

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik
und Poliklinik Tübingen**

Abteilung I

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Michael Gregor

**Die Hemmung der Angiogenese
im Hepatozellulären Karzinom
mittels VEGF Trap**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Valerie Nißler
aus Stuttgart**

2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Graepler
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schwarz

1	Einleitung	1
1.1	Das Hepatozelluläre Karzinom	1
1.1.1	Epidemiologie, Risikofaktoren und Pathogenese	1
1.1.2	Diagnostik des HCC	3
1.1.3	Stadieneinteilung des HCC	4
1.1.4	Behandlung des HCC.....	6
1.2	Angiogenese	8
1.3	VEGF	12
1.3.1	Entdeckung von VEGF	12
1.3.2	Die VEGF-Familie	12
1.3.3	Die VEGF Rezeptoren.....	13
1.3.4	Der Stellenwert von VEGF im HCC.....	14
1.4	Der Angiogeneseinhibitor VEGF Trap	15
1.4.1	Herstellung von VEGF Trap	16
1.4.2	Klinische Anwendungen von VEGF Trap	16
1.5	Fragestellung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Zellkultur.....	19
2.2	Tierversuch.....	23
2.2.1	Fallzahlab-schätzung zum Tierversuch	23
2.2.2	Ablauf des Tierversuchs.....	25
2.2.3	Auswertung des Tierversuches	28

2.3	Tumorasservierung	29
2.3.1	Kryokonservierung	29
2.3.2	Formalinkonservierung	29
2.4	Anfertigen von Kryoschnitten.....	30
2.5	Histopathologie und Immunhistochemie.....	31
2.5.1	HE- Färbung.....	31
2.5.2	Auswertung der Nekroseanteile und der Hämorrhagien.....	32
2.5.3	Gefäßendothelfärbung	33
2.5.3.1	Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung.....	33
2.5.3.2	Meca32- Färbung.....	36
2.5.4	MIB-1-Färbung	38
2.5.4.1	Auswertung	39
2.5.5	Untersuchung der Apoptose mittels Caspase-Färbung.....	40
2.5.5.1	Auswertung	41
2.6	Untersuchungen des Serums.....	42
2.6.1	VEGF-Serumspiegel	42
2.6.2	Komplexbildung aus VEGF und VEGF Trap	42
2.7	SRB- Assay zur Untersuchung der Zytotoxizität von VEGF Trap..	43
2.7.1	Auswertung	44
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Tierversuch.....	45
3.1.1	Verlauf des Tumorwachstums.....	45
3.1.2	Makroskopische Aspekte der Tumoren	48

3.2	Histopathologische Auswertungen	49
3.2.1	Verteilung der Nekrosen in HE gefärbten Tumoren.....	49
3.2.2	Hämorrhagien.....	51
3.2.3	Gefäßendothelfärbungen zur Quantifizierung der Gefäße	52
3.2.4	Bestimmung der Proliferation anhand der MIB-1-Färbung	53
3.2.5	Auswertung der Apoptose	55
3.3	Untersuchungen des Serums.....	56
3.3.1	Quantifizierung des VEGF Spiegels mittels ELISA.....	56
3.3.2	Quantifizierung des Komplexes aus VEGF und VEGF Trap	56
3.4	Zytotoxizität des VEGF Trap auf vitale HuH7-Zellen.....	58
4	Diskussion	60
4.1	Tierversuch.....	60
4.2	Nekrosequantifizierung.....	64
4.3	Hämorrhagien.....	65
4.4	Gefäßendothelfärbungen	66
4.4.1	Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung.....	66
4.4.2	Meca32-Färbung	66
4.5	Bestimmung der Proliferation in der MIB-Färbung	67
4.6	Caspase-Färbung.....	68
4.7	Untersuchungen des Serums.....	69
4.7.1	VEGF Trap senkt den VEGF-Spiegel im Serum.....	69
4.7.2	Komplexbildung aus VEGF und VEGF Trap	69
4.8	Ausschluss der Zytotoxizität von VEGF Trap	70

5	Zusammenfassung.....	71
6	Abkürzungsverzeichnis	78
7	Literaturverzeichnis	81
8	Veröffentlichungen.....	91
9	Danksagung.....	92
10	Lebenslauf	94

1 Einleitung

1.1 Das Hepatozelluläre Karzinom

1.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Pathogenese

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört zu den weltweit häufigsten malignen Tumoren und ist die dritthäufigste Ursache für krebisbedingte Mortalität.[69] Die Inzidenz liegt in Europa bei 2-7/100 000 Einwohnern und in Asien bei 35-40/100.000 Einwohnern. Mehr als 80 % aller HCCs entstehen auf dem Boden einer Leberzirrhose. Risikofaktoren für die Erkrankung an einem HCC sind Hepatitis B und C, Hämochromatose und Alkoholabusus, sowie die Entwicklung einer Leberzirrhose anderer Ätiologie.[7, 79, 95]

Das HCC ist ein hoch vaskularisierter Tumor mit schlechter Prognose. Es zeigt zwei verschiedene schädigende Komponenten, zum einen eine lokale Schädigung durch die entstandene Neoplasie, zum anderen die diffuse Schädigung durch die in der Regel vorbestehende Lebererkrankung.[9] Dies macht ihn zu einem schwer zu behandelnden Tumor.

Das Risiko für Patienten mit einer Leberzirrhose, in ihrem Leben an einem HCC zu erkranken, liegt zwischen drei und fünf %. Im Durchschnitt liegen zwischen der Diagnose einer Zirrhose und der Erkrankung an einem HCC drei Jahre, dies ist allerdings abhängig von der Genese der Zirrhose.[81]

Sowohl für die Hepatitis B als auch für die Hepatitis C liegt die Zeit zwischen Infektion und Erkrankung an einem HCC im Mittel bei ca. 30 Jahren.[103]

In Afrika und Südostasien liegt das Lebenszeitrisiko für HBV-Infizierte, ein HCC zu entwickeln, zwischen 20 % bei Frauen und 50 % bei Männern.[61] Das HCC ist bei schätzungsweise 30 bis 50 % aller Hepatitis B Virus (HBV) assoziierten Todesfälle die Ursache.[63]

In einer großen Kohortenstudie konnte eine hohe Korrelation der HBV-Ausgangsviruslast mit der Rate an HCC-Erkrankungen nachgewiesen werden.[14] HBV interagiert mit der Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) und verändert die Expression von Enzymen des Zellzyklus. In vitro kann das Protein x des HBV das Tumorsuppressorgen p53 ausschalten.[24, 82]

In Europa und den USA verursacht Hepatitis C die meisten HCC-Erkrankungen. Als Folge der Infektion treten bei etwa 20 % eine Leberzirrhose und bei etwa zwei % ein HCC auf. Das Risiko, an einem HCC zu erkranken, steigt auf das 24fache an, wenn im peripheren Blut HCV RNA nachweisbar ist.[21, 24, 55, 79] Auch für das HCV konnte gezeigt werden, dass es direkt an der Entstehung eines HCC beteiligt ist. So kommt es bei Patienten mit chronischer Hepatitis C zum Anstieg des transforming growth factor alpha (TGF- α) im Serum und einer erhöhten Genexpression des insulin-like growth factor-2 (IGF-2). Das Hüllprotein des Hepatitis C-Virus fungiert als Wnt-Ligand und kann p53 inaktivieren.[69, 109]

Das Risiko, an einem HCC aufgrund einer alkoholtoxischen Leberzirrhose zu erkranken, liegt zwischen drei und 15 %.[101] Ein weiterer Risikofaktor ist Aflatoxin, ein Toxin des Pilzes *Aspergillus flavus*, welcher häufig in kontaminierten Lebensmitteln zu finden ist, vor allem wenn sie unter warmen und feuchten Bedingungen gelagert werden. Im Aflatoxin assoziierten HCC wurden erhöhte Mutationsraten des p53 gemessen.[84, 100] Bei der Hämochromatose liegt das Lebenszeitrisiko, an einem HCC zu versterben, bei bis zu 45 %.[26]

Bei der autosomal rezessiv vererbten Tyrosinämie treten schon in der Kindheit hepatozelluläre Karzinome auf. In 37 % der Patienten, die älter als zwei Jahre wurden, wurde das Auftreten eines HCCs beobachtet.[94]

Beim ebenfalls autosomal rezessiv vererbten Alpha-1-Antitrypsin-Mangel entwickeln viele Betroffene schon im jungen Erwachsenenalter eine Leberzirrhose und haben dadurch ein hohes Risiko, an einem HCC zu erkranken.[17, 59]

Unabhängig von der Ätiologie finden sich neben dem Primärkarzinom oft weitere dysplastische Knoten in der Leber, die Vorläufer für die Entwicklung eines HCC darstellen. Innerhalb von 36 Monaten nach Resektion des Primarius erkranken ca. 40 % der Patienten an einem zweiten Primärtumor.[55]

Das Verständnis der molekularen Mechanismen in der Entstehung des HCC ist von großer Bedeutung, um die Diagnostik zu verbessern und neue Therapien zu entwickeln. Aufgrund von Leberzellschädigungen und anschließender Regeneration kommt es zu einer prokarzinogenen Umgebung.[78] In humanen Hepatomen konnten Chromosomeninstabilitäten infolge von Verkürzung der Telomere nachgewiesen werden.[86] Darüber hinaus ist in der Genese des HCC auch die Inaktivierung des p53 von zentraler Bedeutung. Intaktes p53 kann die Instabilität von Telomeren und damit die Progression zu einem malignen Tumor verhindern, während die Kombination aus Mutation des p53 und Dysfunktion der Telomere zu einer schnelleren Tumorentstehung führt. Oxidativer Stress kann durch die Bildung freier Radikale zu Veränderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen führen.[25]

1.1.2 Diagnostik des HCC

Für die Diagnose eines HCC sind die Schnittbildgebung (Sonographie ggf. mit Kontrastmittel, dynamische Computertomographie und Kernspintomographie) sowie die Bestimmung des Serumspiegels von Alpha Fetoprotein (AFP) die wichtigsten nichtinvasiven Verfahren. Je nach Konstellation erfolgt die Diagnosesicherung durch Biopsie oder intraoperativ im Rahmen einer Resektion.

1.1.3 Stadieneinteilung des HCC

Neben der TNM-Klassifikation kommen als weitere Stadieneinteilungen des HCC die Cancer of the Liver Italian Program (CLIP)-Kriterien, die Okuda-Kriterien und die Barcelona Clinic Liver Cancer-Kriterien (BCLC-Kriterien) zur Anwendung. Die BCLC-Kriterien umfassen die Tumorgröße und -ausdehnung nach der TNM-Klassifikation, die Leberfunktion gemäß der Child-Pugh-Einteilung sowie den WHO-Performance-Status Test (PST) und mit dem Tumor verknüpfte Symptome.[96] Die BCLC-Kriterien erwiesen sich für den klinischen Gebrauch günstiger als die TNM-Klassifikation, da sie eine bessere prognostische Aussagekraft haben und sich eher als Grundlage für Therapieentscheidungen eignen.[70]

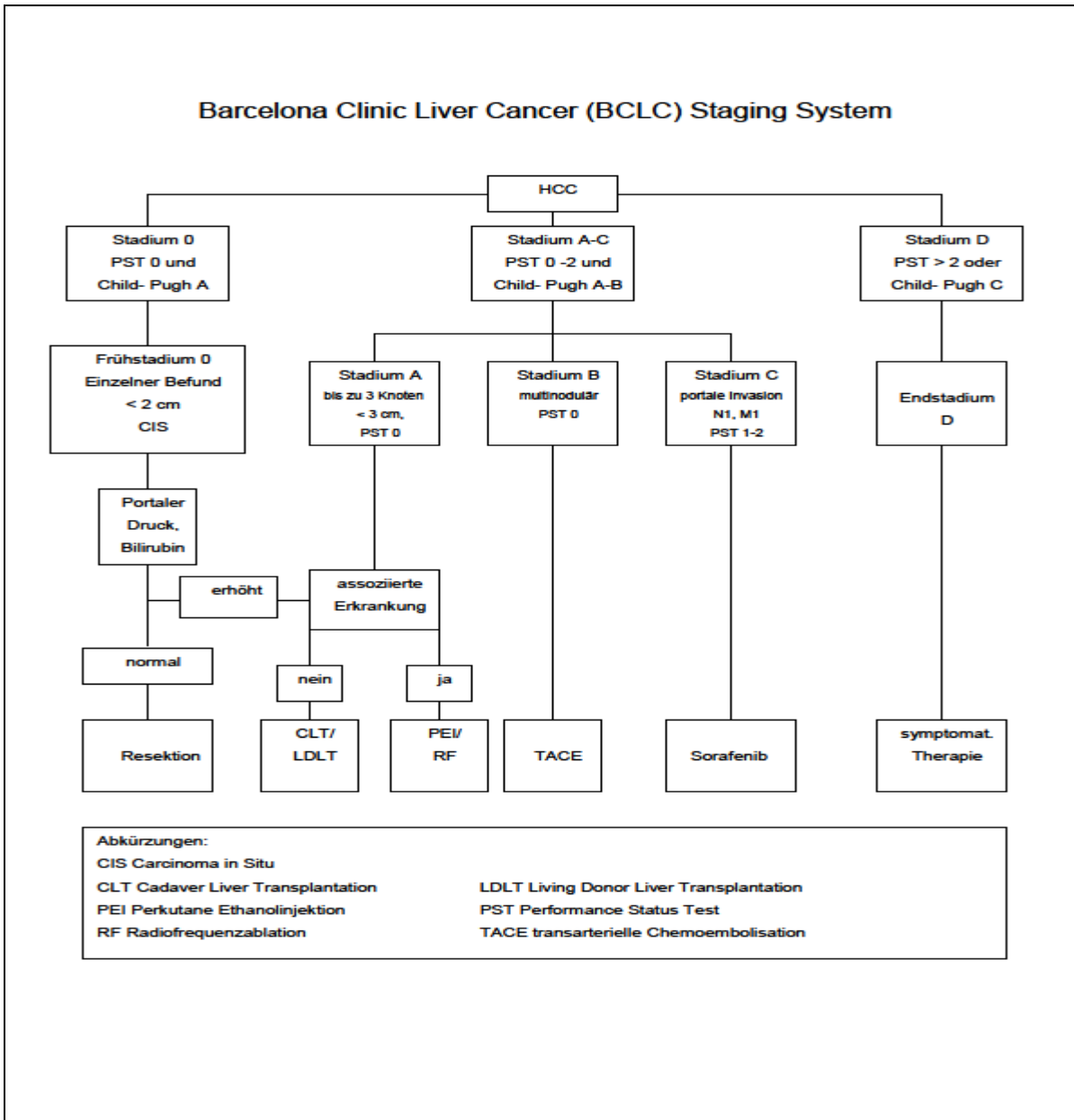


Diagramm 1: BCLC Staging Klassifikation und Behandlungsschema[68]

1.1.4 Behandlung des HCC

Bisher ist die operative Therapie, also eine Teilresektion der Leber oder gar eine vollständige Leberresektion mit anschließender Transplantation der einzige kurative Ansatz.[67, 76] Die Lebertransplantation hat im Vergleich zur Leberteileresektion den Vorteil, dass man auch die zugrunde liegende Lebererkrankung, sowie die portale Hypertension und ihre Folgen therapiert.[76]

Die Tumorresektion hat bei multiplen Läsionen, größeren Läsionen als 5 cm, AFP >200ng/ml, Lymphknotenmetastasen, nicht tumorfreien Resektionsrändern (R>0) und fortgeschrittenem Tumorstadium ein schlechtes Outcome.[32] Rezidive sind häufig .[69]

Als palliative Methoden oder zum sogenannten „bridging“ bis zu einer Operation /Transplantation kommen die transarterielle Chemoembolisation, die perkutane Ethanolinjektion und die Radiofrequenzablation zum Einsatz. Systemische Chemotherapie, Bestrahlung, Kryotherapie, hepatische intra-arterielle Chemotherapie (HIA) und Thermochemotherapie sind von untergeordneter klinischer Bedeutung.

Hormontherapien (Anti-Östrogene, Anti-Androgene oder Octreotid), Immuntherapien (Interferon) und andere Ansätze mit dem Thymidylatsynthase-Inhibitor Nolatrexed oder Seocalcitol, einem dem Vitamin D ähnlichen Wirkstoff erfüllten nicht die an sie gestellten Anforderungen.[15, 116]

Da die systemischen Chemotherapeutika nicht den erwünschten Durchbruch brachten, setzt man nun große Hoffnungen in die sog. *targeted therapies*. Hierbei handelt es sich um Substanzen, die direkt auf Wachstumsfaktoren wirken und in die intrazelluläre Signaltransduktion und in den Zellzyklus eingreifen.[89] Große Bedeutung erlangte Sorafenib, ein Multikinaseinhibitor, der gegen Raf-1, B-Raf, VEGFR2, PDGFR und c-Kit-Rezeptoren wirkt.

Llovet et al konnten in einer wichtigen Phase III Studie mit Sorafenib - erstmals für eine systemische Therapie - eine signifikante Verlängerung von ca. drei Monaten im durchschnittlichen Überleben der Patienten und in der Zeit bis zur radiologischen Progression des HCC erzielen.[71] Seither gilt Sorafenib als Standard für Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung.[69]

1.2 Angiogenese

Die Entwicklung von Blutgefäßen in der Embryogenese verläuft über zwei Wege, zum einen über die Vaskulogenese und zum anderen über die Angiogenese. Vaskulogenese bedeutet, dass die Endothelzellen von Vorläuferzellen abstammen. Angiogenese beschreibt die Bildung neuer Blutgefäße ausgehend von schon bestehenden Gefäßen. [46, 90]

Beim Erwachsenen spielt im gesunden Gewebe wie auch bei der Tumorentstehung nur die Angiogenese eine Rolle.

Die Angiogenese ist ein dynamischer Prozess, der sich in verschiedene Schritte einteilen lässt.

Zu Beginn muss zunächst die Basalmembran gelockert werden, um den Endothelzellen das Einwandern in das umliegende Stroma zu ermöglichen. Gleichzeitig proliferieren die Endothelzellen an der Stelle, wo die neuen Gefäße entstehen sollen. Während die Endothelzellen ihre Form ändern und das Lumen der neu entstehenden Kapillaren bilden, wandern murale Zellen wie Perizyten und vaskuläre glatte Muskelzellen zu den von Endothelzellen neu geformten Schleifen, ummanteln diese und bilden dadurch Kapillaren, Arteriolen und Venolen. Das Blut kann die neu erschlossene Region mit Nährstoffen versorgen. Dieser Prozess tritt physiologischerweise auf, wenn es zu einem Gewebezuwachs kommt. In Tumoren sind die Kontrollmechanismen der Angiogenese gestört, die Gefäße verbleiben in ständigem Umbau, zeigen einen chaotischen Aufbau und eine lückenhafte Endothelauskleidung.[46, 50, 80]

Folkman et al formulierten die These, dass Tumoren bis zu einem Durchmesser von 3 - 4 mm in einem angiogenen Ruhezustand verbleiben.[29] Um weiter wachsen zu können, benötigt der Tumor direkten Kontakt zu versorgenden Gefäßen, da die Diffusion allein dann nicht mehr ausreicht.[36] Das zentrale Ereignis, das nun stattfindet, wird *angiogenic switch* genannt.[46] Das Gleichgewicht verschiebt sich in Richtung Gefäßproliferation und der Tumor ist nun in der Lage, weiter zu wachsen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie der Tumor direkten Zugang zu Blutgefäßen erlangt, die folgenden vier sind am bedeutsamsten:[113]

- Angiogenese. Hierbei kommt es zur Aussprossung neuer Blutgefäße ausgehend von schon vorhandenen Gefäßen.
- Vaskuläre Co-Option. In diesem Fall nutzt der Tumor schon bestehende Gefäße zur Versorgung mit Nährstoffen und wächst an ihnen entlang.
- Vaskulogenese. Die Gefäße werden durch Vorläuferzellen aus dem Knochenmark gebildet.
- Vaskuläres Mimikry. Hierbei wird das Lumen nicht durch Endothelzellen, sondern durch Tumorzellen gebildet.

Es ist möglich, dass Tumore mehr als eine Möglichkeit nutzen, dies hängt auch vom Stadium des Tumors und dem Grad der Malignität ab.

Die Ausschüttung der pro- und anti-angiogenen Faktoren durch die Tumorzellen wird durch Onkogene, Tumorsuppressorgene, Transkriptionsfaktoren und durch die Umgebung des Tumors gesteuert. Bisher ist noch nicht genau bekannt, wodurch dieser *angiogenic switch* initiiert wird, man weiß aber, dass am *angiogenic switch* unterschiedliche Zelltypen beteiligt sind. Es kommt zur Ausschüttung von löslichen angiogenen Faktoren durch Tumorzellen, aber auch durch Bindegewebs- und Immunzellen. Diese Faktoren stimulieren in der Umgebung des Tumors vaskuläre Zellen wie die Endothelzellen, die auf ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren tragen. Die Angiogenese ist also das Ergebnis eines Balanceaktes der anti-angiogenen und pro-angiogenen Faktoren, die auf die Endothelzellen Einfluss nehmen.[105, 113]

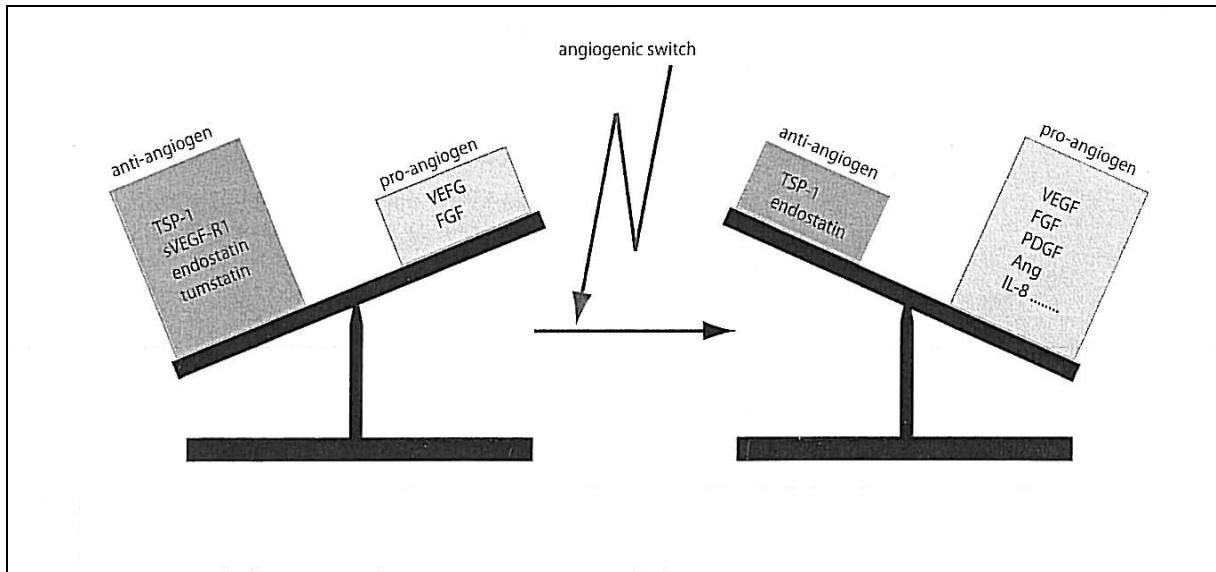


Diagramm 2: Pro- und anti-angiogene Faktoren stimulieren über den „angiogenic switch“ die Angiogenese. TSP-1 Thrombospondin; PDGF Platelet Derived Growth Factor; Ang Angiopoietin; IL-8 Interleukin-8; FGF Fibroblast Growth Factor; VEGF Vascular Endothelial Growth Factor, sVEGF-R1 löslicher VEGF- Rezeptor-1.[113]

Pro-angiogene Faktoren werden bei zellulärem Stress freigesetzt, wie etwa durch Hypoxie, Glucosemangel, freie Radikale und Azidose.[108]

Mit der wichtigste pro-angiogene Faktor ist der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) A.[113] VEGF bindet an Transmembran-Tyrosinkinase Rezeptoren auf den Endothelzellen, die über eine Signalkaskade in die Abläufe der Zelle eingreifen.[46, 98]

Auch der Fibroblast Growth Factor (FGF) spielt eine große Rolle. Weitere pro-angiogene Faktoren sind der Platelet-Derived Growth Factor B (PDGF-B), die Zytokine und die Matrix-Metalloproteasen MMP 2 und 9, sowie die Familie der Angiopoietine.[33, 113]

Anti-angiogene Faktoren lassen sich in 2 Gruppen einteilen:

1.) Proteine der Extrazellulärmatrix und der Basalmembran, wie Fibronectin, Thrombospondin und die Familie der Kollagene.

2.) Wachstumsfaktoren, Zytokine und andere Proteine, die nicht von der Extrazellulärmatrize abstammen, wie Plasminogen, Antithrombin III, VEGFR1, und Interferon.[38, 46, 113]

Nicht nur die Tumorzellen selbst produzieren pro-angiogene und anti-angiogene Faktoren, auch die Umgebung des Tumors ist daran maßgeblich beteiligt. Man weiß dies von Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Zellen des Immunsystems (Natürliche Killerzellen, Makrophagen, dendritische Zellen).[53, 113]

Bisher erwiesen sich einige angiogene Inhibitoren als geeignete Kandidaten in der Tumorthherapie, dazu gehören Peptid- und Antikörper-Integrinantagonisten, anti-angiogene Proteine wie Endostatin, Matrix-Metalloprotease-Inhibitoren und Hemmstoffe der angiogenen Wachstumsfaktoren.[22, 23, 43, 56]

Im HCC hat die Angiogenese aufgrund der starken Vaskularisierung eine Schlüsselrolle in Entwicklung, Wachstum und Metastasierung inne.[115]

Zu den Zelltypen, die in die Angiogenese involviert sind, zählen neben den endothelialen Tumorzellen die HSCs (Hepatic Stellate Cells), die Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells und die Bone Marrow-Derived Hemangiocytes.[48, 54, 85, 92]

Wichtige pro-angiogene Faktoren im HCC sind neben VEGF die Angiopoietine, der Epidermal Growth Factor (EGF), der Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor (PD-ECGF), der Fibroblast Growth Factor (FGF), Interleukin-8 (IL-8) sowie die Cyclooxygenase-2 (COX-2).[42, 86, 95, 98, 101, 103, 116]

Für verschiedene anti-angiogene Substanzen konnte im Tiermodell und in frühen klinischen Studien auch ein wachstumshemmender Effekt auf das HCC nachgewiesen werden. Hierzu gehören der Tyrosinkinaseinhibitor PTK 787, das Fumagillin-Analogon TNP-470, lösliches Flt-1, Endostatin und der monoklonale VEGF Antikörper Bevacizumab, in Kombination mit einer Chemotherapie.[41, 68, 117]

1.3 VEGF

1.3.1 Entdeckung von VEGF

Schon vor mehr als 100 Jahren ging man davon aus, dass das Tumorwachstum von der Durchblutungssituation abhängt. Folkman stellte 1971 die These auf, dass eine anti-angiogene Therapie als neuartiges Prinzip für eine Inhibition des Tumorwachstums geeignet sein müsste.[30]

Daraufhin wurden einige angiogene Faktoren identifiziert, zu denen unter anderem auch der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gehört. VEGF spielt eine zentrale Rolle in der Neoangiogenese von Tumoren.[30, 52]

VEGF wurde zuerst von Senger et al im Jahre 1983 als *tumor vascular permeability factor* (VPF) beschrieben.[97] Man erkannte, dass VPF für die Durchlässigkeit von Plasmaproteinen in die Extrazellulärmatrix des Tumors, die Extravasation von Fibrinogen und die Aszitesbildung wichtig war. Der Name *vascular endothelial growth factor* (VEGF) stammt von Ferrara und Henzel aus dem Jahr 1989. Ihnen gelang die Isolation eines endothelialen Mitogens aus folliculären Zellen der Rinderhypophyse. VEGF wies eine Wirksamkeit auf, die 400fach stärker war als die von Histamin.

Nach Sequenzierung der cDNA stellte sich heraus, dass es sich bei VPF und VEGF um dasselbe Molekül handelt.[28, 46] Die Bezeichnung VPF wird nicht mehr verwendet.

1.3.2 Die VEGF-Familie

Zur VEGF-Familie gehören VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PlGF-1 und PlGF-2. VEGF-A ist ein wichtiger Koordinator des Wachstums von Endothelzellen, die von Arterien, Venen und Lymphgefäßen ausgehen. VEGF-A besteht aus 8 Exons, durch variables Spleißen entstehen verschiedene Isoformen wie etwa VEGF-121, VEGF-145, VEGF-165, VEGF-189, VEGF-206,

die unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. So diffundiert VEGF-121 ins Interstitium, da es nicht an die Extrazellulärmatrix bindet, während VEGF-165 an die Proteoglykane der Extrazellulärmatrix bindet.[27]

Die Hypoxie ist ein wichtiger Regulationsmechanismus der VEGF-Expression. Dadurch kommt es zu einer Induktion des Transkriptionsfaktors HIF-1 α , (Hypoxie-induzierender Faktor 1 α) der an die Promoterregion des VEGF bindet. Dies resultiert in einer gesteigerten VEGF-Produktion.[6, 75] Auch eine Mutation des ras-Onkogens führt zu einer vermehrten VEGF-Expression.[88, 115]

VEGF hat viele verschiedene Funktionen, so trägt er zum Wachstum der vaskulären Endothelzellen bei und fungiert auch gleichzeitig als protektiver Faktor, da er die Apoptose verhindert. Des Weiteren stößt er die Bildung von Bcl-2, einem anti-apoptotischen Protein, an und ist wichtig für die Kapillarenbildung.

1.3.3 Die VEGF Rezeptoren

VEGF bindet an seine Rezeptoren VEGFR1 (Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor 1), und VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor 2), die sich auf der Oberfläche von Endothelzellen befinden, sowie an VEGFR3 (Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor 3), der auf Lymphgefäßen lokalisiert ist. Auf Endothelzellen agiert Neuropilin-1 als Co-Rezeptor von VEGFR2.[27, 115]

Die Rezeptoren gehören zu der Familie der Klasse III-Rezeptor Tyrosinkinasen. Von der Transmembranregion der Rezeptoren zeigen sieben Immunglobulin-ähnliche Regionen in die extrazelluläre Richtung, nach intrazellulär weist eine Tyrosinkinase-Domäne. Über eine Ligandenbindung erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors mit anschließender Autophosphorylierung und Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasen, die verschiedene Signalkaskaden in der Zelle anstößt.[62, 65]

1.3.4 Der Stellenwert von VEGF im HCC

Im HCC wurde VEGF zuerst von Mise et al im Jahr 1996 nachgewiesen.[77]
Inzwischen ist VEGF ein gründlich untersuchter angiogene Faktor im HCC. So korreliert die VEGF-Expression im HCC mit der Mikrogefäßdichte und einem niedrigeren mittleren Überleben.[104, 110]

1.4 Der Angiogeneseinhibitor VEGF Trap

Bei VEGF Trap handelt es sich um einen solchen löslichen decoy Rezeptor, der zirkulierendes VEGF abfängt.

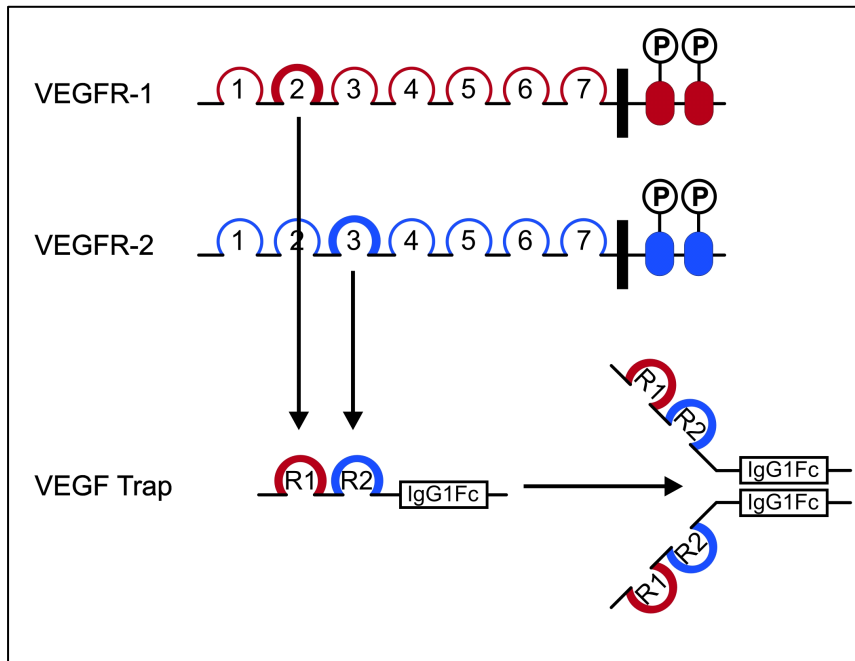


Diagramm 3: VEGF Trap ist ein löslicher decoy Rezeptor. Hierbei bindet die zweite Ig-Domäne des VEGFR1 und die dritte Ig-Domäne des VEGFR2 an die konstante Fc-Region von humanem IgG1.[46]

1.4.1 Herstellung von VEGF Trap

Ziel der Entwicklung von VEGF Trap durch die Arbeitsgruppe von Holash war die Kombination der Bindungseigenschaften von VEGFR1 und VEGFR2. Bei dem hierbei zunächst klonierten VEGFR1-Fc handelte es sich um einen löslichen Rezeptor, der aus den ersten drei Ig Domänen von VEGFR1, die an die konstante Fc Region von humanem IgG1 binden, besteht. Er wirkt bei einer 500fach niedrigeren Konzentration als ein vergleichbares VEGFR2-Molekül. Allerdings wies VEGFR1-Fc schwierige pharmakokinetische Eigenschaften auf, die zu einer hohen Toxizität führten.[49, 60] Bei der weiterentwickelten Form, VEGF Trap_{R1R2}, binden die zweite Ig Domäne des *high affinity* VEGFR1 und die dritte Ig Domäne des *low affinity* VEGFR2 an die Fc-Region von menschlichem IgG1. Zwei dieser Moleküle dimerisieren zu VEGF Trap.[49] Diese Variante, die auch in der vorgelegten experimentellen Arbeit zum Einsatz kam, wird im Weiteren als VEGF Trap bezeichnet. VEGF Trap kombiniert somit die günstigen Bindungseigenschaften der beiden VEGF-Rezeptoren und weist bessere pharmakologische Eigenschaften als die ursprünglichen Rezeptoren auf.[62]

1.4.2 Klinische Anwendungen von VEGF Trap

Bisher wurden verschiedene anti-angiogene Therapien getestet, dazu gehören Antikörper gegen VEGF, Antikörper gegen VEGF-Rezeptoren und kleinmolekulare Hemmstoffe, sogenannte „small molecule inhibitors“ des VEGF-Rezeptors.[31, 58, 87] Allein VEGF Trap erkennt die gesamte VEGF-Familie, die VEGFR1 und VEGFR2 bindet, einschließlich des Placental Growth Factors.[62]

In einer Phase-I klinischen Studie wurde die Wirksamkeit von VEGF Trap in Patienten mit soliden Tumoren im fortgeschrittenen Stadium getestet. Die Gabe erfolgte sechs mal wöchentlich (50, 100, 200, 400 und 800 µg/kg KG), die Höchstdosis wurde ferner auch zweimal wöchentlich verabreicht.

Es wurde zwar keine partielle oder vollständige Remission erzielt, allerdings erreichten 18 von 35 Patienten für 10 Wochen eine Stabilisierung ihrer Erkrankung.[102]

Darüber hinaus werden Therapieprotokolle mit VEGF Trap noch in anderen Studien, wie etwa beim fortgeschrittenen Ovarial-Karzinom mit malignem Aszites in einer Phase-II-Studie getestet.[4] Unter der Therapie mit 4 mg/m² VEGF Trap im zweiwöchentlichen Abstand konnte eine Verdopplung der Zeitspanne zwischen zwei Aszitespunktionen erreicht werden.[16] Beim metastasierten Pankreas-Karzinom wird die Therapie mit VEGF Trap in einer Phase-III-Studie untersucht.[1] Auch bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) wird VEGF Trap in Kombination mit Docetaxel in einer Phase-III-Studie getestet.[5]

Beim metastasierten Kolonkarzinom wurde eine Phase-III-Studie mit VEGF Trap, 5-FU und Irinotecan begonnen.[3] Im androgenunabhängigen metastasiertem Prostatakarzinom findet im Rahmen einer Phase-III-Studie eine Kombination aus VEGF Trap, Docetaxel und Prednison Anwendung.[2]

VEGF Trap findet auch in der Ophthalmologie Anwendung, so wurde es in der Behandlung der altersbedingten Makuladegeneration und beim diabetischen Makulaödem eingesetzt.[20, 83] In der Dermatologie wurden Erfolge in der Psoriasis-therapie verbucht.[114]

1.5 Fragestellung der Arbeit

Bisher kann man nur wenigen Patienten mit einem HCC eine kurative Therapie anbieten, da die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose meist schon fortgeschritten ist. Hoffnungen setzt man in die Hemmung der Angiogenese, besonders in die Inhibition von VEGF, der im HCC eine große Rolle spielt.

Für den VEGF decoy Rezeptor VEGF Trap, der für die klinische Anwendung in der Ophthalmologie bereits zugelassen ist und derzeit in mehreren klinischen Phase III-Studien zur Behandlung verschiedener solider Tumoren getestet wird, liegen bislang keine Daten zur Behandlung des HCC vor.

In der vorliegenden Arbeit sollten in einem HCC-Xenotransplantat-Mausmodell erstmalig Daten zur Eignung des Wirkstoffes für die Behandlung des HCC erhoben werden.

Primäre Zielgröße war die Inhibition der Wachstumsgeschwindigkeit durch die Gabe von VEGF Trap in zwei Dosierungsstufen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.

Durch die histologische Aufarbeitung der Tumoren sollten die Phänomenologie der Behandlungseffekte beschrieben und erste Hinweise auf mögliche Wirkmechanismus gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Im folgenden soll eine Übersicht über das allgemeine Material für die Zellkultur gegeben werden:

- Pasteur-Pipetten (Fortuna, Poulten & Graf GmbH, Wertheim, Deutschland)
- Sterile Pipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml
(Costar, Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland)
- Mikropipetten (Biohit, Helsinki, Finnland)
- Mikropipettenspitzen Safe Seal-Tips 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl
(Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, Deutschland)
- Zellkulturflaschen 260 ml (mittlere Größe)
(Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland)
- Handschuhe Safe Skin Satin Plus (Kimberley-Clark, Koblenz, Deutschland)
- Zentrifugen:
 - Megafuge 1.0R mit Ausschwingrotor
(Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)
 - Megafuge 3.0R und Biofuge fresco
(Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)
- Mikroskop: Olympus IMT-2
(Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland)

Lösungen:

- Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium

(DMEM, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien):

Zu 450 ml DMEM pipettiert man 5 ml einer 200 mM L-Glutamin-Lösung (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien) und 50 ml FCS (10 %).

- FCS (Fetales Kälberserum, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien)

- PBS: Zu 10 l Aqua bidest. gibt man 95,5 g Dulbecco's PBS-Pulver (Sigma- Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland).

- 0,2 g/l Kaliumchlorid (KCl)

- 0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

- 1,15 g/l Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

- 8 g/l Natriumchlorid (NaCl)

Sämtliche Komponenten wurden von der Firma Merck KG, Darmstadt, Deutschland, bezogen.

- Trypsin/ EDTA mit Phenolrot (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien):

Diese Lösung enthält 0,25 g/l Trypsin.

Zum Auftauen der gefrorenen Zellen wird folgendes Material benötigt:

- DMEM

- Wasserbad: (GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland)

- Zentrifuge : Megafuge 1.0R mit Ausschwingrotor (Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland)

Die HuH7-Zellen werden von der Europäischen Zellbank EC ACC bezogen und auf Trockeneis geliefert. Die Zellen werden in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend pipettiert man 10 ml FCS-Lösung und zentrifugiert mit 200 U/min. Der Überstand wird verworfen und das Zellsediment in frischer FCS-Lösung in einer Zellkulturflasche ausgesät.

Nach dem Auftauen erfolgt alle drei Tage eine Passage der Zellen. Hierzu benötigt man folgenden Substanzen:

- DMEM
- PBS
- Trypsin

Zuerst wird das alte Medium abpipettiert. Um das Medium vollständig zu entfernen, wäscht man mit 5 ml PBS. Nun gibt man 1 ml Trypsin in die Zellkulturflasche, damit sich die Zellen vom Flaschenboden lösen. Hierfür ist es wichtig, dass das Trypsin den Zellrasen komplett bedeckt. Lösen sich die Zellen vom Flaschenboden ab, pipettiert man DMEM mit 10 % FCS hinein. Das FCS dient der Inaktivierung des Trypsins. Nun erfolgt die Passage der Zellen, um schließlich die Flasche mit 13 bis 15 ml frischem Medium aufzufüllen.

Um das Wachstum der Zellen zu überschauen, zählt man die Zellen in einer Neubauer- Zählkammer.

Diese Neubauer-Zählkammer besteht aus einer Glasplatte, die in der Mitte eine Vertiefung aufweist. In diese Vertiefung sind quadratische Felder eingelassen, die dem Zählen der Zellen dienen.

Folgendes Material wird benötigt:

- Deckgläser (Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland)
- Eppendorf-Tube Safe-Lock 1,5 ml
(Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Mikroskop Olympus IMT-2
(Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Neubauer- Zählkammer (Hecht-Assistent, Sondheim, Deutschland)
- 0,4 % Trypanblau (Sigma- Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

Die Zellen werden mit PBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden pipettiert man 2 ml Trypsin hinein. Die Zellen gibt man in 8 ml Medium, welches aus DMEM und 10 % FCS besteht. In einem Eppendorf-Cup mischt man 10 µl dieser Zellsuspension mit 90 µl 0,4 %igem Trypanblau. Nun legt man ein Deckglas auf die beiden Glasstege der Zählkammer und pipettiert seitlich einen Tropfen der Zellsuspension aus dem Eppendorf-Cup in den Zwischenraum. Jetzt werden die vier großen Eckquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt, es wird nur der linke und der obere Rand der Quadrate mitgezählt. Liegen Zellen übereinander, so werden sie als eine Zelle gewertet. Es werden nur die vitalen (weißen) Zellen gezählt, erscheinen die Zellen blau, so sind sie abgestorben.

Die Zellzahl wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{durchschnittliche Zellzahl je Eckquadrat} \times 10^4 \times 10$$

Ein großes Quadrat hat ein Volumen von 10^{-4} cm^3 . Die Verdünnung der Zellsuspension mit dem Trypanblau liegt bei 1:10. Die durchschnittliche Zellzahl erhält man über die Endsumme der Auszählung dividiert durch die vier Quadrate.

2.2 Tierversuch

2.2.1 Fallzahlabeschätzung zum Tierversuch

Ziel des Tierversuches ist die Hemmung des Tumorwachstums mit dem Angiogenesehemmer VEGF Trap in einem HuH7- Xenograft-Modell.

Für die Planung des Tierversuches werden die Erwartungswerte der Kubikwurzel der Tumorumfänge benötigt. Am ersten und zehnten Tag der Behandlung werden die Erwartungswerte mithilfe der Ellipsoidformel bestimmt:

$$\frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} + \frac{z^2}{c^2} - 1 = 0$$

a, b und c seien die Halbachsen.

Es wird von einer Gaußschen Normalverteilung ausgegangen. Die Abschätzung der jeweiligen Wachstumskurven erfolgt über die Annahme einer nicht-linearen Regression, das heißt, es werden eine Vielzahl nicht linearer Modelle zur Abschätzung der Wachstumskurve und deren mittlerer Parameter herangezogen. Mit Zuhilfenahme eines Konfidenzintervalls werden die fehlenden Werte von Tag 14, dem Zieltag der statistischen Planung, für die Endauswertung abgeschätzt. Zur Ermittlung nicht mehr vertretbarer Tumorgrößen wird auf das Modell von Kaplan und Meier zurückgegriffen.

Der Konfidenzgrad der Konfidenzintervalle soll bei 0,95 liegen. Der F-Test soll das Signifikanzniveau 5 % mit einer Power von 0,8 haben.

Von früheren Versuchsergebnissen aus der Arbeitsgruppe liegen Daten zum Wachstumsverhalten der Tumore im Tiermodell vor.

Die Fallzahl wird unter der Annahme berechnet, dass in der „low dose“ Behandlungsgruppe das Tumorwachstum auf die Hälfte reduziert wird und in der „high dose“ Behandlungsgruppe auf ein Viertel. Somit beträgt die Gruppenanzahl $n_i = 10$ Tiere pro Gruppe. Laut Plan werden vier Tiere an Tag 14 für die histologische Auswertung euthanasiert. Da die Tumorimplantation nur in 80 % zum Erfolg führt, teilt man die 34 Tiere noch durch 0,8. Insgesamt erhält man dadurch eine Tierzahl von 43.

Die statistischen Berechnungen werden mit der JMP IN 5.1 Software durchgeführt. (SAS Institute Inc. Cary NC 2003)

Für die geblockte Randomisierung werden vom Institut für Medizinische Biometrie Randomisierungslisten erstellt. Die Verblindung wird erst nach Auswertung der Versuche aufgehoben.

2.2.2 Ablauf des Tierversuchs

Die Durchführung des Tierversuches wird unter dem AZ M1/07 vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

Der Tierversuch wird in einem Xenotransplantat-Mausmodell durchgeführt. Weibliche Balb/cOlaHsd Foxn1nu/nu-Mäuse im Alter von acht Wochen werden von Harlan Winkelmann, Borcheln, bezogen. Die 43 Tiere werden in der Tierhaltungsanlage der UKT-Kinderklinik in Gruppen von sechs Tieren in einzelbelüfteten Käfigen unter SPF-Bedingungen gehalten (12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus, freier Zugang zu Trinkwasser und Standard-Kost). Die tierärztliche Betreuung erfolgt durch die Mitarbeiter der Einrichtung für Tierschutz, Tierärztlichen Dienst und Labortierkunde der Universität.

In diesem Modell kann etwa 14 Tage nach subcutaner Implantation der humanen Hepatomzellen der Linie HuH7 in ca. 80 % der Tiere mit einem Anwachsen tastbarer Tumoren gerechnet werden.

Der Versuch besteht aus drei unterschiedlichen Behandlungsgruppen, die erste Gruppe erhält eine niedrige Dosierung des Wirkstoffes VEGF Trap („low dose“; 2,5 mg/kg Körpergewicht), die zweite Gruppe eine hohe Dosis („high dose“; 25 mg/kg Körpergewicht). Die dritte Gruppe fungiert als Kontrollgruppe, es wird humanes Fc- Fragment in einer Dosierung von 25 mg/kg Körpergewicht appliziert.

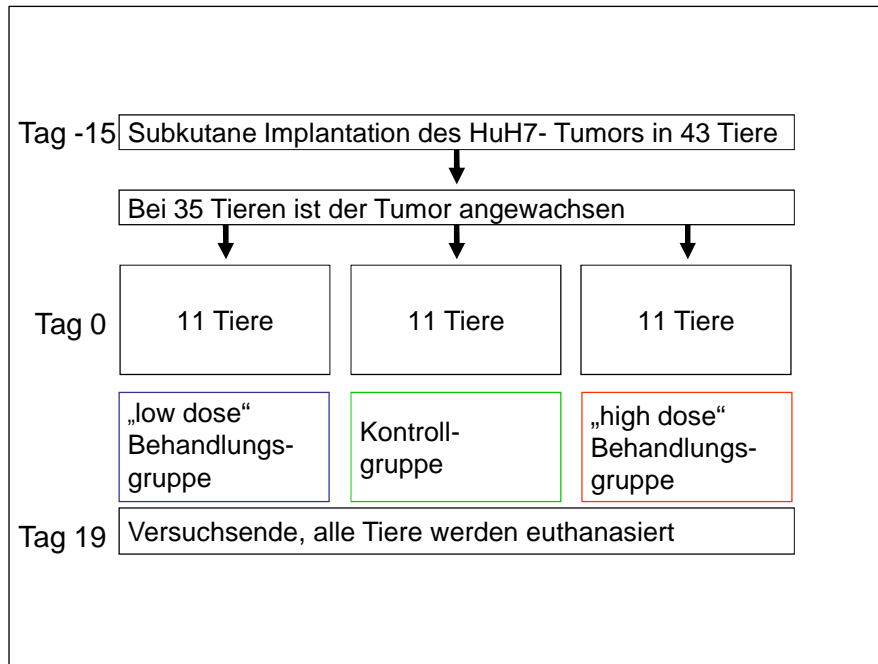


Diagramm 4: Schematischer Ablauf des Tierversuchs.

Zu Beginn werden die HuH7-Zellen aufgetaut und in Kultur genommen. Es erfolgt die erneute Passage der 20 Flaschen HuH7-Zellen, diese werden sechs Tage später geerntet. Die Zellzahl beläuft sich auf $1,4 \cdot 10^7$ Zellen pro Flasche. Die Zellen werden in DMEM gewaschen und auf $5 \cdot 10^6$ Zellen pro 100 μ l eingestellt. Als nächstes wird die Zellsuspension (5,6 ml) auf drei Kryoröhrchen verteilt.

Anschließend werden 100 μ l Zellsuspension pro Maus s.c. rechts paravertebral injiziert.

15 Tage später sind bei 35 Tieren die Tumoren auf einen mittleren Durchmesser von 10 mm angewachsen. Die Tiere werden mithilfe eines Permanent Markers mit Nummern versehen. Das Ranking erfolgt nach Tumorgröße. Tier Nr. 16 und Tier Nr. 43 werden vom Versuch ausgeschlossen, da ersteres einen überdurchschnittlich großen Tumor und letzteres zwei Tumoren aufweist.

Die Tiere werden nach der Randomisierungsliste geblockt randomisiert. Da bei mehr Tieren als erwartet Tumoren angewachsen waren, befinden sich nun in jeder Behandlungsgruppe elf statt der ursprünglich angenommenen zehn Tiere. Die Gruppe der acht unbehandelten Tiere wird weiter beobachtet, bei vier Tieren kommt es zum Anwachsen eines Tumors.

Die Mäuse werden ab dem ersten Versuchstag täglich gewogen und Länge, Breite und Höhe der Tumoren mit einem Messschieber vermessen. Die erste Injektion VEGF Trap s.c. erfolgt links paravertebral mit einem Volumen von 100 µl an Tag 1 des Tierversuches.

Im Rahmen der ersten Wirkstoffgabe kommt es durch eine Verwechslung der Tiere 40 und 42 zu einer Protokollverletzung, die sofort bemerkt wird. Die Gruppenzuordnung dieser beiden Tiere wird daher nicht gemäß dem Randomisierungsprotokoll, sondern entsprechend der Erstgabe des Wirkstoffes fortgeführt.

Am folgenden Tag werden die Tumorgößen per Messschieber und das Gewicht aller Tiere erfasst. Es findet außerdem die Euthanasie der Tiere 16 und 43 (in Äther-Narkose) statt. Die Tumoren werden explantiert und je zur Hälfte in Formalin fixiert und kryokonserviert. Eine intracardiale Blutentnahme wird ebenfalls durchgeführt, schließlich wird das Blut in Sarstedt Monovetten für Serum abzentrifugiert und das Serum in 30 µl Aliquots kryokonserviert.

Das dreidimensionale Vermessen der Tumorgößen und die Gewichtsmessung werden täglich mit dem Messschieber bzw. einer elektronischen Waage durchgeführt. Um Messfehler im Rahmen zu halten, wird die Messung immer vom gleichen Untersucher vorgenommen. Falls nötig, werden die Tiere bei der Messung neu beschriftet.

Drei Tage nach der ersten VEGF Trap Injektion erfolgt die zweite Gabe, hierbei tritt bei Tier 6 wieder etwas injizierte Flüssigkeit aus dem Stichkanal aus, weshalb ca. 30 µl VEGF Trap nachinjiziert werden.

Insgesamt finden sechs Injektionen statt, vier Tage nach der letzten Injektion wird der Tierversuch beendet und alle Tiere euthanasiert. Neben der Tumorentnahme für die Formalin- und Kryokonservierung werden auch Milz, Leber und Lunge kryoasserviert. Schließlich erfolgt eine intracardiale Blutentnahme und Fotodokumentation der Tiere.

2.2.3 Auswertung des Tierversuches

Zur Auswertung des Tierversuches werden ein Fisher- Test, ein t-Test, sowie ein Tukey- Kramer- Test durchgeführt.[112]

2.3 Tumorasservierung

Eine Asservierung in Formalin erfolgt neben den Tumoren auch von Milz, Leber, Lunge und Peritoneum.

Die andere Hälfte der Tumoren wird bei -80°C kryokonserviert. Das Blutserum wird ebenfalls bei -80°C gelagert.

2.3.1 Kryokonservierung

Material:

- Kryo-Röhrchen
- Tissue Teck (Tissue Tek O.C.T. Compound, Embedding Medium For Frozen Tissue Specimens, Miles Inc. Diagnostics Division, Elkhart, USA)

Kryokonserviert werden Tumor-, Leber- und eine Peritoneumprobe. Sie werden sofort nach der Entnahme in Tissue Teck gebettet und in Kryo-Röhrchen bei -80°C gelagert.

2.3.2 Formalinkonservierung

Material: Formalin 4 %

Außer den Tumorproben werden auch Leber-, Lunge- und Peritoneumproben in Formalin asserviert. Der Zuschnitt der Proben erfolgt im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen. Die zugeschnittenen Gewebeproben werden nun für 12 Stunden in 4 % gepuffertem Formalin fixiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe:

45 Minuten 70 %ige Isopropanol-Lösung
1 Stunde 96 %ige Isopropanol-Lösung in Aqua dest.
1 Stunde 96 %ige Isopropanol-Lösung in Aqua dest.
1 Stunde 100 %ige Isopropanol-Lösung in Aqua dest.
1 Stunde 100 %ige Isopropanol-Lösung in Aqua dest.
1 Stunde 100 %ige Isopropanol-Lösung
1 Stunde 100 %ige Isopropanol- Lösung
1 Stunde in Xylol
1,5 Stunden in Xylol
30 Minuten in 60°C heißem Paraffin
30 Minuten Paraffin
1 Stunde Paraffin
1,5 Stunden Paraffin
Danach wird das Gewebe eingeblockt.

2.4 Anfertigen von Kryoschnitten

Für die Herstellung der Kryoschnitte werden die bei -80°C tiefgefrorenen Tumoren über Nacht bei -20°C gelagert. Sobald das Kryotom eine Betriebstemperatur von -20°C erreicht hat, wird der zu schneidende Tumor auf den Schneideträger mithilfe eines Tröpfchens Tissue Teck aufgefroren. Nun werden $7\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt, die auf Objektträger gebracht wurden. Die Schnitte trocknen eine Stunde Stunde bei Raumtemperatur. Danach werden sie entweder bei -20°C konserviert oder für Färbungen verwendet.

2.5 Histopathologie und Immunhistochemie

2.5.1 HE- Färbung

Die Paraffinschnitte werden anschließend noch einer HE- Färbung unterzogen.

Reagenzien:

- Mayers Hämatoxylin (Bio Optica, Milano SpA , Mailand, Italien)
- Eosin (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

Ablauf:

Entparaffinieren

2 mal Xylol je 15 Minuten

2 mal 100 % Ethanol je 5 Minuten

2 mal 96 % Ethanol je 5 Minuten

2 mal 70 % Ethanol je 5 Minuten

Aqua dest. für 5 Minuten

Anschließend färbt man für 2 Minuten in Hämatoxylin.

10 Minuten in Leitungswasser zum Bläuen

5 Minuten Eosin

1 Minute 96 % Ethanol

2 mal 3 Minuten 100 % Ethanol

2 mal 5 Minuten Xylol

Das Gewebe wird zum Schluss mit Pertex eingedeckt.

2.5.2 Auswertung der Nekroseanteile und der Hämorrhagien

In den HE-gefärbten Schnitten erfolgt die Auswertung der Nekrosefläche. Es soll gezeigt werden, ob Nekroseanteil und Behandlungsgruppe miteinander korrelieren.

Die Schnitte werden unter einem Zeiss Axioplan Mikroskop bei 1,25-facher Vergrößerung betrachtet und mit einer ProgRes C10 plus Fotokamera fotografiert. Die Vermessung des Schnitts erfolgt an einem Flex Scan M1700 Multi Edge Monitor von EIZO mithilfe der Bildsoftware Image Access Enterprise 6 von der Imagic Bildverarbeitung AG, Glattbrugg, Schweiz. Täglich wird vor jeder Auswertung eine Eichung vorgenommen.

Zuerst wird die gesamte Fläche des auf dem Schnittpräparat erfassten Gewebes vermessen, anschließend werden unter dem Mikroskop die nekrotischen Teilflächen des Tumors aufgesucht und am Bildschirm ausgemessen. Die Messwerte werden in eine Excel-Tabelle übertragen.

Ist es nicht möglich, den Schnitt aufgrund seiner Größe vollständig auf dem Bildschirm abzubilden, so wird er in Teilflächen unterteilt und dann die Nekroseareale bestimmt. Zur Auswertung der Nekrosen wird ein t-Test durchgeführt.

Bei der Betrachtung der HE-Präparate fallen in einem Teil der Schnitte ausgedehnte Hämorrhagien auf. Um zu klären, inwieweit das Ausmaß dieser Hämorrhagien mit der Art der Behandlung korreliert, wird eine Auswertung durchgeführt. Anhand der HE-Färbungen wird von zwei unabhängigen Untersuchern eine verblindete Auswertung der Hämorrhagien vorgenommen. Die Auswertung erfolgt anhand einer drei-Punkte Scala von 1 (wenig Einblutungen) bis 3 (viele Einblutungen). Die Übereinstimmung der Betrachter wird über ein κ mit asymptotischem 95 %-Konfidenzintervall gemessen, der Anteil an Übereinstimmungen mittels der Blyth-Still-Casella CI Methode.[12]

Der durchschnittliche Hämorrhagie-Score wird benutzt, um die Behandlungsgruppen per Kruskal-Wallis-Test zu überprüfen. Die Berechnungen erfolgten mithilfe des Programms StatExact 8.0.0 (Cytel Inc. 2007).

2.5.3 Gefäßendothelfärbung

Zur Darstellung der Gefäße in den Tumorschnitten wurde auf zwei unterschiedliche Färbungen zurückgegriffen, die Alkalische Phosphatase-Färbung und die Meca-32-Färbung. Ziel ist der Nachweis einer Korrelation von Gefäßanzahl und Behandlungsgruppe.

2.5.3.1 Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung

Material für die Alkalische Phosphatase-Färbung:

- Aqua dest.
- Naphtholphosphat: Naphthol- AS-Bi- Phosphate, Sodium Salt, No. N-2250 (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)
- Fast Red: Fast Red TR Salt, S-Chloro-2-Toluenediazonium Chloride Hemi Zinc Chloride, No. F-1500 (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)
- Magnesiumsulfat ($MgSO_4$): Magnesiumsulfat- Heptahydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Borsäure (H_3BO_3) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natronlauge (NaOH) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Fettstift: ImmEdge Pen (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA)
- Eindeckelungsmittel: Fluor Save TM Reagent (EMD Biosciences, Inc. La Jolla, USA)
- Objektträger: Super Frost Objektträger (R. Langenbrick, Labor- und Medizintechnik, Teningen, Deutschland)
- Deckgläser: Stärke 24*50 mm, Glasdicke 0,08 - 0,12 mm. (G. Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland)

Herstellung des Puffers:

172,2 mg MgSO_4 und 167 mg H_3BO_3 werden mit einer Feinwaage abgewogen und dann mit Aqua dest. auf ein Volumen von 80 ml aufgefüllt. Tröpfchenweise gibt man NaOH hinzu, bis man einen pH-Wert von 9,2 erreicht hat. Abschließend füllt man die Lösung auf 100 ml auf.

Herstellung der Färbelösung:

20 mg Naphtholphosphat werden mit Methanol bis zu einem Volumen von 10 ml ergänzt.

100 mg Fast Red werden mit der oben beschriebenen Pufferlösung auf 10 ml aufgefüllt.

Die bei -80°C gelagerten Tumor- und Leberproben werden auf eine Temperatur von -20°C gebracht und im Kryotom bei -18°C gelagert. Es werden $7\ \mu\text{m}$ und $10\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt. Diese werden eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Danach werden die Schnitte entweder bei -20°C aufbewahrt oder für die Alkalische Phosphatase-Färbung verwendet. Besonders die $7\ \mu\text{m}$ dicken Schnitte eignen sich für die Färbung, da das Gewebe bei dieser Dicke nicht so sehr einreißt.

Während die Schnitte trocknen, stellt man in 1 ml Eppendorf-Cups die Färbeverdünnung her, bestehend aus $75\ \mu\text{l}$ Fast Red, $75\ \mu\text{l}$ Naphtholphosphat und $850\ \mu\text{l}$ Puffer. Ein weiteres Eppendorf-Cup enthält lediglich den Puffer als Ansatz zur Kontrolle.

Nach der Trocknungsphase werden die Objektträger für zwei bis drei Minuten in -20°C kaltes Aceton gestellt. Als nächsten Schritt kreist man die einzelnen Schnitte auf den Objektträgern mit dem Fettstift ein. Anschließend werden die Schnitte für 30 Sekunden mit dem Puffer befeuchtet. Die Pufferlösung kippt man bei allen Objektträgern außer den Kontrollen wieder ab und die Färbeverdünnung wird auf die Schnitte gegeben.

Nun inkubiert man die Schnitte für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37°C. Nach der Inkubation wird die Flüssigkeit abgekippt und die Schnitte werden für fünf Minuten mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend erfolgt eine Färbung mit Hämatoxylin für zwei Minuten. Die Objektträger werden danach unter fließendem Leitungswasser so lange gewaschen, bis das Wasser ganz klar ist. Die Objektträger müssen noch feucht sein, wenn man das Eindeckelungsmittel auf die Deckgläschen gibt und die Schnitte damit verschließt.

2.5.3.1.1 Auswertung

Die Schnitte werden bei 10-facher Vergrößerung betrachtet. Für die Quantifizierung der Gefäße werden pro erfasstem Schnittpräparat vier Gesichtsfelder ausgewertet. Für den Herstellernachweis des Mikroskops, der Fotokamera, des Scanners und der Bildverarbeitungssoftware siehe 2.5.2.

2.5.3.2 Meca32- Färbung

Material für die Meca32- Färbung:

- PBST: PBS wird 1:10 mit VE-Wasser verdünnt und 1 ml Tween hinzugegeben.
- Tween (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- H₂O₂/ MeOH (Dako Denmark AIS, Glostrup, Dänemark)
- Mausserum/ Ziegenserum: selbst gewonnen
- 1. Antikörper: Meca32 (BD Pharmingen San Diego, USA)
- 2. Antikörper (Ratte) (Vector Laboratories Inc. ,Burlingame, USA)
- DAB Reagenz: 3,3' Diaminobenzidin
(Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)
- ABC- Reagenz: Avidin- Biotin-Complex.
(Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA)
- Hämatoxylin (Dako Denmark AIS, Glostrup, Dänemark)
- PapPen (Dako Denmark AIS, Glostrup, Dänemark)
- Objektträger: Super Frost Objektträger
(R. Langenbrick, Labor- und Medizintechnik, Teningen, Deutschland)
- Deckgläser: Stärke 24*50 mm, Glasdicke 0,08- 0,12mm
(G. Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland)

Die bei -20°C gelagerten Gefrierschnitte werden 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Es ist ratsam, zu den Objektträgern ein kleines Kissen aus Kieselgel (aus Zellstoff ein Kissen formen, in das man die Kieselgel-Kügelchen gibt) zu legen. Das Kieselgel nimmt die beim Auftauprozess entstehende Feuchtigkeit auf und schützt dadurch die Schnitte.

Als nächstes inkubiert man die Schnitte zehn Minuten lang mit -20°C kaltem Aceton und lässt sie dann 30 Minuten trocknen. Anschließend werden die Objektträger mit PBST befeuchtet, um sie danach für 15 Minuten in 0,3 %iger Lösung von $\text{H}_2\text{O}_2/\text{MeOH}$ (Wasserstoffperoxid/Methanol) inkubieren zu lassen. Danach wäscht man drei mal fünf Minuten lang mit PBST. Schließlich werden die Schnitte mit einem PapPen Fettstift umrandet. Nun werden die Schnitte mit 10 % Mausserum/Ziegenserum geblockt, um unspezifische Bindungen abzufangen. Nach einer Stunde Einwirkzeit gibt man den ersten Antikörper, das Meca32 (Iso rat, das 1:10 mit PBST verdünnt wird), ebenfalls für die Dauer von einer Stunde auf die Schnitte. Der Meca32-Antikörper richtet sich gegen panendotheliales Antigen. Anschließend wäscht man die Objektträger drei mal für fünf Minuten mit PBST, um dann den zweiten Antikörper auf die Schnitte zu geben. Hierbei handelt es sich um einen anti-Ratte-Antikörper, der 1:250 mit PBST verdünnt wird und gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist. Auch der zweite Antikörper wirkt eine Stunde lang ein. Danach inkubiert man die Schnitte für 30 Minuten mit einem ABC- Reagenz bei Raumtemperatur. Wieder wäscht man mit PBST für drei mal fünf Minuten. Die Entwicklung erfolgt mithilfe eines DAB- Reagenz, die Dauer der Einwirkzeit wird unter dem Mikroskop kontrolliert und liegt zwischen zehn und 30 Minuten. Ist die Färbung intensiv genug, so inkubiert man die Schnitte in Leitungswasser und stoppt damit die Reaktion des DAB- Reagenz. Die Gegenfärbung erfolgt mit Hämatoxylin, in welches die Objektträger nur kurz eingetaucht werden. Nun spült man die Objektträger gut mit Leitungswasser und deckelt sie mit einem wasserlöslichen Eindeckmittel ein, z. B. Aquatex. Das Eindeckmittel muss wasserlöslich sein, da das ABC- Substrat nicht lösungsmittelbeständig ist.

2.5.3.2.1 Auswertung

Die Auswertung ist nicht erfolgt, da der Versuch fehlgeschlagen ist. (siehe auch 4.4.2)

2.5.4 MIB-1-Färbung

Zur Untersuchung der Proliferation der Tumorzellen wird eine MIB-Färbung durchgeführt. Es soll gezeigt werden, ob die Proliferation und die Behandlungsgruppen voneinander abhängig sind.

Der MIB-1-Antikörper fungiert als ein monoklonaler muriner Referenz-Antikörper für die Detektion des Ki-67-Antigens in Paraffinschnitten. Ki-67 wird lediglich während der aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2- und M- Phase) exprimiert, nicht in der G0-Phase. Nur wenn sich die Zelle in der Interphase befindet, kann das Antigen im Nukleus nachgewiesen werden. Während der Mitose wird das Antigen auf der Oberfläche der Chromosomen exprimiert.

Die MIB-Färbung wird im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt, verwendet wird der Ventana Immunostainer, Bench Mark XT Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA.

.

Material:

- EZ-Präp-Lösung (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA)
- MIB-1-Antikörper: Monoclonal Mouse Anti Human Ki-67 Antigen (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark)
- Detection Kit (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA)
- Liquid Cover Slip
- Tris Puffer: selbst hergestellt
- 3-Hämatoxylin (Shandon, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA)

Es wird zuerst eine Entparaffinisierung der Objektträger mit der EZ-Präp-Lösung durchgeführt. Nach jedem der folgenden Arbeitsschritte wird ein Liquid Cover Slip auf die Schnitte aufgetragen, um sie vor Austrocknung zu schützen. Anschließend erfolgt eine Hitzevorbehandlung zur Freilegung der Epitope bei 95°C für acht Minuten. Die Objektträger werden dann bei einem pH von 8,4 in Tris Puffer inkubiert. Nun wird der MIB-Antikörper für 32 Minuten bei 37°C aufgetragen. Bei dem Antikörper wird nach der Avidin-Biotin Methode als Enzym vorgegangen. MIB-1 positive Kerne erscheinen unter dem Mikroskop braun. Die Gegenfärbung erfolgt mit einer Hämatoxylinfärbung nach Gill's. Hierfür werden zu 7 ml Hämatoxylin (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) 10 ml Eisessig pipettiert und mit 12 ml Aqua dest. aufgefüllt. Die Schnitte werden für acht Minuten gegengefärbt, die Zellkerne erscheinen unter dem Mikroskop blau. Um den Ölfilm abzuwaschen, inkubiert man die Objektträger in warmem Pril-Leitungswasser, danach für fünf Minuten in kaltem Leitungswasser. Nun durchlaufen die Schnitte noch eine aufsteigende Alkoholreihe:

2 mal 2 Minuten in 70 % Isopropanol

2 mal 2 Minuten in 90 % Isopropanol

4 mal 2 Minuten in 100 % Isopropanol

Abschließend inkubiert man noch für vier mal zwei Minuten in Xylol, versiegelt werden die Schnitte mit Aquatex.

2.5.4.1 Auswertung

Bei einer 40-fachen Vergrößerung wird in acht Kreisen à 50 µm, die zufällig über den Schnitten verteilt werden, eine Auszählung der positiven (dunkelbraunen) und negativen (blauen) Zellen vorgenommen. Es werden Schnitte von allen Tumoren ausgezählt. Anschließend erfolgt eine Übertragung der Werte in eine Excel-Tabelle. Zur Auswertung der Proliferation wird ein Wilcoxon-Test durchgeführt.

2.5.5 Untersuchung der Apoptose mittels Caspase-Färbung

Anhand der Färbung auf aktivierte Caspase-3 wird eine Untersuchung apoptotischer Zellen vorgenommen. Ziel ist der Nachweis einer Korrelation von Apoptose und Behandlungsgruppe.

Material:

- Ventana Immunostainer Bench Mark XT
(Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA)
- EZ Prep (Ventana, Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA)
- aktivierte Caspase-3 (DCS Innovative Diagnostik- Systeme GmbH u.
Co.KG Poppenbütteler, Hamburg)
- Reaktionspuffer (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA)
- CC2- Puffer (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA)
- Diluent (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland)
- i-View DAB Detection Kit
(Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA)
- Cytoseal XYL (Microm, Microm Micromarketing-Systeme und Consult
GmbH, Neuss, Deutschland)
- Eindeckautomat CTM6 (Microm, Microm Micromarketing-Systeme und
Consult GmbH, Neuss, Deutschland)

Die Färbung wird im vollautomatisierten Ventana Immunostainer Bench Mark XT durchgeführt. Jedem Vorgang folgt eine Spülung mit Trispufferlösung bei einem pH-Wert von 7,6 bis 7,8. Zunächst erfolgt die Vorbehandlung mit EZ Prep, einer wässrigen Lösung, zur Entparaffinierung bei einem pH- Wert von 7,0. Die anschließende Denaturierung wird mit einem Citratpuffer bei pH 6 und 90°C durchgeführt. Der aktivierte Caspase-3-Antikörper wird 1:200 in Diluent verdünnt. Die Objektträger werden für 32 Minuten bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgt mit dem i-view DAB Detection Kit, einem Nachweissystem basierend auf einem biotinyliertem Sekundärantikörper mit Streptavidin-gekoppeltem HRP-Komplex mit DAB als Substrat. Zur Kernfärbung wird eine Hämatoxylinfärbung nach Gilles angewendet.

Die nachfolgende Dehydrierung findet außerhalb des Ventana Immunostainers statt, sie wird manuell durchgeführt. Die Schnitte durchlaufen eine aufsteigende Alkoholreihe, hierbei wird folgendermaßen vorgegangen:

70 % Alkohollösung je 2 mal 2 Minuten

96 % Alkohollösung je 2 mal 2 Minuten

100 % Alkohollösung je 2 mal 2 Minuten

Xylol 4 mal 2 Minuten

Die Eindeckelung erfolgt im Eindeckautomaten CTM6 mittels Cytoseal XYL.

2.5.5.1 Auswertung

In die Auswertung werden nur solide vitale Tumorareale einbezogen. Es werden jeweils zwei Runden à 10 „high power fields“ ausgezählt, um einen "learning" Effekt bzw. ein Driften bei der Auswertung zu vermeiden. Nur Zellen, die eine Tumorzellmorphologie zeigen, werden gewertet.

2.6 Untersuchungen des Serums

2.6.1 VEGF-Serumspiegel

Um frei zirkulierendes VEGF im Serum nachzuweisen, erfolgt bei der Euthanasie der Tiere eine intracardiale Blutentnahme. Über ein ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) wird der Serumspiegel quantifiziert. Der ELISA wird von der Firma Regeneron durchgeführt. Es soll überprüft werden, ob Serumspiegel und Behandlungsgruppe voneinander abhängig sind.

2.6.2 Komplexbildung aus VEGF und VEGF Trap

Zur Quantifizierung des Komplexes aus VEGF und VEGF Trap in den Behandlungsgruppen wird von der Firma Regeneron ein ELISA durchgeführt.

2.7 SRB- Assay zur Untersuchung der Zytotoxizität von VEGF Trap

Um die toxische Wirkung von VEGF Trap auf die Tumorzellen zu untersuchen, wird ein SRB-Assay durchgeführt. Ziel des Versuches ist der Nachweis, dass VEGF Trap keine direkte zytotoxische Wirkung auf vitale Tumorzellen hat. Als Kontrollsubstanz wird humanes Fc-Fragment in gepufferter PBS-Lösung verwendet.

Der SRB-Assay wird in Konzentrationen von 0,00; 0,01; 0,1; 10 und 100 µg VEGF Trap/ml bzw. humanem Fc-Fragment in 24 Well Platten getestet. Bei den statistischen Auswertungen werden in Varianzanalysen die Einflussgrößen Wirkstoff, Kontrolle, Wiederholungen der Versuche und Konzentrationen bezogen auf den Wirkstoff untersucht. Die Hypothesen werden getestet; die Normalität durch einen Normalen-Quantilen- Plot sowie die Varianzhomogenität und die Unabhängigkeit in einem Streudiagramm der Residuen der vorhergesagten Werte.

Material:

- Extraktionslösung: 10 mM Tris-Base (pH bei 10,5)
1,211 g Tris Base werden mit Aqua bidest. bis zu einem Volumen von 1 l aufgefüllt.
- Färbelösung: 0,4 %ige SRB
(Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
Zu 100 ml 1 %iger Essigsäurelösung gibt man 0,4 g Sulforhodamin B.
- Fixierlösung: 10 %ige Trichloressigsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Mit Aqua bidest. werden 100 g Trichloressigsäure auf ein Volumen von 1 l aufgefüllt.
- Pufferlösung: PBS- Puffer
- Waschlösung: 1% ige Essigsäurelösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)
10 ml Essigsäure (konz.) werden mit 990 ml Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt.

Die Dauer des Versuchs ist auf fünf Tage angelegt. Pro 24-Well Platten werden 20000 HuH7- Zellen ausgesät. Die Konzentrationen belaufen sich auf 0; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µg/ml VEGF Trap. Die Zellen werden bei 36,5°C inkubiert. Am zweiten Tag findet ein Mediumwechsel statt, das heißt, der Überstand an Lösung wird vorsichtig abpipettiert, ohne den Boden der Wells zu berühren. Anschließend wird neues Medium hinzugegeben. Unter dem Mikroskop beurteilt man die Zellen. 48 Stunden danach wird ein weiterer Mediumwechsel durchgeführt. 72 Stunden nach dem zweiten Mediumwechsel (also 120 Stunden nach Versuchsbeginn) wird der Versuch beendet.

Zum Abstoppen des Versuches werden die 24-Well-Platten auf Eis gekühlt, die toten Zellen entfernt man durch Waschen mit gepufferter PBS-Lösung. Die vitalen Zellen werden durch 30 minütige Inkubation in 4°C kalter Trichloressigsäure-(TCA) Lösung gebunden. Durch viermaliges Waschen mit Leitungswasser sind die Zellen frei von TCA- Rückständen und können nun bei 37°C trocknen.

Als nächster Schritt werden am folgenden Tag die getrockneten Zellen gefärbt. Für eine Dauer von 10 Minuten wird nun bei Raumtemperatur je 250 µl 0,4%iger SRB- Farbstoff auf die Zellen gegeben. Überschüssiger Farbstoff, der von den Zellen nicht aufgenommen wurde, wird durch Hinzugeben von 1%iger Essigsäurelösung entfernt. Nun trocknen die Zellen für mindestens sechs Stunden bei 37°C. Den restlichen Farbstoff entfernt man mit 10 mM Tris-Base, dazu werden die Wells auf Eis gelagert.

2.7.1 Auswertung

Die Auswertung erfolgt im ELISA- Reader bei 550 nm. Der zytotoxische Effekt ist umgekehrt proportional zur optischen Dichte, aber direkt proportional zur Zahl der überlebenden Zellen.

Eine lineare Beziehung gilt für optische Dichte- Werte (OD) von <1,8. Übersteigen die Werte diese Grenze, so muss mit alkalischer Tris-Base-Lösung nochmals verdünnt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Tierversuch

3.1.1 Verlauf des Tumorwachstums

Durch eine Behandlung mit dem Angiogeneseinhibitor VEGF Trap sollte das Tumorwachstum in einem HuH7-Xenograft-Modell gehemmt werden.

Die Fallzahlplanung zielte auf den Nachweis einer Reduktion des Tumolvolumens auf 50 % der Kontrolle in der „low dose“ Behandlungsgruppe und auf 25 % in der „high dose“ Behandlungsgruppe an Tag 14 des Versuches, dem Zieltag der statistischen Planung. Das Tumolvolumen konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe in der „low dose“ Behandlungsgruppe auf 42,2 % und in der „high dose“ Behandlungsgruppe auf 21,3 % reduziert werden. Somit wurde das Wachstum in beiden Behandlungsgruppen signifikant gehemmt.

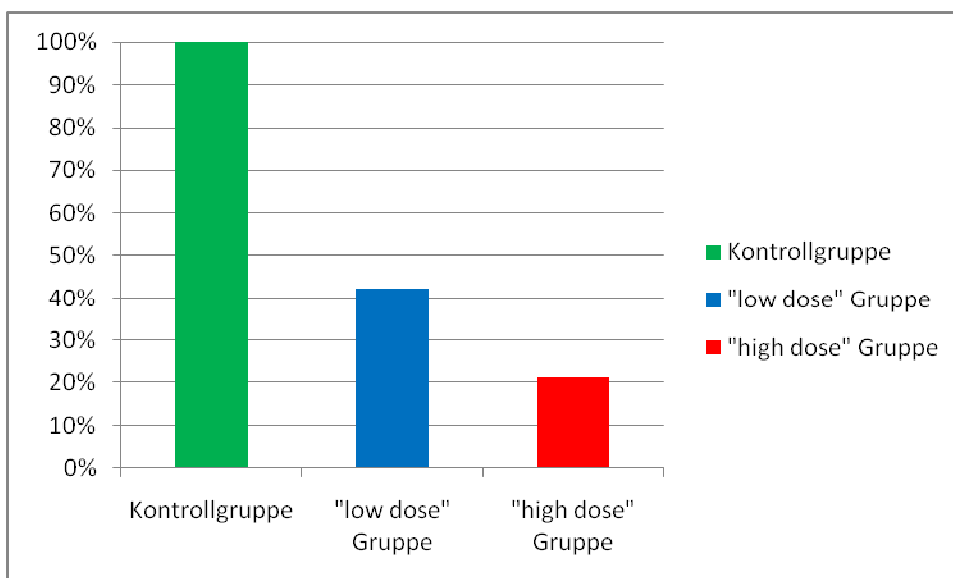


Diagramm 5: Darstellung des Tumorwachstums der „low dose“ Behandlungsgruppe, der „high dose“ Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe war das Tumorwachstum am stärksten, gefolgt von der „low dose“ Behandlungsgruppe und der „high dose“ Behandlungsgruppe.

Diagramm 6 stellt die Volumenzunahme in den Behandlungsgruppen dar. Über die Differenz der Tumervolumina von Tag 0 und Tag 14 wurde die prozentuale Zunahme in diesem Zeitraum berechnet. In der Kontrollgruppe nahm das Tumervolumen um 1067 % zu, in der „low dose“ Gruppe betrug die Zunahme 450 %, und in der „high dose“ Gruppe 227 %. In der Kontrollgruppe war somit das stärkste und in der „high dose“ Gruppe das geringste Wachstum zu verzeichnen.

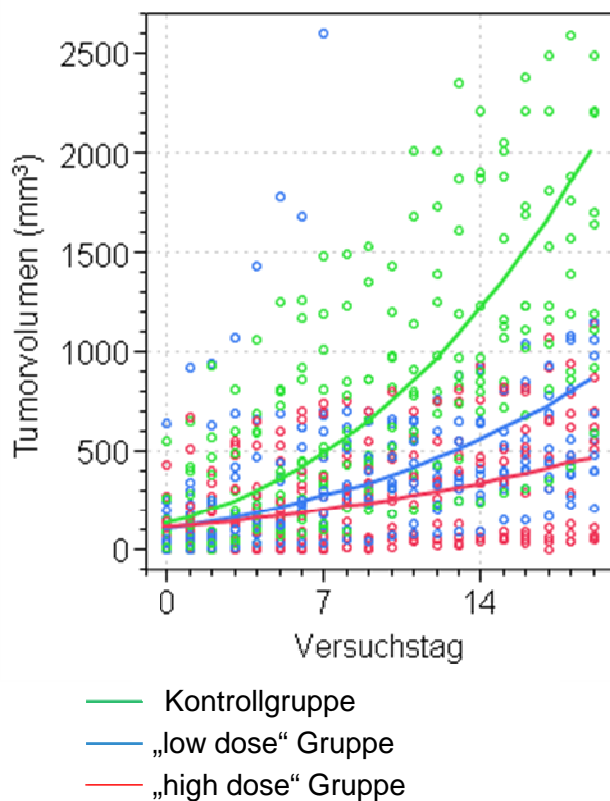


Diagramm 6: Die Volumenzunahme in den einzelnen Behandlungsgruppen. In der Kontrollgruppe war die Zunahme am größten, in der „high dose“ Behandlungsgruppe am geringsten.

Um die Unterschiede in den Wachstumsgeschwindigkeiten der Behandlungsgruppen zu berechnen, wurde ein Custom Test durchgeführt. Im Vergleich „high dose“ mit Kontrollgruppe ergab sich ein Wert von $p = 0,00004$ (Standardfehler 0,024). Der Wert der „low dose“ verglichen mit der Kontrolle betrug $p = 0,0067$ (Standardfehler 0,024). In beiden Therapiegruppen konnte somit eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums nachgewiesen werden. (Der nach Protokoll nicht geplante Vergleich „low dose“ mit „high dose“ verfehlte mit einem Wert von 0,0564 die Signifikanz-Schwelle.)

3.1.2 Makroskopische Aspekte der Tumoren

Schon makroskopisch ließ sich ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen feststellen. Die Tumoren der Kontrollgruppe stellten sich dunkelrot bis schwarz gefärbt dar, wohingegen die Tumoren der Behandlungsgruppen wesentlich heller erschienen. (Abb. 1)

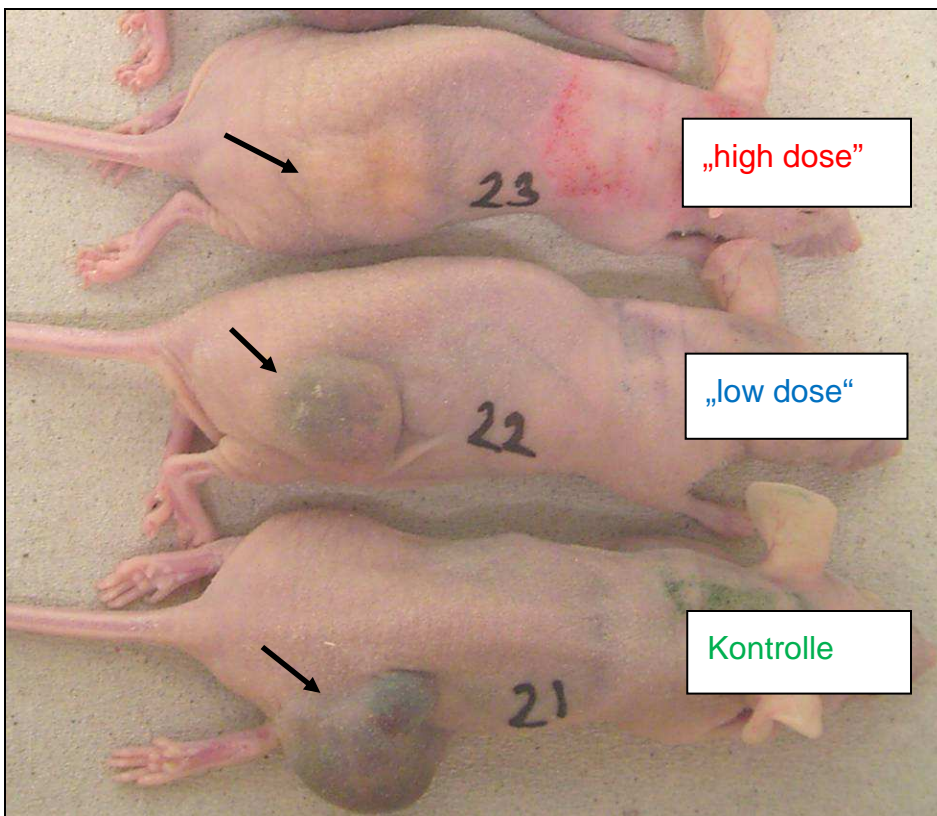


Abbildung 1: Blick auf Tumoren der unterschiedlichen Behandlungsgruppen. Die Unterschiede sind deutlich zu erkennen, so erscheinen die Tumoren der „high dose“ Behandlungsgruppe klein und weißlich, in der Kontrollgruppe hingegen sind die Tumoren größer und wirken fast schwarz. (siehe Pfeile)

Als Ursache dieser von uns nicht quantifizierbaren Farbunterschiede vermuteten wir Unterschiede in der „Durchblutung“ der Tumoren, die in der histopathologischen Untersuchung weiter beschrieben werden sollen.

3.2 Histopathologische Auswertungen

Für die histopathologische Auswertung stand sowohl formalinfixiertes Material als auch kryoasserviertes Material zur Verfügung. Zunächst erfolgte eine allgemeine morphologische Betrachtung anhand von Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparaten einschließlich morphometrischer Analysen. Diese wurden durch histochemische und immunhistochemische Untersuchungen ergänzt.

3.2.1 Verteilung der Nekrosen in HE gefärbten Tumoren

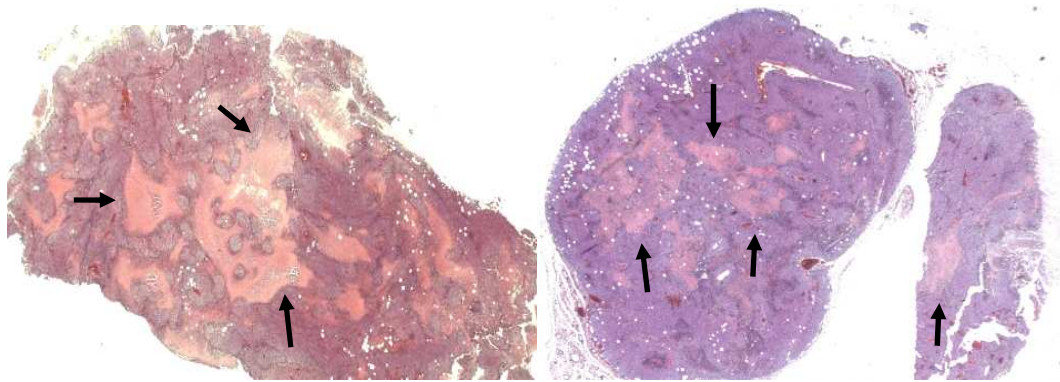


Abbildung 2: HE-gefärbte Schnitte aus Tumorgewebe. Vergrößerung 1,25-fach.

Die Nekroseflächen stellen sich hellrosa dar (siehe Pfeile), während vitales Gewebe lila gefärbt ist.

Links: Schnitt eines Tumors aus der „high dose“ Behandlungsgruppe.

Rechts: Schnitt eines Tumors aus der „low dose“ Behandlungsgruppe.

Um den subjektiven Eindruck von sehr unterschiedlichen Nekroseanteilen in den geblindeten Präparaten zu quantifizieren, wurde in den HE-gefärbten Tumorschnitten der Anteil an Nekrose am Tumorgewebe morphometrisch ermittelt. Ziel des Versuches war der Nachweis einer Korrelation von Nekroseanteil und Behandlungsgruppe.

Der Median des Anteils der Nekrosefläche an der Gesamtfläche der Schnitte betrug in der „high dose“ Behandlungsgruppe 26,04 %, in der „low dose“ Behandlungsgruppe 20,37 % und in der Kontrollgruppe 20,15 %.

Im Mittelwert belief sich der Anteil an Nekrose in der „low dose“ Behandlungsgruppe auf 18,8 % (Standardabweichung 7,65), in der „high dose“ Gruppe auf 26,1 % (Standardabweichung 14,37) und in der Kontrollgruppe auf 25,6 % (Standardabweichung 17,25).

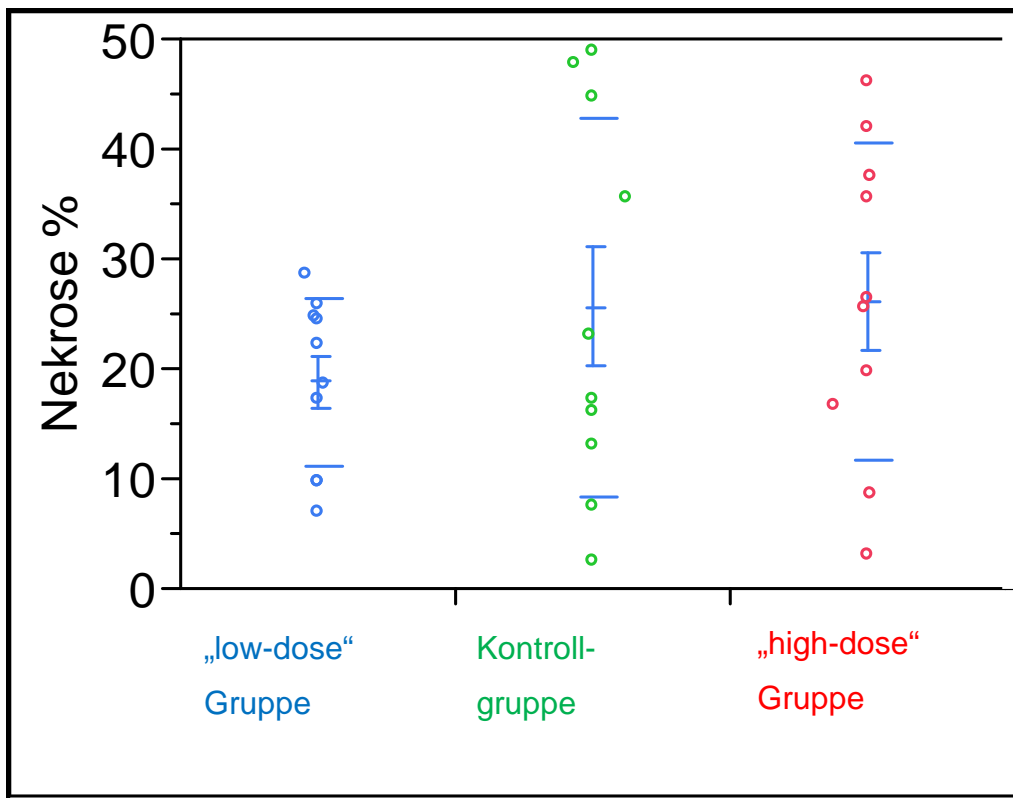


Diagramm 7: Es wird der Anteil der Nekrose in % in der jeweiligen Behandlungsgruppe gezeigt. Es ist erkennbar, dass der größte Nekroseanteil mit 26,1 % in der „high dose“ Behandlungsgruppe vorlag (Standardabweichung 14,37), gefolgt von der Kontrollgruppe mit 25,6 % (Standardabweichung 17,25) und der „low dose“ Behandlungsgruppe mit 18,8 % (Standardabweichung 7,65).

Die Mittelwerte wurden in einem t-Test überprüft. In keiner der Behandlungsgruppen war eine Signifikanz nachweisbar. Die Unterschiede im Anteil der Nekrose waren somit zufällig und keine Folge der unterschiedlichen therapeutischen Interventionen.

3.2.2 Hämorrhagien

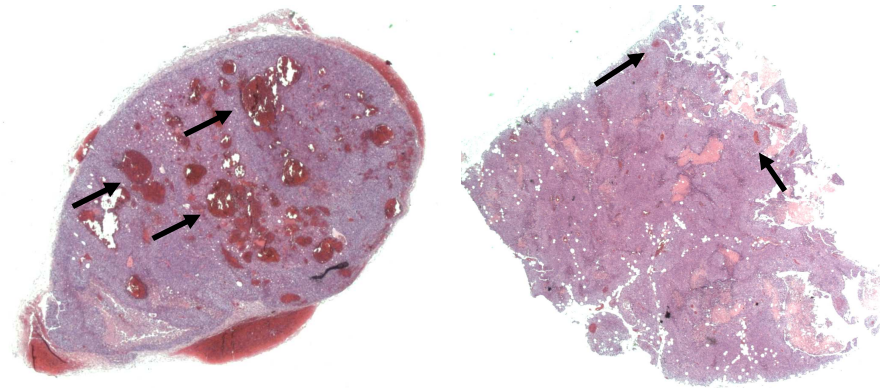


Abbildung 3: HE-gefärbte Schnitte aus Tumorgewebe. Vergrößerung 1,25-fach, ProgRes C10 plus Fotokamera der Firma Jenoptik Jena Laser Optik Systeme.

Die Hämorrhagien grenzen sich in den HE-gefärbten Tumorschnitten dunkelrot vom übrigen Gewebe ab. (siehe Pfeile)

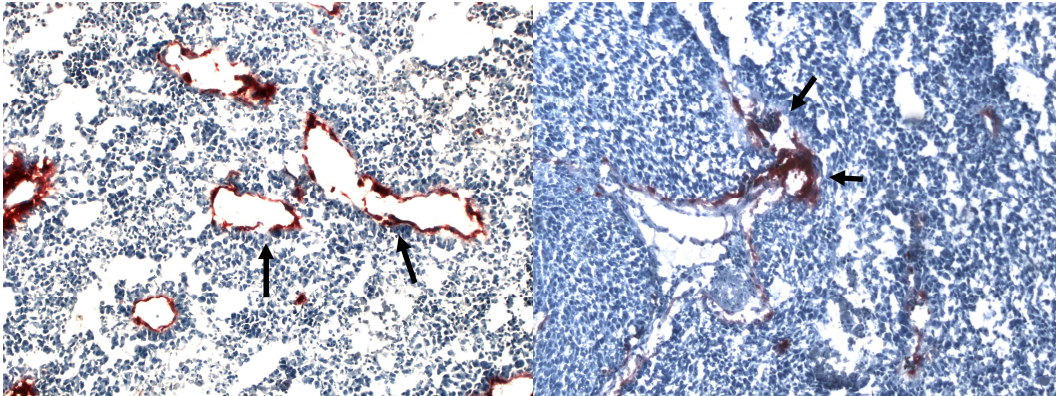
Links: Schnitt eines Tumors aus der Kontrollgruppe.

Rechts: Schnitt eines Tumors aus der „high dose“ Behandlungsgruppe.

Bei der Betrachtung der HE-Schnitte fielen neben den z.T. ausgedehnten Nekrosen auch deutliche Einblutungen in die Tumoren auf. Diese Unterschiede wurden als mögliches Korrelat für die makroskopisch bereits auffallenden Farbunterschiede der Tumoren gesehen. Um einen Zusammenhang zwischen Ausmaß der Einblutungen und Therapiegruppe zu erkennen, wurde eine Quantifizierung der Hämorrhagien durch zwei verblindete Betrachter in einer drei-Punkte Skala von 1 (wenig Einblutungen) bis 3 (viele Einblutungen) vorgenommen. Die Betrachter stimmten in 35 von 40 Schnitten in ihrer Bewertung überein, in 5 Schnitten bestanden diskordante Einschätzungen

($\kappa = 0,80$, KI 0,64-0,97). Die Behandlungsgruppen unterschieden sich signifikant im Ausmaß der Hämorrhagien. Während in der Kontrollgruppe ausgedehnte Hämorrhagien mit einem Median von 2 zu beobachten waren, traten nach der „high dose“ Behandlung mit VEGF Trap nur geringe Einblutungen auf. Hier lag der niedrigste Median von 1 vor. In der „low dose“ Gruppe lag der Median bei 1,5. ($p = 0,00013$)

3.2.3 Gefäßendothelfärbungen zur Quantifizierung der Gefäße



**Abbildung 4: AP-gefärbte Schnitte aus Tumorgewebe der „low dose“
Behandlungsgruppe. Vergrößerung 40-fach.**

Die positiv gefärbten Endothelzellen erscheinen auf dem Bild rot. (siehe Pfeile)

Eine Quantifizierung der Endothelien wurde in der Färbung auf Alkalische Phosphatase vorgenommen. Ziel war der Nachweis einer Abhängigkeit von Gefäßanzahl und Behandlungsgruppe.

In der „high dose“ Behandlungsgruppe belief sich die mittlere Anzahl der Gefäße pro Gesichtsfeld auf 15,57 (Standardabweichung 7,53).

In der „low dose“ Behandlungsgruppe betrug der Mittelwert 14,51 (Standardabweichung 6,99) und in der Kontrollgruppe lag der Mittelwert bei 12,76 (Standardabweichung 3,74).

Es konnte somit keine Abhängigkeit von Gefäßanzahl und Behandlungsgruppe nachgewiesen werden.

3.2.4 Bestimmung der Proliferation anhand der MIB-1-Färbung

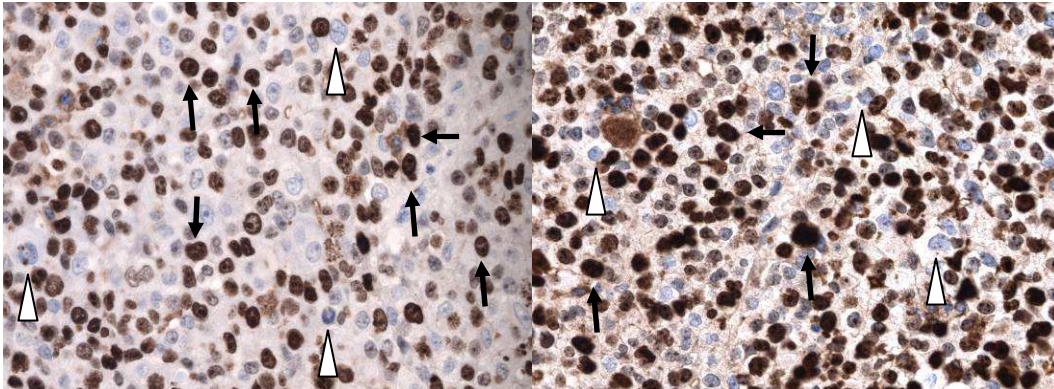


Abbildung 5: MIB-1 gefärbte Schnitte aus Tumorgewebe. Vergrößerung 40-fach.
Gut im Bild zu erkennen sind die MIB-1 positiv gefärbten dunkelbraunen Zellkerne (schwarze Pfeile), hingegen erscheinen die MIB-1-negativen Kerne hellblau. (weiße Pfeile)
Links: Schnitt eines Tumors aus der Kontrollgruppe.
Rechts: Schnitt eines Tumors aus der „low dose“ Behandlungsgruppe.

Die Proliferation der Tumorzellen wurde anhand einer MIB-Färbung ausgewertet. Es sollte geprüft werden, ob Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen vorliegen.

Der mittlere Anteil der proliferierenden Zellen belief sich in der „low dose“ Behandlungsgruppe auf 50,9 % (Standardabweichung 12,03), in der „high dose“ Behandlungsgruppe auf 40,67 % (Standardabweichung 8,75) und in der Kontrollgruppe auf 46,85 % (Standardabweichung 10,44). Der mediane Anteil an proliferierenden Zellen lag in der „low dose“ Behandlungsgruppe bei 51,79%; in der Kontrollgruppe bei 43,07% und in der „high dose“ Behandlungsgruppe bei 40,05 %.

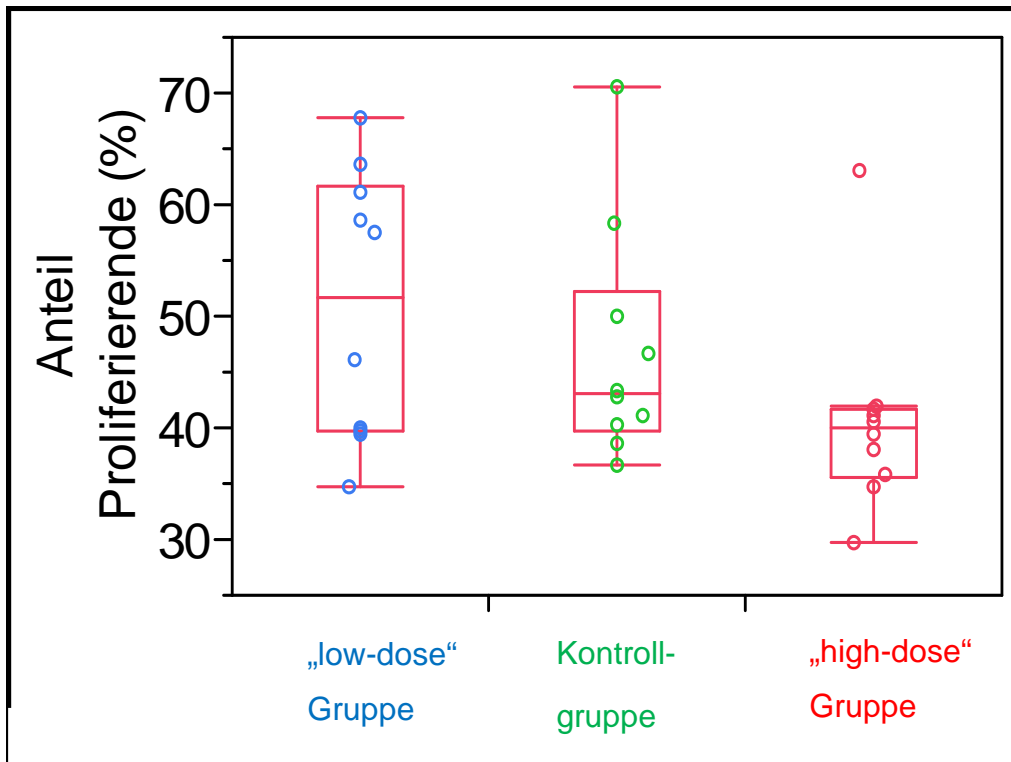


Diagramm 8: Darstellung der jeweiligen Anteile an proliferierenden Zellen nach der Behandlung mit VEGF Trap in der „low dose“ Behandlungsgruppe, der „high dose“ Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe. Den größten Anteil an proliferierenden Zellen hatte somit die „low dose“ Behandlungsgruppe mit 50,9 % (Standardabweichung 12,03), gefolgt von der Kontrollgruppe mit 46,85 % (Standardabweichung 10,44) und der „high dose“ Behandlungsgruppe mit 40,67 % (Standardabweichung 8,75). (Unterschiede nicht signifikant.)

Die Relation von Behandlung und Proliferation wurde in einer Chi-Quadrat-Approximation untersucht. Für die „low dose“ Behandlung betrug sie 65 %, für die „high dose“ Behandlungsgruppe 7 %. Weder in der Chi-Quadrat- noch in der Normalapproximation ergab sich eine statistische Signifikanz.

Auch die Untersuchung mithilfe dem Wilcoxon-Test zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied.

3.2.5 Auswertung der Apoptose

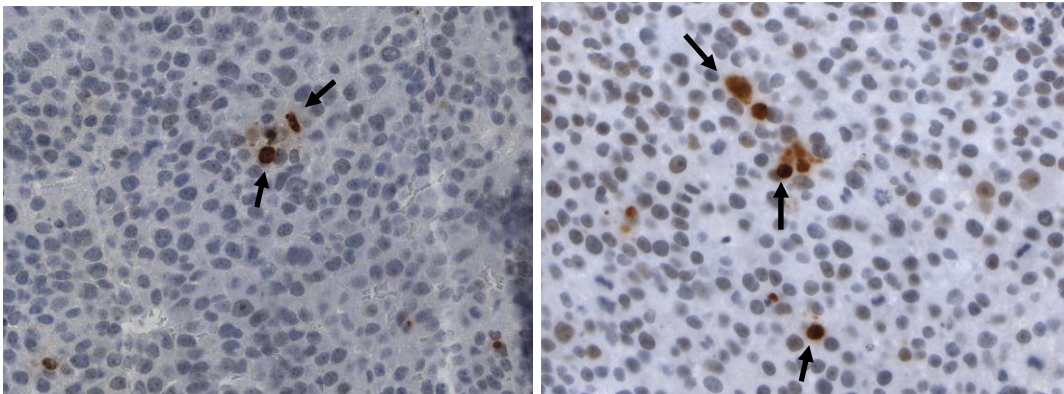


Abbildung 6: Färbung mit aktivierter Caspase-3 an Tumorgewebe. Vergrößerung 40-fach.

Die apoptotischen Zellen sind dunkelbraun gefärbt. (siehe Pfeile)

Links: Schnitt eines Tumors aus der „low dose“ Behandlungsgruppe.

Rechts: Schnitt eines Tumors aus der „high dose“ Behandlungsgruppe.

Mittels einer Färbung auf aktivierte Caspase-3 wurde eine Auswertung der Apoptose vorgenommen. Es sollte untersucht werden, ob die Apoptoserate von der Behandlungsgruppe abhängig ist.

Der Mittelwert der Anzahl apoptotischer Zellen pro „high power field“ belief sich in der „high dose“ Behandlungsgruppe auf 7,9 (Standardabweichung 2,88). In der „low dose“ Behandlungsgruppe betrug der Mittelwert 7,14 (Standardabweichung 3,10) und in der Kontrollgruppe 5,41 (Standardabweichung 2,35).

Eine Korrelation von Apoptoserate und Behandlungsgruppe ließ sich somit nicht feststellen.

3.3 Untersuchungen des Serums

3.3.1 Quantifizierung des VEGF Spiegels mittels ELISA

Die VEGF-Serumspiegel wurden nach der Behandlung mit VEGF Trap in ELISAs quantifiziert. Ziel war die Untersuchung einer Korrelation von Serumspiegel und Behandlungsgruppe.

In den beiden Behandlungsgruppen konnte erwartungsgemäß kein frei zirkulierendes VEGF nachgewiesen werden. Der Mittelwert betrug für die Kontrollgruppe 453,4 pg/ml (Standardabweichung 454,7 pg/ml) und für die unbehandelte Gruppe 479,3 pg/ml (Standardabweichung 450,7 pg/ml).

3.3.2 Quantifizierung des Komplexes aus VEGF und VEGF Trap

Zur Quantifizierung der Komplexbildung aus VEGF und VEGF Trap wurde ein ELISA durchgeführt.

Sowohl in der „high dose“ Behandlungsgruppe als auch in der „low dose“ Behandlungsgruppe war der Komplex nachweisbar.

Für die „high dose“ Behandlungsgruppe lag der Mittelwert des Komplexes bei 3124,1 ng/ml (Standardabweichung 732,7), für die „low dose“ Behandlungsgruppe bei 2816,9 ng/ml (Standardabweichung 637,5) und für die Kontrollgruppe bei 24,2 ng/ml (Standardabweichung 76,4). In der „high dose“ Behandlungsgruppe betrug der Median 3120 ng/ml (Spannweite 1680 bis 4493 ng/ml), in der „low dose“ Behandlungsgruppe 3063 ng/ml (Spannweite 1883 bis 3732 ng/ml) und in der Kontrollgruppe 0 ng/ml (Spannweite 0 bis 241 ng/ml).

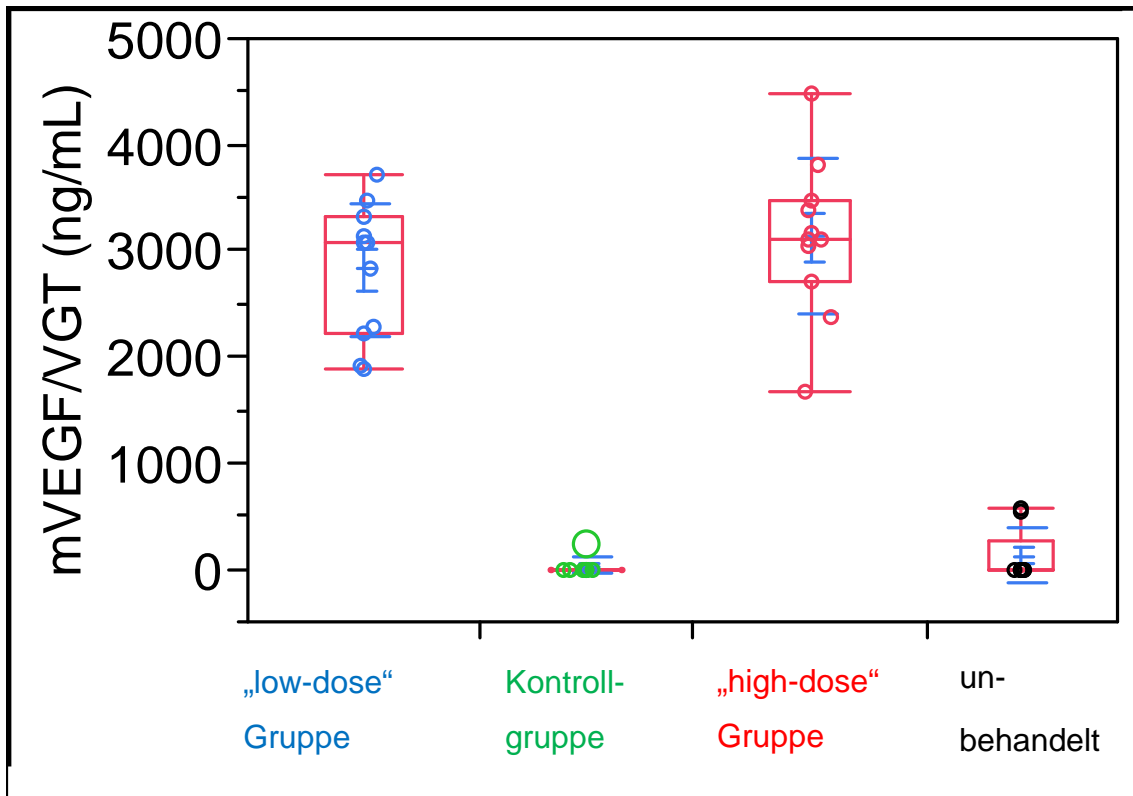


Diagramm 9: Serumspiegel des Komplexes aus VEGF und VEGF Trap.

Sowohl in der „low dose“ Behandlungsgruppe mit einem Median von 3063 ng/ml (Spannweite 1883 bis 3732 ng/ml) als auch in der „high dose“ mit einem Median von 3120 ng/ml (Spannweite 1680 bis 4493 ng/ml) war der Komplex detektierbar. Der Median in der Kontrollgruppe lag bei 24,2 ng/ml (Spannweite 0 bis 241 ng/ml).

3.4 Zytotoxizität des VEGF Trap auf vitale HuH7-Zellen

Um eine direkte toxische Wirkung von VEGF Trap auf die Tumorzellen auszuschließen, wurde *in vitro* ein SRB – Assay durchgeführt.

Im SRB Assay wurde VEGF Trap bzw. als Kontrolle humanes Fc-Fragment in Konzentrationen von 0,01 bis 100 µg/ml getestet.

Die univariate Varianzanalyse ergab ein adjustiertes R^2 von 25 % der gesamten Varianz, mit einer Standardabweichung von 0,12. Die Residuen waren normalverteilt, unabhängig und varianzhomogen. Der Fisher-Test der Konzentration in Abhängigkeit vom Wirkstoff war hinsichtlich des 5 %-Levels nicht signifikant. Bezogen auf die Kontrolle mit humanem Fc-Fragment konnte keine Hemmung des Wachstums der HuH7-Zellen nachgewiesen werden, da die Werte der mit VEGF Trap behandelten Zellen unter denen der Kontrolle lagen.

Die statistische Signifikanz wurde in einem t-Test berechnet. Statistische Signifikanz ergab sich für den Vergleich der Dosis 0 und 0,01 µg/ml VEGF Trap mit einem Wert von $p = 0,02$; der Vergleich von 0,01 und 0,1 µg/ml VEGF Trap erbrachte ein Resultat von $p = 0,4$; für den Vergleich der Dosierungen 10 und 100 µg/ml VEGF Trap ergab sich $p = 0,19$; und für 0,1 und 1 µg/ml VEGF Trap $p = 0,25$. Als nicht signifikant stellte sich der Unterschied der Dosierungen 10 µg/ml VEGF Trap und 1 µg/ml VEGF Trap heraus, der Wert lag hier bei $p = 0,65$. Im Vergleich der Dosierungen von humanem Fc-Fragment wurde für die Vergleiche der Dosierungen 0 und 0,01 µg/ml hFc-Fragment mit einem Wert von $p = 0,39$ sowie bei 0,1 und 1 µg/ml hFc Fragment mit einem Wert von $p = 0,18$ und bei 10 und 100 µg/ml hFc Fragment mit einem Wert von $p = 0,27$ ein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt.

Im SRB- Assay ließ sich in einem ANOVA (Analysis of Variance) nach Adjustierung für multiples Testen kein direkter Effekt des VEGF Trap auf die vitalen Tumorzellen nachweisen. Es konnte also gezeigt werden, dass VEGF Trap keine direkte Toxizität auf die Tumorzellen hat.

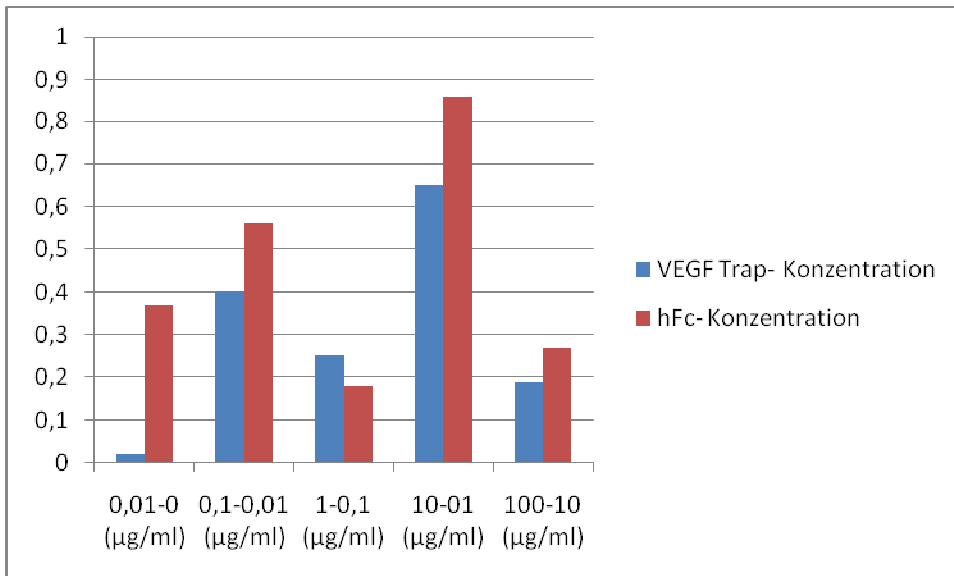


Diagramm 10: Ergebnis des SRB-Assays zur Testung der Toxizität von VEGF Trap auf die Tumorzellen. Als Kontrolle wurde humanes Fc-Fragment (hFc) verwendet. Man erkennt, dass VEGF Trap keinen direkten inhibitorischen Effekt auf die Tumorzellen hatte.

4 Diskussion

4.1 Tierversuch

Das HCC als hoch vaskularisierter Tumor bietet sich für eine anti-angiogene Therapie an. In der Angiogenese des HCC spielt der VEGF eine große Rolle, eine Inhibition von VEGF mit VEGF Trap ist daher eine vielversprechende Therapieoption. Bei VEGF Trap handelt es sich um einen löslichen decoy Rezeptor, der zirkulierendes VEGF bindet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Hemmung des Tumorwachstums durch eine Behandlung mit VEGF Trap in einem HuH7-Xenograft-Modell.

Im Vorfeld waren mit dem Tiermodell der Balb/cOlaHsd Foxn1nu/nuMäuse in der Arbeitsgruppe bereits im Rahmen anderer Untersuchungen erste Erfahrungen gesammelt worden. Auf den Wachstumsdaten aus diesen Versuchen basierte die Fallzahlplanung, die eine Mindestanzahl von 43 Tieren ergab. Für die Wahrscheinlichkeiten des Fehlers der ersten und der zweiten Art wurden 95 %-Konfidenzintervalle festgelegt. Der F-Test sollte bei einer Macht von 0,8 eine Signifikanz von 5 % haben. Als Zieltag der statistischen Planung wurde der Versuchstag 14 definiert, als primäre Zielgröße der Tumordurchmesser. Es wurde von einem linearen Tumorwachstum ausgegangen.

Durch eine verblindete Medikamentengabe und die nach Tumorgöße geblockte Randomisierung sollte eine Behandlungs- und Beobachtungsgleichheit gewährleistet sein. Nur Tiere mit einem zu messbarer Größe herangewachsenen Tumor wurden in den Versuch eingeschlossen, so dass letztendlich je elf Tiere pro Gruppe behandelt wurden. Auch die Tiere, bei denen zum Randomisierungszeitpunkt noch kein Tumor nachweisbar war, wurden (außerhalb des eigentlichen Versuches) weiter verfolgt. Es wurde täglich das Körpergewicht sowie die Tumorgöße der Tiere gemessen.

Um einen Bias von vornherein zu minimieren, wurden die Messungen immer von demselben Untersucher mit demselben Messschieber vorgenommen.

Die „low dose“ Behandlungsgruppe erhielt 2,5 mg/kg KG VEGF Trap, die „high dose“ Behandlungsgruppe 25 mg/kg KG VEGF Trap und die Kontrollgruppe 25 mg/kg KG humanes Fc-Fragment subkutan injiziert. Die subkutane Injektion gewährleistet eine Depotwirkung des Wirkstoffes.

Die Fallzahlplanung zielte auf den Nachweis einer Hemmung des Tumorwachstums auf mindestens 50 bzw. 25 % bis zu Tag 14. In der „high dose“ Behandlungsgruppe belief sich das Tumolvolumen nur auf 21,3 % im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der „low dose“ Behandlungsgruppe wurde ein Tumolvolumen von 42,2 % im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht. Somit konnte erstmalig für das HCC durch die Behandlung mit VEGF Trap eine signifikante Wachstumsinhibition erzielt werden und das Versuchsziel sogar noch übertroffen werden.

Die von uns im HCC-Modell erzielten Ergebnisse passen gut zu Berichten aus anderen Arbeitsgruppen über die Behandlung anderer Tumorentitäten im Tiermodell.

Holash et al erzielten in ihren Versuchen mit der Behandlung mit vergleichbaren Dosierungen von VEGF Trap in verschiedenen Tumormodellen (Melanom, Rhabdomyosarkom und Gliom) signifikante Unterschiede zwischen Kontrolltumoren und den mit 2,5 mg/kg KG VEGF Trap und 25mg/kg KG VEGF Trap behandelten Tumoren.[49]

Kim et al untersuchten das Ansprechen einer Therapie verschiedener VEGF-Inhibitoren im *in vitro* Neuroblastommodell. Die größte Hemmung konnte von ihnen mit der höchsten getesteten Dosis von 500 µg pro Dosis VEGF Trap erzielt werden. Es wurde allerdings beobachtet, dass bei niedrigerer Dosierung trotz VEGF-Hemmung die vaskuläre Co-Option persistierte und so die anti-angiogene Therapie unwirksam wurde. Durch eine wirksamere Blockade mit VEGF Trap in einer Dosis von 500 µg war es jedoch möglich, auch die vaskuläre Co-Option im Tumor zu unterbinden.[57]

Die Anwendung von VEGF Trap konnte auch im Nierenzellkarzinom erfolgreich getestet werden. Verheul et al gelang 2007 eine signifikante Inhibition sowohl des Tumorwachstums ($p < 0,001$) als auch der Metastasierung ($p < 0,004$). Die Mikrogefäßdichte konnte um 66 % gehemmt werden.[107]

Im Wilms-Tumor wurde das Tumorwachstum signifikant inhibiert ($p = 0,0009$) und die Inzidenz von Lungenmetastasen reduziert ($p < 0,0055$). Nach Behandlung mit VEGF Trap war der Tumor fast vollständig avaskulär.[34] Darüber hinaus gelang eine erfolgreiche Tumorblokade durch VEGF Trap im Ewing-Sarkom.[18] Auch in einem Ovarialkarzinommodell wurde eine Blockade des Tumorwachstums erzielt. Byrne et al beschrieben zusätzlich noch eine größere Dichte und Gewundenheit der Gefäße.[11]

Ein Problem, das im Zuge der Behandlung mit VEGF Trap aufgetreten ist, stellt die Resistenzentwicklung gegen das Medikament dar. Noch sind die Pathomechanismen nicht bekannt, es wurden allerdings mehrere Hypothesen hierzu aufgestellt:[107]

- 1) Aufgrund von Mutationen sinkt die Selektivität des Rezeptors.
- 2) Tumorzellen produzieren selektiv andere Wachstumsfaktoren, die von VEGF Trap nicht gehemmt werden.
- 3) Es kommt zu einer Überproduktion von VEGF, welches nicht in dem erforderlichen Maße von VEGF Trap abgefangen werden kann.

Um die Angiogenese an verschiedenen Stellen zu blockieren und so die Resistenzentwicklung zu reduzieren, erscheint eine Kombinationstherapie aus VEGF Trap und weiteren Wirkstoffen als eine erfolgversprechendes Strategie der anti-angiogenen Tumortherapie.

So konnte in einem Xenograftmodell für das HER2 positive Mamma-Karzinom eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums, der Mikrogefäßdichte (MVD) und der Tumorzellproliferation durch die Kombination des HER2/neu Antikörpers Trastuzumab (1mg/kg Körpergewicht) und VEGF Trap (2,5 bis 10 mg/kg Körpergewicht) gezeigt werden.[64]

Lu et al wiesen in einem Xenograftmodell für das Lungen- und Pankreaskarzinom die Hemmung des Tumorwachstums um 40 bis 50 % im Vergleich zur Kontrollgruppe nach. Die Therapie erfolgte hierbei durch die Kombination aus einem *small molecule* Inhibitor der Thymidinphosphorylase und VEGF Trap.[73]

Auch der duale Einsatz von Platelet Derived Growth Factor (PDGF) Trap und VEGF Trap wurde für das Ovarialkarzinom im Mausmodell erfolgreich getestet.[72]

4.2 Nekrosequantifizierung

In der Literatur finden sich Berichte über die Auswirkung einer VEGF Trap Therapie auf die Nekrosenbildung innerhalb von Tumoren.

So beschrieben Holash et al in ihren Xenograft-Mausmodellen verschiedener Tumorentitäten ausgedehnte Nekrosen, die sowohl in der Dosierung mit 2,5 mg/kg Körpergewicht als auch in der höheren Dosierung mit 25 mg/kg Körpergewicht VEGF Trap statistisch signifikant waren.[49]

Hu et al erzielten eine Nekrosebildung in einem Xenograft-Modell des Ovarialkarzinoms von 90 % in der Kombinationstherapie aus Paclitaxel und 10 mg/kg Körpergewicht VEGF Trap.[51]

Auch für das Gliom konnten in der Behandlung mit VEGF Trap zentrale Nekrosen im Mausmodell beschrieben werden.[37]

Der Anteil an Nekrose im Tumorgewebe wurde auch von uns in HE-gefärbten Tumorschnitten ermittelt. Ziel war der Nachweis einer Korrelation von Nekroseanteil und Behandlungsgruppe.

Der Mittelwert der Nekroseanteile an der Gesamtfläche der Tumorschnitte lag in der „low dose“ Behandlungsgruppe bei 18,8 % (Standardabweichung 7,65), in der Kontrollgruppe bei 25,6 % (Standardabweichung 17,25) und in der „high dose“ Gruppe bei 26,1 % (Standardabweichung 14,37). Die Unterschiede waren innerhalb der von uns untersuchten HCC-Tumoren nicht signifikant. Dabei ist die kleine Fallzahl von elf Tieren pro Gruppe zu berücksichtigen. Die Nekrosebildung scheint somit im untersuchten Modell eher eine Folge des raschen Tumorstwachstums zu sein und einer daraus resultierenden Minderversorgung der Tumorzellen.

4.3 Hämorrhagien

Bei der Betrachtung der HE-gefärbten Tumorschnitten fiel auf, dass die Tumoren Einblutungen sehr unterschiedlichen Ausmaßes aufwiesen. Daraufhin wurde die Korrelation zwischen dem Ausmaß der Hämorrhagien und den Behandlungsgruppen überprüft. Es konnte ein signifikanter Unterschied gezeigt werden. So waren in der Kontrollgruppe mit einem Median von 2 großflächige Einblutungen vorhanden, während in der „high dose“ Behandlungsgruppe nur minime Einblutungen auftraten. Hier lag der Median bei 1 ($p = 0,00013$), in der „low dose“ Behandlungsgruppe betrug der Median 1,5.

Eine Ursache könnte in dem ungebremsten Tumorwachstum der Kontrollgruppe liegen, welches zu großen Einblutungen geführt hat. Dies kann durch die fragilen Gefäße bzw. die inkompletten Gefäßwände des Tumors bedingt sein. Es ist bekannt, dass die Endothelzellen in Tumorgefäßen im Vergleich zu gesundem Lebergewebe eine andere Morphologie aufweisen. Allerdings wurde auch beschrieben, dass die Gefäße im HCC einen größeren Durchmesser und weniger Fenestrationsen aufweisen. [47]

Die von uns beobachtete Abnahme im Ausmaß der Einblutungen kann als indirektes Zeichen für eine Abnahme der Durchblutung bzw. Stabilisierung der Gefäßwände durch die anti-angiogene Therapie gewertet werden. Aufgrund der weiter unten angeführten Probleme in der immunhistologischen Darstellbarkeit der Gefäßwände konnte diese Frage nicht weiter geklärt werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen waren nicht Gegenstand dieses Projektes.

4.4 Gefäßendothelfärbungen

Die Gefäßendothelien wurden mit einer Alkalischen Phosphatase-Färbung und einer Meca32-Färbung dargestellt. Es sollte untersucht werden, ob die Anzahl an Gefäßen mit der Behandlungsgruppe korreliert.

4.4.1 Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung

Ursprünglich war statt der AP-Färbung eine immunhistochemische Färbung auf CD34 an formalinfixiertem Gewebe vorgesehen. CD34 spielt in den Untersuchungen zur Malignität des HCC und zur Unterscheidung von gesundem Lebergewebe eine große Rolle.[19, 111]

Vermutlich kam es aufgrund der Konservierung in Formalin zur Schädigung der Gewebes, so dass die CD34-Färbung nicht mehr durchzuführen war. Als Alternative wurde auf die AP-Färbung an Kryoschnitten zurückgegriffen.

Es konnte keine Korrelation der Gefäßanzahl und der Behandlungsgruppe nachgewiesen werden. Hierbei ist die kleine Stichprobe von elf Tieren pro Behandlungsgruppe zu berücksichtigen.

4.4.2 Meca32-Färbung

Die Meca32-Färbung ist ein gängiges Verfahren für die Darstellung von Endothelzellen der Maus.[44, 74]

Ein großes Problem hierbei war die Qualität der Kryoschnitte. Das Schneiden des Tumorgewebes am Kryotom erwies sich als große Herausforderung, die Schnitte zeigten große Risse und Faltungen. Bis zum Schluss konnte keine zufriedenstellende Qualität der Schnitte erreicht werden, die eine Quantifizierung der Gefäße ermöglicht hätte.

4.5 Bestimmung der Proliferation in der MIB-Färbung

MIB-1, auch als KI-67 bezeichnet, wird von allen Zellen in der aktiven Phase des Zellzyklus exprimiert und dient zur Charakterisierung maligner Tumoren.[10] So korreliert es im Mammakarzinom beispielsweise mit dem Tumorstadium und dem histologischen Grading.[66]

Auch im HCC ist die MIB-1-Expression erhöht. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der MIB-1-Expression und der Transaminasenerhöhung im HCC nachgewiesen werden.[13] Saito et al konnten zeigen, dass MIB-1 die wirkungsvollste Färbemethode für die Einteilung der Aggressivität von kleinen HCCs darstellt.[93]

Amaoka et al untersuchten den Zusammenhang zwischen der Proliferation der Tumorzellen und der Expression der VEGF-Rezeptoren in MIB-1-gefärbten humanen Zellen des HCC. Sie fanden heraus, dass die histologische Differenzierung des Tumors vom VEGF-Rezeptorstatus beeinflusst wird.[8]

In dieser Arbeit wurde die Proliferation der Tumorzellen anhand einer MIB-1 Färbung ausgewertet. Ziel war die Untersuchung einer Korrelation von proliferierenden Tumorzellen und Behandlungsgruppe.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen Kontroll- und beiden Behandlungsgruppen. Auch hier muss der kleine Stichprobenumfang berücksichtigt werden. Eine direkte antiproliferative Wirkung einer anti-angiogenen Therapie wird vom Konzept der Anti-Angiogenese nicht erwartet und war auch *in vitro* im SRB-Assay nicht nachweisbar.(siehe auch 4.8)

4.6 Caspase-Färbung

Mit einer Färbung auf aktivierte Caspase-3 sollten die Auswirkungen der VEGF Trap Therapie auf die Apoptoserate untersucht werden. Es ergaben sich keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es gilt auch hier, die kleine Fallzahl von elf Tieren pro Behandlungsgruppe zu berücksichtigen.

In der Literatur finden sich ebenfalls Untersuchungen zur Apoptose nach der Behandlung mit VEGF Trap in verschiedenen Tumormodellen. So konnten Huang et al nach der Therapie mit 500 µg VEGF Trap zwei Mal wöchentlich in ihrem Wilms-Tumormodell Apoptose in den Tumorgefäßen nachweisen, während die Gefäße im gesunden Gewebe unbehelligt blieben.[52] Die anti-angiogene Therapie führte sowohl in den perivaskulären als auch in den endothelialen Zellen zu einer Induktion der Apoptose. Dieses Resultat lassen Hood et al darauf schließen, dass es einen Zusammenhang zwischen perivaskulären Zellen und Endothelzellen gibt.[50] Obwohl man die Apoptose dieser Zellen aufgrund des geringen Nährstoffangebots erwarten könnte, berichteten Huang et al, dass die Apoptose fast zeitgleich, nämlich einen Tag nach Beginn der Behandlung mit VEGF Trap, begann. Möglicherweise kam es durch die Blockade von VEGF zu einer Signalunterbrechung in der Gefäßwand, die zur Apoptose führt.[52] Eine andere Theorie von Hood et al stützt sich darauf, dass die Therapie das umgebaute Gefäßsystem des Tumors stark beeinflusst. Viele Blutgefäße im Tumor befinden sich in einem andauerndem Wechsel von Wachstum und Regression. Durch ihre fehlende Reife könnten sie sensibler auf die Behandlung mit einem stärkeren VEGF-Inhibitor ansprechen. Hood et al erwähnen in ihrer Arbeit auch die Möglichkeit, dass VEGF Trap andere Wachstumsfaktoren bindet, die für das weitere Überleben der vaskulären Zellen im wachsenden Tumor wichtig sind.[50]

4.7 Untersuchungen des Serums

4.7.1 VEGF Trap senkt den VEGF-Spiegel im Serum

Für eine Therapie mit VEGF Trap ist die VEGF-Produktion und -freisetzung durch den Tumor grundlegende Voraussetzung. Zur Quantifizierung des VEGF Serum-Spiegels der HuH7-Tumor-tragenden Tiere wurde ein ELISA durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass freies VEGF nur in der Kontrollgruppe (und in der unbehandelten Gruppe mit verzögertem Anwachsen der Tumoren) detektierbar war. In den beiden Behandlungsgruppen war frei zirkulierendes VEGF nicht nachweisbar.

Gordon et al erzielten ähnliche Ergebnisse bei Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium (u.a. Liposarkom, Mammakarzinom und Nierenzellkarzinom) nach der Therapie mit intravenös appliziertem Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF. In einer Dosierung von 0,1 bis 10 mg/kg kam es zu einer Abnahme von freiem VEGF.[40]

4.7.2 Komplexbildung aus VEGF und VEGF Trap

Zur Quantifizierung der Komplexbildung aus VEGF und VEGF Trap wurde ein ELISA durchgeführt.

Sowohl in der „high dose“ Behandlungsgruppe als auch in der „low dose“ Behandlungsgruppe war der Komplex nachweisbar.

Auch Rudge et al haben in ihren Versuchen an einem SCID-Mausmodell in den Dosierungen von 1 mg/kg bis 25 mg/kg VEGF Trap s.c. stabile VEGF/VEGF Trap-Komplexe gemessen. Darüber hinaus konnten sie in einem Rhabdomyosarkommodell zeigen, dass es eine Korrelation zwischen den VEGF/VEGF Trap-Komplexen und der Tumorgröße gibt.[91]

4.8 Ausschluss der Zytotoxizität von VEGF Trap

Um die Zytotoxizität des VEGF Trap auf die Tumorzellen zu untersuchen, wurde ein SRB-Assay durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass VEGF Trap nicht toxisch auf die Zellen wirkt. Dies spricht dafür, dass die Wachstumshemmung in vivo über die Inhibition der Angiogenese abläuft.

SRB-Assays sind etablierte Verfahren, um den Effekt eines Wirkstoffes auf Tumorzellen nachzuvollziehen. [35, 45, 99]

5 Zusammenfassung

Das HCC gehört zu den weltweit häufigsten Tumoren. Aufgrund der langen symptomfreien Latenzzeit und der meist gleichzeitig vorhandenen Leber-Grunderkrankung gilt die frühe Detektion als schwierig. Entwickeln die Patienten Symptome, so kommt eine kurative Therapie meist nicht mehr in Frage. Zudem bedeutet die schon bestehende Grunderkrankung der Leber einen häufig limitierenden Faktor für eine radikale Operation oder eine aggressive Chemotherapie. Neue Ansätze in der Therapie werden daher dringend gebraucht.

Das HCC kommt aufgrund seiner starken Vaskularisierung für eine anti-angiogene Therapie in Frage, da die Angiogenese einen zentralen Schaltpunkt in der Entstehung, im Wachstum und in der Metastasierung des HCC darstellt.

Bis zu einem Durchmesser von 3-4 mm verbleiben Tumoren in einem angiogenen Gleichgewicht. Proliferation und Apoptose halten sich die Waage, das Wachstum sistiert. Um weiter wachsen zu können, benötigt der Tumor direkten Kontakt zu versorgenden Gefäßen, da die Diffusion allein dann nicht mehr ausreicht. Das zentrale Ereignis, das nun stattfindet, wird „angiogenic switch“ genannt. Die Tumorzellen beginnen zu proliferieren, das Wachstum wird wieder angestoßen.

Die Angiogenese im HCC wird zum einen über die Tumorzellen vermittelt, die pro-angiogene Faktoren sezernieren, zum anderen exprimieren die Endothelzellen die dazu passenden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Neben den Tumorzellen produzieren auch die Endothelzellen und Lymphozyten pro-angiogene Substanzen.

Der am besten untersuchte pro-angiogene Faktor ist VEGF, der Vascular Endothelial Growth Factor.

VEGF wirkt über seine Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2, die sich auf der Oberfläche von Endothelzellen befinden, sowie über VEGFR3, der in Lymphgefäßen lokalisiert ist. Von der Transmembranregion der Rezeptoren weisen in die extrazelluläre Richtung sieben Immunglobulin-ähnliche Regionen, nach intrazellulär folgt eine Tyrosinkinase-Domäne. Über eine Ligandenbindung erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors mit anschließender Autophosphorylierung und Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasen, die eine Signalkaskade in der Zelle anstößt.

In den letzten Jahrzehnten wurden einige Inhibitoren der Angiogenese entwickelt, die VEGF angreifen. Sowohl humanisierte anti-angiogene Antikörper als auch sogenannte small-molecule receptor tyrosine kinase Inhibitoren haben bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium klinische Wirksamkeit gezeigt.

Bei VEGF Trap handelt es sich um einen löslichen decoy Rezeptor, der zirkulierendes VEGF abfängt.

Die zweite Immunglobulin-Domäne des *high affinity* VEGF-Rezeptors 1 (VEGFR1) und die dritte Domäne des *low affinity* VEGF-Rezeptors 2 (VEGFR2) binden an die Fc-Region von menschlichem IgG1. Zwei dieser Moleküle dimerisieren zu VEGF Trap.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Therapie des Hepatozellulären Karzinoms mittels des Angiogeneseinhibitors VEGF Trap in einem Xenotransplantat-Mausmodell mit humanen Hepatomzellen der Linie HuH7.

Material und Methoden:

Um eine direkte Zytotoxizität des VEGF Trap auf die Tumorzelllinie HuH7 auszuschließen, wurde in vitro ein SRB-Assay durchgeführt.

Weiblichen Balb/c OlaHsd Foxn1 nu/nu Mäusen wurden 5×10^6 HuH7-Hepatomzellen am Rücken s.c. implantiert. Am Tag 0 (= 15 Tage nach Implantation) erfolgte bei einem mittleren Tumordurchmesser von 10 mm die geblockte Randomisierung in drei Gruppen à 11 Tiere. Die Mäuse erhielten im Abstand von 3 Tagen jeweils (verblindet) insgesamt 6 mal 2,5 mg/kg KG („low dose“) oder 25 mg/kg Körpergewicht („high dose“) VEGF Trap (Aflibercept[®], Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, USA) bzw. 25 mg/kg Körpergewicht hFc Fragment (Kontrolle). Die Fallzahlberechnung zielte auf eine Reduktion des Tumolvolumenwachstums an Tag 14 in der „low dose“ Gruppe auf 50 % und in der „high dose“ Gruppe auf 25 % bezogen auf die Kontrollgruppe.

Nach Abschluss des Versuchs wurden die Tiere euthanasiert, fotografiert und Plasma und Gewebe kryoasserviert bzw. in Formalin fixiert.

Anschließend wurden die Tumoren histopathologisch ausgewertet: In einer HE-Färbung wurde zum einen die Abhängigkeit des Nekroseanteils von der Behandlungsgruppe und zum anderen die Abhängigkeit der Hämorrhagien von der Behandlungsgruppe untersucht. Die Überprüfung einer Korrelation von proliferierenden Zellen und der Behandlungsgruppe erfolgte anhand einer MIB-1-Färbung. In einer Färbung auf Caspase-3 wurde die Apoptose quantifiziert. Mittels einer Alkalischen Phosphatase-Färbung wurde die Gefäßanzahl in den Behandlungsgruppen bestimmt. Die Quantifizierung des Serumspiegels von VEGF in einem ELISA sollte zeigen, dass frei zirkulierendes VEGF in den Behandlungsgruppen nicht nachzuweisen war. Die Komplexbildung von VEGF und VEGF Trap in den Behandlungsgruppen wurde ebenfalls in einem ELISA untersucht.

Ergebnisse:

Der Test auf die zytotoxische Wirkung von VEGF Trap im SRB Assay bestätigte, dass VEGF Trap in Konzentrationen von 0,01 bis 100 µg/ml keine direkte proliferationshemmende Wirkung auf die Hepatomzellen ausübt. Eine Hemmung des Tumorwachstums in vivo ist folglich durch die Inhibition der Angiogenese bedingt.

Tag 14 wurde als Zieltag der statistischen Auswertung festgelegt. Verglichen mit der Kontrollgruppe betrug das Tumolvolumen in der „high dose“ Behandlungsgruppe an diesem Tag 21,3%, in der „low dose“ Gruppe 42,2%. Der Vergleich der Steigungen der Wachstumskurven an Tag 14 im t-Test zeigte signifikante Unterschiede der Wachstumsgeschwindigkeiten im Vergleich „low dose“ gegen Kontrolle ($p = 0,007$) und im Vergleich „high dose“ gegen Kontrolle ($p = 0,00004$).

Erstmalig für das HCC konnte durch die Behandlung mit VEGF Trap somit eine signifikante Wachstumsinhibition erzielt werden und das Versuchsziel sogar noch übertroffen werden.

Der Einsatz von VEGF Trap war auch in Tumormodellen anderer Arbeitsgruppen erfolgreich. So gelang in Mausmodellen des Nierenzellkarzinoms, des Wilms-Tumors und des Ovarialkarzinoms ebenfalls eine Hemmung des Tumorwachstums.

Der Anteil der Nekrose an der Gesamtfläche betrug in der „high dose“ Behandlungsgruppe 26,1 %, in der „low dose“ Gruppe 18,8 % und in der Kontrollgruppe 25,6 %. Im t-Test ergaben sich hierfür keine signifikanten Unterschiede. Dies kann an der kleinen Stichprobe von 11 Tieren je Gruppe liegen. In der Literatur wurde die Bildung ausgedehnter Nekrosen in einer Reihe anderer Tumormodelle nach der Behandlung mit VEGF Trap beschrieben, wie etwa dem Rhabdomyosarkom und dem Gliom.

Die Tumoren der vorliegenden Arbeit wiesen Einblutungen unterschiedlichen Ausmaßes auf. Daraufhin konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem Ausmaß der Hämorrhagien und den Behandlungsgruppen gezeigt werden. So waren in der Kontrollgruppe mit einem Median von 2 großflächige Einblutungen vorhanden, während in der „high dose“ Behandlungsgruppe nur minimale Einblutungen auftraten. Hier lag der Median bei 1, in der „low dose“ Behandlungsgruppe betrug der Median 1,5. ($p = 0,00013$)

Die von uns beobachtete Abnahme im Ausmaß der Einblutungen kann als indirektes Zeichen für eine Abnahme der Durchblutung bzw. Stabilisierung der Gefäßwände durch die anti-angiogene Therapie gewertet werden. Aufgrund methodischer Probleme in der immunhistologischen Darstellbarkeit der Gefäßwände konnte diese Frage nicht weiter geklärt werden. Die hierfür notwendigen weiterführenden Untersuchungen wie etwa der Einsatz der Elektronenmikroskopie waren nicht Gegenstand dieses Projektes.

Der Anteil proliferierender Zellen belief sich in der Kontrollgruppe auf 43,1 %, in der „high dose“ Gruppe auf 40 % und in der „low dose“ Gruppe auf 51,8 %. Bei einer Testung der Proliferation im χ^2 -Test stellten sich keine signifikanten Unterschiede heraus.

Auch hier muss die kleine Fallzahl berücksichtigt werden. Bei einer anti-angiogenen Therapie ist nicht von einer antiproliferativen Wirkung auszugehen, diese war auch in vitro im SRB-Assay nicht nachweisbar.

In einer Caspasefärbung konnten wir in den Tumoren keine erhöhte Apoptoserate nachweisen. Der Mittelwert der Anzahl apoptotischer Zellen pro „high power field“ betrug in der „high dose“ Behandlungsgruppe 7,9 (Standardabweichung 2,88), in der „low dose“ Behandlungsgruppe 7,14 (Standardabweichung 3,10) und in der Kontrollgruppe 5,41 (Standardabweichung 2,35).

In der Literatur wurde in einem Wilms-Tumormodell die Detektion apoptotischer Zellen in Tumorgefäßen nach der Therapie mit 500 µg VEGF Trap zwei Mal wöchentlich beschrieben. In gesunden Gefäßen konnte keine Apoptose nachgewiesen werden.

Bei der Quantifizierung der Gefäße betrug in der hier vorgelegten Arbeit die mittlere Anzahl der Gefäße pro Gesichtsfeld in der „high dose“ Behandlungsgruppe 15,57 (Standardabweichung 7,53), in der „low dose“ Behandlungsgruppe 14,51 (Standardabweichung 6,99) und in der Kontrollgruppe 12,76 (Standardabweichung 3,74).

Die Gruppen unterschieden sich nicht. Möglicherweise lag dies am kleinen Stichprobenumfang von 11 Tieren je Gruppe.

Die in ELISAs untersuchten mittleren VEGF-Serumspiegel betrugen in der Kontrollgruppe 453 pg/ml (95 % Konfidenzintervall: 106 bis 799 pg/ml), in den Behandlungsgruppen war erwartungsgemäß kein freies VEGF nachweisbar.

Der Komplex aus VEGF und VEGF Trap war in dem durchgeführten ELISA sowohl in der „high dose“ als auch in der „low dose“ Behandlungsgruppe in hohen Konzentrationen vorhanden. Während der Median in der Kontrollgruppe 0 ng/ml betrug (Spannweite 0 bis 241 ng/ml), lag der Median in der „low dose“ Gruppe bei 3063 ng/ml (Spannweite 1883 bis 3732 ng/ml) und in der „high dose“ Gruppe bei 3120 ng/ml (Spannweite 1680 bis 4493 ng/ml).

Dieses Ergebnis deckt sich mit Berichten aus der Arbeitsgruppe von Rudge et al, die in ihrem SCID-Mausmodell nach der Applikation von VEGF Trap s.c. stabile VEGF/VEGF Trap-Komplexe messen konnten. Darüber hinaus wurde von den Autoren im Rhabdomyosarkmodell eine Korrelation zwischen der Tumorgröße und dem Serumpiegel des VEGF/VEGF Trap-Komplexes festgestellt.

Erstmals konnte in dieser Arbeit an einem humanen Xenograft-Mausmodell die Wirksamkeit von VEGF Trap zur Behandlung des HCC gezeigt werden. Die Ergebnisse erster Phase I und II Studien an Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren (jedoch noch ohne HCC) lassen ein gutes Verträglichkeitsprofil von VEGF Trap erkennen. Die besonders günstigen Bindungseigenschaften von VEGF Trap zur Neutralisierung von VEGF könnten in Zukunft neben Substanzen wie Sorafenib und Sunitinib eine wichtige Erweiterung der Möglichkeiten in der multimodalen Behandlung des HCC darstellen.

6 Abkürzungsverzeichnis

AASLD	American Association for the Study of Liver Disease
aFGF	acidic Fibroblast Growth Factor
AFP	Alpha-Feto-Protein
Ang	Angiopoietin
ANOVA	Analysis Of Variance
AP	Alkalische Phosphatase
Bcl-2	B- Cell Lymphoma –2
BCLC-Kriterien	Barcelona Clinic Liver Cancer Einteilung
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
CLIP-Kriterien	Cancer of the Liver Italian Program-Kriterien
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAB Reagenz	3,3' Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FudR	Floxuridin
5-FU	5-Fluorouracil
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₃ BO ₃	Borsäure
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HDV	Hepatitis D Virus

HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER2/neu	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
HIA	Hepatische intraarterielle Chemotherapie
HIF-1 α	Hypoxia Inducible Factor 1 α
HSC	Hepatic Stell Cells
HSP70	Hitzeschockprotein 70
HuH7	Humane Hepatomzelllinie
IGF-2	Insulin-like growth factor-2
IgG1	Immunglobulin G1
IL-8	Interleukin-8
KCl	Kaliumchlorid
Kd	Bindungsaffinität
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MeOH	Methanol
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MIB-1	Mitose-Bindendes Antigen 1
MMP 2	Matrixmetalloprotease 2
MMP 9	Matrixmetalloprotease 9
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MVD	microvessel density, Mikrogefäßdichte
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NSCLC	Nicht Kleinzelliges Lungenkarzinom
OD	Optische Dichte-Werte
OLT	Orthotope Lebertransplantation
PBS	Phosphate Buffered Saline

PDGF-B	Platelet-Derived Growth Factor B
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Rezeptor
PIGF	Placenta Growth Factor
PVE	Portalvenenembolisation
PST	Performance Status
Raf-1	Rapidly Growing Fibrosarcoma-1
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SRB Assay	Sulforhodamine B Assay
sVEGF-R1	löslicher VEGF-Rezeptor 1
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TCA-Lösung	Trichloressigsäurelösung
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TGF- α	Transforming growth factor alpha
TNM-Stadium	Einteilung nach der Weltgesundheitsorganisation von Tumorerkrankungen nach Tumorgroße (T), Lymphknotenstatus (N) und Fernmetastasen (M)
TSP-1	Thrombospondin-1
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A
VEGF-B	Vascular Endothelial Growth Factor B
VEGFR1 (Flt-1)	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor 1
VEGFR2 (Flk-1)	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor 2
VEGFR3	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor 3
VPF	Vascular Permeability Factor

7 Literaturverzeichnis

1. *Aflibercept Compared to Placebo in Term of Efficacy in Patients Treated With Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer (VANILLA)*. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00574275?term=VEGF+Trap+AND+Pancreas&rank=1>. Letzter Zugriff: 15.3.2011.
2. *Aflibercept in Combination With Docetaxel in Metastatic Androgen Independent Prostate Cancer (VENICE)*. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00519285?term=VEGF+Trap&rank=50>. Letzter Zugriff: 15.3.2011.
3. *Aflibercept Versus Placebo in Combination With Irinotecan and 5-FU in the Treatment of Patients With Metastatic Colorectal Cancer After Failure of an Oxaliplatin Based Regimen (VELOUR)*. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00561470?term=colorectal+carcino ma+AND+5-FU+AND+VEGF+Trap&rank=1>. Letzter Zugriff: 15.3.2011.
4. *AVE0005 (VEGF Trap) in Patients With Recurrent Symptomatic Malignant Ascites*. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00396591?term=VEGF+Trap&rank=8>. Letzter Zugriff: 15.3.2011.
5. *A Study of Aflibercept Versus Placebo in Patients With Second-Line Docetaxel for Locally Advanced or Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer (VITAL)*. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00532155?term=VEGF+Trap&rank=45>. Letzter Zugriff: 15.3.2011.
6. Airley RE, Mobasher A. *Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics*. *Chemotherapy* 2007; 53: 233.
7. Akriviadis EA, Llovet JM, Efremidis SC, Shouval D, Canelo R, Ringe B, Meyers WC. *Hepatocellular carcinoma*. *Br J Surg* 1998; 85: 1319.
8. Amaoka N, Saio M, Nonaka K, Imai H, Tomita H, Sakashita F, Takahashi T, Sugiyama Y, Takami T, Adachi Y. *Expression of vascular endothelial growth factor receptors is closely related to the histological grade of hepatocellular carcinoma*. *Oncol Rep* 2006; 16: 3.
9. Bergsland, EK. *Molecular mechanisms underlying the development of hepatocellular carcinoma*. *Semin Oncol* 2001; 28: 521.
10. Borre M, Bentzen SM, Nerstrøm B, Overgaard J. *Tumor cell proliferation and survival in patients with prostate cancer followed expectantly*. *J Urol* 1998; 159: 1609.
11. Byrne AT, Ross L, Holash J, Nakanishi M, Hu L, Hofmann JI, Yancopoulos GD, Jaffe RB. *Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model*. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5721.
12. Casella, G. *Refining binominal confidence intervals*. *Canadian Journal of Statistics* 1986; 14: 113.

13. Cheah PL, Looi LM, Nazarina AR, Mun KS, Goh KL. *Association of Ki67 with raised transaminases in hepatocellular carcinoma*. Malays J Pathol 2008; 30: 103.
14. Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH. *Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level*. JAMA 2006; 295: 65.
15. Chow PK, Tai BC, Tan CK, Machin D, Win KM, Johnson PJ, Soo KC. *High-dose tamoxifen in the treatment of inoperable hepatocellular carcinoma: A multicenter randomized controlled trial*. Hepatology 2002; 36: 1221.
16. Colombo N, Mangili G, Mammoliti S, Kalling M, Tholander B, Sternas L, Buzenet G, Chamberlain D. *Aflibercept (VEGF Trap) for advanced epithelial ovarian cancer (EOC) patients (pts) with symptomatic malignant ascites: Preliminary results of a pilot study*. J Clin Oncol 2008; 26: Abstract 14598.
17. Crystal, RG. *Alpha 1-antitrypsin deficiency, emphysema, and liver disease. Genetic basis and strategies for therapy*. J Clin Invest 1990; 85: 1343.
18. Dalal S, Berry AM, Cullinane CJ, Mangham DC, Grimer R, Lewis IJ, Johnston C, Laurence V, Burchill SA. *Vascular endothelial growth factor: a therapeutic target for tumors of the Ewing's sarcoma family*. Clin Cancer Res 2005; 11: 2364.
19. Di Carlo I, Fraggetta F, Lombardo R, Azzarello G, Vasquez E, Puleo S. *CD 34 expression in chronic and neoplastic liver diseases*. Panminerva Med 2002; 44: 365.
20. Do DV, Nguyen QD, Shah SM, Browning DJ, Haller JA, Chu K, Yang K, Cedarbaum JM, Vitti RL, Ingerman A, Campochiaro PA. *An exploratory study of the safety, tolerability and bioactivity of a single intravitreal injection of vascular endothelial growth factor Trap-Eye in patients with diabetic macular oedema*. Br J Ophthalmol 2009; 93: 144.
21. Donato F, Boffetta P, Puoti M. *A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer 1998; 75: 347.
22. Drevs J, Laus C, Medinger M, Schmidt-Gersbach C, Unger C. *Antiangiogenesis: current clinical data and future perspectives*. Onkologie 2002; 25: 520.
23. Eder JP Jr, Supko JG, Clark JW, Puchalski TA, Garcia-Carbonero R, Ryan DP, Shulman LN, Proper J, Kirvan M, Rattner B, Connors S, Keogan MT, Janicek MJ, Fogler WE, Schnipper L, Kinchla N, Sidor C, Phillips E, Folkman J, Kufe DW. *Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily*. J Clin Oncol 2002; 20: 3772.
24. Farazi PA, DePinho RA. *Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment*. Nat Rev Cancer 2006; 6: 674.

25. Farazi PA, Glickman J, Horner J, Depinho RA. *Cooperative interactions of p53 mutation, telomere dysfunction, and chronic liver damage in hepatocellular carcinoma progression.* Cancer Res 2006; 66: 4766.
26. Fargion S, Mandelli C, Piperno A, Cesana B, Fracanzani AL, Fraquelli M, Bianchi PA, Fiorelli G, Conte D. *Survival and prognostic factors in 212 Italian patients with genetic hemochromatosis.* Hepatology 1992; 15: 655.
27. Ferrara, N. *VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors.* Nat Rev Cancer 2002; 2: 795.
28. Ferrara N, Henzel WJ. *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun 1989; 161: 851.
29. Folkman J, Cole P, Zimmerman S. *Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment.* Ann Surg 1966; 164: 491.
30. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. *Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis.* J Exp Med 1971; 133: 275.
31. Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G. *SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types.* Cancer Res 1999; 59: 99.
32. Fong Y, Sun RL, Jarnagin W, Blumgart LH. *An analysis of 412 cases of hepatocellular carcinoma at a Western center.* Ann Surg 1999; 229: 790.
33. Friesel RE, Maciag T. *Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction.* FASEB J 1995; 9: 919.
34. Frischer JS, Huang J, Serur A, Kadenhe-Chiweshe A, McCrudden KW, O'Toole K, Holash J, Yancopoulos GD, Yamashiro DJ, Kandel JJ. *Effects of potent VEGF blockade on experimental Wilms tumor and its persisting vasculature.* Int J Oncol 2004; 25: 549.
35. Gaspar N, Sharp SY, Pacey S, Jones C, Walton M, Vassal G, Eccles S, Pearson A, Workman P. *Acquired resistance to 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in glioblastoma cells.* Cancer Res 2009; 69: 1966.
36. Gimbrone MA Jr, Aster RH, Cotran RS, Corkery J, Jandl JH, Folkman J. *Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium.* Nature 1969; 222: 33.
37. Gomez-Manzano Candelaria, Jocelyn Holash, Jing Xu, Ok-Hee Lee, Juan Fueyo, John Rudge, B. Nebiyu Bekele, Xian Zhou, Kenneth Aldape, W. K. Alfred Yung *Treatment of glioma-bearing mice with VEGF Trap results in significant prolongation of survival.* Proc Amer Assoc Cancer Res 2005; 46.

38. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP. *A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin*. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87: 6624.
39. Goodsell, DS. *The molecular perspective: VEGF and angiogenesis*. Oncologist 2002; 7: 569.
40. Gordon MS, Margolin K, Talpaz M, Sledge GW Jr, Holmgren E, Benjamin R, Stalter S, Shak S, Adelman D. *Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer*. J Clin Oncol 2001; 19: 843.
41. Graepler F, Verbeek B, Graeter T, Smirnow I, Kong HL, Schuppan D, Bauer M, Vonthein R, Gregor M, Lauer UM. *Combined endostatin/sFlt-1 antiangiogenic gene therapy is highly effective in a rat model of HCC*. Hepatology 2005; 41: 879.
42. Griffiths L, Stratford IJ. *Platelet-derived endothelial cell growth factor thymidine phosphorylase in tumour growth and response to therapy*. Br J Cancer 1997; 76: 689.
43. Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR, Watkins JD, Huse WD, Bodkin DJ, Cheresch DA. *Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphavbeta3*. Clin Cancer Res 2000; 6: 3056.
44. Hallmann R, Mayer DN, Berg EL, Broermann R, Butcher EC. *Novel mouse endothelial cell surface marker is suppressed during differentiation of the blood brain barrier*. Dev Dyn 1995; 202: 325.
45. Hamelers IH, Staffhorst RW, Voortman J, de Kruijff B, Reedijk J, van Bergen en Henegouwen PM, de Kroon AI. *High cytotoxicity of cisplatin nanocapsules in ovarian carcinoma cells depends on uptake by caveolae-mediated endocytosis*. Clin Cancer Res 2009; 15: 1259.
46. Hanahan D, Folkman J. *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell 1996; 86: 353.
47. Haratake J, Scheuer PJ. *An immunohistochemical and ultrastructural study of the sinusoids of hepatocellular carcinoma*. Cancer 1990; 65: 1985.
48. Ho JW, Pang RW, Lau C, Sun CK, Yu WC, Fan ST, Poon RT. *Significance of circulating endothelial progenitor cells in hepatocellular carcinoma*. Hepatology 2006; 44: 836.
49. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS. *VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects*. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 11393.
50. Hood JD, Cheresch DA. *Building a better Trap*. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 7785.

51. Hu L, Hofmann J, Holash J, Yancopoulos GD, Sood AK, Jaffe RB. *Vascular endothelial growth factor trap combined with paclitaxel strikingly inhibits tumor and ascites, prolonging survival in a human ovarian cancer model.* Clin Cancer Res 2005; 11: 6966.
52. Huang J, Frischer JS, Serur A, Kadenhe A, Yokoi A, McCrudden KW, New T, O'Toole K, Zabski S, Rudge JS, Holash J, Yancopoulos GD, Yamashiro DJ, Kandel JJ. *Regression of established tumors and metastases by potent vascular endothelial growth factor blockade.* Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 7785.
53. Kano MR, Morishita Y, Iwata C, Iwasaka S, Watabe T, Ouchi Y, Miyazono K, Miyazawa K. *VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling.* J Cell Sci 2005; 118: 3759.
54. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. *VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche.* Nature 2005; 438: 820.
55. Kashef E, Roberts JP. *Transplantation for hepatocellular carcinoma.* Semin Oncol 2001; 28: 497.
56. Kerr JS, Slee AM, Mousa SA. *The alpha v integrin antagonists as novel anticancer agents: an update.* Expert Opin Investig Drugs 2002; 11: 1765.
57. Kim ES, Serur A, Huang J, Manley CA, McCrudden KW, Frischer JS, Soffer SZ, Ring L, New T, Zabski S, Rudge JS, Holash J, Yancopoulos GD, Kandel JJ, Yamashiro DJ. *Potent VEGF blockade causes regression of coopted vessels in a model of neuroblastoma.* Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 11399.
58. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo.* Nature 1993; 362: 841.
59. Köhnlein T, Welte T. *Alpha-1 antitrypsin deficiency: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and treatment.* Am J Med 2008; 121: 3.
60. Kuo CJ, Farnebo F, Yu EY, Christofferson R, Swearingen RA, Carter R, von Recum HA, Yuan J, Kamihara J, Flynn E, D'Amato R, Folkman J, Mulligan RC. *Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer.* Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 4605.
61. Lai CL, Gregory PB, Wu PC, Lok AS, Wong KP, Ng MM. *Hepatocellular carcinoma in Chinese males and females. Possible causes for the male predominance.* Cancer 1987; 60: 1107.
62. Lau SC, Rosa DD, Jayson G. *Technology evaluation: VEGF Trap (cancer), Regeneron/sanofi-aventis.* Curr Opin Mol Ther 2005; 7: 493.

63. Lavanchy, D. *Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures*. J Viral Hepat 2004; 11: 97.
64. Le XF, Mao W, Lu C, Thornton A, Heymach JV, Sood AK, Bast RC. *Specific blockade of VEGF and HER2 pathways results in greater growth inhibition of breast cancer xenografts that overexpress HER2*. Cell Cycle 2008; 7: 3747.
65. Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H, Wood WI. *Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4*. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93: 1988.
66. Lellé, RJ. *In situ determination of the Ki-67 growth fraction (Ki-67 GF) in human tumors. (studies in breast cancer)*. Acta Histochem Suppl 1990: 109.
67. Little SA, Fong Y. *Hepatocellular carcinoma: current surgical management*. Semin Oncol 2001; 28: 474.
68. Liu H, Peng CH, Liu YB, Wu YL, Zhao ZM, Wang Y, Han BS. *Inhibitory effect of adeno-associated virus-mediated gene transfer of human endostatin on hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol 2005; 11: 3331.
69. Llovet JM, Bruix J. *Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma*. Hepatology 2008; 48: 1312.
70. Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, Sherman M, Schwartz M, Lotze M, Talwalkar J, Gores GJ. *Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma*. J Natl Cancer Inst 2008: 698.
71. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. *Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma*. N Engl J Med 2008; 359: 378.
72. Lu C, Thaker PH, Lin YG, Spannuth W, Landen CN, Merritt WM, Jennings NB, Langlely RR, Gershenson DM, Yancopoulos GD, Ellis LM, Jaffe RB, Coleman RL, Sood AK. *Impact of vessel maturation on antiangiogenic therapy in ovarian cancer*. Am J Obstet Gynecol 2008; 198: 1.
73. Lu H, Klein RS, Schwartz EL. *Antiangiogenic and antitumor activity of 6-(2-aminoethyl)amino-5-chlorouracil, a novel small-molecule inhibitor of thymidine phosphorylase, in combination with the vascular endothelial growth factor-trap*. Clin Cancer Res 2009; 15: 5136.
74. MacPhee MJ, Wiltrout RH, McCormick KL, Sayers TJ, Pilaro AM. *A method for obtaining and culturing large numbers of purified organ-derived murine endothelial cells*. J Leukoc Biol 1994; 55: 467.

75. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ. *Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth.* Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 8104.
76. McCormack L, Petrowsky H, Clavien PA. *Surgical therapy of hepatocellular carcinoma.* Eur J Gastroenterol Hepatol 2005; 17: 497.
77. Mise M, Arai S, Higashitani H, Furutani M, Niwano M, Harada T, Ishigami S, Toda Y, Nakayama H, Fukumoto M, Fujita J, Imamura M. *Clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor.* Hepatology 1996; 23: 455.
78. Miura N, Horikawa I, Nishimoto A, Ohmura H, Ito H, Hirohashi S, Shay JW, Oshimura M. *Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis.* Cancer Genet Cytogenet 1997; 93: 56.
79. Monto A, Wright TL. *The epidemiology and prevention of hepatocellular carcinoma.* Semin Oncol 2001; 28: 441.
80. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. *Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors.* Am J Pathol 2002; 160: 985.
81. Muir, AJ. *The natural history of hepatitis C viral infection.* Semin Gastrointest Dis 2000; 11: 54.
82. Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Br  chet C, Paterlini-Br  chet P. *Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas.* Gut 2005; 54: 1162.
83. Nguyen QD, Shah SM, Browning DJ, Hudson H, Sonkin P, Hariprasad SM, Kaiser P, Slakter JS, Haller J, Do DV, Mieler WF, Chu K, Yang K, Ingerman A, Vitti RL, Berliner AJ, Cedarbaum JM, Campochiaro PA. *A phase I study of intravitreal vascular endothelial growth factor trap-eye in patients with neovascular age-related macular degeneration.* Ophthalmology 2009; 116: 2141.
84. Ozturk, M. *p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure.* Lancet 1991; 338: 1356.
85. Park YN, Yang CP, Cubukcu O, Thung SN, Theise ND. *Hepatic stellate cell activation in dysplastic nodules: evidence for an alternate hypothesis concerning human hepatocarcinogenesis.* Liver 1997; 17: 271.
86. Plentz RR, Caselitz M, Bleck JS, Gebel M, Flemming P, Kubicka S, Manns MP, Rudolph KL. *Hepatocellular telomere shortening correlates with chromosomal instability and the development of human hepatoma.* Hepatology 2004; 40: 80.

87. Prewett M, Huber J, Li Y, Santiago A, O'Connor W, King K, Overholser J, Hooper A, Pytowski B, Witte L, Bohlen P, Hicklin DJ. *Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors*. *Cancer Res* 1999; 59: 5209.
88. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS. *Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis*. *Cancer Res* 1995; 55: 4575.
89. Rampone B, Schiavone B, Martino A, Viviano C, Confuorto G. *Current management strategy of hepatocellular carcinoma*. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3210.
90. Risau W, Flamme I. *Vasculogenesis*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73.
91. Rudge JS, Holash J, Hylton D, Russell M, Jiang S, Leidich R, Papadopoulos N, Pyles EA, Torri A, Wiegand SJ, Thurston G, Stahl N, Yancopoulos GD. *VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 18363.
92. Ryschich E, Lizdenis P, Ittrich C, Benner A, Stahl S, Hamann A, Schmidt J, Knolle P, Arnold B, Hämmerling GJ, Ganss R. *Molecular fingerprinting and autocrine growth regulation of endothelial cells in a murine model of hepatocellular carcinoma*. *Cancer Res* 2006; 66: 198.
93. Saito Y, Matsuzaki Y, Doi M, Sugitani T, Chiba T, Abei M, Shoda J, Tanaka N. *Multiple regression analysis for assessing the growth of small hepatocellular carcinoma: the MIB-1 labeling index is the most effective parameter*. *J Gastroenterol* 1998; 33: 229.
94. Schafer DF, Sorrell MF. *Hepatocellular carcinoma*. *Lancet* 1999; 353: 1253.
95. Schütte K, Bornschein J, Malfertheiner P. *Hepatocellular carcinoma-epidemiological trends and risk factors*. *Dig Dis* 2009; 27: 80.
96. Semela David, Heim Markus. *Managment des Hepatozellulären Karzinoms*. *Onkologie* 2006; 29: 23.
97. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. *Science* 1983; 219: 983.
98. Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. *A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines*. *Cancer Res* 1986; 46: 5629.
99. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1107.

100. Sun Z, Lu P, Gail MH, Pee D, Zhang Q, Ming L, Wang J, Wu Y, Liu G, Wu Y, Zhu Y. *Increased risk of hepatocellular carcinoma in male hepatitis B surface antigen carriers with chronic hepatitis who have detectable urinary aflatoxin metabolite M1*. *Hepatology* 1999; 30: 379.
101. Tagger A, Donato F, Ribero ML, Chiesa R, Portera G, Gelatti U, Albertini A, Fasola M, Boffetta P, Nardi G. *Case-control study on hepatitis C virus (HCV) as a risk factor for hepatocellular carcinoma: the role of HCV genotypes and the synergism with hepatitis B virus and alcohol. Brescia HCC Study*. *Int J Cancer* 1999; 81: 695.
102. Tew WP, Gordon M, Murren J, Dupont J, Pezzulli S, Aghajanian C, Sabbatini P, Mendelson D, Schwartz L, Gettinger S, Psyrrri A, Cedarbaum JM, Spriggs DR. *Phase 1 study of aflibercept administered subcutaneously to patients with advanced solid tumors*. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 358.
103. Tong MJ, el-Farra NS, Reikes AR, Co RL. *Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C*. *N Engl J Med* 1995; 332: 1463.
104. Tseng PL, Tai MH, Huang CC, Wang CC, Lin JW, Hung CH, Chen CH, Wang JH, Lu SN, Lee CM, Changchien CS, Hu TH. *Overexpression of VEGF is associated with positive p53 immunostaining in hepatocellular carcinoma (HCC) and adverse outcome of HCC patients*. *J Surg Oncol* 2008; 98: 349.
105. Udagawa T, Fernandez A, Achilles EG, Folkman J, D'Amato RJ. *Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy*. *FASEB J* 2002; 16: 1361.
106. Venook AP, Warren RS. *Introduction: Hepatocellular Carcinoma*. *Semin Oncol* 2001; 28: 439.
107. Verheul HM, Hammers H, van Erp K, Wei Y, Sanni T, Salumbides B, Qian DZ, Yancopoulos GD, Pili R. *Vascular endothelial growth factor trap blocks tumor growth, metastasis formation, and vascular leakage in an orthotopic murine renal cell cancer model*. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4201.
108. Verheul HM, Voest EE, Schlingemann RO. *Are tumours angiogenesis-dependent?* *J Pathol* 2004; 202: 5.
109. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. *Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma*. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 55.
110. Wang C, Lu Y, Chen Y, Feng Y, An L, Wang X, Su S, Bai W, Zhou L, Yang Y, Xu D. *Prognostic factors and recurrence of hepatitis B-related hepatocellular carcinoma after argon-helium cryoablation: a prospective study*. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26: 839.
111. Wee, A. *Diagnostic utility of immunohistochemistry in hepatocellular carcinoma, its variants and their mimics*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2006; 14: 266.

112. Werner, J, *Biomathematik und Medizinische Statistik*. 1984, München. 66.
113. Wicki A, Christofori G, *The Angiogenic Switch in Tumorigenesis*. In: Tumor Angiogenesis Basic Mechanisms and Cancer Therapy. Fusening N, Marmé D (Hrsg.) 2008, Berlin. 67.
114. Xia YP, Li B, Hylton D, Detmar M, Yancopoulos GD, Rudge JS. *Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis*. Blood 2003; 102: 161.
115. Yang ZF, Poon RT. *Vascular changes in hepatocellular carcinoma*. Anat Rec (Hoboken) 2008; 291: 721.
116. Yuen MF, Poon RT, Lai CL, Fan ST, Lo CM, Wong KW, Wong WM, Wong BC. *A randomized placebo-controlled study of long-acting octreotide for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma*. Hepatology 2002; 36: 687.
117. Zhu AX, Blaszkowsky LS, Ryan DP, Clark JW, Muzikansky A, Horgan K, Sheehan S, Hale KE, Enzinger PC, Bhargava P, Stuart K. *Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma*. J Clin Oncol 2006; 24: 1898.

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Graepler F, Nissler V, Scharpf M, Vonthein R, Heidenreich R, Wehrmann M, Rudge J, Bitzer M, Gregor M, Lauer UM. *The angiogenesis inhibitor VEGF Trap (aflibercept), a soluble VEGF decoy receptor, inhibits tumor growth in a human HCC xenograft model.* DDW 2009, Chicago (Auszeichnung "Poster of Distinction") Gastroenterology 2009; 136 (Suppl 1):T2016.

Nißler V, Scharpf M, Vonthein R, Heidenreich R, Smirnow I, Schenk A, Wehrmann M, Rudge J, Gregor M, Lauer U, Graepler F. *Der Angiogenese-Inhibitor VEGF Trap inhibiert das HCC-Tumorwachstum in einem humanen HuH7-Xenograft-Modell.* Z Gastroenterol 2008; 46: 966.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Gregor und Herrn Professor Dr. Lauer, Medizinische Universitätsklinik Tübingen, Abteilung I, die mir die Möglichkeit gaben, an dieser Abteilung meine Dissertation zu erstellen.

Bei Herrn PD Dr. Graepler als Doktorvater und Betreuer möchte ich mich für seine stetige Motivation sowie seine ehrlichen und aufmunternden Worte besonders bedanken. Es ist ihm durch seine herzliche Art gelungen, eine freundschaftliche Atmosphäre zu schaffen und dadurch die Freude an meiner Arbeit zu erhalten.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Lauer und Herrn Professor Dr. Bitzer danke ich für ihre freundliche Aufnahme und Einarbeitung. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Andrea Schenk und Frau Irina Smirnow für ihre Einführungen in die Arbeit am Kryotom und in die Färbetechniken der Alkalischen Phosphatase bedanken.

Besonderen Dank an Herrn Professor Dr. Fend vom Institut für Pathologie der Universitätsklinik Tübingen für die Möglichkeit, die histopathologischen Auswertungen dort vorzunehmen. Herrn Professor Wehrmann möchte ich für seine Überlegungen hinsichtlich der Auswertungsplanungen recht herzlich danken. Herrn Marcus Scharpf möchte ich meinen großen Dank für seine Einführung in die Arbeit mit einem Fotomikroskop und seine stete Ansprechbarkeit aussprechen. Frau Annemarie Adam danke ich für die Erklärung der Färbemethoden und Protokolle im Pathologischen Institut.

Bei dieser Arbeit wurde die methodische Beratung des Instituts für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen. Für die Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Dr. Vonthein und Frau Naumann herzlich bedanken.

Frau Dr. Regina Heidenreich danke ich für ihren Beitrag in der Meca-32 Färbung.

Schließlich danke ich meinen Brüdern Christian und Robin herzlich für ihre Unterstützung im Umgang mit Computerprogrammen, für die Auseinandersetzung mit meiner Arbeit und ihre große Geduld bei meinen Fragen zur EDV.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Name: Valerie Nißler

Geburtstag: 23.01. 1985

Geburtsort: Stuttgart

1996-2004: Hans-Baldung-Gymnasium Schwäbisch Gmünd, Abitur 2004

2004-2010: Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen, Staatsexamen 23.11. 2010

Famulaturen:

im März 2007 in der Klinik für Radioonkologie und Strahlentherapie in
Braunschweig

im März 2008 in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin im
Katharinenhospital Stuttgart

im August 2008 im Städtischen Klinikum Köln in der Medizinischen Klinik

im September 2008 in der Zentralen Einheit Endoskopie der Universitätsklinik
Tübingen

im März 2009 in der Klinik für Mund-, Kiefer-und Gesichtschirurgie der
Universitätsklinik Tübingen