

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K. Roosen

**Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors PTK 787/ ZK 222584
auf Vaskularisation und Wachstum
intracerebraler Gliome der Ratte**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Michael Kiderlen
aus Würzburg

Würzburg, Januar 2003

Inhalt

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1. | Tumoren des zentralen Nervensystems | 1 |
| 1.1.1. | Begriffsbestimmung und Epidemiologie | 1 |
| 1.1.2. | Die Gruppe der Astrozytome | 2 |
| 1.1.3. | Das Glioblastoma multiforme | 3 |
| 1.2. | Vaskularisation und Angiogenese | 6 |
| 1.2.1. | Mechanismus der Gefäßneubildung | 6 |
| 1.2.2. | Die VEGF-Familie und ihre Rezeptoren | 9 |
| 1.2.3. | Inhibition der VEGF-Rezeptors – PTK 787 | 11 |
| 1.3. | Das Sphäroidmodell | 12 |
| 1.4. | Zielsetzung | 14 |
| 2. | Geräte, Materialien und Chemikalien | 15 |
| 2.1. | Geräte und Laborhilfen | 15 |
| 2.2. | Verbrauchsmaterialien | 16 |
| 2.3. | Chemikalien | 16 |
| 2.4. | Antikörper und Reagenzien für die Immunhistochemie | 17 |
| 2.5. | Medikamente | 17 |
| 2.6. | Tyrosinkinaseinhibitor | 17 |
| 2.7. | Puffer und Lösungen | 18 |
| 2.8. | Reagentien für die Zellkultur | 18 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3. | Methoden | 20 |
| 3.1. | Zellbiologische Methoden..... | 20 |
| 3.1.1. | Monolayer-Zellkultur von C6 VEGF-sense transfizierten Gliomzellen | 20 |
| 3.1.2. | Einfrieren und Auftauen von Gliomzellen | 20 |
| 3.1.3 | Anlegen von Tumorsphäroiden | 21 |
| 3.1.4. | Beschichtung der Zellkulturflaschen und 24 Well Platten | 22 |
| 3.1.5. | Transfektion von C6-Zellen | 22 |
| 3.2. | Tierversuche | 23 |
| 3.2.1. | Implantation von Tumorsphäroiden | 23 |
| 3.2.2. | Applikation von PTK 787 | 23 |
| 3.2.3. | Kernspintomographie | 24 |
| 3.2.4. | Entnahme der Gewebeproben | 25 |
| 3.3. | Konventionelle Färbungen | 26 |
| 3.3.1. | Hämalaun-Eosin Färbung | 26 |
| 3.4. | Immunhistochemische Färbungen | 27 |
| 3.4.1. | VEGF-Protein und CD 31 Rezeptor mit Histostain® Kit | 27 |
| 3.4.2. | Apoptosefärbung mit <i>in situ</i> Cell Death Detection Kit AP Roche | 28 |
| 3.4.3. | PCNA Färbung | 28 |
| 3.5. | Quantifizierung der Gefäßdichte, des Apoptoseindex und der Proliferationsrate | 29 |
| 3.6. | Nekroseindex | 30 |
| 3.7. | Statistische Auswertung | 30 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4. | Ergebnisse | 31 |
| 4.1. | Sphäroidimplantation und PTK 787 Applikation | 31 |
| 4.2. | In vivo Gewebskonzentration von PTK 787 | 31 |
| 4.3. | Einfluss von PTK 787 auf die MR-Morphologie | 31 |
| 4.4. | Einfluss von PTK 787 auf die Tumervolumina | 33 |
| 4.5. | Einfluss von PTK 787 auf die Apoptoserate in den Tumoren | 34 |
| 4.6. | Einfluss von PTK 787 auf die Gefäßdichte in den Tumoren | 34 |
| 4.7. | Einfluss von PTK 787 auf die Zahl der proliferierenden Zellen | 36 |
| 4.8. | Einfluss von PTK 787 auf den Nekroseindex | 37 |
| 5. | Diskussion | 38 |
| 5.1. | Die Bedeutung von VEGF | 38 |
| 5.2. | Wirkungen von PTK 787 | 39 |
| 5.3. | Das Sphäroidmodell als <i>in vivo</i> Tumormodell | 40 |
| 5.4. | Möglichkeiten der anti-angiogenen Tumorthherapie | 42 |
| 5.5. | Klinischer Einsatz der anti-angiogenen Tumorthherapie - ein Ausblick | 45 |
| 6. | Zusammenfassung | 47 |
| 7. | Abkürzungsverzeichniss | 49 |
| 8. | Literaturverzeichniss | 51 |

Danksagung

Lebenslauf

Referent: Priv.-Doz. Dr. R. Goldbrunner

Koreferent: Prof. Dr. W. Roggendorf

Dekan: Prof. Dr. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2003

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern

1. Einleitung

1.1. Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS)

1.1.1. Begriffsbestimmung und Epidemiologie

Hirntumore kommen in allen Altersstufen vor und spielen klinisch eine wichtige Rolle, obwohl sie nur 2% aller menschlichen Tumoren repräsentieren. Besonders häufig sind Kinder betroffen, bei denen ZNS Neoplasien (einschließlich der Retinoblastome und der Neuroblastome des sympathischen Nervensystems) nach den Tumoren des lymphatischen Systems an zweiter Stelle stehen. Die Inzidenz intrakranieller Tumoren liegt in Europa bei 7 – 10 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr [KLEIHUES 1997a].

Hirntumoren entwickeln sich in allen Hirnarealen und aus fast allen Zellen (Ausnahme Mikroglia). Traditionell hinzugerechnet werden Tumoren, die von den Hirnhäuten ihren Ausgang nehmen. Die häufigsten Tumoren des ZNS sind Gliome, die von dem glialen Stützgewebe des Hirns ausgehen. Für die Neoplasien des ZNS gelten die klassischen Merkmale der Malignität (infiltrativ-destruierendes Wachstum und Metastasierung) nur eingeschränkt. Die Tumordinfiltration beschränkt sich normalerweise auf das Hirnparenchym; eine Infiltration benachbarter Strukturen wie Knochen oder Dura stellt die Ausnahme dar. Sehr selten ist die hämatogene Streuung in andere Organe, findet sie dennoch statt, ist ihr Einfluss auf die Prognose des Patienten gering. Im Gegensatz dazu ist eine Metastasierung über den Liquor cerebrospinalis bei z.B. Medulloblastomen häufig und klinisch von erheblicher Relevanz. [SCHWEITZER 2001]

Das Gliom, als häufigster Tumor des ZNS, leitet sich aus Astro -, Oligodendrozyten, Ependym- und Plexusepithelzellen oder allgemein der Neuroglia ab.

Gliazellen nehmen neben Stütz- und Ernährungsfunktionen auch Aufgaben in der Entwicklung, der Aufrechterhaltung der Signaltransduktion und dem Schutz der Neuronen wahr und sind somit für die Erhaltung und Lebensfähigkeit der Nervenzellen unerlässlich [JUNQUEIRA 1996]. Die Differenzierung der Gliazellen aus den zugehörigen

Stammzellen sowie die dafür notwendigen molekularen Faktoren sind z.Zt. Gegenstand umfangreicher Diskussion. [CALDWELL 2001]

1.1.2. Die Gruppe der Astrozytome

Astrozytome sind bei den Gliomen die am stärksten vertretene Gruppe und werden anhand ihrer Dignität in verschiedene Grade eingeteilt (Tab. 1).

| WHO-Grad | WHO Bezeichnung | Dignität | Histologie | Überlebenszeit (ca.- Angaben) |
|----------|----------------------------|---------------------------|--|-------------------------------|
| I | Pilozytisches Astrozytom | gutartig | bipolare, „piloide“ Zellen, Rosenthal-Fasern, eosinophile Körperchen, gut differenziertes Gewebe | > 5 (-50) Jahre |
| II | Astrozytom (niedriggradig) | niedriger Malignitätsgrad | einzelne Kernatypien, ansonsten gut differenziertes Gewebe | 5-8 Jahre |
| III | Anaplastisches Astrozytom | hoher Malignitätsgrad | Kernatypien, Mitosen | 2-5 Jahre |
| IV | Glioblastoma multiforme | hoher Malignitätsgrad | Kernatypien, Mitosen, Nekrosen und/ oder Gefäßproliferationen | 9 Monate |

(Tab. 1) Nach: Kleihues P, Caranee W: Tumors of the nervous system IARC Press, Lyon, 2000

Die Einteilung orientiert sich an morphologischen Merkmalen, wie Nekrose, endotheliale Proliferation und Anstieg der Zelldichte bzw. -teilungen. Mit dem WHO-Grad steigt die Malignität an.

Hochmaligne Tumoren können *de novo* entstehen oder im Rahmen einer Progression eines Astrozytoms niedrigerer Malignität erwachsen.

Das pilozytische Astrozytom ist ein langsam wachsender astrozytärer Tumor des Kindesalters mit bevorzugter Lokalisation in den Mittellinienstrukturen des Gehirns. Es

kann, wenn möglich, durch eine komplette chirurgische Resektion kurativ behandelt werden, und zeigt selten eine maligne Progression.

Das niedriggradige Astrozytom manifestiert sich bevorzugt bei jüngeren Erwachsenen mit einem Wachstumsgipfel zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr und besitzt noch eine geringe Wachstumstendenz. Allerdings infiltriert es benachbarte Strukturen, so dass eine biologisch vollständige Resektion nicht möglich ist.

Das anaplastische Astrozytom entwickelt sich häufig aus einem niedriggradigen Astrozytom. Es unterscheidet sich morphologisch im wesentlichen durch eine größere Zellteilungsaktivität, was sich klinisch durch ein rascheres Auftreten von Rezidiven zeigt [KLEIHUES 1997a].

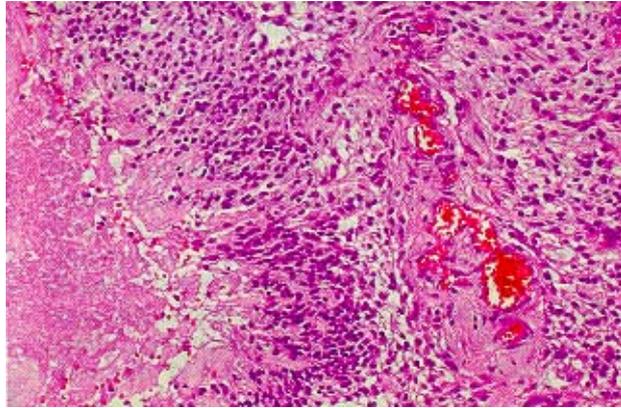
Im Gegensatz zum Glioblastome multiforme weisen anaplastischen Astrozytome allerdings kaum Gefäßproliferate oder Tumornekrosen auf.

1.1.3. Das Glioblastoma multiforme (GBM)

Das Glioblastom ist ein hochmaligner, glialer Tumor astrozytären Ursprungs, der sich bevorzugt im höheren Erwachsenenalter (50.- 60. Lebensjahr) manifestiert.

Das Glioblastom (WHO Grad IV) ist der häufigste astrozytäre Tumor und macht 15 – 20 % aller intrakranieller Tumoren aus. Das Glioblastom kann sich aus einem niedriggradigen Astrozytom entwickeln oder mit sehr kurzer klinischer Anamnese de novo entstehen. Die Großhirnhemisphären stellen den bevorzugten Lokalisationsort dar. Das GBM weist makroskopisch eine charakteristische und multiforme (!) Schnittfläche auf mit gelblichen Nekrosen, Blutungen und grau- weißem Tumorgewebe. Selbst bei mikroskopischer Betrachtung lässt sich der Tumor nicht klar vom umgebenden Gewebe abgrenzen. Neben strichförmigen Nekrosen und Einblutungen sind vor allem glomeruloide Gefäßproliferate durch tumoreigene Endothelzellen zu sehen. Weiterhin sind viele, mehrkernige Tumor-Riesenzellen und polymorph-ovaloid-spindelzellige Tumorzellen charakteristisch [RIEDE 1998].

Das GBM neigt sehr zu diffus infiltrativem Wachstum und breitet sich besonders rasch entlang kompakter Myelinbahnen aus. Einzelne Tumorzellen sind oft weit von der primären Läsion entfernt im gesunden Hirngewebe zu finden [HIRANO 1999]. Durch



(Abb. 1) Histologie eines GBM. Der Tumor ist zellreich, undifferenziert mit ausgeprägten Nekrosen (links) um die sich die Tumorzellen pallisadenartig anordnen. Typisch ist die Kapillarproliferation (rechts). (Aus: Kleihues 1997a)

rasches und infiltratives Wachstum kommt es häufig zur Ausdehnung über den Balken in die kontralaterale Hemisphäre, was zu typischen makroskopischen und neuroradiologischen Kriterien des bilateralen symmetrischen Glioblastoms führt (sog. Schmetterlingsgliom) [KLEIHUES 1997a].

Klinisch manifest werden Glioblastome durch Zeichen erhöhten intrakraniellen Druckes wie Kopfschmerzen, Sehstörungen, Übelkeit und Erbrechen. Weitere Symptome intrakranieller Raumforderungen können, in Abhängigkeit von der Lokalisation, fokale neurologische Symptome wie Hemianopsie, Hemiparese, Sprachstörungen etc. sein.

Neben der Vorgeschichte spielen bildgebende Verfahren wie die Kernspintomographie bei der Diagnostik des Glioblastoms eine entscheidende Rolle (Abb. 2). Hier ist eine im T1-gewichteten Bild signalhyperintense, heterogen Gadolinium aufnehmende Läsion mit ausgedehntem perifokalem Ödem im T2-gewichteten Bild nachweisbar [SCHLEGEL, 1998]

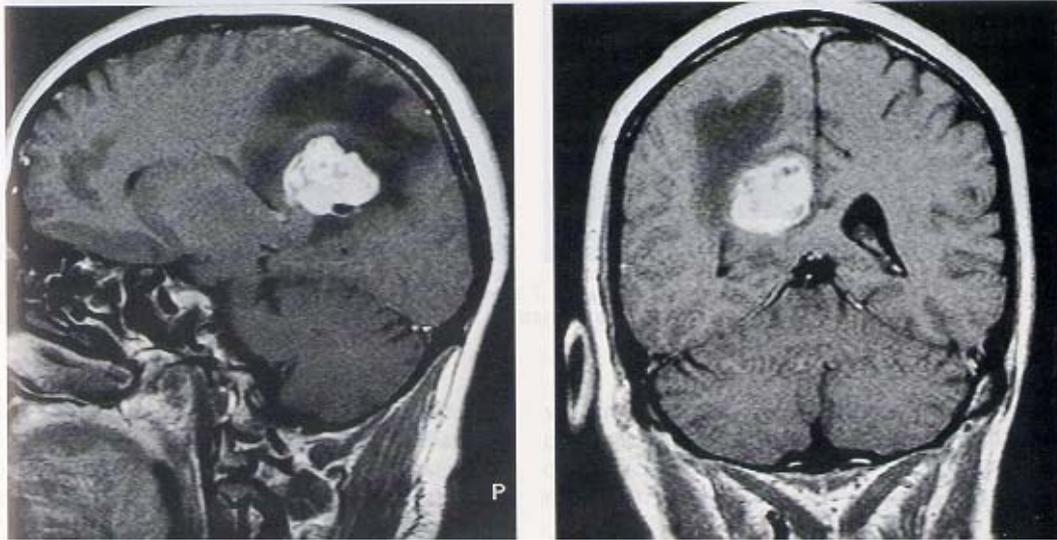


Abb. 2: GBM bei 48 jährigem Mann; inhomogener Tumor mit starker Kontrastmittelaufnahme und perifokalem Ödem. MRT in T1-Wichtung (aus Schlegel, Westphal 1998)

Die Standardtherapie besteht heute in möglichst vollständiger operativer Resektion des soliden Tumoranteils. Dies dient der Verkleinerung der Tumormasse zur Erleichterung der adjuvanten Therapie. Anhand des gewonnenen Tumorgewebes lässt sich eine exakte, histologische Einteilung vornehmen. Ist eine makroskopisch komplette Entfernung des Tumors möglich, so weist der Patient in diesem Fall eine wesentlich günstigere Prognose auf als Patienten bei denen der Tumor nur inkomplett entfernt werden kann.

Glioblastome weisen in kontrollierten Therapiestudien eine mittlere Überlebenszeit von ca. 9 Monaten auf. Eine Prognose, die in einem unselektiertem Patientengut mit unter 30 Wochen noch schlechter ausfällt [SCHLEGEL, 1998].

Anschließend wird eine lokale Bestrahlung mit 55 bis 60 Gy durchgeführt; die Chemotherapie wird allerdings wegen geringer Effektivität nur in besonderen Fällen zur Behandlung dieser Neoplasie herangezogen. Die zahlreichen neuen Ansätze in der Therapie des Glioblastoms wie z.B. die Gentherapie haben sich bisher als wenig effektiv erwiesen. Die Überlebenszeit der Glioblastom-Patienten hat sich in den letzten Jahren trotz großer Anstrengungen kaum erhöht [SALVATI 1998, STEINER 1998, WEN

1995]. Das ist gerade im Vergleich zu anderen Tumoren (z.B. Seminomen) ein sehr unbefriedigender Therapiefortschritt.

Zu den unterschiedlichen Faktoren, die für ein Tumorwachstum bedeutend sind, zählt die Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen aus dem Blut. Die hierfür benötigten Gefäße müssen neu gebildet werden. Dieser Punkt bei der Tumorentstehung und beim Tumorwachstum soll im folgenden näher beleuchtet werden.

1.2. Vaskularisation und Angiogenese

1.2.1. Mechanismus der Gefäßneubildung

Bei der Angiogenese werden neue Blutgefäße gleichsam durch Aussprossen aus bereits bestehenden Gefäßen gebildet. Im Gegensatz dazu bezeichnet die Vaskulogenese die *in situ* Differenzierung von mesodermalen Vorläuferzellen in Endothelzellen und deren Zusammenschluss zu einem primären Gefäßplexus. Es ist davon auszugehen, dass sich die Vaskulogenese auf die frühe Embryogenese beschränkt, während die Angiogenese sowohl bei der frühkindlichen Entwicklung als auch im späteren Leben eine Rolle spielt. Physiologisch tritt Angiogenese z.B. beim Wachstum der Endometriumschleimhaut, bei Muskelhypertrophie, bei der Heilung von Knochenbrüchen oder bei der Reorganisation von Thromben auf. Die Angiogenese wird durch ein Zusammenspiel von pro- und anti-angiogenen Substanzen reguliert. Wird ein vorhandener angiogener Stimulus gestoppt, weil z.B. ein Heilungsprozess abgeschlossen ist, so werden auch die dafür gebildeten Gefäße wieder abgebaut. Es besteht heute ein breiter Konsens darüber, dass die Angiogenese abgeschaltet ist, solange ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Substanzen besteht. Verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der angiogenen Substanzen, so ist die Angiogenese aktiviert. Sie wird besonders durch metabolischen Stress angekurbelt wie z.B. niedrigen pO_2 , niedrigen pH-Wert oder Hypoglykämie, die ihrerseits aus erhöhtem metabolischen Bedarf oder chronischer Minderperfusion resultieren [PEPPER 1996]. Die Entwicklung und der Erhalt einer ausreichenden Vaskularisation sind für gesundes, aber auch für neoplastisches Gewebe sehr wichtig. Wird ein Tumor nicht von Kapillaren durchzogen, so müssen seine Zellen aus dem nächstgelegenen Blutgefäß durch

Diffusion ernährt werden. Da die maximal mögliche Diffusionstrecke für Sauerstoff nur ca. 200 µm beträgt, muss sich ein vielzelliges Gewebe wie ein Tumor neue Blutgefäße rekrutieren, um an Größe zunehmen zu können [FOLKMAN 1971]. Das massive Wachstum von Glioblastomen wäre also ohne eine stark ausgeprägte Gefäßversorgung nicht möglich. Um sich eine eigene endogene Mikrozirkulation aufzubauen, rekrutiert der Tumor sich Endothelzellen aus dem umgebenden Stroma [FOLKMAN 1974]. Die am besten erforschte Möglichkeit der postnatalen Gefäßneubildung ist die Angiogenese.

Einem angiogenen Stimulus folgend werden Endothelzellen aktiviert; es folgt eine Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität und eine Ansammlung von Fibrin außerhalb des Gefäßes. Durch das nun permeablere Gefäß können proteolytische Enzyme die Basalmembran und extrazelluläre Matrix des Muttergefäßes angreifen und so eine „Schneise“ für die aktivierten Endothelzellen bahnen. Diese bilden dünne zytoplasmatische Fortsätze aus und migrieren gerichtet dem angiogenen Stimulus zu. Die migrierenden Endothelzellen bilden einen Spross, indem sie sich strecken und aneinander hängen. Durch Zellteilung wird der Gefäßspross in die Richtung des Stimulus verlängert und von proximal her bildet sich ein Lumen aus. Schließlich anastomosieren benachbarte Sprosse, ein funktioneller Blutfluss kommt in Gang und mit dem Wiederaufbau der Basalmembran findet die Reifung des neuen Gefäßes ihren Abschluss.

Es ist wahrscheinlich, dass Tumorzellklone, sobald sie durch vielfältige genetische und epigenetische Vorgänge einen angiogenen Phänotyp erlangt haben, d.h. im wesentlichen mit der Produktion von angiogenen Wachstumsfaktoren beginnen, die vaskuläre Destabilisierung einleiten und damit die Voraussetzung für die Gefäßneubildung schaffen [MARMÉ 2000]. Tumorzellen können angiogene Faktoren sezernieren, angiogene Faktoren aus der extrazellulären Matrix mobilisieren oder Makrophagen und Lymphozyten anlocken, die ihrerseits angiogene Faktoren produzieren. Maligne Zellen sind zudem fähig, negative Regulatoren der Angiogenese zu inhibieren [HARSTRICK 2000].

Um neue Therapiekonzepte zu erarbeiten, stellt die Untersuchung dieser Faktoren zur Zeit ein Hauptziel der Krebsforschung dar. Mittlerweile sind eine ganze Reihe von Substanzen mit Einfluss auf die Angiogenese gefunden worden.

Die Wirkung und die Signaltransduktionswege sind allerdings meist noch unklar; einige Schritte konnten aber bereits bestimmt werden:

An der Vasodilatation zu Beginn der Angiogenese ist Stickoxid (NO) beteiligt. Die Erhöhung der Gefäßpermeabilität ist eine Folge des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF). Diese erhöhte Durchlässigkeit ist Voraussetzung für die Gefäßneubildung. Im Gegensatz dazu festigt Angiopoietin 1 (Ang 1) das Endothel vorhandener Gefäße und vermeidet so sekundäre Schäden infolge der gesteigerten Permeabilität. Ang 1 ist der Ligand des endothelialen Tie 2- Rezeptors und ein natürlicher Stabilisator der Gefäßwand. Angiopoietin 2 (Ang 2) inhibiert das Tie 2 Signalling und ist vermutlich beim Abbau der Matrix und an der Lockerung glatter Muskelzellen beteiligt [GALE 1999]. Die Ausschüttung von Ang 2 wird u.a. durch VEGF angeregt. Proteinase aus der Familie der Plasminogen-Aktivatoren, der Matrix-Metalloproteinase (MMP), der Chymasen oder Heparinasen haben Einfluss auf die Angiogenese, indem sie die Proteine der Matrix verdauen oder weitere Wachstumsfaktoren, die in der extrazellulären Matrix liegen, freisetzen bzw. aktivieren. An der folgenden Migration und Proliferation hat die Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) großen Anteil.

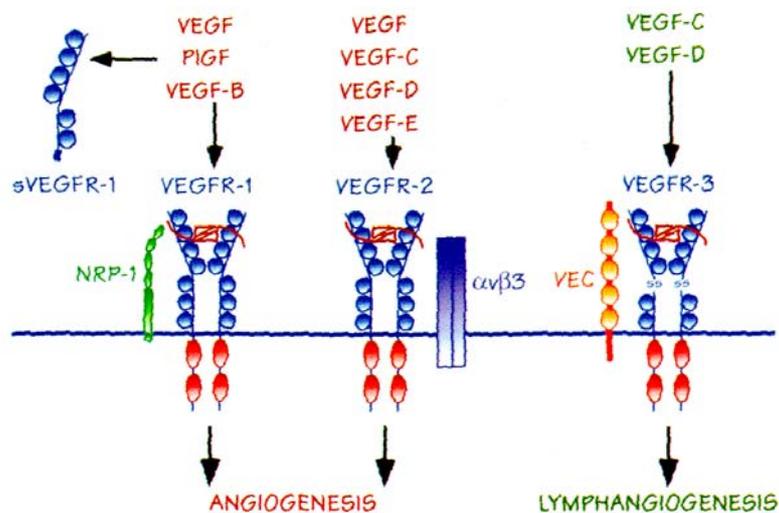
Dieser Effekt wird durch viele weitere Faktoren verstärkt, wie zum Beispiel Ang 2, das u.a. chemotaktisch aktiv ist.

Das Neutralisieren von Angiopoetinen reicht aus, um trotz Anwesenheit von VEGF- mit dem Tumorwachstum und der Vaskularisation zu interferieren. Es wird angenommen, dass Ang 2 für den Start der Tumorangiogenese wichtig ist. VEGF kann nachfolgend die eigentliche Gefäßbildung in Gang setzen. Die Proliferation der Endothelzellen wird durch Ang 2 nicht erhöht. [MARMÉ 2000]. Um zu verhindern, dass die Gefäße gleich wieder abgebaut werden, sind zudem nach deren Fertigstellung Überlebensfaktoren von entscheidender Bedeutung, wobei wiederum VEGF die größte Rolle spielt.

Eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Gefäße des Tumors fällt also den VEGF Rezeptoren sowie ihren Liganden zu. Dies lässt VEGF zu einem bevorzugten Angriffspunkt für die anti-angiogene Tumorthherapie werden.

1.2.2. Die VEGF Familie und ihre Rezeptoren

Die Gruppe der VEGF Rezeptoren umfasst neben dem „VEGF Prototypen“ (VEGF-A) noch fünf weitere Vertreter. Diese sind: PLGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E. Bis heute sind drei Rezeptoren gefunden worden, die, vermittelt durch Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) alle ihre Signale in die Zelle weiterleiten. Jeder der Rezeptoren kommt praktisch nur auf Endothelzellen vor und ist in Struktur und Funktion der PDGF Rezeptorfamilie ähnlich. [KLAGSBRUN 1996, SHIBUYA 1995]. Als weitere Gemeinsamkeit haben die als VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 bezeichneten Rezeptoren sieben Immunglobulin-ähnliche Domänen im Extrazellulärraum und eine intrazelluläre Tyrosinkinase. Während VEGFR1 und –R2 vor allem im Endothel des Blutgefäßsystems exprimiert werden, befinden sich VEGFR-3 Rezeptoren vor allem im Lymphsystem und spielen eine wesentliche Rolle bei der Lymphangiogenese.



(Abb. 3) Aus: Veikkola et al. Cancer Res. 60,203-212, 2000

Das VEGF Molekül ist ein antiparalleles Homodimer, verbunden durch Disulfidbrücken. Durch alternatives Splicing können Isoformen isoliert werden, bestehend aus 121,145,165, 189 oder 206 Aminosäuren. VEGF bindet an VEGFR-1 und VEGFR-2. Im Falle der anderen VEGFs binden PLGF und VEGF-B nur an VEGFR-1, VEGF-E nur an VEGFR-2. VEGF-C sowie VEGF-D interagieren mit VEGFR-2 und VEGFR-3 [VEIKKOLA 2000]. Dazu kommt noch eine Anzahl von Zusatzrezeptoren wie das Neuropilin, welches die Bindung an den Hauptrezeptor zu modulieren scheint. Ihre genaue Rolle bei der Signaltransduktion ist allerdings noch unklar [YANCOPOULOS 2000].

Die Bindung des signalvermittelnden Moleküls führt zu einer Dimerisierung und Trans-autophosphorylierung der Rezeptoren. Dadurch wird die Kinase aktiviert, bestimmte Tyrosinreste von Proteinen zu phosphorylieren. An diese Resten binden dann spezifisch Proteine mit SH₂ Domäne, welche das Signal an andere Protein-Kinasen im Zellinneren weiterleiten. Anders als bei VEGFR-2 und VEGFR-3, die beide autophosphoryliert werden, ist dieser Vorgang bei VEGFR-1 noch unklar [VEIKKOLA 2000]. VEGFR-3 kommt praktisch fast nur auf Lymphgefäßendothelien vor und hat somit kaum Einfluss auf die Tumorangio-genese im Gehirn (Abb. 3).

VEGF wurde früher auch als vascular permeability factor bezeichnet, denn neben der Fähigkeit, auf die Proliferation der Gefäßendothelzellen Einfluss auszuüben, erhöht dieser Faktor auch die Gefäßpermeabilität.

Besonders VEGFR-2 vermittelt die Proliferation und Permeabilität induzierenden Fähigkeiten von VEGF. Ferner erscheinen sowohl VEGFR-1 als auch VEGFR-2 beide erst nach ihrer Aktivierung durch VEGF in großer Zahl auf der Oberfläche von Tumorendothelien. Die Endothelzellen homöostatischer Gefäße besitzen nur eine geringe Anzahl von VEGF Rezeptoren, die allerdings in der Lage sind, das vom Tumor sezernierte VEGF zu perzipieren und die Expression weiterer Rezeptoren in Gang zu setzen [MARMÉ 2000]. VEGFR-1 ruft durch seine Funktion als „Köder“-Rezeptor oder auch durch Suppression der VEGFR-2 vermittelten Signaltransduktion möglicherweise einen negativen Effekt hervor [YANCOPOULOS 2000]. Mäuse, die artifizial keinen VEGFR-2 exprimieren können sind nicht in der Lage, ein Gefäßsystem auszubilden und weisen nur sehr wenige Endothelzellen auf. Bei Mäusen, die durch

Genmanipulation keinen VEGFR-1 besitzen scheinen die Endothelzellen große Formationen zu bilden, um sich zu unorganisierten Tubuli zusammenzuballen. Die Zellteilungsaktivität der Endothelzellen wird nicht wesentlich gehemmt[FONG 1995, SHALABY 1995]. Für die (Tumor-) Angiogenese scheint folglich VEGFR-2 entscheidend zu sein, während VEGFR-1 im normalen Endothel Zell-Zell und Zell-ECM Interaktionen reguliert.

Der VEGF-VEGFR-2 Signalweg ist sogar so wichtig, dass das Ausschalten eines einzigen VEGF kodierenden Allels bei der Maus genügt, um den Tod des Embryos aufgrund schwerster Gefäßmissbildungen zu verursachen. Bei älteren Individuen wirkt sich ein Fehlen von VEGF weit weniger drastisch aus. In diesem Falle sind fast nur Gewebe betroffen, die sich noch in der Entwicklung befinden, wie Knochen oder Ovarien. Postnatal ist VEGF für die Gefäßerhaltung unabdingbar: Wird die Ausschüttung von VEGF durch Hyperoxie (z.B. bei Frühgeburten) für eine gewisse Zeit heruntergefahren, so wird die retinale Vaskularisation so stark gestört, dass die Netzhaut des Kindes irreversibel geschädigt wird [ALON 1995].

Die absichtliche Inhibition der VEGF vermittelten Vaskularisation steht zur Zeit im Zentrum des Interesses bei der Suche nach neuen Therapieansätzen bei Tumorpatienten. Ein besseres Verständnis der pro- und anti-angiogenen Faktoren und deren Signaltransduktionswege könnte neue Möglichkeiten eröffnen, das Tumorwachstum durch Unterbinden der Neovaskularisation zu hemmen.

1.2.3. Inhibition des VEGF-Rezeptors - PTK 787

Angiogene Faktoren können durch neutralisierende Antikörper, lösliche Rezeptoren oder verschiedene synthetische Substanzen blockiert werden.

Monoklonale Antikörper gegen VEGF werden in klinischen Studien der Phasen II/ III (Genentech) getestet, Pharmakokinetik und Wirkung wurden also bereits an freiwilligen Probanden bzw. Patienten untersucht. Spezifische Inhibitoren der VEGF-Rezeptors Tyrosinkinase befinden sich zur Zeit in umfangreichen Tests. Bei den dabei bekanntesten Substanzen handelt es sich um das von der Firma Sugen entwickelte Molekül SU 5416 und das von Novartis und Schering entwickelte PTK 787. Beide Substanzen konnten bereits in präklinischen Untersuchungen vielversprechende

Ergebnisse erzielen und werden in Phase II/ III (SU 5416) bzw. in Phase I/ II (PTK 787) klinisch geprüft. PTK 787, das auch als ZK 222584 bezeichnet wird und dessen chemische Formel 1-[4-chloroanilino]-4-[4-pyridylmethyl] phtalazin succinat lautet, hemmt bereits in submicromolaren Konzentrationen VEGF-Rezeptor- Tyrosinkinase. Liegt das Präparat in höheren Konzentrationen vor, so werden auch andere Kinasen der Klasse III inhibiert, wie zum Beispiel der PDGF-Rezeptor, c-Kit und c-Fms. Nicht blockiert werden Vertreter anderer Rezeptorfamilien wie der EGF-Rezeptor oder FGF-Rezeptor-1. PTK 787, das seine Wirkung durch Inhibition der VEGF induzierten Autophosphorylierung entfaltet, erreicht bei Nacktmäusen nach oraler Gabe von 50mg/kg eine Plasmakonzentration von mehr als 1µM, die über acht Stunden lang anhält. Auf Zellen, die den VEGF-R2 nicht exprimieren, konnte kein anti-proliferativer Effekt festgestellt werden. In ersten Tierversuchen konnte durch Applikation dieser Substanz eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums und der Vaskularisation beobachtet werden.[WOOD 2000, DREVS 2000].

1.3. Das Sphäroidmodell

Werden Tumorzellen als Monolayer (Einzelzellschicht) kultiviert, so entspricht das nur begrenzt den Eigenschaften eines soliden, dreidimensional wachsenden Tumors. Im Gegensatz zu Monolayer-Zellen, die weitgehend die gleichen Bedingungen vorfinden, sind die Zellen eines dreidimensionalen Tumors einem unterschiedlichem Angebot von Sauerstoff und Nahrungsstoffen sowie physischem und chemischem Stress in unterschiedlicher Stärke ausgesetzt. Dies hat großen Einfluss auf die Morphologie der Gewebsneubildung; so können in Bereichen schlechter Sauerstoffversorgung Zellschäden und sogar Nekrosen auftreten [KUNZ-SCHUGHART 1998]. Folgendes Modell soll die tatsächlichen physiologischen Gegebenheiten *in vitro* simulieren: Sphäroide sind kugelförmige Tumorzellaggregate, die sowohl aus Zelllinien wie aus Gewebeproben hergestellt werden können. Sie sind in vielfacher Hinsicht dem soliden Tumor ähnlicher als Monolayer-Kulturen oder Zellsuspensionen: Sphäroide aus Gliomzellen weisen einen natürlicheren Aufbau ihrer extrazellulären Matrix auf, ihre Wachstumsgeschwindigkeit ähnelt sehr der normaler Neoplasien. Tumorsphäroide beinhalten keine mesenchymalen Zellen, stellen also einen primär avaskulären Tumor

dar [SANTINI 1999]. Erreichen die Sphäroide eine bestimmte Größe, bei der auch die inneren Zellen durch Diffusion nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden können, so exprimieren die Zellen VEGF und zwar besonders im schlecht versorgten inneren Bereich (SHWEIKI 1995, MUELLER-KLIESER 1985). Die Implantation eines solchen Sphäroides in das passende Zielgewebe ermöglicht nun die Generierung eines kleinen asyptomatischen und avaskulären Primärtumors. Dieses Procedere wird mittlerweile häufig genutzt, so z.B. bei der Implantation von Sphäroiden, die aus C6-Rattengliomzellen gewonnen worden sind. Aus dem implantierten avaskulären Focus neoplastischer Zellen entsteht schließlich ein hoch vaskularisierter, schnell wachsender Tumor mit vielen Eigenschaften des Glioblastoma multiforme. Neben der dreidimensionalen Natur der Primärtumors stellen die leichte Reproduzierbarkeit, die definierte Tumormasse sowie die genaue Positionierung des Sphäroides im Wirtsgewebe die wichtigen Vorteile dieses Systems dar [FARREL 1987].

Werden Gliome in Rattenkortex implantiert, läßt sich neben der "klassischen Angiogenese", dem Aussprossen von Gefäßen aus bereits bestehenden, noch ein weiterer Mechanismus nachweisen: Einzelne Endothelzellen wandern in den Sphäroid ein, worauf sie sich zu neuen Gefäßen zusammenfinden [GOLDBRUNNER 1999].

1.4. Zielsetzung

Trotz langjähriger umfangreicher Bemühungen ist die Prognose des Glioblastoms infolge mangelnder effizienter Therapiemöglichkeiten schlecht. Neue Denkansätze zur Verbesserung des therapeutischen Vorgehens sind daher dringend notwendig. Ein Erfolg versprechender Ansatz ist in diesem Zusammenhang die Hemmung der Gefäßversorgung betreffender Tumoren. Der Tyrosinkinaseinhibitor PTK 787 hemmt spezifisch den VEGF-Rezeptor und wurde bereits in anderen Modellen erfolgreich getestet.

Für unsere Versuche wurde folgende Hypothese erarbeitet:

PTK 787 inhibiert Vaskularisation und Wachstum auch von malignen Gliomen.

Diese Hypothese zu prüfen, war das Ziel der Doktorarbeit.

Dafür werden anhand folgenden Modells den Versuchstieren orthotop Zellsphäroide implantiert.

Hierbei handelt es sich um die C6-Gliomzelllinie, aus der mittels retroviraler Transfektion ein stark VEGF exprimierender Zellklon gewonnen wurde.

Am elften postoperativen Tag werden die Volumina der einzelnen Tumoren im MRT vermessen. Um den Wirkungsmechanismus darzulegen wird später VEGF im Tumorgewebe nachgewiesen, der Einfluss des Medikamentes auf die Proliferation der Tumorzellen geprüft und das Ausmaß der Vaskularisation im Tumor festgestellt.

Mit dem oben beschriebenen Modell kann das Wirkpotential therapeutischer Substanzen im präklinischen Entwicklungsstadium gut dokumentiert werden.

2. Geräte, Materialien und Chemikalien

2.1. Geräte und Laborhilfen

| | |
|---|---|
| Biofuge Pico | Heraus Instruments, Hanau |
| Brutschrank (IR Autoflow CO ₂ Water-Jacketed Incubator) | Nuaire, Plymouth, U.S.A. |
| Einbettmaschine Citadel 1000 | Shandon, Pittsburgh, U.S.A. |
| Hohlmeißelzange FO 409 | Aesculap, Tuttlingen |
| Instrumente mikrochirurgische Kopfhalter | Aesculap, Tuttlingen Werkstatt Neurologie, Universität Würzburg |
| Kryostat | Leica, Wetzlar |
| Magnetrührer MR 3001 K | Heidolph, Schwabach |
| Magnetrührstäbchen, div. Grössen | Heinse und Ziller, Würzburg |
| Megafuge 1.0 R | Heraus Sepatech, Hanau |
| Messzylinder, div. Volumina | Schott, Mainz |
| Mikropipetten | Eppendorf, Hamburg |
| Mikroskop, Wilovert | Hund , Wetzlar |
| Mikrowellenherd R-2V26 | Sharp, Hamburg |
| Multipette plus | Eppendorf, Hamburg |
| Operationsmikroskop OPMi II | Zeiss, Oberkochen |
| PH-Meter 525 | WTW, Weilheim |
| Pipetten, Glas, 5, 10, 20 ml | Hartenstein, Würzburg |
| Pipettor (Stripettor) | Costar, Bodenheim |
| Skalpell „Cutfix“ | B.Braun, Melsungen |
| Tischzentrifuge 5417 C | Eppendorf, Hamburg |
| Vortex-Genie 2 | Scientific Industries, Bohemia, U.S.A. |
| Wärmeplatte | Medex, Kiel |

| | |
|--------------------------|-----------------------|
| Waage Sartorius BP 300 S | Sartorius, Göttingen |
| Wasserbad | Hartenstein, Würzburg |

2.2. Verbrauchsmaterialien

| | |
|---|----------------------------------|
| Cryoröhrchen | Nalgene, Brüssel |
| Deckgläser | Hartenstein, Würzburg |
| Einmalkanülen, div. Größen | B.Braun, Melsungen |
| Einmalspritzen, div. Größen | B.Braun, Melsungen |
| Faltenfilter | Schleicher und Schüll, Dassel |
| Farbfilme | Agfa, Leverkusen |
| Histowachs | Cambridge Instruments, Nussloch |
| Hautklammergerät | B.Braun, Melsungen |
| Metalleinbettschälchen | Dia Tec, Hallstadt |
| Objektträger | Hartenstein, Würzburg |
| Pasteurpipette | Samco, San Fernando, U.S.A. |
| Petrischalen | Becton Dickinson, Oxuard; U.S.A. |
| Pipettenspitzen, Kunststoff, 10, 100, 1000 µl | Greiner, Würzburg |
| Tubes, Kunststoff, 15, 50 ml | Becton Dickinson, Oxuard, U.S.A. |
| Zellkultur-24-Well-Platten | Costar, Bodenheim |
| Zellkulturflaschen (75 cm ²) | Costar, Bodenheim |

2.3. Chemikalien

| | |
|--|------------------------------|
| Aceton | Roth, Karlsruhe |
| Agar Noble | Nordwald, Hamburg |
| Chloroform | Merck, Darmstadt |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Roth, Karlsruhe |
| Einschlussmittel für mikroskopische OT | Zymed, San Francisco, U.S.A. |
| Eosin | Merck, Darmstadt |
| Ethanol absolut (EtOH) | J.T.Baker, Deventer, NL |
| Methanol (MetOH) | J.T. Baker, Deventer, NL |

| | |
|--|----------------------------|
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Isotonische Kochsalzlösung (NaCl) | Braun, Melsungen |
| Natriumcitrat | Merck, Darmstadt |
| Natronlauge (NaOH) | Merck, Darmstadt |
| Poly-L-Lysin | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Paraformaldehyd (PFA) | Sigma, St. Louis, U.S.A. |
| Rnase Erase | ICN, Eschwege |
| Salzsäure (HCl) | Merck, Darmstadt |
| Tissue Tek | Saluna, Torrance, U.S.A. |
| Wasserstoffperoxid, 30% (H ₂ O ₂) | Sigma-Aldrich, Steinheim |

2.4. Antikörper und Reagentien für Immunhistochemie

| | |
|---------------|--------------------------------|
| CD 31 | Santa Cruz, Santa Cruz, U.S.A. |
| VEGF | Santa Cruz, Santa Cruz, U.S.A. |
| PCNA | Serotec, Oxford, U.K. |
| Apoptosekit | Boehringer Mannheim |
| Histostainkit | Zymed, San Francisco, U.S.A. |

2.5. Medikamente

| | |
|--|-------------------------------|
| Äther | Chinosol, Seelze |
| Magnevist [®] Gadolinium DTPA | Schering, Berlin |
| Ketamin Ketanest [®] | Parke-Davis, Berlin |
| Neo-Kodan Hautantiseptikum | Schülke und Maye, Norderstedt |
| Rompun [®] Xylazin | Bayer, Leverkusen |

2.6. Tyrosinkinaseinhibitor

| | |
|-------------------------------|-----------------|
| PTK 787/ ZK 222584 (BA 25915) | Novartis, Basel |
|-------------------------------|-----------------|

2.7. Puffer und Lösungen

Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

8 g NaCl

+ 0,2 g KCl

+ 1,44 g Na₂HPO₄ * 12 H₂O

+ 0,24 g KH₂PO₄

werden in 1000ml A.d. gelöst und auf ph 7,4 eingestellt.

2.8. Reagentien für die Zellkultur

| | |
|---|--|
| Amphotericin B | Gibco-BRL- Life Technologies, Eggenstein |
| 100x BME nicht essentielle Aminosäuren | Cytogen, Berlin |
| Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit 1g/ l Glucose | Cytogen, Berlin |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Bio Whittaker über Boeringer Ingelheim |
| Genetecin G 418 | Gibco-BRL- Life Technologies, Eggenstein |
| L-Glutamin (200 mM in 0,85% NaCl) | Cytogen, Berlin |
| Penicillin (10000 U) / | Cytogen, Berlin |
| Streptomycin (10 mg/ ml) | |
| Phosphate Buffered Saline (PBS) | Bio Whittaker über Boeringer Ingelheim |
| Trypsin-EDTA (0,05 M/ 0,02%) | Cytogen, Berlin |
| Ultra-reines Wasser (Seromed) | Biochrom, Berlin |
| 100x MEM Vitamine | Gibco-BRL- Life Technologies, Eggenstein |

Zellkulturmedien

für C6 VEGF sens transfizierten Zellen:

500 ml DMEM mit 1g/l Glucose
60 ml FCS, hitzeinaktiviert
6 ml Vitamine (= 1x)
6 ml NEAs (= 1x)
2 ml L-Glutamin (0,65mM)
2 ml Penicillin (=32u/ml) / Streptomycin (=32mg/ ml)
3 ml Genetcin G 418

Einfrriermedium:

50 ml DMEM-Vollmedium mit 20% FCS
40 ml FCS
→ Lagern bei 4°C
bei Gebrauch 9 ml mit 1 ml DMSO ansetzen.
(= 10 % DMSO und 50 % FCS)

Alle Medien und Zusätze werden, sofern nicht anders angegeben, mit einer Temperatur von 37°C verwendet. Die Medienzusätze werden aliquotiert bei -20°C aufbewahrt. Erst kurz vor Gebrauch werden sie aufgetaut und dann max. zwei Wochen bei 4°C gelagert.

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Monolayer-Zellkultur von C6 VEGF-sense transfizierten Gliomzellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten C6 VEGF-sense transfizierten Gliomzellen wurden aufgetaut und unter sterilen Bedingungen in Zellkulturflaschen mittlerer Größe als Monolayer (Einzelschicht) mit 15 ml des jeweiligen Zellkulturmediums kultiviert. Dabei wurden die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

Es handelte sich hierbei um die Standardbedingungen bei der Kultur der Gliomzellen, die auch für alle anderen genannten Inkubationen Gültigkeit besaßen. Zum Passagieren der konfluenten, d.h. den Boden der Zellkultur vollständig bedeckenden Zellen wurden das Medium abgenommen und verworfen, die Flasche mit 3ml vorgewärmten Trypsin EDTA gespült und die Zellen darauffolgend mit 1,5 ml Trypsin (unter genannten Inkubationsbedingungen) vom Flaschenboden gelockert. Nachdem sich die Zellen durch Klopfen vollständig vom Plastik gelöst hatten, wurde die Zellsuspension zum Neutralisieren des Trypsins mit 8,5 ml vorgewärmten Medium aufgenommen und davon wurde die Hälfte bis ein Zehntel wieder in die Zellkulturflasche zurückgegeben. Die Menge dieser Zellen hing davon ab, wann eine mit Gliomzellen konfluent bewachsene Flasche z.B. zum Anlegen von Sphäroiden gebraucht wurde. Je nach Bedarf kann man die restliche Zellsuspension auf andere Flaschen verteilen, einfrieren oder verwerfen. Schließlich wurde die Zellkulturflasche mit Medium wieder auf 15 ml aufgefüllt.

3.1.2. Einfrieren und Auftauen von C-6 Gliomzellen

Überschüssige Zellsuspensionen oder solche Zelllinien, die für aktuelle Versuche nicht gebraucht wurden, konnten für den späteren Gebrauch eingefroren werden. Die Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Hierzu wurden die Zellen

trypsiniert, in kaltem Medium (ad 10 ml) aufgenommen und bei 4°C mit 800 rpm 10 min ungebremst zentrifugiert. Währenddessen wurden Kryoröhrchen beschriftet und das Einfriermedium mit DMSO auf Eis angesetzt. Nach der Zentrifugation wurden der Überstand des Zellpellets abpipetiert, verworfen und die Zellen in 1 bis 3 ml Einfriermedium aufgenommen. Diese Suspension wurde zu je 1 ml pro Kryoröhrchen verteilt und umgehend auf Eis gestellt. Die Röhrchen wurden nach eintägiger Zwischenlagerung bei -80°C in flüssigen Stickstoff überführt und konnten so mehrere Jahre gelagert werden.

3.1.3. Anlegen von Tumorsphäroiden

Normalerweise haften Gliomzellen am Boden von Zellkulturflaschen. Verhindert man diese Adhäsion, indem man die Flaschen vorher mit Agar beschichtet (coated), so können sich die Zellen nicht festsetzen und lagern sich statt dessen zu einem kugelförmigen, dreidimensionalen Zellverband, dem Sphäroid zusammen. Zum Anlegen dieser Kulturen wurden als Monolayer konfluent gewachsene Zellen wie im Fall des Passagierens trypsiniert. Von dieser Zellsuspension wurden 8 ml in eine bereits mit 15 ml warmen Medium gefüllte und beschichtete Kulturflasche gegeben. Der Rest wurde zum Umsetzen verwendet. Die Sphäroidflasche wurde unter Standardbedingungen inkubiert und ihr Inhalt am folgenden Tag auf zwei frische, gecoatete Zellkulturflaschen verteilt. Die Flaschen wurden dann wieder auf insgesamt 15 ml mit Medium aufgefüllt.

Nach insgesamt vier Tagen hatten viele der entstandenen Sphäroide eine Größe von 200-250 µm erreicht und konnten vereinzelt werden. Unter sterilen Bedingungen wurden sie mit einer Kolbenhub-Pasteur-Pipette unter Mikroskopsicht vereinzelt und gecoatete 24 Well Platten überführt. In einem einzelnen Well sollten dafür mindestens 1,5 ml warmes Medium vorgelegt sein. Bei der Auswahl der Sphäroide für die folgende Implantation ist darauf zu achten gewesen, dass keine teilweise nekrotischen Exemplare ausgewählt wurden, die im Phasenkontrastmikroskop durch ihren dunkelgrauen bzw. schwarzen Kern auffielen. Sphäroide aus durchgängig lebenden Zellen hatten hingegen keinen dunklen Kern; sie waren hell und durchscheinend.

3.1.4. Beschichtung der Zellkulturflaschen und 24 Well Platten

Bei der für die Sphäroidkultur erforderlichen Beschichtung mit Agar (1% Agar in Medium, Verfahren nach Yuhas 1977) wurde Agar-Noble verwendet. Dieser wurde zu 10 ml Ultra-Pure-Water gegeben und bis zur vollständigen Lösung ca. 3 min in der Mikrowelle aufgekocht. Sobald in der aufgekochten Agar-Flasche keine ungelösten Bestandteile mehr zu sehen waren, wurden 40 ml Medium hinzupipettiert, vorsichtig gemischt und schnell auf Zellkulturflaschen und Well-Platten verteilt. Um sicher zu gehen, dass das Medium nicht zu kalt war, ist es sinnvoll gewesen, das Zellkulturmedium ca. 10 min vor Beginn dieser Prozedur ins 37°C warme Wasserbad zu stellen. In eine 75 cm² Flasche kamen 10 ml, in ein Well der 24 Well-Platte 1 ml Agar.

3.1.5. Transfektion der C6-Zellen

Die C6 Rattengliomzelllinie wurde mit dem für VEGF₁₆₄ codierenden Gen-Abschnitt durch M. Sasaki, (Department of Neurosurgery, Kobe Medical School, Japan) in sense und antisense Richtung transfiziert. Die dafür notwendige mit dem entsprechenden Vektorkonstrukt beladene Viren-Produktions-Zelllinie GP+E86 wurde von Dr. Wizigmann-Voos (Abt. Molekulare Zellbiologie, W.G. Kerkoff Institut, Bad Nauheim) zur Verfügung gestellt. Um diese Zelllinie mit dem entsprechenden Vektor-Konstrukt zu beladen, wurde die CaPO₄ Methode verwendet. Da zusammen mit dem implantierten Gen auch eine Resistenz gegenüber Neomycin in die Zielzellen eingebracht wurde, konnten nach Transfektion der C6-Zellen durch Zugabe von G 418 (400 µg/ ml) Neomycin-resistente Zellen und damit erfolgreich transfizierte C6-Zellen herausselektiert werden [SASAKI 1999].

3.2. Tierversuche

3.2.1. Implantation von Tumorsphäroiden

Die folgende Vorgehensweise wurde unter Projekt Nummer 621-2531.01-28/ 99 vom Ausschuss für Tierschutz der Universität Würzburg genehmigt. Als Tumorwirte wurden 60 Ratten des Typs Sprague-Dawley ausgewählt. Alle Tiere waren männlich und wiesen zum Zeitpunkt der Implantation ein Gewicht von 300 – 350 g auf. Vor der Operation hatten die Tiere, welche sich zu viert einen Käfig teilten, eine Woche Zeit, sich an ihre Umgebung zu gewöhnen. Für die eigentliche Implantation erhielten die Tiere eine Narkose mit 100mg/ kg KG Ketamin (Ketanest[®]) und 10 mg/ kg KG Xylazin (Rompun[®]), die beide i.m. in den Oberschenkel injiziert wurden. Um Komplikationen bei der Wundheilung zu vermeiden, wurden der Kopf der Tiere rasiert und das Operationsgebiet mit Betaisodona[®] gespült. Danach wurden der Kopf der Tiere mit einem Kopfhalter fixiert, und die Haut in sagittaler Richtung von etwas rostral der Augen bis in etwa Höhe der Ohren inzidiert. Der Schädel wurde im Bereich des Bregma mit der Diamantfräse unter fortlaufender Spülung trepaniert und die Dura offengelegt. Um eine Vaskularisation durch Gefäße der Dura zu unterbinden, wurde diese nach ihrer Offenlegung im Bereich des Knochens entfernt. Die weiche Hirnhaut und Hirnrinde wurden mit einem Mikroskalpell in Form eines Halbkreises (2 mm) eingeschnitten und ein einzelner, frisch dem Medium entnommener Sphäroid wurde unter Mikroskopsicht subkortikal in die Inzision plaziert.

Anschließend wurde das Bohrloch mit Knochenwachs verschlossen, um ein extrakranielles Tumorwachstum zu vermeiden.

Der Verschluss der Hautnaht erfolgte mittels Klammern. Für die gesamte Dauer der Narkose wurden die Tiere auf 37°C Wärmeplatten vor Auskühlung geschützt und erst nach dem Aufwachen in ihre Käfige zurückgebracht.

3.2.2. Applikation von PTK 787

Die tumortragenden (VEGF+) Tiere wurden auf drei zahlenmäßig gleich starke Gruppen verteilt: Die erste (PTK 1-12) bekam das PTK 787 vom ersten postoperativen

Tag an, was in klinischer Korrelation einem Zustand nach makroskopischer Resektion mit minimalem Resttumor entsprach. Im Falle der zweiten Gruppe (PTK 7-12), deren Tiere erst ab dem siebten postoperativen Tag mit PTK 787 behandelt wurden, wurde bereits ein kleiner solider Tumor primär mit dem Medikament angegangen. Der dritten Gruppe (Kontrolle) wurde als Kontrollgruppe kein PTK 787 appliziert, um ein von jeglicher Medikation unbeeinflusstes Tumorwachstum zu erhalten. Als Positivkontrolle dienten Tiere, in die ein VEGF-antisense transfizierter Sphäroid implantiert wurde. Diese Tiere simulierten ein Tumorwachstum ohne endogene VEGF Expression. Die Applikation der Substanz erfolgte einmal täglich in einer Dosis von 50 mg/ Kg KG, wobei den Tieren mit einer 1 ml Spritze und einer gebogenen Metallkanüle 0,5 ml in Wasser gelöstes Medikament oral verabreicht wurden. Um zu verhindern, dass die Ratten die verabreichte Substanz ausspuckten, war es erforderlich die Kanüle weit genug in den Rachen der Tieres einzuführen. Ging dennoch Material verloren, musste die entsprechende Menge nachgegeben werden.

Bei den früh (PTK 1-12) und spät (PTK 7-12) behandelten Tieren endete die Medikamentengabe nach dem zwölften postoperativen Tag. Über den gesamten Behandlungszeitraum wurden die Versuchstiere täglich auf neurologische Symptome, wie motorische Koordination, Reflexe und Muskeltonus hin untersucht, um den Versuch im Falle eines positiven Befundes bei der betroffenen Ratte abubrechen.

3.2.3 Kernspintomographie

Bei der Magnet-Resonanz-Tomographie kann der Bildkontrast durch Wichtung der Kontrast bestimmenden physikalischen Faktoren (Protonendichte, T1- und T2-Relaxationszeiten) variiert werden und ermöglicht so Hinweise auf die Morphologie des Gewebes. Mit T1-gewichteten Aufnahmen erscheinen z.B. Flüssigkeiten oder pathologische Strukturen signalarm, während sie in T2-gewichteten Aufnahmen signalreich abgebildet werden. Die Anwendung der T2-Wichtung ermöglicht außerdem eine genauere Beurteilung des perifokalen Ödems sowie eine genauere Abgrenzung des infiltrativem Wachstums des Tumors. Das Signal aus dem Gewebe kann zudem durch die Gabe von Gadolinium DTPA (Prohance 0,1 ml/ kg) gesteigert werden, da es zu einer Verkürzung der Relaxationszeit kommt [THURN 1998]. Das Kontrastmittel reichert

sich gerade im Bereich des Tumors wegen der hier gegebenen Störung der Blut-Hirn-Schranke und der pathologischen erhöhten Gefäßversorgung vermehrt im Gewebe an.

Die Kernspin-Untersuchungen wurden am zwölften Tag nach Implantation durchgeführt. Dabei kam ein NMR-Tomograph (Siemens, Magnetom Vision[®]) mit einer Feldstärke von 1,5 Tesla zur Anwendung. Die Versuchstiere befanden sich in Rückenlage, den Kopf in einem provisorischen Halter fixiert, und wurden zuvor wie bei der Implantation narkotisiert. Die Messung selbst wurde in einer selbst angefertigten Spule mit einem Durchmesser von 30 mm durchgeführt und bestand aus einer T2-gewichteten (T2-w) TSE Sequenz (TE 3000 ms, TR 96 ms, Schichtdicke 2 mm) und einer T1-gewichteten (T1-w) SE Sequenz (TE 460 ms, TR 14 ms, Schichtdicke 2 mm), die vor und nach der i.v. Gabe von Gadolinium-DTPA (Prohance[®], 0,1 ml/ kg KG) Kontrastmittel durchgeführt wurde. Außerdem wurde bei allen Tieren eine CISS 3-D Sequenz (TE 12,2 ms, TR 5,9 ms, Schichtdicke 0,5 mm) gemessen. Die bei der CISS 3-D Sequenz gewonnenen Daten wurden mit Hilfe einer Workstation (Silicon Graphics[®]) und entsprechender Software (Siemens Virtuoso[®]) volumetrisch ausgewertet. Dies wurde erreicht durch manuelles Markieren des Tumors in jedem Schichtbild wofür eine genaue coronare, sagittale und axiale Ausrichtung der einzelnen Schichten durchgeführt wurde. Berechnet wurde das Volumen des Tumors schließlich aus der mittleren Fläche der Läsionen in coronarer, axialer und sagitaler Schnittrichtung.

Die Messungen wurden in Kooperation mit Dr. M. Bendzus, Abt. für Neuroradiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

3.2.4. Entnahme der Gewebeprobe

Nach der Kernspin-Untersuchung wurden sämtliche Ratten mit 100mg/ kg KG Ketamin (Ketanest[®]) narkotisiert und bei je drei Tieren der früh und spät behandelten Gruppen durch cardiale Punktion ca. 3 ml Vollblut gewonnen, um die Konzentration von PTK 787 im Serum festzustellen. Das in Eppendorf-cups umgefüllte Blut wurde bei 10.000 upm. zentrifugiert, das Serum abpipetiert und bei -20°C eingefroren.

Noch unter Narkose wurden alle Versuchstiere durch intrakardiale Injektion von 50 mg/ kg Pentobarbital getötet und ihre Hirne mittels Skalpell und Hohlmeißelzange

freigelegt. Der Tumor wurde dann zusammen mit dem zugehörigen Segment der ipsilateralen Hemisphäre entnommen. Im Falle von Gefrier(Kryo-) schnitten wurde das Gewebsblöckchen mit Tissue Tek[®] an einem kleinen Korkplättchen befestigt, danach wurde es in Isopentan, das mit flüssigem Stickstoff gekühlt wird, schockgefroren und sofort in den -80°C Schrank überführt.

Sollten Paraffinschnitte angefertigt werden, so wurden die Gewebeproben erst eine Woche in 5% Paraformaldehyd fixiert, dann in einem Einbettautomaten entwässert und schließlich in Paraffin eingebettet. Dafür wurde das Material in eine aufsteigende Alkoholreihe überführt (50, 70, 80, 96% EtOH für je 45 min, 2x 100% EtOH für je 60 min.). Anschließend kamen die Gewebestückchen in ein 1:1 Gemisch aus 100% EtOH und Chloroform, um dann zwei mal 30 Min. in reinem Chloroform zu inkubieren. Nach dem Einlegen der Gewebsblöcke in Paraffin für zwei mal zwei Stunden war der Einbettvorgang abgeschlossen und die Proben wurden endgültig in Kassetten eingegossen. Sowohl von kryo- als auch von paraffineingebettetem Gewebe wurden nach dem Schneiden $9\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt, die auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern aufgenommen, entweder für Hämatoxylin-Eosin- oder immunhistochemische Färbungen verwendet wurden.

3.3. Konventionelle Färbungen

3.3.1. Hämalaun-Eosin Färbung

Die Paraffinschnitte wurden zum Entparaffinieren zunächst für eine halbe Stunde in Xylol gegeben. Anschließend durchlief das Material eine absteigende Alkoholreihe, die aus dem Einstellen in Ethanol unterschiedlicher Konzentration und Dauer bestand (zweimal zwei Minuten 100% -igen, zweimal eine Minute 96% igen, je einmal 30 Sekunden 90- 80- 70- und 50% igen Ethanol). Vor dem eigentlichen Färbevorgang wurden die Paraffinschnitte kurz in Aqua dest. gestellt. Die Kryoschnitte, bei denen das Entparaffinieren entfällt, wurden ca. eine Stunde lang aufgetaut und getrocknet.

Die Färbung mit Hämalaunlösung dauerte bei Paraffinschnitten 15-30 sek., bei Kryoschnitten ca. 10 Min.. In beiden Fällen wurden die Schnitte mit Leitungswasser ca. zehn Minuten fließend gewässert. Nach Abstoppen der Reaktion in Aqua dest. wurde

das Material eine bis zwei Minuten (ca. 25 sek bei Kryoschnitten) in 1% iger Eosinlösung gegengefärbt. Danach wurden die Schnitte nach Spülung in Aqua dest. in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70%, 96% sowie 100%) entwässert. Schließlich wurde das Material für zehn Minuten in Xylol eingestellt und mit Eukitt eingedeckt.

3.4. Immunhistochemische Färbungen

3.4.1. Färben von VEGF Protein und CD 31 Protein mit Histostain® Kit.

Um das Protein VEGF im Gewebe nachzuweisen, wurden Paraffin und Kryoschnitte immunhistochemisch behandelt, während für die CD 31 Färbung nur Kryoschnitte verwendet wurden. Das CD 31 Protein kommt spezifisch auf Endothelzellen vor und kann somit für eine Endothelzellaufhellung verwendet werden. Nach Trocknung der Kryoschnitte (bzw. Entparaffinierung der Paraffinschnitte) wurde das Material 10 Min. lang in 4°C Aceton fixiert und nach Spülen in PBS unspezifische Bindungsstellen zweimal geblockt. Zuerst wurden die Schnitte 45 Sek. lang in ein Gemisch aus kurz vorher angesetztem Methanol und Wasserstoffperoxid (135 ml MetOH+ 15 ml H₂O₂) eingestellt. Nach gründlichem Waschen wurden die Objektträger mit Pferdeserum beträufelt. Nachdem das Serum abgelaufen, aber nicht abgewaschen war, wurden 50 µl Lösung mit Primärantikörper auf einen einzelnen Gewebeschnitt gegeben und eine Stunde in der feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Der Antikörper wurde im Falle des CD 31 1:20 und im Falle des VEGF 1:1000 in PBS verdünnt.

Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen und der Sekundärantikörper aufgetragen. Nach zehnmütiger Einwirkzeit wurden das Material erneut gewaschen und die Schnitte mit Enzymkonjugat benetzt. Nach weiteren zehn Min. wurden dieses wieder abgewaschen und frisch angesetzte DAB Reagenz aufgetragen. Während der Inkubationszeit von drei bis zehn Minuten sollte man den Färbeprozess kontrollieren und bei ausreichender Färbung mit Aqua dest. abstoppen. Die Schnitte konnten jetzt mit Hämalaun gegengefärbt und mit einem wasserlöslichem Eindeckmittel konserviert werden.

3.4.2. Apoptosefärbung mit In situ Cell Death Detection Kit AP Roche®

Die bei dieser Färbung verwendeten Kryoschnitte wurden zuerst in 4% PFA in PBS Lösung 30 Min. lang fixiert. Dann wurden die Objektträger nach gründlichem Waschen in PBS zwei Min. mit einer Permeabilisierungslösung behandelt, die aus 0,5 g Triton X in 500 ml 0,1% iger Natriumcitratlösung bestand. Anschließend wurde das Material dreimal mit PBS gewaschen. Um eine Positiv-Kontrolle zu erhalten wurden 1 mg/ ml DNase I und die gleiche Menge BSA in 50 mM TrisHcl ph 7,5 gelöst und einer der histologischen Schnitte zehn Min. bei Raumtemperatur mit dieser Lösung inkubiert. Hierbei werden die DNA-Strukturen so beschädigt, dass die entstehenden Fragmente denen apoptotischer Zellen so ähneln, dass diese Schnitte als Positiv-Kontrolle verwendet werden konnten. Das gebrauchsfertige Enzym wurde mit dem im Kit vorhanden Puffer gemischt (5 ml Enzym + 45ml Puffer/ Gewebeschnitt) und auf die gewaschenen Schnitte pipettiert. Für eine Negativ-Kontrolle wurde Puffer ohne Enzym aufgetragen. Nach der einstündigen Inkubation in feuchter Kammer bei 37°C wurden die Objektträger gründlich gewaschen und das Material mit einer gebrauchsfertigen Entwicklerlösung versehen. Diese wirkte 30 Min. bei 37°C auf die Präparate ein und bereitete diese auf den anstehenden letzten Schritt vor.

Einige Min. vor Ablauf dieser halben Stunde war die Substratlösung für den eigentlichen Färbeprozess anzusetzen. Dazu wurde eine im Kit enthaltene NTB/ BCIP Tablette in 10 ml Aqua bidest. gelöst, in das anschließend noch 10ml 1M Levamisol gegeben wurde. Diese Mischung wurde auf die gewaschenen Objektträger gegeben und der Fortgang der Färbung unter dem Mikroskop kontrolliert. Durch gründliches Waschen des Materials wurde die Färbung schließlich beendet und die Gewebeschnitte konnten mit Aquatex eingedeckt werden.

3.4.3. PCNA Färbung

Um die Zahl der Zellen, welche sich in Proliferation befinden von denjenigen abzugrenzen, die gerade nicht proliferieren, wurde eine PCNA Färbung durchgeführt. Nachdem die Paraffinschnitte wie oben beschrieben entparaffiniert und in Aqua dest. gewaschen waren, wurden die Schnitte in Zitronensäurelösung aufgeköcht (10 Min. im

Mikrowellenofen). Hat man das Material 15 Min abkühlen lassen und abermals in Aqua dest. gewaschen, wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Hasen-Normalserum (1:5 in PBS) geblockt. Nach 15 Min. wurde das Serum abgekippt und der Primärantikörper (mouse-anti-rat PCNA) in einer Verdünnung von 1:10 aufgetragen. Daraufhin inkubierte das Material bei RT in der feuchten Kammer eine halbe Stunde lang. Nachdem die Objektträger anschließend gründlich gewaschen waren, wurde der Brückenantikörper in Form von rabbit-anti-mouse (1:20 in PBS) aufpipetiert. 30 Min. später wurde nach abermaligem Waschen der enzymmarkierte Antikörper aufgetragen, welcher in hundertfacher Verdünnung ebenfalls ein halbe Stunde lang inkubierte. Nach Spülen des Materials wurden die DAB-Entwicklerlösung aufgetragen (ca. 100µl/ Schnitt) und unter Mikroskopkontrolle der Fortgang des Färbeprozesses beobachtet. Spätestens nach zehn Min. ist dieser durch Einstellen der Objektträger in Aqua dest. beendet worden. Die Schnitte wurden zuletzt mit Hämalaun gegengefärbt und eingedeckt.

3.5. Quantifizierung der Gefäßdichte, des Apoptoseindex, der Proliferationsrate

Um das Ausmaß der erfolgten Vaskularisation festzustellen, wurden die mit der CD-31 Färbung sichtbar gemachten Gefäße und Endothelzellsprosse von zwei unabhängigen Personen (Goldbrunner RH, Kiderlen MH) unter dem Lichtmikroskop quantifiziert. Dazu wurden sechs zufällig ausgewählte Gesichtsfelder (100x Vergrößerung), in denen nur vitales Tumorgewebe zu sehen war, ausgezählt. Sämtliche Tumoren waren am zwölften Tag nach Implantation entnommen worden. Bei der Auswertung der Apoptose wurden unter den gleichen Rahmenbedingungen die Zahl aller sichtbaren Zellkerne mit der Zahl aller in Apoptose befindlichen Zellen und so der prozentuale Anteil dieser Zellen ermittelt. Um den Proliferationsindex festzustellen, wurde auf gleiche Weise der Prozentsatz der PCNA positiven Zellen zur Gesamtzahl ermittelt. Der Zählunterschied zwischen beiden Begutachtern betrug in sämtlich Fällen weniger als 10%.

3.6. Nekroseindex

Um einen Eindruck von der Vitalität des Tumors und der Ausdehnung evtl. abgestorbener Areale zu erhalten, wurden die im Tumor vorhandenen Nekrosezonen quantifiziert. Dafür wurden HE-Schnitte gescannt (DeskScan II, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) und mittels eines Morphometrieprogrammes (INTAS, Göttingen) die Relation der Nekroseoberfläche zur Gesamtoberfläche bestimmt.

3.7. Statistische Auswertung

Für die Auswertung der MR-Volumetrie, der Vaskularisation sowie des Apoptose- und Proliferationsindexes wurde der Student's t-test verwendet. Ein p-Wert von $< 0,05$ galt als statistisch signifikant.

4. Ergebnisse

4.1. Sphäroidimplantation und PTK 787 Applikation

Sowohl die Implantation als auch die MR-Messungen wurden von allen Tieren gut toleriert. Abgesehen von einem Fall haben alle Tiere solide Hirntumoren entwickelt. Ebenso wurden im zwölf-tägigen Verlauf des Experimentes bei den täglichen Kontrollen weder neurologische Ausfallerscheinungen noch ein signifikanter Gewichtsverlust beobachtet. Somit wurde bei keinem Tier der Versuchsabbruch notwendig.

4.2. In vivo Gewebskonzentration von PTK 787

Bei den Gewebeprobe, die entweder aus Tumor inkl. des umgebenden Hirngewebes oder ausschließlich aus Tumorgewebe bestanden, wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) die im Gewebe vorhandene Konzentration ermittelt. Durchgeführt wurden diese Untersuchungen von Mitarbeitern der Fa. Novartis, Basel. Die HPLC wurde mit Hilfe eines Autosamplers (HTS PAL, CTC Analytics, Zwingen CH) in Verbindung mit einer Phoenix 40 Pumpe (CE Instruments, Mailand, I) durchgeführt. Die daran angeschlossene Elutionssäule wies eine Partikelgröße von 3µm auf. Das gewonnene Eluat wurde daraufhin in einem Massenspektrometer (ZMD detector, Waters Co., Milford USA) analysiert.

War im getesteten Gewebeblock neben Tumor- auch noch Hirngewebe vorhanden, wurde ein Wert von durchschnittlich 0,95 nmol/ g (0,28- 1,34) festgestellt, bei dem reinen Tumor-präparat lag die Konzentration von PTK 787 mit 4,14 nmol/ g (0,28- 13,72) wesentlich höher.

4.3. Einfluss der Gabe von PTK 787 auf die MR-Morphologie

Um den Einfluss des RTK-Inhibitors PTK 787 zu prüfen waren die Tumor tragenden Tiere auf drei gleich große Gruppen verteilt worden: Eine Gruppe bekam ab dem ersten Tag nach Implantation PTK 787 oral verabreicht. Die zweite Gruppe erhielt das

Medikament ab dem siebten postoperativen Tag, während die dritte Gruppe unbehandelt als Behandlungskontrolle fungierte.

Die Tumoren der unbehandelten Ratten zeichneten sich durch starkes Wachstum aus, verbunden mit der Verdrängung benachbarter Strukturen. So waren z.B. die Ventrikel kaum mehr sichtbar und die symmetrische Mittellinie des Gehirns ist zur Gegenseite verlagert. In T2-gewichteten Aufnahmen fanden sich Hinweise auf intratumorale Nekrosen und Einblutungen, die sich in Form von hypo- und hyperintensivem Resonanzsignal manifestierten. Ein ausgedehntes perifokales Ödem sowie eine inhomogene Aufnahme von Kontrastmittel weisen schließlich auf den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke sowie auf die starke Vaskularisierung des Tumors hin.

Waren die Tiere mit PTK 787 behandelt worden, so änderte sich die im NMR sichtbare Morphologie deutlich. Die Tumoren waren im Falle der frühzeitigen Behandlung (POD 1-12) wesentlich kleiner. Masseneffekt, perifokales Ödem und Kontrastmittelaufnahme kaum sichtbar. War den Ratten erst nach einer Woche (POD 7-12) PTK 787 appliziert worden, so waren o.g. morphologische Kriterien zwar geringer ausgeprägt als bei Kontrolltieren aber deutlicher zu sehen als in der POD 1-12 -Gruppe. (Abb.4).

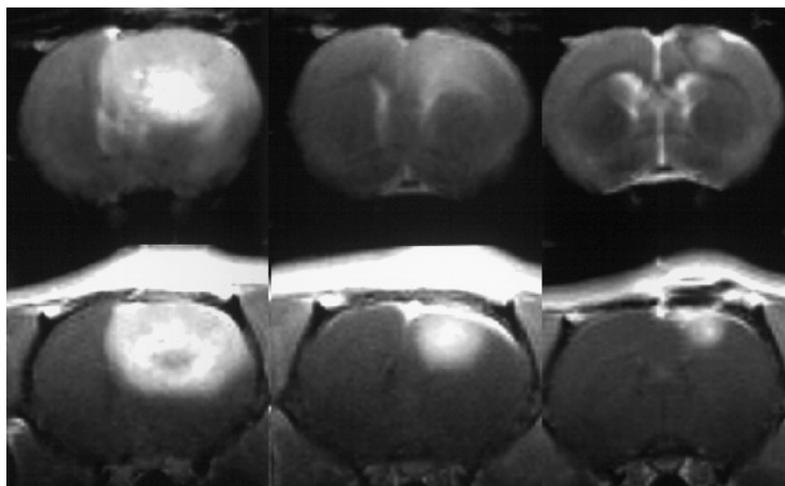


Abb. 4: MR-Aufnahmen der Tumoren am POD 12 in T1 Wichtung (oben) mit KM; T2 Wichtung unten. Links: Kontrolle. Mitte PTK 7-12. rechts: PTK 1-12

4.4. Einfluss von PTK 787 auf die Tumorumfolumina

Sämtliche Tumoren wurden am zwölften Tag nach der Implantation im MR gemessen, die Tumoren in allen drei Schnittebenen manuell markiert und die zugehörige Größenausdehnung berechnet.

Die Tumorumfolumina der früh (POD 1-12) behandelten Tiere unterschieden sich bei der MR-Volumetrie deutlich von den spät (POD 7-12) behandelten Tieren sowie den unbehandelten Kontrollen. Die späte Applikation von PTK 787 führte zu einer Größenreduktion von 37 %, frühe Applikation zu einer Reduktion von 71% ($p < 0,05$) gegenüber unbehandelten. Ein VEGF(-) Zellklon diente als Positivkontrolle. Wie in Abb.5 ersichtlich waren früh behandelte Tumoren gleich groß wie Tumoren, die durch Transfektion nicht zur Produktion von VEGF im Stande waren. Im Falle des VEGF(-) hatte die Gabe von PTK 787 keinen Effekt.

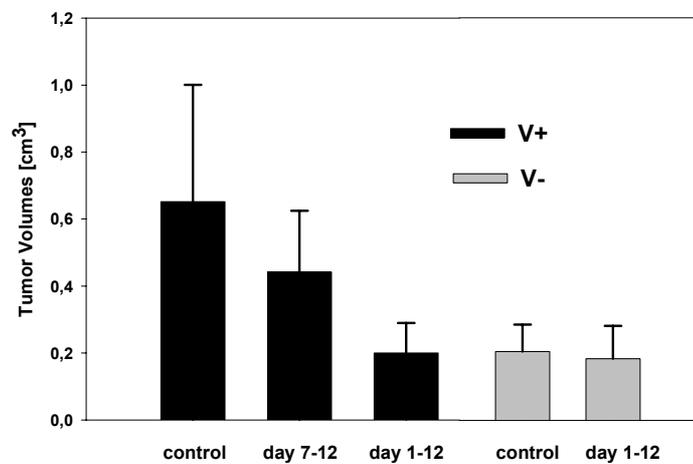


Abb.5: Tumorumfolumina der unterschiedlichen Behandlungsgruppen nach 12 POD

4.5. Einfluss von PTK 787 auf die Apoptoserate in den Tumoren.

Unter Apoptose wird der genetisch programmierte Zelltod verstanden, der eine natürliche Form der Zellmauserung darstellt, aber auch unter pathologischen Bedingungen erhöht sein kann.

Wie in Abb.6 dargestellt betrug Rate der Tumorzellen, die in Apoptose gingen, bei den früh behandelten Ratten 16%, bei den spät behandelten Ratten 20% und bei den unbehandelten Kontrolltieren 15%. Somit konnte eine signifikante Auswirkung der Gabe von PTK 787 auf die Induktion des programmierten Zelltodes nicht nachgewiesen werden.

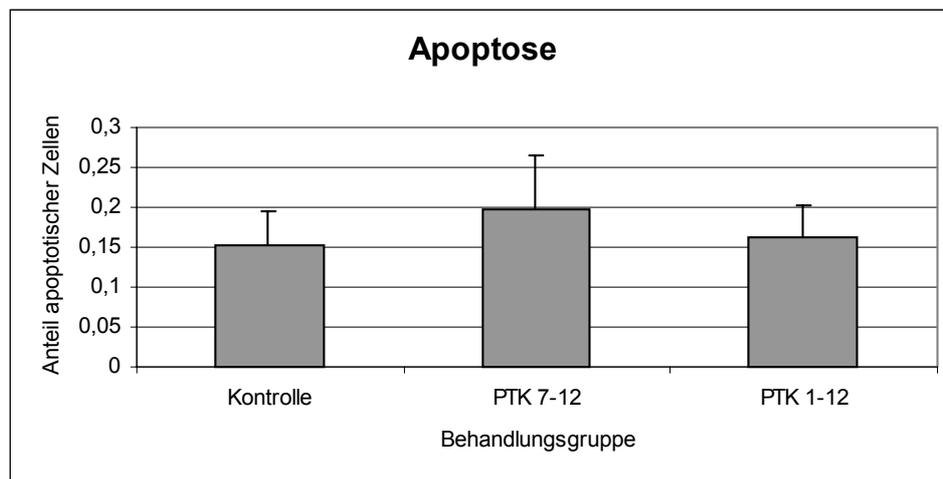


Abb.6: Apoptosenrate der unterschiedlichen Behandlungsgruppen nach POD 12

4.6. Einfluss von PTK 787 auf die Gefäßdichte der Tumoren –

Bereits in der morphologischen Betrachtung der CD31-Färbung waren bei den unbehandelten Kontrollen große, zellreiche, stark vaskularisierte und vitale Tumoren sichtbar. In spät- und vor allem in früh behandelten Tumoren waren neben einer augenscheinlich geringeren Vaskularisierung auch ausgeprägte Nekrosen sichtbar (Abb.8).

Gliome früh behandelte Tiere wiesen bei der CD31-Färbung mit einer durchschnittlichen Gefäßzahl von 30 im Gesichtsfeld (bei 100-facher Vergrößerung)

einer niedrigere Vaskularisation auf als Gliome spät behandelte Tiere (39) und den Tumoren von Ratten, die kein PTK 787 erhalten hatten (53). Die Hemmung der VEGF-Rezeptoren hemmt also deutlich die pathologische Neovaskularisation der Hirntumoren bei den Versuchstieren. Dieser Effekt wird um so deutlicher, je früher der zu Grunde liegende angiogene Mechanismus unterbunden wird (Abb.7).

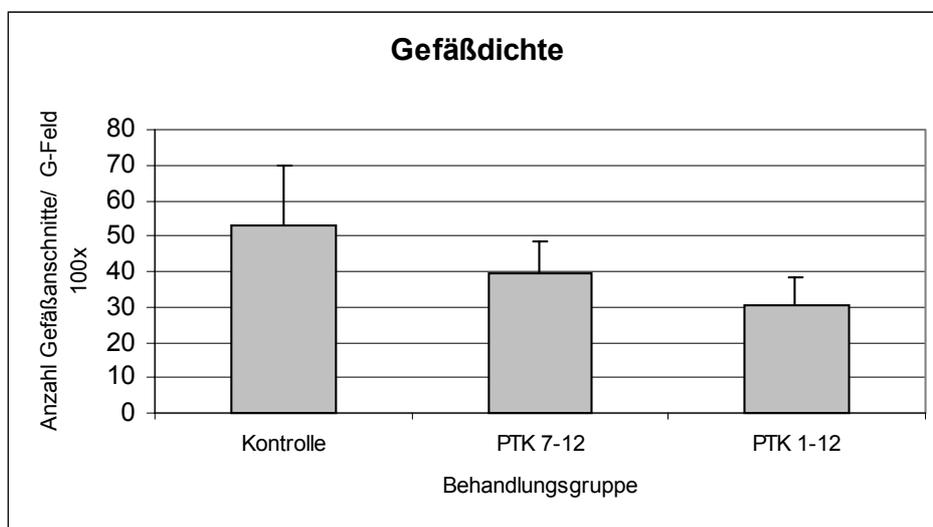


Abb.7: Gefäßdichte der unterschiedlich behandelten Tumoren nach POD12

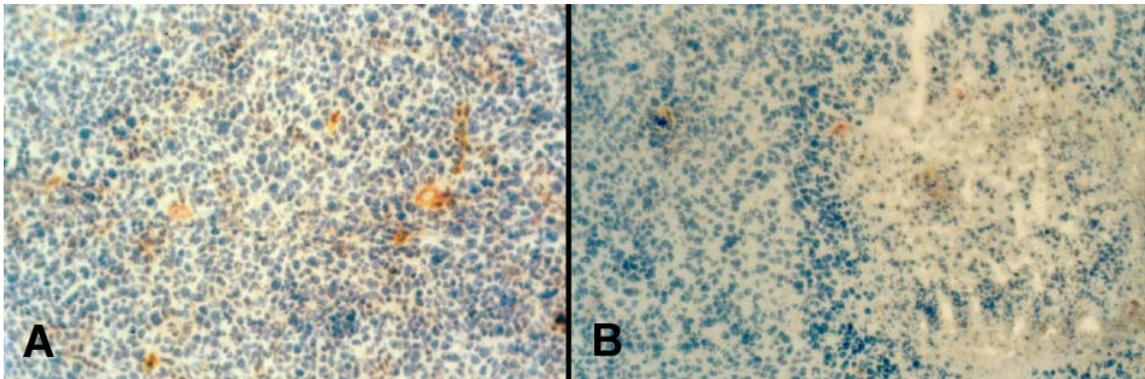


Abb. 8: CD 31 Färbung; A: Tumorgewebe von Kontrolltieren mit zahlreichen Gefäßanschnitten. B: Tumorgewebe (PTK 1-12) mit deutlich schwächerer Vaskularisation. Zusätzlich sind in der rechten Bildhälfte nekrotische Gewebsanteile zu erkennen

4.7. Einfluss von PTK 787 auf die Zahl der proliferierenden Gliomzellen

Wie durch PCNA-Färbung (Abb.10) festgestellt, hemmte die Gabe von PTK 787 ab dem ersten postoperativen Tag die Zahl der proliferierenden Zellen im Tumor signifikant um 89% ($p < 0,05$) verglichen mit den Kontrolltieren. Wurde das Medikament erst später verabreicht, so sank der Anteil der in Proliferation befindlichen Zellen noch um 72%, was ebenfalls noch einen hoch signifikanten Effekt darstellt.

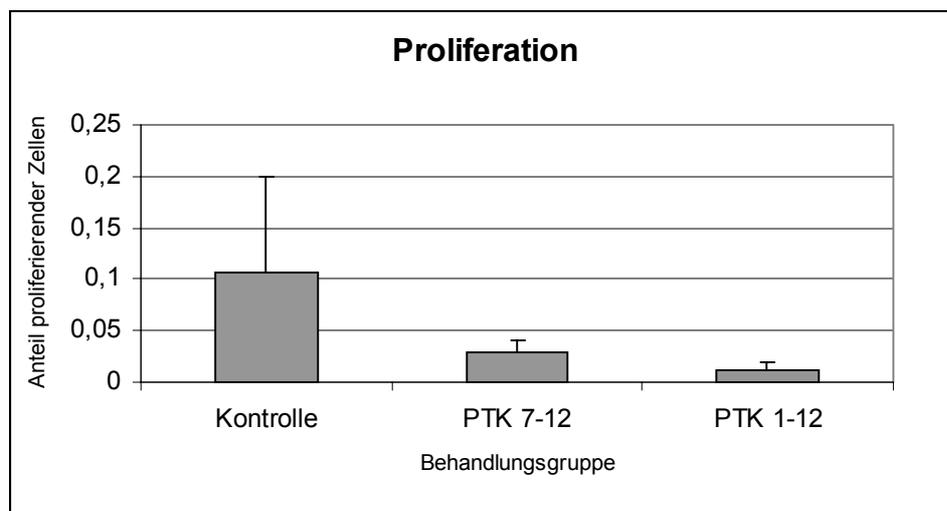


Abb.9: Proliferationsrate der unterschiedlich behandelten Tumoren nach POD 12

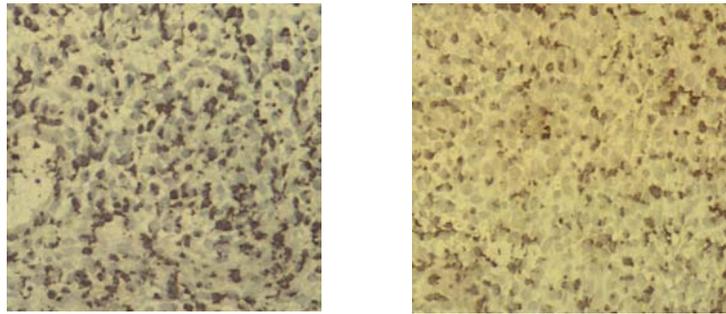


Abb.10: Rechts: Starke Proliferation (schwarz gefärbte Zellen) bei unbehandelten Tieren. Links: Deutlich geringerer Anteil proliferierender Zellen bei PTK 1-12.

4.8. Einfluss von PTK 787 auf den Nekroseindex

Im Falle des Nekroseindexes werden die Flächen der als Tumor bzw. als Tumornekrose identifizierten Areale miteinander verglichen. Die histologischen Schnitte wurden dafür eingescannt und mit Hilfe eines Morphometrieprogrammes ausgewertet. Wurde PTK 787 den Versuchstieren bereits frühzeitig appliziert (POD 1), so führte das zu einer Vergrößerung abgestorbener Tumorareale um das 1,6 Fache, verglichen mit unbehandelten Tieren. Die verspätete Gabe von PTK 787 führte hingegen zu keiner Ausweitung nekrotischer Gebiete im Tumor. (Abb.8)

5. Diskussion

5.1. Bedeutung von VEGF

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen ist ein Zusammenhang zwischen der Gabe von PTK 787, dem VEGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor, und dem Tumorwachstum eindeutig nachzuweisen. Bei den Versuchstieren, die mit der PTK 787 ab POD 1 behandelt wurden, traten signifikant kleinere Tumoren als bei den spät bzw. nicht behandelten Tieren auf.

Ist der VEGF-Signaltransduktionsweg durch die Medikation besonders früh gehemmt worden, so waren in diesen Tumoren besonders wenig Gefäße, wie durch die CD31-Färbung gezeigt. Die Volumina dieser Tumoren bewegten sich dann auch in der Größenordnung von C6-Gliomen, bei denen durch VEGF-antisense Transfektion dieser Faktor von Beginn an nicht exprimiert wird [GOLDBRUNNER 2000a]. Ein derartiger Tumor sollte bei einer Behandlung mit PTK 787 auch keine Veränderungen aufweisen. Übereinstimmend mit anderen Studien wurde also auch hier der Zusammenhang zwischen am Rezeptor aktiven VEGF und dem Grad der Vaskularisierung nachgewiesen. Der „angiogene switch“, also der Zeitpunkt, bei dem im Zusammenspiel von pro- und anti-angiogenen Substanzen erstere das Übergewicht gewinnen und die Vaskularisation beginnt, tritt zwar auch bei behandelten Tieren ein, allerdings in weniger stark ausgeprägten Form.

VEGF und andere Faktoren, welche die Balance zugunsten der Neo-Angiogenese verschieben, werden parakrin von den Tumorzellen freigesetzt, um u.a. Endothelzellen zu aktivieren und die Angiogenese einzuleiten. Der wichtigste Stimulus für die Freisetzung ist Hypoxie des Tumorgewebes.

Neben dieser hypoxie-getriggerten Hochregulation von VEGF geht die Angiogenese in Glioblastomen auch mit einer deutlichen Hochregulation der entsprechenden VEGF-Rezeptoren einher. Schon die kleinen Mengen VEGF, die von den wenigen initial vorhandenen Tumorzellen ausgeschüttet werden, reichen aus, um die Zahl der VEGFR-2 auf den Tumorendothelien zu erhöhen.

Die Ausschüttung von VEGF scheint bei der Neovaskularisation ein Art Starterfunktion zu verrichten [KREMER 1997]. Gewöhnliche Endothelzellen befinden sich nur zu etwa 0.01% in Proliferation. Tumorendothelien sind mit ca. 12 % um Größenordnungen teilungsfreudiger [KLEIHUES 1997b].

Bei in vitro Versuchen wurde zudem festgestellt, dass auch Endothelzellen in der Lage sind, VEGF zu exprimieren. Somit besteht die Möglichkeit, dass aktivierte Endothelzellen durch eine eigene VEGF-Produktion ihre Aktivität autokrin steigern [CASTILLA 2000]. Über welche Stimuli dieser Effekt gesteuert wird, ist allerdings noch unklar. Ein weiterer "autokriner Loop" besteht evtl. bei den Tumorzellen. Auf den Oberflächen verschiedener Malignomzellen, auch von Gliomzellen konnten VEGF-Rezeptor-Isoformen nachgewiesen werden. Somit besteht die Möglichkeit einer autokrinen Stimulation der Gliomzellen. Es bleibt jedoch noch zu klären, welche funktionellen Effekte diese Stimulation der Gliomzellen bewirkt [HEROLD-MENDE].

Neuere Ergebnisse der Gruppe BERGERS ET AL. stellen den angiogenen switch in einen etwas weiteren Zusammenhang. Sie wiesen nach, dass VEGF und seine Rezeptoren getrennt auch in gesundem Gewebe stark vertreten sein können und dass besonders der VEGF-Rezeptor-Komplex praktisch nur in bereits angiogenem Gewebe zu finden ist. Folglich müsste in angiogenem Gewebe eine Substanz vorliegen, welche die Affinität des VEGF zum Rezeptor deutlich erhöht und somit für die angiogene Wirkung von VEGF notwendig ist. Inzwischen gibt es Befunde, dass die Matrixmetalloproteinase 9 (MMP9), ein gewebsabbauendes Enzym, als wichtiger Kofaktor diese Bindung von VEGF zu seinem Rezeptor stark positiv beeinflusst.

Ist die Gefäßneubildung aber schon länger aktiv, so ist der VEGF-Rezeptor-Komplex auch in Abwesenheit von MMP9 zu finden [BERGERS 2000]. Vermutlich ist der Tumor dann mittlerweile in der Lage, die begonnene Vaskularisation auch ohne MMP9 fortzusetzen. Autokrinen Mechanismen könnte dabei eine entscheidende Rolle zukommen.

5.2. Wirkungen von PTK 787

In unseren Versuchen wurde gezeigt, dass PTK787 signifikant das Wachstum von C6-Gliomen hemmt, und zwar um so mehr, je früher das Medikament verabreicht wurde. Wie oben ausgeführt, konnte nach Gabe ab POD 1 der VEGF-vermittelte Wachstumseffekt vollständig ausgeschaltet werden. Dem liegen zwei Effekte zu Grunde: Zum einen beruht dies vor allem auf der geringeren Gefäßversorgung der behandelten Tumoren, während zum anderen auch die festgestellte geringere Proliferationsrate ein vermindertes Tumorstadium bedingt. Die Erklärung für letztere Aussage könnte neben dem Epiphänomen der geringeren Proliferation durch schlechtere Gefäßversorgung auch ein direkter Einfluss von PTK 787 auf die Tumorzellen sein.

GOLDBRUNNER ET AL. konnten 1999 nachweisen, dass C6-Zellen auch *in vitro* durch die Anwesenheit von PTK 787 in ihrer Teilungsfrequenz gehemmt werden. Eventuell weist PTK 787 auch noch einen zytotoxischen/ -statischen Nebeneffekt auf, da die Tumorzellen unter *in vitro* Bedingungen gar nicht auf die VEGF vermittelte Angiogenese angewiesen sind und in einer Monolayer Kultur Nährstoffe ausreichend vorliegen. Auch bei anderen an der Angiogenese beteiligten Faktoren konnte ein direkter zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden. Angiostatin, das ursprünglich als ein Endothelzellwachstumshemmer identifiziert wurde, hat einen direkt auf die Tumorzellen wirkenden Effekt. In *in vitro* Versuchen konnte hier ein anti-proliferativer Effekt auf C6-Rattengliomzellen nachgewiesen werden. [KIRSCH 1998]

Gegen eine zytostatische Nebenwirkung spricht, dass in den Versuchen die Gabe von PTK 787 keinen Einfluss auf den Anteil apoptotischer Zellen im Tumorgewebe hatte.

5.3. Die Sphäroidimplantation als *in vivo* Tumormodell

Um bessere Einblicke in Induktion und Ablauf der Angiogenese von Gliomen zu erhalten, wurde in den letzten Jahren eine Anzahl neuer Tumormodelle entwickelt. Um allerdings möglichst viele Rückschlüsse auf den Fortgang der Angiogenese im humanen Gliomen ziehen zu können, sind einige wichtige Vorgaben zu beachten [GOLDBRUNNER, 2000b]:

1. Die implantierten Tumoren sollten glialer Herkunft sein.

2. Die Tumorzellen sollten orthotop implantiert werden und das Wachstum in eben diesem Milieu erfolgen.
3. Die Wachstumsraten sollten vorhersagbar und reproduzierbar sein.
4. Wachstum und Vaskularisation der implantierten Gliome sollten dem klinischer Gliome entsprechen.
5. Um Therapiestudien durchzuführen muss der Tumor lange genug vom Wirtstier toleriert werden.
6. Durch das Tiermodell herbeigeführte immunologische Reaktionen müssen minimiert sein.
7. Eine Möglichkeit zur *in vivo* Kontrolle von Wachstum und Vaskularisation sollte gegeben sein.

Die in den Versuchen implantierten C6-Sphäroide stellen ein rattenspezifisches Gliom dar und werden orthotop ins Frontalhirn eingepflanzt. Werden Tumorzellen ektop implantiert, wie z.B. in die Flanke, so sind die Ergebnisse weniger verlässlich als in einem orthotopen Modell [FIDLER 1994]. Da Gliome ein sehr organspezifisches Wachstums- und Invasionsverhalten aufweisen, sollten bei der Forschung an Hirntumoren orthotope Tiermodelle zur Anwendung kommen. Die Implantation von Sphäroiden birgt gegenüber dem stereotaktischen Einspritzen von Tumorzellsuspensionen weitere Vorteile. Sphäroide sind dreidimensionale Tumoren, die in einer standardisierten, reproduzierbaren Größe implantiert werden. Sie bleiben in vollen Umfang am Implantationsort und können nicht wie Zellsuspensionen teilweise aus dem Gewebe gespült werden. Wie in einem *de novo* entstandenen Primärtumor erhalten die inneren Zellen wenig Sauerstoff, was sie im Gegensatz zu primär verstreut im Gewebe liegenden Tumorzellen schon zu einem früheren Zeitpunkt angiogene Botenstoffe produzieren läßt.

Mit der Möglichkeit der *in vivo* Kontrolle des Tumorwachstums und der ausreichenden Versuchsdauer, um therapeutische Effekte nachzuweisen, erfüllen die Versuche zwei weitere wichtige Vorgaben für Hirntumor-Modelle. Generiert wurden die verwendeten C6-Zellen allerdings in einem Ratten-Auszuchtstamm (Wistar). Die Implantation erfolgte hingegen in Sprague-Dawley-Ratten. Das verwandte Modell ist zwar spezies-spezifisch, jedoch kein syngenes Tumormodell. Somit sind auch für die durchgeführte

Studie immunologische Abstoßungsreaktionen der Wirtstiere gegen den nicht syngenen Tumor anzunehmen. Da allerdings alle Tiere einen Tumor entwickelten, scheint diese Abstoßungsreaktion zumindest im Untersuchungszeitraum noch moderater Natur zu sein. Das für die Abstoßungsreaktion relevante Auftreten von CD8-positiven T-Lymphozyten ist in dem verwendeten Modell nur sehr gering ausgeprägt [GOLDBRUNNER 2000a]. Nimmt aber die Immunreaktion im Laufe der Studiendauer zu, so wird der Einfluss der immunologischen Reaktion auf das Tumorstadium bzw. die Tumorgöße so groß, dass eine Aussage über die anti-angiogene Wirkung der von PTK 787 nach längerer Zeit nicht mehr möglich ist. Da alle Gruppen der gleichen Immunantwort unterliegen und diese –wie ausgeführt– gut tolerabel ist, können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, welche die Zeitspanne vom 12 Tagen umfasst, vom immunologischen Standpunkt als valide aufgefasst werden. Wenn Überlebensdaten auch nach einer lang andauernden Behandlung ermittelt werden sollen, so ist es sinnvoll, die Immunreaktion durch invasive Maßnahmen wie Thymektomie oder durch die Gabe von Immunsuppressiva zu hemmen.

5.4. Möglichkeiten der anti-angiogenen Tumorthherapie

Als J. FOLKMAN 1971 die Hypothese belegte, dass ein Tumor sich mit Gefäßen versorgen muss, wenn er über die Größe einiger mm^3 hinaus wachsen will, war die Grundlage der anti-angiogenen Krebstherapie gelegt. Diese These, die mittlerweile durch eine Vielzahl von Studien bestätigt wurde, implementiert auch, dass es möglich ist, einen Tumor durch Blocken der Neovaskularisation gleichsam "auszuhungern". Nach Meinung Folkman müsste sich der Tumor eines angiogenen Stimulus bedienen, um neue Gefäße zu rekrutieren. Eine Vielzahl von pro- und anti-angiogenen Substanzen wurde inzwischen gefunden. Von diesen Faktoren stellt VEGF denjenigen dar, der am häufigsten in Tumoren in erhöhter Konzentration auftrat. Verglichen mit normalem Hirngewebe wird VEGF in Glioblastomen 50 mal mehr exprimiert [PLATE 1999].

Mehrere Argumente sprechen dafür, die Gefäßversorgung eines Tumors als therapeutisches Ziel zu wählen. Zum einen sind alle soliden Tumoren und selbst viele Leukämien von Angiogenese abhängig, zum anderen sind die ins Visier genommenen Endothelzellen normale, genetisch stabile Zellen, die weniger als die Tumorzellen dazu

neigen, Resistenzen gegen die medikamentöse Behandlung zu entwickeln. Also muss eine anti-angiogene Therapie endothelzellspezifisch sein und auch Tumorgefäße von normalen unterscheiden. Wie oben beschrieben, proliferieren Tumorendothelien stark, während sich normales Gefäßendothel fast gar nicht teilt. Dieser Unterschied in der proliferativen Aktivität bietet eine Möglichkeit der Diskrimination normaler von pathologischen Endothelzellen. Tumorgefäße sind zudem in Funktion und Struktur anormal. Neben unterschiedlich großem Durchmesser, chaotischer Anordnung usw. weisen sie auch in Ihrer Mikrostruktur große Veränderungen auf. Die Gefäßwände sind löchrig, die Räume zwischen den Endothelzellen sind geweitet, und die Basalmembran ist nur diskontinuierlich ausgeprägt oder fehlt ganz [CARMELIET 2000]. Die Unreife der Tumorgefäße und die damit verbundene Abhängigkeit von spezifischen Reifungsfaktoren könnten diese daher einer selektiven Therapie zugänglich machen.

Tumor- und bereits etablierte normale Gefäße unterscheiden sich auch auf molekularer Ebene. Neben den beschriebenen VEGF-Rezeptoren sind u.a. auch $\alpha\beta3$ - und $\alpha\beta5$ -Integrine auf angiogenen Gefäßen überdurchschnittlich stark vertreten. Auch sie könnten ein Ziel für eine entsprechende Therapie bieten [KESHET1999].

Bei vorklinischen Studien kam mit VEGF neutralisierenden Antikörpern, löslichen VEGF-Rezeptoren 1+2 oder den Inhibitoren der VEGF-R2-Rezeptortyrosinkinasen bereits eine Anzahl unterschiedlicher VEGF-Antagonisten zum Einsatz. Da Ergebnisse vielversprechend waren, werden nun vier Medikamente im klinischen Bereich getestet: Drei der Substanzen blocken VEGF-Rezeptoren (z.Zt. Phase I/ II), eine besteht aus einem VEGF-neutralisierenden Antikörper [SCHLAEPPI 1999, KIM 1993, ANGELOV 1999, WOOD 2000].

Neben dem Inhibieren des beschriebenen Signaltransduktionsweges besteht auch die Möglichkeit, unabhängig von VEGF und vergleichbaren angiogenen Faktoren direkt die Endothelzellen selbst anzugreifen. Bei Thalidomid, einem Medikament, das vor Jahren durch starke Teratogenität aufgefallen war, konnte in Tierversuchen ein anti-angiogener Effekt nachgewiesen werden. Ebenso scheinen Substanzen wie das von *Aspergillus Fumigatus* gebildete TNP-470, das Combrestatin A4 Phosphate (CA4P) sowie auch Angiostatin und Endostatin geeignet zu sein, die Gefäßversorgung von Tumoren zu verschlechtern. Bei den beiden letztgenannten handelt es sich um endogen, durch

Abspaltung von den Vorläufersubstanzen Plasminogen und Collagen XVIII produzierte Agenzien. Bei Substanzen entfalten ihre Wirkung nur auf Endothelzellen. Angiostatin hemmt Proliferation und induziert Apoptose dieser Zellen. Zusätzlich wird auch die VEGF-Signaltransduktion gehemmt. Endostatin lässt hingegen den VEGF-Pathway unbeeinflusst und führt bis zu einer 15-30-fachen Erhöhung der Apoptoserate in Endothelzellen, bedingt durch eine geringere Expression anti-apoptotischer Proteine [SIM 2000].

Neben den Endothelzellen haben auch andere Gefäßkomponenten Einfluss auf die Angiogenese –und bieten auch Ansatzpunkte für eine anti-angiogene Therapie.

Stoffe, die Wachstum und Migration von glatten Muskelzellen bzw. deren Interaktion mit dem umgebenden Extrazellulärraum hemmen, gehören zu dieser Gruppe. Wie in Kapitel 1.2.1. erörtert, stellt der Tie2-Rezeptor in Verbindung mit Angiopoietin 1 einen wichtigen Faktor für die Aktivierung glatter Muskelzellen und Pericyten dar. Bindet Angiopoietin 2 an diesen Rezeptor, so hat das einen gegenteiligen Effekt. Beide Mechanismen gemeinsam modulieren die eigentliche Gefäßneubildung [HOLASH 1999]. Alle an diesem Beispiel beteiligte Faktoren sind bei Glioblastomen verstärkt nachzuweisen und die Gabe von Tie 2-Hemmern z.B. in Form von löslichen Tie 2 Rezeptordomänen konnte Tumorwachstum und –vaskularisation von Mammacarcinomen bei der Ratte signifikant hemmen [STRATMANN 1998, LIN 1997].

Ein typisches Charakteristikum der Angiogenese stellt die Fähigkeit der Endothelzellen und glatten Muskelzellen in Richtung eines humoralen Stimulus zu migrieren dar. Um den Weg durch die ECM zu bahnen, werden mehrere Mechanismen angewandt. Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sowie Serin-Proteasen sind in Gliomen von besonderer Bedeutung. Um die Endothelzellen an ihrem pathologischen Fortkommen durch die ECM zu hindern werden bereits Hemmer der o.g. Enzyme in klinischen Versuchen getestet [VINAYKUMAR 2000]. Für den MMP-Hemmer Marimastat konnte zwar in Phase II Studien ein positiver Effekt gezeigt, eine Verbesserung der Überlebensrate bei u.a. Gliomen in Phase III Studien allerdings noch nicht bestätigt werden [STEWARD 2000].

Neben den beschriebenen Substanzen wird allerdings noch eine ganze Reihe anderer in der anti-angiogenen Tumorthherapie bei Gliomen eingesetzt. Aber auch bei der

Untersuchung der Wirkung von Retinoiden von TNF- α oder Interferonen müssen endgültige Ergebnisse noch abgewartet werden.

Sicher ist indes, dass die anti-angiogene Therapie in den kommenden Jahren bei verschiedensten Malignomen eine große Rolle in der Klinik spielen wird [NELSON 1998, GRADISHAR 1997].

5.5. Klinischer Einsatz der anti-angiogenen Tumorthherapie- ein Ausblick

Das Konzept, nicht den Tumor selbst, sondern seine Gefäßversorgung anzugehen, unterscheidet sich deutlich von den traditionellen Therapieformen. Hier dienen nicht maligne Endothelzellen als Ziel einer medikamentösen Therapie. Eine hohe Toxizität der Therapie wird dadurch unwahrscheinlich, dass Angiogenese beim Erwachsenen nur sehr begrenzt vorkommt (z.B. Wundheilung) und somit dieser Mechanismus weitgehend spezifisch für Tumoren ist. Endothelzellen sind über die Gefäße gut zu erreichen, die Blut-Hirn-Schranke stellt kein Hindernis dar.

Dennoch bleibt die anti-angiogene Therapie eine zytostatische Behandlungsweise. Wie auch unsere Daten nahelegen, kann malignes Wachstum zwar verlangsamt oder sogar gestoppt, ein bereits etablierter Tumor jedoch nur schwerlich verkleinert werden. Im Falle der Gliome bietet sich daher die Therapie eher für die Rezidivprophylaxe nach erfolgter Resektion an. Eine Eradikation von Tumoren ist durch die alleinige Gabe von anti-angiogenen Substanzen wahrscheinlich nicht zu erreichen. Eine entsprechende Behandlung müsste außerdem sehr lange dauern. Viele angiogene Pathways könnten zudem auch wichtige physiologische Funktionen erfüllen und eine Hemmung dieser könnte auf lange Sicht Nebenwirkungen nach sich ziehen. Auch der Einfluss von VEGF auf neuroregenerative Mechanismen ist noch weitgehend unklar.

Da die Gefäßeinsprossung z.B. in Bereichen der Wundheilung, Schwangerschaft, Reperfusion nach ischämischen kardialen Erkrankungen und anderer notwendig ist, könnten sich auch in diesem Falle Einschränkungen für die Gabe entsprechender Substanzen ergeben.

Schließlich bleibt die Frage, wie sich die Blockade eines angiogenen Pathways auf die anderen bei der Angiogenese beteiligten Mechanismen auswirkt. Ist der hemmende

Effekt von Dauer oder werden alternative Signaltransduktionswege hochreguliert und wird so die therapeutisch beabsichtigte Wirkung abgeschwächt?

Trotz all dieser Einschränkungen wird in den kommenden Jahren die anti-angiogene Therapie- insbesondere in Kombination mit anderen u.a. zytotoxischen Chemotherapeutika einen großen Stellenwert bei der Behandlung von Gliompatienten erhalten. Es besteht berechtigte Hoffnung darin, dass in Zukunft eine sorgfältig ausgewählte Kombination zytotoxischer/ zytostatischer Therapeutika auf der einen sowie anti-angiogener Substanzen auf der anderen Seite einen malignen Tumor wie das Glioblastom dauerhaft bekämpfen kann . [PUDUVALLI 2000].

Die hier vorgestellten Ergebnisse konnten die Effektivität des anti-angiogen wirksamen Tyrosinkinaseinhibitors PTK 787 / ZK 222584 in einem präklinischen Gliommodell verdeutlichen. Eine erste Phase I Studie an Patienten mit Glioblastomen hat bereits begonnen. Die vorliegende Datenlage weist darauf hin, dass diese Substanz in absehbarer Zeit einen wertvollen Beitrag in der Therapie von Patienten mit malignen Gliomen leisten kann.

6. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses des für den VEGFR-2 spezifischen RTK-Inhibitors PTK 787 auf Angiogenese und somit Wachstum maligner Gliome in einem orthotopen Tiermodell. Verwendet wurden hierbei C6-Rattengliomzellen aus denen durch retrovirale Transfektion von VEGF cDNA in sense Richtung ein stark VEGF exprimierender Zellklon generiert wurde. Hierdurch konnte ein Modell entwickelt werden, in welchem die VEGF-abhängige Angiogenese eine besondere Rolle spielt und in dem Interferenzen mit dem VEGF / VEGF Rezeptor-System besonders gut erfasst werden können.

Aus diesen Zellen wurden ca. 300µm große Tumorsphäroide hergestellt, welche den Ratten in den Kortex des linken Frontallappens implantiert wurden. Um unterschiedliche klinische Situationen wie Zustand nach Resektion oder primär vorhandener solider Tumor, zu simulieren, wurden die Versuchstiere in mehrere Gruppen unterteilt.

Die Negativ-Kontrollgruppe erhielt kein PTK 787, während andere vom ersten bzw. siebten Tag nach der Implantation an die Substanz verabreicht bekamen.

Als Positivkontrolle dienten Tiere, welchen VEGF negative Tumoren implantiert wurden.

Abhängig von der Gabe eines Tyrosinkinase-Rezeptorblockers, der oral bioverfügbar ist, konnte eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums im Versuchszeitraum von 12 Tagen nach der Implantation nachgewiesen werden .

Hatten die Tiere PTK 787 bereits ab POD 1 erhalten, waren die Tumoren um 71% kleiner als bei Kontrolltieren.

Verspätete Applikation der Substanz (POD 7-12) hatte noch eine Reduktion der Tumorgröße von 37% zur Folge ($p < 0,05$).

Der Grad der Vaskularisierung sank um 44% bei früh und 27% bei spät behandelten Tieren gegenüber unbehandelten Kontrollen ($p < 0,05$).

Dazu kommt, dass die Rate der proliferierenden Zellen stark um 89% und 72% ($p < 0,05$). sank. Etwaige Auswirkungen von PTK 787 auf die Apoptoserate der im Tumor befindlichen Zellen konnten hingegen nicht nachgewiesen werden.

Durch die Behandlung mit PTK 787 wurde also zum einen die Vaskularisationsrate der Tumoren herabgesetzt, zum anderen befanden sich in diesen Tumoren auch weit weniger Zellen in Stadien der aktiven Teilung. Vermutlich bedingen diese beiden Vorgänge den ausgeprägten Wachstum hemmenden Effekt.

7. Abkürzungsverzeichniss

| | |
|-------|---|
| A.d. | Aqua dest. |
| Ang. | Angiotensin |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| °C | Grad Celsius |
| CISS | constructive interference in steady state |
| DMEM | Dulbecco`s modified Eagle`s medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ECM | Extrazelluärmatrix |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzyme linked immune sorbent assay |
| FCS | fetal calf serum |
| GBM | Glioblastoma multiforme |
| HPLC | high pressure liquid chromatography |
| i.m. | intramuskulär |
| kDa | Kilodalton |
| µm | Mikrometer (10^{-6m}) |
| MMP | Matrix-Metalloproteinasen |
| mRNA | messenger-RNA |

| | |
|---------------|---|
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| NMR | nuclear magnetic resonance |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NO | Stickoxid |
| PBS | phosphat buffered Saline |
| PDGF | platelet derived growth faktor |
| PIGF | plazenta growth factor |
| POD | Tag(e) nach Implantation |
| PTK 787 | auch: ZK 222584, Kürzel des in den Versuchen verwendeten Tyrosinkinaseinhibitors der Fa. Novartis |
| rpm | rounds per minute |
| RTK | Rezeptor Tyrosinkinase |
| TKI | Tyrosin Kinase Inhibitor |
| TNF- α | Tumor Nekrose Faktor α |
| TNP-470 | O-(N-chloroacetyl-carbamoyl)-fumagillol |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| VEGF-R1,2 | VEGF-Rezeptor 1,2 |
| WHO | World Health Organisation |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

8. Literaturverzeichnis

Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Med.* 1, 1024-1028, 1995

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

Benjamin LE, Helmo I, , Keshet E. A plasticity window for blood vessels remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed by the endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125, 1592-1598, 1998.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. MMP-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biol.* 2 : 737-744, 2000

Caldwell MA, He X, Wilkie N, Pollack S, Marshall G, Wafford KA, Svendsen CN. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nature Biotech.* 19 (5): 475-479, 2001

Carmeliet P, Fereira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declerq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439, 1996

Carmeliet P, Rakesh KJ. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257, 2000

Castilla MA, Caramelo C, Gazapo RM, Martin o, Gonzalez-Pacheco FR, Tejedor A, Bragado R, Arroyo MV. Role of VEGF in endothelial cell protection against cytotoxic agents. *Life Sci.* 67 (9): 1003-1013, 2000

Dreys J, Hofmann I, Hugenschmidt H, Wittig C, Madjar H, Muller M, Wood J, Martini-Baron G, Unger C, Marmé D. Effects of PTK 787/ ZK 22584, a specific inhibitor of VEGF RTKs, on primary tumors, metastasis, vessel density, and blood flow in a murine renal cell carcinoma model. *Cancer res.* 60: 4819-4824, 2000

Farrel CL, Stewart PA, Del Maestro RF. A new glioma model in rat: The C6 spheroid implantation technique permeability and vascular charakterisation. *J Neuro-Oncol.* 4: 403-415, 1987

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea, KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Natur* 380, 439-442, 1996

Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 79: 185-188, 1994

Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med.* 285: 1182-1186, 1971

Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 19: 331-358, 1974.

Fong GH, Rossant L, Gertenstein M, Breitmann ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating assembly of vacular endothelium. *Nature* 376: 66-70, 1995

Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosin kinases: VEGFs, angiopoetins, and nephrins in vascular development. *Genes Dev.* 13, 1055-1066, 1999.

Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Plate KH, Vince GH, Roosen K, Tonn JC. Vaskularisation of human glioma spheroids into rat cortex is conferred by two distinct mechanisms. *J Neurosc Res.* 55: 486-495, 1999

Goldbrunner RH, Bendzus M, Sasaki M, Kraemer T, Plate KH, Roosen K, Tonn JC. VEGF-driven glioma growth and Vascularisation in an orthotopic rat model monitored by magnetic resonance imaging. *Neurosurg.* 47: 921-930, 2000a

Goldbrunner RH, Wagner S, Roosen K, Tonn JC. Models for assessment of angiogenesis in Gliomas. *J. Neurooncol.* 00: 1-10, 2000b

Gradishar WJ. An overview of clinical trials involving inhibitors of angiogenesis and their mechanism of action. *Invest New Drugs* 15: 49-59, 1997

Harstrick A, Perschl A. Tumorangiogenese-Therapiekonzepte. *Onkologe* 6: 443-449, 2000.

Herold-Mende C, Steiner HH, Andl T, Riede D, Buttler A, Reisser C, Fusenig NE, Mueller MM. Expression and functional significance of VEGF-receptors in human tumor cells. *Lab Invest.* 79 (12) : 1573-1582, 1999

Hirano H, Lopes MB, Laws ER Jr, Asakura T, Goto M, Carpenter JE, Karns LR, VandenBerg SR. Insulin-like growth factor-1 content and pattern of expression correlates with histopathologic grade in diffusely infiltrating astrocytomas. *J Neurooncol.* 1(2):109-119, 1999

Holash J, Wiegand SJ, Yancopopulous GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoetins and VEGF. *Oncogene* 18: 5356-5362,1999

Junqueira LC, Carneiro J. Histologie-übersetzt, überarbeitet und ergänzt von Schiebeler TH. Lehrbuch Springer, 1996

Keshet E, Ben-Sasson SA. Anticancer drug targets: approaching angiogenesis. *JCI*. 104 (11): 1497-1501, 1999

Kim KJ et al. Inhibition of VEGF-induced angiogenesis suppresses Tumor growth in vivo. *Nature* 362: 841-844, 1993

Kirsch M, Strasser J, Allende R, Bello L, Zhang J, Black PM. Angiostatin suppresses malignant tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 58: 4654-4659, 1998

Klagsbrunn M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 7: 259-270, 1996.

Kleihues P, Kiessling M, Wiestler OD. Tumoren des Nervensystems. *Lehrbuch der Pathologie*, Urban und Schwarzenberg: 299-314, 1997a

Kleihues P, Burger PC, Plate KH, Ohgaki H, Cavenee WK. Glioblastoma. Pathology and genetics of tumors of the nervous system. Kleinhues P, Cavenee WK. eds IARC Press Lyon,: 16-24, 1997b.

Kleihues P, Carane W: Tumors of the nervous system IARC Press, Lyon, 2000

Kremer C, Breier G, Risau W, Plate KH. Upregulation of flk-1/ VEGFR-2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res.* 57: 3852-59, 1997.

Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R. Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumor biology. *Int J Exp Pathol.* 79: 1-23, 1998.

Lin P, Polverini P, Dewhirst M, Shan S, Rao PS, Peters K. Inhibition of tumor angiogenesis using a soluble receptor establishes a role for Tie2 in pathologic vascular growth. *J Clin Invest.* 100(8): 2072-2078, 1997

Mueller-Klieser W, Bourrat B, Gabbert H, Sutherland RM. Changes in O₂ consumption of multicellular spheroids during development of necroses. *Adv Exp Med Biol* 191:775

Marmé D.: Hungerkünstler; Tumorangiogenese: Neue Ansätze in der Krebstherapie. *Forum DKG I*: 28-31, 2000.

Nelson NJ. Inhibitors of angiogenesis phase III testing. *J Natl Cancer Inst.* 90: 960-963, 1998

Pepper MS: Positive and negative regulation of angiogenesis: from cell biology to the clinic. *Vascular medicine*, 1: 259-266, 1996.

Plate KH. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropath. and Exp Neur.*4: 313-320.1999.

Puduvalli VK, Sawaya R. Antiangiogenesis -- therapeutic strategies and clinical implications for brain tumors. *J Neurooncol.* 50(1-2):189-200, 2000

Riede UN, Köhler G, Orłowska-Volk M, Schwarzkopf G. *Taschenatlas der allgemeinen Pathologie*, Thieme: 368-369, 1998.

Salvati M, Cervoni L, Artico M, Caruso R, Gagliardi FM. Long-term survival in patients with supratentorial glioblastoma. *J Neurooncol* 36 (1): 61-64, 1998

Santini MT, Rainaldi G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiol.* 67: 148-157, 1999

Sasaki M, Witzmann-Voos S, Risau W, Plate KH. Retrovirus producer cells encoding antisense VEGF prolong survival of rats with intracranial GS9L gliomas. *Int J Dev Neurosci.* 17: 557-563, 1999

Schlaeppli JM, Siemeister G, Weindel K, Schnell C, Wood JM. Characterisation of a new potent, in vivo neutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor. *J Cancer Res Clin Oncol.* 125: 336-342, 1999

Schlegel U, Westphal M, Primäre Tumoren des Gehirns und seiner Häute; Gliome. *Lehrbuch der Neuroonkologie, Thieme:* 170-202, 1998

Schweitzer T, Tilgner C, Vince GH, Herbold C, Roosen K, Tonn JC. Extraneural metastasis of primary brain tumors. *J Neurooncol.*, in print 2001

Shalaby F et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66, 1995

Shibuya M: Role of VEGF-FLT receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.*, 67: 281-316, 1995

Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of VEGF expression by hypoxia and by Glucose deficiency in multicell spheroids: implications for Tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 768-772, 1995

Sim BK, MacDonald NJ, Gubish ER. Angiostation and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev.* 19 (1-2): 181-190, 2000

Steiner HH, Herold-Mende C, Bonsanto M, Geletneky K, Kunze S. Prognosis of brain tumors: epidemiology, survival time and clinical course. *Versicherungsmedizin* 50 (5): 173-179, 1998

Steward WP, Thomas AL. Marimastat: the clinical development of a matrix metalloproteinase inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs.* 9(12):2913-22, 2000

Stratmann A, Risau W Plate KH. Cell type-specific expression of angiopoetin-1 and angiopoetin-2 suggests a role in glioblastome angiogenesis.. Am J Pathol. 153: 1459-1466,1998

Thurn P., Bücheler E., Lackner K-J.: Einführung in die radiologische Diagnostik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K: Regulation of Angiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. Cancer Res. 60, 203-212, 2000

Vinaykumar KP, Raymond S. Antiangiogenesis- therapeutic strategies and clinical implications for brain tumors. J Neurooncol. 50: 189-200, 2000

Wen PY, Fine HA, Black PM, Shrieve DC, Alexander E 3rd, Loeffler JS. High grade astrocytomas. Neurol Clin. 13 (4): 875-900, 1995

Westphal Manfred Neuroonkologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1999.

Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, Hofmann F, Mestan J, Mett H, O'Reilly T, Persohn E, Rosel J, Schnell C, Stover D, Theuer A, Towbin H, Wenger F, Woods-Cook K, Menrad A, Siemeister G, Schirner M, Tierauch KH, Schneider MR, Dreves J, Martiny-Baron G, Totzke F. PTK 787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of VEGF RTK, impairs VEGF-induced responses an tumor growth after oral administration. Cancer Res.60: 2178-2189, 2000

Yancopoulos George D., Samuel Davis, Nicholas W. Gale, John S. Rudge, Stanley J. Wiegand, Jocelyn Holash: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature 407, 242-248, 2000