

**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern der  
Universität München**

**Direktor: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch**

**Antiangiogenetische Therapie des humanen Pankreaskarzinoms  
durch einen EGF-Rezeptor-Antikörper nach orthotoper Implantation  
in die Nacktmaus**

**Dissertation**

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin**

**an der Medizinischen Fakultät der**

**Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von**

**Ole Mantell**

**aus**

**Berlin**

**2006**



**Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern der  
Universität München**

**Direktor: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch**

**Antiangiogenetische Therapie des humanen Pankreaskarzinoms  
durch einen EGF-Rezeptor-Antikörper nach orthotoper Implantation  
in die Nacktmaus**

**Dissertation**

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von**

**Ole Mantell**

**aus**

**Berlin**

**2006**

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

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. C.J. Bruns

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Essler  
Priv. Doz. Dr. A. Brehm  
Prof. Dr. St. Endres

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2006





Meiner Frau Isabel  
und  
meiner Familie  
für Motivation durch Emotion  
auch in schweren Zeiten,  
A. Donath für Motivation durch Competition  
sowie  
J. Wünsch für Coloration



# Inhaltsverzeichnis

## **1. Das Pankreaskarzinom**

1.1 Inzidenz, Ätiologie und Diagnostik S. 11

1.2 Lokalisation und Metastasierung S. 13

1.3 Bisherige Therapieoptionen S. 13

## **2. Angiogenese**

2.1 Physiologische Angiogenese S. 15

2.2 Tumorangigenese S. 18

## **3. Der epidermale Wachstumsfaktor – epidermal growth factor (EGF) S. 20**

## **4. Blockade des EGF-Rezeptors**

4.1 EMD 72000 S. 23

## **5. Zielsetzung (eigener Abschnitt) S. 25**

## **6. Material und Methoden**

6.1 Zellkultur S. 26

6.2 Versuchstiere und orthotope Implantation S. 27

6.3 Behandlungsschemata S. 28

6.4 Versuchsende S. 29

## **7. Immunhistologische Färbungen**

7.1 Hämatoxylin - Eosin (HE) – Färbung: Pathologische Identifizierung	S. 30
7.2 DeadEnd <sup>tm</sup> Fluorometric TUNEL System: Apoptosenachweis	S. 31
7.3 Ki67–Färbung: Proliferationsnachweis	S. 32
7.4 CD31 microvessel density (Mikrogefäßdichte) – Colorimetrische Färbung	S. 33
7.5 Phospho-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)	S. 35
7.6 Statistische Auswertung	S. 37

## **8. Ergebnisse**

8.1 Ergebnisbeschreibung	S. 38
8.2 Abbildungen und Tabellen	S. 41
8.3 Immunhistochemische Analysen	S. 47

## **9. Diskussion** S. 54

## **10. Zusammenfassung** S.63

## **11. Quellen- und Literaturverzeichnis**

11.1 Nach Verwendung im Text	S. 64
------------------------------	-------

## **12. Bild- und Schemaquellenverzeichnis** S. 77

## **13. Materialverzeichnis** S. 78

## **14. Lebenslauf** S. 81

# 1. Das Pankreaskarzinom

## 1.1 Inzidenz, Ätiologie und Diagnostik

Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms ist in den letzten Jahren steigend und stellt das fünft- bzw. sechsthäufigste Malignom bei Männern bzw. Frauen dar (1). Etwa 3,5% aller Krebserkrankungen sind Pankreaskarzinome. Sie sind für etwa 5,8% aller Krebstodesfälle verantwortlich und sind die vierthäufigste Krebstodesursache bei Frauen und fünfhäufigste bei Männern. In der Bundesrepublik Deutschland beträgt die Inzidenzrate für Männer 14,4 und für Frauen 18,3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner/Jahr (im Jahr 2000) (2,3), in den USA rechnet man mit 10 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner/Jahr. Der Altersgipfel liegt in der 7. bis 8. Lebensdekade, wobei 2/3 aller Patienten älter als 60 Jahre sind (siehe Tabelle 1).

*Tabelle 1 (aus siehe Quellenverzeichnis Seite 77):*

### **Inzidenz und Mortalität nach Altersgruppen, Deutschland 2000**

Fälle pro 100.000

Alter in Jahren	Männer		Frauen	
	Inzidenz	Mortalität	Inzidenz	Mortalität
bis unter 45	0,6	0,5	0,3	0,2
45 bis unter 60	13,7	13,3	9,4	7,5
60 bis unter 75	46,8	46,6	36,7	30,7
75 und älter	95,2	98,4	104,5	86,3
<b>Insgesamt</b>	<b>14,4</b>	<b>14,3</b>	<b>18,3</b>	<b>15,1</b>

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist letztendlich ungeklärt. Bestimmte Risikofaktoren disponieren überdurchschnittlich häufig zur Erkrankung. Als sicherer Risikofaktor gilt das Zigarettenrauchen. Weiterhin wird eine fett- und/oder fleischreiche Ernährung als prädisponierender Faktor angesehen. Koffein- oder

Kaffeegenuss haben dagegen keinen nachweisbaren Effekt (1,4). Ebenso konnte eine Fall-Kontrollstudie aus Italien im Jahre 1997 auch keinen Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Pankreaskarzinomen nachweisen (5,6). Patienten nach Magenresektion, mit Diabetes mellitus oder chronischer Pankreatitis weisen dagegen ein erhöhtes Risiko zur Karzinomentwicklung auf. Allerdings ist weder der kausale noch der zeitliche Zusammenhang dieser Beobachtung geklärt. Im Rahmen beruflicher Exposition besteht ein deutlich erhöhtes Risiko gegenüber Noxen wie 2-Naphtylamin, Benzidin oder Benzolderivaten. Weiterhin scheint es auch eine genetisch determinierte Form des Pankreaskarzinoms zu geben (1). Die häufigsten im Pankreaskarzinom nachgewiesenen molekulargenetischen Veränderungen betreffen das Protooncogen K-ras und den Tumorsuppressor p53 (2).

Diese Form der Krebserkrankung stellt das Malignom mit der bei weitem schlechtesten Prognose von allen Neubildungen des Gastrointestinaltraktes dar. Fünf Jahre nach Stellung der Diagnose leben im Mittel noch vier von 1000 Patienten und die mediane Lebenserwartung beträgt 4-6 Monate. Bei nur 10-20% der Fälle ist die Ausdehnung der Tumorerkrankung bei Stellung der Diagnose noch so begrenzt, daß eine kurative chirurgische Resektion versucht werden kann. Selbst in diesen prognostisch günstigeren Fällen liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei nur 3-24% (3). Ursächlich dafür ist sicherlich die späte Diagnosestellung durch das Fehlen typischer Leit- oder spezifischer Frühsymptome. Schmerzen und/oder Ikterus werden zwar bei mehr als 90% der Patienten beobachtet, der Ikterus stellt aber lediglich bei Pankreaskopftumoren ein Frühsymptom dar. Bei Tumoren im Korpus- oder Schwanzbereich entsteht ein Ikterus überwiegend erst bei Metastasierung. Durch Infiltration des Retroperitoneums oder des Plexus solaris kommt es zu Schmerzen im Epigastrium und im Rücken. Ebenso sind Inappetenz, Verdauungsstörungen und Gewichtsverlust sowie seltener rezidivierende Thrombosen Spätsymptome der

Erkrankung. Gelegentlich ist eine akute Pankreatitis Erstmanifestation des Pankreaskarzinoms (1).

Zum Fehlen typischer Frühsymptome kommt das Fehlen einer effektiven und gleichzeitig wenig invasiven Screening-Diagnostik. Diagnostisch kommt eine Kombination aus Laborwerten (Pankreas-, Leberwerte, Tumormarker CA 19-9), Sonographie, endoskopischer retrograder Cholangio-Pankreatikographie (ERCP), Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Fluordesoxyglucose-Positronenemissionstomographie und Punktionszytologie zum Tragen (1).

### **1.2 Lokalisation und Metastasierung**

Die Tumoren finden sich zu 70% im Pankreaskopf-, zu 20% im Korpus- und zu 10% im Schwanzbereich. Sie führen frühzeitig zur Invasion des peripankreatischen Gewebes, wobei es häufig zu einer Infiltration der nahen großen Gefäße, vor allem der Vena mesenterica superior bzw. der Vena portae kommt. Zum Zeitpunkt einer eventuellen Operation bestehen abhängig von der Tumorgröße in über 50% bereits Lymphknotenmetastasen. Fernmetastasen befinden sich primär fast immer in der Leber (in 66% bei primärer Metastasierung), in den Lymphknoten (etwa 20%) und erst später in der Lunge (1).

### **1.3 Bisherige Therapieoptionen**

Eine kurative Therapie des Pankreaskarzinoms kann zum aktuellen Zeitpunkt nur chirurgisch erfolgen, wobei die Resektabilitätsrate bei 10-20% liegt (7). Die operative Methode der Wahl richtet sich dabei nach der Lokalisation und Ausdehnung des Primärtumors, wird aber häufig durch Infiltration benachbarter Gefäße,

Fernmetastasierung und/oder Peritonealkarzinose limitiert. Bei Pankreaskopfkarzinomen empfiehlt sich die partielle Duodenopankreatektomie nach Kausch-Whipple. Die postoperative mediane Überlebenszeit beträgt hierbei 12-15 Monate, unabhängig von chirurgischer Erfahrung des Operateurs, Klinikgröße oder anderen technischen Faktoren. Die postoperative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt im Schnitt 5% oder weniger (8).

Diese unbefriedigenden Langzeitergebnisse nach kurativer Resektion führte zur Entwicklung erweiterter Therapiekonzepte: der neoadjuvanten Radiochemotherapie mit der Zielsetzung der erhöhten Resektabilität mittels Bestrahlung mit 45 bis 50,4 Gy und Applikation von 5-Fluorouracil (5-FU) bzw. Mitomycin C, der intraoperativen Strahlentherapie zur Reduktion lokaler Tumorrezidive mittels Bestrahlung (15-30 Gy) und letztlich der adjuvanten postoperativen Chemo- und Radiochemotherapie (9,10). In dem Feld der chemotherapeutischen Mono- und Kombinationstherapie, die ihr bisher häufigstes Einsatzgebiet im Bereich der weit fortgeschrittenen und metastasierten Erkrankung fand, waren die Erfolge bisher vernachlässigbar (13). 5-FU war das bisher am intensivsten erforschte und erfolgreichste Chemotherapeutikum mit einer jedoch geringen Ansprechrate von 0% bis 19% und einer medianen Überlebenszeit von 4,2 bis 5,5 Monaten (11,12). Alternative Mono- und Kombinationsschemata wie zum Beispiel das Mallinson-Schema (5-FU, Methotrexat, Vincristin und Cyclophosphamid), das 5-FU, Doxorubicin und Mitomycin – Schema oder das Streptozotocin, Mitomycin und 5-FU – Schema fielen nach anfänglich vielversprechenden Erfolgen im Ergebnis sogar hinter der Monotherapie mit 5-FU zurück (13,14,15). Seit Anfang 1996 ist jedoch in Deutschland Gemcitabine (Difluorodeoxycytidine), ein Pyrimidin-Antimetabolit, zugelassen, der als Chemotherapeutikum bei guter Verträglichkeit deutlich bessere Ergebniszahlen produziert als eine Therapie mit 5-FU (1,16,17,18). Eine Palliativ-Studie von 1997

zeigte einen klinischen Benefit bei 23,8% der untersuchten Patienten unter Therapie mit Gemcitabine im Vergleich zu 4,8% der 5-FU Gruppe. Die mittlere Überlebenszeit betrug 5,65 bzw. respektive 4,41 Monate bei einer Ein-Jahres-Überlebensrate von 18% im Vergleich zu 2% unter 5-FU Monotherapie (17).

Angesichts dieser Studie stellte sich daher die zukünftige Aufgabe, unterstützende Therapeutika zur Maximierung des positiven Effekts unter Gemcitabine-Monotherapie zu finden und zu optimieren.

## **2. Angiogenese**

### **2.1 Physiologische Angiogenese**

Angiogenese im klassischen Sinne beschreibt die Aussprossung von Kapillaren aus bereits existierenden Gefäßen. Sie folgt dabei einem schrittweisen Prozess:

Anfangs erweitern sich bereits vorhandene Gefäße und werden vermehrt durchlässig. Proteasen aus dem umgebenden Gewebe dauern Teile der extrazellulären Matrix sowie der Basalmembranen an. Dies ermöglicht es den aktivierten und proliferierenden Endothelzellen zu wandern (Migration) und schließlich Gefäßlumina auszubilden. Die Endothelzellen dieser aussprossenden neuen Gefäße und mit ihnen die sie umgebenden periendothelialen Zellen sowie die umgebende Matrix differenzieren dann weiter unter dem Einfluss der lokalen Umgebung. Die Betrachtung lediglich der Endothelzellen vermag Gefäßwachstum nicht hinreichend zu erklären. Die Kenntnis der molekularen Regulationsmechanismen im Zusammenspiel von Endothelzellen, periendothelialen

Zellen, Matrixmolekülen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren eröffnet erste neue Therapieansätze für Erkrankungen, die mit einer gestörten oder erhöhten Gefäßneubildung einhergehen (19):

Vasodilatation ist der erste Schritt der Angiogenese und erfolgt hauptsächlich als Antwort auf NO (Stickoxid). NO kann VEGF (vascular endothelial growth factor) hochregulieren, der seinerseits die Permeabilität bereits existierender Gefäße steigert (VEGF = VPF, „vascular permeability factor“), und zwar durch Reorganisation von Adhäsionsmolekülen wie PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule, CD31) oder VE-Cadherin (Vascular endothelial cadherin, ein „tight junction“ Molekül).

Angiopoietin-1 (Ang-1), ein Ligand des Endothelzellenrezeptors Tie-2, ist ein natürlich vorkommender Antipermeabilitätsfaktor. Ein anderes Mitglied der Angiopoietinfamilie – Angiopoietin-2 (Ang-2), ein Inhibitor der Tie-2-Signaltransduktion und natürlicher Antagonist von Ang-1 – verstärkt das Aussprossen von Endothelzellen. Ang-2 trägt dazu bei, glatte Muskelzellen von Endothelzellen abzulösen und die extrazelluläre Matrix aufzulösen. Dadurch wird die Migration von Endothelzellen angeregt. Ang-2 konnte in Speichergranula von Endothelzellen nachgewiesen werden und kann auf Stimulation innerhalb von 30 Minuten ausgeschüttet werden. Die Auflösung der extrazellulären Matrix erfordert Proteinasen, die nicht nur den „Platz“ für die proliferierenden Endothelzellen schaffen, sondern auch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF (basic fibroblast growth factor), und IGF-1 (Insulin like growth factor) ermöglichen.

Wenn die physikalischen Barrieren durch die Auflösung der extrazellulären Matrix aufgelöst werden, können sich die Endothelzellen aus dem Verband lösen (Migration). Es setzt eine komplexe Interaktion zwischen Wachstumsfaktoren (z.B.

VEGF), Differenzierungsfaktoren (z.B. den Angiopoetinen) und den zugehörigen Rezeptoren ein.

Endothelzellen, die in die Matrix einwachsen, bilden solide Stränge, die nachfolgend ein Lumen bilden. Dies wird durch eine Interkalation und eine Verdünnung der Endothelzellen erreicht, zusammen mit einer Fusion mit existierenden Gefäßen, um letztlich ein längeres Gefäß zu bilden (Abbildung 1) (19).

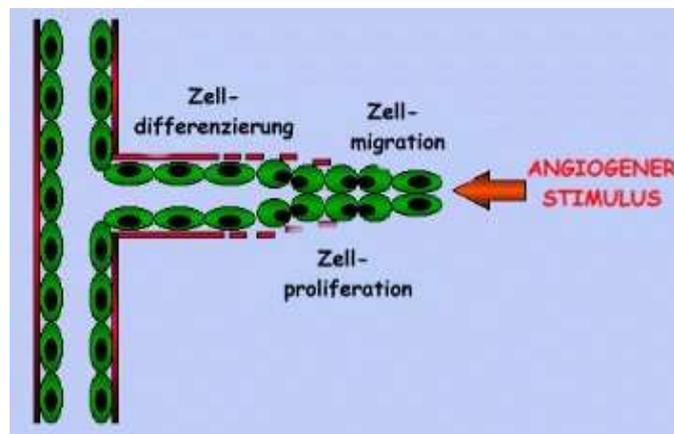


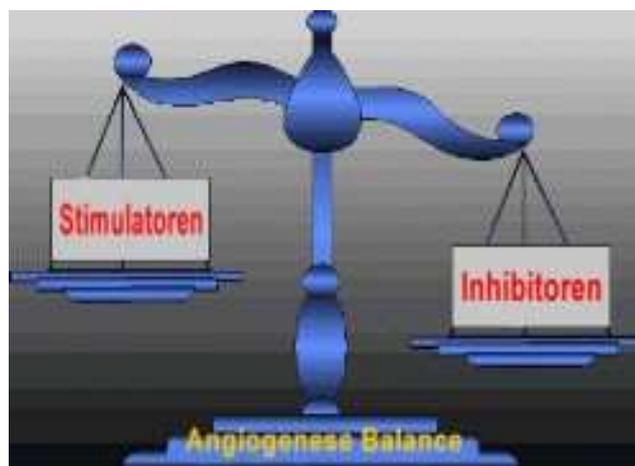
Abbildung 1: Schematischer Ablauf der Angiogenese  
(aus siehe Quellenverzeichnis Seite 77)

Die Angiogenese findet zumeist als langfristige Antwort des Organismus auf durch reine Vasodilatation bestehender Gefäße nicht zu kompensierende, lokale oder regionale Hypoxie und/oder Minderversorgung mit Nährstoffen statt und dient damit letztlich der Anpassung des Körpers an veränderte Versorgungssituationen, wie sie zum Beispiel im Rahmen von Wachstum, Wundreparation oder Kompensation von degenerativen Gefäßerkrankungen (z.B. Thrombosen, Arteriosklerosen, etc.) auftreten. Sie dient damit primär durchaus physiologischen Adaptationsprozessen.

## 2.2 Tumorangiogenese

Das Konzept, dass Tumorwachstum und –metastasen von der Ausbildung neuer Gefäße abhängig sei, wurde bereits 1971 durch J. Folkman formuliert (20) und 2003 aktualisiert (84). Neovaskularisation muss erfolgen, um die Sauerstoff- sowie Nährstoffversorgung der Zellen des Primärtumors zu gewährleisten. Darüber hinaus erleichtern die neugebildeten Gefäße den Eintritt von Tumorzellen in den Kreislauf und damit die Bildung von Fernmetastasen (85,87).

Die Kontrolle der tumorassoziierten Angiogenese hängt dabei von einer empfindlichen Balance mehrerer angiogener und anti-angiogener Faktoren ab (siehe Tabelle 2). Während der Tumorentstehung induzieren genetische und umweltbedingte Einflüsse den sogenannten „angiogenic switch“, ein Prozess der Ausschüttung entsprechender Mediatoren durch die Tumorzellen, der entweder die Stimulation angiogener oder die Hemmung anti-angiogener Faktoren bedingt und damit das Gleichgewicht zwischen beiden stört, so daß die Kontrolle über die lokale Angiogenese für den Gesamtorganismus verloren geht (Abbildung 2) (21,22,87).



*Abbildung2: Kontrolle der Angiogenese durch Stimulatoren und Inhibitoren im Gleichgewicht (aus siehe Quellenverzeichnis Seite 77)*

Zu den Umwelteinflüssen, die Angiogenese auslösen können, rechnet man Hypoxie, Veränderungen im pH-Wert des Gewebes, metabolischen Stress und Zytokine aus einer inflammatorischen Lokalreaktion. Zu den aktivierenden genetischen Faktoren gehören (Proto-) Onkogene wie Src und Ras, inhibitorische Gene sind z.B. p53 und das von Hippel-Lindau-Gen.

*Eine Auswahl endogener angiogenetischer und anti-angiogenetischer Faktoren (Tabelle 2 ohne Quelle)*

**Angiogen**

**Antiangiogen**

Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Thrombospondin-1, 2
Acidic and basic fibroblast growth factors (aFGF, bFGF)	Endostatin
Transforming growth factor- $\alpha/\beta$ (TGF- $\alpha, \beta$ )	Angiostatin
Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)	Interferon- $\alpha/\beta$
Angiopoietin-1	Interleukin-12
Hepatocyte growth factor (HGF)	Platelet factor 4 fragment
Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	Angiopoietin-2
Tissue factor	Vasostatin
Nitric Oxide bzw. Stickoxid (NO)	Human macrophage metallo-elastase
<b>Epidermal growth factor (EGF)</b>	Anti-Thrombin III fragment

### **3. Der epidermale Wachstumsfaktor - Epidermal Growth Factor (EGF)**

Humane Tumoren exprimieren sowohl Wachstumsfaktoren als auch deren Rezeptoren in großer Menge und viele Arten von malignen Zellen scheinen autokrines oder parakrin stimuliertes Wachstum zu zeigen. Mit zu den am besten erforschten Faktor-Rezeptor-Systemen gehört hierbei die Familie der EGF-Rezeptoren (auch bekannt als Typ I Rezeptor-Tyrosinkinase oder ErbB-Tyrosinkinase-Rezeptoren). Diese Familie setzt sich aus vier homologen Rezeptoren zusammen: der EGF-Rezeptor (ErbB1/ EGFR/ HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Diese Rezeptoren bestehen alle aus einer extrazellulären Bindungsdomäne, einem transmembranösen lipophilen Segment und einer intrazellulären Protein-Tyrosinkinase-Domäne mit einem regulatorischen Segment auf Kohlenstoffbasis (27). Besondere Beachtung soll im Folgenden auf dem EGF-Rezeptor selbst liegen.

Die EGF/ErbB-Rezeptoren werden durch Dimerisierung zwischen entweder zwei identischen Rezeptoren (Homodimerisierung) oder zwischen zwei verschiedenen Rezeptoren aktiviert, die allerdings derselben Familie angehören (Heterodimerisierung). Die Bildung dieser Dimere kann durch Bindung eines entsprechenden Liganden an den Rezeptor, oder durch eine hohe Dichte der Rezeptoren durch Überexpression zustande kommen.

Mindestens sechs Liganden, auch bekannt als EGF-ähnliche Liganden (EGF-like ligands) binden an den EGF-Rezeptor (ErbB1): dazu gehören der epidermale Wachstumsfaktor (epidermal growth factor) EGF, der transformierende Wachstumsfaktor  $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ) TGF- $\alpha$  und das sogenannte Amphiregulin. Diese binden selektiv und ausschließlich an den EGF-Rezeptor.

Heparin-bindendes EGF (HB-EGF), Betacellulin und Epiregulin können sowohl an EGF-R als auch an ErbB4 binden.

Nach Rezeptordimerisierung kommt es im Anschluss zu einer Aktivierung der intrinsischen Protein-Tyrosinkinase und zur vermehrten Tyrosinauto-phosphorylierung. Dies wiederum führt zu einer Rekrutierung und Phosphorylierung mehrerer intrazellulärer Substrate, welche mitogene Signalwirkung und weitere zelluläre Aktivitäten bewirken (siehe Abbildung 3) (27).

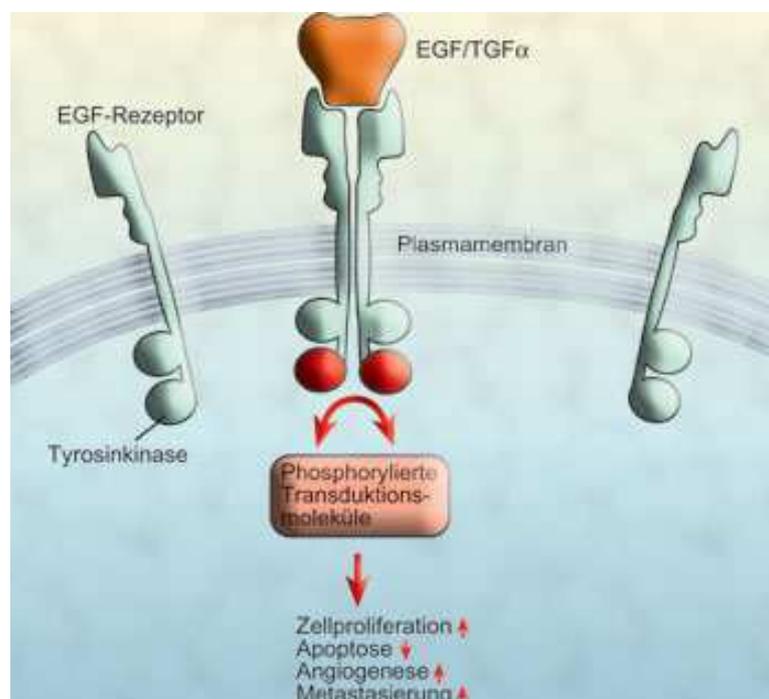


Abbildung 3: Wirkweise des EGF-Rezeptors  
(aus siehe Quellenverzeichnis Seite 77)

Ein Hauptsignalweg des EGF-Rezeptors ist die Ras-Raf-MAPK-Kaskade (siehe Abbildung 4). Die Aktivierung von Ras eröffnet eine mehrstufige Phosphorylierungskaskade, die letztendlich in der Aktivierung der MAPK mündet. Damit stellt der Aktivitätslevel der MAP-Kinase einen indirekten Marker für die Aktivierung des EGF-R-Signalweges und somit für die erfolgreiche Inhibition der Rezeptoren dar.

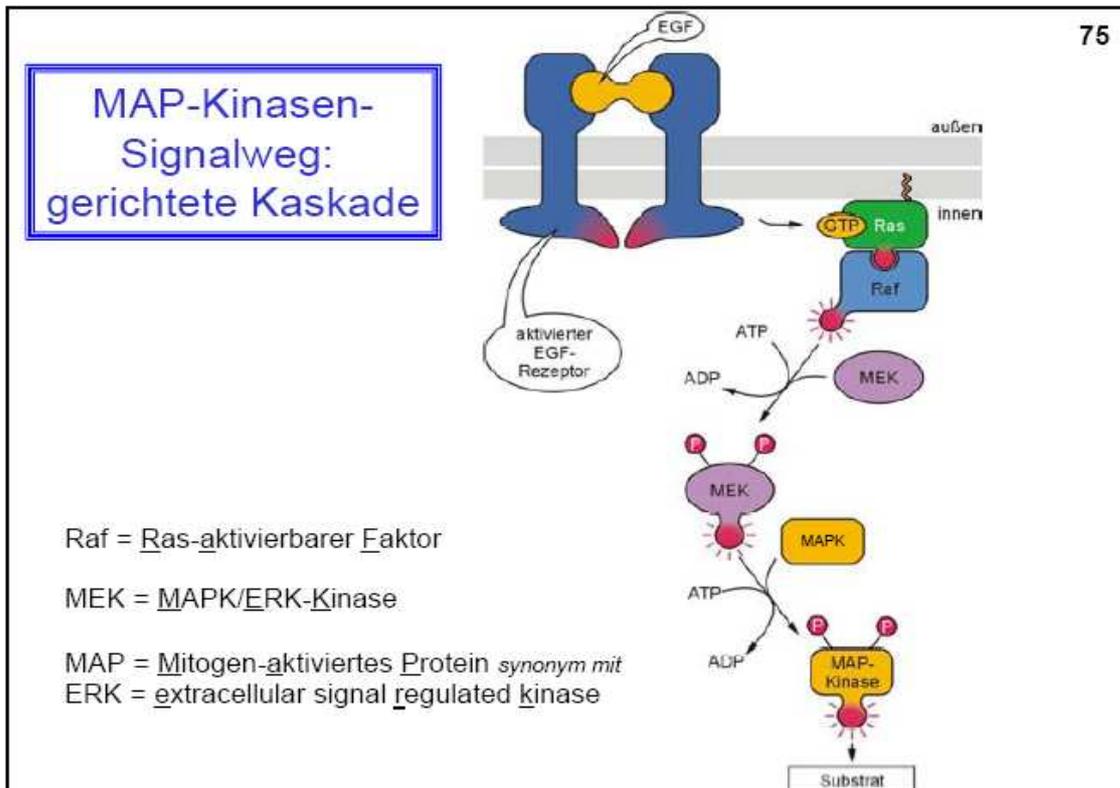


Abbildung 4: Signalweg der mitogen-aktivierten Proteinkinase  
(aus siehe Quellenverzeichnis Seite 77)

In vorhergegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass ein vermehrtes Vorkommen bzw. eine erhöhte Dichte von EGF-Rezeptoren durch ihren stimulierenden Effekt auf unkontrollierte Zellproliferation direkt zu der Entwicklung von soliden Tumoren beiträgt. Co-Expression von EGF-R, TGF- $\alpha$  und EGF korreliert mit einem rapide progressiven Erkrankungsverlauf bei Patienten mit Pankreaskarzinom (28). Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen hoher EGF-R Dichte und erniedrigter Sensitivität gegenüber Chemotherapie in verschiedenen Tumorsystemen gezeigt werden.

## **4. Blockade des EGF-Rezeptors**

### **4.1 EMD 72000**

EMD 72000 (Merck KgaA, Darmstadt/ EMD Pharmaceuticals, Durham USA) ist ein monoklonaler IgG1 Antikörper, gerichtet gegen den EGF-Rezeptor menschlicher Endothelzellen. Er bindet kompetitiv mit hoher Spezifität und Affinität an diesen Rezeptor ( $K_D = 3.4 \times 10^{-10}$  M Bindungsaffinität für EMD72000-verwandte cDNA-Sequenz), jedoch ohne die Aktivierung des Tyrosinkinase-Mechanismus' zu verursachen. Dies geschieht, indem er selbst an ein Polypeptid in enger räumlicher Nähe zum liganden-bindenden Abschnitt des Rezeptors bindet, wodurch die Bindung natürlicher Liganden und die nachfolgende Signalkaskade blockiert wird.

Durch Fortschritte der Gentechnik gelang die Humanisierung dieses ursprünglich murinen Antikörpers (MaB 425 bzw. EMD 55900), mit der Intention, die Wahrscheinlichkeit immunogener Abwehrreaktionen zu vermindern und die durchschnittliche Serumzirkulationszeit zu verlängern. Dieser Prozess beinhaltete das Einspleissen des antigenbindenden Anteils des Maus-Antikörpers in den Bauplan eines menschlichen Antikörpers, ein Grundgerüst aus einer schweren Kette des IgG1 plus  $\alpha$ - und  $\kappa$ -Leichtketten, um letztendlich die Immunantwort des menschlichen Patienten gegen das Mausprotein zu minimieren. Die durchschnittliche Nachweisbarkeitsdauer im menschlichen Serum konnte damit auf ca. sechs bis sieben Tage erweitert werden (29,30,31,32).

Letztendlich besteht der Grundgedanke der medikamentösen Therapie mit EMD 72000 in der Inhibition des EGF-vermittelten Tyrosinkinase-Signalweges mit konsekutiver Unterdrückung der tumorinduzierten Angiogenese, wodurch die Nähr- und Sauerstoffversorgung der entarteten Zellen unterbunden wird. Letztendlich führt

dies zum Absterben oder zumindest Wachstumsstopp des Tumors (siehe Abbildung 5).

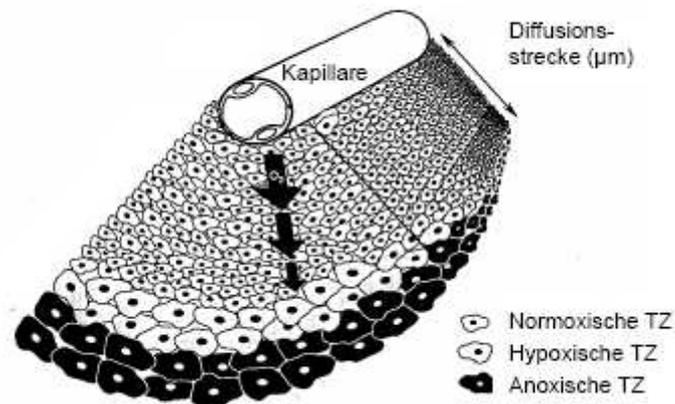


Abbildung 5: Wirkprinzip antiangiogener Therapie  
(aus siehe Quellenverzeichnis Seite 77)

Neben dem antitumorösen Effekt, der durch die Unterversorgung der proliferierenden Tumorzellen durch unterdrückte Neoangiogenese bewirkt wird, hat die Blockade der EGF-Rezeptoren auch einen Effekt auf bereits bestehende und mit Kapillaren suffizient versorgte maligne Zellen: In Vorarbeiten konnte nachgewiesen werden, dass die durch die EGF-R-Signalkaskade vermittelte Expressierung von VEGF einen direkten Überlebensfaktor für - insbesondere proliferierende - Tumorendothelzellen darstellt (73). Eine Herunterregulation dieses Signaltransduktionsweges reduziert damit die Überlebensmöglichkeit bereits bestehender Tumorgefäße und setzt auch bestehendes Karzinomgewebe der Unterversorgung und dem daraus resultierenden Zelltod aus.

## **5. Zielsetzung (eigener Abschnitt)**

Durchgeführt wurden insgesamt zwei experimentelle Versuchsreihen mit der Zielsetzung, die Antitumoreigenschaften von EMD 72000 entweder als Monotherapeutikum oder in Kombinationstherapie mit Gemcitabine, im Vergleich zur Therapie mit Gemcitabine allein oder einer Kontrollgruppe bei einem orthotop in der Nacktmaus wachsenden Tumor der Zellreihe L3.6pl unter zwei verschiedenen zeitlichen Ablaufplänen aufzuzeigen. Zum einen galt das Interesse dem antitumorösen Verhalten in Abhängigkeit zum Zeitpunkt des Beginns der Therapie, zum anderen sollte dieses Verhalten in Relation zur Gesamtdauer der Therapie gezeigt werden.

In Versuchsreihe eins erhielt jeweils eine Gruppe von 8-10 Tieren entweder EMD 72000 allein, Gemcitabine allein, EMD 72000 und Gemcitabine in Kombination, oder PBS (Phosphate buffered Saline - Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) als Kontrollgruppe, per intraperitonealer Injektion zwei Mal/Woche, beginnend zu unterschiedlichen Zeitpunkten (zwischen 8 und 28 Tagen nach Tumordinjektion).

In Versuchsreihe zwei erhielt jeweils eine Gruppe von 8-10 Tieren entweder EMD 72000 allein, Gemcitabine allein, EMD 72000 und Gemcitabine in Kombination, oder PBS (Phosphate buffered Saline – Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) als Kontrollgruppe, per intraperitonealer Injektion zwei Mal/Woche, beginnend 8 Tage nach Tumordinjektion, jedoch mit unterschiedlicher Therapiedauer (zwischen 7 und 25 Tagen). In beiden Reihen wurden die Tiere geopfert, als die Kontrollgruppe inspektorisch deutlich moribund wurde (spröde Haut, Tumorkachexie, etc.)

Die Auswertung der Ergebnisse fand durch Messung des Tiergewichts, Messung des Tumorgewichts, makroskopischer Beschreibung der Inzidenz von Lymphknotenbefall

sowie Inzidenz und Ausmaß von Lebermetastasen und Vorhandensein von Peritonealkarzinose statt. Ferner wurden die Primärtumore immunhistochemisch auf Tumorzellproliferation, Tumorzellapoptose, Aktivität der Phospho-mitogen-aktivierten Proteinkinase und Mikrogefäßdichte untersucht.

## **6. Material und Methoden**

### **6.1 Zellkultur**

Die stark metastasierende humane Pankreaskarzinom-Zelllinie L3.6pl, eine selektionierte Subpopulation der Adenokarzinom-Zellreihe COLO357, wurde in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM, 415ml) kultiviert, welches mit 5% fetalem Rinderserum (fetal bovine serum FBS, 5ml), Natriumpyruvat, nicht essentiellen Aminosäuren (10ml), L-Glutamin (10ml), einer Vitaminlösung (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, 10ml) und einer Penicillin-Streptomycin-Mischung (Flow Laboratories, Rockville MD, 5ml) erweitert wurde, um eine vollständige Nährlösung zu erstellen (= 500ml). Die Zellen wurden als Monoschicht-Kulturen in 50ml- Falcon®-Zellkulturflaschen aus Plastik gehalten und bei 37°C unter 5% CO<sup>2</sup> und 95% O<sup>2</sup> inkubiert. Die Kulturen waren jeweils frei von: Mycoplasmen, Reovirus Typ 3, Pneumonie-Virus, K-Virus, Theiler's Enzephalitis-Virus, Sendai-Virus, Minutenvirus, Maus-Adenovirus, Maus-Hepatitis-Virus, lymphozytischem Choriomeningitis-Virus, Ectromelie-Virus, und Laktat-Dehydrogenase-Virus (nach einem Assay von M. A. Bioproducts, Walkersville, MD).

Ein Wachstumszeitraum von 12 Wochen nach Auftauen aus der Tiefkühl Aufbewahrung bei -70°C wurde bei keiner Kultur überschritten.

## **6.2 Versuchstiere und orthotope Implantation**

Die benötigte Anzahl männlicher, immuninkompetenter Nacktmäuse (Balb/c nu/nu) wurde über Charles River Laboratories (Sulzfeld, BRD) bezogen (gem. Tierversuchsantragsnummer: Akt.Z: 621-2531.1-24/01). Das Alter der Tiere bei Erwerb variierte zwischen 8 und 12 Wochen, die Unterbringung erfolgte unter spezifischen apathogen Bedingungen in Käfigen unter laminarem Luftstrom in den Labors der Universität Regensburg. Über einen Zeitschaltmechanismus wurde eine künstliche Beleuchtung im Zwölf-Stundenrhythmus gewährleistet. Alle Tiere bekamen die gleiche hochkalorische und proteinreiche Diät (Sustacal, Mead Johnson Nutritionals, Evansville, Indiana) und keimfreies Wasser nach Bedarf während der gesamten Versuchsdauer.

Um das eigentliche Heranwachsen humaner Pankreaskarzinome zu induzieren, wurden L3.6pl-Zellen aus subkonfluenten Zellkulturflaschen nach folgender Prozedur geerntet: 4 ml einer Lösung mit 0,25%igem Trypsin und 0,02%igem Ethylen-diamintetraacetat (EDTA) wurden der Kultur zugefügt und 1-2 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit Medium (s.o.), welches 10% FBS enthielt, gestoppt und die Zelllösung mit serumfreiem Medium mehrfach gewaschen. Danach wurden die gelösten Zellen in Hank's balanced salt solution (HBSS) re-suspendiert und auf Vitalität unter dem Mikroskop inspektorisch kontrolliert. Nur zu mindestens 90% vitale Zelllösungen wurden bei einer durch manuelle Auszählung verifizierten Zellzahl zu  $1 \times 10^6$  Zellen in 40 µl Lösung/Maus direkt intrapankreatisch injiziert. Dazu wurde den Versuchstieren nach intraperitoneal verabreichter Kurznarkose (Gemisch aus Rompun/Ketanest/Atropin) die Peritonealhöhle operativ eröffnet, die Zellsuspension mittels Applikator injiziert und die Wunde anschließend chirurgisch verschlossen (33). Im weiteren Verlauf wurden die Tiere randomisiert, in Gruppen zu

je fünf Tieren/Käfig aufgeteilt und den einzelnen Therapie- bzw. der Kontrollgruppe(n) zugeordnet. Der Tag der operativen Tumordinjektion wird im Folgenden als Tag 0 des jeweiligen Experiments geführt.

### **6.3 Behandlungsschemata**

In Versuchsreihe 1 wurde zeitgleich am Tag 8 (nach Tumordinjektion) mit der intraperitonealen Injektion von PBS, Gemcitabine (Lilly Pharma, Gießen, BRD) 100mg/kg Körpergewicht 2x/Woche, EMD 72000 (Merck KgaA, Darmstadt, BRD) 40mg/kg Körpergewicht 2x/Woche und EMD 72000 40mg/kg Körpergewicht 2x/Woche plus Gemcitabine 100mg/kg Körpergewicht 2x/Woche für die erste Therapiegruppe begonnen. Die restlichen Gruppen, die EMD 72000 40mg/kg Körpergewicht 2x/Woche plus Gemcitabine 100mg/kg Körpergewicht 2x/Woche erhielten, wurden respektive ab Tag 15, 22 und 28 behandelt, da hierbei der Effekt des verschiedenen Therapiestarts relevant war.

In Versuchsreihe 2 wurde zeitgleich am Tag 8 (nach Tumordinjektion) mit der Injektion von PBS, Gemcitabine 100mg/kg Körpergewicht 2x/Woche, EMD 72000 40mg/kg Körpergewicht 2x/Woche und EMD 72000 40mg/kg Körpergewicht 2x/Woche plus Gemcitabine 100mg/kg Körpergewicht 2x/Woche für **alle** Mausgruppen begonnen. Da in diesem Aufbau die Therapiedauer von Interesse war, beendeten wir die wöchentlichen Injektionen am Tag 25. In den weiteren Therapiegruppen, die EMD 72000 40mg/kg Körpergewicht 2x/Woche plus Gemcitabine 100mg/kg Körpergewicht 2x/Woche erhielten, beendeten wir die Injektionen respektive bereits nach 7, 14, 21 und 25 Tagen.

#### **6.4 Versuchsende**

Am Tag 28 in Reihe eins und am Tag 25 der Reihe zwei wurden alle Versuchstiere geopfert, ihr Gewicht zum Zeitpunkt des Todes gewogen, die Peritonealhöhle operativ eröffnet und alle Primärtumore explantiert, gemessen, gewogen und photographiert. Danach wurden diese der weiteren Auswertung zugeführt, indem sie zunächst halbiert und die Hälften anschließend entweder in flüssiges Formalin eingelegt, oder in Tissue-Tec<sup>tm</sup> zur sofortigen Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff eingebettet wurden. Die Mausekadaver wurden desweiteren auf das Vorhandensein von Metastasen (Leber und/oder Lymphknoten), Wundtumoren und Peritonealkarzinose untersucht.

Die gefrorenen Frischpräparate wurden mittels eines Schlittenmikrotoms in Scheiben von 3-4µm Stärke zerteilt und auf positiv geladene SuperFrost®-Plus-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD) aufgezogen und weiterhin im Gefrierschrank verwahrt.

Die in Formalin konservierten Tumore wurden in flüssigem Paraffin eingebettet und nach Aushärtung ebenfalls geschnitten und auf handelsübliche Objektträger aufgezogen.

Beide Formen der Präparatschnitte wurden im weiteren Verlauf der entsprechenden immunhistologischen Auswertung zugeführt (s.u.).

## **7. Immunhistologische Anfärbungen**

Durchgeführt wurden: histopathomorphologische Untersuchung mittels Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (H&E), Nachweis apoptotischer Zellen mittels DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI, U.S.A.), colorimetrischer Nachweis der Mikrogefäßdichte (microvessel density, MVD) über CD31-Färbung, Nachweis proliferierender Zellen durch *Ki67*-Färbung und immunhistochemischer Nachweis von Phospho-p44/42 MAP-Kinase-Aktivität

### **7.1 Hämatoxylin - Eosin (HE) – Färbung: Pathologische Identifizierung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist die klassische Routinefärbung des histologisch pathologischen Labors. Diese Färbung dient der Veranschaulichung und inspektorisch mikroskopischen Untersuchung der Tumormorphologie.

Die beiden Farbkomponenten Hämalaun und Erythrosin unterscheiden sich hierbei in ihrer Affinität zu azidophilen und basophilen Strukturen.

Je ein Schnitt eines jeden Tumorpräparats (Paraffinschnitte) wurde mit einer H&E-Färbung behandelt. Die Vorbehandlung erfolgte in einem Hämatoxylin-Bad für 5 min. Auf die Präparate wurde anschließend destilliertes Wasser aufgebracht. Nach 1 Minute färbten sich die Schnitte bläulich.

Als nächster Schritt erfolgte die Behandlung des Zytoplasmas. Damit dieses rötlich erscheint, wurden die Gewebeschnitte für wenige Sekunden in ein Eosin-Bad getaucht und für 1 min dort belassen. Danach wurde wiederum für 1 min destilliertes Wasser aufgeträufelt. Die Gewebeschnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend mit einem Tropfen Aquatex™ (Merck

KgaA, Darmstadt, BRD) und einem Deckglas 24 x 50 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD) abgedeckt. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop.

## **7.2 DeadEnd<sup>tm</sup> Fluorometric TUNEL System: Apoptosenachweis**

Apoptose (definiert als programmierter Zelltod) ist ein physiologischerweise vorkommender Prozess, der dazu beiträgt, die Homöostase eines Organismus' aufrecht zu erhalten. Eine Zelle kann Apoptose in einer benachbarten Zelle durch Signalwege wie z.B. bei der Fas und Fas-Liganden-Interaktion auslösen. Die apoptotisch werdenden Zellen verdichten die Desoxyribonucleinsäure (DNS) ihres Zellkerns, die dabei fragmentiert. In der Analyse mittels DeadEnd<sup>tm</sup> Fluorometric TUNEL System wird diese fragmentierte DNS durch ein Enzym, der terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT), mit fluoreszierenden Uridintriphosphaten (dUTP's) gebunden und somit mikroskopisch sichtbar gemacht (34).

Dazu wurden (entsprechend Promega-Kit, Technical Bulletin No.235) je ein Schnitt je Tumorpräparat (Gefrierschnitte) sukzessive in jeweils gekühltem reinem Aceton für 5 min, einer 1:1 Aceton/Chloroform-Mischung für 5 min und wieder in reinem (und frischem) Aceton für 5 min fixiert. Anschließend wurde jedes Präparat 2x für je 3 min mit PBS gewaschen und mit 4%igem Paraformaldehyd in 96% methanolfreiem PBS für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine erneute Waschung 2x je 5 min mit PBS und eine Inkubation der Präparate für 15 min bei Raumtemperatur mit 0,2%igem TritonX-100 (Sigma Aldrich Chemical Co, St Louis, MO, U.S.A.) in 98,8% PBS. Es wurde noch 2x je 5 min mit PBS gewaschen und die Präparate dann mit ca. 80µl „Equilibration buffer“ aus dem TUNEL-Kit für 10 min vollständig bedeckt.

In diesem Zeitraum taute der Nucleotid-Mix aus dem TUNEL-Kit auf, alle weiteren Schritte erfolgten zur Bewahrung der Fluoreszenz-Fähigkeit in der Dunkelkammer:

Zuerst wurde der Equilibrationspuffer möglichst vollständig entfernt und statt dessen eine Mischung aus 1µl TdT-Enzym, 5µl Nucleotid-Mix und 45µl Equilibrationspuffer aufgetragen, die Präparate mit den ebenfalls aus dem Kit stammenden Plastic coverslips bedeckt und anschließend für 60 min bei 37°C in der lichtfreien Wärmekammer inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde 20X-SSC-Lösung aus dem Kit im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Davon wurde nach Ablauf der 60 min und Entfernen der coverslips je ein dicker Tropfen pro Objektträger appliziert und für 15 min inkubiert. Danach wurde 3x je 5 min mit PBS gewaschen und jedes Präparat mit einem Tropfen Prolong Solution™ (Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.) versehen, mit einem Deckglas 24 x 50 mm (Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD) abgedeckt und bis zur Auswertung unter dem Mikroskop unter Lichtschutz verwahrt.

### **7.3 Ki67-Färbung: Proliferationsnachweis**

Der Antikörper *Ki67* („Ki“ steht dabei für Kiel und weist auf das Institut für Pathologie der Kieler Universitätsklinik hin) dient als spezifischer Marker für die Zellproliferation in Geweben. *Ki67* wurde ursprünglich während der Herstellung von spezifischen Markern für Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen isoliert und reagiert mit einem Antigen, das nur in den Kernen proliferierender Zellen (G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>-Phase und Mitose) exprimiert wird, jedoch nicht in ruhenden Zellen der G<sub>0</sub>-Phase. Die Färbung für *Ki67* gibt also mittelbar Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit z.B. eines Tumors.

Die Durchführung erfolgt mit je einem Schnitt je Tumorpräparat (Paraffinschnitte). Um das Paraffin zu entfernen wurden diese bei 72°C für 20 Minuten in einem Ofen (Haereus, BRD) erwärmt und nachfolgend in einer absteigenden Alkoholreihe mit

Xylol-, 100%igem Alkohol- und 96%igem Alkohol-Bad für je 5min fixiert. Nach Waschen der Schnitte, 2x je 5 min mit PBS, erfolgte die Vorbehandlung der Präparate in einer Mikrowelle für 15 min bei 750 Watt in 10mM Citrat-Puffer (pH-Wert 6,0). Anschließend wurden die Objektträger 3x je 5 min mit PBS gewaschen und 15 min in 3%igem Wasserstoffperoxid in 97% Methanol (beide: Merck KGaA, Darmstadt, BRD) bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu hemmen.

Der primäre Antikörper, ein polyklonaler anti-humaner Antikörper des Hasen gegen *Ki67* (Zymed, CA, U.S.A.), wurde in einer Verdünnung von 1:75 auf die Schnitte aufgebracht und für 120 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde ein sekundärer biotinylierter Ziegen-anti-Hasen-Antikörper (Vector Laboratories, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:200 für 60 min bei Raumtemperatur auf die Präparate aufgetragen, gefolgt von einer Inkubation mit einem Avidin-biotinylierten Meerrettich-Peroxidase-Komplex aus dem ABC-Kit von Vector Laboratories (CA, U.S.A.). Zwischen sieben und zehn "high power fields" (hpf; 0.159 mm<sup>2</sup>) pro Schnitt von 3–5 Tumoren je Behandlungsgruppe wurden mikroskopisch unter 20-facher Vergrößerung untersucht und die durchschnittliche Anzahl der *Ki67*-positiv gefärbten Zellen ausgezählt.

#### **7.4 CD31 microvessel density (Mikrogefäßdichte) – Colorimetrische Färbung**

Bei der immunhistologischen Anfärbung des Cluster Determinants 31 (CD 31) handelt es sich um die Darstellung nicht tumorspezifischer Mikrogefäßdichte eines Gewebeschnittes über die Bindung eines Antikörpers an das Gefäßendothel-spezifische Oberflächenantigen CD31.

Dazu wurden je ein Schnitt je Tumorpräparat (Gefrierschnitte) sukzessive in jeweils gekühltem reinem Aceton für 5 min, einer 1:1 Aceton/Chloroform-Mischung für 5 min und wieder in reinem (und frischem) Aceton für 5 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für je 3 min wurden die Präparate anschließend mit 3% Wasserstoffperoxid in 97% Methanol für 12 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde erneut für 3x je 3 min mit PBS gewaschen, gefolgt von einer Applikation von 5% normal horse serum (Pferdeserum), 1% goat serum (Ziegenserum) in 94% PBS als Proteinblocklösung für 30 min ebenfalls bei Raumtemperatur. Nach Abtropfen bzw. -tupfen der Blocklösung wurde der Primärantikörper (CD31/PECAM-1 Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.), in Proteinblocklösung im Verhältnis 1:200 Antikörper : Proteinblocklösung verdünnt aufgetragen und über Nacht (für mindestens 12h) bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte zuerst eine erneute Waschung 3x für je 3 min mit PBS, gefolgt von einer Inkubation mit Proteinblocklösung für 10 min bei Raumtemperatur. Danach wurde wieder 3x für je 3 min mit PBS gewaschen und der sekundäre Antikörper (peroxidase conjugated goat-anti-rat IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, CA, U.S.A.), in Proteinblocklösung im Verhältnis 1:200 Antikörper:Proteinblocklösung verdünnt aufgetragen und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgte wiederum Waschen 3x für je 3 min mit PBS, woraufhin eine Lösung bestehend aus 20µl Tween 80 (Sigma Aldrich Chemical Co, St Louis, MO, U.S.A.) in 50 ml PBS, auf jedes Präparat aufpipettiert wurde und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Lösung abgetropft und mit Zellstofftüchern abgetupft.

Im nächsten Schritt wurde jedem Objektträger eine Lösung, gemäß der Anleitung des AEC-Kit hergestellt, zugefügt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Objektträger kurz mit destilliertem Wasser gespült und mit Tween 80 (20µl gelöst in 50ml destilliertem Wasser) für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Flüssigkeit auf den Objektträgern mit Zellstoff abgetupft und je Präparat ein Tropfen Gill's Hämatoxylin No. 3 (Sigma Aldrich Chemical Co, St.Louis, MO, U.S.A.) für exakt 1 min hinzugefügt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Schnitte sofort mit destilliertem Wasser gründlich gespült und an der Raumluft getrocknet.

Abschließend wurde den Schnitten je ein Tropfen Aquatex<sup>tm</sup> (Merck KgaA, Darmstadt, BRD) zugefügt, ein Deckglas (Menzel - Gläser 24 x 50mm) aufgebracht und damit das Präparat bedeckt. Die Auswertung bzw. Auszählung erfolgte unter dem Mikroskop.

### **7.5 Phospho-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)**

Der Aktivitätslevel der MAP-Kinase stellt einen indirekten Marker für die Aktivierung des EGF-R-Signalweges und somit für die erfolgreiche Inhibition der Rezeptoren dar. Zur Identifizierung der Phospho-p44/42 MAP-Kinase wurden in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte verwendet. 3 µm starke Sektionen wurden dafür auf positiv geladene SuperFrost® Plus-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD) aufgezogen. Die immunhistochemische Anfärbung wurde dann mit der Deparaffinisierung der Schnitte begonnen und mittels dem Färbeinstrument Discovery<sup>TM</sup> (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, USA) durchgeführt. Nach der Deparaffinisierung folgte eine Erhitzung der Präparate für insgesamt 30 Minuten in Tris Ethylenamidetetraacetat(EDTA)-Puffer (pH 8) gemäß dem Standard CC1-Verfahren laut Discovery<sup>TM</sup>. Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde anschließend durch Inkubation in 1%igem Wasserstoffperoxid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB Map<sup>TM</sup> Kit,

760-124, Ventana Medical Systems). In der Folge wurden die Schnitte zuerst mit dem primären polyklonalen antihumanen Phospho p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Kaninchenantikörper (9101, New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) in einer Verdünnung von 1:50 für insgesamt 32 Minuten bei 37° C inkubiert und anschließend mit dem biotinkonjugierten sekundären anti-Kaninchen Ziegenantikörper (goat anti-rabbit IgG, BA-1000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:500 für insgesamt 8 Minuten bei 37°C.

Eine positive Reaktion konnte durch Inkubation mit Merrettich-Peroxidase-konjugiertem Streptavidin und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB Map™ Kit) sichtbar gemacht werden. Zuletzt erfolgt eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (DAB Map™ Kit) und die Fixierung der Präparate mittels VectaMount™ Fixierungsmedium (Vector Laboratories).

Für die Quantifizierung der immunhistochemischen Reaktionsintensität wurde das Absorptionsverhalten positiv gefärbter Areale (sog. „hot spots“) in den Tumorschnitten unter Verwendung der Leica Bildanalyse-Software Quantimet 500 Qwin (Version V02.00B, Leica Microsystems, Bensheim, BRD) gemessen, wobei 30 zufällig ausgewählte 0,047 mm<sup>2</sup>-Felder unter 20-facher Vergrößerung herangezogen wurden. Da keinerlei Gegenfärbung für densitometrische Evaluation erfolgt war, konnte die Absorption einzig und allein dem Ergebnis der immunhistochemischen Reaktion zugeschrieben werden. Das Bildanalyzesystem wurde dem Standardwert für optische Dichte (OD) von 0.1, 0.3, 0.6 und 0.9 kalibriert.

## **7.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung umfaßte das Primärtumorgewicht, das Gesamtkörpergewicht der Versuchstiere sowie die Quantifikation von *Ki-67* und CD31 mittels einem Einwege-ANOVA mit einem „Student-Newman-Keuls multiple comparisons test“ (InStat 3.0 Statistical Software, Graphpad Software, San Diego, CA, USA) Die gewonnenen Daten entsprechen Mittelwerten plus/minus der Standardabweichung.

Die relative Rate von Leber- und Lymphknotenmetastasen innerhalb der Gruppen wurden mittels „Fisher's exact test“ verglichen. Für alle Analysen wurde  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

Die statistische Analyse der immunhistochemischen Bestimmung der Phospho-p44/42 MAP-Kinase-Aktivität wurde mittels Mann-Whitney U-Test (2-Wege) durchgeführt. Die gewonnenen Daten sind Mittelwerte plus/minus Standardabweichung.

## **8. Ergebnisse**

### **8.1 Ergebnisbeschreibung**

Im ersten Versuchsaufbau, der Untersuchung der Abhängigkeit der Therapieeffektivität vom Zeitpunkt des Therapiebeginns, zeigte die Behandlung der Versuchstiere mit 40mg/kg Körpergewicht EMD 72000 2x/Woche als Monotherapeutikum eine signifikante Reduktion der primären Tumorlast des Pankreaskarzinoms verglichen mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe (Tabelle 3). Die Effektivität der Behandlung mit EMD 72000 erwies sich dabei als vergleichbar zu den Ergebnissen der Gruppe unter Gemcitabine-Therapie (100mg/kg Körpergewicht 2x/Woche), bei Beginn der Therapie am Tag 8 nach Tumorzellinjektion.

Im direkten Vergleich mit Gemcitabine, dem zur Zeit gängigsten Chemotherapeutikum des Pankreaskarzinoms, zeigten sich unter EMD 72000-Therapie deutlich weniger Lymphknotenmetastasen. Die Kombination dieser beiden Wirkmechanismen ab Tag 8 erbrachte einen kumulativen Effekt auf das Wachstum des Primärtumors. Darüber hinaus konnte eine verringerte Häufigkeit von Leber- und besonders Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden.

Der Unterschied im Zeitpunkt des Therapiebeginns erwies sich bei den restlichen Kombinationstherapiegruppen als nachteilig in Bezug auf Tumorwachstum und Metastaseninzidenz, je später mit der Therapie begonnen worden war (Tabelle 3, Abbildung 6a,b). Dennoch reduzierte sich selbst in den Gruppen, die erst 15 bzw. 22 Tage nach Tumorzellinjektion zur Therapie anstanden und somit bereits eine stark vergrößerte Tumorlast aufwiesen, das Wachstum des Primärtumors im Vergleich zur Kontrollgruppe. Darüber hinaus zeigte sich die Kombinationstherapie, begonnen 15 Tage nach Versuchsbeginn, immer noch genauso effektiv wie die Monotherapie mit

EMD 72000 oder Gemcitabine allein, begonnen 7 Tage vorher (am Tag 8 nach Injektion).

Ähnlich dem ersten Versuchsaufbau (siehe Tabelle 3 und Abbildung 6a,b), konnte in der zweiten Versuchsdurchführung unter Monotherapie mit EMD 72000 erneut eine signifikante Reduktion des primären Tumorgewichts im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden; es war über die gesamte Versuchsdauer (25 Tage) betrachtet ebenso effektiv wie Gemcitabine allein. Im zweiten Experiment zeigte sich jedoch eine signifikante Reduktion der Inzidenz von Lymphknotenmetastasen unter EMD 72000-Monotherapie wohingegen Gemcitabine sich in beiden Versuchsreihen als absolut uneffektiv hinsichtlich Lymphknotenmetastasen erwies. Die Kombination aus EMD 72000 und Gemcitabine über 25 Tage resultierte in einer verstärkten Gewichtsreduktion des Pankreas-Primärtumors mit wesentlich geringerer Leber- sowie Lymphknotenmetastasenhäufigkeit im Vergleich zu den Kontrolltieren oder den Tieren der Monotherapiegruppen.

Das Verkürzen der Behandlungsdauer von 25 auf 14 Tage hatte keinen Einfluss auf die Effektivität der Therapie. Allein bei Verkürzung auf 7 Tage wurde ein dezenter Wirkungsverlust in Bezug auf das Wachstum der Primärtumoren (Tabelle 4, Abbildung 7a,b), was dennoch dem Erfolg beider Monotherapien gleichkam.

Immunhistochemische Färbungen auf Zellproliferation (*Ki67*) und Mikrogefäßanschnittsdichte (CD31) wurden 22 Tage nach Therapiebeginn mit EMD 72000, Gemcitabine, EMD 72000 plus Gemcitabine sowie PBS (Kontrollgruppe) durchgeführt (Abbildung 8a,b und 9a,b). Es zeigten sich bei den Tumoren unter EMD 72000 allein und unter Kombinationstherapie mit EMD 72000 und Gemcitabine signifikante Rückgänge sowohl in der Anzahl der proliferierenden Zellen als auch in der Dichte der Mikrogefäßbildung im Vergleich zu den Tumoren unter Gemcitabine allein oder den Kontrolltumoren. Die durchschnittliche Zahl proliferierender Zellen lag

bei  $273 \pm 22$ ,  $113 \pm 16$ , und  $77,3 \pm 12$  in Pankreaskarzinomen unter respektive Gemcitabine-, EMD 72000- und EMD72000+Gemcitabine-Therapie, gegenüber  $273 \pm 31$  bei den Kontrolltumoren (Abbildung 8a,b).

Die durchschnittliche Anzahl CD31-positiver Endothelzellen lag bei  $58,7 \pm 8$ ,  $27,1 \pm 6,5$ , und  $14 \pm 4,3$  in Pankreaskarzinomen unter respektive Gemcitabine-, EMD 72000- und EMD72000+Gemcitabine-Therapie, gegenüber  $52,8 \pm 11,3$  bei den Kontrolltumoren (Abbildung 9a,b).

Zusätzlich dazu wurde die Blockade der durch den EGF-Rezeptor vermittelten Signalkaskade durch immunhistochemische Färbung von Phospho-p42/p44 mitogen aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) bestimmt, einem Marker der Aktivierung des EGF-Rezeptors.

Ähnlich der Ergebnisse der *Ki67*- und CD31-Färbungen erwies sich die Kombinationstherapie aus EMD72000 und Gemcitabine als potenter in der Aktivierungshemmung von p42/44 als Monotherapie mit einem der beiden Substanzen sowie im Vergleich zu den Kontrolltumoren. Eine signifikante Reduktion der Dichte der Phospho-MAPKinase-gefärbten Bereiche in L3.6pl-Tumoren in Kontrast zu den Tumoren der Kontrolle konnte vor allem nach 22 Tagen Kombinationstherapie EMD 72000 und Gemcitabine gezeigt werden, beide Therapeutika allein hatten nur einen marginalen Effekt (Abbildung 10a,b).

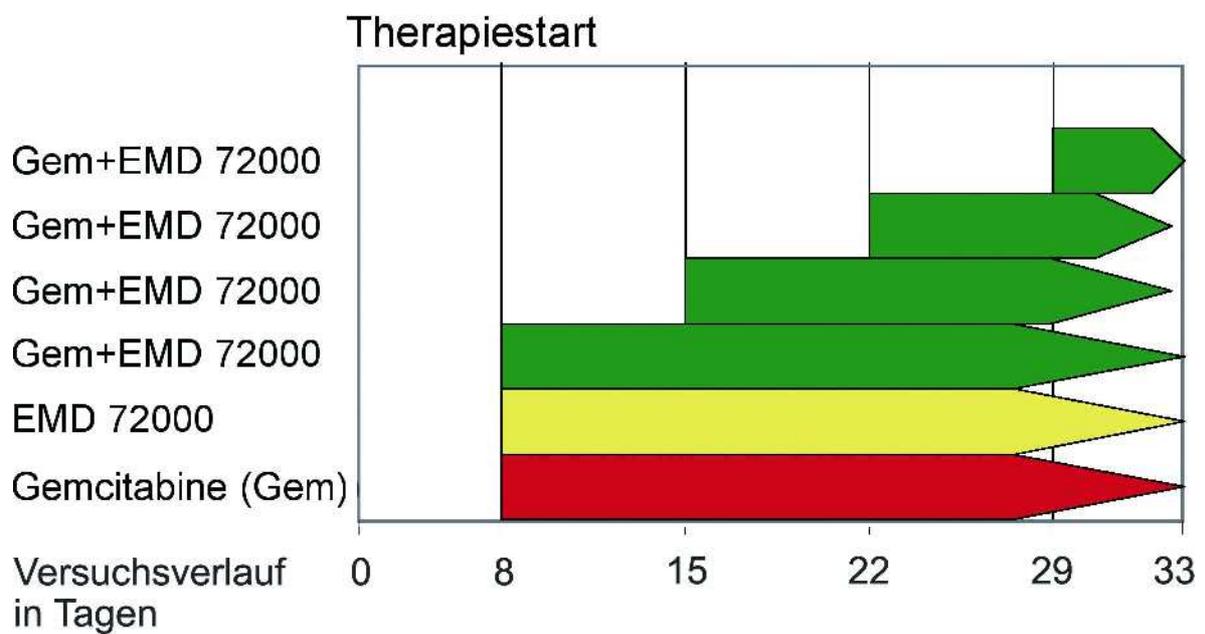
Ein rein qualitativer Nachweis von therapeutischer Apoptoseinduktion mittels DeadEnd<sup>tm</sup> Fluorometric TUNEL System zeigte einen kumulativen Effekt beider Agenzien im Vergleich zur Kontrollgruppe, ein quantitativer Nachweis war zum aktuellen Zeitpunkt technisch organisatorisch nicht möglich (Abbildung 10).

## 8.2 Abbildungen und Tabellen

### Abbildung 6:

### Abbildung 6a:

Behandlungsschema zur Effizienzbestimmung von EMD 72000 und Gemcitabine jeweils als Mono- und Kombinationstherapie gegen humane Pankreaskarzinome (xenografts) in der Nacktmaus. Der Einfluss des unterschiedlichen Therapiebeginns sollte hierbei ermittelt werden.



**Tabelle 3:**

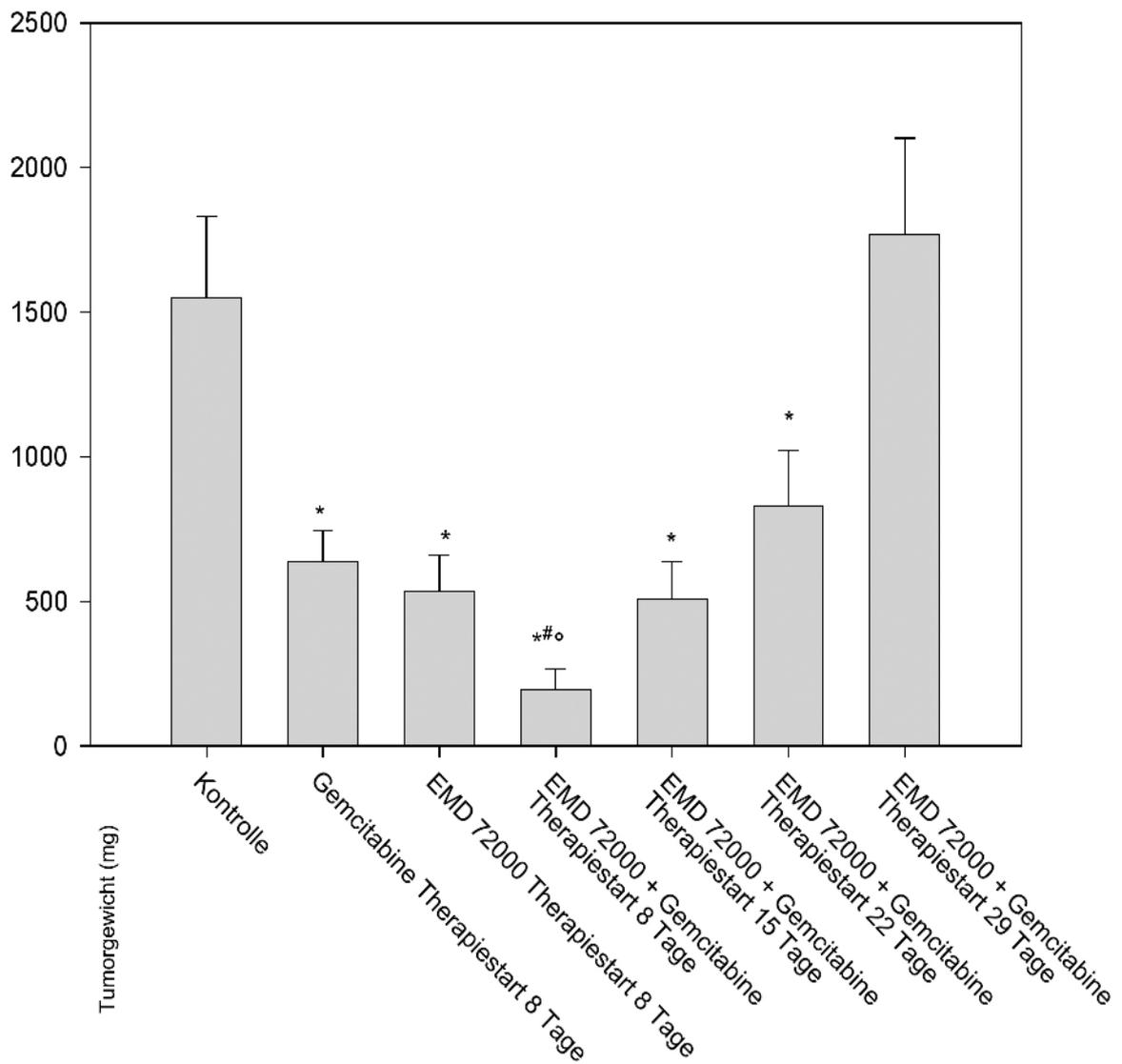
Therapeutischer Effekt von EMD 72000 und Gemcitabine in Abhängigkeit von unterschiedlichen Therapiestartzeitpunkten

Therapie	Therapie-Start	Auftreten von				Durchschn. Tumorgewicht	Durchschn. Körpergewicht
		Pankreas-tumoren	Leber Met.	Lymph-knoten Met.	Peritoneal-karzinose	± StAbw mg	± StAbw g
Kontrollgruppe	-	9/9	4/9	9/9	3/9	1551 ± 279	25.1 ± 2.3
EMD 72000 + Gem	Tag 29	8/8	6/8	8/8	5/8	1770 ± 331	18.7 ± 1.4*
EMD 72000 + Gem	Tag 22	8/8	0/8	7/8	1/8	832 ± 190*	22.4 ± 1.6
EMD 72000 + Gem	Tag 15	10/10	1/10	7/10	0/10	508 ± 130*	21.6 ± 1.5
EMD 72000 + Gem	Tag 8	10/10	1/10	3/10*	0/10	194 ± 73*	22.8 ± 1.7
EMD 72000	Tag 8	8/8	2/8	5/8	1/8	537 ± 123*	23.9 ± 1.6
Gemcitabine (Gem)	Tag 8	6/6	3/6	6/6	1/6	640 ± 104*	18.8 ± 1.9*

Student t-test; jedes p zumindest < 0.05

**Abbildung 6b:**

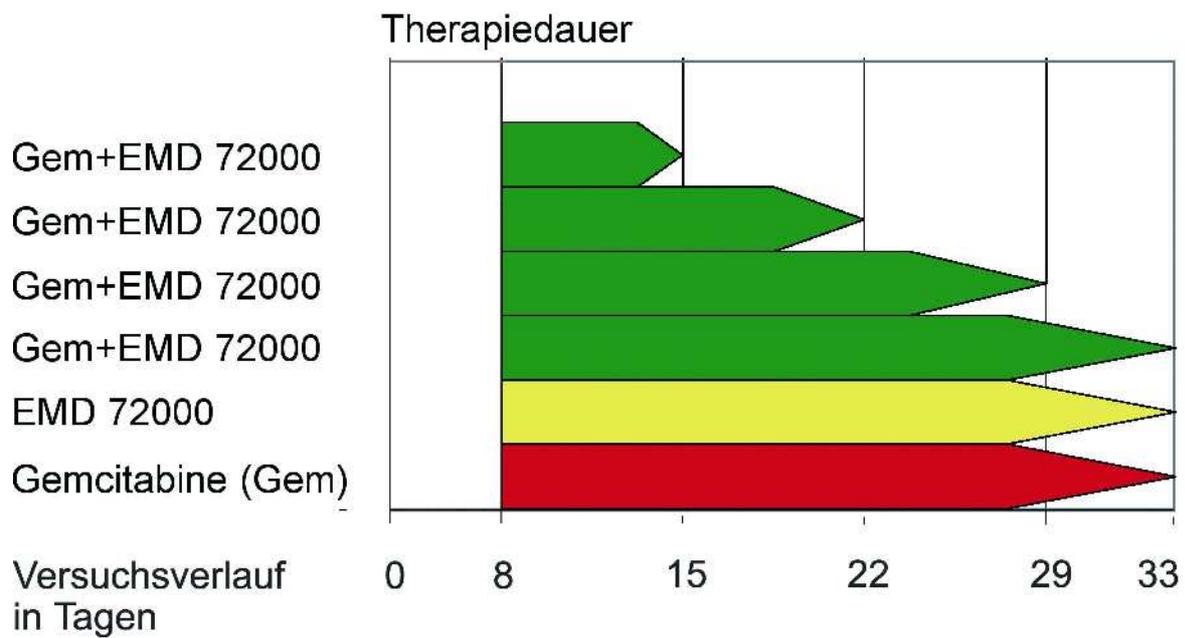
Therapeutischer Effekt von EMD 72000 und Gemcitabine auf das Wachstum der Primärtumoren unter Berücksichtigung unterschiedlicher Therapiestartzeitpunkte.



**Abbildung 7:**

**Abbildung 7a:**

Behandlungsschema zur Effizienzbestimmung von EMD 72000 und Gemcitabine jeweils als Mono- und Kombinationstherapie gegen humane Pankreaskarzinome (xenografts) in der Nacktmaus. Der Einfluss unterschiedlicher Therapiedauer sollte hierbei ermittelt werden.



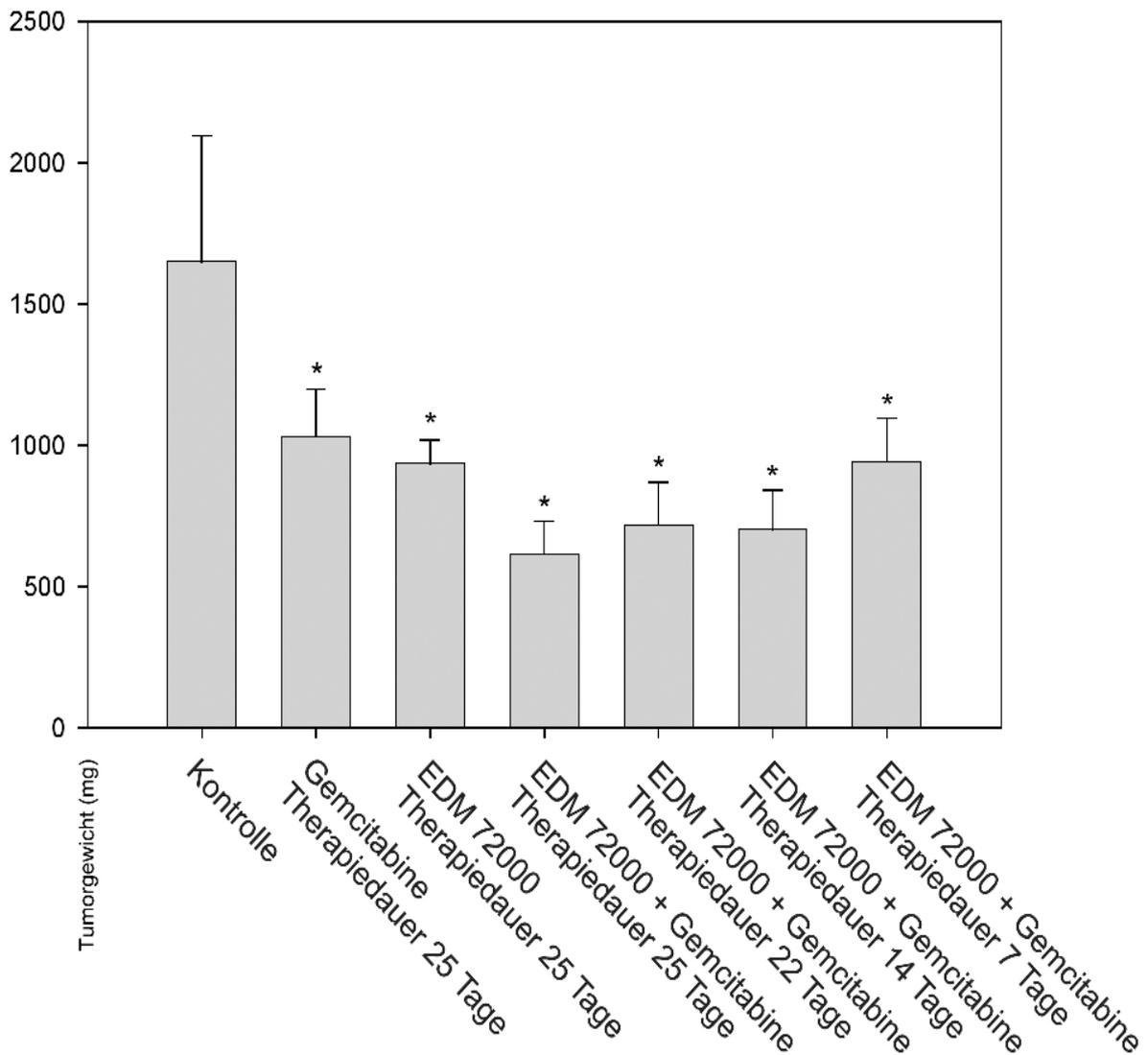
**Tabelle 4:**

Therapie unter EMD 72000 und Gemcitabine in Abhängigkeit zur unterschiedlichen  
Therapiedauer

Therapie	Therapie Dauer	Auftreten von				Durchschn. Tumorgewicht	Durchschn. Körpergewicht
		Pankreas- tumoren	Leber Met.	LK Met.	Peritoneal- karzinose	± StAbw mg	± StAbw g
Kontrollgruppe	-	8/8	3/8	8/8	1/8	1650 ± 445	22 ± 4
EMD 72000 + Gem	7 Tage	10/10	0/10	5/10	0/10	942 ± 152*	24 ± 1
EMD 72000 + Gem	14 Tage	10/10	0/10	8/10	0/10	701 ± 140*	24 ± 1
EMD 72000 + Gem	21 Tage	10/10	3/10	7/10	1/10	717 ± 152*	21 ± 4
EMD 72000 + Gem	25 Tage	10/10	0/10	3/10*	1/10	614 ± 177*	21 ± 4
EMD 72000	25 Tage	10/10	1/10	5/10*	2/10	935 ± 84*	24 ± 1
Gemcitabine (Gem)	25 Tage	9/9	3/9	9/9	0/9	1032 ± 165*	21 ± 2

**Abbildung 7b:**

Der therapeutische Effekt von EDM 72000 und Gemcitabine auf das Wachstum der Primärtumoren unter Berücksichtigung unterschiedlicher Therapiedauer.

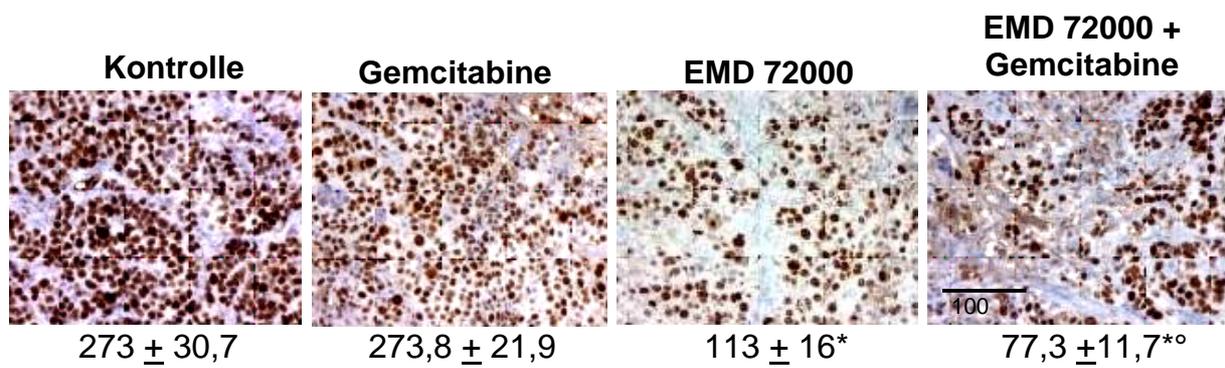


### 8. 3 Immunhistochemische Analysen

#### Abbildung 8:

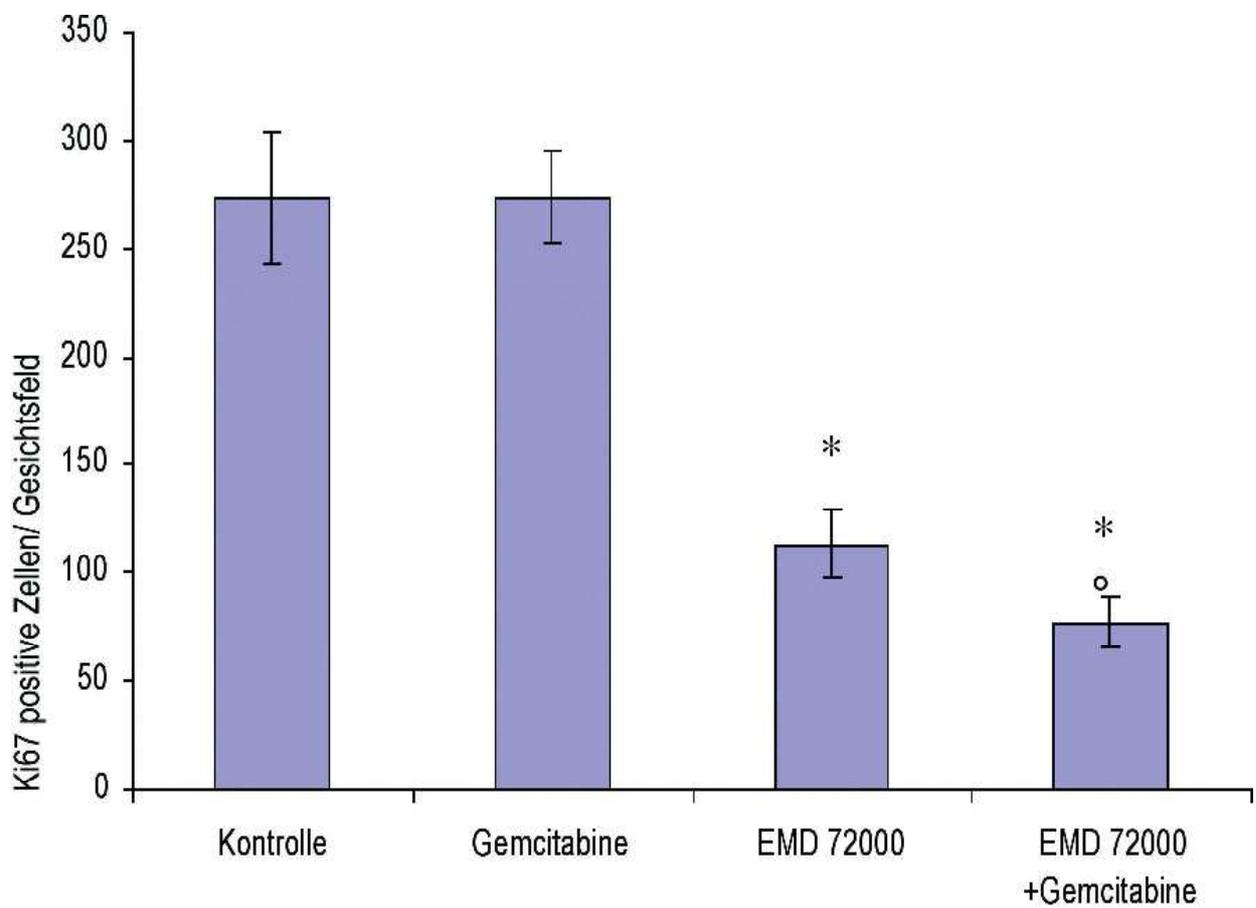
#### Abbildung 8a:

Imunhistochemische Färbung der primären Pankreastumoren auf Zellproliferation (Ki67) nach 22 Tagen Therapie mit EMD 72000, Gemcitabine, EMD 72000 plus Gemcitabine und Kontrolle (PBS).



**Abbildung 8b:**

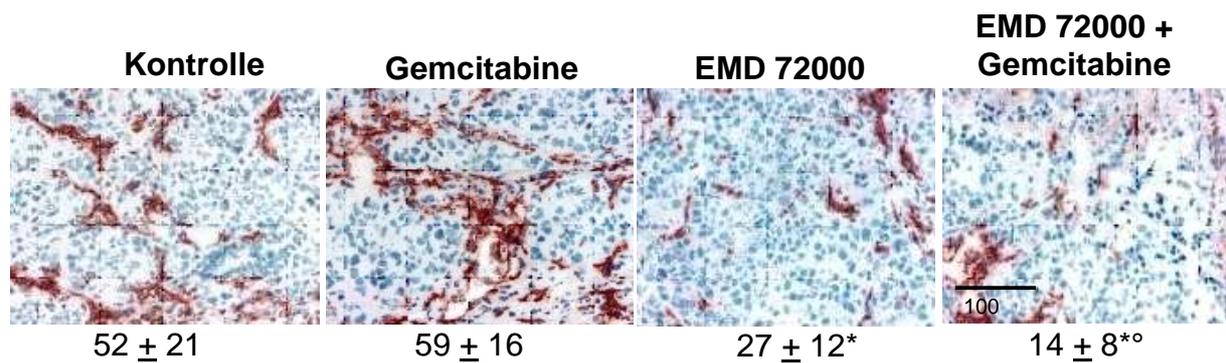
Quantifizierung *Ki67*-positiver Zellen in den primären Pankreastumoren nach 22 Tagen Therapie mit EMD 72000, Gemcitabine, EMD 72000 plus Gemcitabine und Kontrolle (PBS). EMD 72000, EMD 72000 plus Gemcitabine im Vergleich zur Kontrolle \* $p < 0.0001$ , EMD 72000 plus Gemcitabine im Vergleich zu EMD 72000  $p < 0.0001$



**Abbildung 9:**

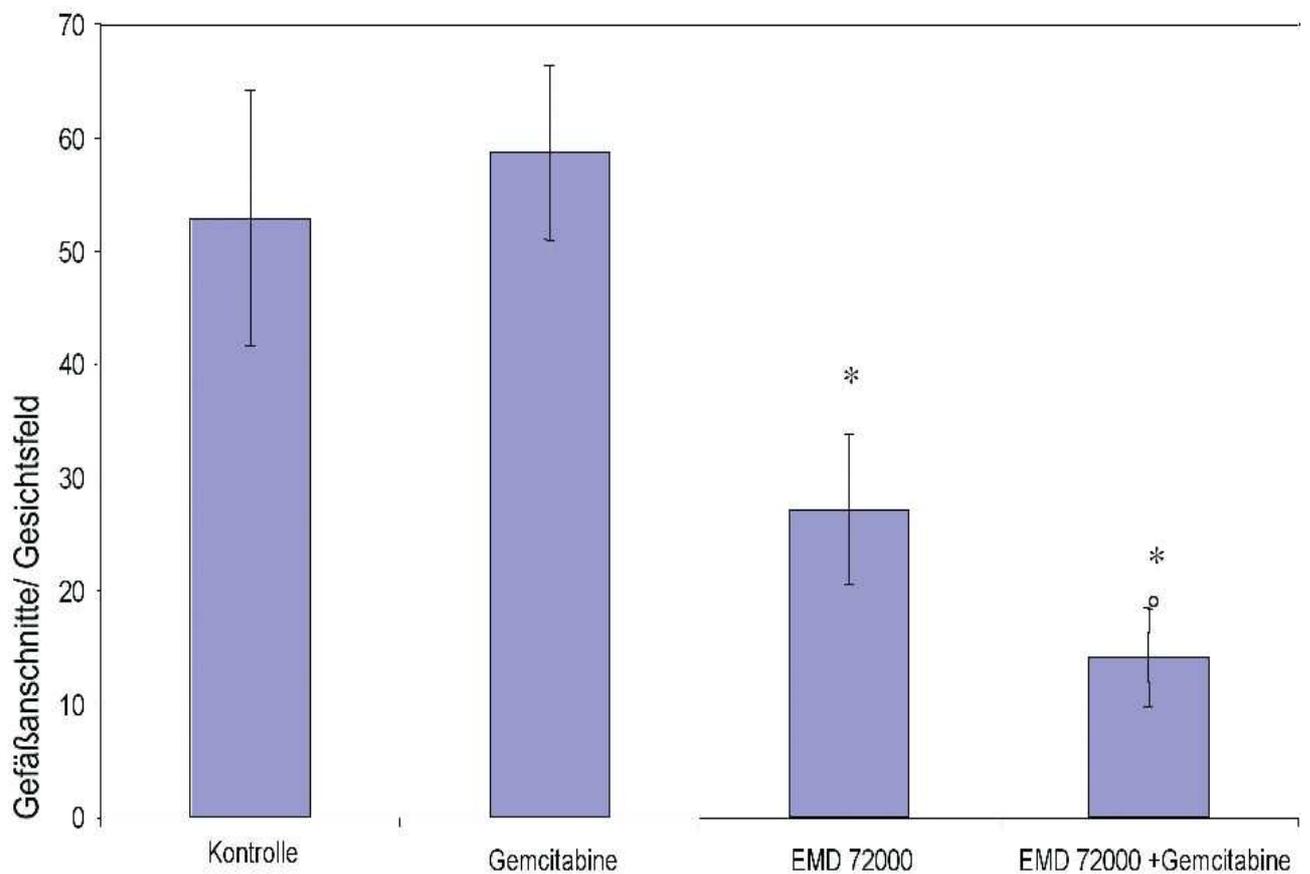
**Abbildung 9a:**

Imunhistochemische Färbung der primären Pankreastumore auf Mikrogefäßanschnittsdichte (CD31) nach 22 Tagen Therapie mit EMD 72000, Gemcitabine, EMD 72000 plus Gemcitabine and Kontrolle (PBS). Repräsentative Bilder unter 100x Vergrößerung.



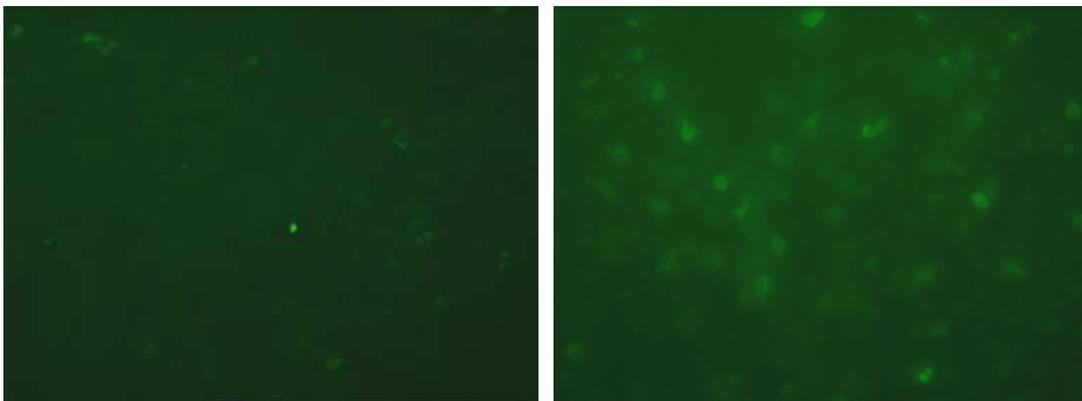
**Abbildung 9b:**

Quantifizierung der Mikrogefäßanschnittsdichte in den primären Pankreastumoren nach 22 Tagen Therapie EMD 72000, Gemcitabine, EMD 72000 plus Gemcitabine und Kontrolle (PBS). EMD 72000, EMD 72000 plus Gemcitabine im Vergleich zur Kontrolle \* $p < 0.0001$ , EMD 72000 plus Gemcitabine im Vergleich zu EMD 72000  $p < 0.0001$



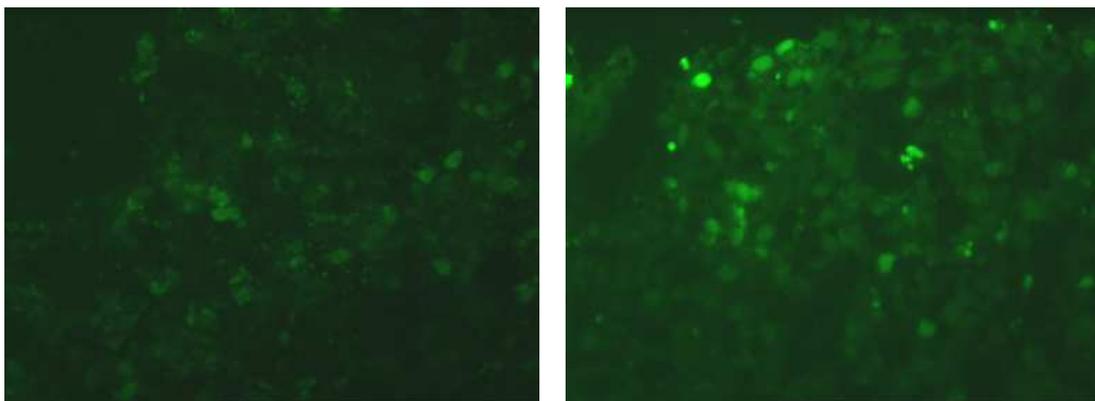
**Abbildung 10:**

DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (s.o.) zum qualitativen Nachweis apoptotischer Zellen nach 22 Tagen Therapie mit EMD 72000, Gemcitabine, EMD 72000 plus Gemcitabine und Kontrolle (PBS). Repräsentative Bilder unter dem Fluoreszenzmikroskop.



Kontrolle

Gemcitabine



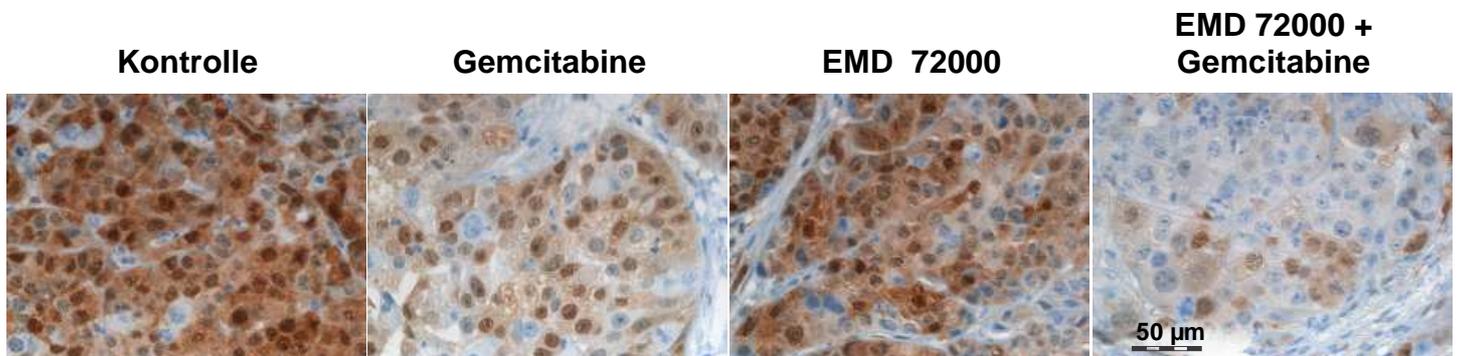
EMD 72000

EMD72000 + Gemcitabine

## **Abbildung 11:**

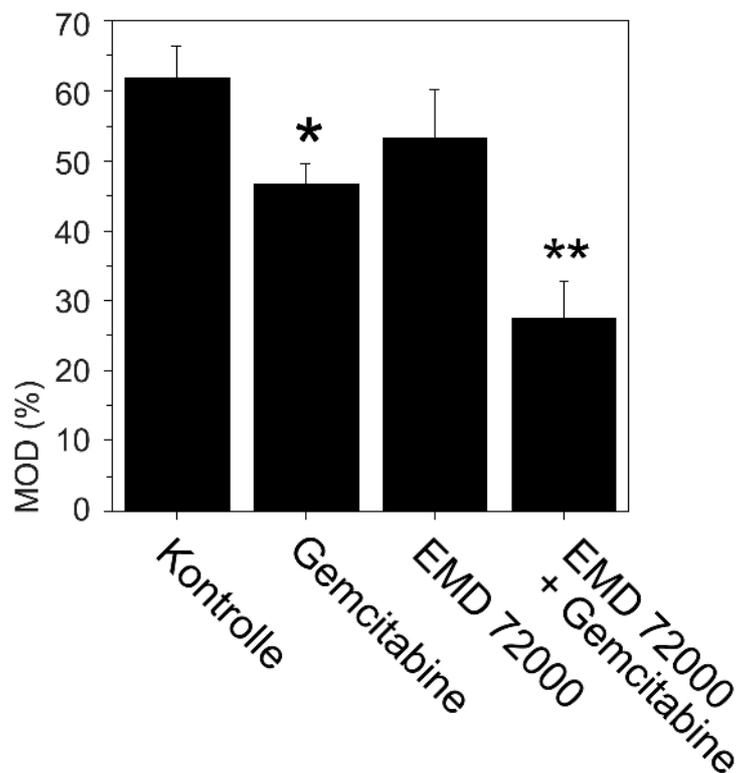
### **Abbildung 11a:**

Immunhistochemische Färbung auf aktivierte mitogenaktivierte Protein-Kinase (MAPK) in Tumorbereichen von L3.6pl Tumoren nach 22 Tagen Therapie mit EMD 72000, Gemcitabine, EMD 72000 plus Gemcitabine und Kontrolle (PBS). Die Tumore wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Phospho-Thr202/Tyr204 Peptid der p44/42 MAPK gefärbt und die größere Immunoreaktivität in der Kontrolle im Vergleich zu Gemcitabine- und EMD 72000 plus Gemcitabine-behandelten Gruppe.



**Abbildung 11b:**

Die mittlere optische Dichte (mean optical density, MOD) der Phospho-p44/42 Immunreaktionsintensität in den primären Pankreastumoren nach 22 Tagen Therapie mit EMD 72000, Gemcitabine, EMD 72000 plus Gemcitabine und Kontrolle (PBS). \* $p < 0.05$  und \*\* $p < 0.01$  im Vergleich zur Kontrolle. Bars, SEM.



## **9. Diskussion**

Karzinome des exokrinen Pankreas bleiben weiterhin ein großes gesundheitliches Problem mit Mortalitätsraten, die den Inzidenzraten nahezu identisch sind. Dies ist zum Teil auf die Schwierigkeiten der Diagnosestellung, die Aggressivität der Pankreaskarzinome, die frühe Metastasierung und den Mangel an effektiven systemischen Therapiemöglichkeiten zurückzuführen (47-50). Schätzungsweise lediglich 1-4% der an einem Adenokarzinom des Pankreas Erkrankten überleben die ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung (47). Das Ausmaß der Erkrankung wird am besten in „resektabel“, „lokal fortgeschritten“ oder „metastasiert“ eingeteilt mit einer medianen Überlebenszeit von respektive 15-19 Monaten, 6-10 Monaten und 3-6 Monaten, wobei zum Zeitpunkt der Erstdiagnose über 80% der Patienten entweder als lokal fortgeschritten oder sogar bereits metastasiert einzustufen sind (47-50).

Gemcitabine (Difluorodeoxycytidine), ein Pyrimidin-Antimetabolit und das am weitesten verbreitete und akzeptierte „first-line“ Therapeutikum für Patienten mit fortgeschrittenem und / oder metastasiertem Pankreaskarzinom, erreichte in einer bereits 1990 erschienenen randomisierten klinischen Studie statistisch signifikante Verbesserungen bezüglich Ansprechrate und medianer Überlebenszeit gegenüber der Monotherapie mit 5-FU. Man muss hierbei jedoch anmerken, dass die durchschnittlichen Überlebenszeit dennoch als sehr niedrig anzusehen ist (51).

Humane Pankreaskarzinomzellen überexprimieren den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGF-R), ein 170 kDa schweres, transmembranöses Glykoprotein, bestehend aus einem extrazellulären Anteil, welcher die ligandenbindende Region enthält, einer transmembranen Domäne und einem intrazellulären Bestandteil mit intrinsischer Protein-Tyrosinkinase-Aktivität. Vorhergegangene Arbeiten haben gezeigt, dass kultivierte humane

Pankreaskarzinom-Zelllinien auf hohem Niveau EGF-R exprimieren und TGF- $\alpha$  („transforming growth factor“ – transformierender Wachstumsfaktor) produzieren (52) und dass humane Pankreastumore selbst den EGF-R und 5 bekannte Liganden überexprimieren (52,53). Darüber hinaus korreliert die Überexprimierung von EGF-R, TGF- $\alpha$ , und EGF in humanen Pankreastumoren mit einer Progression der Erkrankung (33), so wie die Expressierung gestutzter EGF-Rs mit der Hemmung des Tumorzellwachstums und vermehrter Sensitivität gegenüber Chemotherapie mit Cisplatin assoziiert wird (54). Der EGF-R kann jedoch nicht nur durch das Binden von EGF oder TGF- $\alpha$  aktiviert werden, sondern auch durch heparin-bindenden EGF-artigen Wachstumsfaktor (heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF), Beta-Cellulin und Amphiregulin. Nach dem Binden der Liganden bildet EGF-R Dimere aus und wird durch Autophosphorylierung und Transphosphorylierung auf Tyrosinresiduen innerhalb der intrazellulären Domäne aktiviert (54,55). Es existieren zum aktuellen Zeitpunkt bereits zahlreiche Veröffentlichungen, die zeigen, dass die Inaktivierung der EGF-R assoziierten Kinase in der Hemmung von EGF-vermittelter Rezeptor-Autophosphorylierung, MAPK-Aktivierung, PI3K-Aktivierung, Eintritt in die S-Phase, Cyclin E-assoziierte Kinase-Aktivität und letztendlich einer Häufung von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase der Mitose resultiert (39). Mehrere Anläufe wurden unternommen, den EGF-R-Tyrosinkinase-Komplex als therapeutisches Ziel mittels folgenden natürlich vorkommenden und synthetischen Agentien anzugehen: Genistein, ein natürlich vorkommender, generalisierter Tyrosinkinase-Inhibitor; Tyrphostin AG 1478, ein für den EGF-R spezifischer Tyrosinkinase-Inhibitor; CL-387,785, ein synthetisches 4-Anilino-Quinazolin-Derivat und mit ATP kompetitiver EGF-R Ligand; CGP54211 und CGP53353; 4,5-Dianilino-Phtalimid und PD153035 mit Selektivität für die EGF-R Tyrosinkinase auf enzymatischer und zellulärer Ebene.

Interessanterweise wurde in Vorarbeiten darüber berichtet, dass die Kombination aus Genistein, einem generalisierten Tyrosinkinase-Inhibitor, oder Tryphostin AG 1478, einem für den EGF-R spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor, mit Cisplatin, Doxorubicin oder Etoposid den cytostatischen Effekt im Vergleich zur Monotherapie mit einem der Chemotherapeutika vermehren, oder auch als cytotoxischen Effekt *in vitro* den programmierten Zelltod in Tumorzellen induzieren kann (57,58). Unter Verwendung eines anti-EGF-R-Antikörpers (C225 - Erbitux) konnte in Kombination mit variablen Chemotherapeutika und Bestrahlung ein zusätzlicher wachstumshemmender Effekt erzielt werden (41,59,77,80). In Ergänzung dazu konnte unter Überexpression von EGF-R eine Verbindung zur Resistenz der Tumorzellen gegenüber Chemotherapie (60) sowie der Nachweis erhöhter EGF-R-Präsenz in multiresistenten Zelllinien erwiesen werden (61). Tatsächlich könnte die Beeinflussung der Zellzyklus-Verteilung der Tumorzellen durch Blockade des EGF-R-Signaltransduktionsweges eine zentrale Rolle in der Verbesserung der Chemosensitivität spielen. Während die Blockade des EGF-R zum G<sub>1</sub>-Phase-Arrest der Zellen führt, bewirkt die Beschädigung der Zellen durch Chemotherapie oder Bestrahlung typischerweise einen Aufenthalt in der G<sub>2</sub>-M-Phase zur Reparatur von DNS-Schäden. J. Mendelsohn stellte dazu die Hypothese auf, wenn Tumorzellen simultan zwei zelluläre Haltesignale (also durch EGF-R-Blockade und cytotoxische medikamentöse oder strahlentherapeutische Behandlung) ausgesetzt sind, führe diese „fatale“ Situation zum Tod der Tumorzelle (43).

Das gleiche orthotope humane Pankreaskarzinommodell (mit teilweise abweichend verwendeten Zelllinien) nutzend konnte in mehreren Vorarbeiten bereits gezeigt werden, dass die Blockade des EGF-R-Signaltransduktionsweges durch einen z.B. intraperitoneal injizierten monoklonalen anti-EGF-R-Antikörper (z.B. C225 – Erbitux, ZD6474 o.ä.), in Kombination mit Gemcitabine oder einem z.B. oral applizierten

Protein-Tyrosinkinase-Inhibitor (z.B. PKI166) tatsächlich ein signifikantes Antitumorpotential gegen Pankreaskarzinome entwickelt. Durch sowohl indirekt anti-angiogene als auch direkt anti-proliferative Wirkweise wurde eine Hemmung des Primärtumorwachstums als auch der Leber- und Lymphknotenmetastasen vermittelt (36,37,42,75,,80). Auch die Vermittlung erhöhter Radiosensitivität durch Hemmung des EGF-R sowie Applikation von Gemcitabine wurde bereits wissenschaftlich diskutiert, worauf an dieser Stelle aber nicht näher eingegangen werden soll (79, 83). Das Ziel dieser gegenwärtigen Studie war die Evaluation der antitumorösen Effizienz von EMD 72000 in Kombination mit Gemcitabine auf das Wachstum eines primären Pankreastumors sowie dessen Metastasen (Lymphknoten, Leber) im Anschluss an eine orthotopische Injektion von Zellen der humanen Pankreaskarzinomzellreihe L3.6pl. Vor allem sollte der Unterschied zweier Behandlungsschemata mit der Fragestellung a) Effizienz in Abhängigkeit von unterschiedlichen Therapiestartzeitpunkten und b) Effizienz in Abhängigkeit von unterschiedlicher Therapiedauer herausgearbeitet werden. Die vorgelegten Daten demonstrieren, dass die Monotherapie mit EMD 72000 in einer signifikanten Reduktion der primären Tumorlast im Vergleich zu Kontrolltumoren resultierte, wenn die Behandlung am Tag 8 nach Tumorzellinjektion begonnen und über den gesamten Versuchszeitraum in beiden Experimenten beibehalten wurde. Die Therapie mit EMD 72000 allein war auf diese Weise ebenso effektiv wie die Therapie mit Gemcitabine allein, die Monotherapie mit EMD 72000 führte jedoch zu einer bedeutenden Abnahme der Inzidenz von Lymphknotenmetastasen, wohingegen Gemcitabine allein weder im ersten noch im zweiten Versuch irgendeinen nachweisbaren Effekt auf die Bildung von Lymphknotenmetastasen zeigte.

Des Weiteren ließen die Ergebnisse dieser Studie die Annahme zu, dass eine Kombinationstherapie aus EMD 72000 und Gemcitabine die Reduktion des

Primärtumorwachstums und dessen Fernmetastasen im Vergleich zur Monotherapie mit jeweils einer Substanz deutlich verbesserte. Selbst der spätere Beginn der medikamentösen Kombinationstherapie (Tag 15 oder 22 nach Tumorzellinjektion), bei deutlich größerer Tumorlast erzielte noch einen beachtenswerten inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der Pankreastumore im Vergleich zu den Kontrolltieren und war immer noch ebenso erfolgreich wie die Monotherapie mit Gemcitabine oder EMD 72000 allein, selbst wenn diese 7 Tage vorher begonnen worden war (also am Tag 8 nach Tumorzellinjektion). Diese Ergebnisse unterstellen, dass das Ansprechen auf EMD 72000 sich nicht auf kleine Tumore beschränkt, sondern dass, wenn zusammen mit Gemcitabine appliziert, die Kombination beider Therapeutika auch an späteren Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion eine deutliche Antitumoraktivität entfaltet.

Interessanterweise veränderte die Verkürzung der Therapiegesamtdauer von 25 auf 14 Tage den therapeutischen Effekt auf die primäre Tumorlast nicht wesentlich. Eine weitere Verkürzung der Medikationsdauer bis auf 7 Tage zeigte zwar sehr wohl eine verminderte Wachstumshemmung gegenüber den Pankreastumoren, es konnte jedoch insbesondere gezeigt werden, dass die Kombinationstherapie der beiden eingesetzten Substanzen über nur eine Woche (begonnen am Tag 8 nach Tumorzellinjektion) immer noch ebenso effektiv war, wie die Monotherapie mit EMD 72000 oder Gemcitabine allein über die gesamte Versuchsdauer von 25 Tagen.

Möglicherweise wird die Mikrogefäßdichte des Tumors, die EGF-vermittelte Signalkaskade und Zellproliferation bereits nach einer sehr kurzen Therapiedauer mit EMD 72000 und Gemcitabine in Kombination inhibiert, der antitumoröse Effekt hält jedoch darüber hinaus länger an. Nachgewiesen wurde auch ein Wirken der applizierten Therapeutika über den Weg der induzierten Zellapoptose. Dieser

Nachweis erfolgte mittels TUNEL-Fluoreszenzfärbung jedoch rein qualitativ und kann an dieser Stelle nicht zur Quantifizierung der Ergebnisse beitragen.

Es wurde bereits vorberichtet, dass EGF und TGF- $\alpha$  die Proliferation von Endothelzellen stimulieren und dass EGF-R-Aktivierung mit VEGF-Expression in Tumorzellen korreliert (62,63). Die immunhistochemische Analyse von *Ki67* und CD31 demonstrierte eine signifikante Reduktion der Gesamtzahl proliferierender Zellen und eine ebenso signifikante Reduktion der Mikrogefäßanschnittdichte 22 Tage nach Versuchsbeginn in mit EMD 72000 sowie mit EMD 72000 und Gemcitabine in Kombination behandelten Tumoren im Vergleich zu Tumoren, welche mit Gemcitabine allein oder mit PBS als Kontrollgruppe behandelt worden waren.

Die präsentierten Resultate decken sich damit mit Vorarbeiten, die den inhibitorischen Effekt auf primäres Pankreastumorwachstum und Metastasenbildung in Nacktmäusen nachwiesen, bei welchen der EGF-Rezeptor und damit indirekt die Angiogenese des Wirtstieres als therapeutisches Target verwendet wurde. Das primäre Ziel definierte sich dabei als Inhibition der Expressierung von VEGF als Überlebensfaktor für Tumorendothelzellen durch Blockade des EGF-R-Signalweges (73). Zusätzlich dazu wurde bereits der direkte zytostatische und in Bezug auf Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika förderliche Effekt beschrieben (36,43).

Ein Hauptsignalweg des EGF-Rezeptors ist die Ras-Raf-MAPK-Kaskade (siehe Abbildung 4). Die Aktivierung von Ras eröffnet eine mehrstufige Phosphorylierungskaskade, die letztendlich in der Aktivierung der MAPK mündet. Diese erfolgt für die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 durch eine zweifache Phosphorylierung auf einen Tyrosin- und einen Threoninrest durch bispezifische Kinasen. ERK1/2 regulieren in der Folge die Zelltranskription und wurden ebenfalls in Laborstudien mit Zellproliferation, -überlebensdauer und -transformation in Verbindung gebracht. Erhöhte Aktivitätslevel der MAPK in Tumorgeweben im

direkten Vergleich zu entsprechendem nichttumorösem Gewebe wurden erst kürzlich in verschiedenen humanen solide Tumoren nachgewiesen (64-67).

Eine reduzierte Phosphorylierung der p42/44 MAP-Kinase nach Behandlung mit Inhibitoren der EGF-Rezeptoren wird in zahlreichen Tumoren beobachtet, wie zum Beispiel Plattenepithelkarzinomen (68), Adenokarzinomen der Brust (69,70) sowie des Magens (71). Mit der erweiterten antitumorösen Wirkung der Kombinationstherapie mit Gemcitabine und EMD 72000 ging auch durchweg eine verstärkte Reduktion der MAP-Kinasen-Aktivität einher, welche in der Gruppe der mit Kombination therapierten Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe auch am stärksten war. Die Niederregulation dieses wichtigen mitogenen Signalweges korreliert also mit einem signifikant reduzierten Proliferationsindex, insbesondere unter den mit EMD 72000 behandelten Tumoren.

Im Jahre 2004 präsentierten Vanhoefer et al. die Ergebnisse einer klinischen Phase I Studie, in der EMD 72000 bei humanen Patienten mit fortgeschrittenen soliden Pankreastumoren angewandt wurde, welche den EGF-Rezeptor nachweislich exprimieren. Für pharmakodynamische Studien wurden mehrere Serien von Hautbiopsien vor und während des Therapieregimes mit EMD 72000 gewonnen. Wie erwartet zeigte sich darin, dass die Gesamtintensität der EGF-R- und TGF- $\alpha$ -Proteinexpression unter EMD 72000-Therapie nicht relevant verändert wurde. Andererseits konnte eine signifikante Abnahme der Level von phosphoryliertem EGF-Rezeptoren und MAP-Kinase beziehungsweise eine Abnahme des Proliferationsmarkers *Ki67* registriert werden, begleitet von einer Abnahme der cyclinabhängigen Kinaseinhibitoren p27kip1 und pSTAT3 (72).

In Zusammenschau der gewonnen Ergebnisse lässt sich sagen, dass das Wachstum primärer Pankreastumoren signifikant durch sowohl EMD 72000 als auch Gemcitabine gehemmt werden konnte, vorausgesetzt, die Behandlung wurde 8 Tage

nach Tumorzellinjektion begonnen oder dauerte von diesem Zeitpunkt bis Tag 25 an. Monotherapie mit EMD72000 führte zu einer deutlich verminderten Inzidenz von Lymphknotenmetastasen in beiden Versuchsaufbauten, wohingegen Monotherapie mit Gemcitabine allein keinerlei Einfluss auf die Bildung von Lymphknotenmetastasen entfaltete.

Die Kombinationstherapie erzielte einen zusätzlichen Effekt in der Reduktion des Tumorwachstums und führte ebenfalls zu einer Hemmung der Lymphknotenmetastasenbildung, verglichen mit unbehandelten Tumoren.

Das Ansprechen auf EMD 72000 – zusammen mit Gemcitabine eingesetzt – ist nicht auf Tumore mit kleinem Gesamtvolumen beschränkt, es konnte auch bei sehr spätem Therapiebeginn nach Tumorzellinjektion noch nachweisbare Antitumoraktivität beobachtet werden. Selbst nach nur 7-tägiger Behandlung trat unter Kombinationstherapie mit EMD 72000 und Gemcitabine eine signifikante Hemmung im Wachstum der Primärtumoren auf. Die eigentliche Effizienz dieser Kombinationstherapie ist dabei zum einen auf die antiangiogenen Eigenschaften (Reduktion der Mikrogefäßanschnittsdichte) und zum anderen auf das antiproliferative Potential von EMD 72000, welches mit der Reduktion in MAPK-Aktivierung korreliert, zurückzuführen. Darüber hinaus entfalteten die verwendeten Therapeutika einen erwähnenswerten Stimulus auf die Apoptose der Tumorzellen.

Einen prospektiven Ausblick auf die zukünftige klinische Relevanz der erbrachten Ergebnisse liefern möglicherweise eine im Oktober 2005 in Heidelberg begonnene Phase II Studie unter Verwendung von Cetuximab (C225 – Erbitux) einem gegen EGF-R gerichteten Antikörper, Gemcitabine und Radiatio (81), ebenso wie eine durch das US-amerikanische nationale Krebsinstitut (NCI – National Cancer Institute) 2004 initiierte Phase III Studie unter Verwendung von Cetuximab und Gemcitabine am Patienten (82).

Eine weitere Verwendung findet der therapeutische Ansatz der Hemmung des EGF-R-vermittelten Transduktionsweges mittlerweile auch in anderen Tumorzellreihen als der des Pankreaskarzinoms. So ist bzw. war auch die Behandlung von z.B. Magenkarzinom- oder auch Colonkarzinomzellreihen mittels EGFR-Blockade bereits Gegenstand aktueller Forschung mit teilweise sehr ermutigenden Ergebnissen (74,77).

Zusätzlich wird das therapeutische Repertoire im Kampf gegen das Pankreaskarzinom, respektive die im Rahmen dieser Arbeit betonte Tumorangio-genese, gegebenenfalls in Zukunft durch weitere interessante Ansätze bereichert. Erwähnenswert sind hier beispielsweise die Hemmung der angiogeneserelevanten Cyclooxygenase-2 durch Celecoxib, einen selektiven Cox2-Inhibitor (78), oder die Applikation eines replikationsinkompetenten rekombinanten Adenovirus mit der Codierung von Vasostatin, einem natürlich vorkommenden Angiogeneseinhibitor im Tumorgewebe (76). Hier ergeben sich möglicherweise auch zukünftig noch weitere dringend notwendige Kombinationsmöglichkeiten verschiedenster Therapeutika im Kampf gegen das Pankreaskarzinom des Menschen.

## **10. Zusammenfassung**

Nach wie vor stellt das insbesondere bei Diagnosestellung oft bereits multipel metastasierte Pankreaskarzinom die heutige kurative bzw. palliative Medizin mangels zufriedenstellend effektiver Therapieoptionen vor große Herausforderungen.

Ein aktuell vielversprechender Ansatz zielt auf die Inhibition der im Rahmen des Tumor- bzw. Metastasenwachstums nachgewiesenen Angiogenese und somit auf eine indirekte Suppression des Tumorwachstums. Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Substanz – EMD 72000 – handelt es sich um gegen den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktor EGF-R gerichtete humanisierte murine Antikörper.

In zwei voneinander getrennten Versuchsreihen wurde im orthotopen Nacktmausmodell die Effektivität der Therapien mit EMD 72000 sowie Gemcitabine jeweils als Monotherapeutikum sowie in Kombination in Bezug auf Therapiedauer sowie -beginn untersucht. Makroskopisch sowie histochemisch mittels Hämatoxylin-Eosin-, TUNEL-Fluoreszenz-, *Ki67*-, colorimetrischer CD-31- sowie MAP-Kinase-Anfärbung konnte hier eine relevante Tumorgrößenabnahme insbesondere bei der Gruppe der kombiniert therapierten Tiere sowie bei möglichst frühzeitigem Therapiebeginn und auch bereits nach 7 Tagen Therapiedauer nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte ebenfalls schon in der Monotherapie mit EMD 72000 eine signifikante Reduktion der Inzidenz von Lymphknotenmetastasen aufgezeigt werden, welche eine wichtige Rolle in Therapieentscheidung und Prognose der Grunderkrankung darstellt. Somit stellt EMD 72000 eine sinnvolle zukünftige Erweiterung des bestehenden konventionellen Chemotherapieregimes bei gleichzeitig kaum vorhandener physiologischer Angiogenese hoher Selektivität und zu erwartendem niedrigem Nebenwirkungsprofil dar.

# **11. Quellen- und Literaturverzeichnis**

**(Nach Verwendung im Text)**

1. Tumorzentrum München, Veröffentlichung vom 01/02/1998 Karzinome des exokrinen Pankreas
2. Lerch M., Westfälische Wilhelms-Universität: Gutartige und bösartige Neubildungen des Pankreas, 2003
3. Bertz J., Hentschel S., Hundsdörfer G., et al.: Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland/Robert-Koch-Institut. Saarbrücken, 2004
4. Riede U.-N. und Schaefer H.E.: Allgemeine und spezielle Pathologie im Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York, 1995
5. Brand R.E., and Tempero M.A.: Pancreatic cancer. Curr. Opin. Oncol. 10: 362-366, 1998
6. Tavani A., Pregnatolo A., Negri E., et al.: Alcohol consumption and the risk of pancreatic cancer. Nutr. Cancer 27: 157-161, 1997
7. Henne-Bruns D., Dürig M., Kremer B.: Chirurgie im Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York, 2001

8. Cooperman A.M., Kini S., Snady H., et al.: Current surgical therapy for carcinoma of the pancreas. *J. Clin. Gastroenterol.* 31(2): 107-113, 2000
9. Gastrointestinal Tumor Study Group: Radiation therapy combined with adriamycin or 5-fluorouracil for the treatment of locally unresectable pancreatic carcinoma. *Cancer* 56: 2563-2568, 1985
10. Gastrointestinal Tumor Study Group: Further evidence of effective adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection of pancreatic cancer. *Cancer* 59: 2006-2010, 1987
11. Kelsen D.P., Portenoy R.K., Thaler H.T., et al.: Pain and depression in patients with newly diagnosed pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 13: 748-755, 1995
12. Brennan M.F., Kinsella T.J., Casper E.S.: Cancer of the pancreas in DE Vita Jr, Hellman S., Rosenberg S.A. (eds): *Cancer: Principles and practice of oncology* (ed4) - Philadelphia, PA, Lippincott 849-882, 1993
13. Wiggans R.C., Woolley P.V., Macdonald J.S., et al.: Phase II trial of streptozotocin, mitomycin C, and 5-fluorouracil (SMF) in the treatment of advanced pancreatic cancer. *Cancer* 41: 387-391, 1978
14. Bukowski R.M., Aberhalden R.T., Hewlett J.S., et al.: Phase II trial of streptozotocin, mitomycin C, and 5-fluorouracil in adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Clin. Trials* 3: 321-324, 1980

15. Jacobs E.M., Reeves W.J., Wood D.A., et al.: Treatment of cancer with weekly intravenous 5-fluorouracil. *Cancer* 27: 1302-1305, 1971
16. Burris H. and Storniolo A.M.: Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil. *Eur. J. Cancer* 33 (Suppl): 18-22, 1997
17. Burris H.A. 3rd, Moore M.J., Andersen J., et al.: Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 15: 2403-2413, 1997
18. Rothenberg M.L., Moore M.J., Cripps M.C., et al.: A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer. *Ann. Oncol.* 7: 347-353, 1996
19. Jousen A.M., Kirchhof B., Gottstein C.: Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. *Ophthalmologe* 100: 284-291, 2003
20. Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285: 1182-1186, 1971
21. Hanahan D. and Folkman J.: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364, 1996
22. Liotta L.A., Steeg P.S. and Stetler-Stevenson W.G.: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64: 327-336, 1991

23. Tung-Ping Poon R., Sheung-Tat F. and Wong J.: Clinical significance of angiogenesis in gastrointestinal cancers. *Ann. Surg.* 238: 9-28, 2003
24. Tímár J., Döme B., Fazekas K., et al.: Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. *Path. Onc. Res.* 7,2: 85-94, 2001
25. Marmé D.: Tumorangiogenese: Neue Ansätze zur Krebstherapie. *Onkologie* 24,1: 1-5, 2001
26. Kuehn R., Lelkes P.I., Bloechle C., et al.: Angiogenesis, angiogenic growth factors, and cell adhesion molecules are upregulated in chronic pancreatic diseases: angiogenesis in chronic pancreatitis and in pancreatic cancer. *Pancreas* 18,1: 96-103, 1999
27. Mendelsohn J. and Baselga J.: The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19: 6550-6565, 2000
28. Yamanaka Y., Friess H., Kobrin M.S., et al.: Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Res.* 13: 565-570, 1993
29. EMD Pharmaceuticals: Anti-EGFR monoclonal antibodies. Internet publication [www.emdpharmaceuticals.com](http://www.emdpharmaceuticals.com)
30. Moore V.: EMD 72000 (Anti-EGFR Antibody). Internet database [www.bioscorprio.com](http://www.bioscorprio.com), 2003

31. Bier H., Hoffman T., Hauser U., et al.: Clinical trial with escalating doses of the antiepidermal growth factor receptor humanized monoclonal antibody EMD 72000 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47(6): 519-524, 2001
32. Bier H., Hoffmann T., Haas I., et al.: Anti-(epidermal growth factor) receptor monoclonal antibodies for the induction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Cancer Immunol. Immunother.* 46(3): 167-173, 1998
33. Bruns C.J., Harbison M.T., Kuniyasu H., et al.: *In vivo* selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia* (1): 50-62, 1999
34. Jewell J. and Mastro A.M.: Using Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) enzyme to detect TUNEL-positive, GFP-expressing cells. *Cell Notes* (3): 13-14, 2002
35. Huang S.-M., Li J., Harari P.M.: Molecular inhibition of angiogenesis and metastatic potential in human squamous cell carcinomas after epidermal growth factor receptor blockade. *Mol. Canc. Ther.* 1: 507-514, 2002
36. Bruns C.J., Solorzano C.C., Harbinson M.T., et al.: Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 60: 2926-2935, 2000

37. Bruns C.J., Harbinson M.T., Davis D.W., et al.: Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin. Can. Res.* 6: 1936-1948, 2000
38. Perotte P., Matsumoto T., Inoue K., et al.: Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin. Can. Res.* 5: 257-264, 1999
39. Lipson K.E., Pang L., Huber L.J., et al.: Inhibition of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor receptor signaling events after treatment of cells with specific synthetic inhibitors of tyrosine kinase phosphorylation. *J. Pharm. & Exp. Ther.* 285: 844-852, 1998
40. Overholser J.P., Prewett M.C., Hooper A.T., et al.: Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice. *Cancer* 89(1): 74-82, 2000
41. van Gog F.B., Brakenhoff R.H., Stigter-van Walsum M., et al.: Perspectives of combined radioimmunotherapy and anti-EGFR antibody therapy for the treatment of residual head and neck cancer. *Int. J. Cancer* 77: 13-18, 1998
42. Huang Z.-Q., Buchsbaum D.J., Raisch K.P., et al.: Differential responses by pancreatic carcinoma cell lines to prolonged exposure to Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody. *J. Surg. Res.* 111: 274-283, 2003

43. Mendelsohn J.: Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin. Can. Res.* 3: 2703-2707, 1997
44. Rozenblum E., Schutte M., Goggins M., et al.: Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 57: 1731-1734, 1997
45. Linder S., Blasjö M., von Rosen A., et al.: Patterns of distribution and prognostic value of angiogenesis in pancreatic duct carcinoma: a semiquantitative immunohistochemical study of 45 patients. *Pancreas* 22(3): 240-247, 2001
46. Warshaw A. L. and Fernandez-del Castillo C.: Pancreatic carcinoma. *N. Engl. J. Med.*: 326: 455-465, 1992
47. Wanebo H.J. and Vezeridis M.P.: Pancreatic carcinoma in perspective. A continuing challenge. *Cancer* 78: 580-591, 1996
48. Moore M.: Clinical experience with gemcitabine in pancreatic cancer. *Oncology* 11: 1615-1622, 1997
49. Bukowski R.M.: Biologic therapy in patients receiving salvage treatment. *Semin. Oncol.* 21: 96-99, 1994
50. Rothenberg M.L., Abbruzzese J.L., Portenoy R.K., et al.: A rationale for expanding the endpoints for clinical trials in advanced pancreatic cancer. *Cancer* 78: 627-632, 1996

51. Hertel L.W., Boder G.B., Kroin J.S., et al.: Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Res.* 50: 4417-22, 1990
52. Smith J.J., Derynck R. and Korc M.: Production of transforming growth factor  $\alpha$  in human pancreatic cancer cells: evidence for a superagonist autocrine cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7567-7570, 1987
53. Korc M., et al.: Overexpression of the Epidermal Growth Factor Receptor in Human Pancreatic Cancer is Associated with Concomitant Increases in the Levels of Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor Alpha. *J. Clin. Invest.* 90: 1352-1360, 1992
54. Wagner M., Cao T., Lopes M.E., et al. : Expression of a truncated EGF receptor is associated with inhibition of pancreatic cancer cell growth and enhanced sensitivity to cisplatin. *Int. J. Cancer* 68: 782-92, 1996
55. Pazin M.J., Williams L.T.: Triggering signaling cascades by receptor tyrosine kinases. *Trends Biochem. Sci.* 17: 374-8, 1992
56. Schlessinger J., Ullrich A.: Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9 (3): 383-91, 1992
57. Baselga J., Norton L., Masui H., et al.: Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.* 85 (16):1327-33, 1993

58. Baselga J., Mendelsohn J.: The epidermal growth factor receptor as a target for therapy in breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* 29(1):127-38, 1994
59. Huang S.-M., Bock J.M. and Harari P.M.: Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 59: 1935-1940, 1999
60. Lei W., Mayotte J.E., Levitt M.L.: Enhancement of chemosensitivity and programmed cell death by tyrosine kinase inhibitors correlates with EGFR expression in non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Res.* 19 (1A): 221-8, 1999
61. Meyers M.B., Merluzzi V.J., Spengler B.A., et al.: Epidermal growth factor receptor is increased in multidrug-resistant Chinese hamster and mouse tumor cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83: 5521-5525, 1986
62. Goldman C.K., Kim J., Wong W.L., et al.: Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol. Biol. Cell* 4: 121-133, 1993
63. Schreiber A. B., Winkler M. E. and Derynck R.: Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232: 1250-1253, 1986

64. Oka H., Chatani Y., Hoshino R., et al.: Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 55: 4182–4187, 1995
65. Ito Y., Sasaki Y., Horimoto M., et al.: Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 27: 951–958, 1998
66. Hoshino R., Chatani Y., Yamori T., et al.: Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18: 813–822, 1999
67. Gioeli D., Mandell J.W., Petroni G.R., et al.: Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res.* 59: 279–284, 1999
68. Rojo F., Albanell J., Del Campo J., et al.: Activation of mitogen-activated protein kinase is associated with epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha and HER2 receptor overexpression in head and neck tumors. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 19: 614 (abstr 2417), 2000
69. Gee J., Barroso A., Ellis I., et al.: Biological and clinical associations of c-jun activation in human breast cancer. *Int. J. Cancer* 89: 177-186, 2000
70. Gee J., Robertson J., Ellis I., et al.: Phosphorylation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase is associated with poor response to antihormonal

therapy and decreased patient survival in clinical breast cancer. *Int. J. Cancer* 95: 247-254, 2001

71. Rojo F., Albanell J., Sauleda S., et al.: Characterization of epidermal growth factor (EGF) receptor and transforming growth factor (TGF)-alpha expression in gastric cancer and its association with activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20: 4 (abstr. 2417), 2001

72. Vanhoefler U., Tewes M., Rojo F., et al.: Phase I study of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody EMD 72000 in patients with advanced solid tumors that express the epidermal growth factor receptor. *J. Clin. Oncol.* 22:1, 175-184, 2004

73. Bruns C.J., Wenbiao L., Darren D., et al.: Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases. *Am. Can. Soc.* 488-499, 2000

74. Tokuzo M., Kazuyoshi Y., Misato T., et al.: ZD 6474 inhibits tumor growth and intraperitoneal dissemination in a highly metastatic orthotopic gastric cancer model. *Int. J. Cancer* 118: 483-489, 2006

75. Buchsbaum D.J., Bonner J.A., Grizzle W.E., et al.: Treatment of pancreatic cancer xenografts with Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody, gemcitabine and radiation. *Int. J. Radiation Onc. Biol. Phys.* 54(4) ; 1180-1193, 2002

76. Li L., Yuan Y.-Z., Lu J., et al.: Treatment of pancreatic carcinoma by adenoviral mediated gene transfer of vasostatin in mice. *Gut* 55: 259-265, 2006
77. Cunningham D., Humblet Y., Siena S., et al.: Cetuximab monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 351: 337-345, 2004
78. Ferrari V., Valcamonico F., Amoroso V., et al.: Gemcitabine plus celecoxib (GECO) in advanced pancreatic cancer: a phase II trial. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 57: 185-190, 2006
79. Sartor C.I.: Epidermal growth factor family receptors and inhibitors: radiation response modulators. *Sem. Rad. Onc.* 13(1): 22-30, 2003
80. Huang S.H., Armstrong E.A., Benavente S., et al.: Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Res.* 64: 5355-5362, 2004
81. Krempien R., Muentner M.W., Huber P.E., et al.: Randomized phase II – study evaluating EGFR targeting therapy with Cetuximab in combination with radiotherapy and chemotherapy for patients with locally advanced pancreatic cancer – PARC: study protocol. *BMC Cancer* 5: 131-142, 2005
82. Philip P. (National Cancer Institute) et al.: Phase III randomized study of Gemcitabine with versus without Cetuximab as first-line therapy in patients with

locally advanced unresectable or metastatic adenocarcinoma of the pancreas.

Clin. Adv. Hematol. Oncol. 2: 201-252, 2004

<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/ft-SWOG-S0205>

83. Milas L., Fuji T., Hunter N., et al.: Enhancement of tumor radioresponse in vivo by gemcitabine. *Cancer Res.* 59:107-114, 1999

84. Folkman J.: Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr. Mol. Med.* 3: 643-651, 2003

85. Onizuka S., Kawakami S., Taniguchi K., et al.: Pancreatic carcinogenesis: apoptosis and angiogenesis. *Pancreas* 28: 317-319, 2004

86. Abbruzzese J.L., Rosenberg A., Xiong Q., et al.: Phase II study of anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody cetuximab (IMC C225) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20: 518, 2001

87. Harper J., Moses M.A., Herausg. Bignold L.: Molecular regulation of tumor angiogenesis: mechanisms and therapeutic implications. *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*, Birkhäuser Verlag, Schweiz 2006

## **12. Bild- und Schemaquellenverzeichnis**

1. Abbildungen 1 und 2: Special Project Angiogenesis/Angiogenesis: a brief introduction, <http://www.med.unibs.it/~airc/angiogen.html>
2. Abbildung 3: Göretzlehner G., Heufelder A. et al.: Verringertes Tumorwachstum durch Hemmung der Signaltransduktion <http://www.gynehormonweb.de/Onkologie/Chemotherapie/lressa.php> , 2002
3. Abbildung 4: MAP-Kinasen-Signalweg: gerichtete Kaskade [http://www.zbc.kgu.de/zbclehre/HauptvorlesungWS04-05/Hormone\\_WME\\_29.10.pdf](http://www.zbc.kgu.de/zbclehre/HauptvorlesungWS04-05/Hormone_WME_29.10.pdf) , 2004
4. Abbildung 5: Schmidt J.M.: Meta-analytische und experimentelle Untersuchungen zu Gefäßdichte in Tumoren [http://elib.tiho-hannover/dissertations/schmidtj\\_ss04.pdf](http://elib.tiho-hannover/dissertations/schmidtj_ss04.pdf) , Hannover, 2004
5. Tabelle 1: Bertz J., Hentschel S., Hundsdörfer G., Kaatsch P., Katalinic A., Lehnert M., Schön D., Stegmaier C., Ziegler H., et al.: Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland/Robert-Koch-Institut. Saarbrücken, 2004
6. Tabelle 2, abgeändert nach: Special Project Angiogenesis/Angiogenesis: a brief introduction, <http://www.med.unibs.it/~airc/angiogen.html>

## **13. Materialverzeichnis**

- Falcon®-Zellkulturflaschen 50 ml
- Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)
- Penicillin und Streptomycin (Flow Laboratories, Rockville, MD, USA)
- Männliche Nacktmäuse (Balb/c nu/nu) (Charles River Laboratories, Sulzfeld, BRD)
- Chirurgischer Faden (Prolene 4/0, FS-2S, Ethicon Deutschland, Norderstedt, BRD)
- Proteinreiche Maus-Diät („Sustacal“, Mead Johnson Nutritionals, Evansville, IN, USA)
- Vitaminlösung (Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)
- EMD 72000 (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
- Gemcitabine („Gemzar“, Lilly Pharma, Gießen, BRD)
- Pufferlösung (PBS, Dulbecco's, Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- Hank's balanced salt solution (HBSS)
- Tissue-Tec<sup>tm</sup> (Miles Inc., Elkhart, IN, USA)
- SuperFrost®-Plus-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD)
- Schlittenmikrotom Leitz 1208, (Leitz, Oberkochen, BRD)
- Ofen (für Paraffinschnitte) Haereus (Haereus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts., BRD)
- Fettstift Dako- Pen (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)

- DeadEnd<sup>tm</sup> Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI, USA)
- TritonX-100 (Sigma Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA)
- Deckgläser: Menzel-Gläser 24 x 50 mm (Braunschweig, BRD)
- Prolong Solution<sup>tm</sup> (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)
- Ki67 rabbit anti-human polyclonal antibody (Zymed, San Francisco, CA, USA)
- Biotin-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Avidin-biotin-conjugated horseradish-peroxidase-complex ABC-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- CD31/PECAM-1 primary antibody (Pharmingen, San Diego, CA, USA)
- Peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, CA, USA)
- Tween 80 (Sigma Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA)
- Gill's haematoxylin No. 3 (Sigma Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA)
- Aquatex<sup>tm</sup> (Merck KgaA, Darmstadt, BRD)
- Färbeinstrument Discovery<sup>TM</sup> (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA)
- 1%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB Map<sup>TM</sup> Kit, 760-124, Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA)
- Polyclonal rabbit anti-human phospho p44/42 MAP-kinase (Thr202/Tyr204) primary antibody (9101, New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA)
- Biotin-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (goat anti-rabbit IgG, BA-1000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)
- Stable 3,3'-diaminobenzidine sowie horseradish-conjugated streptavidin (DAB Map<sup>tm</sup> Kit; Research Genetics, Huntsville, AL, USA)

- VectaMount<sup>tm</sup> Fixierungsmedium (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)
- Leica Bildanalyse-Software Quantimet 500 Qwin (Version V02.00B, Leica Microsystems, Bensheim, BRD)
- Mikroskop (Firma Zeiss, Oberkochen, BRD)
- Reines H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie Methanol (beide: Merck KgaA, Darmstadt, BRD)

## **14. Lebenslauf**

- Geboren am 21.11.1976 in Berlin als zweiter Sohn der Diplomchemikerin Karin Mantell (geborene Klaskala) und des Versicherungsjuristen Otto Mantell
- 1983 – 84 Besuch der Kronach-Grundschule in Berlin
- 1984 Berufsbedingter Umzug der Familie nach Germering, Bayern
- 1984 – 87 Besuch der Kleinfeld-Grundschule in Germering
- 1987 – 96 Besuch des Carl-Spitzweg-Gymnasiums in Germering, Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife am 28.06.1996
- 01.01.1997 Eintritt in die deutsche Bundeswehr als Soldat auf Zeit in der Laufbahn der Sanitätsoffiziere
- November 1997 bis April 2004 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg, Abschluß mit dem Staatsexamen am 13.04.2004
- 01.08.2003 Hochzeit mit der Auszubildenden der Humanphysiotherapie Isabel Mantell (geborene Nowak) in Regensburg
- 27. April 2004 bis 30. April 2005 ärztliche Tätigkeit im Stationsdienst des Bundeswehrkrankenhauses Amberg, Abteilung I – Innere Medizin in der Weiterbildung zum Facharzt für Innere und Allgemeinmedizin
- 01.10.2004 Vollapprobation als Arzt
- 01. Mai 2005 bis 31. Oktober 2005 ärztliche Tätigkeit im Stationsdienst des Bundeswehrkrankenhauses Amberg, Abteilung X – Anästhesie und Intensivmedizin in der Weiterbildung zum Facharzt für Innere und Allgemeinmedizin
- Seit 01. November 2005 ärztliche Tätigkeit im Stationsdienst des Bundeswehrkrankenhauses Amberg, Abteilung II – Chirurgie in der Weiterbildung zum Facharzt für Innere und Allgemeinmedizin