

Aus der Klinik für Neurochirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Antiangiogene Therapie in Kombination mit Temozolomid
beim experimentellen MGMT-methylierten Glioblastom**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jeanette Brünner
aus Erlabrunn

Datum der Promotion: 25.10. 2013

Abstrakt:**Antiangiogene Therapie in Kombination mit Temozolomid beim experimentellen MGMT-methylierten Glioblastom***Einleitung:*

Die Kombination von antiangiogener und zytostatischer Therapie entwickelt sich derzeit auch als attraktives Therapiekonzept in der Behandlung des Glioblastoms. Unsere Studie untersucht die therapeutische Effektivität einer kombinierten Therapie von Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib (SU) und dem Alkylans Temozolomid (TMZ) mittels Charakterisierung von antitumoralen Effekten und mikrovaskulären Veränderungen unter dieser Therapieform.

Material/Methoden:

Eine MGMT-Promotorstatus-Bestimmung durch Pyrosequenzierung wurde an den verwendeten Gliomzelllinien durchgeführt. Ein subkutanes Tumorexograft-Modell diente zur Analyse des Tumorwachstums in verschiedenen Therapiegruppen (TMZ, SU, SU gefolgt von TMZ, TMZ gefolgt von SU, TMZ/SU kombiniert). Durch intravitalmikroskopische Untersuchungen am Rückenhautkammer-Modell wurden die mikrozirkulären Konsequenzen der Therapieschemata evaluiert. Quantitative immunhistochemische Untersuchungen wurden zur Beurteilung von Tumor- und Endothelzell-Proliferation, sowie von Apoptose, mikrovaskulärer Gefäßdichte und Gefäß-Perizyten-Assoziation verwendet. Mit Hilfe von Real Time- PCR-Analysen wurden die Expressionsveränderungen in Angiogenese-assoziierten Signalwegen untersucht.

Ergebnisse:

Kombinierte TMZ/SU-Therapie resultierte in einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zu beiden Monotherapien. Dies basierte insbesondere auf additiven antiangiogenen Effekten beider Substanzen und synergistischen proapoptotischen Effekten im Vergleich zu TMZ-Therapie. In den sequenziellen Therapieschemata (Su->TMZ; TMZ->SU) konnten diese Effekte nicht nachgewiesen werden. TMZ/SU führte im Unterschied zu beiden Monotherapien zu Veränderungen

der Tumormikrozirkulation. Zu beobachten war unter TMZ/SU eine signifikante Zunahme der mikrovaskulären Blutflussrate sowie eine signifikant reduzierte Gefäßpermeabilität. Zudem stellten wir unter Kombinationstherapie TMZ/SU als Hinweis auf eine Aggravation vaskulärer Resistenzmechanismen eine deutliche Reetablierung von Perizyten-Endothelzell-Interaktionen fest, die parallel einherging mit einer Hochregulation von Ang-1 und Tie-2 und Down- Regulation von Dll-4.

Zusammenfassung:

Simultane kombinierte TMZ/SU führt zu einer verbesserten Tumorkontrolle durch additive antiangiogene und synergistische proapoptotische Effekte. Die gesteigerte therapeutische Effektivität von kombinierter TMZ/SU-Therapie wird nur durch kontinuierliche gemeinsame Applikation, nicht jedoch durch sequenzielle Applikation beider Substanzen erreicht. Dennoch aggraviert diese Form der Kombinationstherapie Perizyten-vermittelte vaskuläre Resistenzmechanismen mit Expressionsveränderungen in den Signalwegen des Ang-1/Tie-2 und Dll-4- Systems.

Abstract:**Combining sunitinib and temozolomide in the treatment of malignant MGMT-methylated glioma enhances antitumor efficacy but promotes vascular resistance mechanisms***Introduction:*

Recently, combined antiangiogenic and cytotoxic treatment also evolves as an attractive therapeutic approach in the treatment of glioblastoma. Thus, this study aims at characterizing the direct anti-tumor efficacy and the microvascular consequences of treatment with receptor tyrosine kinase inhibitor (RTKI) sunitinib (SU) and the alkylating agent temozolomide (TMZ).

Materials and Methods:

O⁶-Methylguanine methyltransferase (MGMT) status of our tumor cell lines was assessed by pyrosequencing. Tumor growth of subcutaneous glioma xenografts was analyzed under different treatment protocols (TMZ, SU, SU followed by TMZ, TMZ followed by SU, combined TMZ/SU). Assessment of microvascular changes was conducted by intravital microscopy (dorsal skinfold chamber model). Quantitative immunohistochemical analysis evaluated tumor and endothelial cell proliferation, apoptosis and vascular pericyte coverage. Genetic alterations of expression patterns in angiogenesis-related pathways in response to therapy were analyzed by Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results:

Combined TMZ/SU therapy resulted in significantly reduced tumor growth compared to monotherapy protocols. This beneficial therapeutic effect was due to additive antiangiogenic effects and synergistic induction of tumor cell apoptosis versus TMZ treatment alone. These additive antitumor effects were not observed in sequential treatment protocols. Microvascular changes predominantly observed under combined TMZ/SU treatment included a significantly higher blood flow rate, a significantly reduced permeability and recovery of pericyte-endothelial interactions which may presumably represent aggravated vascular resistance mechanisms by this treatment regimen.

Vascular resistance was paralleled by an increase in Ang-1 and Tie-2 expression and by the downregulation of Dll4.

Conclusion:

Continuous application of combined TMZ/SU yielded beneficial therapeutic efficacy by additive antiangiogenic and synergistic pro-apoptotic effects. Sequential application of TMZ and SU in the angiogenic window does not add antitumor efficacy to monotherapy. Thus, long-term efficacy of combination therapy may be hampered by aggravated pericyte-mediated vascular resistance mechanisms with alterations in Ang-1-Tie-2 and Dll4/Notch pathways.

1. Inhaltsverzeichnis

1. INHALTSVERZEICHNIS	6
1.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	9
1.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	10
2. EINLEITUNG	12
2.1 EPIDEMIOLOGIE DES GLIOBLASTOMS	12
2.2 MOLEKULARE PATHOLOGIE DES GLIOBLASTOMS	13
2.3 HISTOPATHOLOGISCHE KRITERIEN DES GLIOBLASTOMS	15
2.4 DERZEITIGER THERAPIESTANDARD FÜR DAS GLIOBLASTOM	16
2.5 ANGIOGENESEINHIBITION IN DER GLIOBLASTOM THERAPIE	17
2.5.1 MALIGNITÄTSKRITERIUM ANGIOGENESE	17
2.5.2 DER ANGIOGENE SCHALTER	18
2.5.3 VERÄNDERTE GEFÄßSTRUKTUR IM GLIOBLASTOM	19
2.5.4 SCHLÜSSELMOLEKÜLE DER ANGIOGENESE: VEGF-VEGF-REZEPTORSYSTEM	20
2.5.5 GEFÄßSTABILISIERUNG DURCH PDGF UND SEINEN REZEPTOR	22
2.5.6 TIE-REZEPTOREN UND ANGIOPOETINE	24
2.5.7 DLL-4/NOTCH1 SIGNALGEBUNG: GEFÄßSPROSSEN UND „TIP-ZELLEN“-REGULATION	26
2.5.8 BEDEUTUNG VON ANTIANGIOGENEN THERAPIESTRATEGIEN BEIM GBM	26
3. MATERIAL UND METHODEN	30
3.1 ZELLKULTUR	30
3.1.1 ZELLINIEN	30
3.1.2 ZELLVORBEREITUNG FÜR DIE SUBKUTANE IMPLANTATION	30
3.1.3 ZELLVORBEREITUNG FÜR DAS RÜCKENHAUTKAMMERMODELL	31
3.2 TIERVERSUCHE	31
3.2.1 VERSUCHSTIERE	31
3.2.2 MEDIKAMENTE	32
3.2.3 SUBKUTANES TUMORMODELL	34
3.2.4 RÜCKENHAUTKAMMERMODELL	37
3.2.5 INTRAVITALMIKROSKOPIE	38
3.2.6 AUSWERTUNG DER INTRAVITALMIKROSKOPIE	38
3.2.7 GEWEBEGEWINNUNG UND KONSERVIERUNG	39
3.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE STUDIE VON ANTITUMORALEN EFFEKTEN	40

3.3.1	ANFERTIGUNG VON KRYOSCHNITTEN	40
3.3.2	FÄRBUNG FÜR DEN PROLIFERATIONSMARKER PHOSPHOHISTONE H3	40
3.3.3	FÄRBUNG FÜR DEN APOPTOSEMARKER CASPASE 3	41
3.3.4	FÄRBUNG FÜR ANTI-MAUS-KI-67 ZUR DETEKTION VON ENDOTHELZELLPROLIFERATION	41
3.3.5	PERIZYTENDARSTELLUNG MIT DOPPELIMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG PECAM-DESMIN	42
3.3.6	FÄRBUNG ZUR GEFÄßDICHTEBESTIMMUNG MIT CD31 ALS ENDOTHELZELLMARKER	42
3.3.7	NEGATIVKONTROLLEN	43
3.3.8	MIKROSKOPIE UND AUSWERTUNG	43
3.4	BESTIMMUNG DES MGMT STATUS	44
3.4.1	DNA-EXTRAKTION UND BEHANDLUNG MIT NATRIUM-BISULFIT	44
3.4.2	PYROSEQUENZIERUNG	44
3.5	CHARAKTERISIERUNG DES EXPRESSIONSPROFILS VON SF126 UND U87 ZELLEN	44
3.5.1	RNA- ISOLATION UND MESSUNG DER RNA- AUSBEUTE	44
3.5.2	REAL TIME-QPCR	45
3.6	STATISTIK	45
4.	ERGEBNISSE	47
4.1	BESTIMMUNG DES MGMT-PROMOTORMETHYLIERUNGSSTATUS	47
4.2	EFFEKTE VON KOMBINierter TMZ/SU THERAPIE AUF DAS TUMORWACHSTUM IN VIVO	48
4.2.1	KONTINUIERLICHE TMZ/SU-THERAPIE IST EFFEKTIVER ALS SEQUENZIELLE APPLIKATION	48
4.2.2	INHIBITION DES TUMORWACHSTUMS DER ZELLINIE SF126	49
4.2.3	INHIBITION DES TUMORWACHSTUMS DER ZELLINIE U87	50
4.3	CHARAKTERISIERUNG DER THERAPEUTISCHEN EFFEKTIVITÄT HINSICHTLICH PROLIFERATION UND APOPTOSE	51
4.3.1	THERAPIEEFFEKTE AUF TUMORZELLPROLIFERATION	51
4.3.2	THERAPIEEFFEKTE AUF CASPASE-ABHÄNGIGE TUMORAPOPTOSE	53
4.4	CHARAKTERISIERUNG DER ANTIANGIOGENEN AKTIVITÄT	55
4.4.1	THERAPIEEFFEKTE AUF DIE GEFÄßDICHTE (MVD)	55
4.4.2	THERAPIEEFFEKTE AUF DIE ENDOTHELZELLPROLIFERATION	58
4.4.3	THERAPIEEFFEKTE AUF DIE GEFÄß-PERIZYTEN-ASSOZIATION	60
4.5	MIKROHÄMODYNAMIK IM EXPERIMENTELLEN GLIOM	62
4.5.1	TOTALE UND FUNKTIONELLE GEFÄßDICHTE	62
4.5.2	PERFUSIONSINDEX, MIKROZIRKULATION UND PERMEABILITÄT	63
4.6	EXPRESSIONSPROFIL ANGIOGENESE-RELEVANTER TARGETS	66
5.	DISKUSSION	68
5.1	DISKUSSION DER METHODIK	68

5.1.1	GLIOMZELLINIEN SF126 UND U87 UND RELEVANZ DES MGMT-STATUS	68
5.1.2	EIGNUNG VON SUNITINIB ALS ANTIANGIOGENE SUBSTANZ BEIM GBM	69
5.1.3	TEMOZOLOMID WIRKT NICHT NUR ZYTOTOXISCH, SONDERN AUCH ANTIANGIOGEN	71
5.1.4	VOR- UND NACHTEILE DES SUBKUTANEN TUMORMODELLS	74
5.1.5	RÜCKENHAUTKAMMERMODELL	74
5.1.6	IMMUNHISTOCHEMISCHE MARKER	75
5.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	79
5.2.1	CHEMOSENSIBILISIERENDE-EFFEKTE VON ANTIANGIOGENER THERAPIE	79
5.2.2	RESISTENZMECHANISMEN GEGEN ANTIANGIOGENE THERAPIESTRATEGIEN	83
5.2.3	ROLLE DER PERIZYTEN IN DER RESISTENZ GEGENÜBER ANTIANGIOGENER THERAPIE	84
5.2.4	IMPLIKATIONEN DES ANG-1/TIE-2-SYSTEMS UND DER DLL-4/NOTCH SIGNALGEBUNG	85
6.	ZUSAMMENFASSUNG	88
7.	LITERATURVERZEICHNIS	89
8.	LEBENS LAUF	98
9.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	100
10.	DANKSAGUNG	102

1.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Genetische Alterationen im humanen Glioblastom modifiziert nach Belden 2011 ¹²	15
Abb. 2: Phasen des Tumorwachstums in Abhängigkeit von Angiogenese modifiziert nach Folkman ²² ...	18
Abb. 3: Eigenschaften von Sunitinib (SU11248) modifiziert nach Faivre 2007 ⁶⁹	33
Abb. 4: Messschieber von F.S.T zur Bestimmung des subkutanen Tumolvolumens.....	34
Abb. 5: Experimentelles Protokoll der Therapiestudie am subkutanen Tumormodell.....	36
Abb. 6: MGMT-Promotor-Methylierungs-Analyse mittels Pyrosequenzierungsverfahren modifiziert nach Czabanka ⁸²	47
Abb. 7: Vergleich von sequenzieller und kontinuierlicher Kombinationstherapie TMZ/SU modifiziert nach Czabanka ⁸²	48
Abb. 8: Wachstumskurven der subkutanen SF126-Gliome während der Therapiephase modifiziert nach Czabanka ⁸²	49
Abb. 9: Wachstumskurven der subkutanen U87-Gliome während der Therapiephase modifiziert nach Czabanka ⁸²	50
Abb. 10: Graphische Darstellung von Tumorzellproliferation in A) SF126- und B) U87-	52
Abb. 11: Exemplarische fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Tumorzellproliferation in SF126-Xenografts	52
Abb. 12: Exemplarische fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Tumorzellproliferation in U87-Xenografts	53
Abb. 13: Graphische Darstellung von Tumorzellapoptose in A) SF126- und B) U87-Tumoren.....	54
Abb. 14: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung von Caspase-3 in SF126-Xenografts ⁸²	54
Abb. 15: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung von Caspase-3 in U87-Xenografts ⁸²	55
Abb. 16: Graphische Darstellung der Tumorgefäßdichte in A) SF126 und B) U87-Tumoren	56
Abb. 17: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der mikrovaskulären Gefäßdichte in SF126-Xenografts	57
Abb. 18: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der mikrovaskulären Gefäßdichte in U87-Xenografts	57
Abb. 19: Graphische Darstellung der Endothelzellproliferation in A) SF126- und B) U87-Gliomen.....	58
Abb. 20: Exemplarische fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Endothelzellproliferation in SF126-Xenografts	59
Abb. 21: Exemplarische fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Endothelzellproliferation in U87-Xenografts	59
Abb. 22: Graphische Darstellung der Pecam-Desmin-Ratio% für A) SF126- und B) U87-Tumore	60
Abb. 23: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Gefäß-Perizyten-Assoziation in SF126-Xenografts ⁸²	61
Abb. 24: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Gefäß-Perizyten-Assoziation in U87-Xenografts ⁸²	61

Abb. 25: Graphische Darstellung von totaler und funktioneller Gefäßdichte in SF126-Xenografts modifiziert nach Czabanka ⁸²	63
Abb. 26: Graphische Darstellung des Perfusionsindex und der mikrovaskulären Blutflussrate in SF126-Xenografts modifiziert nach ⁸²	64
Abb. 27: Graphische Darstellung der Gefäßpermeabilität in SF126-Xenografts modifiziert nach ⁸²	65
Abb. 28: Repräsentative intravitalmikroskopische Darstellung der Tumormikrozirkulation ⁸²	66
Abb. 29: Expressionsveränderungen von Ang-1, Tie-2, und DLL-4 in SF126-Xenografts.....	67

1.2 Abkürzungsverzeichnis

Ang-1	Angiopoetin 1
Ang-2	Angiopoetin-2
BSA	Bovines Serum Albumin
CD31	Platelet endothelial cell adhesion molecule
CTRL	Kontrolle
CSC	Cancer stem cell
CSF	Colony stimulating factor
CSFR	Colony stimulating factor receptor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	(4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid)
DLL-4	Delta like ligand 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EPC	Endothelial progenitor cell
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluoreszierendes Isothiocyanat
Flk 1	Fetal liver kinase-1 (VEGFR-2)
FLT3	Fms- related tyrosine kinase 3
FOLFIRI	5-FU/Leukovorin plus Irinotecan
GBM	Glioblastoma multiforme
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor-1 α
i.p.	Intraperitoneal
KDR	Kinase-insert domain containing receptor (VEGFR-2)

KIT	Stem cell growth factor receptor
MAPK	Mitogen-activated-protein-kinase
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MTD	Maximum-tolerated Doses
mTOR	Mammalian target of rapamycin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PCI	Pericyte coverage index
PI3K	Phospho-Inositol-3-Kinase
PLC- γ	Phospholipase C-gamma
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PIGF	Placental growth factor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
PI	Propidium-iodid
RAS	Rat sarcoma viral oncogene homolog
RB1	Retinoblastoma 1
ROI	Region of interest
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
SU	Sunitinib (Sutent, SU11248)
Tie-2	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2
TMZ	Temozolomid (Temodal)
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

2. Einleitung

2.1 Epidemiologie des Glioblastoms

Gliome haben einen Anteil von 75% an allen primären Tumoren des Zentralen Nervensystems (ZNS)^{1,2}. Der Begriff Gliom beinhaltet alle Tumore, die ursprünglich von Zellen glialer Herkunft ausgehen. Dazu gehören nach WHO Klassifikation der Tumoren des ZNS astrozytäre (WHO Grad I bis IV), oligodendrogliale, oligoastrozytäre und ependymale Tumore, sowie andere seltene Tumore neuroepithelialen Ursprungs³. Nach Statistik des deutschen Krebsregisters erkrankten im Jahre 2008 nahezu 7000 Menschen neu an primären Tumoren des Zentralen Nervensystems⁴. Männer sind insgesamt etwas häufiger betroffen als Frauen (Inzidenz in den USA: Männer: 3.86/100.000; Frauen: 2.39/100.000)¹. Man kann eine alterskorrelierte Zunahme der ZNS-Neoplasien mit einem Maximum für das 65. Lebensjahr beobachten. Die Inzidenz ist, verglichen mit Asien und Afrika², in Europa und den Vereinigten Staaten mit zunehmender Tendenz höher, welches auf eventuelle ethnische Häufigkeiten dieser Tumorentitäten hindeutet.

Mit ihrem maßgeblichen Anteil von über zwei Dritteln an allen primären Hirntumoren, beeinflussen Gliome diese Statistik erheblich. Insgesamt sind Neubildungen des ZNS bei Erwachsenen zwar vergleichsweise selten, denn sie machen nur 2% aller Krebserkrankungen in Deutschland aus. Dennoch stellt ihre Therapie aufgrund der weitgehenden Resistenz gegenüber den gängigen therapeutischen Optionen und der nur schwierig zugänglichen Lokalisation im Schädelinneren eine große Herausforderung für Spezialisten dar.

Trotz intensiver Forschungsarbeiten in den vergangenen Dekaden und multimodalen Therapieansätzen an spezialisierten Zentren, hat insbesondere das Glioblastom eine sehr ungünstige Prognose, mit letalem Ausgang nach durchschnittlich 14 Monaten unter Maximaltherapie. Weniger als 10% aller Glioblastom Patienten leben 5 Jahre nach Diagnosestellung noch⁵. Für die Überlebensrate ist dabei das höhere Lebensalter (> 50 Jahre) als prognostisch negativer Faktor zu werten⁵.

Über die Ursachen für die Entstehung von Gliomen ist nach wie vor nur wenig bekannt. Bei den meisten Patienten treten diese Tumoren sporadisch auf ohne bekannte hereditäre Vorbelastung. Bisher lassen sich kaum beeinflussbare Risiken nennen, wie sie für die Entwicklung von anderen Krebserkrankungen bekannt sind, wie

beispielsweise das Rauchen im Zusammenhang mit dem Bronchialkarzinom. Lediglich zwei relativ seltene exogene Faktoren sind nachgewiesenermaßen mit einer erhöhten Gliominzidenz assoziiert. Dies ist einerseits eine hohe Belastung mit ionisierender Strahlung und andererseits sind hier vererbte Mutationen, häufig Keimbahnmutationen, im Rahmen seltener Syndrome zu nennen. Sekundär auftretende Gliome nach kranial betonter Radiatio mit einer durchschnittlichen Latenz von zehn Jahren spielen eine bedeutende Rolle in der Pädiatrie bei der Therapie von akuten lymphatischen Leukämien. Zu den bekannten Syndromen, die mit einem häufigen Auftreten von Glioblastomen assoziiert sind, zählen das Li-Fraumeni-Syndrom, Neurofibromatose Typ 1 und 2 und das Turcot-Syndrom².

Interessanterweise gibt es einige fundierte wissenschaftliche Hinweise dafür, dass Träger von Asthma- und Atopieneigung- assoziierten genetischen Keimbahn-Polymorphismen ein geringeres Lebenszeitrisiko dafür besitzen, ein Gliom zu entwickeln¹. Immunologische Prozesse scheinen daher in der Gliomentstehung und-progression durchaus einen Einfluss zu haben.

2.2 Molekulare Pathologie des Glioblastoms

Der allenfalls moderate Erfolg moderner Therapieansätze beim Glioblastom ist im Wesentlichen der komplexen Tumorbilogie und der enormen funktionellen Heterogenität der Gliomzellen zuzuschreiben. Einen Grund für diese große Vielfalt stellt zweifellos die hohe Zahl an genetischen Veränderungen dar, die bisher in hoch-malignen Gliomen detektiert werden konnten. Desweiteren hat der „Tumor-initiiierende“ Zelltypus einen essentiellen Einfluss auf die Biologie und Heterogenität des entstehenden Glioms⁶. Präzise Vorstellungen über den eigentlichen Zellursprung der Gliome sind nach derzeitigem Wissenstand noch nicht etabliert, doch scheint die Kenntnis darüber entscheidend für das Verständnis der Tumorgenese und dem spezifischen Mikromilieu des Glioms zu sein. Tiermodelle haben bisher vor allem auf drei verschiedene Zelltypen als Ursprung für die Genese eines Glioms schließen lassen. Als wissenschaftlich bereits gut untersuchte Kandidaten für die Gliomgenese kommen insbesondere Astrozytenvorläuferzellen, neuronale Stammzellen und Vorläuferzellen von Oligodendrozyten in Betracht⁶. Gemeinsam ist all diesen Zelltypen, dass sie unreife Zellvorstufen sind, und die Eigenschaft besitzen, sich ständig selbst zu erneuern und sich in viele Richtungen zu differenzieren, mit Expression verschiedener neuronaler und glialer Biomarker. Besonders auffällig ist CD133 als Marker in der

Tumorstammzellforschung, den Cancer stem cells (=CSC). Richtungsweisende in vivo Studien konnten zeigen, dass CD133+ GBM-Zellen, die in einer Quantität von nur 100 Zellen in NU-NU-Nacktmäusen implantiert wurden, einen Tumor induzieren konnten⁷. Dennoch scheint CD133 nicht essentiell für die stammzell-artigen Eigenschaften von CSC zu sein, denn es konnten anschließend auch CD133-negative CSC Zelllinien charakterisiert werden, die ein ähnliches Differenzierungsprofil, eine vergleichbare Tumor-induzierende Potenz und Klonogenität aufwiesen. CSC stellen ein interessantes therapeutisches Target dar, da sie häufig Proteine überexprimieren, die für eine Resistenz gegenüber vielen Medikamenten verantwortlich sind, sog. Multi-Drug-Resistance-Proteine (MDRP)⁸. Diese Refraktärität der Stammzellfraktion des Tumors gegenüber gängigen Zytostatika kann somit jederzeit zu einem Glioblastomrezidiv führen. In einigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Temozolomid vorzugsweise in der „Stammzellfraktion“ der Gliomzellen MGMT-Status abhängig Apoptose induzieren kann⁹. O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (=MGMT) ist ein DNA-Reparturenzym, das die zytotoxische Wirkung von Temozolomid antagonisieren kann und einen prognostischen Marker in der GBM-Therapie darstellt¹⁰. MGMT-negative GBM-Stammzellen waren empfänglicher für die zytotoxischen Effekte von Temozolomid, wurden also stärker depletiert als MGMT-positive⁹.

Erst kürzlich sind für Studienzwecke die häufigsten genetischen Alterationen, die in Glioblastomen auftreten, unter Verwendung von Daten des Cancer Genome Atlas Research Network katalogisiert worden. Das typische Glioblastom weist in der Regel mehr als 60 genetische Alterationen auf, wobei davon nahezu 90% Mutationen ausmachen und die verbleibenden 10% chromosomale Aberrationen darstellen¹¹. Diese Genomanalysen von humanen Glioblastomen haben zahlreiche Mutationen in Genen von primär drei Hauptsignalwegen identifiziert: die Mehrzahl an Tumoren, nach Literaturangaben ca. 80%¹², wies Veränderungen im RTK/PI3K/PTEN- Signalweg auf mit alterierter Expression von insbesondere EGFR, PDGFR-A und PTEN. Ferner betroffen waren die p53-Signalkaskade und die RB1-Signalkaskade, die ebenfalls zentrale Schaltstellen von zellulären Prozessen wie Zellteilung, Migration und Überleben darstellen⁶. Alterationen in diesen Signalwegen führen zu einer erhöhten autonomen Aktivität weiter distal in der Signalkaskade gelegener Schaltstellen. Resultate der gestörten Aktivität sind eine gesteigerte Zellproliferation, zunehmende proangiogene Tumoraktivität gepaart mit dem Überleben atypischer Zellen.

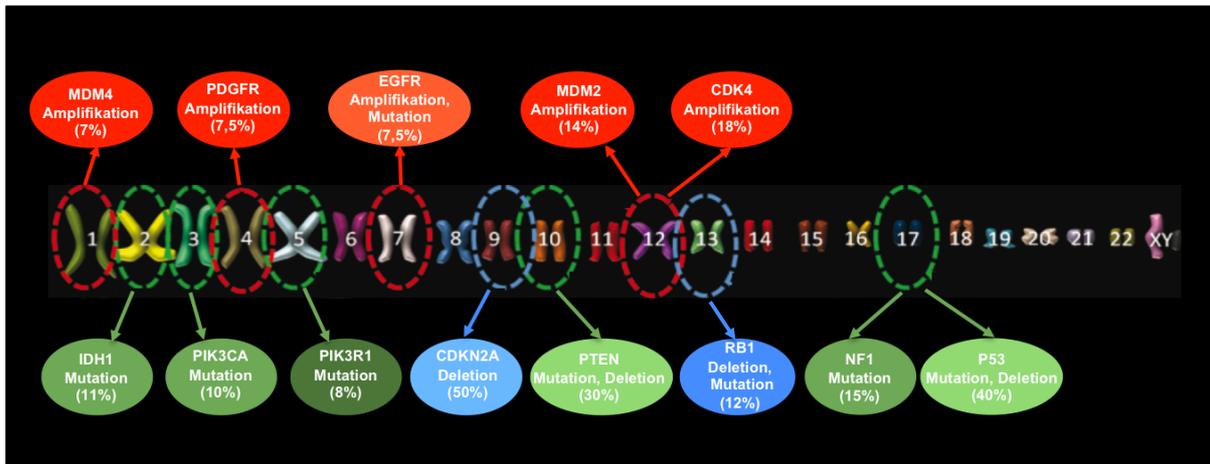


Abb. 1: Genetische Alterationen im humanen Glioblastom modifiziert nach Belden 2011¹²

Diese Abbildung stellt die am häufigsten auftretenden genetischen Alterationen in humanen Glioblastomen dar angegeben mit prozentualen Häufigkeiten für das entsprechende Gen. Das typische Glioblastom weist durchschnittlich bis zu 60 verschiedene genetische Veränderungen auf. Rote Kreise = Amplifikation des Gens, grüne Kreise = Mutationen, blaue Kreise = homozygote Deletionen. Hellere Farben der Kreise signalisieren höhere Häufigkeit der genetischen Veränderungen. **PI3K** = Phosphatidylinositol 3-Kinase, **PIK3R1** = Phosphatidylinositol 3-Kinase-Regulatorische Untereinheit, **PIK3CA** = Phosphatidylinositol 3-Kinase-Katalytische Untereinheit, **PTEN** = Phosphatase tensin homolog on chromosome 10, **P53** = Protein 53, **CDKN2A** = Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, **CDK4** = Cyclin-dependent kinase 4, **RB1** = Retinoblastoma 1, **MDM2** = murine double minute 2, **MDM4** = murine double minute 4, **NF1** = Neurofibromatose 1, **EGFR** = Epidermal growth factor receptor, **PDGFR** = Platelet-derived growth factor receptor, **IDH1** = Isozitrat-dehydrogenase 1.

2.3 Histopathologische Kriterien des Glioblastoms

Prinzipiell existieren verschiedene Klassifikationsysteme zur Einstufung von Tumoren des zentralen Nervensystems. In der Praxis durchgesetzt haben sich die von der WHO definierten Kriterien, die eine Differenzierung von glialen Tumoren in Astrozytome, Oligodendrogliome und Oligoastrozytome vornimmt. Die infiltrativen glialen Tumore werden ferner von Grad 2 bis 4 in ihrer Malignität bewertet, wobei Grad 2 benigne Tumore und Grad 4 die aggressivsten bezeichnet. Das Glioblastom ist hiernach ein anaplastischer, diffus infiltrierender Grad 4 Tumor. Es ist entweder von astrozytärer oder oligodendroglialer Herkunft oder kann sogar aus beiden Zelltypen hervorgehen. Diese Tumore entstehen häufig de novo oder entwickeln sich im Sinne einer progredienten Tumorzellendifferenzierung aus einem niedriggradigen Gliom.

Charakteristisches Kennzeichen für das histologische Bild des Glioblastoms ist ein starker Zellpolymorphismus, eine hohe Zelldichte, eine erhebliche Mitoserate, regressive Umwandlungen, Nekrosezonen vor allem zentral mit umgebenden Palisadenzellen und eine massive mikrovaskuläre Proliferation mit glomerulumartigen Formationen, die für diese Tumorentität pathognomonisch sind^{13,14}. Das hohe Potential

zur Neovaskularisation und Ausbildung einer enormen mikrovaskulären Gefäßdichte ist eines der charakteristischen Merkmale des Glioblastoms und gleichzeitig ein entscheidendes Differenzierungsmerkmal zu den niedriggradigeren Gliomen^{15,16}. Die Forschungsergebnisse zahlreicher Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahrzehnten umfassend demonstriert, dass die hohe mikrovaskuläre Gefäßdichte als Resultat der hochaktiven Tumorangio-genese nicht nur histologisches Kriterium des Glioblastoms ist, sondern auch als prognostischer Indikator für die mittlere Überlebenszeit gewertet werden kann¹⁷.

2.4 Derzeitiger Therapiestandard für das Glioblastom

Nach der aktuellsten Literatur (Januar 2013), besteht das Standardprozedere bei Patienten mit einem neu diagnostizierten, nicht vorbehandelten Glioblastom aus einem extensiven neurochirurgischen Eingriff zur Zytoreduktion und Biopsieentnahme zwecks histologischer Diagnosesicherung¹⁸. Moderne intraoperative Radikalitätskontrollen und Neuronavigationsverfahren sind heute fester Bestandteil der operativen Strategie.

Die sich unmittelbar anschließende Kombinationstherapie aus Chemotherapie und Bestrahlung setzt sich zusammen aus einer sechswöchigen fraktionierten Radiatio mit einer Gesamtdosis von 60 Gy (2 Gy/ 5 Tage/Woche über 6 Wochen) gepaart mit einer simultanen täglichen Chemotherapie mit Temozolomid in einer Dosierung von 75mg/m² für 42 Tage. Nach einmonatiger Pause und bildgebender Kontrolle mittels Kontrastmittel-MRT, folgen weitere 6 Zyklen Chemotherapie mit Temozolomid in einer Dosierung von 150 bis 200mg/m² für 5 Tage in einem 28 Tage Zyklus¹⁹.

Ohne jegliche Behandlung würden die meisten Patienten an dieser aggressiven, schnell wachsenden Tumorerkrankung innerhalb von ca. drei Monaten versterben¹⁸. Eine alleinige chirurgische Intervention kann die Überlebenszeit auf max. zehn Monate verlängern¹⁸. Dieses Intervall kann additiv durch eine adjuvante Radiatio auf durchschnittlich 12 Monate verlängert werden¹⁸. Erstmalig konnte 2005 durch die Arbeitsgruppe um Roger Stupp in einer klinischen Studie demonstriert werden, dass die Kombination aus Temozolomid (1999 zugelassenes Chemotherapeutikum) und fraktionierter Bestrahlung eine verbesserte Gesamtüberlebenszeit von durchschnittlich 15 Monaten sowie eine 2 Jahres-Überlebensrate von 27% der Patienten bewirkt⁵. Dieser Erfolg ist nach wie vor unbefriedigend, verglichen mit den therapeutischen Optionen bei anderen Tumorerkrankungen.

Die bislang noch unbefriedigenden Ergebnisse im Hinblick auf das Überleben und die bis dato nicht zu vernachlässigende Mortalität des Glioblastoms geben weiterhin Anlass für die intensive Suche nach neueren zielgerichteten und tumorbiologie-adaptierten therapeutischen Strategien zur Behandlung des Glioblastoma multiforme.

2.5 Angiogeneseinhibition in der Glioblastom Therapie

2.5.1 Malignitätskriterium Angiogenese

Anschluss an das umgebende Gefäßsystem zu gewinnen ist eine essentielle Voraussetzung für die Expansion und die Metastasierung von Tumorzellagglomeraten. Man kann sagen, der Prozess der Tumorangiogenese ist für den Tumor überlebensnotwendig. Nach Hanahan und Weinberg gehört die Angiogenese neben invasivem Potenzial, Metastasierung, Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Faktoren, autonomer Zellproliferation mit Evasion von Apoptose und unbegrenztem replikativem Potenzial zu den malignitätskennzeichnenden Eigenschaften²⁰. Per definitionem handelt es sich bei der Angiogenese um die Bildung von neuen Blutgefäßen aus bereits existierenden Gefäßen, sogenannte „sprossende Angiogenese“²¹.

Weitere Mechanismen, die zur Bildung von neuen Blutgefäßen führen sind zum einen die Vasculogenese, die die de-novo Formation von Blutgefäßen aus Angioblasten (=Vorläuferzellen) bezeichnet und vor allem bei der Entwicklung des primären embryonalen Gefäßsystems eine Rolle spielt²¹. Ferner entstehen neue Gefäße auch durch sog. Intussuszeption oder durch den Prozeß des sog. Vascular Mimicry. Bei der intussuszeptiven Angiogenese entstehen durch Teilung eines bestehenden Gefäßes mit Erhalt der Basalmembran neue Gefäßabschnitte²¹. Der Vorgang des „Vascular Mimicry“ charakterisiert das Phänomen, dass Tumorzellen „Gefäßkanäle“ formieren und Endothelzellen imitieren, bzw. auch Mosaikgefäße mit einem Nebeneinander von Endothelzellen und Tumorzellen formieren können²¹. Die größte Aufmerksamkeit gilt in dieser Arbeit der Angiogenese, da sie in der Glioblastomgenese und –progression durchweg primordiale Bedeutung besitzt. Die angiogenen Stimuli, die zu einem Aussprossen von Endothelzellen aus präexistenten Kapillaren führen, um neue Gefäße zu formieren, sind vielfältig. Einer der stärksten Stimuli ist die Gewebehypoxie. Es folgt die Ausschüttung von zahlreichen angiogenen Faktoren, dessen prominentester Vertreter ohne Zweifel VEGF ist, der Vascular Endothelial Growth Factor. Erstmals wurde dieser Faktor 1971 von Prof. Judah Folkman, dem Pionier auf dem Gebiet der

Tumorangiogenese, als TAF (=Tumor Angiogenesis Factor) bezeichnet. Als einer der Pioniere auf dem Gebiet der Tumorangiogenese stellte er die fundamentale Hypothese auf, dass Tumorwachstum nur in Abhängigkeit von der Neubildung von Blutgefäßen möglich ist und eine effektive Tumorthherapie durch geeignete Angiogeneseinhibitoren sichergestellt werden könnte²².

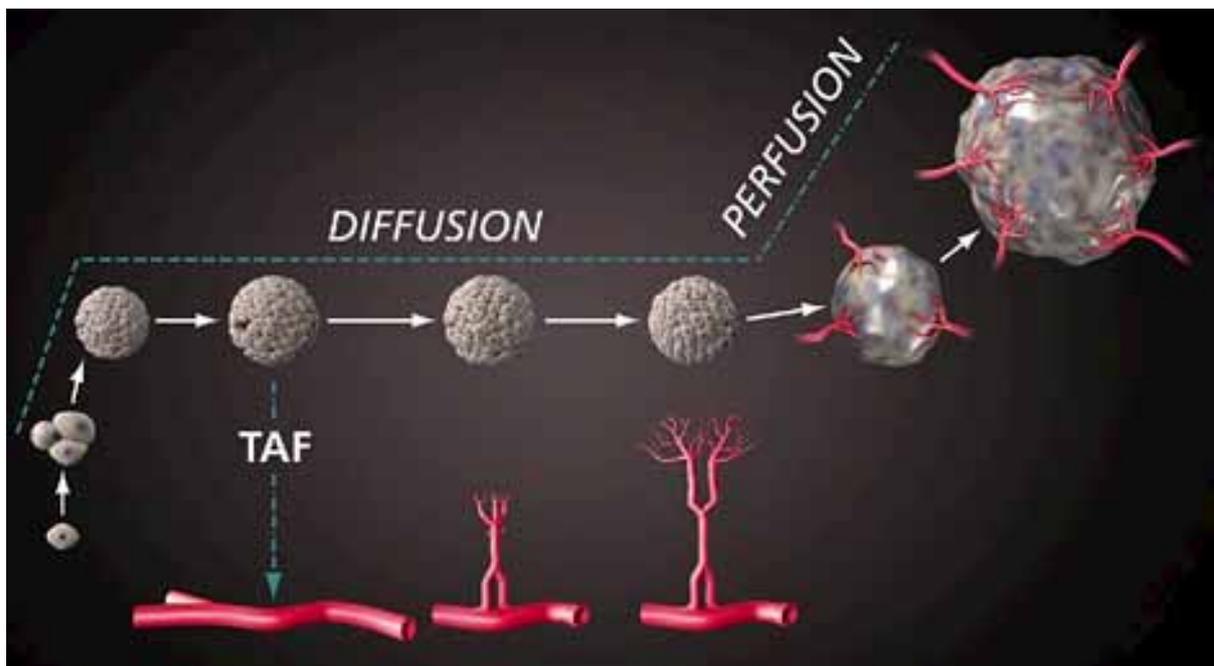


Abb. 2: Phasen des Tumorwachstums in Abhängigkeit von Angiogenese modifiziert nach Folkman²²

2.5.2 Der angiogene Schalter

In seiner Arbeit formulierte er, dass Tumorzellagglomerate bis zu einer Größe von wenigen Kubikmillimetern, d.h. zwei bis drei mm^3 , ihren Nährstoff- und Sauerstoffbedarf durch Diffusion decken können²³. Ist die Distanz für eine ausreichende Oxygenierung und Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen im weiteren Verlauf des Wachstums schließlich zu groß, verharrt der Tumor in einem „Dämmerzustand“, dem sog. Tumor Dormancy State²⁴. Das bedeutet, dass die Zellen nun in einem Gleichgewicht untergehen und proliferieren, aber keine Verbindung an das umgebende Gefäßsystem besitzen. Tumoren können jahrelang in diesem Dämmerzustand verweilen und besitzen in diesem Stadium noch keinen eigentlichen Krankheitswert²⁴. Sobald die Tumorzellen die Fähigkeit erhalten, angiogene Prozesse zu induzieren, wird das Tumorwachstum durch den hohen Vaskularisationsgrad exponentiell schneller und eine Metastasierung kann stattfinden. Man geht davon aus, dass die Tumorzellen im Dämmerzustand einer

dauerhaften genetischen Reprogrammierung ausgesetzt sind²⁴. Genomweite molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass vorrangig die funktionell mit Angiogenese assoziierte Genkategorie davon betroffen ist²⁵. Das Ereignis des Umschaltens eines Tumors auf einen angiogenen, rapide wachsenden Phänotyp wird mit dem Begriff „angiogener Schalter“ (=angiogenic switch)^{23,24,26} beschrieben. Das Phänomen des „angiogenen Schalters“ beruht auf einer Aufhebung des Gleichgewichts zwischen proangiogenen und antiangiogenen Faktoren wie es im gesunden Gewebe unter physiologischen Bedingungen vorherrscht. Im adulten Organismus kommt es nur selten unter besonderen Bedingungen wie beim weiblichen Zyklus oder im Rahmen der Schwangerschaft, sowie bei Prozessen der Wundheilung und Entzündung zur Induktion von Neoangiogenese, also zur Verschiebung des streng regulierten Faktorengleichgewichts in Richtung proangiogen.

2.5.3 Veränderte Gefäßstruktur im Glioblastom

Der „angiogene Schalter“ (angiogenic switch) im Glioblastom führt allerdings nicht zu einer effizienten Angiogenese mit Ausbildung eines normalen, hochspezialisierten Gefäßsystems, wie es für die Kapillaren des zentralen Nervensystems mit einer komplexen Blut-Hirn-Schranke typisch ist. Die initial durch massive Hypoxie angestoßene Tumoriangiogenese resultiert in einer chaotischen Gefäßarchitektur, welche sich in vielerlei Hinsicht von der Beschaffenheit normaler Kapillaren unterscheidet. Die Gefäße verlaufen häufig stark geschlängelt, was man auch als Tortuositas bezeichnet, und weisen häufig extreme Kaliberschwankungen auf. Das vermehrte Auftreten von Shunts zwischen den Tumorgefäßen, resultiert in einer veränderten Mikrohämodynamik des Tumors mit ineffizienter Perfusion und inadäquater Oxygenierung²⁷. Die hoch permeablen Kapillaren eines Glioblastom weisen in der Regel starke Abnormalitäten ihrer endoluminalen Endothelauskleidung auf, die oft lückenhaft sein kann mit Abnormalitäten im Basalmembranaufbau und der Perizytenummantelung²⁷. Durch das Fehlen einer hoch abdichtenden Endothelzellschicht kommt es zur Extravasation von Flüssigkeit und konsekutiv zu einem erhöhten interstitiellen Druck²⁷. Dies wiederum wirkt sich sowohl negativ auf die Durchblutung, als auch auf die Penetration von Medikamenten ins Tumorgewebe aus²⁸. Außerdem fördern diese vaskulären Veränderungen die Migration von Tumorzellen in die Zirkulation und eine hämatogene Metastasierung²⁷.

2.5.4 Schlüsselmoleküle der Angiogenese: VEGF-VEGF-Rezeptorsystem

Bei der Identifikation von Botenstoffen, die in der Tumorangio-genese involviert sind, kommt VEGF eine besondere Bedeutung zu. VEGF wurde ursprünglich von Dvorak et al. 1983 als vaskulärer endothelialer Permeabilitätsfaktor (VPF) beschrieben, da er zu einer erheblichen Steigerung der Gefäßpermeabilität führte^{29,30}. Desweiteren wurde VEGF bisher als potentester Endothelzell-Wachstumsfaktor definiert, der eine Proliferation und eine Migration von Endothelzellen induziert³⁰. Zu dem gut erforschten VEGF-VEGFR- System gehören als Liganden VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E sowie PlGF (Placental growth factor), die an ihre spezifischen Rezeptoren binden. Es wurden drei wichtige Rezeptoren für diese Liganden charakterisiert, die alle in die Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehören und vorwiegend auf vaskulären Endothelzellen und Lymphgefäßendothelzellen lokalisiert sind: VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3²¹. VEGF-A ist ein diffusionsfähiges Molekül, das seine Effekte fast ausschließlich auf Endothelzellen ausübt und sowohl mitogene als auch chemotaktische Eigenschaften für Endothelzellen besitzt²¹. Die durch VEGF erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität führt zu einer extravasalen Freisetzung von Flüssigkeit und Plasmaproteinen, sowie zur Migration von Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix²¹. Im Glioblastom führt das von den Tumorzellen gebildete VEGF, dessen Expression hier typischerweise signifikant hochreguliert ist, zum Verlust der Integrität und der Funktion der Blut-Hirn-Schranke. Die zum Teil bis auf das 50-fach erhöht gemessenen VEGF-mRNA-Konzentrationen im Glioblastomgewebe verglichen mit normalem Hirngewebe zeigen eine enge Korrelation mit einer Überexpression von VEGF-Rezeptoren vom Typ 1 und 2, die interessanterweise in direkter Nachbarschaft zu den pathognomonischen Nekrosenzonen mit palisadenartig angeordneten Tumorzellen auftritt^{31,32}. Direkte Konsequenz dieser VEGF-vermittelten Barrierefunktionsstörung beginnend in den nekrotischen Arealen ist folglich ein vasogenes Gehirnödem mit einem konsekutiv erhöhten intrakraniellen Druck aufgrund der fehlenden Dehnbarkeit der Schädelkalotte. Die Patienten fallen häufig erst durch Hirndrucksymptomatik im Sinne von fokal-neurologischen Defiziten, sekundär generalisierten epileptischen Anfällen und vernichtenden Kopfschmerzen auf. Mehrere Arbeiten haben ferner gezeigt, dass die intratumoralen VEGF-Konzentrationen mit dem histologischen Malignitätsgrad des Glioms korrelieren^{33,34}.

Die elementare Bedeutung von VEGF für das Überleben von Endothelzellen, besonders auch in der embryonalen Vaskulogenese, ist durch Studien mit VEGF-

Knockout-Mäusen von Carmeliet und Ferrara aus den neunziger Jahren belegt³⁵. Die gezielte Ausschaltung von VEGF-A während der Embryonalentwicklung von Mäusen führte zu schweren Vaskularisationsdefekten mit letalem Ausgang meist an Embryonntag 11/12 auch bei heterozygoter Ausschaltung³⁵⁻³⁷. Eine differente Ausprägung des VEGF-A Gens konnte identifiziert werden, da verschiedene Isoformen des Moleküls mit unterschiedlichen Molekulargewichten nachgewiesen wurden. Vier Isoformen, die durch alternatives Splicing auf mRNA-Ebene entstehen und sich in der Anzahl ihrer Aminosäuren unterscheiden, konnten bis heute identifiziert werden: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆. VEGF₁₆₅ ist dabei die im humanen Gewebe am häufigsten vorkommende Form³⁸. In humanem Glioblastomgewebe konnten VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, nicht jedoch VEGF₂₀₆ nachgewiesen werden³⁸. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Möglichkeiten zur Interaktion mit der extrazellulären Matrix und ihren Affinitäten zum Neuropilin-Rezeptor-1: VEGF₁₂₁ ist löslich und bindet nicht an Heparin³⁹. Die Isoformen VEGF₁₆₅ und VEGF₁₈₉ besitzen zunehmend basische Eigenschaften und binden an Heparin. VEGF₁₆₅ ist bezüglich seiner permeabilitätssteigernden Wirkung 50000fach stärker als Histamin und andere Entzündungsmediatoren²¹.

Die Signaltransduktion durch VEGF wird vorwiegend über drei Tyrosinkinase reguliert: flt-1 (*fms-like receptor tyrosine kinase, VEGFR-1*), Flk-1/KDR (*fetal liver kinase/kinase insert domain containing receptor, VEGFR-2*), flt-4 (*fms-like receptor tyrosine kinase 4, VEGFR-3*). Die Rezeptoren VEGFR-1 und -2 werden selektiv, aber nicht ausschließlich auf aktivierten Endothelzellen exprimiert²¹. VEGFR-1 ist ein positiver Regulator der Makrophagenmigration und kann außerdem das Ausmaß der VEGFR-2 Signalgebung durch seine lösliche Rezeptorform, sVEGFR-1, maßgeblich positiv wie negativ dirigieren. VEGFR-2 fungiert bei Bindung des Liganden VEGF-A als wichtigster positiver Signalübermittler für die endotheliale Zellproliferation und Zelldifferenzierung⁴⁰. VEGFR-3 ist sowohl in die Angiogenese als auch besonders in die Lymphangiogenese involviert. Die Aktivierung des VEGFR-3 durch den Liganden VEGF-C konnte in mehreren soliden Tumoren nachgewiesen werden und potenziert die zelluläre Mobilität und die proinvasiven Eigenschaften der entarteten Zelle⁴¹. VEGF vermittelt vor allem über seine Isoform VEGF₁₆₅ über weitere Rezeptoren, den sog. Neuropilinen, weitere Effekte. Neuropiline (NP) spielen eine Rolle in der Entwicklung des neuronalen Netzwerks und der axonalen Ausbreitung, aber offensichtlich auch bei der Tumorprogression und Tumorangiogenese³⁹. Gen-knock-out-Versuche konnten

demonstrieren, dass die Deletion von VEGFs, VEGFRs und NPs in fast allen Fällen zum embryonalen Tod führt²¹. Dies beleuchtet zwar einerseits wieder die Schlüsselposition des VEGF-VEGFR-Systems im komplexen Prozess der Angiogenese, andererseits muss jedoch konstatiert werden, dass andere Systeme ebenfalls von großer Bedeutung dafür sind. Das Ausschalten nur eines Faktors kann die Angiogenese nicht vollständig blockieren.

2.5.5 Gefäßstabilisierung durch PDGF und seinen Rezeptor

Ein weiterer Vertreter der Familie der Wachstumsfaktoren, der eine wichtige Rolle in der tumorassoziierten Tumorangiogenese einnimmt, ist der Platelet Derived Growth Factor, PDGF. Ursprünglich wurde er aus humanem Blutserum isoliert und als mitverantwortlich für die Proliferation von glatten Muskelzellen in Arteriolen angesehen⁴². PDGF besitzt ein breites Funktionsspektrum und wird in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert. Schon früh konnte die funktionelle Partizipation in der Tumorgenese und an angiogenen Prozessen nachgewiesen werden^{43,44}. Auch unter physiologischen Bedingungen kommt PDGF eine essentielle Bedeutung in der Gewebemöostase, der Skelettentwicklung sowie der ZNS-Reifung zu⁴⁵. Eine Überexpression von PDGF und seinen Rezeptoren konnte bisher schon in multiplen Tumorentitäten beobachtet werden, zu denen eine Vielzahl von Tumoren des zentralen Nervensystems gehören: Sarkome, Keimzelltumore und einige Typen von gastrointestinalen Neoplasien⁴². Insbesondere gut etabliert aus vielzähligen Untersuchungen ist die Vorstellung, dass der PDGF-Signalweg eine wichtige Rolle in der Gliomentwicklung spielt.

Zur PDGF-Familie gehören die vier Liganden PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D sowie ihre zwei Rezeptoren, PDGF-alpha und PDGF-beta.

PDGF zeigt einen dimeren Aufbau und besteht aus zwei Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind⁴⁵. Es existieren zwei Isoformen der Untereinheiten, eine α - und eine β -Kette, die eine Homologie in der Aminosäuresequenz aufweisen. Das komplett prozessierte PDGF-Protein kann daher strukturell als PDGF- $\alpha\alpha$, PDGF- $\alpha\beta$ oder PDGF- $\beta\beta$ vorkommen⁴⁵. Die PDGF-Rezeptoren gehören ebenfalls zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase mit Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden, die z.B. über MAPK (=Mitogen-activated-protein-kinase), PI3K (=Phospho-Inositol-3-Kinase), SRC (=Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src) oder PLC γ (=Phospholipase C-gamma) vermittelt werden. Die

Rolle von PDGF sowohl in der Vaskulogenese als auch der Angiogenese ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In Versuchen mit transgenen Mäusen konnte demonstriert werden, dass ein Defekt der PDGF-B Synthese einen Mangel an mikrovaskulären Perizyten zur Folge hat⁴⁶. Diese stellen einen wichtigen Bestandteil der intakten Kapillarwand dar und haben einen stabilisierenden Effekt auf das Gefäß^{46,47}. PDGF-B-defiziente Mäuse sterben während der Embryonalzeit an weitreichenden mikrovaskulären Defekten wie Mikroaneurysmata und ubiquitärer Gefäßdilatation⁴⁶. Die parakrine Kommunikation zwischen Endothelzellen und Perizyten ist entscheidend für die Entstehung stabiler Gefäße während der Embryonalentwicklung. Betsholtz et. al konnten vor einigen Jahren zeigen, dass Endothelzellen PDGF-B sezernieren und mit PDGFR- β exprimierenden Perizyten interagieren⁴⁸. PDGF-B fördert die Proliferation von Perizyten-Progenitor-Zellen und deren Migration⁴⁸. In den meisten Geweben PDGF-B oder PDGF- β defizienter Mäuse ist die Perizytenassoziation der Gefäße drastisch reduziert⁴⁹. Die Endothelzellen von aussprossenden Kapillaren in den PDGF-B-defizienten Mäusen konnten keine Perizytenvorläuferzellen anlocken⁴⁹. Die mangelnde Perizytenrekrutierung führte in den Versuchen zu vaskulärer Instabilität und Gefäßregression⁵⁰. In neueren Studien konnte demonstriert werden, dass unter besonderen Konditionen von PDGF-vermittelter Angiogenese, VEGF als negativer Regulator die Perizytenrekrutierung inhibieren kann, wodurch eine Gefäßinstabilität entsteht oder eine Regression neu entstehender Kapillaren erfolgt. Die Endothelzellen neuer Gefäßsprossen bilden VEGF, welches über VEGFR-2-Aktivierung und unter VEGFR-2/PDGFR- β -Komplexbildung den PDGFR- β -Signalweg supprimiert. Andererseits ist in vielen Arbeiten schon gezeigt worden, dass VEGF unter hypoxischen Bedingungen direkt die Proliferation und Migration von Perizyten induziert und diese über Interaktionen mit Endothelzellen, z.B. durch VEGF-Sekretion deren Überleben steuern⁵¹.

Aus der Literatur geht hervor, dass vor allem beim Glioblastom die häufig vorherrschenden genetischen Alterationen den PDGF -Signalweg betreffen. Lokker et al. fanden eine Hochregulation der PDGF-D und PDGFR Expression in Glioblastomzelllinien und primärem Glioblastomgewebe, wohingegen normales Hirngewebe keine oder wenig Expression dieser Proteine aufwies⁵². Eine Blockade des PDGF/PDGFR-Signalweges hatte eine Inhibition von Signalwegen, die das Überleben der Gliomzellen steuern, zur Folge und konnte in vivo die Glioblastomentwicklung verhindern⁵². Die Behandlung mit einem potentem PDGFR-Kinase-Inhibitor zeigte eine

signifikante Reduktion des Tumorwachstums in Gliomzellen, die mit PDGF transfiziert worden waren⁵². Eine PDGF-Überexpression zählt zu den häufigen genetischen Alterationen in Gliomen und ist mit Tumorprogression korreliert⁵³. Es konnte gezeigt werden, dass eine höhere PDGF-Expression des Glioms mit einem höheren Malignitätsgrad nach WHO und einer schlechteren Prognose einhergeht⁵³. Desweiteren gibt es viele Hinweise dafür, dass die Hochregulation der mRNA von PDGFR und seiner Liganden häufig mit einem Verlust des P53-Tumorsuppressorsgens assoziiert ist⁴². Diese genetische Veränderung ist besonders charakteristisch für sekundäre Glioblastome. Durch autokrine und parakrine Stimulation fördert die hoch PDGF-exprimierende Gliomzelle ihre eigene Proliferation sowie von benachbarten Tumorzellen. PDGF treibt die Angiogenese voran, unterstützt das spezifische Tumormikromilieu, kann die Differenzierung glialer Zellen inhibieren und die Aktivität bzw. Proliferation von Tumorstammzellen, den sog. CSC, induzieren. Dies ist hinreichend Evidenz für die substanzielle Rolle des PDGF-Signalwegs in der Gliomgenese und –progression. Die Inhibition dieser Signalkaskade stellt daher einen erfolgsversprechenden Ansatz in der Therapie des Glioblastoms dar, der sich an Tumormodellen auch bereits im Jahr 2000 mit Imatinib demonstrieren ließ⁵⁴.

2.5.6 Tie-Rezeptoren und Angiopoetine

Ein weiteres System mit wesentlicher Bedeutung in der Angiogeneseforschung ist das Angiotensin/Tie-System. Es ist verantwortlich sowohl für die Entstehung neuer Blutgefäße als auch für deren spätere Umstrukturierung und stellt die Integrität des entstandenen Gefäßbettes her. Allerdings ist das Tie/Ang- System bisher auf molekularer Ebene nicht präzise verstanden und das therapeutische Potenzial einer Modulation in diesen Signaltransduktionswegen noch nicht ausreichend validiert²¹.

Die Rezeptoren Tie-1 und Tie-2 gehören ebenfalls zu den Rezeptortyrosinkinasen, wobei nach Rezeptoraktivierung die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase(PI3K)-Signaltransduktion die wichtigsten Tie-2 abhängigen Effekte vermittelt. Als Liganden für die Tie-Rezeptoren wurden die Angiopoetine Ang-1 bis Ang-4 identifiziert. Ferner sind Ang-1 und Ang-2 die bestuntersuchten Angiopoetine, deren ausbalanciertes Wechselspiel der Aktivierung von Tie-2 die Gefäßbetthomöostase reguliert. Ang-1 und Ang-2 binden an Tie-2 mit gleicher Affinität.

Tie-2 liegt im ruhenden Gefäßbett des adulten Organismus phosphoryliert vor, was die Integrität des Gefäßbetts aufrecht erhält und das Überleben der Endothelzellen

sicherstellt. Die Gefäße sind stabil, impermeabel, antiadhäsiv und antithrombotisch⁵⁵. Eine Bindung von Ang-1 an Tie-2 induziert die rasche Rezeptorautophosphorylierung in Endothelzellen und führt somit zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Die distal in der Signalkaskade induzierten Effekte durch den aktivierten Tie-2-Rezeptor steuern Endothelzellüberleben, Gefäßstabilität, Endothelzellmigration und verminderte Thrombogenität⁵⁵. Ein wichtiger Regulator der Tie-2 abhängigen Signalwege ist Ang-2. Ang-2 inhibiert die Tie-2-Autophosphorylierung durch Ang-1 und wirkt somit als Tie-2-Antagonist. Ang-2-mRNA wird nur in angiogen aktiven Endothelzellen und nicht im ruhenden Gefäßbett exprimiert⁵⁶. Ang-2 wird nach Aktivierung von Endothelzellen z.B. durch Histamin innerhalb kürzester Zeit von diesen sezerniert und kann das benachbarte Endothel weitergehend aktivieren und für angiogene Zytokine suszeptibel machen. Die transkriptionelle Regulation von Ang-1 ist relativ moderat verglichen mit anderen Signalmolekülen, die in der Angiogenese und bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielen. Daraus lässt sich ableiten, dass Ang-1 weitgehend konstitutiv exprimiert wird. Im Gegensatz dazu ist die Expression von Ang-2 durch zahlreiche negative und positive Transkriptionsfaktoren strikt reguliert²¹. Wichtige Regulatoren sind beispielsweise proangiogen wirkende Faktoren VEGF, FGF und HIF-1 α , die eine Hochregulation der Expression bewirken²¹.

Die Expression von Ang-1 und Ang-2 mRNA kann in normalem Gehirngewebe nicht nachgewiesen werden. In den Gefäßen von Gliomen wurde aber eine vermehrte Expression der Tie-2-Rezeptor und Ang-2-mRNA beobachtet, während die Tumorzellen selbst Ang-1 verstärkt exprimieren⁵⁶. Im Gliom entfaltet hochreguliertes Ang-1 eine stark angiogene Wirkung, welche durch die Rekrutierung von Perizyten, glatten Muskelzellen und endothelialen Progenitorzellen vermittelt wird. Im experimentellen Gliom führte Ang-1 Überexpression zu verstärktem Wachstum und hohem Vaskularisationsgrad der Tumore. Ganz und gar gegensätzlich wirkt sich eine experimentell-induzierte Ang-2-Überexpression in Gliomxenografttumoren aus, welche zu einer Inhibierung der Vaskularisierung und konsekutiv des Tumorwachstums führte⁵⁷. Desweiteren scheint die Ang-2-Überexpression von Endothelzellen eine Dissoziation der ortständigen Perizyten mit konsekutiver Gefäßdestabilisierung zu induzieren und in reduzierter Perizytenbedeckung existenter Gefäße zu resultieren. Diese Beobachtungen konnten an der Retina von transgenen Mäusen, die Ang-2 überexprimieren, bestätigt werden⁵⁸.

2.5.7 DLL-4/NOTCH1 Signalgebung: Gefäßsprossen und „Tip-Zellen“-Regulation

Delta-like ligand 4 (=DLL-4) gehört zur Familie der Delta/Jagged Liganden, die an Notch-Rezeptoren binden. Die Signalvermittlung über DLL-4/Notch ist in ZNS-Entwicklung und angiogenetische Prozesse involviert. Die vermittelten Effekte gehören vor allem in den Bereich Zellüberleben, -proliferation und-differenzierung⁵⁹. Endothelzellen, die durch DLL-4-Signale aktiviert werden, zeigen eine verminderte Expression von VEGFR2 und seines Co-Rezeptors NRP-1, was in der Folge eine Inhibition des VEGF-Signalwegs bedeutet²⁷. Die Formation von „Tip-Zellen“, den entscheidenden Zellen endothelialer Sprossen, wird maßgeblich über die Aktivierung des DLL-4/Notch Signalweg reguliert⁶⁰. Eine Hochregulation von DLL-4 führt zu einer reduzierten Anzahl von Tipzellen, während sein Mangel, z.B. induziert durch anti-DLL-4-Antikörper, die Bildung von Tipzellen erhöht^{59,60}. In tumorassoziierter Angiogenese findet man eine Hochregulation von DLL-4⁶¹. Zwei unabhängige Forschungsteams haben in Tumormodellen deutlich demonstriert, dass die Blockade von DLL-4 durch Antikörper oder Fc-Fragmente das Tumorwachstum reduzieren kann^{62,63}. Gleichzeitig nahm die Anzahl der Tumorgefäße in diesen Versuchen zu. Diese waren jedoch nicht funktional im Vergleich zu den Kontrolltumorgefäßen mit DLL-4-Aktivität^{62,63}. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass durch ein Fehlen von DLL-4 die Tumorangio-genese fehlreguliert wird. Therapiestrategien, die eine Inhibition von DLL-4 und VEGF kombinieren, wiesen in einigen Tumormodellen additive Effekte auf⁵⁹.

2.5.8 Bedeutung von antiangiogenen Therapiestrategien beim GBM

Die Abhängigkeit maligner Neoplasien von einer adäquaten Vaskularisierung zur Tumorprogression und Metastasierung, bildet das wissenschaftliche Fundament für den klinischen Einsatz von Angiogeneseinhibitoren. Die Erfolge, die mit antiangiogenen Therapieansätzen, v.a. mit Inhibitoren der VEGF/VEGFR-Signalkaskade und Multikinase-Inhibitoren in den letzten Jahren erzielt werden konnten, stellen einen bedeutenden Fortschritt und eine wichtige Erweiterung der onkologischen Therapieoptionen dar. Nach mehr als 30 Jahren wird dadurch die von Prof. Folkman formulierte Hypothese, dass Tumorerkrankungen durch antiangiogene Substanzen zu behandeln seien, klinisch bestätigt. Klinische Studien mit antiangiogenen Therapiestrategien konnten bei multiplen Tumorentitäten vielversprechende Resultate bezüglich der Endpunkte Gesamtüberlebenszeit (OS=Overall Survival) und progressionsfreie Überlebenszeit (PFS=Progression-free Survival) demonstrieren²¹.

Dazu gehören besonders das metastasierte kolorektale Karzinom, das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, das Mammakarzinom sowie das Nierenzellkarzinom²¹.

Aktuell basieren die Therapiestrategien von ZNS-Tumoren immer noch vorrangig auf den klassischen Ansätzen der maximalen chirurgischen Resektion kombiniert mit Strahlen- und Chemotherapie¹⁸. Diese Therapieformen zielen primär auf die Minimierung und Destruktion genetisch veränderter Tumorzellen ab. Im Gegensatz dazu behandelt eine antiangiogene Substanz in erster Linie das endotheliale Kompartiment eines Tumors. Dies ist günstig, wenn man bedenkt, dass diese antiendothelialen, systemischen Therapien unabhängig von der Blut-Hirn-Schranke eingesetzt werden können, die aufgrund ihrer selektiven Transporteigenschaften ein beachtliches Hindernis bei der Distribution von Pharmaka ins ZNS darstellt²¹. Außerdem besitzen Endothelzellen im Unterschied zu Tumorzellen ein stabiles Genom, das nicht einem andauernden Selektionsdruck ausgesetzt ist²¹. Damit ist eine Adaptation an ungünstige Bedingungen, eine Selektion stärker malignerer Zellklone und eine Resistenzentwicklung weniger wahrscheinlich. Gesunde Gewebe werden von antiangiogener Therapie dadurch wenig affiziert, da im gesunden adulten Organismus der Umsatz von Endothelzellen sehr gering ist. Angiogeneseinhibitoren entfalten ihre Wirkung vor allem an Orten mit hoher angiogener Aktivität. Limitierend für den durchschlagenden Erfolg einer antiangiogenen Therapie in der Behandlung von Malignomen scheint die Vielfalt an existierenden Resistenzmechanismen zu sein⁶⁴. Die aktuell verfügbaren klinischen Daten suggerieren, dass der bestmögliche Therapieerfolg mit antiangiogenen Wirkstoffen in einer Kombination mit Zytostatika erzielt wird⁶⁵. Folglich, sind alle bisher von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassenen Angiogeneseinhibitoren nur in Kombination mit Chemotherapie einzusetzen, mit der einzigen Ausnahme von Bevacizumab (Avastin) beim Glioblastom⁶⁵.

Aufgrund der Tatsache, dass das Glioblastom zu den gefäßreichsten Tumoren mit hohem Endothelzellumsatz gehört und eine starke Gefäßpermeabilität sowie eine hohe Expression pro-angiogener Signalproteine, wie VEGF, aufweist, macht es den Einsatz von Angiogeneseinhibitoren besonders attraktiv. Unzählige klinische Studien (ca. 119 Studien bei clinicaltrials.gov) mit Einsatz von multiplen antiangiogenen Pharmaka, vor allem VEGF-Blocker und die auch als „small molecules“ bezeichneten Tyrosinkinase-Inhibitoren, werden heute kontrolliert an GBM-Patienten durchgeführt.

Verschiedene Therapieansätze mit unterschiedlichen Zielstrukturen sind untersucht worden, um die Tumorangio-genese zu blockieren. Entweder beruhen sie auf dem Prinzip des direkten Targeting des Liganden, meistens VEGF (z.B. durch monoklonale Antikörper oder lösliche Rezeptoren, sog. „traps“), oder seiner zellmembranständigen Rezeptoren, wobei letztlich beide Ansätze zu einer Unterbrechung der VEGF-vermittelten Signaltransduktion führen²¹. Oder sie gehören zu den auf Multitargeting-basierenden Konzepten, wie z.B. die kleinmolekularen RTK-Inhibitoren, welche simultan mehrere Signalwege intrazellulär blockieren.

Eine der klinisch bisher am wirkungsvollsten eingesetzten Angiogeneseinhibitoren ist Sunitinib (SU, SU11248), der zu den kleinmolekularen RTK-Inhibitoren gehört und verschiedene Tyrosinkinase, jedoch vornehmlich VEGFR und PDGFR, hemmt. Trotz guter klinischer Resultate von Sunitinib als Monotherapie beim Nierenzellkarzinom, konnte ein therapeutischer Effekt einer Sunitinib-Monotherapie beim GBM nicht nachgewiesen werden, obwohl das Medikament die hier typisch alterierten Signalwege inhibiert⁵².

Basierend auf dem Konzept der Chemosensibilisierung durch antiangiogene Therapie besteht die Mehrzahl der aktuellen antiangiogenen Therapiestrategien aus einer Kombination von Angiogeneseblockern mit Chemotherapeutika. Allerdings bleibt noch definitiv zu klären, welches der antiangiogenen Medikamente den idealen Partner für eine Chemotherapie darstellt und welcher Therapiealgorithmus schließlich die höchste Effektivität hervorbringen kann.

Das effektivste Zytostatikum in der GBM-Therapie ist Temozolomid, eine alkylierende Substanz, die in Kombination mit Radiotherapie eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens von Glioblastompatienten gezeigt hat⁶⁶. Derzeit untersucht die GLARIUS-Studie der Uniklinik Frankfurt am Main die klinische Effizienz einer Kombinationstherapie aus Temozolomid und Bevacizumab (Avastin=humanisierter monoklonaler anti-VEGF-Antikörper) bei Glioblastom-Patienten mit unmethyliertem MGMT-Promoter. Auch die zur Zeit laufende AVAglio-Studie untersucht die Wirksamkeit und das Sicherheitsprofil von Bevacizumab in Kombination mit Radiotherapie und Temozolomid-Chemotherapie nach einer Operation oder Biopsie bei Patienten mit neu diagnostiziertem Glioblastom unabhängig vom MGMT-Status. Hier zeigen aktuelle Resultate eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens, wobei endgültige Daten für das Jahr 2013 erwartet werden.

In Konklusion unterstützen diese Daten unsere Annahme, dass eine Kombinationstherapie aus Sunitinib und Temozolomid ebenfalls ein neues erfolgreiches Therapiekonzept für das Glioblastoma multiforme repräsentieren kann.

ZIEL:

In Anbetracht der aktuellen Datenlage zum Thema kombinierte antiangiogene und zytostatische Therapie beim Glioblastom war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die therapeutische Effektivität einer Kombinationstherapie von Temozolomid und Sunitinib am experimentellen Gliom genauer zu untersuchen.

Der antitumorale Therapieeffekt einer solchen Strategie sollte anhand Detektion und quantitativer Analyse von Proliferation, Apoptose und angiogener Aktivität an subkutanen Gliomxenograft-Modellen evaluiert werden. Ergänzend sollten die mikrohämodynamischen Konsequenzen einer kombinierten TMZ/SU-Therapie verifiziert werden.

Unsere Experimente zielten desweiteren darauf ab, den idealen Therapiealgorithmus einer Kombinationstherapie zu identifizieren, um die maximale Therapieeffektivität zu erreichen.

Schließlich sollten die molekularbiologischen Veränderungen in Angiogenese-assoziierten Signalwegen charakterisiert werden, um potenzielle vaskuläre Resistenzeffekte einer kombinierten TMZ/SU zu erkennen.

3. Material und Methoden

Alle Versuchsergebnisse einschließlich der anschließend aufgeführten Methodik sind in Kooperation sowie mit der technischen Hilfe der nachfolgend gelisteten MTA und Mitdoktoranden entstanden und etabliert worden (Irina Kremenetskaia, MTA; Melina Nieminen, MTA; Claire Gehlhaar, MTA; Güliz Parmaksiz, Doktorandin; Simon Bayerl, Doktorand; Miroslav Topalovic, Doktorand; Thomas Broggin, Doktorand). Die behördliche Genehmigung wurde durch Tierversuchsantrag (Aktenzeichen G0003/08) geregelt.

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinien

In unserer Studie wurden die beiden humanen Gliomzelllinien SF126 (Klinik für Neurochirurgie, Mannheim) und U87-MG (ATTC, USA) eingesetzt. Diese Zelllinien sind etabliert für den Einsatz als xenogenes Glioblastommodell in der athymischen Nacktmaus^{67,68}.

Zur Kultivierung der beiden Zelllinien wurde DMEM mit 4,5 g/L Glukosegehalt und 10%igem FCS Zusatz sowie 5%igem Penicillin/Streptomycin Zusatz verwendet.

Die Zellen (SF126, U87-MG) wurden bei 37°C in 5%iger Kohlendioxid-Atmosphäre inkubiert. Ein Mediumwechsel fand regelmäßig alle 24-48 Stunden statt. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 60-80% in 75 cm² großen Zellkulturflaschen.

Zellpassagen wurden zwischen den Versuchsintervallen in Einfriermedium (FCS + 10% DMSO) in stickstofftauglichen Cryoröhrchen in einem Isopropanol-haltigem Gefäß erst 24 Stunden bei -80° C eingefroren und dann in einen Stickstofftank gelagert.

3.1.2 Zellvorbereitung für die subkutane Implantation

Die Zellen hatten am Tag der subkutanen Tumorinokulation eine Konfluenz von ca. 90%. Nach Absaugung des Nährmediums, wurden die Zellen anschließend ein bis zweimal mit 1X PBS gewaschen.

Um die adhärennten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen, wurde anschließend 2 ml Trypsin hinzugegeben (T-75 Flasche) und kurz (1-3 min) bei 37°C inkubiert.

Die Reaktion wurde mit Medium gestoppt und das Zellpellet bei 1300rpm, 7 min lang und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml 1XPBS resuspendiert, nachdem vorher das alte Medium abgesaugt wurde. Die Zellen wurden nun zu jeder Zeit bis zur erfolgten Implantation auf Eis gelagert.

Um die Zellzahl nun mittels Neubauer-Kammer zu bestimmen, wurden 10 µl der Zellsuspension in 0,25%iger Erythrosin B Lösung (Viabilitätsvisualisierung) 1:100 verdünnt, gut gemischt und 7,5 µl der Zählkammer zugeführt.

Nach Errechnung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen pro 100 µl Zellsuspension eingestellt.

3.1.3 Zellvorbereitung für das Rückenhautkammermodell

Die Vorbereitung der Zellen für die Rückenhautkammerimplantation entspricht im Wesentlichen der zuvor beschriebenen Präparationen für das subkutane Modell. Nachdem das Zellpellet durch Abzentrifugieren gewonnen wurde, wurde es auf Eis gelagert und daraus dann später 1,5 µl in die Rückenhautkammer implantiert, das einer Zellzahl von ca. $1-2 \times 10^5$ Zellen entspricht.

3.2 Tierversuche

3.2.1 Versuchstiere

In der vorliegenden Studie wurden CD1 Nu/Nu Mäuse verwendet. Diese Mäuse zeichnen sich durch einen genetischen Defekt aus, der das Fehlen des Thymus bedingt.

Die athymische Nacktmaus besitzt aufgrund der Thymusaplasie keine reifen T-Lymphozyten, was ihr Immunsystem erheblich schwächt. Diese Eigenschaft macht sie zu einem idealen Wirt für xenogene Transplantationen, da keine Abstoßungsreaktion induziert wird.

Die für die Experimente benötigten Tiere wurden bei der Firma Charles River Laboratories erworben.

Die in den Versuchen verwendeten Tiere waren männlich, 7-8 Wochen alt und wogen zu Versuchsbeginn zwischen 25-30 g.

Alle Tiere wurden in apathogenen Barriereräumen mit kontrollierter Luftfeuchtigkeit, Temperatur und 12h Tag/Nacht Rhythmus in Kunststoffkäfigen zu je fünf Tieren gehalten. Wasser und Futter standen den Tieren nach Belieben zur Verfügung.

Im Umgang mit den Tieren wurden stets strenge Hygienevorschriften beachtet. Die weitere Versorgung der Versuchstiere stellten ausgebildete Veterinärmediziner und Tierpfleger sicher.

3.2.2 Medikamente

In unserer Studie kamen die folgenden zwei Wirkstoffe zum Einsatz: der potente Multi-Tyrosin-Kinase-Inhibitor Sunitinib und der zytotoxische Wirkstoff Temozolomid.

Sunitinib wurde uns freundlicherweise von Prof. Ullrich (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt. Temozolomid (Temodal®) wurde in Pulverform von der Firma Tocris erworben.

Die Familie der Rezeptortyrosinkinasen spielt eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion elementarer zellulärer Funktionen, insbesondere der Zellproliferation und –differenzierung. Bei der großen Anzahl der bisher beschriebenen angiogenen Faktoren nehmen Liganden von Rezeptortyrosinkinasen, wie VEGF, PDGF, und FGF eine zentrale Stellung ein. Aus diesem Grund stellen die Rezeptortyrosinkinasen ein attraktives pharmakologisches Angriffsziel für die Entwicklung neuer Angiogeneseinhibitoren dar.

Rezeptortyrosinkinase(RTK)-Inhibitoren, die auch als „small molecules“ bezeichnet werden, zeichnen sich durch multiple Wirkmechanismen aus, da sie ein breites Kinasebindungsprofil haben und somit nicht spezifisch an einem Rezeptor wirken. Dies unterscheidet die RTK-Inhibitoren von monoklonalen Antikörpern, wie Bevacizumab (Avastin®; Antikörper gegen VEGF), die eine wesentlich spezifischere Bindung mit ihrer Zielstruktur eingehen.

Sunitinib (SU11248, Sutent® von Pfizer) weist sowohl potente antiangiogene als auch antiproliferative und proapoptotische Eigenschaften auf. Diese resultieren aus einer selektiven Inhibition von VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- α , PDGFR- β , c-KIT, FLT-3, RET und CSF-1⁶⁹⁻⁷¹.

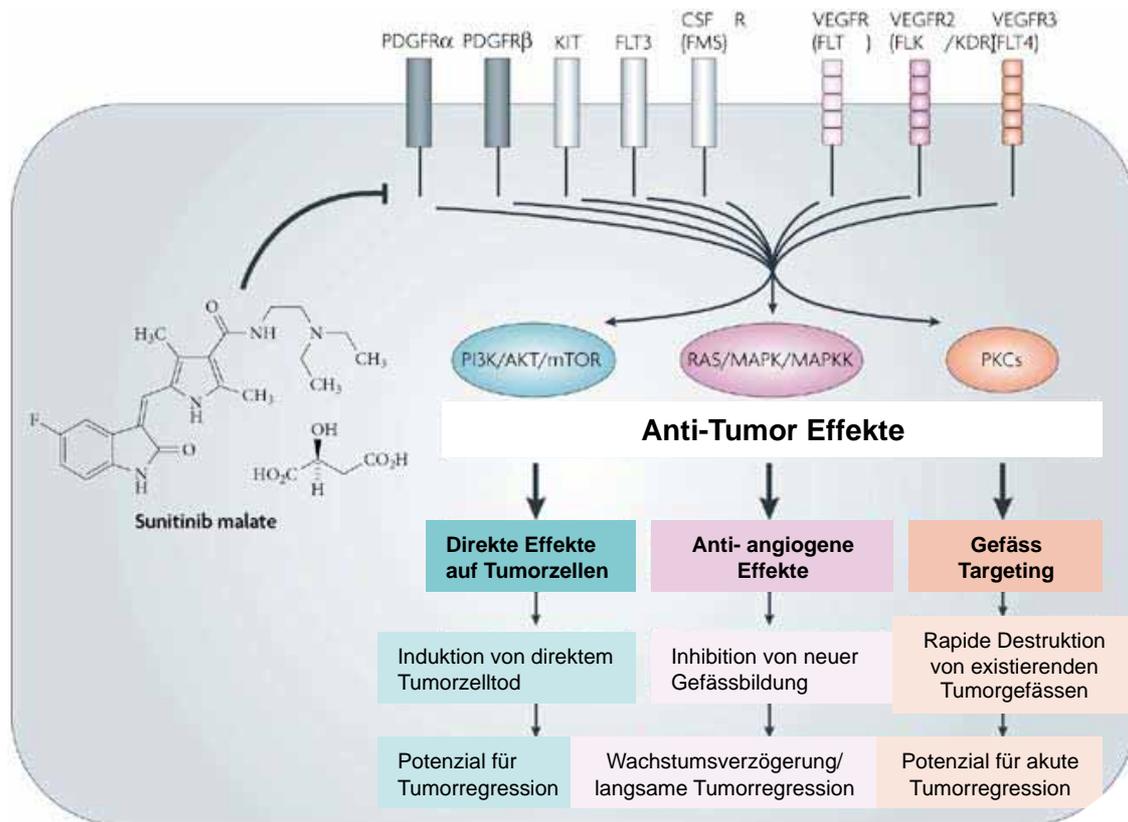


Abb. 3: Eigenschaften von Sunitinib (SU11248) modifiziert nach Faivre 2007⁶⁹

Sunitinib gehört zur Molekülfamilie der Indolinone und hemmt selektiv die Tyrosinkinase VEGFR1-3, PDGFR α / β , KIT, FLT3 und CSFR1 durch kompetitive Inhibition im Bereich der intrazellulären ATP-Bindungsstelle. Die Inhibition dieser Rezeptoren übt multiple Effekte aus auf zelluläre Prozesse wie Tumorzellüberleben, Endothelzellwachstum und -migration, Gefäßpermeabilität und Perizytenrekrutierung. MAPK (mitogen-activated protein kinase), mTOR (mammalian target of rapamycin), PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase), PKC (Proteinkinase C)

Beim zweiten in unserer Studie eingesetzten Wirkstoff Temozolomid handelt es sich um ein alkylierendes Zytostatikum. Temozolomid wird als Standardzytostatikum zur simultanen adjuvanten Therapie von Glioblastomen in Kombination mit Strahlentherapie eingesetzt. In großen multizentrischen randomisierten klinischen Studien zeigte die Kombination von Strahlentherapie und simultanem Temozolomid (75 mg/m²) gefolgt von sechs Zyklen adjuvanten Temozolomid (200 mg/m²) eine Verlängerung der durchschnittlichen Überlebenszeit von 2,5 Monaten (14,6 Monate bei RT/TMZ gegenüber 12,1 Monate bei RT allein) und eine Erhöhung der 2-Jahres-Überlebensrate um 16,1 % (von 10,4% bei RT allein auf 26,5% bei RT/TMZ)⁶⁶.

Seine Wirkung entfaltet TMZ durch die Depletion des mittlerweile gut untersuchten DNA-Reparaturenzyms O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Dieser Wirkungsmechanismus spielt eine zentrale Rolle für den Therapieerfolg, da GBM-

Patienten mit hoher MGMT Expression (unmethylierter Promoter des MGMT Gens) erheblich schlechter auf Temozolomid ansprechen als Patienten mit niedriger MGMT Expression (methylierter MGMT-Promoter) ^{10,72}.

3.2.3 Subkutanes Tumormodell

Die auf Eis gelagerte vorbereitete Zellsuspension mit einer Konzentration von 2×10^6 Tumorzellen pro 100 μ l wurde in 1 ml Spritzen aufgenommen und vor jeder Inokulation wieder gut durchgemischt. Anschließend wurden die Spritzen mit 0,3 mm Spritzenspitzen bestückt.

Zur Durchführung der subkutanen Implantation wurden die Versuchstiere mit folgender Narkosemischung anästhesiert: $\frac{1}{4}$ Rompum (Xylazin 16 μ g/kg KG) und $\frac{3}{4}$ Hostaket (Ketamin 120 μ g/kg KG). Diese Mischung wurde in einer Dosierung 0,01 ml/ 10 g KG intraperitoneal appliziert. Alle Tiere wurden auf diese Weise narkotisiert.

Jedem anästhesiertem Versuchstier wurden in beide Flanken 2×10^6 Zellen in die Subkutis injiziert, welches 100 μ l der vorbereiteten Zellsuspension pro Flanke entspricht.

Je nach verwendeter Tumorzelllinie, wurde vier bis sechs Tage nach der Implantation mit der Tumorumfangsmessung begonnen. Dafür wurde ein spezieller Messschieber von F.S.T. (siehe Abb.) verwendet, der eine Messgenauigkeit von 0,1 mm besitzt. Nach der täglichen Messung von Länge, Breite und Höhe des subkutanen Tumors, wurden die Werte direkt in einer Excel-Tabelle dokumentiert.

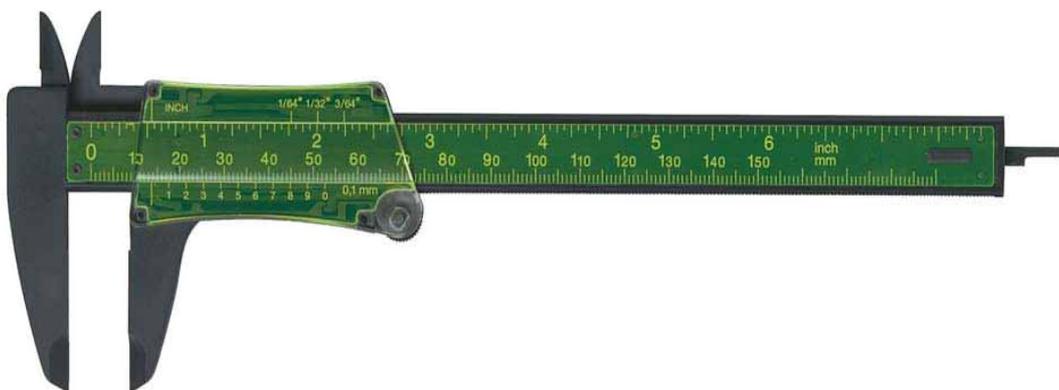


Abb. 4: Messschieber von F.S.T zur Bestimmung des subkutanen Tumorumfangs

Eine geringfügige Varianz des Startzeitpunkts für das regelmäßige Tumolvolumenmonitoring erklärt sich in der unterschiedlichen Tumorwachstumskinetik der beiden verwendeten humanen Gliomzelllinien, wobei U87-Tumore eine kleinere Tumorverdopplungsrate aufwiesen als SF126-Tumore und ein insgesamt homogeneres Wachstum aufzeigten. In unserer Therapiestudie wurde deshalb nicht nach Zeit sondern nach Tumorgröße zu Beginn der Behandlungsphase randomisiert.

Das Tumolvolumen wurde anhand folgender Gleichung ermittelt:

$\text{Tumolvolumen} = \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe} / 2.$

Die ersten Versuche dienten der Evaluierung sowie der Herausarbeitung des wirksamsten Therapieschemas der geplanten Kombinationstherapie mit Sunitinib und Temozolomid. Ziel war es vor allem, einen Unterschied in der Effizienz von sequentiell verabreichter TMZ/SU-Therapie oder kontinuierlich kombinierter Therapie herauszufiltern.

Die sequentielle Strategie umfasste eine Vorbehandlung mit entweder 1) Sunitinib für 5 Tage und anschließender TMZ-Therapie (=SU->TMZ) oder 2) Temozolomid-Chemotherapie für 5 Tage mit SU-Therapie im Anschluss (=TMZ->SU).

Hauptaugenmerk dieser Vorversuche war der in der Literatur weit verbreitete Einfluss des „normalization window“ (Zeitfenster der „vaskulären Normalisierung“ nach antiangiogener Therapie) auf die Therapieeffizienz von kombinierter zytostatischer und antiangiogener Therapie.

Die Therapiedauer dieser Versuche betrug in allen Gruppen 10 Tage, wobei die sequenziellen Therapieprotokolle auf einer fünftägigen Gabe der ersten Substanz und anschließend fünftägiger Gabe der zweiten Substanz basierten. Dies entspricht dem in der Angiogeneseforschung etablierten Zeitfenster von ca. fünf Tagen für Tumorgefäßnormalisierung nach antiangiogener Therapie.

Nachdem die subkutanen Tumore eine durchschnittliche Größe von 50 mm^3 erreicht hatten, wurden die Mäuse (n=6 pro Gruppe) zufällig in vier Therapiegruppen eingeteilt:

Gruppe 1= Kontrolle (Therapie mit 0,5 ml 0,9% NaCl)

Gruppe 2= SU (40mg/kg KG) gefolgt von TMZ (200mg/m²)

Gruppe 3= TMZ (200mg/m²) gefolgt von SU (40mg/kg KG)

Gruppe 4= Kombination: SU (40mg/kg KG) und TMZ niedrigdosiert (50mg/kg KG).

Gruppe 4 erhielt TMZ in niedriger Dosierung, um die Toxizität der Kombinationstherapie zu begrenzen und eine Durchführbarkeit für eine Behandlungsdauer über zehn Tage zu gewährleisten.

In den anschließenden Versuchen wurde die kontinuierliche Kombinationstherapie von TMZ/SU über sechs Tage mit TMZ- und SU-Monotherapie bezüglich einer Inhibition des Tumorwachstums verglichen. Tumorzellen wurden wie oben beschrieben subkutan implantiert, und heranwachsende Tumore anschließend nach obigem Schema vermessen.

Sobald die subkutanen Tumore eine durchschnittliche Größe von 50 mm^3 erreicht hatten, wurden die Mäuse ($n=6$ pro Gruppe) zufällig in vier Therapiegruppen eingeteilt:

Gruppe 1= Kontrolle (Therapie mit 0,5 ml 0,9% NaCl)

Gruppe 2= Sunitinib (40mg/kg KG)

Gruppe 3= TMZ (200mg/m²)

Gruppe 4= Kombination: Sunitinib (40mg/kg KG) und TMZ (200mg/m²).

Es schloss sich eine sechstägige Therapiephase der Versuchstiere entsprechend ihrer Einteilung in eine der vier Versuchsgruppen an. Medikamente wurden intraperitoneal in oben genannten Dosierungen beim anästhesierten Tier verabreicht. Während der Therapiephase wurde täglich das Körpergewicht und das Tumolvolumen der Versuchstiere erfasst.

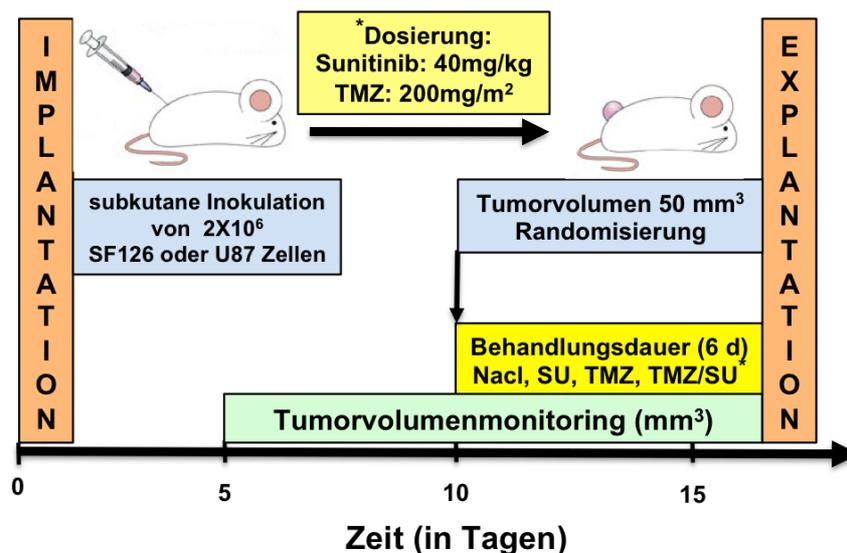


Abb. 5: Experimentelles Protokoll der Therapiestudie am subkutanen Tumormodell

3.2.4 Rückenhautkammermodell

Zur Untersuchung der Tumormikrozirkulation sowie der mikrohämodynamischen Parameter wurde das Rückenhautkammermodell gewählt. SF126 und U87 Tumorzellen wurden in präparierte Rückenhautkammern an Nacktmäusen (n=3 pro Gruppe) implantiert, um die stattfindenden angiogenen Prozesse und mikrovaskulären Veränderungen mittels Intravitalmikroskopie zu beobachten. 7 Tage nach der Tumorzellimplantation wurden die Tiere zufällig in vier Behandlungsgruppen für eine Therapiedauer von sechs Tagen eingeteilt:

Gruppe 1= Kontrolle (Therapie mit 0,5 ml 0,9% NaCl)

Gruppe 2= Sunitinib (40mg/kg KG)

Gruppe 3= TMZ (200mg/m²)

Gruppe 4= Kombination: Sunitinib (40mg/kg KG) und TMZ (200mg/m²).

Es folgten intravitalmikroskopische Untersuchungen an Tag 7, 9, 11, und 13 nach Tumorzellimplantation.

Im Folgenden sollen kurz die Entwicklung des Rückenhautkammermodells und die mikrochirurgischen Arbeitstechniken beleuchtet werden.

Das 1980 von Endrich et al. etablierte Modell ermöglicht eine kontinuierliche, nichtinvasive Verlaufsbeobachtung von mikrovaskulären Prozessen mittels Fluoreszenz-Epiilluminationmikroskopie über einen Zeitraum von ca. vier Wochen.⁷³

1993 wurde Versuchsmodell von Lehr et al. auf die Nackmaus übertragen⁷⁴.

Nach intraperitonealer Anästhesie der Versuchstiere (nu/nu, männlich, 7-8 Wo, 25-32 g), wird unter Gegenlichtkontrolle eine Rückenhautfalte der Maus entlang der Wirbelsäule angehoben und fixiert. Anschließend werden zwei Titanrahmen der RHK kaudal der Schulterbasis so implantiert, dass sich die Versorgungsgefäße der Haut im späteren Beobachtungsfenster der Haut befinden. Die Fixierung der beiden Titanrahmen erfolgt an ihren Bohrungen entlang der Haut mit 5.0 Seidennähten (Ethibond 5-0, Ethicon GmbH).

Die Rückenhaut der athymischen Nacktmaus besteht aus quergestreifter Muskulatur, subkutanem Gewebe und einer Hautschicht, so dass nun das Beobachtungsfenster (Hautstück mit 15 mm Durchmesser) jeweils eine dieser Schichten enthält. Bei der Exzision des runden Hautstücks wird auf das Vermeiden von Mikrohämorraghien

geachtet. Die Bedeckung des entstandenen Beobachtungsfensters mit einem Glas (Dicke= 0,1 mm) sowie dessen Fixierung mit einem Sprengring im Titanrahmen bilden den Abschluss der Kammerimplantation. Durch Abnehmen des Deckgläschens, können Eingriffe wie z.B. die Tumorzellinokulation bequem und einfach durchgeführt werden.

Um den Einfluss der Effekte des chirurgischen Traumas zu eliminieren, werden die Rückenhautkammern zwei Tage vor der Tumorzellimplantation implantiert. Die Inokulation der Tumorzellen erfolgt am narkotisierten und fixierten Tier nach Entfernung des Sprengrings sowie Deckgläschens der RHK. Unter mikroskopischer Sicht werden 1,5 µl Zellpellet (ca. 3×10^5 Zellen) implantiert.

3.2.5 Intravitalmikroskopie

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen zur Evaluierung der Tumorangiogenese der beiden untersuchten Zelllinien wurden durch fluoreszenzepiilluminationsmikroskopische Technik mittels eines modifizierten Axiotech Vario-Mikroskops (Attotarc, Zeiss) realisiert.

Zur Bildeinstellung wurde sowohl ein konventionelles Objektiv mit langem Arbeitsabstand 10X als auch ein Wasserimmersionsobjektiv 20X (Zeiss) verwendet. Eine lichtempfindliche CCD-Kamera (Cohu FK6990, Pieper) mit einem optionalen Bildverstärker für schwache Fluoreszenz (Kappa), die an das Mikroskop angeschlossen war, ermöglichte die Bildübertragung des untersuchten Areals auf einen Monitor. Die Dokumentation der mikroskopischen Aufnahmen für eine spätere quantitative computergestützte off-line Analyse erfolgte über den Transfer der Aufnahmen an ein mit der Kamera verbundenes S-VHS-Videobandgerät (Panasonic).

Kapillaren und kleinere Arteriolen konnten durch Kontrastverstärkung mit 2 % FITC-konjugiertem Dextran (0,1 ml, intravenös, Molekulargewicht= 150000; Sigma) und dem Blaufilter zur Epi-Illumination visualisiert werden. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran wurde über die Schwanzvene am narkotisierten Tier appliziert. Hierfür wurde das Versuchstier zur Platzierung auf dem Mikroskoptisch auf einer zweckmäßigen Bühne fixiert.

3.2.6 Auswertung der Intravitalmikroskopie

Zur off-line Analyse der mikrovaskulären und mikrohämodynamischen Parameter mit den intravitalmikroskopisch angefertigten Videoaufnahmen diente ein computergestütztes Evaluierungsprogramm (CAPIMAGE, Zeintl Software Engineering, Heidelberg, Deutschland).

Zur Beurteilung der Mikrozirkulation wurde die neu im xenogenen Tumor entstandene Mikrovaskularisation in drei radiäre Zonen eingeteilt: zentral, peritumoral und marginal. Jede der drei Zonen wurde mit zwei bis drei Beobachtungsfeldern pro Zone separat ausgewertet, welches eine Anzahl von insgesamt sechs bis neun Messungsfeldern pro Tier ergibt.

Eine Einschätzung der tumoralen Neoangiogenese sowie der Einfluss der verschiedenen Therapieschemata darauf, konnte durch die quantitative Auswertung der folgenden mikrovaskulären Parameter gelingen: totale Gefäßdichte (TVD), definiert als die Gesamtlänge aller neu im beobachteten Tumorbereich entstandenen Gefäße in der Einheit (cm/cm^2 bzw. cm^{-1}) und funktionelle Gefäßdichte (FVD), welche als Gesamtlänge aller mit Erythrozyten perfundierten neu entstandenen Gefäße im untersuchten Tumorareal definiert ist, auch angegeben in der Einheit (cm/cm^2 bzw. cm^{-1}). Der prozentuale Anteil der funktionalen Gefäßdichte (FVD) an der totalen Gefäßdichte (TVD), genannt Perfusionsindex (PI), wurde anhand folgender Gleichung ermittelt: $\text{PI} = \text{FVD}/\text{TVD} \times 100$. Zu den ausgewerteten Parametern, die ebenfalls in die mikrozirkulatorische Bewertung mit einfließen, zählen der Gefäßdurchmesser (D) und die Permeabilität (P), die das Verhältnis zwischen intra- und extravaskulärem Kontrast darstellt und somit, wie bereits durch Vajkoczy et al. beschrieben, das Ausmaß der Extravasation des Fluoreszenzmarkers beschreibt.^{75,76}

Die tumorhämodynamische Analyse schloss die quantitative Auswertung der Parameter RBCV (Red Blood cell Velocity, mm/s) und die mikrovaskuläre Blutflussrate (Q_v , nl/s), wie von Vajkoczy et al. beschrieben, ein.

Die mikrovaskuläre Blutflussrate (Q_v) wurde aus der RBCV und dem Gefäßdurchmesser (D) auf folgender Gleichung basierend berechnet: $Q_v = \pi \times (D/2)^2 \times \text{RBCV}/K$, wobei D dem Gefäßdurchmesser, RBCV der red blood cell velocity und K (=1,3) dem Baker Wayland Faktor, der das parabole Profil der Blutflussgeschwindigkeit in Kapillaren berücksichtigt, entspricht.

3.2.7 Gewebegewinnung und Konservierung

Nach Abschluss der Therapiephase wurden die subkutanen Tumore beim anästhesierten Versuchstier sorgfältig präpariert und explantiert. Zur sofortigen Fixierung der Exzidate wurden diese in ein stickstofftaugliches Gefäß mit Tissue-Tek® hineingegeben und direkt im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur weiteren Begutachtung und histologischen Untersuchung wurden auch die kreisrunden Präparationen der Rückenhautkammer nach intraperitonealer Anästhesie der Mäuse exzidiert und auf oben beschriebene Weise kältefixiert.

Die Tumorproben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

Alle Versuchstiere wurden am Ende des durchgeführten Experiments unter Schmerzfreiheit mittels zervikaler Dislokation tierschutzgerecht euthanasiert.

3.3 Immunhistochemische Studie von antitumoralen Effekten

3.3.1 Anfertigung von Kryoschnitten

Zur histologischen und immunhistochemischen Analyse der Tumorexplantate wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von $4\text{-}5\ \mu\text{m}$ aus Tumorrand I, Tumorzentrum und Tumorrand II angefertigt. Die Kryoschnitte wurden auf speziell beschichtete Objektträger (Super Frost Plus, Microm) aufgenommen und zu jeder Zeit des Schneidevorgangs bei -20° gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden die Kryoschnitte bei -80°C aufbewahrt. Die weitere Fixierung der Schnittpräparate erfolgte erst unmittelbar vor Durchführung der jeweiligen Färbemethode.

3.3.2 Färbung für den Proliferationsmarker Phosphohistone H3

Während der aktiven Mitose kommt es zu einigen Phosphorylierungsmodifikationen an den Histonen (Untereinheit des Nukleosoms, welche das Chromatin des Zellkerns bilden), vornehmlich an Histone H3. Zur Detektion der aktiv proliferierenden Tumorzellen erfolgte nun eine immunhistochemische Darstellung mit dem Mitosemarker Phosphohistone-H3 (Millipore, Wirt: Kaninchen).

Die bei -80°C gelagerten Schnitte wurde direkt in Methanol überführt und 5 Minuten bei -20°C fixiert. Nach kurzem Trocknen, erfolgte ein dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS für jeweils 5 Minuten. Zur Inhibition der endogenen Peroxidase wurden die Präparate 10 min bei Raumtemperatur DAKO Dual Endogenous Enzyme Blocking Reagent inkubiert. Darauf folgten zwei weitere Waschvorgänge mit PBS für jeweils 5 Minuten. Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden im Anschluss mit einer 1%igen Casein-PBS-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper Anti-Phosphohistone-H3 (1:500 in 0,5% Casein-PBS) für 2 Stunden bei Raumtemperatur schloss sich an. Nach zweimaligem Waschen in 0,5 % Casein-PBS-Lösung für jeweils 5 Minuten wurde anschließend mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (1:200, Dianova) für 1 Stunde bei Raumtemperatur

inkubiert. Es folgten wiederholt 2 Waschvorgänge mit 0,5 % Casein-PBS-Lösung bevor die Schnitte mit dem ABC-Komplex (Vector® Vectastain PK-6100 Elite ABC Kit) für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Zur Visualisierung der immunhistochemischen Färbung, wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion nun nach weiterem Waschen 3x für 5 Minuten, mit dem DAKO DAB Substrat Chromogen System entwickelt (kurze Inkubation von 1-3 Minuten bis zum Sichtbarwerden der Reaktion). Die Schnitte wurden jetzt nach Spülen mit ddH₂O mit Mayers Hämatoxilin (DAKO) gegengefärbt (1 Minute), in Leitungswasser gebläut und mit AquaMount Medium (Merck) eingedeckt.

3.3.3 Färbung für den Apoptosemarker Caspase 3

Zur Beurteilung der tumoreigenen Apoptose wurde ein Färbeprotokoll für den Apoptosemarker Caspase 3 (Cell Signalling, Wirt: Kaninchen) an den Tumorschnitten etabliert. Caspase 3 ist ein führendes Enzym der Apoptose, zu deren Funktionen als Effektor-Caspase die Aktivierung von Nukleasen und Spaltung von zelleigenen Proteinen wie Aktin und Laminin gehört.

Nachdem die Schnitte für 15 min bei Raumtemperatur mit 2% PFA fixiert wurden sowie anschließend Waschen 3x 5 Minuten in PBS, folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und Permeabilisierung der Schnitte mit einer 0,3%tigen Triton-X-100 Lösung mit 5 % Eselsserumzusatz für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Es folgte die Inkubation des Primärantikörpers (1:100, in 0,3% Triton-PBS + 1% BSA) bei 4° C über Nacht. Nach wiederholtem Waschen (3X 5 Minuten in PBS), wurden die Präparate für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur mit einem FITC-konjugiertem Sekundärantikörper (1:200, Dianova) in der lichtgeschützten Feuchtkammer inkubiert. Nachdem ungebundene Reste des Sekundärantikörpers mehrfach mit PBS abgewaschen wurden (3X 5 Minuten), erfolgte die Eindeckelung der fluoreszenzgefärbten Kryoschnitte mit PI-haltigem (rote Fluoreszenzmarkierung der Kerne) Antifading Eindeckmedium (Immunoselect Antifading Mounting Medium PI, Dianova).

3.3.4 Färbung für Anti-Maus-Ki-67 zur Detektion von Endothelzellproliferation

Die Identifikation von proliferierenden Endothelzellen im humanen Tumorgewebe der Xenografts gelang mit einer immunhistochemischen Darstellung von anti-Maus-Ki-67 (DAKO, Clone Tec-3, Wirt: Ratte). Die von den humanen Xenografts induzierte Tumorangio-genese durch spezifische Stimuli wie VEGF wird vom Wirt Maus, d.h. mauseigenen Endothelzellen realisiert.

Fixierung, Blockierung, ABC-Komplex-Behandlung und Entwicklung der konventionellen Immunhistochemie mit DAB-Substrat-Chromogen wurden wie unter Phosphohistone-H3-ICH bereits beschrieben ausgeführt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper Ki-67 (1:25 in 0,5% Casein-PBS) erfolgte über Nacht bei 4° C. Der biotinylierte sekundäre Antikörper (1:200 in 0,5% Casein-PBS, Dianova) wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxilin sowie das Eindecken der Präparate wurden analog zum oben beschriebenen Protokoll effektiert.

3.3.5 Perizytendarstellung mit Doppelimmunfluoreszenzfärbung Pecam-Desmin

Die Kombination der beiden Immunfluoreszenzmarkierungen von Desmin (Abcam, Wirt: Kaninchen) und Pecam (CD31, BD Pharmingen, Wirt: Ratte) ermöglicht die gleichzeitige Visualisierung von Perizyten (Desmin-positiv) und Endothelzellen (CD31-positiv).

Die Doppelimmunfluoreszenz-Färbung wurde simultan durchgeführt, d.h. beide Primärantikörper sowie beide Sekundärantikörper wurden zusammen in einer Antikörper-Lösung inkubiert. Zunächst wurde nach Fixierung mit Methanol 5 Minuten lang bei -20° C, dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend in 1% Casein-PBS-Lösung 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt, um das Auftreten unspezifischer Bindungen zu inhibieren.

Danach wurden die Primärantikörper anti-CD31 (1:50) und anti-Desmin (1:100), verdünnt in 0,5% Casein-PBS, 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem waschen in 0,5% Casein-PBS, wurden die Kryoschnitte mit den Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (beide 1:200) 1,5 Stunden bei Raumtemperatur in einer Kammer vor Licht geschützt inkubiert. Anti-Desmin wurde mit FITC-konjugiertem (grüne Fluoreszenz), Anti-CD31 mit Cy-3-konjugiertem (rote Fluoreszenz) Sekundärantikörper detektiert. Nach wiederholtem Waschen in PBS (3X 5 Minuten), wurden die Schnitte im Dunkeln mit DAPI-haltigem (blaue Fluoreszenzmarkierung der Kerne) Antifading Eindeckmedium (Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI, Dianova) eingedeckt.

3.3.6 Färbung zur Gefäßdichtebestimmung mit CD31 als Endothelzellmarker

Die mikrozirkulatorische Gefäßdichte in den Tumorschnitten wurde durch immunfluoreszenz-gekoppelte Markierung von Endothelzellen mit einem Antikörper gegen CD31 (Pecam, BD Pharmingen, Wirt: Ratte) evaluiert.

Fixierung, Blocken von unspezifischen Bindungen und die Waschschritte mit samt Inkubationszeiten gleichen der Behandlung des oben beschriebenen Protokolls der Pecam-Desmin-Doppelimmunfluoreszenz.

Der Primärantikörper anti-CD31 wurde in der Verdünnung 1:50 (in 0,5 % Casein-PBS) verwendet, 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und mit dem Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper (1,5 Std., Raumtemperatur) detektiert. Die Kerngegenfärbung erfolgte wieder mittels DAPI-haltigem Antifading Eindeckmedium.

3.3.7 Negativkontrollen

Um eventuelle unspezifische Signalintensitäten ausschließen zu können, wurde bei jeder Färbung eine Negativkontrolle des Tumorkontrollgewebes mitgeführt. Dazu wurde der Objektträger entsprechend der Protokolle für die zuvor beschriebenen Antikörper behandelt, jedoch wurde hierbei auf den Primärantikörper verzichtet.

3.3.8 Mikroskopie und Auswertung

Die Mikroskopie der gefärbten Schnitte erfolgte nach Färbeabschluss bei Immunfluoreszenz am darauffolgenden Tag, um eine mögliche Signalabschwächung zu vermeiden. Immunhistochemisch gefärbte Schnitte mit DAB Chromogen-Visualisierung wurden ebenfalls zeitnah mikroskopiert, um eine maximale Signalqualität zu gewährleisten.

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem computergestützten Axioskop von der Firma Zeiss und der dazugehörigen Software Axiovision 3.0 durchgeführt.

Zur quantitativen Auswertung der jeweiligen immunhistochemischen Untersuchungen wurden 4 Tumore pro Behandlungsgruppe und pro Zelllinie herangezogen (SF126: 4X Kontrolle, 4X TMZ, 4X SU, 4X TMZ/SU ; U87-MG: 4X Kontrolle, 4X TMZ, 4X SU, 4X TMZ/SU). Pro Tumor wurde eine Anzahl von fünf 4 μm Schnitten analysiert. Von jedem Schnitt wurden drei Untersuchungsfelder von 0,04 mm^2 Größe („Region of interest“, 2x Rand, 1X Zentrum) in einer 200X Vergrößerung evaluiert.

Bei der Bestimmung der Gefäßdichte nach Weidner et al., wurden alle Präparate zunächst zur Übersichtsgewinnung in der 100X Vergrößerung begutachtet. Bei 200X Vergrößerung wurde nun Areal von 0,7386 mm^2 ausgewertet, wobei einzelne CD-31-positive Endothelzellen oder Endothelzellcluster, die eindeutig getrennt von benachbarten Gefäßanschnitten waren, als ein Gefäß gewertet wurden. Nach Quantifizierung wurde die Blutgefäßdichte (MVD) als Gefäße pro Quadratmillimeter (mm^2) errechnet⁷⁷⁻⁷⁹.

3.4 Bestimmung des MGMT Status

3.4.1 DNA-Extraktion und Behandlung mit Natrium-Bisulfit

Aus kryokonservierten Tumorgewebe konnte mittels des QiA-Amp-DNA-Minikit (Qiagen, Hilden, Germany) DNA der Gliomzelllinien SF126 und U87 durch Befolgung der Herstellerangaben extrahiert werden.

Um den MGMT-Methylierungsstatus der untersuchten Tumorzelllinien analysieren zu können, erfolgte anschließend eine Behandlung der DNA (500pg) mit Natrium-Bisulfit mittels des EZ-DNA-Methylation-Gold-Kit unter Beachtung des festgelegten Protokolls (Zymo Research, Orange, CA). Als Positivkontrolle wurde hier die genomische DNA aus der weißen Substanz nicht-tumoröser zerebraler Läsionen herangezogen, die ebenfalls nach dem obigen Protokoll behandelt wurde.

3.4.2 Pyrosequenzierung

Der Methylierungsstatus-Assay mithilfe von Pyrosequenzierung wurde mit einem Kit, dem PyroMarkQ24-MGMT-Kit (Qiagen, Hilden, Germany) und dem PSQTM96 MA System (Biotage, Uppsala, Sweden) durchgeführt, unter Beachtung der Herstellerangaben. Das PyroMarkQ24-MGMT-Kit kann den Methylierungsgrad in Prozent von fünf CpG-Inseln detektieren, die im ersten Exon des MGMT-Gens lokalisiert sind. Ein Methylierungsgrad von über 8% gilt nach Hersteller als sicheres positives Ergebnis.

Um die vollständig abgeschlossene Bisulfit-Behandlung zu erfassen, diente als intrinsische Kontrolle ein Cytosin-Nukleotid, dem einer Nicht-Methylierung entsprechend kein Guanin-Nukleotid folgt.

3.5 Charakterisierung des Expressionsprofils von SF126 und U87 Zellen

3.5.1 RNA- Isolation und Messung der RNA- Ausbeute

Die RNA-Extraktion aus den gewonnenen Kryogewebe erfolgte unter Verwendung des TRIzol-Reagenz in Anlehnung an die Methode von Chomczynski⁸⁰.

Diese Methode beinhaltet im Wesentlichen die folgenden Schritte: 1. Homogenisation des Gewebe mit Hilfe des TRIzol Reagenz, 2. Phasentrennung und 3. anschließender Präzipitation sowie 4. darauffolgender Waschung und 5. die Auflösung der gewonnenen RNA.

Die präzise Bestimmung der RNA-Ausbeute erfolgte mittels photometrischer Messung mit dem Nanodrop®-Spektrophotometer. Desweiteren wurde zur Überprüfung der Qualität der RNA- Moleküle eine Elektrophorese unter Verwendung eines 1% (w/v) denaturierenden RNA-Agarose-Gels durchgeführt.

3.5.2 Real Time-qPCR

Die reverse Transkription der RNA wurde mit dem QuantiTect-Rev-Transcription Kit von Quiagen in Anlehnung an die Herstelleranweisungen realisiert. Real-Time PCR-Analysen (qPCR) wurden für alle Proben mithilfe des Applied Biosystems 7900H Fast Real-Time PCR-System und der SYBR Green-dye (Abgene) Methodik durchgeführt. Die relative Quantifizierung von mRNA aus dem explantierten Tumorgewebe wurde geplant und erfolgte mittels Anwendung eines etablierten Protokolls⁸¹.

Zur Detektion von entsprechenden Angiogenesetargets und der GAPDH Kontrolle wurden Maus-spezifische Primer verwendet.

3.6 Statistik

Die Auswertung der quantitativen Daten erfolgte durch die Errechnung des Mittelwertes mit Angabe der Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$). Die Mittelwerte der analysierten immunhistochemischen Parameter errechneten sich wie folgt: zunächst wurde ein Mittelwert aus den Ergebnissen der einzelnen Untersuchungsfelder von jedem untersuchten Tumor gebildet. Anschließend wurde aus den Mittelwerten der zu einer Behandlungsgruppe gehörenden Tumore (n=4) ein Mittelwert gebildet, und dessen Standardabweichung berechnet.

Die Mittelwerte der mikrozirkulatorischen Parameter errechneten sich wiederum aus den Ergebnissen der einzelnen Versuchstiere zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten.

Die statistische Auswertung von Vergleichen zwischen den Gruppen konnte nach einer ANOVA-Varianzanalyse und anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt werden. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt. Die immunhistochemischen Ergebnisse wurden ebenfalls mithilfe einer one-way-ANOVA-Varianzanalyse und

konsekutivem Dunn's Test statistisch ausgewertet. Das Signifikanzniveau lag hier ebenso bei $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

Nachfolgend sind die Ergebnisse unserer Therapiestudie graphisch dargestellt. Bei allen Angaben handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung mit Markierungen für statistisch signifikante Unterschiede der Merkmale.

Als Referenz zu den drei Therapiegruppen fungierte bei der Durchführung der Experimente eine mit NaCl-behandelte Kontrollgruppe. Der Ergebnisvergleich zwischen den Kontrollgruppen und den Therapiegruppen erlaubte es, Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen Therapeutika am Prozess des Tumorwachstums und der stattfindenden Angiogenese zu ziehen.

Bei den Versuchstieren gab es zu Versuchsbeginn keine Unterschiede bezüglich des Alters und des Körpergewichts.

4.1 Bestimmung des MGMT-Promotormethylierungsstatus

Die Bestimmung des MGMT-Promotor-Methylierungsstatus der beiden untersuchten Tumorzelllinien mittels Pyrosequenzierung demonstrierte eine klare Methylierung von mindestens einer CpG-Inselle des MGMT-Promotors in sowohl SF126- als auch U87-Xenografts. Demnach erfolgten unsere Versuche an zwei Gliomzelllinien mit einem hypermethylierten MGMT-Promotor, wodurch deren Genexpression für das Enzym MGMT als niedrig zu betrachten ist.

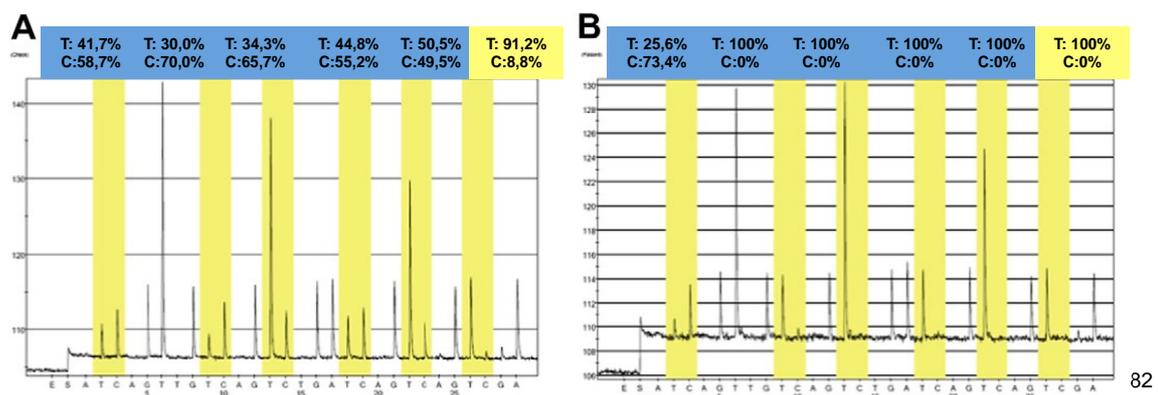


Abb. 6: MGMT-Promotor-Methylierungs-Analyse mittels Pyrosequenzierungsverfahren modifiziert nach Czabanka⁸²

Während die SF126-Zellen eine eindeutige Methylierung aller fünf untersuchten CpG-Insellen des MGMT-Promotors aufweisen, zeigen U87 Zellen eine MGMT-Methylierung in einer von fünf analysierten CpG-Insellen.

4.2 Effekte von kombinierter TMZ/SU Therapie auf das Tumorwachstum in vivo

4.2.1 Kontinuierliche TMZ/SU-Therapie ist effektiver als sequenzielle Applikation

Die Versuche, in denen wir sequenzielle Kombinationstherapie, also entweder SU gefolgt von TMZ (SU->TMZ) oder TMZ gefolgt von SU (TMZ->SU) mit kontinuierlich applizierter TMZ/SU-Therapie verglichen haben, zeigen, dass ein kontinuierliches kombiniertes Therapieregime von TMZ/SU einen signifikant besseren Effekt auf die Tumorwachstumsreduktion hat als das sequenzielle Therapieschema.

Beide sequenziellen Therapieprotokolle, d.h. sowohl fünf Tage SU-Behandlung mit anschließender fünftägiger TMZ-Monotherapie als auch fünf Tage TMZ-Behandlung mit konsekutiver SU-Behandlung, führten zu einer signifikanten Tumorwachstumshemmung im Vergleich zur Placebogruppe. Es konnten keine signifikanten Differenzen im Vergleich der beiden Gruppen untereinander beobachtet werden. Daraus kann man schließen, dass eine antiangiogene Vorbehandlung der Tumormikrozirkulation durch Sunitinib mit konsekutiver Chemotherapie (SU->TMZ) für fünf Tage im sogenannten „Normalisierungsfenster“ (=angiogenic window) keinen therapeutischen Vorteil gegenüber sequenziell (TMZ->SU) erzielt hat.

Im Gegensatz dazu führte die kontinuierlich verabreichte Kombinationstherapie (=SU in Kombination mit TMZ in niedriger Dosierung über zehn Tage) zu einem ausgeprägten konstanten Therapieerfolg in der Behandlungsphase.

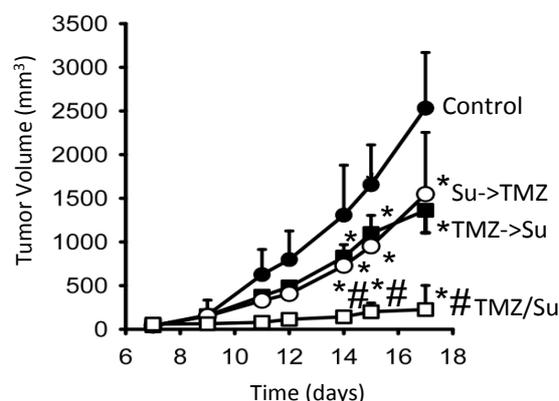


Abb. 7: Vergleich von sequenzieller und kontinuierlicher Kombinationstherapie TMZ/SU
modifiziert nach Czabanka⁸²

Alle drei Therapiegruppen resultierten in einer Tumorwachstumsverzögerung verglichen mit der Kontrollgruppe. Beide sequenziellen Therapieregime (SU->TMZ und TMZ->SU) führten zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums in SF126-

Xenografts verglichen mit Kontrolltumoren. Im Vergleich untereinander zeigten SU->TMZ bzw. TMZ->SU keinen signifikanten Unterschied. Kontinuierlich verabreichte TMZ(niedrigdosiert)/SU-Therapie führte zur effektivsten Wachstumsinhibition mit signifikantem Unterschied zu beiden sequenziellen Therapieschemata und zur Plazebogruppe. (N=6; Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. *p<0,05 vs. Control; #p<0,05 vs TMZ and vs. SU)

4.2.2 Inhibition des Tumorwachstums der Zelllinie SF126

Nach einer sechstägigen Therapiephase der subkutanen SF126-Tumore zeigten sich in den vier verschiedenen Behandlungsgruppen (Kontrolle, TMZ, SU, TMZ/SU) deutliche Tumolvolumensdifferenzen zwischen den Gruppen. Alle drei Behandlungsgruppen wiesen einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf das Tumorwachstum auf im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl: 174 ± 38 mm³; TMZ: 106 ± 13 mm³; SU: 114 ± 53 mm³; TMZ/SU: 34 ± 7 mm³). Die beiden Monotherapien TMZ und SU erreichten jedoch eine deutlich niedrigere Tumorstadiumsinhibition von 39% (TMZ) bzw. 34% (SU) im Vergleich zur Kombinationsgruppe TMZ/SU. Diese hemmte das Tumorstadiumwachstum um 80%. Das Ergebnis demonstriert einen signifikanten Vorteil der Kombinationstherapie bei der Tumorstadiumvolumensreduktion gegenüber beiden getesteten Monotherapien. Der Vergleich von Temozolomid- und Sunitinib-Monotherapie untereinander zeigte im Endresultat keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

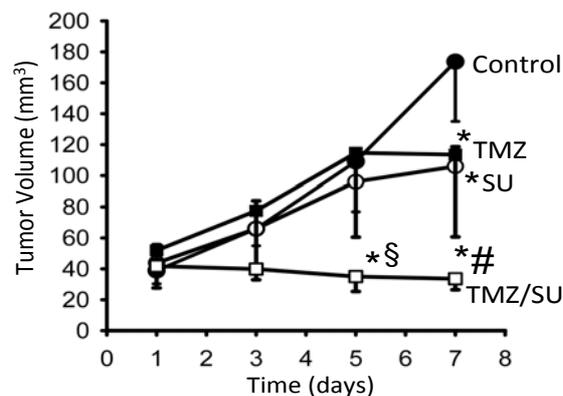


Abb. 8: Wachstumskurven der subkutanen SF126-Gliome während der Therapiephase modifiziert nach Czabanka⁸²

Das Tumorstadiumvolumen war signifikant reduziert in allen behandelten Gruppen verglichen mit der Kontrollgruppe nach einer Therapiephase von sechs Tagen. Die Kombinationstherapie TMZ/SU führte zu einer signifikanten Reduktion des Tumorstadiumvolumens (-80%) im Vergleich zu beiden Monotherapien. (N=6; Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. *p<0,05 vs. Control; #p<0,05 vs TMZ and vs. SU)

4.2.3 Inhibition des Tumorwachstums der Zelllinie U87

Die sechstägige Behandlung von U87 Xenograft-Tumoren resultierte analog zu den SF126 Tumoren in klaren Unterschieden der Tumorendvolumina vor Explantation in den verschiedenen Therapiegruppen. Behandelte Tumore aller drei Gruppen (TMZ, SU, TMZ/SU) wiesen ein signifikante reduziertes Tumolvolumen gegenüber der Referenzgruppe auf (NaCl: 78 ± 15 mm³; TMZ: 37 ± 7 mm³; SU: 31 ± 6 mm³; TMZ/SU: 21 ± 3 mm³). Folglich wies TMZ-Behandlung allein eine 53%ige, SU-Behandlung allein eine 60%ige und die Kombinationstherapie TMZ/SU eine 73%ige Reduktion des Tumolvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Die Kombination von Temozolomid und Sunitinib zeigte auch in dieser Zelllinie eine signifikant höhere Tumolvolumenreduktion gegenüber beiden Monotherapien, wobei die synergistische antitumorale Wirksamkeit der Kombinationsstrategie hier weniger ausgeprägt war als bei den SF126-Tumoren.

Interessanterweise zeigte sich bei den U87-Xenografts ein geringerer Unterschied beim Ansprechen auf beide Monotherapien im Vergleich zu Ergebnissen der SF126-Tumorversuche.

Bezüglich des Tumorendvolumens von U87-Tumoren nach Therapie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen TMZ- und SU-Monotherapie beobachtet werden.

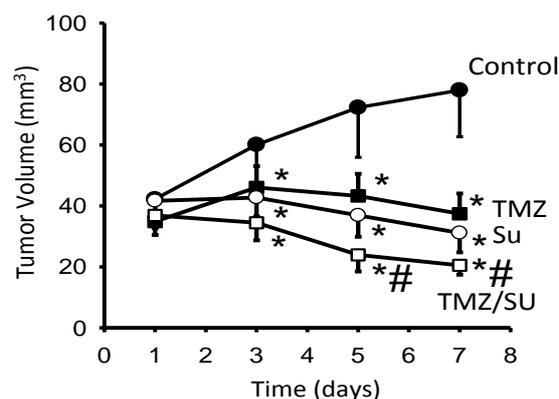


Abb. 9: Wachstumskurven der subkutanen U87-Gliome während der Therapiephase modifiziert nach Czabanka⁸²

Alle Behandlungsgruppen zeigten eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens verglichen mit der Kontrollgruppe nach einer Therapiephase von sechs Tagen. Wie bei SF126 Xenografts, führte auch hier die Kombinationstherapie TMZ/SU zu einer signifikanten Reduktion des Tumolvolumens im Vergleich zu beiden Monotherapien. (N=6; Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. *p<0,05 vs. Control; #p<0,05 vs. TMZ and vs. SU)

4.3 Charakterisierung der therapeutischen Effektivität hinsichtlich Proliferation und Apoptose

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der quantitativen immunhistochemischen Analyse für Tumorzellproliferation und Tumorzellapoptose graphisch dargestellt werden.

Bei allen Angaben handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung mit Markierungen für statistisch signifikante Unterschiede der Merkmale.

4.3.1 Therapieeffekte auf Tumorzellproliferation

Die Graphik für die Tumorzellproliferation in allen Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe ist für beide untersuchte Zelllinien in der folgenden Abbildung dargestellt.

Die untersuchten Tumorpräparate beider Gliomzelllinien (SF126; U87) zeigten ähnliche Ergebnisse für die drei Behandlungsarme unserer Studie. Sowohl bei den SF126-Tumoren als auch bei den U87-Tumoren konnte eine signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation in allen Therapiegruppen gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden.

SF126-Kontrolltumore zeigten im Durchschnitt 35% mehr proliferierende Tumorzellen pro Untersuchungsareal als U87-Kontrolltumore (SF126=98/ROI \pm 19; U87=73 \pm 14), was das zuvor beschriebene langsamere und homogenere Wachstum der subkutanen Xenografts dieser Zelllinie erklären könnte. Die hochproliferativeren SF126-Tumore zeigten im Vergleich zu den niedriger proliferativen U87-Tumoren eine höhere prozentuale Reduktion der Tumorzellproliferation in allen Behandlungsarmen (SF126: TMZ=-53%, SU=-60%, TMZ/SU=-65%; U87: TMZ=-35%, SU=-44%, TMZ/SU=-47%).

Signifikante Unterschiede zwischen den drei Therapiegruppen waren in beiden Zelllinien nicht zu beobachten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die beiden angewendeten Substanzen die Tumorzellproliferation zwar negativ beeinflussen und vermindern, jedoch kein unmittelbarer additiver antiproliferativer Effekt von der Kombination TMZ/SU auf beide experimentellen Gliomentitäten nachzuweisen ist.

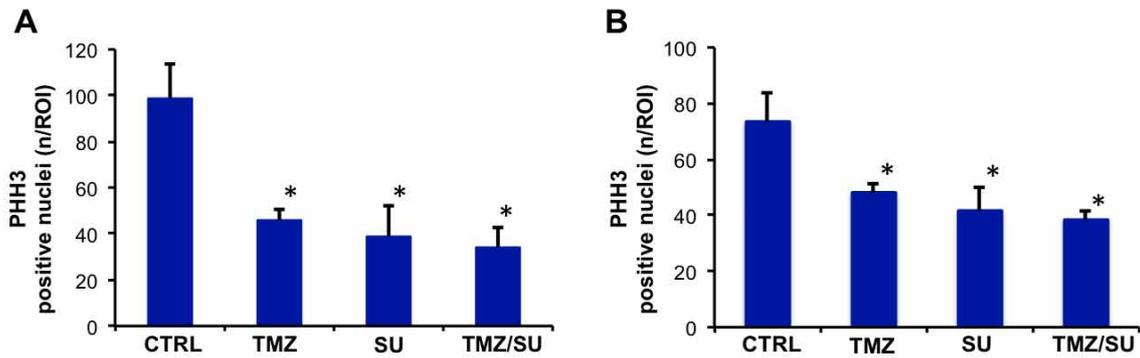


Abb. 10: Graphische Darstellung von Tumorzellproliferation in A) SF126- und B) U87-

In beiden Zelllinien (A=SF126, B=U87) wiesen alle Behandlungsgruppen (A: TMZ= 46±10, SU=39±20, TMZ/SU=34±19; B: TMZ= 48±9, SU= 41±15, TMZ/SU= 39±14) eine signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation (gemessen in Phosphohistone-H3-positiven Zellen pro Beobachtungsfeld von 0,04 mm²) im Vergleich zur Referenzgruppe (CTRL: A=99±19; B=73±14) auf. Zwischen den drei Therapiegruppen konnte keine statistisch signifikante Differenz festgestellt werden. (N=4; alle Werte sind als Mittelwerte ±SD angegeben. *p<0,05 vs. CTRL)

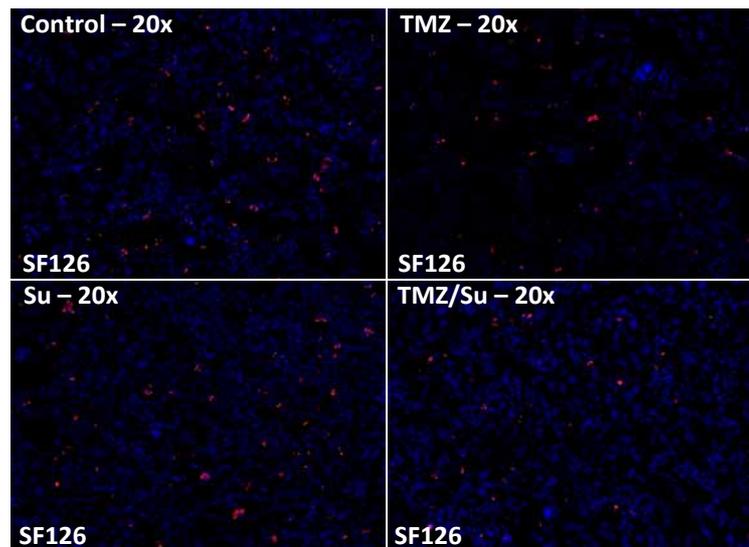


Abb. 11: Exemplarische fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Tumorzellproliferation in SF126-Xenografts

Proliferationsmarker Phosphohistone H3 (rot) und Kerngegenfärbung mit DAPI (blau). 20X vergrößert. Alle verwendeten Substanzen (TMZ, SU, TMZ/SU) führten zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsfraktion in den Gliomxenografts im Vergleich zu Kontrolltumoren. Auch wenn in der Kombinationsgruppe häufig Areale mit deutlich verminderter Tumorzellproliferation wie hier zu beobachten waren, konnte insgesamt keine statistische Signifikanz beim Vergleich der drei verschiedenen Therapien nachgewiesen werden.

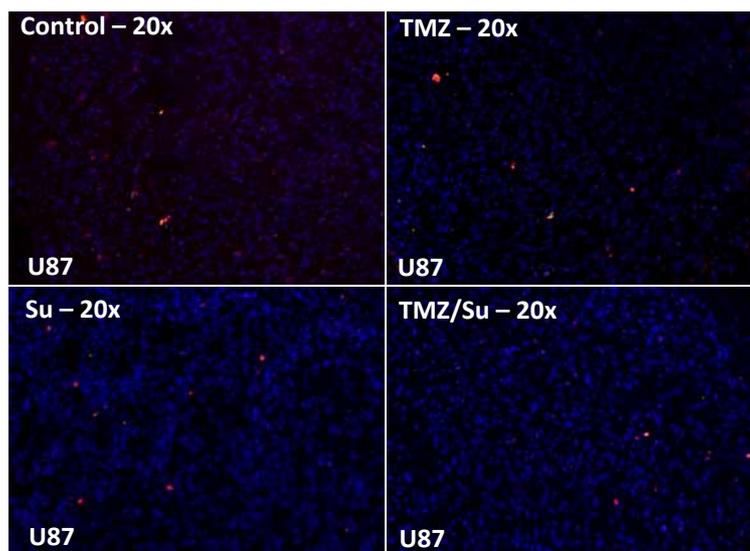


Abb. 12: Exemplarische fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Tumorzellproliferation in U87-Xenografts

Proliferationsmarker Phosphohistone H3 (rot) und Kerngegenfärbung mit DAPI (blau). 20X vergrößert. Ergebnisse in den ebenfalls MGMT-methylierten U87-Gliomxenografts waren analog zu denen in SF126-Tumoren beobachteten Ergebnissen bezüglich der Tumorzellproliferation in allen drei Therapiegruppen. (Siehe Kommentar oben). Es war kein deutlicher additiver antiproliferativer Effekt von TMZ/SU-Kombinationstherapie festzustellen.

4.3.2 Therapieeffekte auf Caspase-abhängige Tumorapoptose

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Caspase 3-vermittelten Apoptose ließen sich folgende Ergebnisse für die beiden untersuchten Gliomzelllinien feststellen. Es kam zu einer signifikanten Zunahme der Tumorzellapoptose in allen behandelten Tumoren beider Zelllinien verglichen mit ihren jeweiligen Kontrolltumoren. Desweiteren zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen TMZ- und SU-Monotherapie und der Kombinationsgruppe TMZ/SU bezüglich der Apoptoserate: kombinierte TMZ/SU-Therapie resultierte sowohl bei SF126- als auch U87-Gliomen in einem signifikantem Anstieg der Caspase3-positiven Zellen im Vergleich zu Tumoren, die entweder mit TMZ oder SU allein behandelt worden waren. Dies spricht für einen additiven proapoptotischen Effekt von kombinierter TMZ/SU-Therapie.

Vergleicht man beide Zelllinien miteinander, so kann konstatiert werden, dass bei kombiniert TMZ/SU-behandelten U87-Tumoren im Durchschnitt 43% mehr apoptotische Zellen zu beobachten waren als bei SF126-Tumoren, bei vergleichbarer Apoptoserate beider Kontrolltumorentitäten.

Darüber hinaus wies Sunitinibmonotherapie bei U87-Tumoren eine tendenziell höhere proapoptotische Potenz auf mit 32% mehr Caspase3-positiver Zellen im Vergleich zu SU-behandelten SF126-Tumoren. In U87-Tumoren konnte eine signifikante Differenz

zwischen TMZ- und SU-Therapie festgestellt werden mit einem Anstieg von Caspase3-Aktivität in der SU-Gruppe. Diese Beobachtung könnte mit der vorher in der U87-Wachstumskurve sichtbar gewordenen Tendenz einer erhöhten Effektivität von SU-Therapie bei dieser Gliomzelllinie im Vergleich zu SU-Therapie bei SF126-Tumoren korrelieren. Signifikante Unterschiede der Apoptoserate zwischen beiden Monotherapien ließen sich bei SF126-Tumoren nicht feststellen.

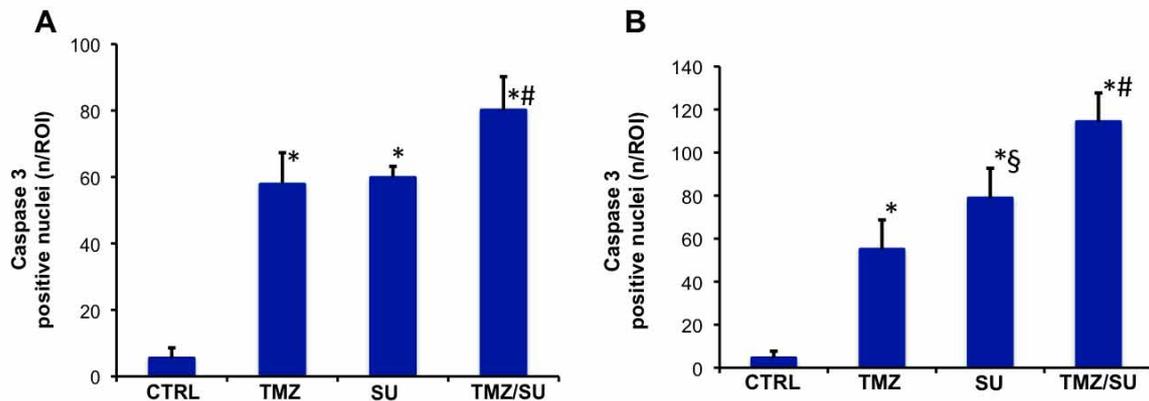


Abb. 13: Graphische Darstellung von Tumorzellapoptose in A) SF126- und B) U87-Tumoren

In beiden Zelllinien (A=SF126, B=U87) demonstrierten alle Behandlungsgruppen (A: TMZ= 58±28, SU=60±20, TMZ/SU=80±26; B: TMZ= 55±31, SU= 79±33, TMZ/SU= 114±30) eine signifikante Zunahme der Tumorzellapoptose (gemessen in Caspase3-positiven Zellen pro Beobachtungsfeld von 0,04 mm²) im Vergleich zur Kontrollgruppe (CTRL: A=5±7; B=4,5±7). Kombinierte TMZ/SU-Therapie führte in SF126- und U87-Gliomen zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu beiden Monotherapien. (N=4; Alle Werte sind als Mittelwerte ±SD angegeben. *p<0,05 vs. CTRL; #p<0,05 vs TMZ and vs. SU; §p<0,05 vs TMZ)

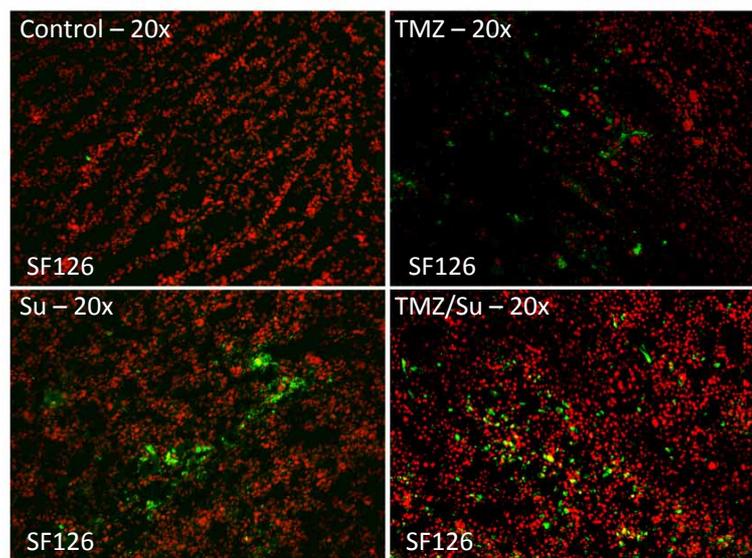


Abb. 14: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung von Caspase-3 in SF126-Xenografts⁸²

Caspase-3 Detektion, 20X Vergrößerung, in allen vier Therapiegruppen: Caspase-3-positive apoptotische Zellen in grün, Kerngegenfärbung mittels PI (Propidium-Iodid) in rot. TMZ/SU-Therapie zeigte wie hier repräsentativ veranschaulicht einen deutlichen additiven Effekt vs. Kontrolle und beiden Monotherapien in der Apoptoseinduktion.

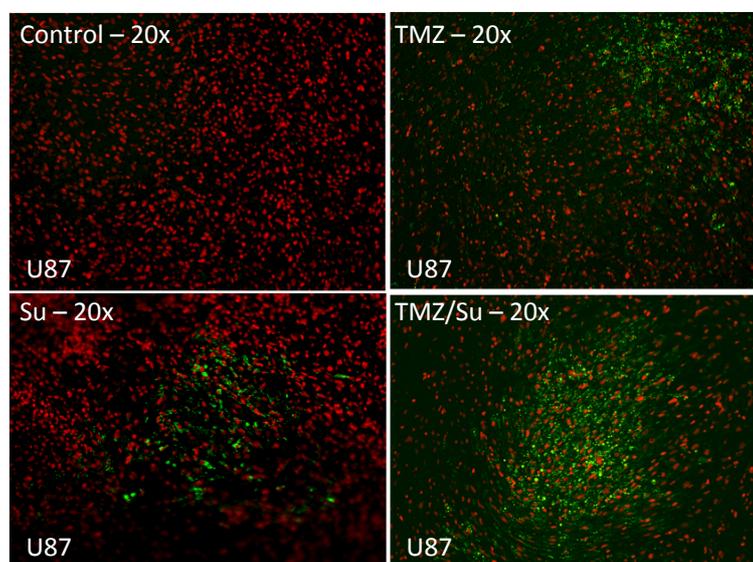


Abb. 15: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung von Caspase-3 in U87-Xenografts⁸²

Siehe Beschreibung oben. Deutlicher synergistischer apoptotischer Effekt in der TMZ/SU-Gruppe zu sehen.

4.4 Charakterisierung der antiangiogenen Aktivität

Zur Beurteilung der angiogenen Aktivität unser experimentellen Gliome, wurden die Parameter kapilläre Gefäßdichte (MVD=Microvessel Density), Endothelzellproliferation und den Perizytenassoziationsindex immunhistochemisch analysiert.

4.4.1 Therapieeffekte auf die Gefäßdichte (MVD)

Die Evaluation der quantitativen immunhistochemischen Analyse der Gefäßdichte unserer Studie lieferte folgende Resultate:

Die simultane Ablation der VEGFR-2 und PDGFR- β vermittelten Signalwege durch Sunitinib (SU11248) führte zu einer Regression von Tumorgefäßen und folglich zu einer signifikanten Abnahme der kapillären intratumoralen Gefäßdichte (MVD) bei SU- und TMZ/SU- behandelten Tumoren beider Gliomentitäten im Vergleich zu den untersuchten Tumoren der Referenzgruppe (SF126: Reduktion der MVD in % betrug bei SU= $-56\% \pm 5\%$, bei TMZ/SU= $-67\% \pm 2\%$; U87: Reduktion der MVD in % betrug bei SU= $-61\% \pm 6\%$, bei TMZ/SU= $-69\% \pm 5\%$). Tumore der Kombinationsgruppe TMZ/SU von SF126 und U87 zeigten einen additiven antiangiogenen Effekt und demonstrierten eine deutlich höhere Abnahme der intratumoralen Gefäßdichte im Vergleich zu

Tumoren der Sunitinibmonotherapiegruppe. TMZ- Therapie führte bei U87-Tumoren zu einer geringen, dennoch signifikanten Abnahme der Gefäßdichte im Vergleich zur Kontrollgruppe (TMZ=-7%±10% vs. CTRL). Andere in vivo Studien haben bereits einen antiangiogenen Effekt von TMZ beschrieben⁸³. Dieser geringe antiangiogene Effekt ließ sich in unserer Studie bei TMZ-behandelten SF126-Tumoren durch die immunhistochemische Analyse jedoch nicht belegen.

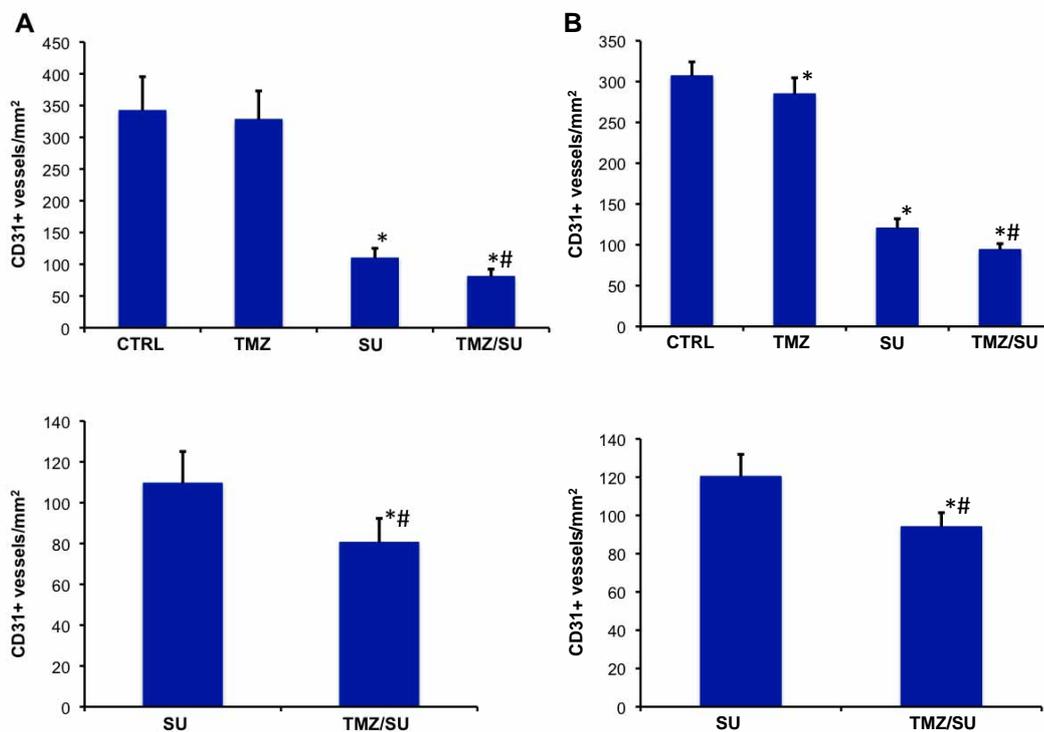


Abb. 16: Graphische Darstellung der Tumorgefäßdichte in A) SF126 und B) U87-Tumoren

In beiden Zelllinien (A=SF126, B=U87) wiesen die Gruppen SU und TMZ/SU (A: SU=116±15, TMZ/SU=78±8; B: SU=120±19, TMZ/SU= 94±16) eine signifikante Abnahme der Gefäßdichte (gemessen in klar voneinander separierten CD31-positiven Gefäßanschnitten/mm²) im Vergleich zur Kontrollgruppe (CTRL: A=342±59; B=307±30) auf. Verglichen mit den SU-behandelten Tumoren, war die Abnahme der Gefäßdichte in Tumoren beider Zelllinien signifikant höher unter Kombinationstherapie TMZ/SU (siehe C zur Verdeutlichung). In U87-Tumoren wurde bei der TMZ- Gruppe (MVD=285±31) ebenso eine geringe, statistisch signifikante Verminderung der MVD im Vergleich zu Kontrolltumoren (s.o.) beobachtet. (N=4; Alle Werte sind als Mittelwerte ±SD angegeben. *p<0,05 vs. CTRL; *#p<0,05 vs. SU)

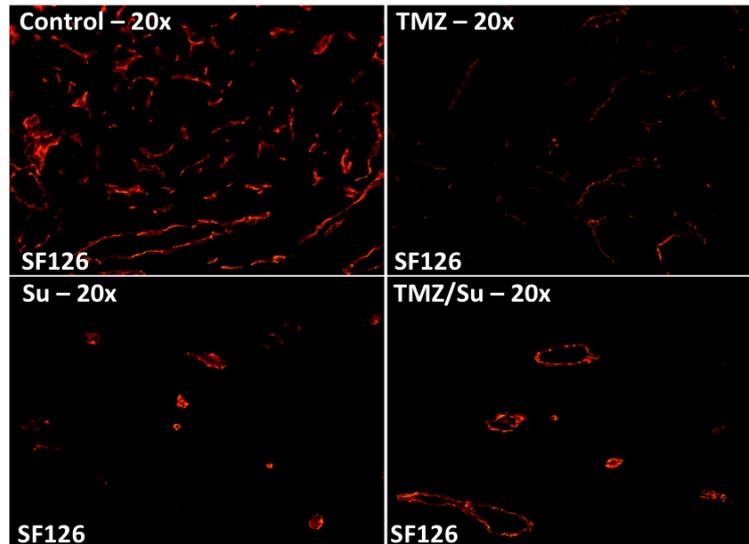


Abb. 17: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der mikrovaskulären Gefäßdichte in SF126-Xenografts

Gefäßmarker PECAM (CD31, rote Fluoreszenz) zur Analyse der Tumorgefäßdichte. 20X Vergrößerung. Ein deutlicher additiver antiangiogener Effekt von TMZ/SU ließ sich quantitativ feststellen, der hier in beispielhaft in SF126-Gliomen visualisiert wird. Auffällig ist der Kaliberunterschied der resistenten, trotz TMZ/SU-Therapie überlebenden Tumorgefäße im Vergleich zu den schmalen, diffuseren Gefäßanschnitten aus Kontrolltumoren.

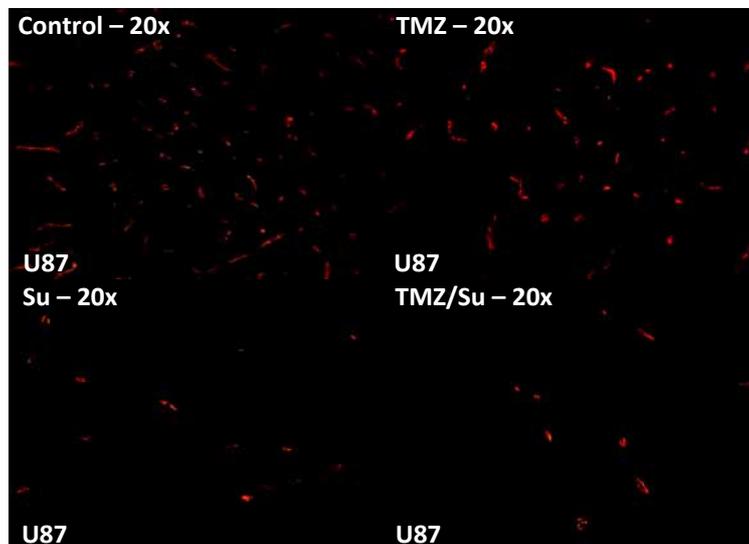


Abb. 18: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der mikrovaskulären Gefäßdichte in U87-Xenografts

Gefäßmarker PECAM (CD31, rote Fluoreszenz) zur Analyse der Tumorgefäßdichte. 20X Vergrößerung. Vergleichbares Phänomen wie oben beschrieben als Reaktion auf Kombi-Therapie TMZ/SU kann hier beispielhaft auch in U87 Gliomen demonstriert werden. Man erkennt deutlich reduzierte Gefäßdichte sowohl in der SU- Gruppe als auch noch massiver ausgeprägt in TMZ/SU-Gruppe im Vergleich zur Referenz mit wenigen übrigen, größerkalibrigen Tumorgefäßen.

4.4.2 Therapieeffekte auf die Endothelzellproliferation

Aus der folgenden Abbildung werden die Resultate der quantitativen Auswertung der Endothelzellproliferation ersichtlich.

Alle applizierten Therapien induzierten eine signifikante Reduktion der proliferierenden Endothelzellen in den analysierten Tumorpräparaten beider Zelllinien im Vergleich zu den Kontrolltumoren. Die Abnahme der Endothelzellproliferation war in den Tumoren, die mit einer Kombination von zytostatischem (TMZ) und antiangiogenem Wirkstoff (SU) behandelt worden waren am höchsten (SF126: TMZ/SU=-70%±7%; U87: TMZ/SU= -53%±6%) und unterschied sich signifikant von der erreichte Reduktion beider Monotherapien (SF126: TMZ=-37%±4%, SU=-52%±4% ; U87: TMZ=-24%±12% , SU=-30%±18%). Analog zu den Ergebnissen der immunhistochemisch-basierten Gefäßdichtebestimmung verweist dieses Ergebnis auf einen möglichen additiven antiangiogenen Effekt der beiden eingesetzten Wirkstoffe.

Eine statistisch signifikante Differenz des antiangiogenen Effektes auf die Endothelzellproliferation zwischen den beiden Gruppen TMZ und SU war nicht zu beobachten.

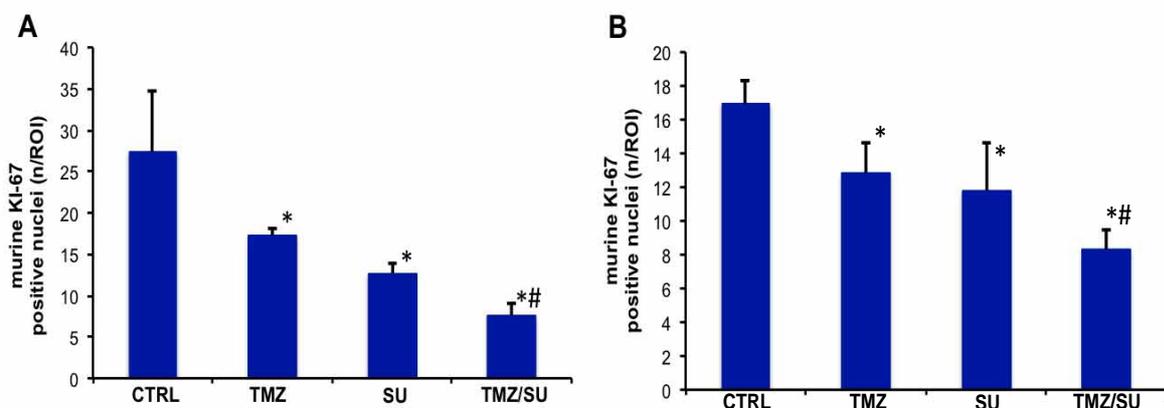


Abb. 19: Graphische Darstellung der Endothelzellproliferation in A) SF126- und B) U87-Gliomen

In beiden Zelllinien (A=SF126, B=U87) wiesen alle Behandlungsgruppen (A: TMZ= 17±1, SU=13±1, TMZ/SU=8±2; B: TMZ= 13±2, SU= 12±3, TMZ/SU= 8±1) eine signifikante Abnahme der Endothelzellproliferation (gemessen in Ki-67+- positiven Mausezellen pro Beobachtungsfeld von 0,04 mm²) im Vergleich zur Kontrollgruppe (CTRL: A=27±7; B=17±1) auf. Kombinierte TMZ/SU-Therapie führte in SF126- und U87-Gliomen zu einer signifikanten Reduktion der Endothelzellproliferationsrate im Vergleich zu beiden Monotherapien. (N=4; Alle Werte sind als Mittelwerte ±SD angegeben. *p<0,05 vs. CTRL; **p<0,05 vs TMZ and vs. SU)

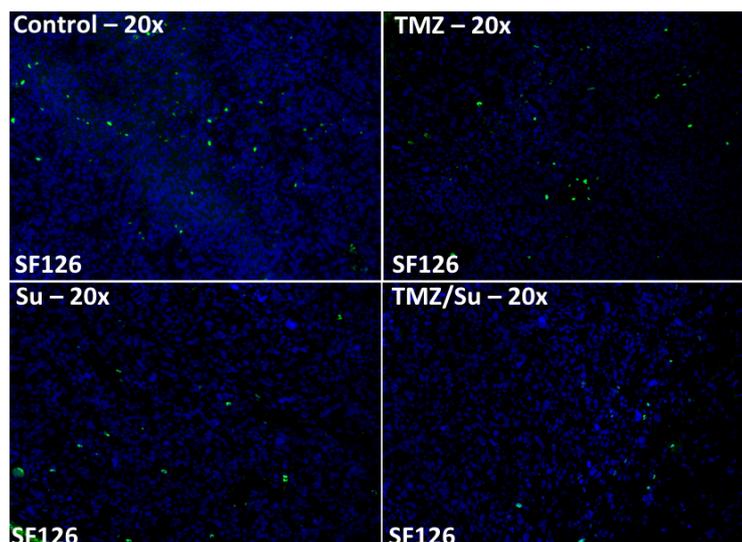


Abb. 20: Exemplarische fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Endothelzellproliferation in SF126-Xenografts

Endothelzellproliferation mit Anti-Maus KI-67 (grün) detektiert. Kerngegenfärbung mit DAPI (blau). 20 X Vergrößerung. In Analogie zur detektierten signifikant reduzierten MVD in der TMZ/SU Gruppe, zeigte auch die Auswertung der Endothelzellproliferation diesen additiven antiangiogenen Effekt in dieser Gruppe im Vergleich zu Kontrolle, TMZ und insbesondere auch zur SU-Gruppe. Hier ist beispielhaft die starke Drosselung der aktiven Endothelzellproliferation in der Kombinationsgruppe dargestellt.

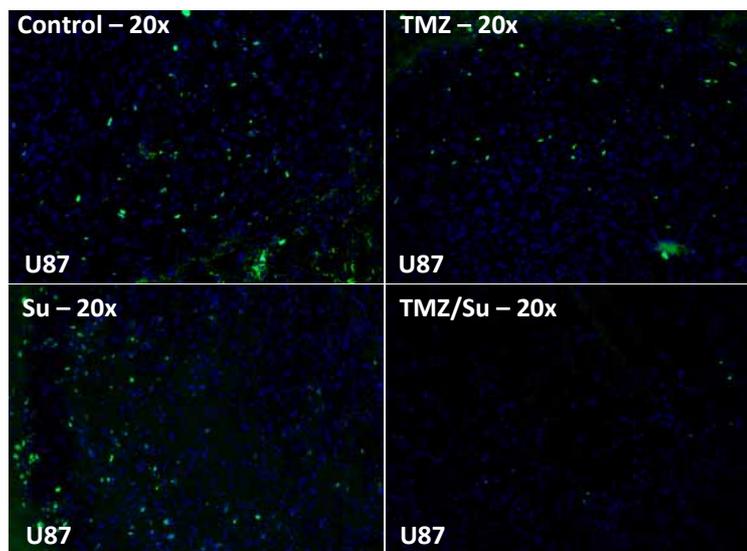


Abb. 21: Exemplarische fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Endothelzellproliferation in U87-Xenografts

Endothelzellproliferation mit Anti-Maus KI-67 (grün) detektiert. Kerngegenfärbung mit DAPI (blau). 20 X Vergrößerung. U87-Gliome wiesen ebenfalls diese signifikante Reduktion der Endothelzellproliferation in den kombiniert therapierten Xenografts auf, wobei hier die Endothelzellproliferation auch in den Kontrolltumoren deutlich niedriger war als in den SF126-Gliomen.

4.4.3 Therapieeffekte auf die Gefäß-Perizyten-Assoziation

Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung der Gefäß-Perizyten-Assoziation sind in der kommenden Graphik veranschaulicht.

Wie schon zuvor in vorangegangenen Studien beschrieben, führte die simultane Inhibition der Tyrosinkinase VEGFR2 und PDGFR- β durch Sunitinib, die maßgeblich sind für eine fein abgestimmte Endothelzell-Perizyten-Interaktion, auch in unseren Experimenten zu einer signifikanten Abnahme der von Perizyten umgebenen Gefäße in der SU-Gruppe (SF126: $-24\% \pm 9\%$; U87: $-23\% \pm 2\%$) und der TMZ/SU- Gruppe (SF126: $-12\% \pm 9\%$; U87: $-7\% \pm 3\%$) beider Tumorzelllinien.

Beachtlich ist aber, dass die Inhibition der Perizytenassoziation von Tumorgefäßen bei beiden Gliomzelllinien in der TMZ/SU- Gruppe signifikant niedriger ist als in der SU-Monotherapie-Gruppe. Folglich führte die kombinierte Therapie hier zu einer partiell reetablierten mit Umgehung der von Sunitinib vermittelten potenten Blockade von Perizyten-Endothelzell-Interaktionen.

Ein signifikanter Effekt von TMZ-Monotherapie auf die Perizyten-Gefäß-Assoziation der Tumorgefäße war im Vergleich zur Referenzgruppe nicht zu beobachten. Der PCI (Pericyte-Coverage-Index) war bei Plazebo-behandelten Tumorgefäßen durchschnittlich $90\% \pm 7$ und in Gliomxenograftgefäßen TMZ-behandelter Mäuse $89\% \pm 10\%$.

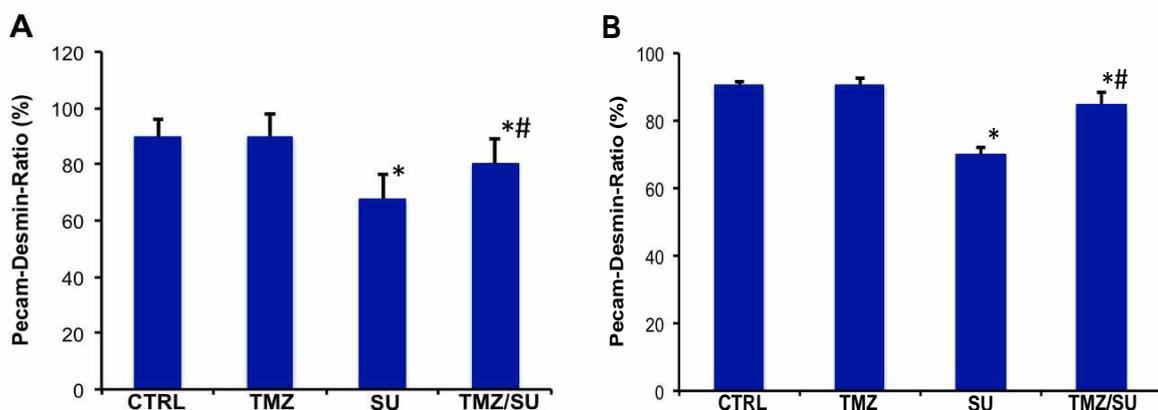


Abb. 22: Graphische Darstellung der Pecam-Desmin-Ratio% für A) SF126- und B) U87-Tumore

In beiden Zelllinien (A=SF126, B=U87) wiesen SU-behandelte und TMZ/SU-behandelte Tumore (A: SU= $68\% \pm 9\%$, TMZ/SU= $80\% \pm 9\%$; B: SU= $70\% \pm 2\%$, TMZ/SU= $85\% \pm 3\%$) eine signifikante Abnahme der Gefäß-Perizytenassoziation (gemessen als Ratio von Desmin-positiven Gefäßanschnitten zur Gesamtanzahl von Gefäßanschnitten pro Beobachtungsfeld von $0,04 \text{ mm}^2$)

im Vergleich zur Kontrollgruppe (CTRL: A=90%±7%; B=91%±1%) auf. Kombinierte TMZ/SU-Therapie führte jedoch im Vergleich zu alleiniger SU-Therapie wieder zu einer signifikanten Zunahme der Perizyten-assoziierten Gefäße in SF126- und U87-Gliomen. (N=4; Alle Werte sind als Mittelwerte ±SD angegeben. *p<0,05 vs. CTRL; *#p<0,05 vs. SU)

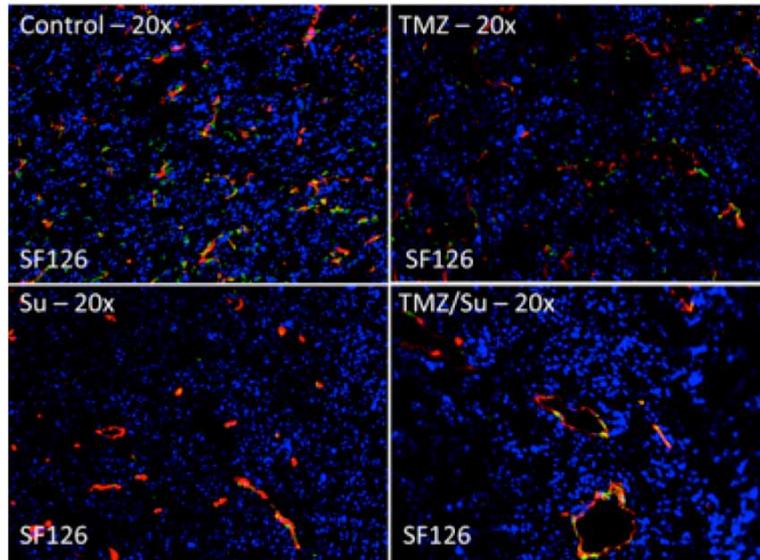


Abb. 23: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Gefäß-Perizyten-Assoziation in SF126-Xenografts⁸²

Die Doppelimmunfluoreszenz-Färbung mit PECAM (rot)/Desmin(grün) visualisiert die Perizyten-Endothel-Interaktion der untersuchten SF126-Tumoren. 20X Vergrößerung. Auffällig ist die reduzierte Anzahl von Desmin-positiven Tumorgefäßen als Reaktion auf Sunitinibmonotherapie und eine Reetablierung von Desmin-positiven Tumorgefäßen in Tumoren, die kombiniert mit TMZ/SU therapiert worden waren. Außerdem sind deutlich vergrößerte Gefäßdurchmesser der insgesamt signifikant reduzierten Tumorgefäße in der Kombinationsgruppe zu erkennen.

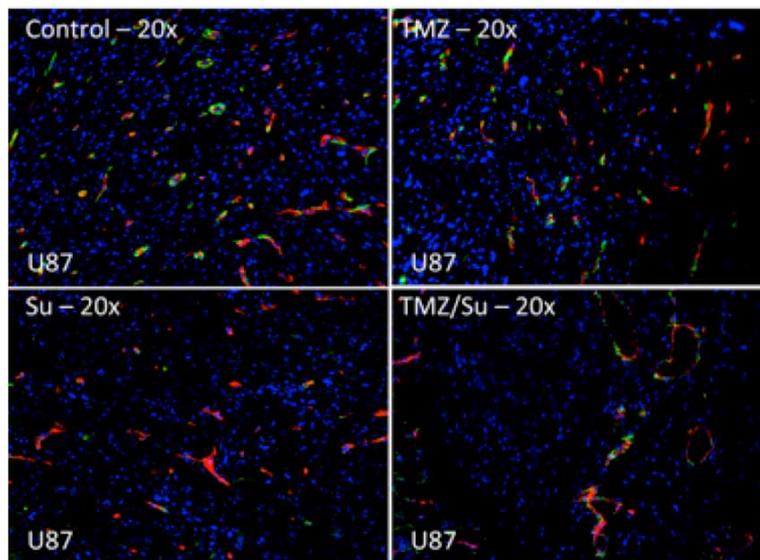


Abb. 24: Repräsentative fluoreszenzimmunhistochemische Darstellung der Gefäß-Perizyten-Assoziation in U87-Xenografts⁸²

Perizyten-Endothel-Interaktion visualisiert mittels PECAM (rot)/ Desmin(grün)-Doppelimmunfluoreszenz (20X Vergrößerung) in subkutanen U87-Gliomxenografts. In Analogie zu den SF126-Gliomen, kann auch hier eine Reetablierung der Perizytenassoziation von Tumorgefäßen beobachtet werden, die unter SU-Monotherapie blockiert und, wie hier beispielhaft abgebildet, reduziert ist.

4.5 Mikrohämodynamik im experimentellen Gliom

4.5.1 Totale und funktionelle Gefäßdichte

Ausführliche intravitalmikroskopische Untersuchungen an SF126-Xenografts konnten die therapeutischen Effekte auf die Tumormikrozirkulation aufklären. Wir konnten eine signifikant reduzierte totale Gefäßdichte (TVD) in den experimentellen Tumoren monotherapierter Versuchstiere (SU und TMZ) im Vergleich zur Kontrolle (0,9% NaCl) beobachten. Die Abnahme der absoluten Gefäßdichte war signifikant stärker zu sehen in den SU-behandelten und TMZ/SU- behandelten Tumoren verglichen mit den TMZ-behandelten Tumoren. Der Vergleich von Sunitinibtherapie und Kombinationstherapie bezüglich TVD-Reduktion demonstrierte keine signifikante Differenz.

Im Gegensatz zur TVD, welche der Gesamtheit aller neu entstanden Gefäße im Tumorareal entspricht, stellt die FVD einen mikrovaskulären Parameter dar, der ausschließlich die tatsächlich mit Erythrozyten perfundierten Tumorgefäße einbezieht. Unsere Versuche konnten einen deutlich ausgeprägteren antiangiogenen Effekt in der Kombinationsgruppe TMZ/SU im Vergleich zu den anderen Gruppen aufzeigen. Während Sowohl SU – als auch TMZ- Monotherapie zu einer signifikanten Abnahme der funktionellen Gefäßdichte im Vergleich zur Plazebogruppe führte, erzielte die Kombination von TMZ/SU synergistisch eine weitere signifikante Reduktion von funktionellen Gefäßen besonders verglichen mit TMZ-Therapie allein.

Es ergaben sich keine Unterschiede für den Vergleich der Monotherapiegruppen untereinander.

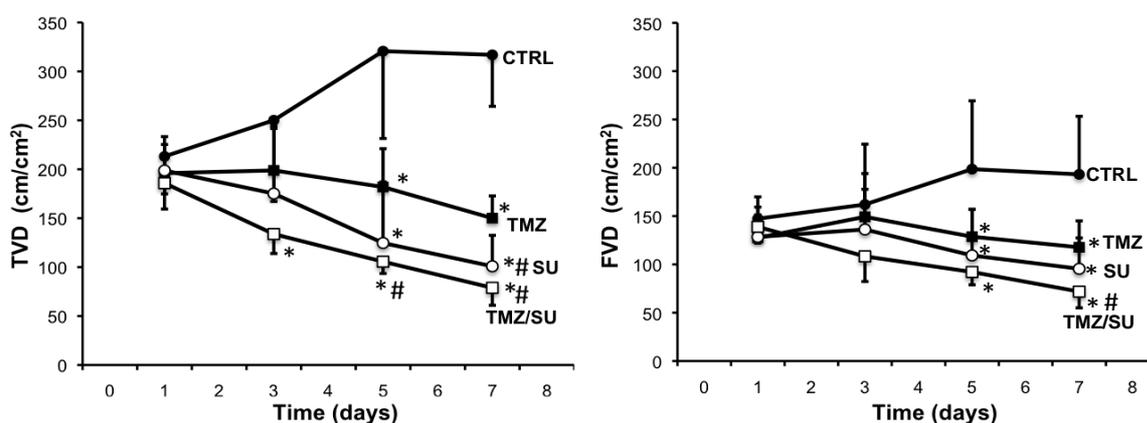


Abb. 25: Graphische Darstellung von totaler und funktioneller Gefäßdichte in SF126-Xenografts modifiziert nach Czabanka⁸²

Links: Ergebnisse der totalen Gefäßdichte graphisch dargestellt: Alle Therapiegruppen (SU, TMZ, TMZ/SU) zeigen eine reduzierte totale Tumorgefäßdichte (=TVD) im Vergleich zu Kontrollen. SU und TMZ/SU führten zu einer signifikant höheren Abnahme der TVD im Vergleich zu TMZ-Therapie allein.

Rechts: Graphische Darstellung der funktionellen Gefäßdichte (=FVD) in allen Versuchsgruppen: Auch die FVD nimmt in allen Behandlungsgruppen ab verglichen mit der Plazebogruppe. Ein additiver antiangiogener Effekt mit signifikanter Reduktion der funktionellen Gefäßdichte durch die Kombination TMZ/SU wurde im Vergleich zu beiden Monotherapien beobachtet. (N=6; Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben * = $p < 0,05$ vs. CTRL, # = $p < 0,05$ vs TMZ)

4.5.2 Perfusionsindex, Mikrozirkulation und Permeabilität

Eine genaue Betrachtung der oben ausgeführten basalen intravitalmikroskopischen Untersuchungen lässt erkennen, dass trotz ausgeprägtem additiven inhibitorischem Effekt auf die Tumorangio-genese, die TMZ/SU Kombinationsbehandlung niemals zu einer absoluten Eradizierung von neu entstandenen Tumorgefäßen führte. Die maximale Reduktion der totalen Gefäßdichte betrug durchschnittlich 70-80%. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine nicht unerhebliche Anzahl an Tumorgefäßen resistent gegenüber der erfolgten Therapie sind.

Alle eingesetzten Angiogenese-inhibierenden Strategien ergaben nach intravitalmikroskopischen Analysen eine Augmentation des Perfusionsindex der Tumorgefäße. Definiert wird der Perfusionsindex als Ratio der funktionellen Gefäßdichte, also von Erythrozyten perfundierten Gefäßen, an der totalen nachweisbaren Gefäßdichte. Dieser Parameter spiegelt hiermit die Funktionalität und Effektivität des neu entstandenen Tumorgefäßnetzes wieder. Folglich kann konstatiert werden, dass ein Anstieg des Perfusionsindex als Folge der angewandten antiangiogenen Therapie eine strukturierte, homogenere Tumorrestdurchblutung bedingt mit verbesserter Funktionalität vor allem der therapie-refraktären Tumorgefäße.

Dieses Phänomen präsentierte sich in unseren Untersuchungen signifikant stärker ausgeprägt in TMZ/SU kombiniert behandelten sowie in SU-monotherapierten Tumoren im Vergleich zur TMZ-Gruppe.

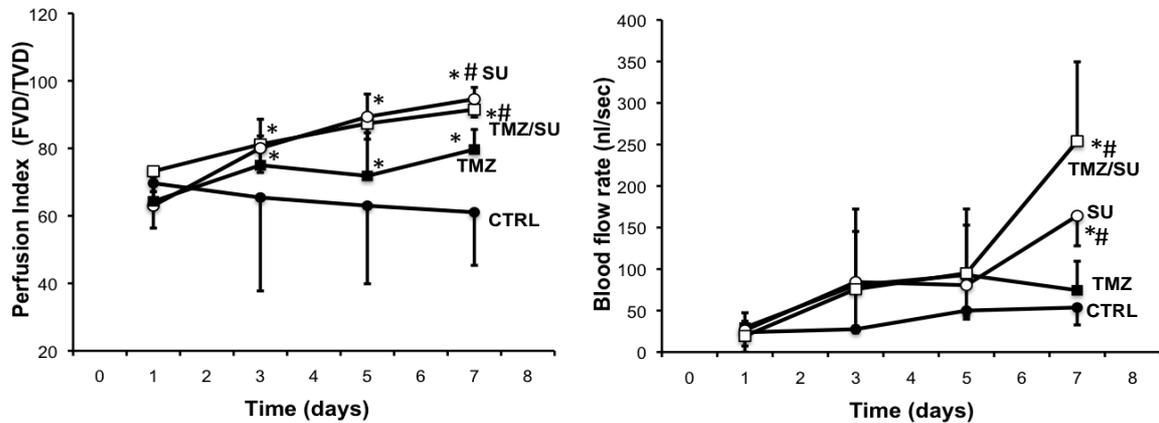


Abb. 26: Graphische Darstellung des Perfusionsindex und der mikrovaskulären Blutflussrate in SF126-Xenografts modifiziert nach⁸²

Links: Der Perfusionsindex nahm in allen Therapiegruppen im Vergleich zum Placebo zu. Die Perfusion war in SU- und TMZ/SU-therapierten Xenografts signifikant effektiver als in der TMZ-Gruppe.

Rechts: Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des mikrovaskulären Blutflusses in der SU- und TMZ/SU-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe parallel zum verbesserten Perfusionsindex. TMZ-Therapie führte zu keiner nachweisbaren Veränderung dieses mikrohämodynamischen Parameters. (N=6; Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben * = $p < 0,05$ vs. CTRL, # = $p < 0,05$ vs TMZ)

In Analogie zum verbesserten Perfusionsindex in TMZ/SU- und SU-therapierten Tumoren, konnte in diesen Gruppen ebenso eine verbesserte Mikrohämodynamik beobachtet werden, insbesondere eine Zunahme des mikrovaskulären Blutflusses, (gemessen in nl/s) in den therapie-resistenten Gefäßen. In TMZ-therapierten Tumoren ließ sich im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Blutflussrate ermitteln.

Darüber hinaus ergab die Analyse der mikrovaskulären Permeabilität, dass die residualen Tumorgefäße, die auf die vorausgegangene TMZ/SU- Therapie nicht angesprochen hatten, eine signifikant verminderte Permeabilität im Vergleich zu Tumoren der beiden Monotherapie- und Kontrollgruppen zeigten. Veränderung der Tumorgefäßpermeabilität konnten in den SU- und TMZ-therapierten Tumoren nicht beobachtet werden. Passend zur intravitalmikroskopisch festgestellten Reduktion der Gefäßpermeabilität in kombiniert behandelten experimentellen SF126 Gliomen, hatte die immunhistochemische Analyse in dieser Gruppe eine veränderte Perizyten-

Endothel-Assoziation gezeigt, insbesondere im Vergleich zu Tyrosinkinase-Inhibition (v.a. PDGFR- β) durch Sunitinib allein.

Die partiell reetablierte Gefäß-Perizyten-Assoziation in Tumorgefäßen unter kombinierter TMZ/SU-Therapie spricht für eine Zunahme der Perizyten-Endothelzell-Interaktionen hierunter trotz potenter PDGFR-Blockade mit Sunitinib.

Insgesamt jedoch war der Perizyten-Coverage-Index (PCI=Anteil von Tumorgefäßen, die Perizytenkontakt aufweisen) in sowohl SU-behandelten als auch kombiniert TMZ/SU behandelten Tumoren signifikant niedriger als in TMZ- und Kontrolltumoren.

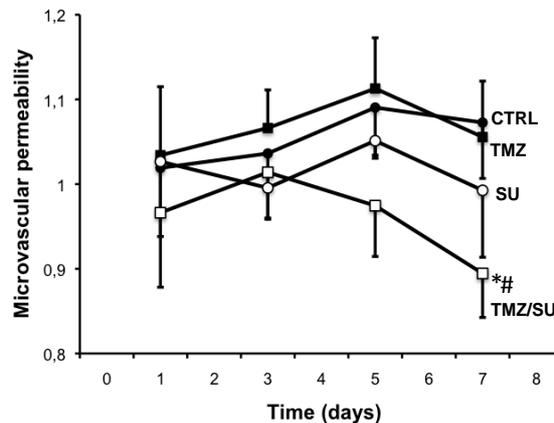


Abb. 27: Graphische Darstellung der Gefäßpermeabilität in SF126-Xenografts modifiziert nach⁸²

Kontroll- und TMZ-Gruppe wiesen keine nachweisbaren Differenzen bezgl. Permeabilität der Tumorgefäße auf. Die niedrigste Permeabilität, vermutlich resultierend aus einer Reetablierung der Endothel-Perizyten-Schranke, wiesen die residualen Gefäße nach TMZ/SU-Therapie auf, mit signifikanter Differenz zu allen anderen drei Gruppen, insbesondere auch zu SU-therapierten Xenografts. Im Vergleich zu Kontroll- und TMZ-Gruppe erreichte auch die SU-Gruppe signifikant niedrigere Werte für die Gefäßpermeabilität. (N=6; Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben * = $p < 0,05$ vs. CTRL, # = $p < 0,05$ vs. TMZ und vs. SU)

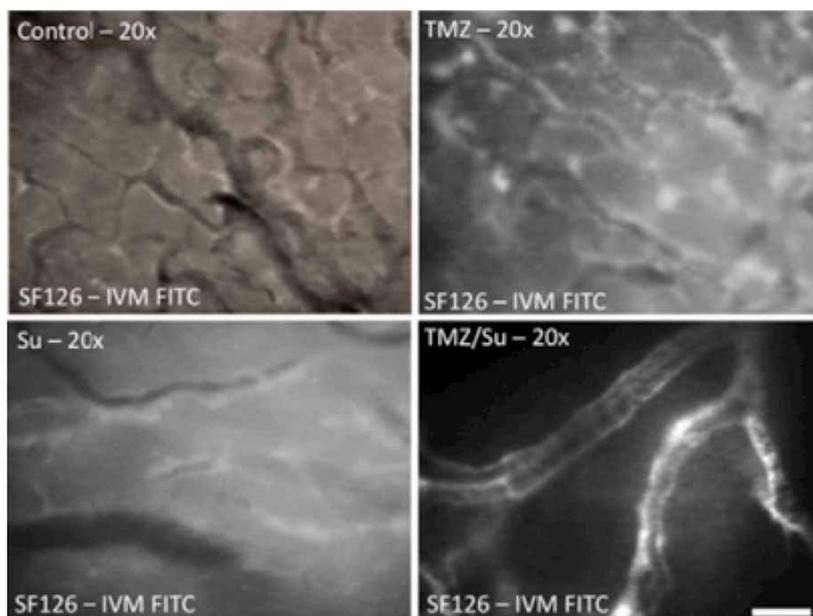


Abb. 28: Repräsentative intravitalmikroskopische Darstellung der Tumormikrozirkulation⁸²

Darstellung erfolgte mittels FITC-Fluoreszenz und Epiilluminationstechnik durch einen Grünfilter in 20X Vergrößerung. Oben: links=Kontrolle, rechts=TMZ. Unten: links=SU, rechts=TMZ/SU. Zu erkennen sind eine reduzierte Tumorgefäßdichte in SU- und TMZ/SU-behandelten Tumoren. Therapie-resistente Tumorgefäße in SU- und TMZ/SU-Tumoren weisen größere Gefäßdurchmesser auf. Zu beobachten ist ein deutliches extravaskuläres FITC-Fluoreszenzsignal in Kontroll-, TMZ- und SU-Tumoren, welches aus der erhöhten vaskulären Permeabilität in diesen Tumoren resultiert. Resistente Tumorgefäße in TMZ/SU-behandelten Tumoren zeigen ein signifikant niedrigeres extravaskuläres Fluoreszenzsignal als Folge der geringeren Gefäßpermeabilität.

4.6 Expressionsprofil Angiogenese-relevanter Targets

Nachdem unsere in vivo Versuche und die anschließenden immunhistochemischen Nachuntersuchungen einige Anhaltspunkte für die Implikation von vaskulären Resistenzmechanismen nach antiangiogener Therapie geliefert hatten, sollte diese These mit molekularbiologischen Methoden weiter verifiziert werden.

Hierzu wurde das Expressionsprofil der explantierten Xenografts in allen vier Gruppen hinsichtlich Veränderungen typischer Angiogenese-assoziierter Gene mittels qPCR analysiert. Untersuchungsgegenstand waren folgende Gene: Ang 1, Ang 2, Notch 1, DLL-4, Ephrin B2, Ephrin B4, Tie-2.

In den quantitativen molekularbiologischen Analysen konnte eine signifikante Hochregulation von Ang-1 und Herunterregulation von DLL-4 induziert durch Kombinationstherapie mit TMZ/SU identifiziert werden.

Die Applikation von TMZ resultierte in einer deutlichen Hochregulation von Ang-1 und Tie-2, welche beide Schlüsselmediatoren in Perizyten-vermittelten Signalwegen des Endothelzellüberlebens darstellen.

Als Reaktion auf SU-Monotherapie kam es in den Tumoren zu einer signifikanten Downregulation von DLL-4-RNA, wobei diese verminderte Expression deutlich ausgeprägter ($p < 0,05$) in kombiniert therapierten Xenografts war. In den übrigen Tumorangiogenese-relevanten Genen, die durch unsere Analyse erfasst wurden, waren keine Expressionsveränderungen feststellbar.

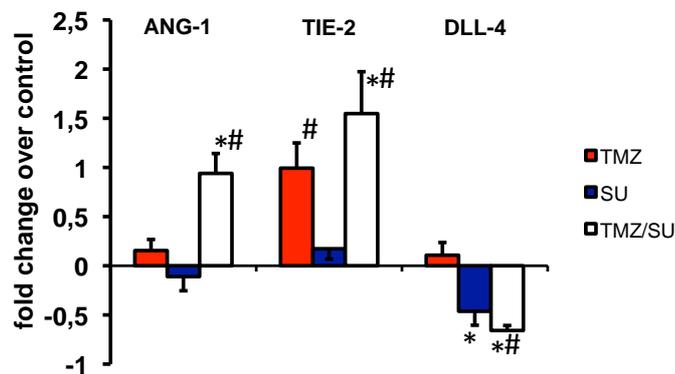


Abb. 29: Expressionsveränderungen von Ang-1, Tie-2, und DLL-4 in SF126-Xenografts

Die quantitative PCR-Analyse zeigte in kombiniert TMZ/SU-therapierten Xenografts eine signifikante Hochregulation von ANG-1 und Tie-2, wobei die vermehrte Expression von Tie-2 ebenfalls in reduziertem Maß in TMZ-behandelten Tumoren zu detektieren war. Ferner induzierte SU-Therapie in SF126 Xenografts eine Downregulation von DLL-4, die ebenfalls ausgeprägter unter TMZ/SU-Therapie festzustellen war. (N=3; Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben * = $p < 0,05$ vs. CTRL, # = $p < 0,05$ vs. SU, die Nulllinie markiert die Genexpression der Kontrolltumore.)

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Gliomzelllinien SF126 und U87 und Relevanz des MGMT-Status

Die Untersuchungen wurden an zwei etablierten Gliomzelllinien SF126 und U87 im subkutanen Tumormodell durchgeführt. Einerseits konnten dadurch eventuelle zelllinienspezifische Unterschiede in der Ansprechbarkeit auf die ausgewählten Therapieschemata untersucht werden. Andererseits wurde so eine Vergleichbarkeit von antiangiogenen und antitumoralen Effekten der eingesetzten Therapie in zwei Gliomentitäten gewährleistet.

Die Analyse des MGMT-Promotor-Methylierungs-Status mittels Pyrosequenzierung zeigte in beiden Zelllinien eine Methylierung von mindestens einer CpG-Insel des MGMT-Promoters und ist damit mit einer epigenetischen Stummschaltung des MGMT-Gens und damit seiner Expression gleichzusetzen⁸⁴. O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase (MGMT) ist eine ubiquitär vorkommendes DNA-Reparaturenzym, das im Laufe der Evolution gut konserviert wurde. Eine Methylierung des MGMT-Promoters ist mit einer Resistenz gegenüber alkylierenden Chemotherapeutika assoziiert. Das Enzym macht die Alkylierung der DNA an der O6-Position von Guanin rapide rückgängig, indem es die Alkylgruppe in sein aktives Zentrum überführt und neutralisiert. Daher antagonisiert MGMT den Effekt vieler gängiger alkylierender Zytostatika in der Therapie maligner ZNS-Tumoren. Dazu gehören Substanzen wie Carmustin (BCNU), Lomustin, Fotemustin, Procarbazin und Temozolomid. Die von Ihnen gesetzte zytotoxische DNA-Läsion mit Akkumulation von O6-Alkylguanin in der Zelle und konsekutivem Mismatch-Repair und Apoptoseinduktion wird durch hohe MGMT-Spiegel unwirksam gemacht. Klinische Strategien zur Modulation der MGMT-Aktivität und dadurch Erhöhung der Chemosensitivität in Tumorzellen sind bereits seit zwei Dekaden Gegenstand wissenschaftlicher Investigationen.

Klinisch erhält dieser Biomarker zunehmend Bedeutung als prognostischer Marker für Glioblastompatienten nachdem große multizentrische Studien eine positive Korrelation von MGMT-Promotor-Methylierungsstatus und klinischem Ansprechen auf alkylierende Chemotherapien, v.a. Temozolomid, aufgedeckt haben⁸⁵. Der MGMT-Status wird aktuell bereits bei der klinischen Entscheidungsfindung im Sinne einer

individualisierten, tumorbiologie-adaptierten Medizin für Gliompatienten berücksichtigt und gehört zu den Stratifizierungskriterien neuer klinischer Studien⁸⁴.

In der Fachliteratur variieren die Zahlen für einen methylierten MGMT-Status bei Glioblastomen sehr stark und schwanken je nach klinischer Studie zwischen 30-60%. Eine Übersichtsarbeit, die die 25 größten Studien zur Detektion der Häufigkeit von Methylierung des MGMT-Promoters bei Glioblastomen herausgefiltert und evaluiert hat, nennt eine durchschnittliche Häufigkeit von 50% MGMT-Methylierung beim Glioblastom⁸⁴. Das bedeutet, dass nur in etwa die Hälfte der neu diagnostizierten Glioblastompatienten von der besseren Prognose nach kombinierter Radiochemotherapie und adjuvanter Temozolomidgabe profitieren. U87- und SF126-Zellen aus unseren Versuchen gehören daher in die Kategorie der Gliomzellen, die besser von den zytotoxischen Effekten der Temozolomidbehandlung erfasst werden.

5.1.2 Eignung von Sunitinib als antiangiogene Substanz beim GBM

Sunitinib hat sich als potenter Multi-Tyrosin-Kinase-Inhibitor mit starker antiangiogener und antiproliferativer Aktivität in vielen präklinischen und klinischen Studien erwiesen. Es handelt sich um ein orales Oxindol, das im Vergleich zu seinen Vorgängersubstanzen SU5416 und SU6668⁶⁹ eine bessere Löslichkeit sowie ein niedrigeres Toxizitätsprofil aufweist. Die antiangiogene und antiproliferative Aktivität resultiert aus der selektiven Inhibition folgender Zielstrukturen/-rezeptoren: VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR- α , PDGFR- β , KIT, FLT3, RET und CSF1R.

Der Einsatz von Sunitinib hat in Mausmodellen zahlreicher Tumorentitäten inklusive Kolon-, Lungen-, Brust-, Prostata- und Nierenzellkarzinom zur Tumorregression bzw. Tumorwachstumsverzögerung geführt⁸⁶. Phase-III-Studien haben in den USA zur Zulassung der Substanz beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom⁸² und beim Imatinib-refraktären GIST (Gastrointestinaler Stromatumor)⁸⁷ geführt. Klinische Studien in früheren Phasen werden zur Detektion einer Effektivität bei anderen Krebserkrankungen an einigen Zentren durchgeführt⁶⁹. Auch in subkutanen Gliomxenografts der Zelllinien C6, GL261 und SF763T hat Sunitinib zur Tumorverkleinerung bzw. Wachstumsverzögerung geführt⁸⁸. Die Arbeitsgruppe um de Boüard et al. konnte nachweisen, dass Sunitinib auch im orthotopen Mikromilieu antiinvasive und antiangiogene Effekte zeigt⁸⁶. Sunitinib-behandelte Versuchstiere mit intrazerebral implantierten U87-Xenografts zeigten in dieser Arbeit in der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse einen signifikanten Überlebensvorteil von 36% (36d vs. 25d) im

Vergleich zu den Kontrolltieren. Da Sunitinib sowohl VEGFRs als auch PDGFRs inhibiert, kann erwartet werden, dass die Substanz simultan das Überleben und die Proliferation von Endothelzellen, Perizyten und PDGFR-exprimierenden Gliomzellen beeinflusst. Dies macht die ausgewählte Substanz zu einem idealen Kandidaten für die in unserer Studie verwendeten Tumorentitäten mit hoher VEGFR- PDGFR-Expression. Die duale Inhibition von VEGFR- und PDGFR- vermittelten Signalwegen verhindert spezifische Perizyten-Endothelzell-Interaktionen, die bei der Resistenzentwicklung gegen monospezifische antiangiogene Therapien eine Rolle spielen⁸⁹. In intravitalmikroskopischen Untersuchungen führte kombinierte VEGFR- und PDGFR-Inhibition zu einer signifikant erhöhten Regression von existenten Tumorgefäßen^{89,90}. Dabei resultiert die hochpotente antiangiogene Wirkung einer kombinierten VEGFR- und PDGFR-Blockade aus der breitgefächerten Inhibition von Mechanismen des Überlebens und der Migration von Endothelzellen sowie deren Formation zu Gefäßschläuchen (Tube formation)^{20,89}.

Eine Vorgängerstudie aus unserer Klinik konnte den Effekt von Sunitinib auf die Tumormikrohämodynamik und den lokalen Zufluss einer Chemotherapie in SF126-Xenografts erfolgreich intravitalmikroskopisch demonstrieren⁶⁸. Unter Sunitinibtherapie konnten einige Tumorgefäße beobachtet werden, die sich gegenüber den antiangiogenen Stimuli refraktär verhielten. Interessanterweise war die hämodynamische Situation in genau diesen therapierefraktären Gefäßen verbessert, mit einer höheren Blutflussrate aufgrund durchschnittlich größerer Gefäßdurchmesser und konsekutiv zunehmender Erythrozytenfließgeschwindigkeit (RBCV = Red Blood Cell Velocity). Hierdurch könnte Sunitinib einen potenziellen „chemosensibilisierenden“ Effekt auf Tumorgefäße und -zellen haben. Zhou et al. haben 2008 den Einfluss von Sunitinib auf die Distribution von Temozolomid im subkutanen und orthotopen experimentellen Gliom mittels Mikrodialyse analysiert⁹¹. Es zeigte sich hier eine verbesserte Versorgung des Tumors mit Temozolomid (Tumor-Plasma-Ratio erhöht) unter simultaner Sunitinibtherapie mit 10mg/kg täglich. Dies wurde durch einen verbesserten „vaskulären Normalisationsindex“ mit stabilen, vollentwickelten Gefäßen begründet^{88,91}.

Ein neuerer Aspekt für die Sunitinibtherapie des Glioms ist die Tatsache, dass hier ebenfalls der MGMT-Status für die therapeutische Effektivität gegenüber Glioblastomzellen essentiell zu sein scheint⁹². Chahal et al. konnten eine Korrelation von MGMT-Status und dem angiogenen Profil der Tumorzellen sowie deren Tumor-

induzierender Potenz demonstrieren⁹². Eine niedrige MGMT-Expression bei methyliertem Promoterstatus war hier mit einem höheren angiogenen Potenzial der Tumorzellen assoziiert⁹². Dies erlaubt uns die Annahme, dass die hier verwendeten MGMT-methylierten, TMZ-responsiven Gliomzellen durch ihr ausgeprägtes proangiogenes Potenzial und ihre hohe Gefäßdichte ideale Kandidaten für eine kombinierte Therapie von Angiogeneseblockern und Temozolomid darstellen.

Letztes Jahr zeigte die Veröffentlichung einer Phase-II-Studie aus Belgien an Patienten mit Glioblastomrezidiv, dass eine Sunitinibmonotherapie weder die Progression der Erkrankung aufhalten konnte, noch das Gesamtüberleben der Patienten verbesserte⁹³. Insofern könnte eine Kombination mit anderen onkologischen Therapiemodalitäten, insbesondere die Kombination mit Zytostatika, einen Einsatz von Sunitinib beim Glioblastom klinisch sinnvoll machen.

5.1.3 Temozolomid wirkt nicht nur zytotoxisch, sondern auch antiangiogen

Temozolomid, ein Imidazotetrazinon zweiter Generation, ist 1987 von Stevens et al. synthetisiert worden⁹⁴. Das Interesse an dieser Substanz nahm unter den Krebsforschern rasch zu, da Temozolomid nicht wie seine Vorgängersubstanzen (DTIC, MITC) von hepatischer Konversion in einen aktiven Metaboliten abhängig ist¹⁸. Obwohl die Methylierung an der N7-Position von Guanin eine Hauptwirkung (70% der Aktivität) von Temozolomid ausmacht, ist es die O6-Methylierung (5% Aktivität), die den biologisch wirksamen zytotoxischen Effekt an der Tumorzelle bewirkt¹⁸. Wie bereits zuvor erwähnt, kann dieser zytotoxische Effekt leicht von MGMT antagonisiert werden. Deshalb ist das Ansprechen auf Temozolomid entscheidend von der MGMT-Expression in den Tumorzellen abhängig, welche über die MGMT-Promotermethylierung reguliert wird.

Die neue Substanz zeigte eine gute antitumorale Aktivität in vielen Tumorentitäten *in vivo*⁹⁵. Erste klinische Studien von Newlands und seinen Kollegen Anfang der neunziger Jahre demonstrierten, dass die gute Effektivität beim Melanom und Glioblastom vor allem von einem festen zeitlich exakt reglementierten Dosierschema abhängig war⁹⁵. Desweiteren zeigte die Studie, dass Temozolomid eine gute orale Bioverfügbarkeit hat und eine geringe Myelotoxizität besitzt¹⁸.

In der Folge zeigte die gezielte Evaluation einer Temozolomid-Therapie bei primären Gehirntumoren⁹⁶ vielversprechende Ergebnisse. Die aus dieser Studie hervorgehende Datenlage, welche den synergistischen zytotoxischen Effekt von Radio-

/Temozolomidtherapie auf Gliomzellen untermauert, bildete das Fundament für die therapiereformierende multizentrische Studie von Stupp et al. im Jahr 2005⁶⁶. Gewonnene Resultate dieser klinischen Studie definieren bis heute den Therapiestandard für das Glioblastom⁵. Durch die kombinierte TMZ-/Radiotherapie konnte ein bisher unübertroffener Erfolg mit einer Verlängerung der Überlebenszeit von Glioblastompatienten auf durchschnittlich 14,6 Monate, einer Steigerung der 2-Jahres-Überlebensrate (2-JÜR) auf 27,2% sowie der 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) auf 9,8% erzielt werden⁵. Deutlich optimistischer ist die Statistik im Langzeit-Follow-Up für die Untergruppe von GBM-Patienten mit methyliertem MGMT-Promoter, die im Median eine Überlebenszeit von 23,4 Monaten haben, sowie eine 2-JÜR von 48,9% und eine 5-JÜR von 13,8%. Die Resultate dieser klinischen Studie definieren bis heute den Therapiestandard für das Glioblastom⁵.

In unserer Studie hat Temozolomidtherapie allein in hoher Dosis (200 mg/m^2) bei beiden MGMT-negativen Zelllinien signifikante proapoptotische, antiproliferative und antiangiogene Effekte demonstriert. Die Hypothese, dass niedrig dosierte Chemotherapie, die kontinuierlich oder in kurzen Intervallen (einmal täglich bis einmal wöchentlich) appliziert wird, eine antiangiogene Wirkung haben kann ist auch für Temozolomid in mehreren Arbeiten belegt worden⁹⁷. Hier ist nicht mehr die Tumorzelle, sondern die Endothelzelle der Mikrozirkulation der eigentliche Angriffspunkt. Diese Form der Chemotherapie wird auch als metronome bzw. als antiangiogene Chemotherapie bezeichnet⁹⁸. Neben der lokalen antiangiogenen Wirkung am Endothel der Tumormikrozirkulation besitzt die metronome Chemotherapie auch eine systemische antivaskuläre Wirkung. Die Mobilisation von endothelialen Progenitorzellen (EPC = Endothelial Progenitor Cells) aus dem Knochenmark wird inhibiert und die EPCs in der Peripherie werden geschädigt⁹⁹. Die „optimale biologische Dosis“ der metronomen Chemotherapie orientiert sich stark an der Konzentration von peripher zirkulierenden EPCs. Die Überlegenheit dieser Therapieform gegenüber einer MTD-Chemotherapie (MTD = maximal tolerable Dosis = hochdosierte Chemotherapie) in der Kontrolle wurde für einige Tumorentitäten nachgewiesen⁹⁸. Eine Pilotstudie von Patienten mit Glioblastomrezidiv, die auf eine konventionelle hochdosierte TMZ Therapie nicht ansprachen, zeigte, dass kontinuierliche niedrigdosierte (40 mg/m^2) metronome TMZ-Therapie die Progressions-freie Überlebenszeit (PFS) verlängern kann¹⁰⁰. Durch kombinierte metronome Chemotherapieschemata in Kombination mit

Angiogenese-Inhibitoren kann nach Evidenz aus mehreren Arbeiten ein synergistischer Effekt in der Tumorkontrolle erzielt werden¹⁰¹.

Untersuchungen von Mathieu et al. aus dem Jahr 2008 demonstrierten dieses Phänomen eines synergistischen antiangiogenen Effektes von Temozolomid durch kombinierte Gabe mit Bevacizumab auch an orthotopen SF188-Gliomxenografts⁸³. In dieser Arbeit wurde Temozolomid in konventioneller, höherer Dosierung (150 bis 200 mg/m²) verabreicht. Unter anderem wird dies durch eine verminderte Expression von HIF-1 α und anderer wichtiger pro-angiogener Faktoren untermauert.

Unsere Versuche, die ebenfalls mit einer hochdosierten TMZ-Therapie durchgeführt wurden, belegen diesen antiangiogenen Effekt. Wir konnten unter TMZ-Monotherapie eine histologisch verminderte mikrovaskuläre Gefäßdichte und eine reduzierte Endothelzellproliferation bei U87-Xenografts beobachten.

Es ist unklar, inwiefern Temozolomid die Angiogenese auch durch Einfluss auf die Perizyten-Endothel-Interaktion von Tumorgefäßen mitbestimmt. Immunhistologisch haben unsere Analysen an Gliomxenografts keinen statistisch signifikanten Unterschied des mithilfe von Desmin bestimmten PCI (Pericyte-Coverage-Index) von Tumorgefäßen unter TMZ-Therapie im Vergleich zur Kontrolle erkennen lassen. Unsere Daten haben interessanterweise gezeigt, dass die durch Sunitinib-Blockade verminderte Perizyten-Endothelzell-Interaktion mit signifikant reduzierter Perizytenassoziation von Tumorgefäßen um 20% (PCI = 90% in Kontrollmikrozirkulation, PCI = 68-70% unter SU-Monotherapie) durch eine Kombination mit Temozolomid partiell reetabliert wird. Dabei beobachten wir einen Anstieg der Perizyten-Gefäß-Assoziation unter TMZ/SU-Therapie, die zwar signifikant unter dem Ausgangsmaß von 90% liegt, aber um 12-15% zunimmt im Vergleich zu SU-Monotherapie. Wir vermuten, dass die Alterationen in der Perizyten-Gefäß-Assoziation unter kombinierter TMZ/SU-Therapie mit den von uns demonstrierten Expressionsveränderungen des angiogenen Profils, insbesondere von Ang-1 und Tie-2 korrelieren. Die Hochregulation der Faktoren Ang-1 und Tie-2, die unter anderem Perizytenüberlebensmechanismen und deren Rekrutierung regulieren, war in reduziertem Ausmaß bereits unter TMZ-Monotherapie zu sehen. Eine Studie von Zhang et al. hat ebenfalls einen vaskulären Normalisierungseffekt von alleiniger TMZ-Therapie zeigen können mit reduzierter Gefäßdichte und Zunahme Perizyten-assoziiertes α -SMA-positiver Tumorgefäße¹⁰². Dieser Effekt konnte so in unseren Analysen unter TMZ-Monotherapie jedoch nicht verifiziert werden.

5.1.4 Vor- und Nachteile des subkutanen Tumormodells

Die Versuche dieser Therapiestudie wurden wie zuvor beschrieben an einem subkutanen Tumormodell durchgeführt. Diese Methodik besitzt einige pragmatische Vorteile. Erstens können subkutane Tumoren unter einfacher Handhabung durch Injektion von Tumorzellen unter die Haut des Versuchstiers induziert werden. Die intrazerebrale Implantation von Tumorzellen erfordert aufwendigere operative Maßnahmen, die auch für die Versuchstiere eine höhere Belastung bedeuten. Zunächst stellt eine chirurgische Intervention ein Trauma für die Versuchstiere dar, die eine Einplanung von einer postoperativen Erholungsphase erforderlich macht.

Zweitens kann das Volumen subkutan implantierter Tumoren während des Beobachtungszeitraumes durch einfaches Ausmessen mit Hilfe eines Mess-Schiebers genau dokumentiert werden. Die Messung des Tumorsvolumens von orthotopen, intrazerebral wachsenden Tumoren verlangt eine gute Bildgebung, die zeitaufwendig und kostenintensiver ist und dabei noch einer höheren Messungsgenauigkeit unterliegt. Da ein zentraler Parameter für den Erfolg einer antitumoralen Therapie ihr Einfluss auf das Wachstum des Primärtumors und seine Metastasierung ist, hat sich das subkutane Modell in seiner Einfachheit und guten Aussagefähigkeit bewährt¹⁰³.

Dennoch hat das subkutane Modell einen entscheidenden Nachteil. Die Tumore wachsen nicht in ihrem Primärorgan und vermissen so die dort herrschenden physiologischen Einflüsse. Im orthotopen Modell unterliegt das Tumorwachstum und die Angiogenese essentiellen Faktoren des realen Mikromilieus wie Wachstumsfaktorkonzentrationen, Temperatur, Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, die sich wesentlich vom künstlich induzierten Milieu subkutan unterscheiden¹⁰⁴. Folglich imitiert das orthotope Modell die humane Pathophysiologie besser.

5.1.5 Rückenhautkammermodell

Das Rückenhautkammermodell ist eines von wenigen Modellen, mit dem in vivo mikrozirkulatorische Parameter visualisiert werden können und mittels intravitalmikroskopischer Untersuchung eine Darstellung des dynamischen Verlaufs von angiogenen Prozessen möglich ist.

Das Modell wurde von Endrich und Mitarbeitern⁷³ im Jahr 1983 entwickelt und zehn Jahre später erstmals von Lehr et al.⁷⁴ für die Maus beschrieben.

Zur Untersuchung von Angiogenese und Revaskularisierungsprozessen wurde das Rückenhautkammermodell bereits für multiple Gewebe angewandt wie z.B. für Analysen der Milz¹⁰⁵, des Kolorektalen Karzinoms¹⁰⁶, der Langerhans'schen Inseln¹⁰⁷, von Ovarialfollikeln¹⁰⁸ und des malignen Glioms⁷⁵.

Das in unserer Studie verwendete Modell der transparenten Rückenhautkammer an der Nacktmaus erlaubt nach einer postoperativen Regenerationsphase von ein bis zwei Tagen eine intravitalmikroskopische Analyse der Mikrohämodynamik über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen je nach Kammerqualität⁷⁴. Dieser verhältnismäßig lange Beobachtungszeitraum, den dieses Tiermodell für repetitive Analysen mikrozirkulatorischer Veränderungen gewährleistet, ist bisher einzigartig. Im Vergleich zu den gängigen sog. „Akutmodellen“, kann ein Tier ohne weitere Intervention in vivo mehrfach untersucht werden.

Makroskopische und mikroskopische Untersuchungen konnten morphologische oder funktionelle Veränderung der Gefäße im Präparationsareal ausschließen⁷³.

Die individuelle Belastung der Versuchstiere wurde minimiert durch die Wahl von Titankammern, die sich durch ein geringes Gewicht, eine äußerst hohe Stabilität und biologische Inertheit auszeichnen¹⁰⁷.

Darüber hinaus ermöglicht die Kammerkonstruktion eine praktisch einfach durchführbare Implantation und Beobachtung verschiedener syngener (z.B. Langerhans Inseln, Nebenschilddrüsen) und xenogener (z.B. Tumorzellen) Gewebe.

5.1.6 Immunhistochemische Marker

In unserer Studie wurden folgende immunhistologischen Marker verwendet:

- CD31/PECAM zur Gefäßdarstellung
- aktivierte Caspase-3 zur Apoptosedetektion
- PHH3 als Proliferationsmarker
- anti-Maus KI-67 als Proliferationsmarker für Endothelzellen
- Desmin als Perizytenmarker.

Die Eignung der einzelnen Marker für unsere Fragestellung soll hier kurz diskutiert werden.

Eine Vielzahl an Markern zur Visualisierung von vaskulären Endothelzellen sind in der Vergangenheit identifiziert und in umfangreichen Arbeiten bewertet worden. Dazu gehören v.a. CD31, CD34, CD105, MECA-32, VEGFR-2, vWF, VE-cadherin, Kollagen-IV, Integrine und Lectine¹⁰⁹.

Die mikroskopische Bildgebung von Angiogenese, bzw. der Gefäßdichte im engeren Sinne, mit dem panendothelialen Marker CD31, ebenso bekannt als PECAM-1, ist seit langem gut etabliert¹¹⁰. Die Expression ist sowohl in Blutgefäßen als auch Lymphgefäßen zu beobachten, jedoch bei letzteren in deutlicher geringerer Ausprägung. CD31 wird ebenfalls von Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten exprimiert. Der Vorteil von diesem Marker besteht in der Darstellung auch früher bzw. unreifer Gefäßabschnitte, weniger in seiner Selektivität.

Man trifft auf eine erstaunliche Heterogenität bei der Expression von Endothelzellmarkern in Blut- und Lymphgefäßen verschiedener Spezies, Gewebe, Entwicklungsstadien, und physiologisch sowie pathologische Konditionen.

Dreidimensionale Whole-Mount Präparationen mit kombinierter Färbung mehrerer Marker könnten daher die Komplexität der Gefäßtypen und den endothelialen Phänotyp unverfälschter abbilden als Dünnschnitte mit einem singulären Marker.

Die Detektion von Apoptose gehört zu den primären Untersuchungen der antitumoralen Effektivität einer Therapieform. Diese genetisch programmierte Art des Zelltods kann durch bestimmte morphologische Charakteristika, Endonuklease-getriggerte DNA-Degradation und Beteiligung Apoptose-spezifischer Regulatorproteine identifiziert werden¹¹¹. Viele wissenschaftliche Arbeiten der Vergangenheit haben das Apoptoselevel mittels TUNEL-Assay (terminal deoxyribonucleotidyl transferase – mediated dUTP nick end labelling) analysiert. Hierbei handelt es um eine Methode, die in situ freie OH-Gruppen an fragmentierten DNA-Strängen markiert¹¹². Wenig später hat sich die Darstellung von aktivierter Caspase-3 als Alternative für die TUNEL-Methode etabliert.

Die TUNEL-Methode wurde aufgrund einer unzureichenden Diskriminierung von apoptotischen und nekrotischen Zelluntergängen bereits häufig kritisiert¹¹². Caspase-3 ist apoptose-spezifisch, und gehört zu den sog. Effektorcaspasen, die die zelleigene Aktin- und Lamininspaltung induzieren und DNA-spaltende Nukleasen aktivieren. Dennoch muss bedacht werden, dass Tumorzellen auch Caspase-unabhängig Apoptose begehen können und dieser Anteil der Tumorfraction durch unsere Methode nicht erfasst wurde^{113,114}.

Phosphoryliertes Phosphohistone H3 (PHH3) erreicht seine maximale Konzentration im Zellkern während der Mitose und kommt in der Interphase des Zellzyklus nur in vernachlässigbarer Quantität vor¹¹⁵. Ribalta et al. haben einen Antikörper gegen PHH3 an Meningeomproben untersucht, der eine stabile positive Korrelation von Mitosefigur-Quantifizierungen an herkömmlichen HE-Schnitten und PHH3-Immunhistochemien aufweist¹¹⁶. Aufgrund der prominenten fingerartigen Projektionen positiv-markierter Nuklei, ermöglicht diese Färbung eine rasche Fokussierung auf mitotisch aktive Areale, die sich deutlich von apoptotischen oder pyknotischen Nuclei unterscheiden. Daher postuliert diese Arbeit, dass PHH3 ein rapides verlässliches Grading von Meningeomen nach WHO-Kriterien ermöglicht, mit signifikantem Vorteil gegenüber anderen Proliferationsmarkern wie MIB-1 und KI-67.

Zur Darstellung der proliferierenden Endothelzellen in unseren humanen Gliomxenografts, die das Maß an aktiver Angiogenese widerspiegeln, haben wir einen monoklonalen Antikörper aus der Ratte gegen Maus Ki-67 Antigen ausgewählt. Dieser Klon zeigt keine Kreuzreaktion mit humanem Ki-67-Antigen, so dass wir davon ausgehen können, hiermit verlässlich die von der Maus in den xenogenen Tumoren induzierte Angiogenese mit Endothelzellproliferation darzustellen. PHH3-Antikörper, die selektiv nur auf Mausantigen reagieren stehen bislang noch nicht zur Verfügung. Der Name des Ki-67-Antigens leitet sich aus der Stadt Kiel ab, in der das Antigen ursprünglich identifiziert wurde und dem entsprechenden „Well“ mit Ursprungsklon in einer Arbeitsplatte¹¹⁷. Das Protein wird in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert außer in der Ruhephase G_0 und zu Beginn der G_1 Phase. Es besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit von max. einer Stunde und ist daher in ruhenden und in DNA-Reparaturprozessen implementierten Zellen nicht zu detektieren¹¹⁷. Seine Eignung als Proliferationsmarker auch in gering proliferierenden Geweben wird im Vergleich mit BrdU-Labeling deutlich, da dieser Marker nur in der S-Phase der Mitose in die Zelle eingebaut wird, wohingegen Ki-67 während des gesamten Verlaufs der Replikation exprimiert wird. Außerdem wird die Applikation anderer Proliferationsmarker wie BrdU und PCNA durch ungünstige Nebenwirkungen wie oxidativem und mutagenem Zellstress begleitet¹¹⁷.

Blutgefäße bestehen im Wesentlichen aus Endothelzellen und muralen Zellen (Perizyten und glatten Muskelzellen in der Gefäßwand)¹¹⁸. Zur Diversität ihrer Funktionen zählen hauptsächlich die Stabilisation hämodynamischer Prozesse, die Modulation der Endothelzellfunktion und angiogenen Stimuli, sowie die Erhaltung der

Integrität der Blut-Hirn-Schranke, an deren Bildung sie mit der kapillären Basalmembran direkt beteiligt sind.

Da Perizyten im Allgemeinen unzureichend erforscht sind und erst seit jüngster Zeit zunehmend das Interesse der Wissenschaft geweckt haben, existieren noch keine verlässlichen Marker für ihren spezifischen Nachweis. Dennoch konnten in den letzten Jahren eine Reihe von Markern identifiziert werden, die mit Perizyten assoziiert sind. Dazu gehören unter anderem α -SMA, Desmin, Vimentin, Nestin und PDGF β und NG-2. Das perizytäre Expressionsmuster dieser verschiedenen Marker hängt vom Differenzierungsstatus der Zelle ab.

Das in unserer Studie verwendete Desmin gehört zu den Intermediärfilamenten vom Typ III. Desmin ist in den Sarkomeren von Skelett- und Herzmuskelzellen sowie glatten Muskelzellen nachweisbar. Während der Embryonalentwicklung ist es bereits frühzeitig im entstehendem Muskelgewebe detektierbar, und seine Expression steigt mit zunehmender Differenzierung weiter an. Obwohl Desmin insbesondere der Detektion Zellen muskulären Ursprungs dient, sowie beispielsweise in der Diagnostik von Leiomyomen oder Rhabdomyosarkomen, wird dieser Marker auch regelmäßig zur Identifikation von Perizyten verwendet¹¹⁹. Endothelzellen sind hingegen negativ für diesen Marker¹²⁰ ebenso wie für α -SMA .

In unserer Fragestellung erscheint die weitergehende Utilisation von Desmin als perizytärer Marker sinnvoll, da der PCI, der Perizyten-Assoziations-Index, unserer Vorläuferstudien mit Sunitinib und verwandten Tyrosinkinaseinhibitoren gleichfalls mit der kombinierten Darstellung von PECAM/Desmin analysiert wurde und somit eine intrinsische Kontrolle und Vergleichbarkeit gegeben ist^{68,89}.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Chemosensibilisierende-Effekte von antiangiogener Therapie

In den vielen Jahren seit Folkman's Formulierung der These, Angiogeneseinhibition sei ein neues potentes onkologisches Therapiekonzept, ist die internationale Forschung bestrebt, die tatsächliche Effektivität antiangiogener Substanzen zu ermitteln. Aufgrund der aktuellen Studienlage kann man konstatieren, dass eine antiangiogene Monotherapie, ob monospezifisch oder „multi-targeted“, keine vielversprechenden klinischen Erfolge beobachten ließ. Eine Kombination mit anderen Therapiemodalitäten scheint für den onkologischen Erfolg dieser Substanzklasse ausschlaggebend^{65,121}.

Hierzu passend haben die Ergebnisse multizentrischer klinischer Studien der letzten Dekade suggeriert, dass Angiogeneseinhibitoren durch eine Reihe an verschiedenen Mechanismen einen „chemosensibilisierenden“ Effekt generieren können. Das heißt sie könnten effektive Substanzen darstellen, um die Tumorzellen gegenüber zytotoxischer Therapie zu sensibilisieren und damit insgesamt die onkologische Therapieeffektivität zu steigern. Der wohl prominenteste Erfolg von kombinierter Chemotherapie und Angiogeneseinhibition ist in der Studie von Hurwitz et al. aus dem Jahr 2004 zu sehen¹²², der heute fest in leitliniengerechten klinischen Behandlungsschemata verankert ist. Erstmals gelang eine zuvor unerreichte Verlängerung des Gesamtüberlebens von 4,7 Monaten beim metastasierten kolorektalem Karzinom mit kombinierter Bevacizumab/FOLFIRI-Therapie (FOLFIRI= Folinsäure plus 5-FU plus Irinotecan). Auch in der Mammakarzinom- und Bronchialkarzinomtherapie konnten vergleichbare Ergebnisse mit der Addition von Bevacizumab zu Chemotherapie erzielt werden^{123,124}.

Diese Resultate aus der Klinik werfen einige spannende Fragen auf: Durch welchen Mechanismus können Substanzen, die die VEGF-Signalgebung unterbinden, die Effektivität von Chemotherapeutika anheben? Antiangiogene Substanzen führen durch Regression von Blutgefäßen zum Untergang der bestehenden Tumorperfusion¹²⁵. Man würde daher vermuten, dass der Zufluss von Chemotherapeutika ins Tumornere durch den Einsatz antiangiogener Wirkstoffe abgeschwächt wird. Außerdem führt der Gefäßuntergang durch VEGF-Inhibition zu erhöhter Hypoxiedauer der Tumorzellen, die dadurch in ein Ruhestadium versetzt werden, und nicht mehr stark proliferieren.

Eine kombinierte TMZ/SU-Therapie hat in unseren subkutanen Xenograft-Experimenten in einer hoch signifikanten Tumorwachstumsverzögerung resultiert.

Erklärend ist hier sicher einerseits die synergistische antitumorale Wirkung der Einzelsubstanzen, jedoch andererseits auch eine optimale „Chemosensibilisierung“ der Tumorzellen mit Hilfe der antiangiogenen Substanz.

Im Folgenden sollen nun die potenziellen Mechanismen dieser möglichen Chemosensibilisierung von Tumorzellen unter antiangiogener Therapie präzise erklärt werden.

5.2.1.1 „Vaskuläre Normalisierung“ unter antiangiogener Therapie verbessert die Effektivität von Chemotherapeutika

Der Begriff der „vaskulären Normalisierung“ der Tumormikrozirkulation als Folge einer antiangiogenen Therapie wurde erstmals von Rakesh K. Jain postuliert¹²⁶. Er beschrieb damit die Wiederherstellung physiologischer Mikrozirkulationsparameter durch den Einsatz von VEGF-Inhibitoren. Diese Hypothese stellte nun neben der bisher als hauptverantwortlich gesehenen Gefäßablation einen neuen Wirkmechanismus für die Effektivität von onkologischer Angiogeneseinhibition, insbesondere in Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie, vor.

Im Gegensatz zur Gefäßversorgung differenzierter Organe, ist die Gefäßarchitektur von Tumoren durch enorme strukturelle und funktionelle Abnormalitäten gekennzeichnet¹²⁷. Das Gesamterscheinungsbild der Tumolvaskularisation ist von chaotischer, strukturloser und Labyrinth-ähnlicher Natur¹²⁷. Charakteristisch für Tumorgefäße sind Gefäßdilatationen, -elongationen, -abbrüche, Sproßbildungen und inhomogene Gefäßwände mit fehlender Ausdifferenzierung¹²⁷. Häufig ist ein Fehlen oder eine völlig veränderte Basalmembranstruktur mit verminderter oder loser Perizytenassoziation zu beobachten. Des Weiteren liegt eine starke Heterogenität der Gefäßdurchmesser vor, da die Gefäße von außen oder teils innen von Tumorzellen, Stromazellen oder multiplen Endothelzellschichten komprimiert werden. Endothelzellen von Tumorgefäßen verlieren ihre Polarität¹²⁷ und sind dadurch nicht mehr fest mit der Basalmembran verankert, was die Akkumulation in mehreren Schichten zur Folge hat. Außerdem sind Endothelzellen oft mit multiplen Fenestrations und Kanälen durchsetzt, die teilweise hundertfach größer sind als die Poren gesunder Gefäße¹²⁷. Hieraus resultiert eine erhöhte Permeabilität die sich in einem Anstieg des interstitiellen Druckes manifestiert. In der Folge ist die Tumorperfusion eingeschränkt. Der Zufluss, sowie die Diffusion applizierter Chemotherapeutika wird hierdurch am gewünschten Wirkungsort reduziert. Es wird diskutiert, dass eine antiangiogene Therapie in einem Zeitfenster von

6 Tagen, dem sogenannten „Normalisierungsfenster“, vorübergehend die oben genannten durch VEGF induzierten Gefäßabnormalitäten rückgängig machen kann¹²⁸. Einige Autoren sind der Ansicht, dass Perizyten-assoziierte PDGFRs zu dieser vaskulären Normalisierung beitragen¹²⁹. Das PDGF- System, v.a. die PDGFRB Achse, reguliert maßgeblich Prozesse der Gefäßreifung durch z.B. Rekrutierung wandständiger Perizyten, die ihrerseits Gefäßpermeabilität und Perfusionsparameter steuern. Daraus könnte man schließen, dass PDFR Blockade durch Tyrosinkinaseinhibitoren wie z.B. Sunitinib, eine „vaskuläre Normalisierung“ stört, und somit zu keiner signifikanten Steigerung der Effektivität von zytotoxischen Substanzen führt. Blansfield et. al konnten dennoch zeigen, dass Sunitinib trotz bekanntermaßen potenter PDGFR-Inhibition in Kombination mit Zytostatika (Cyclophosphamid und Lenalidomid) eine signifikant erhöhte Wirksamkeit gegenüber einer Monotherapie der jeweiligen Zytostatika hatte¹²⁸. Unsere präklinische Studie lieferte ebenfalls Hinweise dafür, dass das Phänomen der „vaskulären Normalisierung“ mitverantwortlich ist für die uns gesehene signifikant verbesserte Tumorkontrolle durch kombinierte TMZ/SU-Therapie. Wir konnten bereits in einer Vorgängerstudie die Normalisierung der Tumormikrozirkulation unter SU-Monotherapie⁶⁸ zeigen. In der hier vorgestellten Studie führt die kombinierte TMZ/SU-Therapie zu einer Stabilisierung der Gefäßnormalisierung sowie zu einer signifikant reduzierten Gefäßpermeabilität im Vergleich zu SU-Therapie allein. Eine durch diese Effekte erhöhte Distribution von TMZ an seinen Wirkort unter kombinierter Therapie könnte für die bessere Tumorkontrolle kausal sein. Eine kontinuierliche Applikation der kombinierten Therapie ist für den synergistischen Therapieeffekt jedoch entscheidend. Wir konnten beobachten, dass die „sequentielle“ kombinierte Therapieform im Sinne einer antiangiogenen Vorbehandlung der Tumormikrozirkulation mit konsekutiver Zytostatikatherapie keinen synergistischen therapeutischen Effekt zeigt. Eine Ursache hierfür könnte beispielsweise die rapide Restitution der Tumormikrozirkulation nach Absetzen der VEGF-Inhibition durch Sunitinib sein¹³⁰. Residuale Basalmembran- und Perizyten-schläuche werden hier von Mancuso et al. als Leitschienen für Endothelzellen diskutiert.

5.2.1.2 Antiangiogene Therapie verstärkt die antivaskulären Effekte einer Chemotherapie

Bei einer Vielzahl von Zytostatika tragen auch moderate antivaskuläre Eigenschaften zu deren antitumoraler Effektivität bei. Dafür sind im Wesentlichen zwei Prinzipien mitverantwortlich.

Einerseits können Zytostatika, so auch Temozolomid, direkt die Proliferation von Endothelzellen hemmen. Die additive Blockade des potenten Endothelzellüberlebensfaktors VEGF durch entsprechende Inhibitoren könnte folglich den antiproliferativen Effekt von Chemotherapie auf Endothelzellen potenzieren⁶⁵.

Andererseits hat Chemotherapie auch indirekte systemische antivaskuläre Effekte, indem sie durch generelle Myelosuppression die Mobilisierung von Knochenmarkszellen hemmt. Dazu gehören v.a. endotheliale Progenitorzellen und CD45+Tie-2+ Monozyten, die aktiv am Prozess der Vaskulogenese und Angiogenese partizipieren¹³¹. Auch diese beiden Mechanismen könnten für die von uns beobachtete potenzierte Wirkung von Chemotherapie in Kombination mit antiangiogener Therapie eine Rolle spielen.

Hierbei ist in der Klinik problematisch, dass dem initialen Abfall von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen durch chemotherapie-induzierte Knochenmarksschädigung durch eine Art Reboundphänomen ein rapider Wiederanstieg von EPCs auf höhere Werte als zuvor folgt¹²¹. Dieser Prozess wird durch chemotherapie-induzierte Tumorphoxie und dadurch getriggert Sekretion zahlreicher proangiogener Wachstumsfaktoren zwischen zwei Zyklen unterstützt. Faktoren, die als Hauptverursacher dieser rapiden Reevaluation von endothelialen Vorläuferzellen nach Chemotherapie gelten, sind insbesondere G-CSF und SDF-1 α . Daher wurde das Abfangen dieses akuten Anstiegs von EPCs durch antiangiogene Therapie im therapiefreien Intervall oder als langfristige Erhaltungstherapie nach Chemotherapie von einigen Experten diskutiert¹³². Dieses Therapiekonzept wird aktuell in klinischen Studien mit ersten positiven Resultaten für einige Tumorerkrankungen untersucht^{133,134}. Sunitinib scheint unter dieser Prämisse kein idealer Kandidat zu sein, den EPC-Anstieg nach Chemotherapie zu neutralisieren, da es unter Therapie zu erhöhten Spiegel von G-CSF und SDF-1 α kommt¹³⁵.

5.2.2 Resistenzmechanismen gegen antiangiogene Therapiestrategien

Die Erfahrungen mit Angiogeneseinhibitoren der aktuellen Generation in präklinischen und klinischen Untersuchungen haben in den vergangenen Jahren mehrfach gezeigt, dass der therapeutische Nutzen meist nur transitorischer Natur ist⁵⁹. Ein Grund hierfür scheint zu sein, dass sich die Tumorzellen rasch an die Substanzen adaptieren und evasive Resistenzmechanismen entwickeln.

5.2.2.1 Alternative Angiogenese- Programme werden vom Tumor genutzt

Es sind prinzipiell vier Mechanismen für die rapide Resistenzentwicklung unter antiangiogener Therapie zu nennen⁶⁴. Die Ausschaltung einer oder auch mehrerer angiogener Signalkaskaden induziert nach kurzer Zeit die Hochregulation eines alternativen kompensatorischen proangiogenen Programms. Eine VEGF- bzw. VEGFR-Blockade resultiert vor allem in einer Hochregulation der Faktoren FGF-1, FGF-2, SDF-1 α , MMP-9, PlGF und CXCL1¹³⁶. Dieses „angiogenic rescue program“ führte in Tumormodellen mit Rip-1-Tag2 Mäusen bereits nach 14 Tagen zu einer Reinitiierung der Angiogenese mit konsekutiver Tumorgrößenprogredienz¹³⁷.

5.2.2.2 Knochenmarksaktivierung antagonisiert antiangiogene Therapie

Als zweiter Resistenzmechanismus ist die bereits für die Chemotherapie beschriebene Rekrutierung von vaskulären Vorläuferzellen und anderen pro-angiogenen Monozyten aus dem Knochenmark zu nennen. Auch die massive Gefäßregression als Folge einer potenten antiangiogenen Therapie kann hypoxische Areale im Tumormikromilieu verursachen. Diese Areale regen das Knochenmark über proangiogene Signale zur Ausschwemmung von EPCs und anderen Angiogenese-modulierenden Zellen an⁶⁴. Es werden folglich alternative Wege zur „sprossenden“ Angiogenese für Etablierung einer Tumorzirkulation genutzt. Hier wird das Prinzip der Vaskulogenese beschrieben.

5.2.2.3 Perizyten schützen TumorgefäÙe vor Regression unter VEGF-Deprivation

Als dritter Mechanismus ist eine erhöhte Perizytenrekrutierung und –assoziation zu nennen, insbesondere als Folge einer solitären VEGF-Inhibition, welche das Überleben von TumorgefäÙen fördern. Diese Form der vaskulären Resistenz scheint in unserem Modell eine zentrale Position einzunehmen, weshalb dieser Punkt im Anschluss gesondert betrachtet werden soll.

5.2.2.4 VEGF-Blockade resultiert in einem proinvasivem GBM-Tumorphänotyp

Es besteht hinreichende Evidenz, dass Tumoren, deren Angiogenese genetisch oder pharmakologisch blockiert wird, in der Lage sind, daran zu adaptieren, indem die Tumorzellen schneller und aggressiver in das umliegende Gewebe migrieren⁶⁴. Diese gesteigerte Infiltrationstendenz wurde erstmals in einem orthotopischen Glioblastommodell an VEGF-, HIF-1 α und MMP-9-defizienten Mäusen beobachtet^{138,139}. In diesen Versuchen ließ sich zwar insgesamt eine Tumorzellwachstumsverzögerung beobachten, jedoch auch eine tiefere Infiltration von Tumorzellen in benachbartes Hirngewebe⁶⁴. Die Tumorzellen siedeln sich dann bevorzugt in der Nähe von normalen Blutgefäßen an und wandern entlang der Gefäße in tiefer gelegenes Gewebe. Man bezeichnet dieses Phänomen auch als „vascular co-option“. Es gibt Hinweise, dass dieser Prozess über β -Integrine vermittelt wird⁶⁴. Ein Umschalten auf dieses pro-invasive Programm als Hauptantriebskraft für das Tumorzellwachstum konnte auch klinisch-radiologisch in Form von multifokaler Rezidivbildung von Glioblastom-Herden beim Follow-Up von Patienten nach Behandlung mit Bevacizumab beobachtet werden⁶⁴.

5.2.3 Rolle der Perizyten in der Resistenz gegenüber antiangiogener Therapie

Perizyten, als periendotheliale Stützzellen der Mikrozirkulation, regulieren im Zusammenspiel mit den Endothelzellen eine Reihe vaskulärer Funktionen. Vorrangig perizytäre Aufgaben sind die Gefäßstabilisierung und die Förderung der Gefäßmaturation. Kapillaren, die ihre Perizytenassoziation verlieren, werden durchlässiger und sind hyperdilatiert. Resultierend daraus entstehen Ödeme, Hämorrhagien und Mikroaneurysmen¹¹⁸. Außerdem ist ein unerwünschter Effekt von massivem Perizytenverlust durch antiangiogene Therapie eine erhebliche Einbuße der Gefäßintegrität, die Tumorzellen den Eintritt in die Zirkulation erleichtert und deren Metastasierung fördert¹⁴⁰.

Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits demonstriert, dass eine singuläre VEGF-Blockade zwar zur substantiellen Regression der unreifen Tumorgefäße führt, aber einige dicht von Perizyten umgebene Gefäße zurückbleiben⁶⁴. Perizyten sind also einerseits wichtig für die gute Funktionalität der Gefäße, stellen aber auch einen wichtigen Aspekt der Resistenz gegenüber antiangiogener Therapie dar.

Trotz synergistischer antiangiogener Effekte einer kombinierten TMZ/SU Therapie in unserer Studie, die sich durch eine erhebliche Reduktion von Endothelzellproliferation

und mikrovaskulärer Gefäßdichte manifestiert haben, stellten wir eine Therapieresistenz von ca. 20% der Tumorgefäße fest. Immunhistochemisch war für diese Gefäße ein vergleichsweise hoher Gefäßdurchmesser und eine erhöhte Perizytenassoziation charakteristisch.

Insbesondere in diesen therapieresistenten Tumorgefäßen konnte in unseren intravitalmikroskopischen Untersuchungen unter TMZ/SU- Therapie eine hoch signifikant reduzierte Permeabilität der Gefäße im Kontrast zu beiden Monotherapien (SU; TMZ) demonstriert werden. Diese funktionelle Veränderung der Gefäßpermeabilität ging einher mit einer partiell reetablierten Perizyten-Gefäßassoziation im Vergleich zu SU-Monotherapie. SU-monotherapierte Xenografts demonstrieren zunächst eine hoch signifikante Reduktion von Perizyten-Endothelzell-Interaktionen. Dieses Phänomen resultiert aus der potenten dualen Inhibition von Perizyten und Endothelzellen bzw. der verantwortlichen Tyrosinkinase VEGFR-2 und PDGFR- β ^{89,141}. Unter kombinierter TMZ/SU-Therapie kommt es zum Wiederanstieg dieser Interaktion von Perizyten und Endothelzellen vermutlich durch Veränderungen im angiogenen Profil wie weiter unten ausgeführt.

Perizyten haben einen drosselnden Effekt auf die Endothelzellproliferation, der für die Reifung und Stabilisierung der Gefäßstrukturen notwendig ist⁶⁴. Die Endothelzellen erhalten daher über die Interaktion mit fest assoziierten Perizyten Überlebenssignale, die sie in einen ruhenden Zustand überführen und sie weniger sensibel gegenüber antiangiogenen Stimuli machen⁶⁴. Desweiteren konnte in aktuellen Arbeiten demonstriert werden, dass die Perizyten-Endothelzell-Interaktion die Expression wichtiger Basalmembranproteine wie Fibronectin, Laminin und Integrinen hochreguliert¹⁴². Auch dieser Aspekt kann kausal für Therapieresistenz perizytenassoziierter Tumorgefäße gegenüber Angiogeneseinhibitoren sein. In Konklusion spricht die Reetablierung von Perizyten-Endothelzell-Interaktionen unter kombinierter TMZ/SU-Therapie folglich für eine erhöhte vaskuläre Resistenzentwicklung in diesen Tumoren im Vergleich zu SU-Monotherapie.

5.2.4 Implikationen des ANG-1/Tie-2-Systems und der DLL-4/Notch Signalgebung

Zu den potenziellen Signalwegen, die an der Regulation der vaskulären Perizytenrekrutierung beteiligt sind, gehört das Ang-1/Tie-2 System. Ang-1 wird von Perizyten und glatten Muskelzellen produziert, aktiviert endotheliale Tie-2- Rezeptoren

und potenziert die Perizyten-Endothelzell-Interaktionen in Gefäßarealen hinter hochaktiven angiogenen Sprossen⁵¹. Ang-1 und Tie-2 defiziente Mäuse sterben in der Embryonalentwicklung mit ähnlichen Gefäßdefekten wie PDGF-B knock-out Tiere. Diese Defekte sind vor allem durch eine unzureichende Gefäßausreifung und -umstrukturierung gekennzeichnet, die sich durch instabile, wenig verzweigte Gefäße ohne Perizytenassoziation zeigt. In der Folge entwickeln die Tiere schwere Blutungen, Ödeme und Organentwicklungsstörungen, insbesondere von Herz, Niere und Lunge.

Die enge Verbindung von Ang-1/Tie-2- und PDGF/PGFR-System wird auch durch den Fakt gestützt, dass die Applikation von rekombinantem Ang-1 bei PDGF-B Knock-out-Mäusen die normale Gefäßarchitektur wiederherstellen und die VEGF-induzierte Permeabilitätszunahme rückgängig machen⁵¹. Dies geschieht vermutlich durch eine Ang-1 induzierte Konstriktion der endothelialen Gap-junctions⁵¹.

Ang-2 wiederum wird von Endothelzellen exprimiert, die an der Spitze von proliferierenden Gefäßen lokalisiert sind. Hier agiert es als destabilisierender Faktor und bindet kompetitiv an Tie-2 ohne Auslösung von intrazellulärer Signaltransduktion. Es kommt zur Dissoziation der Perizyten des entsprechenden Gefäßabschnitts. Dieser durch Ang-2 vermittelte gefäßdestabilisierende Effekt mit Perizytenverlust tritt im Tumor auch in der Präsenz von VEGF-Stimulation auf¹⁴³. Es ist die Balance von Ang-1/Ang-2, die die Perizytenassoziation und Gefäßreifung reguliert⁵⁸.

In unseren Versuchen kam es zur signifikanten Hochregulation von Ang-1 und Tie-2 mRNA-Expression unter TMZ-Monotherapie und kombinierter TMZ/SU-Therapie. Vorgängerstudien haben eine vaskuläre Resistenz in Form von Ang-1/Tie-2-vermittelter Verstärkung von Perizyten-Endothelzell-Interaktionen als Reaktion auf VEGF-Blockade zeigen können⁸⁹. Wie bereits erwähnt, sollte dieser Art von Resistenz durch duale anti-VEGF und anti-PDGF Therapie begegnet werden mit Substanzen, wie z.B. SU. Die hier erworbenen Daten postulieren nun, dass TMZ zur Hochregulation der für ANG-1/Tie-2 codierenden Gene führt. Hierdurch könnte also die zusätzliche Gabe von TMZ zur SU-Therapie die SU-vermittelten anti-PDGF Effekte mit einer erhöhten Ang-1/Tie-2-Expression überwinden. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die uns beobachtete vaskuläre Resistenz unter TMZ/SU-Therapie sein.

Unsere PCR-Analysen angiogenese-relevanter Signalmoleküle demonstrierten neben den Alterationen der Ang-1/Tie-2-Expression auch eine signifikante Reduktion von Delta-like ligand 4-Expression (DLL-4) in kombiniert therapierten TMZ/SU-Tumoren. Die genaue Rolle von DLL-4/Notch1-Signalgebung unter antiangiogener Therapie ist bisher

unklar. Die Implikation des DLL-4/Notch-Systems in die präzise regulierte Gefäßverzweigung angiogener Sprossen wurde von Hellström et al. klar belegt⁶⁰. Das aus dieser Arbeit entstandene Gefäßverzweigungs-Modell geht von der Existenz von prinzipiell zwei angiogenese-relevanten Endothelzelltypen aus: „Tip“-Zellen, welche von der „Spitze“ aus sprossen und „Stiel“-Zellen, die ortsständig proliferieren¹⁴⁴. In Abhängigkeit von anwesenden VEGF-Signalen verhindert die Aktivierung von DLL-4/Notch-Signaltransduktion eine Gefäßverzweigung mit Reduktion der aussprossenden Tip-Zellen⁶⁰. Blockade und Funktionsverlust von DLL-4-Notch-Signalgebung resultieren in einer Elevation von Tip-Zellen und einer beträchtlichen Zunahme der mikrovaskulären Gefäßdichte in verschiedenen Tumormodellen^{62,63}. Paradoxerweise war die erhöhte Gefäßdichte unter DLL-4-Blockade in Tumoren nicht wie anzunehmen wäre mit einem verbesserten Tumorwachstum korreliert. Die Inhibition von DLL-4 Signalgebung induzierte eine Hemmung des Tumorwachstums in mehreren Modellen^{62,63}. Begründet wird dies durch die funktionelle Minderwertigkeit dieser unter DLL-4-Blockade entstehenden Gefäße, die kleine Lumina haben und massiv verzweigt sind. Die Folge davon sind eine schlechte Tumorperfusion und viele hypoxische Areale⁶². Passend dazu wurde demonstriert, dass die Hochregulation von DLL-4 zu verstärktem Tumorwachstum führt und Resistenz gegenüber VEGF-Inhibitoren vermittelt¹⁴⁵. Diese Resistenzentwicklung lag in einer Expressionsveränderung von VEGF und VEGFRs begründet sowie in einer Aktivierung von alternativen proangiogenen Signalwegen, vor allem dem FGF2-FGFR und EphB4-EphrinB2-System¹⁴⁵. Diese Resistenzentwicklung ist unabhängig von Perizyten-Endothelzell-Interaktion, da hochreguliertes DLL-4 zu einer Reduktion der Perizytenassoziation führt. Diese Aspekte deuten nun also nicht darauf hin, dass es sich bei der von uns nachgewiesenen DLL-4-Downregulation um einen weiteren Mechanismus vaskulärer Resistenzentwicklung unter Kombinationstherapie handelt. Dennoch kann die DLL-4-Downregulation auch als Versuch betrachtet werden trotz additiver antiangiogener Effekte einer TMZ/SU- Therapie, eine Tumorangiogenese- wenn auch ineffizienter Natur- aufrechtzuerhalten.

6. Zusammenfassung

Die Therapie des Glioblastoms stellt derzeit trotz hochspezialisierter Medizin eine große Herausforderung für die behandelnden Ärzte dar. Eine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit um max. 14-16 Monate sowie eine Verbesserung 5-JÜR auf 13% für GBM-Patienten mit methyliertem MGMT-Promotor sind aktuell der maximal erzielbare therapeutische Erfolg nach leitliniengerechter Behandlung. Der MGMT-Promotor-Methylierungsstatus ist in der Therapie des GBM prognostisch bedeutsam, da er mit dem Ansprechen auf Temozolomidtherapie korreliert.

Eine antiangiogene Therapiestrategie in der Behandlung eines hochvaskularisierten Tumors wie des Glioblastoms erscheint tumorbiologisch durchaus sinnvoll. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass antiangiogene Substanzen vor allem in Kombination mit Chemotherapie eine gute Tumorkontrolle erzielen können.

Unser Ziel war es deshalb, eine antiangiogene Therapie in Kombination mit Temozolomid beim experimentellen Gliom zu evaluieren. Methodisch wurde hierfür ein etabliertes subkutanen Tumormodell verwendet sowie intravitalmikroskopische Untersuchungen am Rückenhautkammermodell durchgeführt. GBM-Tumorexografts mit methyliertem MGMT-Promotor-Status wurden zur Beurteilung antitumorale und antiangiogener Eigenschaften immunhistochemisch analysiert sowie hinsichtlich Alterationen in der Expression angiogener Signale untersucht.

Kombinierte TMZ/SU-Therapie resultierte in einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zu beiden Monotherapien. Dies beruht vermutlich auf additiven proapoptotischen und synergistischen antiangiogenen Effekten einer kombinierten TMZ/SU-Therapie, die wir in beiden Zelllinien demonstriert haben.

Des Weiteren konnten wir feststellen, dass die potenzierten proapoptotischen und antiangiogenen Therapieeffekte der Kombination TMZ/SU mit einer Reetablierung der Gefäß-Perizyten-Assoziation von Tumorgefäßen einhergehen. Die reetablierten Perizyten-Endothel-Interaktionen sind ferner mit einer Hochregulation des ANG-1/Tie-2-Systems assoziiert.

Zusammenfassend bleibt zu konstatieren, dass kombinierte TMZ/SU-Therapie in einer verbesserten Tumorkontrolle beim MGMT-methylierten Gliom resultiert. Jedoch wird die Langzeiteffektivität dieser Therapie möglicherweise durch vaskuläre Resistenzmechanismen aggraviert.

7. Literaturverzeichnis

1. Schwartzbaum, J.A., Fisher, J.L., Aldape, K.D. & Wrensch, M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* **2**, 494-503; quiz 491 p following 516 (2006).
2. Ohgaki, H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol* **472**, 323-342 (2009).
3. Louis, D.N., *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**, 97-109 (2007).
4. <http://www.gekid.de>, w.k.d.
5. Stupp, R., *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* **10**, 459-466 (2009).
6. Jiang, Y. & Uhrbom, L. On the origin of glioma. *Uppsala journal of medical sciences* (2012).
7. Singh, S.K., *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401 (2004).
8. Salmaggi, A., *et al.* Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. *Glia* **54**, 850-860 (2006).
9. Beier, D., *et al.* Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res* **68**, 5706-5715 (2008).
10. Hegi, M.E., *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 997-1003 (2005).
11. Parsons, D.W., *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807-1812 (2008).
12. Belden, C.J., *et al.* Genetics of glioblastoma: a window into its imaging and histopathologic variability. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* **31**, 1717-1740 (2011).
13. Sarkar, C., Jain, A. & Suri, V. Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian journal of cancer* **46**, 108-119 (2009).
14. Liberski, P.P. The ultrastructure of glial tumors of astrocytic lineage: a review. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* **36**, 161-177 (1998).
15. Birner, P., *et al.* Vascular patterns in glioblastoma influence clinical outcome and associate with variable expression of angiogenic proteins: evidence for distinct angiogenic subtypes. *Brain Pathol* **13**, 133-143 (2003).
16. Kern, M.A., Feisel, K.D., Friese, M., Ernestus, R.I. & Schroder, R. Proliferative activity of microvascular cells in glioblastomas does not correlate with time to recurrence. *J Neurooncol* **63**, 9-13 (2003).
17. Leon, S.P., Folkherth, R.D. & Black, P.M. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer* **77**, 362-372 (1996).

18. Becker, K.P. & Yu, J. Status quo--standard-of-care medical and radiation therapy for glioblastoma. *Cancer J* **18**, 12-19 (2012).
19. Stupp, R., *et al.* Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* **20**, 1375-1382 (2002).
20. Timke, C., *et al.* Combination of vascular endothelial growth factor receptor/platelet-derived growth factor receptor inhibition markedly improves radiation tumor therapy. *Clin Cancer Res* **14**, 2210-2219 (2008).
21. Mross, P.-D.D.K. *Angiogeneseinhibition in der Onkologie*, (Uni-Med Verlag AG, Bremen, 2007).
22. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**, 1182-1186 (1971).
23. Folkman, J. & Hanahan, D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu symposia* **22**, 339-347 (1991).
24. Bergers, G. & Benjamin, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews. Cancer* **3**, 401-410 (2003).
25. Almog, N., *et al.* Transcriptional switch of dormant tumors to fast-growing angiogenic phenotype. *Cancer Res* **69**, 836-844 (2009).
26. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-364 (1996).
27. Jain, R.K., *et al.* Angiogenesis in brain tumours. *Nature reviews. Neuroscience* **8**, 610-622 (2007).
28. Plate, K.H. & Mennel, H.D. Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* **47**, 89-94 (1995).
29. Nagy, J.A., *et al.* VEGF-A induces angiogenesis, arteriogenesis, lymphangiogenesis, and vascular malformations. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **67**, 227-237 (2002).
30. Ferrara, N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *Exs*, 209-231 (2005).
31. Plate, K.H., Breier, G., Weich, H.A. & Risau, W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* **359**, 845-848 (1992).
32. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843-845 (1992).
33. Samoto, K., *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res* **55**, 1189-1193 (1995).
34. Schmidt, N.O., *et al.* Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis. *Int J Cancer* **84**, 10-18 (1999).
35. Ferrara, N., *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439-442 (1996).

36. Shalaby, F., *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62-66 (1995).
37. Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70 (1995).
38. Robinson, C.J. & Stringer, S.E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Journal of cell science* **114**, 853-865 (2001).
39. Ellis, L.M. The role of neuropilins in cancer. *Molecular cancer therapeutics* **5**, 1099-1107 (2006).
40. Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, J. & Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 359-371 (2006).
41. Su, J.L., *et al.* The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *British journal of cancer* **96**, 541-545 (2007).
42. Shih, A.H. & Holland, E.C. Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis. *Cancer letters* **232**, 139-147 (2006).
43. Dalla-Favera, R., Gelmann, E.P., Gallo, R.C. & Wong-Staal, F. A human onc gene homologous to the transforming gene (v-sis) of simian sarcoma virus. *Nature* **292**, 31-35 (1981).
44. Heldin, C.H. & Westermark, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological reviews* **79**, 1283-1316 (1999).
45. Andrae, J., Gallini, R. & Betsholtz, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & development* **22**, 1276-1312 (2008).
46. Uutela, M., *et al.* PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood* **104**, 3198-3204 (2004).
47. Hellberg, C., Ostman, A. & Heldin, C.H. PDGF and vessel maturation. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* **180**, 103-114 (2010).
48. Armulik, A., Abramsson, A. & Betsholtz, C. Endothelial/pericyte interactions. *Circulation research* **97**, 512-523 (2005).
49. Betsholtz, C. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine & growth factor reviews* **15**, 215-228 (2004).
50. Benjamin, L.E., Hemo, I. & Keshet, E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* **125**, 1591-1598 (1998).
51. Ribatti, D., Nico, B. & Crivellato, E. The role of pericytes in angiogenesis. *The International journal of developmental biology* **55**, 261-268 (2011).
52. Lokker, N.A., Sullivan, C.M., Hollenbach, S.J., Israel, M.A. & Giese, N.A. Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res* **62**, 3729-3735 (2002).
53. Varela, M., *et al.* EGF-R and PDGF-R, but not bcl-2, overexpression predict overall survival in patients with low-grade astrocytomas. *Journal of surgical oncology* **86**, 34-40 (2004).

54. Kilic, T., *et al.* Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Cancer Res* **60**, 5143-5150 (2000).
55. Pfaff, D., Fiedler, U. & Augustin, H.G. Emerging roles of the Angiopoietin-Tie and the ephrin-Eph systems as regulators of cell trafficking. *Journal of leukocyte biology* **80**, 719-726 (2006).
56. Stratmann, A., Risau, W. & Plate, K.H. Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol* **153**, 1459-1466 (1998).
57. Lee, O.H., *et al.* Sustained angiopoietin-2 expression disrupts vessel formation and inhibits glioma growth. *Neoplasia* **8**, 419-428 (2006).
58. Feng, Y., *et al.* Impaired pericyte recruitment and abnormal retinal angiogenesis as a result of angiopoietin-2 overexpression. *Thrombosis and haemostasis* **97**, 99-108 (2007).
59. Crawford, Y. & Ferrara, N. Tumor and stromal pathways mediating refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies. *Trends in pharmacological sciences* **30**, 624-630 (2009).
60. Hellstrom, M., *et al.* Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**, 776-780 (2007).
61. Mailhos, C., *et al.* Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* **69**, 135-144 (2001).
62. Noguera-Troise, I., *et al.* Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* **444**, 1032-1037 (2006).
63. Ridgway, J., *et al.* Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* **444**, 1083-1087 (2006).
64. Bergers, G. & Hanahan, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature reviews. Cancer* **8**, 592-603 (2008).
65. Kerbel, R.S. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? *Science* **312**, 1171-1175 (2006).
66. Stupp, R., *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 987-996 (2005).
67. Guo, P., *et al.* Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *Am J Pathol* **162**, 1083-1093 (2003).
68. Czabanka, M., Vinci, M., Heppner, F., Ullrich, A. & Vajkoczy, P. Effects of sunitinib on tumor hemodynamics and delivery of chemotherapy. *Int J Cancer* **124**, 1293-1300 (2009).
69. Faivre, S., Demetri, G., Sargent, W. & Raymond, E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 734-745 (2007).
70. Mendel, D.B., *et al.* In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* **9**, 327-337 (2003).

71. Osusky, K.L., *et al.* The receptor tyrosine kinase inhibitor SU11248 impedes endothelial cell migration, tubule formation, and blood vessel formation in vivo, but has little effect on existing tumor vessels. *Angiogenesis* **7**, 225-233 (2004).
72. Stupp, R., Hegi, M.E., Gilbert, M.R. & Chakravarti, A. Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol* **25**, 4127-4136 (2007).
73. Endrich, B., Asaishi, K., Gotz, A. & Messmer, K. Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* **177**, 125-134 (1980).
74. Lehr, H.A., Leunig, M., Menger, M.D., Nolte, D. & Messmer, K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* **143**, 1055-1062 (1993).
75. Vajkoczy, P., Schilling, L., Ullrich, A., Schmiedek, P. & Menger, M.D. Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifuorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 510-520 (1998).
76. Vajkoczy, P., *et al.* Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy. *Neoplasia* **1**, 31-41 (1999).
77. Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R. & Folkman, J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* **324**, 1-8 (1991).
78. Eberhard, A., *et al.* Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* **60**, 1388-1393 (2000).
79. Weidner, N. Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol* **184**, 119-122 (1998).
80. Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15**, 532-534, 536-537 (1993).
81. Nolan, T., Hands, R.E. & Bustin, S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* **1**, 1559-1582 (2006).
82. Czabanka, M., *et al.* Combined temozolomide and sunitinib treatment leads to better tumour control but increased vascular resistance in O-methylguanine methyltransferase-methylated gliomas. *Eur J Cancer* (2013).
83. Mathieu, V., *et al.* Combining bevacizumab with temozolomide increases the antitumor efficacy of temozolomide in a human glioblastoma orthotopic xenograft model. *Neoplasia* **10**, 1383-1392 (2008).
84. Weller, M., *et al.* MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nature reviews. Neurology* **6**, 39-51 (2010).
85. Hegi, M.E., *et al.* Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **26**, 4189-4199 (2008).
86. de Bouard, S., *et al.* Antiangiogenic and anti-invasive effects of sunitinib on experimental human glioblastoma. *Neuro-oncology* **9**, 412-423 (2007).

87. Bieback, K., *et al.* Recruitment of human cord blood-derived endothelial colony-forming cells to sites of tumor angiogenesis. *Cytotherapy* (2013).
88. Zhou, Q. & Gallo, J.M. Differential effect of sunitinib on the distribution of temozolomide in an orthotopic glioma model. *Neuro Oncol* **11**, 301-310 (2009).
89. Erber, R., *et al.* Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 338-340 (2004).
90. Farhadi, M.R., Capelle, H.H., Erber, R., Ullrich, A. & Vajkoczy, P. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor signaling: effects on the angiogenesis, microcirculation, and growth of orthotopic malignant gliomas. *Journal of neurosurgery* **102**, 363-370 (2005).
91. Zhou, Q., Guo, P. & Gallo, J.M. Impact of angiogenesis inhibition by sunitinib on tumor distribution of temozolomide. *Clin Cancer Res* **14**, 1540-1549 (2008).
92. Chahal, M., *et al.* MGMT modulates glioblastoma angiogenesis and response to the tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Neuro Oncol* **12**, 822-833 (2010).
93. Neyns, B., *et al.* Phase II study of sunitinib malate in patients with recurrent high-grade glioma. *J Neurooncol* **103**, 491-501 (2011).
94. Stevens, M.F., *et al.* Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methylimidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer research* **47**, 5846-5852 (1987).
95. Newlands, E.S., *et al.* Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045; M&B 39831; NSC 362856). *British journal of cancer* **65**, 287-291 (1992).
96. O'Reilly, S.M., *et al.* Temozolomide: a new oral cytotoxic chemotherapeutic agent with promising activity against primary brain tumours. *Eur J Cancer* **29A**, 940-942 (1993).
97. Kurzen, H., Schmitt, S., Naher, H. & Mohler, T. Inhibition of angiogenesis by non-toxic doses of temozolomide. *Anti-cancer drugs* **14**, 515-522 (2003).
98. Kerbel, R.S. & Kamen, B.A. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature reviews. Cancer* **4**, 423-436 (2004).
99. Shaked, Y., *et al.* Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity. *Blood* **106**, 3058-3061 (2005).
100. Kong, D.S., *et al.* A pilot study of metronomic temozolomide treatment in patients with recurrent temozolomide-refractory glioblastoma. *Oncology reports* **16**, 1117-1121 (2006).
101. Klement, G., *et al.* Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *The Journal of clinical investigation* **105**, R15-24 (2000).
102. Zhang, M., *et al.* Trimodal glioblastoma treatment consisting of concurrent radiotherapy, temozolomide, and the novel TGF-beta receptor I kinase inhibitor LY2109761. *Neoplasia* **13**, 537-549 (2011).

103. Kerbel, R.S. What is the optimal rodent model for anti-tumor drug testing? *Cancer Metastasis Rev* **17**, 301-304 (1998).
104. Naito, S., von Eschenbach, A.C., Giavazzi, R. & Fidler, I.J. Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. *Cancer research* **46**, 4109-4115 (1986).
105. Foitzik T, F.W., Roth H, Messmer K. Splenic implants: influence of particle size and fibrin fixation on vascularisation and angiarchitecture. *Pediatr Surg Int*, 263-268 (1988).
106. Leunig, M., *et al.* Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res* **52**, 6553-6560 (1992).
107. Menger, M.D., Jager, S., Walter, P., Hammersen, F. & Messmer, K. A novel technique for studies on the microvasculature of transplanted islets of Langerhans in vivo. *International journal of microcirculation, clinical and experimental / sponsored by the European Society for Microcirculation* **9**, 103-117 (1990).
108. Vollmar, B., Laschke, M.W., Rohan, R., Koenig, J. & Menger, M.D. In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am J Pathol* **159**, 1661-1670 (2001).
109. Baluk, P. & McDonald, D.M. Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1131**, 1-12 (2008).
110. Albelda, S.M., Muller, W.A., Buck, C.A. & Newman, P.J. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *The Journal of cell biology* **114**, 1059-1068 (1991).
111. Arends, M.J., Morris, R.G. & Wyllie, A.H. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* **136**, 593-608 (1990).
112. Grasl-Kraupp, B., *et al.* In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* **21**, 1465-1468 (1995).
113. Cummings, B.S., Kinsey, G.R., Bolchoz, L.J. & Schnellmann, R.G. Identification of caspase-independent apoptosis in epithelial and cancer cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **310**, 126-134 (2004).
114. Nakagawa, Y., Iinuma, M., Naoe, T., Nozawa, Y. & Akao, Y. Characterized mechanism of alpha-mangostin-induced cell death: caspase-independent apoptosis with release of endonuclease-G from mitochondria and increased miR-143 expression in human colorectal cancer DLD-1 cells. *Bioorganic & medicinal chemistry* **15**, 5620-5628 (2007).
115. Takei, H., Bhattacharjee, M.B., Rivera, A., Dancer, Y. & Powell, S.Z. New immunohistochemical markers in the evaluation of central nervous system tumors: a review of 7 selected adult and pediatric brain tumors. *Archives of pathology & laboratory medicine* **131**, 234-241 (2007).
116. Ribalta, T., McCutcheon, I.E., Aldape, K.D., Bruner, J.M. & Fuller, G.N. The mitosis-specific antibody anti-phosphohistone-H3 (PHH3) facilitates rapid reliable grading of meningiomas

- according to WHO 2000 criteria. *The American journal of surgical pathology* **28**, 1532-1536 (2004).
117. O., v.B.u.H. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* **Jul**, 1-19 (2011).
 118. Bergers, G. & Song, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* **7**, 452-464 (2005).
 119. von Tell, D., Armulik, A. & Betsholtz, C. Pericytes and vascular stability. *Experimental cell research* **312**, 623-629 (2006).
 120. Balabanov, R. & Dore-Duffy, P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *Journal of neuroscience research* **53**, 637-644 (1998).
 121. Shaked, Y., *et al.* Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents. *Cancer cell* **14**, 263-273 (2008).
 122. Hurwitz, H., *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **350**, 2335-2342 (2004).
 123. Miller, K.D., *et al.* Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **23**, 792-799 (2005).
 124. Herbst, R.S., *et al.* Phase I/II trial evaluating the anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **23**, 2544-2555 (2005).
 125. Carmeliet, P. & Jain, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249-257 (2000).
 126. Jain, R.K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature medicine* **7**, 987-989 (2001).
 127. Carmeliet, P. & Jain, R.K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* **10**, 417-427 (2011).
 128. Blansfield, J.A., *et al.* Combining agents that target the tumor microenvironment improves the efficacy of anticancer therapy. *Clin Cancer Res* **14**, 270-280 (2008).
 129. Winkler, F., *et al.* Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer cell* **6**, 553-563 (2004).
 130. Mancuso, M.R., *et al.* Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *The Journal of clinical investigation* **116**, 2610-2621 (2006).
 131. Folkins, C., *et al.* Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Res* **69**, 7243-7251 (2009).

132. Hudis, C.A. Clinical implications of antiangiogenic therapies. *Oncology (Williston Park)* **19**, 26-31 (2005).
133. Kozloff, M., *et al.* Clinical outcomes associated with bevacizumab-containing treatment of metastatic colorectal cancer: the BRITe observational cohort study. *Oncologist* **14**, 862-870 (2009).
134. Dhillon, S. Bevacizumab combination therapy: for the first-line treatment of advanced epithelial ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer. *Drugs* **72**, 917-930 (2012).
135. Ebos, J.M., Lee, C.R., Christensen, J.G., Mutsaers, A.J. & Kerbel, R.S. Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 17069-17074 (2007).
136. Fischer, C., *et al.* Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* **131**, 463-475 (2007).
137. Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G. & Hanahan, D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer cell* **8**, 299-309 (2005).
138. Du, R., *et al.* HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer cell* **13**, 206-220 (2008).
139. Blouw, B., *et al.* The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer cell* **4**, 133-146 (2003).
140. Xian, X., *et al.* Pericytes limit tumor cell metastasis. *The Journal of clinical investigation* **116**, 642-651 (2006).
141. Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E. & Hanahan, D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *The Journal of clinical investigation* **111**, 1287-1295 (2003).
142. Stratman, A.N., Malotte, K.M., Mahan, R.D., Davis, M.J. & Davis, G.E. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* **114**, 5091-5101 (2009).
143. Cao, Y., *et al.* Systemic overexpression of angiopoietin-2 promotes tumor microvessel regression and inhibits angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* **67**, 3835-3844 (2007).
144. Phng, L.K. & Gerhardt, H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Developmental cell* **16**, 196-208 (2009).
145. Li, J.L., *et al.* DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo. *Cancer Res* **71**, 6073-6083 (2011).

8. Lebenslauf

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht“

9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jeanette Brünner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Antiangiogene Therapie in Kombination mit Temozolomid beim experimentellen MGMT-methylierten Glioblastom**“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer PD Dr.med. Marcus Czabanka, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Jeanette Brünner hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Czabanka M, Bruenner J, Parmaksiz G, Broggin T, Topalovic M, Bayerl SH, Auf G, Kremenetskaia I, Nieminen M, Jabouille A, Mueller S, Harms U, Harms C, Koch A, Heppner FL, Vajkoczy P. ; **Combined temozolomide and sunitinib treatment leads to better tumour control but increased vascular resistance in O6-methylguanine methyltransferase-methylated gliomas.** Eur J Cancer, 2013 Mar 14

Beitrag im Einzelnen :

Selbstständige Durchführung der beschriebenen Experimente mit Unterstützung durch die betreuenden MTA und Mit-Doktoranden, insbesondere der subkutanen Tumorxenograftexperimente mit den erfolgten Nachuntersuchungen

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

10. Danksagung

Nach Abschluss der experimentellen Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Herrn Prof. Dr.med. Peter Vajkoczy, Direktor der Neurochirurgischen Klinik der Charité Berlin, für die freundliche Aufnahme und die Möglichkeit, in seiner Klinik meine Dissertation erstellen zu dürfen.

Meinem Betreuer und Doktorvater, PD Dr.med. Marcus Czabanka, der mich in unermüdlicher und aufmunternder Weise durch die Höhen und Tiefen des experimentellen Arbeitens fachkompetent geleitet hat und mir durch gedankliche Anstöße und konstruktive Kritik bei der Planung, Durchführung, und Auswertung der Experimente zur Seite stand.

Den Mitarbeitern der Experimentellen Neurochirurgischen Forschung, insbesondere Frau Irina Kremenetskaia, Frau Melina Nieminen-Kelhä, Frau Sabine Seidlitz und Herrn Adnan Ghori für ihre kontinuierliche fachliche und freundschaftliche Unterstützung und das stets angenehme Arbeitsklima.

Meinen Mitdoktoranden Frau Güliz Parmaksiz, Herrn Simon Bayerl und Herrn Thomas Broggini für die fachlichen Diskussionen, die gute Zusammenarbeit und die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft untereinander.

Meiner Familie, insbesondere meinen zwei wunderbaren Kindern, für Ihren unermüdlichen Rückhalt und Ihre Geduld in dieser Zeit.