

**UNTERSUCHUNGEN DES EINFLUSSES VON  
INHIBITOREN DER ANGIOGENESE UND  
IONISIERENDER BESTRAHLUNG AUF DAS  
WACHSTUMSVERHALTEN SOLIDER  
TUMOREN *IN VIVO***

**HEIKE ZIEHER**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**édition scientifique  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum, Forschungsschwerpunkt Innovative  
Krebsdiagnostik und Therapie, Abteilung Strahlentherapie, Heidelberg

Betreuer: Prof. Dr. Dr. P.E. Huber

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. M. Reinacher

Untersuchungen des Einflusses von  
Inhibitoren der Angiogenese und ionisierender Bestrahlung  
auf das Wachstumsverhalten solider Tumoren  
*in vivo*

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

HEIKE ZIEHER  
Tierärztin aus Ehingen (Donau)

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. P. E. Huber
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reinacher

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2007

**Meinen Eltern und Harald**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	<b>Entstehung von Blutgefäßen - Angiogenese und Vaskulogenese</b>	<b>5</b>
	1.1 Morphologische Aspekte der Angiogenese	6
<b>2</b>	<b>Tumorangiogenese</b>	<b>7</b>
	2.1 Steuerung der Angiogenese	8
<b>3</b>	<b>Ionisierende Bestrahlung</b>	<b>10</b>
	3.1 <sup>60</sup> Co-Bestrahlung - Physikalische Grundlagen	10
	3.2 Radiobiologie	12
<b>4</b>	<b>Strategien der Angiogeneseinhibition</b>	<b>15</b>
	4.1 Hemmung zentraler Wachstumsfaktoren	17
	4.2 Endostatin	20
	4.3 Hemmung von Integrinen	21
<b>5</b>	<b>Kombinierte Therapiekonzepte - Derzeitiger Stand und Fragestellungen</b>	<b>23</b>
	5.1 Kombination verschiedener Angiogenese-Inhibitoren	23
	5.2 Kombination von Angiogenese-Inhibition und Bestrahlung	24
	5.3 Fragestellungen	26
<b>III</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>1</b>	<b>Tumormodelle</b>	<b>27</b>
	1.1 Langzeitlagerung und Kultivierung der Zellen	28
	1.2 Vorbereitung der Zellsuspensionen für die Tumorzellinokulation	29
<b>2</b>	<b>Tierversuche</b>	<b>30</b>
	2.1 Genehmigung der Tierversuche	30
	2.2 Tiere und Tierhaltung	30
	2.3 Tumorzellinokulation	31
	2.4 Messung der Tumorgöße	32
	2.5 Behandlung mit Angiogenese-Inhibitoren	33
	2.6 Bestrahlung mit <sup>60</sup> Co-Gammastrahlen	37
	2.7 Versuchsgruppen	39
	2.8 Sektion und Probengewinnung	40

<b>3</b>	<b>Gewebeaufarbeitung</b>	<b>40</b>
3.1	Paraffinhistologie	40
3.2	Kryostat-Mikrotomie	42
3.3	Histologische Färbemethoden	43
3.4	Immunhistochemische Färbemethoden	45
3.5	TUNEL (terminale deoxynucleotidyl transferase nick end labeling)	49
<b>4</b>	<b>Mikroskopische Beurteilung</b>	<b>50</b>
4.1	HE- und PAS-Präparate	51
4.2	Phosphorylierte Akt (pAkt) und TUNEL	51
4.3	CD31-Gefäßdarstellung	52
4.4	Tumorzellproliferation	52
<b>5</b>	<b>Photodokumentation</b>	<b>53</b>
5.1	Makroskopie	53
5.2	Histologie und Immunhistochemie	53
<b>6</b>	<b>Statistische Bearbeitung und Darstellung der Ergebnisse</b>	<b>53</b>
<b>IV</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
<b>1</b>	<b>Kombinierte Therapie mit dem VEGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor SU416 und Endostatin (Versuchsreihe A)</b>	<b>55</b>
1.1	Tumorstadium	55
1.2	Wachstumsverzögerung	56
1.3	Vergleichende Tumorstadium	58
1.4	Tumorzellproliferation	61
<b>2</b>	<b>Therapie mit VEGFR-2- und PDGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren und <sup>60</sup>Co-Bestrahlung (Versuchsreihe B)</b>	<b>63</b>
2.1	Tumorstadium	63
2.2	Wachstumsverzögerung	67
2.3	Tumormakroskopie	69
2.4	Vergleichende Tumorstadium	70
2.5	Tumorzellproliferation	73
2.6	Darstellung der Tumorgefäße	75
<b>3</b>	<b>Therapie mit dem <math>\alpha_v\beta_3</math>-Integrin-Inhibitor S247 und die Kombination mit <sup>60</sup>Co-Bestrahlung (Versuchsreihe C)</b>	<b>77</b>
3.1	Tumorstadium	77
3.2	Wachstumsverzögerung	78
3.3	Vergleichende Tumorstadium	79
3.4	Tumorzellproliferation	80

3.5	Darstellung der TumorgefäÙe	81
<b>4</b>	<b>Therapie mit dem <math>\alpha_v\beta_3</math>-Integrin-Inhibitor S247 und die Kombination mit <math>^{60}\text{Co}</math>-Bestrahlung am A431-Tumormodell (Versuchsreihe D)</b>	<b>83</b>
4.1	Tumorstachstum	83
4.2	Wachstumsverzögerung	84
4.3	Detektion phosphorylierter Akt (p-Akt)	85
4.4	TUNEL	86
<b>5</b>	<b>Auftreten spontaner Metastasierung der PC3-Tumoren</b>	<b>87</b>
<b>V</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>89</b>
<b>1</b>	<b>Diskussion der Methodik</b>	<b>89</b>
1.1	Tier- und Tumormodelle	89
1.2	Behandlung der Tiere	91
1.3	Ermittlung der Tumorstachstumina	92
1.4	Untersuchung von Tumorstachstumgewebe im Versuchszeitraum	93
<b>2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>96</b>
2.1	Das Konzept des kombinierten Einsatzes eines direkten und eines indirekten Angiogenese-Inhibitors	96
2.2	Das Konzept des kombinierten Einsatzes von Bestrahlung und Rezeptortyrosinkinase-Inhibition	103
2.3	Das Konzept des kombinierten Einsatzes von Bestrahlung und einer $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Blockade	110
2.4	Auftreten spontaner Metastasen der PC3-Tumoren	116
2.5	Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Angiogenese-Inhibitoren	118
<b>3</b>	<b>Klinische Relevanz und Ausblick</b>	<b>120</b>
<b>VI</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>123</b>
<b>VII</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>126</b>
<b>VIII</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>129</b>
<b>IX</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>132</b>
	<b>VERÖFFENTLICHTE TEILASPEKTE</b>	<b>155</b>

# I Einleitung

Die Radiotherapie stellt neben der operativen Behandlung und Chemotherapie weiterhin eine der drei wichtigsten Therapieformen bei Krebserkrankungen dar. Etwa die Hälfte aller Patienten mit einem malignen Tumor erhalten im Verlauf ihrer Krankengeschichte eine Bestrahlung. Dabei reichen die Einsatzgebiete von präoperativer, alleiniger und postoperativer Bestrahlung über simultane oder sequenzielle Radiochemotherapie bis zu multimodalen Verfahren.

In Kombination mit anderen Maßnahmen kann die Strahlentherapie ein Drittel der Heilungen für sich verbuchen. Dennoch gibt es nach wie vor eine Vielzahl an Malignomen, die aufgrund einer intrinsischen oder erworbenen Radioresistenz nur sehr schlecht oder gar nicht auf Bestrahlung ansprechen. Aus diesem Grund liegt das Bestreben seit langem darin, Verfahren zu entwickeln, welche die Effizienz der Strahlentherapie verbessern. Im Fokus der Bemühungen steht dabei zum einen die physikalische Herausforderung, möglichst hohe Dosen im Tumor bei größtmöglicher Schonung des umliegenden Gewebes zu erreichen, und zum anderen die Kombination von Bestrahlung mit anderen Therapien. Das Grundprinzip der kombinierten Therapiemodalitäten basiert dabei im Wesentlichen auf drei Konzepten: additive Anti-Tumor-Effekte, nicht-überlappende Nebenwirkungen und das räumliche Zusammenwirken (STEEL und PECKHAM 1979).

Beispiele für in neuerer Zeit entwickelte Medikamente, die in Kombination mit Radiotherapie eingesetzt werden, sind hypoxische Tumorzellen sensibilisierende Substanzen, die sich derzeit noch in präklinischer Testung befinden (DAS et al. 2004; DENNY 2004). Supportivtherapeutisch werden Radioprotektoren angewendet, wobei Amifostin (Ethyol®) der einzige Vertreter dieser Therapeutika ist, der klinisch bereits eingesetzt wird (Zytoprotektivum der Speicheldrüse; SAMUELS 2004).

Ein relativ junges Therapieprinzip bei Tumorerkrankungen, das in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen wurde, stellt die Beeinflussung bzw. Hemmung der Angiogenese in Tumoren dar. Die Neubildung von Gefäßen ist die Voraussetzung für die Entwicklung, das Wachstum und eine Metastasierung von Tumoren und somit für ein Voranschreiten des Krankheitsprozesses. Vor annähernd 100 Jahren wurde die Blutgefäßneubildung im Zusammenhang mit Tumoren

erstmals erwähnt (GOLDMAN 1907). Bereits vor 60 Jahren wurde eine solche Gefäßneubildung bei Tumoren beobachtet (IDE et al. 1939; ALGIRE et al. 1945). Die Hypothese, dass Tumorzellen die Eigenschaft aufweisen, das Wachstum neuer Kapillaren hervorzurufen fand jedoch wenig Akzeptanz. Die Gefäßneubildung wurde lediglich als „Nebeneffekt“ von entzündlichen Vorgängen während des Tumorwachstums angesehen. FOLKMAN formulierte 1971 die Hypothese, dass solide Tumoren abhängig von angiogenen Vorgängen seien und dass Endothelzellen durch einen Faktor, der vom Tumor freigesetzt wird, zur Neubildung von Gefäßen angeregt würden. Eine Blockade dieses Faktors könne als möglicher therapeutischer Ansatz in der Krebstherapie dienen - das Konzept bezeichnete FOLKMAN als *Anti-Angiogenese*. Erst mit der Entwicklung neuer zellulärer und molekularer Untersuchungsmethoden konnten weitere Erkenntnisse über die Mechanismen der Angiogenese, der Antiangiogenese und der daran beteiligten Faktoren gewonnen werden, wodurch die essentielle Rolle der Gefäßbildung bei der Tumorprogression nicht mehr angezweifelt wurde. Es folgte die intensive Suche nach sogenannten pro- und antiangiogenen Substanzen.

Eine Angiogenese-Inhibition zielt auf die Hemmung der Neubildung von Kapillaren bzw. Gefäßen ab und greift dabei die Endothelzelle direkt an bzw. blockiert deren Interaktionen mit dem umgebenden Gewebe. Diese Zielzellen zeichnen sich verglichen mit Tumorzellen durch eine sehr geringe genetische Variabilität und Heterogenität aus. Darin begründet liegt die Hoffnung, Probleme der heutigen Tumorthherapie wie die Resistenzentwicklung gegenüber Bestrahlung oder Chemotherapie umgehen zu können.

Dennoch erscheint die Kombination von Radiotherapie mit Angiogenese-Inhibitoren auf den ersten Blick kontraproduktiv und eine additive Wirkung bei Kombination dieser beiden Therapieprinzipien paradox. Denn schon seit über 50 Jahren ist bekannt, dass die Verfügbarkeit von Sauerstoff unabdingbare Voraussetzung für die Wirksamkeit von Strahlentherapie darstellt und der Grad der Oxygenierung des Tumors vor und während der Bestrahlung ein wichtiger prädiktiver Faktor ist, während Hypoxie zu einer Strahlenresistenz führt (GRAY et al. 1953). Und gerade die Hemmung der Blutgefäßversorgung der Tumoren würde doch zum Abschneiden der Versorgung von Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff führen. Neuere Studien konnten zeigen, dass antiangiogene Therapien zu einer „Normalisierung“

des strukturell wie auch funktionell abnormalen Tumorgefäßnetzwerks führen und sogar gesteigerte Sauerstoffgehalte bei verschiedenen Tumoren gemessen werden (HANSEN-ALGENSTAEDT et al. 2000; LEE et al. 2000), was eine Kombination mit Radiotherapie sehr nahe legt.

Durch eine alleinige Strahlentherapie werden vornehmlich die oxygenierten Tumorzellen eliminiert, während die hypoxischen, radioresistenten Zellen überleben. Sie beginnen, protektive Zytokine zu produzieren und eine zweite Welle der Angiogenese und Tumorzellproliferation sind die Folge. Bedingt durch den Angriff von Tumorzell- und Tumorstroma-Kompartiment, vermögen antiangiogene Substanzen genau an diesem Punkt den kodependenten Zyklus von Tumorwachstum und Angiogenese zu unterbrechen und so die Radioresistenz von Tumoren zu vermindern. Neuere präklinische und klinische Studien haben gezeigt, dass die Kombination mit antiangiogenen Substanzen den therapeutischen Effekt ionisierender Bestrahlung verbessern konnte.

Der komplexe Mechanismus der Blutgefäßbildung bei malignen Tumorneubildungen lässt darauf schließen, dass kombiniert eingesetzte antiangiogen wirksame Therapeutika effektiver wirken. Dennoch ist trotz mittlerweile zahlreicher Untersuchungen bis heute unklar, welche Kombinationen den größten Effekt und die größte synergistische Aktivität erreichen bei gleichzeitig minimierter Toxizität. Es zeigt sich, dass die Angiogenese-Inhibition bei verschiedenen malignen Tumorneubildungen bezüglich der Art und Administration optimiert werden muss.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von verschiedenen kombinierten Therapiekonzepten mit Angiogenese-Inhibitoren auf das Wachstumsverhalten von Tumoren unter komplexen *in-vivo*-Bedingungen an zwei humanen Xenograft-Tumormodellen zu untersuchen.

In vier Versuchsreihen wurden verschiedene Angiogenese-Inhibitoren einzeln sowie kombiniert eingesetzt bzw. kombiniert mit lokaler fraktionierter Bestrahlung getestet. Dabei kamen folgende gefäßwachstumshemmenden Substanzen zum Einsatz:

Der endogene Angiogeneseinhibitor Endostatin, die kleinmolekularen Imidazol-Derivate SU5416 und SU6668 sowie der peptidomimetische  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Inhibitor S247.

Tab. 1: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen

Versuchsreihe	Angiogenese-Inhibitor 1	Angiogenese-Inhibitor 2	Bestrahlung
A (PC3)	VEGFR2-Tyrosinkinase-Inhibitor	Endostatin	--
B (PC3)	VEGFR2-Tyrosinkinase-Inhibitor	PDGFR- $\beta$ -Tyrosinkinase-Inhibitor	5 x 2,5 Gy
C (PC3)	$\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Inhibitor	--	5 x 2,5 Gy
D (A431)	$\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Inhibitor	--	5 x 2,5 Gy

Bei den beiden im Rahmen dieser Arbeit verwendeten subkutan wachsenden und damit ektopen Tumormodellen handelte es sich zum einen um das humane Prostata-Karzinom PC3. Zudem wurde die Kombination der Bestrahlung und Integrin-Inhibition an einem weiteren Tumormodell untersucht, dem humanen A431-Epidermoid-Karzinom. Damit wurden zwei unterschiedliche Tumormodelle gewählt, die zudem deutliche Unterschiede hinsichtlich ihres (subkutanen) Wachstumsverhaltens aufzeigten. So konnten im Rahmen dieser Arbeit weitere Erkenntnisse bzgl. antitumoraler Effekte dieser Behandlungskombination gewonnen werden.

Zur Erfassung des therapeutischen Effektes wurde der Tumorwachstumsverlauf unter dem Einfluss der jeweils vorgenommenen Behandlung durch Messung der Tumorgrößen ermittelt. Begleitend wurden Tumoren aus den PC3-Behandlungsgruppen histologisch sowie immunhistochemisch hinsichtlich des Proliferationsverhaltens der Tumorzellen bzw. der Gefäßversorgung untersucht. Bei den A431-Tumoren wurde neben der Expression von phosphorylierter Akt (pAkt) die Apoptose immunhistochemisch dargestellt. Klinische und pathologische Veränderungen der Tiere wurden dokumentiert.

## II Literaturübersicht

### 1 Entstehung von Blutgefäßen - Angiogenese und Vaskulogenese

Ursprünglich bezeichnete der Begriff *Angiogenese* den komplexen Vorgang der Gefäßneubildung durch Aussprossen aus bestehenden Blutgefäßen (CARMELIET u. COLLEN 2000; RISAU 1997). Neben der Sprossung gibt es noch weitere Formen der Angiogenese, die u.a. in der Lunge, im Herzen sowie in der Chorioallantoismembran beschrieben wurden, wie die Intussuszeption (BURRI u. TAREK 1990; PATAN et al. 1992 u. 1993; RISAU 1997; VAN GRONINGEN et al. 1991). Hierbei werden bereits vorhandene Gefäße durch Einschnürung oder Kompartimentierung via luminal einwachsender Endothelzellpfeiler geteilt.

Bei der Bildung von Gefäßen im adulten Organismus überwiegen angiogene Vorgänge, während in der frühen Phase der embryonalen Entwicklung zunächst die Vaskulogenese im Vordergrund steht. Dabei differenzieren sich extraembryonal im Dottersack aus mesenchymalen Blutinseln die Vorläuferzellen von Blutzellen (hämatopoetische Vorläuferzellen) und Endothelzellen (Angioblasten). Durch eine weitere Differenzierung dieser Vorläuferzellen kommt es zur Bildung von Blutgefäßen und zur Organisation in ein primäres, vaskuläres Netzwerk (RISAU u. FLAMME 1995). Neuere Untersuchungen zeigen, dass eine Gefäßneubildung durch vaskulogenese-artige Prozesse auch im adulten Organismus stattfindet (SHI et al. 1998; ASAHARA et al. 1999; LIN et al. 2000; LUTTUN et al. 2002).

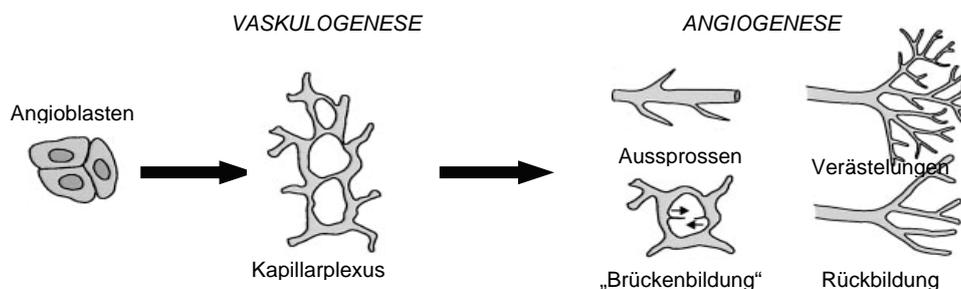


Abb. 1: Arten der Blutgefäßbildung (modifiziert aus CARMELIET u. COLLEN 2000, S. 388)

Angiogenese tritt neben der Embryonalentwicklung physiologisch auch im adulten Organismus im Rahmen hormonell gesteuerter zyklischer Veränderungen in den weiblichen Reproduktionsorganen (D'AMORE u. THOMPSON 1987) und bei einer Gravidität in der Milchdrüse auf (FINDLAY 1986; REDMER u. REYNOLDS 1996; DJONOV et al. 2001). Eine kontrollierte Neubildung von Blutgefäßen tritt bei regenerativen Prozessen wie der Wundheilung auf (CLARK et al. 1982; FOLKMAN u. SHING 1992). Im Gegensatz dazu kommt es bei einer Reihe von Erkrankungen, wie bei proliferativen Retinopathien oder der rheumatoiden Arthritis, zu einer überschießenden, unkontrollierten Blutgefäßbildung (FOLKMAN u. SHING 1992; PLENDL u. SINOWATZ 1999). Größte Bedeutung hat die Angiogenese als Komponente des progressiven Wachstums und der Metastasierung solider Tumoren (FOLKMAN 1971 u. 1995). Ein wachsender Tumor benötigt für die Sicherstellung seiner Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff ein ausgedehntes kapilläres Netzwerk. Zusätzlich eröffnen die neu gebildeten Blutgefäße den Tumorzellen einen Weg, in den Kreislauf zu gelangen und somit in anderen Organen und Geweben Metastasen zu bilden.

### **1.1 Morphologische Aspekte der Angiogenese**

Hauptschritte der Angiogenese sind die Migration, Proliferation und schließlich die Lumenbildung durch die Endothelzellen sowie Veränderungen, die in den periendothelialen Komponenten, also der Basalmembran, der extrazellulären Matrix und den Perizyten stattfinden (RISAU 1997).

Durch einen angiogenen Stimulus aktivierte Endothelzellen verändern ihre Morphologie und bilden z.T. fingerförmige Ausläufer. Es kommt zum teilweisen Ab- bzw. Umbau der Basalmembran und der extrazellulären Matrix durch diverse proteolytische Enzyme, darunter Matrixmetalloproteinasen und Plasminogen-Aktivatoren, die unter anderem von den Endothelzellen und Perizyten synthetisiert werden (FOLKMAN 1984; NICOSIA u. VILLASCHI 1999). Endothelzellen heften sich an diese Matrix mit Hilfe eigens exprimierter Adhäsionsmoleküle. Zu diesen gehören unter anderem die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  (RUOSLAHTI u. REED 1994; BENJAMIN et al. 1999; ERDREICH-EPSTEIN et al. 2000). Diese Integrine binden einerseits an ihrer Rezeptorseite Proteine der Endothelzellmembran (EZM), die eine bestimmte Aminosäuresequenz aufweisen, und andererseits sequenzunabhängig die

Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2). Durch diese Assoziation wird nicht nur das „Remodelling“ der EZM erleichtert, sondern gleichzeitig auch die Migration der Endothelzelle ermöglicht (RAY u. STETLER STEVENSON 1994; BROOKS et al. 1998; ELICEIRI u. CHERESH 1999).

Zunächst gelangen die Endothelzellen durch die fragmentierte Basalmembran hindurch in das perivaskuläre Gewebe und wachsen in Richtung chemotaktischer Faktoren als Gefäßsprossen heran, die dann im Verlauf ein Lumen bilden. Im weiteren kommt es zu Verzweigungen, oftmals auch zur Ausbildung von Anastomosen („Schlingenbildung“). Von diesen Schlingen ausgehend migrieren dann wiederum Endothelzellen, so dass nach und nach ein Netz feiner, kapillarähnlicher Strukturen entsteht (FOLKMAN 1984; AMSELGRUBER et al. 1999). Die Basalmembran wird neu gebildet und nachdem sich die Perizyten während der Kapillarsprossung von den Endothelzellen gelöst haben werden schließlich wieder Perizyten rekrutiert, die ein umgebendes Stützgewebe formen (HAMMERSEN et al. 1985; HIRSCHI u. D'AMORE 1996 u. 1997; RISAU 1997). Diese Stabilisierungsphase ist entscheidend für das Fortbestehen der neu gebildeten Gefäße, da unreife Gefäße bei Wegfall des angiogenen Stimulus schnell der Apoptose und Regression unterliegen können (BENJAMIN et al. 1999). Das Ergebnis ist ein dreidimensionales, funktionierendes Gefäßnetz.

## **2 Tumorangiogenese**

Ein kompetentes, expandierendes, vaskuläres Versorgungsnetzwerk ist notwendige Voraussetzung für progressives Wachstum solider Tumoren, da maligne Zellen ebenso wie normales Gewebe Sauerstoff und Nährstoffe für Überleben und Wachstum benötigen (FOLKMAN 1971).

Es können zwei Phasen unterschieden werden, die prävasculäre und die vaskuläre Phase (PEPPER 1997). In der prävasculären Phase besitzt der Tumor noch keine angiogenen Eigenschaften. Tumorzellen proliferieren Angiogenese-unabhängig und die Tumoren können lediglich bis zu einer kritischen Größe von einigen Tausend Zellen bzw. von ca. 2 bis 3 mm im Durchmesser wachsen (FOLKMAN 1995). Grund dafür ist dabei eine maximale Entfernung der Tumorzellen zu Kapillargefäßen von

ca. 100 bis 200  $\mu\text{m}$ , die Sauerstoff und Nährstoffe durch passive Diffusion zurücklegen können, wodurch eine ausreichende Versorgung sichergestellt ist (FOLKMAN 1971). Ein *in-situ*-Tumor kann über Monate oder Jahre lokal begrenzt bleiben. Es herrscht ein Gleichgewicht zwischen der Anzahl proliferierender und apoptotischer Zellen (FOLKMAN 1995; HOLMGREN et al. 1995). Um über dieses durch passive Diffusion limitierte Stadium hinaus wachsen zu können, muss der wachsende Tumor neue Blutgefäße generieren (vaskuläre Phase).

Tumorgefäße entwickeln sich überwiegend via Angiogenese und Intussuszeption aus den umliegenden, bereits bestehenden Gefäßen. Ergebnisse neuerer Untersuchungen lassen vermuten, dass dabei auch zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen aus der Gefäßwand oder aus dem Knochenmark involviert sind (RAFII 2000). Zwischen der Angiogenese, wie sie bei physiologischen Prozessen auftritt und der Angiogenese, wie sie bei der Entwicklung von soliden Tumoren und auch bei anderen pathologischen Prozessen stattfindet, scheint große Ähnlichkeit zu bestehen (FOLKMAN 1984). Dennoch zeigen die im Verlaufe des Tumorwachstums neu gebildeten Gefäße in struktureller und funktioneller Hinsicht einige Besonderheiten. Beispielsweise erfolgt eine Stabilisierung der Tumorgefäße durch Rekonstruktion einer Basalmembran sowie durch Anlagerung perivaskulärer Zellen nur unvollständig (BENJAMIN et al. 1999; CARMELIET u. JAIN 2000). Die exzessiv neu gebildeten Endothelzellen und abnormale perivaskuläre Zellen bilden folglich wenig differenzierte Tumorgefäße, die stark gewunden, von unregelmäßigem Durchmesser, dilatiert und durch Fenestrierung stark permeabel sind (DVORAK et al. 1995; CHANG et al. 2000; HASHIZUME et al. 2000). Verbunden hiermit ist ein zumeist chaotischer und variabler Blutfluss (BAISH u. JAIN 2000), der zu lokaler Hypoxie und Nekrose führt (HELMLINGER et al. 1997). Die Bildung der neuen permeablen Gefäße erlaubt neben dem weiteren Tumorwachstum auch das Eindringen von Tumorzellen in die systemische Zirkulation und eröffnet dem Tumor damit zusätzlich die Möglichkeit der hämatogenen Metastasierung (FOLKMAN 1995).

## **2.1 Steuerung der Angiogenese**

Im Gegensatz zur streng regulierten physiologischen Gefäßbildung verläuft die pathologische Angiogenese während der Entwicklung solider Tumoren i.d.R. persistent und anhaltend. Krebszellen beginnen mit der Veranlassung der

Blutgefäßneubildung zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorentstehung (FOLKMAN 1995). Dieser Prozess wird durch Wachstumsfaktoren eng reguliert. Neben sogenannten „proangiogenen“ Faktoren, d.h. Faktoren, welche die Blutgefäßneubildung fördern, konnten in den letzten Jahren dank intensiver Forschung auf diesem Gebiet auch zahlreiche natürliche (endogene) „antiangiogen“ wirkende Faktoren identifiziert werden, die spezifisch die Proliferation von Gefäßendothelzellen und damit die Angiogenese hemmen. Diese Faktoren stehen bei der Gefäßhomöostase in einem funktionellen Gleichgewicht (PEPPER 1997).

Das „Umschalten“ von einem ruhenden Tumorzellverband (tumor dormancy) in einen Endothelzell-aktivierenden, wachsenden Tumor haben HANAHAN und FOLKMAN 1996 als *Angiogenic Switch* bezeichnet. Dieser wird durch eine lokale Imbalance zwischen positiven und negativen Regulatoren der Angiogenese im Tumor eingeleitet; als Resultat der Bildung angiogener Faktoren bzw. der Niederregulierung antiangiogener Faktoren (FOLKMAN et al. 1989; BOUCK et al. 1996; SENGER et al. 1996; PEPPER 1997). Die Ursache dafür, dass ein Tumorzellverband oftmals erst nach Monaten oder sogar Jahren plötzlich eine angiogene Aktivität entwickelt, ist noch weitgehend unklar.

Als eine der Hauptursachen dieser Angiogenese-Induktion wird ein Absinken der Sauerstoffspannung (Hypoxie) durch ein Missverhältnis zwischen Tumormasse und Gefäßversorgung angesehen. Die in der Mikroumgebung von Tumoren oftmals herrschenden hypoxischen Bedingungen aktivieren Hypoxia-Inducible Factors (HIF-1 $\alpha$ , HIF- $\beta$ , HIF-2 $\alpha$ ), wobei HIF-1 $\alpha$  die bedeutendste Rolle zugeschrieben wird, welcher wiederum die Hochregulierung von Genen bzw. verschiedenen angiogenen Faktoren unterstützt (SHWEIKI et al. 1995; DACHS et al. 1997; CARMELIET 1998; KUNG et al. 2000). Eine enge Verbindung scheint in diesem Zusammenhang zu dem als Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) bezeichneten Wachstumsfaktor zu bestehen (siehe auch Abb. 2, S. 14), der als einer der zentralen Faktoren bei der Tumorangiogenese betrachtet wird.

Daneben gibt es eine ganze Reihe von Evidenzen, dass bestimmte Mutationen vermehrte Angiogenese bewirken. Charakteristisch ist dabei die Aktivierung von Onkogenen wie z.B. v-src oder ras, was eine erhöhte HIF-Aktivität und eine vermehrte Expression proangiogener Proteine wie VEGF zur Folge hat. Gleichzeitig

werden Gene inaktiviert (z.B. von Hippel-Lindau (VHL)-Tumor-Suppressor-Gen, p53-Tumor-Suppressor-Gen) und Suppressor-Proteine wie Thrombospondin niedereguliert, welche normalerweise die Bildung von angiogenen Faktoren kontrollieren bzw. unterdrücken (JIANG et al. 1997; GALE u. YANCOPOULOS 1999; RAK et al. 2000; RAVI et al. 2000).

Neben VEGF spielt eine Reihe von weiteren proangiogenen Faktoren eine Rolle, so z.B. der Fibroblast Growth Factor (FGF), Interleukin-8, Placenta Growth Factor (PIGF), Transforming Growth Factor (TGF), Growth Factor- $\beta$  (GF- $\beta$ ), Tumor Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Pleiotrophin oder Cyclooxygenase-2, um nur einige Beispiele zu nennen (RELF et al. 1997; CARMELIET et al. 1998; FUKUMURA et al. 1998; DACHS et al. 2000).

### **3 Ionisierende Bestrahlung**

Ionisierende Strahlen gelten als effektive Behandlungsmethode bei einer Vielzahl von Tumoren. Rund die Hälfte aller Krebspatienten erfahren eine Bestrahlung im Verlauf ihrer Behandlung (OWEN et al. 1992). Dabei kommt weiterhin überwiegend die mittels Linearbeschleunigern oder  $^{60}\text{Co}$ -Strahleneinheiten erzeugte hochenergetische Photonenstrahlung zum Einsatz.

#### **3.1 $^{60}\text{Co}$ -Bestrahlung - Physikalische Grundlagen**

Wird Materie ionisierender Strahlung ausgesetzt, kann die aufgenommene Energie zu Anregungen und Ionisationen der Atome oder Moleküle in diesem biologischen Material führen. Im Falle einer Anregung wird ein Elektron eines Atoms oder Moleküls durch die Strahlung auf ein höheres Energieniveau gehoben. Bei einer Ionisation hat die Strahlung genügend Energie, um ein oder mehrere Orbitalelektronen aus einem Atom oder Molekül herauszuschlagen.

Ionisierende Strahlung lässt sich in Photonenstrahlung (oder auch elektromagnetische Strahlen) und Teilchenstrahlung (Neutronen, Protonen,  $\alpha$ -Teilchen, mittelschwere oder schwere Ionen) unterteilen (GEHRTSEN et al. 1993). Eine wichtige Eigenschaft dieser Strahlung ist die lokale Abgabe großer Mengen Energie.

$^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung gehört wie die Röntgenstrahlung zu der Photonenstrahlung. Der einzige Unterschied zwischen diesen Strahlenarten besteht in ihrer Herkunft. Röntgenstrahlen werden in einer Röntgenröhre erzeugt, in der Elektronen in einem elektrischen Feld auf hohe Geschwindigkeiten beschleunigt werden, um dann in fester Materie (meistens Wolfram) abrupt abgebremst zu werden. Dabei wird ein Teil der kinetischen Energie der Elektronen in Röntgenstrahlung umgewandelt, die sich aus der Bremsstrahlung und der charakteristischen Röntgenstrahlung zusammensetzt.  $\gamma$ -Strahlen entstehen ausschließlich bei Kernprozessen und werden von radioaktiven Isotopen ausgesendet. Die wichtigsten Kernumwandlungsarten bei  $^{60}\text{Cobalt}$  sind  $\beta$ -Umwandlungen, Emission von  $\alpha$ -Teilchen und Kernspaltung. Es unterliegt einem  $\beta$ -Zerfall mit einer Halbwertszeit von 5,27 Jahren. Dabei wandelt sich ein Neutron in ein Proton, ein Elektron und ein Antineutrino um. Elektron und Antineutrino werden emittiert, zurück bleibt ein angeregter  $^{60}\text{Nickel}$ -Kern, der sich sofort ( $<10^{-9}$  s) in einer Gamma-Kaskade von 1,17 MeV und 1,33 MeV in seinen Grundzustand verwandelt (MAYER-KUCKUCK 1984). Das Dosismaximum der über 1 MeV Gammaquanten der  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung wird erst nach etwa 0,5 cm unter der Hautoberfläche erreicht. Mittlerweile lassen sich mit Linearbeschleunigern durch Bremsstrahlung noch sehr viel höhere Photonenenergien erzeugen, die ihr Dosismaximum noch tiefer haben (z.B. 25 MeV).

Photonenstrahlung gehört wie die ungeladenen Neutronen zu den indirekt ionisierenden Strahlen, während alle geladenen Partikel Atome direkt ionisieren. Im Fall der  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung werden v.a. durch den Photoeffekt Elektronen aus den äußeren Schalen herausgelöst, die Bindungsenergien in der Größenordnung von 10 eV haben und damit von MeV-Quanten leicht entfernt werden können. Diese Elektronen ionisieren dann sekundär weitere Atome. Anhand der Dichte der auftretenden Ionisationen lässt sich die Strahlung in dünn und dicht ionisierende Strahlung unterteilen. Die Photonenstrahlung gehört zu den dünn ionisierenden Strahlen, bei denen jedes Photon ein schnelles Sekundärelektron erzeugen kann, welches eine relativ geringe Anzahl an Ionisationen beim Durchgang durch einen Zellkern mittlerer Größe hinterlässt. Die Ionisationsorte liegen für dünn ionisierende Strahlung weiter und für dicht ionisierende Strahlung weniger weit auseinander. Das Maß für die Dichte der Ionisation ist der *Lineare Energie Transfer* (LET), der durch die Angabe der pro Wegstrecke absorbierten Energie charakterisiert ist und in

keV/ $\mu\text{m}$  angegeben wird. Für monoenergetische geladene Teilchen ist das ein fester Wert, während er für die indirekten Strahlenarten vom Ausmaß der sekundären Ionisation und deren Energieübertrag abhängt. Für  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung schwankt er zwischen 0,3 und etwa 3 keV/ $\mu\text{m}$ , während er für 5 MeV  $\alpha$ -Teilchen etwa 100 keV/ $\mu\text{m}$  betragen kann (TUBIANA 1990).

### 3.2 Radiobiologie

Ionisationen spielen die entscheidende Rolle bei den durch ionisierende Strahlung ausgelösten biologisch relevanten Schäden.

Man geht davon aus, dass Photonen-Strahlung bei Energien von größer als 124 eV ionisierend ist. Um die biologische Strahlenwirkung quantifizieren zu können, führte man den Begriff der *Dosis* ein. Sie ist ein Maß für die pro Masseneinheit absorbierte Energie und wird in Gray [*Joule/kg*] angegeben. In biologischen Systemen besteht jedoch das Problem, dass unterschiedliche Strahlenarten verschiedene biologische Auswirkungen bei gleicher Dosis haben. Um nun unterschiedliche Strahlenarten miteinander vergleichen zu können, wurde die *Relative Biologische Wirksamkeit* (RBW) eingeführt. Sie dient als Maß der Effektivität einer getesteten Strahlung im Vergleich mit einer Referenzstrahlung, üblicherweise 250 kV-Röntgen- oder  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlen. Generell steigt die RBW mit dem LET, allerdings nur bis zu einem Maximum bei etwa 100 keV/ $\mu\text{m}$ . Darüber hinaus wird mehr Energie deponiert als zur Zellabtötung notwendig ist („overkill“), wobei sie anschließend auf Werte unter 1 fällt (BARENSEN et al. 1963; SKARSGARD et al. 1967).

Der durch ionisierende Bestrahlung verursachte Zelltod beruht hauptsächlich auf der Schädigung der DNA der (Tumor-)Zellen und einem sich anschließenden getriggerten Zelltod durch Apoptose bzw. Nekrose. Das Ausmaß der Schädigung hängt von mehreren Faktoren ab. Am bedeutendsten erscheint dabei der Sauerstoffgehalt in den Zellen (LITTBRAND u. REVESZ 1969). Es wird angenommen, dass Sauerstoff zu einer deutlichen Verlängerung der Lebenszeit freier Radikale führt, die bei der Interaktion von Strahlen mit zellulärem  $\text{H}_2\text{O}$  entstehen, und dadurch die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Bestrahlung stark erhöht (CHAPMAN et al. 1974). Freie Radikale interagieren mit der DNA, was zu deren Schädigung führt.

Mit der sog. „fraktionierten“ Bestrahlung wurde schon früh im 20. Jahrhundert ein Bestrahlungskonzept entwickelt, das genauso effektiv ist, verglichen mit der Gabe von hohen Einzeldosen jedoch weitaus besser toleriert wird und bis heute breite Anwendung findet. Die Bestrahlung wird dabei in geteilten, relativ geringen Dosen vorgenommen. In der Zeit zwischen den einzelnen Dosen werden dem gesunden Gewebe Reparatur- und Repopulationsvorgänge ermöglicht und es somit „geschont“. Gleichzeitig verstärkt ein anschließender Anstieg des Sauerstoffgehalts im Gewebe die darauf folgende Strahlenwirkung und Tumorzellen werden vermehrt in empfindlichen Phasen des Zellzyklus erfasst. Grund dafür ist, dass bei sublethal geschädigten Tumorzellen nach Bestrahlung Reparaturmechanismen einsetzen. Dabei folgen Phasen des Zellzyklus, in denen die Zellen unterschiedlich sensitiv gegenüber Strahlen reagieren. Radioresistent ist die S-Phase, während Zellen in der G2- bis M-Phase sensitiv gegenüber Strahlen reagieren (ELKIND u. SUTTON 1960; ELKIND et al. 1965; ELKIND 1988).

### **3.2.1 Angiogene Stimulation nach Bestrahlung**

Seit Ende der achtziger Jahre wurde über die Bildung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und den Zellzyklus regulierenden Genen in Tumorzellen und Endothelzellen nach Bestrahlung berichtet (WITTE et al. 1989; HALLAHAN et al. 1989; WOLOSCHAK et al. 1990). Dies ist als Teil einer umfassenden Antwort der Zellen auf die Stresseinwirkung zu sehen, bei der eine Vielzahl von Reaktionen ablaufen, in deren Verlauf es über Transkriptionsfaktoren zur vermehrten Expression dieser Faktoren kommt. Im Hinblick auf angiogene Vorgänge kommt es dabei durch die Aktivierung des Rezeptors des Epidermal Growth Factor (EGFR) zur Anregung des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalwegs (BOWERS et al. 2001), was mit einer gesteigerten Expression von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\alpha$ , VEGF und FGF einhergeht (GORSKI et al. 1999). ABDOLLAHI et al. berichteten 2003 über die vermehrte Bildung von VEGF und FGF in Tumorzellen und VEGFR2 in Endothelzellen *in vitro* nach Bestrahlung (ABDOLLAHI et al. 2003a).

In diesem Zusammenhang ist ein weiterer Signalweg bekannt, der mit einer Hochregulation von VEGF einhergeht. Die Proteinkinase B, auch als AKT bezeichnet, führt dabei nach Phosphorylierung (pAKT) zu einer Stabilisierung von HIF-1 (MAXWELL et al. 1997; MAZURE et al. 1997; s. auch Abschnitt 2.1). Dieser Kaskade

nachgeschaltet wird pAkt in Endothelzellen nach Rezeptorstimulation durch Wachstumsfaktoren hochreguliert (s. Abb. 2). Untersuchungen in jüngerer Zeit konnten zeigen, dass pAkt unabhängig von dieser durch Wachstumsfaktoren induzierten Hochregulierung nach Bestrahlung vermehrt gebildet wird (TAN u. HALLAHAN 2003; ABDOLLAHI et al. 2005). pAkt, das bekannt für die Vermittlung antiapoptotischen Schutzes ist (DATTA et al. 1997), führt dort zum Überleben der Zellen und zur Kapillarbildung (TAN et al. 2006).

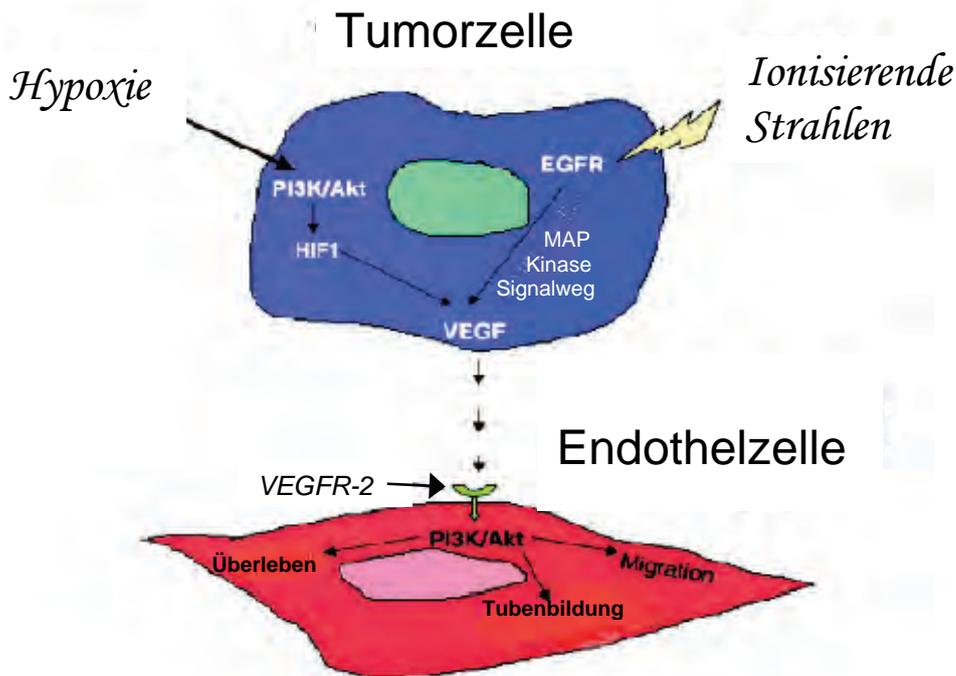


Abb. 2: Signalmechanismus im Zusammenhang mit der VEGF-induzierten Tumorangiogenese.

Sowohl das Überleben der Endothelzellen als auch der Vorgang der Neubildung von Gefäßen werden über die VEGF/VEGFR2-Aktivierung und die nachgeschaltete Phosphatidyl-Inositol 3`-Kinase/Akt Signalkaskade induziert. VEGF wird durch Stressfaktoren, welche wie z.B. ionisierende Strahlung von außen einwirken, oder im Tumorgewebe vorherrschende Stressfaktoren wie z.B. Hypoxie hochreguliert [Quelle: modifiziert aus WACHSBERGER 2003, S. 1959].

Die gesteigerte Tumorzellproliferation, welche sich oft nach Bestrahlung beobachten lässt, ist möglicherweise ebenso Folge der Angiogenese-Stimulation (KOUKOURAKIS et al. 2001) wie auch der gesteigerten Proliferation des Tumorstammzell-Kompartiments (HENDRY 1992). Wahrscheinlich ist, dass neben hypoxischen Bedingungen auch eine zytotoxisch wirkende Therapie wie die Bestrahlung zur Intensivierung von angiogenen Vorgängen führt, und damit wiederum selbst zu einer Resistenzentwicklung beiträgt.

## 4 Strategien der Angiogeneseinhibition

Mögliche Ansatzpunkte für eine antiangiogene Therapie sind vielfältig und ergeben sich aus dem bereits zuvor geschilderten komplexen Geschehen der Tumorangiogenese (s. Abschnitt 2). Das Prinzip besteht darin, einzelne oder mehrere Schritte der Gefäßbildung zu blockieren, um so die Etablierung eines suffizienten Gefäßsystems im Tumor zu verhindern, bzw. einen bereits vaskularisierten Tumor von der Substratversorgung abzuschneiden. Wachstum und Metastasierung des Tumors würden inhibiert sein. Bis heute sind über 300 medikamentöse Hemmer der Angiogenese bekannt, wobei in letzter Zeit nicht nur endogene, sondern auch zahlreiche synthetische Substanzen identifiziert und entwickelt worden sind. Für eine Vielzahl von ihnen konnte gezeigt werden, dass sie Tumorwachstum verzögern. Nach den ersten viel versprechenden *in-vitro*-Versuchen und deren erfolgreicher Transfer zu zahlreichen *in-vivo*-Experimenten an Xenograft-Modellen wurde 1992 mit der Substanz TNP 470 der erste klinische Versuch am Menschen unternommen. Seitdem sind bis heute über 10 000 Krebspatienten im Rahmen von klinischen Studien mit Angiogenese-Inhibitoren behandelt worden. Mit dem VEGF-neutralisierenden Antikörper Bevacizumab (Avastin™, Genentech) hat das erste antiangiogene Tumormedikament am 26. Februar 2004 durch die United States Food and Drug Administration (FDA) seine klinische Zulassung erhalten.

Primär antiangiogen wirkende Substanzen greifen an unterschiedlichen Stellen der angiogenen Signalwege bzw. Strukturen an, die bei der Bildung von Gefäßen beteiligt sind. Hinsichtlich ihres Wirkmechanismus können dabei Substanzen unterschieden werden, welche die Wirkung von Wachstumsfaktoren neutralisieren, proteolytische Enzyme, die Endothelzell-Matrix-Anheftung oder die Gefäßreifung inhibieren. Direkt an den Endothelzellen wirkende Wirkstoffe verhindern deren Migration, Proliferation oder Invasion oder bewirken Apoptose. Sekundär antiangiogene Substanzen bewirken verschiedenste Reaktionen, in deren Folge es auch zu einer Hemmung der angiogenen Mechanismen kommt. Hierzu werden z.B. die selektiven COX-2-Inhibitoren wie Celecoxib (Celebrex®) oder Antikörper gegen EGFR wie Tarceva, Iressa® oder Erbitux® gezählt. Die genauen antiangiogenen Wirkmechanismen wie z.B. bei dem ehemals als Beruhigungsmittel Contergan eingesetzten Wirkstoff Thalidomid sind häufig nicht bekannt.

Tab. 2: Übersicht über einige der derzeit in Phasen klinischer Testung I bis III stehende antiangiogene Substanzen [Quellen: National Cancer Institute, Stand: August 2006; American Society of Clinical Oncology, Juni 2006; Penn State Cancer Institute, August 2005].

Mechanismus	Substanz	Wirkprinzip
Hemmung der Integrine	Cilengitide (EMD121974)	Kleinmolekularer $\alpha_v\beta_3$ -/ $\alpha_v\beta_5$ -Integrin-Antagonist
	ATN-161	Kleinmolekularer $\alpha_v\beta_1$ - Antagonist (Peptid)
Proteinase-Hemmung	AE-941 (Neovastat™, GW786034); Aeterna, Sainte-Foy, Québec	Matrix-Metalloproteinase- Inhibitoren
	Marimastat (British Biotech; Annapolis, MD)	
Direkte Hemmung der Endothelzellen	Combretastatin A4 Phosphate	Apoptose proliferieren- der Endothelzellen (Tubulin-Bindung)
	Soy Isoflavone (Genistein; Sojaprotein-Isolat)	
	2-Methoxyestradiol (2-ME; Panzem)	
	Endostatin (EntreMed; Rockville, MD)	Endogener Angiogenese-Inhibitor
	TNP-470 (TAP Pharmaceuticals, Deerfield, IL)	Endothelzellproliferation
VEGF-Antagonisten	Bevacizumab (Avastin™; Genentech; San Francisco, CA)	monoklonaler Antikörper gegen VEGF
	VEGF-Trap (Aventis, Strassburg, Frankreich)	dimerer, löslicher VEGFR1/-2
Rezeptor-Antagonisierung	ZD6474	VEGFR-Antagonist
	PTK787/ZK 222584 (Vatalanib)	oraler VEGFR2-Inhibitor
breite Hemmung von Wachstumsfaktoren	Dalteparin (Fragmin®)	Inhibitoren der Bindung von Wachstumsfaktoren
	Suramin	
EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren	Erlotinib (Tarceva™, Genentec)	kleinmolekulare Antagonisten
	Gefitinib (Iressa®, AstraZeneca, London, GB)	
	Cetuximab (Erbix®, ImClone, New York, NYS)	monoklonaler Antikörper
Antiinflammatorische Substanzen	Celecoxib (Celebrex®)	Cyclooxygenase-2- Inhibitor
	Thalidomid (Celgene; Warren, NJ)	Mechanismus unbekannt
	CC-5013 (Lenalidomid; Thalidomid-Analog)	
Verschiedene Mechanismen	Interferon- $\alpha$	hemmt Produktion von bFGF, VEGF, Endothel- zellproliferation
Unspezifische Mechanismen	Interleukin-12	hemmt Endothelzellproliferation
	Halofuginone Hydrobromide (Tempostat™)	
	Squalamin	hemmt Natrium-Hydro- gen-Austauscher (NHE3)

Generell werden antiangiogene Substanzen entsprechend ihrer Wirkmechanismen in die „direkten“ und „indirekten“ Angiogenese-Inhibitoren unterteilt (FOLKMAN u. HLATKY 1998; KERBEL u. FOLKMAN 2002). Direkte Angiogenese-Inhibitoren wirken direkt auf die Endothelzellen der Gefäßkapillaren, die zum Tumorbett hinzugezogen werden. Im Gegensatz dazu interferieren indirekte Angiogenese-Inhibitoren mit den angiogenen Kommunikations-Signalen zwischen den Tumorzell- und Endothelzell-Kompartimenten. Im folgenden werden die dabei möglichen Ansatzpunkte anhand der Blockade der VEGF-Signalkaskade exemplarisch erläutert und die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Wirkstoffe bzw. Prinzipien der Hemmung vorgestellt.

#### **4.1 Hemmung zentraler Wachstumsfaktoren**

Der Vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor wird als einer der zentralen Wachstumsfaktoren bei der physiologischen und auch der pathologischen Angiogenese gesehen und ist das mit Abstand am besten charakterisierte endothelspezifische Mitogen, das in nahezu allen Tumorarten und oft in erheblichen Mengen gebildet und sezerniert wird.

Es existieren verschiedene VEGF-Isoformen, die durch alternatives Spleißen der mRNA aus einem einzigen Gen entstehen und durch Cystein-Brücken verbundene Dimere bilden (BREIER et al. 1997). Zur VEGF-Familie werden auch die verwandten plazentaren Wachstumsfaktoren PlGF-1 und PlGF-2 gezählt (CARMELIET 2003). Es sind drei hochaffine VEGF-Rezeptoren (VEGFR) bekannt: VEGFR1 (Flt-1) und VEGFR2, als Flk-1 bei der Maus bzw. KDR beim Menschen bezeichnet, und VEGFR3 (flt-4). Dabei handelt es sich um sogenannte Rezeptor-Tyrosinkinase, d.h. um Transmembran-Proteine, deren zytosolischer Anteil eine Tyrosinkinase-Domäne und Tyrosin-Reste enthält und die extrazellulär aus Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen bestehen. Die Tyrosinkinase-Funktion wird durch Liganden-Bindung aktiviert. Die Rezeptoren dimerisieren und phosphorylieren sich gegenseitig an den Tyrosin-Resten. Die phosphorylierten Tyrosine setzen dann über die spezifische Assoziation mit SH2-Proteinen die Signaltransduktion in den Zellen bis hin zur Proliferation in Gang (FERRARA u. DAVIS-SMYTH 1997). VEGFR1 und VEGFR2 werden beide fast ausschließlich in Endothelzellen exprimiert (DE VRIES et al. 1992; TERMAN et al. 1992; FERRARA 1999). Dadurch ist die endothelspezifische Wirkung

von VEGF gewährleistet, da VEGF in den verschiedensten Zelltypen exprimiert wird. In neueren Untersuchungen gelang der Nachweis von VEGFR2 (Flk-1) auch auf Tumorzellen bei unterschiedlichen Tumoren wie dem Melanom, Vulva- und Mammakarzinom oder dem (hormonunabhängigen) metastasierenden Prostatakarzinom sowohl *in vivo* als auch im Tumorgewebe von Patienten (LACAL et al. 2000; CHEN et al. 2004; AKAHANE et al. 2005). Neben seiner Funktion als Endothelzell-Wachstumsfaktor hat VEGF auch eine permeabilitätssteigernde Wirkung, weshalb er auch als Vascular Permeability Factor (VPF) bezeichnet wird (CONNOLLY 1991; FLAMME et al. 1995; FERRARA 1999). Außerdem ist er an der Entstehung bzw. am Erhalt der Fenestrierung von Endothelien beteiligt, wie sie z.B. in den Nierenglomerula und im Plexus choroideus anzutreffen sind (ESSER et al. 1998). Die besondere Bedeutung von VEGF für die Blutgefäßentwicklung spiegelt sich zudem in der Tatsache wider, dass das VEGF-kodierende Gen das einzige bekannte autosomale Gen ist, dessen hemizygoter Status letal ist (FERRARA et al. 1996). Ein erhöhter VEGF-Plasmaspiegel wird als prognostischer Marker diskutiert. So war VEGF bei Patienten mit metastasierendem Prostatakarzinom erhöht und korrelierte mit Gefäßdichten im Tumorgewebe (DUQUE et al. 1999; STEFANOUE et al. 2004).

Neben VEGF spielen auch der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und Platelet Derived Growth Factor (PDGF) eine bedeutende Rolle bei der Gefäßentwicklung, zum Teil auch in Verbindung mit VEGF. Ihre Wirkung entfalten sie ebenfalls über Rezeptoren der Tyrosinkinase-Familie (RTKs). Von FGF sind mehr als 20 verschiedene, strukturell verwandte Polypeptide bekannt, die sich durch ihre hohe Affinität zur Bindung an zelluläres Heparan-Sulfat-Proteoglykan auszeichnen. Bei den zwei zuerst entdeckten und in Bezug auf angiogenetische Abläufe bedeutendsten Mitgliedern der FGF-Familie handelt es sich um FGF-1 (auch „acidic“ FGF) und FGF-2 („basic“ FGF). FGF wirkt mitogen auf verschiedene Zellarten wie Gefäßendothelzellen und Fibroblasten (BIKFALVI et al. 1997), aber auch auf Tumorzellen. Zusammen mit seinen Rezeptoren wird er von einer Reihe humaner Tumorarten exprimiert, so u. a. beim Prostatakarzinom, Nierenzellkarzinom oder invasiven Brustkrebs, um nur drei Beispiele zu nennen (ADNANE et al. 1991; NAKAMOTO et al. 1992; SINGH et al. 1996; DE JONG et al. 1998). Entsprechend konnte PDGF bei zahlreichen humanen Tumoren nachgewiesen werden, so z.B. bei

Prostata-Malignomen, dem Mammakarzinom oder Karzinomen der Speiseröhre und des Magens (STORY et al. 1991; ANTONIADES et al. 1992; HERMANSON et al. 1992; SEYMOUR et al. 1993; YOSHIDA et al. 1993). Bisher sind vier PDGF-Polypeptid-ketten nachgewiesen, die fünf dimere PDGF-Isoformen bilden (HELDIN et al. 2002). Die Expression ihrer Rezeptoren wurde auf Gefäßendothelzellen und auf glatten Muskelzellen in den Stromata von Tumoren nachgewiesen. Wie VEGF konnte auch ein erhöhter PDGF-Spiegel im Blut mit höheren Gefäßdichten in Tumoren in Verbindung gebracht werden (ANAN et al. 1996).

Verschiedene Zugänge zur therapeutischen Beeinflussung der VEGF-Signalkaskade sind untersucht worden: Der neutralisierende Antikörper Bevacizumab (Avastin™, Genentech) bindet und neutralisiert VEGF und verhindert so die Bindung an seinen Rezeptor (JAIN 2002). Diesem Konzept ähnlich handelt es sich bei der „VEGF-trap“ (Aventis, Strassburg, Frankreich) um einen dimeren löslichen Rezeptor, welcher aus Teilen der extrazellulären Domänen der VEGFR1 und -2 besteht (HUANG et al. 2003). Anders als Avastin bindet VEGF-trap nicht nur VEGF, sondern auch sämtliche Mitglieder der VEGF-Familie inklusive PlGF.

Um die Signalkaskade nach erfolgter VEGF-Rezeptor-Aktivierung zu unterbrechen, wurden zahlreiche Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren entwickelt, die Substanzen SU5416, SU6668, PTK787/ZK222584 sind nur wenige Beispiele. In mehreren murinen Tumormodellen konnte mit dem Wirkstoff SU5416, einem Inhibitor der VEGFR2-Tyrosinkinase (FONG et al. 1999), die Blutgefäßbildung reduziert sowie eine Verzögerung des Wachstums und der Metastasierung bewirkt werden (ANGELOV et al. 1999; FONG et al. 1999; VAJKOCZY et al. 1999). Für die Substanz SU6668, die ein breiteres Spektrum an RTK hemmt und dabei neben der Hemmung des FGFR und VEGFR2 eine hohe Aktivität gegen PDGFR- $\beta$  aufweist, wurde bei einer ganzen Reihe humaner Xenograft-Tumormodelle eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums und der Gefäßbildung nachgewiesen, so u. a. beim Glioblastom, Melanom, Bronchial-, Kolon- und Ovarialkarzinom (SHAHEEN 1999; LAIRD et al. 2000 u. 2002). Es stellte sich dann heraus, dass SU5416 ein effektives Mittel bei der Behandlung angiogener Frühstadien darstellt, während SU6668 auch bei großen Tumoren mit einem ausgeprägten etablierten Gefäßnetz seine Wirkung erzielte (BERGERS et al. 2003; SAHARINEN u. ALITALO 2003). Die Behandlung mit einem anderen PDGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor, Glivec™ (STI 571), konnte das

intrakraniale Wachstum von Gliomen bei Mäusen hemmen, und zeigte damit Wirkung bei einer äußerst aggressiven und behandlungsresistenten Tumorart (KILIC et al. 2000). Kürzlich wurde mit SU11248 (Pfizer, New York, USA) ein oraler RTK-Inhibitor entwickelt, der seine Antitumor- und antiangiogene Aktivität durch die Blockade des PDGFR, VEGFR, KIT und FLT3 entwickelt (ABRAMS et al. 2003).

Neben diesen Rezeptorblockaden existieren weitere Mechanismen zur Unterbindung des VEGF-Signals: Aptamere sind DNA- oder RNA-Moleküle, welche in der Lage sind, Zielproteine zu binden und funktionell zu neutralisieren. Ein solches VEGF-Aptamer befindet sich derzeit in klinischen Studien zur Lokalbehandlung der altersabhängigen Makuladegeneration (EYETECH STUDY GROUP 2003). Und schließlich wurde 2003 eine klinische Phase-II-Studie mit Angiozym, einem VEGFR1-Ribozym, welches die Proteinbiosynthese des VEGFR1 unterdrückt, erfolgreich abgeschlossen (WENG u. USMAN 2001).

## 4.2 Endostatin

Endostatin ist ein endogen vorkommendes, direkt antiangiogen wirkendes Protein und gehört zu den bekanntesten Vertretern der AI. Dabei handelt es sich um ein 20 kDa großes C-terminales enzymatisches Spaltprodukt von Kollagen XVIII, welches erstmals aus dem Kulturüberstand von einer Maus-Hämangioendothelium-Zelllinie (EOMA) isoliert wurde (O'REILLY et al. 1997) und darauffolgend in Serum und Urin tumortragender Mäuse nachgewiesen werden konnte (SASAKI et al. 1998).

Bei *in-vivo*-Versuchen hemmte rekombinant hergestelltes Endostatin die Angiogenese in der Chorioallantoismembran und führte bei verschiedenen Xenograft-Tumormodellen [u.a. Lewis-Lung-Karzinom, T241-Fibrosarkom, EOMA-Hämangiom, Nierenzellkarzinom, Prostatakarzinom (hormonunabhängig)] zu einer Suppression des Tumorwachstums bis hin zur nahezu vollständigen Regression auch bei bereits fortgeschrittener Tumoren (BOEHM et al. 1997; O'REILLY et al. 1997; DHANABAL et al. 1999). Interessanterweise berichteten BOEHM und Kollegen 1997, dass wiederholte Behandlungszyklen jeweils zu einer nahezu vollständigen Regression der Tumoren führten, und es demnach zu keiner Resistenz-Entwicklung gegenüber Endostatin kam. Schließlich bildeten sich die Tumoren sogar dauerhaft zurück, auch nachdem die Behandlung endgültig eingestellt worden war.

SORENSEN et al. zeigten 2002 bei Untersuchungen an einem ektopen Gliosarkom-Modell der Ratte, dass neben der Tumorgröße auch der Blutfluss im Tumorgewebe nach 10 Behandlungstagen um ca. die Hälfte reduziert war. Bei Untersuchungen an weiteren Tumormodellen bei Mäusen reduzierte Endostatin neben dem Tumorstadium zudem deutlich das Auftreten von Metastasen (XIA et al. 2002; ZHANG et al. 2002).

Mittlerweile sind eine ganze Reihe von Reaktionen nachgewiesen, über die Endostatin seine Wirkung entfaltet: so kommt es unter anderem zu einer Blockade des VEGFR2 (DIXELIUS et al. 2003) und zu einer Bindung an das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  (WICKSTROM et al. 2002) bzw. Glycopican-1 und -4 (KARUMANCHI et al. 2001), um nur zwei Beispiele zu nennen, mit der Folge einer Inhibition von Endothelzell-Migration und -Proliferation (YAMAGUCHI et al. 1999; BERGER et al. 2000). Daneben steigert es die Apoptoserate von Endothelzellen (DHANABAL et al. 1999; SIM et al. 2000). Trotz dieser Erkenntnisse waren die eigentlichen Wirkmechanismen bisher noch weitgehend unbekannt. Erst vor kurzem gelang es ABDOLLAHI und Kollegen, in diesem Zusammenhang ein äußerst komplexes Netzwerk von interagierenden Angiogenese-Signalen zu beschreiben (ABDOLLAHI et al. 2004a). Sie konnten zeigen, dass zahlreiche Schlüsselregulatoren der proangiogenen Signalkaskade direkt im Anschluss an eine Behandlung mit Endostatin niederreguliert werden. So lag zum Beispiel ein breites Spektrum von Genen wie Id-1, Stat3,  $\alpha_v$ - und  $\beta_3$ -Integrine zusammenhängend, abhängig vom angiogenen Status der Zellen, hoch- bzw. niederreguliert vor.

### **4.3 Hemmung von Integrinen**

Integrine sind heterodimere transmembranöse Rezeptor-Komplexe, die aus nicht-kovalent gebundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten bestehen und als Rezeptoren auf der Endothelzellmembran fungieren (RUOSLATHIE u. PIERSCHBACHER 1987). Bisher sind 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Einheiten bekannt, die 24 verschiedene  $\alpha$ - $\beta$ -Heterodimere bilden, wodurch ihr Vorkommen und ihre Funktion jeweils definiert sind (IVASKA u. HEINO 2000). Exprimiert auf Endothelzellen binden sie jeweils spezifisch an eine Reihe von Proteinen der extrazellulären Matrix, welche die Aminosäuresequenz Arginin, Glycin und Aspartat (RGD) aufweisen.

Bestimmte Integrine nehmen eine Schlüsselposition bei der Tumorangiogenese ein, indem sie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen ermöglichen (HYNES 1992; BROOKS et al. 1994a u. 1994b; ELICEIRI u. CHERESH 1999). Das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  interagiert mit einer Reihe von extrazellulären Matrix-Proteinen. Dies sind vor allem Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen, Thrombospondin, Osteopoetin, von Willebrand Faktor (BROOKS 1996; VARNER u. CHERESH 1996) und auch andere Proteine mit unterschiedlichen biologischen Funktionen wie dem FGF2 (RUSNATI et al. 1997) und der MMP-2 (BROOKS et al. 1996). Es konnte zudem gezeigt werden, dass  $\alpha_v\beta_3$  in Verbindung mit PDGF, Insulin und VEGF-Rezeptoren beteiligt ist an der Aktivierung von Signalwegen der Zellproliferation (GIANCOTTI et al. 1999; KUMAR et al. 2001) und die Apoptose von Endothelzellen verhindert (STROMBLAD et al. 1996). Da das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin überwiegend auf aktivierten Endothelzellen exprimiert wird, wird weiterhin von geringen Nebenwirkungen der Integrin-Inhibitoren auf bereits bestehende „physiologische“ Gefäße ausgegangen (BROOKS et al. 1994b; STROMBLAD et al. 1996).

Ein weiteres für die Angiogenese bedeutendes Integrin konnte in neueren Untersuchungen identifiziert werden - das Integrin  $\alpha_v\beta_5$ . FRIEDLANDER et al. zeigten in Untersuchungen an der Cornea und der Chorioallantoismembran, dass durch Antagonisierung von  $\alpha_v\beta_5$  die VEGF-stimulierte Gefäßbildung gehemmt wird, während die Antagonisierung von  $\alpha_v\beta_3$  zu einer Hemmung der FGF2-stimulierten Angiogenese führt (FRIEDLANDER et al. 1995 u. 1996).

Bislang ist eine Reihe von Antikörpern, synthetischen RGD-Peptiden und anderen Rezeptor-Antagonisten getestet worden, die gegen die Integrine  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_5$  gerichtet sind. *In vitro* verhinderte die Hemmung dieser Integrine die Tubenbildung (tube formation) von Gefäßendothelzellen in Matrigel-Assays (NICOSIA u. BONANNO 1991; BROOKS 1996; BAYLESS et al. 2000) und die FGF2- sowie die VEGF-induzierte Endothelzell-Proliferation (KUMAR et al. 2001). Die Antagonisierung führte *in vivo* zu einer verminderten Gefäßdichte und zur Hemmung des Wachstums bzw. zur Rückbildung von Tumoren (BROOKS et al. 1994a u. 1994b; KUMAR et al. 2001; NEMETH et al. 2003). Außerdem reduzierte sie signifikant die Bildung von Metastasen bei einer ganzen Reihe von Tumormodellen (BUERKLE et al. 2000 u. 2002; REINMUTH et al. 2003). Durch eine Blockade von  $\alpha_v\beta_3$  und Glykoprotein IIb/IIIa, einem weiteren Mitglied der Integrin-Familie, wurden

neben der Zelladhäsion, Migration und Invasion *in vitro* die Metastasierung und das Tumorwachstum *in vivo* inhibiert (TRIKHA 2002).

## **5 Kombinierte Therapiekonzepte - Derzeitiger Stand und Fragestellungen**

### **5.1 Kombination verschiedener Angiogenese-Inhibitoren**

Mit der Entdeckung einzelner Wirkstoffe oder der Erstellung kombinierter Behandlungs-Protokolle mit einer geringen Gesamt-Toxizität, die unterschiedliche angiogene Stimuli inhibieren, welche von einem Tumor und seiner Mikroumgebung gebildet werden, fand weltweit eine Entwicklung für die antiangiogene Therapie als viel versprechende neue Behandlungsform bei Krebserkrankungen statt. Bei verschiedenen Tumoren konnte die Beteiligung mehrerer Signalfaktoren bzw. -wege nachgewiesen werden (YOSHIJI et al. 1997; FIDLER 2001). Eine inkomplette Wirksamkeit oder ein Umgehen der Therapieantwort durch ein kompensatorisches Ankurbeln der nicht gehemmten Signalwege ist somit bei Blockade einzelner Schritte der Angiogenese vorstellbar. Zudem kann aufgrund der Natur indirekt wirkender Angiogenese-Inhibitoren, welche die Wirkung angiogener Kommunikationssignale unterbinden, angenommen werden, dass (genetisch instabile) Tumorzellen in der Lage sind, sich durch z.B. ein Umschalten auf andere Signalfaktoren der Therapie zu entziehen.

Aufgrund der multifaktoriellen Mechanismen der Blutgefäßbildung bei malignen Tumorneubildungen erscheint es daher nahe liegend, dass durch Behandlungsprotokolle, die unterschiedliche Mechanismen bei der Gefäßbildung hemmen, der Behandlungserfolg verbessert werden könnte. Bei den bereits in Abschnitt 4.1 angesprochenen Untersuchungen an einem Pankreas-Inselzell-Karzinom-Tumormodell (Maus) wurde gezeigt, dass eine gleichzeitige Blockade der VEGF- und PDGF-Rezeptoren durch SU5416 und SU6668 bei allen Tumorstadien größere antitumorale Effekte erzielt als die jeweils einzeln eingesetzten Substanzen (BERGERS et al. 2003; SAHARINEN u. ALITALO 2003). Entsprechende Ergebnisse ergaben sich auch bei Untersuchungen am C6-Gliom der Ratte (ERBER et al. 2004).

## 5.2 Kombination von Angiogenese-Inhibition und Bestrahlung

Neben der Chirurgie und der Chemotherapie stellt die Strahlentherapie eine der drei großen Säulen der Krebstherapie dar. Dennoch gibt es nach wie vor eine Vielzahl an Malignomen, die aufgrund einer intrinsischen oder erworbenen Radioresistenz nur sehr schlecht oder nicht auf die Radiotherapie ansprechen (Weichselbaum 1986 u. 1988). Aus diesem Grund ist es seit langem das Bestreben der Forschung, Verfahren zu entwickeln, welche das klinische Outcome der Strahlentherapie verbessern. Im Fokus der Bemühungen steht dabei zum einen die physikalische Herausforderung, möglichst hohe Dosen im Tumor bei größtmöglicher Schonung des umliegenden Gewebes zu erreichen, und zum anderen die Kombination von Bestrahlung mit anderen Therapieformen.

Die Verfügbarkeit von Sauerstoff ist eine wichtige Determinante für die Wirksamkeit von Strahlentherapie. Durch die strahleninduzierte Bildung freier Radikale entfaltet die Radiotherapie ihre tumorizide Wirkung, und Hypoxie führt zu mehr Strahlenresistenz. Demzufolge scheint der kombinierte Einsatz von Radiotherapie mit Angiogenese-Inhibitoren auf den ersten Blick kontraproduktiv. Anders als normale Blutgefäße sind Tumorgefäße jedoch strukturell wie funktionell abnormal und minderwertig (JAIN 1994; siehe dazu auch Abschnitt 2). Bedingt durch die abnormal hohe Permeabilität der unreifen Gefäße herrscht in Tumoren ein hoher interstitieller Druck, welcher verstärkt durch die Kompression durch die Tumorzellen zu teilweisem Kollaps, vermindertem Druckgradienten und somit auch erniedrigten Blutfluss, schlechter Oxygenierung sowie saurem Milieu führt (EBERHARD et al. 2000; KAKYLORIS et al. 2000). Neuere Studien lassen vermuten, dass antiangiogene Therapien zu einer „Normalisierung“ des Tumorgefäßnetzwerks führen. So wurde gezeigt, dass die Blockade von VEGF bzw. seines Rezeptors eine Reduktion der Gefäßdurchmesser und -permeabilität zur Folge hat (YUAN et al. 1996; TSUZUKI et al. 2000; KADAMBI et al. 2001), wodurch konsekutiv auch der interstitielle Druck bei einigen Tumoren sank. Tatsächlich konnte eine gegen das VEGF-System gerichtete Therapie die Oxygenierung bei verschiedenen Tumoren steigern (HANSEN-ALGENSTAEDT et al. 2000; LEE et al. 2000; FENTON et al. 2003). In der Literatur wird in letzter Zeit dem entgegen auch von erniedrigten (BRUNS et al. 2002; GONG et al. 2003; FENTON et al. 2004) oder gar

unveränderten Sauerstoffpartialdruck-Werten unter VEGF-Hemmung berichtet (KOZIN et al. 2001).

Durch eine alleinige Strahlentherapie werden vornehmlich die oxygenierten Tumorzellen eliminiert, während die hypoxischen, radioresistenten Zellen überleben. Sie beginnen, protektive Zytokine zu produzieren und eine zweite Welle der Angiogenese und Tumorzellproliferation sind die Folge (s. Abschnitt Punkt 3.2.1). Die Erkenntnis, dass Bestrahlung dadurch selbst zur Strahlenresistenz führen kann, hat zu Versuchen veranlasst, mit der Kombination von antiangiogenen Substanzen diese Resistenz zu durchbrechen. TEICHER et al. waren vor zehn Jahren die ersten, die ein besseres Ansprechen auf eine Einzeldosis-Radiotherapie bei gleichzeitiger Therapie mit Angiogenese-Inhibitoren nachweisen konnten (TEICHER et al. 1995). Seitdem belegten zahlreiche weitere präklinische Studien, dass die Kombination von medikamentösen Hemmern der Angiogenese mit Radiotherapie die Tumorkontrolle verbessern kann, so z.B. Angiostatin, Endostatin und COX-2-Inhibitoren (MAUCERI et al. 1998; GRISCELLI et al. 2000; HANNA et al. 2000; KISHI et al. 2000; LEE et al. 2000; JAIN et al. 2001). Bisher wurde dieses Behandlungskonzept insbesondere auch mit Hemmern des VEGF-Signalweges untersucht. Eine Blockade mit neutralisierenden Antikörpern vor der Bestrahlung führte zu ausgeprägten hemmenden Effekten auf das Wachstumsverhalten von Tumoren (GORSKI et al. 1999; KOZIN et al. 2001; FENTON et al. 2004). Darüber hinaus wurde für verschiedene Tumorentitäten ein verbessertes Ansprechen auf Radiotherapie bei gleichzeitiger Behandlung mit Inhibitoren der Rezeptor-Tyrosinkinasen unter anderem von VEGF bzw. PDGF nachgewiesen (GENG et al. 2001; HESS et al. 2001; GRIFFIN et al. 2002; NING et al. 2002; SCHUENEMAN et al. 2003; LU et al. 2004).

Ergebnisse einer ersten klinischen Testung (Phase I) der Kombination dieser beiden Therapie-Prinzipien (Angiostatin und Bestrahlung) wurden 2002 von DICKER et al. veröffentlicht. Aktuell laufen mehrere klinische Studien mit Angiogenese-Inhibitoren, bzw. erste Testungen bei Tumorpatienten sind bereits abgeschlossen. Aussagekräftige Ergebnisse stehen jedoch bisher noch aus. Aufgrund der bereits existierenden Zulassung von selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitoren bei anderen Indikationen kommt diese Substanzklasse dabei vermehrt zur Anwendung [Quellen: RTOG, NCI (Stand: Juli 2005)].

### 5.3 Fragestellungen

Trotz der inzwischen vorhandenen Datenmenge zur Thematik ist immer noch weitgehend unklar, welche Kombination von Angiogenese-Inhibitoren durch synergistische Effekte die effektivste ist bei gleichzeitig minimierter Toxizität.

Diese Arbeit beschäftigte sich daher mit dem Konzept des kombinierten Einsatzes des „direkten“ Angiogenese-Inhibitors Endostatin und des „indirekt“ wirkenden VEGF-Rezeptor-2-Inhibitors SU5416. Die Effekte der kombiniert eingesetzten Wirkstoffe, die an unterschiedlichen Punkten der angiogenen Signalwege angreifen, wurden im Rahmen dieser Arbeit *in vivo* am PC3-Tumormodell untersucht.

Des Weiteren sollte hier untersucht werden, inwieweit die Blockade des VEGF- und PDGF-Rezeptors durch die Substanzen SU5416 und SU6668 die Therapieeffekte von ionisierender Bestrahlung auf solide PC3-Tumoren *in vivo* weiter steigern kann.

Bekannt ist die Tatsache, dass die Integrin-abhängigen Signalwege ähnlich den durch Wachstumsfaktoren wie VEGF getriggerten sind, und dass sie miteinander gekoppelt sind. Daraus kann man schließen, dass der Integrin-Signalweg eine bedeutende Rolle bzgl. der Sensitivität der Endothelzellen gegenüber Bestrahlung spielt und eine ähnlich bedeutsame Rolle wie die VEGF-Inhibition einnimmt. Zielsetzung in einer weiteren Versuchsreihe war es daher, den Effekt eines kürzlich beschriebenen  $\alpha_v$ -Integrin-Antagonisten (S247; SHANNON et al. 2004) in Kombination mit Bestrahlung zu untersuchen. Diese Kombination wurde an den Modellen PC3-Prostatakarzinom und A431-Epidermoid-Karzinom *in vivo* untersucht.

## III Material und Methoden

### 1 Tumormodelle

Als Tumormodell dienten zum einen ein PC3-Prostatakarzinom- und zum anderen ein A431-Epidermoid-Karzinom-Xenograft, welche durch die Arbeitsgruppe im subkutanen Modell auf der Nacktmaus etabliert wurden (Abb. 3).

Bei den humanen Prostata-Adenokarzinomzellen handelt es sich um die Zelllinie PC3 (KAIGHN et al. 1979). Sie wurde aus einem Resektionspräparat eines hormonunabhängigen Primärtumors der Prostata eines 62-jährigen Patienten etabliert. Bei dem Mann hatten sich Knochenmetastasen ausgebildet. Sie wurde 1992 in die Tumorbank des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) aufgenommen. PC3 zeigt generell im subkutanen Modell ein relativ langsames Wachstum und erreichte bei den Untersuchungen dieser Arbeit nach 20 Tagen ein Tumolvolumen von ca. 100 - 150 mm<sup>3</sup>. Funktionell und histologisch ist er durch das Bild eines wenig differenzierten Adenokarzinoms charakterisiert.

Die A431-Zelllinie wurde von einem epidermoiden Vulvakarzinom einer 85 Jahre alten Frau isoliert (GIARD et al. 1973) und ist seit 1994 über die Tumorbank des DKFZ zu beziehen. Es handelte sich um maligne entartete Keratinozyten. Im subkutanen Modell zeigte sie ein sehr schnelles Wachstum und erreichte bereits nach ca. 6 bis 7 Tagen ein entsprechendes Volumen von ca. 150 - 200 mm<sup>3</sup>. Histologisch ist der Tumor durch das Bild eines epidermoiden Karzinoms charakterisiert.

Beide Zelllinien sind bereits weltweit in zahlreichen *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen verwendet worden (AWAD et al. 2001; LI et al. 2003; SANDERS et al. 2003; TEJEDA et al. 2003; CAPITOSTI et al. 2004; KUMAR et al. 2004).

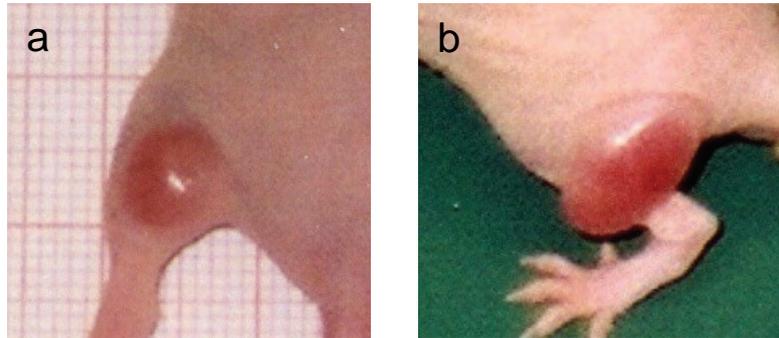


Abb. 3: Aufsicht auf die am linken Oberschenkel der Nacktmäuse wachsenden Xenograft-Tumoren PC3 am Tag 20 (a) und A431 am Tag 10 (b; Maße ca. 13x8 mm) nach Tumorzellimplantation (unbehandelt). Der A431-Tumor zeigte im Gegensatz zum PC3-Modell ein äußerst schnelles und aggressives Wachstum und erreichte ein Tumolvolumen von ca. 200 mm<sup>3</sup> nach bereits 7 Tagen (Tag des Therapiebeginns).

### 1.1 Langzeitlagerung und Kultivierung der Zellen

Um dauerhaft über die Zelllinien verfügen zu können und dabei Alterungsprozessen vorzubeugen, wurden die Zellen in 10 %-igem Dimethylsulfoxid-(DMSO)-Kryokonservierungsmedium (100 µl DMSO, 900 µl Kulturmedium; Sigma, München) tiefgefroren bei -80 °C gelagert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank (CO<sub>2</sub>-Inkubator; Heraeus, Hanau) bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub>-angereicherter Luft bei einer relativen Luftfeuchte von 95 % in T25- und T75-Kulturflaschen (Becton Dickinson, New Jersey, New York State). Bei dem verwendeten Nährmedium handelte es sich um Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 1 g/l D-Glucose sowie 1,0289 g/l N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin), das mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS; Biochrom KG, Berlin) versetzt wurde. Auf den Zusatz von Antibiotika wurde verzichtet. Zur Anzüchtung wurden die tiefgefrorenen Zellen in den Kryo-Röhrchen (1,8 ml; Nalge Nunc International, New York, New York State) im 37 °C-Wasserbad (M20 Lauda; GenTech, New York) ca. 1 bis 2 Minuten aufgetaut, in vorgewärmtes DMEM-Kulturmedium aufgenommen und in Kulturflaschen 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Da die Erfahrung zeigte, dass ein Zentrifugieren die Zellen

mehr schädigte als die DMSO-Reste in der Kultur, wurde auf das Trennen von Zellen und Kryokonservierungsmedium verzichtet. Am nächsten Tag wurde der Kulturüberstand mit den toten Zellen abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Das Medium wurde anschließend zwei mal pro Woche gewechselt. Die Kontrolle des Zellwachstums erfolgte täglich am inversen Lichtmikroskop (Nikon Diaphot Type 114; Nikon, Tokyo, Japan). Bevor die adhärennten Zellen vollständige Konfluenz erreichten (ca. 90 %) und über den gesamten Flaschenboden zahlreiche Mitosefiguren erkennbar waren wurde die Kultur passagiert.

## **1.2 Vorbereitung der Zellsuspensionen für die Tumorzellinokulation**

Für alle Versuche wurden Tumorzellen bis zur Kulturpassage sechs bis neun verwendet, um gut vergleichbare Tumoren zu erhalten.

Die Aufarbeitung und Portionierung der angezüchteten Tumorzellen erfolgte unmittelbar vor der Verabreichung. Zunächst wurde die Gesamtzahl vorhandener vitaler Tumorzellen ermittelt. Die Kulturflaschen wurden dazu mit jeweils 1 - 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert (Trypsin 0,03 %; EDTA 0,04 %; Sigma, München), bis sich die Zellen von der Kulturflasche ablösten. Die Zellen wurden in 5 ml PBS aufgenommen und in einem Eppendorf-Glaszylinder gesammelt. Mit einer Neubauer Zählkammer wurde lichtmikroskopisch die Zelldichte bestimmt. Um nur die vitalen Zellen zu berücksichtigen wurde eine 10 µl-Zellsuspensionsprobe mit Trypanblau (0,2 %-ige Lösung) 1/2 verdünnt. Die vitalen, nicht angefärbten Zellen wurden gezählt. In der Regel betrug der Anteil der blau angefärbten, also nicht-vitalen Zellen ca. 10 - 15 %. Anschließend wurden jeweils 5 Millionen vitale Zellen in Suspension in 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Cellstar; Greiner, Frickenhausen) pipettiert und 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert (Hermle-Zentrifuge, Gosheim). Der Überstand wurde abgenommen und daraufhin 50 µl PBS (Phosphate Buffered Saline, 1 x; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugegeben. Die Portionen mit jeweils ca. 5 Millionen Zellen wurden bis zur Verabreichung abgedunkelt auf Eis gelagert.

## 2 Tierversuche

### 2.1 Genehmigung der Tierversuche

Sämtliche Tierexperimente waren durch das Regierungspräsidium Karlsruhe geprüft und genehmigt worden.

### 2.2 Tiere und Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte nach den Richtlinien für Labortiere der Deutschen Regierung. Für die Untersuchungen wurden sieben Wochen alte weibliche Mäuse des Inzuchtstammes BALB/c *nu/nu* mit einem Körpergewicht von 17 - 19 g der Firma IFFA Crédo, Frankreich über Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Bei dieser Nacktmaus handelt es sich um einen thymusaplastischen und unbehaarten Albinostamm der Maus. Für diesen Stamm ist charakteristisch, dass das mutante Allel des *nude*-Locus (Symbol: *nu*) autosomal und rezessiv vererbt wird. Dieser Gendefekt trat bei einem Albino-Mausstamm 1961 in Glasgow infolge einer Spontanmutation auf. In den darauf folgenden Jahren stellte sich heraus, dass diese Tiere in hohem Maße für heterologe Transplantationen geeignet sind, da den homozygoten Tieren reife, funktionelle T-Lymphozyten fehlen (SPRENT 1974), wodurch nicht mit Komplikationen beim Wachsen von spezie fremden Tumorzellen im Körper zu rechnen ist. Allerdings ist durch die fehlende T-Lymphozyten-Population eine sehr hohe Infektionsgefährdung für die Tiere bedingt, was besondere Haltungsbedingungen in möglichst keimarmer Umgebung erfordert (FORTMEYER 1981; FORTMEYER u. BASTERT 1977). Die B-Zellen-Population der Lymphozyten ist bei diesen Mäusen vorhanden.

Die Tiere wurden in mit Überdruck zwangsbelüfteten, sterilen Typ III 1290 Filterkäfigen („Individually Ventilated Cages“, IVC-Haltungssystem der Firma Venti-Rack, Heidelberg) im Zentralen Tierlabor des Krebsforschungszentrums in Gruppen zu maximal 6 Tieren je Käfig gehalten. Der Luftwechsel erfolgte 30-fach/Stunde. Der Raum war klimatisiert (22,5 °C, Luftwechsel von 500 l/min, Luftfeuchtigkeit 50 - 60 %). Es bestand ein 12-stündig wechselnder Licht-Dunkel-Rhythmus. Zu Futter (Alleinfutter für Nacktmäuse, V1244-727 ssniff NM, 10 mm, steril; ssniff Spezialdiäten

GmbH, Soest) und Wasser aus Nippeltränken (Ehret, Emmendingen) hatten die Tiere freien Zugang. Als Einstreu wurde mehrfach entstaubtes und entkeimtes Weichholzgranulat (Altromin, Lage) verwendet. Einmal wöchentlich erfolgte die Umsetzung sämtlicher Tiere in saubere, sterilisierte Käfige mit frischer Einstreu. Das Umsetzen wurde wie auch alle weiteren Manipulationen an den Tieren unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 (BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen) vorgenommen. Für die Dauer der Bestrahlung kamen die Tiere ausschließlich mit sterilen bzw. desinfizierten Materialien in Kontakt.

Nach einer Eingewöhnungsphase von mindestens acht Tagen wurden die Tiere durch Metallohrmarken mit 3-stelligen Nummern gekennzeichnet und konnten so jederzeit eindeutig identifiziert werden.

Der Allgemeinzustand der Tiere wurde im Versuchszeitraum täglich kontrolliert. Kam es im Verlauf der Untersuchungen zu Störungen des Befindens, deutlichem Gewichtsverlust (Körpermasse < 17,5 g) oder erreichten die Tumoren eine bestimmte Größe (maximal 1,8 cm im Durchmesser), wurden die Tiere nach Betäubung mit CO<sub>2</sub> durch zervikale Dislokation getötet (in Anlehnung an die Kriterien zur vorzeitigen Tötung tumortragender Tiere der GV-SOLAS, 1999).

### **2.3 Tumorzellinokulation**

Die Verabreichung der Tumorzellen wurde ohne Betäubung der Tiere durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse von einer Person an Schwanz und Nacken fixiert. Eine zweite Person injizierte die Zellsuspension (50 µl) langsam subkutan am linken Oberschenkel über eine auf die Tuberkulinspritze (1 ml Dispomed®; Dispomed Witt oHG, Gelnhausen) aufgesetzte 27G<sup>1</sup>/<sub>4</sub>-Kanüle (BD Microlance™ 3; Drogheda, Irland). Vor dem Hintergrund einer möglichst hohen Standardisierung erfolgten sämtliche Tumorzellinokulationen gegen 11 Uhr vormittags.

Zum Zeitpunkt der Tumorzellgabe waren die Tiere ca. 10 Wochen alt und mit ca. 19 bis 20 g annähernd ausgewachsen.



### 2.4.1 Berechnung der Tumorumina

Die Tumorumina  $V$  der Versuchsreihe A wurden nach folgender Formel

berechnet:  $V=0.5 \times l \times b \times t$  [ $l$ =vertikaler,  $b$ =horizontaler,  $t$ =Tiefen-Durchmesser]

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass sich die ohne den gemessenen „Tiefen-Durchmesser“ ermittelten Tumorumina nicht wesentlich von den mit den mit drei Durchmessern ( $l$ ,  $b$  und  $t$ ) ermittelten Werten unterschieden, wurden die Volumina  $V$  der Versuchsreihen B bis D nach folgender Formel berechnet:

$$V=0.5 \times l \times b^2 \quad [l=\text{vertikaler, } b=\text{horizontaler Durchmesser}]$$

## 2.5 Behandlung mit Angiogenese-Inhibitoren

Mit der Behandlung wurde bei einem Tumorumen von 75-200 mm<sup>3</sup> begonnen. Der Tag des Behandlungsbeginns wurde als Tag 0 definiert. Die erste Applikation der Medikamente in den Versuchsreihen mit kombinierter Bestrahlung erfolgte stets sechs Stunden vor der angesetzten ersten Radiotherapie. Den Tieren der Kontrollgruppen und der ausschließlich mit Bestrahlung behandelten Gruppe wurde entsprechend dem Behandlungsschema der mit Angiogenese-Inhibitoren therapierten Gruppen PBS bzw. CMC verabreicht. Alle Substanzen wurden als körperwarme Suspensionen bzw. Lösungen subkutan verabreicht.

### 2.5.1 SU6668

SU6668 ist ein ATP-kompetitiver Inhibitor der PDGFR- $\beta$ -Kinase ( $K_i=0,008 \mu\text{M}$ ). Des weiteren hemmt SU6668 die Tyrosinkinase des VEGFR2 (Flk-1/KDR) mit einem  $K_i$ -Wert von 2,1  $\mu\text{M}$  und des FGFR-1 mit einem  $K_i$ -Wert von 1,2  $\mu\text{M}$ , benötigt also dazu deutlich höhere Hemmkonzentrationen (LAIRD et al. 2000; REINMUTH et al. 2001; SUN et al. 1999). SU6668, (Z)-3-[2,4-dimethyl-5-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrol-3-yl]-Propionsäure (Abb. 5) wurde 1999 von der Firma SUGEN Inc. (South San Francisco, Kalifornien) in fünf Schritten synthetisiert, ausgehend vom kommerziell erhältlichen 4-(2-Methoxycarbonyl-ethyl)-3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-Carboxy-Säure-Benzyl-Ester (SUN et al. 1999).

Als Trägersubstanz diente eine ebenfalls von der Firma SUGEN zur Verfügung gestellte Carboxymethylcellulose (CMC)-Lösung (s. Tab. 3). Die Konzentration betrug 50 mg/ml. Vor der Applikation war jeweils ein sorgfältiges Aufschütteln der Suspension erforderlich. Die Lagerung des Pharmakons erfolgte lichtgeschützt bei +4 °C. Die Applikation erfolgte jeden zweiten Tag in einer Dosierung von 250 mg/kg über den gesamten Beobachtungszeitraum.

### 2.5.2 SU5416

SU5416 ist ein ATP-kompetitiver, selektiver Inhibitor der VEGFR2-Tyrosinkinase (Flk-1/KDR;  $K_i$ -Wert von ca. 160 nM). Daneben besitzt es eine geringere biochemische Aktivität auch gegen PDGFR- $\beta$ -Tyrosinkinase ( $K_i=320$  nM) und minimal gegen FGFR-1 ( $K_i=19,5$   $\mu$ M) (FONG et al. 1999; VAJKOCZY et al. 1999). Der Angiogenese-Inhibitor SU4516 wurde von der Firma SUGEN (SUGEN Inc., South San Francisco, Kalifornien) entwickelt, und zwar durch Aldo-Kondensation des kommerziell erhältlichen 3,5-Dimethylpyrrol-2-Carboxyaldehyd mit Indolin-2-eins in Ethanol in der Gegenwart von Piperidin. Die chemische Bezeichnung lautet 3-[(2,4-Dimethylpyrrol-5-yl)methylidenyl]-Indolin-2-eins (s. Abb. 5).

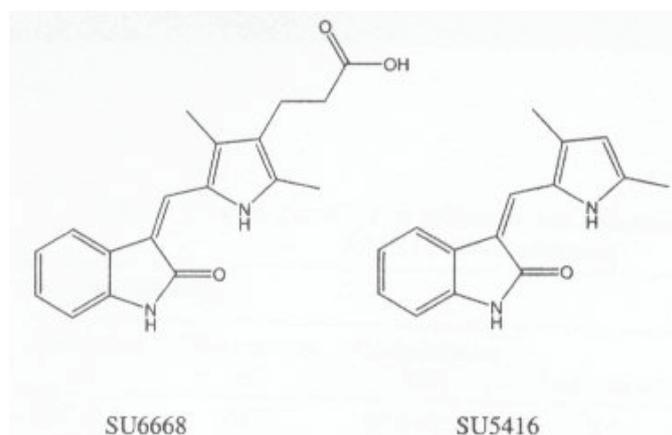


Abb. 5: Chemische Strukturen der Tyrosinkinase-Inhibitoren SU6668 und SU5416 (aus LAIRD et al. 2000, S. 4154).

Obwohl SU5416 nach erfolgter Applikation nur noch einige Stunden im Blut nachweisbar ist, besteht aufgrund der intrazellulären RTK-Blockade seine biologische Aktivität auch noch nach drei bis vier Tagen. Entsprechend erfolgte die

Gabe in präklinischen wie klinischen Studien zweimal wöchentlich, ein Schema, das auch bei der vorliegenden Arbeit Anwendung fand. Als Trägersubstanz diente ebenfalls die CMC-Lösung (Tab. 3). Die Konzentration betrug 20 mg/ml. Vor der Applikation war jeweils ein sorgfältiges Aufschütteln der Suspension erforderlich. Die Lagerung des Pharmakons erfolgte lichtgeschützt bei +4 °C. Die Applikation erfolgte zwei Mal wöchentlich in einer Dosierung von 100 mg/kg in 100 µl CMC über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Tab. 3: Zusammensetzung der CMC-Trägerlösung

Bestandteil	Konzentration % (w/v)
Carboxymethylcellulose-Natrium	0.5
NaCl	0.9
Polysorbat-80	0.4
Benzylalkohol	0.9
Entionisiertes Wasser	100 ml

### 2.5.3 Endostatin

Bei dem in den Experimenten verwendeten Endostatin handelte es sich um lösliches, rekombinant hergestelltes Maus-Endostatin (*Pichia Pastoris*; Calbiochem, Schwalbach). Nach Erhalt der tiefgefrorenen und durch Citrat-Phosphat-Puffer bei einem pH von 6,2 gepufferten Substanz in 1 ml-Röhrchen (1 mg/ml) wurde sie aufgetaut, mit PBS auf die finale Konzentration von 150 µg/ml verdünnt und anschließend portioniert in 1,5 ml-Eppendorf-Gefäßen bei -80 °C aufbewahrt. Die für die Behandlungen jeweils erforderliche Menge konnte so unmittelbar vor Verabreichung aufgetaut werden. Ein häufiges Auftauen und erneutes Einfrieren der instabilen Substanz konnte dadurch vermieden werden. Die Substanz wurde zwei mal täglich in einer Dosierung von jeweils 0,375 mg/kg in 50 µl PBS für die Dauer von 15 Tagen subkutan verabreicht, was einer täglichen Gesamtdosierung von 0,75 mg/kg Körpergewicht entsprach.

#### **2.5.4 S247**

Bei dem Integrin-Inhibitor S247 (Pharmacia Corporation, St. Louis, Missouri) handelt es sich um einen erst vor kurzem beschriebenen synthetischen peptidomimetischen hochpotenten und selektiven Antagonisten der  $\alpha_v$ -Integrinfamilie (REINMUTH et al. 2003; SHANNON et al. 2004). Die Substanz wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in PBS gelöst und bei +4 °C aufbewahrt. S247 wurde zwei mal täglich in einer Dosierung von 25 mg/kg (in jeweils 50  $\mu$ l PBS) verabreicht.

## 2.6 Bestrahlung mit $^{60}\text{Co}$ -Gammastrahlen

An den Tieren der Bestrahlungs-Gruppen wurden die Bestrahlungen mit der Anlage Gammatron S (Siemens, Erlangen) des Krebsforschungszentrums durchgeführt. Die Tumoren wurden mit hochenergetischen Photonen der  $^{60}\text{Co}$ -Gammastrahlung jeweils an fünf aufeinander folgenden Tagen mit einer täglichen Dosis von 2,5 Gy bestrahlt, was einer Gesamtdosis von 12,5 Gy entsprach. Beginn war an Tag 0 der antiangiogenen Therapie.



Abb. 6:  $^{60}\text{Co}$ -Bestrahlungs-Anlage Gammatron Siemens S mit den im Bestrahlungsfeld positionierten Mäusen.

Die Feldgröße betrug nach einer Begrenzung des Primärstrahlbündels durch eine Satellitenblende aus Woodschem Metall 20,0 x 20,0 cm. Die Tiere bzw. Tumoren waren in einem Abstand von 70 cm zur Strahlenquelle positioniert.

Die Dosisverteilung über dem Feld schwankte filmdosimetrisch um maximal 5 %. Die exakte Bestrahlungsdauer wurde anhand der für die  $^{60}\text{Cobalt}$ -Quelle geltenden Dosisleistungstabelle ermittelt. Die sich monatlich ändernden Werte berücksichtigten dabei den natürlichen Zerfall und die dadurch bedingte Verringerung der Dosisleistung der Strahlenquelle.

### 2.6.1 Fixierung der Tiere

Für die Dauer der Bestrahlung wurden die Tiere mit einer für diese Behandlung entwickelten und in der Werkstatt des DKFZ hergestellten Fixierungs-Vorrichtung immobilisiert (DKFZ Heidelberg). Das Prozedere der Fixierung wurde von allen Tieren toleriert. Damit konnten die Tiere relativ schonend fixiert werden, ohne dass eine Sedierung notwendig war, was für die Tiere eine erhebliche Belastung bedeutet hätte. Plexiglasröhren mit einem Innendurchmesser von 2,5 cm und 10 cm Länge waren um ein zentrales Feld (20 x 20 cm) angebracht und ermöglichten eine Behandlung von bis zu 10 Tieren gleichzeitig. Das Bestrahlungsfeld wurde so eingestellt, dass ausschließlich die tumortragenden Beine im Bestrahlungsfeld positioniert waren, wodurch die Strahlenbelastung auf den Gesamtorganismus gering gehalten werden konnte (s. Abb. 7).

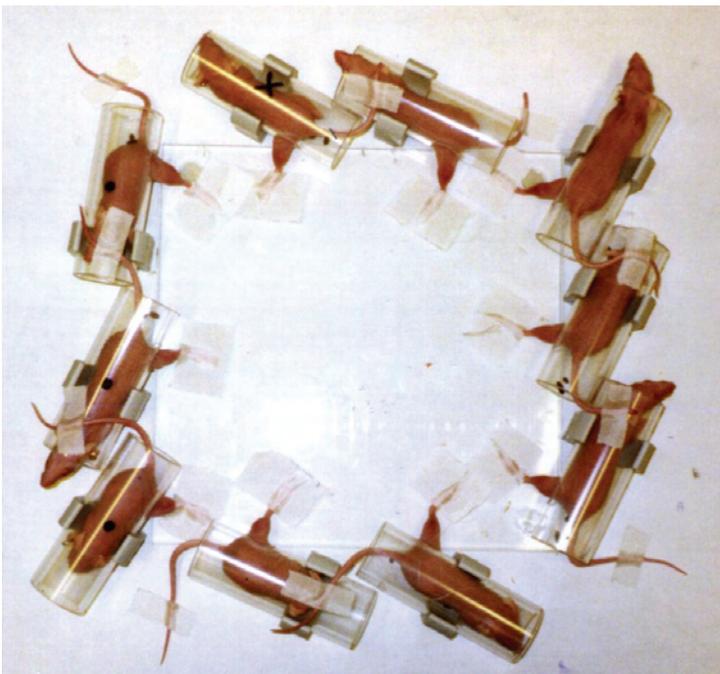


Abb. 7: Fixierung der Tiere zur Bestrahlung.

Die Tiere waren in den Plexiglas-Röhren derart immobilisiert, dass eine lokale Bestrahlung der Tumoren durchgeführt werden konnte. Durch eine seitliche runde Öffnung in den Röhren wurde das tumortragende Bein zur Plattenmitte hin mit einem ca. 3 cm langen Streifen Leukosilk (Baiersdorf AG, Hamburg) fixiert. Entsprechend wurde der Schwanz außerhalb des Bestrahlungsfeldes befestigt.

## 2.7 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden randomisiert den Versuchsgruppen der jeweiligen Versuchsreihe zugeteilt und entsprechend auf neue Käfige verteilt. Es wurden maximal sechs Mäuse in einem Käfig gehalten. Tiere, bei denen kein Tumor sichtbar gewachsen war, wurden aussortiert. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Gruppen der Versuchsreihen und die jeweils durchgeführten Behandlungen und Untersuchungen.

Tab. 4: Übersicht über die Behandlungsgruppen/-protokolle

Versuchsreihe	Tierzahl (n)	Gruppe/Behandlung	Dauer der AI-Behandlung
<b>A (PC3)</b>	8 je Gruppe	Kontrolle	Endostatin: 15 Tage SU5416: gesamter Beobachtungszeitraum
		Endostatin	
		SU5416	
		SU5416 + Endostatin	
<b>B (PC3)</b>	8 je Gruppe	Kontrolle	gesamter Beobachtungszeitraum
		SU5416	
		SU6668	
		SU5416 + SU6668	
	6 je Gruppe	RT	
		RT + SU5416	
		RT + SU6668	
		RT + SU5416 + SU6668	
<b>C (PC3)</b>	20	Kontrolle	gesamter Beobachtungszeitraum
	15	RT	
	8	S247	
	8	RT + S247	
<b>D (A431)</b>	10	Kontrolle	gesamter Beobachtungszeitraum
	8	RT	
	8	S247	
	8	RT + S247	

Erläuterung Tabelle 4:

PC3: Untersuchungen am PC3-Tumormodel A431: Untersuchungen am A431-Tumormodell

RT: fraktionierte Bestrahlung

SU5416, SU6668, S247, Endostatin: verabreichte Angiogenese-Inhibitoren (s. Abschnitt 2.5)

## **2.8 Sektion und Probengewinnung**

Im Untersuchungszeitraum wurde zu den in der jeweiligen Versuchsreihe angegebenen Zeitpunkten aus jeder Gruppe ein Tier zunächst mit CO<sub>2</sub> betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Das Tumorgewebe wurde zur weiteren histologischen bzw. immunhistochemischen Aufarbeitung entnommen. Dazu wurde der Tumor mit der darüber liegenden Haut sowie der Oberschenkelmuskulatur zusammenhängend entfernt. Der Oberschenkelknochen wurde i.d.R. herausgelöst. Eine Tumorthälfte wurde für die immunhistochemische Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff konserviert und bis zur endgültigen Aufarbeitung bei einer Temperatur von -80 °C aufbewahrt. Die zweite Hälfte wurde zur histologischen bzw. immunhistochemischen Aufarbeitung in einer 4 %-igen gepufferten Formaldehydlösung (Merck, Darmstadt) über Nacht fixiert.

Bei allen getöteten Tieren wurden Sektionen durchgeführt. Dabei konnten vereinzelt veränderte bzw. vergrößerte Lymphknoten festgestellt werden. Diese Tiere wurden zunächst als „Lymphknoten-positiv“ eingestuft. Die veränderten Lymphknoten sowie die Organe Lunge, Herz, Milz, Nieren und Leber der Lymphknoten-positiven Tiere wurden für die histologische Untersuchung auf Tumorzellinfiltration entnommen und asserviert.

Die Ergebnisse der Sektionen wurden protokolliert.

## **3 Gewebeaufarbeitung**

### **3.1 Paraffinhistologie**

Die Formalin-fixierten Gewebeproben wurden zwei Stunden in Wasser ausgewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (vollautomatisch, TISSUE-TEK®VIP; Miles Scientific, Etobicoke, Ontario, Canada). Die Entkalkung von Tumorgewebeproben, die mit kleinen Knochenanteilen des Femurs entnommen wurden, erfolgte zuvor durch Einstellen in 20 %-ige EDTA-Lösung für 24 Stunden.

EDTA-Lösung 20 %-ig:

- 200 g Na-EDTA
- 800 ml Aqua dest., unter ständigem Rühren erhitzen,
- ca. 50 ml NaOH (40 %) zugeben (bis pH 7,4)
- add 1 l Aqua dest.

Tab. 5: Protokoll Paraffineinbettung

1.	Isopropanol 70 %	2 x 25 min
2.	Isopropanol 80 %	25 min
3.	Isopropanol 90 %	25 min
4.	Isopropanol 96 %	2 x 25 min
5.	Isopropanol 100 %	2 x 20 min
6.	Xylol (Merck, Darmstadt)	2 x 20 min
7.	Paraffin (60 °C)	4 x 30 min
10.	Einblocken in Paraffin (60 °C)	

Der Paraffinblock wurde auf -20 °C abgekühlt. Mit dem Mikrotom (Modell 1140; Reichert-Jung, Wetzlar) wurden dann 2 µm dicke Schnitte angefertigt und zum Strecken direkt auf die Wasseroberfläche eines Paraffinstreckbades gegeben (37 °C; GFL, Burgwedel). Anschließend wurden sie mit einem Spatel auf Objektträger aufgezogen und 30 Minuten bei 60 °C getrocknet. Es folgte die Entparaffinierung der Schnitte nach folgendem Schema (Tab. 6).

Tab. 6: Entparaffinierungsschema

1.	Xylol	2 x 5 min
2.	Ethanol 100 %	2 x 2 min
3.	Ethanol 96 %	2 min
4.	Ethanol 70 %	2 min
5.	Aqua dest.	1 min

### 3.2 Kryostat-Mikrotomie

Bei dieser Methode wird die zum Schneiden des Gewebes notwendige Härtung durch Gefrieren der Präparate erzielt. Neben der schnellen Verarbeitung bei niedrigen Temperaturen liegt der Vorteil dieses Verfahrens in dem Verzicht auf vorherige Entwässerung und Einbettung und somit in der möglichst schonenden Gewebebehandlung unter Vermeidung von Schrumpfungartefakten sowie vor allem in einer optimalen Antigenitätserhaltung als Voraussetzung für die Immunhistochemie.

Direkt vor dem Schneiden wurden die tiefgefrorenen Gewebestücke auf einen Metallhalter mit Wasser in gewünschter Position festgefroren. Zur Anpassung an eine für das Schneiden optimale Objekt-Temperatur von ca. -20 °C wurde das Gewebe ca. 2 Stunden im Leica Kryostat CM 3050 S (Leica, Wetzlar) belassen. Es wurden dann 4 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Danach wurden sie 10 Minuten in Aceton fixiert.

#### 3.2.1 Vorbehandlung der Objektträger („Silanisierung“)

Zur ausreichenden Haftung der Schnitte wurden die Glasobjektträger Superfrost® (Menzel, Braunschweig) entsprechend dem in Tabelle 7 aufgeführten Schema entfettet, gereinigt und mit einer Silan-Lösung (APES; Sigma Aldrich, Steinheim) behandelt.

Tab. 7: Schema Silanisierung

1.	Chloroform 100 %	10 min
2.	Isopropanol 100 %	10 min
3.	5 ml 3-Aminopropyltriethoxy-Silan (Sigma, München) + 245 ml Aceton	10 min
4.	Spülen in Aceton	10 min
5.	Spülen in Aqua dest.	3 x 10 min
6.	Trocknen im Trockenschrank bei 37 °C	über Nacht

### 3.3 Histologische Färbemethoden

#### 3.3.1 Hematoxylin-Eosin-Färbung

Zur histomorphologischen Beurteilung der Gewebe wurden HE-Präparate angefertigt.

Die Färbung wurde nach dem in Tabelle 8 aufgeführten Schema durchgeführt.

Tab. 8: Schema Hematoxylin-Eosinfärbung

1.	Schnitte in Hematoxylin nach Mayer (Chroma, Münster) einstellen	8 min
2.	Abspülen mit Aqua dest.	3 s
3.	Eosin 2 % (Chroma, Münster)	3 min
4.	zum Bläuen unter Leitungswasser abspülen	10 min
5.	Abspülen mit Aqua dest.	3 s
6.	Ethanol 76 %	1 x eintauchen
7.	Ethanol 96 %	1 min
8.	Ethanol 100 %	1 min
9.	Xylol	2 x 5 min
10.	Eindecken der Schnitte mit Eukitt™ (Xylol-gelöster Kleber; Electron Microscopy Sciences, München)	

#### 3.3.2 PAS-Färbung

Die Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) ist ein histochemisches Verfahren zur Darstellung von Glycogen, Cerebrosiden, Glycoproteinen und Mucoproteinen. Zur besseren Kontrastierung wird zusätzlich mit Hematoxylin nach Mayer gegengefärbt. Ergänzend zur HE-Übersichtsfärbung wurden PAS-gefärbte Schnittpräparate der Tumoren und der Nieren angefertigt. Die Muzinbildung der Adenokarzinomzellen konnte mit der PAS-Reaktion dargestellt werden (Abb. 8).

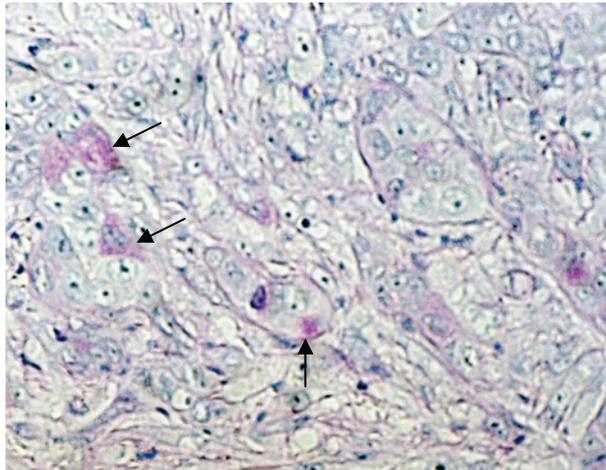


Abb. 8: Die für Adenokarzinomzellen typischen PAS-positiven Reaktionen (schwarze Pfeile) sind im Zytoplasma der PC3-Tumorzellen zu sehen.

Tab. 9: Protokoll PAS-Färbung

1.	Perjodsäurelösung 0,6 %-ig (nur 1 x verwendbar)	5 min
2.	Spülen mit Leitungswasser, dann mit Aqua dest.	
3.	SCHIFFsches Reagenz (Chroma, Münster)	10 min
4.	Spülen in Sulfitwasser	3 x 2 min
5.	Gegenfärben mit Hematoxylin nach Mayer	2 min
6.	Spülen mit VE-Wasser	2 min
7.	Spülen mit HCl-Alkohol	
8.	Wässerung mit fließendem Leitungswasser	15 min
9.	Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (s. Tab 8)	
10.	Eindecken der Schnitte mit Eukitt™	

#### Sulfitwasser

- 300 ml Aqua dest.
- 15 ml 1 N HCl
- 18 ml 10 %-ige wässrige Natriumdisulfit-Lösung (immer frisch zubereiten!)

#### HCl-Alkohol (0,5 %)

- 2 ml 25 % HCl
- 98 ml 70 % Alkohol

### 3.4 Immunhistochemische Färbemethoden

Mit Hilfe spezifischer, enzymgekoppelter Antikörper können die korrespondierenden antigenen Strukturen (Epitope) eines Gewebes nachgewiesen, identifiziert und gegebenenfalls quantifiziert werden.

pAkt und Ki67 wurden anhand von Paraffin-, CD31 anhand von Gefrierpräparaten dargestellt. Für die Färbungen wurde die sogenannte indirekte Biotin-Streptavidin-Amplified-Methode angewendet (B-SA; Testkit von Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien). Als Reagenz benötigt man einen Antigen-spezifischen Primärantikörper. Zudem ist ein Biotin-konjugierter Sekundärantikörper notwendig, der als „Brücke“ zwischen dem enzymgekoppelten Streptavidin und dem Primärantikörper fungiert. Über das Biotin des Sekundärantikörpers erfolgt die Bindung von Enzym-markiertem Streptavidin, wobei pro Sekundärantikörper mehrere Streptavidin-Enzym-Einheiten gebunden werden können. Das Enzym Peroxidase setzt ein Chromogen/Substrat um, welches an der Stelle des gesuchten Antigens präzipitiert und als Farbstoff (lichtmikroskopisch) sichtbar wird. Insgesamt kommt es zu einer zweifachen Amplifikation, was unter anderem die höhere Sensitivität dieser Methode im Vergleich zu anderen immunhistochemischen Färbemethoden bedingt.

Eine Vorbehandlung der Präparate mit 0,3 %-igem  $H_2O_2$  dient dabei zur Blockade der endogenen Peroxidase, die sich vor allem in Erythrozyten und Leukozyten befindet. Die Gegenfärbung wurde mit Hematoxylin nach Mayer durchgeführt. Nach Eindecken der Präparate wurden die Gewebeproben in lichtundurchlässigen Aufbewahrungsmappen im Kühlschrank bei 4 °C (Gefrierschnitte) bzw. Raumtemperatur (Paraffinpräparate) aufbewahrt.

#### Vorbereitung der Paraffinschnitte

Die Gewebe-Schnitte (2  $\mu$ m) wurden mit Xylol und Ethanol entparaffiniert (s. Tab. 6) und dann getrocknet.

Vor der Bearbeitung wurden die Schnitte im Dampfdrucktopf in Citratpuffer (10 mM, pH 6,0) für 4 Minuten auf 120 °C erhitzt. Anschließend wurden sie im Puffer für ca.

20 Minuten abgekühlt, mit VE-Wasser 5 Minuten gespült. Dadurch werden die durch die Formalin-Fixierung in ihrer räumlichen Struktur veränderten Proteine renaturiert.

Nach Lufttrocknung und Umrahmen mit einem Fettstift (PAP Pen; Dako Cytomations, Hamburg) erfolgte die Färbung der Schnitte in der feuchten Kammer gemäß dem nachfolgend aufgeführten Protokoll.

Tab. 10: Färbe-Protokoll der indirekten Biotin-Streptavidin-Amplified (B-SA)-Methode

1.	Beschichten mit PBS; danach absaugen	
2.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 0,3 %-ig	10 min
3.	Spülen mit PBS-Tween	5 x
4.	PBS-Tween	20 min
5.	Spülen mit PBS	
6.	Avidin D-Lösung (Blocking Kit; Vector Laboratories, Burlingame)	15 min
7.	Spülen mit PBS	
8.	Biotin-Lösung (Blocking Kit; Vector Laboratories, Burlingame)	15 min
9.	Spülen mit PBS	
10.	Primärantikörper, 100 µl, 1/25 in PBS-Tween, bei 37°C	2 h
11.	Spülen mit PBS	2 x 5 min
12.	Biotinylierter Sekundärantikörper 100 µl (bei RT) a) Ki67-Darstellung: goat anti-mouse-Ak, 1/125 in PBS-Tween b) CD31-Darstellung: goat anti-rat-Ak, 1/50 in PBS-Tween c) pAkt-Darstellung: anti-rabbit-Ak (Ser473)	a) 40 min b) 30 min c) 30 min
13.	Spülen mit PBS	3 x 5 min
14.	HRP (Horseradish-Peroxidase Streptavidin) in PBS, 1/200 (bei RT)	1 h
15.	PBS, danach absaugen	2 x 5 min
16.	angesetzte Substratlösung dazugeben	10 min
17.	Abspülen mit PBS, danach mit VE-Wasser spülen	
18.	Gegenfärben mit Hematoxylin nach Mayer	ca. 40 s
19.	Spülen unter fließendem Leitungswasser (Bläuen)	mind. 3 min
20.	Eindecken der Schnitte mit Immun-Mount (Thermo Shandon, Dreieich)	

AEC-Substratlösung (3-Amino-9-Ethylcarbazol 90 %; Sigma Aldrich, Steinheim):

- 4 mg 3-Amino-Ethylcarbazol in 500 ml Dimethylformamid lösen
- 2,1 ml 0,1 M Essigsäure mit 0,1 M Natriumacetat auf 10 ml auffüllen und mischen
- 500 µl davon verwerfen und das gelöste Aminoethyl-Carbazol hinzugeben und mischen
- die 10 ml Lösung filtrieren (Porenweite 0,45 µm, Schleicher und Schuell, Dassel), danach ist die Lösung klar und farblos
- Lösung lichtgeschützt aufbewahren; direkt vor der Färbung mit 5 µl 30 %-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzen

Substrat zur pAkt-Darstellung: NovaRed™ Substrat (Cell Signaling Technology, Beverly, Minnesota)

PBS-Tween:

- PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20 (Sigma Aldrich, Steinheim) supplementiert

Citrat-Puffer:

- 18 ml 0,1M Zitronensäure (Merck, Darmstadt)
- 82 ml 0,1M Natriumcitrat (Merck, Darmstadt)
- in 900 ml Aqua bidest. lösen, auf pH 6,0 einstellen

### **3.4.1 Ki67-Färbung**

Das Ki67-Antigen wird bevorzugt in den Phasen G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> und M des Zellzyklus im Zellkern exprimiert, nicht jedoch während der G<sub>0</sub>-Phase (KERNS et al. 1994). Es ist definiert durch seine Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper des Ki67-Klons. Als Primärantikörper wurde MIB-1 Maus-Antihuman Ki67-Antigen (Dako Cytomations, Hamburg) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen monoklonalen Maus-Antikörper in Form von gereinigtem IgG, vom Subtyp IgG1. Als Sekundärantikörper wurde ein gegen Maus gerichteter Antikörper verwendet (Vector Laboratories, Burlingame; s. Tab. 10).

### 3.4.2 CD31-Färbung

Für die Quantifizierung von Gefäßen in histologischen Tumorschnitten spielt die Detektion von endothelzellspezifischen Markermolekülen eine große Rolle. Es werden zwei Kategorien von endothelzellspezifischen Markermolekülen unterschieden: Die Panendothelzellmarker sind sowohl für ruhendes als auch für aktiviertes Endothel charakteristisch, während die Proliferationsmarker nur auf aktiviertem oder proliferierendem Endothel zu finden sind (HASAN et al. 2002). Die Panendothelzellmarker CD31 (PECAM-1), CD34 und von-Willebrand-Faktor (vWF) gehören zu den am besten untersuchten und am häufigsten verwendeten Markern in der Angiogeneseforschung (McDONALD u. CHOYKE 2003).

In dieser Arbeit wurde als Primärantikörper der monoklonale Antikörper gegen das PECAM-1-Antigen (Santa Cruz, Kalifornien) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen monoklonalen Ratte-Antikörper in Form von gereinigtem IgG vom Subtyp IgG2a. Dieser reagiert mit einem Glykoprotein 129/Sv der Maus-Endotheliom-Zelllinie tEnd.1. PECAM-1 gehört der Immunglobulin-Gen-Superfamilie an. Es handelt sich um ein 130 kDa-Membranprotein und ist auf allen Endothelzellen und v.a. an deren interzellulären Verbindungen vorhanden. Ebenso wird es von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, hämatopoetischen Stammzellen, Zellen der myeloischen Reihe und einer Subpopulation der Lymphozyten exprimiert (BERMAN et al. 1996, WATT et al. 1995). Entsprechend des bei dieser Färbung verwendeten Primärantikörpers wurde ein gegen Ratte gerichteter Sekundärantikörper (Vector Laboratories, Burlingame; s. Tab. 10) verwendet.

### 3.4.3 Phosphorylierte Akt (pAkt)

Bei Akt (auch Proteinkinase B oder Rac) handelt es sich um eine Serin-Threonin-Kinase mit doppelter Spezifität zu ihren Substraten Serin und Threonin. Sie wird u.a. durch Phosphorylierung am C-terminalen Ende an Ser473 aktiviert (pAKT). Als Primärantikörper zur Darstellung von pAkt diente ein monoklonaler rabbit anti-phospho-Akt (Ser473) Antikörper (IHC Specific; Cell Signaling Technology, Beverly, Minnesota). Entsprechend wurde ein gegen Kaninchen gerichteter Sekundärantikörper (Cell Signaling Technology, Beverly; s. Tab. 10) verwendet.

#### **3.4.4 Positiv-/Negativkontrollen**

Als Positivkontrollen für die CD31-Färbungen wurde die Gefäßdarstellung in Muskel- und umliegendem Gewebe kontrolliert. Als Positivkontrollen der pAkt-Färbungen dienten Karzinom-Präparate, die aktiviertes Akt aufwiesen. Als weitere Kontrollen dienten histologische Schnitte, welche ohne Primärantikörper, unter ansonsten gleichen Bedingungen, inkubiert wurden.

#### **3.5 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase nick end labeling)**

Apoptose, der programmierte Zelltod, kann durch eine Vielzahl von Noxen sowie über mehrere Rezeptorkaskaden induziert werden. Alle Apoptose-Induktionswege münden jedoch in der gleichen Endstrecke, die sich morphologisch als Kondensation und Fragmentation des Zellkerns darstellt und biochemisch mit der Spaltung von Chromatin durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Endonukleasen einhergeht. Diese Chromatin-Spaltung führt zunächst zu größeren (50 - 300 Kilobasen) und schließlich zu kleineren (180 - 200 Basenpaare) Fragmenten. Es können sowohl doppelsträngige nieder-molekulare DNA-Fragmente als auch Einzelstrangbrüche (nicks) in hochmolekularer DNA auftreten. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphat [dUTP] nick end-labeling) ist eine Technik zum Nachweis von Apoptosen in Gewebeschnitten. Dabei ermöglicht eine terminale Desoxynucleotidyltransferase die Markierung freier DNA-Strangbrüche mittels markierter dUTP-Moleküle.

Die Vorbereitung der Paraffinschnitte erfolgte wie unter 3.4 beschrieben (Entparaffinieren, Erhitzen im Dampfdrucktopf und Spülen). Nach Lufttrocknung und Umrahmen mit einem Fettstift erfolgte die Färbung der Schnitte in der feuchten Kammer gemäß dem nachfolgend aufgeführten Protokoll.

Tab. 11: Protokoll der TUNEL-Färbung

1.	50 µl TUNEL Reaktionsmischung (45 µl TUNEL-Label und 5 µl TUNEL-Enzym; In Situ Cell Death Detection Kit; Roche Diagnostics, Mannheim)	1 h (bei 37 °C, im Dunkeln)
2.	Spülen mit PBS	3 x 5 min
3.	mit 50 µl Converter-POD bedecken (Anti-Fluoreszein Antikörper gekoppelt mit Horseradish-Peroxidase, zur Signalkonversation), Abdecken mit Parafilm	30 min (bei 37 °C)
4.	Spülen mit PBS	3 x
5.	100 µl angesetzte AEC-Substratlösung (s. unter 3.4) dazugeben	10 min (bei 15–25 °C)
6.	Spülen mit PBS	3 x
7.	Gegenfärben mit Hematoxylin nach Mayer	ca. 40 s
8.	Spülen unter fließendem Leitungswasser (Bläuen)	mind. 3 min
9.	Eindecken der Schnitte mit Immun-Mount	

Für Positivkontrollen wurden die Schnitte vor der Zugabe der TUNEL-Reaktionsmischung für 10 Minuten bei 25 °C mit DNase I, grade I inkubiert (Roche Diagnostics, Mannheim; 100 U/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA). Weitere Kontrollen wurden nur mit 50 µl TUNEL-Label (ohne terminale Transferase) bedeckt.

#### 4 Mikroskopische Beurteilung

Für die histologischen bzw. immunhistochemischen Untersuchungen wurden folgende Mikroskope verwendet:

- Nikon Diaphot, Type114, Inverses Mikroskop (Nikon, Tokyo, Japan)
- Leica, DM-RB E (Leica, Wetzlar)

Die Präparate wurden lichtmikroskopisch zunächst hinsichtlich ihrer Auswertbarkeit unter dem Mikroskop überprüft. Als nicht verwertbar wurden Präparate mit zu wenig Tumormasse, verblasster Färbung oder zu vielen Artefakten durch Faltenbildung oder Gewebequetschung angesprochen. Sämtliche Präparate wurden ohne Kenntnis ihrer Zugehörigkeit zu einer bestimmten Behandlungsgruppe ausgewertet. Die Auswahl der Zählfelder der quantitativen Untersuchungen (Abschnitte 4.3 und 4.4)

erfolgte zufällig und unter Ausschluss nekrotischer Areale. Die Ergebnisse wurden protokolliert.

## **4.1 HE- und PAS-Präparate**

### **4.1.1 Organe und Lymphknoten**

Die Präparate der Lymphknoten und Organe (Lunge, Herz, Milz, Nieren und Leber) wurden histologisch auf Tumorzellinfiltrationen untersucht.

### **4.1.2 Tumoren**

Die Tumorgewebe wurden qualitativ anhand der HE- und PAS-gefärbten Präparate nach folgenden Gesichtspunkten beurteilt:

1. Sicherung der histologischen bzw. klinischen Diagnose sowie Beschreibung der vorherrschenden Strukturen
2. PC3-Tumoren der Versuchsreihen A bis C: Ausprägung der nekrotischen Areale, Verminderung der Tumorzellen im Anschnitt, Zunahme von Bindegewebs-Strukturen, Auftreten von Apoptosen, Entzündungszellen und extravasal liegenden Erythrozyten.

Die Ausprägung der in Punkt 2 aufgeführten Strukturen wurde mit 0 - 3 bewertet [0: unverändert; 1: geringgradig; 2: mäßig; 3: hochgradig]. Die Beurteilung ist in tabellarischer Form im Ergebnisteil aufgeführt. Repräsentative Ausschnitte dazu sind exemplarisch bei den verschiedenen Versuchsreihen abgebildet.

## **4.2 Phosphorylierte Akt (pAkt) und TUNEL**

Die immunhistochemisch pAkt-gefärbten A431-Tumorpräparate wurden hinsichtlich des Vorkommens von pAkt-positiven Reaktionen in den Endothelzellen qualitativ untersucht. In den TUNEL-gefärbten Schnitten wurde das Vorkommen von TUNEL-positiven Endothelzellen qualitativ bewertet.

### **4.3 CD31-Gefäßdarstellung**

Die Bestimmung der Gefäßdichte ist die am weitesten verbreitete Methode, die Gefäßversorgung in histologischen Präparaten von Tumoren zu analysieren (WEIDNER et al. 1991). Die Gefäßdichte drückt die Anzahl der Gefäße pro Tumorfläche ( $\text{mm}^2$ ) aus. Im englischen Sprachgebrauch wird meistens der Begriff Mikrogefäßdichte (microvessel density, MVD) verwendet, da Kapillaren, Venolen und Arteriolen mit Abstand den größten Teil der MVD eines Gewebes ausmachen. Soweit nicht ausdrücklich von „Lymphgefäßdichte“ (lymphatic microvessel density) gesprochen wird, handelt es sich bei der MVD um Blutgefäßdichten. Es gibt eine Vielzahl etablierter Verfahren, die immunhistochemisch hervorgehobenen Gefäße in einem Tumorschnitt zu quantifizieren. Für diese Untersuchungen wurde die manuelle quantitative Bestimmung verwendet. Dabei soll der Begriff „manuell“ ausdrücken, dass die Gefäßzählung nicht mit Hilfsmitteln wie dem Computer oder der Zähl-schablone erfolgte (VERMEULEN et al. 1996).

Die heute übliche manuelle Gefäßzählung geht auf WEIDNER und Kollegen zurück. Je Tumor wurden anhand CD31-gefärbter Schnittpräparate 10 Gesichtsfelder lichtmikroskopisch bei 200-facher Vergrößerung ausgezählt. Jede CD31-positiv (rötlich-braun) gefärbte Endothelzelle oder Endothelzell-Gruppe, die sichtbar durch immunhistochemisch nicht gefärbtes Tumorgewebe getrennt von angrenzenden Mikrogefäßen war, wurde als einzelnes, zählbares Mikrogefäß betrachtet. Das Gefäßlumen war zur Identifikation nicht notwendig (modifiziert nach WEIDNER et al. 1991).

### **4.4 Tumorzellproliferation**

Der Anteil der proliferierenden Tumorzellen wurde anhand Ki67-gefärbter Schnittpräparate der Tumorgewebe ermittelt. Dazu wurden lichtmikroskopisch mindestens 10 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt und je Gesichtsfeld bis zu 250 Zellkerne erfasst. Die Anzahl der rot gefärbten Kerne wurde ermittelt. Dadurch bestand die Möglichkeit, eine Menge an Ki67-positiven Kernen zu erfassen und mit einer bestimmten Menge an Tumorzellkernen im Tumorgewebe ins Verhältnis zu setzen. Dies hat den Vorteil, dass der ermittelte Wert unabhängig von

dem jeweils im Gesichtsfeld des Mikroskops vorherrschenden Tumor-Stroma-Verhältnis ist. Bei der Ki67-Färbung ist zu beachten, dass alle Phasen außer  $G_0$  positiv reagieren und auch gering rot angefärbte Bereiche im Zellkern Zeichen für sich in Zellteilungsphasen befindliche Zellen darstellen. Daher wurde, unabhängig von der Intensität der Anfärbung, jeder rot gefärbte Zellkern als positiv betrachtet.

## **5 Photodokumentation**

### **5.1 Makroskopie**

Zur Photo-Dokumentation des subkutanen Tumorwachstums und der Veränderungen von Lymphknoten bzw. Organen wurden Aufnahmen mit einer Digitalkamera (Nikon D70; Nikon, Tokyo, Japan) angefertigt.

### **5.2 Histologie und Immunhistochemie**

Mit einer auf dem Mikroskop angebrachten Digitalkamera (Super Coolscan ED 4000; Nikon, Tokyo, Japan) und einem daran angeschlossenen PC wurden die lichtmikroskopischen Sehfelder auf einen Computermonitor übertragen und mit dem digitalen Bildanalysesystem Leica QWin (Leica) betrachtet. Bilder wurden in 100- bis 400-facher Vergrößerung zur Dokumentation digital gespeichert.

## **6 Statistische Bearbeitung und Darstellung der Ergebnisse**

Die gesamten für diese Arbeit ermittelten Daten wurden für die weitere Auswertung mit dem Auswertungsprogramm Origin<sup>TM</sup> (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts) erfasst. Die Berechnungen wurden mit dem Computer-Programm Statistica 5.0 durchgeführt (StatSoft, Hamburg). Für den Mittelwert-Vergleich nicht-normalverteilter Variablen wurden der Wilcoxon Rang-Test (paarweiser Vergleich) oder der Kruskal-Wallis ANOVA (multipler Vergleich) mit anschließendem Tukey Test verwendet (Tumorgrößenmessungen). Für näherungsweise normalverteilte Variablen wurden einfaktorielle ANOVA-Varianzanalysen verwendet. Alle Analysen waren zweiseitig. In allen Fällen galt ein Ergebnis mit einer Überschreitungs-

wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als signifikant. Als Signifikanzniveau wurde durchgehend  $\alpha = 0,05$  verwendet.

Um den Einfluss der durchgeführten Behandlungen auf das Tumorwachstum zu ermitteln, wurden zunächst die Tumolvolumina der verschiedenen Gruppen an festgelegten Messzeitpunkten mit nicht-parametrischen Rangtests miteinander verglichen. Zur graphischen Darstellung der Wachstumsverläufe (Origin™) wurden gruppenweise die Mittelwerte und Standardfehler (MW  $\pm$  SEM) der normierten Tumolvolumina an den verschiedenen Messzeitpunkten zusammengefasst und die Mittelwerte verbunden.

Als zusätzliches Maß für eine Erfassung der Wachstumsverzögerung wurden für die einzelnen Tumoren Wachstumszeiten in Tagen ( $T_n$ ) berechnet, welche diese bis zum Erreichen eines jeweils definierten  $n$ -fachen ihres Ausgangsvolumens am Tag des Behandlungsbeginns (Tag 0) benötigten. Dies erfolgte mit einer Näherung durch Berechnung einer quadratischen Regressionskurve zwischen den gemessenen Werten (sog. linear-quadratisches Modell). Für die statistischen Vergleiche wurden jeweils der Kruskal-Wallis ANOVA mit anschließendem Tukey Test verwendet. Die Ergebnisse wurden gruppenweise als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (MW  $\pm$  SEM) in Balkendiagrammen dargestellt.

Aus den in jeweils 10 Sehfeldern je Tumor ermittelten Anteilen Ki67-positiver Zellkerne wurden der arithmetrische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Das arithmetrische Mittel wurde als Tumorzellproliferationsrate (Angabe in %) des Tumors zitiert. Entsprechend wurden aus in jeweils 10 Sehfeldern je Tumor ermittelten Werten CD31-positiver Endothelzellen bzw. Endothelzellgruppen der arithmetrische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Das arithmetrische Mittel wurde als Mikrogefäßdichte (CD31<sup>+</sup> / Sehfeld) des Tumors zitiert (BOSARI et al. 1992). Der statistische Vergleich erfolgte jeweils durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und einem nachfolgenden post-hoc-Vergleich mit dem Fisher's least-significant difference (LSD) - Test. Die Ergebnisse mit Angabe der Überschreitungswahrscheinlichkeit sind in den einzelnen Versuchsreihen in Balkendiagrammen aufgeführt.

## **IV Ergebnisse**

In den Versuchsabschnitten wurde der Tag des Therapiebeginns jeweils als Tag 0 definiert. Die Angaben der Zeitpunkte (z.B. Tag 10) sind als Tage nach Beginn der Behandlung zu verstehen.

### **1 Kombinierte Therapie mit dem VEGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor SU5416 und Endostatin (Versuchsreihe A)**

In diesem Teil der Experimente wurde der Einfluss einer Behandlung mit dem VEGF-Rezeptor-2-Inhibitor SU5416, Endostatin sowie der kombinierten Behandlung mit SU5416 und Endostatin auf das Wachstumsverhalten von PC3-Tumoren untersucht. An Tag 10 und am Ende des Beobachtungszeitraums wurden Tumorgewebe zur histologischen bzw. immunhistochemischen Untersuchung entnommen.

#### **1.1 Tumorwachstum**

Der Vergleich der Tumorumfängen am Tag 41 (Endpunkt der Kontrollgruppe) ergab, dass die Tumorumfänge sämtlicher Behandlungsgruppen verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant kleiner waren. Zudem wurden signifikant geringere Tumorumfänge bei der kombiniert behandelten Gruppe verglichen mit den Monotherapie-Gruppen ermittelt ( $p < 0,01$ ).

In Abbildung 9 sind die Tumorwachstumskurven der Gruppen dieser Versuchsreihe dargestellt.

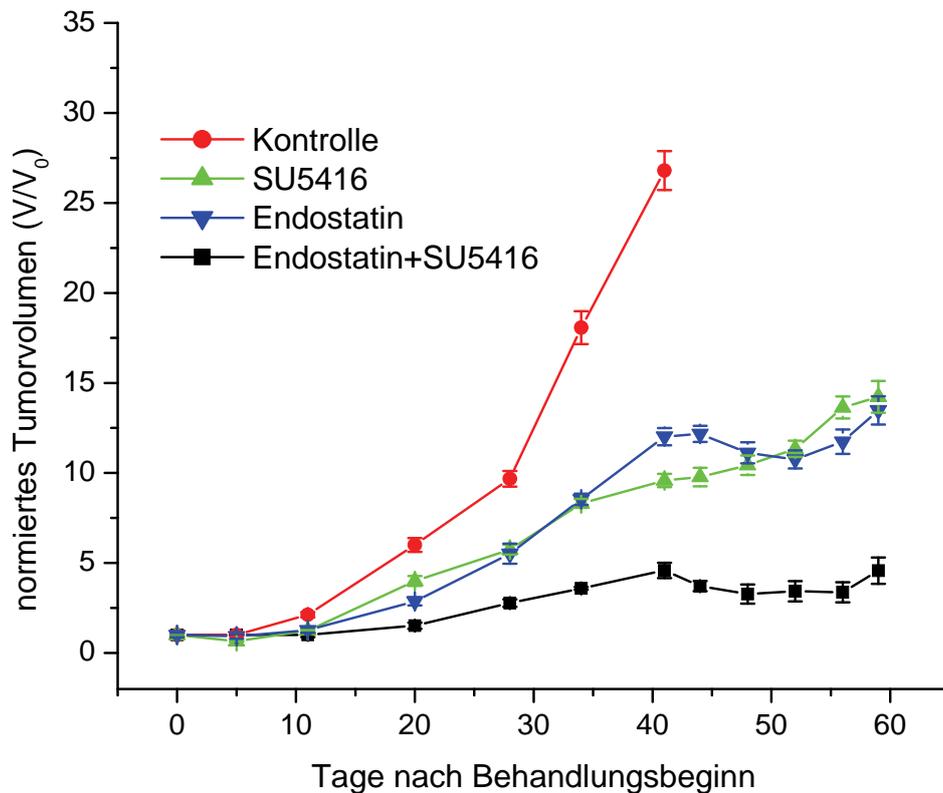


Abb. 9: Wachstumskurven der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden PC3-Tumoren nach Behandlung mit Endostatin, SU5416 und kombiniert mit SU5416 und Endostatin (Gruppengröße jeweils  $n = 8$ ). Die Datenpunkte repräsentieren jeweils das mittlere Tumorstadium  $V$  normiert auf das Ausgangsvolumen  $V_0 \pm \text{SEM}$ .

## 1.2 Wachstumsverzögerung

Des Weiteren wurde aus den Wachstumsdaten die Wachstumszeit  $T_4$  durch lineare Interpolation in Tagen berechnet, d.h. die Zeit, welche die Tumoren der jeweiligen Gruppe benötigten, um das vierfache des Ausgangsvolumens zu Beginn der Behandlung zu erreichen. Die Differenz von  $T_4$  der einzelnen Behandlungsgruppen zu  $T_4$  der Kontrollgruppe wurde als Wachstumsverzögerung angegeben. In Abbildung 10 sind die berechneten Wachstumszeiten, Wachstumsverzögerungen und Signifikanzniveaus des statistischen Vergleichs dargestellt.

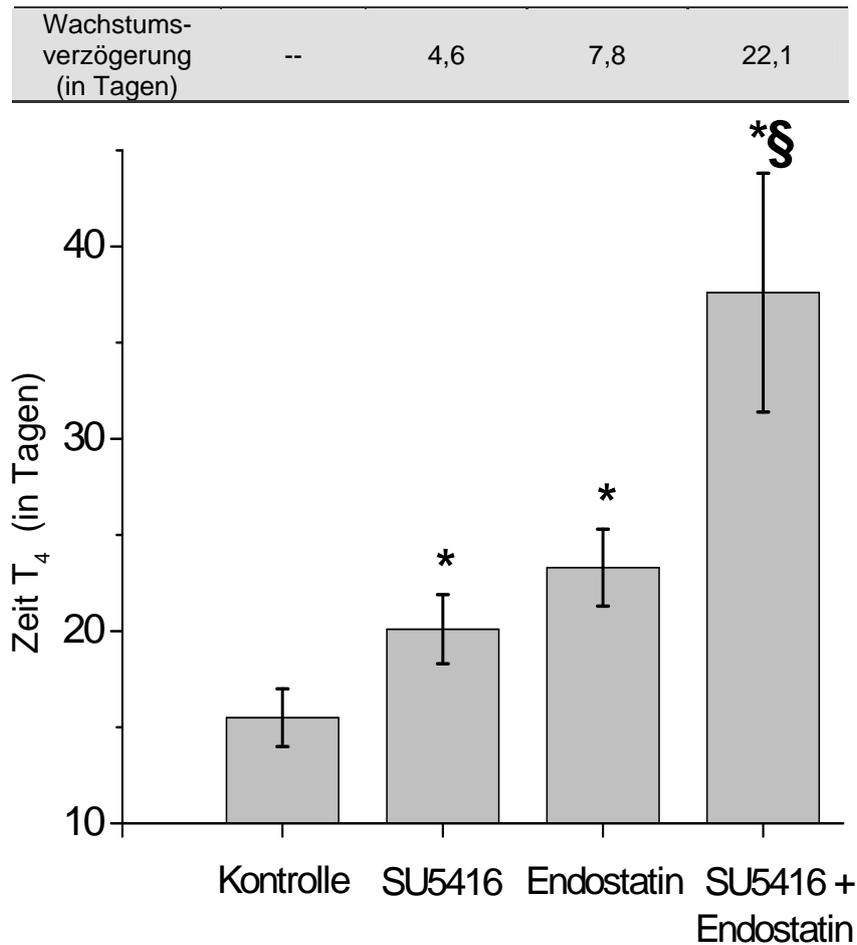


Abb. 10: Tumorstadiumszeiten  $T_4$  und Wachstumsverzögerungen innerhalb der PC3-Behandlungsgruppen der Versuchsreihe A.

Die Balken repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: \*  $p < 0,01$  vs. Kontrolle, §  $p < 0,05$  vs. antiangiogene Monotherapien. Die Wachstumsverzögerung stellt die Differenz der Zeiten  $T_4$  (Mittelwerte) zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe dar.

Bei einem Tier der Kombinationsgruppe (SU5416 + Endostatin) kam es zu einer dauerhaften Rückbildung des Tumors. Insgesamt waren sieben der mit SU5416 behandelten Tiere am Ende der Beobachtungszeit (Tag 59) hochgradig abgemagert.

### 1.3 Vergleichende Tumorhistologie

Die Tumorgewebe wurden anhand von HE-Präparaten histologisch untersucht. Die Ergebnisse der qualitativen Untersuchung der am Tag 10 und am Ende der Beobachtungen entnommenen Tumorgewebe sind in den Tabellen 12 und 13 aufgeführt.

Tab. 12: Qualitative Untersuchung der PC3-Histologien (HE) der am Tag 10 entnommenen Tumorgewebe der Versuchsreihe A.

Die Ausprägung folgender Strukturen wurde jeweils mit 0 (keine) bis 3 (hochgradig) bewertet: (a) Ausprägung nekrotischer Areale, (b) Zunahme der Bindegewebs-Strukturen, (c) Verminderung der Tumorzellen, (d) Auftreten von Tumorzell-Apoptosen (apoptotic bodies), (e) Entzündungszellen (EZ) und (f) extravasal liegender Erythrozyten. Nekrotische Areale blieben bei b bis f unberücksichtigt.

Gruppe	Nekrotische Areale (a)	Bindegewebs-zubildung (b)	Tumorzell-verminderung (c)	apoptotic bodies (d)	EZ (e)	extravasale Erythrozyten (f)
Kontrolle	0	0	0	1	1	0
SU5416	2	2	2	3	3	1
Endostatin	2	1	1	2	2	0
SU5416 + Endostatin	2	2	2	2	2	1

Tab. 13: Qualitative Untersuchung der PC3-Histologien (HE) der am Beobachtungsende untersuchten Tumorgewebe der Versuchsreihe A.

Die Bewertung erfolgte wie bereits zuvor in Tabelle 12 beschrieben wurde, wobei d - f wegen zahlreicher nekrotischer Bereiche in den Anschnitten nicht bewertet wurden (n.b.).

Gruppe	Nekrotische Areale (a)	Bindegewebs-zubildung (b)	Tumorzell-verminderung (c)	apoptotic bodies (d)	EZ (e)	extravasale Erythrozyten (f)
Kontrolle (Tag 41)	2	0	0	n.b.	n.b.	n.b.
SU5416 (Tag 59)	2	3	3	n.b.	n.b.	n.b.
Endostatin (Tag 59)	2	2	2	n.b.	n.b.	n.b.
SU5416 + Endostatin (Tag 59)	3	3	3	n.b.	n.b.	n.b.

Verglichen mit dem Kontrolltumor zeigten die Tumoren der behandelten Tiere grundlegende Unterschiede. Abbildungen 11 und 12 zeigen exemplarisch repräsentative Ausschnitte der Tumorhistologien der Versuchsreihe.

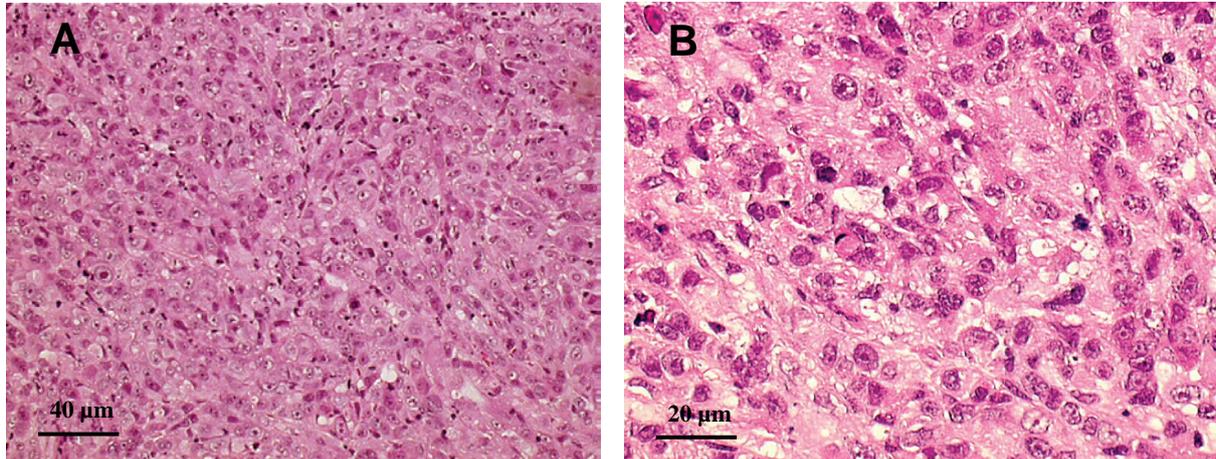


Abb. 11: Repräsentative histologische Ausschnitte der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden PC3-Tumoren der Kontrollgruppe der Versuchsreihe A am Tag 10 [(A,B) HE-Färbung].

Es zeigen sich histologisch wenig differenzierte epitheliale Tumorzellen, deren Zellkerne hyperchromatisch gefärbt sind (Kernbasophilie). Die Zellen weisen ein stark kohäsives Wachstumsmuster auf. Auffallend ist die hohe Kern-Plasma-Relation, der hochgradige Kernpolymorphismus, prominente Nukleolen sowie das überwiegend eosinophil gefärbte Zytoplasma. Eine hohe mitotische Aktivität ist anhand zahlreicher Mitosefiguren zu erkennen. Am Ende des Beobachtungszeitraums (Tag 41, nicht abgebildet) waren neben entsprechenden Bereichen „intakten“ Tumorgewebes ausgeprägte Nekrosen zu sehen.

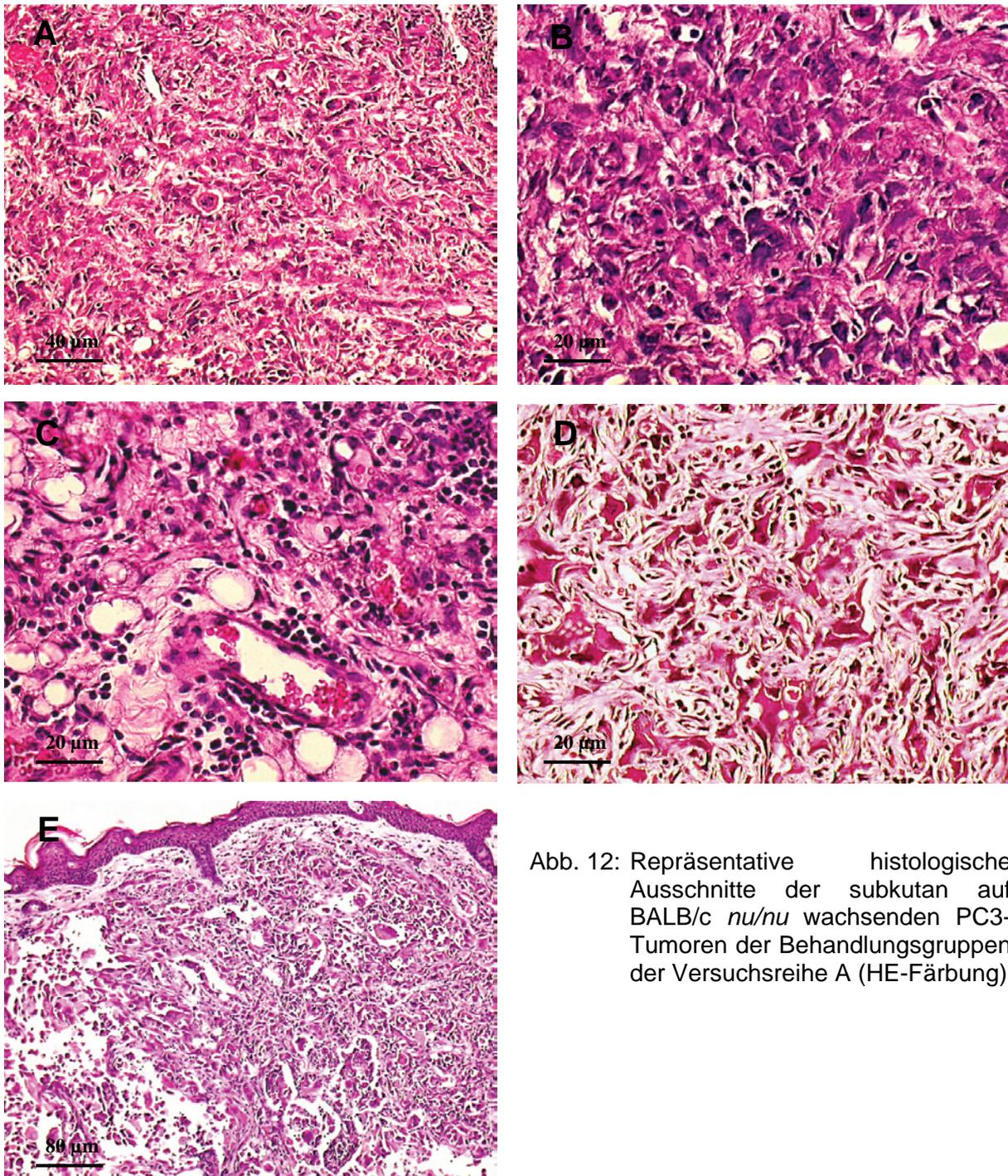


Abb. 12: Repräsentative histologische Ausschnitte der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden PC3-Tumoren der Behandlungsgruppen der Versuchsreihe A (HE-Färbung)

Tag 10 (A - C): A und B zeigen Gewebe der Gruppe Endostatin. Die Zahl der Tumorzellen im Anschnitt ist deutlich reduziert. Zwischenzelluläre (Bindegewebs-) Strukturen mit Entzündungszellen und Fibrozyten sind zu sehen. C zeigt einen Ausschnitt der Kombinationsgruppe mit mehreren Gefäßanschnitten und zahlreichen Entzündungszellen im Gewebe.

Tag 59 (D, E): Bei den am Ende des Beobachtungszeitraums untersuchten Tumorgeweben der Behandlungsgruppen fielen neben extensiven Nekrosen (E, linker und unterer Bildbereich, Gruppe SU5416) die dominierenden Bindegewebsstrukturen der Tumorstromata auf, insbesondere bei der mit SU5416 und kombiniert behandelten Gruppe (D). Tumorzellen waren hier nur noch vereinzelt bzw. in kleinen „Zellinseln“ angeordnet vorhanden.

## 1.4 Tumorzellproliferation

Von den am Tag 10 entnommenen Tumoren wurden zur Darstellung der sich in Teilungsphasen befindenden Tumorzellen immunhistochemisch Ki67-gefärbte Gewebeschnitte angefertigt. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse sind in Abbildung 13 dargestellt.

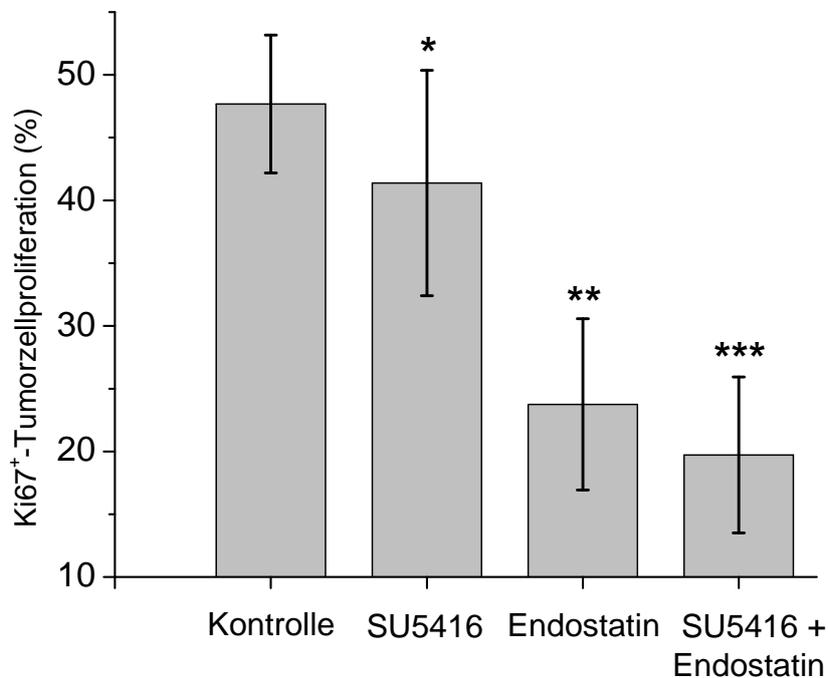


Abb. 13: Quantitative Analyse der Ki67-Immunhistochemie der Gruppen der Versuchsreihe A am Tag 10.

Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der in den Zählfeldern ermittelten Proliferationsraten je Tumor ( $\pm$  SD). Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: \*  $p < 0,01$  vs. Kontrolle; \*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrolle; \*\*\*  $p < 0,05$  vs. antiangiogene Monotherapien und  $p < 0,001$  vs. Kontrolle.

Abbildung 14 zeigt exemplarisch repräsentative Ausschnitte der Ki67-Immunhistochemie der Behandlungsgruppen.

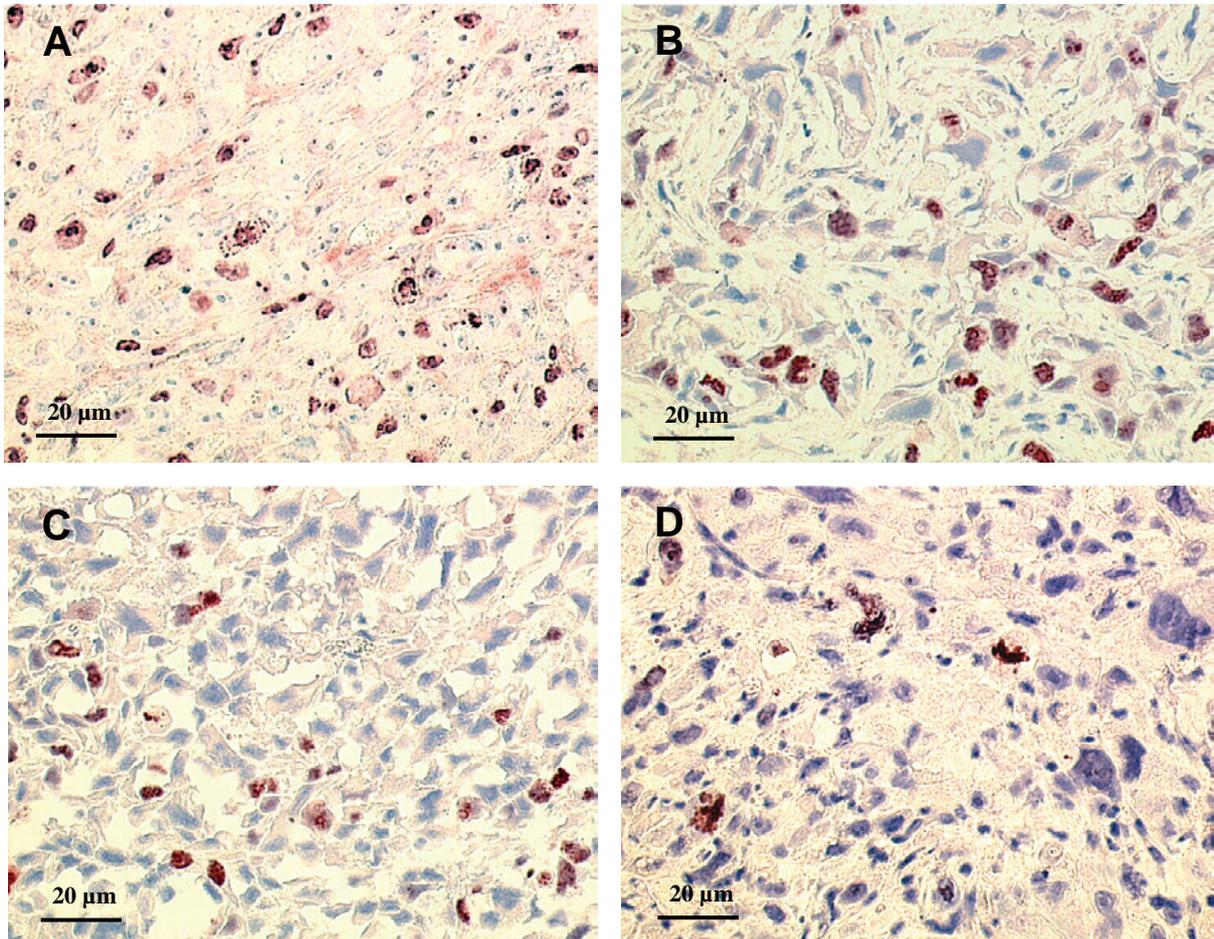


Abb. 14: Repräsentative Ausschnitte immunhistochemisch Ki67-gefärbter Gewebe der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden PC3-Tumoren der Gruppen der Versuchsreihe A am Tag 10. Zellkerne in Zellteilungsphasen sind rot gefärbt.

- A Kontrolltumor
- B SU5416
- C Endostatin
- D Endostatin + SU5416

## 2 Therapie mit VEGFR2- und PDGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren und $^{60}\text{Co}$ -Bestrahlung (Versuchsreihe B)

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss der Therapie mit dem VEGF-Rezeptor-2-Inhibitor SU5416, dem PDGF-Rezeptor- $\beta$ -Inhibitor SU6668 bzw. der kombinierten Behandlung mit SU5416 und SU6668 alleine sowie jeweils in Kombination mit einer lokalen fraktionierten Strahlenbehandlung (Radiotherapie, RT) zu Beginn der antiangiogenen Therapie auf das Wachstumsverhalten von PC3-Tumoren untersucht. Für die histologischen bzw. immunhistochemischen Untersuchungen wurden an den Tagen 24 und 50 Tumoren aus jeder Gruppe entnommen.

### 2.1 Tumorwachstum

#### 2.1.1 Vergleich der kombinierten Behandlung mit SU5416 und SU6668

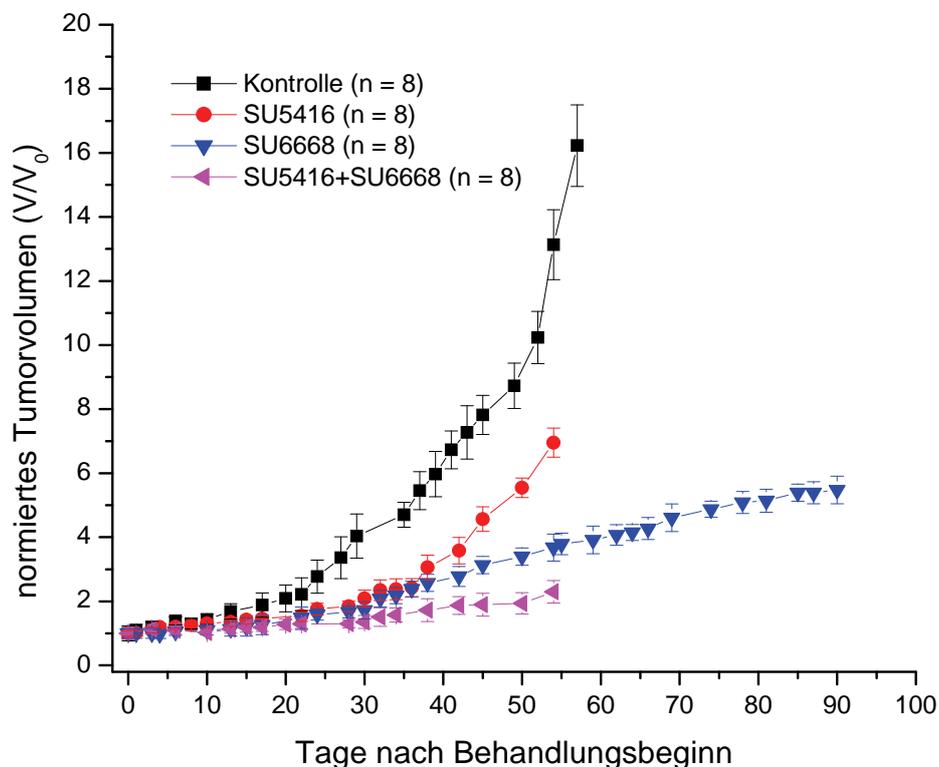


Abb. 15: Wachstumskurven der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden PC3-Tumoren nach Behandlung mit SU5416, SU6668 und deren Kombination. Die Datenpunkte repräsentieren jeweils das mittlere Tumolvolumen  $V$  der Behandlungsgruppen normiert auf das Ausgangsvolumen  $V_0 \pm \text{SEM}$ .

Der Vergleich der Tumorumfänge am Tag 50 ergab, dass die Tumorumfänge sämtlicher Behandlungsgruppen verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant kleiner waren ( $p < 0,05$ ). Zudem wurden signifikant geringere Tumorumfänge bei der kombiniert behandelten Gruppe SU5416 + RT verglichen mit den Monotherapie-Gruppen (Gruppe SU5416 und Gruppe RT) ermittelt ( $p < 0,05$ ).

### 2.1.2 Vergleich der Behandlung mit SU5416 und $^{60}\text{Co}$ -Bestrahlung

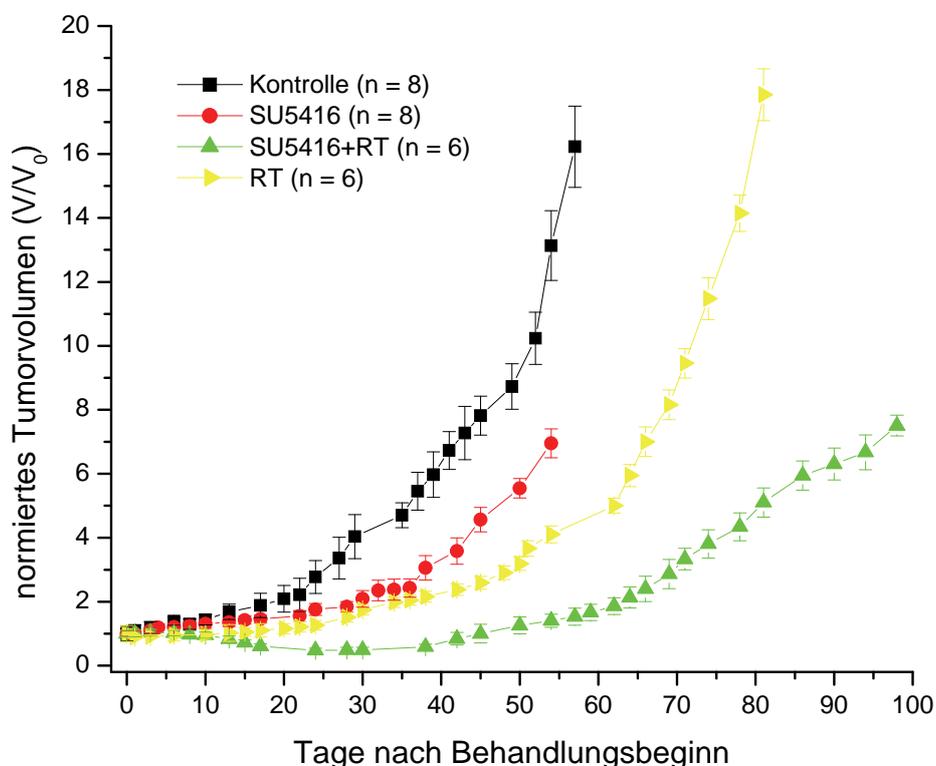


Abb. 16: Wachstumskurven der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden PC3-Tumoren nach Behandlung mit SU5416, Bestrahlung (RT) und deren Kombination. Die Datenpunkte repräsentieren jeweils das mittlere Tumorumfang  $V$  der Behandlungsgruppen normiert auf das Ausgangsvolumen  $V_0 \pm \text{SEM}$ .

Der Vergleich der Tumorumfänge am Tag 50 ergab, dass die Tumorumfänge sämtlicher Behandlungsgruppen (Gruppe SU5416, Gruppe RT und Gruppe SU5416 + RT) verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant kleiner waren. Zudem wurden signifikant verringerte Tumorumfänge bei der kombiniert behandelten Gruppe verglichen mit den Monotherapie-Gruppen (Gruppe SU5416 und Gruppe RT) ermittelt ( $p < 0,05$ ).

### 2.1.3 Vergleich der Behandlung mit SU6668 und $^{60}\text{Co}$ -Bestrahlung

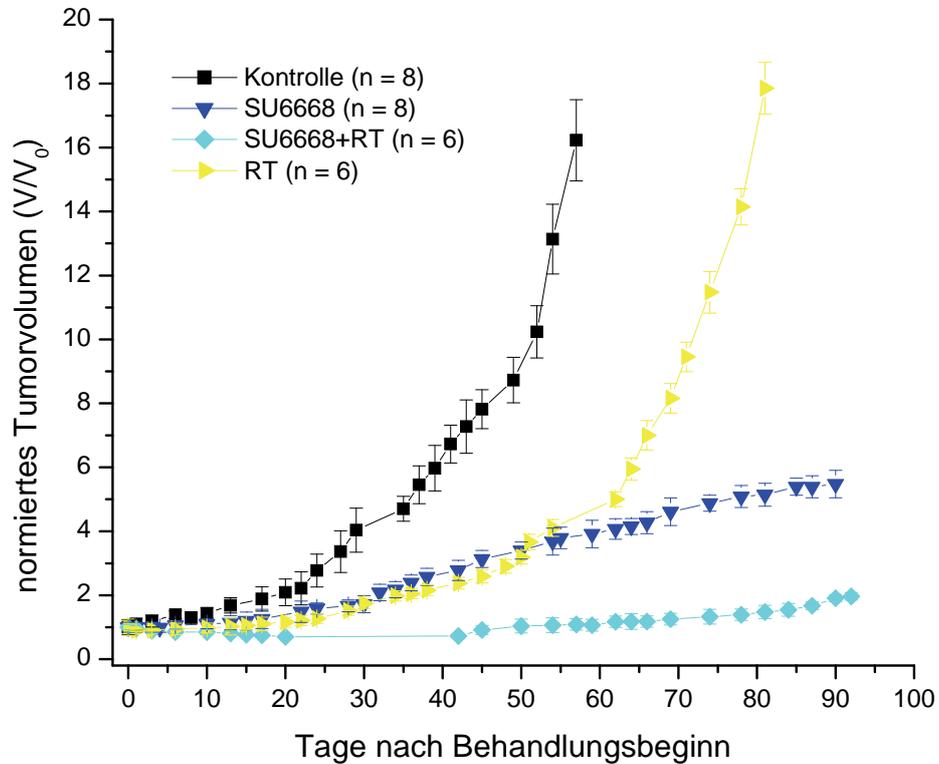


Abb. 17: Wachstumskurven der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden PC3-Tumoren nach Behandlung mit SU6668, Bestrahlung (RT) und deren Kombination. Die Datenpunkte repräsentieren jeweils das mittlere Tumorstadium  $V$  der Behandlungsgruppen normiert auf das Ausgangsvolumen  $V_0 \pm \text{SEM}$ .

Der Vergleich der Tumorstadien am Tag 50 ergab, dass sämtliche Behandlungsgruppen verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant kleinere Tumorstadien aufwiesen ( $p < 0,05$ ). Zudem wurden signifikant geringere Tumorstadien bei der kombinierten behandelten Gruppe RT + SU6668 verglichen mit den Monotherapie-Gruppen (Gruppe RT und Gruppe RT + SU6668) ermittelt ( $p < 0,05$ ).

### 2.1.4 Vergleich der Behandlung mit SU6668, SU5416 und $^{60}\text{Co}$ -Bestrahlung

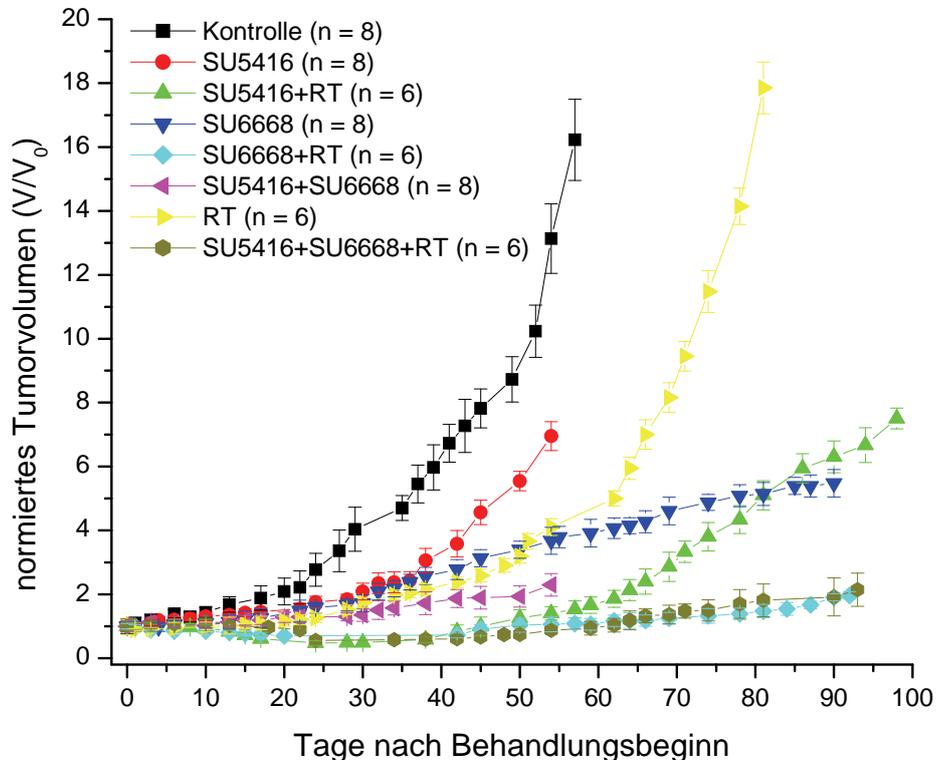


Abb. 18: Gesamtübersicht über die Wachstumskurven der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden PC3-Tumoren nach Behandlung mit SU5416, SU6668, Bestrahlung (RT) und den verschiedenen Kombinationen. Die Datenpunkte repräsentieren jeweils das mittlere Tumorstadium  $V$  der Behandlungsgruppen normiert auf das Ausgangsvolumen  $V_0 \pm \text{SEM}$ .

Bei dem Vergleich der Tumorstadien der dreifach kombinierten Behandlungsgruppe (SU5416 + SU6668 + RT) gegenüber sämtlichen anderen Gruppen am Tag 50 wurden mit Ausnahme zu den antiangiogen einfachtherapierten Bestrahlungs-Gruppen (RT + SU6668 und RT + SU5416) signifikant kleinere Tumorstadien ermittelt (jeweils  $p < 0,05$ ).

Ein weiterer Vergleich wurde daraufhin an Tag 70 gegenüber den antiangiogen einfachtherapierten Bestrahlungs-Gruppen durchgeführt, um ggf. Unterschiede in der späten Phase der Behandlung dieser Tiere feststellen bzw. ausschließen zu können. Dabei konnte eine signifikante Verringerung der Tumorstadien der Dreifachtherapie SU5416 + SU6668 + RT gegenüber der Behandlung mit Bestrahlung und SU5416 ermittelt werden ( $p < 0,01$ ). Dem entgegen zeigten sich keine Unterschiede bei

zusätzlicher Verabreichung von SU5416 gegenüber den ausschließlich mit SU6668 und Bestrahlung behandelten Tieren ( $p > 0.9$ ).

## 2.2 Wachstumsverzögerung

Des Weiteren wurde aus den Wachstumsdaten die Wachstumszeit  $T_5$  durch lineare Interpolation in Tagen berechnet, d.h. die Zeit, welche die Tumoren der jeweiligen Gruppe benötigten, um das fünffache des Ausgangsvolumens zu Beginn der Behandlung zu erreichen (Abbildung 19).  $T_2$  (Abbildung 20) wurde zusätzlich zu  $T_5$  berechnet, da einige der Tumoren aus den Behandlungsgruppen das fünffache ihres Ausgangsvolumens im Beobachtungszeitraum nicht erreichten.

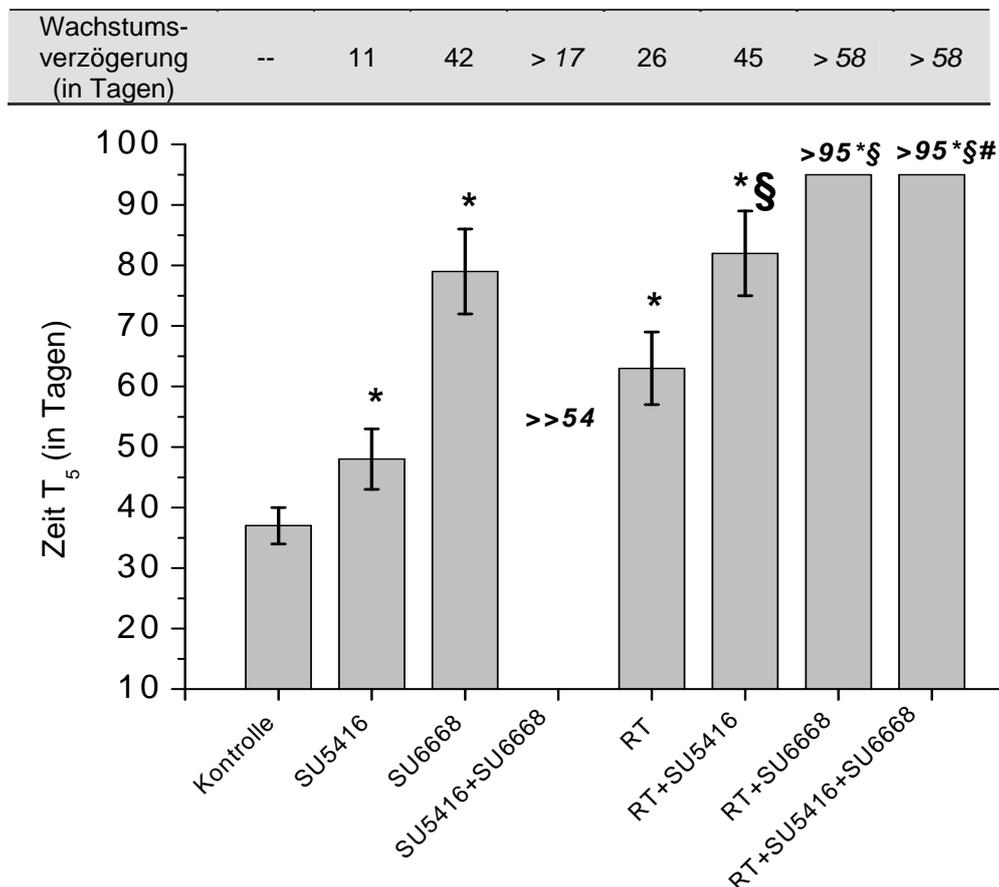


Abb. 19: Tumorwachstumszeiten  $T_5$  und Wachstumsverzögerungen innerhalb der PC3-Behandlungsgruppen der Versuchsreihe B.

Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: \*  $p < 0.05$  vs. Kontrolle, §  $p < 0.05$  vs. Monotherapien, #  $p < 0.05$  vs. Zweifachtherapien (außer RT + SU6668). Die Wachstumsverzögerung stellt die Differenz der Zeiten  $T_5$  (Mittelwerte) zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe dar.

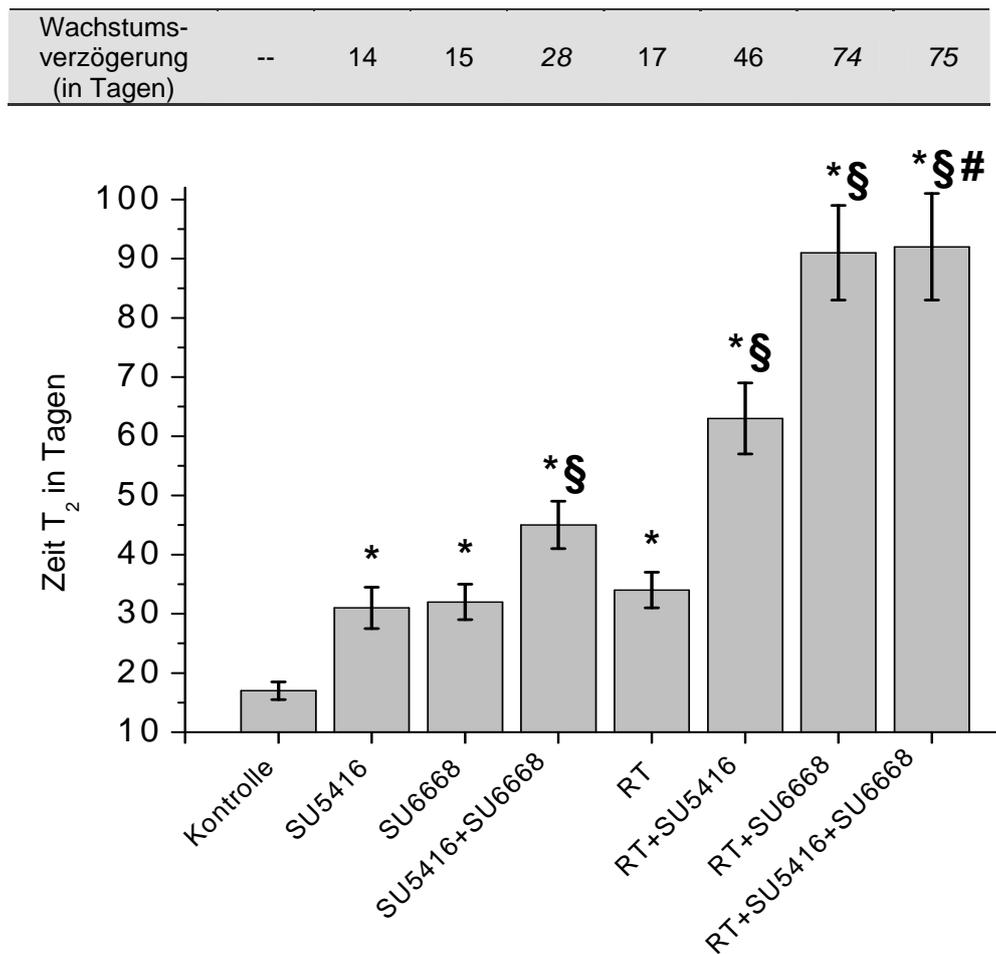


Abb. 20: Tumorwachstumszeiten  $T_2$  und Wachstumsverzögerungen innerhalb der PC3-Behandlungsgruppen der Versuchsreihe B.

Die Balken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: \*  $p < 0.05$  vs. Kontrolle, §  $p < 0.05$  vs. Monotherapien, #  $p < 0.05$  vs. Zweifachtherapien (außer RT + SU6668). Die Wachstumsverzögerung stellt die Differenz der Zeiten  $T_2$  (Mittelwerte) zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe dar.

Die stärkste Verzögerung wurde bei der Kombination von SU6668 und Bestrahlung sowie bei der dreifachkombinierten Behandlung mit SU5416, SU6668 und Bestrahlung ermittelt. Bei einzelnen Tieren dieser Behandlungsgruppen kam es zu einem andauernden Sistieren des Tumorwachstums (RT + SU6668:  $n = 1$ ) bzw. zu einer Rückbildung (jeweils  $n = 1$ ) des Tumors.

## 2.3 Tumormakroskopie

Abbildung 21 zeigt exemplarisch die Aufsicht auf die am linken Bein wachsenden Tumoren der Kontroll- und Behandlungsgruppen an den Tagen 0 und 50.

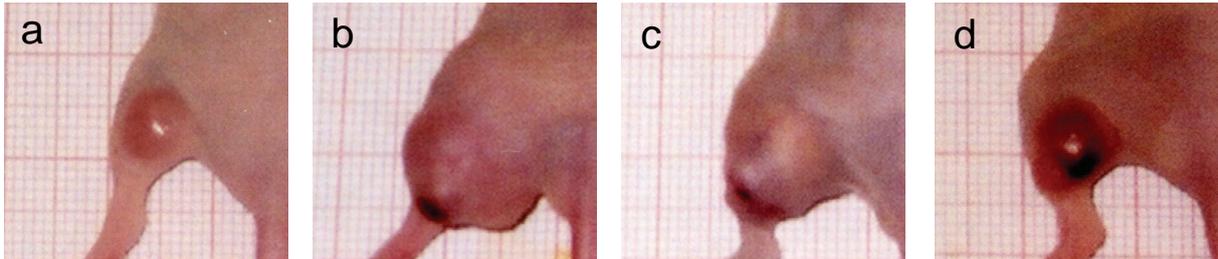


Abb. 21: Aufsicht auf die am linken Oberschenkel der Nacktmäuse wachsenden PC3-Tumoren der Versuchsreihe B (exemplarisch):

- a Kontrolle (Tag 0)
- b Kontrolle (Tag 50)
- c SU5416 + SU6668 (Tag 50)
- d RT + SU5416 + SU6668 (Tag 50)

Bei b ist distal eine beginnende Nekrose der Haut zu erkennen. Bei d ist eine Einblutung im Bereich des Tumors direkt unter die Haut zu sehen (dunkelrote bis schwarze Verfärbung).

Alle mit SU5416 behandelten Tiere zeigten im Beobachtungszeitraum eine deutliche und zum Teil hochgradige Abmagerung. Aufgrund der starken Gewichtsabnahme (> 2,5 g) bzw. des schlechten Allgemeinzustandes der Tiere musste die Beobachtung der Gruppen SU5416 und SU5416 + SU6668 am Tag 54 beendet werden, also verglichen mit den anderen Behandlungsgruppen zu einem deutlich früheren Zeitpunkt (s. auch Abbildungen 15 - 18).

## 2.4 Vergleichende Tumorhistologie

An den Tagen 0, 24 und 50 wurde aus jeder Gruppe Tumorgewebe entnommen und anhand HE-gefärbter histologischer Präparate lichtmikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 14 und 15 aufgeführt.

Tab. 14: Qualitative Untersuchung der PC3-Histologien (HE) der zu Behandlungsbeginn (Tag 0, Kontrolltumor) und am Tag 24 entnommenen Tumorgewebe (Versuchsreihe B).

Die Ausprägung folgender Strukturen wurde jeweils mit 0 (keine) bis 3 (hochgradig) bewertet: (a) Ausprägung nekrotischer Areale, (b) Zunahme der Bindegewebs-Strukturen, (c) Verminderung der Tumorzellen, (d) Auftreten von Tumorzell-Apoptosen (apoptotic bodies), (e) Entzündungszellen (EZ) und (f) extravasal liegender Erythrozyten. Nekrotische Areale blieben bei b bis f unberücksichtigt.

Gruppe	Nekrotische Areale (a)	Bindegewebs-zubildung (b)	Tumorzell-verminderung (c)	apoptotic bodies (d)	EZ (e)	extravasale Erythrozyten (f)
Kontrolle (Tag 0)	0	0	0	1	0	0
Kontrolle (Tag 24)	1	0	0	1	0	0
SU5416	2	2	1	2	0	0
SU6668	2	1	1	2	0	1
SU5416 + SU6668	2	1	1	2	2	0
RT	0	2	2	2	0	0
RT + SU5416	0	3	3	2	2	1
RT + SU6668	0	2	3	2	0	0
RT + SU5416 + SU6668	0	3	3	2	1	0

Bei allen kombiniert bestrahlten Tumoren fielen am Tag 24 insbesondere der fortgeschrittene Ersatz des Tumorgewebes durch Bindegewebe sowie die stark reduzierte Tumorzellzahl auf.

Tab. 15: Qualitative Untersuchung der PC3-Histologien (HE) der am Tag 50 entnommenen Tumorgewebe (Versuchsreihe B).

Die Bewertung erfolgte wie bereits zuvor in Tabelle 14 beschrieben wurde. Von der Gruppe RT + SU6668 konnte kein Präparat beurteilt werden, da das Gewebe bei der Entnahme überwiegend nekrotisch war.

Gruppe	Nekrotische Areale (a)	Binde-gewebs-zubildung (b)	Tumorzell-verminderung (c)	apoptotic bodies (d)	EZ (e)	extravasale Erythrozyten (f)
Kontrolle	2	0	0	1	1	-
SU5416	1	2	2	2	2	-
SU6668	2	2	2	2	2	-
SU5416 + SU6668	1	2	2	2	2	1
RT	1	2	2	2	2	-
RT + SU5416	2	3	3	2	2	1
RT + SU6668	-----					
RT + SU5416 + SU6668	1	3	3	2	2	1

Bei sämtlichen therapierten Tumoren fielen am Tag 50 die deutlich verminderten Tumorzellzahlen sowie die ausgeprägte Proliferation von Bindegewebe auf. Abbildung 22 zeigt exemplarisch Ausschnitte der histologisch untersuchten Tumorgewebe der Versuchsreihe.

Abb. 22: Repräsentative histologische Ausschnitte der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden PC3-Tumoren der Versuchsreihe B an den Tagen 24 (A-G) und 50 (H) [HE-Färbung (A, C-H); PAS-Färbung (B)].

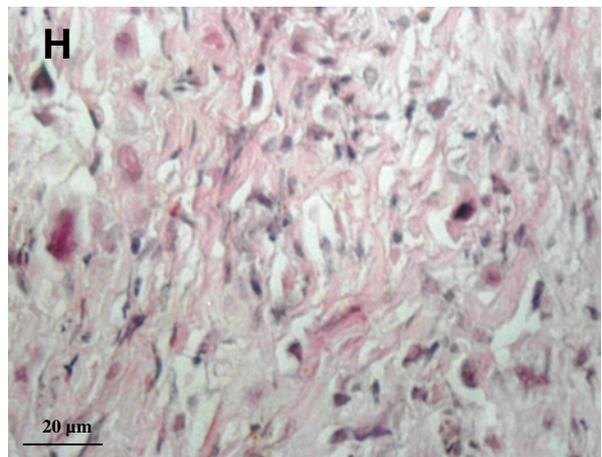
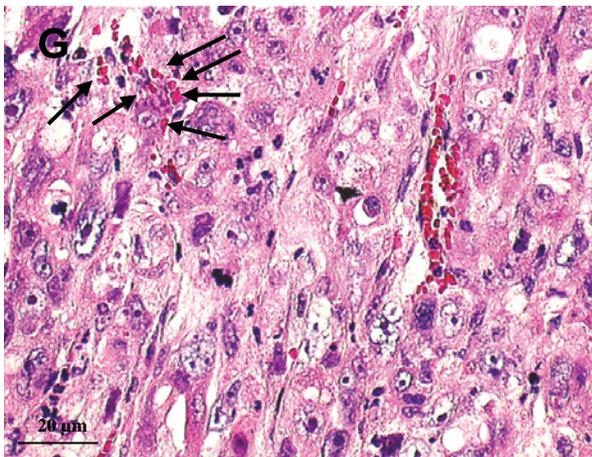
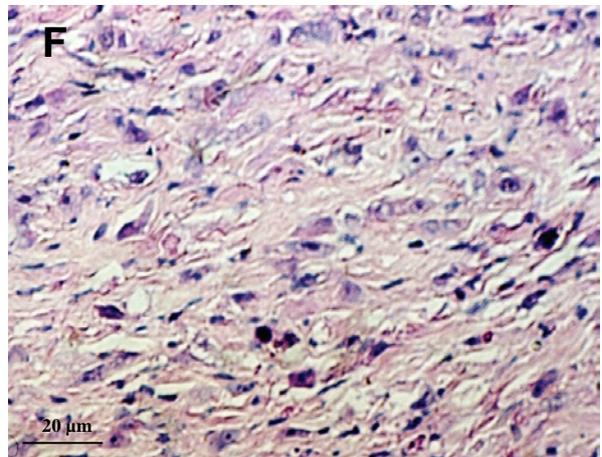
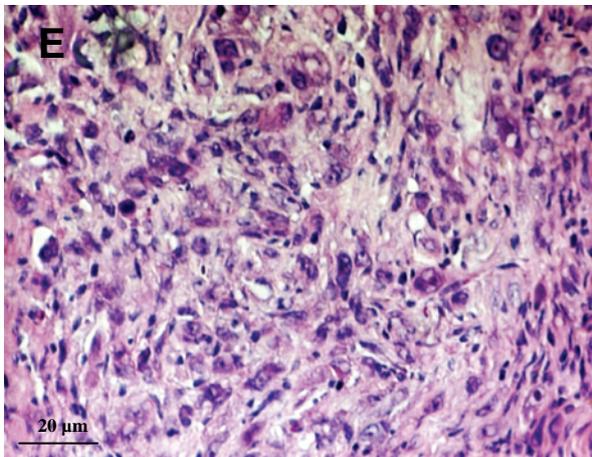
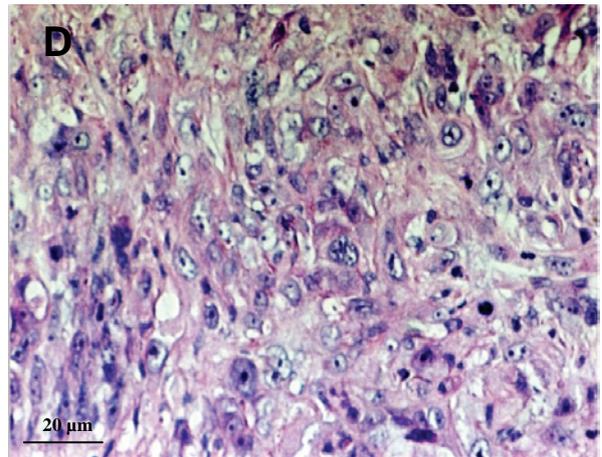
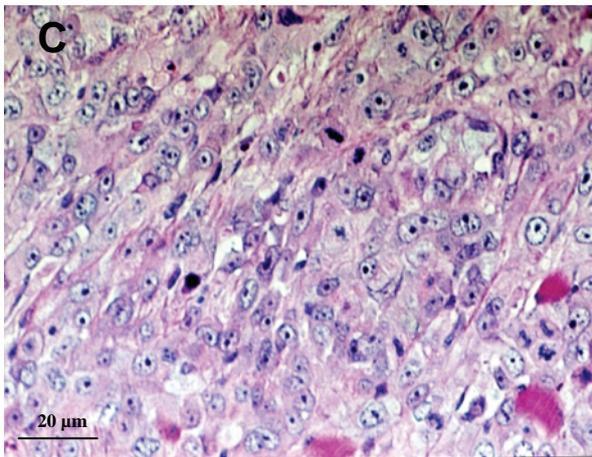
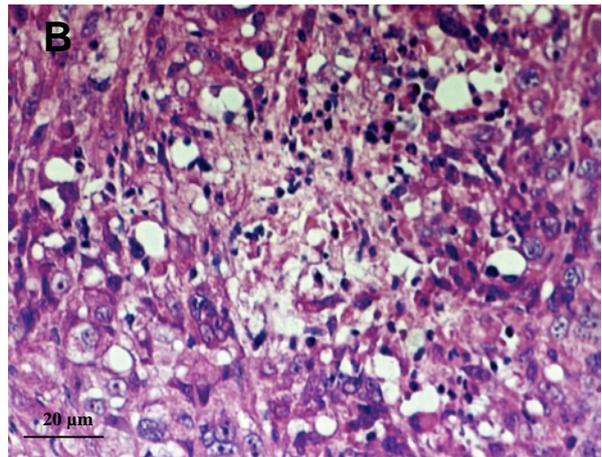
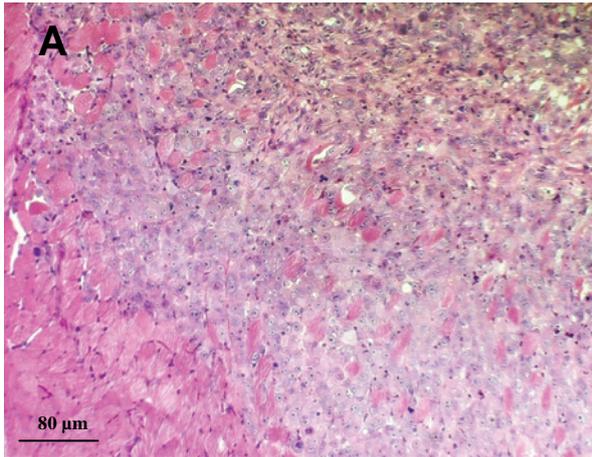
A - C zeigen Tumorgewebe der Kontrollgruppe. Bei A ist die Infiltration in umliegendes Muskelgewebe im Randbereich des Tumors dargestellt. Lediglich im Zentrum sind kleine nekrotische Bereiche mit Zellresten und Entzündungszellen zu sehen  
D: Gruppe SU5416 + SU6668

E: Deutliche Bindegewebs-Strukturen und verringerte Anzahl an Tumorzellen sind im Gewebe nach Bestrahlung zu erkennen (Gruppe RT)

F: SU5416 + SU6668 + RT: Bindegewebs-Strukturen dominieren, Tumorzellen sind deutlich reduziert

G: Im linken oberen Bildbereich liegen Erythrozyten außerhalb von Gefäßen im Gewebe (Pfeile, Gruppe SU6668)

H: Gruppe RT + SU6668: das Tumorstroma überwiegt; Tumorzellen sind nur noch vereinzelt zu sehen.



## 2.5 Tumorzellproliferation

Von Gewebeschnitten der am Tag 24 entnommenen Tumoren (je Gruppe ein Tumor) wurden zur Darstellung der sich in Teilungsphasen befindenden Tumorzellen immunhistochemische Ki67-Färbungen angefertigt. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse sind in Abbildung 23 dargestellt.

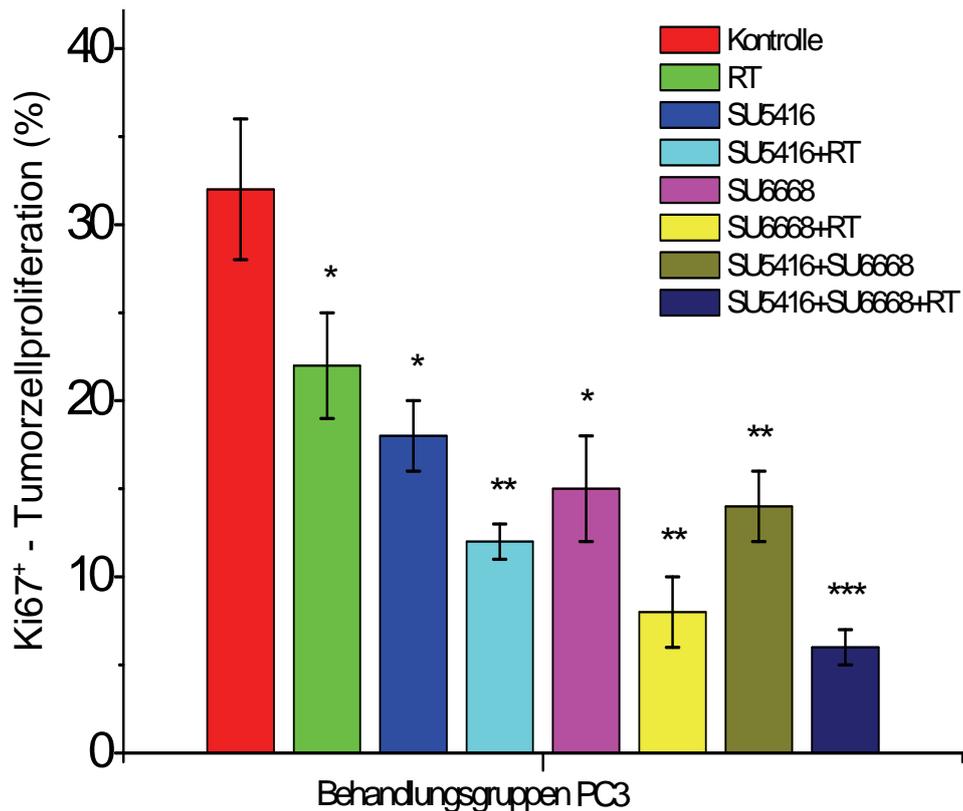


Abb. 23: Quantitative Analyse der Ki67-Immunhistochemie der PC3-Tumoren der Behandlungsgruppen am Tag 24 (Versuchsreihe B). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der in den Zählfeldern ermittelten Proliferationsraten je Tumor ( $\pm$  SD). Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, \*\*  $p < 0,05$  vs. Monotherapien, \*\*\*  $p < 0,05$  vs. Zweifachtherapien.

Abbildung 24 zeigt exemplarisch repräsentative Ausschnitte der Ki67-Immunhistochemie der Behandlungsgruppen.

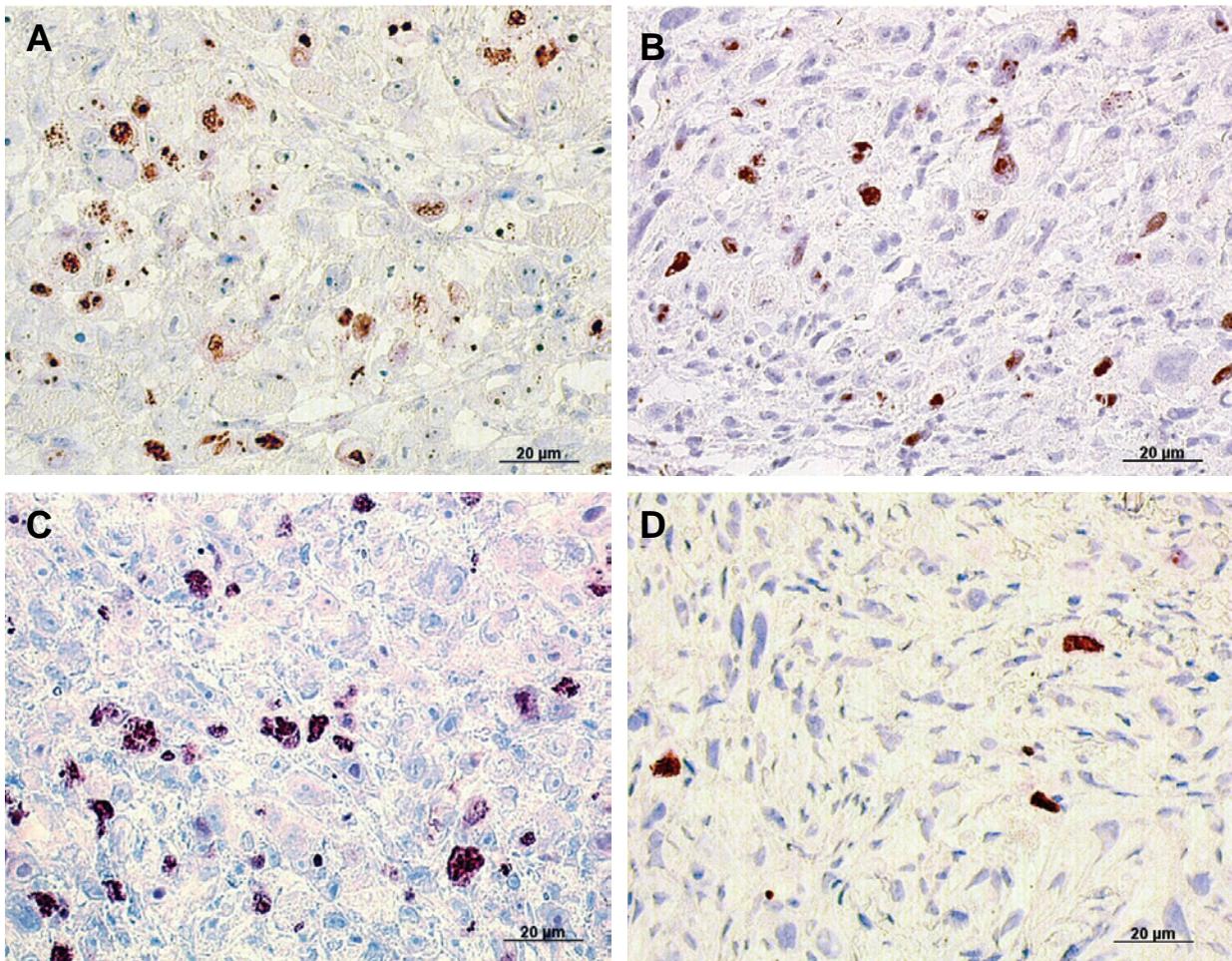


Abb. 24: Repräsentative Ausschnitte immunhistochemisch Ki67-gefärbter Gewebe der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden PC3-Tumoren der Versuchsreihe B am Tag 24.

Zellkerne in Zellteilungsphasen sind rot gefärbt.

- A Kontrolle
- B SU5416 + SU6668
- C Bestrahlung (RT)
- D RT + SU5416 + SU6668

## 2.6 Darstellung der Tumorgefäße

Anhand der immunhistochemischen CD31-Färbung von Schnittpräparaten der am Tag 24 entnommenen Tumoren wurden die Endothelzellen dargestellt.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse sind in Abbildung 25 dargestellt. Mit  $12 \pm 2$  /HPF (High Power Field) fiel die stark verminderte Gefäßdichte im Gewebe der Dreifach-Kombination auf.

Abbildung 26 zeigt vergleichend repräsentative Ausschnitte der CD31-gefärbten Tumorpräparate.

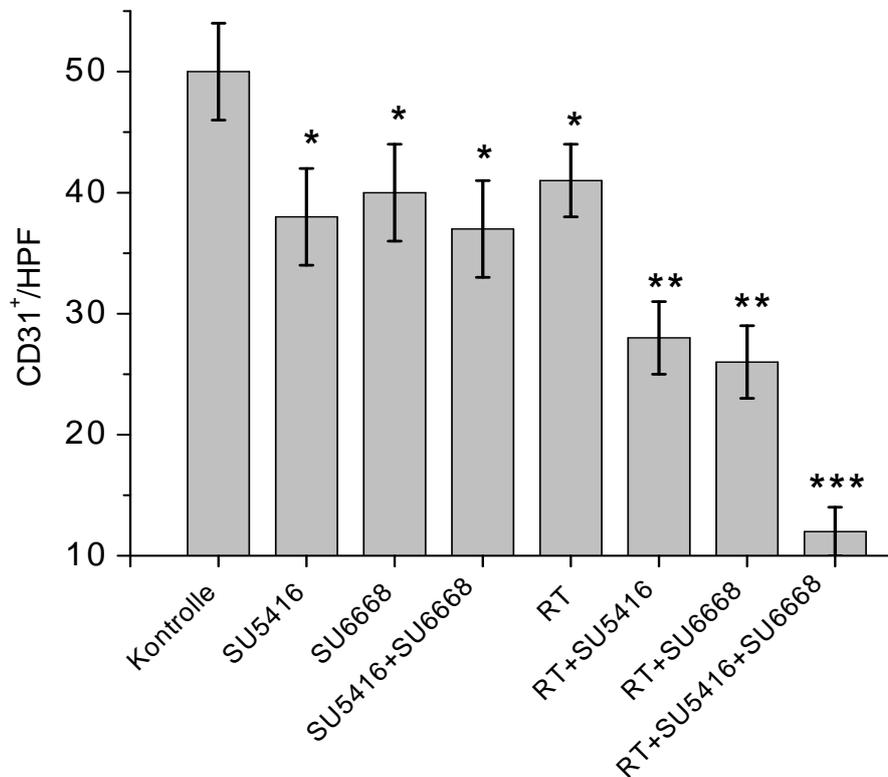


Abb. 25: Ermittelte Gefäßdichten [Anzahl CD31-positiver Gefäße je Gesichtsfeld (CD31<sup>+</sup>/HPF, 200x)] der PC3-Tumoren der Versuchsreihe A am Tag 24. Je Gruppe wurde ein Tumorgewebe untersucht.

Die Balken stellen die mittlere Gefäßdichte von 10 Zählfeldern dar ( $\pm$  SD). Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, \*\*  $p < 0,05$  vs. Monotherapien, \*\*\*  $p < 0,05$  vs. Zweifachtherapien.

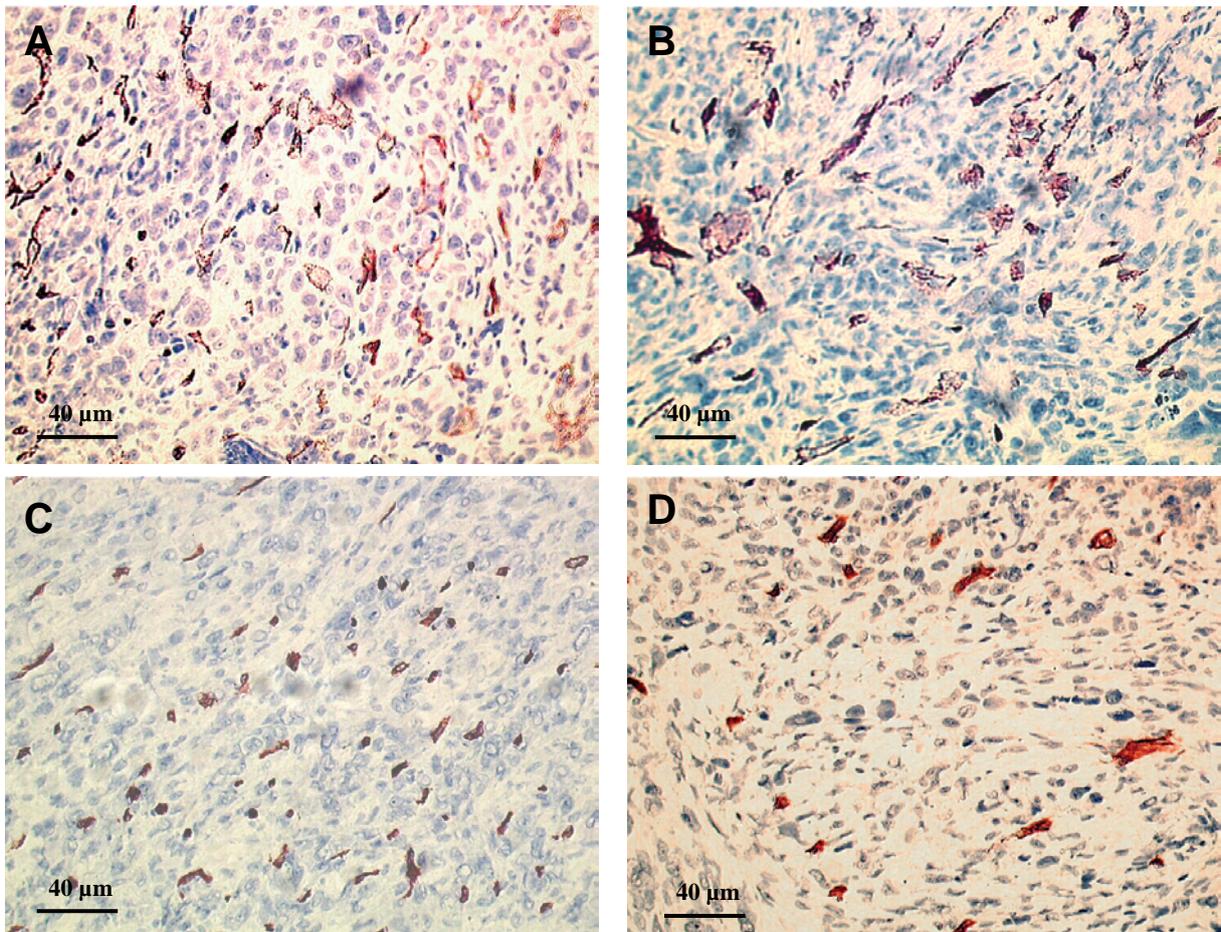


Abb. 26: Repräsentative Ausschnitte immunhistochemisch CD31-gefärbter Gewebe der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden PC3-Tumoren der Versuchsreihe B am Tag 24 (Gegenfärbung der Zellkerne mit Hematoxylin nach Mayer):

- A Kontrolle
- B Bestrahlung (RT)
- C SU5416 + SU6668
- D RT + SU5416 + SU6668

Bei der Dreifachkombination (D) fiel die stark reduzierte Anzahl an CD31-exprimierenden, rotbraun gefärbten Gefäßendothelien auf.

### 3 Therapie mit dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Inhibitor S247 und die Kombination mit $^{60}\text{Co}$ -Bestrahlung (Versuchsreihe C)

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss der Therapie mit dem  $\alpha_v\beta_3$ -Inhibitor S247 alleine bzw. kombiniert mit einer lokalen fraktionierten Strahlenbehandlung (RT) zu Beginn der S247-Therapie auf das Wachstumsverhalten von Tumoren am PC3-Xenograft-Modell untersucht. Im Anschluss daran wurde dieses Konzept an einem weiteren Tumormodell getestet, dem humanen Epidermoid-Karzinom A431 (Versuchsreihe D). Am Tag 10 wurden Tumorgewebe zur histologischen bzw. immunhistochemischen Untersuchung entnommen.

#### 3.1 Tumorwachstum

In Abbildung 27 sind die Tumorwachstumskurven der Gruppen dieser Versuchsreihe wiedergegeben.

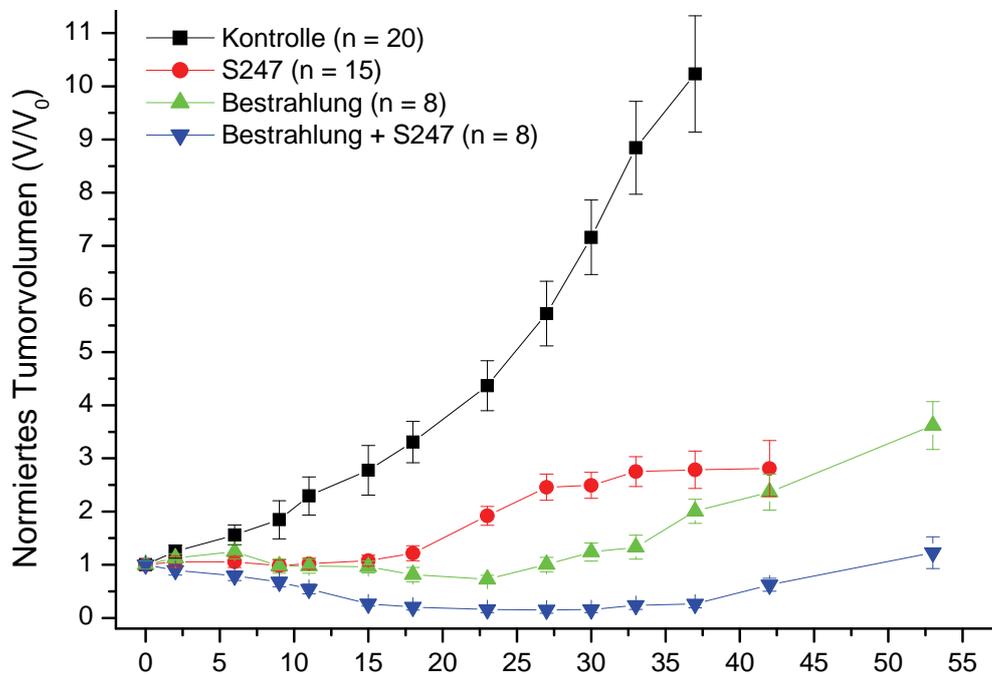


Abb. 27: Wachstumskurven der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden PC3-Tumoren nach Behandlung mit S247, Bestrahlung (RT) und deren Kombination. Die Datenpunkte repräsentieren jeweils das mittlere Tumolvolumen  $V$  der Behandlungsgruppen normiert auf das Ausgangsvolumen  $V_0 \pm \text{SEM}$ .

Der Vergleich der Tumorumfängen am Tag 37 (Endpunkt der Kontrollgruppe) ergab, dass die Tumorumfänge sämtlicher Behandlungsgruppen verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant verringert waren ( $p < 0,02$ ). Zudem wurden signifikant geringere Tumorumfänge bei der kombinierten behandelten Gruppe verglichen mit den Monotherapie-Gruppen ermittelt ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 Wachstumsverzögerung

Des Weiteren wurde aus den Wachstumsdaten die Wachstumszeit  $T_2$  durch lineare Interpolation in Tagen berechnet, d.h. die Zeit, welche die Tumoren der jeweiligen Gruppe benötigten, um das zweifache des Ausgangsvolumens zu Beginn der Behandlung zu erreichen.  $T_2$  wurde gewählt, da einige Tumoren aus den Behandlungsgruppen das vierfache ihres Ausgangsvolumens im Beobachtungszeitraum nicht erreichten.

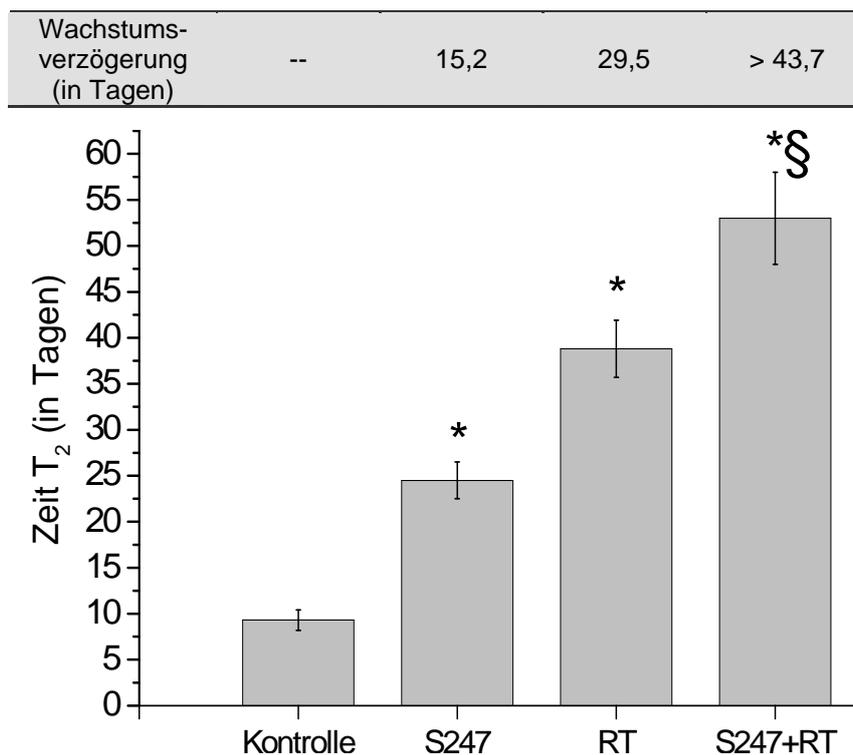


Abb. 28: Tumorstadiumszeiten  $T_2$  und Wachstumsverzögerungen innerhalb der PC3-Behandlungsgruppen der Versuchsreihe C.

Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, §  $p < 0,05$  vs. Monotherapiegruppen. Die Wachstumsverzögerung stellt jeweils die Differenz der Zeit  $T_2$  zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe dar.

Bei insgesamt 3 Tieren der Kombinationsgruppe kam es zum anhaltenden Wachstumsstopp (n = 2) oder sogar zu einer Rückbildung (n = 1) der Tumoren.

### 3.3 Vergleichende Tumorhistologie

Am Tag 10 nach Behandlungsbeginn wurde aus jeder Gruppe Tumorgewebe entnommen und anhand von HE-Präparaten histologisch untersucht. Die Ergebnisse der qualitativen Bewertung sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tab. 16: Qualitative Untersuchung der PC3-Histologien (HE) der am Tag 10 entnommenen Tumorgewebe der Versuchsreihe C.

Die Ausprägung folgender Strukturen wurde jeweils mit 0 (keine) bis 3 (hochgradig) bewertet: (a) Ausprägung nekrotischer Areale, (b) Zunahme der Bindegewebs-Strukturen, (c) Verminderung der Tumorzellen, (d) Auftreten von Tumorzell-Apoptosen (apoptotic bodies), (e) Entzündungszellen (EZ) und (f) extravasal liegender Erythrozyten. Nekrotische Areale blieben bei b bis f unberücksichtigt.

Gruppe	Nekrotische Areale (a)	Bindegewebs-zubildung (b)	Tumorzell-verminderung (c)	apoptotic bodies (d)	EZ (e)	extravasale Erythrozyten (f)
Kontrolle	3	0	0	1	1	0
S247	0	1	1	1	1	0
RT	2	1	2	1	1	0
RT + S247	2	2	2	3	1	0

### 3.4 Tumorzellproliferation

Von den am Tag 10 entnommenen Tumoren wurden zur Darstellung der sich in Teilungsphasen befindenden Tumorzellen immunhistochemisch Ki67-gefärbte Gewebeschnitte angefertigt. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse sind in Abbildung 29 dargestellt.

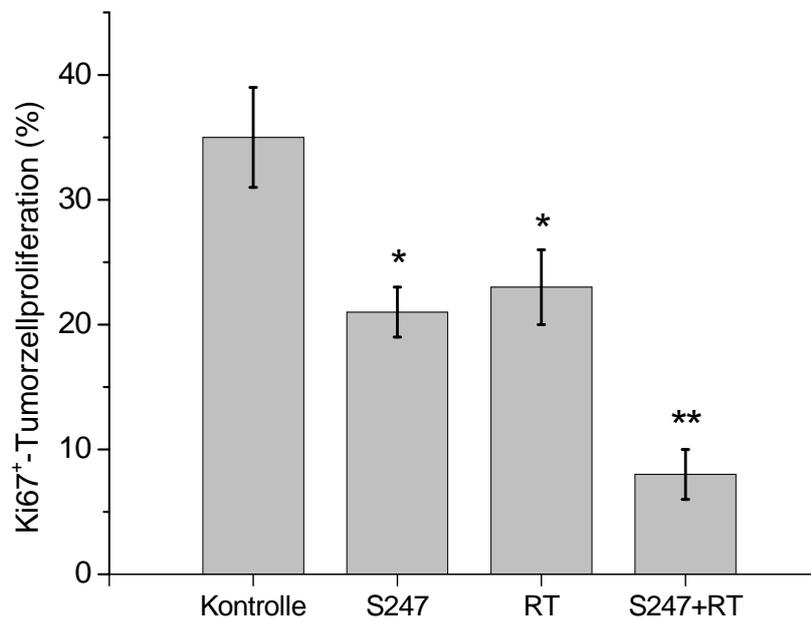


Abb. 29: Quantitative Analyse der Ki67-Immunhistochemie der PC3-Tumoren der Behandlungsgruppen am Tag 10 (Versuchsreihe C). Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der in den Zählfeldern ermittelten Proliferationsraten je Tumor ( $\pm$  SD) [\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, \*\*  $p < 0,05$  vs. Monotherapien].

### 3.5 Darstellung der Tumorgefäße

Anhand der immunhistochemischen CD31-Färbung von Schnittpräparaten der am Tag 10 entnommenen Tumoren wurden die Endothelzellen dargestellt. Aus jeder Gruppe wurde ein Tumorgewebe untersucht. Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der Gefäßauszählung im Balkendiagramm sowie die Signifikanzniveaus des statistischen Vergleichs.

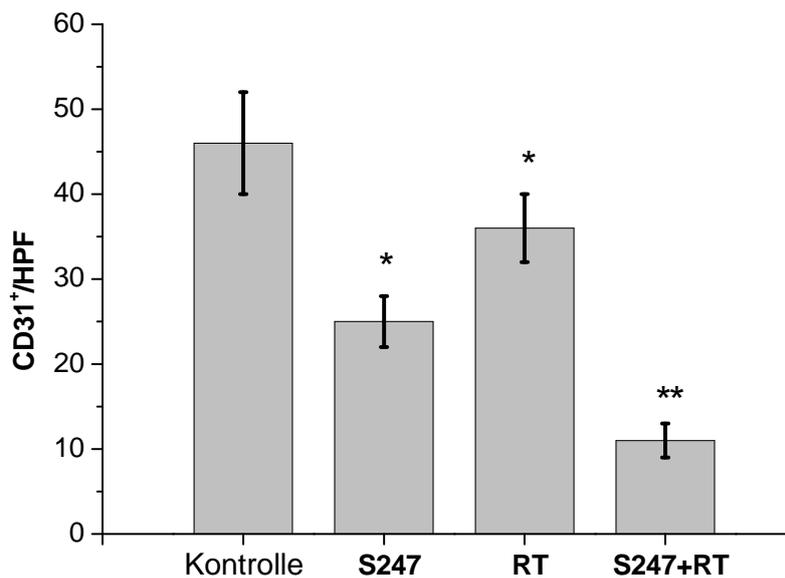


Abb. 30: Ermittelte Gefäßdichten [Anzahl CD31-positiver Gefäße je Gesichtsfeld (CD31<sup>+</sup>/HPF, 200x)] der PC3-Tumoren der mit S247 und Bestrahlung (RT) behandelten Gruppen am Tag 10.

Die Balken stellen die Mittelwerte ( $\pm$  SD) dar. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgende Symbole gekennzeichnet: \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, \*\*  $p < 0,05$  vs. Monotherapien.

Im Gewebe der Kombinationsgruppe fiel die geringe Gefäßdichte auf.

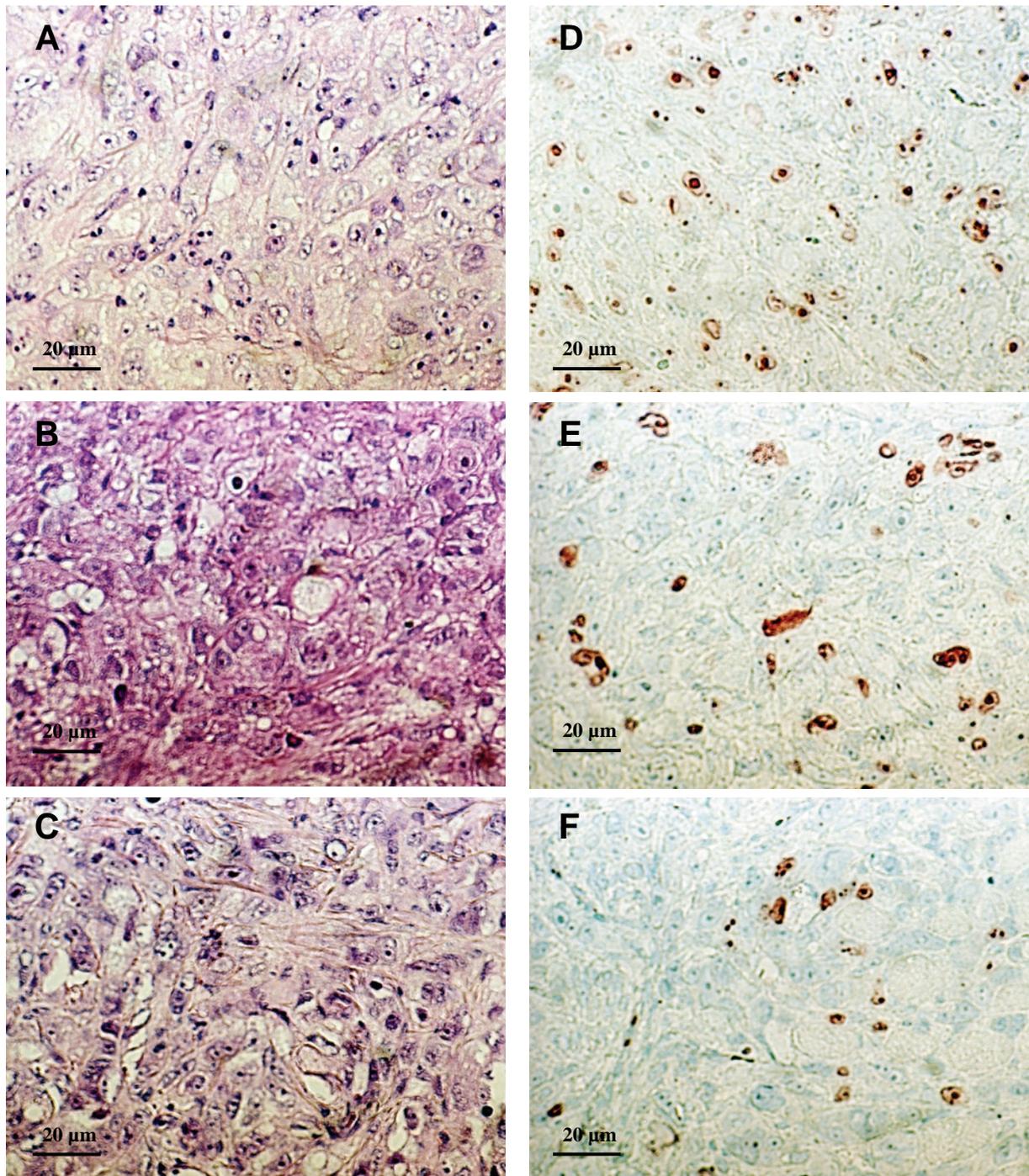


Abb. 9: Repräsentative Ausschnitte HE-gefärbter (A - C) bzw. immunhistochemisch Ki67-gefärbter (D - F) Gewebeschnitte der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden PC3-Tumoren der Versuchsreihe C am Tag 10 [Ki67-Färbung: Zellkerne in Zellteilungsphasen sind rot gefärbt].

A, D	Kontrolle
B, E	S247
C, F	RT + S247

## 4 Therapie mit dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Inhibitor S247 und die Kombination mit $^{60}\text{Co}$ -Bestrahlung am A431-Tumormodell (Versuchsreihe D)

Im Anschluss an die Untersuchungen am PC3-Tumormodell wurde der Einfluss der Therapie mit dem  $\alpha_v\beta_3$ -Inhibitor S247 alleine bzw. kombiniert mit einer lokalen fraktionierten Strahlenbehandlung, RT zu Beginn der S247-Therapie an einem weiteren Tumormodell getestet, dem humanen Epidermoid-Karzinom-Xenograft A431. Im Vergleich zum PC3-Tumor weist A431 zudem ein deutlich schnelleres subkutanes Wachstum auf. Am Tag 10 wurden Tumorgewebe zur immunhistochemischen Darstellung von pAkt und Apoptose entnommen.

### 4.1 Tumorwachstum

In Abbildung 32 sind die Tumorwachstumskurven der Gruppen dargestellt.

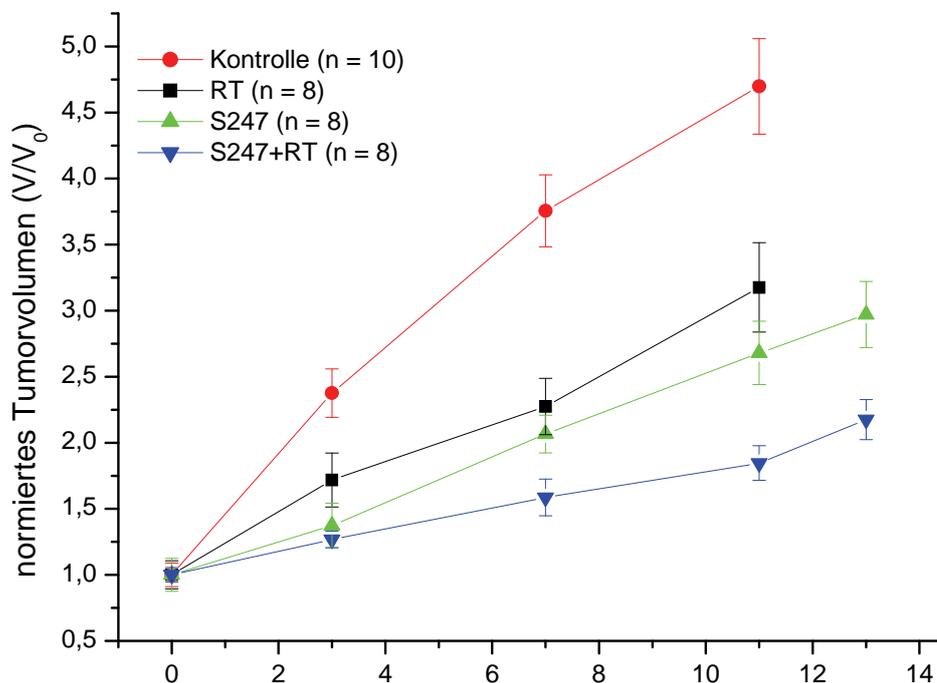


Abb. 32: Wachstumskurven der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden A431-Tumoren nach Behandlung mit S247, Bestrahlung (RT) und deren Kombination. Die Datenpunkte repräsentieren jeweils das mittlere Tumolvolumen  $V$  der Gruppen normiert auf das Ausgangsvolumen  $V_0 \pm \text{SEM}$ .

Der Vergleich der Tumorumfänge am Tag 11 (Endpunkt der Kontroll- bzw. RT-Gruppe) ergab, dass die Tumorumfänge sämtlicher Behandlungsgruppen verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant verringert waren ( $p < 0,02$  für S247 und S247 + RT;  $p < 0,05$  für RT). Bei der kombiniert behandelten Gruppe wurden signifikant kleinere Tumorumfänge mit  $p < 0,02$  gegenüber der S247-Therapiegruppe bzw. mit  $p < 0,05$  gegenüber der Bestrahlungsgruppe ermittelt.

## 4.2 Wachstumsverzögerung

Des Weiteren wurde aus den Wachstumsdaten die Wachstumszeit  $T_2$  durch lineare Interpolation in Tagen berechnet, d.h. die Zeit, welche die Tumoren der jeweiligen Gruppe benötigten, um das zweifache des Ausgangsvolumens zu Beginn der Behandlung zu erreichen.  $T_2$  wurde gewählt, da einige Tumoren aus den Behandlungsgruppen das vierfache ihres Ausgangsvolumens im Beobachtungszeitraum nicht erreichten. Durch den Vergleich dieser Zeiten konnten Wachstumsverzögerungseffekte in den Behandlungsgruppen erfasst werden.

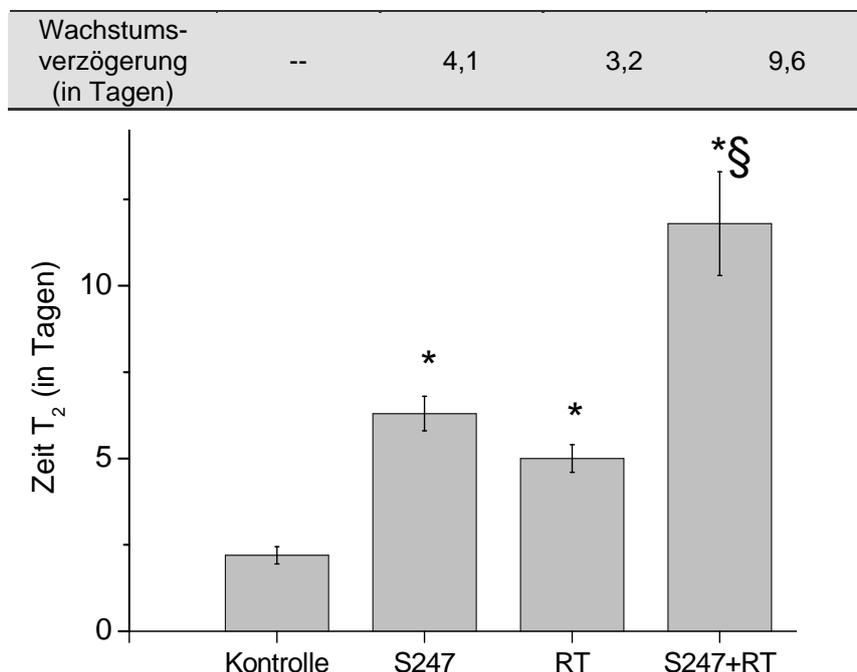


Abb. 33: Tumorstadiumszeiten  $T_2$  und Wachstumsverzögerungen innerhalb der A431-Behandlungsgruppen der Versuchsreihe D.

Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch folgendes Symbol gekennzeichnet: \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; §  $p < 0,05$  vs. Monotherapien. Die Wachstumsverzögerung stellt jeweils die Differenz der Zeit  $T_2$  zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe dar.

Die Tumorwachstumsverzögerung durch die kombinierte Behandlung betrug 9,6 Tage und belief sich damit auf das 2,3- bzw. 3-fache der bei den Monotherapien beobachteten.

### 4.3 Detektion phosphorylierter Akt (pAkt)

Bei *in-vitro*-Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass die bestrahlungsinduzierten Integrin-vermittelten Signalwege in humanen Endothelzellen u.a. über eine Hochregulierung von phosphoryliertem Akt ablaufen und dass eine Hemmung von Integrin-Signalen zu einer Reduzierung von pAkt führt (ABDOLLAHI et al. 2005). Bei den am Tag 10 aus den Gruppen entnommenen Tumorgeweben wurde daher anhand von Paraffinschnitten pAkt in den Endothelzellen immunhistochemisch dargestellt und deren Anfärbung qualitativ untersucht.

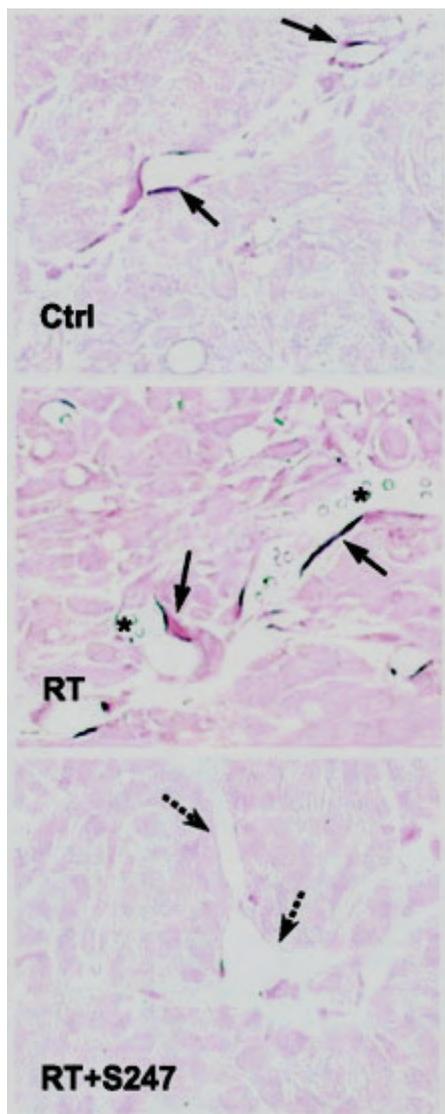


Abb. 34: Phospho-Akt (Ser473)-Immunhistochemie von Paraffinschnitten der subkutan auf BALB/c *nu/nu* wachsenden A431-Tumoren (Tag 10) der Gruppen Kontrolle (Ctrl), Bestrahlung (RT) und kombinierter Behandlung mit dem Integrin-Antagonisten und Bestrahlung (RT + S247).

Eine verstärkte positive Markierung der Endothelzellen ist in der Kontrolle und im bestrahltem Tumor zu sehen (schwarze Pfeile mit durchgehender Linie) während die Behandlung mit S247 zu einer reduzierten Phosphorylierung von pAkt führte (schwarze Pfeile mit unterbrochenen Linien). \* = Erythrozyten im Gefäßlumen.

#### 4.4 TUNEL

Die am Tag 10 entnommenen Tumoren (Abschnitt 4.3) wurden mit der TUNEL-Methode anhand von Paraffin-Gewebeschnitten auf das Vorkommen apoptotischer Endothelzellen qualitativ untersucht (Abb. 35).

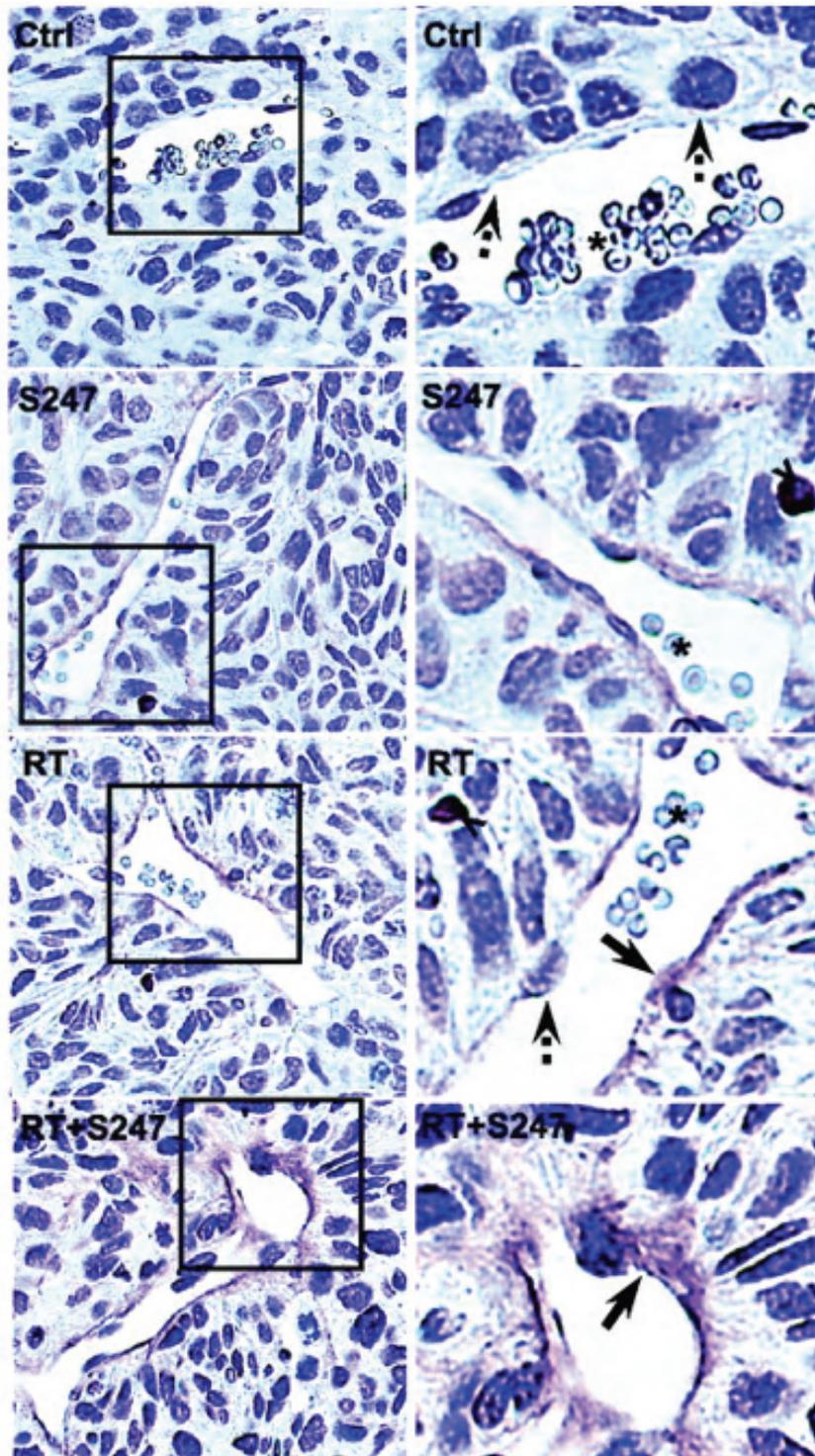


Abb. 35: Darstellung apoptotischer Endothelzellen mittels TUNEL-Färbung an Paraffinschnitten der subkutan auf BALB/c nu/nu wachsenden A431-Tumoren (Tag 10) der Gruppen der Versuchsreihe D.

Ctrl = Kontrolle

S247 = Integrin-Inhibitor

RT = Bestrahlung

RT + S247 = kombinierte Behandlung mit S247 und Bestrahlung

Im Gewebe der therapierten Gruppen traten vermehrt apoptotische Endothelzellen auf, wobei die größte Anzahl bei der Kombinationsgruppe auffiel. Schwarze Pfeilspitzen und Pfeile mit durchgezogener Linie zeigen auf TUNEL-positive apoptotische Endothel- und Tumorzellen (>); schwarze Pfeile mit unterbrochener Linie zeigen auf Tunel-negative Endothelzellen. Die linken Bilder zeigen Ausschnitte bei 100-facher Vergrößerung, die rechten Ausschnitte zeigen jeweils die markierten quadratischen Ausschnitte der Bilder links (400x); \*=Erythrozyten in den Gefäßen.

## 5 Auftreten spontaner Metastasierung der PC3-Tumoren

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Sektionen wurden bei Tieren der PC3-Versuchsreihen vereinzelt veränderte bzw. vergrößerte Lymphknoten in der Inguinal- bzw. Abdominal- und/oder Pelvinalregion festgestellt. Nach histologischer Bestätigung von Metastasen der Primärtumoren PC3 wurden die Tiere endgültig als Lymphknoten-positiv eingestuft (Kontrollgruppen: n = 6; Behandlungsgruppen: n = 16). Eine Metastasierung in Lunge, Leber, Milz und Nieren konnte bei keinem der Tiere festgestellt werden. Aufgrund des gewählten (subkutanen) Versuchsmodells und -aufbaus war die Untersuchung des Einflusses der Behandlungen auf die Metastasierung nicht Gegenstand dieser Arbeit und es soll und kann daher lediglich eine Tendenz angegeben werden (s. dazu auch Diskussion, Abschnitt 2.4). Unterschiede bzgl. des Vorkommens von Metastasen bei behandelten und unbehandelten Tieren fielen nicht auf.

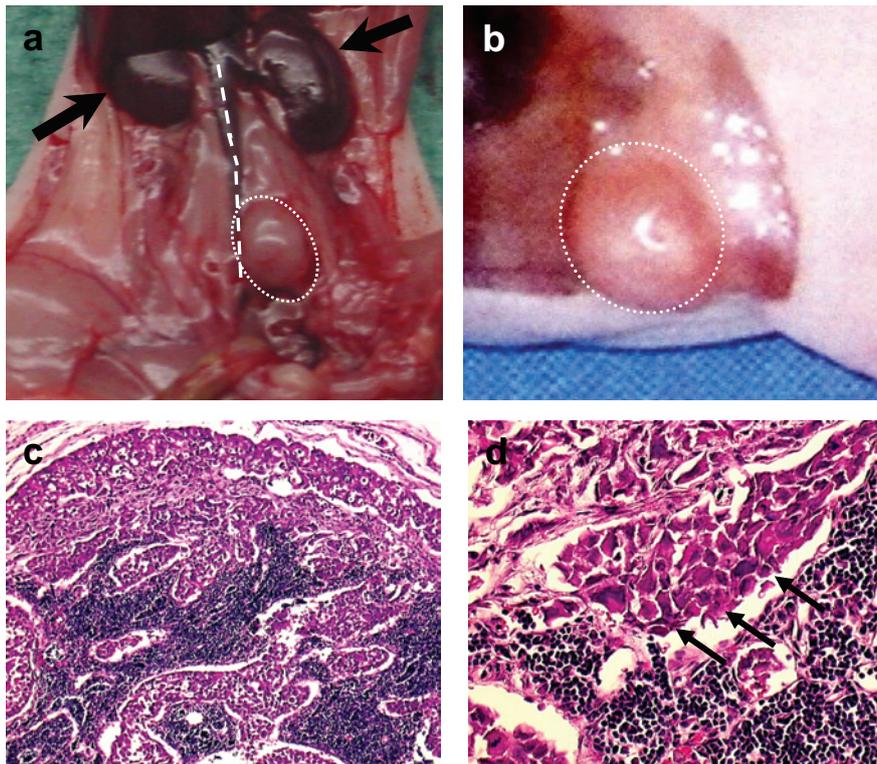


Abb. 36: Metastasierung der PC3-Tumoren in Lymphknoten.

a Bauchsitus einer PC3-Tumor-tragenden Maus BALB/c *nu/nu* der Gruppe SU6668 der Versuchsreihe B (Tag 50): linker Ln. paraaortalis stark vergrößert (ca. 8 x 7 mm; weiße gepunktete Linie); schwarze Pfeile weisen auf Nieren, weiße unterbrochene Linie kennzeichnet den Verlauf der Aorta.

b Aufsicht im Bereich linke Flanke nach Entfernung der Hautschichten (Gruppe SU5416 + Endostatin; Tag 59): Lymphknoten des Lc. inguinale superficiale deutlich vergrößert (Durchmesser ca. 7 mm; weiße gepunktete Linie).

c, d Lymphknoten-Histologie [HE-Färbung, 100x (c) bzw. 400x (d)] mit ausgeprägter PC3-Tumorzellinfiltration (schwarze Pfeile).

# V Diskussion

## 1 Diskussion der Methodik

### 1.1 Tier- und Tumormodelle

#### 1.1.1 Humanes Prostata- und Epidermoidkarzinom

Das Prostatakarzinom ist der häufigste maligne Tumor des Mannes. Für diese Tumorerkrankung existieren durchaus effektive Behandlungsmethoden, vorausgesetzt sie wird in einem frühen, lokalen Stadium ihrer Entwicklung erkannt. Mit der Verbesserung der diagnostischen Techniken bzw. einem steigenden Vorsorgebewusstsein wächst die Zahl der Früherkennungen (STEELE et al. 2000). Dennoch ist das Prostatakarzinom weiterhin die zweithäufigste Todesursache bei an Krebs erkrankten Patienten (JEMAL et al. 2005). Insgesamt betrachtet sind die bisherigen Behandlungsmöglichkeiten trotz großer Fortschritte nicht zufriedenstellend, was die Suche nach effektiveren und zugleich schonenderen Behandlungskonzepten erfordert.

Wie bereits im Literaturteil beschrieben wurde, konnte bei metastasierenden (hormonunabhängigen) Prostatakarzinomen von Patienten wie auch bei der für diese Untersuchungen verwendeten Zelllinie PC3 die Expression verschiedener angiogener Wachstumsfaktoren wie dem VEGF, PDGF und FGF nachgewiesen werden. Zudem scheint es, dass die Aggressivität von Tumoren mit der Bildung dieser Wachstumsfaktoren zusammenhängt. Die Kombination von Bestrahlung bei gleichzeitiger Integrin-Blockade wurde an einem weiteren und im Vergleich zu PC3 (subkutan) deutlich schneller wachsenden Modell getestet, dem humanen A431-Epidermoidkarzinom. Dabei handelt es sich um entartete Keratinozyten eines Vulva-Malignoms. Plattenepithelkarzinome (auch Epidermoid-Karzinome) stellen eine der häufigsten Tumorarten des Integuments dar. Dieser Tumor bleibt zunächst lokalisiert, am Ort seiner Entstehung und entwickelt i.d.R. erst in einem späteren Stadium die Tendenz zu metastasieren. Daher stellt sich eine zum Prostatakarzinom vergleichbare Problematik dar, die im übrigen eine Vielzahl von Tumorerkrankungen

charakterisiert. Bei verschiedenen Epidermoidkarzinomen (der Vulva) wie auch bei der Tumorzelllinie A431 ist ebenfalls die Bildung von VEGF sowie seines Rezeptors (VEGFR-2) nachgewiesen (s. auch Literaturteil Abschnitt 4.1). Die Tumormodelle stellen daher geeignete Tumorarten für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Behandlungsstrategien dar.

### 1.1.2 Xenograft-Tumormodell

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben präklinische *in-vivo*-Modelle etabliert, die Aussagen über den Einfluss von Wirkstoffen oder neuen Substanzen auf das Wachstum von Tumoren erlauben. So stellen immundefiziente Mäuse wie SCID, SCID beige oder Nacktmäuse attraktive Modelle für die Untersuchung des Wachstums- und Metastasierungsverhalten von humanen Tumorzellen *in vivo* dar (GAROFALO et al. 1993; MITCHELL et al. 1997). Diese Tiere sind in hohem Maße für heterologe Transplantationen geeignet, da bei ihnen nicht mit Komplikationen beim Wachsen von speziesfremden Tumorzellen im Körper zu rechnen ist.

Seit 1971 von der ersten erfolgreichen Transplantation eines humanen Kolonkarzinoms in die Nacktmaus berichtet wurde (POVLSEN u. RYGAARD 1971), konnten verschiedenste humane Tumoren erfolgreich übertragen und in Serienpassagen überführt werden (SORDAT et al. 1977; GIOVANELLA et al. 1978). Auch in Zellkultur wachsende Tumorzelllinien führten in der Nacktmaus zur Ausbildung solider Tumoren (GIOVANELLA et al. 1972). Als präklinische Testmodelle ermöglichen sie seither Untersuchungen zum Wachstumsverhalten und zur Wirkung unterschiedlichster Substanzen auf diese etablierten Tumoren. Die Verwendung eines Inzuchtstammes mit genetisch und mikrobiologisch standardisierten Tieren (hier: Balb/c *nu/nu*) führt neben den einheitlichen Umwelt- bzw. Haltungsfaktoren zu weitestgehend standardisierten Versuchsbedingungen, welche die Voraussetzung für aussagekräftige Ergebnisse von Tierversuchen darstellen.

### 1.1.2.1 Subkutanes Tumormodell

Seit Tumor-Xenograft-Modelle etabliert sind besteht die Diskussion über geeignete Implantationsarten der Tumorzellen. Mittlerweile liegen zahlreiche Erkenntnisse über Vor- und Nachteile von verschiedenen Applikationsorten der Tumoren vor. Eine große Rolle spielt dabei die jeweilige Fragestellung für die durchzuführenden Untersuchungen, da das Wachstum und die Entwicklung von implantierten Tumorzellen oder -gewebe durch deren Mikroumgebung beeinflusst wird.

Die subkutane Implantation humaner Tumorxenografts stellt ein kliniknahes Modell zur Testung neuer antitumoral wirksamer Substanzen dar. So konnte gezeigt werden, dass zwischen dem subkutan wachsenden Xenotransplantat und dem Spendentumor beim Vergleich der Histologien (REVAZOVA et al. 1992), der Expression von Tumormarkern (RANDT 1984), der Pharmakokinetik (KUBOTA et al. 1993) und der Chemosensibilität (DUPLAN 1984; BERGER et al. 1992) Übereinstimmungen bestehen.

Ein Vorteil der subkutanen Implantation liegt darin, dass sie relativ schonend und einfach vorgenommen werden kann. Die Tumorzellen wurden bei diesen Untersuchungen den durch eine zweite Person fixierten Tieren injiziert. Auf eine Narkose, die eine erhebliche Belastung für die Tiere dargestellt hätte, konnte verzichtet werden.

## 1.2 Behandlung der Tiere

In dieser Arbeit sollte der Effekt der verschiedenen Behandlungsschemata auf das Wachstumsverhalten von soliden Tumoren mit bereits etabliertem Gefäßnetz untersucht werden. Mit der Behandlung wurde daher zu einem Zeitpunkt begonnen, zu dem die an den Hinterbeinen gewachsenen Tumoren gut messbar waren und Volumina zwischen 75 bis 200 mm<sup>3</sup> erreicht hatten.

### 1.2.1 Behandlung mit Angiogenese-Inhibitoren

Die subkutane Verabreichung der Medikamente stellt eine gewisse Belastung für die Tiere dar, insbesondere bei Behandlung mit mehreren Substanzen bzw. bei Verabreichung zweimal täglich. Daher wurde besonderer Wert gelegt auf, dass die Medikamente auf Körpertemperatur vorgewärmt verabreicht wurden und durch

entsprechende Konzentration der Wirkstoff-Lösungen und -Suspensionen tägliche Volumengaben von 100 µl nicht überschritten wurden (GV-SOLAS 1999). Zugleich ermöglicht diese Verabreichungsart eine sichere und zeitlich exakte Dosierung der Wirkstoffe. Die erste Gabe der Substanzen erfolgte jeweils ca. sechs Stunden vor der ersten Bestrahlung.

### 1.2.2 Bestrahlung der Tiere

Die lokale Bestrahlung der Tumoren wurde in Anlehnung an die beim Menschen häufig durchgeführten Gaben von relativ geringen täglichen Einzeldosen (hier 2,5 Gy) fraktioniert an fünf (Wochen-)Tagen in Folge vorgenommen. Durch dieses Bestrahlungsschema wurde ein vorübergehender Rückgang oder vorübergehendes Sistieren (PC3-Tumoren) oder zumindest eine Verzögerung des Tumorwachstums (A431-Tumoren) bei den ausschließlich bestrahlten Tieren erreicht.

## 1.3 Ermittlung der Tumorumfänge

Wichtige Kriterien in der Krebstherapie sind Wachstum und Metastasierung der Tumoren. Zahlreiche Versuchsansätze für die Untersuchung der therapeutischen Effizienz neuer Substanzen und deren Einfluss auf Tumorwachstum und -regression in verschiedenen Tumormodellen beruhen auf der Messung des Tumorumfanges. Dies kann am subkutan wachsenden Tumor mit Schieblehren oder Mess-Schablonen einfach durchgeführt werden, und das Wachstum des Tumors lässt sich direkt verfolgen.

Die Quantifizierung der Tumorumfängeverläufe erfolgte in dieser Arbeit durch Messungen der Tumordurchmesser mit einer Schieblehre in jeweils zueinander orthogonalen Raumachsen. Die Messung der Tumordurchmesser stellt in zahlreichen Arbeitsgruppen weltweit eine gängige Methode zur Messung der Tumorgrößen bzw. -umfänge dar. A priori ist keineswegs klar, dass eine solche Messung zu validen Tumorumfängen führt. DEBUS 1992 konnte jedoch durch einen eingehenden Vergleich mit computertomographischen Messungen zeigen, dass der Fehler der Schieblehrenmessung kleiner als 10 % ist und damit unter der biologischen Schwankungsbreite der einzelnen Wachstumsgruppen liegt. Ferner ergab sich, dass die Tumorform für die Schätzung des Volumens keine wesentliche

Rolle spielt. Es kann aber ebenso unter Annahme einer Kugelform aus dem Mittelwert von Breite und Länge valide berechnet werden. FEIN bestätigte 1992 diese Aussagen durch Vergleich mit B-Bild Ultraschalluntersuchungen. Fein errechnete zum Beispiel, dass der größte Beitrag zum Fehler der Schieblehrenmessung bei Untersuchungen an der Ratte aus der Nichtberücksichtigung der Hautdicke resultiert, was zu einer Unterschätzung der Wachstumszeiten führt (STEEL 1977). Aufgrund der dünneren Hautschichten der Maus kann hier jedoch davon ausgegangen werden, dass dieser Fehler im murinen System die Ergebnisse deutlich geringer beeinflusst. Das Tumolvolumen wurde unter Annahme eines kugelähnlichen Körpers durch die Rotationsellipsoid-Methode angenähert, wobei der Korrekturfaktor 0,5 verwendet wurde. Häufig verwendet wird auch z.B.  $\pi/6$ , abgeleitet von der Volumen-Berechnung eines Ellipsoids mit  $V = \pi d^3/6$ , was ca. einem Wert von 0,52 entspricht und damit annähernd identisch ist mit dem in dieser Arbeit verwendeten Korrekturfaktor.

Bei der Vermessung der zu Behandlungsbeginn relativ kleinen Tumoren spielt die Messungengenauigkeit noch eine größere Rolle, während sie mit zunehmender Tumorgöße für die Berechnung des Tumolvolumens nur noch einen geringen Einfluss auf den berechneten Wert hat (WEISS et al. 1990). Die Tumordicke („Tiefe“) wurde bei Berechnungen der Tumorumfänge zunächst berücksichtigt. Dabei wurde der Wert der mittleren Beindicke der Tiere vom gemessenen Wert abgezogen. Es zeigte sich jedoch, dass es durch z.T. erhebliche Schwankungen u.a. durch unterschiedliche Beindurchmesser der Tiere zu Verfälschungen der tatsächlichen Tumordurchmesser kam. Mit einer Annäherung über das Quadrat des gemessenen Breite-Wertes konnte dieser Fehler verringert werden.

#### **1.4 Untersuchung von Tumorgewebe im Versuchszeitraum**

Eine gezielte Betrachtung weniger oder einzelner Aspekte wie z.B. der direkte Einfluss auf die Tumor- oder Endothelzellen bzw. Tumorgefäße oder zelluläre Interaktionen unter dem Einfluss einer oder gar mehrerer zeitgleich verabreichter Wirkstoffe oder Behandlungsmodalitäten ist unter komplexen *in-vivo*-Bedingungen besonders schwierig. Die histologische Untersuchung des Tumors bedingt die Tötung des Tieres und eine „longitudinale“, kontinuierliche Beobachtung des selben Tumors ist nicht möglich. Darin begründet lag zugleich die insgesamt geringe Anzahl

der Tumorentnahmen in den verschiedenen Teilversuchen dieser Arbeit. Die erhaltene Gewebeprobe lieferte somit einen „statischen“ Eindruck zu dem jeweiligen Zeitpunkt im Versuchszeitraum. Eine hier nicht praktikable Alternative würde die Gewinnung von Gewebeproben des Tumors darstellen. Die heterogenen Gewebe- und Gefäßstrukturen des Tumors selbst machen es dann jedoch erforderlich, mehrfache Probeexzisionen zu entnehmen. Bleibt das Tier über den Versuchszeitraum am Leben, so sind nur wenige Biopsien möglich, und es ist wiederum nicht vorhersehbar, ob diese z.B. aus gut oder schlecht vaskularisierten Bereichen des Tumors stammen. Zudem wird dabei das Gewebe traumatisiert und eine Beeinflussung, gerade im Hinblick auf nachfolgende Untersuchungen, kann angenommen werden.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurden die Ergebnisse der begleitend durchgeführten Gewebeuntersuchungen im Zusammenhang mit den durchgeführten Behandlungen und den dabei beobachteten Effekten auf das Wachstum herangezogen und interpretiert. Die erste Entnahme wurde jeweils zu einem relativ frühen Zeitpunkt im Behandlungszeitraum durchgeführt, d.h. bevor bzw. als erste Größenunterschiede zwischen den Behandlungsgruppen deutlich wurden und bevor Nekrosen im Gewebe auch der unbehandelten Tumoren zu erwarten waren, was eine gruppenspezifische Interpretation erschwert.

#### 1.4.1 Bedeutung der Mikrogefäßdichte in Tumoren

Mit der Bestimmung der Gefäßdichte (MVD) in histologischen Präparaten von Tumoren konnten zahlreiche Erkenntnisse über die Rolle der Angiogenese beim Tumorwachstum und der Metastasierung gewonnen werden (WEIDNER et al. 1991). Bei diesem Verfahren werden die Gefäße mit verschiedenen immunhistochemischen Färbetechniken (z.B. Anti-Faktor-VIII; Anti-CD31, Anti-CD34, etc.) dargestellt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Seit der ersten Gefäßdichtebestimmung in Hirntumoren von BREM und Kollegen (BREM et al. 1972) sind nahezu alle häufigen humanen Tumoren mit dieser Methode untersucht worden (HLATKY et al. 2002). Der Nachweis eines Zusammenhanges zwischen der Gefäßdichte in den gefäßreichsten Tumorarealen, den vaskulären Hotspots, und dem Metastasierungsrisiko führte zu einem starken Interesse an dieser Methode. Die Gefäßdichte wurde in Karzinomen des Magens und Rektums, der Speiseröhre, Prostata, Lunge und Zervix sowie in

einigen anderen Tumoren als prognostischer Marker identifiziert (SACLARIDES et al. 1994; YAMAZAKI et al. 1994; DRAY et al. 1995). Allerdings gibt es auch Autoren, die dieses nicht bestätigen (ABULAFIA et al. 1999; BOSTWICK et al. 2000; LEEK 2001; MORETO 2001; PAPAMICHAEL 2001). Außerdem wurde die Mikrogefäßdichte mit der Expression angiogener Zytokine, wie z.B. der Thymidin Phosphorylase, dem bFGF und VEGF positiv korreliert (LI et al. 1994; TOI et al. 1994 und 1995).

In der experimentellen Onkologie wird die MVD vor allem untersucht, um das Ergebnis einer Therapie zu beurteilen, die auf eine Zerstörung bestehender Gefäße (antivaskuläre Therapie) oder auf eine Blockade der Gefäßneubildung (antiangiogene Therapie) abzielt (HLATKY et al. 2002). Dabei stellt die Gefäßdichte ein indirektes Maß für die interkapillare Distanz dar. Es wird davon ausgegangen, dass bei einer erfolgreichen antiangiogenen Therapie die MVD sinkt, da bei einer Blockade der Gefäßneubildung das Tumorzellkompartiment noch weiter wachsen kann, bis die interkapillare Distanz so groß wird, dass die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch die bestehenden Gefäße nicht mehr ausreicht. Bei einer antivaskulären Therapie kann die MVD je nachdem, ob Gefäß- und Tumorkompartiment synchron oder asynchron untergehen, wachsen, steigen oder bei verringerter Tumormasse gleich bleiben. Entsprechend berichten zahlreiche Arbeitsgruppen über z.T. widersprüchliche Ergebnisse nach bzw. während antiangiogener Therapien *in vivo*. Trotz dieses Umstandes wird in der experimentellen Praxis allerdings nur eine Verringerung der MVD als Therapieerfolg gewertet (HLATKY et al. 2002).

Insbesondere im Rahmen von Untersuchungen zur antiangiogenen Tumorthherapie muss berücksichtigt werden, dass auf die komplexen dynamischen Mechanismen während der Tumorangio-genese Einfluss genommen wird. Ein direkter Schluss von der Mikrogefäßdichte auf den funktionellen Status der Gefäße im zeitlichen Verlauf ist daher mit Vorsicht zu betrachten (EBERHARD et al. 2000). Zahlreiche Arbeitsgruppen berichteten in diesem Zusammenhang über eine positive Korrelation der Tumorperfusion mit der MVD (KIESSLING et al. 2003; FAN et al. 2005; ZENK et al. 2005), wobei in der Literatur auch hier widersprüchliche Aussagen zu finden sind (KAN et al. 2005; LI et al. 2005; MILLER et al. 2006).

## 2 Diskussion der Ergebnisse

### 2.1 Das Konzept des kombinierten Einsatzes eines direkten und eines indirekten Angiogenese-Inhibitors

Es wird davon ausgegangen, dass eine antiangiogene Therapie, die zeitgleich an verschiedenen Stellen die durch den Tumor und dessen Mikroumgebung provozierten angiogenen Signalkette(n) unterbricht, effektiver wirken kann als eine Therapie, die nur an einer Stelle angreift. Demzufolge liegt es nahe, dass Kombinationstherapien mit verschiedenen Angriffspunkten effektiver sind als Monotherapien. Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet ist aber in weiten Teilen noch unklar, welche Substanzen dabei das höchste Maß an Synergismus entfalten.

Man geht davon aus, dass Tumoren in der Lage sind, die inhibitorischen Effekte von indirekten Angiogenese-Inhibitoren durch einen Wechsel zu einem anderen proangiogenen Faktor (z.B. von VEGF zu bFGF) umgehen zu können. Tatsächlich zeigten *in-vitro*- wie auch *in-vivo*-Arbeiten ein wechselndes Muster bei der Expression von angiogenen Faktoren im Laufe der Tumorprogression (YOSHIJI et al. 1997; FIDLER 2001). Aufgrund dieser gegebenen Möglichkeit von Tumoren, den durch eine spezifische indirekte antiangiogene Substanz blockierten Signalweg zu umgehen, liegt eine gezielte Kombination mit Inhibitoren der redundanten Signalwege nahe (KERBEL und FOLKMAN 2002). Im Gegensatz dazu wird angenommen, dass das Risiko einer Resistenzausbildung gegenüber direkten Angiogenese-Inhibitoren geringer ist, da diese an den genetisch stabilen Endothelzellen direkt angreifen und ein Umgehen einer Hemmung, wie es etwa die Tumorzellen durch Mutationen erreichen, unwahrscheinlich ist. Zudem wirken direkte Angiogenese-Inhibitoren an dem Ort, an dem verschiedenste angiogene Stimulationssignale eingehen und hemmen dadurch ein breiteres Spektrum proangiogener Stimuli. Wie bereits im Literaturteil (Abschnitt 4.2) beschrieben wurde, konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Endostatin die Antwort von Endothelzellen auf zahlreiche angiogene Proteine wie bFGF, VEGF, IL-8, PDGF und Integrin-vermittelte Stimulation verhindert und dass Tumoren im Mausmodell auch bei wiederholt vorgenommenen Behandlungszyklen mit Endostatin keine Resistenz ausbildeten. Was wiederum nicht bedeutet, dass ein

Wirkungsverlust dieser Substanzen niemals zu erwarten wäre. Erst kürzlich wurde über epigenetische Wirkmechanismen berichtet, die letztlich zu einem verringertem Ansprechen auf direkte Angiogenese-Inhibitoren führten, insbesondere bei deren Einsatz als Monotherapie (KERBEL et al. 2001). Unter der Annahme, dass es sich dabei jedoch weniger um durch Mutationen bedingte als um adaptive Wirkungsverluste handelte, ließe sich dann nach Aussetzen der Behandlung für eine gewisse Zeit wiederum ein erneutes Ansprechen auf die Substanz beobachten (BROWDER et al. 2002).

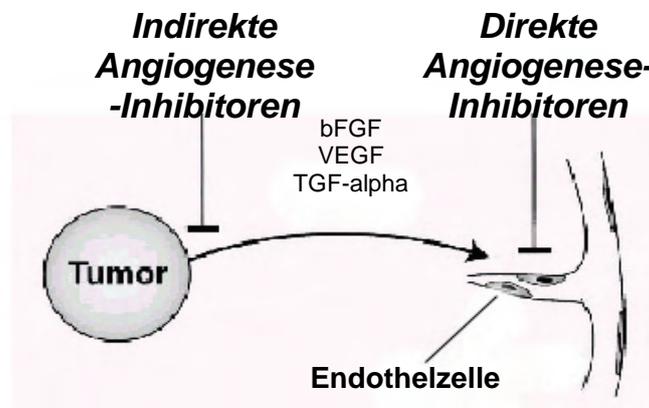


Abb. 37: Wirkmechanismus direkter und indirekter Angiogenese-Inhibitoren (modifiziert nach Kerbel und Folkman, S. 728).

Direkte Angiogenese-Inhibitoren wirken direkt auf Endothelzellen der Gefäßkapillaren, die zum Tumorbett hinzugezogen werden, und verhindern deren Antwort auf unterschiedlichste proangiogene Stimuli. Im Gegensatz zu den direkten interferieren indirekte Angiogenese-Inhibitoren mit den angiogenen Kommunikationssignalen zwischen den Tumorzell- und Endothelzell-Kompartimenten.

In seinen ersten beiden Phase I Studien hat Endostatin als Monotherapie messbare antiangiogene Aktivität gezeigt (EDER et al. 2002). Wie mit Positronen-Emissions-Tomographie-Untersuchungen (PET) nachgewiesen wurde, nahmen mit steigender Dosierung Blutfluss im Tumor wie auch Metabolismus ab. Acht Wochen nach Therapiestart gewonnene Tumorbiopsien zeigten einen signifikanten Anstieg von Tumorzell- und Endothelzell-Apoptose-Raten (HERBST et al. 2002a). Man vermutet, dass die Kombination mit anderen Angiogenese-Inhibitoren oder Chemotherapeutika die Effektivität von Endostatin weiter verbessern würde (HERBST et al. 2002b; THOMAS et al. 2003).

In einer Versuchsreihe wurde das Konzept der Kombination des „direkten“ Angiogenese-Inhibitors Endostatin mit einem synthetischen ATP-kompetitiven Inhibitor der Flk-1/KDR/VEGFR2-Tyrosinkinase als Beispiel eines indirekten Angiogenese-Inhibitors (SU5416) auf mögliche synergistische Effekte am PC3-Prostatakarzinom-Tumormodell *in vivo* untersucht.

### 2.1.1 Einfluss der Behandlung mit Endostatin bei Blockade der VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die bimodale Therapie einer direkten und indirekten Angiogenese-Inhibition starke antitumorale Wirkung *in vivo* entfaltet. Der Vergleich der Tumorumfänge am Ende der Beobachtungszeit der Kontrollgruppe ergab, dass sowohl die Behandlung mit Endostatin und SU5416 allein wie auch die kombinierte Behandlung bei dem hier verwendeten Xenograftmodell zu einem signifikant kleineren Tumorumfang verglichen mit den Kontrolltumoren führte. Die Kombination von Endostatin mit SU5416 verringerte das Tumorumfang weiter und verglichen mit den jeweiligen Einzeltherapien signifikant. Die Wachstumsverzögerung, die anhand der Zeit gemessen wurde, welche die Tumoren benötigten, um das vierfache ihres Ausgangsvolumens zu erreichen, betrug mit 22,1 Tagen das 2,8-fache der ausschließlich mit Endostatin bzw. das 4,8-fache der ausschließlich mit SU5416 therapierten Gruppe. Bemerkenswert ist dabei, dass die Verabreichung von SU5416 und zusätzliche Gabe von Endostatin über lediglich 15 Tage zu einer derartigen Wachstumsverzögerung führte, bei der die Tumoren das fünffache ihres Ausgangsvolumens bis zum Ende der Beobachtungszeit von 60 Tagen im Durchschnitt nicht erreichten und sich ein Tumor sogar dauerhaft zurückbildete.

Unter physiologischen Bedingungen erscheint das Verhältnis von VEGF und Endostatin eng reguliert, während es bei entzündlichen und malignen Krankheitsprozessen aus dem Gleichgewicht gerät (NAGASHIMA et al. 2000; ASAI et al. 2002). Bei Patienten mit hepatozellulärem (DHAR et al. 2002) bzw. Nierenzellkarzinom (FELDMAN et al. 2002) konnten erhöhte Endostatin-Spiegel gemessen werden, welche mit den Spiegeln von zirkulierendem VEGF korrelierten. Daher wird angenommen, dass die Aggressivität des Tumors mit der Bildung von endogenem Endostatin bei Tumorpatienten einhergeht. Ferner fand man, dass metastasierende Tumoren mit erhöhten VEGF-Spiegeln und einem Ungleichgewicht

zwischen proangiogenen Zytokinen und Endostatin assoziiert sind (MIYASHITA et al. 2003). Entsprechend wird davon ausgegangen, dass die antitumoralen Effekte von exogen verabreichtem Endostatin zumindest teilweise über eine Niederregulierung der VEGF-Expression im Tumor vermittelt werden (HAJITOU et al. 2002). Mit Hilfe von Gen-Expressionsanalysen an humanen Endothelzellen (HDMVEC) *in vitro* konnten Mitglieder der Arbeitsgruppe Abdollahi et al. kürzlich zeigen, dass zahlreiche Schlüsselregulatoren der proangiogenen Signalkaskade direkt im Anschluss an eine Behandlung mit Endostatin niederreguliert werden (ABDOLLAHI et al. 2004a). Dies beinhaltet auch mehrere Gene der VEGF-Signalkette, wie z.B. Thrombin-Rezeptoren und HIF-1 $\alpha$ . Durch die Fähigkeit von Endostatin, die VEGF-upstream und -downstream Signale nieder zu regulieren, könnte sich der hier gezeigte funktionelle Synergismus mit VEGF-Rezeptor-Inhibitoren wie SU5416 erklären. Die Ergebnisse unterstützen des weiteren die Annahme, dass Endostatin in der Lage ist, die nach der VEGF-Signal-Blockade hochregulierten alternativen angiogenen Mechanismen zu supprimieren. Obwohl die durch Endostatin vermittelten molekularen Mechanismen nicht vollständig bekannt sind, die letztlich zu einer Hemmung des Tumorwachstums führen, konnte gezeigt werden, dass Endostatin die Stimulation von Endothelzellen durch diverse proangiogene Stimuli verhindert, indem es intrazelluläre Signale antagonisiert. Das dadurch bedingte breitere Spektrum der Hemmung könnte, gerade wenn man die bei verschiedenen Tumoren nachgewiesene Heterogenität bezüglich der komplexen Mechanismen der Gefäßbildung betrachtet, die stärkere Wirkung des kombinierten Einsatzes erklären.

Bei der histologischen Untersuchung von Tumorgeweben am Tag 10 nach Therapiestart konnten starke Veränderungen bei sämtlichen Geweben der Behandlungsgruppen im Vergleich zum Kontrolltumorgewebe festgestellt werden. Die Ursache dafür liegt am ehesten in der hemmenden Wirkung der Substanzen auf die Gefäßversorgung der Tumoren, was dann zu einer schlechteren Blutversorgung und dadurch bedingt zu einer vermehrten Metabolitenanreicherung und mangelnden Versorgung mit Nährstoffen in den Tumoren führte. Die Veränderungen wie die signifikant verringerten Proliferationsraten der Tumorzellen, die zahlreichen nekrotischen Areale und Zelluntergänge und die bereits zu diesem frühen Zeitpunkt deutliche Zunahme von Bindegewebs-Strukturen in den Tumorstromata könnten als Folge dieser Mangelversorgung gesehen werden. Einen weiteren Hinweis, dass die

Behandlungen wahrscheinlich zu Defekten an den Gefäßen geführt haben, geben Erythrozyten, die außerhalb von Gefäßen im Gewebe der Endostatin- und Kombinationsgruppe lagen. Es fiel zudem auf, dass die Proliferationsraten der Tumorzellen bei der Kombinationsgruppe mit 19,7 % auffallend stark erniedrigt war. Dies könnte ebenso mit dem zuvor erläuterten breiteren hemmenden Spektrum auf die Gefäßversorgung der kombinierten Therapie erklärt werden, welches bereits früh größere antiangiogene bzw. antitumorale Effekte erzielen konnte, und im folgenden eine messbar geringere Größenzunahme als bei den einfach therapierten Gruppen zuließ. Bei Betrachten der Wachstumskurven werden Unterschiede diesbezüglich ab ca. Tag 20 ersichtlich. Dass es weiter bis zum Ende zu starken antiangiogenen bzw. antitumoralen Effekten durch die jeweiligen Behandlungen gekommen sein musste, die dennoch weitere Größenzunahmen der Tumoren zuließen, lassen die am Ende des Untersuchungszeitraums untersuchten Gewebe vermuten. Diese wiesen ein Bild auf, bei dem das Tumorstroma überwog bei gleichzeitig starker, bei der Kombinationsgruppe bis hin zu fast vollständiger Verdrängung der Tumorzellen.

Die beschriebenen Ergebnisse korrelieren gut mit denen weiterer Untersuchungen von Abdollahi et al.: Auch *in vitro* zeigte die Kombination von Endostatin mit SU5416 hinsichtlich Endothelzell-Proliferation, klonogenem Überleben, Migrationsverhalten und Röhrenformation (Tubenbildung) der Endothelzellen sowie Apoptose-Induktion größere Effekte als die jeweilige Therapie allein (ABDOLLAHI et al. 2003b). Schließlich zeigten SU5416 und Endostatin wachstumsverzögernde und zytotoxische Wirkung auch an PC3- und Humanes Glioblastom U87-Tumorzellkulturen, wobei auch hier die Kombinationstherapie größere Effekte entfaltete (ABDOLLAHI et al. 2003b). Es muss jedoch betont werden, dass diese Effekte deutlich geringer ausfielen verglichen mit den Effekten auf die Endothelzellen. Die Ergebnisse legen dennoch die Vermutung nahe, dass auch in der hier vorliegenden Studie die insgesamt beobachteten antitumoralen Effekte nicht ausschließlich durch eine Hemmung der Gefäßbildung und eine letztlich dadurch bedingte mangelnde Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen bedingt waren, sondern möglicherweise auch durch eine direkte Wirkung auf die Tumorzellen selbst verursacht wurden. Tatsächlich konnte mittlerweile, wie schon zuvor erwähnt, die Expression des VEGF-Rezeptors bei Prostatakarzinomen nachgewiesen werden, nicht jedoch bei PC3-Zellen (s. auch Abschnitt 1.1.1). Der Mechanismus, über den Endostatin seine

Wirkung an den Tumorzellen erzielt, ist nicht bekannt. Demzufolge bedarf es der weiteren Abklärung, um herauszufinden, wie diese Wirkstoffe ihre *in-vitro*-Aktivität gegen Tumorzellen entfalten.

Neben dem in dieser Arbeit verwendeten Modell des PC3 Prostata-Karzinoms wurden die Substanzen außerdem auch anhand des U87-Glioblastoms evaluiert (ABDOLLAHI et al. 2003b). Das Glioblastom wurde als Beispiel für einen äußerst aggressiven Tumor gewählt, welcher sich zudem weitgehend resistent gegen bisherige verfügbare Behandlungsverfahren zeigt. Weniger als 10 % der Patienten erreichen eine Überlebenszeit von einem Jahr. Beachtlich ist daher, dass die kombinierte Behandlung mit SU5416 und Endostatin zu einer verstärkten Hemmung des Tumorwachstums bei dieser äußerst schnell wachsenden Tumorart ab Tag 12 verglichen mit den einzeln eingesetzten Substanzen führte. Um die Blutperfusion der Tumoren zu analysieren, fand zudem das nicht-invasive Verfahren der intermittierenden, bolus-kontrastverstärkten Sonographie Anwendung. Sowohl in der Endostatin- als auch in der SU5416-Behandlungsgruppe ließ sich eine im Vergleich zur Kontrollgruppe deutliche Reduktion der Blutperfusion zehn Tage nach dem Start der antiangiogenen Therapie nachweisen, während die Kombination von Endostatin und SU5416 die Perfusion weiter verringerte als eines der Medikamente allein. Schließlich gelang es, die Angiogenese unter dem Einfluss dieses Behandlungskonzepts direkt am lebenden Tier durch Intravitalmikroskopie an einem neuartigen kraniellen Fenster-Modell zu studieren: Nach der Implantation eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (A549) in einer Vertiefung der Kalotte von SCID-Mäusen konnte anhand eines intra-ossären Tumorfensters gezeigt werden, dass die antiangiogenen Effekte bei der Behandlung mit Endostatin und SU5416 signifikant stärker ausgeprägt waren als bei der jeweiligen Monotherapie, wie anhand der Reduktion der funktionellen Gefäßdichte deutlich wurde (ABDOLLAHI et al. 2003b). Zusammen mit diesen Ergebnissen können die hier beobachteten Tumorwachstums-Verzögerungen, bis hin zur Tumorkontrolle bei der Kombinationsgruppe, zumindest teilweise durch eine Hemmung der Angiogenese erklärt werden.

Zusammenfassend legen die vorliegenden Ergebnisse nahe, dass sich durch die Kombination von Angiogenese-Inhibitoren mit unterschiedlichen Angriffspunkten tatsächlich eine größere Wirksamkeit erzielen lässt. Die Gültigkeit dieses Prinzips wurde bereits für die Kombination von Endostatin mit Angiostatin (BERGERS et al.

1999) und Endostatin mit Chemotherapeutika (TE VELDE et al. 2002) gezeigt. Demgegenüber wurde durch eine kombinierte Rezeptorblockade von VEGF und EGF mit Blockern der Rezeptor-Tyrosinkinasen derselben Familie keine gesteigerte Antitumor-Aktivität erreicht. Erst die Kombination von VEGFR- bzw. EGFR-Blockade mit Gemcitabin führte zu supra-additiven Effekten (BAKER et al. 2002).

## **2.2 Das Konzept des kombinierten Einsatzes von Bestrahlung und Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibition**

Wie bereits im Literaturteil (Abschnitt 5.1) dargestellt wurde, ist die Effizienz einer kombinierten Hemmung der VEGF- bzw. PDGF-Rezeptoren bei unterschiedlichen Tumormodellen bereits nachgewiesen. Eine Versuchsreihe befasste sich mit der Frage, inwieweit diese gesteigerte Wirkung einer kombinierten Hemmung durch die Substanzen SU5416 und SU6668 bei zusätzlich durchgeführter lokaler Bestrahlung die Therapieeffekte bei soliden Tumoren weiter steigern können.

### **2.2.1 Einfluss einer Blockade der VEGF- und PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinasen und deren Kombination mit Bestrahlung**

Bei dieser Versuchsreihe zeigte die Kontrollgruppe einen Wachstumsverlauf, bei dem die Tumoren das zwei- bzw. fünffache des Tumorumens zu Beginn der Behandlung nach 17 bzw. 37 Tagen erreichten. Die jeweils mit SU5416 oder SU6668 durchgeführten Monotherapien (wie auch sämtliche anderen Behandlungen in dieser Versuchsreihe) führten zu signifikant kleineren Tumorumina am Tag 50 der Beobachtungen. Bei den kombiniert mit SU5416 und SU6668 behandelten Gruppen waren diese antitumoralen Effekte gegenüber den jeweils einfach-behandelten Gruppen weiter verstärkt. Die Wachstumsverzögerung betrug hier, gemessen als Zeit bis zur Volumenverdopplung, 28 Tage. Bis zum Ende der Beobachtungen in dieser Gruppe (Tag 54) hatten sie das 5-fache ihres Ausgangsvolumens nicht erreicht. Die stärkeren antitumoralen Effekte der Kombination von SU5416 und SU6668 bestehen demnach trotz ihrer teilweise identischen Wirkmechanismen, wobei erstgenannte Substanz, wie in Abschnitt 2.1.1 bereits beschrieben, spezifisch VEGFR-2 inhibiert, während SU6668 mit dem Angriff an den Rezeptoren von PDGF, FGF und VEGF ein breiteres Spektrum aufweist.

Zieht man zunächst die wichtigen Rollen von VEGF, FGF und PDGF sowie ihrer korrespondierenden Rezeptoren bei der Angiogenese in Betracht, sollte man für einen Inhibitor mit entsprechend breitem Spektrum wie SU6668 eine höhere Effektivität annehmen als durch eine alleinige Blockade der VEGF-Signal-Transduktion (GRIFFIN et al. 2002; NING et al. 2002). Tatsächlich fällt bei

Betrachten der Wachstumskurven der hier verwendeten, relativ langsam subkutan wachsenden PC3-Tumoren auf, dass sie bei der ausschließlich mit SU5416 behandelten Gruppe im Vergleich zur ausschließlich mit SU6668 behandelten Gruppe zunächst ähnlich verlaufen (bis ca. Tag 30) und die Wachstumsverzögerungen bis zur Volumenverdopplung mit 14 bzw. 15 Tagen annähernd gleich groß sind. Während im späteren Verlauf (bis zum Erreichen des fünffachen des Anfangsvolumens) die mit SU6668 behandelten Tumoren ein deutlich langsames Wachstum aufweisen und die Wachstumsverzögerung mit 42 Tagen verglichen mit der ausschließlich VEGF-inhibierten Gruppe das 3,8-fache beträgt. Bedeutend dabei erscheint der weitere Angriffspunkt von SU6668 an Perizyten, der durch die Blockade ihrer PDGF-Rezeptoren vermittelt wird. Es zeigte sich, dass bei Blockade von PDGFR die Anlagerung von Perizyten an die Gefäße inhibiert und die Gefäßdichte vermindert waren (BERGERS et al. 2003; ERBER et al. 2004). In diesen Erkenntnissen wird die Begründung für die größere Effektivität von SU6668 gegen Tumoren im fortgeschrittenen Stadium und mit bereits etabliertem Gefäßnetzwerk gesehen. Während die ausschließliche Hemmung von VEGF seine größte Wirkung bei Tumoren in Frühstadium entfaltet und weitgehend wirkungslos bei Spätstadien war (s. auch Literaturübersicht, Abschnitt 4.1 und 5.1). Damit könnte auch hier angenommen werden, dass SU6668 aufgrund der zusätzlichen Wirkung auf Perizyten insbesondere bei den größeren Tumorstadien mit weiter entwickelten Gefäßen besser wirkte verglichen mit SU5416. Bei weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe am Modell des äußerst schnell wachsenden Glioblastoms U87 konnten keine entsprechend gesteigerten Effekte beobachtet werden (ABDOLLAHI et al., in Revision).

Bei den bereits im Literaturteil dargestellten Untersuchungen am Pankreas-Inselzell-Karzinom-Tumormodell (Maus) sowie beim C6-Gliom der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der Kombination beider Substanzen (SU5416 und SU6668) in allen Tumorstadien signifikant größer war als die jeweilige Monotherapie (ERBER et al. 2004). Demzufolge könnten die beiden Angiogenese-Inhibitoren durch ihren Angriff an zwei verschiedenen Zellpopulationen der Neovaskulatur sich ergänzende, komplementäre Effekte entfalten und auch bei diesen Untersuchungen letztlich zu einer stärkeren Hemmung des Tumorwachstums geführt haben. Zieht man die Ergebnisse von *in-vitro*-Versuchen der Arbeitsgruppe ABDOLLAHI und

Kollegen heran, fand sich aber auch für die Endothelzellen allein ein deutlich besseres Ansprechen auf die Kombination dieser beiden RTK-Inhibitoren verglichen mit den jeweils einzeln eingesetzten Substanzen (ABDOLLAHI et al., in Revision). Diese Ergebnisse könnten zu erklären sein durch eine nur inkomplette Blockade des VEGF-Signals durch SU6668, welche erst durch die Kombination mit SU5416 vervollständigt wird. Gleichzeitig muss man in der „downstream“-Signalkaskade, d.h. welche der durch SU5416 blockierten RTK nachgeschaltet ist, einen Bypass-Mechanismus annehmen, welcher durch SU6668 blockiert wird. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass nach alleiniger Hemmung von VEGFR-2 vermehrt Perizyten um Tumorgefäße rekrutiert wurden (ERBER et al. 2004). Zudem konnte dabei die vermehrte Expression des „endothelzell-schützenden“ Faktors Angiopoietin-1 in den Perizyten nachgewiesen werden, womit angenommen werden kann, dass Perizyten neben der durch ihre Anlagerung an Endothelzellen bedingten Stabilisierung auch durch die Bildung von Signalstoffen, die das Überleben von Endothelzellen sichern, zum Bestehen der Gefäße beitragen.

Bei der histologischen Untersuchung von Tumorgewebe am Tag 24 und am Beobachtungsende konnten deutliche Veränderungen bei sämtlichen Geweben der mit Angiogenese-Inhibitoren behandelten Gruppen im Vergleich zum Kontrolltumorgewebe festgestellt werden, was darauf hinweist, dass es zu starken antiangiogenen bzw. antitumoralen Effekte durch die jeweiligen Behandlungen gekommen sein muss. Die Ursache dafür liegt aufgrund der bisher vorliegenden Erkenntnisse hinsichtlich der Wirkweise der Substanzen am ehesten in der hemmenden Wirkung der Substanzen auf die Gefäßversorgung der Tumoren, was dann zu einer schlechteren Blutversorgung und dadurch bedingt zu einer Mangelversorgung mit Nährstoffen der Tumoren führte. Die Veränderungen wie die signifikant verringerten Proliferationsraten der Tumorzellen, die zahlreichen nekrotischen Areale und Zelluntergänge und die bereits deutliche Zunahme von Bindegewebs-Strukturen in den Tumorstromata könnten als Folge dieser Mangelversorgung gesehen werden. Tatsächlich war die Anzahl der Gefäße in allen mit Angiogenese-Inhibitoren behandelten Tumoren signifikant erniedrigt. Einen weiteren Hinweis, dass die Behandlungen sehr wahrscheinlich auch zu Defekten an den Gefäßen geführt haben, geben Erythrozyten, die außerhalb von Gefäßen im Gewebe der mit Angiogenese-Inhibitoren behandelten Gruppen lagen.

Ein weiterer interessanter Aspekt ergibt sich aus Ergebnissen von *in-vitro*-Untersuchungen: beide RTK-Inhibitoren zeigten eine wachstumsverzögernde und zytotoxische Wirkung auch an PC3- und U87-Tumorzellkulturen, wobei auch hier wiederum die Kombinationstherapie größere Effekte entfaltete als die einzeln eingesetzten Substanzen (ABDOLLAHI et al., in Revision). Die Wirkung von SU6668 lässt sich durch die Tatsache erklären, dass viele solide Tumoren inklusive des Prostatakarzinoms und Glioblastoms PDGF sowie seinen korrespondierenden Rezeptor als Teil eines autokrinen Stimulationsmechanismus exprimieren (TAKEUCHI et al. 2004). Unklar ist jedoch, wie schon im vorausgegangenen Abschnitt dargestellt wurde, wie SU5416 seine *in-vitro*-Aktivität gegen diese Tumorzellen entfaltet. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass auch in der hier vorliegenden Studie die insgesamt beobachteten antitumoralen Effekte durch die Behandlungen mit Angiogenese-Inhibitoren nicht ausschließlich durch eine Hemmung der Gefäßbildung und eine letztlich dadurch bedingte mangelnde Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen bedingt waren, sondern möglicherweise auch durch eine direkte Wirkung der Angiogenese-Inhibitoren auf die Tumorzellen.

Alles in allem ist die gesteigerte antitumorale Aktivität einer Kombination von SU5416 und SU6668 wahrscheinlich Ausdruck mehrerer sich ergänzender Mechanismen, welche die Tumorzellen selbst, das Endothelzellkompartiment und auch die Interaktion zwischen Endothel und Perizyten betreffen.

Dabei lassen sich die zuvor in diesem Punkt aufgeführten Überlegungen auch auf die Beobachtungen der zusätzlich bestrahlten Tumoren übertragen. Die RTK-Inhibition war in der Lage, die Antitumoraktivität der fraktionierten Bestrahlung in einer relativ geringen Gesamtdosis deutlich zu steigern. Eine zusätzlich durchgeführte Bestrahlung führte zu einem signifikant größeren wachstumshemmenden Effekt verglichen mit den entsprechenden ausschließlich mit SU5416 bzw. SU6668 therapierten Gruppen. Und ähnlich wie bei den zuvor beschriebenen Beobachtungen der ausschließlich mit den RTK-Inhibitoren behandelten Gruppen fiel auf, dass beide TK-Inhibitoren das Wachstum zunächst ähnlich stark hemmten und die SU6668-Bestrahlungskombination in der späteren Beobachtungszeit effektiver wirkte. Ähnliche Effekte zeigten sich bei den bereits zuvor erwähnten Untersuchungen am Tumormodell U87 (ABDOLLAHI et al., in Revision). Auch in *in-vitro*-Untersuchungen hatte die zusätzlich zur Hemmung des VEGFR-2 bzw. PDGFR durchgeführte

Bestrahlung bei Endothelzellen (HUVEC) eine deutlich größere Verminderung der Proliferation, Migration, Tubenbildung und des klonogenen Überlebens zur Folge (ABDOLLAHI et al. 2003a).

Es ist bekannt, dass eine Bestrahlung die Produktion von Wachstumsfaktoren durch Tumorzellen sowie die Expression der korrespondierenden Rezeptoren der Endothelzellen induziert. Zudem ergaben neuere Untersuchungen, dass darauf folgend die Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signaltransduktion aktiviert wird, welche anti-apoptotisch wirkt und dies wiederum zum Überleben der Endothelzellen führt (GERBER et al. 1998; EDWARDS et al. 2002; BISCHOF et al. 2004; BROWN et al. 2004; s. dazu auch nachfolgenden Abschnitt). Während dies zunächst nur für die Aktivierung des VEGFR-2 nachgewiesen wurde, weiß man heute, dass auch andere Rezeptor-Tyrosinkinasen der EGFR-Familie zu einer Phosphorylierung von Akt führen und somit anti-apoptotisch wirken (CONTESSA et al. 2002). Erst kürzlich konnte die Radiosensibilisierung durch SU6668 der Unterbrechung dieses Überlebens-Signals zugeschrieben werden (LU et al. 2004). Gleichzeitig fand man aber auch, dass diese Blockade nur inkompletter Natur ist, was dafür spricht, dass die verbliebene Akt-Phosphorylierung Folge einer anderen, nicht durch SU6668 affizierten Rezeptorstimulation ist, oder dass die VEGF-Blockade durch SU6668, wie bereits erörtert, insuffizient ist. Die hier vorliegenden Ergebnisse mit dem ausgeprägtesten wachstumshemmenden Potential bis hin zur Tumorkontrolle schon bei einer Kombination von Radiotherapie mit SU6668 sind diesbezüglich bemerkenswert. Die Effekte dieser Kombination waren derart stark ausgeprägt, dass die Tumoren im Beobachtungszeitraum (99 Tage) im Schnitt lediglich das zweifache ihres Volumens zu Beginn der Behandlungen erreichten und bei zwei Tieren eine Tumorkontrolle bzw. Rückbildung beobachtet wurde. Durch die zusätzliche Verabreichung des selektiven VEGFR2-Hemmers konnte die zuvor am U87-Tumormodell erzielte größere Hemmung des Tumorwachstums (ABDOLLAHI et al., in Revision) bei diesen Untersuchungen nicht beobachtet werden. Berücksichtigt werden muss dabei, dass es sich bei dem U87-Glioblastom um einen anderen und zudem deutlich schneller wachsenden Tumor handelt, und die Behandlungskonzepte zu Verzögerungen des Tumorwachstums führten, nicht jedoch zu einer Tumorkontrolle, wie sie zum Teil bei dem hier verwendeten PC3-Modell bei kombinierter Bestrahlung beobachtet wurde. Die bei PC3 ausgebliebene größere

Wachstumshemmung durch die Dreifachkombination könnte somit mit der bereits hochwirksamen SU6668-Bestrahlungskombination erklärt werden. Das Ergebnis lässt noch eine weitere Vermutung zu: Die Hemmung des VEGF könnte bei dieser Tumorart eine geringere Rolle spielen. Unabhängig von diesem Signalweg könnten weitere angiogene Mechanismen bedeutend sein. In diesem Zusammenhang muss auch bedacht werden, dass die Behandlung mit SU5416 bei diesen Untersuchungen stark belastend für die Tiere schien, was nicht zuletzt die Effekte auf die Tumoren beeinflusst haben könnte (siehe dazu Abschnitt 2.5).

Insgesamt gehen die Ergebnisse der Untersuchung der Tumorgewebe im Versuchszeitraum konform mit der beobachteten Wachstumshemmung und damit letztlich antitumoralen Wirkung der angewendeten Behandlungskonzepte. Am stärksten waren die strukturellen Veränderungen bei den kombiniert mit Angiogenese-Inhibitoren und ionisierender Bestrahlung behandelten Tieren. Am Tag 50 war nur noch eine geringe Anzahl an Tumorzellen in den Anschnitten zu sehen. Es fiel zudem auf, dass das Tumorgewebe der RT+SU6668-Gruppe bei der Entnahme am Tag 50 weitgehend nekrotisch war, wodurch sich eine histologische Untersuchung erübrigte. Zieht man die Ergebnisse der immunhistochemischen Bestimmung der Gefäßdichten und der Proliferationsraten der Tumorzellen der Behandlungsgruppen am Tag 24 heran, und damit bevor Unterschiede im Wachstum zwischen den antiangiogen therapierten Bestrahlungsgruppen deutlich wurden, fiel bei dem dreifachbehandelten Tier die verglichen mit den anderen Gruppen sehr stark reduzierte Gefäßdichte neben der geringsten Proliferationsrate der Tumorzellen auf. Daher könnte angenommen werden, dass die Dreifach-Kombination durchaus verstärkte Effekte hervorgerufen hat, die jedoch nicht zu messbaren Größenunterschieden führte.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Ergebnisse der Versuchsreihe das kürzlich vorgestellte Konzept eines Synergismus der kombinierten VEGF- und PDGF-Rezeptorblockade unterstützen. Auch die zuvor beschriebenen Überlegungen bezüglich einer „insuffizienten“ Hemmung der Angiogenese durch SU6668 werden bekräftigt. Es wird jedoch auch ersichtlich, dass dieses kombinierte Behandlungskonzept, selbst bei relativ hohen Dosierungen der Angiogenese-Inhibitoren, nicht zu einer Tumorkontrolle führt, zumindest nicht bei dem hier verwendeten PC3- und dem weiteren von der Arbeitsgruppe verwendeten U87-

Tumor. Die Vermutung liegt daher nahe, dass viele spontane Tumoren des Menschen dadurch nicht effektiv therapiert werden können. Dem entgegen konnte gezeigt werden, dass sich die günstigen Effekte einer Kombination von Radiotherapie bei gleichzeitiger Rezeptor-Tyrosinkinase-Blockade deutlich steigern lassen. Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang mit der bereits mehrfach nachgewiesenen Radiosensibilisierung durch einzelne RTK-Inhibitoren (GORSKI et al. 1999; GRIFFIN et al. 2002; NING et al. 2002; LU et al. 2004). Dabei erzielte die Substanz SU6668, die ein breiteres Spektrum an Tyrosinkinasen hemmt, bereits eine starke Wachstumshemmung bis hin zur Tumorkontrolle. Eine weitere Steigerung der Hemmung des Tumorwachstums durch die zusätzliche Verabreichung von SU5416 konnte bei dem hier verwendeten Tumor nicht beobachtet werden.

## 2.3 Das Konzept des kombinierten Einsatzes von Bestrahlung und einer $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Blockade

Bekannt ist mittlerweile, dass die integrin-abhängigen Signalwege ähnlich denen sind, welche durch Wachstumsfaktoren wie VEGF getriggert werden, und dass sie miteinander gekoppelt sind. Daraus kann man folgern, dass der Integrin-Signalweg eine bedeutende Rolle bzgl. der Sensitivität der Endothelzellen gegenüber Bestrahlung spielen könnte (siehe dazu Abschnitt 2.2). Zielsetzung von zwei weiteren Versuchsreihen war es daher, den Effekt eines kürzlich beschriebenen synthetischen kleinmolekularen Peptid-Antagonisten von  $\alpha_v$ -Integrinen (S247), kombiniert mit Bestrahlung eingesetzt, auf das Wachstum von soliden Tumoren *in vivo* zu untersuchen. Diese Kombination wurde am Prostatakarzinom PC3 sowie an einem weiteren Tumor-Xenograft untersucht, dem humanen Epidermoid-Karzinom A431.

### 2.3.1 Einfluss einer lokalen Bestrahlung bei gleichzeitiger Integrin-Blockade auf Tumoren

Die Daten der PC3-Versuchsreihe zeigen, dass sowohl die Bestrahlung als auch die Behandlung mit S247 zu deutlichen antiangiogenen bzw. antitumoralen Effekten führten. Die Behandlungen führten dabei zu signifikant kleineren Tumoren. Des Weiteren konnte eine deutlich verstärkte Hemmung bei dem kombinierten Einsatz des Angiogenese-Inhibitors und der Radiotherapie gegenüber den jeweiligen Monotherapiegruppen ermittelt werden. Die Wachstumsverzögerung war derart ausgeprägt, dass die Tumoren im Schnitt das zweifache ihres Anfangsvolumens im Versuchszeitraum (54 Tage) nicht erreichten und bei 3 Tieren eine Rückbildung bzw. andauernde Hemmung des Wachstums beobachtet werden konnten. Die Tumor-Histologien zeigten bereits früh (Tag 10) deutliche Veränderungen, die bei der Kombinationsgruppe am ausgeprägtesten erschienen, wo insbesondere die weiter (signifikant) verringerte Tumorgefäßzahl und Tumorzellproliferation auffielen. Diese Hinweise auf eine verstärkte antitumorale Wirkung bei kombinierter Behandlung zeichnen sich beim Betrachten der Wachstumskurven bereits in der ersten Hälfte des Behandlungszeitraums durch geringere Tumorumfänge ab.

Nachdem diese Kombination am PC3-Modell deutliche Effekte gezeigt hat, wurde sie an einem weiteren Tumormodell getestet, dem humanen A431-Xenograft. Dieser Tumor weist im Vergleich zu PC3 ein wesentlich schnelleres subkutanes Wachstum auf, wodurch die mit 11 (Kontroll-) bzw. 13 (Therapiegruppen) Tagen kurzen Beobachtungszeiträume bedingt waren. Wie bei den Untersuchungen am PC3-Modell führte die Kombination auch bei A431 zu signifikant kleineren Tumorumfängen verglichen mit den jeweils einfach-therapierten Gruppen. Mit einer Wachstumsverzögerung von 9,6 Tagen (Volumen-Verdopplungszeit) wurde eine verstärkte Hemmung bei dem kombinierten Einsatz des Angiogenese-Inhibitors und der Radiotherapie gegenüber den jeweiligen Monotherapiegruppen ermittelt (4,1 Tage für Gruppe S247 bzw. 3,2 Tage für Gruppe RT). Keine der Behandlungen führte zu einem wie bei dem PC3-Modell beobachteten Sistieren des Wachstums. Im Hinblick auf das aggressive Wachstumsverhalten dieses Tumors sind die beobachteten antitumoralen Effekte insbesondere der Kombination jedoch beachtlich.

Die Antagonisierung von Integrinen hat sich mittlerweile als erfolgreiche Strategie mit antitumoraler Wirkung bei unterschiedlichen Krebsmodellen herausgestellt (HOOD et al. 2002; REINMUTH et al. 2003; STOELTZING et al. 2003; TRIKHA et al. 2002; BUERKLE et al. 2002). Auch bei diesen Untersuchungen konnte durch die alleinige Integrin-Hemmung ein bemerkenswert langsames Wachstum beobachtet werden, wenngleich sie nicht annähernd zu einer Tumorkontrolle führte.

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass Integrine wie  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_5\beta_1$  bei der Gefäßbildung und dem Wachstum von Tumoren eine Schlüsselrolle einnehmen (HOOD et al. 2002; LIVANT et al. 2000; SEFTOR et al. 1998; REINMUTH et al. 2003). Jedoch besteht Unklarheit über die durch Integrine vermittelten Mechanismen im Rahmen angiogener Signalwege. Inzwischen bekräftigen teilweise widersprüchliche Aussagen die Annahme, dass in Verbindung mit Integrinen weitaus komplexere Signalkaskaden und Interaktionen existieren als zunächst angenommen wurde (BRAKEBUSCH et al. 2002; CARMELIET 2002; REYNOLDS et al. 2002; SHEPPARD 2002). Bekannt ist, dass Integrin-abhängige Signalwege ähnlich denen sind, welche durch Wachstumsfaktoren getriggert werden, und dass diese zudem eng miteinander gekoppelt sind. So ist zum Beispiel das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  physiologischerweise mit der Expression von VEGFR2 assoziiert und führt zu einer Verstärkung der VEGF-Signalkaskade. Des Weiteren kooperieren die Integrin-

vermittelte Aktivierung und deren nachfolgend ablaufende Signalketten an der Zelloberfläche mit VEGFR2 und unterhalten die Proliferation, Migration sowie Überlebenssignale in Endothelzellen (Abb. 38; HYNES 2002; RUOSLAHTIE 2002). Zudem haben Untersuchungen zur Integrin-Blockade gezeigt, dass die bFGF-vermittelte Angiogenese von dem Integrin  $\alpha_v\beta_3$  abhängt (RUOSLAHTIE 2002). Bei zuvor durchgeführten *in-vitro*-Untersuchungen der Arbeitsgruppe wie auch bei anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass S247 zu deutlichen Effekten an Endothelzellen führt, wie etwa zu einer starken Hemmung der Proliferation und Migration bzw. erhöhten Apoptose (REINMUTH et al. 2003; ABDOLLAHI et al. 2005). Somit könnte aufgrund theoretischer Überlegungen die Mechanismen von Integrin und dessen Antagonist betreffend, sowie aufgrund der Befunde der Arbeitsgruppe bzw. der Literatur argumentiert werden, dass der wachstumsverzögernde Effekt tatsächlich durch die Hemmung der Angiogenese bedingt war.

Die Ergebnisse lassen weiter vermuten, dass es durch die kombinierte Behandlung mit dem Integrin-Hemmer und ionisierender Bestrahlung und somit den Angriff sowohl auf die Tumervaskulatur als auch auf die Tumorzellen zu deutlich synergistischen Effekten gekommen sein muss. Entsprechende Beobachtungen konnten auch bei einem weiteren Tumormodell, dem humanen Glioblastom (U87) gemacht werden, bei dem es sich um einen ähnlich schnell wachsenden Tumor wie A431 handelt, und bei dem ab Tag 6 eine Verzögerung des Wachstums gegenüber der einfach-therapierten Gruppen ersichtlich wurde (ABDOLLAHI et al. 2005).

In diesem Zusammenhang sind auch die Erkenntnisse von Interesse, dass wie bereits im Abschnitt zuvor geschildert wurde, Bestrahlung zur Bildung von VEGF und bFGF in Tumorzellen sowie zu einer Hochregulation von VEGFR2 in Endothelien führt. Darauf folgend kommt es zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signaltransduktion, welcher eine Schlüsselposition bei der Verhinderung der Apoptose dieser Zellen zugesprochen wird. Eine Signalkette, die mittlerweile auch für andere Rezeptor-Tyrosinkinasen der EGFR-Familie nachgewiesen wurde, deren Aktivierung eine Phosphorylierung von Akt nach sich zieht und somit anti-apoptotisch wirkt.

In Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass nach Bestrahlung die Expression von  $\alpha_v\beta_3$  in humanen Endothelzellen induziert wird (ABDOLLAHI et al. 2005). Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass die strahleninduzierten Integrin-vermittelten Signalwege unter anderem ebenfalls über eine Hochregulierung der phosphorylierten Akt (auch pAkt) ablaufen und dass eine Hemmung mit einem Integrin-Inhibitor zu einer Reduzierung von pAkt in Endothelzellen führt (Abb. 38).

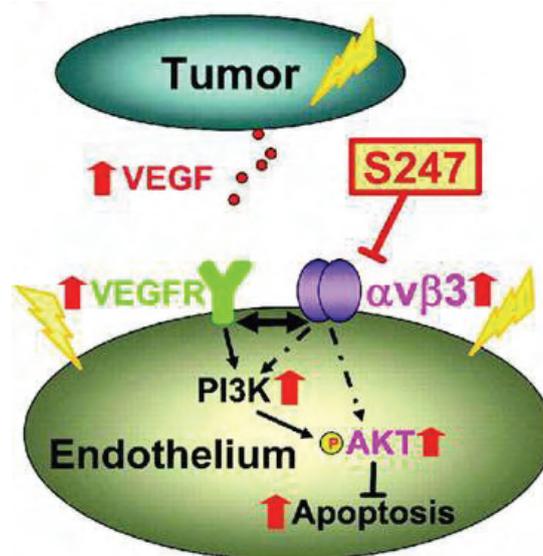


Abb. 38: Schema der strahleninduzierten Survival-Signalkette (aus ABDOLLAHI et al. 2005). Bestrahlung führt zur vermehrten Bildung von VEGF in Tumorzellen und gleichzeitig zur Hochregulation von VEGF-Rezeptor-2 und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen an Endothelien. Die Aktivierung des nachgeschalteten Signalwegs führt dann zur Bildung des anti-apoptotischen Akt-Proteins. Dadurch ist eine verstärkte Resistenz der Endothelzellen gegenüber Bestrahlung bedingt, welche wiederum durch S247 verhindert werden kann.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die pro-apoptotischen Effekte einer Bestrahlung auf Endothelzellen unter *in-vitro*-Bedingungen durch die Anwesenheit von VEGF und bFGF unterdrückt werden (PARIS et al. 2001; ABDOLLAHI et al. 2003a; SCHUENEMANN et al. 2003; BISCHOF et al. 2004). Daher liegt die Annahme nahe, dass hohe lokale Konzentrationen von VEGF und bFGF in der Mikroumgebung von Tumoren zu einer vermehrten Resistenz gegenüber der Strahlenwirkung beitragen könnten, indem sie hochspezifische radioprotektive Effekte an VEGFR2- und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiven Endothelzellen des Tumors

induzieren. Wie im Abschnitt zuvor diskutiert wurde könnte demnach angenommen werden, dass zum einen durch ein Behandlungskonzept, bei dem Radiotherapie mit einem Wirkstoff kombiniert eingesetzt wird, der bFGF, VEGF oder deren Rezeptoren (VEGFR2) blockiert, selektiv die pro-apoptotischen Effekte der Bestrahlung gegen aktivierte Endothelzellen gehemmt werden. Oder aber wie hier demonstriert ist, durch die Kombination von Radiotherapie mit einem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Hemmer (Abb. 38).

Diesen Vermutungen folgend, dass es unter Integrin-Inhibition zu einer Reduzierung von pAkt und dadurch bedingt zu einer gesteigerten Apoptose der Endothelzellen kommt, wurden A431-Tumorgewebe immunhistochemisch auf das Vorkommen von pAkt in den Endothelzellen untersucht (Tag 10). Tatsächlich war pAkt in den Endothelzellen der mit S247 behandelten Tumorgewebe erniedrigt. Entsprechend wurde auch eine gesteigerte Apoptose der Endothelzellen ermittelt.

Dem entgegen wird davon ausgegangen, dass die Integrin-Hemmung keine Effekte auf andere, sich teilende nicht-entartete Zellarten hat und somit mit nur geringen oder keinen Nebeneffekten gerechnet werden kann. Hieraus lässt sich schließen, dass die Hemmung der durch VEGF oder Integrin-vermittelten Überlebenssignalkette die Radioresistenz von Endothelzellen reduzieren könnte und dadurch bedingt die antitumoralen Effekte einer Bestrahlung verstärkt (HUBER et al. 2005).

Wie bereits im Literaturteil 4.2 beschrieben wurde, konnte im Zusammenhang mit dieser sich gegenseitig beeinflussenden Signalwirkung ein äußerst komplexes Netzwerk von interagierenden Angiogenese-Signalen beschrieben werden (ABDOLLAHI et al. 2004a). Ein breites Spektrum von Genen wie Id-1, Stat3,  $\alpha_v$ - und  $\beta_3$ -Integrine lagen gleichzeitig, abhängig vom angiogenen Status der Zellen, hoch- bzw. niederreguliert vor. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Integrine und proangiogene Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel Id-1 oder Stat3 in den Stunden nach ionisierender Bestrahlung in Endothelzellen hochreguliert werden (ABDOLLAHI et al. 2003c). Zusammen mit den Daten bezüglich der Ko-Regulation und Kommunikation von Ids, stats und Integrinen (GIANCOTTI u. RUOSLAHTIE 1999; LYDEN et al. 1999; HOOD et al. 2002) legen diese Erkenntnisse nahe, dass die Hemmung der Integrin-Signalkaskade durch S247 zu einer breiteren Niederregulierung von angiogenen und Überlebens-Faktoren führt, die notwendig ist, um

die unerwünschten proangiogenen Nebeneffekte zu unterbinden, die durch eine Bestrahlung induziert werden.

Neben der Betrachtung dieser involvierten Signalmechanismen ergaben andere Untersuchungen, dass nach der Behandlung mit einem zyklischen RGD-Peptid radioaktiv markierte Antikörper verstärkt in das Tumorgewebe eindringen konnten und somit auch vermehrt im Zielgewebe wirken konnten. Diese Erkenntnisse implizieren, dass Integrin-Inhibition kombiniert eingesetzt mit Radiotherapie oder Chemotherapie erfolgreich sein könnte (DE NARDO et al. 2000; BURKE et al. 2002). Jedoch bedarf es noch der Abklärung, inwieweit Integrin-Antagonisten auf die Endothelpermeabilität, Perfusion oder auf die interstitiellen Druckverhältnisse im Tumorgewebe Einfluss nehmen.

Schließlich ergibt sich noch ein weiterer Aspekt daraus, dass eine starke Expression von Integrinen wie  $\alpha_v\beta_3$  als Charakteristikum bei einer Reihe von invasiven Tumorarten wie dem Gliom, malignen Melanom, Prostata- und Brustkrebs beschrieben wurde, und wodurch, zumindest zum Teil bedingt, die Malignität dieser Tumoren angenommen wird (WEIDNER et al. 1991; BROOKS et al. 1994; SEFTOR et al. 1998; HOOD et al. 2002). Diese Erkenntnisse legen wiederum die Vermutung nahe, dass auch die bei diesen Versuchen insgesamt beobachteten antitumoralen Effekte durch die Integrin-Hemmung nicht ausschließlich durch eine Hemmung der Gefäßbildung und eine letztlich dadurch bedingte mangelnde Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen bedingt waren, sondern möglicherweise auch durch eine direkte Wirkung auf die Tumorzellen. Zur Klärung dessen bedarf es weiterer Untersuchungen wie zum Beispiel die Untersuchung der Integrin-Expression bei den hier verwendeten Tumorzelllinien.

Insgesamt betrachtet berechtigen die Ergebnisse unter Heranziehen des zuvor erläuterten zu der Annahme, dass die Kombination einer Integrin-Inhibition zur Strahlentherapie ein wirkungsvolles Behandlungskonzept bei der Behandlung von Tumorerkrankungen darstellen könnte und dass unter Integrin-Inhibition etwa die Bestrahlungsdosen, die nötig sind, um eine Tumorkontrolle zu erreichen, gesenkt werden könnten.

## 2.4 Auftreten spontaner Metastasen der PC3-Tumoren

Tumorzellen haben eine Reihe von Barrieren zu überwinden, um erfolgreich Tochtergeschwülste in Entfernung vom Primärtumor zu etablieren: nach einem Zugang zum Gefäßsystem und erfolgreichem Entgehen der Immunabwehr bei hämatogener Streuung müssen letztlich Voraussetzungen für das Wachstum im Zielorgan geschaffen werden (NICOLSON 1988; WEIDNER et al. 1991). Angiogenese scheint dabei sowohl zu Beginn als auch am Ende dieser Kaskade beteiligt zu sein. Wie bereits zuvor beschrieben wurde (Literaturübersicht Abschnitt 4, Diskussion Abschnitte 1.4.1 und 2.3), konnte bei einer ganzen Reihe an invasiven Krebsarten beim Menschen das Metastasierungsrisiko und damit der Malignitätsgrad mit dem Grad der Neovaskularisierung des Primärtumors, der Expression von Integrinen oder von Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF, PDGF und FGF korreliert werden. Und zahlreiche Untersuchungen berichten mittlerweile von einer Hemmung der Ausbildung von Metastasen unter antiangiogener Therapie, wie etwa bei Verwendung von Integrin-, VEGF-Inhibitoren oder Endostatin (ANGELOV et al. 1999; FONG et al. 1999; VAJKOCZY et al. 1999; BUERKLE et al. 2000 u. 2002; TRIKHA 2002; XIA et al. 2002; ZHANG et al. 2002; REINMUTH et al. 2003).

Viele humane Tumorzellen, wie auch der PC3-Tumor in diesen Untersuchungen, führen nach subkutaner Injektion zu einer spontanen Metastasierung. Ein Einfluss durch die vorgenommenen Behandlungen ist nach dem zuvor Dargestellten auch bei diesen Versuchen denkbar. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass im subkutanen Modell oftmals nur vereinzelte Metastasen ausgebildet werden (GAROFALO et al. 1993), was auch bei dem hier verwendeten PC3-Xenograft beobachtet werden konnte. Lediglich bei 6 von insgesamt 32 Tieren der Kontrollgruppen wurden am Ende der Beobachtungszeiträume, die zwischen 37 und 58 Tagen betragen, Metastasen festgestellt. Oftmals ist, wie auch hier, durch das aggressive Wachstum dieser Tumoren in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz ein Versuchsende bedingt, bevor eine erhöhte Metastasierungsrate durch eine Verlängerung der Studie erreicht wird. Für Untersuchungen von Effekten auf eine Metastasierung sind derartige Modelle daher generell weniger geeignet.

Die operative Entfernung des Primärtumors stellt in diesem Zusammenhang mittlerweile eine weit verbreitete und etablierte Methode dar, um die Versuchsdauer

von *in-vivo*-Studien zu verlängern. Dabei muss beachtet werden, dass die Entfernung des Primärtumors das Wachstum von Metastasen begünstigen kann (HOLMGREN et al. 1995) und das Wachstum von (zirkulierenden) Mikrometastasen durch die Bildung antiangiogener Stoffen wie z.B. Angiostatin oder Endostatin durch den Primärtumor selbst unterdrückt wird (SCKELL et al. 1998; GUBA et al. 2001).

Die hier ausschließlich in den Inguinal- und Paraaortallymphknoten festgestellten Metastasen legen des weiteren die Vermutung nahe, dass es sich um eine lymphogene Metastasierung der subkutan wachsenden Primärtumoren in die regionären Lymphknoten handelt. Diese Beobachtungen gehen konform mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen am subkutanen PC3-Modell (LIN et al. 2005). Im weiteren Verlauf Ihrer Untersuchungen isolierten LIN et al. Zellen aus den Lymphknotenmetastasen der subkutan gewachsenen PC3-Tumoren. Diese PC3-Sublinie führte nach erneuter subkutaner Implantation bei 80 % der verwendeten Mäuse zur Ausbildung von Lymphknotenmetastasen.

In der Literatur gibt es keine Hinweise, dass die im Rahmen dieser Untersuchungen angewendeten Substanzen über eine Wirkung auf Lymphgefäße die Metastasierung von Tumoren beeinflussen. Im Zusammenhang mit der lymphogenen Metastasierung konnten LIN et al. 2005 neben zahlreichen anderen Arbeitsgruppen in den letzten Jahren Mitglieder der VEGF-Familie identifizieren, die mittlerweile als Schlüsselfaktoren angesehen werden. VEGF-C stimuliert die Bildung von Lymphgefäßen und das Wachstum und die Migration lymphatischer Endothelzellen über die Bindung an seinen Rezeptor VEGFR-3 (KARKKAINEN u. ALITALO 2002). Es zeigte sich, dass VEGF-C und -D bei einigen soliden Tumoren die lymphogene Metastasierung über eine Induktion der tumorassozierten Bildung von Lymphgefäßen unterstützen (KARKKAINEN u. PETROVA 2000; ERIKSSON u. ALITALO 2002; STACKER et al. 2002). Während eine Unterbrechung dieses Signalwegs die lymphogene Metastasierung und Bildung von Lymphgefäßen hemmte (KARPANEN u. ALITALO 2001; STACKER et al. 2001; LIN et al. 2005).

Alternativ zu den bisher aufgeführten subkutanen Modellen existiert noch eine Reihe weiterer Metastasierungsmodelle, von denen die orthotope Applikation von Tumorzellen bzw. -gewebe noch erwähnt werden soll. Hierbei werden die Zellen in das Organ implantiert, aus dem sie ursprünglich stammten. Vorteile dieser Methode

werden darin gesehen, dass davon ausgegangen wird, dass die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie die Anordnung der Zellen zueinander im Ursprungsorgan des Tumors besser den Bedürfnissen der entarteten Zellen entspricht (FIDLER 1990). Untersuchungen konnten zeigen, dass das Metastasierungsverhalten orthotoper Tumoren weitgehend dem des Patienten entspricht, von dem sie stammen (KIGUCHI et al. 1998). Damit bietet es anderen Modellen gegenüber, die zumeist nur Teilaspekte dieses Vorganges beleuchten, einen klaren Vorteil (KUBOTA 1994).

Unter Berücksichtigung der aufgeführten Aspekte kann die Tendenz angegeben werden, dass Unterschiede bzgl. des Auftretens von Metastasen am Ende der jeweiligen Beobachtungszeiträume bei behandelten und unbehandelten Tieren nicht festgestellt wurden. Eine weitere Bewertung soll und kann bei dem gewählten Versuchsaufbau nicht erfolgen (s. dazu Ergebnisse Abschnitt 5).

## **2.5 Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Angiogenese-Inhibitoren**

Bisheriges Ziel der konventionellen Krebstherapie war die Krebszelle selbst. Dieser reduktionistische Ansatz wird seit kurzem in Frage gestellt, als man begann, die Bedeutung der im Tumor integrierten Normalzellen zu beachten (HANAHAN u. WEINBERG 2000). Der Einsatz von Chemo- oder Strahlentherapie führt bei den Patienten oft zu schweren Nebenwirkungen, da auch normale, gesunde Zellen in Mitleidenschaft gezogen werden. Zielzelle der antiangiogenen Therapie ist dem entgegen die proliferierende Endothelzelle im wachsenden Blutgefäß. Endothelzellen in etablierten Gefäßen erneuern sich im Schnitt mit einem Turnover von ca. 1000 Tagen. Proliferierende Endothelzellen während der Tumorangiogenese haben dagegen einen Teilungszyklus von wenigen Tagen (HOBSON u. DENEKAMP 1984; JAFFE 1987; DENEKAMP 1993). Da man davon ausgeht, dass sich Angiogenese physiologisch nur während der Embryonalentwicklung und im weiblichen Menstruationszyklus abspielt (D'AMORE u. THOMPSON 1987; FOLKMAN u. SHING 1992), wäre theoretisch kaum mit Nebenwirkungen zu rechnen. Tatsächlich fällt bei sämtlichen hier zitierten Studien auf, dass generell von keinen oder aber nur von geringen erkennbaren Nebenwirkungen bei der Anwendung der Angiogenese-Inhibitoren berichtet wird. Dennoch sind die Erkenntnisse bezüglich der Folgen

gerade auch einer Langzeitbehandlung mit Hemmern der Angiogenese noch weitgehend unbekannt.

Denkbar wäre, dass es unter antiangiogener Therapie zu Wundheilungsverzögerungen (BREM u. FOLKMAN 1993) und Fertilitätsstörungen kommt (FERRARA et al. 1998). Besondere Vorsicht ist während der Blutgefäßbildung im Embryo geboten. Thalidomid, ehemals als Beruhigungsmittel unter dem Namen „Contergan“ bekannt, hat sich mittlerweile als ein potenter Inhibitor der Angiogenese erwiesen. Die bei Einnahme in der Schwangerschaft eingetretenen Schäden der Feten waren wahrscheinlich die Folge einer Hemmung der Gefäßbildung (D'AMATO et al. 1994). Die weitere Anwendung von selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitoren wie Rofecoxib (Vioxx®) und Celecoxib (Celebrex®) als antiangiogenes Tumormedikament ist aufgrund der unklaren Nebenwirkungen wie z.B. erhöhter Infarktraten fraglich.

#### 2.5.1 Nebenwirkungen bei der Behandlung mit SU5416

Die Behandlung mit der Substanz SU5416 erschien für einige Tiere äußerst belastend zu sein, was sich in einer deutlichen Gewichtsabnahme im Verlauf der Versuche äußerte. Ähnliche Beobachtungen machten BERGERS et al. 2003 bei ihren Untersuchungen und berichteten ebenfalls von einer durch die hohen Gewichtsabnahmen bedingten früheren Beendigung der Versuche der mit SU5416 behandelten Tieren nach ca. vier Wochen, bei subkutaner Verabreichung und gleicher Dosierung der Substanz (bzw. mit der Hälfte der Dosis bei kombinierter Behandlung). Dem entgegen berichteten zuvor LAIRD et al. 2002, dass sie keine oder nur geringe Nebenwirkungen bei oraler Gabe einer wöchentlichen Dosierung von 175 mg/kg und damit annähernd der hier eingesetzten wöchentlichen Dosierung (200mg/kg) feststellen konnten, wobei der mit ca. 15 Tagen deutlich kürzere Behandlungszeitraum verglichen mit diesen Untersuchungen berücksichtigt werden muss. In bis vor kurzem laufenden klinischen Studien I und II wurde von verschiedenen Nebenwirkungen bei der Behandlung mit SU5416 berichtet, insbesondere von Thrombembolien, Kopfschmerzen oder Müdigkeit (KUENEN et al. 2003; HEYMACH et al. 2004; O`FARRELL et al. 2004; PETERSON et al. 2004; ZANGARI et al. 2004; COONEY et al. 2005).

### 3 Klinische Relevanz und Ausblick

In der Praxis rekrutiert sich nach wie vor die Mehrzahl der etablierten Therapieschemata aus den drei klassischen Standbeinen der Onkologie: Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie. Die chirurgische Intervention stellt grundsätzlich eine hochselektive Maßnahme dar, doch es bestehen häufig Grenzen durch die Invasivität des Eingriffs. Zudem entziehen sich mikroskopische und kleine Tumoren oder Metastasen, die sich mittels Routinediagnostik nicht darstellen lassen, der Anwendbarkeit dieser Methode. Chemotherapie und Strahlentherapie hingegen stellen nicht invasive Verfahren dar, die zudem gegen nicht sichtbare Läsionen wirksam sind. Der Nachteil besteht in einer nicht ausreichenden Selektivität, weshalb zum Teil gravierende Nebenwirkungen in Kauf genommen werden müssen bzw. die verhindern, dass effektive und damit ausreichend hohe Dosierungen verabreicht werden können.

In den vergangenen Jahrzehnten hat sich das Wissen über Ursachen und molekulare Grundlagen der Tumorentstehung drastisch erhöht. Im Bestreben, nicht invasive, gegen Mikrometastasen ebenfalls aktive, und dennoch selektive Medikamente zur Verfügung zu haben, wurden insbesondere seit den 80er Jahren zielgerichtet wirkende Medikamente entwickelt, die sich zunächst gegen die malignen Zellen selbst richteten. Schon früh wurde der Gedanke geäußert, dass tumorversorgende Gefäße geeignetere Ziele darstellen könnten als die Tumorzellen selbst. Denn die insbesondere im größeren Tumor herrschenden abnormalen Perfusionsverhältnisse oder der erhöhte interstitielle Druck stellen eine weitere Barriere für Moleküle dar, die bis zur Tumorzelle vordringen müssen, um ihre Wirkung entfalten zu können (JAIN 1994).

Gerade die Nachteile, die oftmals den Behandlungserfolg anderer Therapieformen mindern oder unterdrücken, erscheinen bei den gegen die Tumorgefäße gerichteten Substanzen gering oder gar nichtig. Die Zielzelle ist problemlos zugänglich. Auch Metastasen, die sich einer kurativen chirurgischen Therapie entziehen, oder Krankheiten wie die akute und chronische Leukämie sowie das Myelodysplastische Syndrom sind ebenfalls von der Angiogenese abhängig und somit einer antiangiogenen Therapie zugänglich (FIDLER u. ELLIS 1994; FOLKMAN 1990; AGUAYO et al. 2000). Des Weiteren sind die Zielstrukturen auf Tumorgefäßen vielen

unterschiedlichen Tumorarten gemeinsam. Es besteht ein Potenzierungseffekt, da zahlreiche Tumorzellen von einem einzelnen Gefäß versorgt werden. Wahrscheinlich ist auch weiterhin, dass selektive angiosuppressive Medikamente eine niedrige Toxizität beinhalten (siehe auch Abschnitt 2.5). Die Gefahr einer Resistenzentwicklung wird bei der therapeutischen Antiangiogenese generell als gering eingeschätzt (s. auch Abschnitt 2.1).

So verwundert es nicht, dass sich das Feld der Angiogeneseforschung zu einer der am schnellsten entwickelnden biomedizinischen Disziplin entfaltet hat. Die molekularen Mechanismen der angiogenen Kaskade konnten in den vergangenen Jahren detailliert entschlüsselt werden. Eine Vielzahl von Therapiestrategien, die auf diesen Erkenntnissen basieren, wurden und werden in präklinischen wie auch klinischen Studien getestet.

Häufiger Kritikpunkt ist, dass eine antiangiogene Therapie für sehr lange Zeit, mitunter sogar lebenslang, durchgeführt werden müsste, da sich die Tumoren im frühen Stadium auch durch Diffusion ernähren können. Die alleinige antiangiogene Therapie kann vom theoretischen Aspekt her eine chronische Therapieform darstellen. Und obgleich sich zur Zeit zahlreiche Substanzen in klinischen Prüfungen befinden, um ihren Effekt als Monotherapeutikum zu evaluieren, so ist schon jetzt abzusehen, dass sie wahrscheinlich eher den Effekt bisheriger Therapien steigern können. Sowohl die Kombination mit Chemo- als auch mit Strahlentherapie verbesserte in experimentellen Studien deutlich den therapeutischen Effekt (KAKEJI u. TEICHER 1997; GORSKI et al. 1998; MAUCERI et al. 1998; MILAS et al. 1999; HANNA et al. 2000; HUBER et al. 2005). Aber auch die Kombination verschiedener Hemmstoffe der Angiogenese geht mit einer gesteigerten Wirkung einher (BREM et al. 1993; BERGERS et al. 2003). Sowohl aus theoretischer als auch aus experimentell-praktischer Sicht stellen kombinierte antiangiogene Therapiekonzepte daher in vielerlei Hinsicht eine neue, attraktive und viel versprechende Form zur Behandlung von Krebsleiden dar.

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten, zusammen mit Ergebnissen weiterer Untersuchungen der Arbeitsgruppe, scheint das Behandlungskonzept bestehend aus dem direkt auf Endothelzellen wirkenden Angiogenese-Inhibitor Endostatin mit einem indirekt wirksamen antiangiogenen

Wirkstoff, welcher spezifisch den VEGF-Signalweg bei der Gefäßentwicklung hemmt, deutlich synergistisch und dadurch effektiver zu wirken. Andererseits muss man bei dem gegebenen extrem komplexen Netzwerk des Genexpressions-Musters allein im Zusammenhang mit der Regulation der Angiogenese (ABDOLLAHI et al. 2004a) sicher auch andere intrazelluläre Signalwege bei der Suche nach einer optimierten multimodalen Strategie in Betracht ziehen.

Viel versprechend erscheint des weiteren, Angiogenese-Inhibition kombiniert mit Bestrahlung einzusetzen. Es konnte gezeigt werden, dass eine fraktionierte Bestrahlung einer relativ geringen Gesamtdosis und somit auch geringerer Nebenwirkungen in der Lage war, die Antitumoraktivität von RTK-Inhibitoren deutlich zu steigern, wobei die Inhibition mehrerer Wachstumsfaktoren eine größere antitumorale Wirkung erzielte verglichen mit der alleinigen Blockade des VEGF-Signalwegs. Die Ergebnisse der Untersuchungen des kombinierten Konzepts der Integrin-Blockade mit ionisierender Bestrahlung berechtigen zu der Annahme, dass eine Integrin-Blockade durch kleinmolekulare peptidomimetische Agentien zusammen mit Bestrahlung angewendet ein effizientes Therapiekonzept darstellen könnte.

Die Wirksamkeit der im Rahmen dieser präklinisch experimentellen Arbeit angewendeten kombinierten Behandlungskonzepte wird letztlich in klinischen Studien zu evaluieren sein.

## VI Zusammenfassung

Angiogenese, die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen, stellt die Voraussetzung für das Wachstum und die Metastasierung solider Tumoren dar. Aufgrund der komplexen Gegebenheiten bei der Blutgefäßbildung erscheint es nahe liegend, dass durch eine antiangiogene Therapie, die gleichzeitig an verschiedenen Stellen der angiogenen Signalketten angreift, die therapeutische Effizienz gesteigert werden kann. Die Erkenntnis, dass eine Bestrahlung selbst zu einer Intensivierung angiogener Folgereaktionen und damit zur Strahlenresistenz beitragen kann, begründet gleichermaßen die Hoffnung, dass durch Unterbrechung dieser Mechanismen die Radioresistenz von Tumoren verringert werden könnte.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurden im Rahmen dieser Arbeit die Einflüsse von drei verschiedenen kombinierten Behandlungskonzepten mit Angiogenese-Inhibitoren (AI) auf das Wachstumsverhalten von soliden Tumoren an zwei subkutanen (ektopen) humanen Xenograft-Tumormodellen auf Nacktmäusen untersucht.

Die Tumorzellen wurden nach *in-vitro*-Anzüchtung als Suspension subkutan am linken Oberschenkel der Tiere verabreicht. Tumortragende Tiere wurden randomisiert den Versuchsgruppen zugeteilt. Mit der Behandlung wurde bei gemessenen Tumorumfängen von 75 - 200 mm<sup>3</sup> begonnen. Endostatin wurde 14 Tage lang, alle weiteren Substanzen jeweils bis zum Ende der Beobachtungen subkutan verabreicht. Die Tiere der Kontrollgruppen wurden entsprechend mit den Trägerlösungen, jeweils ohne Wirkstoff, behandelt. Die Bestrahlung der Tiere der Bestrahlungsgruppen erfolgte lokal mit einer <sup>60</sup>Cobalt-Strahlenquelle (Siemens Gammatron S). Zur Berechnung der Tumorumfänge wurden Länge, Breite und Höhe der Tumoren gemessen. Ergänzend zur Messung der Tumormessungen wurden aus jeder Gruppe Tumorgewebe im jeweiligen Versuchszeitraum histologisch bzw. immunhistochemisch untersucht.

Zunächst wurde der Einfluss der kombinierten Behandlung mit Endostatin, einem direkten AI, und einem selektiven VEGFR2-Inhibitor (SU5416), einem sogenannten

indirekten AI, am PC3-Prostatakarzinom-Xenograft untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die bimodale Therapie verglichen mit den jeweils einzeln eingesetzten Substanzen zu einer deutlichen verstärkten Hemmung des Tumorwachstums bis hin zur dauerhaften Rückbildung führte. Bei der histologischen Untersuchung waren bereits zu einem frühen Zeitpunkt (Tag 10 der Behandlungen) starke Veränderungen bei den Tumorgeweben der Behandlungsgruppen ersichtlich. Die Ergebnisse berechtigen zu der Annahme, dass die therapeutische Effizienz einer Behandlung mit der bereits als Monotherapeutikum in klinischer Testung befindlichen Substanz Endostatin durch Gabe eines weiteren AI, der, wie hier verwendet, die Signalkette des Wachstumsfaktors VEGF blockiert, deutlich gesteigert werden könnte.

Des weiteren beschäftigte sich diese Arbeit mit der Frage, inwieweit eine gleichzeitige Blockade mehrerer Wachstumsfaktoren durch die Wirkstoffe SU5416 und SU6668, einem RTK-Inhibitor von PDGF, bFGF und VEGF die Therapieeffekte von ionisierender Bestrahlung bei PC3-Tumoren weiter steigern kann. Die zuvor bereits bei unterschiedlichen *in-vivo*-Modellen nachgewiesenen stärkeren antiangiogenen und antitumoralen Effekte durch den kombinierten Einsatz der Substanzen SU5416 und SU6668 zeigten sich auch bei diesen Untersuchungen. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die günstigen Effekte einer Kombination von Radiotherapie bei gleichzeitiger Rezeptor-Tyrosinkinase-Blockade deutlich steigern lassen und die Ergebnisse somit im Einklang mit der bereits nachgewiesenen Radiosensibilisierung durch einzelne RTK-Inhibitoren stehen. Dabei erzielte die Hemmung eines breiteren Spektrums an Tyrosinkinasen (durch SU6668) bereits die stärkste Wachstumshemmung bis hin zur Tumorkontrolle bei einzelnen Tieren, bei der die Tumoren im Beobachtungszeitraum im Mittel lediglich das zweifache ihres Anfangsvolumens erreichten. Interessanterweise ergab die Analyse der Gefäßdichte und Tumorzellproliferation der Tumorgewebe, dass die antiangiogenen und antitumoralen Effekte durch die Dreifachbehandlung weiter verstärkt wurden.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Untersuchung von Effekten einer zusätzlich zur Bestrahlung vorgenommenen Integrin-Hemmung durch den kleinmolekularen Antagonisten der  $\alpha_v$ -Integrine, S247, auf das Tumorwachstum. Diese Kombination wurde am PC3-Tumormodell und anschließend an einem

weiteren Tumor-Xenograft untersucht, dem Epidermoid-Karzinom A431. Es zeigte sich bei beiden Modellen, dass der kombinierte Einsatz des Angiogenese-Inhibitors und Radiotherapie die Hemmung des Tumorwachstums gegenüber den jeweiligen Monotherapien deutlich verstärkte. Die Wachstumsverzögerung bei PC3 war derart ausgeprägt, dass die Tumoren im Schnitt das zweifache ihres Anfangsvolumens im Versuchszeitraum nicht erreichten und vereinzelt eine Rückbildung bzw. Tumorkontrolle beobachtet wurde. Bei den PC3-Tumorhistologien waren die Tumorgefäßzahl und Tumorzellproliferation bei der Kombinationsgruppe signifikant weiter verringert. Anhand der Untersuchung von A431-Tumorgewebe konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit S247 zu einer reduzierten Phosphorylierung von Akt und einer gesteigerten Endothelzell-Apoptose führte, insbesondere bei den bestrahlten Tumoren. Somit hatte die antiangiogene Therapie mit S247 kombiniert mit lokaler, niedrig dosierter fraktionierter Bestrahlung einen bemerkenswerten Erfolg auf Wachstum des PC3 wie auch auf den sehr schnell wachsenden Tumor A431.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten kombinierten Behandlungsprotokolle stellen somit aussichtsreiche Konzepte für einen klinischen Einsatz bei der Behandlung von Tumorerkrankungen dar.

## VII Summary

Angiogenesis, the formation of new vessels from pre-existing vessels, represents the precondition for growth and metastasizing of solid tumors. Regarding the complex mechanisms of angiogenesis it seems quite obvious that treatment concepts simultaneously affecting different locations of angiogenic signaling may enhance therapeutical efficacy. Radiation itself contributes to an increase of angiogenic effects and therefore promotes radioresistance. Likewise there exists justified hope that interrupting these mechanisms may decrease radioresistance of tumors.

Regarding these aspects the effects of three different combined treatment concepts including angiogenesis inhibitors have been studied in the course of this thesis. In this context, two different solid xenograft tumor models subcutaneously growing in nude mice were used.

After propagating *in vitro*, tumor cells were resuspended and injected subcutaneously into the left hind limb of the animals. Tumor bearing mice were randomized into therapy groups. Treatment was started when tumors had reached volumes between 75 and 200 mm<sup>3</sup>. All substances were administered subcutaneously; Endostatin for 14 days, all other substances until the end of observation. Animals from control groups were given carriers only (without active agents) following exactly the schedule of the treated groups. Local radiation was applied by a Siemens Gamatron S (<sup>60</sup>Cobalt). To calculate tumor volumes, length, width and depth of the tumors were determined three times weekly by direct measurement with calipers. Accordingly tumors of each group were taken for histological and immunohistochemical examination during the period of investigation.

Initially, the combined effect of the “direct” angiogenesis inhibitor endostatin with the “indirect” anti-angiogenic compound SU5416 (selective VEGFR2 RTK-inhibitor) was investigated on the PC3 xenograft. The combination of SU5416 and low-dose endostatin reduced tumor growth more effectively in combination in contrast to their single application respectively. In some animals tumor regression was induced. Additionally, early histology and immuno-histochemistry of PC3 tumors showed major

changes in tissues from treated groups. Summarizing, present data suggest that combining endostatin with other antiangiogenic compounds blocking specific pathways, especially the VEGF pathway, may achieve markedly increased therapeutic effectiveness.

In addition, the concept of inhibiting several growth factors at a time was examined on the PC3 xenograft, using the VEGFR2 inhibitor SU5416 and SU6668, an inhibitor of PDGFR, bFGF and VEGF. Also, the concomitant therapeutical effects of radiotherapy were tested. It could be shown that the recently proposed concept of inhibiting both, VEGF and PDGF, resulted in enhanced antiangiogenic and antitumoral effects. Radiation markedly increased tumor growth delay in all kinase inhibitor groups, ongoing with pre-existing results of radiosensitizing by inhibitors of receptor tyrosine kinases. Interestingly, the combination of radiotherapy with the broad spectrum RTK inhibitor SU6668 alone already induced tumor control and tumors did not reach two-fold of their initial tumor volume. A further increased effectiveness due to additional SU5416 treatment could not be detected within the experimental design. Data on CD31 vascular counts as well as the tumor proliferation (Ki67 staining) demonstrate that the triple combination had the highest antiangiogenic and antitumor activity among the schedules tested.

Moreover, this thesis investigated the effects of combination of radiation with concurrent administration of S247, a small molecular antagonist of the  $\alpha_v$ -integrins, on the growth of solid tumors. This combination was examined on both the human prostate carcinoma PC3 and the human epidermoid carcinoma A431. In both models it could be demonstrated that the combination of radiation and S247 administration induced significant delays in tumor growth in contrast to that produced by either therapy alone. During PC3 test series, tumors of the combination group did not reach a two-fold of their initial tumor volume during the period of investigation and in some animals tumor control or regression was mediated. Accordingly, immunohistochemistry of PC3 tumors showed significantly reduced number of vessels and proliferating tumor cells in the combination group. In A431 tumors, treatment with S247 in particular in the irradiated group, resulted in an increased endothelial cell apoptosis and reduced phosphorylation of Akt. Consequently antiangiogenic therapy with S247 combined with local low-dose fractionated irradiation produced an

remarkable inhibitory effect on the growth of PC3 as well as on the fast growing A431 tumor.

Therefore the combined protocols of treatment investigated in the course of this thesis represent promising concepts for local cancer therapy in the future.

## VIII. Abkürzungsverzeichnis

A431	Epidermoidkarzinom-Tumorzelllinie (human)
AI	Angiogenese-Inhibitor
Abb.	Abbildung
add	in der Rezeptur: füge hinzu!
Aqua dest.	destilliertes Wasser (Aqua destillata)
Aqua bidest.	zweifach-destilliertes Wasser (Aqua bidestillata)
Aqua ad inj.	Wasser zu Injektionszwecken (Aqua ad injectabilia)
ATP	Adenosintriphosphat
BALB/c <i>nu/nu</i>	Maus-Inzuchtstamm
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
chem.	chemisch
CMC	Carboxymethyl-Cellulose
d	Durchmesser
DFCC	Dana-Farber Cancer Center
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid (Kryoschutzstoff)
E	Energie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Chelatbildner)
EGF	Endothelial Growth Factor
EGFR	Endothelial Growth Factor Receptor
em	elektromagnetisch
engl.	englisch
et al.	„et alii“ (und andere [Autoren]); bei Literaturziten)
Fa.	Firma
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
Flk-1	Fetal liver kinase-1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2)
Flt-1	Fetal liver transferase-1 (VEGFR-1)
G2-Phase	Phase des Zellteilungszyklus
GP	Glykoprotein
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HRP	Horseradish Peroxidase
Hrsg.	Herausgeber (bei Literaturziten)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells

---

Ig	Immunglobulin
Inc.	Incorporation
i.d.R.	in der Regel
i.v.	intra venös
KDR	Flk-1 bzw. VEGFR-1 beim Menschen
KGW	Körpergewicht
K <sub>i</sub> –Wert	Dissoziationskonstante für Substrat/Inhibitor-Rezeptor- indungen (kompetitive Hemmung)
KIT	Stammzellwachstumsfaktor-Rezeptor
LET	Linearer Energietransfer
M	-molar, mol/l (Stoffmengenkonzentration)
M-Phase	Phase des Zellteilungszyklus
m-RNA	messenger-RNA
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
med.vet.	veterinärmedizinisch
mind.	mindestens
n	Umfang/Anzahl der Beobachtungen, auch z.B. der Tiere in den Gruppen
N	-normal
NCI	National Cancer Institute
PAS	Periodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalz- lösung)
PC	Personal Computer
PC3	Prostatakarzinom-Tumorzelllinie (human)
PDGF	Plateled Derived Growth Factor
PDGF-R	Plateled Derived Growth Factor Receptor
pH	potentia Hydrogenii; negativer Logarithmus der Wasserstoff- ionenkonzentration
POD	Peroxidase
p.o.	per os
RBW	Relative Biologische Wirksamkeit
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Radiotherapie/Bestrahlung
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
S-Phase	Phase des Zellteilungszyklus
S.	Seite
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SCID	severe combined immunodeficiency
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
sog.	sogenannt(e/es/-er)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)

TGF	Tumor Growth Factor
TNF	Tumor Nekrose Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Puffersubstanz)
U	[engl.] units [Einheit(en)]
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
v.a.	vor allem
V	Volumen
$\nu$	Frequenz
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
v/v	„volume per volume“, Volumen pro Volumen (Volumengehalt, meist in Prozent)
w/v	„weight per volume“, Masse pro Volumen (Massenkonzentration, meist in Prozent)
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

### **Konstanten und Einheiten**

°C	Grad Celsius
cm	Centimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
Da	Dalton
eV	Elektronenvolt
g	Gramm
Gy	Gray
h	Plancksches Wirkungsquantum
Hz	Hertz
IE	Internationale Einheit(en)
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Mol
m	Meter
min	Minute(n)
$\pi$	(kleines Pi): Ludolfsche Zahl (Konstante, die das Verhältnis von Umfang zu Durchmesser eines Kreises angibt; $\pi = 3,14159$ )
V	Volt

### **Präfixe für Einheiten**

k	Kilo
c	Centi
M	Mega
m	Milli
$\mu$	Mikro
n	Nano

## IX Literaturverzeichnis

Abdollahi A, Lipson KE, Han X, Krempien R, Trinh T, Weber KJ, Hahnfeldt P, Hlatky L, Debus J, Howlett AR, Huber PE. SU5416 and SU6668 attenuate the angiogenic effects of radiation-induced tumor cell growth factor production and amplify the direct anti-endothelial action of radiation in vitro. *Cancer Res.* 2003a;63:3755-3763.

Abdollahi A, Lipson KE, Sckell A, Zieher H, Klenke F, Poerschke D, Roth A, Han X, Krix M, Bischof M, Hahnfeldt P, Grone HJ, Debus J, Hlatky L, Huber PE. Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Res.* 2003b;63:8890-8898.

Abdollahi A, Gong P, Rastert R, Debus J, Hlatky L, Hahnfeldt P, Maercker C, Huber PE. Genome wide expression profiling of irradiated human lung endothelial cells reveals the activation of genes involved in coagulation, inflammation and angiogenic pathways. *Proc Amer Assoc Cancer Res.* 2003c;44:6155.

Abdollahi A, Hahnfeldt P, Maercker C, Grone HJ, Debus J, Ansorge W, Folkman J, Hlatky L, Huber PE. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol Cell.* 2004a;13:649-663.

Abdollahi A, Griggs DW, Zieher H, Roth A, Lipson KE, Saffrich R, Grone HJ, Hallahan DE, Reisfeld RA, Debus J, Niethammer AG, Huber PE. Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11:6270-6279.

Abdollahi A, Zieher H, Roth A, Poerschke D, Niethammer A, Oertel S, Krempien R, Debus J, Lipson K, Grone HJ, Weber KJ, Huber PE. Radiation markedly increases antiangiogenic and antitumor effects of combined VEGF/PDGF Signaling Inhibition in PC3 Human Prostate and U87 Glioblastoma models. *Cancer Res.* in Revision.

Abrams TJ, Murray LJ, Pesenti E, Holway VW, Colombo T, Lee LB, Cherrington JM, Pryer NK. Preclinical evaluation of the tyrosine kinase inhibitor SU11248 as a single agent and in combination with "standard of care" therapeutic agents for the treatment of breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2003;2:1011-1021.

Abulafia O, Triest WE, Sherer DM. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract. *Gynecol Oncol.* 1999;72:220-231.

Adnane J, Gaudray P, Dionne CA, Crumley G, Jaye M, Schlessinger J, Jeanteur P, Birnbaum D, Theillet C. BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene.* 1991;6:659-663.

Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2000;96:2240-2245.

Akahane M, Akahane T, Shah A, Okajima E, Thorgeirsson UP. A potential role for vascular endothelial growth factor-D as an autocrine growth factor for human breast carcinoma cells. *Anticancer Res.* 2005;25:701-707.

Algire GH, Chalkley HW. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst USA.* 1945;6:73-85.

Amselgruber WM, Schafer M, Sinowatz F. Angiogenesis in the bovine corpus luteum: an immunocytochemical and ultrastructural study. *Anat Histol Embryol.* 1999;28:157-166.

Anan K, Morisaki T, Katano M, Ikubo A, Kitsuki H, Uchiyama A, Kuroki S, Tanaka M, Torisu M. Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. *Surgery.* 1996;119:333-339.

Angelov L, Salhia B, Roncari L, McMahon G, Guha A. Inhibition of angiogenesis by blocking activation of the vascular endothelial growth factor receptor 2 leads to decreased growth of neurogenic sarcomas. *Cancer Res.* 1999;59:5536-5541.

Antoniades HN, Galanopoulos T, Neville-Golden J, O'Hara CJ. Malignant epithelial cells in primary human lung carcinomas coexpress in vivo platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs and their protein products. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:3942-3946.

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85:221-228.

Asai K, Kanazawa H, Otani K, Shiraishi S, Hirata K, Yoshikawa J. Imbalance between vascular endothelial growth factor and endostatin levels in induced sputum from asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110:571-575.

Awad AB, Fink CS, Williams H, Kim U. In vitro and in vivo (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. *Eur J Cancer Prev.* 2001;10:507-513.

Baish JW, Jain RK. Fractals and cancer. *Cancer Res.* 2000;60:3683-3688.

Baker CH, Solorzano CC, Fidler IJ. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor signaling for therapy of metastatic human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2002;62:1996-2003.

Barendsen GW, Walter HM, Fowler JF, Bewley DK. Effects of different ionizing radiations on human cells in tissue culture. III. Experiments with cyclotron-accelerated alpha-particles and deuterons. *Radiat Res.* 1963;18:106-119.

Bayless KJ, Salazar R, Davis GE. RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins. *Am J Pathol.* 2000;156:1673-1683.

Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Podes D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest.* 1999;103:159-165.

Berger AC, Feldman AL, Gnant MF, Kruger EA, Sim BK, Hewitt S, Figg WD, Alexander HR, Libutti SK. The angiogenesis inhibitor, endostatin, does not affect murine cutaneous wound healing. *J Surg Res.* 2000;91:26-31.

Berger DP, Winterhalter BR, Fiebig HH. Establishment and Characterization of Human Tumor Xenografts in Thymus-Aplastic Nude Mice. In: H.H. Fiebig, D.P. Berger (Hrsg.): Immunodeficient Mice in Oncology. Verl. Karger, Basel 1992;23-46.

Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*. 1999;284:808-812.

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. *J Clin Invest*. 2003;111:1287-1295.

Berman ME, Xie Y, Muller WA. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J Immunol*. 1996;156:1515-1524.

Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*. 1997;18:26-45.

Bischof M, Abdollahi A, Gong P, Stoffregen C, Lipson KE, Debus JU, Weber KJ, Huber PE. Triple combination of irradiation, chemotherapy (pemetrexed), and VEGFR inhibition (SU5416) in human endothelial and tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;60:1220-1232.

Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*. 1997;390:404-407.

Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol*. 1992;23:755-761.

Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond ME, Amin MB, Cohen M, Crawford D, Gospodarowicz M, Kaplan RS, Miller DS, Montironi R, Pajak TF, Pollack A, Srigley JR, Yarbrow JW. Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124:995-1000.

Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res*. 1996;69:135-174.

Bowers G, Reardon D, Hewitt T, Dent P, Mikkelsen RB, Valerie K, Lammering G, Amir C, Schmidt-Ullrich RK. The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene*. 2001;20:1388-1397.

Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fassler R. Integrins in invasive growth. *J Clin Invest*. 2002;109:999-1006.

Breier G, Damert A, Plate KH, Risau W. Angiogenesis in embryos and ischemic diseases. *Thromb Haemost*. 1997;78:678-683.

Brem H, Folkman J. Analysis of experimental antiangiogenic therapy. *J Pediatr Surg*. 1993;28:445-450.

Brem S, Cotran R, Folkman J. Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst*. 1972;48:347-356.

Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*. 1994;264:569-571.

Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*. 1994;79:1157-1164.

- Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer*. 1996;32:2423-2429.
- Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresh DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*. 1996;85:683-693.
- Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresh DA. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell*. 1998;92:391-400.
- Browder T, Folkman J, Hahnfeldt P, Heymach J, Hlatky L, Kieran M, Rogers MS. Antiangiogenic therapy and p53. *Science*. 2002;297:471.
- Brown CK, Khodarev NN, Yu J, Moo-Young T, Labay E, Darga TE, Posner MC, Weichselbaum RR, Mauceri HJ. Glioblastoma cells block radiation-induced programmed cell death of endothelial cells. *FEBS Lett*. 2004;565:167-170.
- Bruns CJ, Shrader M, Harbison MT, Portera C, Solorzano CC, Jauch KW, Hicklin DJ, Radinsky R, Ellis LM. Effect of the vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody DC101 plus gemcitabine on growth, metastasis and angiogenesis of human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice. *Int J Cancer*. 2002;102:101-108.
- Buerkle MA, Pahernik SA, Sutter A, Jonczyk A, Messmer K, Dellian M. Inhibition of the alpha-nu integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo. *Br J Cancer*. 2002;86:788-795.
- Buerkle MA, Pahernik SA, Sutter A, Jonczyk A, Messmer K, Dellian M. Treatment with a small peptide antagonist against alpha v integrins inhibits angiogenesis, growth and metastasis of tumors in vivo. *J Vasc Res*. 2002;37:321.
- Burke PA, DeNardo SJ, Miers LA, Lamborn KR, Matzku S, DeNardo GL. Cilengitide targeting of alpha(v)beta(3) integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res*. 2002;62:4263-4272.
- Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec*. 1990;228:35-45.
- Capitosti SM, Hansen TP, Brown ML. Thalidomide analogues demonstrate dual inhibition of both angiogenesis and prostate cancer. *Bioorg Med Chem*. 2004;12:327-336.
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998;394:485-490.
- Carmeliet P, Collen D. Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *J Pathol*. 2000;190:387-405.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407:249-257.
- Carmeliet P. Integrin indecision. *Nat Med*. 2002;8:14-16.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9:653-660.

Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:14608-14613.

Chapman JD, Dugle DL, Reuvers AP, Meeker BE, Borsa J. Letter: Studies on the radiosensitizing effect of oxygen in Chinese hamster cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1974;26:383-389.

Chen J, De S, Brainard J, Byzova TV. Metastatic properties of prostate cancer cells are controlled by VEGF. *Cell Commun Adhes*. 2004;11:1-11.

Clark RA, Lanigan JM, DellaPelle P, Manseau E, Dvorak HF, Colvin RB. Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol*. 1982;79:264-269.

Connolly DT. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem*. 1991;47:219-223.

Contessa JN, Hampton J, Lammering G, Mikkelsen RB, Dent P, Valerie K, Schmidt-Ullrich RK. Ionizing radiation activates Erb-B receptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. *Oncogene*. 2002;21:4032-4041.

Cooney MM, Tserng KY, Makar V, McPeak RJ, Ingalls ST, Dowlati A, Overmoyer B, McCrae K, Ksenich P, Lavertu P, Ivy P, Hoppel CL, Remick S. A phase IB clinical and pharmacokinetic study of the angiogenesis inhibitor SU5416 and paclitaxel in recurrent or metastatic carcinoma of the head and neck. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005;55:295-300.

D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:4082-4085.

D'Amore PA, Thompson RW. Mechanisms of angiogenesis. *Ann Rev Physiol*. 1987;49:453-464.

Dachs GU, Coralli C, Hart SL, Tozer GM. Gene delivery to hypoxic cells in vitro. *Br J Cancer*. 2000;83:662-667.

Dachs GU, Patterson AV, Firth JD, Ratcliffe PJ, Townsend KMS, Stratford IJ, Harris AL. Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat Med*. 1997;3:515-520.

Das T, Chakraborty S, Banerjee S, Mukherjee A, Samuel G, Sarma HD, Nair CK, Kagiya VT, Venkatesh M. Preparation and preliminary biological evaluation of a <sup>177</sup>Lu labeled sanazole derivative for possible use in targeting tumor hypoxia. *Bioorg Med Chem*. 2004;12:6077-6084.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell*. 1997;91:231-241.

De Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP. Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II. Correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol*. 1998;184:53-57.

De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 1992;255:989-991.

Debus J. Tumorbehandlung mit gepulstem, hochenergetischem Ultraschall am Beispiel des Dunning Prostata Tumors der Ratte. Med. Dissertation, Universität Heidelberg 1992.

DeNardo SJ, Burke PA, Leigh BR, O'Donnell RT, Miers LA, Kroger LA, Goodman SL, Matzku S, Jonczyk A, Lamborn KR, DeNardo GL. Neovascular targeting with cyclic RGD peptide (cRGDf-ACHA) to enhance delivery of radioimmunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm.* 2000;15:71-79.

Denekamp J. Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol.* 1993;66:181-196.

Denny WA. Prospects for hypoxia-activated anticancer drugs. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents.* 2004;5:395-399.

Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem.* 1999;274:11721-11726.

Dhar DK, Ono T, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi E, Rahman MA, Kohno H, Nagasue N. Serum endostatin predicts tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2002;95:2188-2195.

Dicker AP, Anne R, Bonnani R, Sidor C, Gubish E, Curran WJ Jr. Phase I trial results of recombinant human angiostatin protein (rhA) and external beam radiation therapy (EBRT). In: 38th Annual Meeting of the American Association of Clinical Oncology 2002; Alexandria, VA: ASCO Publications.

Dixelius J, Cross MJ, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. Endostatin action and intracellular signaling: beta-catenin as a potential target? *Cancer Lett.* 2003;196:1-12.

Djonov V, Andres AC, Ziemiecki A. Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microsc ResTech.* 2001;52:182-189.

Dray TG, Hardin NJ, Sofferman RA. Angiogenesis as a prognostic marker in early head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1995;104:724-729.

Duplan JF. Use of xenografts for the evaluation of tumor chemotherapy. Application to adjuvant chemotherapy. *Bull Cancer.* 1984;71:292-296.

Duque JL, Loughlin KR, Adam RM, Kantoff PW, Zurakowski D, Freeman MR. Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer. *Urology.* 1999;54:523-527.

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995;146:1029-1039.

Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res.* 2000;60:1388-1393.

Eder JP Jr., Supko JG, Clark JW, Puchalski TA, Garcia-Carbonero R, Ryan DP, Shulman LN, Proper J, Kirvan M, Rattner B, Connors S, Keogan MT, Janicek MJ, Fogler WE, Schnipper L, Kinchla N, Sidor C, Phillips E, Folkman J, Kufe DW. Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily. *J Clin Oncol.* 2002;20:3772-3784.

Edwards E, Geng L, Tan J, Onishko H, Donnelly E, Hallahan DE. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2002;62:4671-4677.

Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest.* 1999;103:1227-1230.

Elkind MM, Sutton H. Radiation response of mammalian cells grown in culture. 1. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. *Radiat Res.* 1960;13:556-593.

Elkind MM, Sutton-Gilbert H, Moses WB, Alescio T, Swain RW. Radiation response of mammalian cells grown in culture. V. Temperature dependence of the repair of x-ray damage in surviving cells (aerobic and hypoxic). *Radiat Res.* 1965;25:359-376.

Elkind MM. The initial part of the survival curve: does it predict the outcome of fractionated radiotherapy? *Radiat Res.* 1988;114:425-436.

Erber R, Thurnher A, Katsen AD. Combined inhibition of VEGF- and PDGF-signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J.* 2004;18:338-340.

Erdreich-Epstein A, Shimada H, Groshen S, Liu M, Metelitsa LS, Kim KS, Stins MF, Seeger RC, Durden DL. Integrins alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 are expressed by endothelium of high-risk neuroblastoma and their inhibition is associated with increased endogenous ceramide. *Cancer Res.* 2000;60:712-721.

Eriksson U, Alitalo K. VEGF receptor 1 stimulates stem-cell recruitment and new hope for angiogenesis therapies. *Nat Med.* 2002;8:775-777.

Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol.* 1998;140:947-959.

Eyetech Study Group. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularisation secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology.* 2003;979-986.

Fan G, Zang P, Jing F, Wu Z, Guo Q. Usefulness of diffusion/perfusion-weighted MRI in rat gliomas: correlation with histopathology. *Acad Radiol.* 2005;12:640-651.

Fein M. Sonographische Erfassung von Gewebeveränderungen nach Behandlung mit gepulstem, hochenergetischem Ultraschall und lokaler Hyperthermie. Med. Dissertation, Universität Heidelberg 1992.

Feldman AL, Alexander HR Jr., Yang JC, Linehan WM, Eyler RA, Miller MS, Steinberg SM, Libutti SK. Prospective analysis of circulating endostatin levels in patients with renal cell carcinoma. *Cancer.* 2002;95:1637-1643.

Fenton BM, Paoni SF, Grimwood BG, Ding I. Disparate effects of endostatin on tumor vascular perfusion and hypoxia in two murine mammary carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;57:1038-1046.

Fenton BM, Paoni SF, Ding I. Effect of VEGF receptor-2 antibody on vascular function and oxygenation in spontaneous and transplanted tumors. *Radiother Oncol.* 2004;72:221-230.

- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L., O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380:439-442.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18:4-25.
- Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med*. 1998;4:336-340.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;237:1-30.
- Fidler IJ, Naito S, Pathak S. Orthotopic implantation is essential for the selection, growth and metastasis of human renal cell cancer in nude mice [corrected]. *Cancer Metastasis Rev*. 1990;9:149-165. Erratum in: *Cancer Metastasis Rev*. 1991;10:79.
- Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell*. 1994;79:185-188.
- Fidler IJ. Angiogenic heterogeneity: regulation of neoplastic angiogenesis by the organ microenvironment. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93:1040-1041.
- Findlay JK. Angiogenesis in reproductive tissues. *Endocrinol*. 1986;111:357-366.
- Flamme I, von Reutern M, Drexler HC, Syed-Ali S, Risau W. Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation. *Dev Biol*. 1995;171:399-414.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285:1182-1186.
- Folkman J. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest*. 1984;51:601-604.
- Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*. 1989;339:58-61.
- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*. 1990;82:4-6.
- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;267:10931-10934.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995;1:27-31.
- Folkman J, Hlatky L. The logic of anti-angiogenic gene therapy. In: Friedmann T. (Hrsg.): The Development of Gene Therapy. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1998:1-17.
- Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res*. 1999;59:99-106.

- Fortmeyer HP, Bastert G. Breeding and Keeping of nu/nu mice. *Z Versuchstierk.* 1977;19:339.
- Fortmeyer HP. Thymusaplastische Maus- (nu/nu) Thymusaplastische Ratte (rnu/rnu)-Haltung, Zucht, Versuchsmodelle. Schriftenreihe Versuchstierkunde 8, Verlag P. Parey, Berlin, Hamburg 1981.
- Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science.* 1995;270:1500-1502.
- Friedlander M, Theesfeld CT, Sugita M, Fruttiger M, Thomas MA, Chang S, Cheresch DA. Involvement of integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  in ocular neovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:9764-9769.
- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell.* 1998;94:715-725.
- Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* 1999;13:1055-1066.
- Garofalo A, Chirivi RG, Scanziani E, Mayo JG, Vecchi A, Giavazzi R. Comparative study on the metastatic behavior of human tumors in nude, beige/nude/xid and severe combined immunodeficient mice. *Invasion Metastasis.* 1993;13:82-91.
- Gehrtsen C, Vogel H. Physik. Springer, Berlin Heidelberg New York 1993.
- Geng L, Donnelly E, McMahon G, Lin PC, Sierra-Rivera E, Oshinka H, Hallahan DE. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. *Cancer Res.* 2001;61:2413-2419.
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* 1998;273:30336-30343.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999;285:1028-1032.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51:1417-1423.
- Giovanella BC, Yim SO, Stehlin JS, Williams LJ Jr. Development of invasive tumors in the "nude" mouse after injection of cultured human melanoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1972;48:1531-1533.
- Giovanella BC, Stehlin JS Jr., Williams LJ Jr., Lee SS, Shepard RC. Heterotransplantation of human cancers into nude mice: a model system for human cancer chemotherapy. *Cancer.* 1978;42:2269-2281.
- Goldman E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet.* 1907;2:1236-1240.

Gong H, Pottgen C, Stuben G, Havers W, Stuschke M, Schweigerer L. Arginine deiminase and other antiangiogenic agents inhibit unfavorable neuroblastoma growth: potentiation by irradiation. *Int J Cancer*. 2003;106:723-728.

Gorski DH, Mauceri HJ, Salloum RM, Gately S, Hellman S, Beckett MA, Sukhatme VP, Soff GA, Kufe DW, Weichselbaum RR. Potentiation of the antitumor effect of ionizing radiation by brief concomitant exposures to angiostatin. *Cancer Res*. 1998;58:5686-5689.

Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, Seetharam S, Koons A, Hari DM, Kufe DW, Weichselbaum RR. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res*. 1999;59:3374-3378.

Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br.J.Radiol*. 1953;26:638-648.

Griffin RJ, Williams BW, Wild R, Cherrington JM, Park H, Song CW. Simultaneous inhibition of the receptor kinase activity of vascular endothelial, fibroblast, and platelet-derived growth factors suppresses tumor growth and enhances tumor radiation response. *Cancer Res*. 2002;62:1702-1706.

Griscelli F, Li H, Cheong C, Opolon P, Bennaceur-Griscelli A, Vassal G, Soria J, Soria C, Lu H, Perricaudet M, Yeh P. Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:6698-6703.

Groningen van JP, Wenink ACG, Testers LHM. Myocardial capillaries: increase in number by splitting of existing vessels. *Anat. Embryol*. 1991;184:65-70.

Guba M, Cernaianu G, Koehl G, Geissler EK, Jauch KW, Anthuber M, Falk W., Steinbauer M. A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. *Cancer Res*. 2001;61:5575-5579.

GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz, 1999. Empfohlene maximale Injektionsvolumina bei Versuchstieren.

GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz, 1999. Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäusen und Ratten im Versuch.

Hajitou A, Grignet C, Devy L, Berndt S, Blacher S, Deroanne CF, Bajou K, Fong T, Chiang Y, Foidart JM, Noel A. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *FASEB J*. 2002;16:1802-1804.

Hallahan DE, Spriggs DR, Beckett MA, Kufe DW, Weichselbaum RR. Increased tumor necrosis factor alpha mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:10104-10107.

Hammersen F, Endrich B, Messmer K. The fine structure of tumor blood vessels. I. Participation of non-endothelial cells in tumor angiogenesis. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1985;4:31-43.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86:353-364.

Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.

Hanna NN, Seetharam S, Mauceri HJ, Beckett MA, Jaskowiak NT, Salloum RM, Hari D, Dhanabal M, Ramchandran R, Kalluri R, Sukhatme VP, Kufe DW, Weichselbaum RR. Antitumor interaction of short-course endostatin and ionizing radiation. *Cancer J*. 2000;6:287-293.

Hansen-Algenstaedt N, Stoll BR, Padera TP, Dolmans DE, Hicklin DJ, Fukumura D, Jain RK. Tumor oxygenation in hormone-dependent tumors during vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade, hormone ablation, and chemotherapy. *Cancer Res*. 2000; 60:4556-4560.

Hasan J, Byers R, Jayson GC. Intra-tumoural microvessel density in human solid tumours. *Br J Cancer*. 2002;86:1566-1577.

Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*. 2000;156:1363-1380.

Heldin CH, Eriksson U, Ostman A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Arch Biochem Biophys*. 2002;398:284-290.

Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med*. 1997;3:177-182.

Hendry JH. Treatment acceleration in radiotherapy: the relative time factors and dose-response slopes for tumours and normal tissues. *Radiother Oncol*. 1992;25:308-312.

Herbst RS, Mullani NA, Davis DW, Hess KR, McConkey DJ, Charnsangavej C, O'Reilly MS, Kim HW, Baker C, Roach J, Ellis LM, Rashid A, Pluda J, Bucana C, Madden TL, Tran HT, Abbruzzese JL. Development of biologic markers of response and assessment of antiangiogenic activity in a clinical trial of human recombinant endostatin. *J Clin Oncol*. 2002a;20:3804-3814.

Herbst RS, Hess KR, Tran HT, Tseng JE, Mullani NA, Charnsangavej C, Madden T, Davis DW, McConkey DJ, O'Reilly MS, Ellis LM, Pluda J, Hong WK, Abbruzzese JL. Phase I study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2002b;20:3792-3803.

Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermarck B, Nister M. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res*. 1992;52:3213-3219.

Hess C, Vuong V, Hegyi I, Riesterer O, Wood J, Fabbro D, Glanzmann C, Bodis S, Pruschy M. Effect of VEGF receptor inhibitor PTK787/ZK222584 [correction of ZK222548] combined with ionizing radiation on endothelial cells and tumour growth. *Br J Cancer*. 2001;85:2010-2016.

Heymach JV, Desai J, Manola J, Davis DW, McConkey DJ, Harmon D, Ryan DP, Goss G, Quigley T, Van den Abbeele AD, Silverman SG, Connors S, Folkman J, Fletcher CD, Demetri GD. Phase II study of the antiangiogenic agent SU5416 in patients with advanced soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5732-5740.

Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res*. 1996;32:687-698.

Hirschi KK, D'Amore PA. Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS*. 1997;79:419-428.

Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:883-893.

Hobson B, Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer*. 1984;49:405-413.

Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*. 1995;1:149-153.

Hood JD, Cheresh DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:91-100.

Huang J, Frischer JS, Serur A, Kadenhe A, Yokoi A, McCrudden KW, New T, O'Toole K, Zabski S, Rudge JS, Holash J, Yancopoulos GD, Yamashiro DJ, Kandel JJ. Regression of established tumors and metastases by potent vascular endothelial growth factor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:7785-7790.

Huber PE, Bischof M, Jenne J, Heiland S, Peschke P, Saffrich R, Grone HJ, Debus J, Lipson KE, Abdollahi A. Trimodal cancer treatment: beneficial effects of combined antiangiogenesis, radiation, and chemotherapy. *Cancer Res*. 2005;65:3643-3655.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69:11-25.

Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110:673-687.

Ide AG, Baker NH, Warren SL. Vascularisation of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Radiol*. 1939;42:891-899.

Ivaska J, Heino J. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*. 2000;20:57:16-24.

Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol*. 1987;18:234-239.

Jain RK. Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci Am*. 1994;271:58-65.

Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med*. 2001;7:987-989.

Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol*. 2002;29:3-9.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:10-30.

Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem*. 1997;272:19253-19260.

Kadambi A, Mouta CC, Yun CO, Padera TP, Dolmans DE, Carmeliet P, Fukumura D, Jain RK. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C differentially affects tumor vascular function and leukocyte recruitment: role of VEGF-receptor 2 and host VEGF-A. *Cancer Res*. 2001;61:2404-2408.

- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* 1979;17:16-23.
- Kakeji Y, Teicher BA. Preclinical studies of the combination of angiogenic inhibitors with cytotoxic agents. *Invest New Drugs.* 1997;15:39-48.
- Kakolyris S, Fox SB, Koukourakis M, Giatromanolaki A, Brown N, Leek RD, Taylor M, Leigh IM, Gatter KC, Harris AL. Relationship of vascular maturation in breast cancer blood vessels to vascular density and metastasis, assessed by expression of a novel basement membrane component, LH39. *Br J Cancer.* 2000;82:844-851.
- Kan Z, Phongkitkarun S, Kobayashi S, Tang Y, Ellis LM, Lee TY, Charnsangavej C. Functional CT for quantifying tumor perfusion in antiangiogenic therapy in a rat model. *Radiology.* 2005;237:151-158.
- Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene.* 2000;19:5598-5605.
- Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic endothelial regulation, lymphoedema, and lymph node metastasis. *Semin Cell Dev Biol.* 2002;13:9-18.
- Karpanen T, Alitalo K. Lymphatic vessels as targets of tumor therapy? *J Exp Med.* 2001;194:37-42.
- Karumanchi SA, Jha V, Ramchandran R, Karihaloo A, Tsiokas L, Chan B, Dhanabal M, Hanai JI, Venkataraman G, Shriver Z, Keiser N, Kalluri R, Zeng H, Mukhopadhyay D, Chen RL, Lander AD, Hagihara K, Yamaguchi Y, Sasisekharan R, Cantley L, Sukhatme VP. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Mol Cell.* 2001;7:811-822.
- Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:727-739.
- Kerbel RS, Yu J, Tran J, Man S, Vilorio-Petit A, Klement G, Coomber BL, Rak J. Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev.* 2001;20:79-86.
- Kerns BJ, Jordan PA, Faerman LL, Berchuck A, Bast RC Jr., Layfield LJ. Determination of proliferation index with MIB-1 in advanced ovarian cancer using quantitative image analysis. *Am J Clin Pathol.* 1994;101:192-197.
- Kiessling F, Krix M, Heilmann M, Vosseler S, Lichy M, Fink C, Farhan N, Kleinschmidt K, Schad L, Fusenig NE, Delorme S. Comparing dynamic parameters of tumor vascularization in nude mice revealed by magnetic resonance imaging and contrast-enhanced intermittent power Doppler sonography. *Invest Radiol.* 2003;38:516-524.
- Kiguchi K, Kubota T, Aoki D, Udagawa Y, Yamanouchi S, Saga M, Amemiya A, Sun FX, Nozawa S, Moossa AR, Hoffman RM. A patient-like orthotopic implantation nude mouse model of highly metastatic human ovarian cancer. *Clin Exp Metastasis.* 1998;16:751-756.
- Kishi K, Petersen S, Petersen C, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, Tofilon PJ, Milas L. Preferential enhancement of tumor radioresponse by a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res.* 2000;60:1326-1331.
- Koukourakis M, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos K, Pissakas G, Gatter KC, Harris AL. Squamous cell head and neck cancer: evidence of angiogenic regeneration during radiotherapy. *Anticancer Res.* 2001;21:4301-4309.

Kozin SV, Boucher Y, Hicklin DJ, Bohlen P, Jain RK, Suit HD. Vascular endothelial growth factor receptor-2-blocking antibody potentiates radiation-induced long-term control of human tumor xenografts. *Cancer Res.* 2001;61:39-44.

Kubota T, Inoue S, Furukawa T, Ishibiki K, Kitajima M, Kawamura E, Hofman RM. Similarity of serum-tumor pharmacokinetics of antitumor agents in man and nude mice. *Anticancer Res.* 1993;13:1481-1484.

Kubota T. Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. *J Cell Biochem.* 1994;56:4-8.

Kuenen BC, Tabernero J, Baselga J, Cavalli F, Pfanner E, Conte PF, Seeber S, Madhusudan S, Deplanque G, Huisman H, Scigalla P, Hoekman K, Harris AL. Efficacy and toxicity of the angiogenesis inhibitor SU5416 as a single agent in patients with advanced renal cell carcinoma, melanoma, and soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9:1648-1655.

Kumar CC, Malkowski M, Yin Z, Tanghetti E, Yaremko B, Nechuta T, Varner J, Liu M, Smith EM, Neustadt B, Presta M, Armstrong L. Inhibition of angiogenesis and tumor growth by SCH221153, a dual  $\alpha\beta 3$  and  $\alpha\beta 5$  integrin receptor antagonist. *Cancer Res.* 2001;61:2232-2238.

Kumar M, Liu ZR, Thapa L, Chang Q, Wang DY, Qin RY. Antiangiogenic effect of somatostatin receptor subtype 2 on pancreatic cancer cell line: Inhibition of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 expression in vitro. *World J Gastroenterol.* 2004;10:393-399.

Kung AL, Wang S, Kico JM, Kaelin WG, Livingston DM. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med.* 2000;6:1335-1340.

Lacal PM, Failla CM, Pagani E, Odorisio T, Schietroma C, Falcinelli S, Zambruno G, D'Atri S. Human melanoma cells secrete and respond to placenta growth factor and vascular endothelial growth factor. *J Invest Dermatol.* 2000;115:1000-1007.

Laird AD, Vajkoczy P, Shawver LK, Thurnher A, Liang C, Mohammadi M, Schlessinger J, Ullrich A, Hubbard SR, Blake RA, Fong TA, Strawn LM, Sun L, Tang C, Hawtin R, Tang F, Shenoy N, Hirth KP, McMahon G, Cherrington. SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors. *Cancer Res.* 2000;60:4152-4160.

Laird AD, Christensen JG, Li G, Carver J, Smith K, Xin X, Moss KG, Louie SG, Mendel DB, Cherrington JM. SU6668 inhibits Flk-1/KDR and PDGFRbeta in vivo, resulting in rapid apoptosis of tumor vasculature and tumor regression in mice. *FASEB J.* 2002;16:681-690.

Lee CG, Heijn M, di Tomaso E, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, Park KR, Ferrara N, Jain RK, Suit HD, Boucher Y. Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res.* 2000;60:5565-5570.

Leek RD. The prognostic role of angiogenesis in breast cancer. *Anticancer Res.* 2001;21:4325-4331.

Li L, Steinauer KK, Dirks AJ, Husbeck B, Gibbs I, Knox SJ. Radiation-induced cyclooxygenase 2 up-regulation is dependent on redox status in prostate cancer cells. *Radiat Res.* 2003;160:617-621.

- Li VW, Folkerth RD, Watanabe H, Yu C, Rupnick M, Barnes P, Scott RM, Black PM, Sallan SE, Folkman J. Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumours. *Lancet*. 1994;344:82-86.
- Li ZP, Meng QF, Sun CH, Xu DS, Fan M, Yang XF, Chen DY. Tumor angiogenesis and dynamic CT in colorectal carcinoma: radiologic-pathologic correlation. *World J Gastroenterol*. 2005;11:1287-1291.
- Lin JM, Lalani AS, Harding TC, Gonzalez M, Wu WW, Luan B, Tu GH, Koprivnikar K, VanRoey MJ, He Y, Alitalo K, Jooss K. Inhibition of Lymphogenous Metastasis Using Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer of a Soluble VEGFR-3 Decoy Receptor. *Cancer Research*. 2005;65:6901-6909.
- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. 2000;105:71-77.
- Littbrand B, Revesz L. The effect of oxygen on cellular survival and recovery after radiation. *Br J Radiol*. 1969;42:914-924.
- Livant DL, Brabec RK, Pienta KJ, Allen DL, Kurachi K, Markwart S, Upadhyay A. Anti-invasive, antitumorigenic, and antimetastatic activities of the PHSCN sequence in prostate carcinoma. *Cancer Res*. 2000;60:309-320.
- Lu B, Geng L, Musiek A, Tan J, Cao C, Donnelly E, McMahon G, Choy H, Hallahan DE. Broad spectrum receptor tyrosine kinase inhibitor, SU6668, sensitizes radiation via targeting survival pathway of vascular endothelium. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58:844-850.
- Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12:88-96.
- Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, Benezra R. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*. 1999;401:670-677.
- Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA, Gorski DH, Staba MJ, Stellato KA, Bigelow K, Heimann R, Gately S, Dhanabal M, Soff GA, Sukhatme VP, Kufe DW, Weichselbaum RR. Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy. *Nature*. 1998;394:287-291.
- Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:8104-8109.
- Mayer-Kuckuck T. Kernphysik. BG Teubner, Stuttgart 1984.
- Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ. Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-rastransformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood*. 1997;90:3322-3331.
- McDonald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med*. 2003;9:713-725.
- Milas L, Kishi K, Hunter N, Mason K, Masferrer JL, Tofilon PJ. Enhancement of tumor response to gamma-radiation by an inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:1501-1504.

- Miller KD, Miller M, Mehrotra S, Agarwal B, Mock BH, Zheng QH, Badve S, Hutchins GD, Sledge GW Jr. A physiologic imaging pilot study of breast cancer treated with AZD2171. *Clin Cancer Res.* 2006;12:281-288.
- Mitchell BS, Horny HP, Schumacher U. Immunophenotyping of human HT29 colon cancer cell primary tumours and their metastases in severe combined immunodeficient mice. *Histochem J.* 1997;29:393-399.
- Miyashita M, Tajiri T, Yanagi K, Shimizu T, Futami R, Sasajima K, Tokunaga A. Serum levels of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and endostatin in human metastatic liver tumors. *Hepatogastroenterology.* 2003;50:308-309.
- Moreto M. Diagnosis of esophagogastric tumors. *Endoscopy.* 2001;33:1-7.
- Nagashima M, Asano G, Yoshino S. Imbalance in production between vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2000;27:2339-2342.
- Nakamoto T, Chang CS, Li AK, Chodak GW. Basic fibroblast growth factor in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1992;52:571-577.
- Nemeth JA, Cher ML, Zhou Z, Mullins C, Bhagat S, Trikha M. Inhibition of alpha(v)beta3 integrin reduces angiogenesis, bone turnover, and tumor cell proliferation in experimental prostate cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis.* 2003;20:413-420.
- Nicolson GL. Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer Metastasis Rev.* 1988;7:143-188.
- Nicosia RF, Bonanno E. Inhibition of angiogenesis in vitro by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptide. *Am J Pathol.* 1991;138:829-833.
- Nicosia RF, Villaschi S. Autoregulation of angiogenesis by cells of the vessel wall. *Int Rev Cytol.* 1999;185:1-43.
- Ning S, Laird D, Cherrington JM, Knox SJ. The antiangiogenic agents SU5416 and SU6668 increase the antitumor effects of fractionated irradiation. *Radiat Res.* 2002;157:45-51.
- O'Farrell AM, Yuen HA, Smolich B, Hannah AL, Louie SG, Hong W, Stopeck AT, Silverman LR, Lancet JE, Karp JE, Albitar M, Cherrington JM, Giles FJ. Effects of SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, on FLT3 expression and phosphorylation in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2004;28:679-689.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 1997;88:277-285.
- Owen JB, Coia LR, Hanks GE. Recent patterns of growth in radiation therapy facilities in the United States: a patterns of care study report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992;24:983-986.
- Papamichael D. Prognostic role of angiogenesis in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2001;21:4349-4353.

- Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Kolesnick R. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science*. 2001;293:293-297.
- Patan S, Alvarez MJ, Schittny JC, Burri PH. Intussusceptive microvascular growth: a common alternative to capillary sprouting. *Arch Histol Cytol*. 1992;55:65-75.
- Patan S, Haenni B, Burri PH. Evidence for intussusceptive capillary growth in the chicken chorio-allantoic membrane (CAM). *Anat Embryol*. 1993;187:121-130.
- Pepper MS. Manipulating angiogenesis: from basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:605.
- Peterson AC, Swiger S, Stadler WM, Medved M, Karczmar G, Gajewski TF. Phase II study of the Flk-1 tyrosine kinase inhibitor SU5416 in advanced melanoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:4048-4054.
- Plendl J, Sinowatz F. Angiogenese und Antiangiogenese: neue therapeutische Strategien. *Tierärztl Prax*. 1999;27:348-353.
- Povlsen CO, Rygaard J. Heterotransplantation of human adenocarcinomas of the colon and rectum to the mouse mutant Nude. A study of nine consecutive transplantations. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1971;79:159-169.
- Rafii 2000. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest*. 2000;105:17-19.
- Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2000;5:24-33.
- Randt T. Immunhistologischer CEA-Nachweis an serienmäßig auf Nacktmäuse xenotransplantierten menschlichen Dickdarmtumoren. Med. Dissertation, Universität Freiburg i. Brsg. 1984.
- Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Genes Dev*. 2000;14:34-44.
- Ray JM, Stetler Stevenson WG. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J*. 1994;7:2062-2072.
- Redmer DA, Reynolds LP. Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod*. 1996;1:182-192.
- Reinmuth N, Liu W, Jung YD, Ahmad SA, Shaheen RM, Fan F, Bucana CD, McMahon G, Gallick GE, Ellis LM. Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival. *FASEB J*. 2001;15:1239-1241.
- Reinmuth N, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Stoeltzing O, Parikh AA, Bucana CD, Gallick GE, Nickols MA, Westlin WF, Ellis LM. Alphavbeta3 integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. *Cancer Res*. 2003;63:2079-2087.

- Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res.* 1997;57:963-969.
- Revazova ES, Solovjov YN, Chumakov PM, Kushlinskij NE, Tkachjova GA, Spitkovsky DD, Karamov EV, Frolova EI. Study of human tumor models established in nude mice. In: H.H. Fiebig, D.P. Berger (Hrsg.): *Immunodeficient Mice in Oncology*. Verl. Karger, Basel 1992;126-127.
- Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, Sheppard D, Hynes RO, Hodivala-Dilke KM. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med.* 2002;8:27-34.
- Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:73-91.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386:671-674.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 1987;238:491-497.
- Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell.* 1994;77:477-478.
- Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:83-90.
- Rusnati M, Tanghetti E, Dell'Era P, Gualandris A, Presta M. alphavbeta3 integrin mediates the cell-adhesive capacity and biological activity of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in cultured endothelial cells. *Mol Biol Cell.* 1997;8:2449-2461.
- Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, Szeluga DJ, Rubin DB. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum.* 1994;37:921-926.
- Saharinen P, Alitalo K. Double target for tumor mass destruction. *J Clin Invest.* 2003;111:1277-1280.
- Samuels MA. Cytoprotection in head and neck cancer: issues in oral care. *J Support Oncol.* 2004;2:9-12.
- Sanders JL, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Brown EM. Ca(2+)-sensing receptor expression and PTHrP secretion in PC-3 human prostate cancer cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281:1267-1274.
- Sasaki T, Fukai N, Mann K, Gohring W, Olsen BR, Timpl R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J.* 1998;17:4249-4256.
- Schueneman AJ, Himmelfarb E, Geng L, Tan J, Donnelly E, Mendel D, McMahon G, Hallahan DE. SU11248 maintenance therapy prevents tumor regrowth after fractionated irradiation of murine tumor models. *Cancer Res.* 2003;63:4009-4016.
- Sckell A, Safabakhsh N, Dellian M, Jain RK. Primary tumor size-dependent inhibition of angiogenesis at a secondary site: an intravital microscopic study in mice. *Cancer Res.* 1998;58:5866-5869.

Seftor RE. Role of the beta3 integrin subunit in human primary melanoma progression: multifunctional activities associated with alpha(v)beta3 integrin expression. *Am J Pathol.* 1998;153:1347-1351.

Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol.* 1996;149:293-305.

Seymour L, Dajee D, Bezwoda WR. Tissue platelet derived-growth factor (PDGF) predicts for shortened survival and treatment failure in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1993;26:247-252.

Shaheen RM, Davis DW, Liu W, Zebrowski BK, Wilson MR, Bucana CD, McConkey DJ, McMahan G, Ellis LM. Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res.* 1999;59:5412-5416.

Shannon KE, Keene JL, Settle SL, Duffin TD, Nickols MA, Westlin M, Schroeter S, Ruminski PG, Griggs DW. Anti-metastatic properties of RGD-peptidomimetic agents S137 and S247. *Clin Exp Metastasis.* 2004;21:129-138.

Sheppard D. Endothelial integrins and angiogenesis: not so simple anymore. *J Clin Invest.* 2002;110:913-914.

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MAS, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998;92:362-367.

Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:768-772.

Sim BK, MacDonald NJ, Gubish ER. Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev.* 2000;19:181-190.

Singh RK, Llansa N, Bucana CD, Sanchez R, Koura A, Fidler IJ. Cell density-dependent regulation of basic fibroblast growth factor expression in human renal cell carcinoma cells. *Cell Growth Differ.* 1996;7:397-404.

Skarsgaard L, Kihlman B, Parker L, Pujara C, Richardson S. Survival, chromosome abnormalities and recovery in heavy-ion- and xirradiated mammalian cells. *Radiat Res.* 1967;7:208-221.

Sordat B, Merenda C, Carrel S. Invasive growth and dissemination of human solid tumors and malignant cell lines grafted subcutaneously to new-born nude mice. In: Nomura, T. (Hrsg.): Proc Second Intern Workshop Nude Mice. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1977;313-26.

Sorensen DR, Read TA, Porwol T, Olsen BR, Timpl R, Sasaki T, Iversen PO, Benestad HB, Sim BK, Bjerkvig R. Endostatin reduces vascularization, blood flow, and growth in a rat gliosarcoma. *Neuro-oncol.* 2002;4:1-8.

Sprent J. Migration and Lifespan of Circulating B-Lymphocytes of Nude (nu/nu) Mice. In: Ryygard J, Povlsen CO (Hrsg.): Proc First Intern Workshop Nude Mice. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1974;11-12.

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med.* 2001;7:186-191.

Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J.* 2002;16:922-934.

Steel GG. Growth kinetics of tumours: cell population kinetics in relation to the growth and treatment of cancer. In: Steel (Hrsg): Growth kinetics of tumours. Clarendon Press, Oxford 1977;309-341.

Steel GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1979;5:85-91.

Steele CB, Miller DS, Maylahn C, Uhler RJ, Baker CT. Knowledge, attitudes, and screening practices among older men regarding prostate cancer. *Am J Public Health.* 2000;90:1595-1600.

Stefanou D, Batistatou A, Kamina S, Arkoumani E, Papachristou DJ, Agnantis NJ. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and association with microvessel density in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *In Vivo.* 2004;18:155-160.

Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Fan F, Parry GC, Parikh AA, McCarty MF, Bucana CD, Mazar AP, Ellis LM. Inhibition of integrin alpha5beta1 function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-FU infusion reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice. *Int J Cancer.* 2003;104:496-503.

Story MT. Polypeptide modulators of prostatic growth and development. *Cancer Surv.* 1991;11:123-146.

Stromblad S, Becker JC, Yebra M, Brooks PC, Cheresh DA. Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin  $\alpha v \beta 3$  during angiogenesis. *J Clin Investig.* 1996;98:426-433.

Sun L, Tran N, Liang C, Tang F, Rice A, Schreck R, Waltz K, Shawver LK, McMahon G, Tang C. Design, synthesis, and evaluations of substituted 3-[(3- or 4-carboxyethylpyrrol-2-yl)methylidene]indolin-2-ones as inhibitors of VEGF, FGF, and PDGF receptor tyrosine kinases. *J Med Chem.* 1999;42:5120-5130.

Takeuchi H, Kanzawa T, Kondo Y, Kondo S. Inhibition of platelet-derived growth factor signalling induces autophagy in malignant glioma cells. *Br J Cancer.* 2004;90:1069-1075.

Tan J, Hallahan DE. Growth Factor-Independent Activation of Protein Kinase B Contributes to the Inherent Resistance of Vascular Endothelium to Radiation-Induced Apoptotic Response. *Cancer Res.* 2003;63:7663-7667.

Tan J, Geng L, Yazlovitskaya EM, Hallahan DE. Protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in irradiated vascular endothelium. *Cancer Res.* 2006;15;66:2320-2327.

te Velde EA, Vogten JM, Gebbink MF, van Gorp JM, Voest EE, Borel R, I. Enhanced antitumor efficacy by combining conventional chemotherapy with angiostatin or endostatin in a liver metastasis model. *Br J Surg*. 2002;89:1302-1309.

Teicher BA, Holden SA, Ara G, Dupuis NP, Liu F, Yuan J, Ikebe M, Kakeji Y. Influence of an anti-angiogenic treatment on 9L gliosarcoma: oxygenation and response to cytotoxic therapy. *Int J Cancer*. 1995;61:732-737.

Tejeda M, Gaal D, Barna K, Csuka O, Keri G. The antitumor activity of the somatostatin structural derivative (TT-232) on different human tumor xenografts. *Anticancer Res*. 2003;23:4061-4066.

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187:1579-1586.

Thomas JP, Arzoomanian RZ, Alberti D, Marnocha R, Lee F, Friedl A, Tutsch K, Dresen A, Geiger P, Pluda J, Fogler W, Schiller JH, Wilding G. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. 2003;21:223-231.

Toi M, Hoshina S, Takayanagi T, Tominaga T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res*. 1994;85:1045-1049.

Toi M, Hoshina S, Taniguchi T, Yamamoto Y, Ishitsuka H, Tominaga T. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast cancer. *Int J Cancer*. 1995;64:79-82.

Trikha M, Zhou Z, Timar J, Raso E, Kennel M, Emmell E, Nakada MT. Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub> integrins in tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res*. 2002;62:2824-2833.

Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuysen B, Koike C, Carmeliet P, Jain RK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha--> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res*. 2000;60:6248-6252.

Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A. Introduction to Radiobiology. Taylor and Francis, London New York Philadelphia 1990.

Vajkoczy P, Menger MD, Vollmar B, Schilling L, Schmiedek P, Hirth KP, Ullrich A, Fong TA. Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy. *Neoplasia*. 1999;1:31-41.

Varner JA, Cheresch DA. Tumor angiogenesis and the role of vascular cell integrin  $\alpha\beta_3$ . *Important Adv Oncol*. 1996;:69-87.

Vermeulen PB, Dirix LY, Van Marck E, Van Oosterom AT. High endothelial cell proliferation index and high microvessel density in vascular hotspots suggest an active angiogenic process in human colorectal adenocarcinomas. Angiogenesis Group. *Br J Cancer*. 1996;74:1506-1507.

- Wachsberger P, Burd R, Dicker AP. Tumor response to ionizing radiation combined with antiangiogenesis or vascular targeting agents: exploring mechanisms of interaction. *Clin Cancer Res*. 2003;9:1957-1971.
- Watt SM, Gschmeisser SE, Bates PA. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma*. 1995;17:229-244.
- Weichselbaum RR, Dahlberg W, Beckett M, Karrison T, Miller D, Clark J, Ervin TJ. Radiation-resistant and repair-proficient human tumor cells may be associated with radiotherapy failure in head- and neck-cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83:2684-2688.
- Weichselbaum RR, Beckett MA, Dahlberg W, Dritschilo A. Heterogeneity of radiation response of a parent human epidermoid carcinoma cell line and four clones. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1988;14:907-912.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;324:1-8.
- Weiss N, Delius M, Gambihler S, Dirschedl P, Goetz A, Brendel W. Influence of the shock wave application mode on the growth of A-Mel 3 and SSK2 tumors in vivo. *Ultrasound Med Biol*. 1990;16:595-605.
- Weng DE, Usman N. Angiozyme: a novel angiogenesis inhibitor. *Curr Oncol Rep*. 2001;3:141-146.
- Wickstrom SA, Alitalo K, Keski-Oja J. Endostatin associates with integrin alpha5beta1 and caveolin-1, and activates Src via a tyrosyl phosphatase-dependent pathway in human endothelial cells. *Cancer Res*. 2002;62:5580-5589.
- Witte L, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A, Vlodavsky I, Goodman DS, Eldor A. Effects of irradiation on the release of growth factors from cultured bovine, porcine, and human endothelial cells. *Cancer Res*. 1989;49:5066-5072.
- Woloschak GE, Chang-Liu CM, Jones PS, Jones CA. Modulation of gene expression in Syrian hamster embryo cells following ionizing radiation. *Cancer Res*. 1990;50:339-344.
- Xia H, Luo LM, Wen JX, Tong WC. Inhibitory effects of recombinant human endostatin on growth and metastasis of lung adenocarcinoma LA795 in mice. *Ai Zheng*. 2002;21:1197-1202.
- Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, Sasaki T, Fukai N, Shapiro R, Que I, Lowik C, Timpl R, Olsen BR. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J*. 1999;18:4414-4423.
- Yamazaki K, Abe S, Takekawa H, Sukoh N, Watanabe N, Ogura S, Nakajima I, Isobe H, Inoue K, Kawakami Y. Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. *Cancer*. 1994;74:2245-2250.
- Yoshida K, Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Toge T, Tahara E. Expression of growth factors and their receptors in human esophageal carcinomas: regulation of expression by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1993;119:401-407.
- Yoshiji H, Harris SR, Thorgeirsson UP. Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res*. 1997;57:3924-3928.

Yuan F, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, Jain RK. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:14765-14770.

Zangari M, Anaissie E, Stopeck A, Morimoto A, Tan N, Lancet J, Cooper M, Hannah A, Garcia-Manero G, Faderl S, Kantarjian H, Cherrington J, Albitar M, Giles FJ. Phase II study of SU5416, a small molecule vascular endothelial growth factor tyrosine kinase receptor inhibitor, in patients with refractory multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:88-95.

Zenk J, Bozzato A, Steinhart H, Greess H, Iro H. Metastatic and inflammatory cervical lymph nodes as analyzed by contrast-enhanced color-coded Doppler ultrasonography: quantitative dynamic perfusion patterns and histopathologic correlation. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005;114:43-47.

Zhang GF, Wang YH, Zhang MA, Wang Q, Luo YB, Wang DS, Han CR. Inhibition of growth and metastases of human colon cancer xenograft in nude mice by angiogenesis inhibitor endostatin. *Ai Zheng*. 2002;21:50-53.

## Veröffentlichte Teilaspekte

Abdollahi A, Lipson KE, Sckell A, Zieher H, Klenke F, Poerschke D, Roth A, Han X, Krix M, Bischof M, Hahnfeldt P, Grone HJ, Debus J, Hlatky L, Huber PE. Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects. *Cancer Res.* 2003;63:8890-8898.

Abdollahi A, Griggs DW, Zieher H, Roth A, Lipson KE, Saffrich R, Grone HJ, Hallahan DE, Reisfeld RA, Debus J, Niethammer AG, Huber PE. Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11:6270-6279.

Abdollahi A, Zieher H, Roth A, Poerschke D, Niethammer A, Oertel S, Krempien R, Debus J, Lipson K, Grone HJ, Weber KJ, Huber PE. Radiation markedly increases antiangiogenic and antitumor effects of combined VEGF/PDGF Signaling Inhibition in PC3 Human Prostate and U87 Glioblastoma models. *Cancer Res.* in Revision.

---

## Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Huber für die Überlassung des interessanten Themas, seine Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit und die Bewältigung der statistischen Herausforderung.

Herrn Prof. Dr. Manfred Reinacher für die externe Betreuung und sein Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Dr. Jürgen Jenne, Frau Dr. Gabriela Wilzbach Divkovic, Herrn Dr. Ralf Rastert, Herrn Dr. Peter Peschke, Herrn Dr. Amir Abdollahi, Frau Dr. Heike Corban-Wilhelm, Frau Alexandra Roth und Herrn Dr. Daniel Poerschke für die kooperative Zusammenarbeit und ihre fachliche Kompetenz, mit der sie diese Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Hermann-Josef Gröne, Leiter der Abteilung Zelluläre und Molekulare Pathologie des DKFZ, für die stets freundliche Unterstützung und Beratung. Ganz besonders auch Frau Iris Moll der Abteilung, Frau Annette Kohl, Mund-Zahn-Kieferklinik und Frau Thui Trinh, Radiologische Klinik der Kopfklinik des Universitätsklinikums Heidelberg, für die Einweisung in die Welt der (immun)-histologischen und zellbiologischen Arbeitstechniken und ihre Unterstützung.

Frau Dr. Rita Sanchez-Brandelik, Herrn Dr. Uwe Zillmann, Leiter des Zentralen Tierlabors (ZTL) des DKFZ, und Herrn Dr. Werner Nicklas für ihre interessanten und kreativen Anregungen bei tierexperimentellen Belangen jeglicher Art. Unvergessen auch die vielen Stunden im Reich der versierten Pfleger mit Herzen für Tiere des ZTL.

Nicht zuletzt Herrn PD Dr. Detlef Thiele für seine kollegiale Unterstützung und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Für ihre Unterstützung, das Verständnis und ihre unermüdliche Geduld danke ich insbesondere meiner Mutter, Harald und meinen Freunden, die immer wieder aufmunternde Worte während der Anfertigung dieser Arbeit gefunden haben.  
DANKE.

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5155-6



9 783835 195155 6

