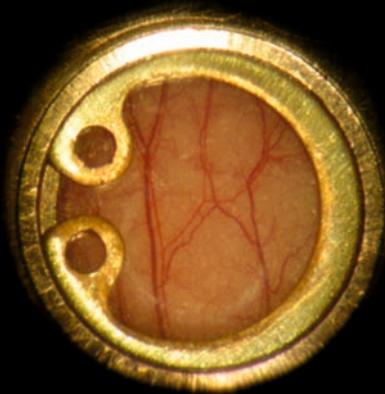


**Niedrigdosierte kontinuierliche Chemotherapie mit
Temozolomid (TMZ) zur Behandlung maligner
Gliome in athymischen NMRI nu/nu Mäusen
sowie die Rolle der angiogenen Faktoren
VEGF und Cyclooxygenase-2**

TOBIAS KORN



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
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 2013

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.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Universitätsklinikum Mannheim, Abteilung Neurochirurgie

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

Niedrigdosierte kontinuierliche Chemotherapie mit
Temozolomid (TMZ) zur Behandlung maligner
Gliome in athymischen NMRI nu/nu Mäusen
sowie die Rolle der angiogenen Faktoren
VEGF und Cyclooxygenase-2

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

eingereicht von

Tobias Korn
Tierarzt aus Pritzwalk

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs

Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Peter Vajkoczy
Prof. Dr. Eberhard Burkhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2013

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe, nur mit den hierin genannten Hilfsmitteln und Beihilfen erstellt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie die in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Tobias Korn

Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	3
Inhaltsverzeichnis.....	4
1 Einleitung.....	6
2 Literaturübersicht.....	8
2.1 Gliatumoren.....	8
2.1.1 Einteilung.....	8
2.1.2 Genetische Veränderungen.....	9
2.1.3 Prognostische Faktoren.....	10
2.1.4 Therapeutische Optionen.....	10
2.2 Temozolomid (TMZ).....	11
2.2.1 Pharmakologie und -kinetik.....	11
2.2.2 Wirkmechanismus.....	12
2.2.3 Dosierschemata.....	13
2.3 Resistenz- und Reparaturmechanismen.....	13
2.4 Angiogenese.....	14
2.4.1 Vascular Endothelia Growth Factor (VEGF).....	15
2.4.2 Cyclooxygenase 2.....	15
2.5 Humane endotheliale Nabelschnurvenen-Zellen.....	16
2.6 Prinzip der anti-angiogenen Therapie.....	16
2.7 Prinzip der kontinuierlichen niedrigdosierten oder metronomen Therapie.....	17
2.8 Migration als Problem der Gliomtherapie.....	18
3 Ziel der Arbeit.....	19
4 Material und Methoden.....	20
4.1 Versuchstiere.....	20
4.2 Temozolomid (TMZ).....	20
4.2.1 Herstellung und Dosierung einer TMZ-Injektionslösung.....	20
4.3 Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC).....	21
4.4 Tumorzellen.....	21
4.4.1 Zellkultur.....	22
4.4.2 Zytotoxizitäts-Untersuchungen.....	22
4.4.3 Herstellung von Sphäroiden.....	23
4.4.4 Migrationsuntersuchungen.....	23
4.5 Tumormodelle.....	23
4.5.1 Subkutanen Tumormodell zur Ermittlung des Tumorwachstums.....	23
4.5.2 Rückenhautkammermodell (RHK) zur Ermittlung der Tumorvaskularisation.....	24
4.6 Intravitalvideomikroskopie.....	27
4.6.1 Multifluoreszenzvideomikroskopie.....	27
4.6.2 Auswertungsparameter.....	28
4.7 Immunhistologie.....	31
4.8 RNA-Analyse.....	32
4.8.1 Gewebeaufbereitung.....	32
4.8.2 Reverse Transkriptase.....	32
4.8.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	33
4.8.4 Auftrennen der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese.....	34
4.9 Proteindetektion mittels Western Blot.....	34
4.9.1 Probenaufbereitung.....	34
4.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
4.9.3 SDS-PAGE Gelelektrophorese.....	34
4.9.4 Semi-Dry-Blot.....	35

4.10	Tabelle verwendeter Chemikalien	36
4.11	Protokolle.....	37
4.11.1	Immunhistochemische Färbungen und H.&E. Färbung	37
4.11.2	Western Blot	37
4.11.3	Puffer und Lösungen.....	39
5	Ergebnisse.....	40
5.1	Wachstumsverhalten und Chemoresistenz gegenüber TMZ in vitro.....	40
5.1.1	SF188wt- und SF188tr-Zelllinien	40
5.2	Zytotoxizitätsassay in der Zellkultur (MTT-Assay)	41
5.2.1	SF188wt und SF188tr Zellen	41
5.2.2	HUVEC Zellen.....	42
5.3	Vergleich der Migration von Sphäroiden in vitro.....	43
5.4	Charakterisierung der Tumorzellen in vivo	45
5.4.1	Untersuchungen im subkutanen Tumormodell	45
5.4.2	Intravitalmikroskopie der Rückenhautkammern.....	45
5.4.3	Immunhistologische Untersuchungen der Zelllinien auf Gefäßdichte in der RHK	47
5.4.4	Expression der angiogenen Faktoren VEGF und Cox-2.....	48
5.5	Vergleich der Therapiemodelle unter TMZ-Therapie	49
5.5.1	Vergleich der TMZ-Therapiedosen im subkutanen Tumormodell	49
5.5.2	Wirkungsvergleich der TMZ-Therapiedosen auf die Tumorangiogenese in der Rückenhautkammer	50
5.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	51
6	Diskussion	52
6.1	Gliome.....	52
6.1.1	Gliome und deren vaskuläre Besonderheiten.....	52
6.1.2	Gliome und deren infiltrative Eigenschaften	53
6.1.3	Rolle der Cyclooxygenase-2 bei der Neovaskularisation	54
6.1.4	Rolle der Migration	56
6.2	Temozolomid in der Gliomtherapie.....	56
6.3	TMZ in der low-dose bzw. metronomischen Therapie.....	57
6.4	Tumormodelle.....	59
6.4.1	Subkutanen Tumormodell	59
6.4.2	Tumormodell der RHK	60
7	Schlussfolgerung	61
8	Zusammenfassung	62
8.1	Summary.....	63
9	Abkürzungen	65
10	Referenzen.....	67
11	Danksagung	71

1 Einleitung

Gliale Tumore sind mit ca. 60% die häufigsten zerebralen Neubildungen beim Menschen. Tumore des Gehirns umfassen eine Reihe unterschiedlicher Tumortypen. Zu ihnen zählen auch gutartige Neubildungen, die jedoch durch ihr verdrängendes Wachstum einen bösartigen und schließlich tödlichen Verlauf nehmen, wenn sie unbehandelt bleiben. Unterschieden wird dabei zwischen den Astrozytomen, den Oligodendrogliomen und den Mischgliomen. Mit einer Rate von 5364 Neuerkrankungen im Jahr 2002 in Deutschland gehören die Hirntumoren eher zu den seltenen Tumorarten. Bei dem überwiegenden Teil der Hirntumoren handelt es sich um Gliome.

Da die Prognose bei der Behandlung maligner Gliome sehr ungünstig ist, besteht das derzeit mögliche Therapieziel hier vor allem in einer Verlängerung der Überlebenszeit bei guter Lebensqualität.

Die Standardtherapie des malignen Glioms umfasst derzeit die chirurgische Resektion mit darauf folgender Strahlentherapie. Der Stellenwert einer Chemotherapie im Rahmen der Standardtherapie wird für die malignen Gliome (mit Ausnahme der oligodendroglialen Tumoren) kontrovers beurteilt (Hofer S., Merlob, A., 2002).

Das Wachstum von malignen Gliomen ist sehr abhängig von der Entwicklung eines ausgeprägten Gefäßsystems. Je dichter das Gefäßnetzwerk, desto höher der Malignitätsgrad (Leon S.P. et al., 1996). Daher ist eine Therapie gegen das vaskuläre Kompartement dieser Tumore eine mögliche Strategie zur Verminderung des Wachstums.

Ein Angriff auf das Gefäßsystem eignet sich vermutlich besser als Ansatzpunkt einer Therapie, da die Endothelzellen einerseits eine geringere Wirkdosis des Chemotherapeutikums benötigen als die Tumorzellen und andererseits genetisch stabiler sind und daher eine Resistenzentwicklung unwahrscheinlicher ist.

Dieser Therapieansatz hat zum Ziel, die Gefäßneubildung des Tumors zu unterbinden, um ihm die Nährstoffgrundlage zu entziehen und damit sein Wachstum zu vermindern.

Da bei der konservativen Chemotherapie die maximal tolerierbaren Dosen in zyklischen Gaben verabreicht werden, entsteht eine Therapiepause, in der sich Endothelzellen regenerieren und neu gebildete Gefäße sich stabilisieren können. Um dies zu vermeiden, wäre eine kontinuierliche Applikation des Chemotherapeutikums notwendig, was aber in der Regel vom Organismus des Tumorpatienten aufgrund der Toxizität des Medikamentes nicht toleriert wird.

Deshalb begünstigt eine niedrigdosierte kontinuierliche, sog. metronomische Chemotherapie (von Metronom: mechanischer Taktgeber in der Musik) auch die Lebensqualität der Patienten, da durch die geringeren Wirkstoffkonzentrationen die Nebenwirkungen ebenfalls milder ausfallen.

Als mögliches Chemotherapeutikum für einen solchen Therapieansatz eignet sich Temozolomid aufgrund seiner hohen Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe.

Bisher ist es jedoch nicht klar, inwieweit eine solche Therapiestrategie mit Temozolomid Erfolg haben könnte und ob das vaskuläre Kompartement resistenter Tumoren ebenfalls auf diesen theoretischen Ansatz anspricht.

2 Literaturübersicht

2.1 Gliatumoren

2.1.1 Einteilung

Von der WHO werden die Gliome des Menschen nach ihrem histologischen Bild und der Prognose eingeteilt. Tabelle 1 zeigt die modifizierte Klassifikation nach Hofer S. et al (1999).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation und histopathologische Einteilung der Gliome

Gliatumoren	WHO	Grad I	Grad II	Grad III	Grad IV
Histopathologie (Daumas-Duport C. et al., 1988)		keine Kriterien	1 Kriterium nukleäre Atypie	2 Kriterien nukleäre Atypie + mitotische Aktivität	3 Kriterien nukleäre Atypie + Mitose + endotheliale Proliferation, +/- Nekrosen
astrozytäre Tumoren	pilozytisches Astrozytom	+			
	Astrozytom		+		
	anaplastisches Astrozytom			+	
	Glioblastoma multiforme				+
Oligodendro- gliome	Oligodendrogliom		+		
	anaplastisches Oligodendrogliom			+	
Mischgliome	Oligoastrozytom		+		
	anaplastisches Oligoastrozytom			+	

Grad I ist gekennzeichnet durch ein isomorphes histologisches Bild mit geringer Zelldichte und seltenen Mitosen. Es treten keine Zell- bzw. Kernanplasie auf. Die Prognose ist bei möglicher totaler Resektion günstig mit Überlebenszeiten von über fünf Jahren.

Grad II zeigt histologisch ein etwas unruhiges, jedoch noch isomorphes Gewebebild mit mittlerer Zelldichte und geringen Zell- bzw. Kernaplasien. Gelegentlich zeigen sich Mitosen und es ist eine geringe Gefäßproliferation zu beobachten. Die prognostische Überlebenszeit beträgt zwischen 3-5 Jahren, da ein erhebliches Potenzial zur malignen Progression besteht.

Grad III zeigt ein heteromorphes unruhiges Gewebebild mit hoher Zelldichte und starken Zell- bzw. Kernaplasien. Des Weiteren sind reichlich Mitosen, starke Gefäßproliferationen, Endothelproliferationen und evtl. auch schon Nekrosen zu beobachten. Die Überlebenszeit wird mit 2-3 Jahren angegeben.

Grad IV ist gekennzeichnet durch extreme Polymorphie, ausgedehnte Nekrosen und die zytogenetische Abkunft ist kaum noch erkennbar. Starke Gefäß- und Bindegewebs-

proliferationen sind zu beobachten. Prognostisch ist das maligne Gliom mit einer Überlebenszeit von 6-15 Monate sehr ungünstig.

2.1.2 Genetische Veränderungen

Alle gliale Tumore basieren auf molekularen Abnormalitäten. Die Tumore weisen häufig eine histologische Entartung im zeitlichen Verlauf auf, häufig durch einen Verlust oder eine Mutation der Chromosomen 17p, 9p, 19q, 10q und 22q.

Oligodendrogliome sind meist prognostisch günstiger als Astrozytome. Dies rührt daher, weil sie meist chemosensitiver sind. Daher wird hier nur am Rande auf sie eingegangen.

Primäre maligne Astrozytome entstehen *de novo*, meistens in älteren Patienten ohne dass niedriggradigere Tumore vorausgegangen sind. Zytogenetisch zeigen sie häufig eine Polysomie des Chromosoms 7 und einen Verlust von Chromosom 10 sowie molekulargenetisch eine Amplifikation des EGFR-Gens und eine Deletion des PTEN-Gens.

Sekundäre maligne Astrozytome kommen hingegen häufig bei jüngeren Personen mit progredienten niedriggradigen Astrozytomen vor. Zusätzlich zu p53 Mutationen haben diese Tumoren verschiedenste andere genetische Veränderungen, die eventuell dazu führen, dass der Zellzyklus unkontrolliert die G1 Phase zur S Phase passiert.

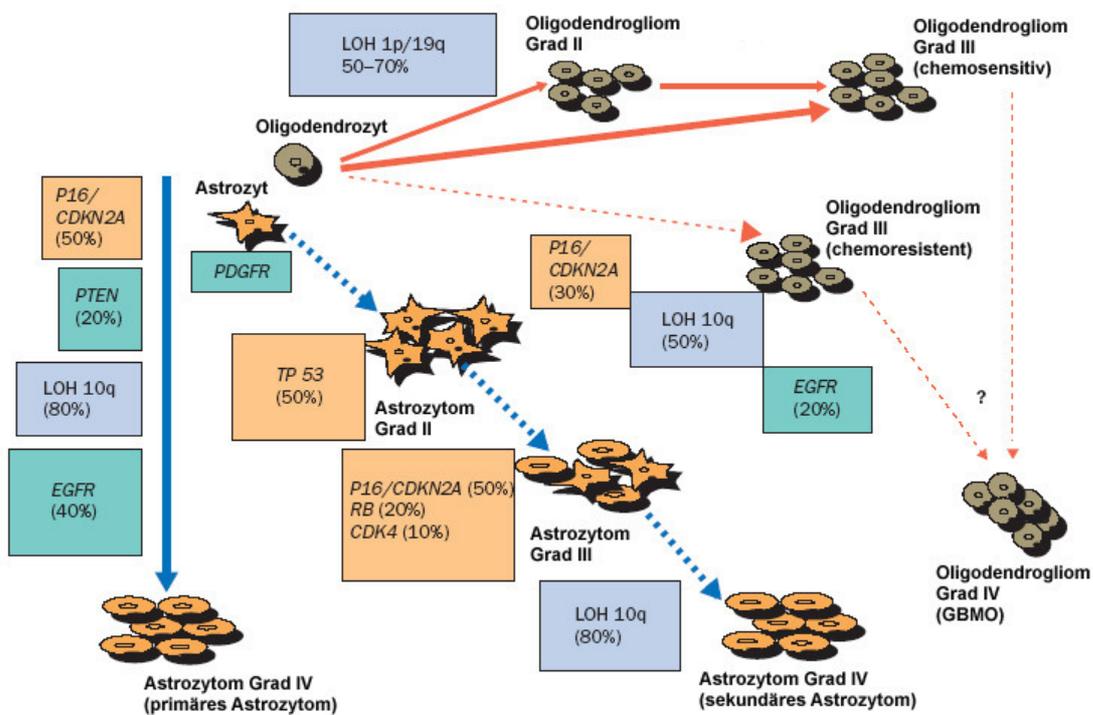


Abbildung 1: Genetische Veränderungen in der Progression von Gliomen (Behin A. et al., 2003)

Ein Merkmal dieser Tumoren ist die Korrelation der Anzahl der genetischen Abberationen mit dem höheren histopathologischen Grad.

Mutationen der an der Zellzyklus-Regulation beteiligten Gene finden sich in fast allen höher gradigen Gliomen. Eine CDK4-Genamplifikation findet sich bei ca. 15% der malignen Gliome und führt zu einer Überaktivierung des Kinase-Komplexes.

Des Weiteren sind Veränderungen in der zellulären Signaltransduktion häufig zu beobachten. Daran beteiligt sind extrazelluläre Botenstoffe, ihre membrangebundenen Rezeptoren und die intrazellulären Signaltransduktions-Kaskaden.

Insbesondere die Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Funktion spielen eine bedeutende Rolle, die in glialen Tumoren sowohl genetische als auch funktionelle Aberrationen aufweisen.

Die genetischen Veränderungen, die zu Hirntumoren führen, sind in Abb. 1 dargestellt.

2.1.3 Prognostische Faktoren

Durch das verdrängende Wachstum der Hirntumoren sind die Leitsymptome meist auf eine intrakranielle Druckerhöhung und die lokale Hirnfunktionsstörung zurückzuführen. Prognostisch ungünstig sind ein hoher Malignitätsgrad und ein Alter des Patienten über 60 Jahre. Eine Symptombdauer über sechs Monate, epileptische Anfälle und ein hoher Karnofsky-Index (Index zur Standardisierung der Lebensqualität eines Patienten) vor Behandlung korrelieren mit einer besseren Prognose. Akut auftretende Symptome sind häufig auf eine Tumoreinblutung zurückzuführen. Die 1-Jahres-Überlebensrate liegt beim Astrozytom, WHO-Grad III, bei 60-70%, beim Glioblastom bei 30-40%.

Verlässliche molekulare Marker, die eine Korrelation mit der Überlebenszeit aufzeigen und deshalb eine verbesserte prognostische Aussage erlauben, konnten bis heute durch entsprechende molekularbiologische Untersuchungen noch nicht gefunden werden

2.1.4 Therapeutische Optionen

Der chirurgische Eingriff ist meist zur Reduzierung der Symptomatik notwendig und trägt zu einer Verbesserung der Lebensqualität bei. Patienten ohne jegliche therapeutische Intervention haben ein mittleres Überleben von 3-4 Monaten.

Die Rezidivbildung ist bei Glioblastomen selbst bei radikaler chirurgischer Resektion mit hohem Anteil unverändert erscheinendem Gewebe aufgrund des stark infiltrativen Wachstums in der Regel nicht zu verhindern.

Eine postoperative Weiterbehandlung drängt sich daher auf.

Die Radiotherapie hat sich seit den 70er Jahren zur Standardtherapie im Anschluss an die Operation etabliert. Die Strahlentherapie verlängert das mediane Überleben um etwa 6 Monate, wobei v.a. jüngere Patienten (< 45 Jahre) davon zu profitieren scheinen. Die obere Altersgrenze für eine Bestrahlung sollte individuell bestimmt werden und liegt bei etwa 65 Jahren (Lin J.C. et al., 1992).

Die Chemotherapie im Anschluss an die Operation und Radiotherapie wird nicht einheitlich als Standardtherapie, sondern oftmals als adjuvante Chemotherapie umgesetzt. Dies rührt daher, dass die meisten malignen Gliome, mit Ausnahme der Oligodendrogliome und der Mischgliome, wenig chemosensibel sind. Tatsächlich profitieren nur wenige Patienten (5-10%) mit derartigen malignen Gliomen von einer Chemotherapie mit einer Überlebenszeitverlängerung von etwa ein bis zwei Monaten (Quant E.C. et al., 2010).

2.2 Temozolomid (TMZ)

2.2.1 Pharmakologie und -kinetik

Das Imidazo-Tetrazin-Derivat Temozolomid (TMZ) ist ein seit 1999 in der Bundesrepublik Deutschland zugelassenes, peroral applizierbares Alkylans, das zur Behandlung von Patienten mit rezidivierendem oder progredientem Glioblastom zugelassen ist. Als Zytostatikum ist es zytotoxisch und mutagen, kann Krebs verursachen sowie zu Infertilität führen.

Die chemische Bezeichnung ist 8-Carbamoyl-3-Methylidazo(5,1-D)-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one, als chemische Summenformel ausgedrückt: $C_6H_6N_6O_2$. Die Strukturformel geht aus Abbildung 2 hervor.

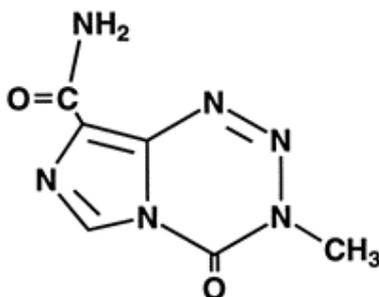


Abbildung 2: Strukturformel von Temozolomid

TMZ wird sehr gut oral resorbiert und erreicht nach 20 Minuten seine maximale Wirkstoffkonzentration. Durch die starke Lipophilie überwindet TMZ im Gegensatz zu anderen Zytostatika die Blut-Hirn-Schranke. Die kurze Plasmahalbwertszeit von 1,8 Stunden

führt bei täglicher Applikation zu keinem kumulativen Effekt. Die Eiweißbindung ist mit 10-20% niedrig, das Verteilungsvolumen mit 28,3 l sehr groß. Die Elimination verläuft überwiegend renal. Nach oraler Anwendung können ungefähr 5-10% der Dosis im Verlauf von 24 Stunden unverändert im Urin nachgewiesen werden. Der Rest wird als Metabolit, meist Temozolomidsäure oder 5-Aminoimidazol-4-carboxamid (AIC), ausgeschieden (Danson S.J. et al., 2001; Darkes M. et al., 2002; Dresemann G., 2010).

2.2.2 Wirkmechanismus

Der Wirkmechanismus von TMZ ist bis jetzt noch nicht vollständig geklärt. Aktuelle Untersuchungsergebnisse werden nachfolgend zusammengefasst:

TMZ ist ein Vorläufer des Alkylanz Monomethyl-triazenoimidazol-carboxamid (MTIC). Der Metabolit entsteht spontan bei physiologischem pH.

MTIC hängt verschiedenen Nucleotiden im DNA-Molekül Methylreste an. Es entstehen methylierte DNA-Basen wie N⁷-Methylguanin, N³-Methylguanin und O⁶-Methylguanin (O⁶-MG). Obwohl O⁶-MG nur 5% der gesamten durch Temozolomid gebildeten Addukte ausmacht, wird ihm ein zentraler Stellenwert bei der zytotoxischen Aktivität dieses Agens zugesprochen.

Da die DNA-Reparaturenzyme keine komplementäre Base für O⁶-MG finden können, kommt es zu zahlreichen Strangbrüchen, die durch die Mismatch-Reparaturproteine der Zelle nicht mehr repariert werden können. Die geschädigte DNA kann das Zellwachstum und die Replikation nicht unterstützen und induziert, bei funktionellen Apoptosemechanismen, die Apoptose.

Diese Apoptosemechanismen sind jedoch in Tumorzellen meist gestört, so dass sich durch entstehende Änderungen im Methylierungsmuster oder sogar in den Basenpaarungen Änderungen in der Genexpression ergeben können. Des Weiteren kann es durch die veränderte Bindungsaffinität zu einem Basentausch Cytosin/Tyrosin kommen und somit können Mutationen im Genom entstehen, die einerseits zu Resistenzen, andererseits aber auch zu funktionellen Fehlfunktionen und damit zum Absterben der Zelle führen.

Darüber hinaus wird diskutiert, ob durch die Methylierung in Promotor-Regionen eine Bildung von Proteinen verhindert wird und es dadurch zur Dysregulation in der Zelle kommt. Beschrieben wird dies vor allem für die Promotorregion des Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) Gens, die für die Bildung der Alkylguanin-Transferase (AGT) verantwortlich ist. Es kommt dadurch zu einem Stopp in der Bildung dieses Resistenzproteins (Zhang J. et al., 2012).

2.2.3 Dosierschemata

Auf der Basis vorklinischer Studien, die eine erhöhte Aktivität bei wiederholter Exposition mit TMZ vermuten ließen, wurde eine tägliche Therapie über fünf Tage in einem 28 Tage Zyklus entwickelt. Die maximal tolerierte Dosis von 200 mg/m² wurde verwendet, wenn der erste Zyklus mit 150 mg/m² gut vertragen wurde. Dosislimitierend war die auftretende Thrombozytopenie.

Verschiedenste andere Schemata wurden versucht, brachten jedoch meist keinen besseren Therapieerfolg (Yung W.K., 2000).

2.3 Resistenz- und Reparaturmechanismen

Neben unspezifischen Reparaturmechanismen bei DNA-Schädigung sind verschiedene DNA-Reparaturmechanismen verantwortlich für die Resistenzentwicklung gegenüber TMZ.

Die Expression von O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist dabei wohl der wichtigste Resistenzmechanismus. Durch die Übertragung des Methylrestes der geschädigten DNA-Base auf das Enzym wird die DNA-Läsion repariert. Dadurch verliert jedoch das Enzym seine Aktivität und muss neu gebildet werden. Die Zytotoxizität von TMZ hängt damit von dem Gleichgewicht zwischen O⁶-Methylguanin-Bildung und der Reparaturrate der DNA-Schäden ab. Daher sind die meisten Zellen mit niedrigen MGMT-Konzentrationen sensitiv gegenüber TMZ, wohingegen MGMT-überexprimierende Zellen unempfindlicher gegenüber der Behandlung sind (Friedman H.S. et al., 2000; Gerson S.L., 2002).

Unterstützung dieser Theorie kommen von Untersuchungen mit O⁶-Benzylguanin und O⁶-(4-bromothienyl)guanin, die die *in vitro* und *in vivo* Wirksamkeit von TMZ potenziert haben. Diese Pseudosubstrate haben eine höhere Affinität zu der Bindungsstelle von MGMT als O⁶-Methylguanin. MGMT wird dadurch inaktiviert und muss neu synthetisiert werden (Kokkinakis D.M. et al., 2001). Auch haben Untersuchungen von Esteller M. et al. (2000) gezeigt, dass bei Glioblastomen, die eine Methylierung in der MGMT-Promoter-Region der DNA hatten (bei ca. 40%), und daher eine geringere MGMT-Aktivität, eine Tumorregression sowie eine verlängerte progressionsfreie Überlebenszeit unter TMZ-Therapie festzustellen war. Da sich einige Zelllinien mit geringer MGMT-Expression resistent gezeigt haben, muss es einen weiteren Mechanismus der Resistenz gegenüber TMZ geben.

Der sog. Mismatch Repair (MMR)-Signalweg ist ein Reparaturmechanismus, der zuerst in Bakterien (*E. coli*) beschrieben wurde. Bakterien, die nicht über diesen

Reparaturmechanismus verfügen, weisen eine hohe Mutationsfrequenz auf. Das System besteht aus einer Anzahl verschiedener Proteine, die Läsionen erkennen, deren Art identifizieren und reparieren. Ein Defekt im MMR-Signalweg führt dazu, dass methylierte DNA nicht mehr erkannt und repariert wird. Die DNA-Replikation wird ohne Reparatur fortgesetzt und es kommt zu Fehlpaarungen im Zellzyklus.

Ein weiterer Reparaturmechanismus gegenüber TMZ ist der Poly-(ADP)-Ribose-Polymerase (PARP)-Mechanismus. Es sind 17 PARP-Proteine bekannt, die in die DNA-Reparatur eingreifen. Diese Proteine reparieren DNA-Einzelstrangbrüche unter Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)-Verbrauch. Es konnte gezeigt werden, dass TMZ PARP induziert und Inhibitoren von PARP die Zytotoxizität von TMZ potenzieren (Tentori L. et al., 2003).

Ein unspezifischer Resistenzmechanismus gegenüber chemischen Noxen auf zellulärer Ebene ist das Glykoprotein P170 (P-gp), das von Multidrug Resistant Typ 1 (MDR-1)-Genen generiert wird. Dabei handelt es sich um eine unspezifische, energieabhängige Pumpe für den Efflux verschiedenster Substanzen, so auch von Zytostatika. Diese Pumpe findet sich häufig in normalen epithelialen Zellen mit sekretorischer oder exkretorischer Aktivität sowie in Endothelzellen der Blut-Hirn- sowie der Blut-Hoden-Schranke. Die Expression dieser „Pumpen“-Proteine in Tumorzellen führt zu einer vermehrten Ausschleusung der Chemotherapeutika und damit zu einer geringeren intrazellulären Konzentration in der Zelle, was zu einer verminderten Wirkung dieser Substanzen in der Zelle führt.

2.4 Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man die Entstehung und Formation neuer Kapillargefäße aus existierenden Gefäßen der Mikrozirkulation. Sie tritt in bestimmten physiologischen und pathologischen Situationen auf. Grundsätzlich gibt es bei der Angiogenese zwei Mechanismen, durch die sich die Kapillardichte vergrößern kann. Beim ersten und häufigsten Mechanismus wird die Basalmembran um eine vorhandene Kapillare proteolytisch aufgelöst, so dass die so befreiten Endothelzellen proliferieren und in die entstandenen Lücken auswandern können, was zu einer Aussprossung neuer Gefäße führt (sog. Sprouting). Der zweite Mechanismus beruht auf der Aufspaltung von Gefäßwänden in bereits vorhandenen Kapillaren, was schließlich zu einer Zweiteilung und damit zu einer Gefäßverdopplung führt (sog. Intussusception). Diese Mechanismen bedürfen der Abfolge von proteolytischen Degenerations-, Zell-Zell-Adhäsions-, Proliferations- sowie Migrationsprozessen, deren

Zusammenspiel von speziellen Angiogenesefaktoren kontrolliert wird (Carmeliet P. et al., 2000; Conway E.M. et al., 2001; Ellis L.M., 2002).

Unter physiologischen Bedingungen stehen diese Angiogenesefaktoren im Gleichgewicht mit anti-angiogenen Stoffen. In der Tumorangiogenese ist jedoch dieses Gleichgewicht in Richtung der Angiogenesefaktoren verschoben. Neben vielen anderen Zellen, die in dieses System eingreifen, spielen die Endothelzellen und die Tumorzellen eine entscheidende Rolle. Im Folgenden werden einige dieser Angiogenesefaktoren näher beschrieben.

2.4.1 Vascular Endothelia Growth Factor (VEGF)

VEGF ist wohl einer der wichtigsten parakrinen Mediatoren der Angiogenese.

Ausgehend von einem Gen werden fünf verschiedene VEGF-Isoformen, von 121 bis 206 Aminosäuren, durch alternatives "Splicing" als homodimere Glycoproteine gebildet. Zellen, die VEGF exprimieren, produzieren meistens mehrere Isoformen gleichzeitig.

Wichtig für die Tumorangiogenese scheinen vor allem die Isoformen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ zu sein. VEGF₁₂₁ diffundiert gut, da es nicht an Heparansulfat-Proteoglykane bindet, und steigert die Blutgefäßpermeabilität. VEGF₁₆₅ bindet hingegen besser an vaskulären endothelialen Wachstumsfaktorrezeptoren, die von VEGF₁₂₁ nicht erkannt werden.

Weitere Studien haben in vivo und in vitro gezeigt, dass VEGF ein Überlebensfaktor für Endothelzellen ist. So verhindert VEGF den Eintritt in die Apoptose über verschiedene Mediatoren unter anderem Bcl-2, MAPK (Ferrara N., 2000, 2004, 2005).

2.4.2 Cyclooxygenase 2

Cyclooxygenase-2 (Cox-2) ist im Gegensatz zur Cyclooxygenase-1 ein konstitutiv exprimiertes Enzym, das von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1), Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) und anderen stimuliert wird. Sie katalysieren die Umwandlung von Arachidonsäuren in Prostaglandin-H₂.

Neben ihrer Rolle als Entzündungsmediator wird der COX-2 auch eine Rolle in der Tumorangiogenese beigemessen. Ihren signifikanten Beitrag in der Tumorprogression konnte vor allem in Arbeiten über Familiäre Adenomatöse Polyposis gezeigt werden (Dempke W. et al., 2001; Gately S. et al., 2003; Gately S. und Li W.W., 2004).

Der genaue Mechanismus, über den COX-2 angiogen wirkt, wird noch diskutiert. Sicher scheint dabei der Weg über Prostaglandin H₂ (PGH₂) als Mediator für verschiedene andere angiogene Faktoren wie Tromboxan A₂ für die Endothelzellen-Migration, Prostaglandin I₂ für

die vaskuläre Permeabilität und Endothelzellen „Sprouting“. Ein COX-2 Produkt, Prostaglandin E₂, scheint hierbei besonders starke angiogene Mechanismen zu stimulieren. PGE₂ wird sogar die mögliche Stimulation des VEGF über den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) zugesprochen (Prescott S.M., 2000).

Ein anti-angiogener Effekt bei der Behandlung von Tumoren mit COX-2 Inhibitoren wie Celecoxib und Rofecoxib konnte schon *in vitro* sowie *in vivo* gezeigt werden (Gately S. und Kerbel R., 2003; Giglio P. et al., 2004; Nam D.H. et al., 2004).

Das Gehirn stellt bei der COX-2 Expression eine Ausnahme dar. Im Kortex des Gehirns sowie in den Glomerula der Niere wird die COX-2 auch bei nicht pathologischen Prozessen expremiert. Daher wird eine Schlüsselrolle der COX-2 bei Tumoren in diesen Geweben diskutiert (Kurznel F. et al., 2002; New P., 2004).

2.5 Humane endotheliale Nabelschnurvenen-Zellen

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) werden im *in vitro* Modell zur Untersuchung von Gefäßwandzellen in der Chemotherapie genutzt. Gewonnen werden diese Zellen aus einer frischer Nabelschnurvene nach dem Protokoll von Jaffe (Jaffe E.A. et al., 1973). Diese Zellen wurden nach zwei bis vier Zellkulturpassagen zur Ermittlung der TMZ-Konzentration für die niedrigdosierte Chemotherapie verwendet (Chen Z. et al., 2009; Kurzen H. et al., 2003).

2.6 Prinzip der anti-angiogenen Therapie

Judah Folkmann stellte 1971 die These auf, dass Krebswachstum und -metastasierung angiogenese-abhängig sind und somit ein Tumorwachstum mit einer anti-angiogenen Therapie verhindert werden kann.

Er geht dabei davon aus, dass das Gleichgewicht der pro-und anti-angiogenen Moleküle im Tumor zugunsten der pro-angiogenen verändert ist und somit Gefäßwachstum induziert wird. Dieser „angiogenic switch“ ermöglicht dem Tumor, die notwendigen Nährstoffe für eine weitere Proliferation über die neuen Kapillaren zu beziehen. Kann man diese Kapillarneubildung verhindern, so wird gleichzeitig eine Tumorprogression verhindert.

Dieser Ansatz ist unabhängig vom molekularen Status der Tumorzellen. Eine Resistenzentwicklung der Tumorzelle ist bei diesem Ansatz unerheblich, da die Therapie vornehmlich auf die Endothelzellen zielt (Folkman J., 2003).

Gelingt es dabei, das Gleichgewicht zugunsten der anti-angiogenen Faktoren zu verschieben, ist womöglich eine Tumordegradation zu erreichen; doch auch schon eine Erhaltung des Status quo führt meist zu einer Lebenszeitverlängerung. Dies bedeutet, dass die Therapie über einen langen Zeitraum durchgeführt werden muss, um das Gleichgewicht der pro- und anti-angiogenen Moleküle im Tumor zu erhalten und es zu einem sog. schlafenden (dormant) bzw. seneszenten Tumor kommt.

Möglich ist die Beeinflussung der Angiogenese im Tumor auf verschiedenste Weise. Die Entdeckung von Angiostatin und Endostatin, endogenen anti-angiogenen Faktoren, durch J. Folkman (1997) entfachte die Hoffnung, mit „natürlichen“ Substanzen in den angiogenen Prozess eingreifen zu können. Auch immuntherapeutische Ansätze werden verfolgt.

Die Behandlung mit Zytostatika mittels einer metronomischen bzw. niedrigdosierten Langzeittherapie gegen die notwendige Neovaskularisation des Tumors wird ebenfalls von vielen Gruppen untersucht und zeigte bei einigen Tumorarten viel versprechenden Erfolg.

Robert Kerbel (Kerbel R.S., 1997; Kerbel R.S. et al., 2002) zeigte, dass der anti-angiogene Effekt der Chemotherapeutika durch metronomische Therapie optimiert werden kann, da hierbei eben keine Therapiepause entsteht und somit keine Tumorerholung stattfinden kann.

2.7 Prinzip der kontinuierlichen niedrigdosierten oder metronomen Therapie

Die metronomische Chemotherapie ist eine Therapieform, die nicht in zyklischer Weise mit hohen Dosen und Behandlungspausen die Zellproliferation inhibieren möchte, sondern durch kontinuierliche Gabe eine Wirkung über einen langen Zeitraum erzielen will. Dabei sind aufgrund der Toxizität der Zytostatika die sonst verwendeten Höchstdosen nicht praktikabel. Es gilt eine Dosierung zu finden, die vom Patienten gut vertragen wird und zu einem gleichen, wenn nicht sogar besseren Effekt führt wie die zyklische Standardtherapie. Diese Dosierung wird im Allgemeinen in der Low-Dose bzw. niedrigdosierten, metronomischen Therapie verwendet.

Je nach Patient, Tumorart, Chemotherapeutikum und Zielsetzung der Therapie kann diese Dosis 10%, aber auch 50% der maximal tolerierbaren Dosis (MTD) betragen (Folkman J., 1999; Kerbel R.S. et al., 2002; Kerbel R.S. et al., 2004).

Es soll eine Dosierung gefunden werden, bei der eine Neovaskularisation des Tumors verhindert wird und gleichzeitig eine kontinuierliche zytotoxische Wirkung auf die

Tumorzellen erhalten bleibt. Dadurch soll eine Therapiepause vermieden werden bei keinen oder nur möglichst geringen Nebenwirkungen der Chemotherapie.

2.8 Migration als Problem der Gliomtherapie

In der Gliomtherapie beim Menschen fiel auf, dass es nach der Therapie mit Resektion, Strahlen- und Chemotherapie des Primärtumors teilweise zu einer Neubildung des Tumors in einem anderen, mehrere Zentimeter entfernten Areal kam. Aufgrund des diffusen Wachstums glialer Tumorzellen im Hirngewebe ist eine vollständige chirurgische Resektion des Tumors kaum möglich. Tumor-assoziierte Faktoren, die die Migration von Gliomzellen stimulieren, sind vielfältig; unter anderem VEGF, Insulin-like Growth Faktor (IGF), Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor (SF/HGF), Transforming Growth Faktor (TGF- α) (Brockmann M.A. et al., 2003; Lamszus K. et al., 1998).

3 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Untersuchung und Bewertung der anti-angiogenen Wirkung von TMZ bei resistenten und sensitiven Gliomzelllinien mittels einer kontinuierlichen niedrigdosierten (metronomischen) Chemotherapie im Vergleich zur hochdosierten Standardtherapie mit Therapiepausen.

Die genetischen Veränderungen der Gliomzelllinien SF188wt (sensitiv) und SF188tr (resistent) sollten bezüglich der Genexpression der Angiogenesefaktors VEGF und der Cyclooxygenase-2 auf RNA (PCR-Technik) und Proteinebene (Western-Blot Technik) verglichen werden, um Rückschlüsse auf die Gefäß- und Resistenzentwicklung zu ziehen.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Die im Folgenden dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurden in der Zeit von Februar 2003 bis August 2004 am Institut für Neurochirurgische Forschung des Universitätsklinikums Mannheims durchgeführt. Die Experimente fanden mit behördlicher Genehmigung des Regierungspräsidiums Karlsruhe (Nr.: 129/01) im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1069 der DFG statt.

Als Versuchstiere dienten acht bis zwölf Wochen alte athymische NMRI nu/nu Mäuse der Firma Janvier mit einem mittleren Körpergewicht von 30 g (25-35 g). Die Tiere wurden in Gruppen bis zu fünf Tieren in einem Käfig mit ad libitum-Fütterung bei 24°C Umgebungstemperatur im SPF-Tierhaus des Klinikums Mannheim gehalten. Es bestand ein künstlicher 12 stündiger Tag-Nacht Rhythmus.

Dieser thymuslose Mausstamm eignet sich wegen seines supprimierten Immunsystems hervorragend für die Untersuchung von xenotransplantierten Tumorzellen (sog. xenografts).

4.2 Temozolomid (TMZ)

TMZ wurde vom Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, New Jersey, USA zur Verfügung gestellt.

4.2.1 Herstellung und Dosierung einer TMZ-Injektionslösung

Für die Herstellung einer Injektionslösung wurde eine sterile 0,9 % isotonische Natriumchlorid-Lösung mit 10 % sterilem Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. 135 mg TMZ wurden in 45 ml dieser Mischung gelöst und steril filtriert. Bis zur Verwendung wurde diese Lösung bei -20°C aufbewahrt. Für die low-dose Therapie wurde diese Lösung 1:10 mit dem oben genannten reinen Lösungsmittel verdünnt.

Die Tagesdosis in der high-dose Therapie entsprach bei einer 30 g schweren Maus 1,74 mg TMZ.

Für die Standardtherapie (high-dose) wurden in den Tumormodellen über fünf Tage in einem 28 Tage-Zyklus 200 mg/m² Körperoberfläche (=57,93 mg/kg für 30g Maus ((FDA) U.S.F.a.D.A., 2004)) TMZ verwendet.

Für die low-dose bzw. metronomische Therapie wurden täglich 20 mg/m² Körperoberfläche (=5,79 mg/kg für 30g Maus) TMZ verwendet.

Die Therapie begann bei den Tieren mit den subkutanen Tumormodellen (sS. 23, 4.5.1) am vierten Tag post implantationem, bei den Tieren mit Rückenhautkammern (sS. 24, 4.5.2) am ersten Tag. Die Applikation erfolgte durch intraperitoneale Injektion.

4.3 Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC)

Zur Toxizitätsprüfung von TMZ auf endotheliale Zellen verwendeten wir Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC's).

Zur Gewinnung wurde das modifizierte Protokoll von Jaffé der Arbeitsgruppe um H. Kurzen verwendet (Jaffe E.A. et al., 1973; Kurzen H. et al., 2003).

Dabei wurde die frische Nabelschnurvene zum Säubern mehrfach mit PBS gespült. Nach Verschluss einer Seite mittels Arterienklemme wurde das Lumen mit warmer (35°C-37°C) Collagenase (10% in PBS) gefüllt und ca. 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Nabelschnur mit 10%igem fetalem Kälberserum (FCS) in PBS mehrmals gespült. Die Spülflüssigkeit mit den abgelösten Endothelzellen (HUVEC) wurde in ein bis zwei Falcon-Flaschen (50 ml) der Firma Greiner überführt, zentrifugiert, nochmals gewaschen und in eine 500 ml Zellkulturflasche (Greiner) mit 10 ml DMEM überführt.

4.4 Tumorzellen

Als humane Gliomzelllinie wurde die Zelllinie SF188 verwendet. Aus dieser Zelllinie war von der Arbeitsgruppe um James Gallo durch kontinuierliche Expression mit ansteigenden Konzentrationen gegenüber TMZ in einem Zeitraum von sechs Monaten die resistente Zelllinie SF188tr selektioniert worden. Sie ist bereits auf molekularbiologische Veränderungen untersucht und gut beschrieben (Ma J. et al., 2002).

So führt die Behandlung mit TMZ bei SF188wt (**wildtyp**) Zellen nach 24 Stunden zu einem Zellzyklusarrest in G₂-M. Dagegen arretiert die selektierte SF188tr (**tmz-resistent**) nur wenig. Die intrazellulären Konzentrationen von TMZ sind in beiden Ziellinien etwa gleich. Die Aktivität von O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist in den SF188tr erhöht. Beide Zelllinien haben ein mutiertes *p53*-Gen. Des Weiteren war es nicht möglich, den Zellzyklusregulator CDK-Inhibitor 1 (p21^{WAF1}) zu induzieren. Pro-apoptotische Proteine, wie

Bad, Bax und Bcl X_S sind in der resistenten Zelllinie 2-4fach reduziert, die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 + Bcl X_L sind jedoch nicht verändert.

Die Resistenz der SF188tr Zellen gegenüber TMZ wurde mittels Zytotoxizitäts-Untersuchungen (MTT-Assay) vor ihrem weiteren Einsatz bestätigt.

4.4.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% Fötalem Kälber Serum (FCS) und 1% Penicillin-Streptomycin (entsprechen 10⁵ I.E. Penicillin und 10⁵ I.E. Streptomycin) bei einer Luftfeuchtigkeit von 90%, 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Zur Passage in vitro wurden die Zellen in ihren Kulturflaschen (Greiner) mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA geerntet. Der Verdau wurde mit Medium gestoppt und die Zellsuspension durch Zentrifugieren nach Standardmethode gewaschen. Durch Zugabe von Medium wurden die Zellen auf die gewünschte Konzentration eingestellt und passagiert.

Bei der Vorbereitung der Zellen für die Implantation in die Rückenhautkammer wurden die Zellen zuvor mittels Di-I der Firma Invitrogen (Molecular Probes[®], Eugene, Oregon, USA) angefärbt. Di-I (1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanineperchlorate) ist ein lipophiler, orange-roter Membran-Fluoreszebfarbstoff, der das schnelle und einfache Färben von vitalen humanen Zellen ermöglicht, um diese in Kokulturen bzw. in in-vivo-Versuchen fluoreszenzmikroskopisch darstellen zu können (Jung S. et al., 2002).

Die Färbung erfolgte über Nacht durch Zugabe von 25µl einer 10 % Lösung Di-I zu den 10ml DMEM-Medium in der Zellkulturflasche. Am Tag der Implantation wurden die Zellen wie beim Passagieren geerntet und mehrmals mit PBS gewaschen, bevor die gewünschte Konzentration der Zellen eingestellt wurde.

Die Konzentration der Zellen pro Milliliter wurde nach Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer errechnet.

4.4.2 Zytotoxizitäts-Untersuchungen

Zur Bestimmung der TMZ-Zytotoxizität wurde mittels CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) ein MTT-Assay angesetzt. In 96-well Platten mit flachem Boden wurden je 1000 Zellen in 100 µl Medium verteilt. Zum Adherieren wurden sie eine Nacht im Brutschrank belassen. Tags darauf wurde das Medium entfernt und durch ein Medium mit einem TMZ-Konzentrationsgradient ersetzt. Bei längeren Zytotoxizitäts-

Untersuchungen wurde das Medium alle 48 Stunden entfernt und erneuert. Dabei wurde die TMZ-Konzentration im Medium beibehalten.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen. Es wurden 10 µl der CellTiter 96[®]-Lösung 100 µl frischem, TMZ-freiem Mediums zugesetzt und nach einer Inkubationszeit von einer Stunde photometrisch bei 490 nm Wellenlänge mittels eines ELISA-Readers der gebildete blaue Farbstoff gemessen.

4.4.3 Herstellung von Sphäroiden

Zur Imitation von Tumorknoten aus kultivierten Tumorzellen wurde die Sphäroid-Technik eingesetzt. Zur Herstellung von Zellsphäroiden wurden mit Agar vorbehandelte Zellkulturflaschen verwendet (sog. Coaten). Der Flaschenboden wurde dazu mit 5 ml flüssigem 5 %igem Agar (Nobel Agar) benetzt und 12 h im Kühlschrank gelagert (Nederman T. et al., 1984). Anschließend wurden ca. 100000 Zellen in 10 ml Medium hinzugegeben. Die Zellen können durch den Agar nicht am Flaschenboden adherieren und bilden daher Zellhaufen. Nach drei Tagen konnten etwa gleich große Zellsphäroide aus einer Petrischale zur gewünschten Untersuchung entnommen werden.

4.4.4 Migrationsuntersuchungen

Zur Untersuchung der Migrationsgeschwindigkeit wurden einzelne Zellsphäroide in 24-well-Platten überführt und die Migration täglich im Auflichtmikroskop digital-fotographisch festgehalten. Der Inhalt einer Agar-benetzen Zellkulturflasche wurde dazu in eine sterile Petrischale überführt und einzelne Sphäroide mit einem Durchmesser von etwa 100 µm mit einer Eppendorfpipette (100 µl Pipettenspitze) selektiert und ein Sphäroid pro Well überführt. Mittels eines Softwareprogrammes (ImageJ, <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) wurde die Fläche des anfänglichen Sphäroids und der sich ausbreitenden (migrierenden) und wachsenden Zellen in der Umgebung des zentralen Sphäroids vermessen.

4.5 Tumormodelle

Verwendet wurden zwei Tumormodelle; ein subkutanen (s.c.) Tumormodell sowie die Rückenhautkammer (RHK).

4.5.1 Subkutanen Tumormodell zur Ermittlung des Tumorwachstums

Zweck dieses Modells war die Erstellung einer Wachstumskurve unter Kontrollbedingungen (d.h. ohne TMZ-Zugabe) sowie unter Standard (high-dose)- und low-dose-Therapie mit TMZ. Bei diesem ektopischen Modell wurden die Gliomzelllinien in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen in 0,1 ml DMEM mit einer Spritze in das Unterhautgewebe appliziert. Messungen des Tumorwachstums fanden ab dem vierten Tag post implantationem statt.

Das Volumen wurde mit $V \text{ (mm}^3\text{)} = \frac{1}{2} a \cdot b$ berechnet, wobei a dem längsten und b dem kürzesten Durchmesser des Tumors entsprach.

4.5.2 Rückenhautkammermodell (RHK) zur Ermittlung der Tumervaskularisation

Als Modell zur Beobachtung der Tumervaskularisation und damit der Tumormikrozirkulation diente die Rückenhautkammer. Die Technik dieses Modells wurde bereits vielfach angewendet und ist international hinsichtlich mikrozirkulatorischer Untersuchungen etabliert und gut beschrieben (Lehr H.A. et al., 1993).

Die Versuchsmäuse wurden zunächst mit einer intraperitonealen Injektion von 100mg/kg Ketanest und 5mg/kg Xylazin (Hoechst Russel Vet / Bayer Vital) narkotisiert. Nach Bedarf wurde die Narkose durch zusätzliche Gaben von Ketanest/ Xylazin aufrechterhalten.

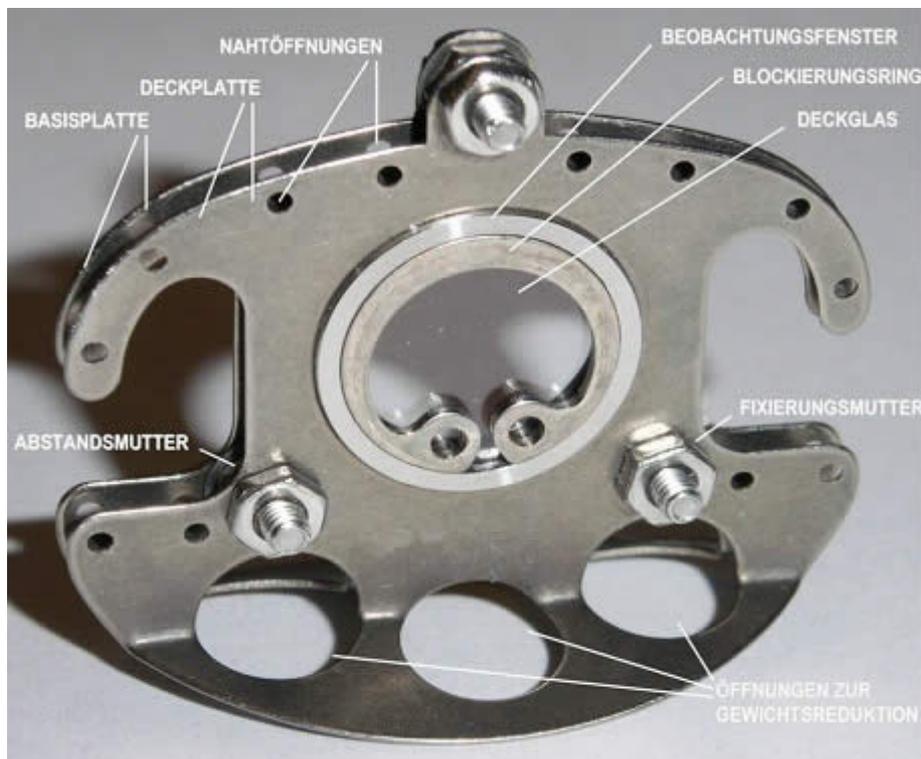
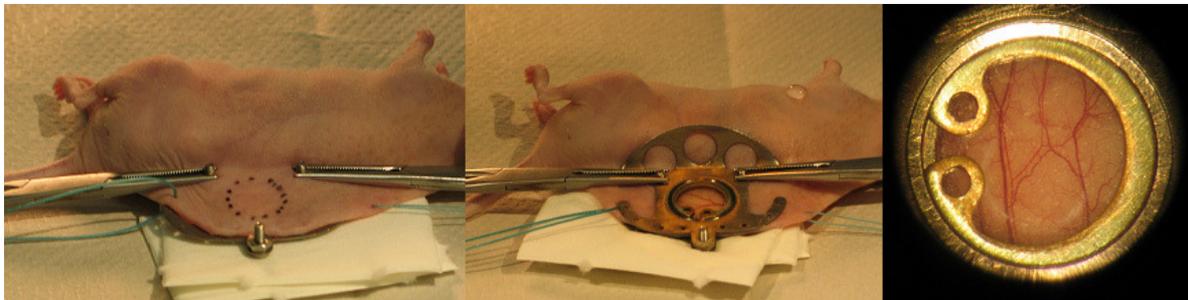


Abbildung 3: Rückenhautkammer

Bild entnommen aus der Dissertation von Ring A. (2004)

Die Rückenhaut wurde mit einem Tupfer feucht gereinigt und mit 70%-igem Alkohol desinfiziert. Diaphanoskopisch (Untersuchung der Haut mittels durchscheinendem Licht einer Tischlampe) ließ sich nun die Struktur und der Verlauf der subkutanen Arteriolen und Venolen beurteilen. Danach folgte die Implantation der transparenten Rückenhautkammer (Werkstatt, Institut für Chirurgische Forschung der Universität Mannheim), welche aus zwei konvexen, spiegelbildlich gleich großen Titanplatten besteht. Vor der Implantation wurden Rückenhautkammer und Instrumente mittels Alkohol (70%) sterilisiert. Nach Markierung der Mittellinie wurde durch Transillumination die Gefäßversorgung in der Rückenhaut lokalisiert und das Präparationsareal festgelegt. Anschließend wurde eine Kammerhälfte am Oberrand der Rückenhaut über der Mittellinie mit zwei Haltefäden fixiert (Abb. 4 a).



a

b

c

Abbildung 4: Intraoperative Bilder der Rückenhautkammerpräparation.

- a. **OP Situs nach Fixation der ersten Hälfte der RHK mit Markierung des Präparationsareals.**
- b. **OP Situs nach Entfernung der oberen Hautschichten des Präparationsareals und Fixation der zweiten Hälfte der RHK.**
- c. **fertige RHK (Sicht durch Auflichtmikroskop)**

Die weitere Präparation erfolgte in Seitenlage des Tieres, so dass die jetzt noch freie Hauthälfte dem Präparator zugewandt war. In dem kreisrunden Hautareal, über welchem das Beobachtungsfenster der anderen Kammerhälfte zu liegen kommen sollte, wurden sowohl das kutane als auch das subkutane Gewebe der zugewandten Hautseite mikrochirurgisch abpräpariert und damit die intakte Schicht der gegenüberliegenden Epidermis mit subkutanem Gewebe, versorgenden Gefäßen und dem Hautmuskel zur Darstellung gebracht. Nach Abschluss der chirurgischen Präparation wurde die kontralaterale Kammerhälfte aufgesetzt und mit drei Muttern an den drei Schrauben der gegenüberliegenden Platte befestigt. Der Abstand der beiden Platten voneinander betrug 450 µm, dies wurde durch entsprechende Unterlegscheiben als Platzhalter gewährleistet. Die subkutane Schicht der Gegenseite schmiegte sich durch Adhäsionskräfte an das Sichtfenster an. Die

Hautfalte wurde durch weitere vier Haltefäden (Ethibond, 5-0, Fa. Ethikon, Norderstedt) in den vorgesehenen Bohrungen am Kammerrand fixiert. Das Fenster der Kammer war mit einem sterilen Deckglas (\varnothing 11,7 mm, Fa. Plano) und einem Sprengring verschlossen. Dadurch konnten die anliegenden Gefäße des Musculus cutaneus maximus ständig sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch beobachtet werden (Abbildung 4c).

Die Anordnung der verschiedenen Gewebsschichten in der RHK ist schematisch in Abb. 5 dargestellt.

Zwei Tage nach Präparation der Rückenhautkammer wurden die Tiere erneut anästhesiert und auf einem Plastiktisch fixiert. Sprengring und Deckglas wurden nach vorhergehender Säuberung des Areals entfernt. In das zentral gelegene Areal der Kammerpräparation wurde ein Mikroliter der Tumorzellsuspension (ca. 5×10^5 Tumorzellen) aufgebracht. Anschließend wurde das Fenster mit einem neuen, sterilen Deckglas und dem Sprengring verschlossen.

Die Implantation der Tumorzellsuspension am ersten Tag und der Verlauf des Tumorwachstums und der Angiogenese wurde mittels Intravitalmikroskopie an den Tagen 7, 14, 21 post implantationem aufgezeichnet.

Nach Abschluss der intravitalem Untersuchungen wurden die Tiere schmerzlos getötet, die Tumore sowie das umliegende Gewebe beider Tumormodelle entnommen, in N-Pentane über flüssigem Stickstoff schockgefroren und für weitere Untersuchungen bei -80° C aufbewahrt.

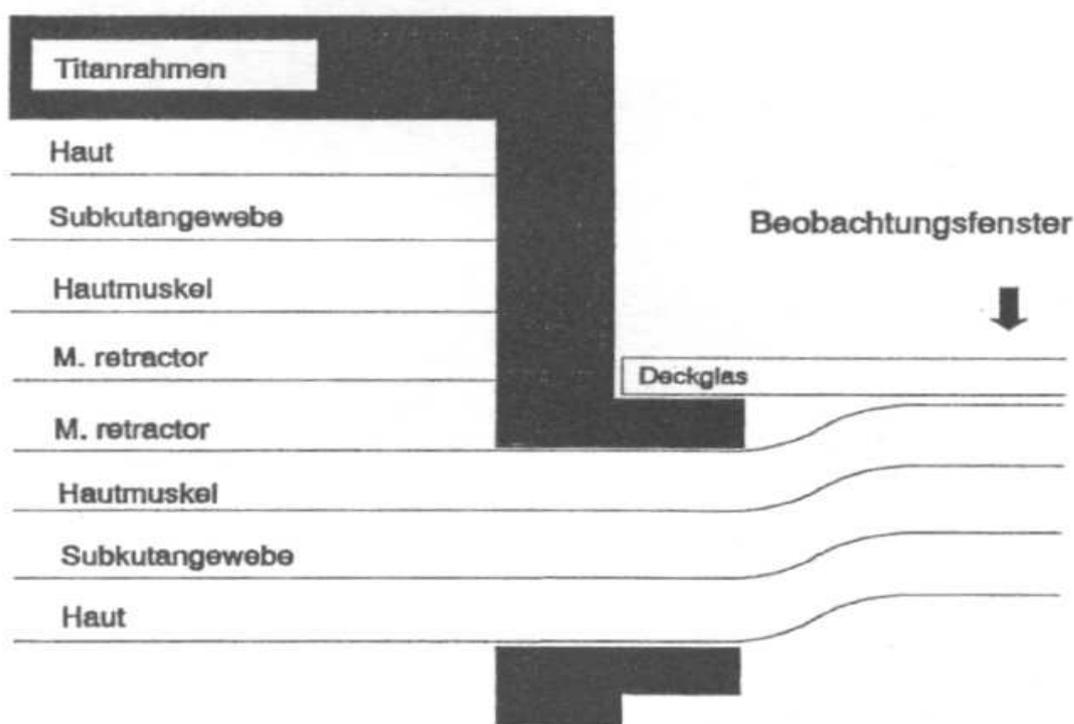


Abbildung 5: schematisches Schnittbild durch die RHK (Vajkoczy P. et al., 2000)

4.6 Intravitalvideomikroskopie

4.6.1 Multifluoreszenzvideomikroskopie

Zur Beobachtung der Angiogenese des implantierten Tumors in der Rückenhautkammer wurde die Multifluoreszenzvideomikroskopie verwendet. Dabei handelt es sich um ein UV-Auflichtmikroskop (Axioscope, Zeiss) mit einer CCD-Kamera, die über einen Verstärker und einen Videotimer an ein Videogerät angeschlossen ist (Abb. 6). Zur Darstellung der Gefäße wurden bis zu 0,4 ml der Fluoreszenzfarbstoffe FITC und Rhodamin (je 5%ige Lösungen) in die Schwanzvene der sedierten Mäuse injiziert. Die Mäuse wurden mit der RHK auf einem mobilen Plexiglastisch fixiert und so unter das Auflichtmikroskop positioniert.

Die Videoaufzeichnung wurde über einen Computer digitalisiert und mittels eines Softwareprogrammes (Cap-Image, Dr.Zeintl, Heidelberg) ausgewertet (Vajkoczy P. et al., 2000).

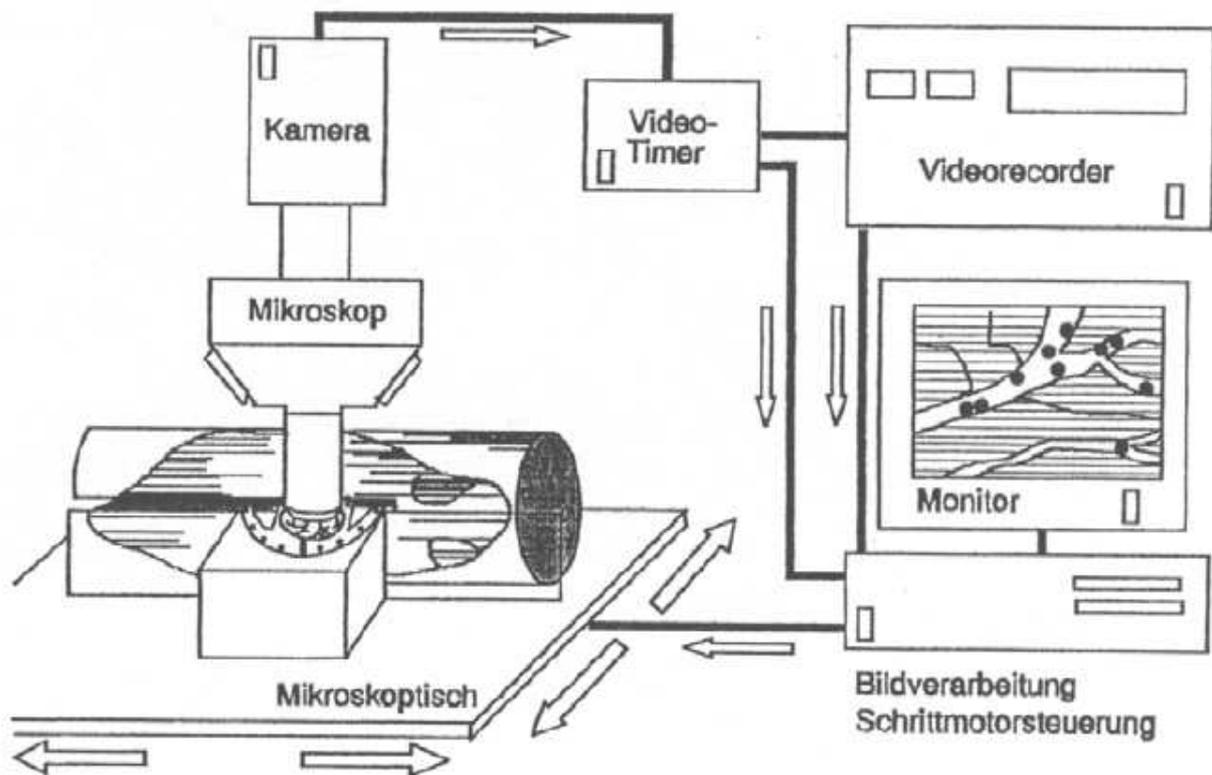


Abbildung 6: Aufbau der Multifluoreszenz-Intravitalvideomikroskopie-Anlage

4.6.2 Auswertungsparameter

Um die Auswertung zu standardisieren, wurden pro Rückenhautkammer mit einer 200fachen Vergrößerung das Tumor-Zentrum (Abb.7, blau), der Rand des Tumors bei 12, 3, 6 und 9 Uhr (Abb. 7, rot) sowie die Tumor-Peripherie bei 12, 3, 6 und 9 Uhr (Abb.7, grün) als Areal beobachtet und zur Auswertung herangezogen.

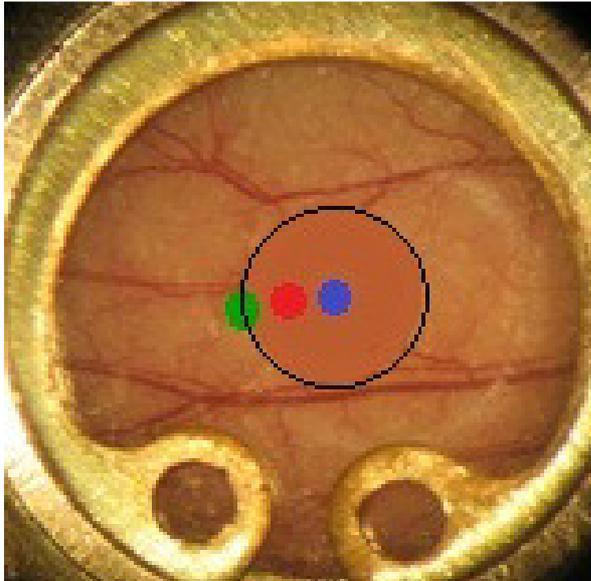


Abbildung 7: Bild der Auswertungs-Areale

Die Auswertung der einzelnen Areale umfasste die totale Gefäßdichte (total vessel density, TVD) in cm/cm^2 , die funktionelle Gefäßdichte (funktional vessel density, FVD) in cm/cm^2 und den Gefäßdurchmesser (d) in μm .

Die totale Gefäßdichte umfasst dabei alle neu gebildeten Tumorgefäße ohne Unterscheidung, ob diese zum Untersuchungszeitpunkt funktionstüchtig, also perfundiert, sind oder nicht. Die funktionelle Gefäßdichte umfasst nur die Gefäße, die zum Untersuchungszeitpunkt perfundiert sind (Abb. 8).

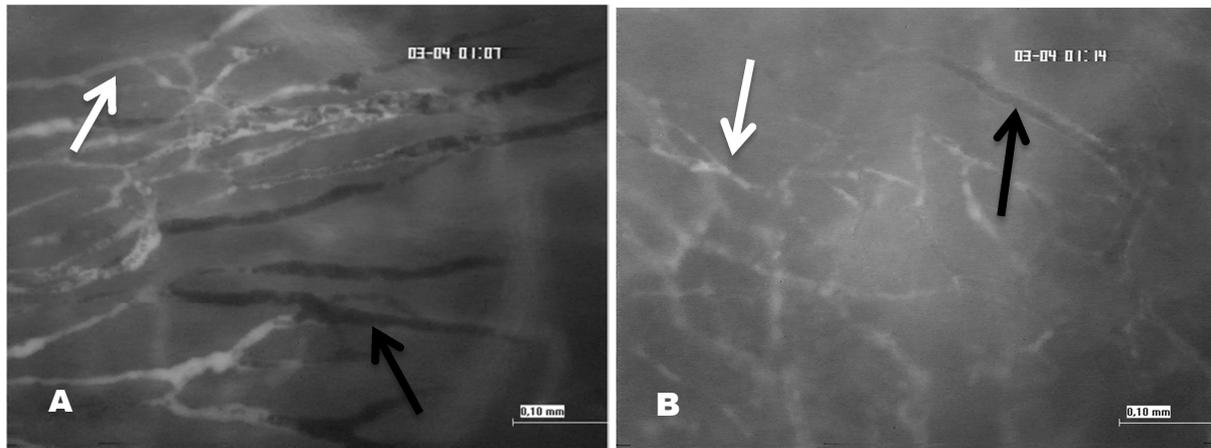


Abbildung 8: perfundierte Gefäße (weisser Pfeil) und verschlossene Gefäße (schwarzer Pfeil)

Des Weiteren kam bei einer Übersichtsaufnahme die Tumorfläche in der Rückenhautkammer (A) in mm^2 hinzu (Abb. 9). War dabei die Tumorfläche größer als die Ausschnittfläche des Mikroskopes, so wurde die Tumorfläche anhand von 4 Teilfeldern bestimmt.

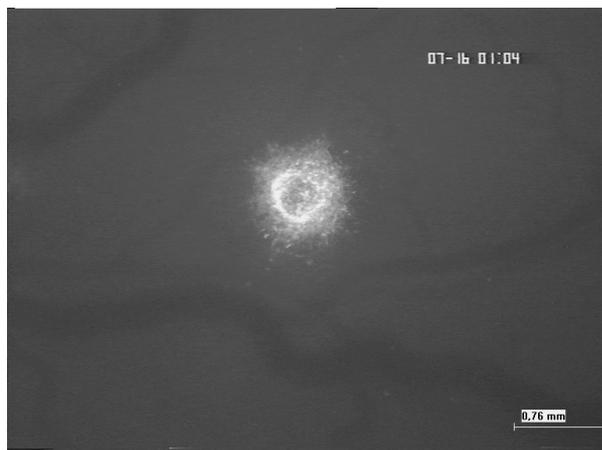


Abbildung 9: Aufnahme der gefärbten Tumorzellen zur Bestimmung der Tumorfläche am Beispiel eines implantierten Spheroids.

Auch konnte der Kontrast bestimmt werden, indem man die Fluoreszenzintensität innerhalb der Gefäße mit dem umliegenden Gewebe verglich. Der Kontrast kann als Maß für die Permeabilität der Gefäße für den Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran gesehen werden. Je dichter die Endothelzellen des neu gebildete Gefäß sind, umso höher ist der Kontrast, da wenig Farbstoff durch die Gefäßwand diffundiert (Abb. 10).

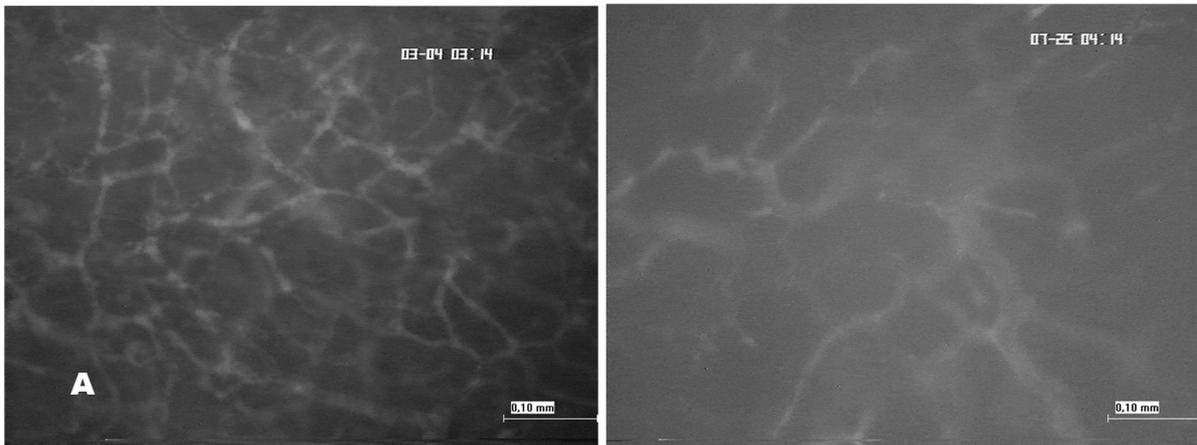


Abbildung 10: Kontrastunterschiede;

Bild A: Tumorgefäßnetzwerk von SF188tr, hoher Kontrast

Bild B: Tumorgefäßnetzwerk von SF188wt, niedriger Kontrast

4.7 Immunhistologie

Zur immunhistologischen Untersuchung wurden von den schockgefrorenen Gewebeproben (s.c. und RHK Tumorzell-Implantationen, s.S. 27) 5-10µm dicke Kryoschnitte angefertigt. Diese wurden über Nacht bei -20°C aufbewahrt und anschließend 10 min. in Aceton bei minus 20°C fixiert. Nach gründlicher Lufttrocknung (20 min.) bei Raumtemperatur wurden die Präparate gefärbt. Zu den immunhistochemischen Färbungen wurde meist noch eine Hämatoxilin-Eosin (H&E) Färbung zur Kontrolle ergänzend angefertigt.

Als Primärantikörper zur Darstellung von Gefäßendothel verwendeten wir einen Antikörper gegen CD31 (Pecam s.S. 34, Tbl. 3 Nr. 4):

Die acetonfixierten, getrockneten Schnitte wurden mit 10%igem Pferdeserum in PBS 1 Std. zur Verminderung unspezifischer Reaktionen geblockt. Der Primär-Antikörper CD31 (purified Rat-Anti-Mouse CD 31 (PECAM-1), BD Pharmingen, Katalog Nr. 550274) wurde in einer Verdünnung von 1:50 in 10% Pferdeserum in PBS 2 Std. inkubiert. Es folgte ein 2 x 10 min. Waschen in PBS; der Biotin-konjugierte Sekundär-Antikörper (donkey-anti-rat, Jackson Lab. USA, Cat. Nr. 712-001-003) wurde 1:200 verdünnt in PBS 1 Std. inkubiert und dannach 2 x 10 min. in PBS gewaschen. Anschließend wurde der ABC-Komplex für die Alkalische Phosphatase (Vectastain ABC-AP Kit (Goat IgG), Vector Lab. USA, Cat.Nr. AK-5005) nach Protokoll des Herstellers zur Verstärkung aufgetragen. Nach 2 maligem Spülen in PBS wurde mit Fuchsin als chromogenen Substrat 2-10 min. entwickelt (DAKO, Cat. Nr. K0689) und nach anschließendem Waschen mit Hämalaun für 2-10 sek. gegengefärbt. Das gefärbte Präparat wurde mit Kaisers Glyceringelantine eingedeckt.

Zur Darstellung der Endothelzellproliferation wurde ein Ki-67 Antikörper als Proliferationsmarker verwendet (Tec-3, Dako s.S 37, Tbl. 3 Nr. 3):

Die acetonfixierten, getrockneten Kryo-Schnitte wurden mit 10%igem Pferdeserum in PBS 1 Std. geblockt. Der Primär-Antikörper Tec-3 (purified Rat-Anti-Mouse Tec-1, DAKO Katalog Nr.: M7249) wurde in einer Verdünnung von 1:50 in 10% Pferdeserum in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte ein 2 x 10 min. Waschen in PBS; der Biotin-konjugierte Sekundär-Antikörper (donkey-anti-rat, Jackson Lab. USA, Cat. Nr. 712-001-003) wurde 1:200 verdünnt in PBS 1 Std. inkubiert und dannach 2 x 10 min. in PBS gewaschen. Anschließend wurde der ABC-Komplex für die Peroxidase (Vectastain ABC Kit (Goat IgG), Vector Lab. USA, Cat.Nr. AK-5000) nach Protokoll des Herstellers zur Verstärkung aufgetragen. Nach 2 maligem Spülen in PBS wurde mit DAB als chromogenen Substrat 2-10 min. entwickelt

(DAKO, Katalog Nr. K3468) und nach anschließendem Waschen mit Hämalau für 2-10 sek. gegengefärbt. Das gefärbte Präparat wurde mit Kaisers Glyceringelantine eingedeckt.

Des Weiteren wurde zur Darstellung der Cox-2 Expression in den *in vitro* Zellen der monoklonale Maus-anti-Cox-2-Antikörper der Firma Invitrogene (Kat.Nr.: 35-8200, s.S. 37, Tbl. 3 Nr. 5) verwendet. Dieser wurde mit einem kommerziellen Färbungs-Kit, dem DAKO ARK™ (AnimalResearchKit Katalog Nr.: K3954), vorbehandelt und auf die Aceton-fixierten Zellen aufgetragen.

Die einzelnen Schritte zur Anfertigung der immunhistologischen H&E Präparate werden im Abschnitt 4.11, den Protokollen, dargelegt (S. 39).

Die Daten zur quantitativen immunhistologischen Auswertung wurden anhand der Anzahl von Gefäßanschnitten pro Gesichtsfeld bei 40 fache Objektivvergrößerung erhoben. Dabei wurde eine Serie von 12 immunhistologischen Schnitten von einer Rückenhautkammer durch drei unterschiedliche Personen ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet.

4.8 RNA-Analyse

Zur Analyse der angiogenen Faktoren VEGF und Cox-2 sowie des Resistenzfaktors MGMT wurde deren RNA mittels PCR sowohl von Tumorgewebe als auch von Tumorzellen aus Kulturflaschen bestimmt.

4.8.1 Gewebeaufbereitung

Die RNA wurde mittels RNeasy Qiagen nach Protokoll des Herstellers aufbereitet. Dazu wurden bei der Verwendung von Gewebe meist 200-500 Serienschritte von 3 µm Dicke angefertigt und in eine Eppendorf-Tube überführt. Handelte es sich um Zellen, so wurde das Zentrifugat aus einer Zellkulturflasche benutzt.

4.8.2 Reverse Transkriptase

Für die Reverse Transkriptase (RT) wurde zunächst die RNA-Konzentration des Lysates mittels Photometer (Eppendorf Biophotometer) bestimmt.

Zur RT wurden 1 µg extrahierte mRNA verwendet, diese mit 1,75µl Oligo (dT) (100pmol/µl) (Promega, Mannheim) vermischt und mit HPLC-Wasser auf ein Volumen von 17 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 5 min. auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Anschließend wurde eine Mischung aus RT-Puffer (5x), dNTP-Mix (10mM), Rnase-Inhibitor (40U/µl) und M-MLV RT (200U/µl) hinzugegeben und bei 37°C 60 min. inkubiert. Die

Reverse Transkriptase wurde nun 10 min. bei 95°C inaktiviert. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

4.8.3 Polymerase-Kettenreaktion

Als housekeeping Gene für die Quantifizierung der verschiedenen cDNA Proben wurde GAPDH verwendet. Um zu gewährleisten, dass die Plateau-Phase der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nicht erreicht wurde, wurden die GAPDH-cDNA Proben 1:50 oder 1:100 verdünnt, während die cDNA Proben für alle anderen zu untersuchenden Gene direkt eingesetzt wurden. Alle PCR-Reaktionen wurden in 20 µl Volumen durchgeführt. 1 µl cDNA wurden dabei in PCR-Gefäßen vorgelegt. Separat wurde ein Mix mit 2 µl MgCl₂ (25mM), 1 µl dNTP (10mM), 2 µl 10xPuffer, 0,2 µl Taq Polymerase (5U/µl), 10,8 µl ddH₂O und je 1 µl Forward und Reverse Primer (10pmol) angesetzt. Dieser Mix wurde zu der cDNA pipettiert und auf einem Vortexer gemischt. Das Gefäß wurde kurz zentrifugiert und in einen Thermocycler überführt. Das PCR-Programm umfasste folgende Schritte: 1. Ein einmaliges Denaturieren bei 94°C, 5 min.; 2. Denaturieren 94°C, 20 sek.; Annealing 55°C 40 sek.; Extension 72°C 30 sek.; (32 Zyklen); 3. 72°C 10 min. Nach der PCR-Reaktion wurden die PCR-Produkte mit 2 µl 6x Sample-Buffer versetzt.

Verwendung fanden die in Tabelle 2 aufgeführten Primer.

Tabelle 2: Verwendete Primer für die PCR

Ursprung	Primer-Name	Sequenz 5'-3'
Ratte	MGMT FW 31	gttacggagtttctgcacag
	MGMT FW 303	gaagcctattccacgaacc
	MGMT RV 749	accaccacacatccgcttc
Human	MGMT RV 750	gaaattatgtcgccacggag
	MGMT FW 567	gccatgaaggccaccggtt
Human	MGMT RV 713	tccacgccccgcatccgatg
	MGMT-FW 400	ggcaggcaaccccaaagccg
	MGMT-RV	gtgctccacgccccgcatcc
	Cox 2 FW	gaacacaacagagtatgcca
	Cox 2 RV	ttctacagttcagtccaacg
	Gap-dh FW	ctcactcaagattgtcagcaatg
	Gap-dh RV	gagggagatgctcagtgttgg

4.8.4 Auftrennen der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Zum Auftrennen der PCR-Produkte wurde ein 1,5% Agarosegel mit Ethidium-Bromid (0,01%) versetzt und gegossen. In der Elektrophoresekammer wurde das Gel nun bei 80-110 V für 40 min. belassen und anschließend mittels einer CCD-Kamera fotografiert.

4.9 Proteindetektion mittels Western Blot

4.9.1 Probenaufbereitung

Die Proteinaufbereitung für die Untersuchung von MGMT, VEGF und Cox-2 erfolgte durch einen hyperosmolaren Lysis-Puffer auf Eis und anschließender Zentrifugation der unlöslichen Zellbestandteile bei 4°C und 150 000 rpm für 30 min.

4.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Standardreihe mit bovinem Serum Albumin (BSA) angefertigt und nach Bradford mittels BioRAD Protein Assay gemessen. Die Lösung wurde 1:5 verdünnt und je 1 ml mit 10 µl Proteinlösung versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 38°C wurde der Ansatz photometrisch gemessen.

4.9.3 SDS-PAGE Gelelektrophorese

Unter der SDS-Gelelektrophorese versteht man die Proteinauftrennung einer Probe mittels einer eindimensionalen Elektrophorese in SDS-Gelen. Bei diesem, von Lämmli (1970) entwickelten Verfahren werden die Proteine unter denaturierten Bedingungen entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Hierzu werden die Proteine mit Lämmli-Puffer (SDS-Puffer) denaturiert, wobei sich das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) an die hydrophoben Teile der Proteine bindet. Diese starke negative Ladung überdeckt die vorhandenen Ladungen und steht in proportionalem Bezug zu der Molekülmasse der Proteine. Außerdem führt diese negative Ladung in einem elektrischen Feld zu einer Wanderung der Proteine in Richtung Anode. Dabei kommt es infolge des Molekularsiebeffektes durch die kleinen Gelporen zu einer linearen Auftrennung von sich schneller bewegenden kleinen und langsameren großen Proteinen.

Die Gele wurden, je nach Größe des nachzuweisenden Proteins, 7,5 %ig oder 12 %ig gegossen. Sie bestanden aus einem Sammel- sowie einem Trenngel (siehe Protokolle). Es wurden meist zwischen 40 und 80 µg Protein pro Linie aufgetragen, wobei die

unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Proben durch Verdünnung ausgeglichen wurden. Das Programm zur Elektrophorese enthielt zwei Stufen. Die Proteine wurden zunächst aus den Geltaschen im Sammelgel zusammengeführt (600 V, 300 mA, 20 min.), um sie anschließend im Trenngel aufzutrennen (50 V, 1000 mA, 1:30-2:30 h je nach Proteingröße).

4.9.4 Semi-Dry-Blot

Im Semi-Dry-Blot wurden die einzelnen Proteine auf eine PVDF Membran überführt, um anschließend die gesuchten Proteine mittels immunochemischer Färbung nachzuweisen.

Dazu wurde die Gelkammer vorsichtig geöffnet und das Trenngel entnommen. Das Gel wurde 20 min. im Kathodenpuffer inkubiert, bevor es zusammen mit der Membran auf den Blot-Tisch überführt wurde.

Nach dem Blotten (bei ca. 80-90mA für 60-90min) wurde die Membran in 2-5% Non-Fat-Dry-Milk (NFDM) in PBS/Tween eine Stunde geblockt und nach Auftragen des Primärantikörpers (4µg/ml in PBS/Tween) für VEGF, Cox-2 und MGMT, eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach gründlichem Waschen (2 x 10min.) wurde der Alkalische Phosphatase (AP)-konjugierte sekundäre Antikörper für eine Stunde aufgetragen. Nach nochmaligem Waschen wurde die Membran im Detektionspuffer equilibriert und anschließend mit dem chromogenen Substrat NBT/BCIP gefärbt.

Die Primärantikörper gegen MGMT (Nr. 1), VEGF (Nr. 2) und Cox-2 (Nr. 5) die verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Primärantikörper für die Immunhistologie und den Western-Blot

Nr.	Name	Cat. No	Firma
1	purified mouse anti-human mgmt AB	557045	BD Pharmingen
2	Goat-anti-VEGF (A-20-G)	sc-152	Santa Cruz Biotechnology
3	Mouse KI-67 antigen (Tec-3)	M7249	Dako
4	Purified Rat Anti-Mouse CD31 (PECAM-1)	550274	BD Pharmingen
5	Mous anti-cox-2 (clone 229)	35-8200	Invitrogene

4.10 Tabelle verwendeter Chemikalien

Die eingestetzten Enzyme und Chemikalien sowie deren Hersteller sind nachfolgend gelistet.

Produkt:	Hersteller:
10x Puffer (für PCR)	Promega, Mannheim, Deutschland
Acrylamid, Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Biozym, Oldendorf (Hessen), Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bradford Protein Assay	Biorad, München, Deutschland
Coomassie	Merck, Darmstadt, Deutschland
DEPC	Fluka, Schweiz
DNTPs	Sigma, Steinheim, Deutschland
ENVISION	Dako, Hamburg, Deutschland
Ethidium Bromid	Sigma, Steinheim, Deutschland
Gelatine	Sigma, Steinheim, Deutschland
MgCl ₂ (für PCR)	Promega, Mannheim, Deutschland
n-Pentan	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Primer und Oligo-dT ₁₈	Invitrogen, Heidelberg, Deutschland
Reverse Transkriptase (M-MLV H (-)) und 5x Puffer	Promega, Mannheim, Deutschland
RNAse-Inhibitor	Promega, Mannheim, Deutschland
SDS (Sodiumdodecylsulfate)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim, Deutschland
Taq Polymerase	Promega, Mannheim, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton x-100	Sigma, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formamid	Fluka, Schweiz

4.11 Protokolle

4.11.1 Immunhistochemische Färbungen und H.&E. Färbung

4.11.1.1 Hämatoxin & Eosin Färbung

H&E Färbung nach Standartprotokoll:

Arbeitsschritt/Agenz	Details	Dauer
• Azetonfixierung -20°C		10 min.
	gut trocknen	20 min. (od. über Nacht)
• Hämalaun-Lösung (Standard)	H ₂ O	spülen
	H ₂ O	5 min.
	H ₂ O	5 min.
• Eosin-Lösung (Standard)		2 min.
	Aqua dest.	spülen
	70 % Ethanol	kurz eintauchen
	80 % Ethanol	kurz eintauchen
	96 % Ethanol	2 min.
	96 % Ethanol	2 min.
	100 % Ethanol	5 min.
• Eindecken in Eukitt		

4.11.2 Western Blot

Membranbehandlung nach dem Semi-Dry Blot, hier am Beispiel für Cox-2, für jeden Blot.

Arbeitsschritt/Agenz	Details	Dauer
• Blocken	Mit 2-5% NFDM in PBS/Tween	1h
	<i>in PBS/Tween spülen</i>	<i>2 x 5 min.</i>
• prim. Antikörper: Cox-2 (Invitogen) oder VEGF	1µg/ml in 2%NFDM	1 h oder über Nacht, 4 °C
	<i>in PBS/Tween spülen</i>	<i>2 x 10 min.</i>
• sek. Antikörper: horse-anti-goat-BIO (DAKO)	1:500 in 2%NFDM	1h
	<i>in PBS spülen</i>	<i>2 x 10 min.</i>
• ABC Komplex für Alkalische Phosphatase (Vector) vorher jeweils Lsg. A 1:1000 in PBS	zusammenmischen	30 min

Material und Methoden

Lsg. B 1:1000 in PBS	zusammen inkubieren <i>in PBS spülen</i>	30-60min. <i>2 x 10 min.</i>
• equilibrieren in Detektionspuffer		10 min.
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
• Chromogen-Substrat: NBT/BCIP	10ml Detektionspuffer + 66µl NBT + 33µl BCIP <i>in PBS spülen</i>	2-10 min.

Trenngel (Ansatz reicht für 2 Gele, ca. 12ml):

Konzentration des Trenngels:	7,5%	12%
Acrylamid 30%	3,00 ml	4,80 ml
Bis Acrylamid 2%	1,20 ml	1,92 ml
Resolving Buffer Tris 2M pH 8,8	1,50 ml	1,50 ml
10% SDS	0,12 ml	0,12 ml
ddH ₂ O	6,18 ml	3,66 ml
10% Ammonium Persulphate (APS)	0,12 ml	0,12 ml
TEMED	12 µl	12 µl

Sammelgel (Ansatz reicht für 2 Gele, ca. 5ml):

Konzentration des Sammelgels:	5%	7%
Acrylamid 30%	0,83 ml	1,17 ml
Bis Acrylamid 2%	0,33 ml	0,47 ml
Stacking Buffer Tris 0,5M pH 6,8	1,25 ml	1,25 ml
10% SDS	0,04 ml	0,04 ml
ddH ₂ O	2,54 ml	2,08 ml
10% Ammonium Persulphate (APS)	0,15 ml	0,15 ml
TEMED	10 µl	10 µl

4.11.3 Puffer und Lösungen

Lösung	Substanz	Menge
SDS (10-fach)	Glycin	144,2 g
	Tris	30,3 g
	Natrium(Sodium)-Dodecylsulfat mit ddH ₂ O auf 1 Liter auffüllen	10 g
Laemmli Puffer (5-fach)	Bromphenolblau	5 mg
	Glycerin	3,5 ml
	Natrium (Sodium)-Dodecylsulfat	1,5 g
	1 M Tris-HCl, pH 6,8	3,2 ml
	Mercaptoethanol	2,5 ml
Coomassie Färbelösung gebrauchsfertig	Coomassie Brilliant Blue R250	1 g
	Methanol (100 %)	400 ml
	Eisessig	100 ml
	demin. Wasser	ad 1000
Entfärbelösung für Coomassie	Ethanol 96%, vergällt	400 ml
	Eisessig	100 ml
	demin. Wasser	ad 1000
PBS (Phosphate- buffered saline) (10-fach)	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Na ₂ HPO ₄	14,4 g
	KH ₂ PO ₄	2,4 g
Tris-HCl	Tris in 800 ml ddH ₂ O lösen	121,1g
	pH-Wert mit konz. HCl einstellen (pH=6,8) ddH ₂ O	ad 1000

5 Ergebnisse

5.1 Wachstumsverhalten und Chemoresistenz gegenüber TMZ in vitro

5.1.1 SF188wt- und SF188tr-Zelllinien

Das Wachstumsverhalten der Zelllinien verhielt sich so wie in der Veröffentlichung von J. Ma et. al. (2002) angegeben. Mit einer Verdoppelungsrate von 33 Stunden war die resistente SF188tr Zelllinie gegenüber 30 Stunden der sensiblen SF188 Zelllinie (wildtyp, SF188wt) in ihrem Wachstum geringfügig verzögert, konnte jedoch höhere Konzentrationen von TMZ ohne Wachstumsverzögerung aushalten (Messergebnisse hier nicht dargestellt).

Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) ist, wie beschrieben, ein Enzym, das die Methylgruppe des O⁶-Methylguanin in der DNA an sich bindet und damit der Schädigung durch TMZ entgegenwirkt. Nach Reaktion verliert das Enzym seine Aktivität, so dass die Konzentration die Aktivität widerspiegelt.

Die Chemoresistenz gegenüber TMZ wurde anhand der Expression von MGMT in beiden Zelllinien auf Gen- und Protein-Ebene untersucht. Es zeigte sich, dass die SF188tr Zellen in beiden Untersuchungen mehr MGMT exprimieren als die SF188wt Zellen (Abb. 11).

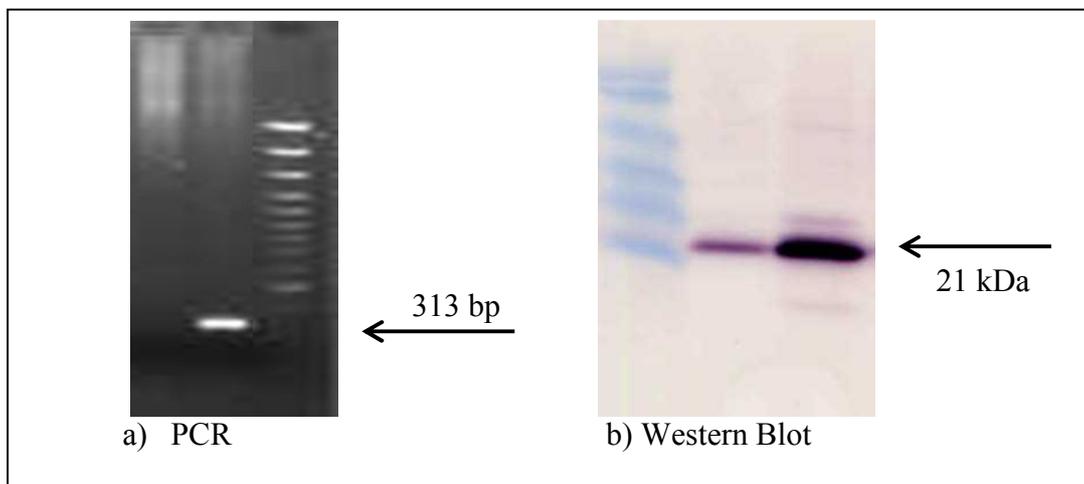


Abbildung 11:

PCR und Western Blot von SF188wt und SF188tr mit Primern für MGMT bzw. Antikörper (mouse-anti-human mgmt)

PCR: Linie 1: SF188wt

WesternBlot: Linie 1: Molekulargewichtsmaßstab

Linie 2: SF188tr

Linie 2: SF188wt

Linie 3: Maßstab der Basenpaare

Linie 3: SF188tr

Höhere Expression des Resistenzzyms MGMT in SF188tr Zellen

5.2 Zytotoxizitätsassay in der Zellkultur (MTT-Assay)

5.2.1 SF188wt und SF188tr Zellen

Mittels MTT-Assay wurde das Wachstumsverhalten unter TMZ-Einfluss in den Tumorzelllinien untersucht. Die SF188tr-Zellen wurden mit steigender Konzentration an TMZ weniger in ihrer Proliferation gehemmt als die SF188wt-Zellen (Abb. 12).

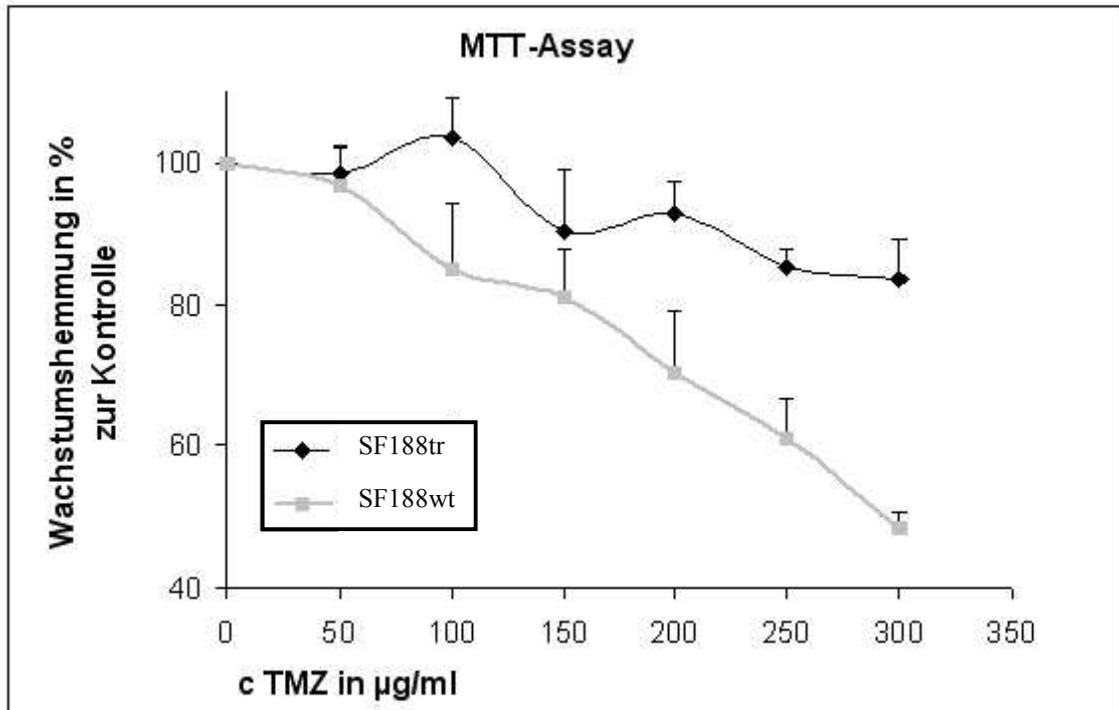


Abbildung 12: Prozentuale Wachstumshemmung von SF188wt und SF188tr-Zelllinien bei Behandlung mit TMZ im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels MTT-Assay. Deutlich stärkere Wachstumshemmung bei SF188wt-Zellen innerhalb 72 Std. Kulturdauer

5.2.2 HUVEC Zellen

HUVEC Zellen sind schon bei Konzentrationen von 30 μg TNZ/ml stark in ihrem Wachstum gehemmt (Abb. 13). Dies bewog uns dazu, die low-dose Therapie mit nur 10% der high-dose Therapie anzusetzen, also mit nur 20 mg/kg Körpergewicht.

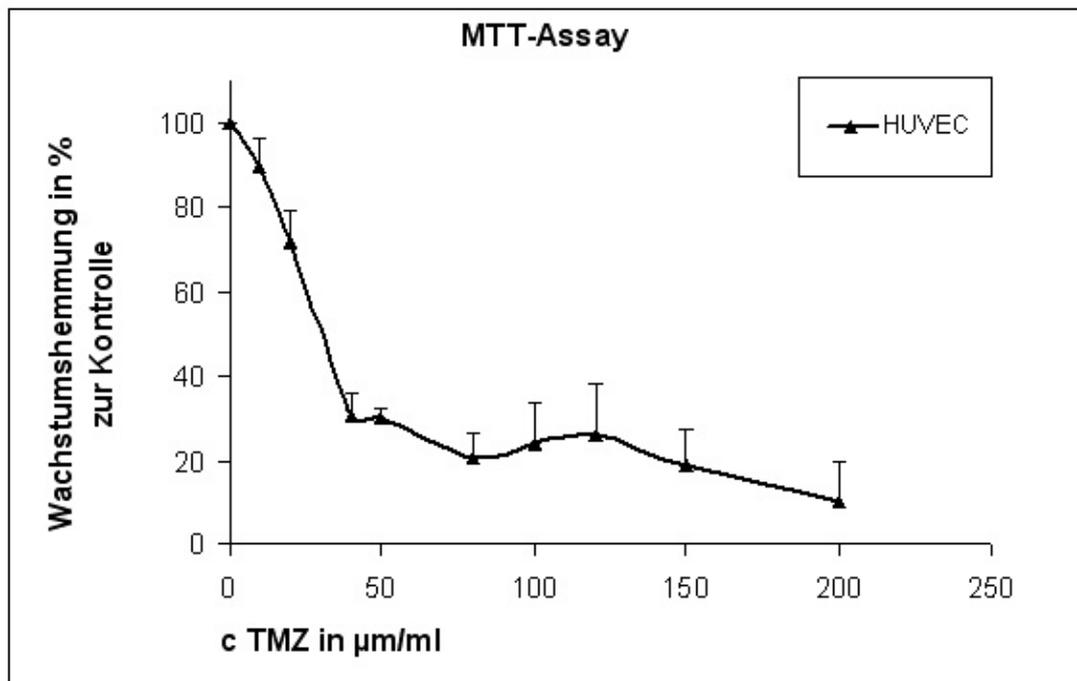


Abbildung 13: Prozentuale Wachstumshemmung von HUVEC-Zelllinien bei Behandlung von TMZ im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels MTT-Assay innerhalb 72 Std. Kulturdauer

5.3 Vergleich der Migration von Sphäroiden *in vitro*

In vitro konnte in 24 Well-Zellkulturplatten eine schnellere Migration bei den TMZ-resistenten Zellen SF188tr beobachtet werden, während die SF188 sich deutlich langsamer ausbreiteten (Abb. 14).

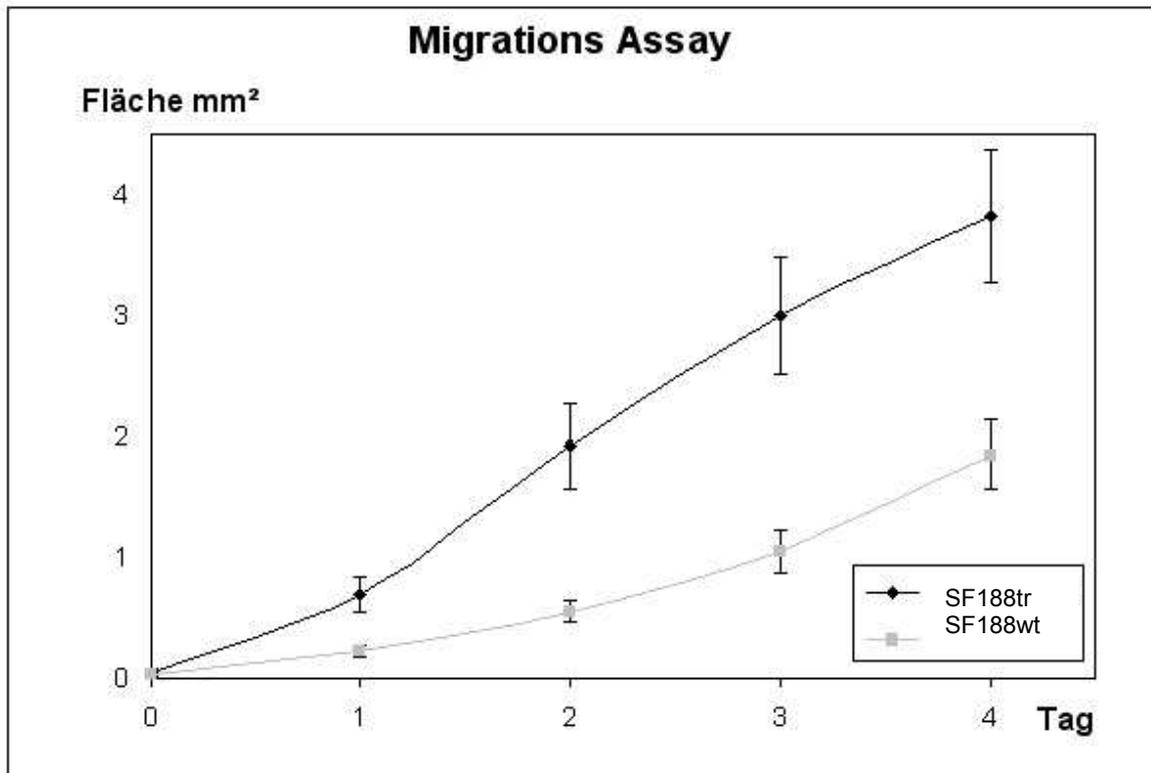


Abbildung 14: Fläche der Zellkultur nach Beimpfen einer 24-well-Platte mit Sphäroiden von SF188wt und SF188tr (Auswertung mit ImageJ s.S. 25)

Des Weiteren fiel bei diesen Untersuchungen auf, dass die resistenten Zellen SF188tr auch nicht die Form des Ausgangs-Sphäroid beibehielten, sondern schnell wieder eine Einzel-Zellschicht bildeten.

Im Gegensatz dazu wurde das SF188wt-Sphäroid im Beobachtungszeitraum größer und optisch auch dichter. Die Migration war jedoch geringer (Abb. 15).

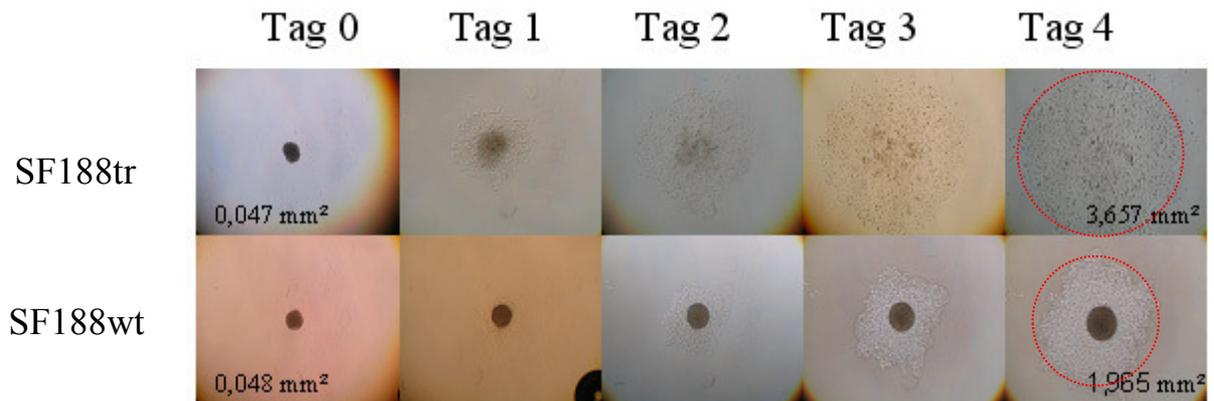


Abbildung 15: Serienbilder der *in vitro* Migrationsuntersuchung sowie die Flächen-
dimensionen am Anfang und Ende des Beobachtungszeitraumes. Flächenzunahme infolge Migration der resistenten SF188tr (obere Reihe) und
Auflösung des Spheroids in Vergleich zu den SF188wt Zellen (untere Reihe)
Der rote Ring gibt die äußere Begrenzung der Zellausdehnung an

5.4 Charakterisierung der Tumorzellen in vivo

5.4.1 Untersuchungen im subkutanen Tumormodell

Bei unseren Versuchen im subkutanen Tumormodell sind nur die SF188wt-Zellen angewachsen. Ein subkutanes Tumorwachstum der SF188tr konnte auch 3 Wochen nach Implantation nicht beobachtet werden.

5.4.2 Intravitalmikroskopie der Rückenhautkammern

Nach Implantation der Zelllinien in die Rückenhautkammern war die Beobachtung überraschend, dass das vaskuläre Kompartiment der resistenten SF188tr-Zellen dichter war als das der sensitiven SF188wt-Zellen (Abb. 16).

Die Kammern mit den SF188tr-Zellen wiesen ein verzweigteres Gefäßnetzwerk als die RHK mit Tumoren von SF188wt-Zellen auf. Der Gefäßdurchmesser war bei beiden Zelllinien gleich. Der Kontrast, das heißt die Fluoreszenzintensität innerhalb des Gefäßnetzwerkes im Vergleich zur Umgebung, war in der Rückenhautkammer der SF188tr höher (Abb.16 b), was auf eine bessere Konnektivität (Zellverbund) der Endothelzellen in den Gefäßen zurückzuführen ist (s.S. 29).

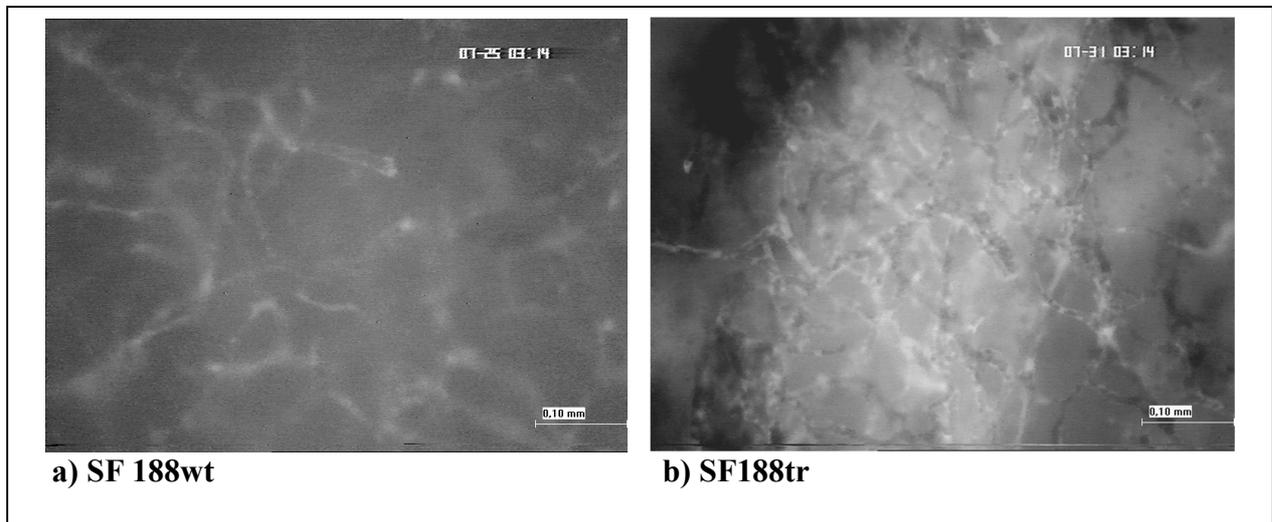


Abbildung 16: Beispielbilder der RHK für SF 188wt und SF188tr am Tag 14 post implantationem. Erhöhte Gefäßdichte sowie besserer Kontrast bei den TMZ-resistenten SF188tr Zellen (b) als bei den TMZ-sensiblen SF188wt Zellen (a)

Abbildung 17 zeigt die quantitative Analyse der Gefäßversorgung beider Zelllinien SF188wt und SF188tr in der RHK. Die resistente Zelllinie hat eine um ca. 30% dichtere funktionelle (FVD) als auch totale (TVD) Gefäßdichte gegenüber der sensitivere Zelllinie SF188wt bei annähernd gleichem Durchmesser der Gefäße.

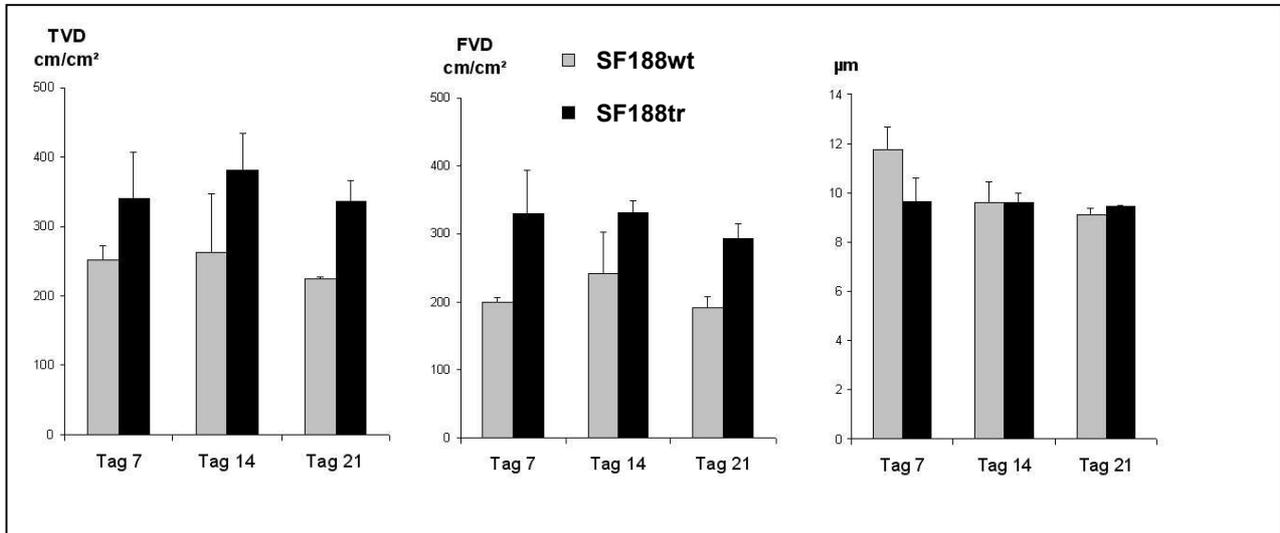


Abbildung 17: Quantitative Analyse der Gefäßversorgung beider Zelllinien zu den Untersuchungszeitpunkten der Intravitalmikroskopie

Die totale- (TVD) und funktionale Gefäßdichte (FVD) ist bei SF188tr Zellen erhöht. Der Gefäßdurchmesser (µm) ist bei beiden Zelllinien gleich (n = 4). Daraus folgt eine verbesserte Durchblutung in Tumoren von SF188tr-Zellen

5.4.3 Immunhistologische Untersuchungen der Zelllinien auf Gefäßdichte in der RHK

Die vermehrte Gefäßdichte bei den SF188tr konnte ebenfalls an histologischen Schnitten aus den Geweben der Rückenhautkammern nach Färbung mit dem Endothel-spezifischen Pecam-Antikörper bestätigt werden (Abb. 18).

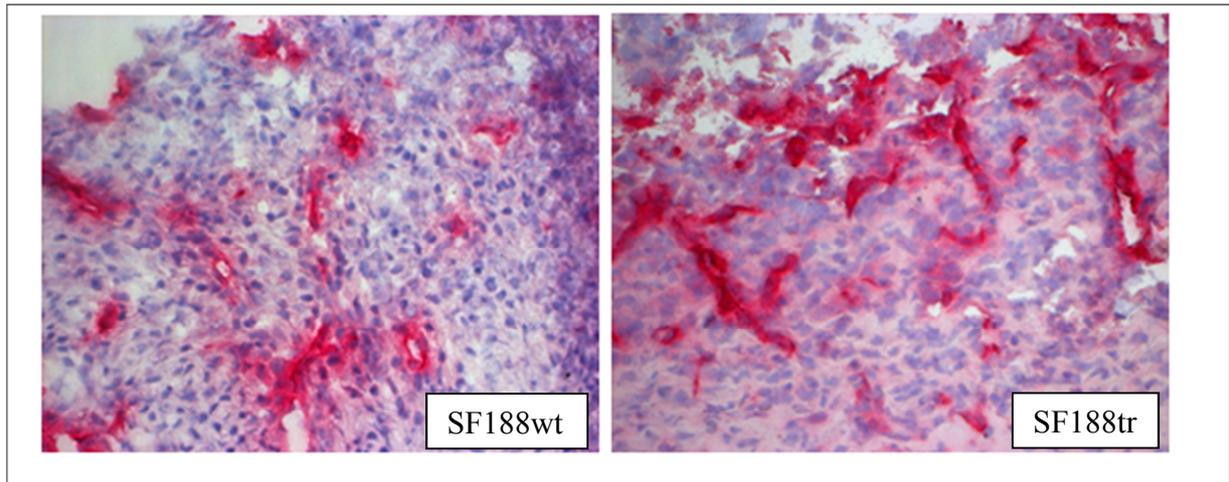


Abbildung 18: Immunhistologische Darstellung des Gefäßendothels von Schnitten der RHK von SF188wt und SF188tr mit Hilfe des CD31 Antikörpers (Pecam). Deutlich stärkere Reaktion von endothel-spezifischem Antigen bei den SF188tr-Zellen. (Primärvergrößerung: x 40 Objektiv)

Ebenso ergab die quantitative Analyse der immunohistochemischen Reaktionen auch hier eine vermehrte Gefäßdichte bei der SF188tr Zelllinie (Abb.19).

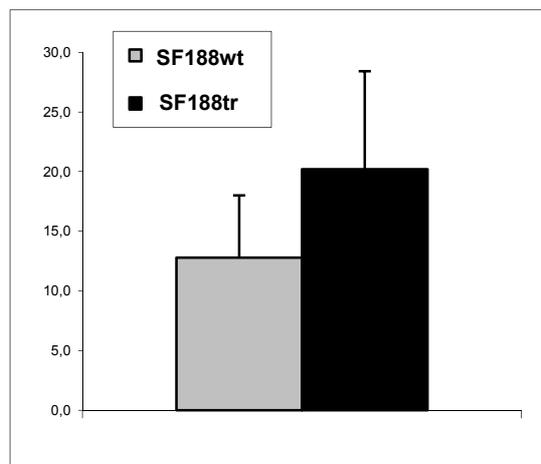


Abbildung 19: Quantitative Bestimmung der Gefäßdichte an immunhistologischen Schnitten (40 fache Objektiv-Vergrößerung pro Bild, n=12)

5.4.4 Expression der angiogenen Faktoren VEGF und Cox-2

Wegen des stark sichtbaren Unterschieds der Gefäßversorgung in der Rückenhautkammer zwischen den beiden Zelllinien SF188wt und SF188tr wurde die Expression der angiogenen Faktoren VEGF und Cox-2 in diesen beiden Zelllinien mittels PCR (Genexpression) und Western Blot (Proteinexpression) untersucht.

Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, exprimiert die sensitivere Zelllinie SF188wt bei beiden Untersuchungsmethoden mehr VEGF, wohingegen die resistente Zelllinie SF188tr mehr COX-2 exprimiert.

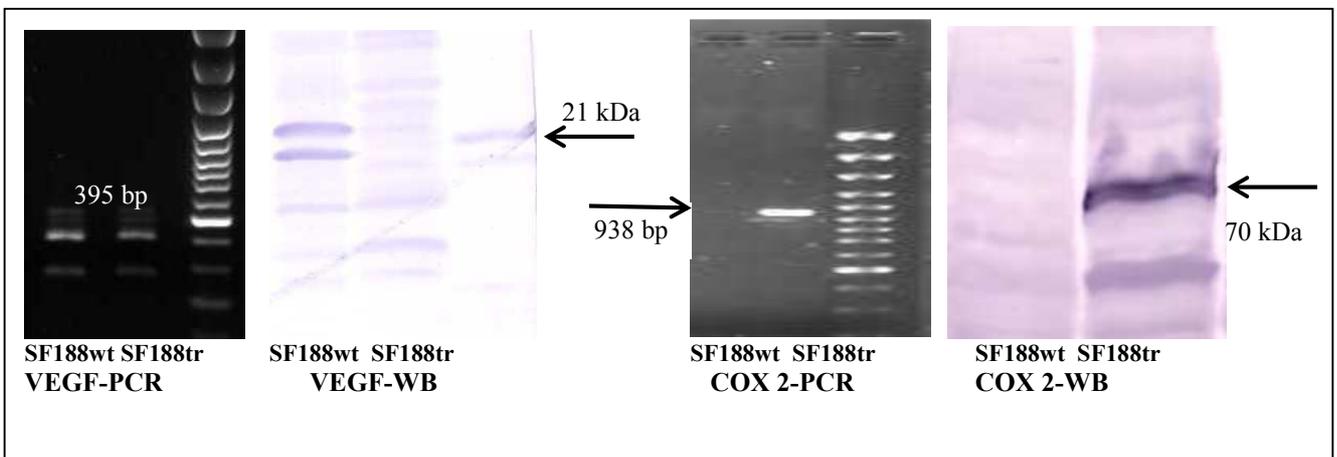


Abbildung 20: links: VEGF - PCR und WB von SF188wt und SF188tr

rechts: COX 2 - PCR+WB von SF188wt und SF188tr

Deutlich ist die erhöhte Cox-2 Expression bei SF188tr Zellen zu erkennen.

VEGF wird vermehrt von SF188wt Zellen gebildet

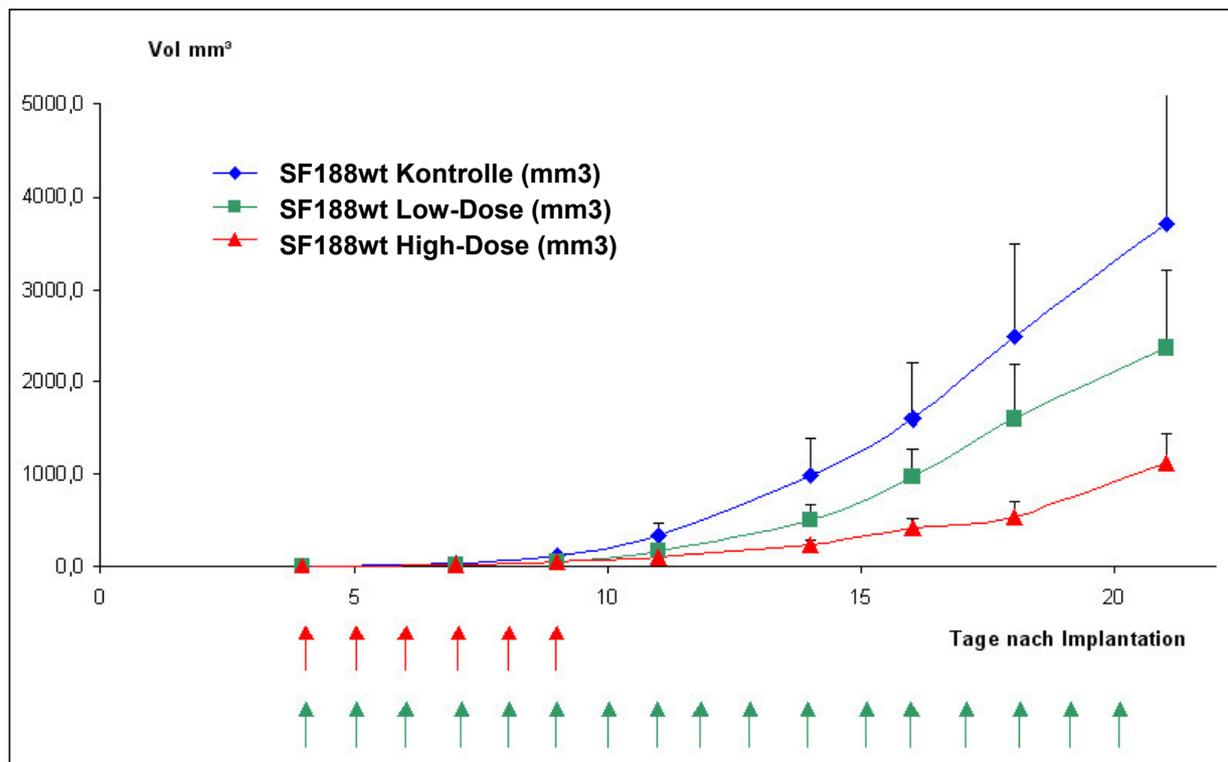
5.5 Vergleich der Therapiemodelle unter TMZ-Therapie

Da die niedrigdosierte oder metronomische Chemotherapie auf das Tumorgefäßsystem wirken soll, wurde der Schwerpunkt der Untersuchung in dieser Arbeit vor allem auf das sich bildende Gefäßsystem in den Rückenhautkammern gelegt. Verglichen wurde dabei das Gefäßwachstum innerhalb der einzelnen Tumorimplantate unter hochdosierter und niedrigdosierter Therapie sowie ohne Therapie (Kontrollen).

Bei den subkutanen Implantaten sind nur SF188wt Zellen angewachsen, so dass nur mit dieser Zelllinie der Einfluss der TMZ-Therapie auf das Volumen untersucht werden konnte.

5.5.1 Vergleich der TMZ-Therapiedosen im subkutanen Tumormodell

Die Beeinflussung des Tumorwachstums im subkutanen Tumormodell durch die unterschiedlichen Therapieschemata ist für die SF188wt-Zelllinie in Abbildung 21 dargestellt. Man kann gut erkennen, wie das Tumorwachstum unter TMZ-Therapie im Vergleich zur Kontrolle gehemmt wird. Die High-Dose-Therapie zeigt hierbei die stärkste Hemmung des Tumorwachstums.



n = 10

Die Pfeile geben den Zeitpunkt der i.p. Injektion v. TMZ an;

Abbildung 21: s.c. Wachstumskurve von SF188wt bei LD- und HD-Therapie im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

5.5.2 Wirkungsvergleich der TMZ-Therapiedosen auf die Tumorangiogenese in der Rückenhautkammer

Für den Vergleich in der Rückenhautkammer wurde mittels CapImage in der Intravitalmikroskopie die durchschnittliche Gefäßdichte der einzelnen Tumoren untersucht. Man kann in Abbildung 22 erkennen, dass Temozolomid bei beiden Therapiedosen einen hemmenden Einfluss auf die Angiogenese hat, jedoch ist dieser antiangiogene Effekt bei unseren Untersuchungen nicht signifikant.

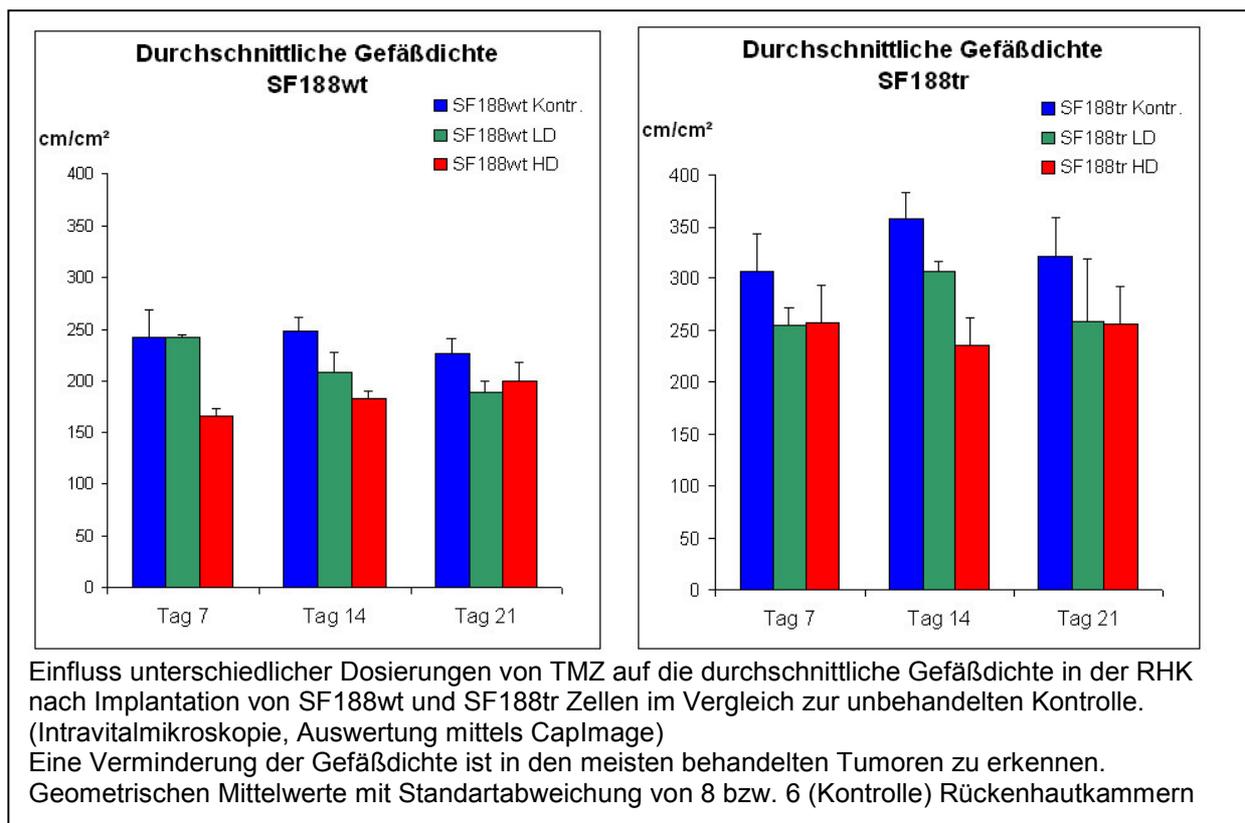


Abbildung 22: Vergleich der durchschnittlichen Gefäßdichte in Rückenhautkammern von SF188wt (links), SF188tr (rechts) bei LowDose- und HighDose-Therapie sowie der Kontrollgruppe

5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine Hemmung des Endothelwachstums durch niedrige TMZ-Dosen (ca. 10% der Standarddosis) konnte anhand von HUVECS im MTT-Assay gezeigt werden

Temozolomid übt sowohl eine anti-angiogene Wirkung auf das Gefäßnetzwerk in den Tumoren als auch eine direkte Hemmung des Tumorzellwachstums auf die von uns untersuchten Zelllinien aus. Ein statistisch gesicherter Vorteil der niedrig-dosierten metronomischen Chemotherapie (Low-Dose) gegenüber der hochdosierten Standardtherapie (High-Dose) durch eine signifikante Hemmung der Angiogenese des Tumors konnte jedoch im Untersuchungszeitraum nicht beobachtet werden.

6 Diskussion

6.1 Gliome

6.1.1 Gliome und deren vaskuläre Besonderheiten

Glioblastome zählen zu den höchst vaskularisierten humanen Tumoren. Diese Ansicht wird durch die Identifizierung der Tumorgefäßdichte als unabhängigem prognostischen Parameter für humane gliale Tumoren gestützt (Mentlein R. et al., 2003).

Experimentelle Untersuchungen sprechen dafür, dass das solide Gliomwachstum von der Gefäßneubildung abhängig ist, wie auch bei jedem anderen Tumor die Neovaskularisation als entscheidender Schritt zur Tumorprogression gesehen wird. Der sog. „Angiogenic Switch“ zu einem angiogenen Phänotyp entsteht meist erst Monate, wenn nicht sogar Jahre nach der *de novo* Entstehung (Folkman J., 2002). Deshalb steht eine Anti-Angiogenesetherapie zur erfolgreichen Behandlung dieser Tumore heute im Zentrum dieses Therapieansatzes. Das Chemotherapeutikum TMZ ist für die Behandlung des malignen Glioms zugelassen. Die Wachstumshemmung für Gefäßendothelzellen mit geringen Dosen ist in der Literatur beschrieben (Kurzen H. et al., 2003) und konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden (Kurzen H. et al., 2003).

Störungen in der Blut-Hirnschranken-Funktion eines Hirntumors sowie der Gewebepfusion, Ödembildung und im Energieverbrauch sind sehr unterschiedlich in ihrer Ausprägung in malignen Gliomen. Hinweise auf Unterschiede in der Gewebepfusion sowie in der Durchlässigkeit der Gefäßwände (Kontrast in der RHK) konnten zwischen SF188wt und SF188tr-Zellen bei den intravitalmikroskopischen Aufnahmen beobachtet werden. So waren Bilder von SF188tr-Tumorzellen in den Rückenhautkammern klarer und kontrastreicher (s.S. 42, 5.4.2). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die ausgebildeten Gefäßwände in den SF188tr Tumoren weniger permeabel gegenüber dem Kontrastmittel FITC-Dextran waren als die der SF188wt Gefäßwände. Wahrscheinlich ist dies hauptsächlich auf die in dieser Arbeit nachgewiesene erhöhte Expression von VEGF in SF188wt-Tumorzellen (s.S. 45) zurückzuführen.

SF188tr-Zellen sind aus SF188wt-Zellen unter TMZ-Therapie in der Zellkultur, also *in vitro* selektiert worden. Die molekularen Veränderungen der SF188tr als Ausweich-Mechanismus zur Resistenzsteigerung gegenüber TMZ sind daher nicht abhängig von einer Neovaskularisation. Daher ist zu vermuten, dass die beobachteten angiogenen Veränderungen (bspw. höherer Kontrast und höhere Gefäßdichte in SF188tr) eine Begleiterscheinung des

veränderten Resistenzprofils von SF188tr-Zellen sind. Das bedeutet, dass die molekularen Veränderungen zur Steigerung der Resistenz gegenüber TMZ in SF188tr Zellen eine Veränderung der angiogenen molekularen Faktoren wie die hier beobachtete unterschiedliche Expression von VEGF in dieser Gliomzelllinie bewirkt haben.

Aufgrund dieser Verknüpfung von Resistenz und Angiogenese in glialen Tumoren könnte ein Wechsel im Therapieregime bei rezidivierenden oder resistenten Tumoren, im Hinblick auf die Veränderungen im Tumor-Gefäßsystem, sinnvoll sein.

6.1.2 Gliome und deren infiltrative Eigenschaften

Gliome metastasieren im Gegensatz zu anderen malignen Tumoren äußerst selten. Für ihr klinisch malignes Verhalten ist vor allem das massive infiltrative Wachstum der Tumorzellen verantwortlich. Meist ist diese ausgeprägte, mikroskopische Aussaat entlang des Neuropils oder Gefäßnetzes bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erfolgt, so dass bei Rezidivtumoren oftmals keine örtliche Beziehung zum Primärtumor besteht.

Bei den hier vorliegenden humanen Gliomzelllinien sieht man dieses unterschiedliche Verhalten bezüglich der Migration und Proliferation anhand der *in vitro* Migrationsuntersuchungen von SF188wt und SF188tr sehr gut. Die SF188wt Zelllinie proliferiert, die resistente SF 188tr Zelllinie migriert. Das ist daran zu erkennen, dass SF188wt-Sphäroide in den Untersuchungen intakt blieben und sich neue Zellen am Rand bildeten, wohingegen bei SF 188tr-Zellsphäroiden eine Auflösung in Einzelzellen zu beobachten war (s.S. 41).

Daher stellt sich die Frage, ob therapieresistente Gliome eher migrieren als proliferieren.

Bevor eine Gliomzelle in das Stadium der Migration und Invasion eintreten kann, wird sie in einem bestimmten Stadium des Zellzyklus arretiert. Dies entspricht der „go or grow“-Theorie (Berens M.E. et al., 1990). Da sie folglich in diesem Stadium nicht proliferiert, können auch proliferationsassoziierte Therapien nicht greifen (Soroceanu L. et al., 1999). Erst nach der Migration können die Tumorzellen wieder in den Zellzyklus zurückkehren und proliferieren.

Zur Verhinderung von Rezidivtumoren ist es notwendig, die Agglomeration und Neovascularisation dieser migrierten Zellen zu unterbinden. Durch eine kontinuierliche Chemotherapie, die einerseits antiproliferativ, andererseits angiostatisch ist, könnten Rezidivtumore verhindert werden.

6.1.3 Rolle der Cyclooxygenase-2 bei der Neovaskularisation

In den meisten höhergradigen Gliomen wird die Cox-2 überexprimiert (Joki T. et al., 2000). Ob die Cox-2 auch zur vermehrten Vaskularisation des Glioms beiträgt, wird allerdings kontrovers diskutiert.

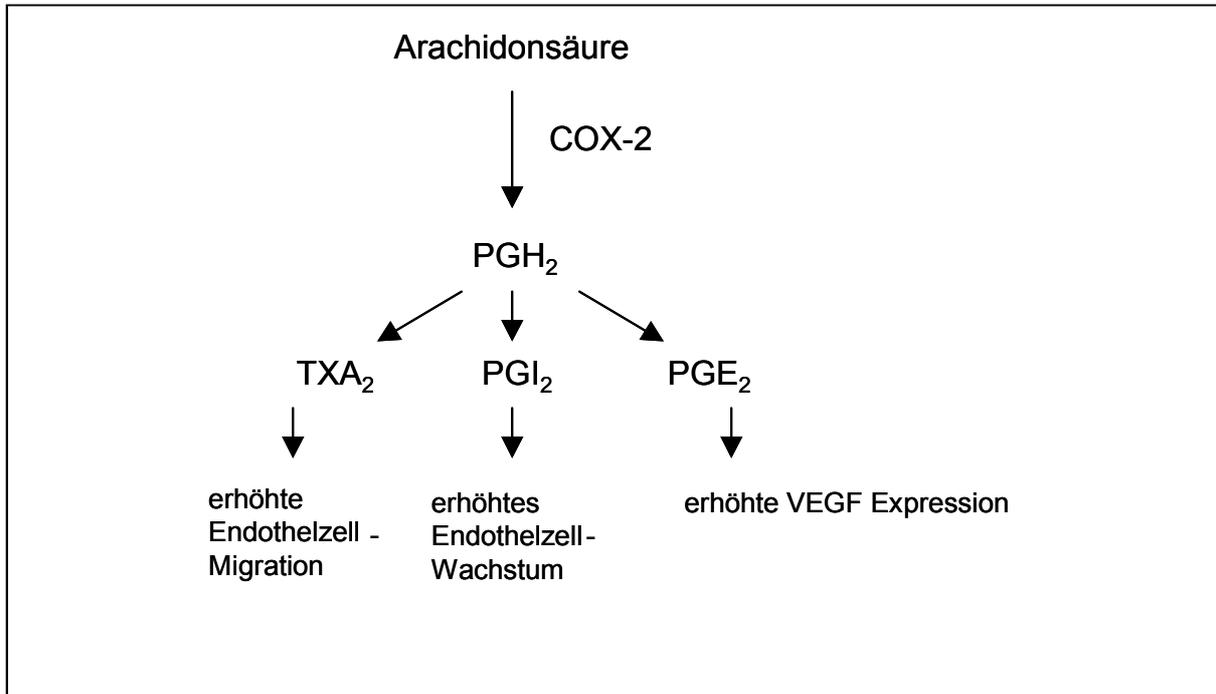


Abbildung 23: Cox-2 induziert über verschiedene Wege Tumor-Angiogenese (Gately S. et al., 2004)

Interessant bei den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur Tumorgefäßdichte in der RHK ist, dass die *in vitro* Entwicklung einer Resistenz gegenüber TMZ bei den SF188tr Zellen *in vivo* zu mehr Neovaskularisation führt. Wir vermuten, dass dies im Zusammenhang mit der vermehrten Expression der Cox-2 steht. Diese Vermutung wird von verschiedenen Veröffentlichungen unterstützt, die eine hohe Cox-2 Expression mit einer höheren Kapillardichte in Gliomen zeigen konnten (Shono T. et al., 2001). Eine höhere Cox-2 Expression korreliert über die Synthese von PGE₂ mit erhöhter VEGF-Expression (Abb. 23) sowie mit einer höheren Kapillardichte (Hara A. et al., 2004). Eine direkte Korrelation von Cox-2 mit VEGF im untersuchten Tumorgewebe konnten wir in unseren Modellen allerdings nicht finden (s.S. 46).

Der Weg über die Prostaglandine hin zu erhöhter Permeabilität und Stimulation von anderen angiogenen Mechanismen scheint wahrscheinlich (Abb.23(Gately S. und Li W.W., 2004)). Der stimulierende Effekt auf die Neovaskularisation durch die Cox-2 in verschiedenen

Tumorentitäten konnte mit Versuchen, in denen Cox-2-Inhibitoren therapeutisch genutzt wurden, bewiesen werden (Guo J.S. et al., 2002).

Der Einsatz der Cox-2-Hemmer wird deshalb in der Gliomtherapie von vielen Autoren befürwortet und könnte sich positiv auf die Therapie auswirken (Iniguez M.A. et al., 2003; Joki T. et al., 2000; Tuettenberg J. et al., 2004).

6.1.4 Rolle der Migration

Sollten Gliomangiogenese und Gliomzellinvasion tatsächlich assoziierte Prozesse sein, würde dies für den Einsatz anti-angiogener Therapiestrategien in der Behandlung maligner Gliome sprechen. Ein Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, der Beziehung zwischen Gliomangiogenese und Gliominvasion nachzugehen.

Wir konnten durch den Vergleich der humanen Gliomzelllinien SF188wt und SF188tr zeigen, dass wir in einem stärker vaskularisierten Tumor (SF188tr) auch stärker migrierende Zellen haben. SF188tr-Zellen zeigen in der RHK eine höhere Gefäßdichte (s.S. 46) und im Migrationsassay *in vitro* ein schnelleres Auflösen des Sphäroids (s.S. 44).

Andere Autoren halten Migration und Proliferation für zwei getrennte Vorgänge, von der die Tumorzelle nur eins von beiden zur gleichen Zeit vollbringt. Entweder proliferieren oder migrieren Tumorzellen, sogenanntes go-or-grow.

Der Einfluss der Cox-2 auf die Prostaglandinsynthese führt in entzündlichen Geweben zu einer Lockerung des Zellverbundes und der extrazellulären Matrix, so dass es zu einer Ödembildung kommt. Damit sind durch die höhere Cox-2-Expression bessere Möglichkeiten zur Migration der Tumorzellen gegeben.

6.2 Temozolomid in der Gliomtherapie

In der älteren Leitlinie „Maligne Gliome“ der Deutschen Gesellschaft für Neurologie vom Juni 2004 wird der Chemotherapie in der Gliomtherapie nur ein geringer Stellenwert beigemessen. Dies rührt daher, dass die rein astrozytären Tumoren meist nicht sehr chemosensitiv sind. Der Einsatz der Chemotherapie als Primärtherapie wird kontrovers diskutiert, da die Datengrundlage hier nicht ausreicht, eine ausreichende therapeutische Wirksamkeit zu dokumentieren. Deshalb ist die Chemotherapie bei diesen Tumoren bis heute nicht etabliert.

Mittlerweile wird der Einsatz von TMZ in der Primärtherapie maligner Gliome in einigen Tumorzentren vor allem dann erwogen, wenn es sich um jüngere Patienten (< 65 Jahre) mit gutem Karnofsky-Index (> 70) handelt. Der Behandlungsplan folgt hierbei der Studie von (Yung W.K. et al., 2000).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen spiegeln den positiven Effekt von TMZ wider. Auch hier hatte Temozolomid einen starken zytostatischen Effekt (s.S. 49) und reduzierte das Tumolvolumen deutlich.

Aufgrund dieser Befunde kann zu einer Chemotherapie für die Behandlung maligner Gliome mit Temozolomid geraten werden, da die Progression des Tumors im Vergleich zu anderen Therapieformen stärker vermindert wird und des Weiteren eine Steigerung in der Lebensqualität der Patienten aufgrund oraler Selbstmedikation und geringerer Nebenwirkungen zu beobachten ist (Carpentier A.F., 2005; Stupp R. et al., 2002; Stupp R. et al., 2005). TMZ wurde 2008 in die derzeit gültige Leitlinie zur Glioblastom-Behandlung aufgenommen (Stupp R. et al., 2010).

6.3 TMZ in der low-dose bzw. metronomischen Therapie

Die metronomische Therapie basiert auf einem anti-angiogenen Ansatz (Gasparini G., 2001; Kerbel R.S., 1997; Kerbel R.S. und Kamen B.A., 2004). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit von TMZ gegen endotheliale Zellen sowie gegen den Aufbau eines Gefäßnetzwerkes untersucht. So konnte eine Verringerung der Proliferation von Endothelzellen bei einer Therapie mit TMZ gefunden werden. Eine starke Abnahme (LD 50) der Proliferation von HUVEC's war bereits bei etwa 10% der TMZ-Standard-Dosis zu erkennen. Eine Reduktion der Endothelzellproliferation konnte mittels Immunhistochemie sowohl bei Low-Dose Therapie als auch bei High-Dose Therapie *in vivo* mit beiden Tumormodellen (s.c. und RHK) festgestellt werden (s.S. 47). Wobei für das s.c.-Modell nur die SF188wt Zellen zur Verfügung standen, da nur diese Zellen einen soliden s.c.-Tumor entwickelten.

Diese Ergebnisse entsprechen auch Befunden von der Arbeitsgruppe um H. (Kurzen H. et al., 2003) die mittels Chorioallantois-Membran-Assay beim bebrüteten Hühnerei (CAM-Essay) gezeigt haben, dass eine Hemmung der Angiogenese bei Behandlung mit TMZ bereits bei Konzentrationen von 5µM einsetzt. Für eine anti-angiogene, metronomische Therapie wird von ihnen beim Menschen die orale Applikation von 20 mg/m² TMZ alle acht Stunden empfohlen (Kurzen H. et al., 2003).

Unsere *in*

zeigten allerdings keine signifikante Reduzierung der Tumorgefäßdichte mit der von uns gewählten Low-Dose-Therapiedosis von nur 10% der üblichen High-Dose-Standardtherapiedosis. Als Grund dafür ist wahrscheinlich eine zu geringe TMZ-Konzentration im Tumorgebiet anzunehmen.

Studien mit Dosierungen von 75mg/m² TMZ (entspricht ca. 37% der High-Dose-Therapie) über 6-7 Wochen mit zusätzlicher Radiotherapie und anschließenden 3 Zyklen High-Dose-

Therapie werden von der European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) untersucht (<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/EORTC-26041>) (Stupp R. et al., 2005).

Auch in klinischen Phase 1-Untersuchungen, bei denen TMZ oral in Konzentrationen von 50-100 mg/m²/Tag über 7 Wochen verwendet wurden, konnte die Gabe von TMZ auf das über Zweifache an Wirkdosis im Behandlungszeitraum gegenüber der Standard-Therapie gesteigert werden (Brock C.S. et al., 1998).

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die Resistenzentwicklung bei malignen Gliomen mit der metronomischen TMZ-Therapie anders verläuft als bei der High-Dose-Therapie.

Hierzu gibt es einige Untersuchungen, die sich mit der Reduzierung des Resistenzzyms MGMT befassen haben. (Tolcher A.W. et al., 2003) beschreiben, dass eine längere kontinuierliche Einnahme von TMZ, selbst in geringen Dosen, zu einer signifikanten Aktivitätsminderung des MGMT führt. Zu erklären wäre dies mit der Methylierung der Promoter-Region von MGMT, wie sie (Esteller M. et al., 2000) beschreiben. Auch Stupp et al. (2005) konnten bei Patienten mit methylierten MGMT ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit TMZ beobachten (Hegi M.E. et al., 2005). Jedoch ist diese Methylierung des MGMT-Gens nicht immer auf die TMZ-Therapie zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit führte die kontinuierliche Exposition gegenüber TMZ in vitro zu einer vermehrten Bildung von MGMT (s.S. 39).

Daher ist es notwendig, die Low-Dose-Therapie mittels TMZ noch weiter zu optimieren, gegebenenfalls auch durch Kombination mit Cox-2 Hemmern.

6.4 Tumormodelle

6.4.1 Subkutanes Tumormodell

Das subkutane Tumormodell in athymische Mäusen ist ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Tumorzelllinien. Durch das vom zellulären Immunsystem der Mäuse weitgehend unbeeinflusste Wachstum ist die Erstellung von Wachstumskurven gut möglich.

Jedoch sind die Voraussetzungen für ein Wachstum im Unterhautgewebe natürlich nicht mit denen des orthotrophen Gewebes im Gehirn vergleichbar. Die extrazelluläre Matrix ist in der Unterhaut viel stärker entwickelt und eine schnelle Neovaskularisation ist daher entscheidend für das Anwachsen der Tumoren.

In den durchgeführten Untersuchungen sind die SF188tr-Tumorzellen in diesem subkutanen Modell jedoch nicht angewachsen und haben keinen soliden Tumor entwickelt.

Ausgehend von den Erkenntnissen unserer molekulargenetischen Untersuchungen fällt dabei die geringere Expression des Angiogenesefaktors VEGF in den SF188tr gegenüber den SF188wt auf. VEGF ist in diesem subkutanen Modell vielleicht der entscheidende Angiogenesefaktor, der den SF188wt eine schnelle Gefäßneubildung und daher ein Anwachsen ermöglicht, den Sf188tr wegen der nur geringen Expression dieses Angiogenesefaktors hingegen nicht.

Die Untersuchung der Wirksamkeit der verschiedenen Therapieschemata kann deshalb nur innerhalb jeder einzelnen Tumorzelllinie verglichen werden, da nur hier annähernd die Gleichmäßigkeit im Wachstum gegeben ist.

Gezeigt werden konnte, dass das Tumorstadium bei der High-Dose-Therapie mittels TMZ in Form einer Wachstumshemmung beeinflusst wird. Leider war die Streuung in diesen Untersuchungen sehr groß, so dass keine Signifikanzen nachgewiesen werden konnten.

6.4.2 Tumormodell der RHK

Das Rückenhautkammermodell eignet sich hingegen sehr gut für die Untersuchung der Tumorangiogenese (Lehr H.A. et al., 1993). Durch die mikrochirurgische Präparation werden die Tumorzellen direkt auf die Unterhautgefäße implantiert, so dass hier eine Trennschicht zwischen den Tumorzellen und dem Wirtsgefäßsystem vorhanden ist. Die Wachstumsbedingungen sind daher ähnlich einem Primärtumorherd oder bei einer Metastasierung und die Gefäßneubildung kann vor Ort direkt beobachtet werden.

Als negativ kann man anführen, dass es sich bei der RHK nicht um ein orthotrophes Modell handelt. Die Entwicklung im Stammgewebe kann somit nur eingeschränkt beschrieben werden. Gerade bei Tumoren aus dem Hirngewebe ist deren Untersuchung in der Rückenhautkammer wegen der hier fehlenden Blut-Hirnschranke und wegen des Fehlens des Schädels als Wachstumsgrenze nur begrenzt möglich, weil damit in diesem Tumormodell nicht zu unterschätzende physiologische Parameter fehlen, die Wachstum, Migration und Gefäßneubildung von Tumoren aus dem Gehirn beeinflussen können.

7 Schlussfolgerung

Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse im Mäusemodell ist Temozolomid für die Therapie des malignen Glioms beim Menschen zu empfehlen. Seit Oktober 2005 ist es für die first-line Therapie des malignen Glioms zugelassen (Stupp R. und Warren P., 2005).

Wir konnten zeigen, dass die low-dose Therapie zwar eine Reduzierung des Gefäßnetzwerks bei unseren experimentellen Tumoren mit SF188 Zellen bringt, die anti-angiogene Wirksamkeit war im untersuchten Zeitraum allerdings in der Standardtherapie besser.

Ursächlich dürfte hierfür eine zu geringe Dosis von nur 10% der MTD bei der metronomischen Chemotherapie in Frage kommen. Deshalb sollte in weiterführenden Untersuchungen mit einer etwas höheren Dosis von 25% -40% der MTD gearbeitet werden. Hierzu gibt es Untersuchungen mit täglich 75mg/m² Körperoberfläche, die vielversprechend sind (Lanzetta G. et al., 2003). Dies entspricht ca. 37% der MTD bzw. der Dosis des Standardregimes.

Therapieschemata mit niedrigdosierter, kontinuierlicher Applikation von TMZ zeigen nach Literaturangaben Wirksamkeit auf die Tumorangiogenese (Kurzen H. et al., 2003). Gerade in Bezug auf die Hemmung von MGMT als Resistenzzym kann durch die Methylierung des MGMT ein positiver Nutzen für die Chemotherapie entstehen (Hegi M.E. et al., 2005).

Durch Kombination der Therapie mit Cox-2-Hemmern ist eine Verminderung der Endothelzellproliferation und Migration offenbar möglich (Kurznel F. et al., 2002; New P., 2004; Tuettenberg J. et al., 2004; van Niftherik K.A. et al., 2011).

8 Zusammenfassung

Maligne Gliale Tumoren sind beim Menschen mit ca. 60 % die häufigsten cerebralen Neoplasien und wegen ihres infiltratives Wachstum prognostisch sehr ungünstig. Nach chirurgischer Resektion und Strahlentherapie liegt die mittlere Überlebenszeit der Patienten nach Diagnosestellung noch immer unter einem Jahr. Durch eine Chemotherapie wird eine Verbesserung des Therapieerfolges erhofft.

Die metronomische Chemotherapie möchte mit kontinuierlicher, dosisreduzierter Gabe eines Chemotherapeutikums (meist 1/10 bis 1/3 der Maximal Tolarierbaren Dosis (MTD) möglichst die Gefäßversorgung des Tumors inhibieren und dadurch eine Progression der Erkrankung verhindern. Gerade bei rezidivierenden chemoresistenten Tumoren ist es eine Therapieoption, mittels metronomischer Chemotherapie die Gefäßneubildung (Angiogenese) zu stören oder zu verhindern (Kerbel R.S. und Kamen B.A., 2004).

Das Alkylans Temozolomid (TMZ) ist seit 1999 in Deutschland zur Behandlung des anaplastischen Astrozytoms sowie des Glioblastoma multiforme nach dem zyklischen Therapieschema mit einer Dosis von 200 mg/m² über 5 Tage in einem 28 Tage-Zyklus als Standardtherapie zugelassen (Schema nach Young et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde die Angiogenese von experimentellen Tumoren aus Gliomzellen mittels des Rückenhautkammermodells in Mäusen untersucht (Lehr H.A. et al., 1993). Dabei wurde die Gliomzelllinien SF188wt (wildtyp) und die TMZ-resistente SF188tr (tr für TMZ resistant) verwendet (Ma J. et al., 2002), deren Veränderungen in Wachstumsverhalten und Chemosensitivität geprüft wurden. Verglichen wurde der Therapieeffekt von TMZ auf das Wachstum und die Gefäßsystementwicklung dieser implantierten Tumorzellen bei Standard- und metronomische Chemotherapie sowie molekulare Faktoren, die Angiogenese und Resistenz beeinflussen. Desweiteren wurde die Migration der Gliomzelllinien SF188 und SF188tr anhand von Zellsphäroiden verglichen.

Es zeigte sich, dass in Tumoren der resistenten Zelllinie SF188tr die Gefäßdichte um etwa 30% erhöht ist. Die Therapie mit TMZ führte in Tumoren beider Zelllinien zu einem Rückgang der Gefäßdichte. Die Standardtherapie war im untersuchten Zeitraum hierbei effektiver. Die TMZ resistente SF188tr Gliomzelllinie wies im Vergleich zur SF188 eine verminderte Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und eine erhöhte Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Expression auf. Das Resistenzenzym O⁶-methylguaninemethyltransferase (MGMT) war in SF188tr Zellen erhöht. Beim Vergleich der Migration

waren die SF188tr Zellen deutlich motiler als SF188wt Zellen. Sphäroide von SF188tr Zellen lösten sich schnell in Einzelzellen auf.

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass TMZ die Gefäßdichte in unseren experimentellen Tumoren verminderte. Die höhere Gefäßdichte bei Rezidivtumoren könnte chemoresistente Zellen empfindlicher für einen anti-angiogenen Ansatz mittels metronomischer Chemotherapie machen. Weiterführende Untersuchungen sollten mit einer erhöhten TMZ-Dosierung (von ca. 25% -30% der MTD) durchgeführt werden oder in Verbindung mit selektiven Cox-2 Hemmern. Eine Reduzierung der Migration durch selektive Cox-2 Hemmer wäre möglich (Kurzelt F. et al., 2002).

8.1 Summary

Malignant glial tumors are the most frequent tumors in humans and account for about 60 % of cerebral neoplasms. Due to their infiltrating growth their prognosis is highly unfavourable. After surgical resection and radiation therapy patients' median survival time after diagnosis is still less than one year. It is hoped that chemotherapy will improve the therapy outcome.

Metronomic chemotherapy aims at inhibiting the supply of the tumor by continuously administering a chemotherapeutic agent (mostly 1/10 to 1/3 of the maximum tolerated dose (MTD)), thus stopping the progression of the disease. In particular in case of recurring, chemotherapy-resistant tumors this is a treatment option to disturb or prevent vascularisation (angiogenesis) using metronomic chemotherapy (Kerbel R.S. und Kamen B.A., 2004).

The alkylating agent Temozolomide (TMZ) has been approved in Germany since 1999 as standard therapy to treat anaplastic astrocytomas as well as glioblastoma multiforme according to the cyclic therapy regimen at a dose of 200 mg/m² over 5 days in a 28 day cycle (regimen according to Young et al., 2000).

In this study the angiogenesis of experimental tumors from glioma cells was studied by means of dorsal skinfoldchamber models in mice (Lehr H.A. et al., 1993). Glioma cell lines SF188 and TMZ-resistant SF188tr (tr for TMZ resistant) were used (Ma J. et al., 2002) whose change in chemosensitivity and growth behavior were verified. The therapeutic effect of TMZ on the growth and development of the vessel systems of these implanted tumor cells was compared in standard- and metronomic chemotherapy, as well as molecular factors which influence angiogenesis and resistance. Furthermore, the migration of the glioma cell lines SF188 and SF188tr was compared using cell spheroids.

It could be shown that the vessel density in tumors of the resistant cell line SF188tr is about 30% higher. TMZ therapy leads to a decrease in vessel density in the tumors of both cell lines. Standard therapy was more effective during the study period. The TMZ resistant SF188tr glioma cell line showed a reduced vascular endothelial growth factor (VEGF) as well as an increased cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression. The resistance enzyme O⁶-methylguanine- methyltransferase (MGMT) was higher in SF188tr cells. When comparing the migration SF188tr cells were much more motile than SF188. Spheroids of SF188tr cells dissolved very fast.

The present results suggest that TMZ decreases the vascular density in our experimental tumors. The higher vascular density in recurrent tumors could make chemoresistant cells more sensitive for an anti-angiogenic approach using metronomic chemotherapy. Further studies should be performed with a higher dosage of TMZ (approximately 25 % - 30% of the MTD) or in combination with selective cox-2 inhibitors. A reduction in migration by selective cox-2 inhibitors could be possible (Kurzel F. et al., 2002; Tuettenberg J. et al., 2004).

9 Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AGT	Alkylguanin-Alkyltransferase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATase	Alkylguanin-Alkyltransferase
BAD	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
Bax	Protein aus der Bcl-2 Familie
BCIP	Bromo-chloro-indolylphosphat
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Cox-2	Cyclooxygenase 2
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DFG	Deutsche Forschungs-Gemeinschaft
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälber Serum
H ₂ O	Wasser
i.cr.	intrakranial
i.p.	intraperitoneal
Lsg.	Lösung
MDR	Multi-Drug-Resistance
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-Methyltransferase
min.	Minuten
ml	Milliliter
MMR	mismatchrepair
MTD	Maximal tolerierte Dosis
MTT	Methyl-Thiazol-Tetrazolium
NBT	Nitro-blau-tetrazoliumchlorid
NFDM	Non-Fat-Dry-Milk
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen.	Penicillin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
rpm	rounds per minute
s.c.	subkutan
sek.	Sekunden
SPF	spezifisch pathogenfrei

Strep.	Streptomycin
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMZ	Temozolomid
Tween	Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate

10 Referenzen

(Fda) U. S. F. a. D. A.(2004)

Behin A., Hoang-Xuan K., Carpentier A. F. und Delattre J. Y.: Primary brain tumours in adults. Lancet. **361**: 323-31.(2003)

Berens M. E., Rutka J. T. und Rosenblum M. L.: Brain tumor epidemiology, growth, and invasion. Neurosurg Clin N Am. **1**: 1-18.(1990)

Brock C. S., Newlands E. S., Wedge S. R., Bower M., Evans H., Colquhoun I., Roddie M., Glaser M., Brampton M. H. und Rustin G. J.: Phase I trial of temozolomide using an extended continuous oral schedule. Cancer Res. **58**: 4363-7.(1998)

Brockmann M. A., Ulbricht U., Gruner K., Fillbrandt R., Westphal M. und Lamszus K.: Glioblastoma and cerebral microvascular endothelial cell migration in response to tumor-associated growth factors. Neurosurgery. **52**: 1391-9; discussion 1399.(2003)

Carmeliet P. und Jain R. K.: Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature. **407**: 249-57.(2000)

Carpentier A. F.: Neuro-oncology: the growing role of chemotherapy in glioma. The Lancet Neurology. **4**: 4-5.(2005)

Chen Z., Htay A., Dos Santos W., Gillies G. T., Fillmore H. L., Sholley M. M. und Broaddus W. C.: In vitro angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by three-dimensional co-culture with glioblastoma cells. J Neurooncol. **92**: 121-8. Epub 2008 Nov 28.(2009)

Conway E. M., Collen D. und Carmeliet P.: Molecular mechanisms of blood vessel growth. Cardiovasc Res. **49**: 507-21.(2001)

Danson S. J. und Middleton M. R.: Temozolomide: a novel oral alkylating agent. Expert Rev Anticancer Ther. **1**: 13-9.(2001)

Darkes M., Posker G. und Jarvis B.: Temozolomide; A Review of its Use in the treatment of Malignant Gliomas, Malignant Melanoma and other advanced Cancers. American Journal of Cancer. **1**: 55-80.(2002)

Daumas-Duport C., Scheithauer B., O'fallon J. und Kelly P.: Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. Cancer. **62**: 2152-65.(1988)

Dempke W., Rie C., Grothey A. und Schmoll H. J.: Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? J Cancer Res Clin Oncol. **127**: 411-7.(2001)

Dresemann G.: Temozolomide in malignant glioma. Onco Targets Ther. **3**: 139-46.(2010)

Ellis L. M.: Tumor Angiogenesis. Horizons in Cancer Therapeutics: From Bench to Bedside. **3**: 4-19.(2002)

Esteller M., Garcia-Foncillas J., Andion E., Goodman S. N., Hidalgo O. F., Vanaclocha V., Baylin S. B. und Herman J. G.: Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of. N Engl J Med. **343**: 1350-4.(2000)

Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. Recent Prog Horm Res. **55**: 15-35; discussion 35-6.(2000)

Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. Oncologist. **9**: 2-10.(2004)

Ferrara N.: The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. Exs.: 209-31.(2005)

Folkman J.: Angiogenesis research: from laboratory to clinic. Forum (Genova). **9**: 59-62.(1999)

- Folkman J.: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol. **29**: 15-8.(2002)
- Folkman J.: Angiogenesis and apoptosis. Semin Cancer Biol. **13**: 159-67.(2003)
- Friedman H. S., Kerby T. und Calvert H.: Temozolomide and treatment of malignant glioma. Clin Cancer Res. **6**: 2585-97.(2000)
- Gasparini G.: Metronomic scheduling: the future of chemotherapy? Lancet Oncol. **2**: 733-40.(2001)
- Gately S. und Kerbel R.: Therapeutic potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in the management of tumor angiogenesis. Prog Exp Tumor Res. **37**: 179-92.(2003)
- Gately S. und Li W. W.: Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. Semin Oncol. **31**: 2-11.(2004)
- Gerson S. L.: Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. J Clin Oncol. **20**: 2388-99.(2002)
- Giglio P. und Levin V.: Cyclooxygenase-2 inhibitors in glioma therapy. Am J Ther. **11**: 141-3.(2004)
- Guo J. S., Cho C. H., Lam Liu E. S., Choy H. T., Wang J. Y. und Leung Koo M. W.: Antiangiogenic effect of a highly selective cyclooxygenase-2 inhibitor on gastric ulcer healing in rats. Toxicol Appl Pharmacol. **183**: 41-5.(2002)
- Hara A. und Okayasu I.: Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. Acta Neuropathol (Berl). **108**: 43-8.(2004)
- Hegi M. E., Diserens A. C., Gorlia T., Hamou M. F., De Tribolet N., Weller M., Kros J. M., Hainfellner J. A., Mason W., Mariani L., Bromberg J. E., Hau P., Mirimanoff R. O., Cairncross J. G., Janzer R. C. und Stupp R.: MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med. **352**: 997-1003.(2005)
- Hofer S., Roelcke U. und Herrmann R.: Neue Aspekte der interdisziplinären Therapie maligner Gliome des Erwachsenenalters. Schweiz Med Wochenschr. **129**: 1332-41.(1999)
- Hofer S., Merlob, A.: Therapeutische Optionen für maligne Gliome WHO-Grad III und IV. Schweiz Med Forum. **32**: 748.(2002)
- Iniguez M. A., Rodriguez A., Volpert O. V., Fresno M. und Redondo J. M.: Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. Trends Mol Med. **9**: 73-8.(2003)
- Jaffe E. A., Nachman R. L., Becker C. G. und Minick C. R.: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest. **52**: 2745-56.(1973)
- Joki T., Heese O., Nikas D. C., Bello L., Zhang J., Kraeft S. K., Seyfried N. T., Abe T., Chen L. B., Carroll R. S. und Black P. M.: Expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in human glioma and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. Cancer Res. **60**: 4926-31.(2000)
- Jung S., Kim H. W., Lee J. H., Kang S. S., Rhu H. H., Jeong Y. I., Yang S. Y., Chung H. Y., Bae C. S., Choi C., Shin B. A., Kim K. K. und Ahn K. Y.: Brain tumor invasion model system using organotypic brain-slice culture as an alternative to in vivo model. J Cancer Res Clin Oncol. **128**: 469-76.(2002)
- Kerbel R. S.: A cancer therapy resistant to resistance. Nature. **390**: 335-6.(1997)
- Kerbel R. S., Klement G., Pritchard K. I. und Kamen B.: Continuous low-dose anti-angiogenic/ metronomic chemotherapy: from the research laboratory into the oncology clinic. Ann Oncol. **13**: 12-5.(2002)
- Kerbel R. S. und Kamen B. A.: The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. Nat Rev Cancer. **4**: 423-36.(2004)
- Kokkinakis D. M., Bocangel D. B., Schold S. C., Moschel R. C. und Pegg A. E.: Thresholds of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase which confer significant resistance of human glial tumor xenografts to treatment with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea or temozolomide. Clin Cancer Res. **7**: 421-8.(2001)

- Kurzel F., Hagel C., Zapf S., Meissner H., Westphal M. und Giese A.: Cyclo-oxygenase inhibitors and thromboxane synthase inhibitors differentially regulate migration arrest, growth inhibition and apoptosis in human glioma cells. Acta Neurochir (Wien). **144**: 71-87.(2002)
- Kurzen H., Schmitt S., Naher H. und Mohler T.: Inhibition of angiogenesis by non-toxic doses of temozolomide. Anticancer Drugs. **14**: 515-22.(2003)
- Lamszus K., Schmidt N. O., Jin L., Laterra J., Zagzag D., Way D., Witte M., Weinand M., Goldberg I. D., Westphal M. und Rosen E. M.: Scatter factor promotes motility of human glioma and neuromicrovascular endothelial cells. Int J Cancer. **75**: 19-28.(1998)
- Lanzetta G., Campanella C., Rozzi A., Nappa M., Costa A., Fedele F., Innocenzi G., Gagliardi F. M., Salvati M., Minniti G., Frati A., Frati L. und Vecchione A.: Temozolomide in radio-chemotherapy combined treatment for newly-diagnosed glioblastoma multiforme: phase II clinical trial. Anticancer Res. **23**: 5159-64.(2003)
- Lehr H. A., Leunig M., Menger M. D., Nolte D. und Messmer K.: Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. Am J Pathol. **143**: 1055-62.(1993)
- Leon S. P., Folkerth R. D. und Black P. M.: Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. Cancer. **77**: 362-72.(1996)
- Lin J. C. und Jan J. S.: Postoperative radiotherapy for glioblastoma multiforme. Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei). **50**: 454-62.(1992)
- Ma J., Murphy M., O'dwyer P. J., Berman E., Reed K. und Gallo J. M.: Biochemical changes associated with a multidrug-resistant phenotype of a human glioma cell line with temozolomide-acquired resistance. Biochem Pharmacol. **63**: 1219-28.(2002)
- Mentlein R. und Held-Feindt J.: Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumour therapy? Naturwissenschaften. **90**: 385-94. Epub 2003 Jul 29.(2003)
- Nam D. H., Park K., Park C., Im Y. H., Kim M. H., Lee S., Hong S. C., Shin H. J., Kim J. H., Eoh W. und McDonnell T. J.: Intracranial inhibition of glioma cell growth by cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. Oncol Rep. **11**: 263-8.(2004)
- Nederman T., Norling B., Glimelius B., Carlsson J. und Brunk U.: Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. Cancer Res. **44**: 3090-7.(1984)
- New P.: Cyclooxygenase in the treatment of glioma: its complex role in signal transduction. Cancer Control. **11**: 152-64.(2004)
- Prescott S. M.: Is cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in cancer? J Clin Invest. **105**: 1511-3.(2000)
- Quant E. C., Drappatz J., Wen P. Y. und Norden A. D.: Recurrent high-grade glioma. Curr Treat Options Neurol. **12**: 321-33.(2010)
- Ring A.: Untersuchungen zur Neovaskularisation und Degradation synthetischer PEGT/PBT-Block-Kopolymermatrizen nach Implantation in die transparente Rückenhautkammer von Balb/c-Mäusen. Fakultät für Medizin, Ruhr-Universität Bochum,.(2004)
- Shono T., Tofilon P. J., Bruner J. M., Owolabi O. und Lang F. F.: Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. Cancer Res. **61**: 4375-81.(2001)
- Soroceanu L., Manning T. J., Jr. und Sontheimer H.: Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl(-) and K(+) ion channel blockers. J Neurosci. **19**: 5942-54.(1999)
- Stupp R., Dietrich P. Y., Ostermann Kraljevic S., Pica A., Maillard I., Maeder P., Meuli R., Janzer R., Pizzolato G., Miralbell R., Porchet F., Regli L., De Tribolet N., Mirimanoff R. O. und Leyvraz S.: Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. J Clin Oncol. **20**: 1375-82.(2002)

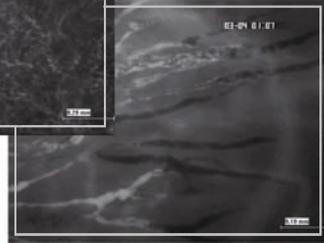
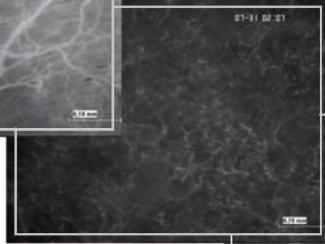
- Stupp R., Van Den Bent M. J. und Hegi M. E.: Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. Curr Neurol Neurosci Rep. **5**: 198-206.(2005)
- Stupp R. und Warren P.: Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. N Engl J Med. **352**: 987-996.(2005)
- Stupp R., Tonn J. C., Brada M. und Pentheroudakis G.: High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. **21 Suppl 5**: v190-3.(2010)
- Tentori L., Leonetti C., Scarsella M., D'amati G., Vergati M., Portarena I., Xu W., Kalish V., Zupi G., Zhang J. und Graziani G.: Systemic administration of GPI 15427, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, increases the antitumor activity of temozolomide against intracranial melanoma, glioma, lymphoma. Clin Cancer Res. **9**: 5370-9.(2003)
- Tolcher A. W., Gerson S. L., Denis L., Geyer C., Hammond L. A., Patnaik A., Goetz A. D., Schwartz G., Edwards T., Reyderman L., Statkevich P., Cutler D. L. und Rowinsky E. K.: Marked inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity with protracted temozolomide schedules. Br J Cancer. **88**: 1004-11.(2003)
- Tuettenberg J., Grobholz R., Korn T., Wenz F., Erber R. und Vajkoczy P.: Continuous low-dose chemotherapy plus inhibition of cyclooxygenase-2 as an antiangiogenic therapy of glioblastoma multiforme. J Cancer Res Clin Oncol. (2004)
- Vajkoczy P., Ullrich A., Menger M. D., Goldbrunner R., Ge S., Fong T. A., Vollmar B., Schilling L., Hirth K. P., Tonn J. C., Schmiedek P., Rempel S. A., Farhadi M. und Vince G.: Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation
Targeting angiogenesis inhibits tumor infiltration and expression of the pro-invasive protein SPARC
Glioma cell migration is associated with glioma-induced angiogenesis in vivo
New model for the study of the microcirculation of islet grafts in hairless and nude mice. Neoplasia. **2**: 53-61.(2000)
- Van Nifterik K. A., Van Den Berg J., Slotman B. J. und Van Rijn J.: Anti-tumour effects by a trimodal combination of temozolomide, meloxicam and X-rays in cultures of human glioma cells. Int J Radiat Biol. **87**: 192-201.(2011)
- Yung W. K.: Temozolomide in malignant gliomas. Semin Oncol. **27**: 27-34.(2000)
- Yung W. K., Albright R. E., Olson J., Fredericks R., Fink K., Prados M. D., Brada M., Spence A., Hohl R. J., Shapiro W., Glantz M., Greenberg H., Selker R. G., Vick N. A., Rampling R., Friedman H., Phillips P., Bruner J., Yue N., Osoba D., Zaknoen S. und Levin V. A.: A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. Br J Cancer. **83**: 588-93.(2000)
- Zhang J., Stevens M. F. und Bradshaw T. D.: Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. Curr Mol Pharmacol. **5**: 102-14.(2012)

11 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter Vajkoczy für die Überlassung dieses interessanten Themas. Die Arbeit fand im Rahmen des SPP 1190 der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) statt.

Herrn Prof. Dr. Eberhard Burkhardt danke ich für die Vertretung im Fachbereich und die große Hilfe bei den Korrekturen. Herrn Dr. Ralf Erber und Dr. Axel Hohenstein danke ich für die Einführungen und Hilfen bei molekularbiologischen Methoden sowie Ihrer Diskussionsbereitschaft. Herrn Prof. Dr. Lothar Schilling danke ich für die Nutzung des Labors und Arbeitsplatzes. Frau Sandra Mohr, Violetta Powajbo und Nina Weinzierl danke ich für die Unterstützung im Labor und Tierhaus.

Dank gilt auch meiner Familie für die seelische und moralische Unterstützung.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6044-2



9 783835 196044 2