, R. L. Coleman, L. M. Ellis & A. K. Sood, 2009. Functional Significance of VEGFR-2 on Ovarian Cancer Cells. *International Journal of Cancer*, 124: 1045–1053.

Suddek, G. M., 2011. Sunitinib improves chemotherapeutic efficacy and ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in experimental animals. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67: 1035–1044.

Swerdlow, A. J., S. R. Huttly & P. G. Smith, 1987. Prenatal and familial associations of testicular cancer. *British journal of cancer*, 55: 571–577.

Takahashi, H. & M. Shibuya, 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 109: 227.

Takahashi, K., Y. Saishin, Y. Saishin, R. L. Silva, Y. Oshima, S. Oshima, M. Melia, B. Paszkiet, D. Zerby, M. J. Kadan, G. Liau, M. Kaleko, S. Connelly, T. Luo & P. A. Campochiaro, 2003. Intraocular expression of endostatin reduces VEGF-induced retinal vascular permeability, neovascularization, and retinal detachment. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17: 896–898.

- Takano, H., S. Murasawa & T. Asahara, 2008. Functional and gene expression analysis of hTERT overexpressed endothelial cells. *Biologics: Targets & Therapy*, 2: 547–554.
- Teng, L.-S., K.-T. Jin, K.-F. He, H.-H. Wang, J. Cao & D.-C. Yu, 2010. Advances in Combination of Antiangiogenic Agents Targeting VEGF-binding and Conventional Chemotherapy and Radiation for Cancer Treatment. *Journal of the Chinese Medical Association*, 73: 281–288.
- Veenstra, C. M. & D. J. Vaughn, 2011. Third-Line Chemotherapy and Novel Agents for Metastatic Germ Cell Tumors. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 25: 577–591.
- Voigt, W., T. Kegel, G. Maher, K. Jordan, L. Müller & H.-J. Schmoll, 2006. Bevacizumab plus high-dose ifosfamide, etoposide and carboplatin (HD-ICE) as third-line salvage chemotherapy induced an unexpected dramatic response in highly platinum refractory germ-cell cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 17: 531–533.
- Wang, N., B. Trend, D. L. Bronson & E. E. Fraley, 1980. Nonrandom abnormalities in chromosome 1 in human testicular cancers. *Cancer Research*, 40: 796–802.
- Wang, X. W., Q. Zhan, J. D. Coursen, M. A. Khan, H. U. Kontny, L. Yu, M. C. Hollander, P. M. O'Connor, A. J. Fornace & C. C. Harris, 1999. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 3706 – 3711.
- Wang, Z., S. Kar & B. I. Carr, 2008. Cdc25A Protein Phosphatase: A Therapeutic Target for Liver Cancer Therapies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry)*, 8: 863–871.
- Wernert, Stanjek, Kiriakidis, Hügel, Jha, Mazitschek & Giannis, 1999. Inhibition of Angiogenesis In Vivo by ets-1 Antisense Oligonucleotides-Inhibition of Ets-1 Transcription Factor Expression by the Antibiotic Fumagillin. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 38: 3228–3231.

Williams, S. D., R. Birch, L. H. Einhorn, L. Irwin, F. A. Greco & P. J. Loehrer, 1987. Treatment of disseminated germ-cell tumors with cisplatin, bleomycin, and either vinblastine or etoposide. *The New England journal of medicine*, 316: 1435–1440.

Wittekind, C., 2008. Biologie und Pathologie von Keimzelltumoren des Hodens. *Der Onkologe*, 14: 602–610.

Wood, J. M., 2000. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) as a novel approach for cancer therapy. *Medicina*, 60 Suppl 2: 41–47.

Woodward, P., A. Heidenreich, L. Looijenga, J. Oosterhuis, D. McLeod, H. Møller, J. Manivel, F. Mostofi, S. Heilemariam, M. Parkinson, K. Grigor, L. True, G. Jacobsen, D. Oliver, A. Talerman, G. Kaplan, T. Ulbright, I. Sestermenn, M. Rushton, H. Michael & V. Reuter, 2004. Testicular germ cell tumors. Pages 217–278 *World Health Organization Classification of Tumours*.

Yamaguchi, N., B. Anand-Apte, M. Lee, T. Sasaki, N. Fukai, R. Shapiro, I. Que, C. Lowik, R. Timpl & B. R. Olsen, 1999. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J*, 18: 4414–4423.

Zhan, Q., 2005. Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutation Research*, 569: 133–143.

Zhu, H., L. Zhang, S. Wu, F. Teraishi, J. J. Davis, D. Jacob & B. Fang, 2004. Induction of S-phase arrest and p21 overexpression by a small molecule 2[[3-(2,3-dichlorophenoxy)propyl] amino]ethanol in correlation with activation of ERK. *Oncogene*, 23: 4984–4992.

8. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

8.1. ORIGINALARBEITEN

Rodrigues, J. R., J. Charris, J. Camacho, A. Barazarte, N. Gamboa, **B. Nitzsche**, M. Höpfner, M. Lein, K. Jung & C. Abramjuk, 2013. N'-Formyl-2-(5-nitrothiophen-2-yl)benzothiazole-6-carbohydrazide as a potential anti-tumour agent for prostate cancer in experimental studies. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65: 411–422.

Nitzsche, B., C. Glösenkamp, M. Schrader, B. Hoffmann, F. Zengerling, S. Balabanov, F. Honecker & M. Höpfner, 2012. Anti-tumour activity of two novel compounds in cisplatin-resistant testicular germ cell cancer. *British Journal of Cancer*, 107: 1853–1863.

Zengerling, F., W. Streicher, A. J. Schrader, M. Schrader, **B. Nitzsche**, M. V. Cronauer & M. Höpfner, 2012. Effects of sorafenib on C-terminally truncated androgen receptor variants in human prostate cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 11530–11542

Glösenkamp, C.*, **B. Nitzsche***, A. R. Lim, E. Normant, E. Vosburgh, M. Schrader, M. Ocker, H. Scherübl & M. Höpfner, 2012. Heat shock protein 90 is a promising target for effective growth inhibition of gastrointestinal neuroendocrine tumors. *International journal of oncology*, 40: 1659–1667.

*both authors contributed equally to this work (Fußnote der Publikation)

Glösenkamp, C. R., **B. Nitzsche**, M. Ocker, P. Di Fazio, K. Quint, B. Hoffmann, H. Scherübl & M. Höpfner, 2012. AKT inhibition by triciribine alone or as combination therapy for growth control of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *International journal of oncology*, 40: 876–888.

Rodrigues, J. R., J. Charris, R. Ferrer, N. Gamboa, J. Angel, **B. Nitzsche**, M. Höpfner, M. Lein, K. Jung & C. Abramjuk, 2012. Effect of quinolinyl acrylate derivatives on prostate cancer in vitro and in vivo. *Investigational new drugs*, 30: 1426–1433

Hohberg, M., J. Knöchel, C. J. Hoffmann, S. Chlench, W. Wunderlich, A. Alter, J. Maroski, B. J. Vorderwülbecke, L. Da Silva-Azevedo, R. Knudsen, R. Lehmann, K. Fiedorowicz, M. Bongrazio, **B. Nitzsche**, M. Höpfner, B. Styp-Rekowska, A. R. Pries & A. Zakrzewicz, 2011. Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries. *Journal of Cellular Physiology*, 226: 350–361.

Rodrigues, J., C. Abramjuk, L. Vásquez, N. Gamboa, J. Domínguez, **B. Nitzsche**, M. Höpfner, R. Georgieva, H. Bäumlner, C. Stephan, K. Jung, M. Lein & A. Rabien, 2011. New 4-maleamic acid and 4-maleamide peptidyl chalcones as potential multitarget drugs for human prostate cancer. *Pharmaceutical Research*, 28: 907–919.

Nitzsche, B., C. Glösenkamp, M. Schrader, M. Ocker, R. Preissner, M. Lein, A. Zakrzewicz, B. Hoffmann & M. Höpfner, 2010. Novel compounds with antiangiogenic and antiproliferative potency for growth control of testicular germ cell tumours. British Journal of Cancer, 103: 18–28.

8.2. KURZVERÖFFENTLICHUNGEN

Nitzsche, B., F. Honecker, M. Schrader, A. Pries & M. Höpfner, 2011. A novel approach for treatment of cisplatin resistant testicular germ cell cancer. Proceedings of the 7th Copenhagen Workshop on Testicular Carcinoma in Situ and Germ Cell Cancer. International Journal of Andrology, 34/4pt2.

Nitzsche, B., C. Glösenkamp, F. Honecker, M. Lein & M. Höpfner, 2010. Novel therapeutic treatment options for testicular germ cell cancer. Onkologie, 33/S2.

Nitzsche, B., R. Preissner, M. Lein & M. Höpfner, 2009. Novel antiangiogenic compounds for innovative approaches in urologic tumor treatment. European Journal of Medical Research, 14 Supl 2: 46.

Ruwwe-Glösenkamp C., **B. Nitzsche**, H. Scherübl, B. Hoffmann & M. Höpfner 2009. Akt-inhibition as a new therapeutic option in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. European Journal of Medical Research, 14 Supl 2.

Nitzsche, B., C. Glösenkamp, M. Schrader, M. Lein & M. Höpfner, 2009. Alterations in the gene expression pattern of testicular germ cell tumors after treatment with a novel antiangiogenic compound. Urologe, 49.

8.3. AUSZEICHNUNGEN UND PREISE

Max-Gruban-Forschungspreis, Stiftung Urologische Forschung, Berlin, 2009

Forschungspreis, Stiftung Urologische Forschung, Berlin, 2010

Forschungspreis, Stiftung Urologische Forschung, Berlin, 2011

9. DANKSAGUNG

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen eines Promotionsstipendiums der „Stiftung Urologische Forschung“ Berlin in dem Institut für Physiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Für die Förderung durch die Stiftung möchte ich mich an dieser Stelle insbesondere bei Prof. Dr. Loening und bei Prof. Dr. Schnorr bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Jung und Prof. Dr. Lein vom Berliner Forschungsinstitut für Urologie bedanke ich mich für ihre freundliche Unterstützung und ihr stetiges Interesse an meiner Arbeit.

Herrn PD. Dr. Höpfner gebührt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit als Doktorvater. Neben den anregenden Diskussionen über inhaltliche Fragen und dem Vertrauen in mich und meine Arbeit habe ich durch Ihn einen umfassenden Einblick in die biomedizinische Forschung erhalten. Diese Erfahrungen werden mir in meinem zukünftigen Arbeitsleben von großem Nutzen sein.

Für die Übernahme der Gutachtertätigkeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Mutzel von der Freien Universität Berlin bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle meine Kolleginnen und Kollegen im Institut für Physiologie für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft in allen Bereichen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich besonders bei Herrn Björn Hoffmann für die uneingeschränkte Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Schrader und Frau Felicitas Genze von der Urologischen Abteilung des Universitätsklinikums in Ulm danke ich für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in den Versuch mit der Chorioallantoismembran des Hühnchens und für die Unterstützung bei der immunhistochemischen Färbung der Präparate.

Frau Dr. Kapp danke ich für ihre Hilfe bei den durchflusszytometrischen Bestimmungen.

10. ANHANG

Tabelle 10-1: Gene reguliert in HUVEC Zellen nach 48 Std. Behandlung mit 15 μ M HP-14 gemessen mit *Oligo GEArray® DNA Human Angiogenesis Microarray* (SABiosciences, MD, USA).

supprimierte Gene

Abkürzung	Wert	Genbezeichnung
EPAS1	0.48	Endothelial PAS domain protein 1
EGF	0.46	Epidermal growth factor
EFNA2	0.45	Ephrin-A2
KDR	0.44	Kinase insert domain receptor (VEGFR-2)
NRP1	0.37	Neuropilin 1
PLAU	0.32	Plasminogen activator, urokinase
TEK	0.25	TEK tyrosine kinase, endothelial
CCL11	0.23	Chemokine ligand 11
IL8	0.21	Interleukin 8
ECGF1	0.19	Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)
TNNT1	0.17	Troponin T type 1
TIMP3	0.12	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
NOTCH4	0.11	Notch homolog 4
EFNA1	0.10	Ephrin-A1
TNFRSF12A	0.09	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A
TIMP2	0.08	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
TGFA	0.07	Transforming growth factor, alpha
VEGFA	0.06	Vascular endothelial growth factor A
EFNA3	0.04	Ephrin-A3
PGF	0.04	Placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein
AKT1	0.04	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
PDGFB	0.03	Platelet-derived growth factor beta polypeptide
IL1B	0.01	Interleukin 1, beta

überexprimierte Gene

Abkürzung	Wert	Genbezeichnung
ANPEP	1.64	Alanyl aminopeptidase
COL18A1	1.96	Collagen, type XVIII, alpha 1
IL6	2.19	Interleukin 6
EDG1	2.23	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1
VEGFB	2.29	Vascular endothelial growth factor B
TIE1	2.37	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1
MMP2	2.41	Matrix metalloproteinase 2
TIMP1	2.45	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
ENG	2.56	Endoglin
CXCL1	2.78	Chemokine ligand 1
EFNB2	2.93	Ephrin-B2

Tabelle 10-2 Gene reguliert in Tera-1 Zellen nach 48 Std. Behandlung mit 15 μ M HP-14 gemessen mit Oligo GEArray® DNA Human Angiogenesis und Cancer PathwayFinder Microarray (SABiosciences, MD, USA).

supprimierte Gene

Abkürzung	Wert	Genbezeichnung
PDGFA	0.51	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide
NFKB1	0.29	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NFKBIA	0.23	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
PDGFB	0.22	Platelet-derived growth factor beta polypeptide
MTA1	0.22	Metastasis associated 1
KDR	0.15	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
CXCL5	0.14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
CDKN1B	0.14	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
MMP2	0.14	Matrix metalloproteinase 2
MTA2	0.13	Metastasis associated 1 family
JUN	0.12	Jun oncogene
CDK2	0.07	Cyclin-dependent kinase 2
SERPINB5	0.07	Serpin peptidase inhibitor
ITGA4	0.06	Integrin, alpha 4
BRCA2	0.05	Breast cancer 2
EGFR	0.05	Epidermal growth factor receptor
AKT1	0.04	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
PRKDC	0.04	Protein kinase
HTATIP2	0.04	HIV-1 Tat interactive protein
FGF2	0.04	Fibroblast growth factor 2
CDC25A	0.03	Cell division cycle 25 homolog A
SERPINB2	0.03	Serpin peptidase inhibitor

überexprimierte Gene

Abkürzung	Wert	Genbezeichnung
FGFR2	1.51	Fibroblast growth factor receptor 2
COL18A1	1.59	Collagen, type XVIII, alpha 1
CCNE1	1.60	Cyclin E1
PNN	1.64	Pinin, desmosome associated protein
TIE1	1.74	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1
ITGB5	1.93	Integrin, beta 5
CDK4	2.03	Cyclin-dependent kinase 4
NME1	2.03	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A)
ITGB1	2.07	Integrin, beta 1
BIRC5	2.11	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
TIMP1	2.11	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
VEGFB	2.21	Vascular endothelial growth factor B
TNFRSF1A	2.23	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
TNFRSF10B	2.24	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
CDKN1A	2.27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
PLAU	2.93	Plasminogen activator, urokinase
ITGA3	12.93	Integrin, alpha 3
TERT	24.59	Telomerase reverse transcriptase