

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern, Klinik der Ludwig-
Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. h.c. mult. Karl-Walter Jauch

**Hemmung der Lymphangiogenese durch Inhibition des
mammalian Target of Rapamycin**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stephan Huber

aus

Schwaz

Jahr

2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Markus Guba

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Endres

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Volker Heinemann

Prof. Dr. Josef Müller-Höcker

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.09

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Aufbau und Funktion des lymphatischen Systems	6
1.2 Pathologische Veränderungen des Lymphgefäßsystems	8
1.3 Neue und molekularbiologische Einsichten in das Lymphgefäßsystem	11
1.4 Lymphangiogenese und Tumor-Metastasierung	14
1.5 Rapamycin und die Substanzgruppe der mTOR-Inhibitoren	16
1.6 mTOR-Inhibitoren als Immunsuppressiva nach Organtransplantation	19
1.7 Fragestellung	21
2. Materialien und Methoden	22
2.1 Murines Skin-Flap-Modell	22
2.2 Muriner Matrigel™ Plug-Assay	24
2.3 Induktion von intraperitonealen Lymphangiomen in der Maus	26
2.4 Zellkultur-Experimente	28
2.4.1 Isolation der LECs	28
2.4.2 Proliferations-Experimente	29
2.4.3 Untersuchung der Migration	30
2.4.4 Bestimmung der Phosphorylierung der P70S6 Kinase mittels Western Blot	31
2.5 Statistische Auswertung	32
3. Ergebnisse	33
3.1 Rapamycin hemmt die lymphatische Regeneration nach chirurgischer Inzision	33
3.3 Rapamycin hemmt die Proliferation von Lymphendothelzellen in vitro	37
3.5 Rapamycin hemmt die VEGF-induzierte Stimulation der p70s6-Kinase	40
3.6 Rapamycin hemmt die Entstehung von Lymphangiomen in einem Mausmodell	42
3.7 Rapamycin hemmt die Entstehung von Lymphangiomen in einem von der Immunsuppression unabhängigen Modell	44
4. Diskussion	46
4.1 Zusammenfassung und kritische Bewertung der Experimente	46

4.2 Bedeutung der Ergebnisse	52
5.Zusammenfassung	59
6.Danksagung	61
7.Literaturverzeichnis	62
A. Lebenslauf	73

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion des lymphatischen Systems

Das Lymphgefäßsystem des Menschen ist entscheidend beteiligt an der Regulation der interstitiellen Flüssigkeitsbalance, an immunologischen Vorgängen sowie der Absorption von Fett aus dem Darm. (Saharinen, Tammela et al. 2004)

Während der Blutkreislauf des Menschen die Gewebe über ein Netzwerk von Blutgefäßen und Kapillaren mit Sauerstoff, Nährstoffen sowie Hormonen versorgt, tritt durch ein Gefälle zwischen Blut- und Gewebedruck ständig Flüssigkeit aus den Gefäßen in das Interstitium der umliegenden Gewebe aus. Die Hauptfunktion der Lymphgefäße ist es, diese interstitielle Flüssigkeit, Makromoleküle und Zellen unidirektional dem Blutkreislauf wieder zuzuführen. (Olszewski 2003) Lymphatische Kapillaren befinden sich neben der Haut in nahezu allen inneren Organen mit Ausnahme des Zentralen Nervensystems, des Knochenmarks und verschiedener avaskulärer Strukturen, wie Knorpel, Cornea und der Epidermis.

Des Weiteren sind die Villi des Dünndarmes mit einem reichhaltigen Netz an Lymphgefäßen durchzogen. Durch dieses Netz wird mit der Nahrung aufgenommenes Fett in Form von Lipidpartikeln, den Chylomikronen, aufgenommen und dem Blutkreislauf zugeführt.

Das Lymphgefäßsystem ist ein charakteristisches Merkmal höherer Wirbeltiere, bei denen sich wegen des komplexen kardiovaskulären Systems die Notwendigkeit für das Vorhandensein eines zweiten Gefäßsystems ergibt. (Alitalo, Tammela et al. 2005)

Das System der Lymphgefäße gliedert sich funktionell in 4 verschiedene Abschnitte, welche Gefäße mit verschiedenen Funktionen und unterschiedlichem Aufbau beinhalten.

In der Peripherie des Lymphkreislaufs liegen Kapillaren. Diese sind einfach und permeabel aufgebaut, sie besitzen keine oder nur eine geringfügig ausgeprägte

Basalmembran und sind neben dem Lymphendothel nicht von anderen Zellen, wie z.B. glatten Muskelzellen oder Perizyten, umgeben. Ihre primäre Funktion ist es, die übergetretene Flüssigkeit zu sammeln.

Diese Kapillaren münden in größere Lymphgefäße, die dem Abtransport der gesammelten Lymphe dienen. Sie sind mit einer Basalmembran ausgestattet und von glatten Muskelzellen umgeben. Des Weiteren weisen sie Klappen auf, um einen gerichteten, eindirektionalen Fluss der Lymphe zu ermöglichen, ähnlich den Klappen im venösen Gefäßsystem. Hier trägt die Kontraktion sowohl der glatten Muskelzellen als auch umgebender Skelettmuskeln dazu bei, die Lymphe propulsiv voranzubewegen.

Die Bahn der Lymphgefäße wird von über 100 linsen- bis bohnen großen Organen unterbrochen, den Lymphknoten. Diese bestehen vorrangig aus Parenchym, in dem zahlreiche Lymphozyten und Makrophagen verankert sind. Auf dem Weg zum Herzen wird die proteinreiche Lymphe an diesen Lymphknoten filtriert, wo artfremde Partikel von Antigen-Präsentierenden Zellen erkannt werden und so der Immunantwort zugeführt werden können. Auch aktivierte Antigen-Präsentierende Zellen werden mit der Lymphe zu Lymphknoten transportiert und können dort erkannte Antigene Lymphozyten präsentieren. (Randolph, Angeli et al. 2005) Neben den genannten immunologischen Funktionen sind Lymphknoten außerdem in der Lage, die ankommende Lymphe durch Wasserresorption zu konzentrieren.

Die Mündung des Lymphgefäßsystems in den Blutkreislauf befindet sich beim Menschen in der jugulären Gegend, wo die Lymphe über den Ductus Thoracicus auf der linken Seite beziehungsweise über den Ductus Lymphaticus Dexter auf der rechten Seite kommend über den linken beziehungsweise rechten Venenwinkel in die jeweilige Vena Subclavia mündet. Die täglich über das Lymphgefäßsystem zurückgeführte Menge an Flüssigkeit beträgt zwischen zwei und vier Litern.

1.2 Pathologische Veränderungen des Lymphgefäßsystems

Die häufigste und bekannteste Erkrankung des Lymphgefäßsystems stellt das Lymphödem dar, was eigentlich nur ein Überbegriff für eine interstitielle Flüssigkeitsakkumulation ist, die durch eine Transportinsuffizienz des lymphatischen Systems aufgrund verschiedenster Ursachen zustande kommt. Ein einheitliches Krankheitsbild ist hier nicht gegeben, man unterscheidet eine Vielzahl von Ursachen für diesen Symptomenkomplex. Die weltweite Inzidenz wird auf etwa 140-250 Millionen Menschen geschätzt. (Rockson 2001) Der Großteil von ihnen ist bedingt durch Filariasis, eine parasitäre Erkrankung, die nahezu ausschließlich in Afrika und dem indischen Subkontinent auftritt. (Ottesen, Duke et al. 1997) Hier geht man von weltweit etwa 120 Millionen Erkrankten aus. Im Gegensatz zur infektiösen Genese ist die häufigste Ursache für Lymphödeme in Industrienationen die chirurgische oder radioonkologische Therapie von Malignomen der Brust. (Rockson 2001) Seltene Ursachen sind primäre (angeborene) Erkrankungen, bei denen die Krankheit von einer erblichen Malfunktion ausgeht. Sie sind abzugrenzen gegenüber den oben genannten sekundären Formen, bei denen eine äußere Ursache für die Stauung der Lymphe in den ansonsten funktionell nicht beeinträchtigten Lymphgefäßen verantwortlich ist. Die Einteilung in diese Formen hat allerdings eher akademischen Wert und keinen nennenswerten Einfluss auf die Wahl der Therapie. Wichtige Komplikationen des Lymphödems stellen maligne Entartungen dar. Bei Zustand nach Mastektomie kommt es immerhin in etwa 0,45% der Fälle zu Lymphödem. (Clements, Kirk et al. 1993)

Eine kurative Behandlung des Lymphödems ist bis heute leider nicht möglich. Vielmehr besteht die derzeitige Behandlung in einer palliativen Kombination aus physikalischen Maßnahmen und chirurgischen Konzepten. Hier sind vor allem lymphangio-venöse Anastomosen nach Campisi sowie die autologe Lymphgefäßtransplantation nach Baumeister zu nennen, die frühzeitig durchgeführt auch zur Heilung des Ödems führen können. (Campisi, Boccardo et al. 1995; Weiss, Baumeister et al. 2003) Neue gentherapeutische Ansätze stellen möglicherweise eine kurative Option für die Zukunft dar, bisher haben sie aber nur am Kleintiermodell Anwendung gefunden. Hier können künstlich gesetzte Lymphödeme mit adenoviralen Genvektoren, welche den Wachstumsfaktor VEGF-C enthalten

(Mechanismus siehe Punkt 1.3), bereits erfolgreich behandelt werden. (Yoon, Murayama et al. 2003; Saaristo, Tammela et al. 2004) Auch der Faktor Angiopoietin-1 (auch hier Mechanismus siehe Punkt 1.3) scheint beim Gentransfer in Mäusen eine zukünftige Behandlungsoption darzustellen. (Tammela, Saaristo et al. 2005)

Neben Lymphödemen können nach Verletzung von Lymphgefäßen infolge von chirurgischen Eingriffen auch sogenannte Lymphozelen auftreten. Hierbei handelt es sich um mit Lymphe gefüllte Hohlräume, die keine distinkte epitheliale Begrenzung aufweisen. Erstmals wurden sie im Jahr 1955 von Mori an Patientinnen mit Zustand nach Hysterektomie beschrieben und als Lymphozysten bezeichnet, ein Begriff der bis in die 70er Jahre gebraucht wurde. (Mori 1955) Heute treten sie häufig als Komplikation im Rahmen von Nierentransplantationen auf und spielen, wie auch das Lymphödem eine große Rolle nach chirurgischer Therapie des Mamma-Karzinoms. (Amante and Kahan 1994; Kuroi, Shimosuma et al. 2005) Die Behandlung der Lymphozele ist deutlich erfolversprechender als die des Lymphödems.

Angemerkt sei hier auch das Kaposi Sarkom, eine Neoplasie wahrscheinlich vaskulären Ursprungs, die in Haut, mukösen Membranen und inneren Organen auftritt. Während diese Erkrankung in Gebieten südlich der Sahara endemisch auftritt, ist sie in Industrienationen meistens mit einer HIV-Erkrankung oder einer Immunsuppression anderer Genese assoziiert. Charakteristisch für das Kaposi-Syndrom sind spindelförmige Tumorzellen, die sowohl blutkreislauf- als auch lymphendothelzell-typische Marker wie LYVE-1 exprimieren und somit auf eine mögliche vaskuläre Herkunft schließen lassen. Studien zeigten, dass dieser Phänotyp assoziiert ist mit einer durch Herpesviren induzierten Umprogrammierung der Expression. (Hong, Foreman et al. 2004; Wang, Trotter et al. 2004)

Bewusst nicht erwähnt sind hier die zahlreichen hämatologischen Erkrankungen der Lymphozyten und anderer Zellen der Lymphknoten oder lymphatischen Organe. Ihre Pathogenese ist in der Regel unabhängig von den Erkrankungen des Lymphgefäßsystems. Allerdings können Lymphödeme in seltenen Fällen auch maligne entarten. (Peyron, Dandurand et al. 1993)

Angemerkt sei hier auch, dass im Rahmen von Neoplasien dieser Zellreihen, also bei malignen Lymphomen, eine Induktion der Lymphangiogenese zu beobachten ist. In den Lymphknoten betroffener Patienten zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Lymphgefäßdichte im Vergleich zu einer Kontrollgruppe neoplasiefreier Patienten.

Als möglicher Mechanismus wird hier eine Hochregulation der Expression von VEGF-A und VEGF-C (siehe unten) angenommen. (Kadowaki, Ichinohasama et al. 2005)

Neoplastische Erkrankungen des Lymphgefäßsystems sind relativ häufig. Das benigne Lymphangiom ist meist bereits bei der Geburt nachweisbar und stellt somit zusammen mit dem Hämangiom, dem benignen Tumor des Blutgefäßsystems, eine vorwiegend pädiatrische Erkrankung dar. Prinzipiell kommen Lymphangiome nahezu am gesamten Körper vor und es gibt nur wenige Prädilektionsstellen. Diese gutartigen Wucherungen sind allerdings meist nur kosmetisch beeinträchtigend und stellen nur in äußerst seltenen Fällen eine Gefährdung für den Patienten dar, wenn sie die Funktion eines Organs behindern. Im Gegensatz zu Hämangiomen zeigen Lymphangiome jedoch keine spontane Rückbildungstendenz. Daher ist nach bisherigem Kenntnisstand stets eine chirurgische Therapie indiziert, zumal keine erfolgreiche medikamentöse Therapie bekannt ist. (Mulliken, Fishman et al. 2000)

Maligne Entartungen der Lymphgefäße werden als Lymphangiosarkome bezeichnet und stellen eine seltene Komplikation bei länger persistierenden Lymphödemen dar. Erstmals wurden sie von Stewart und Treves bei sechs Lymphödem-Patientinnen nach Mastektomie beschrieben und seither wurden in der Literatur etwa 400 weitere Fälle dokumentiert. (Makinen, Adams et al. 2005) Lymphangiosarkome stellen mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 5-29% eine äußerst aggressive Erkrankung dar. (Gregl, Pavic et al. 1988; Brady, Garfein et al. 1994)

1.3 Neue und molekularbiologische Einsichten in das Lymphgefäßsystem

Erstmals wurde die Existenz von Lymphgefäßen im Jahre 1622 von Gaspar Ansellius nachgewiesen, der Gefäße beschrieb, welche vom Dünndarm eines Hundes zu dessen Leber führten. Obwohl offensichtlich eine Reihe pathologischer Prozesse mit Veränderungen im lymphatischen Gefäßsystem einhergehen, fand lange Zeit auf dem Gebiet der Lymphangiogenese, der Neubildung von Lymphgefäßen nur wenig Forschung statt. Erst in den letzten Jahrzehnten rückte die Lymphangiogenese in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Entscheidend war hierbei zunächst, molekulare Marker zu finden, mit welchen Lymphendothelzellen isoliert und Lymphgefäße auf histologischen Schnitten selektiv dargestellt werden konnten.

Einer der ersten Marker, die identifiziert werden konnten, ist der Wachstumsfaktoren-Rezeptor VEGFR-3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3, auch als Flt-4 bezeichnet). Während dieser Rezeptor in der Embryogenese auch auf Endothelzellen des Blutkreislaufs exprimiert wird, ist die Expression postpartal spezifisch für LECs. (Kaipainen, Korhonen et al. 1995) Die gemeinsame Expression während der Embryogenese stützt die bereits über ein Jahrhundert alte Hypothese von Florence Sabin, dass das Lymphatische System venösen Ursprungs ist. (Sabin 1902) Auch andere neue Studien an Mäusen, bei denen der Transkriptionsfaktor Prox-1 oder der Wachstumsfaktor VEGF-C defizient ist, stützen diese Vermutung. (Wigle and Oliver 1999; Karkkainen, Haiko et al. 2004) Auch Prox-1 ist ausschließlich auf LECs aktiviert und eine adenovirale Transfektion von Endothelzellen des Blutkreislaufs mit Prox-1 führt zu einer Veränderung der Expressionsmuster, welche dann eine Verschiebung in Richtung derer von LECs erfahren und LECs phänotypisch ähneln. (Petrova, Makinen et al. 2002)

LYVE-1 (Lymphatic Vessel Hyaluronan Receptor-1) ist der derzeit wahrscheinlich meistgenutzte lymphspezifische Marker. (Jackson 2004) Er befindet sich vorrangig auf den Kapillaren des Lymphsystems, während er auf größeren, sammelnden Lymphgefäßen herunterreguliert wird. (Makinen, Adams et al. 2005) Die Rolle von LYVE-1 ist derzeit noch nicht bekannt, wohl aber ist der Marker als membranständiges Protein für die Identifikation von LECs nutzbar.

Podoplanin, ein transmembranäres Glykoprotein, welches neben LECs auch von Podozyten der Niere, Keratinozyten der Haut und den Alveolarzellen der Lunge

exprimiert wird, kann durch seine relative Selektivität der Expression ebenfalls für die Identifikation von Lymphendothelien genutzt werden. (Breiteneder-Geleff, Soleiman et al. 1999) Podoplanin scheint sowohl für die Entwicklung der Lunge als auch des Lymphsystems von Bedeutung zu sein, da Mäuse mit defizientem Podoplanin-Gen perinatal an Lungenfehlbildungen versterben und Lymphödeme aufweisen. (Schacht, Ramirez et al. 2003)

Nach der Identifikation dieser Moleküle war es möglich, aus gemischten Zellkulturen von Endothelzellen sowohl des Blut- als auch des Lymphgefäßsystems die einzelnen Zelltypen selektiv zu isolieren und so eine molekulare Charakterisierung von LECs durchzuführen. Wichtig ist dies, da gemischte Kulturen aus der Haut unter Isolation auf den pan-endothelialen Marker CD 31 gewonnen werden und anschließend verhältnismäßig einfach kultiviert werden können. Dafür wurden bisher die Marker VEGFR-3, Podoplanin und LYVE bereits als mögliche Epitope für die Isolation beschrieben und die Zellen mittels magnetischer oder fluoreszenzaktivierter Methoden sortiert. (Kriehuber, Breiteneder-Geleff et al. 2001; Makinen, Veikkola et al. 2001; Podgrabinska, Braun et al. 2002) Im Gegensatz zu gemischten Kulturen benötigen isolierte LECs die Zugabe von Wachstumsfaktoren zum Kulturmedium. Die Untersuchung dieser isolierten LECs zeigte, dass die Wachstumsfaktoren VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D das Wachstum der Zellen konzentrationsabhängig zu stimulieren vermögen. (Makinen, Veikkola et al. 2001) Diese sind Liganden an den Rezeptoren VEGFR-3 (VEGF-C und D), welcher so wie oben beschrieben vornehmlich im Lymphgefäßsystem exprimiert wird, und VEGFR-2 (VEGF-A, C und D). VEGFR-2 wird von Endothelzellen des Blutkreislaufs in noch stärkerem Maße exprimiert, ist aber auch auf LECs zu finden. (Makinen, Veikkola et al. 2001) Hierbei handelt es sich um sieben Transmembrandomänen-Rezeptoren, welche die IP-3 Kinase phosphorylieren und so Signale in den Zellkern leiten. (Makinen, Veikkola et al. 2001) Auch bei den Faktoren FGF-2 und IGF 1/2 konnte an einem Modell der Lymphgefäßeinsprossung in die murine Cornea eine deutliche Stimulation der Gefäßneubildung gezeigt werden. (Chang, Garcia-Cardena et al. 2004; Bjorndahl, Cao et al. 2005) Indirekte Hinweise auf eine vergleichbare Wirkung ergibt die Tatsache, dass an dem subkutanen Modell einer murinen Fibrosarkom-Linie die Expression von PDGF-BB die intratumorale Lymphgefäßdichte erhöht und auch die lymphogene Metastasierung gesteigert wird. (Cao, Bjorndahl et al. 2004) Etwas komplexer scheint die Rolle der Angiopoietine (1/2) und ihrer Rezeptoren Tie-1 und

Tie-2 in der Lymphangiogenese zu sein. Beide Rezeptoren sind auf der Oberfläche von LECs ausgebildet und man nimmt eine ähnliche Wirkung wie auf BECs an, wo Ang-1 vor allem agonistisch an Tie-2 wirkt, während Ang-2 einen endogenen Inhibitor und kompetitiven Antagonisten darstellt. (Loughna and Sato 2001) Bei Blutgefäßen ist die resultierende Wirkung letztendlich eine Stabilisierung (Ang-1) bzw. Destabilisierung (Ang-2) der Gefäße. Auf welche Art und Weise die Stimulation der lymphatischen Proliferation zustande kommt, ist allerdings noch nicht geklärt. Wohl aber ist in zwei Untersuchungen am Mausmodell ein signifikant positiver Einfluss von Ang-1 auf diese Proliferation aufgezeigt worden. (Morisada, Oike et al. 2005; Tammela, Saaristo et al. 2005)

Ein inhibitorischer Effekt auf die lymphatische Neubildung wird TGF- β zugeschrieben. Sowohl *in vitro* als auch in murinen xenogenen Tumormodellen wurde diese durch TGF- β gehemmt. Durch geeignete Inhibitoren konnte die Angiogenese gesteigert werden. (Oka, Iwata et al. 2008)

1.4 Lymphangiogenese und Tumor-Metastasierung

Neben dem Lymphödem stellt die Tumor-assoziierte Lymphangiogenese den Hauptfokus der derzeitigen Lymphgefäßforschung dar. Dies ist insofern wichtig, als neue Erkenntnisse zunehmend darauf hinweisen, dass Lymphangiogenese in Tumoren mit der lymphogenen Metastasierung und damit auch mit der Prognose korreliert. (Stacker, Achen et al. 2002) In einer Reihe von Tumoren scheint die lokale oder überregionale Metastasierung in die Lymphknoten ein äußerst wichtiger prognostischer Faktor zu sein. Vor allem die Höhe des VEGF-C und -D Spiegels intratumoral korreliert häufig negativ mit der Überlebenszeit der Patienten. Dies konnte bei einer Reihe von Tumoren, wie dem Kolon- oder Mamma-Karzinom, aus klinischen Daten nachgewiesen werden. (Onogawa, Kitadai et al. 2004; Bando, Weich et al. 2006) Bei vielen weiteren Neoplasien wurde ein Zusammenhang zwischen der intra- oder peritumoralen Lymphangiogenese und der Frequenz der Metastasierungshäufigkeit beobachtet, hier sind vor allem Tumoren des Nasen- und Rachenraums, Melanome und Schilddrüsenneubildungen zu nennen. (Beasley, Prevo et al. 2002; Hall, Freeman et al. 2003)

Eine Ausnahme stellt hier das Mamma-Karzinom dar, bei dem die intra- oder peritumorale Lymphgefäßdichte zumindest in einer Studie nicht direkt mit der Frequenz lymphogener Metastasen zusammenhängt. (Schoppmann, Bayer et al. 2004) Dies steht wegen möglicher weiterer Funktionen von VEGF-C, auf die unten noch eingegangen wird, nicht im Widerspruch zur oben erwähnten Bedeutung seiner Expression für die durchschnittliche Überlebenszeit und lymphogene Metastasierung.

Noch ist wenig bekannt über die genauen Mechanismen des Eintritts von Tumorzellen in Lymphgefäße und die näheren Umstände, die zur vermehrten Ausbildung von Lymphgefäßen bei soliden Neoplasien führen. Die direkten intratumoralen Lymphgefäße scheinen aber nicht zur lymphogenen Metastasierung beizutragen, wie eine Studie berichtet. (Padera, Stoll et al. 2004) In Tiermodellen erwiesen sie sich als nicht funktionell, da sie unter dem erhöhten intratumoralen Druck kollabierten. Wichtiger für den Übertritt von Tumorzellen scheinen hier die Gefäße in der Peripherie des Tumors zu sein, deren Wachstum durch erhöhten interstitiellen Druck sowie vom Tumor sezernierte Wachstumsfaktoren stimuliert wird. (Padera, Kadambi et al. 2002) Im Tiermodell konnte die Expression zahlreicher

Wachstumsfaktoren die Metastasierung auf dem Lymphweg induzieren. Neben VEGF-C waren auch PDGF-B und VEGF-A bisher in diesen Studien auf lymphatischem Wege pro-metastatisch wirksam und wirkten sich somit negativ auf die Prognose der Versuchstiere aus. (Cao, Bjorndahl et al. 2004; Hirakawa, Kodama et al. 2005) Weiters konnte nachgewiesen werden, dass VEGF-C den Tumorzell-Eintritt in die Lymphgefäße ermöglicht, indem sich Protrusionen der Endothelzellen hin zu den VEGF-C produzierenden Tumorzellen bilden, in die die Tumorzellen eintreten können. (He, Rajantie et al. 2005)

Die Bindung von löslichem VEGF-C scheint im Mausmodell die Lymphangiogenese zu mindern, was sich auch in einer selteneren lymphatischen Metastasierung verglichen mit einer Kontrollgruppe äußert.(He, Kozaki et al. 2002)

1.5 Rapamycin und die Substanzgruppe der mTOR-Inhibitoren

Rapamycin (auch als Sirolimus bezeichnet) als erste bekannte Substanz der Klasse der mTOR-Inhibitoren konnte 1975 erstmals aus der Pilzart *Streptomyces hygroscopicus* isoliert werden, welche vor der Küste der Osterinsel (Rapa Nui) gefunden worden war. Nach der erstmaligen Purifizierung der Substanz wurde ihr zunächst eine fungizide Wirkung zugeschrieben. (Sehgal, Baker et al. 1975; Vezina, Kudelski et al. 1975) Weitere Untersuchungen zeigten im Kleintiermodell eine hemmende Wirkung auf Tumorwachstum und immunsuppressive Wirkung. (Martel, Klicius et al. 1977; Douros and Suffness 1981; Eng, Sehgal et al. 1984) Als Wirkungsmechanismus konnte hier die Inaktivierung der Kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) identifiziert werden. Diese Kinase wird aktiviert, nachdem ein eingehendes Signal (im Falle der immunsuppressiven Wirkung handelt es sich um Interleukin-2) die Zelle über einen sieben Transmembrandomänen-Rezeptor erreicht hat. (Huang, Bjornsti et al. 2003) Durch diesen Mechanismus kommt es zur Aktivierung der nachgeschalteten IP-3 Kinase, welche über Zwischenschritte mTOR phosphoryliert. Letztlich wurde die mTOR-Kinase als ein wichtiger Sensor zahlreicher Bedingungen in der Zelle identifiziert. Abhängig von Wachstumsfaktorstimulus, zellularem Nährstoffstatus (vor allem Insulin-assoziiert) und den intrazellulären Redox-Potentialen werden Proliferation und Größenwachstum der Zelle von mTOR über die Phosphorylierung nachgeschalteter Kinasen gesteuert. (Tokunaga, Yoshino et al. 2004) Rapamycin beeinflusst die Aktivität von mTOR nicht direkt. Bevor es zur Bindung von Rapamycin an mTOR kommt, bindet sich Rapamycin unmittelbar an das Protein FKBP 12, das einen intrazellulären Rezeptor für Rapamycin darstellt. Nach der Bindung von Rapamycin an FKBP 12 wird letztlich die Funktion von mTOR inaktiviert. (Hay and Sonenberg 2004)

mTOR stellt den Verbund aus zwei katalytischen Untereinheiten dar, die als Raptor(mTORComplex 1) und Rictor (mTORComplex 2) bezeichnet werden. Raptor (**R**egularly **A**ssociated **P**rotein of **mTOR**) ist assoziiert mit den oben beschriebenen Funktionen des mTOR Pathways. Die beiden am besten charakterisierten Ziel-Proteine, die nach Raptor-Aktivierung nachgeschaltet phosphoryliert werden, sind die p70s6-Kinase und das Protein 4EBP1 (Eukaryotic Initiation Factor 4 Binding Protein 4). Die Phosphorylierung der p70s6Kinase kontrolliert die Synthese einer Reihe

ribosomaler Komponenten, die für Proteinsynthese und das Fortschreiten des Zellzyklus wichtig sind. (Kim, Sarbassov et al. 2002) Rictor (**R**apamycin **I**nsensitive **C**ompanion of **mTOR**) ist gegenüber Rapamycin insensitiv. Seine Hauptaufgabe scheint in einer wichtigen Co-Regulation des Zellskeletts zu bestehen.

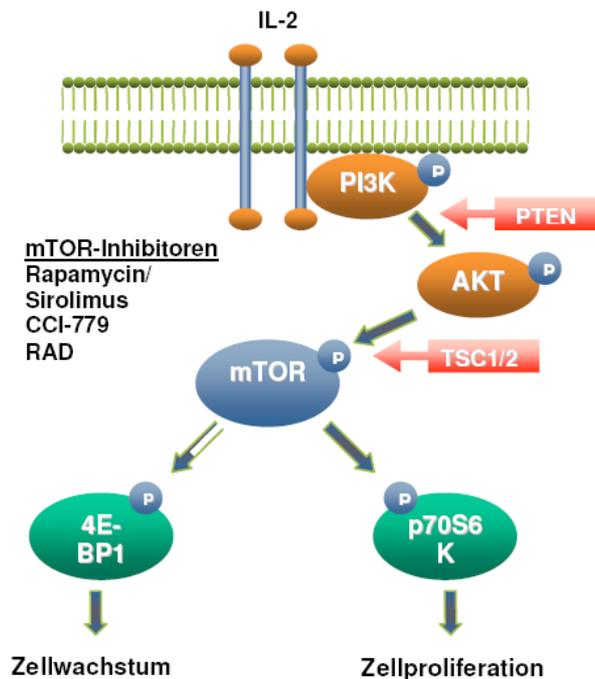


Abbildung 1: Das Schema der Wirkungsweise von Rapamycin und der mTOR-Inhibitoren am Beispiel der Bindung von Interleukin-2.

In einer Reihe von Malignomen konnte die Inhibition von mTOR als potentiell Ziel für eine zytostatische Therapie identifiziert werden. (Amornphimoltham, Patel et al. 2005; Lang, Gaumann et al. 2007)

Neuere Untersuchungen zeigen, dass nicht nur die direkte Hemmung des Tumorwachstums bei der Wirkung von Rapamycin eine Rolle spielt. Vielmehr scheint der Hemmung der Tumor-Angiogenese eine bedeutende Rolle zuzukommen. (Guba, von Breitenbuch et al. 2002; Amornphimoltham, Patel et al. 2008) Hierbei scheint die Hemmung des meist durch VEGF-A eingehenden Signals in der Endothelzelle ein entscheidender Faktor zu sein. Allerdings konnte nicht geklärt werden, ob die ebenfalls nachgewiesene Hemmung der Sekretion von VEGF durch Tumor- und Stromazellen nicht in gleichem oder größerem Maße zu diesem Effekt beiträgt. Dies bedeutete im Mausmodell eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums durch den Einsatz von Sirolimus in Dosierungen, welche auch für eine immunsuppressive

Wirkung beim Menschen angewandt werden (4-12 ng/ml). (Guba, von Breitenbuch et al. 2002) Auch scheint eine vermehrte Thrombosierung in den Gefäßen des Tumors eine Rolle bei diesem Prozess zu spielen. (Guba, Yezhelyev et al. 2005) Bereits unter normalen Umständen kommt es zu einer Hochregulierung der Expression des gerinnungsfördernden tissue factor in Endothelzellen, wenn diese mit VEGF-A stimuliert werden. Eine Behandlung mit Sirolimus konnte diese Expression signifikant steigern. Auch in murinen Neoplasien, welche eine vergleichbare Behandlung erhielten, konnten zahlreiche und im Vergleich zur Kontrolle signifikant häufigere Mikrothrombosen histologisch nachgewiesen werden. (Guba, Yezhelyev et al. 2005) Interessanterweise zeigen Dosierungen, welche über die oben erwähnten hinausgehen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen schwächer hemmenden Effekt auf die Angiogenese und die Proliferation von Endothelzellen als die zur immunsuppressiven Therapie angewandten Dosierungen. Auch zeigt die Applikation des Medikaments als Bolus einen geringeren Effekt auf Tumor- und Gefäßwachstum verglichen mit einer kontinuierlichen niedrigdosierten Gabe. (Guba, Koehl et al. 2005)

Ein murines Modell des orthotopen Pankreas-Karzinoms zeigte eine geringere Metastasierung in die ortsständigen Lymphknoten unter Sirolimus-Therapie verglichen mit der derzeitigen klinischen Standard-Therapie Gemcitabine. (Bruns, Koehl et al. 2004) Ähnliche Resultate ergaben sich aus Mausversuchen mit Kolon-Karzinomen, wo durch den Einsatz von Sirolimus im Vergleich zu einer Behandlung mit 5-FU die metastatische Aktivität deutlich eingeschränkt wurde. (Seeliger, Guba et al. 2004)

Die in diesen Studien gezeigte Hemmung der Angiogenese konnte auch am Auge experimentell gezeigt werden und stellt somit bei ophthalmologischen Erkrankungen, die mit verstärkter Gefäßbildung einhergehen, eine mögliche neue Therapieoption dar. (Kwon, Hong et al. 2005)

1.6 mTOR-Inhibitoren als Immunsuppressiva nach Organtransplantation

Seit den Anfängen der Transplantationschirurgie stellt die Abstoßungsreaktion eines der größten Probleme für die Transplantation von Organen dar. Nachdem zu Beginn der Transplantations-Ära noch häufig unspezifische Immunsuppressiva wie Azathioprin oder 6-Mercaptopurin als Monotherapie zur Behandlung von Abstoßungen eingesetzt wurden, sind in der Zwischenzeit eine Vielzahl von spezifischer wirkenden Alternativen mit potenterer Wirkung erhältlich. Die Einführung von Cyclosporin läutete schließlich 1978 ein neues Zeitalter in der Organtransplantation ein. (Calne, White et al. 1978). Cyclosporin stellt einen Calcineurin-Antagonisten dar, dessen Wirkung hauptsächlich über eine verminderte Interleukin-2-Synthese vermittelt wird. (Hardinger, Koch et al. 2004) Einige Studien zeigten eine effektive immunsuppressive Wirkung von Takrolimus (FK-506) nach Organtransplantation. (Kino, Hatanaka et al. 1987; Ochiai, Nagata et al. 1987; Starzl, Todo et al. 1989) Auch Takrolimus stellt einen Calcineurin-Antagonisten dar. (Hardinger, Koch et al. 2004)

Im Kontrast zu diesen anderen mit der Interleukin-2-Wirkung interferierenden Immunsuppressiva hemmt Sirolimus intrazellulär die Wirkung von IL-2 statt seine Synthese. (Hardinger, Koch et al. 2004)

Unter der Immunsuppressiven Therapie mit Rapamycin sind eine Reihe von Nebenwirkungen gehäuft zu beobachten, welche im Folgenden aufgeführt sind.

Eine Zytopenie aller Zellreihen wurde gehäuft beobachtet, die sich allerdings typischerweise nach Absetzen der Therapie zurückbildet. (Murgia, Jordan et al. 1996; Groth, Brattstrom et al. 1998; Augustine, Knauss et al. 2004)

Ebenfalls wurden Proteinurien, thrombotische Mikroangiopathien und Dyslipidämien unter Sirolimus gehäuft beobachtet. (Augustine, Bodziak et al. 2007)

Im Vergleich zu Calcineurin-Inhibitoren wird bei mTOR-Inhibitoren allerdings ein günstigeres Wirkungsprofil hinsichtlich der Entwicklung von Neoplasien und Hypertonie beobachtet. (Morath, Arns et al. 2007)

Neben den oben genannten Problemen besteht eine weitere unerwünschte Wirkung bei dem Einsatz von Rapamycin in der Interaktion mit anderen Pharmaka, die mittels des CYP 3A4-Enzemes metabolisiert werden. (Kahan 2004)

Nach Nierentransplantation wird Sirolimus derzeit vorwiegend zur Aufrechterhaltung einer bereits induzierten Immunsuppression genutzt, da eine Reihe von Nebenwirkungen den *de novo*-Einsatz unmittelbar nach Transplantation erschwert.

Mehrere Berichte erwähnen Wundheilungsstörungen und Störungen des Lymphgefäßhaushaltes unter *de novo*-Therapie als frühe postoperative Komplikationen. (Guilbeau 2002; Mathis 2003) Sowohl Fälle von Lymphozelen als auch von spontan entstehenden Lymphödemen, die nach Änderung der Immunsuppression stets komplett oder teilweise reversibel waren, sind bereits beschrieben worden. (Giessing, Fischer et al. 2002; Aboujaoude, Milgrom et al. 2004; Romagnoli, Citterio et al. 2005) Bei dem Einsatz unmittelbar nach Lungentransplantation sind lebensgefährliche Störungen der Wundheilung im Bereich der Anastomosen beobachtet worden. (Groetzner, Kur et al. 2004)

1.7 Fragestellung

Die Rolle der mTOR-Inhibition in der Angiogenese der Blutgefäße ist inzwischen anhand von Rapamycin gut belegt (Guba, von Breitenbuch et al. 2002; Guba, Koehl et al. 2005). Die Blockade von mTOR wirkt bei Endothelzellen und glatten Muskelzellen wie der Entzug von Wachstumsfaktoren und Aminosäuren und verhindert die Proliferation und induziert die Apoptose dieser Zellen.

Weiters ist unter der experimentellen Therapie mit Rapamycin im Tierversuch eine Reduktion der lymphogenen Metastasierung erzielt worden, die bei einem derzeit unbekanntem Mechanismus möglicherweise durch eine Hemmung der Lymphangiogenese über diesen Signaltransduktionsweg zustande gekommen ist. (Bruns, Koehl et al. 2004; Seeliger, Guba et al. 2004)

Auch weist der klinische Einsatz von Rapamycin eine Reihe von Nebenwirkungen auf, die durch eine Reduktion der Lymphangiogenese bedingt sein könnten. Berichtet wurde unter anderem von Lymphödemen, die nach Absetzen von Rapamycin zumindest teilweise refraktär waren. (Aboujaoude, Milgrom et al. 2004) Auch Lymphozelen sind in der Literatur bereits häufig mit der immunsuppressiven Therapie mit Sirolimus assoziiert worden. (Giessing, Fischer et al. 2002)

Gestützt auf diese Beobachtungen formulierten wir folgende Fragestellungen:

1. Ist die Stimulation der Proliferation und Migration von Lymphendothelzellen durch bereits als lymphangiogenetisch charakterisierte Wachstumsfaktoren durch die Behandlung mit mTOR-Inhibition hemmbar?
2. Sind die beobachteten Komplikationen nach Transplantation unter experimentellen Zuständen im Mausmodell tatsächlich in einen signifikanten Zusammenhang mit der Behandlung mit mTOR-Inhibitoren zu bringen?
3. Ist mTOR-Inhibition potentiell zur Hemmung der Lymphangiogenese in therapeutischen Dosierungen nutzbar?

2. Materialien und Methoden

2.1 Murines Skin-Flap-Modell

Um den Effekt von Rapamycin auf die Regeneration von Lymphgefäßen *in vivo* zu untersuchen, wurde ein murines Skin-Flap-Modell gewählt. Verwendet wurden Nacktmäuse vom Stamm NMRI nu/nu im Alter von 6-8 Wochen (Harlan Winkelmann, Borchon, Deutschland). Dieses Modell wurde bereits zur Untersuchung der Lymphangiogenese verwendet. (Saaristo, Tammela et al. 2004) Vor dem Eingriff erhielten die Mäuse eine Anästhesie aus Ketamin, Xylazin und Atropin mittels einer intraperitonealen Injektion. Die Schmerzwahrnehmung der Mäuse wurde mit einem kurzen Kneifen in die Pfoten mit einer Pinzette getestet. Erst bei fehlender Reaktion auf diesen Schmerzreiz wurde operiert.

Der Eingriff bestand im Setzen eines Hautschnittes, der einen im Durchmesser circa einen Zentimeter großen Kreis zu drei Vierteln beschreibt. Das kaudal gelegene Viertel wurde frei gelassen, um die Gefäße, welche den Lappen versorgen, zu schonen. Anschließend wurde die Haut innerhalb des Einschnittes von dem subkutanen Gewebe stumpf abpräpariert. Zuletzt wurde der Hautschnitt mit Maxon 4/0 Fäden in Einzelknopfnahnt verschlossen (4-6 Stiche pro Hautschnitt). Um die Drainage zu validieren, die unmittelbar nach dem Hautschnitt nicht über die Grenzen des Lappens erfolgen soll, erhielten einige der Mäuse 50 µl Patent Blau V (2.5%; Guerbet, Roissy, Frankreich) als intrakutane Injektion in das Zentrum der Haut des Flaps. Diese zeigte einen kompletten Verlust der Drainage über den Rand des Flaps. Die übrigen Tiere wurden randomisiert und so entweder einer Behandlung mit Rapamycin per os (5mg/kg/d, gelöst in Leitungswasser und über eine UV-geschützte Trinkwasserflasche gegeben) oder der Kontrollgruppe, die Leitungswasser erhielt, zugeteilt. Die Untersuchung der Vollblut-Talspiegel von Rapamycin nach vier Wochen zeigte, dass die Blutspiegel nach Behandlung in einem klinisch relevanten Bereich lagen (siehe **Tabelle 1**). Nach vier Wochen erfolgte die Auswertung des Versuchs. Hierbei wurden die Mäuse zunächst auf das Vorhandensein eines Lymphödems innerhalb des Flaps palpirt. Anschließend erfolgte die intrakutane Injektion von Patent-Blau wie oben beschrieben. Nach 15 Minuten wurden die unter

dem Mikroskop sichtbaren Lymphgefäße gezählt. Gefäße, die die Lappengrenze kreuzen, wurden als „kreuzende Gefäße“ eingestuft. Andere Gefäße, die nach kaudal und damit am Flap vorbei drainieren, wurden als „Kollateral-Gefäße“ eingestuft. Die Drainage erfolgt unter physiologischen Bedingungen nach kranial, weshalb diese Gefäße als Kollateralen, die sich kompensatorisch bei nicht funktionierendem Fluss der Lymphe in die physiologische Richtung der Drainage bilden, gewertet wurden. Die Drainage in die axillären Lymphknoten wurde nach 20 Minuten quantifiziert. Zusätzlich wurden die axillären Lymphknoten freipräpariert. Blau gefärbte Lymphknoten wurden als positive Lymphknoten gewertet.

Tabelle 1: Rapamycin Tal-Blutspiegel bei Mäusen mit oraler Rapamycin-Gabe

Orale Dosierung von Rapamycin (mg/kg/d)	Tal-Blutspiegel (ng/ml)
1.0	1.7 ± 0.3
2.0	2.7 ± 0.4
5.0	14.4 ± 3.7

2.2 Muriner Matrigel™ Plug-Assay

Um den Effekt von mTOR-Inhibition auf die Einsprossung von Lymphgefäßen in Gewebe zu untersuchen, wurde ein Matrigel Plug-Assay durchgeführt, wie in der Literatur bereits beschrieben. (Passaniti, Taylor et al. 1992) Die Einsprossung von Lymphgefäßen in den Matrigel-Plug allerdings wurde bisher noch nicht nachgewiesen. Für diesen Versuch wurden Balb-c Mäuse (Harlan Winkelmann, Borcheln) verwendet. Die Anästhesie war identisch mit der oben beschriebenen. Auch hier wurde die Schmerzwahrnehmung der Mäuse mit einem kurzen Kneifen in die Pfoten mit einer Pinzette getestet. Erst bei fehlender Reaktion auf diesen Schmerzreiz wurde operiert.

Zunächst wurde ein circa ein Zentimeter großes Areal um die linke Hüfte mit Einwegrasierern enthaart. Anschließend wurde ein kleines Hautstück mit einer Pinzette abgehoben und 500µl Matrigel™ subkutan in die inguinale Gegend injiziert. Das hier verwendete Matrigel™ (Becton Dickinson, Franklin Lanes, New Jersey, USA) wurde vor der Injektion mit 100 ng/ml VEGF-C (RnD Systems) versehen, um einen Migrationsreiz für Lymphgefäße zu setzen. Die Mäuse wurden in eine Rapamycin Therapie-Gruppe mit oraler Zufütterung (5mg/kg/d, gelöst in Leitungswasser) und eine Kontroll-Gruppe mit Leitungswasser randomisiert. Nach 21 Tagen wurden die Mäuse getötet, um die Implantate gewinnen zu können. Diese wurden nach der Entnahme in Paraffin eingebettet. Bei der Entnahme wurde mit großer Sorgfalt versucht, keine Strukturen innerhalb der Implantate zu verletzen und deshalb den Plug so wenig wie möglich zu berühren. Aus den eingebetteten Paraffin-Blöcken wurden 5 µm dicke Schnitte mit Hilfe eines elektronischen 2255 RM-Mikrotoms (Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt.

In den Schnitten wurden Lymphgefäße mittels Immunhistologie dargestellt. Als primärer Antikörper wurde ein Kaninchen-Antikörper gegen murines LYVE-1 (Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland) verwendet. Dieser Antikörper wurde weiter mit einem biotinylierten Ziegen-Antikörper gegen IgG aus dem Kaninchen (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) markiert. Mit dem primären Antikörper wurde über Nacht auf Raumtemperatur inkubiert, während der sekundäre Antikörper für eine Stunde auf 37 Grad Celsius verwendet wurde. Die verwendeten Verdünnungen betragen 1:100 beziehungsweise 1:500 in sterilem Wasser bzw. PBS. Die

Fluoreszenz-Markierung wurde mit Avidin Texas Red D (Vector Labs, Burlingame, USA) durchgeführt. Zum Eindeckeln und zur fluoreszierenden Gegenfärbung der Zellkerne wurde Vectashield-DAPI (Vector Labs) verwendet. Ausgewertet und fotografiert wurden die Schnitte unter einem Axiovert 40 Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), einer AxioCam MRm Kamera (Zeiss) und mittels der AxioVision 4.4 Software (Zeiss). Für die Quantifizierung der Lymphgefäßdichte wurden 10 zufällig ausgewählte Felder pro Schnitt gezählt. Repräsentative Fotos wurden mittels der oben beschriebenen Geräte und Software aufgenommen.

2.3 Induktion von intraperitonealen Lymphangiomen in der Maus

Um die *de novo*-Bildung von Lymphgefäßen unabhängig von einem chirurgischen Eingriff, wie er bei den oben beschriebenen Versuchen nötig ist, beobachten zu können, wurde die Induktion intraperitonealer Lymphangiome gewählt. Dieses Modell wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Mancardi, Stanta et al. 1999), allerdings noch nie zur Untersuchung einer Therapie mit Auswirkung auf das Lymphgefäßsystem.

Vor der Injektion von Freund's Adjuvanz (GIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) wurde dieses mit PBS (PAN, Aidenbach, Deutschland) 1:1 zu einer Emulsion vermischt.

Mittels der zweimaligen intraperitonealen Injektion von jeweils 200 µl der Emulsion aus Freund's Adjuvanz und PBS an den Tagen 0 und 14 wurden bei Mäusen lokale Lymphangiome innerhalb des Bauchfells induziert. Während die Tiere der Rapamycin-Gruppe ihr Medikament wie oben beschrieben ab dem Tag 3 vor der Injektion bis zur Beendigung des Versuches über das Trinkwasser erhielten, bekam die Kontrollgruppe Leitungswasser zu trinken. An Tag 28 wurden die Mäuse getötet. Da die Mäuse die stärkste Ausprägung der Lymphangiome zwischen der Leber und dem Zwerchfell zeigten, wurde die flächenmäßige Ausdehnung der Angiome auf Leber und Zwerchfell mittels einer Schiebelehre vermessen und dokumentiert. Die Ausdehnung konnte wegen der geringen durchschnittlichen Dicke der Raumforderungen nur zweidimensional dokumentiert werden. Alle Oberflächen von Lebern und Zwerchfellen wurden fotografiert. Anschließend wurden die Tumorfleichen an der Leberoberfläche und der abdominalen Zwerchfellseite mittels einer Schiebelehre vermessen und von allen Tumoren Proben für die histologische Analyse entnommen. Diese wurden nach der Entnahme in Formalin 10% fixiert und wie oben beschrieben in Paraffin eingebettet.

Die histologische Analyse wurde an einigen Stichproben durchgeführt, um den lymphendothelialen Phänotyp der Neubildungen zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden Paraffin-Schnitte in 5 µm Dicke angefertigt und anschließend nach unter 2.3 beschriebener Methodik auf den lymphendothelialen Marker LYVE-1 gefärbt.

Um ausschließen zu können, dass eine eventuelle Größenreduktion der Lymphangiome auf einem immunsuppressiven Effekt der Therapie basiert, wurde der

Versuch mit athymischen Nacktmäusen und einer Therapiegruppe mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A wiederholt. 8-10 Wochen alte NMRI nu/nu Mäuse (Janvier) mit angeborenem T-Zell-Defekt wurden in drei Gruppen randomisiert: Eine Gruppe bekam ab dem zweiten Tag vor der Injektion täglich Cyclosporin A subkutan injiziert, eine Gruppe wurde mit Rapamycin oral therapiert und die Kontrollgruppe bekam keine Therapie.

Zur Untersuchung eines möglichen Effektes von mTOR-Inhibition auf vorbestehende Lymphangiome wurde eine zusätzliche Gruppe mit Rapamycin-Therapie ab Tag 16 eingeführt und mit einer nicht therapierten Kontrolle nach 28 weiteren Tagen mittels der Vermessung der Lymphangiome verglichen.

Die Färbung mittels Hämalaun und Eosin zeigte blasige, der Leber aufsitzende, nicht-infiltrierende Läsionen. Um den lymphendothelialen Phänotyp dieser Läsionen zu bestimmen, wurde eine Immunhistochemie auf LYVE-1 (siehe oben) durchgeführt, welche eine deutliche Expression lymphendothelialer Marker bestätigte.

2.4 Zellkultur-Experimente

Um die direkten Auswirkungen der Blockade von mTOR auf Zellen untersuchen zu können, wurden eine Reihe von Zellkultur-Experimenten durchgeführt. Diese umfassen die Untersuchung der Proliferation, die Untersuchung der Migration sowie Enzym-spezifische Western-Blot-Analysen zur Untersuchung der intrazellulären Vorgänge nach mTOR-Blockade. Diese Zellkultur-Versuche werden im nachfolgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

Für alle Zellkultur-Experimente wurden Humane Dermale Mikrovasculäre Endothel-Zellen (HDMECs, Promocell, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Zellen stammten in diesem Fall von einer 30-jährigen Spenderin kaukasischer Abkunft. Nach Ankunft der Zellen im Labor wurden sie unmittelbar in Endothelial Cell Growth Medium MV (Promocell, siehe oben) in Kultur genommen. Verwendet wurden 15 ml Medium pro T-75 Flasche beziehungsweise 35 ml für eine T-175 Flasche. Als Kulturflaschen dienten NUNClon Flaschen (NUNC, Roskilde, Dänemark) in den oben erwähnten Größen. Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 75-80 % erreichten, wurden sie gesplittet in einem Verhältnis zwischen 1:4 bis 1:6. Hierzu wurde als primär das überschüssige Medium entfernt und die Zellen wurden für 30 Sekunden mit 5ml (T-75) bzw. 10 ml (T-175) PBS (PAN) gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und die Zellen mit 2,5ml bzw. 5 ml Trypsin für zwei bis drei Minuten auf 37 Grad Celsius inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von Endothelial Growth Medium MV in einem Verhältnis 3:1 beendet. Die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte die Fortsetzung der Zellkultur wie oben beschrieben. Die Kultur erreichte bis zu 5 Passagen, bevor die Zellen für Versuche verwendet wurden.

2.4.1 Isolation der LECs

Die LECs wurden über magnetisches Sortieren aus der Primären Zellkultur der HDMECs gewonnen. Für diesen Zweck wurden zunächst HDMECs abtrypsiniert wie oben beschrieben und anschließend zentrifugiert und in PBS (PAN) resuspendiert. Die Zellen wurden mittels einer Neubauer-Zählkammer (Assistent, Deutschland) und Trypan Blau (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) gezählt. Anschließend wurden die Zellen mit biotinyliertem Anti-VEGFR-3 Antikörper (RnD Systems) für 30

Minuten auf 4 Grad Celsius inkubiert. Verwendet wurde ein μg Antikörper pro Million eingesetzter HDMEC-Zellen. Nach einem weiteren Wasch-Vorgang in PBS wurden die Zellen für 20 Minuten mit 15 μl MACS anti-Biotin-Beads (magnetische Kleinpartikel, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die VEGFR-3-positiven Zellen mittels eines MidiMACS-Magneten mit MACS-MS Säulen gewonnen. Die MACS-Prozeduren wurden streng nach den Angaben des Herstellers ausgeführt, allerdings wurde statt des empfohlenen MACS-Puffers pures PBS verwendet. Um nach der Isolation die Reinheit der Zellen zu dokumentieren, wurde zusätzlich eine FACS-Analyse auf den LEC-Marker Podoplanin durchgeführt. Hier wurde ein muriner Primär-Antikörper gegen humanes Podoplanin (Acris, Hiddenhausen, Deutschland) angewendet und anschließend mit einem sekundären AK gegen murines IgG (Invitrogen) markiert. Die Reinheit der untersuchten Zellen betrug laut Durchfluss-Zytometrischer Analyse über 95%. Anschließend wurden die isolierten Lymphendothelzellen in NUNClon Flaschen der Größe T-75 weiter kultiviert. Die Flaschen wurden vor der Verwendung mit humanem Fibronectin (Sigma) beschichtet. Nach der Isolation wurde mit einem Selektionsmedium bestehend aus 2% fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin, Deutschland), 1% Gentamicin-Stammlösung (Gibco) sowie 100ng/ml VEGF-C (RnD Systems) verwendet. Die Zellen wurden ohne weitere Passagierung bei einer Konfluenz von circa 75% für die einzelnen Versuche verwendet.

2.4.2 Proliferations-Experimente

Der Einfluss von mTOR-Inhibition auf die Proliferation von Lymphendothelzellen wurde mittels der Inkorporation von BrDU untersucht. BrDU wird im Rahmen der Proliferation während der S-Phase bei der DNA-Synthese eingebaut und reichert sich somit in proliferierenden Zellen an. Verwendet wurde hier ein kompletter Analyse-Kit (BD Bioscience), bei dem BrDU mittels FITC-gelabeltem Antikörper fluoreszenzmarkiert wird und so in einer FACS-Analyse die Inkorporation gemessen werden kann.

Zunächst wurden HDMECs in 6-well NUNC-lon Platten (NUNC) ausplattiert und bis auf eine Konfluenz von circa 75% kultiviert. Eine Isolation von LECs wurde nicht

durchgeführt, da die LEC-Population innerhalb der HDMECs mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen LYVE-1 identifiziert wurde und so bei der FACS-Analyse separat betrachtet worden ist. Vor Beginn des Versuches wurde das Medium verworfen und die Zellen für eine Minute mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit BrDU in einer Konzentration von 10µM in Endothelzell-Medium für 2 Stunden gepulst. Alle Behandlungsgruppen erhielten einen Proliferationsstimulus in Form von 100ng/ml rekombinantes humanes VEGF-C (RnD Systems). Den Behandlungsgruppen wurden noch unterschiedliche Konzentrationen von Rapamycin (0,1 – 100 ng/ml) zugegeben. Als Medium diente ein Milliliter Endothelial Cell Basal Medium (PromoCell) pro well, zu welchem neben VEGF-C (siehe oben) nur 1% fetales Kälber-Serum (Biochrom) hinzugefügt wurde.

Nach zwei Stunden wurde die oben beschriebene Behandlung beendet und die HDMECs mit PBS gewaschen und wie oben beschrieben mit Trypsin abgelöst. Anschließend wurden LECs mit biotinyliertem murinem Antikörper gegen humanes LYVE-1 (RnD Systems) für 1 Stunde auf 37 Grad Celsius inkubiert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit Streptavidin PerCP (Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA). Nach der Markierung der LECs erfolgten den Instruktionen des Herstellers entsprechende Schritte zur Permeabilisierung und Fixierung der Zellen mit im Kit mitgelieferten Puffern, Schritte zur Freilegung der Epitope mittels mitgelieferter DNase und zuletzt die Markierung der Epitope mit FITC-konjugiertem Anti-BrDU Antikörper.

Ausgewertet wurde der Versuch mittels FACS-Analyse und Gegenfärbung von LYVE-1.

2.4.3 Untersuchung der Migration

Die Migration wurde anhand eines Invasions-Assays getestet, der die Transmigration der Zellen durch eine Schicht von Matrigel nötig macht. Zur Durchführung des Versuches wurden $2,5 \times 10^5$ isolierte LECs in 250 µl Endothelial Cell Basal Medium mit 2% Fetalem Kälber Serum resuspendiert und in den oberen Teil einer Matrigel-beschichteten modifizierten Boyden-Chamber (BioCoat® Invasion Assay, 8 µm Poren-Größe, Becton Dickinson Labware, Two Oak Park, Bedford, Massachusetts, USA) gegeben. Diese Kammern wurden in NUNClon 24-well Platten (NUNC) platziert, die jeweils 500 µl des oben beschriebenen Mediums enthielten, dem

zusätzlich 100 ng/ml VEGF-C und in der Behandlungsgruppe 20ng/ml Rapamycin zugesetzt wurde. Die Auswertung erfolgte nach 24 Stunden Inkubation bei 37 Grad Celsius. Zur Auswertung wurden die transmigrierten Zellen gesammelt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.4.4 Bestimmung der Phosphorylierung der P70S6 Kinase mittels Western Blot

Um einen Einfluss auf der Rapamycin-Behandlung auf die Phosphorylierung der nach mTOR geschalteten Kinasen zu zeigen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Untersucht wurde hier spezifisch die phosphorylierte Form der p70s6-Kinase an den Aminosäure Threonin,³⁸⁹ welche die für mTOR spezifische Phosphorylierungsstelle darstellt. (Aoki, Blazek et al. 2001) Um diesen Versuch durchzuführen, wurden zunächst HDMECs wie oben beschrieben kultiviert, mittels magnetischer Isolation LECs gewonnen und diese wie oben beschrieben kultiviert. Schließlich wurden diese wie oben beschrieben abtrypsiniert. Die Behandlung der Zellen fand auf mit Fibronectin beschichteten 6-Well NUNC-Ion-Platten (NUNC) statt. Zunächst wurden die isolierten Zellen für 16 Stunden auf ein Wachstumsfaktor- und Nährstoff-depletiertes „Hunger“-Medium gesetzt. Das Medium bestand aus Endothelial Cell Basal Medium (PromoCell) sowie 1% FCS. Anschließend wurden die Zellen gründlich für eine Minute unter leichtem Schwenken mit PBS (PAN) gewaschen. Schließlich erfolgte die Behandlung, hier wurden die Proben paarig angesetzt. Jeweils eine Probe erhielt zusätzlich zu dem oben beschriebenen depletierten Medium eine Stimulation mit entweder rekombinantem VEGF-A₁₆₅ (50 ng/ml; PromoCell), rekombinantem VEGF-C (200 ng/ml; R&D Systems; ein Agonist für sowohl VEGFR-2 and VEGFR-3), oder recombinant VEGF-C bei welchem die Aminosäure Cystin 156 durch eine Serin-Aminosäure (S156; VEGF-C*; RnD Systeems) ersetzt worden war. Diese Form des VEGF-C ist ein selektiver Agonist des VEGF-Rezeptors-3. (Joukov, Kumar et al. 1998; Veikkola, Jussila et al. 2001) Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen mittels Tris-Puffer lysiert. Die Degradation von Proteinen durch Proteasen wurde mittels der Zugabe von Protease-Inhibitor-Tabletten (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA) verhindert. Gleiche Mengen an Proteinextrakt wurden auf Polyacrylamid Natrium Dodecylsulfat-Gelen (8%) aufgetragen und getrennt. Schließlich fand die Untersuchung mittels eines phospho-spezifischen Anti-Thr³⁸⁹ Anteil der p70S6

Kinase Antikörpers aus dem Kaninchen (Cell Signaling Technology) statt. Die Bindung des primären Antikörpers wurde mittels des Einsatzes von Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Anti-Kaninchen Antikörpers aus der Ziege (sc-2004; Santa Cruz Biotechnology, St. Cruz, California) detektiert. Verwendet wurde hierzu ein Chemilumineszenz Western Blot-System (Amersham). Um die totale Proteinladung der einzelnen Bahnen vergleichen zu können, wurde außerdem als Kontrolle das Gesamt-Actin der Proben mittels eines primären Antikörpers gegen alle sechs Isoformen des Actins aus der Maus (ICN Pharmaceuticals Inc.-Cappel Product, Aurora, Ohio, USA) detektiert. Als sekundärer Antikörper diente hier ein Meerrettich-Peroxidase konjugierter Antikörper gegen murines IgG (Amersham)

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mittels SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Stichproben wurden mittels des unabhängigen t-Tests oder des Mann Whitney U Tests verglichen. Ergebnisse von $P < 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Rapamycin hemmt die lymphatische Regeneration nach chirurgischer Inzision

Die Kapazität der Regeneration der Lymphdrainage wurde in einem murinen Skin-Flap-Modell untersucht.

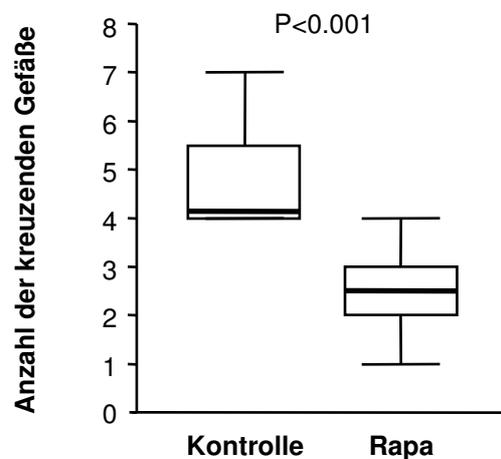
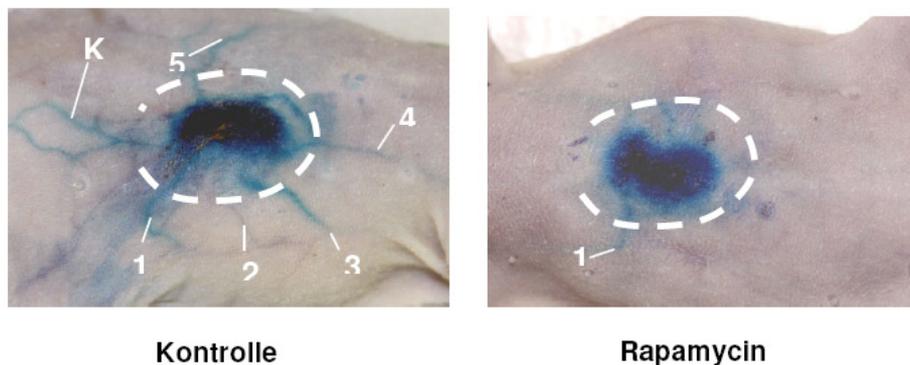


Abbildung 2a: Das Skin-Flap-Modell 28 Tage nach der chirurgischen Schnittsetzung; eine Lymphangiographie wurde mit Patent-Blau V durchgeführt. Dargestellt ist links ein Tier der Kontrollgruppe, während rechts ein Tier der Rapamycin-Behandlungsgruppe zu sehen ist. Die Gefäße, welche die Lappengrenzen kreuzen wurden nummeriert; das mit KG bezeichnete Gefäß ist ein Kollateralgefäß, das durch den nicht inzidierten Teil drainiert. Zur besseren Sichtbarkeit wurde der Flap weiß dargestellt. Abbildung 2b: Die kumulative Darstellung der kreuzenden Gefäße nach 28 Tagen wurde durch Lymphangiographie dargestellt.

Tabelle 2: Skin-Flap-Modell – Anzahl positiver Lymphknoten, Kollateral-Gefäße und Präsenz eines Lymphödems nach 28 Tagen Behandlung

	Kontrolle (K1,K2,K3,K4,K5,K6)	Rapamycin (5 mg/kg/d) (R1,R2,R3,R4,R5)	
Positive Sentinel Lymphknoten¹ (n)	2, 2, 2, 1, 1, 2	1, 0, 0, 1, 0	p<0,01
Kollateral-Gefäße (n)	1, 1, 3, 1, 2, 2	0,0,2,1,2	n.s.
Lymphödem²	–, –, +, –, +, –	+, +, +, +, +	p<0,05

¹ Blau gefärbter rechter und /oder linker Lymphknoten

² + Makroskopisch erkennbares Lymphödem

In diesem Modell hemmte Rapamycin die Regeneration der Drainage von Patent Blau über eine chirurgische Inzision; dies wird erkennbar an der reduzierten Anzahl positiver Sentinel-Lymphknoten (siehe **Tabelle 2**). Zwar war eine Drainage über die Grenze des Lappens in beiden Gruppen zu beobachten, jedoch zeigte sich in der Kontrollgruppe eine signifikant ($p<0,01$) höhere Anzahl der positiven Sentinel-Lymphknoten.

Ebenfalls in beiden Gruppen erkennbar war die Ausbildung kreuzender Gefäße nach Ende der Behandlungsphase. Die Behandlung mit Rapamycin über 28 Tage vermochte allerdings die Entstehung dieser Gefäße hochsignifikant ($p= 0,004$) zu hemmen (siehe Abbildung 3). Konsequenterweise bedeutete dies ein über 28 Tage persistierendes Lymphödem in allen Mäusen der Sirolimus-Gruppe. Die Kontroll-Gruppe dagegen zeigte nur bei 33% der Mäuse ein Lymphödem ($p<0,05$). Der Versuch wurde dreifach reproduziert.

3.2 Rapamycin hemmt die Einsprossung von Lymphgefäßen in vivo

Um die Auswirkung der mTOR-Inhibition auf die Einsprossung von Lymphgefäßen zu untersuchen, wurde ein Matrigel™-Plug Assay angewandt. Zwei Wochen nach der Implantation wurden die Lymphgefäße mittels Immunhistochemie visualisiert.

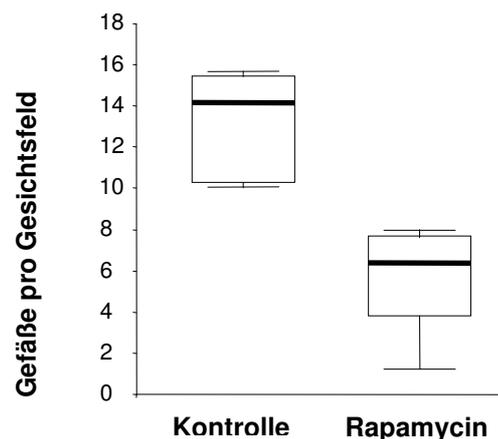
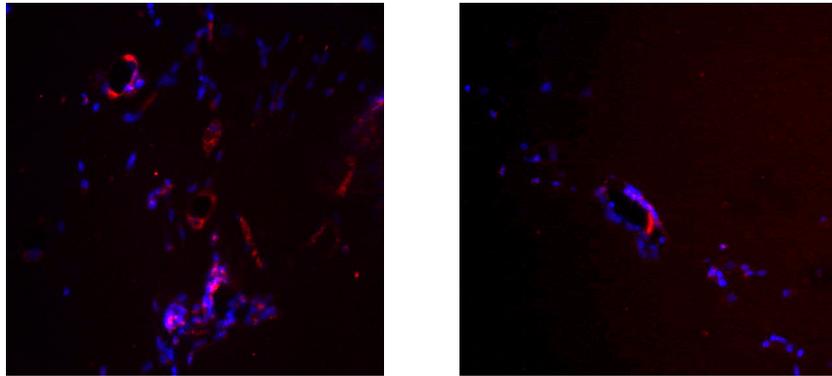


Abbildung 3a: Die Kontrollgruppe (links abgebildet) zeigt nach zwei Wochen eine deutliche Einsprossung von Lymphgefäßen, die hier durch Immunhistologie auf den Marker LYVE-1 als rote Gefäßstrukturen erkennbar sind. In der Behandlungsgruppe (rechtes Bild) zeigte sich eine deutliche Reduktion der Einsprossung. Zellkerne sind in beiden Bildern mittels DAPI blau gegengefärbt.

Abbildung 3b: Der Boxplot vergleicht die pro mikroskopischem Feld gezählte Anzahl LYVE-1-positiver Gefäße. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Gruppengrößen $n=5$ Tiere pro Gruppe. Signifikanzniveau $P=0,002$.

Wie die Abbildungen 5a und 5b zeigen, kam es innerhalb der zwei Wochen in beiden Gruppen zu einer Einsprossung von Lymphgefäßen in die injizierten Matrigel-Plugs. Die Therapie mit Rapamycin aber vermochte diese Einsprossung um circa die Hälfte zu halbieren ($p=0,002$). Dies wird durch Abbildung 5a bestätigt, welche in der Kontrollgruppe zahlreiche rot dargestellte LYVE-1 positive Lymphgefäße aufweist. Die repräsentative Aufnahme der Sirolimus-Therapiegruppe zeigt im Vergleich ein deutlich geringeres Eindringen von Lymphgefäßen.

3.3 Rapamycin hemmt die Proliferation von Lymphendothelzellen in vitro

Der Einfluss von Rapamycin auf die Proliferation von LECs wurde mittels der Inkorporation von Bromdesoxyuracil und der FACS-Analyse gemessen.

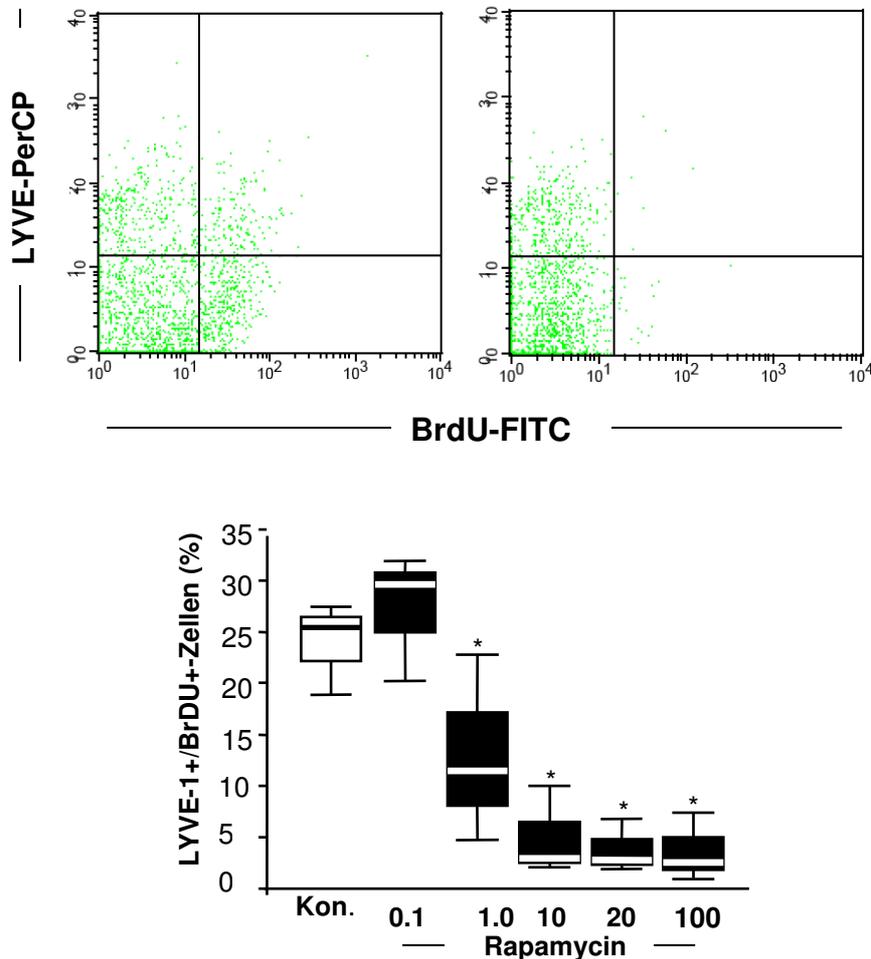


Abbildung 4a: Dargestellt ist ein Dot Plot von einem FACS auf BrDU (x-Achse) und den Lymphendothelialen Marker LYVE-1 (y-Achse). Die obere Hälfte (über dem Strich) bezeichnet die LYVE positiven LECs. Die rechte Hälfte bezeichnet BrDU inkorporierende, also proliferierende Zellen. Daher zeigt der obere rechte Quadrant die Population der proliferierenden LECs. Deutlich zu sehen ist der Unterschied zwischen der Kontrolle (links), die zahlreiche proliferierende LECs aufweist, und der nahezu nicht vorhandenen Population der Proliferierenden LECs unter Behandlung mit 10ng/ml Rapamycin.

Abbildung 4b zeigt einen Boxplot mit der kumulativen Analyse von n=3 Färbungen von HDMECs auf LYVE1 und BrDU.. Die x-Achse bezeichnet die Zahl doppelt positiver Zellen in Prozent, auf der y-Achse sind verschiedene Medium-Konzentrationen von Rapamycin dargestellt. Der Versuch wurde dreimal reproduziert.

Bereits die geringe Konzentration von 1 ng/ml Rapamycin im Medium reduziert die Proliferation von Lymphendothelien nach Stimulus mit 100 ng/ml drastisch, wie sich an der auf ca. 40% des Ausgangswertes reduzierten Inkorporation von BrDU zeigt. Diese sinkt bei höheren therapeutischen Konzentrationen (10-20 ng/ml) auf unter ein Fünftel der Kontroll-Zellen.

3.4 Rapamycin hemmt die Migration von isolierten Lymphendothelzellen in vitro

Ein modifizierter Boyden-Chamber-Versuch mit Transmigration durch eine Schicht von Matrigel™ sollte zeigen, ob die migratorische Kapazität von LECs stimuliert mit VEGF-C durch den Einsatz von Rapamycin beeinträchtigt wird.

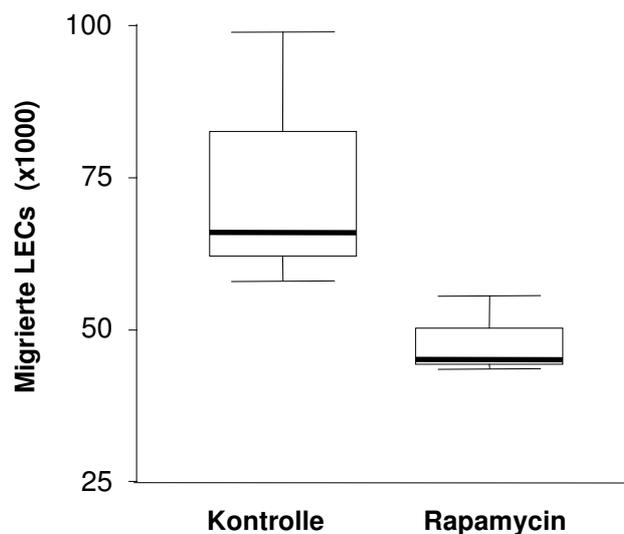


Abbildung 5: Dargestellt ist ein Boxplot, der die migratorische Kapazität von LECs in nach Stimulation mit 100ng/ml VEGF-C zeigt. Die Migration wird durch den Einsatz von 20ng/ml Rapamycin etwa um ein Drittel reduziert. Ausgewertet wurde die Migration nach 24 Stunden. Der Versuch wurde dreimal reproduziert. Signifikanzniveau $P < 0,05$.

In diesem Versuch kam es innerhalb der angesetzten Zeit von 24 Stunden in beiden Gruppen zur Migration von Zellen durch die Membran. Eine Behandlung mit Rapamycin vermochte die Migration isolierter LECs allerdings konstant um circa ein Drittel zu reduzieren. Der Versuch wurde dreimal wiederholt, um sicherzugehen, dass der Unterschied reproduzierbar ist.

3.5 Rapamycin hemmt die VEGF-induzierte Stimulation der p70s6-Kinase

Um die oben beobachteten Phänomene auf einer molekularen Basis erklären zu können, wurde ein Western-Blot durchgeführt, der spezifisch die phosphorylierte (also die aktive) Form der p70s6-Kinase detektiert. Es sei hier nochmals auf Kapitel 1.6 verwiesen, das die Funktion der p70s6-Kinase erläutert. Die verschiedenen verwendeten Wachstumsfaktoren sind Liganden an verschiedenen Rezeptoren. Während VEGF-C sowohl den VEGF-R 3 als auch den VEGF-2 bindet, ist VEGF-A ein selektiver Ligand für VEGFR-2 und VEGF-C* ein selektiver Ligand für den VEGF-Rezeptor 3.

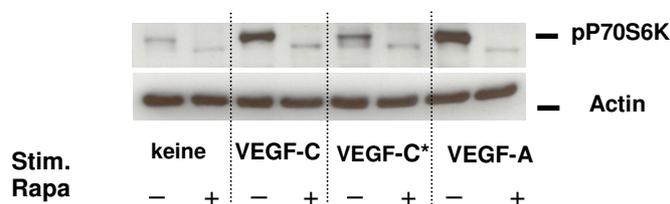


Abbildung 6: Gezeigt ist ein Western Blot, der die phosphorylierte Form der p70s6 Kinase detektiert. Die jeweils linke Bande erhielt nur den oben angegebenen Stimulus, die rechte auch zusätzlich eine Dosis von 20ng/ml Rapamycin. Die Phosphorylierung erscheint nach Zugabe von Rapamycin nahezu auf dem Niveau der nicht-stimulierten Proben zu sein. Die Versuche wurden dreimal reproduziert.

Der durchgeführte Western Blot (Abbildung 8) zeigt die phosphorylierte Form der p70s6-Kinase nach Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren der VEGF-Familie für eine Stunde mit und ohne Zugabe von Rapamycin. Durch die Stimulation konnte jeweils eine deutlich ausgeprägte Phosphorylierung der P70s6-Kinase erzielt werden. Diese Phosphorylierung ist am stärksten ausgeprägt nach Stimulation mit VEGF-A und am schwächsten nach Stimulation mit VEGF-C*. Dieser Effekt kann eventuell durch die unterschiedliche Wirkungsstärke der Faktoren erklärt werden, obwohl versucht wurde, diesen Effekt durch unterschiedliche Konzentrationen der Faktoren auszugleichen. Der Effekt aller eingesetzten Faktoren konnte durch die Behandlung mit Rapamycin beinahe auf das Niveau der nicht stimulierten Proben gesenkt werden. Da VEGF-A und VEGF-C Agonisten an

verschiedenen Rezeptoren (VEGFR-2 bzw. VEGFR-3) sind, kann hieraus geschlossen werden, dass sowohl VEGFR-2 als auch VEGFR-3 mediierte Proliferationsreize durch die Behandlung mit mTOR-Inhibition gehemmt werden können. Um sicherzugehen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt nicht um ein Artefakt handelt, wurde der Versuch dreimal mit jeweils separat isolierten LECs wiederholt.

3.6 Rapamycin hemmt die Entstehung von Lymphangiomen in einem Mausmodell

Um in einem zusätzlichen Modell sicherzugehen, dass die Hemmung der Lymphangiogenese von der allgemeinen Wundheilung unabhängig ist, wurde der Einfluss von mTOR-Inhibition auf die Ausbildung von Lymphangiomen in einem Nacktmausmodell untersucht. Dieses Modell wurde in der Literatur bereits beschrieben. (Mancardi, Stanta et al. 1999)

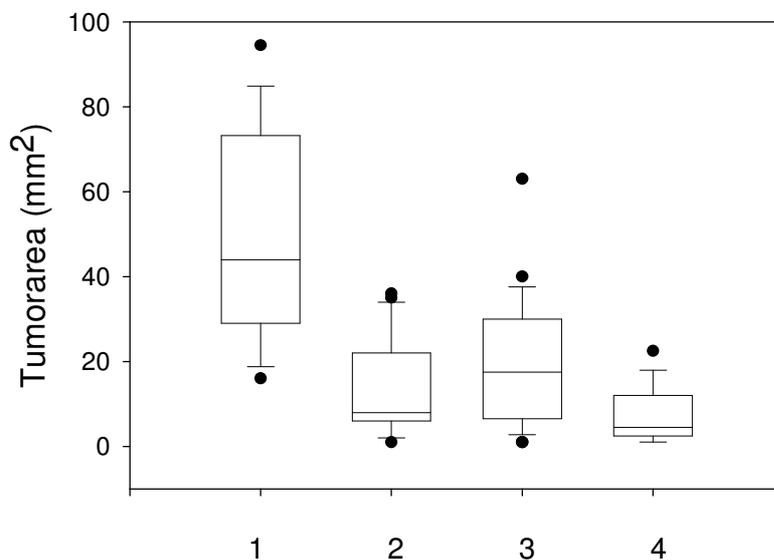
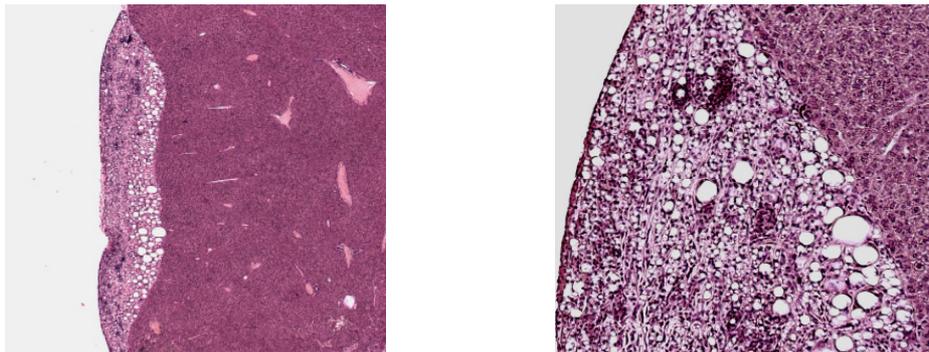


Abbildung 7a: Gezeigt sind HE-Färbungen eines Lymphangioms von der Leber einer Balb-c Maus.

In der Abbildung 7b ist die kumulative Analyse der Fläche der Lymphangiome an Zwerchfell und Leber dargestellt. Legende: 1 bezeichnet die Leber-Läsionen der Kontrollgruppe, 2 bezeichnet die Leber-Ausdehnung der Kontrollgruppe. 3 und 4 bezeichnen die Tumor-Ausdehnung an Diaphragma in Kontrolle (3) und Therapie-Gruppe (4). $n \geq 4$ Tiere pro Gruppe. Signifikanzniveaus zwischen (1) und (2) bzw. (3) und (4) jeweils $P < 0,001$.

Die kumulative Analyse zeigt, dass der Effekt der mTOR-Inhibition auf die Lymphangiogenese auch in einem Modell der neoplastischen Lymphangiogenese vorhanden ist. Sowohl an Leber wie auch am Zwerchfell ist dieser Effekt gleichbedeutend mit einer signifikanten Hemmung der Läsionsgröße ($p < 0.001$ für beide). Weiters ist dieser Effekt auch bei einer verzögert einsetzenden Therapie zu beobachten.

3.7 Rapamycin hemmt die Entstehung von Lymphangiomen in einem von der Immunsuppression unabhängigen Modell

Da mTOR-Inhibitoren eine immunsupprimierende Wirkung besitzen, wurden die oben aufgeführten Versuche in einem weiteren Modell repliziert. Durch den Einsatz einer Therapie-Gruppe mit Cyclosporin A, einem Calcineurin-Inhibitor wurde eine zusätzliche Gruppe als Kontrolle hinzugefügt. Weiters wurden die Versuche an NMRI nu/nu Mäusen wiederholt, die einen B- und T-Zell Defekt und damit eine angeborene Form der Immunsuppression besitzen.

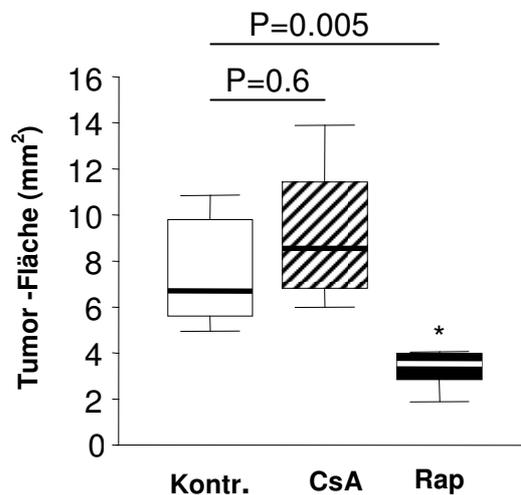


Abbildung 8: Gezeigt ist die gesamte flächenhafte Ausdehnung der Lymphangiome auf Zwerchfell und Leber. Die Therapie mit Cyclosporin führte zur Vergrößerung der Lymphangiome im Vergleich zur Kontrolle. Rapamycin (Rap.) dagegen bewirkte eine drastische Reduktion der Fläche im Vergleich zur Kontrollgruppe und der CyclosporinA-Therapie (CsA). Gruppengrößen von $n > \text{oder} = 4$ Tiere pro Gruppe.

Die oben gezeigten Daten lassen erkennen, dass der beschriebene inhibitorische Effekt auf das Wachstum von Lymphangiomen unabhängig von immunsuppressiven Wirkungen ist. Cyclosporin A ist als ein effizientes Immunsuppressivum derzeit häufig klinisch eingesetzt, zeigt aber keine Reduktion der Lymphangiom-Größe im Vergleich zur Kontrolle. Die orale Therapie mit Rapamycin dagegen vermag auch in Mäusen

mit angeborenem Immundefekt das Wachstum der Neubildungen deutlich unter das Kontrollniveau zu drücken.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung und kritische Bewertung der Experimente

4.1.1. Rapamycin hemmt lymphatische Regeneration nach chirurgischer Inzision

Zusammenfassend wurde in den Experimenten gezeigt, dass die Regeneration der lymphatischen Drainage über eine chirurgische Inzision durch die Therapie mit Rapamycin gehemmt wird. Dies konnte funktionell anhand der verlängerten Persistenz eines sekundären, operativ erzeugten Lymphödems und der geringeren Anzahl der Patent-Blau gefärbten Lymphknoten nach der intrakutanen Injektion gezeigt werden. Diese Beobachtung konnte an zwei voneinander unabhängigen Modellen, sowohl dem Skin-Flap Modell als auch dem Modell eines sekundären Lymphödems am Mausschwanz, konsistent gemacht werden. Die Präsenz eines Lymphödems konnte im Skin-Flap Modells nur durch Palpation bestimmt werden und damit nicht im zeitlichen Verlauf oder der Ausprägung. Daher wurde der zeitliche Verlauf dieses Phänomens im Mausschwanz-Modell dokumentiert.

Auch ist in diesem Modell eine Quantifizierung des Ödems mittels der genauen Vermessung an definierten Punkten möglich, sodass es im Gegensatz zur palpatorischen Bestimmung des Ödems im Skin-Flap-Modell nahezu keinen subjektiven Einflüssen unterworfen ist.

Der zeitliche Verlauf zeigt zunächst einen gleichartigen Verlauf der Ödem-Ausprägung zwischen behandelten Tieren und denen der Kontrolle. Dies ist insofern wichtig, als Rapamycin bereits oft mit unspezifischen Störungen der Wundheilung gerade in der frühen Phase der Wundheilung in Verbindung gebracht worden ist. Die Begründung für die beobachteten Differenzen wiederum konnte besser im Skin-Flap-Modell geliefert werden. Hier zeigt die Lymphangiographie nach der Injektion von Patent Blau einen deutlichen Unterschied in der Zahl der Gefäße, die nach der Behandlung die Schnittgrenze kreuzen. Rapamycin-Behandlung unterbindet nahezu komplett die Regeneration dieser Gefäße, sodass sich kaum Gefäße finden, die funktionell zur Drainage interstitieller Flüssigkeit beitragen können.

Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die Lymphödeme unter der Therapie mit Rapamycin durch eine Defizienz in der Lymphgefäß-Regeneration und Bildung zu erklären sind.

4.1.2. Rapamycin hemmt die Lymphgefäßeinsprossung *in vivo*

In einem Maus-Modell für Lymphgefäßeinsprossung konnte Rapamycin die Einsprossung von Lymphgefäßen drastisch reduzieren. Das Experiment umfasste die Einsprossung *in vivo* in einen Matrigel-Plug, welcher vorher mit VEGF-C zu einer Konzentration von 100ng/ml angereichert wurde. Histologisch waren signifikant weniger LYVE-1 positive Gefäßstrukturen pro analysiertem Feld nachweisbar unter Rapamycin-Therapie. Dieser Einsprossungsversuch erfasst neben der Proliferation von Zellen auch die Migration von Zellen *in vivo*. Beide Prozesse scheinen durch den Einsatz von Sirolimus *in vivo* gehemmt zu sein, ein Befund der mit den *in vivo* gewonnenen Daten, wo beide Vorgänge isoliert betrachtet als gehemmt befunden wurden. Die Einsprossung ist als die Summe dieser Vorgänge zu betrachten und ebenfalls gehemmt, sodass dies als eine mit anderen Versuchen im Rahmen dieses Projektes konsistente Beobachtung gewertet werden kann.

Nicht genau zu analysieren ist in diesem Experiment, welche Wachstumsfaktoren diese Einsprossung begründen. Zwar ist die Zugabe einer *in vitro* stark pro-lymphangiogenetisch wirksamen Menge VEGF-C erfolgt, doch ist Matrigel per se noch mit einer Reihe von anderen Wachstumsfaktoren versehen, die das Lymphgefäßwachstum in anderen Studien schon anzutreiben vermochten. Zu nennen sind hier bFGF, EGF, IGF, und PDGF-bb. Da allerdings trotz dieser Vielzahl von im Plug vorhandenen Stimulantien die Hemmung eindeutig vorhanden ist, kann die Aussage der Inhibition hierdurch eher verallgemeinert werden. Scheinbar wird auch die Gefäßproliferation über die vorrangig betrachtete VEGF-C- und VEGFR-3-Achse hinaus gehemmt, da auch die Präsenz der zahlreichen anderen Induktoren nicht die Wachstumshemmung aufzuheben vermag.

4.1.3. Die Neubildung lymphendothelialen Gewebes wird durch mTOR Blockade inhibiert

In einem Maus-Modell, in welchem durch die intraperitoneale Injektion von Freund's Adjuvanz Lymphangiome hervorgerufen werden, wurde der Umfang dieser gutartigen Wucherungen durch die Behandlung mit therapeutischen Dosen von Sirolimus signifikant reduziert. Dies bezieht sich auf die flächenmäßige Ausdehnung der Tumoren. Das Wachstum in die Dicke dieser Tumoren ist mit einfachen technischen Methoden nicht realisierbar, weswegen hier nur zweidimensionale Ausdehnungen erfasst wurden. So betrachtet aber wurde die kumulative Ausdehnung dieser Läsionen aber durch die Behandlung auf circa die Hälfte reduziert. Dies ist insofern wichtig, als die unter 4.1.1 aufgeführten Resultate sich nur auf die Regeneration chirurgischer Inzisionen beziehen und somit nur die Regeneration der Lymphgefäße im Rahmen allgemeiner Wundheilung beziehen. Dieses Modell aber liefert die Möglichkeit, das Wachstum lymphendothelialer Zellen ohne den eventuell verzerrenden Faktor der Wundheilung darzustellen. Daraus kann gefolgert werden, dass auch ohne eine allgemeine Hemmung der Wundheilung, die in diesem Modell nicht beteiligt ist, die Inhibition von mTOR auf die Proliferation von lymphendothelialen Zellen in vivo einen hemmenden Effekt ausübt. Allerdings sind die überproliferierenden Zellen in diesem Modell bisher nur zu einem geringen Maße molekular charakterisiert worden. (Mancardi, Stanta et al. 1999) Ihre Charakterisierung in dieser Studie, wie auch unsere Analyse auf typische Marker des Lymphendothels lassen zwar einen typischen Phänotyp für dieses erkennen, doch stellt sich trotzdem die Frage, inwieweit ihre Eigenschaften denen normaler LECs entsprechen. Daher ist die Frage berechtigt, inwieweit die Ergebnisse, die hier gewonnen wurden, auf nicht wuchernde LECs übertragbar sind, durchaus berechtigt. Doch eine Reduktion der erkennbaren Tumorgroße und damit auch des Wachstums auf die Hälfte ist durchaus vergleichbar mit den in vitro und in vivo an nicht Tumoren entstammenden Zellen beobachteten Ergebnissen.

4.1.4. Rapamycin hemmt die Proliferation von Lymphendothelzellen mittels der Inhibition der mTOR-Phosphorylierung

In Proliferationsversuchen konnte deutlich eine Inhibition der Inkorporation von BrDU mittels Behandlung mit Rapamycin gezeigt werden. Diese Inhibition um etwa das 10fache bedeutet eine nahezu vollständige Hemmung der Proliferation trotz eines potenten Stimulus. Diese Hemmung ist bei therapeutisch eingesetzten Dosierungen nahezu nicht schwächer als bei der verwendeten Maximaldosis von 100ng/ml, die in vivo aufgrund der starken Toxizität in diesem Dosisbereich nicht angewendet werden kann. Aufgrund dieser Beobachtungen kann von einem vergleichbaren Effekt der Medikation, also nahezu der vollständigen Hemmung von Lymphendothelzellproliferation, in der Klinik ausgegangen werden. Die Hemmung der Inkorporation von BrDU tritt bereits bei einer Dosierung von 1ng/ml ein. Die Hemmung der Proliferation kann mechanistisch erklärt werden mit der inhibierten Phosphorylierung der P70s6-Kinase. Signalübertragung über den IP-3 Kinase-Weg erreicht über die p70s6-Kinase den Zellkern. Die meisten Wachstumsfaktoren, die als Stimulantien der Lymphangiogenese gelten, übertragen ihre Signale zumindest teilweise über IP-3-Kinase assoziierte Wege. (Loughna and Sato 2001; Cao, Brakenhielm et al. 2002)

Dies ist auch von den Wachstumsfaktoren der VEGF-Familie bekannt. Sie führen bei isolierten LECs zur Aktivierung des IP-3-Kinase Weges. (Makinen, Veikkola et al. 2001) Manche Missense-Mutationen des VEGFR-3, bei welchen das Tyrosin-Kinase-Signal durch veränderte Funktion nicht mehr erfolgen kann, sind assoziiert mit hereditären (primären) Formen des Lymphödems, wie zum Beispiel das Milroy-Syndrom. (Karkkainen, Ferrell et al. 2000) Analog dazu wurde entdeckt, dass die Sekretion einer löslichen Variante des Rezeptors, welcher die Faktoren VEGF-C und VEGF-D im Serum bindet und damit inaktiviert, in transgenen Mäusen zur Inhibition der Lymphangiogenese und somit zur Ausbildung von Lymphödem führt. (Makinen, Jussila et al. 2001)

In der für die phosphorylierte p70s6-Kinase spezifischen Western-Blot-Analyse ist es gelungen zu zeigen, dass diese sowohl durch VEGFR-2 (nach Stimulation mit VEGF-A) als auch durch VEGFR-3-selektive Signalisierung phosphoryliert wird. Interessant ist, dass die Stimulation ausschließlich über den VEGFR-2-

Weg eine wesentlich ausgeprägtere Bande aufwies als die der selektiven VEGFR-3-Aktivierung. Zumindest kann aus diesen Beobachtungen geschlossen werden, dass sowohl über VEGFR-2 als auch über VEGFR-3 übertragene Signale in der Lymphangiogenese eine Rolle spielen. Die Banden, die sich sowohl nach den oben genannten selektiven Stimulationen als auch nach der Aktivierung mittels unverändertem VEGF-C (das an beiden Rezeptoren aktiv ist) ließen auf eine Phosphorylierung deutlich über dem Kontroll-Niveau schließen. Die Behandlung mit mTOR-Inhibitoren aber vermochte diese in allen Gruppen wiederum nahezu auf das nicht stimulierte Niveau der Kontroll-Gruppe zu drücken. Somit konnte der Effekt der Aktivierung beider Rezeptoren durch mTOR-Inhibition beinahe komplett suprimiert werden. Damit können die oben geschilderten Ergebnisse der *in vivo*-Modelle zum einen erklärt werden.

Zum anderen ist aus zahlreichen *in vivo*-Modellen bekannt, dass ein Ausfall der VEGFR-3 Signalisierung ein Lymphödem und reduzierte Lymphangiogenese zur Folge hat. (Irrthum, Karkkainen et al. 2000; Karkkainen, Ferrell et al. 2000) In diesem Modell können wir zeigen, dass die Behandlung mit mTOR-Inhibition die Phosphorylierung der p70s6-Kinase drastisch reduziert. Somit wird ein zumindest teilweiser, funktioneller Ausfall der VEGFR-3-Aktivierung erreicht. Dieser Befund kann dazu dienen, die Ausbildung und Persistenz der Ödeme in den *in vivo*-Modellen zu erklären. Analog liegt hier durch die Blockade von mTOR ein funktioneller Verlust der VEGFR-3 Signalisierung vor, auf den auch hier konsistent mit den Beobachtungen bei Knockout-Mäusen die verlängerte Persistenz eines Lymphödems folgt. Um diese Beobachtung noch genauer zu erklären, kann der Proliferationsversuch herangezogen werden, der bei den *in vivo* vorliegenden Konzentrationen eine etwa zehnfache Inhibition der DNA-Synthese (gemessen durch Inkorporation von BrDU) und somit etwa zehnfache Inhibition der Proliferation zeigt. Der Stimulus für die Proliferation wurde durch VEGF-C gesetzt, das wie oben beschrieben VEGFR-2 und VEGFR-3 Aktivierung zur Folge hat. Da die Phosphorylierung der p70s6-Kinase sowohl nach VEGFR-2 als auch VEGFR-3 Stimulation durch mTOR-Inhibition inhibierbar ist, kann ein partieller Wegfall der Aktion dieser Rezeptoren und damit der Proliferation von LECs als der Grund für die deutlich verzögerte Lymphgefäßregeneration und Einsprossung

angenommen werden. Die oben getroffenen Aussagen aber bleiben auf das VEGFR 2/3 System beschränkt.

Andere Induktoren sind durch dieses Experiment nicht erfasst und wurden so zumindest molekular nicht akkurat untersucht. Zwar ist vor allem durch das Matrigel-Experiment, bei welchem eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren in dem Matrigel zu finden ist, zu vermuten, dass auch sie in ihrer Wirkung zumindest beeinträchtigt werden, dies ist aber nicht durch Experimente mit isolierter Betrachtung einzelner Wirkungen belegt.

Weiters ist die Beobachtung wichtig, dass sowohl Sirolimus als auch der neue mTOR-Inhibitor RAD-001 in der Western-Blot-Analyse das Phosphorylierungsniveau deutlich unter das der unbehandelten Kontrolle zu senken vermögen. Damit scheint hier von einem Effekt der gesamten Wirkstoffklasse auszugehen und nicht von einer Wirkung, die nur Rapamycin vermittelt.

4.2 Bedeutung der Ergebnisse

4.2.1 Bedeutung der Ergebnisse für die Transplantationsmedizin

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sind von Bedeutung für die Transplantationsmedizin, da mTOR-Inhibitoren zunehmend als primäre Medikation nach der Transplantation von soliden Organen an Bedeutung gewinnen. Dafür ist hauptsächlich die massive Auswirkung der Calcineurininhibitoren auf die Nierenfunktion verantwortlich. In der Nierentransplantation haben Medikamente wie Sirolimus (Rapamune) oder Everolimus (Certican) bereits einen hohen Stellenwert. Im Vergleich zu den bisher bevorzugten Calcineurininhibitoren weisen sie geringere Abstoßungsepisoden und bessere Nierenfunktionswerte auf, allerdings bei einer höheren Neigung zu gewissen Komplikationen wie Störungen des Lipidhaushalts oder Knochenmarksdepletion. Dies ist durch Metaanalysen mehrerer randomisierter Studien belegt, doch liegen die Ergebnisse großer randomisierter Studien noch nicht vor. (Lee and Chapman 2005; Webster, Lee et al. 2006) Auch in der Herztransplantation gewinnen Sirolimus und Certican klinisch stets an Bedeutung. Auch hier ist die Datenlage noch nicht ausreichend, um eine vollständige Entscheidung zu rechtfertigen, doch Zwischenergebnisse derzeit laufender Studien lassen auch hier auf eine gute Wirksamkeit schließen, bei gleichen Vor- und Nachteilen wie in der Nierentransplantation. (Eisen, Kobashigawa et al. 2005) Durch die wachsende Erfahrung mit mTOR-Inhibitoren in der Nierentransplantation werden allerdings auch zahlreiche unerwünschte Wirkungen bekannt. Einige von ihnen lassen in der Tat die Spekulation zu, dass sie durch eine Beeinträchtigung der Lymphangiogenese zustande kommen, vor allem Lymphozelen und Lymphödeme sind hier als häufige Komplikationen zu nennen. (Giessing, Fischer et al. 2002; Aboujaoude, Milgrom et al. 2004; Romagnoli, Citterio et al. 2005) Bemerkenswerterweise besserten sich die meisten dieser unerwünschten Wirkungen nach Absetzen von Sirolimus wieder. Im Tiermodell konnten spontane Lymphödeme durch die Blockade der VEGF-C/VEGFR 3 Achse erzeugt werden. Die Blockade von freiem VEGF-C durch die Sekretion von löslichem VEGFR 3 resultierte in einem Lymphödem-ähnlichen Phänotyp mit Schwellung der Beine und des Schwanzes. (Makinen, Jussila et al. 2001) Die oben genannte Western-Blot-Analyse weist einen zumindest teilweisen

Wegfall des Signals über den VEGFR-3 nach. Dies stellt einen weiteren Anhaltspunkt dafür dar, dass ein funktioneller Wegfall der VEGF-C Signalisierung durch mTOR-Blockade die Lymphangiogenese hemmt und so bei Patienten Lymphödeme hervorruft. Auch die oben aufgeführten Tierexperimente zeigen nach mTOR-Inhibition zumindest die deutlich verlängerte Persistenz von Lymphödemem und sind somit übereinstimmend mit diesen Resultaten.

Neben den Lymphödemem waren auch Hautveränderungen mit Fibrose und ödematösen Erscheinungen beobachtete Auswirkungen der VEGFR 3 Blockade. (Makinen, Jussila et al. 2001) Auch Transplantationspatienten, die mit Sirolimus therapiert werden, leiden unter häufigen Komplikationen an der Haut. Über die Hälfte der Patienten einer Studie, die sich mit Hautbeteiligungen unter Sirolimus-Therapie beschäftigte, litten unter ödemartigen Hautverdickungen. (Mahe, Morelon et al. 2005) Auch diese Phänomene könnten durch einen Wegfall der VEGF-C Signale in der Haut der Patienten zu erklären sein, analog der Entstehung der Extremitäten-Lymphödeme. Bedenkt man, dass in dieser Studie 25% der Patienten wegen Hautkomplikationen von Rapamycin auf ein anderes Immunsuppressivum umstiegen, ist die Bedeutung solcher Nebeneffekte klar zu erkennen.

Kaposi-Sarkome stellen sowohl bei HIV-Patienten wie auch bei aus therapeutischen Gründen immunsuprimierten Patienten eine bedrohliche Komplikation dar. Diese maligne Entartung wird gemeinhin mit der Infektion mit Humanem Herpes-Virus 8 (HHV-8) in Verbindung gebracht, die entweder bereits vor Transplantation vorliegt oder über das Transplantat erfolgt. In den ersten 2 Jahren nach dem Eingriff liegt das Risiko bei 12,5 pro 100.000 Patientenjahren. (Mbulaiteye and Engels 2006) Bei Kaposi-Sarkomen wurde ein Phänotyp nachgewiesen, der dem einer Lymphendothelzelle stark ähnelt. Bei den Tumoren kommt es in situ zur Expression von Markern wie VEGFR 3 und Podoplanin. (Weninger, Partanen et al. 1999) Wurden organtransplantierte Kaposi-Patienten auf ein Sirolimus-basiertes Therapieregime umgestellt, so kam es innerhalb von drei Monaten zur kompletten Remission der Läsionen. (Stallone, Schena et al. 2005) Hierin findet sich ein weiterer Hinweis auf eine proliferationshemmende Wirkung von mTOR-Inhibition auf Zellen mit lymphendothelialelem Phänotyp und steht so im Einklang mit den oben beschriebenen Beobachtungen. Die oben aufgeführten Experimente zeigen deutlich eine Wachstumshemmung auf Zellen mit ähnlicher molekularer Charakteristik. In Zusammenhang mit den vorliegenden klinischen Daten untermauert dies die Vorzüge

eines immunsuppressiven Regimes mit Sirolimus bei Vorliegen eines Kaposi-Sarkoms unter der Therapie.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierexperimente zeigen die starke Wirkung insbesondere auf die regenerative Bildung von Lymphgefäßen nach chirurgischen Eingriffen. Der *de novo*-Einsatz direkt nach der Transplantation ist wegen der länger bekannten Wundheilungsstörungen bereits nicht mehr üblich. (Mathis 2003; Groetzner, Kur et al. 2004) Der frühe Umstieg auf Sirolimus oder Certican aber wird derzeit in zahlreichen Studien mit Protokollen zur zeitnahen Konversion nach Transplantation erprobt. Die vollständige Wiederausbildung des Lymphflusses ist mit der makroskopisch sichtbaren Wundheilung zumindest unter der Therapie mit diesen Substanzen noch nicht abgeschlossen, wie oben gezeigt wird. Eine spätere Konversion erscheint aber angemessen, da sonst Komplikationen wie die Ausbildung von Lymphödemen oder Lymphozelen drohen.

Eine neue Studie an Biopsien von Nierentransplantaten zeigt eine positive Korrelation der Lymphgefäßdichte mit der Nierenfunktion. (Stuht, Gwinner et al. 2007) Eine niedrige Lymphgefäßdichte im Kortex des Transplantates war in dieser Studie der wichtigste Risikofaktor für eine drastische Verschlechterung der Funktion der Transplantatniere. Als mögliche Begründungen werden ein schneller Abtransport aggressiver Immunzellen aus dem Transplantat oder die häufige Anwesenheit möglicherweise immunregulatorisch wirksamer Lymphozyten in diesen lymphatischen Gefäßneubildungen diskutiert. Dies steht zunächst in einem Widerspruch der Charakterisierung von Rapamycin als anti-lymphangiogenetische Substanz, da gerade Rapamycin mit einer guten Nierenfunktion nach Transplantation assoziiert ist. Diesem Mechanismus scheinen allerdings andere gegenüberzustehen, die Rapamycin unter dem Strich als förderlich für die Transplantatfunktion erscheinen lassen.

4.2.1 Bedeutung der Ergebnisse für die Onkologie

Die Tumor-Lymphangiogenese und lymphogene Metastasierung stellen bei einer Reihe von malignen Erkrankungen, wie dem Kolon-Karzinom oder dem papillären Schilddrüsenkarzinom wichtige prognostische Faktoren dar. (Hall, Freeman et al. 2003; Onogawa, Kitadai et al. 2004) Nicht zuletzt wegen dieser Beobachtungen rückte die Tumor-Lymphangiogenese in den Blickpunkt der onkologischen Grundlagenforschung. Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht wurden, was das Verständnis der molekularen Vorgänge der Lymphangiogenese angeht, so bleiben noch immer zahlreiche wichtige Fragen unbeantwortet. (Cao 2005)

Am besten ist in der Tumor-Lymphangiogenese derzeit die Rolle von VEGF-C und der VEGF-Rezeptoren 2 und 3 charakterisiert. Die Überexpression von VEGF-C resultiert im Tiermodell direkt in einer stärkeren Bildung von Lymphgefäßen in und um den Tumor, was wiederum in einer gesteigerten lymphogenen Metastasierung resultiert. (Mandriota, Jussila et al. 2001) Diese VEGF-C induzierte Lymphangiogenese ist allerdings wiederum durch die Sekretion von löslichem VEGFR-3 in der Maus wieder reversibel. (He, Kozaki et al. 2002) Eine weitere wichtige Rolle für VEGF-C ergab sich im Tierversuch aus der Tatsache, dass VEGF-C aus Tumorzellen die Endothelzellen der umgebenden Lymphgefäße anregt, Protrusionen zu bilden, in die Tumorzellen beim Metastasierungsprozess anschließend eintreten. (He, Rajantie et al. 2005) Damit kann erklärt werden, dass die Expression von VEGF-C bei manchen Tumoren wie dem Mamma-Karzinom die Prognose verschlechtert, die intra- und peritumorale Lymphgefäßdichte aber keinen Einfluss auf die Prognose hat. (Kinoshita, Kitamura et al. 2001; Schoppmann, Bayer et al. 2004)

Trotz der derzeit erkannten Bedeutung von VEGF-C sind noch keine intrazellulären Inhibitoren seiner Signalkaskade bekannt. Die derzeit besten verfügbaren Methoden sind die Überexpression von löslichem VEGFR-3, um das zirkulierende VEGF-C zu neutralisieren, sowie anti-VEGFR-3 Antikörper. Damit ist hier erstmals die Inhibition der VEGFR-3-Kaskade mittels intrazellulärer Hemmung der Signaltransduktion gezeigt worden. Auch sind einige mTOR-Inhibitoren bereits klinisch zugelassen. Die oben erwähnten Inhibitionsmöglichkeiten sind häufig mit gentechnologischer Veränderung verbunden. Da die therapeutische Insertion von Genen in somatische

Zellen des Menschen mit einem Risiko der malignen Entartung verbunden ist, steht ein klinischer Einsatz vorerst nicht zur Debatte und eine klinische Zulassung dieser Substanzen ist auf absehbare Zeit nicht in Sicht. (Pike-Overzet, van der Burg et al. 2007) Sollte in dieser Zeit eine therapeutische Modulation der Lymphangiogenese als sinnvoll für den klinischen Alltag erscheinen, steht nach diesen Experimenten mit Rapamycin eine Substanz zur Verfügung, bei der bereits einige Jahre Erfahrung im Einsatz an Patienten vorliegen.

4.3 Ausblick

Die Auswirkungen des Wegfalls der VEGF-C-Signale auf die lymphogene Metastasierung sind im Tiermodell bereits bekannt. Dort konnte durch die zumindest teilweise Neutralisation von VEGF-C die Frequenz der Streuung in die lokoregionären Lymphknoten signifikant inhibiert werden. (He, Kozaki et al. 2002) Die Therapie mit Rapamycin verspricht eine massive Reduktion der Wirkung von VEGF-C sowohl in Zellkultur- als auch in Tierexperimenten.

Die positiven Auswirkungen von Rapamycin-Langzeittherapie auf die Tumorprogression über die Hemmung der Angiogenese sind am Mausmodell hinreichend bekannt. (Guba, von Breitenbuch et al. 2002) Auch sind die Tumorinzidenzen nach Transplantation unter Sirolimus-basierten Therapieregimes deutlich niedriger. (Kahan, Yakupoglu et al. 2005; Yakupoglu, Buell et al. 2006) Derzeit befinden sich mTOR-Inhibitoren in klinischen Phase I und II Studien für eine Reihe von soliden Tumoren. Auch lymphogen metastasierende Tumoren wie das Mamma-Karzinom werden derzeit erprobt. (Faivre, Kroemer et al. 2006) Diese Studien allerdings verfolgen einen anderen Therapieansatz und setzen auf die kurzfristige zytostatische Therapie, verglichen mit der länger dauernden niedrig dosierten Therapie, die sich gegen die Tumor-Angiogenese richtet. Die anti-lymphogene Wirkung der mTOR-Inhibitoren in der anti-angiogenetischen Dosierung auf diese Tumoren allerdings stellt einen zusätzlichen Grund dar, diese Therapieformen zumindest im Kleintiermodell zu vergleichen. Nach Veröffentlichung dieser Arbeit wurden derartige Versuche in der Maus unter Rapamycin-Therapie durchgeführt und konnten in der Tat einen hemmenden Effekt der Therapie auf die lymphogene Metastasierung zeigen. (Kobayashi, Kishimoto et al. 2007) Ob diese Wirkung aber auch in Szenarien besteht, die häufige klinische Situationen abbilden, wie beispielsweise der adjuvante Einsatz nach Resektion, ist bisher nicht ausreichend geklärt und sollte experimentell beantwortet werden.

Eine hohe Lymphgefäßdichte in den Nierenrinden von Biopsien von Transplantatempfängern wirkt sich positiv auf die Funktion der transplantierten Niere aus. (Stuht, Gwinner et al. 2007) Rapamycin aber ist als ein Immunsuppressivum mit einem vergleichsweise wünschenswerten Profil in Hinblick auf die Funktion transplanteder Organe bekannt. (Lee and Chapman 2005) Da die oben aufgeführten Ergebnisse eine anti-lymphangiogenetische Wirkung von mTOR

Immunsuppression in der Maus zeigen, stehen diese Beobachtungen zunächst in einem Widerspruch. Weitere Experimente sollten die Rolle und Bedeutung von Lymphgefäßen in der immunologischen Reaktion auf Transplantat-Nieren identifizieren und einen möglichen Einfluss von mTOR-Immunsuppression auf die Einsprossung dieser Lymphgefäße identifizieren.

5.Zusammenfassung

mTOR-Inhibitoren wie Sirolimus oder Everolimus werden gegenwärtig in der Transplantationsmedizin als Immunsuppressiva eingesetzt. Aufgrund der antiproliferativen und antiangiogenetischen Wirkung dieser Substanzklasse wird gegenwärtig auch ein klinischer Einsatz in der Onkologie geprüft. Unglücklicherweise kann aber eine mTOR-Inhibitor-basierte Therapie in der frühen postoperativen Phase zu Wundheilungsstörungen, der Ausbildung von Lymphozelen und zu Lymphödemen führen. Da die genannten Probleme sich in Zusammenhang mit einer gestörten Lymphgefäßregeneration bringen lassen, war es Ziel dieses experimentellen Ansatzes, den Einfluss des mTOR-Inhibitors Sirolimus auf die Lymphangiogenese zu untersuchen.

Der Einfluss von Sirolimus auf die Lymphgefäßregeneration wurde nach chirurgischer Durchtrennung der Lymphgefäße in einem Skin-Flap-Modell in der Maus untersucht.

In diesem Modell führte die Rapamycin-Therapie nach chirurgischer Durchtrennung der Lymphgefäße zu einer signifikanten Reduktion der Lymphdrainage. Nach 4 Wochen zeigten SRL-behandelte Tiere in der Lymphangiographie deutlich weniger die Lappengrenze überbrückende Lymphgefäße als Kontrolltiere. Weiters war bei behandelten Tieren darüber hinaus ein deutlich reduzierter Lymphabfluss in die axillären Lymphknoten zu beobachten. Auch Modelle, die von der chirurgischen Durchtrennung unabhängig sind, wie die Einsprossung der Lymphgefäße in einen Matrigel-Plug oder die Hemmung der intraperitonealen Lymphangiom-Ausbildung belegten durchweg einen inhibitorischen Effekt von mTOR-Blockade auf die Lymphangiogenese.

Passend zu diesen *in vivo*-Befunden führte Sirolimus *in vitro* bereits ab einer Konzentration von 1 ng/ml zu einer signifikanten Reduktion der VEGF-C-stimulierten Proliferation von Lymphendothelzellen, die bei hohen noch therapeutisch nutzbaren Konzentrationen am ausgeprägtesten ist. Auch eine Hemmung der migratorischen Kapazität von Lymphendothelzellen durch mTOR-Therapie konnte gezeigt werden.

Die Phosphorylierung der nach mTOR nachgeschalteten p70s6-Kinase wurde durch den Einsatz von mTOR-Blockade massiv reduziert, wodurch die oben beschriebenen Beobachtungen auf einer molekularen Ebene erklärt werden können.

Die hier erstmalig gezeigte anti-lymphangiogenetische Wirkung der mTOR-Inhibition bietet eine mechanistische Erklärung für Wundheilungsstörungen, Lymphozellen-Bildung und Lymphödeme, die unter einer früh postoperativ einsetzenden Therapie gehäuft beobachtet werden. Aus der Entdeckung des zugrunde liegenden Mechanismus zahlreicher Komplikationen ergibt sich die Rationale für einen Einsatz von mTOR-Inhibition erst nach der vollständig erfolgten lymphatischen Regeneration. Da eine Inhibition der Lymphangiogenese eine Reduktion der lymphatischen Metastasierung bewirkt, wird hier erstmalig eine bereits im klinischen Einsatz befindliche Substanz als eine Option zur therapeutischen Hemmung der Lymphangiogenese und damit der lymphatischen Regeneration beschrieben.

6.Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn PD Dr. Guba danken für die Unterstützung bei diesem Projekt und die Möglichkeit, diese Promotion durchzuführen. Durch seine umfassende Betreuung führte er mich an wissenschaftliches Arbeiten heran und ermutigte stets zu selbständigem Arbeiten und Denken. Bei der Etablierung zahlreicher neuer Methoden war seine Kreativität und umfassende wissenschaftliche Erfahrung eine besonders große Hilfe. Ergebnisse konnten stets umfassend besprochen und interpretiert werden. Besonderer Dank gilt ihm nicht zuletzt wegen der Tatsache, dass durch seine Unterstützung bei diesem Projekt mein persönliches Interesse für experimentelle Forschung geweckt worden ist, welches meinen weiteren Werdegang sicherlich beeinflussen wird.

Weiters möchte ich Herrn Prof. Heeschen danken, der durch die zusätzliche Betreuung den erfolgreichen Abschluss dieses Projektes seit seinem Eintreffen wesentlich erleichtert hat.

Sabine Schrepfer und Michael Brückel waren stets tatkräftig an dem Projekt beteiligt und konnten in vielen Situationen mit ihrer langjährigen Erfahrung helfen. Dr. Gerald Schmid war als Ansprechpartner vor Ort ebenso wie bei der Durchführung wichtiger Experimente eine große Hilfe. Auch bei Ihnen allen möchte ich mich von Herzen für die Mitarbeit bedanken. Bei alltäglich anfallenden Problemen im Labor war es mir eine große Hilfe, mich regelmäßig mit erfahrenen Mitdoktoranden austauschen zu können.

Weiters möchte ich für die materielle wie moralische Unterstützung meinen Eltern, Veronika und Christoph Huber, danken. Weder diese Promotion noch mein erfolgreiches Studium hätte ich ohne derart umfangreiche Unterstützung durch meine Familie durchführen können.

7.Literaturverzeichnis

- Aboujaoude, W., M. L. Milgrom, et al. (2004). "Lymphedema associated with sirolimus in renal transplant recipients." Transplantation **77**(7): 1094-6.
- Alitalo, K., T. Tammela, et al. (2005). "Lymphangiogenesis in development and human disease." Nature **438**(7070): 946-53.
- Amante, A. J. and B. D. Kahan (1994). "Technical complications of renal transplantation." Surg Clin North Am **74**(5): 1117-31.
- Amornphimoltham, P., V. Patel, et al. (2008). "A retroinhibition approach reveals a tumor cell-autonomous response to rapamycin in head and neck cancer." Cancer Res **68**(4): 1144-53.
- Amornphimoltham, P., V. Patel, et al. (2005). "Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck." Cancer Res **65**(21): 9953-61.
- Aoki, M., E. Blazek, et al. (2001). "A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 136-41.
- Augustine, J. J., K. A. Bodziak, et al. (2007). "Use of sirolimus in solid organ transplantation." Drugs **67**(3): 369-91.
- Augustine, J. J., T. C. Knauss, et al. (2004). "Comparative effects of sirolimus and mycophenolate mofetil on erythropoiesis in kidney transplant patients." Am J Transplant **4**(12): 2001-6.
- Bando, H., H. A. Weich, et al. (2006). "The association between vascular endothelial growth factor-C, its corresponding receptor, VEGFR-3, and prognosis in primary breast cancer: a study with 193 cases." Oncol Rep **15**(3): 653-9.
- Beasley, N. J., R. Prevo, et al. (2002). "Intratatumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer." Cancer Res **62**(5): 1315-20.

- Bjorndahl, M., R. Cao, et al. (2005). "Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(43): 15593-8.
- Brady, M. S., C. F. Garfein, et al. (1994). "Post-treatment sarcoma in breast cancer patients." Ann Surg Oncol **1**(1): 66-72.
- Breiteneder-Geleff, S., A. Soleiman, et al. (1999). "Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium." Am J Pathol **154**(2): 385-94.
- Bruns, C. J., G. E. Koehl, et al. (2004). "Rapamycin-induced endothelial cell death and tumor vessel thrombosis potentiate cytotoxic therapy against pancreatic cancer." Clin Cancer Res **10**(6): 2109-19.
- Calne, R. Y., D. J. White, et al. (1978). "Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors." Lancet **2**(8104-5): 1323-7.
- Campisi, C., F. Boccardo, et al. (1995). "Reconstructive microsurgery of lymph vessels: the personal method of lymphatic-venous-lymphatic (LVL) interpositioned grafted shunt." Microsurgery **16**(3): 161-6.
- Cao, R., M. A. Bjorndahl, et al. (2004). "PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis." Cancer Cell **6**(4): 333-45.
- Cao, R., E. Brakenhielm, et al. (2002). "Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR-alphaalpha and -alphabeta receptors." Faseb J **16**(12): 1575-83.
- Cao, Y. (2005). "Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis." Nat Rev Cancer **5**(9): 735-43.
- Chang, L. K., G. Garcia-Cardena, et al. (2004). "Dose-dependent response of FGF-2 for lymphangiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(32): 11658-63.
- Clements, W. D., S. J. Kirk, et al. (1993). "A rare late complication of breast cancer treatment." Br J Clin Pract **47**(4): 219-20.

- Douros, J. and M. Suffness (1981). "New antitumor substances of natural origin." Cancer Treat Rev **8**(1): 63-87.
- Eisen, H., J. Kobashigawa, et al. (2005). "Improving outcomes in heart transplantation: the potential of proliferation signal inhibitors." Transplant Proc **37**(4 Suppl): 4S-17S.
- Eng, C. P., S. N. Sehgal, et al. (1984). "Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors." J Antibiot (Tokyo) **37**(10): 1231-7.
- Faivre, S., G. Kroemer, et al. (2006). "Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents." Nat Rev Drug Discov **5**(8): 671-88.
- Giessing, M., T. J. Fischer, et al. (2002). "Increased frequency of lymphoceles under treatment with sirolimus following renal transplantation: a single center experience." Transplant Proc **34**(5): 1815-6.
- Gregl, A., S. Pavic, et al. (1988). "[Stewart-Treves syndrome of the edematous arm following breast cancer operation]." Z Lymphol **12**(2): 66-83.
- Groetzner, J., F. Kur, et al. (2004). "Airway anastomosis complications in de novo lung transplantation with sirolimus-based immunosuppression." J Heart Lung Transplant **23**(5): 632-8.
- Groth, C. G., C. Brattstrom, et al. (1998). "New trails in transplantation: how to exploit the potential of sirolimus in clinical transplantation." Transplant Proc **30**(8): 4064-5.
- Guba, M., G. E. Koehl, et al. (2005). "Dosing of rapamycin is critical to achieve an optimal antiangiogenic effect against cancer." Transpl Int **18**(1): 89-94.
- Guba, M., P. von Breitenbuch, et al. (2002). "Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor." Nat Med **8**(2): 128-35.
- Guba, M., M. Yezhelyev, et al. (2005). "Rapamycin induces tumor-specific thrombosis via tissue factor in the presence of VEGF." Blood **105**(11): 4463-9.

- Guilbeau, J. M. (2002). "Delayed wound healing with sirolimus after liver transplant." Ann Pharmacother **36**(9): 1391-5.
- Hall, F. T., J. L. Freeman, et al. (2003). "Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **129**(7): 716-9.
- Hardinger, K. L., M. J. Koch, et al. (2004). "Current and future immunosuppressive strategies in renal transplantation." Pharmacotherapy **24**(9): 1159-76.
- Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes Dev **18**(16): 1926-45.
- He, Y., K. Kozaki, et al. (2002). "Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling." J Natl Cancer Inst **94**(11): 819-25.
- He, Y., I. Rajantie, et al. (2005). "Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels." Cancer Res **65**(11): 4739-46.
- Hirakawa, S., S. Kodama, et al. (2005). "VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis." J Exp Med **201**(7): 1089-99.
- Hong, Y. K., K. Foreman, et al. (2004). "Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus." Nat Genet **36**(7): 683-5.
- Huang, S., M. A. Bjornsti, et al. (2003). "Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance." Cancer Biol Ther **2**(3): 222-32.
- Irrthum, A., M. J. Karkkainen, et al. (2000). "Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase." Am J Hum Genet **67**(2): 295-301.
- Jackson, D. G. (2004). "Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis." Apmis **112**(7-8): 526-38.

- Joukov, V., V. Kumar, et al. (1998). "A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities." J Biol Chem **273**(12): 6599-602.
- Kadowaki, I., R. Ichinohasama, et al. (2005). "Accelerated lymphangiogenesis in malignant lymphoma: possible role of VEGF-A and VEGF-C." Br J Haematol **130**(6): 869-77.
- Kahan, B. D. (2004). "Sirolimus-based immunosuppression: present state of the art." J Nephrol **17 Suppl 8**: S32-9.
- Kahan, B. D., Y. K. Yakupoglu, et al. (2005). "Low incidence of malignancy among sirolimus/cyclosporine-treated renal transplant recipients." Transplantation **80**(6): 749-58.
- Kaipainen, A., J. Korhonen, et al. (1995). "Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(8): 3566-70.
- Karkkainen, M. J., R. E. Ferrell, et al. (2000). "Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema." Nat Genet **25**(2): 153-9.
- Karkkainen, M. J., P. Haiko, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins." Nat Immunol **5**(1): 74-80.
- Kim, D. H., D. D. Sarbassov, et al. (2002). "mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery." Cell **110**(2): 163-75.
- Kino, T., H. Hatanaka, et al. (1987). "FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro." J Antibiot (Tokyo) **40**(9): 1256-65.
- Kinoshita, J., K. Kitamura, et al. (2001). "Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **66**(2): 159-64.

- Kobayashi, S., T. Kishimoto, et al. (2007). "Rapamycin, a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin, suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis." Cancer Sci **98**(5): 726-33.
- Kriehuber, E., S. Breiteneder-Geleff, et al. (2001). "Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages." J Exp Med **194**(6): 797-808.
- Kuroi, K., K. Shimozuma, et al. (2005). "Pathophysiology of seroma in breast cancer." Breast Cancer **12**(4): 288-93.
- Kwon, Y. S., H. S. Hong, et al. (2005). "Inhibitory effect of rapamycin on corneal neovascularization in vitro and in vivo." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(2): 454-60.
- Lang, S. A., A. Gaumann, et al. (2007). "Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model." Int J Cancer **120**(8): 1803-10.
- Lee, V. W. and J. R. Chapman (2005). "Sirolimus: its role in nephrology." Nephrology (Carlton) **10**(6): 606-14.
- Loughna, S. and T. N. Sato (2001). "Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development." Matrix Biol **20**(5-6): 319-25.
- Mahe, E., E. Morelon, et al. (2005). "Cutaneous adverse events in renal transplant recipients receiving sirolimus-based therapy." Transplantation **79**(4): 476-82.
- Makinen, T., R. H. Adams, et al. (2005). "PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature." Genes Dev **19**(3): 397-410.
- Makinen, T., L. Jussila, et al. (2001). "Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3." Nat Med **7**(2): 199-205.
- Makinen, T., T. Veikkola, et al. (2001). "Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3." Embo J **20**(17): 4762-73.

- Mancardi, S., G. Stanta, et al. (1999). "Lymphatic endothelial tumors induced by intraperitoneal injection of incomplete Freund's adjuvant." Exp Cell Res **246**(2): 368-75.
- Mandriota, S. J., L. Jussila, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis." Embo J **20**(4): 672-82.
- Martel, R. R., J. Klicius, et al. (1977). "Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic." Can J Physiol Pharmacol **55**(1): 48-51.
- Mathis, A. S. (2003). "Comment: delayed wound healing with sirolimus after liver transplant." Ann Pharmacother **37**(3): 453.
- Mbulaiteye, S. M. and E. A. Engels (2006). "Kaposi's sarcoma risk among transplant recipients in the United States (1993-2003)." Int J Cancer.
- Morath, C., W. Arns, et al. (2007). "Sirolimus in renal transplantation." Nephrol Dial Transplant **22 Suppl 8**: viii61-viii65.
- Mori, N. (1955). "Clinical and experimental studies on the so-called lymphocyst which develops after radical hysterectomy in cancer of the uterine cervix." J Jpn Obstet Gynecol Soc **2**(2): 178-203.
- Morisada, T., Y. Oike, et al. (2005). "Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation." Blood **105**(12): 4649-56.
- Mulliken, J. B., S. J. Fishman, et al. (2000). "Vascular anomalies." Curr Probl Surg **37**(8): 517-84.
- Murgia, M. G., S. Jordan, et al. (1996). "The side effect profile of sirolimus: a phase I study in quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant patients." Kidney Int **49**(1): 209-16.
- Ochiai, T., M. Nagata, et al. (1987). "Studies of the effects of FK506 on renal allografting in the beagle dog." Transplantation **44**(6): 729-33.
- Oka, M., C. Iwata, et al. (2008). "Inhibition of endogenous TGF- β signaling enhances lymphangiogenesis." Blood **111**(9): 4571-9.

- Olszewski, W. L. (2003). "The lymphatic system in body homeostasis: physiological conditions." Lymphat Res Biol **1**(1): 11-21; discussion 21-4.
- Onogawa, S., Y. Kitadai, et al. (2004). "Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma." Cancer Sci **95**(1): 32-9.
- Ottesen, E. A., B. O. Duke, et al. (1997). "Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis." Bull World Health Organ **75**(6): 491-503.
- Padera, T. P., A. Kadambi, et al. (2002). "Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics." Science **296**(5574): 1883-6.
- Padera, T. P., B. R. Stoll, et al. (2004). "Pathology: cancer cells compress intratumour vessels." Nature **427**(6976): 695.
- Passaniti, A., R. M. Taylor, et al. (1992). "A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor." Lab Invest **67**(4): 519-28.
- Petrova, T. V., T. Makinen, et al. (2002). "Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor." Embo J **21**(17): 4593-9.
- Peyron, N., M. Dandurand, et al. (1993). "[Malignant tumors as complications of lymphedema]." J Mal Vasc **18**(4): 293-8.
- Pike-Overzet, K., M. van der Burg, et al. (2007). "New insights and unresolved issues regarding insertional mutagenesis in X-linked SCID gene therapy." Mol Ther **15**(11): 1910-6.
- Podgrabinska, S., P. Braun, et al. (2002). "Molecular characterization of lymphatic endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16069-74.
- Randolph, G. J., V. Angeli, et al. (2005). "Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels." Nat Rev Immunol **5**(8): 617-28.
- Rockson, S. G. (2001). "Lymphedema." Am J Med **110**(4): 288-95.

- Romagnoli, J., F. Citterio, et al. (2005). "Severe limb lymphedema in sirolimus-treated patients." Transplant Proc **37**(2): 834-6.
- Saaristo, A., T. Tammela, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor-C gene therapy restores lymphatic flow across incision wounds." Faseb J **18**(14): 1707-9.
- Sabin, F. (1902). "On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and the thoracic duct in pigs." Am J Anat **1**: 367-391.
- Saharinen, P., T. Tammela, et al. (2004). "Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation." Trends Immunol **25**(7): 387-95.
- Schacht, V., M. I. Ramirez, et al. (2003). "T1 alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema." Embo J **22**(14): 3546-56.
- Schoppmann, S. F., G. Bayer, et al. (2004). "Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer." Ann Surg **240**(2): 306-12.
- Seeliger, H., M. Guba, et al. (2004). "Blockage of 2-deoxy-D-ribose-induced angiogenesis with rapamycin counteracts a thymidine phosphorylase-based escape mechanism available for colon cancer under 5-fluorouracil therapy." Clin Cancer Res **10**(5): 1843-52.
- Sehgal, S. N., H. Baker, et al. (1975). "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization." J Antibiot (Tokyo) **28**(10): 727-32.
- Stacker, S. A., M. G. Achen, et al. (2002). "Lymphangiogenesis and cancer metastasis." Nat Rev Cancer **2**(8): 573-83.
- Stallone, G., A. Schena, et al. (2005). "Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients." N Engl J Med **352**(13): 1317-23.

- Starzl, T. E., S. Todo, et al. (1989). "FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation." Lancet **2**(8670): 1000-4.
- Stuht, S., W. Gwinner, et al. (2007). "Lymphatic neoangiogenesis in human renal allografts: results from sequential protocol biopsies." Am J Transplant **7**(2): 377-84.
- Tammela, T., A. Saaristo, et al. (2005). "Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia." Blood **105**(12): 4642-8.
- Tokunaga, C., K. Yoshino, et al. (2004). "mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways." Biochem Biophys Res Commun **313**(2): 443-6.
- Veikkola, T., L. Jussila, et al. (2001). "Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice." Embo J **20**(6): 1223-31.
- Vezina, C., A. Kudelski, et al. (1975). "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle." J Antibiot (Tokyo) **28**(10): 721-6.
- Wang, H. W., M. W. Trotter, et al. (2004). "Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma." Nat Genet **36**(7): 687-93.
- Webster, A. C., V. W. Lee, et al. (2006). "Target of rapamycin inhibitors (TOR-I; sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression in kidney transplant recipients." Cochrane Database Syst Rev(2): CD004290.
- Weiss, M., R. G. Baumeister, et al. (2003). "Dynamic lymph flow imaging in patients with oedema of the lower limb for evaluation of the functional outcome after autologous lymph vessel transplantation: an 8-year follow-up study." Eur J Nucl Med Mol Imaging **30**(2): 202-6.
- Weninger, W., T. A. Partanen, et al. (1999). "Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells." Lab Invest **79**(2): 243-51.

Wigle, J. T. and G. Oliver (1999). "Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system." Cell **98**(6): 769-78.

Yakupoglu, Y. K., J. F. Buell, et al. (2006). "Individualization of immunosuppressive therapy. III. Sirolimus associated with a reduced incidence of malignancy." Transplant Proc **38**(2): 358-61.

Yoon, Y. S., T. Murayama, et al. (2003). "VEGF-C gene therapy augments postnatal lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphedema." J Clin Invest **111**(5): 717-25.

A. Lebenslauf

Stephan Huber

Geboren 13.09.1981
Nymphenburger Str 172
80634 München
Tel.: +49 89 18956013
Mobil: +49 176 24263998
E-mail: shuber_privat@hotmail.com

Ausbildung

1992-2001	Besuch des Theresianum Gymnasium des Johannesbundes, Mainz
	Abitur im März 2001
Seit 2001	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München
	Physikum im September 2003
	2. Ärztliche Prüfung und Studienabschluss April 2008

Medizinische Arbeitserfahrung

2001	Krankenpflegepraktikum am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Wien
2004	Famulatur am Departement für Onkologie, Universitätsspital Zürich
2005	Famulatur auf der Chirurgischen Intensivstation der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Großhadern
2005	Famulatur auf der Thoraxchirurgie der Asklepioskliniken, München-Gauting
2006	Famulatur auf der Chirurgischen Poliklinik der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Großhadern
2006	Famulatur am Department for Hematology des University College London, Royal Free Hospital
2007	Beginn des Praktischen Jahres mit folgenden Rotationen: Februar bis Juni 2007 Chirurgie am Krankenhaus Neuperlach, München

Juni bis Oktober 2007 Wahlfach Urologie am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München

Oktober 2007 bis Januar 2008 Innere Medizin am Departement für Onkologie, Universitätsspital Zürich

Wissenschaftliche Tätigkeiten

- 2003-2004 Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft an der Abteilung für Herzchirurgie am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 2004 Beginn meiner Dissertation mit dem Titel „Inhibition von mTOR hemmt die Lymphangiogenese“ an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Großhadern
Betreuung durch Herrn PD Dr Guba und Prof Heeschen
- 2006-04/2008 Nach Beendigung des experimentellen Teils der Dissertation Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Großhadern
- seit 04/2008 Derzeit Anstellung als wissenschaftlicher Assistent in der Abteilung für Experimentelle Forschung, Chirurgische Klinik Großhadern

Poster und Vorträge

Vortrag „Blockade of mTOR inhibits Lymphatic Angiogenesis in vivo and in vitro“ auf den 9. Chirurgische Forschungstagen, 19.-21. September 2005, Frankfurt am Main

Vortrag „Der mTOR-Inhibitor Sirolimus inhibiert die VEGF-C getriggerte physiologische Lymphangiogenese: Eine experimentelle Erklärung für frühe postoperative Probleme“ auf dem 123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin 02.05. bis 05.05.2006

Vortrag „Der mTOR-Inhibitor Sirolimus inhibiert die VEGF-C getriggerte physiologische Lymphangiogenese: Eine experimentelle Erklärung für frühe postoperative Probleme“ auf der Lymphologica 2007, 29. - 31. März 2007 in München

Poster „Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer“ auf dem 100. Kongress der AACR in Los Angeles, 14. – 19. April 2007

Preise

2007 Vortragspreis für den besten Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Lymphologie

Publikationen

Groetzner J, Kaczmarek I, Mueller I, **Huber S**, Deutsch A, Daebritz S, Arbogast H, Meiser BM, Reichart B. Freedom from graft vessel disease in heart and combined heart- and kidney-transplanted patients treated with tacrolimus-based immunosuppression. J Heart Lung Transplant. 2005 Nov;24(11):1787-92.

Huber S, Bruns CJ, Schmid G, Conrad C, Niess H, Huss R, Graeb C, Jauch KW, Heeschen C, Guba M. Inhibition of the Mammalian Target of Rapamycin Impedes Lymphangiogenesis. Kidney Int. 2007 Apr;71(8):771-7. Epub 2007 Feb 14.

Hermann PC, **Huber SL**, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. Cell Stem Cell. 2007 Sep 13;1(3):313-23

Deutsch MA, Kaczmarek I, **Huber S**, Schmauss D, Beiras-Fernandez A, Ochsenkuehn R, Mueller-Hoecker J, Meiser B, Reichart B. Sirolimus-associated oligospermia. Am J Transplant. 2007.

Weitere Qualifikationen

Mithilfe bei der Organisation der European Conference on Tumor Angiogenesis (ECTA), München, 2004

Organisation der Betreuung der geladenen Sprecher bei der 2nd European Conference on Tumor Angiogenesis (ECTA), München, 2006

Teilnahme am Sonographie-Kurs bei Dr. Gerd Brehm im Wintersemester 2006/07

Hobbies

Literatur, Sport, Kultur, Reisen

B. Veröffentlichung „Inhibition of the Mammalian Target of Rapamycin Impedes Lymphangiogenesis“, *Kidney International*, Februar 2007