

Aus der Chirurgischen Klinik I  
Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. med. H. J. Buhr)  
Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

## **Habilitationsschrift**

# **Verbesserte orthotope Tiermodelle des duktales Pankreaskarzinoms und ihre Anwendung zur Evaluierung neuer anti-angiogener Therapiestrategien**

zur Erlangung der Venia legendi  
für das Fach Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Hubert G. Hotz  
aus Stühlingen

eingereicht: August 2006; Datum der Habilitation: 15.05.2007

Dekan: Prof. Dr. M. Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. med. J. Izbicki, Hamburg
2. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Adler, Ulm

Für Birgit, Alis und Regina

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
1 Hintergrund und Fragestellung	9
1.1 Epidemiologie und Problematik des exokrinen Pankreaskarzinoms	9
1.2 Tiermodelle des duktales Pankreaskarzinoms	10
1.2.1 Nacktmausmodelle	10
1.2.2 Fragestellung Nacktmausmodell	11
1.2.3 Rattenmodelle	12
1.2.4 Fragestellung Rattenmodell	12
1.3 Angiogenesehemmung als neue Therapiestrategie	13
1.3.1 Das Prinzip der Tumorangiogenese	13
1.3.2 Fragestellungen zur antiangiogenen Therapie	15
2 Material und Methoden	20
2.1 Orthotopes Nacktmausmodell	20
2.1.1 Zelllinien und Zellkultur	20
2.1.2 Nacktmäuse	20
2.1.3 Orthotope Implantationstechnik bei Nacktmäusen	21
2.1.4 Orthotope Injektionstechnik bei Nacktmäusen	23
2.1.5 Beobachtungszeitraum und Sakrifizierungskriterien	23
2.1.6 Bestimmung Primärtumorgröße / Disseminierungsscores	23
2.2 Orthotopes Rattenmodell	24
2.2.1 Zelllinien und Zellkultur	24

2.2.2	Immunkompetente Lewis-Ratten	25
2.2.3	Orthotope Implantationstechnik bei Lewis-Ratten	25
2.2.4	Orthotope Injektionstechnik bei Lewis-Ratten	26
2.2.5	Beobachtungszeitraum und Sakrifizierungskriterien	26
2.2.6	Bestimmung Primärtumorgröße / Disseminierungsscores	27
2.3	Therapeutische Substanzen	28
2.3.1	Suramin	28
2.3.2	TNP-470	28
2.3.3	A4.6.1	28
2.3.4	AS-3	28
2.3.5	DT-VEGF	29
2.3.6	BB-94	29
2.4	In vitro Bestimmung von Zellproliferation und –viabilität	29
2.4.1	Zelllinien und Zellkultur	29
2.4.2	Zellzählung	30
2.4.3	MTT-Assay	30
2.5	Bestimmung der VEGF-Konzentration mit ELISA	31
2.5.1	VEGF im Zellkulturmedium	31
2.5.2	VEGF in Plasma und Aszites	31
2.6	VEGF Immunhistologie	31
2.7	VEGF Western Blotting	32
2.8	RT-PCR für VEGF und VEGF-Rezeptoren	33
2.9	Immunhistologie der Mikrovaskulären Gefäßdichte	34
2.10	In vivo Verabreichung der therapeutischen Substanzen	34
2.11	Statistik	36

3	Ergebnisse	37
3.1	Orthotopes Nacktmausmodell	37
3.1.1	Orthotope Implantationstechnik	37
3.1.2	Orthotope Implantations- versus Injektions-Technik	46
3.2	Orthotopes Rattenmodell	48
3.2.1	Implantation von 3 Tumorfragmenten (IPL-3)	48
3.2.2	Implantation von 5 Tumorfragmenten (IPL-5)	49
3.2.3	Injektion von Tumorzellen in das Pankreas (INJ)	54
3.3	Therapiestudie mit Suramin	54
3.3.1	Effekt von Suramin auf Zellproliferation/-viabilität in vitro	54
3.3.2	Effekt von Suramin auf Zellzyklus und Apoptose	55
3.3.3	Suramineffekt auf VEGF in Zellkulturmedium und Aszites	55
3.3.4	Effekt von Suramin in vivo	55
3.3.5	Effekt von Suramin auf die Mikrovaskuläre Gefäßdichte	56
3.4	Therapiestudie mit TNP-470	60
3.4.1	In vitro Effekte von TNP-470	60
3.4.2	Volumina der Primärtumoren	60
3.4.3	Disseminierungsscore	60
3.4.4	Überleben	61
3.4.5	VEGF-Spiegel in Plasma und Aszites	61
3.4.6	Mikrovaskuläre Gefäßdichte in Primärtumoren	61
3.5	Therapiestudie mit dem Anti-VEGF-Antikörper A4.6.1	64
3.5.1	Expression von mRNA für VEGF-Rezeptoren und Effekt von A4.6.1 auf in vitro Proliferation	64
3.5.2	Volumina der Primärtumoren	64
3.5.3	Disseminierungsscore	65

3.5.4	Überleben	65
3.5.5	VEGF-Immunhistochemie in Primärtumoren	65
3.6	Therapiestudie mit dem VEGF-Antisense Molekül AS-3	69
3.6.1	VEGF-Sekretion von Pankreaskarzinom-Zellen	69
3.6.2	Effekt von AS-3 auf VEGF-Produktion von Karzinomzellen	69
3.6.3	Volumina der Primärtumoren	70
3.6.4	Disseminierungsscore	70
3.6.5	Überleben	70
3.6.6	VEGF-Spiegel in Plasma und Aszites	70
3.6.7	Mikrovaskuläre Gefäßdichte in Primärtumoren	71
3.7	Therapie mit Diphtherietoxin-VEGF Fusionsprotein (DT-VEGF)	74
3.7.1	In vitro Effekte von DT-VEGF	74
3.7.2	Volumina der Primärtumoren	74
3.7.3	Disseminierungsscore	75
3.7.4	Überleben	75
3.7.5	Tiergewichte	75
3.7.6	Mikrovaskuläre Gefäßdichte in Primärtumoren	76
3.8	Kombinationstherapie: Anti-VEGF Antikörper A4.6.1 und Matrix Metalloproteinase-Inhibitor BB-94	78
3.8.1	Primärtumorvolumen	78
3.8.2	Tumordisseminierung und Aszitesbildung	79
3.8.3	Überleben	80
3.8.4	Mikrovaskuläre Gefäßdichte in Primärtumoren	80
4	Diskussion	86
4.1	Nacktmausmodell	86
4.1.1	Ektoper vs. orthotoper Ansatz	86
4.1.2	Orthotope Induktionstechnik	86
4.1.3	Tumorzell-Injektion vs. Tumorfragment-Implantation	87

4.1.4	Disseminierungsscore	89
4.1.5	In vivo Phänotyp der untersuchten Zelllinien	89
4.2	Rattenmodell	90
4.2.1	Immunkompetente Tiermodelle	90
4.2.2	Tumorinduktion durch Injektion	91
4.2.3	Tumorinduktion durch Implantation	92
4.3	Therapiestudie mit Suramin	94
4.3.1	In vitro Effekte auf Pankreaskarzinom-Zellen	94
4.3.2	In vivo Effekte von Suramin	95
4.4	Therapiestudie mit TNP-470	96
4.4.1	In vitro Effekte auf Karzinom- und Endothel-Zellen	97
4.4.2	In vivo Wirkung von TNP-470	97
4.5	Therapiestudie mit dem Anti-VEGF-Antikörper A4.6.1	98
4.5.1	VEGF-Rezeptorexpression und in vitro Effekte von A4.6.1	98
4.5.2	In vivo Wirkung von A4.6.1	99
4.6	Therapiestudie mit dem VEGF-Antisense Molekül AS-3	99
4.6.1	In vitro Effekte von AS-3	99
4.6.2	In vivo Wirkung von AS-3	100
4.7	Therapie mit Diphtherietoxin-VEGF Fusionsprotein (DT-VEGF)	102
4.7.1	In vitro Effekte von DT-VEGF	102
4.7.2	In vivo Wirkung von DT-VEGF	103
4.8	Kombinationstherapie: Anti-VEGF Antikörper A4.6.1 und Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor BB-94	104
4.8.1	In vivo Effekte der Kombinationstherapie	105
4.8.2	Mechanismen der VEGF/MMP Interaktion	106

5	Zusammenfassung und Ausblick	108
6	Literatur	111

## Danksagung

Eine solche Arbeit ist nie das Produkt eines Einzelnen – ich bin vielen zu Dank verpflichtet, in erster Linie meiner Frau Birgit. Das gilt vordergründig für Ihre qualitativ unübertroffene Mitarbeit als Biologisch-Technische Assistentin im Labor; insbesondere für die Zeit in den USA, in der ich ohne sie niemals das durchgeführte Arbeitspensum geschafft hätte. Vielmehr bin ich ihr aber für ihre bedingungslose emotionale und ideelle Unterstützung dankbar, ohne die ich den sehr schönen, aber mitunter auch harten Beruf des akademischen Chirurgen nicht ausüben könnte. Danken möchte ich auch meiner Familie; meiner Mutter, meiner Schwiegermutter und meinem leider viel zu früh verstorbenen Vater: ohne ihre kontinuierliche Unterstützung hätte ich meinen Weg nicht gehen können.

Was meinen beruflichen und wissenschaftlichen Werdegang angeht, hatte und habe ich das Privileg, Schüler einer ganzen Reihe von herausragenden Persönlichkeiten sein zu dürfen. Alles begann 1989 im Pharmakologischen Institut in Freiburg. Privatdozent Jackisch war damals ein Betreuer, der immer für den Doktoranden da war und es mir in kurzer Zeit ermöglichte, eine experimentelle Doktorarbeit zu erstellen. Er und mein Doktorvater, Professor Hertting, gaben der Arbeit dann den nötigen Schliff, der in der Bewertung „Summa cum laude“ und dem Gödecke-Forschungspreis 1991 mündete.

Einer der wichtigsten Tage in meinem Leben war der 31. März 1992: ich stellte mich in der Chirurgischen Universitätsklinik in Heidelberg vor, bewarb mich um eine der damals raren AIP-Stellen. Professor Herfarth wurde mein erster Chef und mit seiner chirurgischen Brillanz, Geradlinigkeit und Aufrichtigkeit mein Vorbild. Seit jenem Tag im März ist mein Leben mit Professor Buhr verknüpft, der mich zunächst in Heidelberg als Mitglied in seine wissenschaftliche (Pankreas-)Arbeitsgruppe aufnahm und dann, im Oktober 1994, mit nach Berlin, in seiner neuen Funktion als chirurgischer Ordinarius am Klinikum Steglitz – jetzt Benjamin Franklin. Professor Buhr unterstützt mich bis heute in allem, was meine klinische und wissenschaftliche

Ausbildung betrifft. Absolut bewundernswert ist sein chirurgisch-klinischer Blick und seine menschliche Art der Patientenführung, die es immer wieder schafft, auch in schwierigen Situationen Vertrauen herzustellen. Diesbezüglich habe ich in meinem Jahr als Privatassistent sehr viel dazugelernt. Professor Buhr ist für mich aber viel mehr, als nur ein chirurgisch-wissenschaftlicher Lehrer: er ist ein väterlicher Ratgeber geworden, der immer ansprechbar und offen ist, auch für unangenehme Diskussionen. Hierfür schulde ich Professor Buhr meinen größten Dank und Hochachtung.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei meinem Freund und Kollegen Thomas Foitzik, mit dem ich so manche Nacht im Labor verbracht habe und der mein wissenschaftliches Denken mit geformt hat. Wir haben oft hart, aber immer freundschaftlich um Ideen und Konzepte gerungen. Dank gilt auch meinen Lehrern und Freunden in den USA: der zweijährige Forschungsaufenthalt in Los Angeles hat mich geprägt und meinen Horizont erweitert wie nur wenige Abschnitte meines Lebens. Professor Reber und Joe Hines haben meine wissenschaftlichen Projekte an der UCLA entscheidend vorangebracht, ebenso mein Kooperationspartner Parkash Gill an der USC.

Forschung kostet Geld und Sachmittel; beides habe ich von den Universitätskliniken in Heidelberg und Berlin erhalten; in Los Angeles wurde das Labor von der Ronald S. Hirshberg Foundation finanziert. Besonderen Dank schulde ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die mich sowohl mit dem USA-Forschungsstipendium, als auch nach der Rückkehr nach Deutschland unterstützte.

Eine solche Danksagung bleibt immer unvollständig, und ich möchte mich bei jenen entschuldigen, die ich nicht namentlich genannt habe. Allen Kollegen und vielen anderen Begleitern meines Lebensweges bin ich zu Dank verpflichtet. Die Vollendung dieser Arbeit erfüllt mich mit tiefer Demut und Dankbarkeit - ohne Sie alle hätte ich es nicht geschafft.

Berlin, im Juli 2006

Hubert Hotz

## ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....11.08.2006.....  
Datum

.....Hubert Hotz.....  
Unterschrift