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

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

Kombination von Strahlentherapie und anti-angiogener Therapie durch mTOR-Blockade *in vitro* und *in vivo*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Carmen Paringer
aus
Landshut

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatterin:	Priv. Doz. Dr. Christiane J. Bruns
2. Berichterstatterin:	Priv. Doz. Dr. Susanne Sehlen
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Roland Goldbrunner
	Prof. Dr. Peter Boekstegers
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. P.C. Manegold
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	05.03.2009

Meinen lieben Eltern

gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS I
ABKÜRZUNGEN IV

I. EINLEITUNG 1

1. Angiogenese 2
1.1 Physiologische Grundlagen der Angiogenese 2
1.2 Angiogenese und Tumorwachstum 3
1.3 Aktuelle Studienlage 4
2. Anti-angiogene Therapie durch mTOR-Inhibition 5
3. Strahlentherapie und Angiogenese 6
4. mTOR-abhängige Strahlenresistenz 6
6. Zielsetzung 8

II. MATERIAL UND METHODEN 10

1. Zelllinien und Zellkultur 10
1.1 Humanes Pankreaskarzinom L3.6pl 10
1.2 Murines Kolonkarzinom CT-26 10
1.3 Murines Fibrosarkom BFS-1 10
1.4 Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen (HUVEC) 10
1.5 Zellkultur 11
1.5.1 Kulturmedien der Tumorzellen 11
1.5.2 Kulturmedium der Endothelzellen 11
1.5.3 Kultur der Tumor- und Endothelzellen 11
2. mTOR-Inhibitor RAD001 (Everolimus) 12
3. Experimente *in vitro* 13
3.1 WST-1 Proliferationsassay 13
3.2 Bestimmung der bestrahlungsabhängigen VEGF-Sekretion der Tumorzellen 15
3.2.1 Zellkultur und Behandlung der Zellen 15
3.2.2 Quantitative VEGF-Bestimmung 15
3.2.3 Proteinbestimmung 16
3.3 Spheroidassay 16
3.4 Bestimmung der Aktivierung des mTOR-Signalweges anhand der Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins 17
3.4.1 Antikörper 18
3.4.2 Negativkontrollen 18
3.4.3 Immunzytochemie 18
3.4.3.1 Kultivieren der Zellen auf Objektträgern 18
3.4.3.2 Immunzytochemische Analyse des ribosomalen S6 Proteins anhand der Biotin/ Streptavidin-Methode (FITC= fluoreszierendes Isothiocyanat) 19
4. Experimente *in vivo* 20
4.1 Versuchstiere 20
4.2 Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation 21

4.3 Implantation der Tumorzellen 21

4.3.1 Anästhesie der Tiere 21
4.3.2 Subkutane Implantation der Tumorzellen BFS-1 und CT-26 21
4.3.3 Orthotope Implantation der Tumorzellen L3.6pl....22
4.4 Dokumentation des Tumorwachstums....23
4.4.1 Subkutan wachsende Tumoren 23
4.4.2 Orthotop wachsende Tumoren 23
4.4.3 Wiegen der Tiere 23
4.5 Tierexperimentelles Studiendesign....24
4.5.1 Bestrahlung der Tumoren *in vivo* 26
4.5.1.1 Orthotopes Pankreas-Tumormodell....27
4.5.1.2 Subkutanes Tumormodell....27
4.6. Bestimmung des RAD001 Serumspiegels....27
4.7 Immunhistochemie....28
4.7.1 Negativkontrollen....28
4.7.2 Ribosomales S6 Protein 28
4.7.2.1 Verwendete Antikörper 28
4.7.2.2 Pankreaskarzinom L3.6pl 28
4.7.2.3 Fibrosarkom BFS-1 29
4.7.3 Analyse der Mikrogefäßdichte des humanen Pankreaskarzinom L3.6pl 30
5. Darstellung der Ergebnisse und statistische Bewertung 31

III. ERGEBNISSE 32

1. Experimente *in vitro* 32
1.1 Proliferationsassay 32
1.1.1 Humanes Pankreaskarzinom L3.6pl....32
1.1.2 Murines Fibrosarkom BFS-1....33
1.1.3 Murines Kolonkarzinom CT-26 36
1.1.4 Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen (HUVECs) 39
1.2 Quantitative VEGF-Bestimmung....42
1.2.1 Humanes Pankreaskarzinom L3.6pl....43
1.2.3 Murines Fibrosarkom BFS-1....44
1.2.2 Murines Kolonkarzinom CT-26 46
1.3 Speroidassay....47
1.4 Analyse des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges anhand des phosphorylierten ribosomalen S6 Proteins....49
1.4.1 Humanes Pankreaskarzinom L3.6pl....49
1.4.2 Murines Fibrosarkom BFS-1....50
1.4.3 Murines Kolonkarzinom CT-26 51
1.4.4 Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen (HUVECs) 52
2. Experimente *in vivo*....53
2.1 Orthotopes Pankreaskarzinom L3.6pl....54
2.2 Orthotopes Fibrosarkom BFS-1....55
2.3 Subkutanes Kolonkarzinom CT-26 57
2.4 Bestimmung des RAD001-Serumspiegels....58
2.5 Immunhistochemische Analyse des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges anhand der Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins....59
2.5.1 Humanes Pankreaskarzinom L3.6pl (FITC)....59
2.5.2 Murines Fibrosarkom BFS-1 (DAB) 60

2.6 Immunhistochemische Analyse der Mikrogefäßdichte im humanen Pankreaskarzinom L3.6pl 61

IV. DISKUSSION 62

1. Diskussion der Methodik 62
1.1 Tumorzelllinien 62
1.1.1 Humanes Pankreaskarzinom L3.6pl 62
1.1.2 Murines Fibrosarkom BFS-1 64
1.1.3 Murines Kolonkarzinom CT-26 64
1.2 mTOR-Inhibitor RAD001 (Everolimus) 65
1.2.1 Rapamycin: Herkunft und Ursprung 65
1.2.2 RAD001 (Everolimus) 65
1.2.2.1 Applikation von RAD001 66
1.3 Orthotopes versus subkutanes Tumormodell 67
1.3.1 Vor- und Nachteile in Bezug auf die Strahlentherapie 68
1.4 Messung des subkutanen und orthotopen Tumorwachstums 68
1.5 WST-1 Proliferationsassay 69
1.6 Spheroidassay 70
1.7 Aktivierung/ Inaktivierung des mTOR-Signalweges mittels Immunfluoreszenz des ribosomalen S6 Proteins 70
2. Diskussion der Ergebnisse 71
2.1 mTOR-Inhibition und anti-angiogene Therapie 71
2.1.1 „Normalizing effect“ der anti-angiogenen Therapie 73
2.1.2 Verhinderung der Repopularisierung von Tumorzellen unter anti-angiogener Therapie 75
2.1.3 Hemmung der Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen 76
2.2 Stimulation der Tumorangiogenese als Streßantwort auf die Strahlentherapie 77
2.3 Stellenwert des mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in der Strahlenresistenz 78
2.4 Einfluss von mTOR-Inhibition und Bestrahlung auf die Proliferation von Tumor- und Endothelzellen *in vitro* 82
2.5 Beurteilung der Stressantwort der Tumorzellen auf die Bestrahlung alleine und unter mTOR-Blockade 86
2.6 Anti-angiogene Wirksamkeit von Bestrahlung und mTOR-Inhibition 88
2.7 Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges unter Bestrahlung – Signalweg der strahleninduzierten Stressantwort in Tumorzellen und Endothelzellen 88
2.7.1 Immunzytochemische Untersuchungen der Tumor- und Endothelzellen 88
2.8 Experimente *in vivo* 90

V. ZUSAMMENFASSUNG 94
VI. SCHLUSSFOLGERUNG 98

LITERATURVERZEICHNIS 99
DANKSAGUNG 120
CURRICULUM VITAE 122

ABKÜRZUNGEN

AEC-Lösung	3-Amino-9-Ethylcarbazol
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BSA	Bovines Serum Albumin
CD31 (PECAM-1)	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecel-1
CEA	Karzinoembryonales Antigen
DAB	3,3‘- Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECGS/H	Endothelial cell growth supplement/Heparin
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ErbB2	Human epidermal growth receptor 2
FBS	Fötales bovines Serum
FG	Fast growing
FITC	Fluoreszierendes Isothiocyanat
HIF-1α	Hypoxia inducible factor-1α
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells = Humane Nabelschnurendothelzellen
i.p.	intraperitoneal
IGF	Insuline like growth factor
MTD-Therapie	Maximal tolerierte Dosis-Therapie
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NMU	N-Nitroso-n-Methylurethan
PAK	Primärer Antikörper
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PI3K	Phospho-Inositol-3-Kinase
PSA	Prostata spezifisches Antigen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
Ras	Rat sarcoma
rS6k	Ribosomale S6 Kinase
S6rp	Ribosomales S6 Protein
SAK	Sekundärer Antikörper
SG	Slow growing
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TOP	Terminales Oligopyrimidin
TSC 2	Tuberosis sclerosis complex 2
VEGF	Vascular Endothelial Growth Faktor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
Vgl.	Vergleiche
WST-1	Water soluble tetrazolium-1

I. EINLEITUNG

In Deutschland erkranken laut Robert Koch Institut jährlich über 400.000 Menschen an Krebs. Den Schätzungen zu Folge stirbt ungefähr jeder Dritte an einer Krankheit des Kreislaufsystems und jeder Vierte an einer Krebserkrankung. Damit stellt Krebs nach den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. (www.dkfz.de/de/krebsatlas). Vor allem demographische Faktoren wie gestiegene Lebenserwartung und steigende Bevölkerungszahlen sind als Ursache für die zunehmende Inzidenz der Krebserkrankungen zu sehen, da mit dem Lebensalter auch das Risiko an Krebs zu erkranken steigt. Die höhere Inzidenz lässt sich aber auch auf verbesserte diagnostische Verfahren zur frühzeitigen Erkennung von Krebserkrankungen zurückführen. Hierbei sind insbesondere das Mammographiescreening zur Früherkennung von Brustkrebs und die Bestimmung des PSA-Wertes zur Erkennung von Prostatakarzinomen zu erwähnen. Durch die Möglichkeiten, Krebs in einem frühen Stadium zu diagnostizieren, haben sich auch höhere Heilungschancen ergeben (Krebs in Deutschland, 5. Ausgabe, Saarbrücken 2006).

Die Behandlung maligner Erkrankungen beruht vor allem auf den drei Säulen der interdisziplinären onkologischen Therapie: Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie.

Die operative Intervention stellt bei einer großen Zahl solider Tumoren die Therapie der Wahl dar. Die chirurgische Therapie ist invasiv und kann durch den Allgemeinzustand des Patienten und bereits vorhandene Fernmetastasierung limitiert sein. Im Gegensatz dazu stellen Chemotherapie und Strahlentherapie weniger invasive Therapieverfahren dar. Durch eine Chemotherapie wird eine systemische Therapie bei zumeist fortgeschrittenem, metastasiertem Krebsleiden erreicht. Die lokalisierte Strahlentherapie hat hingegen das Ziel, eine weitere lokale Kontrolle über den Primärtumor oder sein Rezidiv zu erreichen. Nachteile bestehen in der geringen Selektivität dieser Therapieverfahren, wodurch therapielimitierende und teils schwerwiegende Nebenwirkungen, wie z.B. Leukopenien und ihre komplizierenden schwer beherrschbaren Infektionen unter Chemotherapie und Strahlenschäden an gesunden Nachbarorganen berücksichtigt werden müssen.

In den vergangenen Jahrzehnten konnte durch intensive Forschungsaktivitäten das Wissen über die Ursachen sowie die molekularen, genetischen und zellulären

Mechanismen der Tumorentstehung deutlich erweitert werden. Durch den Einsatz neuer Medikamente und neuer zielgerichteter Therapieansätze (Molecular Targeted Therapies) zur Bekämpfung von Tumoren konnten neue viel versprechende Therapieerfolge erzielt werden. Das erweiterte Verständnis der molekularen und genetischen Vorgänge beim Übergang einer normalen Zelle in eine Tumorzelle und die Vorgänge um die Metastasierungskaskade führte zur Aufdeckung neuer innovativer Angriffspunkte in der Tumortherapie (Peters 2003). Eine viel versprechende Strategie besteht darin, nicht den Tumor selbst, sondern sein Gefäßsystem anzugreifen: Die anti-angiogene Therapie (Carmeliet P. und Jain R. K. 2000).

1. Angiogenese

1.1 Physiologische Grundlagen der Angiogenese

Die Bildung neuer Blutgefäße kann zum einen aus endothelialen Vorläuferzellen (Vaskulogenese) oder durch das Aussprossen aus bereits vorbestehenden Blutgefäßen (Angiogenese) erfolgen. Vaskulogenese und Angiogenese finden beim Menschen unter physiologischen Bedingungen in der Embryonalentwicklung und im Menstruationszyklus statt (Folkman J. und Shing Y. 1992; D'Amore P. A. und Thompson R. W. 1987). Auch in der Wundheilung ist die Angiogenese entscheidender Bestandteil der Geweberegeneration (Clark R. A. et al. 1982). Die physiologische Bildung neuer Blutgefäße ist jedoch streng reguliert. Eine Dysregulation hat großen Einfluss auf die Funktion eines Organismus und ist z.B. pathophysiologisch verantwortlich für die Entstehung der diabetischen Retinopathie (Hammes H. P. et al. 1996).

Die Angiogenese ist ein komplexer Vorgang, der durch das Zusammenspiel von Zellen (Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen), angiogenen und anti-angiogenen Faktoren sowie der Extrazellulärmatrix beeinflusst wird (Carmeliet P. 2003; Jain R. K. 2003).

Physiologische Angiogenese	Pathophysiologische Angiogenese
▪ ***Embryo***	▪ **Tumoren**
- **Placenta**	▪ **Rheumatoide Arthritis**
- **Extremitätenentwicklung**	▪ **Ischämische Retinopathie**
- **ZNS-Vaskularisation**	▪ **Maculadegeneration**
▪ ***Erwachsene***	▪ **Chronische Transplantatabstoßung**
- **Zyklische Prozesse (z.B. Menstruation)**	▪ **Psoriasis**
	▪ **Atherosklerose**
- **Wundheilung**	▪ **Re-Stenosierung**
- **Kollateralenbildung**	▪ **Demenz**

Abbildung 1: Physiologisches und pathophysiologisches Vorkommen der Angiogenese

1.2 Angiogenese und Tumorwachstum

Ein entscheidender Schritt sowohl für das Tumorwachstum als auch für den Prozess der Metastasierung ist die Ausbildung eines eigenständigen Gefäßsystems im Tumor (Gerber H. P. et al. 1998). Einzelne maligne entartete Zellen und nur wenige Millimeter große Tumoren können sich überwiegend durch Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen aus ihrer Umgebung versorgen (Folkman J. et al. 1989). Je größer ein Tumor wird, umso mehr ist sein Wachstum von einem suffizienten Gefäßsystem abhängig. Bei der Tumorangiogense kommt es zu zahlreichen Interaktionen zwischen den Tumorzellen und dem umliegenden Gewebe (Neufeld G. et al. 1999). Einerseits sezerniert der Tumor selbst angiogene Wachstumsfaktoren, andererseits findet ihre Produktion in Zellen des umliegenden Gewebes statt. Zusätzlich können angiogene Wachstumsfaktoren aus der extrazellulären Matrix mobilisiert werden. Die Ausbildung eines Tumorgefäßsystems wird zudem durch das Zusammenspiel stimulatorischer und inhibitorischer Angiogenesefaktoren beeinflusst (Bergers G. und Benjamin L. E. 2003; Gerber H. P. et al. 1998).

Die Entstehung von Tumoren kann in zwei Phasen eingeteilt werden: Die prävaskuläre Phase, die in der Regel dem lokalen, nicht metastatischen

Tumorwachstum entspricht, und die vaskuläre Phase, in der der Tumor sein eigenes Gefäßsystem ausbildet und Metastasierungspotential besitzt.

In der prävaskulären Phase überwiegen die inhibitorischen Faktoren der Angiogenese, z.B. Angiostatin und Interferon. Maligne entartete Zellen können über Jahre hinweg im Körper ruhen (dormant tumor), ohne dass es zu einem Tumorwachstum kommt. Demgegenüber steht die vaskuläre Phase, die nicht nur vom Wachstum des Tumors, sondern auch von der Tumorinvasion und -metastasierung dominiert wird (Gerber H. P. et al. 1998). Nach Induktion der Angioneogenese wächst der Tumor exponentiell (Gerber H. P. et al. 1998). Dabei korreliert die Gefäßdichte vieler solider Tumoren mit ihrem invasiven und metastatischen Potential (Bruns C. J. et al. 1999). Die Ursache dafür, dass der Tumorzellverband plötzlich Gefäße ausbildet, ist noch weitgehend unbekannt. Folkman et al. beschreiben die Aktivierung von Endothelzellen als einen der ersten Schritte im so genannten „angiogenic switch“: Der Tumor geht von seiner Phase als ruhender in einen wachsenden Tumor über, der sein eigenes Gefäßsystem ausbildet. (Hanahan D. und Folkman J. 1996; Folkman J. et al. 1989; Folkman J. 1971). Bisher ist noch nicht geklärt, welche Ursache letztendlich für den „angiogenic switch“ verantwortlich ist (Naumov G. N. et al. 2006), es ist aber sehr wahrscheinlich, dass die Expression einer Vielzahl von Faktoren notwendig ist, um die Tumorangiogenese zu induzieren. Dabei werden Endothelzellen durch proangiogene Wachstumsfaktoren wie z.B. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) aktiviert, die vom Tumor sezerniert werden. Dadurch wird die Endothelzellproliferation und -migration induziert, tubuläre Gefäßsprossen formen sich und schließen sich zu einem tumoreigenen Gefäßsystem zusammen.

1.3 Aktuelle Studienlage

In präklinischen und auch klinischen Studien befinden sich anti-angiogene Therapieansätze, die zusammen mit einer Chemotherapie oder Strahlentherapie eine verbesserte antitumorale Wirksamkeit erzielen. Bisher wurden anti-angiogene Therapien mit Angiostatin, VEGF/VEGFR-Inhibitoren und EGFR-Inhibitoren mit Strahlentherapie kombiniert, wodurch zumindest additive Effekte in der Tumorwachstumskontrolle festgestellt werden konnten (Bergers G. und Benjamin L.

E. 2003; Huang S. M. und Harari P. M. 2000; Lee C. G. et al. 2000; Gorski D. H. et al. 1999). Die Kombination anti-angiogener Therapien mit einer Chemotherapie ist auch in Deutschland bereits zugelassen: Beim metastasierten kolorektalen Karzinom gilt die Kombination des anti-angiogen wirkenden VEGF-Rezeptorantikörpers Bevacizumab (Avastin®) mit einer Chemotherapie bereits als first-line Therapie (Hurwitz H. et al. 2004). Im Juni 2007 wurde Bevacizumab auch als first-line Therapie in Kombination mit Paclitaxel zur Therapie des metastasierten bzw. des lokal rezidivierenden Mammakarzinoms zugelassen (Miller K. D. 2003), die Wirkung in Kombination mit Docetaxel wurde in einer Phase II Studie untersucht (Ramaswamy B. et al. 2006). In einer Phase II Studie wird in den USA bei HNO-Tumoren konventionelle Strahlentherapie in Kombination mit Docetaxel und Bevacizumab untersucht (Nieder C. et al. 2006).

2. Anti-angiogene Therapie durch mTOR-Inhibition

Anti-angiogen wirksame Substanzen können die Endothelzellproliferation und Gefäßneubildung in Tumoren auf vielfältige Weise verhindern. Sie lassen sich jedoch in zwei Hauptklassen unterteilen: Zum einen können anti-angiogene Substanzen die Bindung angiogener Wachstumsfaktoren an ihren Rezeptor verhindern oder sie greifen in intrazelluläre Signalkasakaden distal des aktivierten Rezeptors ein.

Eine Möglichkeit, die Angiogenese zu unterdrücken, besteht in der Inhibition des mammalian Target of Rapamycin (mTOR). mTOR ist eine Ser/Thr-Kinase und nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation von Zellproliferation und Zellwachstum ein. mTOR kann über exogene Reize wie Wachstumsfaktoren und Nährstoffe (Aminosäuren, Glucose) aktiviert werden. So wird mTOR über den EGF-Rezeptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor) aktiviert und kontrolliert dabei über die Phosphorylierung der ribosomalen p70S6-Kinase die Aktivierung des ribosomalen S6-Proteins (vgl. Abbildung 2) und damit die Translation von Proteinen und Transkriptionsfaktoren, die die Proliferation und das Wachstum der Zellen regulieren. Über diese Signalkaskade werden die Proliferation und das Wachstum der Zellen stimuliert und ihre Apoptose unterdrückt (Jacinto E. und Hall M. N. 2003; Schmelzle T. und Hall M. N. 2000).

Durch den spezifischen mTOR-Inhibitor Rapamycin konnte eine anti-tumorale Wirkung aufgrund anti-angiogener Eigenschaften nachgewiesen werden (Guba M. et al. 2002; Eng C. P. et al. 1984). Rapamycin (Sirolimus®) und seine Analoga CCI-779 (Temsirolimus®), RAD001 (Everolimus®) und AP23573 werden zur Zeit in klinischen Studien bei fortgeschrittenen Tumorleiden als Mono- und als Kombinationstherapie untersucht (Chang S. M. et al. 2005; Chan S. et al. 2005).

3. Strahlentherapie und Angiogenese

Tumorzellen können einen strahlenprotektiven Einfluss auf die Endothelzellen ihrer Mikrozirkulation ausüben (Abdollahi A. et al. 2003; Colevas A. D. et al. 2003; Gorski D. H. et al. 1999). So kann ionisierende Strahlung in Tumorzellen und Endothelzellen intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, die über eine verstärkte Ausschüttung von angiogenen Wachstumsfaktoren eine Gefäßneubildung im Tumor und dadurch eine Strahlenresistenz vermitteln können (Gorski D. H. et al. 1999). In Tumoren mit hoher Konzentration angiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF (basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor), Angiopoetin u.a. ist eine verminderte Strahlenempfindlichkeit der Endothelzellen zu beobachten (Griffin R. J. et al. 2002; Lee C. G. et al. 2000). Klinisch korreliert die gesteigerte Expression von Wachstumsfaktoren mit einer erhöhten Gefäßdichte in den Tumoren und einer schlechteren Prognose (Kerbel R. und Folkman J. 2002; Geng L. et al. 2001).

4. mTOR-abhängige Strahlenresistenz

Als ein zentraler Signalweg für Angiogenese und Strahlenresistenz von Tumoren wurde die PI3K/Akt-Signalkaskade (Phosphoinositol-3-Kinase/Akt) identifiziert (Cengel K. A. et al. 2007; Weppler S. A. et al. 2007).

An den Tumorzellen können ionisierende Strahlen über den EGF-Rezeptor (epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, EGFR) oder auch direkt die PI3K/Akt-Signalkaskade aktivieren und dadurch eine Strahlenresistenz induzieren (Schmidt-Ullrich R. K. et al. 1999) (vgl. Abbildung 2). Akt reguliert unter anderem die Phosphorylierung von mTOR. Neben der Regulation von Zellproliferation und

Zellwachstum wird über mTOR auch die Expression des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF gesteuert. An der Endothelzelle wird der PI3K/Akt-Signalweg wiederum durch VEGF aber auch durch die Bestrahlung aktiviert, was zu einer gesteigerten Endothelzellproliferation und Angiogenese in Tumoren führt (Zingg D. et al. 2004; Edwards E. et al. 2002).

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg nimmt somit eine zentrale Stellung in der Vermittlung einer Strahlenresistenz und Angiogenese in Tumoren ein (vgl. Abbildung 2). mTOR erscheint daher ein besonders geeignetes Ziel darzustellen, um in einem Tumor eine gesteigerte Empfindlichkeit und gesteigerte anti-angiogene Wirkung unter einer Strahlentherapie zu erreichen.

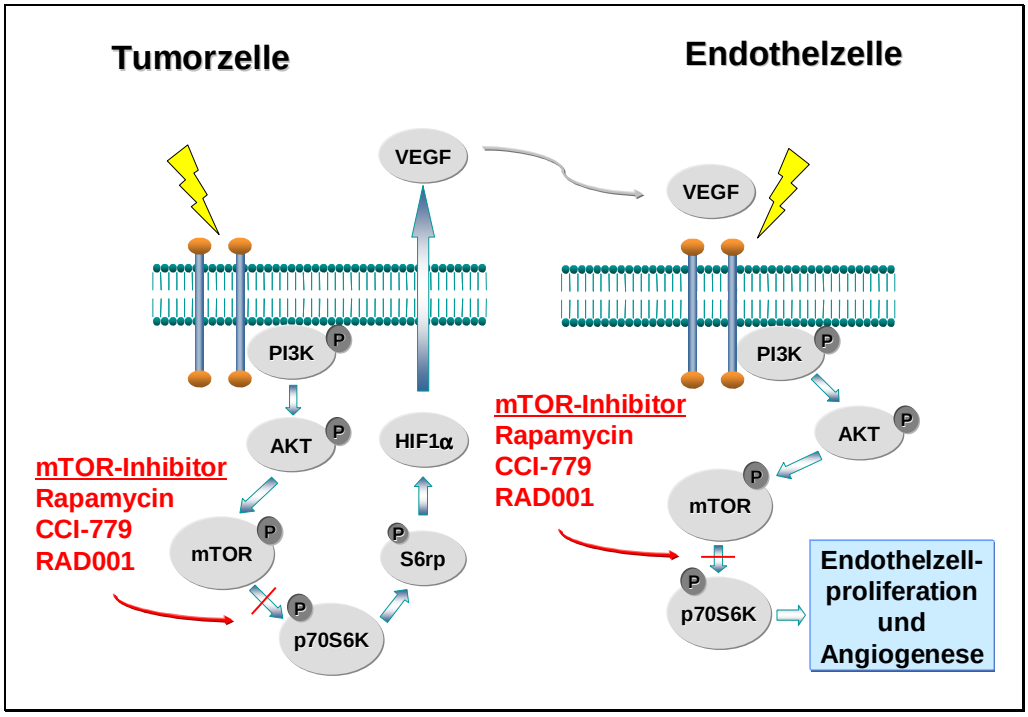

Abbildung 2: PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade in Tumorzellen (links) und Endothelzellen (rechts)

In Tumorzellen kann die Inhibition von mTOR die bestrahlungsinduzierte Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF unterbrechen und dadurch das angiogene Potential der Tumorzellen vermindern. In den Endothelzellen verhindert die Blockade von mTOR die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges durch VEGF und führt so zur Proliferationshemmung und Apoptose der Endothelzellen.

6. Zielsetzung

Die Resistenz von Tumoren gegenüber der Bestrahlung und die Tumorangiogense sind wie zuvor dargestellt über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg miteinander verbunden. Als Streßantwort des Tumors auf eine Bestrahlung kann dieser Signalweg in Tumorzellen und Endothelzellen aktiviert werden, was zur Ausschüttung von (angiogenen) Wachstumsfaktoren führen kann, die eine protektive Wirkung auf Tumorzellen und Endothelzellen ausüben können. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass durch die Kombination einer anti-angiogen wirksamen mTOR-Inhibtion und einer Strahlentherapie die Empfindlichkeit von Tumoren gegenüber beiden Therapieformen additiv oder sogar synergistisch gesteigert werden kann. Dabei wurde angenommen, dass eine möglicherweise verbesserte therapeutische Wirksamkeit insbesondere auf gesteigerte anti-angiogene Effekte der Kombinationstherapie zurückzuführen ist.

Die Zielsetzung der folgenden Arbeit war daher, die Auswirkungen einer Kombinationstherapie aus dem mTOR-Inhibitor RAD001 und ionisierender Strahlung auf das Tumorwachstum und die Angiogenese *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.
Zunächst sollte *in vitro* der Einfluss einer mTOR-Inhibtion und einer einmaligen Bestrahlung als Einzel- und Kombinationstherapie auf die Proliferation von Tumorzellen und Endothelzellen untersucht werden. Es sollten dabei die in der Arbeitsgruppe etablierten Tumorzelllinien des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl, des murinen Fibrosarkoms BFS-1 und murinen Kolonkarzinoms CT-26 miteinander verglichen werden. Die postulierten anti-angiogenen Eigenschaften der unterschiedlichen Therapieformen sollten dann gesondert am Spheroidassy der Endothelzellen geprüft werden. Der Einfluss der mTOR-Blockade und der Bestrahlung kann *in vitro* durch immunocytochemische Untersuchungen von Effektoren dieses Signalweges dargestellt werden. Als ein funktioneller Parameter der Aktivierung dieses Signalweges sollte die VEGF-Sekretion herangezogen werden.
In vivo sollte die Wirkung des mTOR-Inhibitors RAD001 in Kombination mit einer fraktionierten Strahlentherapie auf das Tumorwachstum des orthotop in das Pankreas von Nacktmäusen implantierten humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl, sowie des subkutan in syngenen Mäusen implantierten Fibrosakroms BFS-1 und Kolonkarzinoms CT-26 untersucht werden. Die Beurteilung der anti-angiogenen

Wirksamkeit der Therapie *in vivo* sollte anhand immunhistochemischer Untersuchungen der Gefäßdichte in den Tumoren erfolgen. Zudem sollte versucht werden, die Aktivierung des mTOR-Signalweges ebenfalls mittels immunhistochemischer Färbung in den Tumoren darzustellen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Zelllinien und Zellkultur

1.1 Humanes Pankreaskarzinom L3.6pl

Die Zelllinie L3.6pl ist eine metastatische Variante der Zelllinie des humanen Pankreaskarzinoms COLO 357 nach *in vivo* Pankreas-Leber-Selektion in der Nacktmaus (Morgan R. T. et al. 1980; Bruns C.J. et al. 1999). COLO 357 ist eine humane duktale Pankreasadenokarzinomzelllinie, die aus einem nicht metastasierten, lokal fortgeschrittenen Pankreaskopfkarzinom von Morgan et al. 1980 isoliert wurde.

1.2 Murines Kolonkarzinom CT-26

Das murine Kolonkarzinom CT-26 wurde 1975 von Griswold et al in der Balb/C-Maus durch wiederholte rektale Applikation von N-nitroso-n-methyl-urethan induziert. Hierbei handelt es sich um ein undifferenziertes Kolonkarzinom, welches durch schnelles Tumorwachstum charakterisiert ist (Griswold D. P. und Corbett T. H. 1975).

1.3 Murines Fibrosarkom BFS-1

Der Primärtumor des Fibrosarkomes BFS-1 entstand in der C57/BL/6J-Maus nach subkutaner Injektion des Karzinogens 3-Methylcholantren (Stoelcker B. et al. 2000).

1.4 Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen (HUVEC)

Die aus humanen Nabelschnurvenen isolierten Endothelzellen HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) wurden von der Fa. PromoCell (Heidelberg)

bezogen. Für alle Versuche *in vitro* wurden die HUVECs maximal bis zur Passage 6 verwendet.

1.5 Zellkultur

1.5.1 Kulturmedien der Tumorzellen

Als Kulturmedium für die CT-26 sowie die BFS-1 Zellen diente Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI 1640, Gibco, Karlsruhe), dem 10% fötales bovines Serum (FBS, Biochrom, Berlin), 2 mM L-Glutamin (PAN Biotech, Aidenbach), 10 mM Hepes Puffer (Pan Biotech), 1mM Natriumpyruvat (Pan Biotech) sowie 0,05 mg/ml Gentamycin (Pan Biotech) zugefügt wurden.
Die L3.6pl Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle's Medium (DMEM, Gibco, Karlsruhe) mit 10% FBS (Biochrom), 2 mM L-Glutamin (Pan Biotech), 2% MEM Vitamine (Pan Biotech), 2% nicht essentielle Aminosäuren (Pan Biotech) und 1% Penicillin/Streptomycin (Pan Biotech) kultiviert.

1.5.2 Kulturmedium der Endothelzellen

HUVECs wurden in Endothelial Cell Growth Medium der Firma PromoCell GmbH (Heidelberg) gezüchtet. Das Medium enthält nach Zusatz des Supplementmixes 0,4% ECGS/H (Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin), 2 % FBS, 0,1 ng/ml epidermalen Wachstumsfaktor, 1 µg/ml Hydrokortison, 1 ng/ml basic fibroblast factor (basischen Fibroblasten Faktor). Dem HUVEC-Medium wurden ferner 0,05 mg/ml Gentamycin (Pan Biotech) zugefügt.

1.5.3 Kultur der Tumor- und Endothelzellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden im 37℃ warmen Wasserbad aufgetaut und in 10 ml des jeweiligen Kulturmediums resuspendiert. Anschließend

wurden die Zellen bei 1000 x g bei 23℃ über fünf Minuten zentrifugiert (Rotixa/RP, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen), in 20 ml Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen gezüchtet.

Alle vier Zelllinien wurden in T75 Flachboden-Zellkulturflaschen (EasyFlask™, Nunclon™ Oberfläche, Nunc, Wiesbaden) im Brutschrank (Nuaire US Autoflow Typ 4500E, Plymouth, Minnesota, USA) bei 37℃, 90%iger Luftfeuchtigkeit und mit 5% CO_2 angereicherter Luft kultiviert.

Bei 80%iger Konfluenz der Zellen wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS (Pan Biotech) gewaschen und durch Zugabe von Trypsin-EDTA (Pan Biotech) abgelöst. Nach ca. fünf Minuten lösten sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen und konnten durch Zugabe von 10 ml entsprechendem Zellkulturmedium aus der Flasche abgesaugt und in ein 50 ml Falcon Röhrchen gegeben werden. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 x g bei 23℃ über fünf Minuten zentrifugiert (Rotixa/RP, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) und konnten entweder eingefroren, weitergezüchtet oder, wie nachfolgend beschrieben, entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll weiterbehandelt werden.

Zum Einfrieren wurden ca. $1x10^6$ Zellen in 1 ml Einfriermedium in Schritten über 0°C, -20℃ sowie -80℃ abgekühlt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Einfriermedium bestand zu 70% aus entsprechendem Zellkulturmedium, 20% FBS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen).

Für alle Versuche *in vitro* und *in vivo* wurden von jeder Zelllinie Zellen der gleichen Kulturpassagen verwendet, um gut vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

2. mTOR-Inhibitor RAD001 (Everolimus)

Als mTOR-Inhibitor wurde RAD001 (Everolimus) verwendet, welches von der Fa. Novartis (Basel, Schweiz) in gelöster Form als so genannte „oral solution“ und in pulverisierter Form zur Verfügung gestellt wurde.

Das Pulver wurde in DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gelöst, portioniert und in einer Konzentration von 10 mg/ml bei -20℃ gelagert. Für die *in vitro* Experimente wurde es entsprechend der benötigten Konzentration mit Zellkulturmedium verdünnt.

Die „oral solution“ (20 mg/g) wurde bei 4℃ aufbewahrt und für die intraperitoneale Injektion mit NaCl verdünnt.

3. Experimente *in vitro*

Die Bestrahlung aller Zellen *in vitro* erfolgte bei 37℃ am Müller RT 250 Röntgengerät. Die Bestrahlungsparameter waren wie folgt: 225 kV, 15 mA, 0,35 Cu-Filter, Dosisrate: 0,9 Gy/min.

3.1 WST-1 Proliferationsassay

Um zwischen den Effekten auf Tumorzellen und Endothelzellen unterscheiden zu können, wurden die unterschiedlichen Therapieansätze aus Mono- und Kombinationstherapie des mTOR-Inhibitors und der Strahlentherapie an den Tumorzellen der Zelllinien L3.6pl, BFS-1 und CT-26 sowie an HUVECs *in vitro* durchgeführt.

Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen trypsiniert und abzentrifugiert. Anschließend wurden jeweils 500 Zellen in 100 µl Medium pro Loch (38 mm²) in einer 96-Loch Mikrotiterplatte (Nunc Brand Products, Dänemark) ausplattiert und über Nacht inkubiert. Die äußerste Reihe der Platten wurde mit 200 µl PBS bestückt. Insgesamt wurden für jede Zelllinie je zehn 96-Loch Mikrotiterplatten ausplattiert. Nach 16 Stunden wurde das Zellmedium entfernt. Die eine Hälfte der Platten wurde dann mit entsprechendem Kulturmedium unter Zusatz steigender Dosierungen des mTOR-Inhibitors RAD001 (Volumen jeweils 200 µl, RAD001 Dosierungen: 0 ng/ml, 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml) versehen, die andere Hälfte der Platten wurde mit Kulturmedium ohne Zusatz von RAD001 versehen (vgl. Abbildung 3). Eine Stunde nach Mediumwechsel wurden je zwei Platten (mit RAD001 und ohne RAD001) einer einmaligen Bestrahlung von 0 Gy; 0,25 Gy; 0,5 Gy; 1 Gy und 2 Gy ausgesetzt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde bei allen Platten ein Mediumwechsel durchgeführt. Neben den Zellen, die bereits vor der Bestrahlung mit RAD001 behandelt wurden, wurde jetzt in der zweiten Gruppe der mTOR-Inhibitor dem Kulturmedium in den o.g. Konzentrationen zugesetzt. Der Mediumwechsel wurde alle zwei Tage unter Zusatz des mTOR-Inhibitors in den jeweiligen Gruppen

wiederholt. Sobald das erste Well eine Konfluenz von 90% erreicht hatte, wurde die Versuchsreihe ausgewertet (CT-26 und L3.6pl sechs Tage nach dem ausplattieren, BFS-1 nach sieben Tagen, HUVEC nach fünf Tagen).

Um eventuelle Interaktionen von RAD001 mit dem Reagenz WST-1 (Water soluble tetrazolium-1; Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) auszuschließen, wurde zur Versuchsauswertung bei allen Platten das Medium entfernt und entsprechendes Zellkulturmedium ohne Zusatz von RAD001 mit 10% WST-1 (Roche Diagnostics GmbH) zugegeben. Die Auswertung erfolgte nach einer einstündigen Inkubation mit 10% WST-1 (Roche Diagnostics GmbH) colorimetrisch im ELISA-Reader (MRX Microplate Reader**,** Dynatech Deutschland GmbH, Denkendorf) bei 450 nm (Software: Revelation Software Package, Version G 3.2).

	1	2	3	4	5	6	7
A	X	X	X	X	X	X	X
B	X	U	T	T	T	T	X
C	X	U	T	T	T	T	X
D	X	U	T	T	T	T	X
E	X	U	T	T	T	T	X
F	X	U	T	T	T	T	X
G	X	U	T	T	T	T	X
H	X	X	X	X	X	X	X

Abbildung 3: Verteilungsmuster in der 96-Loch-Mikrotiterplatte

X: Steriles PBS (200 µl/ Loch).

U: Unbehandelte Zellen in entsprechendem Kulturmedium mit 10% FBS (200µl/ Loch).

T: Unterschiedliche Dosierungen von RAD001 (in 200 µl Kulturmedium/Loch):

Spalte 3, B-G: 0,01ng/ml.

Spalte 4, B-G: 0,1ng/ml.

Spalte 5, B-G: 1ng/ml.

Spalte 6, B-G: 10ng/ml.

3.2 Bestimmung der bestrahlungsabhängigen VEGF-Sekretion der Tumorzellen

3.2.1 Zellkultur und Behandlung der Zellen

Die Tumorzellen wurden in 6-Loch Platten (Nunc Brand Products, Dänemark) in entsprechendem Zellkulturmedium so ausplattiert, dass nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden eine Konfluenz von 70% bestand. Ein Mediumwechsel wurde durchgeführt, indem eine Hälfte der Platten mit entsprechendem Kulturmedium mit 10% FBS und 10 ng/ml RAD001, die andere Hälfte mit entsprechendem Zellkulturmedium für eine Stunde inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die Bestrahlung der Zellen mit 0, 2, 4 und 10 Gy.

Nach einer Inkubationszeit von weiteren 72 Stunden wurde der Überstand der Zellen abgenommen und bei $2x10^4$ x g bei 4℃ (Zentrifuge 5417R, Eppendorf Zentrifug en, Wesseling-Berzdorf) zentrifugiert und zur quantitativen VEGF-Bestimmung verwendet.

Die Zellen wurden auf Eis gelagert mit Lysispuffer (Cell Lysis Buffer (10x), Cell Signalling, Boston, USA), lysiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation bei 2×10^4 x g bei 4℃ (Zentrifuge 5417R, Eppendorf Zentrifuge n, Wesseling-Berzdorf). Der Überstand wurde zur Proteinbestimmung verwendet.

3.2.2 Quantitative VEGF-Bestimmung

Die VEGF-Sekretion wurde quantitativ mit Hilfe des Quantakine Human bzw. Mouse VEGF Kit (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) im Überstand der Zellen bestimmt.

Analog zum Protokoll des Herstellers wurde zunächst eine VEGF-Standard Reihe hergestellt: 0; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250; 500 und 1000 pg/ml VEGF.

In die vom Hersteller mitgelieferte 96-Loch-Mikrotiter-Platte wurden pro Loch 50 µl „Assay Diluent RD1W“ pipettiert. Anschließend wurden je Loch 100 µl Standard bzw. Probe dazugegeben. Nach der darauf folgenden Inkubation von zwei Stunden bei Raumtemperatur folgte ein Waschgang mit je 200 µl des mitgelieferten Waschpuffers, der zweimal wiederholt wurde. Pro Loch wurden 200 µl „VEGF Conjugate“-Lösung zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss an einen erneuten Waschschritt wurden pro Loch 200 µl „substrate solution“ pippetiert und bei Dunkelheit und Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von je 50 µl „Stopp solution“ wurde der Versuch innerhalb von 30 Minuten colorimetrisch im Elisa-Reader (Vmax, Kinetic Microplate Reader, Molecular Devices Corp, USA; Software: Softmax 2.32, Molecular Devices Corp. USA) bei 450 nm ausgewertet.

3.2.3 Proteinbestimmung

Um die von den Zellen produzierte VEGF-Menge quantitativ auf die Zellmenge umzurechnen, wurde eine Proteinbestimmung der Zellen pro Well durchgeführt. Diese erfolgte mit BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, USA). Pro Loch einer 96-Loch Mikrotiterplatte (Nunc Brand Products, Dänemark) wurden 45 µl Wasser, 5 µl Probenlösung (Standard oder Zelllysate) und 50 µl Assay Reagent A + B (im Verhältnis 1:50) pipettiert und bei 37℃ für 30 Minuten inkubiert. Die Auswertung erfolgte colorimetrisch im ELISA-Reader (Vmax, Kinetic Microplate Reader, Molecular Devices Corp, USA; Software: Softmax 2.32, Molecular Devices Corp. USA).

3.3 Spheroidassay

Zur Versuchsdurchführung musste zunächst Metocel hergestellt werden. Dazu wurden 6 g autoklavierte Methylcellulose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in 500 ml HUVEC-Kulturmedium (Promo Cell) ohne Zusätze gelöst und über Nacht bei 37℃ gerührt. Am nächsten Tag konnte das Metocel portioniert und bei 5000 x g für drei Stunden abzentrifugiert werden (Rotina 48R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und zur Versuchsdurchführung verwendet. HUVECs wurden in fünf nicht adhärenten U-Boden 96-Loch Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) in 25% Metocel und 75% HUVEC-Kulturmedium (PromoCell) in einer Zellkonzentration von 800 Zellen in 100 µl pro Well ausplattiert. Die Zellen lagerten sich über Nacht kugelförmig zu einem Spheroid zusammen. Die Spheroide wurden nun mit einer elektronischen Mikropipette (Eppendorf Research Pro, Eppendorf, Hamburg) abgesaugt und in ein 50 ml Falcon Röhrchen gegeben. Bei

600 x g wurden die Spheroide bei 23℃ über drei Minuten zentrifugiert (Rotixa/RP, Hettich Zentrifugen) und der Überstand wurde sodann vorsichtig abgenommen.
Das Gel, in das die so gewonnenen Spheroide anschließend eingebettet wurden, setzte sich wie folgt zusammen: 2% FBS (Biochrom), 10% Zehnfachmedium (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 44% Metocel und 44% Kollagen (5,9 mg/ml, Becton Dickinson). In die inneren acht Wells einer 24-Well Platte wurden je 850 µl Gelgemisch mit Spheroiden gegeben.
Nachdem das Gel polymerisierte, wurden unterschiedliche Konzentrationen von RAD001 in 100 µl HUVEC-Kulturmedium ohne Zusätze gelöst auf das Gel pipettiert, sodass nach Diffusion die errechnete Konzentration von RAD001 im Gel 0 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml betrug. Die Spheroide wurden eine Stunde nach Zugabe von RAD001 mit 0, 0,5 und 1 Gy bestrahlt. Eine Stunde nach der Bestrahlung wurden 20 ng VEGF gelöst in 50 µl Medium zugegeben. Die Gelplatten wurden über Nacht im Brutschrank (Nuaire Autoflow) bei 37℃ inkubiert. Um die Spheroide zu fixieren wurde nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden auf jedes Gel 1 ml normalgepuffertes 4%iges Formalin gegeben.
Die Versuchsauswertung erfolgte durch Abfotografieren der Spheroide und computerassistiertem Ausmessen der Sproutlänge (Mikroskop: Carl Zeiss Axioskop 40, Software: Axio Vision Release 4.6, 12-2006, Fa. Carl Zeiss AG, Jena). Dabei ist die kumulative Sproutlänge eines Spheroids der Parameter, der als Maß für die Angiogenese herangezogen wird.

3.4 Bestimmung der Aktivierung des mTOR-Signalweges anhand der Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins

Die Aktivierung bzw. die Inaktivierung des mTOR-Signalweges wurde anhand des Phosphorylierungsstatus des ribosomalen S6 Proteins, einem Downstream-Target von mTOR (vgl. Abbildung 2) immunzytochemisch untersucht.

3.4.1 Antikörper

Folgender primärer Antikörper (PAK) wurde verwendet:

Phospho-S6 Ribosomal Protein Ser235/236 monoklonaler Antikörper, Kaninchen anti-Maus, anti-Mensch (Cell Signalling, Boston, USA); Verdünnung 1:300 (Immunzytochemie), 1:100 (Immunhistochemie, vgl. II.4.7).

Folgender sekundärer Antikörper (SAK) wurde verwendet:

Biotinylierter Ziege anti-Kaninchen Antikörper (Vector, Burlingame, USA); Verdünnung 1:400 (Immunzytochemie), 1:200 (Immunhistochemie, vgl. II.4.7).

3.4.2 Negativkontrollen

Um eventuelle unspezifische Anfärbungen ausschließen zu können, wurde für jede Zelllinie (vgl. II.4.7) eine Negativkontrolle angefertigt. Dazu wurde der Objektträger entsprechend dem nachfolgenden Protokoll behandelt, jedoch wurde dabei auf den primären Antikörper verzichtet.

3.4.3 Immunzytochemie

3.4.3.1 Kultivieren der Zellen auf Objektträgern

Endothelzellen und Tumorzellen wurden in mit autoklavierten Objektträgern bestückten Quadriperms (Quadriperm steril; Greiner bio-one, Frickenhausen) ausplattiert und auf den Objektträgern (SuperFrost Ultra Plus Objektträger 25 x 75 x 1,0 mm; Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig) in entsprechendem Zellkulturmedium kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS (Pan Biotech, Aidenbach) gewaschen und über 16 Stunden

in entsprechendem FBS-freiem Hungermedium inkubiert. Anschließend wurden die Tumorzellen und Endothelzellen wie folgt behandelt:

- Tumorzellen: Unstimuliert, Stimulation mit FBS, IGF 10 ng/ml (R&D Systems, Wiesbaden – Nordenstadt), Bestrahlung mit 1 Gy (CT-26), 2 Gy (BFS-1 und L3.6pl), jeweils mit und ohne Vorinkubation mit 10 ng/ml RAD001 eine Stunde vor entsprechender Stimulation.
- Endothelzellen: Unstimuliert, Stimulation mit FBS, VEGF 10 ng/ml (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt), Bestrahlung mit 0,5 Gy, jeweils mit und ohne Vorinkubation mit 10 ng/ml RAD001 eine Stunde vor entsprechender Stimulation.

30 Minuten nach Stimulation wurden die Zellen in 4°C kalter Methanol/Essigsäure (Verhältnis 3:1) fixiert.

3.4.3.2 Immunzytochemische Analyse des ribosomalen S6 Proteins anhand der Biotin/ Streptavidin-Methode (FITC= fluoreszierendes Isothiocyanat)

Die Avidin/ Biotin-Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweissglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Dadurch weist diese Methode eine sehr hohe Empfindlichkeit auf (Hsu S. M. und Raine L. 1981). Da es jedoch teilweise zu unspezifischen Reaktionen bei der Verwendung von Avidin kommt, wurde ein reineres Produkt auf gentechnischem Wege gewonnen. Dieses neuere Produkt heißt Streptavidin und wird aus dem Bakterium Streptomyces avidinii isoliert (Noll, S., Schaub-Kunnen, S. Praxis der Immunhistochemie. 2000; 1: 15, 17).
Die Objektträger (vgl. II.3.4.3.1) wurden je drei Minuten in PBS mit 0,1% Triton-X-100 und PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen acht Minuten lang in 4% Formaldehydlösung fixiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschritt: Je drei Minuten in PBS, PBS mit 0,1% Triton-X-100, PBS. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Endogenes Avidin/ Biotin wurde mit Avidin/ Biotin Block (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) je 15 Minuten blockiert. Zur Minimierung unspezifischer Hintergrundfärbung wurden die Objektträger nach einem Waschgang mit PBS mit 3% Goatserum in PBS 3% BSA (Bovines Serum Albumin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), über zwei Stunden inkubiert, welches daraufhin abgekippt

wurde. Die folgende Inkubation mit dem PAK (Phospho-S6 Ribosomal Protein Ser235/236 Antikörper, Cell Signalling, Boston, USA) erfolgte im Verhältnis 1:300 in PBS 3% BSA über 45 Minuten. Sodann wurden die Objektträger wieder drei Mal drei Minuten in PBS gewaschen. Der biotinylierte SAK (Goat anti Rabbit biotinyliert, Vector, Burlingame, USA) wurde im Verhältnis 1:400 mit PBS 3% BSA aufgetragen und für ca. 45 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten drei weitere Waschschritte mit PBS über je drei Minuten. Streptavidin-DTAF (Jackson ImmunoReasearch Europe Inc., Suffolk, England) wurde im Verhältnis 1:50 mit PBS (Pan Biotech) verdünnt, die Objektträger damit bei 37℃ in der feuchten Kammer für 20 Minuten inkubiert und im Anschluss daran drei mal drei Minuten in PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden mit Vectaschield + DAPI (Vector, Burlingame, USA) gegengefärbt und die Objektträger eingedeckt.

4. Experimente *in vivo*

4.1 Versuchstiere

Für die tierexperimentellen Studien wurden 6-8 Wochen alte männliche C57Bl/6 Mäuse (Charles River, Sulzefeld) mit einem Körpergewicht von 20-22 g, 6-8 Wochen alte männliche Balb/c Mäuse (Charles River, Sulzefeld), Körpergewicht 20-22 g und 8 Wochen alte männliche NMRI nu/nu Nacktmäuse (Harlan Winkelmann, Borchen), Körpergewicht 30-35 g verwendet.

Alle Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung bei einer Umgebungstemperatur von 24℃, 50% relativer Luftfeuchtigkeit und bei freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Die Balb/c sowie die C57Bl/6 Mäuse wurden in Käfigen zu je vier Mäusen gehalten.

Aufgrund der Immundefizienz der NMRI/nu/nu Mäuse, die auf einem T-Zell-Defekt beruht, wurden die Tiere in Käfigen zu je acht Mäusen in einer vom Institut für Chirurgische Forschung selbst entwickelten Flow mit eingebautem Luftsterilfilter gehalten.

4.2 Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation

Zunächst wurden die Zellen aufgetaut und in die Zellkultur überführt. Für die *in vivo* Versuche wurden die Kulturpassagen 26 der Zelllinie CT-26, Passage 49 der Zelllinie BFS-1 und die Passage 12 der Zelllinie L3.6pl verwendet.
Zur Vorbereitung auf die Implantation wurden die Zellen wie gewohnt trypsiniert, in Medium re-suspendiert und durch Zentrifugation (1000 x g, Rotixa/RP, Hettich Zentrifugen) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden sodann zweimal mit PBS (Pan Biotech) gewaschen und jeweils bei 1000 x g abzentrifugiert (Rotixa/RP, Hettich Zentrifugen). Vor der letzten Zentrifugation wurden die Zellen gezählt und die Vitalität nach Trypanblaufärbung bestimmt (Neubauer Zählkammer). Das Zellpellet wurde so in PBS gelöst, dass die Zellkonzentration $1x10^6$/ 50µl entsprach. Die Vitalität der Tumorzellen vor der Implantation betrug mindestens 90%. Die Zellsuspension wurde bis zur Injektion auf Eis gelagert.

4.3 Implantation der Tumorzellen

4.3.1 Anästhesie der Tiere

Alle Versuchstiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von Ketavet (100 mg/ml; Pharmacia & Upjohn, Erlangen) und Rompun (2%; Bayer, Leverkusen) narkotisiert, entsprechend 70 mg/kg Körpergewicht Ketavet und 14 mg/kg Körpergewicht Rompun. Zusätzlich wurden pro Maus $5x10^{-3}$ mg Atropin intraperitoneal injiziert.

4.3.2 Subkutane Implantation der Tumorzellen BFS-1 und CT-26

Die narkotisierten Versuchstiere wurden vorsichtig unter Schonung der Haut depiliert und die Haut mit 70%igem Alkohol desinfiziert.
Die in PBS (Pan Biotech) gelösten Zellen (BFS-1 und CT-26) wurden mit einer 1 ml Insulinspritze den Versuchstieren subkutan implantiert. Pro Maus wurden dabei 40 µl der Zellsuspension, entsprechend $8x10^5$ Zellen, medial am Rücken subkutan injiziert.

4.3.3 Orthotope Implantation der Tumorzellen L3.6pl

Als orthotopes Tiermodell ist die Injektion von 8 x 10^5 Tumorzellen des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl in das Pankreas an der Nacktmaus etabliert (Bruns C. J. et al. 1999). Es stellt ein schonendes und einfach zu reproduzierendes Verfahren dar, um das Tumorwachstum unter dem Einfluss klinisch relevanter biochemischer Alterationen und biologischer Einflüsse aus dem umgebenden Wirtsgewebe zu untersuchen.

Die in PBS gelösten und auf Eis gelagerten L3.6pl Pankreaskarzinomzellen wurden mit einer 1 ml Insulinspritze aspiriert.

Nach Lagerung der Mäuse in Rechtsseitenlage auf einem sterilen Tuch wurde das Operationsfeld mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Eine quere Oberbauchlaparatomie wurde durchgeführt. Das Pankreas wurde vorsichtig dargestellt und 40 µl der Zellsuspension, entsprechend 8x10^5 Zellen, wurden subkapsulär in das Pankreas injiziert (vgl. Abbildung 4). Nach vorsichtiger Rückverlagerung des Pankreas wurde die Laparatomiewunde durch Einzelknopfnaht mit Prolene 4,0 (Ethicon, Norderstedt) verschlossen.

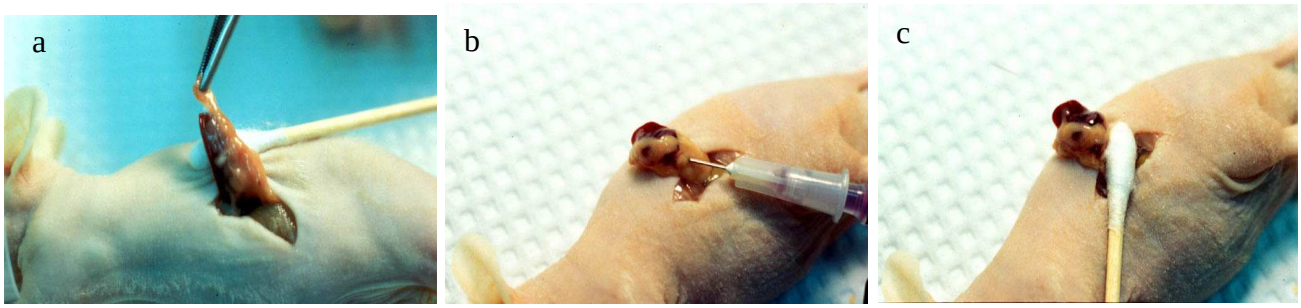

Abbildung 4: Orthotope Injektion der Tumorzellen in das Pankreas.

a: Vorsichtige Darstellung des Pankreas nach querer Oberbauchlaparotomie

b: Injektion der Tumorzellen in die subkapsuläre Region des Pankreas

c: Kontrolle auf Bluttrockenheit vor Rückverlagerung des Pankreas

4.4 Dokumentation des Tumorwachstums

4.4.1 Subkutan wachsende Tumoren

Zur Dokumentation des Tumorwachstums wurden die Tumoren alle zwei Tage mit einem Mess-Schieber vermessen. Die Werte des längsten (l) und kürzesten (b) horizontalen Tumordurchmessers, sowie die Tumorhöhe (h) wurden zur Berechnung des Tumorvolumens nach der Formel

$$l \times b \times h \times \pi/6$$

verwendet. Die eventuell sichtbare Nekrose wurde ebenfalls vermessen und das berechnete Nekrosevolumen vom Tumorvolumen subtrahiert.

4.4.2 Orthotop wachsende Tumoren

Eine Woche nach der Implantation der Tumorzellen wurden die Tumoren palpiert und zweidimensional vermessen. Die Berechnung des Tumorvolumens erfolgte nach der Formel:

$$Durchmesser_{klein}^{2} \times Durchmesser_{groß} \times \pi/6$$

4.4.3 Wiegen der Tiere

Die Versuchstiere wurden auf einer Kleintierwaage (Kern 440-21N, Max. 40g, d=0,001g; Kern & Sohn GmbH, Balingen) alle zwei Tage gewogen.

4.5 Tierexperimentelles Studiendesign

Nach subkutaner bzw. orthotoper Tumorzellinjektion erfolgte die Randomisierung der Tiere in die folgenden Behandlungsgruppen:

a) Kontrollgruppe
b) fraktionierte Bestrahlung von 5 x 2 Gy an fünf konsekutiven Tagen (Abbildung 5).
c) fraktionierte Bestrahlung von 5 x 4 Gy an fünf konsekutiven Tagen (Abbildung 5).
d) anti-angiogene Therapie mit RAD001 1,5 mg/kg KG/d intraperitoneal (Abbildung 6).
e) Kombinationsbehandlung aus anti-angiogener Therapie (RAD001 1,5mg/kg KG/d i.p.) und fraktionierter Bestrahlung (5 x 2 Gy) (Abbildung 7a). Beginn der Therapie mit RAD001: Zwei Tage vor dem Bestrahlungszyklus.
f) Kombinationsbehandlung aus anti-angiogener Therapie (RAD001 1,5mg/kgKG/d i.p.) und fraktionierter Bestrahlung (5 x 4 Gy) (Abbildung 7a). Beginn der Therapie mit RAD001: Zwei Tage vor dem Bestrahlungszyklus.
g) fraktionierte Bestrahlung (5 x 2 Gy) gefolgt von anti-angiogener Therapie (Rapamycin 1,5mg/kgKG/d i.p.) im Anschluss an den Bestrahlungszyklus (Abbildung 7b).

Im orthotopen Fibrosarkommodell wurde auf die Behandlung mit 5 x 4 Gy als Monotherapie und in Kombination mit RAD001 verzichtet.
Im orthotopen Pankreaskarzinom L3.6pl wurde bei einer durch die Haut palpierten Tumorgröße von 0,5 x 0,5 cm, entsprechend 14 Tage nach Tumorzellimplantation, die anti-angiogene Therapie initiiert, in den subkutanen Tumormodellen zwölf Tage nach Tumorzellimplantation. Der Beginn des Bestrahlungszyklus war im orthotopen Modell dementsprechend Tag 16 nach der Tumorzellimplantation, im subkutanen Tumormodell Tag 14 nach der Tumorzellimplantation.
Die anti-angiogene Therapie mit RAD001 wurde in den jeweiligen Versuchsgruppen bis zum Versuchsende fortgesetzt. Das Versuchsende wurde durch Verschlechterung des Allgemeinzustandes, Gewichtsverlust und hohe Tumorlast der Tiere definiert.

Die Versuchstiere wurden am Versuchsende durch eine Überdosis Ketavet/ Rompun (100 mg/ml, Pharmacia & Upjohn, Erlangen/ 2%; Bayer, Leverkusen) euthanasiert, und die Tumoren zur Gewichtsbestimmung und histologischen bzw. immunhistochemischen Aufarbeitung asserviert.

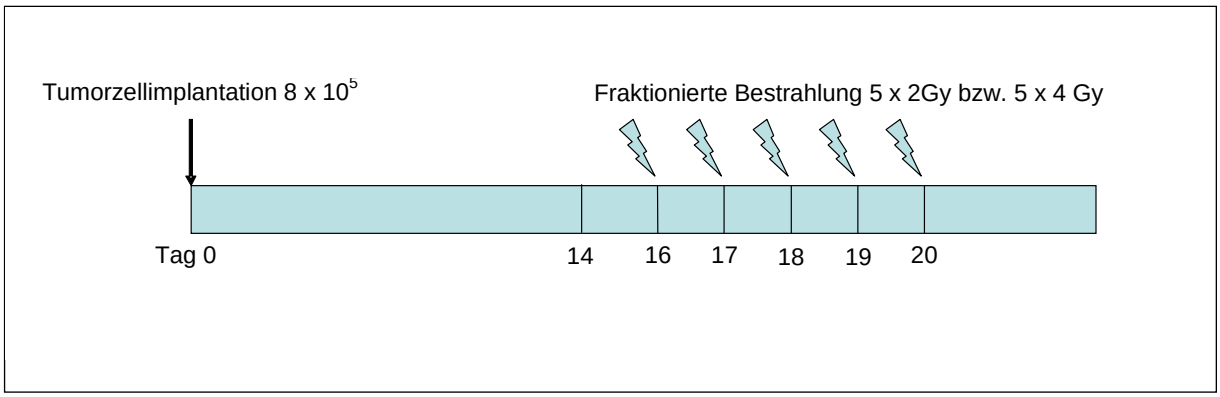

Abbildung 5: *Versuchsprotokoll zur fraktionierten Bestrahlung am orthotopen L3.6pl Pankreaskarzinom. Beginn des Bestrahlungszyklus bei subkutan implantierten Tumoren der Zelllinien CT-26 und BFS-1 an Tag 14.*

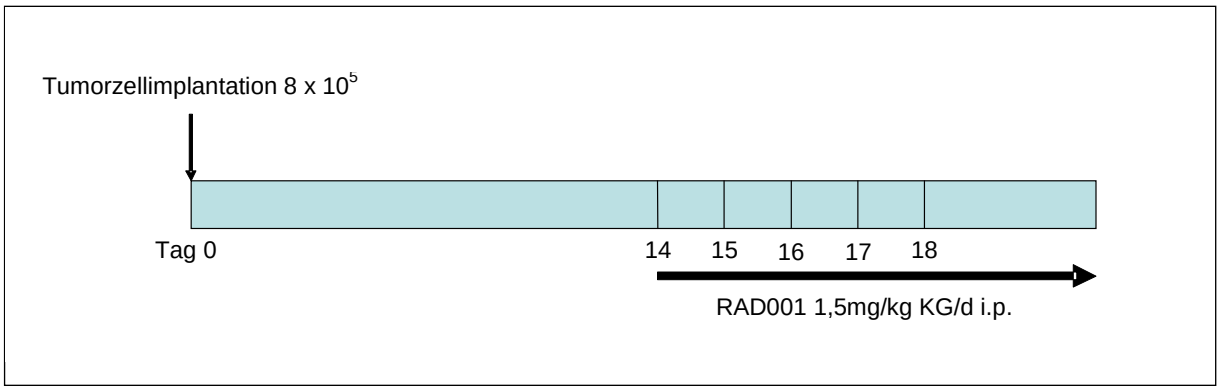

Abbildung 6: *Versuchsprotokoll zur anti-angiogenen Therapie mit RAD001 am orthotopen L3.6pl Pankreaskarzinom. Initiierung der anti-angiogenen Therapie bei den subkutan implantierten Tumoren der Zelllinien CT-26 und BFS-1 an Tag 12.*

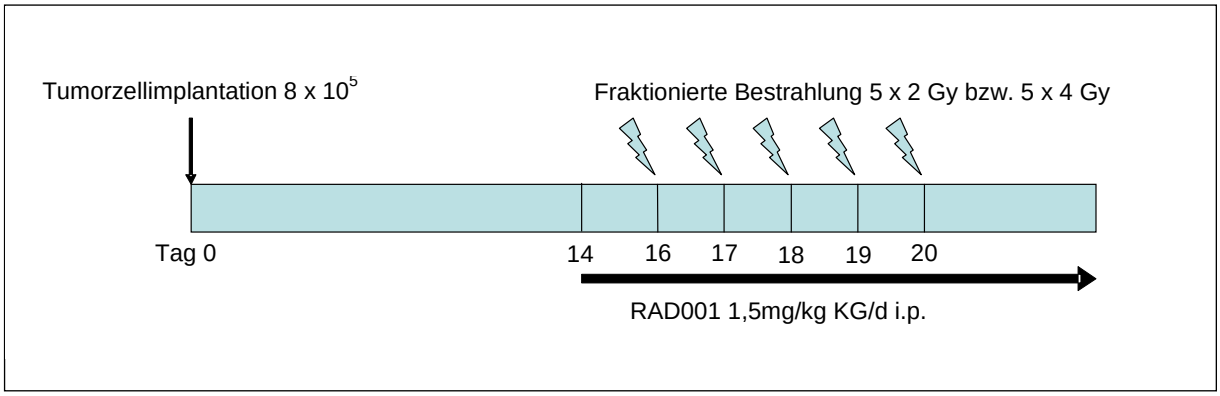

Abbildung 7a: *Versuchsprotokoll zur Kombinationstherapie aus anti-angiogener Therapie mit RAD001 und fraktionierter Bestrahlung am orthotopen L3.6pl Pankreaskarzinom. Bei den subkutan implantierten Tumoren der Zelllinien CT26 und BFS-1: Initiierung der Therapie mit RAD001 an Tag zwölf, Beginn der fraktionierten Bestrahlung an Tag 14.*

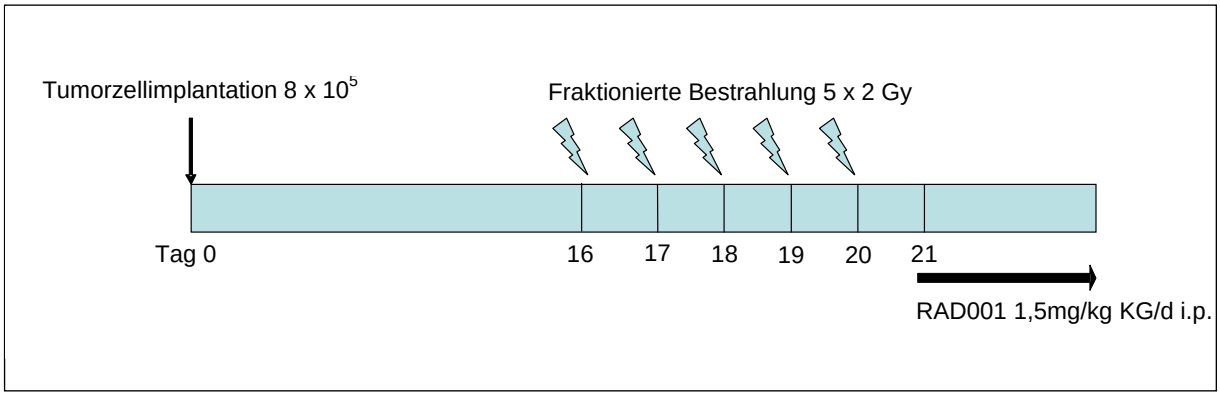

Abbildung 7b: *Versuchsprotokoll zur Kombinationstherapie aus fraktionierter Bestrahlung gefolgt von anti-angiogener Therapie mit RAD001 am orthotopen L3.6pl Pankreaskarzinom. Beginn des Bestrahlungszyklus bei den subkutan implantierten Tumoren der Zelllinien CT-26 und BFS-1 an Tag 14, Initiierung der RAD001 Therapie an Tag 19.*

4.5.1 Bestrahlung der Tumoren *in vivo*

Die Bestrahlung der Tumoren *in vivo* erfolgte am Bestrahlungsgerät Philips RT 100 mit den Bestrahlungsparametern: 100 kV, 8mA, 1,7 Al-Filter, Dosisrate 12,5 Gy/min. Um Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten, wurde die Bestrahlung durch einen 1,5 cm im Durchmesser messenden Bleiglastubus auf das Tumorareal fokussiert.

Die Versuchstiere wurden an den Tagen der Bestrahlung gemäß der zur Tumorzellimplantation durchgeführten Narkose anästhesiert (vgl. II.4.3.1).

4.5.1.1 Orthotopes Pankreas-Tumormodell

In Anästhesie und nach Lagerung der Tiere in Rechtsseitenlage wurden die Tumoren am Tag der ersten Bestrahlung palpiert und die Lage des Tumors auf der Haut markiert, sodass das Bestrahlungsfeld im Bestrahlungszyklus identisch war (vgl. Abbildung 8).

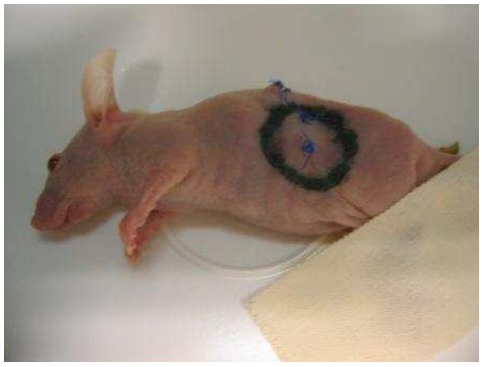

Abbildung 8: *Lagerung der Versuchstiere in Rechtsseitenlage und Kennzeichnung des Bestrahlungsfeldes*

4.5.1.2 Subkutanes Tumormodell

Zur Bestrahlung wurden die Versuchstiere anästhesiert und in Bauchlage gelagert. Das Bestrahlungsfeld der gut sichtbaren und palpablen Tumoren wurde mit dem beschrieben Bleiglastubus begrenzt.

4.6. Bestimmung des RAD001 Serumspiegels

Am ersten Tag der Bestrahlung, in der Mitte des Bestrahlungszyklus sowie nach Abschluss der Strahlentherapie wurde bei je zwei Versuchstieren vor der intraperitonealen Applikation des mTOR-Inhibitors sowie zwei Stunden nach der Applikation Blut zur Bestimmung des basalen und des Peak-RAD001 Serumspiegels gewonnen. Dazu wurde unter Anästhesie der Versuchstiere mit einer Glaskapillare der retrobulbäre Venenplexus im Auge punktiert. Die Kapillare wurde am nasalen Augenwinkel drehend in Richtung gegenüberliegendem Kiefergelenk eingeführt.

Nach Überwindung eines elastischen Widerstandes (Tenon-Kapsel) wurde die knöcherne Orbita erreicht. Die Kapillare wurde sodann vorsichtig zurückgezogen und füllte sich aufgrund der Kapillarwirkung mit Blut.
Die Bestimmung des RAD001 Serumspiegels wurde freundlicherweise vom Institut für Klinische Chemie - Klinikum Großhadern der Universität München übernommen. Die Bestimmung des RAD001-Serumspiegels wird dort nach einem standardisierten chromatographischen Verfahren für die klinische Routine bestimmt („high performance liquid chromatography“) (Brignol N. et al. 2001).

4.7 Immunhistochemie

4.7.1 Negativkontrollen

Negativkontrollen wurden für jeden Tumor und jede Färbung analog zu II.3.4.2 angefertigt.

4.7.2 Ribosomales S6 Protein

4.7.2.1 Verwendete Antikörper

In der Immunhistochemie der Tumorgewebe wurden die identischen Antikörper verwendet, wie sie bereits zuvor für die Immunzytochemie unter II.3.4.1 beschrieben wurden.

4.7.2.2 Pankreaskarzinom L3.6pl

Die immunhistochemische Färbung des ribosomalen S6 Proteins wurde bei den Tumoren des humanen Pankreaskarzinoms nach der Avidin/ Biotin-Methode (vgl. II.3.4.3.2) mit Immunfluoreszenzmarkierung durchgeführt.
Zur Entparaffinisierung wurden die Präparate (Schnittdicke 4 µm) zehn Minuten bei 60℃ erwärmt, 2 x 5 Minuten in Xylol (Merck KG aA, Darmstadt), dann in einer

absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70% Ethanol; Merck KG aA) jeweils drei Minuten inkubiert und anschließend mit Aqua dest. rehydriert.
Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten, sofern nicht anders angegeben, in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur.
Endogenes Avidin/ Biotin wurde mit Avidin/ Biotin Block (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) je 15 Minuten blockiert. Nach einem Waschschritt (drei mal drei Minuten TBS) folgte ein erneuter Schritt, um unspezifische Hintergrundfärbung zu minimieren: Die Objektträger wurden mit 10% Ziegenserum und 1% BSA in TBS für eine Stunde inkubiert. Die Inkubation mit dem PAK erfolgte nach Abkippen des Ziegenserums in der feuchten Kammer bei 4℃ über 16 Stunden. Es folgte ein erneuter Waschschritt, je drei Minuten in TBS, TBS 0,1% Triton X-100 und TBS. Die Objektträger wurden anschließend über eine Stunde mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Nach einem Waschgang (zwei mal drei Minuten TBS, drei Minuten PBS) erfolgte die Fluoreszenzfärbung mit Streptavidin-DTAF (Jackson ImmunoReasearch Europe Inc., Suffolk, England). Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten bei 37℃ in der feuchten Kammer. Nach einem Waschschritt (drei mal drei Minuten PBS) wurden die Objektträger mit biotinyliertem anti-Streptavidin (Vector) 20 Minuten bei 37℃ inkubiert und vor einer erneuten 20-minütigen Inkubation mit Streptavidin-DTAF (s.o.) je drei mal drei Minuten in PBS gewaschen. Vor dem Eindecken mit Vectashield + Dapi (Vector) erfolgte ein letzter Waschschritt mit drei mal drei Minuten PBS. Die Tumoren wurden sofort mikroskopisch begutachtet und fotografiert (Mikroskop: Carl Zeiss Axioskop 40, Software: Axio Vision Release 4.6, 12-2006, Fa. Carl Zeiss AG, Jena)

4.7.2.3 Fibrosarkom BFS-1

Die Tumoren des murinen Fibrosarkoms wurden mit der Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP-) Methode gefärbt. Bei dieser Methode handelt es sich um eine indirekte Methode, für die man folgende drei Reagenzien benötigt: Primärantikörper, Sekundärantikörper und den PAP-Komplex, bestehend aus dem Enzym Peroxidase und einem Antikörper gegen Peroxidase (Noll S. 2000).

Dazu wurden die Objektträger gemäß der oben beschriebenen Avidin/ Biotin-Methode (s. 4.7.2.1) entparaffiniert und rehydriert. Die Blockade der endogenen Peroxidase erfolgte über 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 3% H_2O_2 in Methanol (Merck). Nach einem Waschschritt (zwei mal fünf Minuten TBS, TBS 0,025% Triton X 100) wurde die Färbung analog der Immunhistochemie beim humanen Pankreaskarzinom, beginnend mit der Blockade unspezifischer Hintergrundfärbung durch Inkubation mit 10% Ziegenserum durchgeführt (s.II.4.7.2.1).
Nach Inkubation der Objektträger mit dem Sekundärantikörper und einem Waschgang mit zwei mal fünf Minuten TBS erfolgte die Färbung mit Chormogen DAB (DAKO, Hamburg) über drei Minuten bei Raumtemperatur. Nach Spülen in Aqua dest. erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxilin und anschließender Farbentwicklung durch einen Waschschritt in Leitungswasser. Die Objektträger wurden mit Kaisers Glycerine Gelatine (Merck) eingedeckt. Im Anschluss daran erfolgte die mikroskopische Auswertung der Tumoren (Mikroskop: Carl Zeiss Axioskop 40, Software: Axio Vision Release 4.6, 12-2006, Fa. Carl Zeiss AG, Jena).

4.7.3 Analyse der Mikrogefäßdichte des humanen Pankreaskarzinom L3.6pl

Folgender primärer Antikörper (PAK) wurde verwendet:

PECAM-1, monoklonaler Antikörper, Ziege anti-Maus (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA); Verdünnung 1:250.

Folgender sekundärer Antikörper (SAK) wurde verwendet:

sc-2042, biotinylierter Antikörper, Esel anti-Ziege (Santa Cruz Biotechnology Inc.); Verdünnung 1:200.

Die immunhistochemische Analyse der Mikrogefäßdichte im Tumor erfolgte nach der Avidin/ Biotin-Methode.
Kryoschnitte (10 µm) wurden zehn Minuten bei -20℃ in 100% Ethanol und weitere zehn Minuten in PBS-Tween inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem PAK, gelöst in PBS-Tween, in der feuchten Kammer bei 4℃ über 16 Stunden. Folgend wurden die Schnitte mit PBS-Tween gespült und mit dem sekundären Antikörper über eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten

Waschschritt in PBS-Tween erfolgte die einstündige Inkubation mit der ABC-Lösung: 1 ml PBS, 20 µl Avidin, 20 µl Biotin. Die Schnitte wurden daraufhin erneut mit PBS-Tween gespült und 20 Minuten mit der AEC-Lösung (3-Amino-9-Ethylcarbazol) inkubiert. Diese wurde mit PBS-Tween abgewaschen und die Schnitte zehn Minuten in PBS-Tween inkubiert. Nach einem Waschschritt in destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun (zehn Sekunden, Sigma Aldrich), welches anschließend unter fließendem Wasser zehn Minuten gebläut wurde, so dass die Proben mit Ultra Mount (Dako, Hamburg) eingedeckt werden konnten.

5. Darstellung der Ergebnisse und statistische Bewertung

Alle Ergebnisse werden soweit nicht anders beschrieben als Mittelwert und Standardfehler angegeben.

Die statistische Analyse der experimentellen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaStat (SigmaStat for Windows; SPSS Science, Chicago, USA). Die Ergebnisse der einzelnen Therapiegruppen der *in vivo* und *in vitro* Versuche wurden mit Hilfe einer Varianzanalyse (ANOVA), erweitert durch den LSD-Test, statistisch ausgewertet. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Bei einem p-Wert $<0,05$ wurde ein Unterschied als statistisch signifikant gewertet.

III. ERGEBNISSE

1. Experimente *in vitro*

1.1 Proliferationsassay

Anhand des WST-Assays wurde der Einfluss der Bestrahlung und mTOR-Inhibition auf die Proliferation der Tumorzellen und Endothelzellen *in vitro* untersucht. Die Konzentrationen von RAD001 lagen zwischen 0,01 ng/ml und 10 ng/ml. Die untersuchte Strahlendosis lag zwischen 0,25 Gy und 2 Gy.

1.1.1 Humanes Pankreaskarzinom L3.6pl

Das humane Pankreaskarzinom L3.6pl zeigte eine Resistenz gegenüber der mTOR-Inhibition. Die Proliferation der Zellen wurde durch die hohe Dosis von 10ng/ml RAD001 lediglich um 8±2% im Wachstum gehemmt.
Die anti-proliferative Wirkung der Bestrahlung war ebenso gering: Die Proliferation der Tumorzellen konnte durch die Bestrahlung mit 2 Gy lediglich um 16±1,5% inhibiert werden. Die Kombination der Bestrahlung mit 2 Gy und RAD001 in der Konzentration 10 ng/ml führte nur zu einer leichten weiteren Wachstumshemmung gegenüber der Kontrollgruppe von 24±1.5% (vgl. Abbildung 9). Dabei spielte es keine Rolle, ob der mTOR-Inhibitor vor oder nach der Bestrahlung zu den Zellen gegeben wurde.
Die Bestrahlung der Zellen mit 0,25 und 0,5 sowie 1 Gy, die Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor in den Konzentrationen 0,01 ng/ml bis 1 ng/ml und die jeweilige Kombination beider Therapieformen hatte keinen anti-proliferativen Effekt, weshalb auf die Darstellung der einzelnen Daten verzichtet wurde.

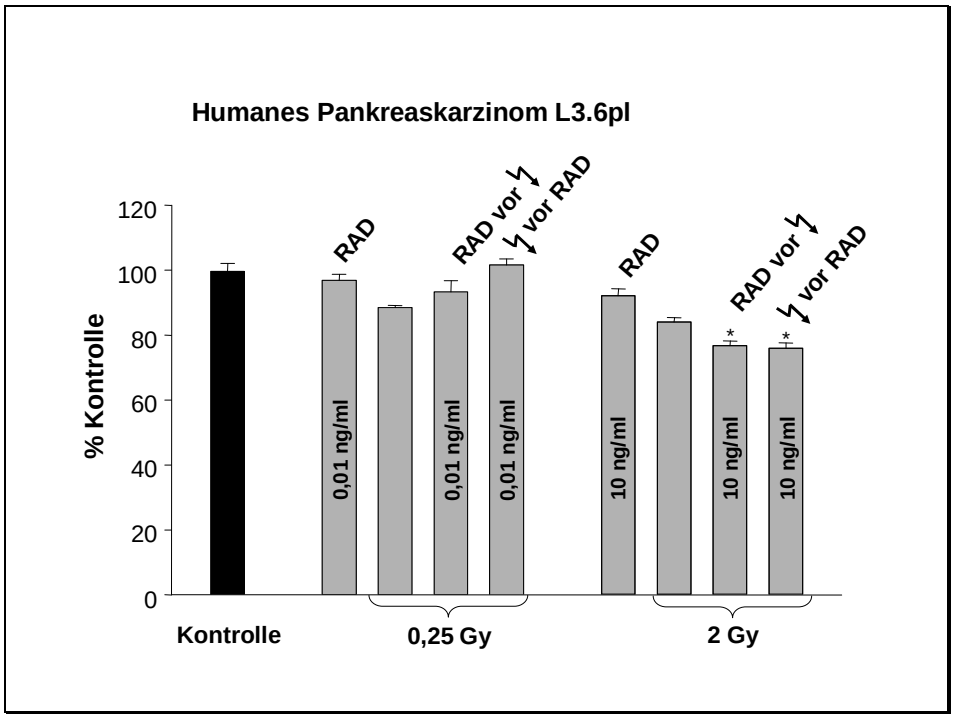

Abbildung 9: Proliferationsassay der Tumorzellen des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl.

Das Pankreaskarzinom L3.6pl scheint resistent gegen die mTOR-Inhibition zu sein. Lediglich im hohen getesteten Dosisbereich zeigt sich eine geringe Proliferationshemmung der Zellen von 8±2% gegenüber der Kontrollgruppe. Die alleinige Bestrahlung mit 2 Gy reduzierte das Wachstum der Zellen um 16±1,5%, die zusätzliche Gabe von 10 ng/ml RAD001 führte zu einer minimalen Zunahme der Inhibition (24±1.5%).

*Angaben als Mittelwerte in % der Kontrolle mit Standardfehler. * p<0,05 gegenüber der Kontrollgruppe*

1.1.2 Murines Fibrosarkom BFS-1

Beim murinen Fibrosarkom BFS-1 konnte nur im hohen getesteten Dosisbereich durch die alleinige Bestrahlung und die alleinige mTOR-Inhibition eine signifikante Wachstumsverzögerung der Zellen erreicht werden. Die Kombinationstherapie aus beiden Therapieformen hatte sowohl im niedrigen als auch im hohen getesteten Dosisbereich additive Effekte auf die Inhibition der Zellproliferation.

Durch die alleinige Bestrahlung mit 0,5; 1 und 2 Gy konnte eine signifikante Reduktion der Zellproliferation um 18±2%, 26±2% und 39±3% erreicht werden.

Durch die Monotherapie mit dem mTOR-Inhibitor in den Konzentrationen 1 ng/ml und 10 ng/ml konnte eine signifikante Inhibition der Zellproliferation um 20±2% und 34±2% gegenüber der Kontrollgruppe erreicht werden (vgl. Tabelle 1 und Abbildung 10).

Im niedrig getesteten Dosisbereich konnte gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Wachstumshemmung der Tumorzellen durch die Gabe von 0,01 ng/ml und 0,1 ng/ml RAD001 eine Stunde vor der Bestrahlung mit 0,25 Gy erreicht werden.

Die Kombinationstherapie aus 0,01 ng/ml RAD001 (Initiierung der mTOR-Inhibition eine Stunde vor der Bestrahlung) und Bestrahlung mit 2 Gy bewirkte eine zusätzlich signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation um 56±2%. Die Gabe des mTOR-Inhibitors 24 Stunden nach der Bestrahlung mit 2 Gy hatte im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung mit 2 Gy keinen zusätzlichen Effekt auf das Wachstum der Tumorzellen (vgl. Tabelle 1). Eine Wachstumsinhibition um 64±1% konnte durch die Kombinationstherapie aus mTOR-Inhibition (10 ng/ml) und Bestrahlung mit 2 Gy erreicht werden. Es bestand jedoch kein Unterschied, ob RAD001 vor oder nach der Bestrahlung zu den Zellen gegeben wurde (vgl. Tabelle 1 und Abbildung 10).

RAD001 [ng/ml]	0	0,01	0,1	1	10
RAD vor 0 Gy	0	0±3	6±3	20±2	34±2
RAD nach 0 Gy	0	6±4	9±2	22±2	36±3
RAD vor 0,25 Gy	9±2	18±3	21±4	34±4	41±1
RAD nach 0,25 Gy	9±2	10±5	7±2	30±1	26±4
RAD vor 0,5 Gy	18±2	28±2	28±4	40±3	44±1
RAD nach 0,5 Gy	18±2	24±4	34±2	45±3	46±1
RAD vor 1 Gy	26±2	25±2	28±2	40±3	42±2
RAD nach 1 Gy	26±2	39±2	40±2	49±3	54±1
RAD vor 2 Gy	39±3	56±2	58±1	64±2	64±1
RAD nach 2 Gy	39±3	41±3	47±4	53±3	60±2

Tabelle 1: Proliferationsverhalten der Fibrosarkomzellen BFS-1 unter RAD001 und/ oder Bestrahlung.

Die jeweilige Monotherapie zeigt lediglich im hohen getesteten Dosisbereich eine signifikante Proliferationshemmung der Tumorzellen. Die Kombination aus mTOR-Inhibition und Bestrahlung hat additive Effekte auf die Hemmung der Zellproliferation. Im niedrig getesteten Dosisbereich ist dabei die Applikation des mTOR-Inhibitors vor der Bestrahlung bedeutend. Demgegenüber besteht im hohen getesteten Dosisbereich jedoch kein signifikanter Unterschied, ob RAD001 vor oder nach der Bestrahlung zu den Zellen gegeben wurde

Reduktion der Zellproliferation in % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Alle Angaben der Inhibition der Proliferation gegenüber der Kontrolle als Mittelwerte in % mit Standardfehler.

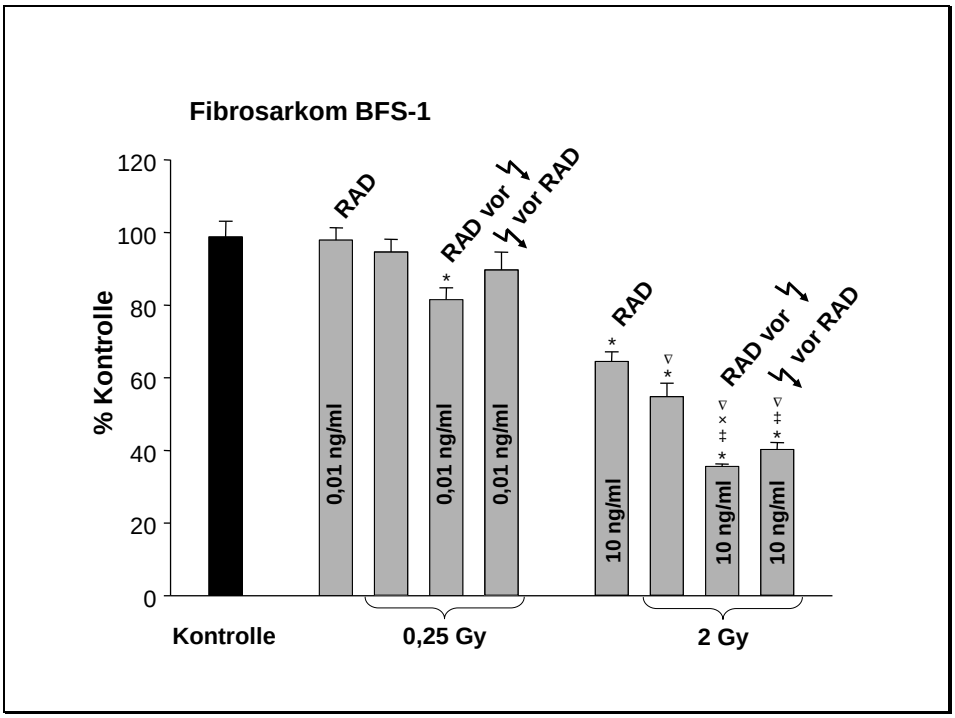

Abbildung 10: Proliferationsassay der Tumorzellen des murinen Fibrosarkoms BFS-1.

Das Fibrosarkom BFS-1 zeigt im niedrigen Dosisbereich eine Resistenz sowohl gegenüber der mTOR-Inhibition als auch gegenüber der Strahlentherapie. Durch hohe Konzentrationen von RAD001 sowie durch die Bestrahlung in hohen Dosen konnte eine Proliferationshemmung der Tumorzellen erreicht werden. Die alleinige Bestrahlung mit 2 Gy reduzierte das Wachstum der Zellen um 39±3%, die zusätzliche Gabe von 10 ng/ml RAD001 führte zu einer additiven Wirkungsverstärkung beider Therapieformen: Die Proliferation konnte um 64±1% reduziert werden.

*Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte in % der Kontrolle und Standardfehler. *p<0.05 vs. Kontrolle, ‡p<0,05 vs. 10 ng/ml, ▽p<0,05 vs. 0,25 Gy, ×p<0,05 vs. 2 Gy.*

1.1.3 Murines Kolonkarzinom CT-26

Die murine Kolonkarzinomzelllinie CT-26 zeigt eine deutliche Sensibilität sowohl gegenüber dem mTOR-Inhibitor als auch gegenüber der Bestrahlung. Darüber hinaus zeigte die Kombination beider Therapieformen additive anti-proliferative Effekte.

Die Proliferation der CT-26 Tumorzellen wurde durch die stufenweise Steigerung der Konzentration von RAD001 graduell inhibiert (vgl. Tabelle 2): 0,01 ng/ml: um 13±1%; 0,1 ng/ml: um 34±1,4%; 1 ng/ml: um 77,6±0,1%; 10 ng/ml: um 85,2±0,1% (Zeitpunkt der Initiierung der RAD001-Therapie: Eine Stunde vor der Bestrahlung) bzw. 0,01 ng/ml: um 2±2%; 0,1 ng/ml: um 16±1,2%; 1 ng/ml: um 69±0,5%; 10 ng/ml: um 79±0,3% (Zeitpunkt der Initiierung der RAD001-Therapie: 24 Stunden nach der Bestrahlung).

Auch durch die Bestrahlung konnte das Wachstum der Zellen vermindert werden: Durch die einmalige Bestrahlung mit 0,25 und 0,5 sowie 1 und 2 Gy wurde das Zellwachstum entsprechend um 12±1%, 22±2%, 35±2 und 70±1% vermindert (vgl. Tabelle 2).

Durch die Kombinationstherapie aus mTOR-Inhibition und Bestrahlung konnte eine additive Wirkungsverstärkung beider Therapieformen erzielt werden. Dies zeigte sich sowohl im niedrig als auch im hohen getesteten Dosisbereich. Im niedrigen Dosisbereich führte die Gabe von 0,01 ng/ml RAD001 vor der Bestrahlung mit 0,25 Gy zu einer signifikanten Hemmung der Zellproliferation um 25±1%. Wurde der mTOR-Inhibitor jedoch 24 Stunden nach der Bestrahlung zu den Zellen gegeben, betrug die Wachstumsinhibition nur noch 18±2% (vgl. Abbildung 11 und Tabelle 2). Im hohen getesteten Dosisbereich konnte das Tumorzellwachstum durch die Kombination von 10 ng/ml RAD001 und die Bestrahlung mit 2 Gy um 92±0,2% bzw. 91±0,3% signifikant verringert werden (vgl. Abbildung 11 und Tabelle 2). Dabei bestand kein Unterschied, ob der mTOR-Inhibitor vor oder nach der Bestrahlung zu den Zellen gegeben wurde.

RAD001 [ng/ml]	0	0,01	0,1	1	10
RAD vor 0 Gy	0	13±1	34±1,4	77±0,1	85±0,1
RAD nach 0 Gy	0	2±2	15±1	68±1	79±0,3
RAD vor 0,25 Gy	12±1	25±1	43±2	81±1	87±0,4
RAD nach 0,25 Gy	12±1	18±2	34±2	72±1	81±0,4
RAD vor 0,5 Gy	22±1	37±2	54±2	83±1	89±0,3
RAD nach 0,5 Gy	22±2	44±2	57±1	79±1	85±0,3
RAD vor 1 Gy	35±2	44±2	56±1	83±1	88±0,3
RAD nach 1 Gy	35±1	55±2	66±1	82±0,3	86±0,4
RAD vor 2 Gy	70±1	74±1	79±1	90±0,3	92±0,2
RAD nach 2 Gy	70±1	78±1	83±1	89±0,3	91±0,3

Tabelle 2: Proliferationsverhalten der Kolonkarzinomzellen CT-26 unter RAD001 und/ oder Bestrahlung.

Sowohl durch die Steigerung der RAD001 als auch der Strahlendosis zeigt sich eine kontinuierliche Wachstumshemmung der Zellen. Die Kombination aus mTOR-Inhibition und Bestrahlung hat additive Effekte auf die Hemmung der Zellproliferation. Dabei besteht jedoch kein signifikanter Unterschied, ob RAD001 vor oder nach der Bestrahlung zu den Zellen gegeben wurde

Reduktion der Zellproliferation in % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Alle Angaben der Proliferationshemmung als Mittelwerte in % gegenüber der Kontrolle mit Standardfehler.

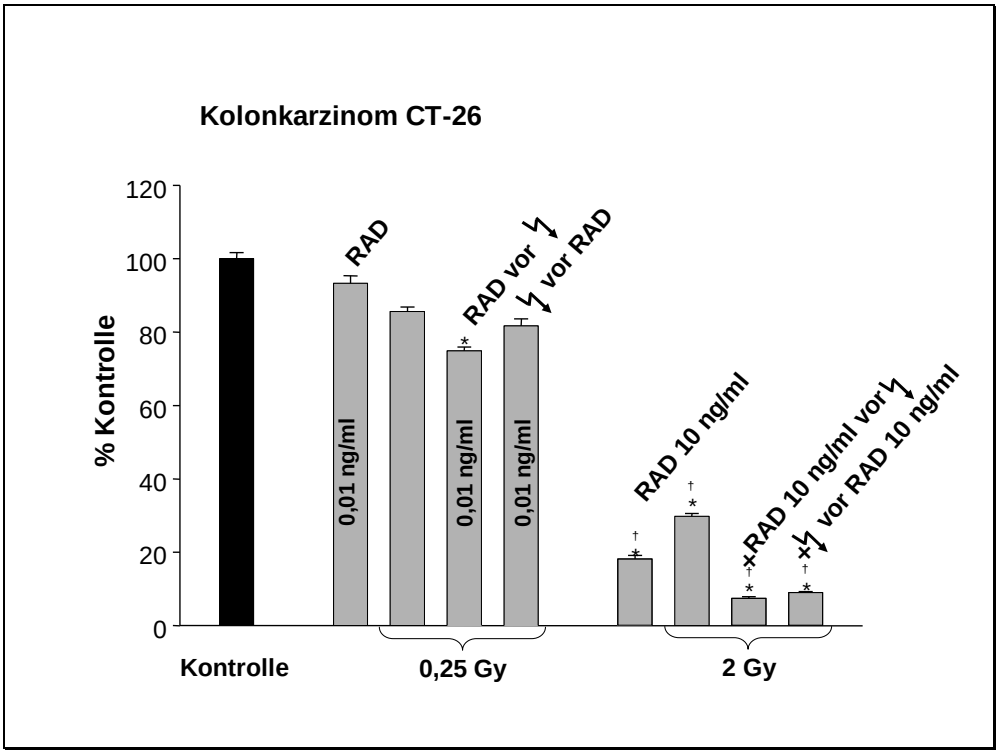

Abbildung 11: Proliferationsassay der Tumorzellen des murinen Kolonkarzinoms CT-26.

Das Kolonkarzinom CT-26 zeigt sowohl gegenüber der mTOR-Inhibition als auch gegenüber der Strahlentherapie eine hohe Empfindlichkeit. Durch die Gabe von RAD001 sowie durch die Bestrahlung konnte eine deutliche Proliferationshemmung der Tumorzellen erreicht werden. Die alleinige Bestrahlung mit 2 Gy reduzierte das Wachstum der Zellen um 70±1%, die zusätzliche Gabe von 10 ng/ml RAD001 führte zu einer additiven Wirkungsverstärkung beider Therapieformen: Die Proliferation konnte um 90±0,2% reduziert werden.

*Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte in % der Kontrolle und Standardfehler. *p<0.05 vs. Kontrolle, †p<0.05 vs. 0,01 ng/ml, ×p<0,05 vs. 2 Gy.*

1.1.4 Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen (HUVECs)

Die höchste Empfindlichkeit sowohl gegenüber der Strahlentherapie als auch gegenüber der mTOR-Inhibition konnte bei den HUVECs gezeigt werden.

Durch die alleinige Gabe von 0,01 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml sowie 10 ng/ml RAD001 konnte das Zellwachstum um 42±2%, 82±0,4% und 89±1% reduziert werden (vgl. Tabelle 3 und Abbildung 12).

Auch die alleinige Bestrahlung mit 0,25 und 0,5 sowie 1 und 2 Gy bewirkt eine signifikante Inhibition der Endothelzellproliferation um 19±1%, 22±2%, 57±1% und 68±1% (vgl. Tabelle 3 und Abbildung 12).

Die Kombination aus Bestrahlung mit 0,25 Gy und 0,01 ng/ml RAD001 (Initiierung eine Stunde vor der Bestrahlung) führte zu einer weiteren signifikanten Reduktion der Zellproliferation um 15±3% im Vergleich zur alleinigen Therapie mit dem mTOR-Inhibitor, wohingegen die Gabe von RAD001 24 Stunden nach der Bestrahlung keinen weiteren Effekt auf die Endothelzellproliferation hatte (vgl. Tabelle 3 und Abbildung 12). Die Kombination aus 0,01 ng/ml RAD001 vor der Bestrahlung mit 0,25 Gy hat den gleichen anti-proliferativen Effekt wie die Bestrahlung mit 0,5 Gy alleine (vgl. Tabelle 3). Ein ähnlicher additiver Effekt beider Therapieformen zeigt sich durch die Bestrahlung mit 0,5 Gy in Kombination mit 0,01 ng/ml RAD001: Die Endothelzellproliferation wird bei Initiierung der mTOR-Inhibition eine Stunde vor der Bestrahlung um 62±3% gehemmt. Demgegenüber steht die Inhibition um 40±3%, sofern der mTOR-Inhibitor 24 Stunden nach der Bestrahlung zu den Zellen gegeben wurde (vgl. Tabelle 3).

Auch im hohen getesteten Dosisbereich lässt sich eine additive Wirkungsverstärkung beider Therapieformen nachweisen: Durch die Zugabe von 10 ng/ml RAD001 vor der Bestrahlung mit 2 Gy konnte die Endothelzellproliferation signifikant gegenüber der Kontrollgruppe um 94±1% verringert werden. Wird RAD001 nach der Bestrahlung zu den Zellen gegeben, minimiert sich die Inhibition auf 88±1%. Der Unterschied, der sich im Zeitpunkt der Initiierung der RAD001-Therapie begründet, ist im hohen getesteten Dosisbereich geringer als im niedrigen, dennoch beträgt er 6% (vgl. Tabelle 3 und Abbildung 12).

RAD001 [ng/ml]	0	0,01	0,1	1	10
RAD vor 0 Gy	0	42±2	82±0,4	89±1	89±1
RAD nach 0 Gy	0	32±4	72±2	80±1	77±1
RAD vor 0,25 Gy	19±1	57±3	88±1	89±2	94±1
RAD nach 0,25 Gy	19±1	29±3	70±1	82±1	80±1
RAD vor 0,5 Gy	22±2	62±3	88±1	90±1	89±1
RAD nach 0,5 Gy	22±2	40±3	76±1	84±1	85±1
RAD vor 1 Gy	57±1	69±2	90±1	90±2	90±2
RAD nach 1 Gy	57±1	64±3	85±2	87±3	87±2
RAD vor 2 Gy	68±1	82±1	93±1	93±1	94±1
RAD nach 2 Gy	68±1	77±1	89±1	89±0,3	88±1

Tabelle 3: Proliferationsverhalten der humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVECs) unter RAD001 und/ oder Bestrahlung*.*

Die RAD001 Monotherapie zeigt bereits im niedrigen Dosisbereich eine deutliche Proliferationshemmung. Durch die alleinige Bestrahlung wird durch steigende Strahlendosis eine kontinuierliche Wachstumshemmung der Endothelzellen erzielt. Die Kombination aus mTOR-Inhibition und Bestrahlung hat additive anti-proliferative Effekte sowohl im niedrigen als auch im hohen Dosisbereich. Durch die Initiierung des mTOR-Inhibitors eine Stunde vor der Bestrahlung der Effekt im Vergleich zum Beginn der RAD001 Therapie 24 Stunden nach der Bestrahlung zusätzlich signifikant verbessert werden.

Reduktion der Zellproliferation in % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Alle Angaben der Inhibition der Proliferation gegenüber der Kontrolle als Mittelwerte in % mit Standardfehler.

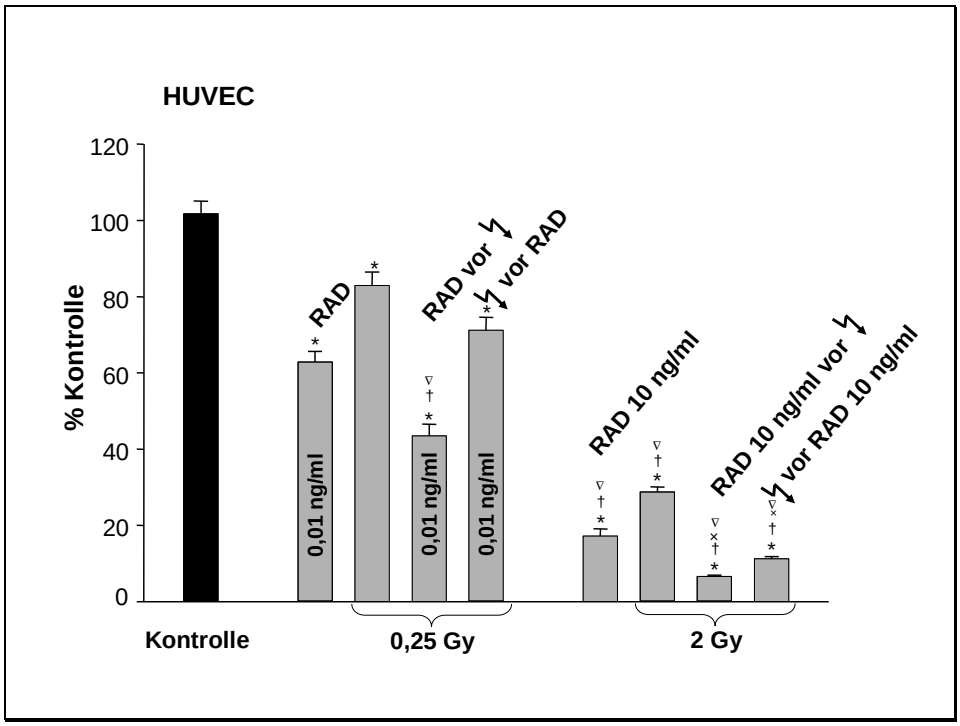

Abbildung 12: Proliferationsassay der Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen (HUVECs).

Sowohl durch die alleinige Bestrahlung als auch durch die alleinige Therapie mit RAD001 besteht ein deutlicher anti-proliferativer Effekt auf die Endothelzellproliferation. Die Kombinationstherapie aus beiden Therapieformen zeigt im niedrigen wie auch im hohen getesteten Dosisbereich einen additiven anti-proliferatifen Effekt. Dieser Effekt ist durch die Gabe des mTOR Inhibitors (0,01 ng/ml) vor der Bestrahlung (0,25 Gy) größer im Vergleich zur Initiierung der mTOR-Inhibition nach der Bestrahlung (Reduktion der Proliferation um 57±3% vs. 29±3%).

*Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte in % der Kontrolle mit Standardfehler. *p<0.05 vs. Kontrolle, †p<0.05 vs. 0,01 ng/ml, ▽ p<0,05 vs. 0,25 Gy, ×p<0,05 vs. 2 Gy.*

1.2 Quantitative VEGF-Bestimmung

Die VEGF-Sekretion der Tumorzellen wurde anhand des Quantakine Human bzw. Mouse VEGF Kit (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) im Überstand der Zellen bestimmt.

Nach einer 72-stündigen Inkubation nach der Bestrahlung konnte ein dosisabhängiger Anstieg der VEGF-Sekretion der Tumorzellen beobachtet werden.

1.2.1 Humanes Pankreaskarzinom L3.6pl

Besonders das humane Pankreaskarzinom L3.6pl zeigte eine deutliche, von der Strahlendosis abhängige Zunahme der VEGF-Produktion (vgl. Abbildung 16). Nach der Bestrahlung mit 10 Gy konnte eine um das zehnfache gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe gesteigerten Konzentration von VEGF festgestellt werden (3363 vs. 395 pg/100µg Protein). Die Gabe des mTOR-Inhibitors (10 ng/ml) bewirkte eine Reduktion der VEGF-Sekretion in allen Behandlungsgruppen, insbesondere konnte jedoch die strahleninduzierte Produktion von VEGF inhibiert werden. In der nicht bestrahlten Kontrollgruppe wurde die VEGF-Sekretion durch die Gabe von RAD001 von 395 pg/100µg Protein auf 243 pg/µg Protein reduziert. Demgegenüber wurde die strahlenabhängige Produktion von VEGF durch die mTOR-Inhibition in etwa halbiert (vgl. Abbildung 13, Tabelle 4):

	10 ng/ml RAD001	
Strahlendosis	**-**	**+**
2 Gy	534	205
4 Gy	694	340
10 Gy	4306	2960

Tabelle 4: VEGF Sekretion des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl mit und ohne mTOR-Inhibitor RAD001.

Darstellung der Ergebnisse in pg/ml/100µg Protein als Mittelwerte

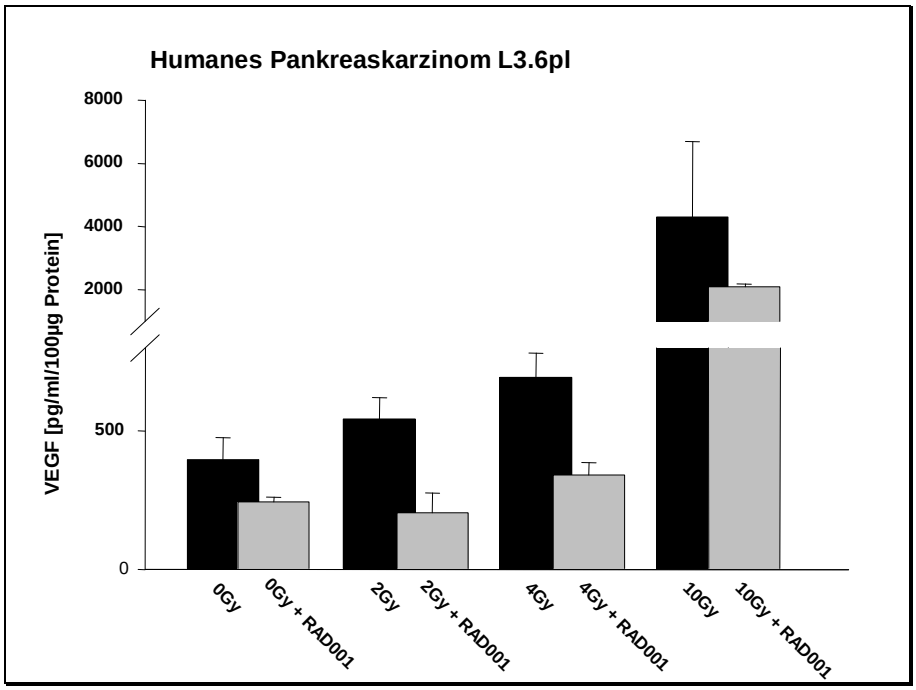

Abbildung 13: VEGF-Sekretion des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl

Die Sekretion von VEGF kann beim humanen Pankreaskarzinom dosisabhängig gesteigert und induziert werden.

Durch die Gabe von 10ng/ml RAD001 eine Stunde vor der Bestrahlung kann die VEGF-Sekretion um 50% reduziert werden.

Darstellung der Ergebnisse in pg/ml/100µg Protein als Mittelwerte mit Standardfehler.

1.2.3 Murines Fibrosarkom BFS-1

Auch die VEGF-Sekretion der Zellen des murinen Fibrosarkoms BFS-1 ist abhängig von der Strahlendosis. Die Höhe der Expression ist vergleichbar mit der des humanen Pankreaskarzinoms.

Die unbehandelte Kontrollgruppe weist ein VEGF-Level von 193 pg/ml/100µg Protein auf, welches durch die Behandlung der Zellen mit 10 ng/ml RAD001 nicht vermindert werden konnte (185 pg/ml/100µg Protein). Die Bestrahlung mit 2 Gy führte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu keiner weiteren Zunahme der VEGF-Sekretion. Dennoch konnte in diesem Dosisbereich die VEGF-Sekretion durch mTOR-Inhibition von 180 auf 49 pg/ml/100µg Protein reduziert werden. Die VEGF-Sekretion des Fibrosarkoms kann durch die Bestrahlung mit 4 Gy auf 390 pg/ml/100µg Protein gesteigert werden. Die Gabe von 10 ng/ml RAD001 führt hierbei

zu keiner Verringerung, sondern eher zu einer Erhöhung der VEGF-Sekretion der Tumorzellen (498 pg/ml/100µg Protein). Durch die Bestrahlung mit 10 Gy werden 4792 pg/ml/100µg Protein VEGF sezerniert, die Behandlung der Tumorzellen mit dem mTOR-Inhibitor führt dabei zu einer Abnahme der VEGF-Produktion um ca. 500 pg/ml/100µg Protein auf 4259 pg/ml/100µg Protein (vgl. Abbildung 14).

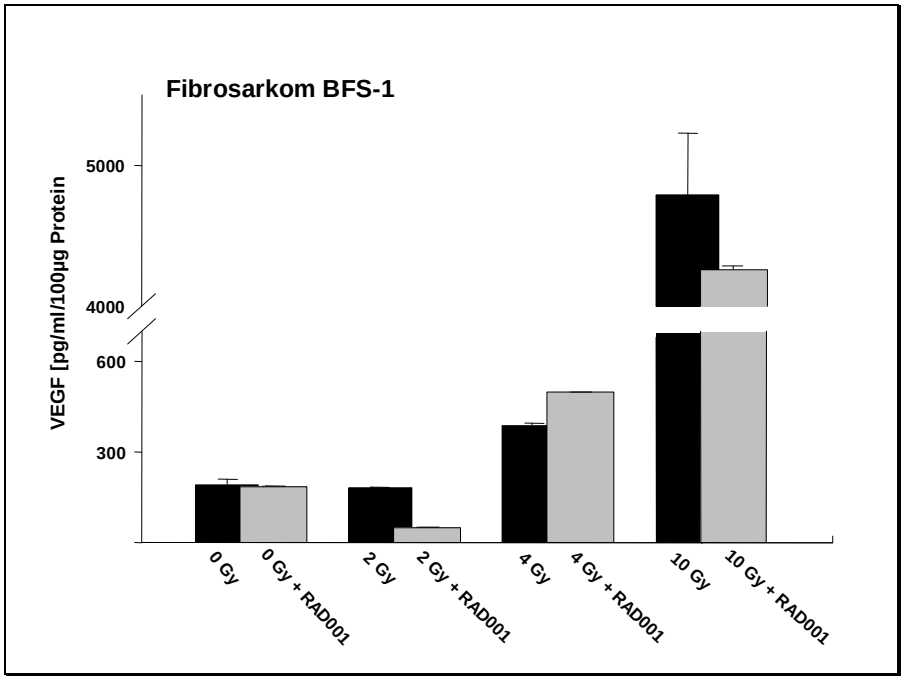

Abbildung 14: VEGF-Sekretion des murinen Fibrosarkoms BFS-1

Die VEGF-Sekretion des murinen Fibrosarkoms BFS-1 wird durch hohe Strahlendosen stimuliert. Erst ab einer Dosis von 4 Gy kommt es zu einer Erhöhung der VEGF-Sekretion. Die Gabe von 10 ng/ml RAD001 eine Stunde vor der Bestrahlung hat im hohen getesteten Dosisbereich keinen bzw. nur einen minimalen Effekt auf die VEGF-Sekretion (10 Gy + RAD001). Durch die Bestrahlung mit 2 Gy wird die VEGF-Sekretion der BFS-1 Tumorzellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zwar nicht erhöht, sie wird jedoch durch den mTOR-Inhibitor vermindert (180 vs. 49 pg/ml/100µg Protein).

Darstellung der Ergebnisse in pg/ml/100µg Protein als Mittelwerte mit Standardfehler.

1.2.2 Murines Kolonkarzinom CT-26

Auch beim murinen Kolonkarzinom CT-26 zeigt sich eine dosisabhängige Stimulation der VEGF-Sekretion. In der unbehandelten Kontrollgruppe betrug das gemessene VEGF-Level 65 pg/ml/100µg Protein. Durch die Bestrahlung mit 2, 4 und 10 Gy wurde die Sekretion von VEGF auf 71, 140 bzw. 2114 pg/ml/100µg Protein gesteigert. Durch die Gabe von 10 ng/ml RAD001 eine Stunde vor der jeweiligen Bestrahlung konnte die Produktion von VEGF nur bei den mit 2 Gy bestrahlten Zellen reduziert werden, das VEGF-Level betrug hier 20 pg/ml/100µg Protein. Die durch hohe Strahlendosen induzierte Sekretion von VEGF konnte durch die Gabe des mTOR-Inhibitors nur minimal verringert werden (vgl. Abbildung 15).

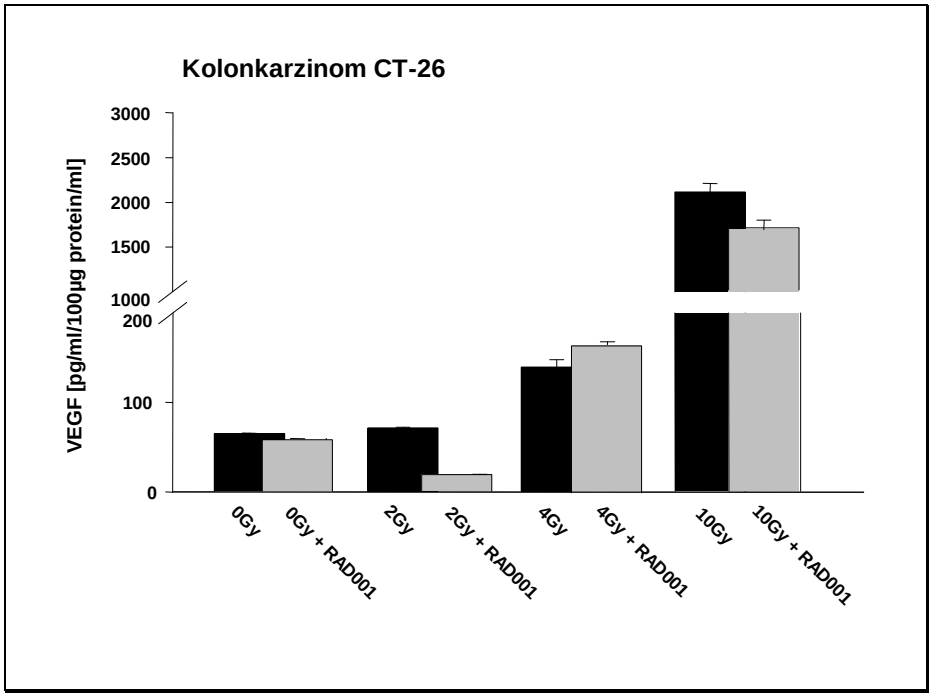

Abbildung 17: VEGF-Sekretion des murinen Kolonkarzinoms CT-26

Die VEGF-Sekretion des murinen Kolonkarzinoms CT-26 ist abhängig von der Strahlendosis: Je höher die Strahlendosis, umso höher ist das VEGF-Level. Die Gabe von 10 ng/ml RAD001 eine Stunde vor der Bestrahlung hat im hohen getesteten Dosisbereich keinen Effekt auf die VEGF-Sekretion. Lediglich im Bereich von 2 Gy wird die VEGF-Sekretion der CT-26 Tumorzellen durch den mTOR-Inhibitor vermindert (71 vs. 20 pg/ml/100µg Protein.

Darstellung der Ergebnisse in pg/ml/100µg Protein als Mittelwerte mit Standardfehler.

1.3 Speroidassay

Durch die Stimulation mit VEGF zeigten die nicht bestrahlten Spheroide ein deutliches Sprouting von 728±28 µm, während die kumulative Sproutlänge ohne VEGF-Stimulation lediglich 68±8 µm betrug (vgl. Abbildung 16).

Durch die Gabe des mTOR-Inhibitors RAD001 in den Dosen 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml konnte das Sprouting signifikant inhibiert werden: die Sproutlänge betrug entsprechend 485±24 µm, 325±16 µm und 171±10 µm. Durch die alleinige Bestrahlung mit 0,5 Gy konnte eine Verminderung der vom Spheroid gebildeten Ausläufer auf eine Gesamtlänge von 450±43 µm beobachtet werden. Ferner zeigte sich in diesem Dosisbereich eine additive Wirkungsverstärkung durch die zusätzliche Gabe von 0,1 ng/ml RAD001 (kumulative Sproutlänge: 376±15 µm, vgl. Abbildung 17).

Durch die Bestrahlung mit 1 Gy konnte eine signifikante Abnahme der Sproutlänge auf 327±13 µm erreicht werden. Auch in diesem Dosisbereich führte die zusätzliche Gabe des mTOR-Inhibitors zu einer weiteren Reduktion des Sproutings, wobei jedoch die Erhöhung der Konzentration von RAD001 von 0,1 ng/ml auf 1 ng/ml keinen zusätzlichen inhibitorischen Effekt auf das Sprouting hatte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl durch die alleinige Bestrahlung als auch durch die alleinige Therapie mit dem mTOR-Inhibitor eine Inhibition des Sprouting erreicht werden kann. Die Kombination aus beiden Therapieformen zeigt additive Effekte, die v.a. im niedrig getesteten Dosisbereich zum Ausdruck kommen.

Abbildung 16: Spheroide

A: Unter der Stimulation mit VEGF zeigen die Spheroide eine deutliche Sproutbildung.

B: Ohne Stimulation bilden die Spheroide kaum bzw. deutlich weniger und kürzere Sprouts.

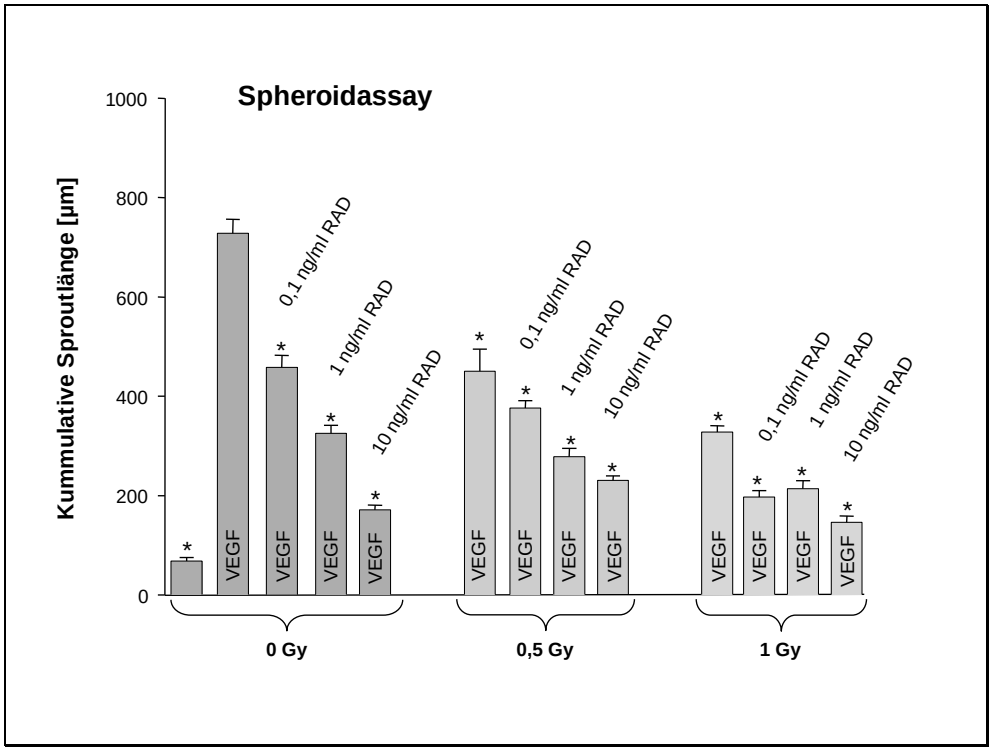

Abbildung 17: Spheroidassay

Sowohl die alleinige Bestrahlung als auch die Monotherapie mit dem mTOR-Inhibitor führt zu einer signifikanten Reduktion der kumulativen Sproutlänge.

Durch die Gabe von geringen Konzentrationen des mTOR-Inhibitors kann eine additive Wirkungsverstärkung beider Therapieformen erreicht werden.

*Darstellung der Ergebnisse Mittelwerte der kummulativen Sproutlänge mit Standardfehler. *p<0.05 vs. Kontrolle.*

1.4 Analyse des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges anhand des phosphorylierten ribosomalen S6 Proteins

Die Aktivierung bzw. Inaktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges wurde anhand der Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins an kultivierten Tumor- und Endothelzellen untersucht.

Nach Inkubation der Zellen in Hungermedium konnte die Inaktivität des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges anhand der fehlenden Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins gezeigt werden. Durch die Stimulation der Zellen mit FBS bzw. VEGF oder IGF wurde die Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins induziert, wodurch die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges in Tumor- und Endothelzellen bewiesen werden konnte. Auch durch die alleinige Bestrahlung wird die PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade aktiviert, was sich in der Phosphorylierung des ribosomalen S6 Protein widerspiegelt.

1.4.1 Humanes Pankreaskarzinom L3.6pl

Nach einer 16-stündigen Inkubationszeit der Zellen in Hungermedium zeigt das humane Pankreaskarzinom L3.6pl keine Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins, was für die Inaktivität des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges spricht. Die Gabe von FBS, IGF und die Einzeitbestrahlung mit 2 Gy führte nach einer Stunde zur Aktivierung der Signalkaskade die in der Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins nachzuweisen war. Eine suffiziente Inhibition der Aktivierung durch IGF und durch die Bestrahlung konnte durch die gleichzeitige Inkubation der Tumorzellen mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 (10 ng/ml, 30 Minuten vor entsprechender Stimulation initiiert) erreicht werden. Demgegenüber konnte die Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins durch FBS-Stimulation der Tumorzellen nicht durch den mTOR-Inhibitor RAD001 unterbunden werden (vgl. Abbildung 18).

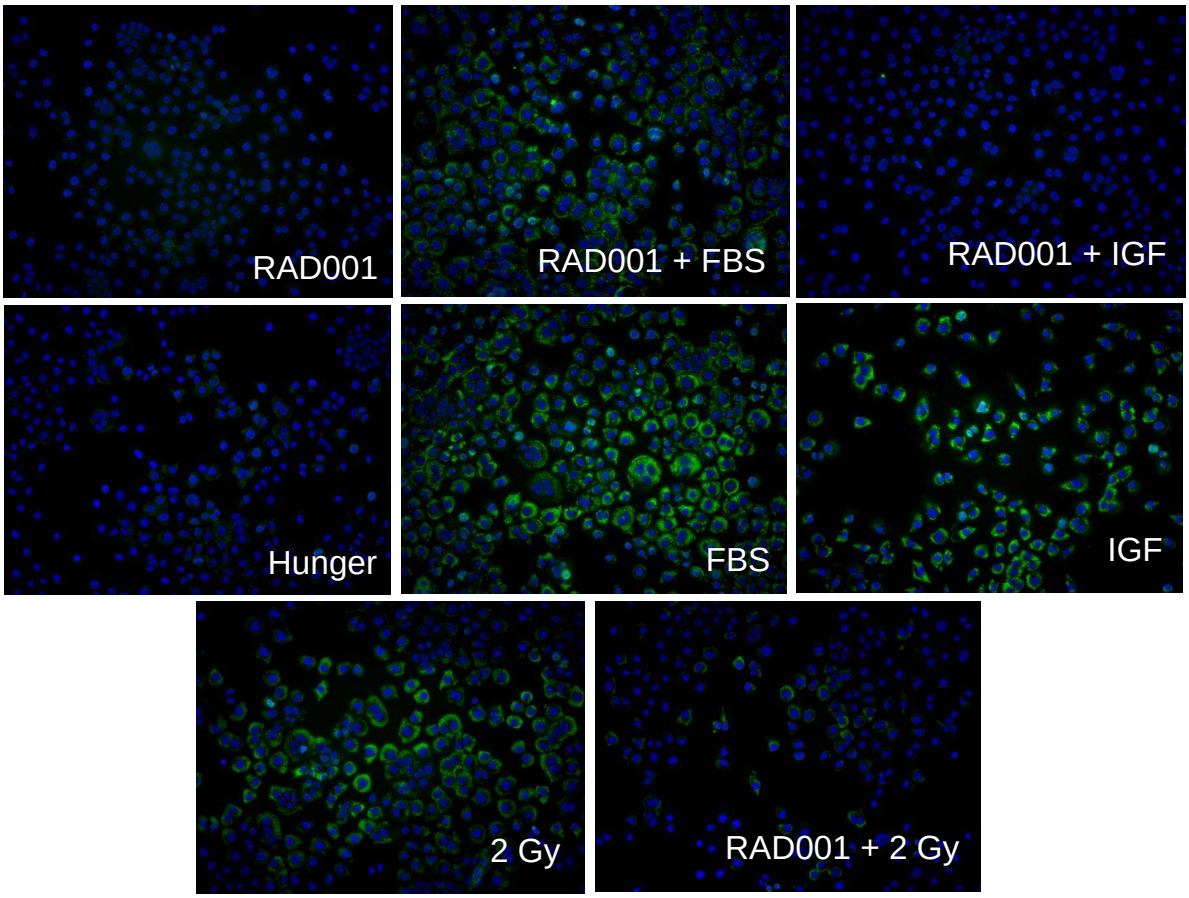

Abbildung 18: Immuncytochemie (phospho S6rp) des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl
Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg ist im Pankreaskarzinom L3.6pl ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren inaktiv und wird durch Zugabe von FBS, IGF und durch die Bestrahlung der Zellen mit 2 Gy aktiviert, was sich anhand der Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins zeigen lässt. Diese Aktivierung kann durch die Gabe von 10 ng/ml RAD001 verhindert werden. Die Aktivierung durch FBS kann jedoch nicht unterdrückt werden.

1.4.2 Murines Fibrosarkom BFS-1

Der Mangel an Wachstumsfaktoren im Hungermedium führte beim murinen Fibrosarkom BFS-1 zu einer Inaktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges, was sich anhand der fehlenden Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins darstellen lässt. Sowohl durch die Gabe von FBS als auch durch die Gabe von IGF wurde die Signalkaskade innerhalb einer Stunde aktiviert. Auch die alleinige Bestrahlung mit 2 Gy führte zur Aktivierung des mTOR-Signalweges. Durch die Gabe von 10 ng/ml RAD001 30 Minuten vor Zugabe von IGF bzw. vor der Einzeitbestrahlung mit 2 Gy

konnte mTOR suffizient inhibiert werden, das ribosomale S6 Protein ist nicht phosphoryliert. Die Aktivierung des Signalweges durch FBS konnte jedoch auch beim murinen Fibrosarkom durch den mTOR-Inhibitor nicht verhindert werden (vgl. Abbildung 19).

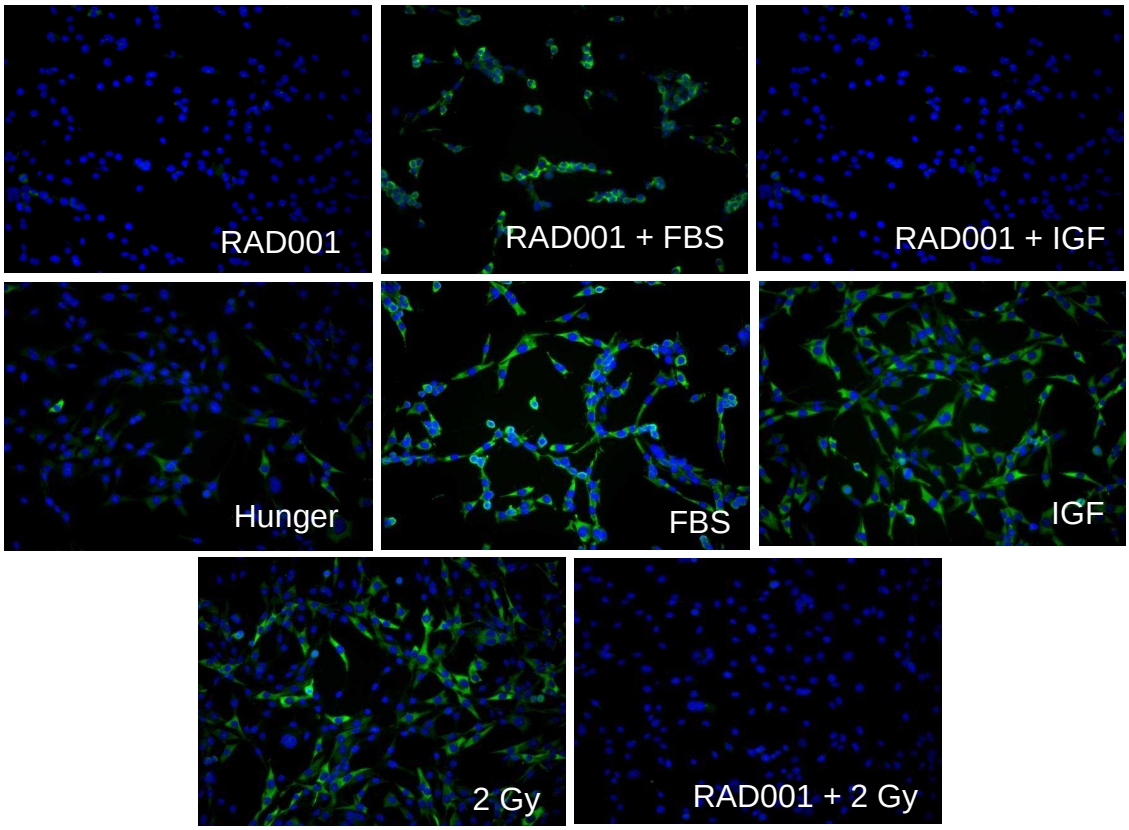

Abbildung 19: Immuncytochemie (phospho S6rp) des murinen Fibrosarkomes BFS-1

Die Deprivation der Zellen von FBS über 16 Stunden führt zur Inaktivierung des mTOR-Signalweges. Durch die Gabe von FBS oder IGF und die Bestrahlung mit 2 Gy wird der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert. Durch die Gabe von RAD001 konnte die Aktivierung durch IGF und die Bestrahlung gehemmt werden, die Gabe des mTOR-Inhibitors in Kombination mit FBS führte nicht zur Inhibition des Signalweges.

1.4.3 Murines Kolonkarzinom CT-26

Der 16-stündige Entzug von Wachstumsfaktoren führt auch beim murinen Kolonkarzinom CT-26 zur Inaktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges, welcher durch die Gabe von FBS und IGF aktiviert werden konnte (vgl. Abbildung 20). Durch die Gabe von FBS, 10 ng/ml IGF bzw. durch die Bestrahlung mit 1 Gy zeigt sich eine

deutliche Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins. Durch die Gabe von 10 ng/ml RAD001 eine Stunde vor Stimulation konnte die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges verhindert werden, was in einer fehlenden Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins zum Ausdruck kam (vgl. Abbildung 20).

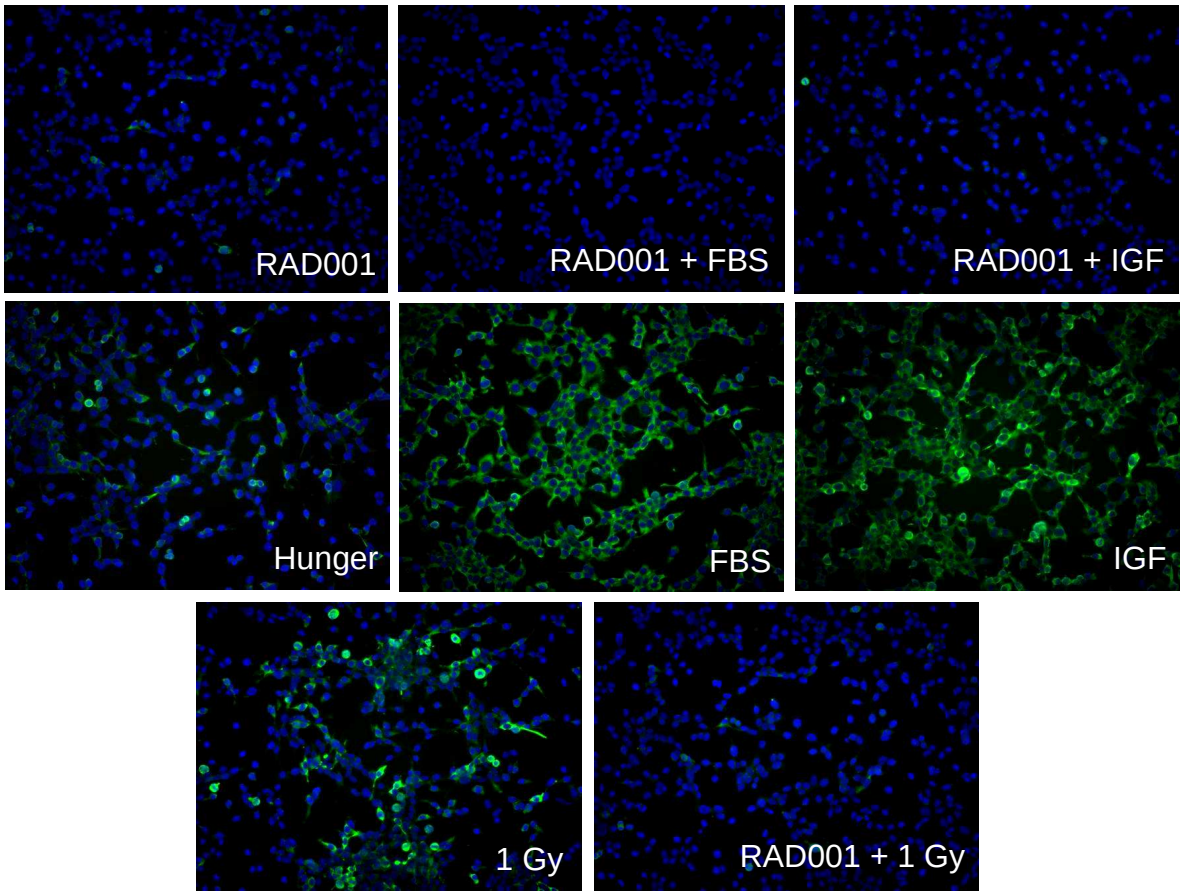

Abbildung 20: Immuncytochemie (phospho S6rp) des murinen Kolonkarzinoms CT-26

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg wird durch die Gabe von Wachstumsfaktoren wie FBS, IGF und die Bestrahlung mit 1 Gy aktiviert, was sich an der phosphorylierten ribosomalen S6 Kinase zeigt. Bei Mangel an Wachstumsfaktoren oder Inhibition des Signalweges durch einen suffizienten mTOR-Inhibitor ist das ribosomale S6 Protein dephosphoryliert, der mTOR-Signalweg ist inaktiv.

1.4.4 Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen (HUVECs)

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg wird durch den Mangel an Wachstumsfaktoren in den HUVECs inaktiviert, das ribosomale S6 Protein ist nicht phosphoryliert. Durch die Bestrahlung mit 0,5 Gy oder die Gabe von FBS bzw. 20 ng/ml VEGF erfolgt die Aktivierung des Signalweges, was sich anhand der Phosphorylierung des

ribosomalen S6 Proteins beweisen lässt. Durch die zusätzliche Inkubation der Zellen mit 10 ng/ml RAD001 kann die jeweilige Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges in den HUVECs unterdrückt werden (vgl. Abbildung 21).

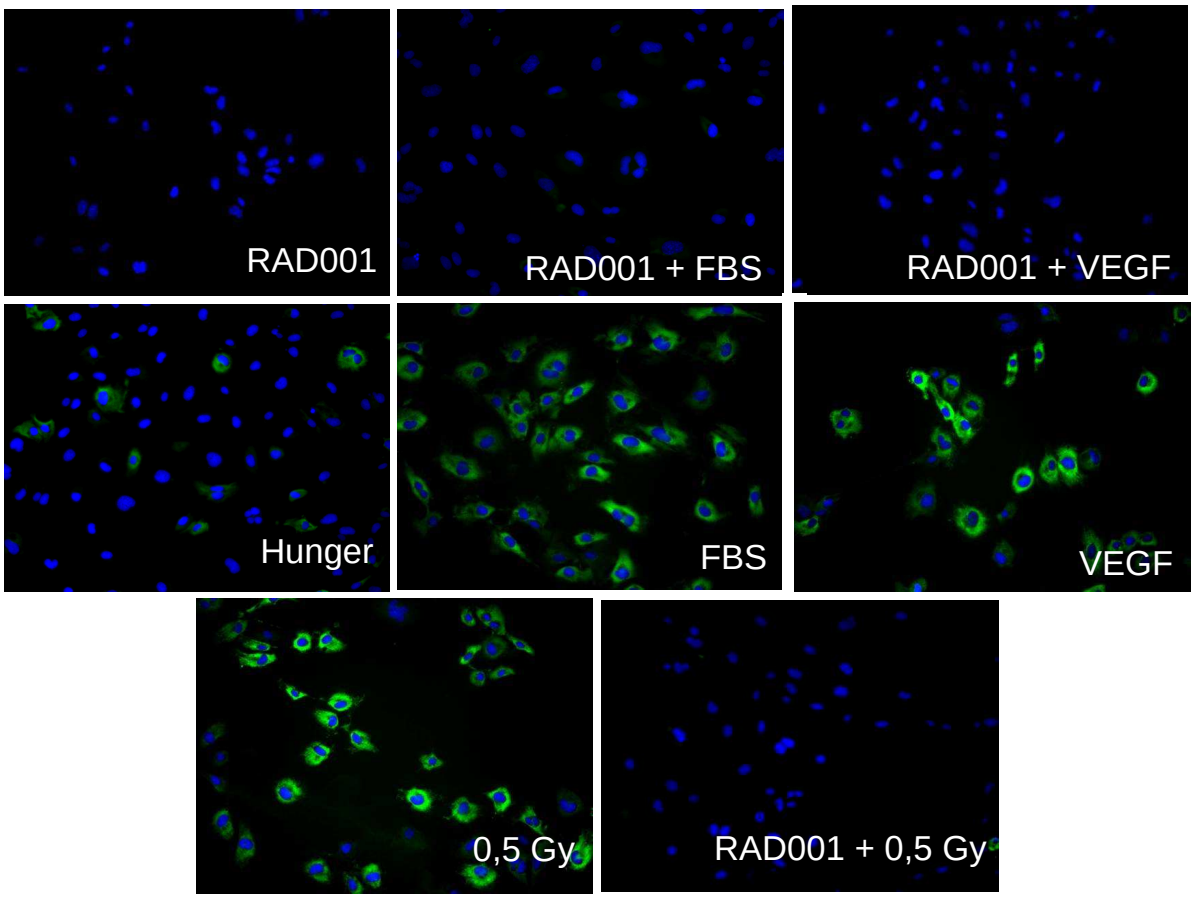

Abbildung 21: Immunfluoreszenz (phospho S6rp) der HUVECs

Durch die Gabe von 10 ng/ml RAD001 kann die durch Wachstumsfaktoren verursachte oder bestrahlungsinduzierte Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges verhindert werden: Die ribosomale S6-Kinase ist dephosphoryliert.

2. Experimente *in vivo*

In allen Tumormodellen konnte durch alle Therapieformen, sowohl durch die Mono- als auch die Kombinationstherapie aus Bestrahlung mit 5 x 2 Gy bzw. 5 x 4 Gy und mTOR-Inhibition, eine Wachstumsverzögerung der Tumoren gegenüber der Kontrollgruppe erreicht werden.

2.1 Orthotopes Pankreaskarzinom L3.6pl

Nach orthotoper Implantation der Tumorzellen des humanen Pankreaskarzinoms entwickelten sich innerhalb von sieben Tagen palpable Tumoren. Zum Zeitpunkt der Initiierung der jeweiligen Therapieform bestand kein signifikanter Unterschied der Tumorgrößen in den verschiedenen Behandlungsgruppen.

In der Kontrollgruppe betrug das Tumorvolumen nach 28 Tagen 1145±229 mm^3, sodass die Tiere aufgrund der Tumorlast euthanasiert wurden. Durch alle Therapieformen konnte gegenüber der Kontrollgruppe eine Wachstumsverzögerung der Tumoren erreicht werden (vgl. Abbildung 22A): Das Tumorvolumen an Tag 28 betrug in der mit dem mTOR-Inhibitor behandelten Gruppe 320±290 mm^3. Durch die alleinige Bestrahlung von 5 x 2 Gy konnte das Tumorvolumen auf 420±255 mm^3, durch die Gabe des mTOR-Inhibitors im Anschluss an den Bestrahlungszyklus von 5 x 2 Gy auf 462±193 mm^3, durch die zusätzliche Therapie mit RAD001 vor der Bestrahlung mit 5 x 2 Gy auf 210±80 mm^3 reduziert werden. Die Bestrahlung mit 5 x 4 Gy reduzierte das Tumorwachstum an Tag 28 auf 200±123 mm^3, die Gabe des mTOR-Inhibitors zur fraktionierten Bestrahlung mit 5 x 4 Gy begrenzte das Tumorvolumen auf 133±132 mm^3.

Der Tumorwachstumsverlauf in den Behandlungsgruppen 5 x 2 Gy mono, RAD001 mono und mTOR-Inhibition im Anschluss an den Bestrahlungszyklus von 5 x 2 Gy war in etwa identisch. Die Gabe von RAD001 nach dem Bestrahlungszyklus mit 5 x 2 Gy hatte somit keinen weiteren therapeutischen Effekt (vgl. Abbildung 22B). Die Tumorvolumina an Tag 32 betrugen 592±343 mm^3 (RAD001 Monotherapie), 555±273 mm^3 (RAD001-Initiierung nach dem Bestrahlungszyklus mit 5 x 2 Gy) und 546±287 mm^3 (5 x 2 Gy mono). Die Kombination der fraktionierten Strahlentherapie von 5 x 2 Gy mit einer zuvor eingeleiteten mTOR-Inhibition zeigte demgegenüber eine signifikant verbesserte Wachstumskontrolle des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl (vgl. Abbildung 22B). Das Tumorvolumen in dieser Behandlungsgruppe betrug 305±120 mm^3 an Tag 32.

Die signifikant beste Tumorwachstumskontrolle konnte durch die Gabe von RAD001 vor dem Bestrahlungszyklus mit 5 x 4 Gy erzielt werden (Tumorvolumen an Tag 39: 180±119 mm^3; vgl. Abbildung 22C). Das Tumorwachstum in der Behandlungsgruppe mit 5 x 4 Gy als Monotherapie (Tumorvolumen an Tag 39: 465±270 mm^3) entsprach der Therapie mit der Kombination aus mTOR-Inhibitor initiiert vor der Bestrahlung mit 5 x 2 Gy (Tumorvolumen an Tag 39: 352±145 mm^3). Somit besteht beim humanen

Pankreaskarzinom L3.6pl eine dosismodifizierende Wirkung des mTOR-Inhibitors RAD001 auf die fraktionierte Strahlentherapie.

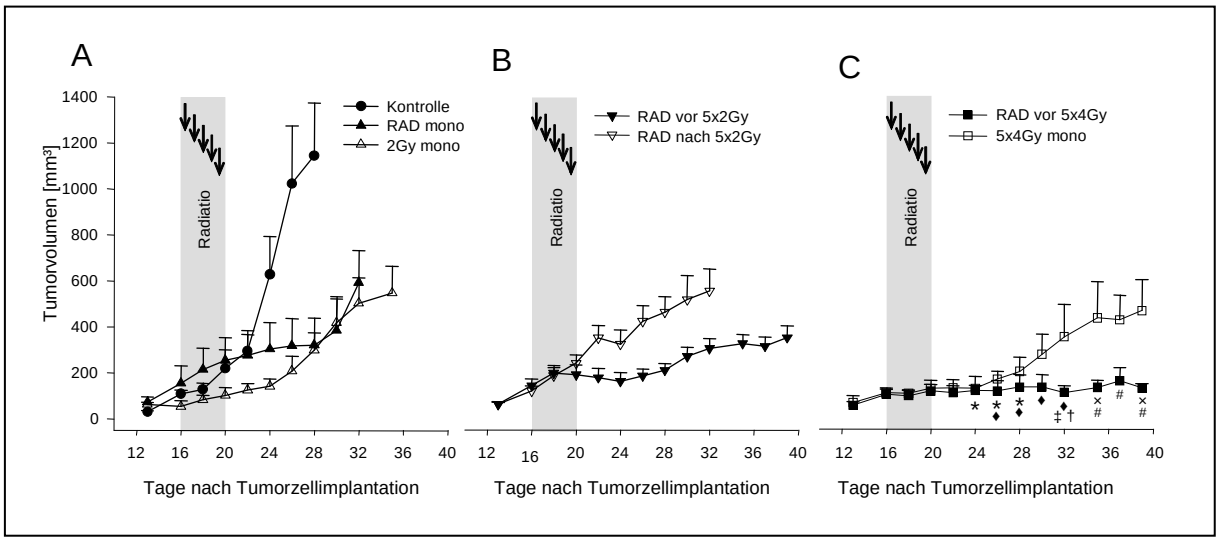

Abbildung 9: Therapieeffekte der mTOR-Inhibition (RAD001) und der fraktionierten Bestrahlung (5 x 2 Gy bzw. 5 x 4 Gy) am orthotopen humanen Pankreaskarzinom L3.6pl

A *Sowohl die alleinige Therapie mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 als auch die alleinige Strahlentherapie von 5 x 2 Gy zeigt eine signifikante Wachstumsverzögerung der Tumoren.*

B *Durch die zusätzliche Gabe des mTOR-Inhibitors vor dem Bestrahlungszyklus mit 5 x 2 Gy bzw. 5 x 4 Gy konnte eine weitere signifikante Wachstumsverzögerung der Tumoren erreicht werden.*

C *Die signifikant beste Tumorkontrolle konnte durch die Gabe des mTOR-Inhibitors vor der Bestrahlung mit 5 x 4 Gy erreicht werden. Das Tumorwachstum unter der Therapie mit dem mTOR-Inhibitor vor der Bestrahlung mit 5 x 2 Gy entspricht in etwa der erreichten Tumorkontrolle durch die alleinige Bestrahlung mit 5 x 4 Gy.*

*Mittelwert + Standardfehler, n = 6 Versuchstiere pro Behandlungsgruppe. *p<0.05 vs. Kontrolle, †p<0.05 vs. 5x2Gy mono, ‡p<0.05 vs. RAD mono, ♦p<0.05 vs. RAD nach 5x2Gy, ×p<0.05 vs. RAD vor 5x2Gy, #p<0.05 vs. 5x4Gy mono.*

2.2 Orthotopes Fibrosarkom BFS-1

Die Tumoren der Kontrollgruppe im subkutanen Fibrosarkommodell zeigten ein exponentielles Wachstum, sodass die Versuchstiere an Tag 23 euthanasiert wurden (Tumorvolumen: 1039±483 mm³). Durch die alleinige Bestrahlung mit 5 x 2 Gy konnte eine deutliche Wachstumsverzögerung der Tumoren erreicht werden (Tumorvolumen an Tag 23: 609±181 mm³). Nach Abschluss des Bestrahlungszyklus

zeigten die Tumoren jedoch ein erneutes exponentielles Tumorwachstum (vgl. Abbildung 23A): Das Tumorvolumen an Tag 29 betrug 1073±297 mm³.

Durch die RAD001 Monotherapie konnte sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber der Therapie mit 5 x 2 Gy mono eine deutlich verbesserte Wachstumskontrolle der Tumoren erreicht werden: Tumorvolumen an Tag 23: 408±120 mm³, an Tag 29: 585±137 (vgl. Abbildung 23A). Die beste Tumorkontrolle wurde durch die Kombination aus mTOR-Inhibition und Strahlentherapie mit 5 x 2 Gy erzielt. Hier bewirkte die Gabe von RAD001 vor dem Bestrahlungszyklus jedoch nur eine tendenziell verbesserte Tumorwachstumsverzögerung im Vergleich zur Gabe des mTOR-Inhibitors im Anschluss an die Strahlentherapie (vgl. Abbildung 23B; Tumorvolumina Tag 34: RAD001 mono: 621±132 mm³; RAD001 vor 5 x 2Gy: 467±67 mm³; RAD001 nach 5 x 2 Gy: 463±233 mm³).

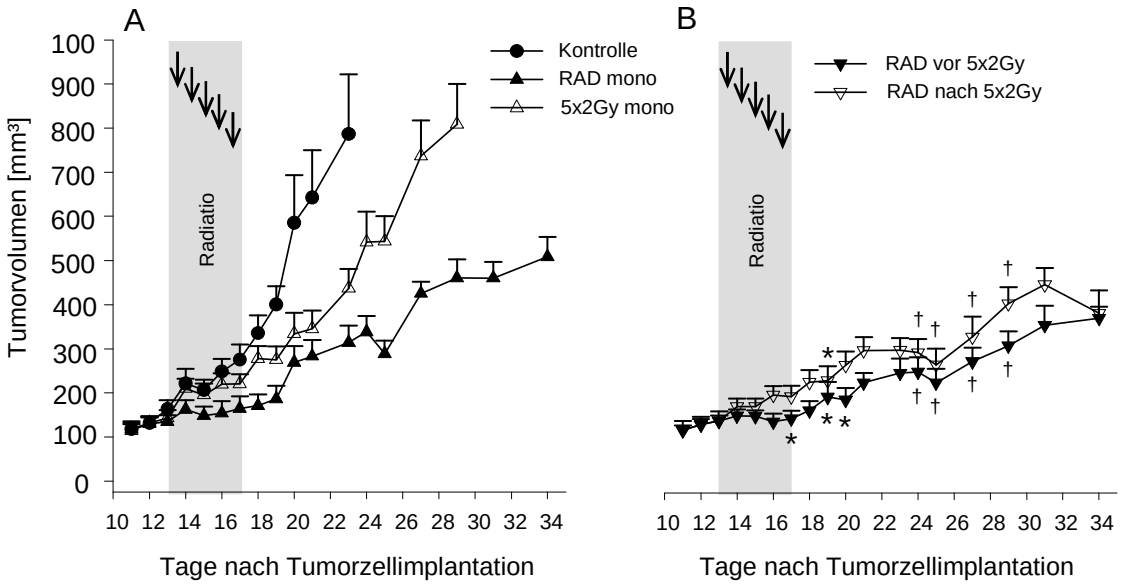

Abbildung 23: Therapieeffekte der mTOR-Inhibition (RAD001) und der fraktionierten Bestrahlung (5 x 2 Gy) am subkutanen Fibrosarkom BFS-1

A *Sowohl die alleinige Therapie mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 als auch die alleinige Strahlentherapie von 5 x 2 Gy zeigt eine signifikante Wachstumsverzögerung der Tumoren.*

B *Durch die zusätzliche Gabe des mTOR-Inhibitors vor der Bestrahlung mit 5 x 2 Gy kann das Tumorwachstum noch deutlich verzögert werden. Die Gabe des mTOR-Inhibitors im Anschluss an die Bestrahlung hat keinen weiteren therapeutischen Effekt*.

Mittelwert + Standardfehler, n = 6 Versuchstiere pro Behandlungsgruppe. †p<0.05 vs. 5x2Gy mono, ‡p<0.05 vs. RAD mono, ♦p<0.05 vs. RAD nach 5x2Gy, ×p<0.05 vs. RAD vor 5x2Gy.

2.3 Subkutanes Kolonkarzinom CT-26

Nach subkutaner Injektion der Kolonkarzinomzellen CT-26 entwickelten sich in allen Tieren nach ca. sieben Tagen sichtbare und gut palpable Tumoren. Zum Zeitpunkt des Therapiebeginns bestand kein signifikanter Tumorgrößenunterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen.

Die Ergebnisse des Tumorwachstumsverlaufes waren denen des orthotopen Pankreaskarzinoms L3.6pl ähnlich. Das Tumorvolumen der Kontrollgruppe betrug an Tag 23 636±136 mm^3 und unterschied sich signifikant von allen anderen Therapiegruppen (vgl. Abbildung 24A):

RAD001 Monotherapie: 287±135 mm^3
RAD001 vor 5 x 2 Gy: 139±50 mm^3
RAD001 nach 5 x 2 Gy: 183±141 mm^3
5 x 2 Gy Monotherapie: 162±114 mm^3
RAD001 vor 5 x 4 Gy: 50±39 mm^3
5 x 4 Gy Monotherapie: 72±53 mm^3

Der Tumorwachstumsverlauf der Kombinationstherapie aus fraktionierter Strahlentherapie mit 5 x 2 Gy gefolgt von der Gabe des mTOR-Inhibitors entsprach in etwa dem Verlauf in der Gruppe RAD001 Monotherapie und der alleinigen Bestrahlung mit 5 x 2 Gy (Tumorvolumina an Tag 32: RAD001 nach 5 x 2 Gy: 376±224 mm^3; RAD001 mono: 410±112 mm^3; 5 x 2 Gy mono: 510±200 mm^3). Eine deutliche Wachstumsverzögerung konnte durch die RAD001-Therapie vor der Bestrahlung mit 5 x 2 Gy erreicht werden (Tumorvolumen an Tag 32: 210±127 mm^3; an Tag 35: 200±97 mm^3, vgl. Abbildung 24B). Die beste Wachstumskontrolle der Tumoren konnte durch die alleinige Bestrahlung mit 5 x 4 Gy erzielt werden. Die zusätzliche Gabe des mTOR-Inhibitors hatte in diesem Dosisbereich keinen weiteren therapeutischen Effekt (Tumorvolumina Tag 35: 5 x 4 Gy Monotherapie: 72±92 mm^3; RAD001 vor 5 x 4 Gy: 220±180 mm^3; vgl. Abbildung 24 C).

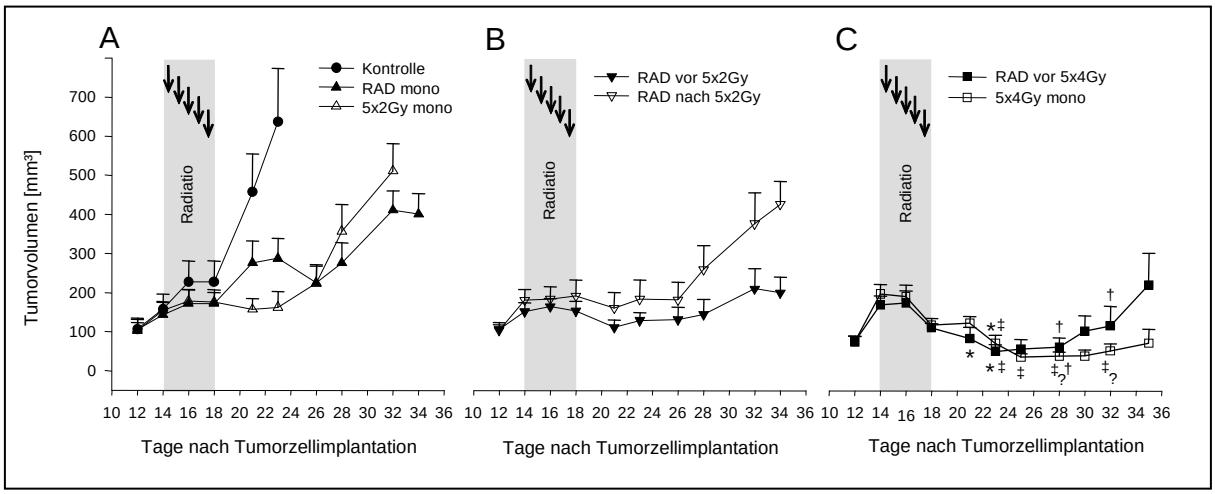

Abbildung 24: Therapieeffekte der mTOR-Inhibition (RAD001) und der fraktionierten Bestrahlung (5 x 2 Gy bzw. 5 x 4 Gy) am subkutanen Kolonkarzinom CT-26

A *Sowohl die alleinige Therapie mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 als auch die alleinige Strahlentherapie von 5 x 2 Gy zeigt eine signifikante Wachstumsverzögerung der Tumoren.*

B *Durch die zusätzliche Gabe des mTOR-Inhibitors vor der Bestrahlung mit 5 x 2 Gy kann das Tumorwachstum noch deutlich verzögert werden. Die Gabe des mTOR-Inhibitors im Anschluss an die Bestrahlung hat keinen weiteren therapeutischen Effekt.*

C *Die zusätzliche Gabe des mTOR-Inhibitors vor der Bestrahlung mit 5 x 4 Gy hatte keine weitere therapeutische Bedeutung.*

*Mittelwert + Standardfehler, n = 6 Versuchstiere pro Behandlungsgruppe. *p<0.05 vs. Kontrolle, †p<0.05 vs. 5x2Gy mono, ‡p<0.05 vs. RAD mono, ♦p<0.05 vs. RAD nach 5x2Gy, ×p<0.05 vs. RAD vor 5x2Gy, #p<0.05 vs. 5x4Gy mono.*

2.4 Bestimmung des RAD001-Serumspiegels

Der basale Serumspiegel von RAD001 lag zwischen 100 ng/l und 250 ng/l in allen Versuchsmodellen *in vivo*. Zwei Stunden nach intraperitonealer Injektion von 1,5 mg/kg KG RAD001 wurden Werte zwischen 1000 ng/L und 2500 ng/L gemessen. Der mTOR-Inhibitor RAD001 wurde somit nach i.p. Injektion gut resorbiert. Zudem bestand ein kontinuierlicher basaler Medikamentenspiegel, sodass die Wirksamkeit von RAD001 über 24 Stunden gesichert war.

2.5 Immunhistochemische Analyse des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges anhand der Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins

2.5.1 Humanes Pankreaskarzinom L3.6pl (FITC)

Die Tumoren der unbehandelten Kontrollgruppe zeigen eine deutliche Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges. Auch in den Tumoren, die fraktioniert mit 5 x 2 Gy bzw. 5 x 4 Gy bestrahlt wurden, ist das ribosomale S6 Protein phosphoryliert. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenzfärbung in den Tumoren, die mit 5 x 4 Gy bestrahlt wurden, höher als in den mit 5 x 2 Gy bestrahlten Tumoren. Durch die Therapie mit dem mTOR-Inhibitor konnte die Aktivierung des mTOR-Signalweges sowohl in der Monotherapiegruppe als auch in Kombination mit der fraktionierten Bestrahlung verhindert werden (vgl. Abbildung 25).

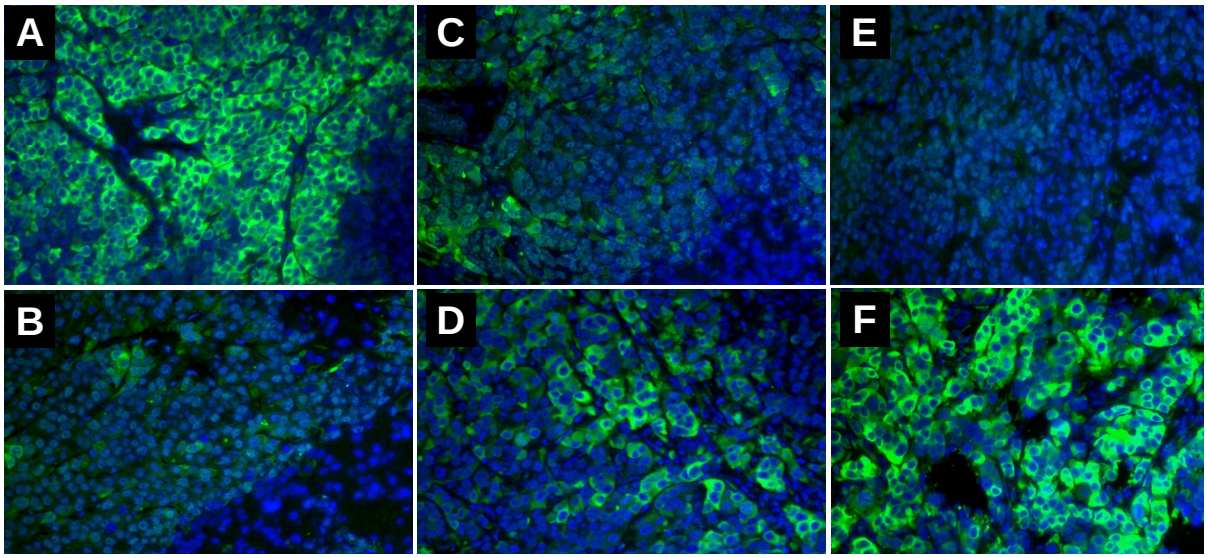

Abbildung 25: Immunfluoreszenz der phospho-S6-Kinase (FITC) beim humanen Pankreaskarzinom L3.6pl

Das humane Pankreaskarzinom L3.6pl zeigt eine Inaktivierung des mTOR-Signalweges im Tumorgewebe durch den mTOR-Inhibitor RAD001. Durch die Bestrahlung mit 5 x 2 Gy erfolgte eine moderate Aktivierung des Signalweges, welches durch die zusätzliche Gabe des mTOR-Inhibitors abgeschwächt werden konnte. Die Bestrahlung mit 5 x 4 Gy führt zu einer starken Aktivierung des mTOR-Signalweges, welche auch in diesem Dosisbereich durch RAD001 inhibiert wurde.
(A) Kontrolle, (B) RAD001 Monotherapie, (C) Kombination von RAD001 und 5 x 2 Gy, (D) 5 x 2 Gy, (E) Kombination von RAD001 + 5 x 4 Gy, (F) 5 x 4 Gy.

2.5.2 Murines Fibrosarkom BFS-1 (DAB)

Sowohl in den Tumoren der Kontrollgruppe, in den Tumoren, die mit 5 x 2 Gy bestrahlt wurden, als auch in den Tumoren der Kombinationstherapie aus Strahlentherapie mit 5 x 2 Gy gefolgt von der Therapie mit dem mTOR-Inhibitor zeigt sich eine deutliche Aktivierung des mTOR-Signalweges. Durch die Gabe von RAD001 kann die Aktivierung sowohl als Monotherapie als auch als Kombinationstherapie vor einer fraktionierten Bestrahlung mit 5 x 2 Gy verhindert werden (vgl. Abbildung 26).

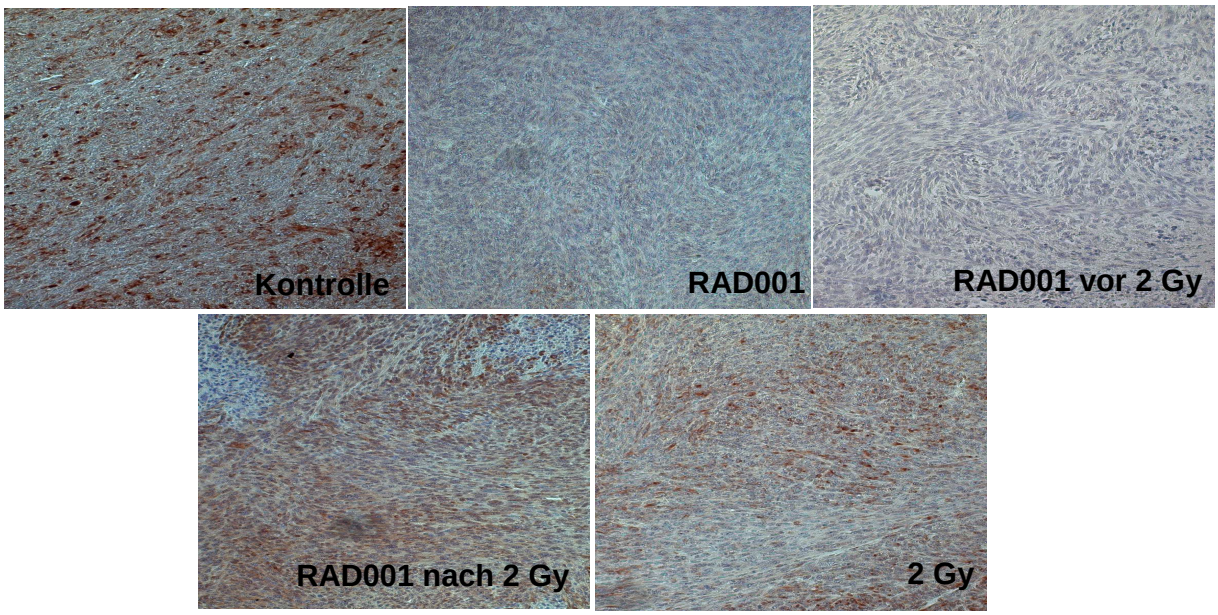

Abbildung 26: Immunhistochemie der phospho-S6-Kinase (DAB) des murinen Fibrosarkom BFS-1.

In der unbehandelten Kontrollgruppe, in den mit 2 Gy bestrahlten Tumoren sowie in den im Anschluss an den Bestrahlungszyklus von 5 x 2 Gy mit RAD001 behandelten Tumoren zeigt sich eine Expression des ribosomalen S6-Proteins, was für eine Aktivierung des mTOR-Signalweges spricht. Im Gegensatz dazu konnte mTOR durch die Behandlung der Tiere mit RAD001 als Monotherapie sowie in Kombination mit der Bestrahlung von 5 x 2 Gy inaktiviert werden, jedoch nur, wenn der mTOR-Inhibitor vor dem Bestrahlungszyklus appliziert wurde.

2.6 Immunhistochemische Analyse der Mikrogefäßdichte im humanen Pankreaskarzinom L3.6pl

Die Analyse der Tumorgefäße anhand der Immunhistochemie mit CD31 zeigte, dass die Mikrogefäßdichte der Tumoren des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl durch die Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor sowie durch die fraktionierte Strahlentherapie mit 5 x 2 Gy gesenkt werden konnte. Die Kombination der beiden Therapieformen hatte eine zusätzliche inhibitorische Wirkung auf die Bildung von Tumorgefäßen (vgl. Abbildung 27).

Die Tumoren, die mit 5 x 4 Gy bestrahlt wurden, bestanden zum größten Teil aus Nekrose, so dass eine Analyse der Mikrogefäßdichte nicht möglich war.

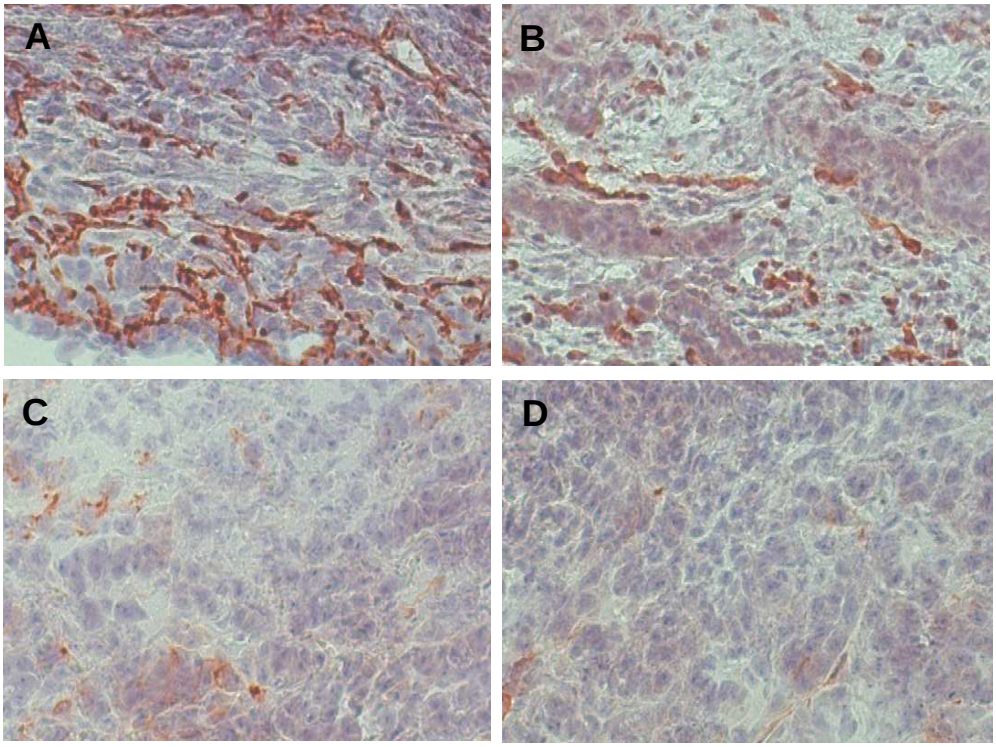

Abbildung 27: Mikrogefäßdichte (CD31) des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl

Die Kombination der mTOR-Inhibition und Strahlentherapie führte zu einer verminderten Mikrogefäßdichte in den L3.6pl Tumoren

(A) Kontrolle, (B) RAD001 Monotherapie, (C) RAD001 initiiert vor der Bestrahlung mit 5 x 2 Gy, (D) Monotherapie mit 5 x 2 Gy.

IV. DISKUSSION

1. Diskussion der Methodik

1.1 Tumorzelllinien

Die Untersuchungen sollten an unterschiedlichen Tumorzelllinien und unterschiedlichen Tumormodellen (subkutan und orthotop) durchgeführt werden, um mögliche tumorspezifische Unterschiede erkennen zu können. Als etabliertes orthotopes Modell wurde das humane Pankreaskarzinom L3.6pl gewählt. Das murine Kolonkarzinom CT-26 wurde als subkutanes Modell gewählt. Als weiteren subkutan wachsenden Tumor wurde das Fibrosarkom BFS-1 gewählt. Aufgrund seines Ursprungs aus dem Subkutangewebe kann das Fibrosarkom BFS-1 auch als orthotopes Tumormodell angesehen werden.

1.1.1 Humanes Pankreaskarzinom L3.6pl

Von Fidler et al. (Fidler I. J. 1990; Fidler I. J. 1989) wurde berichtet, dass Tumorzellen innerhalb einer tumorösen Raumforderung heterogenen, Metastasen dagegen klonalen Ursprungs sind. Bereits in einem frühen Tumorstadium finden sich im Primärtumor Zellen mit metastatischem Potential. Diese sind oftmals in den proliferativ aktiven, peripheren Arealen des Tumors lokalisiert. Bruns et al. beschrieben ein orthotopes Tumormodell durch direkte Implantation von humanen Pankreaskarzinomzellen in das Pankreas von Nacktmäusen mit reproduzierbarem Primärtumorwachstum und spontaner Leber- und Lymphknotenmetastasierung (Bruns C. J. et al. 1999). Dieses orthotope Tumormodell nutzend, wurde die hoch metastatische Tumorzelllinie des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl nach multiplen *in vivo* Pankreas-Leber-Selektionszyklen in der Nacktmaus aus der humanen, primär nicht-metastatischen Pankreaskarzinomzelllinie COLO 357 generiert (vgl. Abbildung 28). COLO 357 ist eine humane, duktale Pankreasadenokarzinomzelllinie, die aus einem nicht-metastasierten, lokal fortgeschrittenen Pankreaskopfkarzinom von Morgan et al. 1989 isoliert wurde. Diese Zelllinie zeigte eine p53-Mutation und

exprimierte neben dem Ki-ras Onkogen das karzinoembryonale Antigen CEA (Morgan R. T. et al. 1980).

Von der Arbeitsgruppe um Vezeridis wurde daraufhin *in vitro* eine schnell wachsende (FG) und eine langsam wachsende (SG) Pankreastumorzelllinie isoliert (Vezeridis M. P. et al. 1992). Aus der schnell wachsenden Zelllinie wurde von Bruns et al. die Zelllinie L3.6pl entwickelt (vgl. Abbildung 28) (Bruns C. J. et al. 1999).

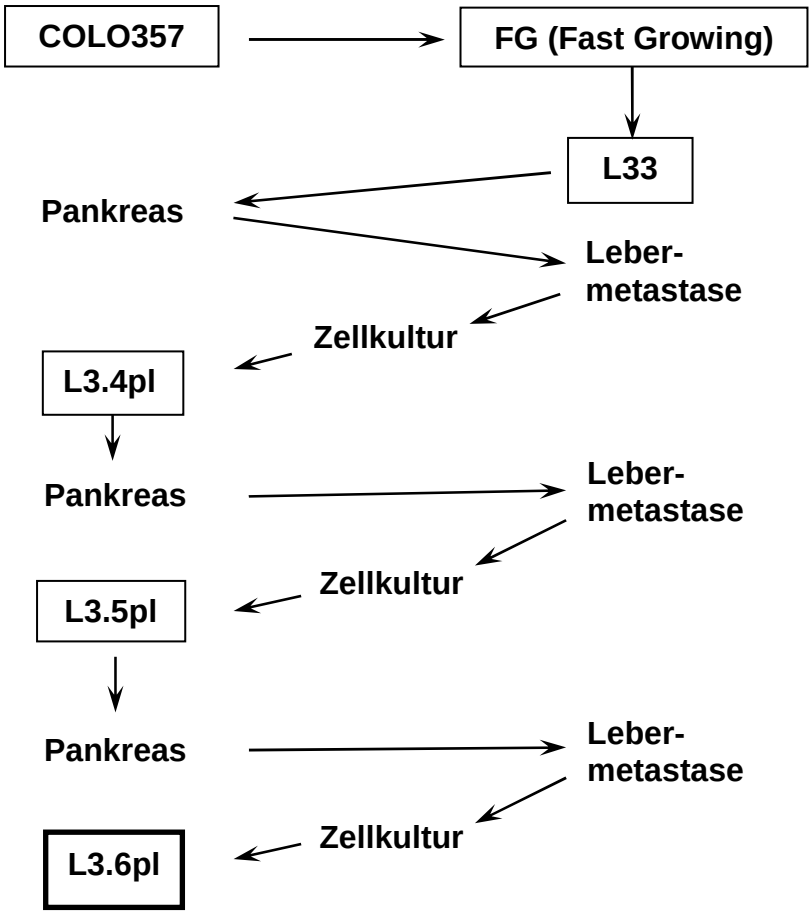

Abbildung 28: In vivo Selektion der humanen Pankreasadenokarzinomzelllinie L3.6pl.

Das humane, duktale Pankreasadenokarzinom COLO357 wurde über FG (fast growing) weiterentwickelt. Durch orthotope Implantation der Tumorzellen und wiederholte Pankreas-Leber-Selektionszyklen entstand die Zelllinie L3.6pl, die sich durch hohes metastatisches Potential auszeichnet.

1.1.2 Murines Fibrosarkom BFS-1

Zur Induktion von Fibrosarkomen wurde das Karzinogen 3-Methylcholantren an unterschiedlichen Mäusestämmen subkutan injiziert. Diese Tumoren wurden vergleichend in einem Modell der Tumorimmunologie gegenübergestellt (Old L. J. et al. 1961). Das in dieser Studie verwendete Fibrosarkom wurde durch subkutan appliziertes 3-Methylcholantren an der C57Bl/6J Maus induziert. Aus den subkutanen Tumoren wurde anschließend die Zelllinie BFS-1 gewonnen (Stoelcker B. et al. 2000). Tumoren der Zelllinie BFS-1 wurden in *in vivo* Studien über die Regulation der Expression von VEGF und seines endothelialen Rezeptors flk-1 verwendet (Heidenreich R. et al. 2000; Clauss M. et al. 1990). Nach subkutaner Injektion wuchsen die implantierten Zellen zu soliden Tumoren heran, deren Wachstum jedoch langsamer als das der CT-26 Karzinome war.

1.1.3 Murines Kolonkarzinom CT-26

Das Kolonkarzinom CT-26 wurde 1975 von Griswold et al etabliert. Wiederholte rektale Applikationen von N-Nitroso-N-methylurethan (NMU) führten zur Induktion des Kolonkarzinoms CT-26 in der Balb/c Maus. NMU (0,03 mg/Maus in 0,01 mg) wurde zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von sechs Monaten rektal appliziert. Nach durchschnittlich 426 Tagen entwickelte sich ein undifferenziertes Kolonkarzinom, welches subkutan transplantiert werden konnte. Nach subkutaner Injektion der CT-26 Tumorzellen verdoppelt sich das Tumorvolumen innerhalb von 1,7 Tagen. Bereits nach 14 Tagen beträgt das Tumorgewicht ein Gramm (Griswold D. P. und Corbett T. H. 1975).

1.2 mTOR-Inhibitor RAD001 (Everolimus)

1.2.1 Rapamycin: Herkunft und Ursprung

1975 wurde erstmals Rapamycin aus dem Bakterium streptomyces hygroscopius, welches aus Bodenproben der Osterinseln stammt, isoliert (Georgakis G. V. und Younes A. 2006). Von den Einheimischen werden die Osterinseln Rapa Nui genannt, was dem isolierten Stoff den Namen gab. Mittlerweile wird Rapamycin (Sirolimus) industriell hergestellt. Anwendung findet Sirolimus in der Transplantationsmedizin als Immunsuppressivum (Mehrabi A. et al. 2006). Als wichtige Nebenwirkungen sind die Bildung von Lymphozelen und die Wundheilungsstörung zu nennen. Ferner werden in der Kardiologie die anti-proliferativen Effekte von Sirolimus ausgenutzt, um Wiederverengungen (Re-Stenosen) der Koronarien nach Implantation eines Koronarstents durch eine Hyperplasie der Gefäß-Intima zu verhindern. Mit Sirolimus beschichtete Stents zeigen in mehreren Studien eine signifikant geringere Re-Stenoserate im Vergleich zum konventionellen Metallstent (Kupferwasser L. I. et al. 2007; Weisz G. et al. 2007; Seo A. et al. 2007).

1.2.2 RAD001 (Everolimus)

Um die pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern, wurden verschiedene Derivate von Rapamycin kreiert, so auch RAD001 (Everolimus) (vgl. Abbildung 29). Seine chemische Formel lautet 40-OH-(2-hydroxyethyl)-rapamycin, das Molekulargewicht beträgt 9,58. Ein wesentlicher Vorteil von Everolimus gegenüber Sirolimus besteht in der besseren oralen Bioverfügbarkeit. Zudem beträgt die Eliminationshalbwertszeit von RAD001 ca. 30 Stunden im Vergleich zu Rapamycin mit einer Halbwertszeit von ca. 60 Stunden (Kahan B. D. et al. 1999). Somit lässt sich RAD001 im Gegensatz zu Rapamycin besser steuern (Neumayer H. H. et al. 1999).

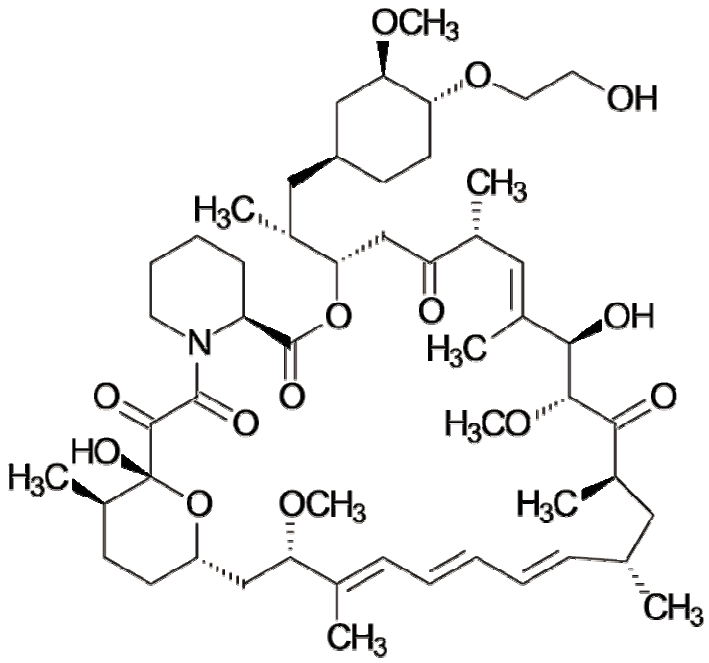

Abbildung 29: Everolimus, ein Derivat von Rapamycin
40-OH-(2-hydroxyethyl)-rapamycin

1.2.2.1 Applikation von RAD001

Die Applikation der „oral solution“ in den *in vivo* Experimenten erfolgte intraperitoneal (i.p.), um eine sichere Aufnahme und Bioverfügbarkeit des Medikamentes gewährleisten zu können. Zudem ist RAD001 lichtempfindlich, was eine Applikation über das Trinkwasser der Versuchstiere erschwert. Ferner ist eine mögliche Nebenwirkung der Strahlentherapie die Beeinträchtigung der intestinalen Resorption von Medikamenten. Die i.p.-Injektion stellt ein etabliertes Verfahren dar, welches leicht und reproduzierbar anzuwenden ist und eine konstante Medikamentenaufnahme gewährleistet. Messungen des Medikamentenspiegels im Blut der Versuchstiere konnten zu verschiedenen Zeitpunkten die peritoneale Resorption von RAD001 bestätigen.

1.3 Orthotopes versus subkutanes Tumormodell

Subkutane Tumoren können durch eine einfache subkutane Injektion von Tumorzellen induziert werden. Die Implantation der Tumorzellen in ein Organ erfordert jedoch operative Maßnahmen, die für die Versuchstiere eine höhere Belastung bedeuten. Die chirurgische Intervention stellt ein Trauma für die Versuchstiere dar. Aufgrund der Immundefizienz der in dieser Studie verwendeten NMRI/nu/nu Nacktmäuse bestand zudem eine erhöhte Infektionsgefahr. Bei der orthotopen Implantation der Pankreaskarzinomzellen wurde daher ein besonderes Augenmerk auf steriles Arbeiten gelegt.

Das Volumen subkutan implantierter Tumoren kann während des Beobachtungszeitraumes durch Ausmessen der Tumoren mittels Mess-Schieber genau dokumentiert werden. Die Messung des Tumorvolumens orthotop wachsender Tumoren kann durch Einschränkungen in der Abgrenzbarkeit der Tumoren von Nachbarstrukturen einer höheren Messungenauigkeit unterliegen (vgl. III.1.4).

Im orthotopen Tumormodell wachsen die Tumoren jedoch in ihrem Primärorgan und sind so den dort herrschenden physiologischen Einflüssen ausgesetzt. Damit unterliegt im orthotopen Modell das Tumorwachstum und die Angiogenese entscheidenden Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Temperatur, Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, die sich von den Verhältnissen des subkutan herrschenden Milieus unterscheiden (Dinney C. P. et al. 1995; Naito S. et al. 1986; Giavazzi R. et al. 1986). Das orthotope Tumormodell stellt die Methode der Wahl dar, um das Tumorwachstum unter Berücksichtigung pathophysiologischer Einflussfaktoren nachzuvollziehen und eine bessere Übertragbarkeit der gewonnen Erkenntnisse auf die Situation im Menschen zu erzielen. Auf die orthotope Injektion des murinen Kolonkarzinoms CT-26 wurde in dieser Studie jedoch verzichtet, da dieser Tumor nach orthotoper Implantation ein sehr aggressives Wachstumsverhalten zeigt und so ein längerer Beobachtungszeitraum nicht möglich gewesen wäre (Lupu C. M. et al. 2007). Zusätzlich wäre bei einer gezielten Bestrahlung des Darms mit verstärkt intestinalen Nebenwirkungen zu rechnen gewesen.

1.3.1 Vor- und Nachteile in Bezug auf die Strahlentherapie

Das Bestrahlungsfeld konnte beim gut sichtbaren subkutan wachsenden Tumor genau auf den Tumor ausgerichtet werden, sodass die Bestrahlung des gesamten Tumors sichergestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu musste das orthotop wachsende Pankreaskarzinom vor der Bestrahlung palpiert werden. Das entsprechende Bestrahlungsfeld wurde sodann auf der Haut der Versuchstiere markiert (vgl. Abbildung 8). Bei dieser Methode können Lageveränderungen der Tiere unter Umständen dazu führen, dass nicht der gesamte Tumor bestrahlt wird. Die anästhesierten Tiere wurden deshalb in Rechtsseitenlage so fixiert, dass Lageveränderungen nicht mehr möglich waren und auch hier die Bestrahlung des gesamten Tumors sichergestellt werden konnte.
Bei der Bestrahlung des orthotopen Pankreaskarzinoms kann trotz Eingrenzung des Bestrahlungsfeldes mittels Bleiglastubus eine Gefährdung anderer Organe, insbesondere die des Darmes, nicht ausgeschlossen werden. In der Tat traten bei den Tieren aus den Versuchsgruppen, die mit 5 x 4 Gy bestrahlt wurden, gastrointestinale Nebenwirkungen und Kachexie als Komplikationen auf, die den Versuch zeitlich limitierten. In den subkutanen Versuchsmodellen zeigte sich auch im hohen Dosisbereich keine limitierende Nebenwirkung der Bestrahlung.

1.4 Messung des subkutanen und orthotopen Tumorwachstums

Entscheidender Parameter für den Erfolg einer antitumoralen Therapie ist ihr Einfluss auf das Wachstum des Primärtumors und seine Metastasierung.
Das Tumorwachstum wurde in dieser Studie durch Ausmessung der Tumoren und Berechnung der Tumorvolumina nach o.g. Formeln berechnet (vgl. II.2.4). Bei der Vermessung der zu Behandlungsbeginn kleinen Tumoren spielt eine Meßungenauigkeit von ± 0,5 mm eine erhebliche Rolle, da sie dreifach in die Volumenberechnung eingeht. Mit steigendem Tumorvolumen nimmt jedoch die Ungenauigkeit für die Berechnung des Tumorvolumens eine untergeordnete Rolle ein. Die Messungen wurden immer von derselben Person durchgeführt, so dass eventuelle Messungenauigkeiten bei allen Versuchstieren sowohl im orthotopen

Pankreaskarzinommodell als auch in den subkutanen Tumormodellen gleich waren und als systematischer Fehler gewertet werden können.

Als alternatives Verfahren zur Bestimmung des Tumorvolumens des orthotop wachsenden Pankreaskarzinoms könnte eine bildgebende Diagnostik mittels Ultraschall erfolgen. Diese ist jedoch im Tierversuch an der Maus relativ teuer und aufwändig. Zudem müsste diese Untersuchung in Narkose durchgeführt werden, um eine sichere und valide Abmessung der Tumoren gewährleisten zu können. Damit wären die Versuchstiere bei engmaschigem Monitoring des Tumorwachstums erheblichen weiteren Belastungen ausgesetzt.

Die Güte der Vermessungen des orthotopen Pankreaskarzinoms durch Palpation und Mess-Schieber ist in der Arbeitsgruppe diskutiert und validiert worden. Nach entsprechender Einarbeitung des Untersuchers sind die Messergebnisse reproduzierbar. Das durch die Palpation ermittelte Tumorvolumen korrelierte sehr gut mit dem Tumorvolumen, das nach Versuchsende an den chirurgisch exzidierten Tumoren bestimmt wurde. Es konnte so eine maximale Messungenauigkeit von ±1 mm festgestellt werden.

1.5 WST-1 Proliferationsassay

Der Einfluss des mTOR-Inhibitors RAD001 und der Bestrahlung auf die Proliferation von Tumor- und Endothelzellen wurde über ein colorimetrisches Verfahren mit Hilfe des WST-1 (water soluble tetrazolium) Proliferationsassays untersucht. Dieser Test basiert auf der intrazellulären Reduktion des Tetrazoliumsalzes WST-1 in den dunkelroten Farbstoff Formazan (Ishiyama M. et al. 1996). Diese Reaktion wird durch mitochondriale Dehydrogenasen vermittelt, so dass durch den Test ausschließlich stoffwechselaktive Zellen erfasst werden. Die Farbstoffmenge ist dabei direkt proportional zur Anzahl lebender, stoffwechselaktiver Zellen.

Der Vorteil des WST-1 basierten Verfahrens im Vergleich zu anderen im Handel erhältlichen Tests wie MTT und XTT besteht vor allem in seiner Anwendbarkeit. Das Tetrazoliumsalz WST-1 wird von den Zellen direkt in ein lösliches Formazan umgewandelt, ohne zuvor in die Zellen eingelagert zu werden. Somit entfallen die im MTT und XTT basierten Verfahren erforderlichen Schritte zum Auswaschen des

eingelagerten Farbstoffes aus den Zellen und ernten der Zellen. Hierdurch werden mögliche Fehlerquellen der Messung vermieden. Daraus ergibt sich die hohe Sensitivität des WST-1 basierten Testverfahrens.

1.6 Spheroidassay

Mit Hilfe des Spheroidassays kann der Einfluss einer Therapie auf die Angiogenese *in vitro* beurteilt werden. Ein Spheroid besteht aus kugelförmig zusammengelagerten Endothelzellen, die in ein Kollagengel eingebettet werden. Unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) bilden die Spheroide sogenannte Sprouts, die Zellausläufern entsprechen (Korff T. und Augustin H. G. 1998; Mueller-Klieser W. 1997).

Die Schwächen des Assays liegen darin, dass es sich eigentlich um ein dreidimensionales Modell handelt, da der kugelförmige Spheroid nicht nur in einer Ebene Sprossen ausbildet, sondern in allen möglichen Ebenen. Mikroskopisch können jedoch nur die Sprouts der horizontalen Ebene erfasst werden, die hinter dem Spheroid liegenden Zellausläufer sowie die nach oben gerichteten werden nicht erfasst. Dennoch liefert der Spheroidassay gut reproduzierbare Ergebnisse, die eine valide Aussage über das angiogene bzw. anti-angiogene Potential der untersuchten Substanzen *in vitro* erlaubt.

1.7 Aktivierung/ Inaktivierung des mTOR-Signalweges mittels Immunfluoreszenz des ribosomalen S6 Proteins

Die Aktivierung von mTOR führt zur Phosphorylierung der p70S6-Kinase. Diese wiederum bedingt die Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins (vgl. Abbildung 2), was zur Translation von Transkriptionsfaktorten und weiteren ribosomalen Proteinen führt (Jefferies H. B. et al. 1997). Das ribosomale S6 Protein ist somit kein direkter Effektor von mTOR. Dennoch ist die Bestimmung des Phosphorylierungsstatus des S6rp ein etabliertes Verfahren, um die Aktivität des mTOR-Signalweges zu beurteilen (El Salem M. et al. 2007; Majumder P. K. et al.

2004; Thomas G. V. et al. 2004). Es scheinen jedoch auch alternative, mTOR-unabhängige Aktivierungskaskaden der p70S6-Kinase zu existieren, die eine Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins bedingen könnten (Pullen N. und Thomas G. 1997).

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1 mTOR-Inhibition und anti-angiogene Therapie

Die Blockade des mammalian Target of Rapamycin (mTOR) wird therapeutisch primär zur Immunsuppression nach Organtransplantation angewendet. Präklinische Untersuchungen haben jedoch auch eine signifikante antitumorale Wirksamkeit der mTOR-Blockade in unterschiedlichen soliden Tumoren gezeigt (Eng C. P. et al. 1984). Der Einsatz von mTOR-Inhibitoren Rapamycin (Sirolimus) und seinen Derivaten RAD001 (Everolimus), CCI779 (Temsirolimus) sowie AR23573 wird daher in klinischen Studien zur Therapie fortgeschrittener Tumorleiden erprobt (Chan S. et al. 2005). Die antitumorale Wirksamkeit der mTOR-Inhibitoren wurde primär auf anti-proliferative Eigenschaften auf die Tumorzellen zurückgeführt.

Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch in experimentellen Studien einen signifikanten anti-angiogenen Effekt des mTOR-Inhibitors Rapamycin nachweisen. *In vivo* war eine deutliche Hemmung des Tumorgefäßwachstums und damit eine Unterdrückung des Tumorwachstums zu verzeichnen. Gleichzeitig war auch eine Abnahme der Tumormetastasierung zu beobachten. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass insbesondere die Endothelzellen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber der mTOR-Inhibition besitzen und die mTOR-Inhibition die VEGF vermittelte Proliferation der Endothelzellen hemmt (Bruns C. J. et al. 2004; Guba M. et al. 2002).

Von weiteren Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass durch eine mTOR-Inhibition sowohl die Differenzierung als auch die Proliferation von endothelialen Vorläuferzellen zumindest *in vitro* gehemmt werden kann (Miriuka S. G. et al. 2006; Butzal M. et al. 2004). Weiter untermauert wird die anti-angiogene Wirksamkeit der mTOR-Inhibition durch Studien an ErbB2 exprimierenden Mammakarzinomen. Hier

korrelierte die Aktivierung des mTOR-Signalweges mit einem hohen angiogenen und metastatischen Potential dieser Tumoren (Klos K. S. et al. 2006).

Die anti-angiogene Therapie richtet sich gegen die genetisch stabilen, jedoch proliferierenden Endothelzellen der Tumormikrozirkulation. Als wesentlicher Vorteil der anti-angiogenen Therapie wurde eine ausbleibende Resistenzentwicklung in genetisch stabilen Endothelzellen angenommen, wie sie im Gegensatz dazu in den genetisch instabilen Tumorzellen zu beobachten ist (Klement G. et al. 2000; Sepp-Lorenzino L. und Thomas K. A. 2002). Die Tatsache, dass das Wachstum und Überleben einer großen Anzahl von Tumorzellen von einer im Vergleich dazu relativ geringen Anzahl von Endothelzellen abhängig ist, verstärkt das therapeutische Potential der anti-angiogenen Therapie erheblich (Folkman J. in Harrison's Textbook of Internal Medicine New York, 2001).

Entgegen der zytotoxisch wirkenden Chemotherapie besitzt die anti-angiogene Therapie jedoch nur eine zytostatische Wirkung auf die Tumorzellen. Nach Beendigung einer anti-angiogenen Therapie ist zumeist mit einem raschen erneuten Tumorwachstum zu rechnen. Mancuso et al. zeigten, dass nach Absetzen einer anti-angiogenen Therapie experimentelle Tumoren ihre ursprüngliche Gefäßdichte innerhalb von sieben Tagen wiedererlangten (Mancuso M. R. et al. 2006). Dabei dienten die unter anti-angiogener Therapie zurückgebliebenen Basalmembranen und Perizyten als Grundgerüst für das erneute schnelle Gefäßwachstum. Daher erscheint bei einer anti-angiogenen Monotherapie eine Dauermediaktion über mehrere Monate oder sogar Jahre erforderlich zu sein, um ein stabiles Tumorstadium zu erhalten.
Unter einer dauerhaften anti-angiogenen Therapie hat sich jedoch der erhoffte Vorteil einer ausbleibenden Resistenz des Tumors gegenüber der Therapie nicht bestätigt. Insbesondere unter monospezifischen anti-angiogenen Substanzen, d.h. Substanzen, die gegen nur einen angiogenen Wachstumsfaktor oder dessen Rezeptor wirksam sind, kommt es im Verlauf der Behandlung zu einer Resistenzentwicklung (Kerbel R. S. et al. 2001). Ein wesentlicher Mechanismus ist dabei das im Verlauf einer Therapie kompensatorische Überwiegen alternativer angiogener Wachstumsfaktoren und Signalkaskaden über den mit einer anti-angiogenen Therapie selektiv blockierten Signalweg. Beispielsweise kann unter der Inhibition des VEGF-Signalweges die Tumorangiogenese unter dem verstärkten

Einfluss von bFGF, Angiopoetin, PDGF und anderen angiogenen Wachstumsfaktoren ungehindert fortschreiten (Gasparini G. et al. 2005). Andererseits kann eine Endothelzellapoptose durch direkte anti-angiogene Substanzen unter dem protektiven Einfluss von VEGF in Tumoren mit hoher VEGF-Expression unterdrückt werden. Unter der anti-angiogenen Therapie kann es ebenso zur Selektion von Tumorzellklonen kommen, die weniger empfindlich gegenüber Hypoxie und Azidose sind. Aus diesen Tumorzellklonen können Tumorareale entstehen, die in ihrem Wachstum und ihrer Metastasierung weniger von der Tumorangiogenese abhängig sind (Yu J. L. et al. 2002).

Es erscheint daher sinnvoll, das Potential einer anti-angiogenen Therapie mit bisherigen konventionellen Therapieformen der Chemotherapie und Strahlentherapie zu kombinieren, um eine dauerhafte Kontrolle über einen Tumor erzielen zu können. In präklinischen und klinischen Studien konnte bereits durch die simultane Gabe einer anti-angiogenen Therapie eine Sensibilisierung von Tumoren gegenüber einer Chemotherapie und Strahlentherapie erzielt werden. Diese gegenseitige positive Wirkungsverstärkung kann durch drei unterschiedliche Ansätze erklärt werden, die im Folgenden näher erläutert werden.

2.1.1 „Normalizing effect“ der anti-angiogenen Therapie

Der “normalizing effect” der anti-angiogenen Therapie auf die Tumormikrozirkulation wurde erstmals von Jain postuliert (Jain R. K. 2001). Er beruht auf den besonderen pathophysiologischen Eigenschaften der Tumormikrozirkulation und ihrem Einfluss auf die Wirksamkeit von Chemotherapie und Strahlentherapie.

Im Gegensatz zur Gefäßversorgung differenzierter Organe ist die Gefäßarchitektur von Tumoren gekennzeichnet durch Gefäßdilatationen, Gefäßelongationen, Sproßbildungen, Gefäßabbrüche und fehlende Ausdifferenzierung der Gefäßwand. Die Gefäße besitzen eine erhöhte Permeabilität und zeigen eine chaotische Gefäßanordnung, die keine Differenzierung zwischen venösem und arteriellem Blut erlaubt (Baish J. W. und Jain R. K. 2000). Die Dichte der Gefäße kann innerhalb eines individuellen Tumors erheblich variieren, wobei sich die höchste Gefäßdichte meist in der Tumorperipherie, der Invasionsfront des Tumors findet. Diese Variationen im Gefäßaufbau sowie die Kompression, die von der proliferierenden

Tumorzellmasse auf das Gefäßsystem ausgeübt wird, können zu erhöhtem Perfusionswiderstand im Tumorgefäßsystem führen und so die Blutversorgung des Tumors beeinträchtigen. Bedingt durch das verschobene Gleichgewicht von Perfusionswiderstand und Gefäßpermeabilität kommt es mit zunehmender Extravasation von Plasmaproteinen zu einer weiteren kontinuierlichen Zunahme des interstitiellen Druckes im Tumor. Als Folge der weiter beeinträchtigten Perfusion im Tumorgefäßsystem entstehen trotz einer hohen Gefäßdichte hypoxische Areale im Tumor, die zu Strahlenresistenz führen können (Vaupel P. 2004). Die anti-angiogene Therapie führt zu einer Abnahme der Tumorgefäßdichte und zu einer Abnahme der in Tumoren stark erhöhten Gefäßpermeabilität (vgl. Abbildung 30). Dies führt zu einer Annäherung des Aufbaus des Tumorgefäßsystems an die Gefäßversorgung differenzierter Organe, d.h. zu einer „Normalisierung“ der Gefäße in ihrem strukturellen Aufbau und ihren physiologischen Eigenschaften. Durch die damit verbundene Abnahme der Gefäßpermeabilität und die Abnahme des Perfusionswiderstandes kommt es zu einer Senkung des interstitiellen Druckes im Tumor und damit zu einer verbesserten Tumorperfusion und Tumoroxygenierung (Boucher Y. et al. 1996). In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Blockade von VEGF oder seinem Rezeptor die Apoptose von Endothelzellen induzieren kann und daraus eine Abnahme der Gefäßdichte, der Permeabilität und der Gefäßdurchmesser resultiert (Kadambi A. et al. 2001; Tsuzuki Y. et al. 2000; Yuan F. et al. 1996), was zur Reduktion des interstitiellen Druckes führt und den Sauerstoffpartialdruck im Tumor erhöht (Lee C. G. et al. 2000; Hansen-Algenstaedt N. et al. 2000). Zudem wird angenommen, dass unter einer anti-angiogenen Therapie der Sauerstoffbedarf eines Tumors durch die Reduktion von stoffwechselaktiven Tumorzellen und Endothelzellen gesenkt wird.

Durch diese „Normalisierungseffekte“ im Tumorgefäßsystem könnten zytotoxische Chemotherapeutika leichter in die Tumormikrozirkulation gelangen und aufgrund des ausgeglichenen interstitiellen Druckes leichter in das Tumorinterstitium, an ihren Wirkort, den Tumorzellen, diffundieren. Die verbesserte Tumoroxygenierung ist zudem entscheidend für die verbesserte Wirkung einer Strahlentherapie, die durch Bildung von Sauerstoffradikalen zu einem DNA-Schaden der stoffwechselaktiven Tumorzellen führt (Jonathan E. C. et al. 1999; Haimovitz-Friedman A. 1998).

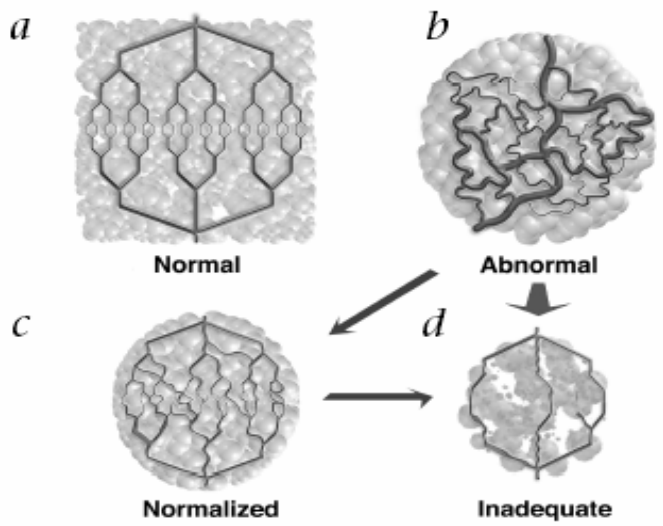

Abbildung 30: Schematische Darstellung des Tumorgefäßsystems während der anti-angiogenen Therapie (nach Jain RK 2001)

a: Darstellung eines physiologischen Gefäßsystems.

b: Abnormales Tumorgefäßsystem mit Gefäßdilatationen, Gefäßelongationen, Sproßbildungen, Gefäßabbrüchen und erhöhter Gefäßpermeabilität.

c: Durch anti-angiogene Therapie „normalisiertes" Tumorgefäßsystem.

d: Eine Thrombosierung von Tumorgefäßen oder eine rasche Reduktion der Gefäßdichte unter anti-angiogener Therapie kann das Tumorgefäßsystem soweit reduzieren, dass ein erneutes Tumorwachstum aufgrund von inadäquater Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff nicht möglich ist. Dies ist das Endziel der anti-angiogenen Therapie.

2.1.2 Verhinderung der Repopularisierung von Tumorzellen unter anti-angiogener Therapie

Die anti-angiogene Therapie kann die Repopularisierung eines Tumors im Intervall einer Chemo- oder Strahlentherapie beeinträchtigen (Kim J. J. und Tannock I. F. 2005; Dinney C. P. et al. 1995).

Üblicherweise erfolgt die Applikation einer Strahlentherapie fraktioniert in geringen Einzeldosen von 1,8-2 Gy an fünf aufeinander folgenden Tagen pro Woche. Die Dauer der Therapie beträgt insgesamt ca. fünf bis acht Wochen. Die Gründe hierfür liegen darin, dem im Strahlenfeld liegenden gesunden Gewebe Zeit zu geben, sich von der Bestrahlung zu erholen und so mögliche Nebenwirkungen zu minimieren. Unter der Bestrahlung wird im Tumor durch die Schädigung von Tumorzellen und des Tumorgefäßsystems eine lokale Hypoxie induziert, die die Tumorangiogenese

stimuliert. Im therapiefreien Intervall nach Strahlentherapie kann es daher durch eine reaktiv gesteigerte Tumorangiogenese zu einem raschen erneuten Tumorwachstum kommen. Daher ist bei der Kombination einer Strahlentherapie mit einer anti-angiogenen Therapie eine Wirkungsverstärkung zu erwarten (Gorski D. H. et al. 1999).

Die Applikation der zytotoxischen Chemotherapie erfolgt zumeist in Form einer maximal tolerierten Dosis (MTD-) Therapie in Zyklen. An einen Therapiezyklus schließt sich ein therapiefreies Intervall von ca. drei Wochen an, da unter der MTD-Chemotherapie nicht nur Tumorzellen, sondern auch die empfindlichen Zellen des Wirtsorganismus wie Knochenmarksstammzellen geschädigt werden. Im therapiefreien Intervall soll sich auch hier insbesondere der Wirtsorganismus regenerieren können. Häufig kommt es analog zur Strahlentherapie jedoch auch zu einer raschen Repopulation der Tumorzellen mit einem erneuten Tumorwachstum. Der zur Regeneration eines Tumors benötigte hohe Sauerstoffbedarf stimuliert dabei die Tumorangiogenese. Durch die zusätzliche Gabe einer anti-angiogenen Therapie im Intervall soll eine Hemmung der Tumorrepopulation erreicht werden. Auf dieser theoretischen Grundlage beruht die Kombinationstherapie von Bevacizumab mit einer Chemotherapie in der Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms (Hudis C. A. 2005).

2.1.3 Hemmung der Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen

Endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark unterhalten die Vaskulogenese (Rafii S. et al. 2002; Asahara T. et al. 1999). Unter dem Einfluß angiogener Wachstumsfaktoren, insbesondere VEGF, werden sie aus dem Stammzellpool des Knochenmarks freigesetzt (Lapidot T. und Petit I. 2002). Am Ort der verstärkten Gefäßneubildung (Tumor, Wundheilung) integrieren sie sich in die Wand neu entstehender Gefäße und differenzieren sich zu Endothelzellen aus. Bei einer MTD-Chemotherapie kommt es durch die Schädigung des Knochenmarks initial zu einer Abnahme der endothelialen Vorläuferzellen im peripheren Blut. Als Folge einer therapieinduzierten Tumorhypoxie kommt es unter der vermehrten Ausschüttung von angiogenen Wachstumsfaktoren durch den Tumor anschließend zu einem

Reboundphänomen mit erneutem Anstieg der endothelialen Vorläuferzellen auf Ausgangswerte oder sogar deutlich höhere Werte im peripheren Blut (Bertolini F. et al. 2003). Ebenso kann es nach einer Strahlentherapie aufgrund einer Tumorhypoxie und der reaktiv gesteigerten Expression angiogener Wachstumsfaktoren zur vermehrten Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen kommen. Eine anti-angiogene Therapie kann durch Hemmung der Rekrutierung und Integration endothelialer Vorläuferzellen in das periphere Gefäßsystem den therapeutischen Effekt einer Chemotherapie oder einer Strahlentherapie verstärken (Kerbel R. S. 2006).

Neue Therapieansätze bestehen in einer niedrig dosierten Chemotherapie, die kontinuierlich oder in kurzen Intervallen (einmal täglich bis einmal wöchentlich) appliziert wird. Nicht mehr die Tumorzelle, sondern die Endothelzelle der Tumormikrozirkulation ist der eigentliche Angriffspunkt. Diese Form der Chemotherapie wird als metronome Chemotherapie bzw. als anti-angiogene Chemotherapie bezeichnet (Kerbel R. S. und Kamen B. A. 2004). Neben der lokalen anti-angiogenen Wirkung am Endothel der Tumormikrozirkulation besitzt die metronome Chemotherapie auch eine systemische anti-angiogene Wirkung. Die Mobilisation von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark unterbleibt und die endothelialen Vorläuferzellen in der peripheren Zirkulation werden geschädigt. Anhand der Konzentration der peripher zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen orientiert sich daher die „optimale biologische Dosis“ der metronomen Chemotherapie (Shaked Y. et al. 2005). Die Überlegenheit dieser Therapie gegenüber einer MTD-Chemotherapie in der Tumorkontrolle wurde nachgewiesen. Die Kombination einer metronomen Chemotherapie mit einer anti-angiogenen Therapie führte zu einer weiter verbesserten Tumorkontrolle (Citron M. L. 2004; Klement G. et al. 2000).

2.2 Stimulation der Tumorangiogenese als Streßantwort auf die Strahlentherapie

Die Grundlage, Strahlentherapie mit Inhibitoren der Angiogenese zu kombinieren begründet insbesondere darin, dass Tumorzellen im Sinne einer Streßantwort auf die Bestrahlung vermehrt angiogene Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF exprimieren

können, was sich protektiv auf die Tumorgefäße unter der Strahlentherapie auswirkt (Abdollahi A. et al. 2003; Colevas A. D. et al. 2003; Gorski D. H. et al. 1999). Verstärkt wird dieser Effekt durch die unter der Strahlentherapie induzierte Tumorhypoxie, die zusätzlich einen starken Stimulus zur Expression angiogener Wachstumsfaktoren (VEGF, bFGF, Angiopoetin u.a.) in Tumorzellen und zu einer lokalen Stimulation der Angiogenese sowie zu einer Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen in die Tumormikrozirkulation führt (Kerbel R. und Folkman J. 2002; Browder T. et al. 2000; Willett C. G. et al. 2004).

Tumoren, die primär durch eine gesteigerte Sekretion angiogener Wachstumsfaktoren gekennzeichnet sind, zeigen daher häufig eine Strahlenresistenz (Gupta V. K. et al. 2002; Kerbel R. und Folkman J. 2002; Geng L. et al. 2001). Andererseits kann durch die Bestrahlung ein direkter Endothelzellschaden verursacht werden (Abdollahi A. et al. 2003). Je strahlensensibler die tumorversorgenden Gefäße sind, umso weniger Strahlenresistenz bietet der Tumor (Camphausen K. und Menard C. 2002). Da das Wachstum von Tumoren entscheidend von ihrer Gefäßversorgung abhängt (Folkman J. 2002), kann ein geringer Schaden der Tumormikrozirkulation große Auswirkungen auf die Tumorkontrolle haben (Denekamp J. 1993).

Somit kann sich die Kombinationstherapie aus Bestrahlung und anti-angiogener Therapie in zweifacher Weise auf die Tumorgefäße auswirken: Zum einen werden die Endothelzellen durch die Bestrahlung geschädigt, zum andern wird die Stimulation der Endothelzellproliferation als Folge einer Streßantwort des Tumors auf die Bestrahlung durch die anti-angiogene Therapie unterdrückt.

2.3 Stellenwert des mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in der Strahlenresistenz

Die Strahlenresistenz maligner Tumoren kann auf unterschiedliche Mutationen in Tumorsuppressorgenen, z.B. p53 und Ras, Reparaturmechanismen von DNA-Schäden und die Aktivierung molekularer Signalwege zurückgeführt werden (Camphausen K. und Tofilon P. J. 2004).

Insbesondere die Stimulation des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mit Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalkaskade konnte als ein

entscheidender Signalweg, der eine Strahlenresistenz vermittelt, identifiziert werden. Gleichzeitig ist der EGFR-Signalweg für die Regulation angiogener Mechanismen bedeutend. Es konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass durch Bestrahlung die Rezeptoren der EGF-Gattung (EGFR, ErbB2-3) aktiviert werden können und über deren Rezeptor-Tyrosinkinasen die Signaltransduktion über den Phosphoinositol-3 Kinase-Signalweg und Akt stimuliert wird (Schmidt-Ullrich R. K. et al. 2003; Chakravarti A. et al. 2002; Edwards E. et al. 2002).

Die PI3/Akt-abhängige Phosphorylierung des mammalian Target of Rapamycin (mTOR) spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Zellproliferation über die Translation von Transkriptionsfaktoren und die Synthese ribosomaler Proteine. Die beiden am besten beschriebenen Substrate von mTOR und Regulatoren der mRNA-Translation sind die ribosomale p70S6 Kinase (S6K1) und das 4E-binding protein 1 (4E-BP1) (Sarbassov D. D. et al. 2005) (vgl. Abbildung 31). mTOR induziert die Phosphorylierung der ribosomalen p70S6 Kinase und konsekutiv die Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins (S6rp). Das S6rp wird als indirekter Marker der Aktivierung des mTOR-Signalweges eingesetzt. Die mTOR abhängige Phosphorylierung des 4E-BP1 hebt dessen inhibierende Wirkung auf den Elongationsfaktor elF4E auf. Hieraus resultiert eine gesteigerte mRNA-Translation von für den Zellzyklus und das Zellwachstum wichtigen Proteinen. Besonders hervorzuheben ist die Translation von mRNA's, die ein 5'-terminales Oligopyrimidin (5'TOP) enthalten (Jefferies H. B. et al. 1997).

Durch mTOR wird somit auch die Translation der 5´-TOP-mRNA des Hypoxia Inducible Factor-1α (HIF-1α) vermittelt (Thomas G. V. 2006) (vgl. Abbildung 31). HIF-1α ist einer der nukleären Transkriptionsfaktoren, die die Transkription der angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF, bFGF und weiteren induziert (Bilton R. L. und Booker G. W. 2003; Zhong H. et al. 2000). Somit kann die ionisierende Strahlung in Tumorzellen über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg zu einer verstärkten Expression von angiogenen Wachstumsfaktoren und einer verstärkten Angiogenese führen (Moeller B. J. et al. 2004). HIF-1α beeinflusst darüber hinaus den Glucosemetabolismus und die Proliferation der Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen, sodass unter einer verstärkten HIF-1α-Aktivität eine erhöhte Hypoxietoleranz der Tumorzellen zu beobachten ist (Moeller B. J. et al. 2005).

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg wird von zwei Tumorsuppressorgenen und deren Proteinen negativ kontrolliert (vgl. Abbildung 31). Sind die Lipidphosphatase „phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten" (PTEN) und der

„tuberous sclerosis complex 1 und 2“ (TSC-1/2) in Tumoren durch Mutation inaktiviert, so führt dies zu einer gesteigerten Aktivierung des mTOR-Signalweges (Huang S. und Houghton P. J. 2003). PTEN hemmt die PI3K-abhängige Phosphorylierung von Akt (Cantley L. C. und Neel B. G. 1999). Eine Deletion von PTEN führt zur dauerhaften Aktivierung von Akt, die von zentraler Bedeutung in der Tumorentstehung ist. TSC-1 und -2 werden durch Akt gehemmt, woraufhin die inhibierende Funktion des TSC-1/2 auf die Phosphorylierung von mTOR entfällt. Die alleinige Deletion von TSC 2 führt zur klinischen Manifestation von gutartigen Hamartomen. Erst in Kombination mit einer Deletion von PTEN konnte eine gesteigerte maligne Entartung dieser Tumoren hervorgerufen werden (Manning B. D. et al. 2005). mTOR übt eine negative Rückkopplung auf Akt aus, wodurch die mTOR Aktivierung limitiert werden kann. Dieser Rückkopplungsmechanismus kann jedoch durch die Deletionen an den Tumorsuppressoren PTEN und TSC-1/2 aufgehoben werden und die permanente Aktivierung von mTOR bedingen.

An der Endothelzelle kann der PI3K/Akt-Signalweg ebenfalls durch ionisierende Strahlen direkt aktiviert werden und sogar eine Endothelzellproliferation induzieren (Edwards E. et al. 2002). Insgesamt erscheint jedoch die schädigende Komponente der Strahlentherapie auf die Endothelzellen zu überwiegen (Paris F. et al. 2001). Im Zusammenhang mit der Strahlenresistenz von Tumoren ist jedoch von größerer Bedeutung, dass die VEGF-abhängige Endothelzellproliferation und Angiogenese ebenfalls über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg vermittelt wird (Neufeld G. et al. 1999). Somit ist die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges für die strahleninduzierte Stressantwort und Strahlenresistenz in Tumoren von zentraler Bedeutung. Zum einen wird über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg in Tumorzellen die Expression der angiogenen Wachstumsfaktoren gesteuert, zum anderen ist die Wirkung dieser angiogenen Wachstumsfaktoren, wie v.a. VEGF, in den Endothelzellen zumindest zum Teil vom PI3K/Akt/mTOR-Signalweg abhängig.

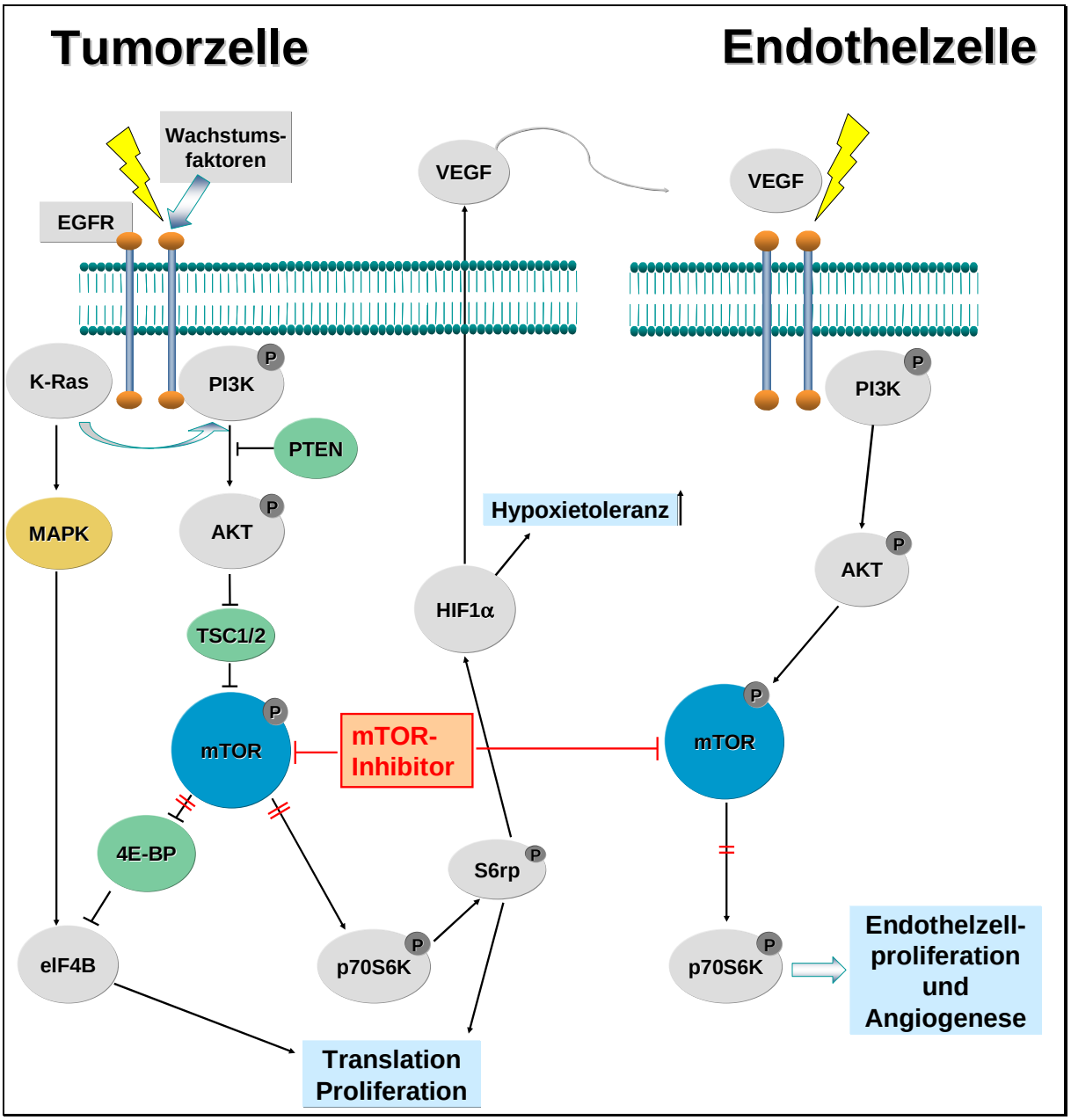

Abbildung 31: mTOR-Signalweg und MAPK-Signalweg, vereinfacht dargestellt.

mTOR wird von zwei Tumorsuppressorgenen (PTEN und TSC1/2) reguliert. Deletionen beider Tumorsuppressoren führen zur permanenten Aktivierung von mTOR. K-Ras-Mutationen führen zu einer verstärkten Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges und des MAPK-Signalweges, andererseits ist der mTOR-Signalweg mit dem MAPK-Signalweg über eIF4B gekoppelt. Die Aktivierung von eIF4B führt zur Translation ribosomaler Proteine und steuert die Proliferation von Zellen.

Wir stellten daher die Hypothese auf, dass durch die Kombination einer Strahlentherapie mit einer mTOR-Blockade die Mechanismen einer Strahlenresistenz unterdrückt werden können. Dadurch könnte eine verbesserte Effektivität gegenüber der alleinigen Strahlentherapie bzw. alleinigen mTOR-Inhibition auf die Hemmung

des Tumorwachstums erzielt werden. Wir nahmen an, dass hierbei insbesondere die anti-angiogenen und anti-vaskulären Eigenschaften der mTOR-Inhibition und Strahlentherapie zum Tragen kommen.

2.4 Einfluss von mTOR-Inhibition und Bestrahlung auf die Proliferation von Tumor- und Endothelzellen *in vitro*

Im WST-1 Proliferationsassay wurde der Einfluss einer einmaligen Bestrahlung und der mTOR-Inhibition auf die Proliferation von Tumorzellen des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl, des murinen Fibrosarkoms BFS-1 und des murinen Kolonkarzinoms CT-26 sowie auf die Proliferation von Endothelzellen (HUVECs) *in vitro* untersucht. Sowohl durch die Bestrahlung als auch durch die Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 und der Kombination aus beiden Therapieformen zeigten sich zellspezifische Effekte auf die Proliferation der Tumorzellen und Endothelzellen.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Pankreaskarzinomzellen L3.6pl *in vitro* resistent gegenüber der Bestrahlung sind. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die L3.6pl Zellen vermehrt den EGFR exprimieren, was über die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges eine Resistenz gegenüber der Bestrahlung begünstigen kann (Schmidt-Ullrich R. K. et al. 2003; Bruns C. J. et al. 2000; Bruns C. J. et al. 1999). Ferner führt eine Mutation innerhalb der Ras Onkoproteine (K-Ras, H-Ras, N-Ras) zur Aktivierung von Signalkaskaden distal des EGFR, wie z.B. dem PI3K/Akt-Signalweg sowie dem Mitogen Activated Protein (MAP)-Kinase Signalweg, woraus eine Strahlenresistenz der Tumorzellen resultieren kann (Kim I. A. et al. 2005; Kim I. A. et al. 2004). K-Ras Mutationen sind charakteristisch für das Pankreaskarzinom L3.6pl (Gysin S. et al. 2005). In gastrointestinalen Tumoren ist eine unterschiedliche Verteilung der Häufigkeiten von Mutation des K-Ras Onkogen beschrieben. Im Pankreaskarzinom ist dabei mit der höchsten Prävalenz an K-Ras-Mutationen mit 75-90% zu rechnen, während in Adenokarzinomen des Dünn- und Dickdarms eine Prävalenz von 30-40% gefunden werden kann (Arber N. et al. 2000; Hruban R. H. et al. 1993; Almoguera C. et al. 1988).

Die Tumorzellen des Fibrosarkoms BFS-1 zeigten nur im hohen getesteten Dosisbereich eine geringe Sensibilität gegenüber der Bestrahlung. Auch bei Fibrosarkomen ist die Aktivierung des EGFR-Signalweges bereits beschrieben worden (Fishman D. et al. 1997), was eine Resistenz gegenüber der Bestrahlung bedingen kann.

Im Vergleich zum Pankreaskarzinom und Fibrosarkom war bei den Tumorzellen des Kolonkarzinoms CT-26 eine deutliche Hemmung der Proliferation durch die einmalige Bestrahlung mit 2 Gy zu beobachten. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen anderer Studien, die eine Strahlenempfindlichkeit von Adenokarzinomen des Dickdarms beschreiben. Auch für das Kolonkarzinom CT-26 ist eine Expression des EGFR beschrieben worden, hingegen ist eine K-Ras-Mutation in dieser Tumorzelllinie nicht bekannt.

Die Applikation des mTOR-Inhibitors RAD001 führte zu einer tumorzellspezifischen Inhibition der Zellproliferation. Das humane Pankreaskarzinom L3.6pl sprach *in vitro* nicht auf die alleinige Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor an. Das murine Fibrosarkom BFS-1 zeigte eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber dem mTOR-Inhibitor im höheren Dosisbereich, wohingegen die Proliferation des Kolonkarzinoms CT-26 bereits durch niedrige Konzentrationen des mTOR-Inhibitors RAD001 gehemmt wurde. Unterschiedliche Empfindlichkeiten von Tumorzellen gegenüber der mTOR-Inhibition sind in der Literatur bereits beschrieben. Sie können auf unterschiedliche genetische Mutationen oder epigenetische Veränderungen innerhalb des mTOR-Signalweges zurückgeführt werden, beispielsweise hinsichtlich der Expression der p70S6-Kinase oder eIF4E. Sie konnten auch mit dem Muster von Tumorsuppressorgenen wie p53, und anderen in Verbindung gebracht werden (Huang S. und Houghton P. J. 2001). Es liegt nahe, dass die anti-proliferative Wirkung der mTOR-Inhibition in Tumorzellen abhängig von der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges ist (Dancey J. E. 2004). Obwohl der PI3K/Akt-Signalweg eine zentrale Bedeutung in der Tumorangiogenese spielt, konnte in ersten klinischen Untersuchungen eine therapeutische Wirkung des mTOR-Inhibitors nur gegenüber wenigen Tumoren nachgewiesen werden. Es bedarf daher molekularer Indikatoren, die das Ansprechen auf eine mTOR-Inhibition abschätzen lassen. Mutationen in PTEN und TSC1/2 Tumorsupressorgenen beeinflussen die Regulation der mTOR-Aktivierung erheblich. Sie könnten daher als Indikatoren für eine gesteigerte Empfindlichkeit eines Tumors gegenüber einer Behandlung mit mTOR-Inhibitoren

dienen. Erste Untersuchungen hierzu am Endometriumkarzinom bestätigten diese Vermutung (Abraham R. T. und Gibbons J. J. 2007).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Resistenz der L3.6pl Zellen gegenüber dem mTOR-Inhibitor auf Signalwegen oder Mutationen beruhen könnte, die entweder zu einer gegenüber dem mTOR-Inhibitor unempfindlichen Aktivierung des PI3K/Akt – Signalweges oder zu dessen vollständiger Umgehung führen. In Pankreaskarzinomen ist bereits in der frühen Tumorgenese die Mutation von K-Ras nachweisbar. K-Ras beeinflusst die Zellproliferation und Apoptose durch die Aktivierung mehrerer Signalkaskaden. K-Ras führt auch zur Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges, der in einer Regulation des Zellzyklus und der Zellproliferation sowie der Hemmung der Apoptose mündet. Daneben kann K-Ras auch den PI3K/Akt-Signalweg aktivieren (Downward J. 2003). Aufgrund der beobachteten Resistenz gegenüber der mTOR-Inhibition und der Bestrahlung ist daher zu vermuten, dass die Regulation von Proliferation und Apoptose des humanen Pankreaskarzinom L3.6pl v.a. vom MAP-Kinase Signalweg abhängig ist.
Das Fibrosarkom BFS-1 war lediglich im hohen getesteten Dosisbereich empfindlich gegenüber dem mTOR-Inhibitor RAD001. Fibrosarkomzellen scheinen zwar in ihrer Proliferation abhängig von der Aktivierung des EGFR-Signalweges zu sein (Fishman D. et al. 1997), der mTOR-Signalweg wurde jedoch im BFS-1 Fibrosarkom bislang nicht genauer untersucht. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die geringe Empfindlichkeit des Fibrosarkoms gegenüber der Bestrahlung und der mTOR-Inhibition auf einer tumorzellspezifischen Abhängigkeit des Fibrosarkoms von regulatorischen Einflüssen des PI3K/Akt-Signalweges gegenüber anderer alternativer Signalkaskaden wie dem MAP-Kinase-Signalweg zu beruhen scheint. Der Einfluss unterschiedlicher Signalkaskaden wie dem PI3K/Akt und dem MAPK-Signalweg wurden in der Tumorgenese von Sarkomen beschrieben (Helman L. J. und Meltzer P. 2003).
Die Tumorzellen des CT-26 Kolonkarzinoms zeigten im Vergleich zu den oben genannten Tumorzellen eine deutliche Empfindlichkeit sowohl gegenüber der Bestrahlung als auch gegenüber der mTOR-Inhibition *in vitro*. In der Tumorgenese von Adenokarzinomen des Kolons konnte eine gesteigerte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges und von Effektoren distal von mTOR festgestellt werden, die mit dem Entartungspotential der untersuchten Zelllinien assoziiert waren (Rychahou P. G. et al. 2006; Khaleghpour K. et al. 2004). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das

Wachstum und die Apoptose der CT-26 Zellen insbesondere vom PI3K/Akt-Signalweg abhängig sind, und somit die Empfindlichkeit dieser Zelllinie gegenüber dem mTOR-Inhibitor RAD001 erklärt werden kann.

Die Kombination der höchsten Dosis der Strahlentherapie (2 Gy) und der effektivsten Konzentration von RAD001 (10 ng/ml) führte zu einer Reduktion der Zellproliferation in allen untersuchten Tumorzelllinien. Die Effekte waren wiederum am deutlichsten im Kolonkarzinom CT-26 ausgeprägt. Diese Wirkungsverstärkung der einzelnen Therapieformen lässt sich durch die zuvor beschriebenen Mechanismen der Streßantwort der Tumorzellen auf die Bestrahlung erklären. Die durch Stressmechanismen induzierte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren aus Tumorzellen kann in parakrinen und autokrinen Mechanismen sowohl die Proliferation von benachbarten Zellen wie Endothelzellen, wie auch die der Tumorzellen selbst beeinflussen (Abdollahi A. et al. 2003; Gorski D. H. et al. 1999). Durch die mTOR-Inhibition vor einer Strahlentherapie kann diese Streßantwort tumorzellspezifisch unterdrückt werden.
Neben den Tumorzellen wurden die Effekte der Bestrahlung und der mTOR-Inhibition auch auf die Proliferation von Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene (HUVECs) *in vitro* untersucht. Die Proliferation der HUVECs wurde bereits durch die niedrigsten getesteten Dosen der Bestrahlung und die niedrigste Konzentration des mTOR-Inhibitors signifikant gehemmt. Durch die Kombination von Bestrahlung und mTOR-Inhibition konnte eine additive Wirkungsverstärkung erzielt werden. Interessanterweise war dabei der Zeitpunkt der Initiierung der Therapie mit RAD001 jedoch von großer Bedeutung: Im Vergleich zur Initiierung der mTOR-Inhibition 24 Stunden nach der Bestrahlung der Zellen war der anti-proliferative Effekt auf die HUVECs weitaus größer, wenn RAD001 vor der Bestrahlung appliziert wurde.
Im Gegensatz zu den Tumorzellen stellen Endothelzellen genetisch stabile Zellen dar. Der schädigende Einfluss ionisierender Strahlen auf die Endothelzellen und deren Bedeutung für die Tumorkontrolle wurde bereits diskutiert (Garcia-Barros M. et al. 2003; Paris F. et al. 2001). Andererseits konnte jedoch auch gezeigt werden, dass ionisierende Strahlung einen Proliferationsreiz in der Endothelzelle auslösen kann (Abdollahi A. et al. 2003). Die Bestrahlung stellt für die Endothelzellen wie für die Tumorzellen einen Stressreiz dar. In Untersuchungen zu unterschiedlichen exogenen und endogenen Stressreizen auf Zellen konnte dem mTOR-Signalweg eine bedeutende Rolle in der Regulation der Streßantwort zugeordnet werden (Reiling J.

H. und Sabatini D. M. 2006). Demzufolge kann u.a. durch Sauerstoffradikale, wie sie unter Bestrahlung entstehen, die Aktivierung des mTOR-Signalweges und der von ihm abhängigen Effektoren erfolgen. Aufgrund fehlender kompensatorischer Signalkaskaden in genetisch stabilen Endothelzellen lässt sich hierdurch die deutliche Wirkungsverstärkung der Strahlentherapie durch eine vorherige Blockade der mTOR-Signalkaskade erklären. Es konnte auch gezeigt werden, dass nach einem Stressreiz der mTOR-Signalweg über ca. sieben Stunden eine erhöhte Aktivität aufweist (Huang C. et al. 2002; Ding M. et al. 2002; Brenneisen P. et al. 2000; Parrott L. A. und Templeton D. J. 1999). Somit kann auch eine Blockade des mTOR-Signalweges noch nach einer Bestrahlung die zellprotektiven Effekte der Stressantwort beeinträchtigen, wie es an den *in vitro* Untersuchungen der HUVECs gezeigt werden konnte.

2.5 Beurteilung der Stressantwort der Tumorzellen auf die Bestrahlung alleine und unter mTOR-Blockade

Die Anwendung von ionisierender Strahlung in der Tumortherapie kann zur Aktivierung einer Stressantwort der Tumorzellen und der Entwicklung einer Strahlenresistenz führen. Als ein Signalweg dieser Stressantwort konnte der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg identifiziert werden (Gorski D. H. et al. 1999; Eng C. P. et al. 1984). Die Stressantwort der Tumorzellen hat eine Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Botenstoffen zur Folge, die auf parakrinem und autokrinem Weg die Tumorzellen sowie Zellen des umliegenden Gewebes vor einem Strahlenschaden schützen sollen. Insbesondere wird angenommen, dass es durch eine Bestrahlung der Tumorzellen über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg zu einer gesteigerten Freisetzung des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF kommt, der auf parakrinem Signalweg die Endothelzellen der Tumormikrozirkulation schützt und eine gesteigerte Endothelzellproliferation und Angiogenese induzieren kann.
Der Einfluss einer Bestrahlung auf die Freisetzung von VEGF aus den Tumorzellen wurde *in vitro* untersucht.

Die Ergebnisse der quantitativen VEGF-Bestimmung im Quantakine VEGF Kit (R&D-Systems) zeigten in allen Tumorzelllinien (L3.6pl. BFS-1, CT-26) eine von der

Bestrahlungsdosis abhängige Steigerung der VEGF-Sekretion. In der Höhe der VEGF-Sekretion konnten jedoch bedeutende Unterschiede zwischen dem humanen Pankreaskarzinom L3.6pl, dem murinen Fibrosarkom BFS-1 und dem murinen Kolonkarzinom CT-26 festgestellt werden. Die L3.6pl und BFS-1 Zellen produzierten als Antwort auf die Bestrahlung in etwa doppelt so viel VEGF wie die CT-26 Zellen. Durch die Gabe des mTOR-Inhibitors RAD001 vor der Bestrahlung konnte die VEGF-Sekretion der Tumorzellen unterdrückt werden. Interessanterweise stehen das Ausmaß der durch Bestrahlung induzierten VEGF-Sekretion und ihre Hemmung durch den mTOR-Inhibitor im umgekehrten Verhältnis zur Effektivität der Bestrahlung und mTOR-Inhibition auf die Proliferation der jeweiligen Tumorzellen. So zeigte das Pankreaskarzinom L3.6pl die höchste VEGF-Expression in Folge der Bestrahlung, die wiederum in dieser Zelllinie am effektivsten durch den mTOR-Inhibitor unterdrückt werden konnte. Wie zuvor diskutiert hatte die Bestrahlung und mTOR-Inhibition jedoch keinen relevanten Einfluss auf die Proliferation der L3.6pl Zellen *in vitro* ergeben. Im Falle der auf die Bestrahlung und mTOR-Inhibition empfindlichen Zellen des Kolonkarzinoms CT-26 konnte nur eine relativ geringe Steigerung der VEGF-Sekretion durch die Bestrahlung induziert werden. Auch hatte in dieser Zelllinie die Gabe des mTOR-Inhibitors einen geringeren Einfluss auf die VEGF-Sekretion.

Die *in vitro* Untersuchungen der VEGF-Sekretion lassen somit die folgenden Schlüsse zu: Durch eine Bestrahlung kann im Sinne einer Stressantwort die VEGF-Sekretion in Tumorzellen gesteigert werden. Je ausgeprägter diese Stressantwort, d.h. hier die VEGF-Sekretion ist, umso geringer ist die anti-proliferative Wirkung der Bestrahlung auf die jeweilige Tumorzelllinie. Diese Stressantwort wird über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg vermittelt und kann durch die Blockade von mTOR unterdrückt werden.

VEGF ist einer der potentesten angiogenen Wachstumsfaktoren, der entscheidend die Tumorangiogenese reguliert. Seine vermehrte Freisetzung im Rahmen einer Bestrahlung kann durch einen protektiven Einfluss auf die Tumormikrozirkulation und eine Stimulation der Tumorangiogenese die Effektivität der Strahlentherapie beeinträchtigen (Abdollahi A. et al. 2003). Durch die Kombination der Strahlentherapie mit einem mTOR-Inhibitor zur Unterdrückung der strahleninduzierten Stressantwort in den Tumorzellen könnte daher v.a. über

verstärkte anti-angiogene und anti-vaskuläre Effekte eine gesteigerte therapeutische Wirksamkeit erzielt werden.

2.6 Anti-angiogene Wirksamkeit von Bestrahlung und mTOR-Inhibition

Die Auswirkungen der mTOR-Inhibition und der Strahlentherapie auf die Angiogenese wurden *in vitro* im Spheroidassay validiert. Sowohl durch die Strahlentherapie als auch durch die mTOR-Inhibition zeigte sich eine deutliche Inhibition des Sproutings der in Spheroiden zusammengelagerten Endothelzellen (HUVECs). Die alleinige Behandlung mit einer hohen Konzentration des mTOR-Inhibitors RAD001 (10 ng/ml) hatte den größten inhibierenden Effekt auf die Ausbildung von Sprouts aus den Endothelzellspheroiden. Eine zusätzliche Bestrahlung zeigte hier keine weitere Wirkung.
Die Kombination von mTOR-Inhibition und Bestrahlung führte jedoch im niedrigen Dosisbereich zu einer verstärkten Reduktion der Sprossenbildung, so dass sich hieraus additive anti-angiogene Effekte der beiden Therapieformen ableiten lassen. Die Ergebnisse des Spheroidassays bestätigen die Beobachtungen einer hohen Empfindlichkeit der HUVECs gegenüber der mTOR-Blockade und der Bestrahlung im Proliferationsassay (vgl. IV.2.4). Durch den Speroidassay konnte darüber hinaus die funktionelle anti-angiogene Wirksamkeit der mTOR-Inhibition und der Strahlentherapie *in vitro* nachgewiesen werden.

2.7 Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges unter Bestrahlung – Signalweg der strahleninduzierten Stressantwort in Tumorzellen und Endothelzellen

2.7.1 Immunzytochemische Untersuchungen der Tumor- und Endothelzellen

Der Einfluss der Bestrahlung und der Gabe des mTOR-Inhibitors RAD001 auf die Aktivierung des PI3k/Akt/mTOR-Signalweges wurde immuncytochemisch *in vitro* an kultivierten Tumor- und Endothelzellen untersucht. Als Marker der Aktivierung des Signalweges wurde das ribosomale S6 Protein herangezogen. Das ribosomale S6 Protein (S6rp) wird bei Aktivierung des mTOR-Signalweges über die p70S6-Kinase

phosphoryliert. Somit ist das S6rp kein direkter Effektor von mTOR. Dennoch hat sich die Bestimmung des Phosyphorylierungsstatus des S6rp als ein indirekter Parameter der mTOR-Aktivierung in klinischen und experimentellen Studien etabliert (El Salem M. et al. 2007; Majumder P. K. et al. 2004; Thomas G. V. et al. 2004). Die Beurteilung der mTOR-Aktivität anhand der Phosphorylierung der p70S6-Kinase hat sich in der Immuncytochemie bzw. Immunhistochemie aufgrund möglicher Kreuzrekationen der hierzu verwendeten Antikörper mit der strukturell ähnlichen p90S6-Kinase als unvorteilhaft erwiesen (El Salem M. et al. 2007).

Der mTOR-Signalweg mit seinen Effektoren S6rp und eIF4B wird unter dem Einfluß von Wachstumsfaktoren, aber auch von Nährstoffen wie Glucose und Aminosäuren aktiviert. Um den alleinigen Einfluss einer Bestrahlung auf die mTOR abhängige Signalkaskade beurteilen zu können wurden die jeweiligen Tumorzellen und Endothelzellen über 16 Stunden in serumfreiem und wachstumsfaktorfreiem Kulturmedium gehungert. Wie zu erwarten, war nach dieser Periode unter Mangelbedingungen der mTOR-Signalweg inaktiviert, was anhand der fehlenden Phosphorylierung des S6rp gezeigt werden konnte.

Die Bestrahlung sowie die Gabe der Wachstumsfaktoren IGF (Insulin like growth factor) und VEGF bewirkten in Tumorzellen und Endothelzellen eine nachweisbare Phosphorylierung des S6rp, was für eine Aktivierung des mTOR-Signalweges spricht. Die Effekte der Bestrahlung und der Wachstumsfaktoren auf die Phosphorylierung des S6rp wurden durch den mTOR-Inhibitor RAD001 vollständig inhibiert. Somit konnte durch diese Untersuchungen nachgewiesen werden, dass es durch die Bestrahlung zur Aktivierung mTOR-abhängiger Effektoren kommt, die einen entscheidenden Einfluss auf den Zellzyklus und die Zellproliferation besitzen.

Die Zugabe von Serum (FBS) zu den zuvor gehungerten Zellen führte ebenso zu einer Phosphorylierung des S6rp. Der mTOR-Inhibitor RAD001 beeinflusste die durch Serum induzierten Effekte in zellspezifischer Weise: In HUVECs und Tumorzellen des CT-26 Kolonkarzinoms konnte durch RAD001 die Phosphorylierung des S6rp unterdrückt werden. In den Tumorzellen des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl und des Fibrosarkoms BFS-1 konnte jedoch durch die Blockade von mTOR die Phosphorylierung des S6rp durch Serumstimulation nicht vollständig verhindert werden.

Das in der Zellkultur verwendete Serum (FBS) ist in seiner genauen qualitativen Zusammensetzung bis heute nicht genau definiert. Es ist davon auszugehen, dass

es eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen enthält, die womöglich über einen alternativen Signalweg zur Aktivierung und Phosphorylierung des S6rp geführt haben. Vermutlich ist hier wiederum der MAP-Kinase-Signalweg von Bedeutung. *In vitro* Untersuchungen wiesen in der Zelllinie eines humanen Cervixkarzinoms eine Konvergenz des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges und des MAPK-Signalweges nach. Die gegenseitige Überlappung der beiden Signalwege wurde distal von mTOR in einer Phosphorylierung des eukaryoten Translationsinitiationsfaktors 4B (eIF4B) identifiziert (Shahbazian D. et al. 2006). Ein Bezug zum S6rp konnte in dieser Studie nicht beschrieben werden. Jedoch ist in einer weiteren Studie auch eine MAPK-abhängige Aktivierung der p70S6K und damit einer konsekutiven Phosphorylierung des S6rp beschrieben worden. Die Bedeutung dieser Überlappung für die Zellproliferation konnte in dieser Studie noch nicht genau definiert werden (Pende M. et al. 2004).

In Zusammenschau der zuvor diskutierten *in vitro* Ergebnisse dieser Studie bestätigen die Ergebnisse der Immuncytochemie die bisherigen Schlussfolgerungen: Die Bestrahlung von Tumorzellen und HUVECs bewirkt im Sinne einer Stressantwort eine Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges. Die gegenüber einer Bestrahlung und mTOR-Blockade in ihrer Proliferation unempfindlichen Tumorzellen des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl und des Fibrosarkoms BFS-1 verfügen über alternative Signalkaskaden, die eine Regulation und Stimulation der Zellproliferation und Translation unabhängig von mTOR ermöglichen. Unter Berücksichtigung von in der Literatur beschriebenen Studien ist über den MAPK-Signalweg eine Umgehung der mTOR-abhängigen Tumorzellproliferation am wahrscheinlichsten.

2.8 Experimente *in vivo*

Die Ausgangsfrage dieser Studie war, ob durch die kombinierte Anwendung einer mTOR-Inhibition und der Strahlentherapie eine im Vergleich zu den Einzeltherapien verbesserte Kontrolle über das Wachstum solider Tumoren *in vivo* erzielt werden kann. Die bereits aus den *in vitro* Untersuchungen bekannten Tumorzellen des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl wurden orthotop in das Pankreas von Nacktmäusen implantiert. Die murinen Tumorzellen des Kolonkarzinoms CT-26 und

des Fibrosarkoms BFS-1 wurden hingegen zur Tumorinduktion subkutan in syngene Mäuse implantiert. An den so induzierten soliden Tumoren wurde in unterschiedlichen therapeutischen Sequenzen die Kombination von mTOR-Inhibition mit einer fraktionierten Strahlentherapie untersucht. Zusätzlich wurde die Strahlendosis variiert, um eine mögliche Auswirkung der mTOR-Inhibition auf die Effektivität der Strahlentherapie aufdecken zu können.

In den subkutanen Tumormodellen des Kolonkarzinoms CT-26 und des Fibrosakroms BFS-1 konnte durch die Kombination einer Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 und einer fraktionierten Bestrahlung im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie eine verbesserte Tumorkontrolle erzielt werden. Tendenziell war dabei eine weiter verbesserte therapeutische Wirksamkeit zu beobachten, wenn mit der Behandlung des mTOR-Inhibitors zwei Tage vor Beginn der Strahlentherapie begonnen wurde. Im Kolonkarzinom CT-26 konnte das Tumorwachstum durch eine alleinige Steigerung der Strahlendosen (5 x 4 Gy) unterdrückt werden. Die zusätzliche Gabe des mTOR-Inhibitors RAD001 hatte unter diesen Bedingungen keinen weiteren Effekt auf die Tumorkontrolle. Die am Kolonkarzinom und Fibrosarkom *in vivo* gemachten Beobachtungen zeigen eine gute Übereinstimmung mit zuvor *in vitro* gewonnen Erkenntnissen zur Empfindlichkeit dieser Tumoren auf die mTOR-Inhibition und die Bestrahlung. Im Falle des Fibrosarkoms BFS-1 erscheint jedoch der *in vivo* erzielte therapeutische Effekt der Kombinationstherapie ausgeprägter zu sein, als er zunächst anhand der *in vitro* Studien vermutet wurde.

Im Gegensatz zu den *in vitro* Untersuchungen konnte das Tumorwachstum des humanen Pankreaskarzinom L3.6pl *in vivo* sowohl durch die Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 als auch durch eine fraktionierte Bestrahlung verzögert werden. Insbesondere konnte durch die Kombination der mTOR-Inhibiton vor Einleitung der fraktionierten Strahlentherapie mit 5 x 2 Gy bzw. 5 x 4 Gy eine signifikant verbesserte Tumorkontrolle erreicht werden. Im ortothopen Modell des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl konnte zudem eine dosismodifizierende Wirkung des mTOR-Inhibitors RAD001 auf die fraktionierte Strahlentherapie gezeigt werden: Durch die Applikation des mTOR-Inhibitors RAD001 vor Beginn der fraktionierten Strahlentherapie mit 5 x 2 Gy wurde der gleiche therapeutische Effekt auf das Tumorwachstum erzielt wie durch die alleinige Behandlung der Tumoren mit einer fraktionierten Strahlentherapie von 5 x 4 Gy.

Die *in vivo* besonders am Pankreaskarzinom und Fibrosarkom beobachtete verbesserte therapeutische Wirksamkeit der Kombination von mTOR-Inhibition und fraktionierter Strahlentherapie kann unter Berücksichtigung der an diesen Tumorzelllinien durchgeführten *in vitro* Untersuchungen nicht auf einen alleine gegen die Tumorzellen gerichteten Effekt zurückgeführt werden.

In den *in vitro* Untersuchungen hatte sich im Vergleich zur fehlenden bzw. nur geringen Empfindlichkeit der Tumorzellen des humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl und des Fibrosarkoms BFS-1 eine sehr hohe Empfindlichkeit der HUVECs gegenüber einer mTOR-Inhibition und Bestrahlung ergeben. Es ist daher anzunehmen, dass auch *in vivo* ein wesentlicher therapeutischer Effekt der Kombinationstherapie von mTOR-Inhibition und Strahlentherapie durch eine verstärkt gegen die Endothelzellen gerichtete Wirksamkeit zu erklären ist. Die anti-vaskuläre Wirksamkeit der Strahlentherapie ist gut dokumentiert (Garcia-Barros M. et al. 2003). Ebenso konnte in mehreren unabhängigen Studien gezeigt werden, dass Endothelzellen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber der mTOR-Inhibiton besitzen und *in vivo* anti-angiogene Effekte in Tumoren zu erzielen sind (Frost P. et al. 2007; Klos K. S. et al. 2006; Guba M. et al. 2002). In den proliferierenden Endothelzellen der Tumormikrozirkulation konnte zudem eine gesteigerte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges nachgewiesen werden, die eine besondere Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber einer mTOR-Blockade erklärt (Phung T. L. et al. 2006).

Mit Hilfe der Immunhistochemie konnte auch in den Tumoren dieser Studie eine Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges nachgewiesen werden. Die Immunhistochemie zeigt eine Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins (S6rp) in allen Tumoren der Kontrollgruppe sowie in allen Tumoren, die als alleinige Therapie eine Bestrahlung erhielten. Durch die Therapie mit RAD001 konnte sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie mit der fraktionierten Bestrahlung eine Inaktivierung des Signalweges beobachtet werden. Es bestätigte sich damit, dass der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg in allen untersuchten Tumoren aktiviert war, und die Applikation des mTOR-Inhibitors *in vivo* zu einer Inhibition des Signalweges führte.

Die anti-angiogene Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus mTOR-Inhibition und Strahlentherapie wurde in der vorliegenden Studie immunhistochemisch anhand der Expression des Oberflächenmarkers CD31/PECAM-1 der Endothelzellen an Kryoschnitten der Tumoren beurteilt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die

Behandlung der Tumoren sowohl mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 als auch mit einer fraktionierten Strahlentherapie eine Abnahme der Gefäßdichte in den Tumoren bewirkte. Für die Kombinationstherapie konnte eine darüber hinaus reichende weitere Abnahme der Tumorgefäße festgestellt werden.

Somit konnte in den *in vivo* Untersuchungen nachgewiesen werden, dass durch die Kombination von mTOR-Inhibition und fraktionierter Strahlentherapie eine signifikant verbesserte Tumorkontrolle v.a. durch anti-angiogene und anti-vaskuläre Effekte erzielt werden kann. Diese Effekte waren am humanen Pankreaskarzinom L3.6pl besonders deutlich. Hier konnte durch den mTOR-Inhibitor RAD001 eine dosismodifizierende Wirkung auf die Strahlentherapie erzielt werden. Wurde der mTOR-Inhibitor hingegen erst nach Abschluss der Strahlentherapie verabreicht, fielen die anti-proliferativen Effekte geringer aus. Entsprechend dem von Jain postulierten Modell können diese Beobachtungen auf einen möglichen Normalisierungseffekt der anti-angiogenen Therapie zurückgeführt werden (Jain R. K. 2001). Die Empfindlichkeit eines Tumors gegenüber einer Strahlentherapie wird durch die Tumorperfusion und Tumoroxygenierung beeinflusst (Vaupel P. 2004). Wie bereits zuvor ausführlich dargestellt, kann es unter einer anti-angiogen wirksamen Therapie zu einer Verbesserung der Tumorperfusion und Tumoroxygenierung kommen, und dadurch die Empfindlichkeit eines Tumors gegenüber Strahlentherapie und Chemotherapie gesteigert werden (Jain R. K. 2001).
Ebenso sind eine Beeinträchtigung der Tumorrepopularisierung und eine Beeinträchtigung der Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen durch den mTOR-Inhibitor denkbar, die zu einer gesteigerten Empfindlichkeit der Tumoren gegenüber der Strahlentherapie führen können. Anhand des in dieser Studie verwendeten Modells eines einmaligen Bestrahlungszyklus können jedoch keine Aussagen über mögliche Effekte einer Tumorrepopularisierung auf die Therapie getroffen werden. Auch ist der Einfluss endothelialer Vorläuferzellen auf den Therapieerfolg in diesem Modell nicht definitiv abzuschätzen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die anti-angiogene Therapie hemmt die Bildung von Blutgefäßen in Tumoren und stellt in Kombination mit der Chemo- und Strahlentherapie eine wirkungsvolle Therapieoption in der Behandlung maligner Tumoren dar.

Anti-angiogen wirksame Substanzen können sich entweder gegen spezifische Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren oder gegen intrazelluläre Signalkaskaden in Tumorzellen und Endothelzellen richten.

Ein Erklärungsansatz, durch den eine anti-angiogene Therapie die Wirksamkeit von Chemotherapie und Strahlentherapie verstärken kann, stellt die Normalisierung des Tumorgefäßsystems („Normalisierungseffekt“, „normalizing effect“) dar: Durch die Hemmung des ungeordneten Gefäßwachstums gleicht sich das Tumorgefäßsystem in seinen physiologischen Eigenschaften dem „normalen“ Gefäßsystem differenzierter Organe an. Daraus resultiert eine verbesserte Perfusion und Oxygenierung des Tumors (Jain R. K. 2001). Chemotherapeutika können so leichter an ihren Wirkort gelangen und es kann eine erhöhte Strahlensensibilität beobachtet werden (Lee C. G. et al. 2000).

Einen viel versprechenden neuen Angriffspunkt der anti-angiogenen Therapie stellt die Inhibition des mammalian Target of Rapamycin (mTOR) dar. mTOR nimmt eine zentrale Stellung in der Regulation der Zellproliferation ein und wird dabei über die Tumorsuppressoren PTEN und TSC1/2 negativ reguliert (Guertin D. A. und Sabatini D. M. 2007). Seine Aktivierung erfolgt über den PI3K/Akt-Signalweg unter dem Einfluss unterschiedlicher exogener Reize wie Wachstumsfaktoren und Nährstoffen (Aminosäuren, Glucose). Die exakte Regulation des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges ist jedoch noch nicht vollständig erschlossen.

Von besonderer Bedeutung ist jedoch, dass der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg durch ionisierende Strahlung aktiviert und durch ihn Strahlenresistenz von Tumoren vermittelt werden kann (Schmidt-Ullrich R. K. et al. 2003; Contessa J. N. et al. 2002). Dabei üben die Tumorzellen über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, insbesondere des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF, auf autokrinem und parakrinem Weg einen protektiven Effekt auf die Tumorzellen und das Tumorgefäßsystem aus.

Zielsetzung der vorliegenden Studie war es, die Wirkung der Kombinationstherapie aus mTOR-Inhibition und Strahlentherapie auf Tumorzellen und Endothelzellen *in vitro* und das Tumorwachstum *in vivo* zu untersuchen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch die Gabe eines mTOR-Inhibitors in Kombination mit der Strahlentherapie eine mögliche Strahlenresistenz von Tumoren überwunden werden könnte und so der therapeutische Effekt im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie gesteigert werden kann. Aufgrund des bekannten anti-angiogenen Potentials der mTOR-Inhibition und durch Unterbrechung der Stressantwort in Tumorzellen wurde angenommen, dass durch eine Kombinationstherapie v.a. die anti-angiogenen Effekte verstärkt werden könnten.

In den *in vitro* Untersuchungen wurden zellspezifische Effekte der mTOR-Inhibition und Bestrahlung auf HUVECs und die Tumorzellen nachgewiesen. Im Proliferationsassay zeigte sich, dass das humane Pankreaskarzinom L3.6pl *in vitro* sowohl gegenüber der mTOR-Inhibition als auch gegenüber der Strahlentherapie resistent ist. Die höchste Empfindlichkeit gegenüber beiden Therapieformen wiesen die HUVECs auf. Eine additive Wirkungsverstärkung beider Therapieformen konnte hier bereits im niedrig getesteten Dosisbereich erzielt werden.
Im Spheroidassay der HUVECs konnte wiederum bereits durch die Kombination der niedrigsten getesteten Dosis des mTOR-Inhibitors RAD001 und der Bestrahlung eine additive Wirkungsverstärkung auf das Sprossen der Endothelzellen gezeigt und damit die anti-angiogene Wirksamkeit *in vitro* nachgewiesen werden. Die im Sinne einer Stressantwort durch die Bestrahlung in Tumorzellen induzierte VEGF-Sekretion war in allen Tumorzelllinien nachweisbar, jedoch im humanen Pankreaskarzinom L3.6pl am ausgeprägtesten. Sie konnte effektiv durch den mTOR-Inhibitor RAD001 unterdrückt werden.
Anhand des Phosphorylierungsstatus des ribosomalen S6 Proteins (S6rp) konnte schließlich die Aktivierung des mTOR-Signalweges durch die Bestrahlung in allen untersuchten Tumorzelllinien und den HUVECs gezeigt werden. Die strahlenabhängige Aktivierung des mTOR-Signalweges wurde durch den mTOR-Inhibitor RAD001 unterbunden.

Die Kombinationstherapie mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 und einer fraktionierten Bestrahlung mit 5 x 2 Gy bzw. 5 x 4 Gy führte *in vivo* zu einer weiteren signifikanten Verbesserung des therapeutischen Effektes im Vergleich zur jeweiligen

Monotherapie. Im humanen Pankreaskarzinom L3.6pl konnte darüber hinaus eine dosismodifizierende Wirkung des mTOR-Inhibitors RAD001 auf die Strahlentherapie gezeigt werden.
Zusätzlich konnte in den mit dem mTOR-Inhibitor behandelten Tumoren im Vergleich zu den unbehandelten Tumoren eine deutlich verminderte Mikrogefäßdichte nachgewiesen werden.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen erlaubt Rückschlüsse über den Wirkungsmechanismus der Kombinationstherapie von mTOR-Inhibition und Bestrahlung. Grundlegend ist festzustellen, dass eine für die jeweilige Tumorzelllinie spezifische Empfindlichkeit gegenüber der mTOR-Inhibition und der Bestrahlung besteht. In Übereinstimmung mit anderen Studien konnte auch eine besonders hohe Empfindlichkeit der HUVECs gegenüber der jeweiligen Therapie gezeigt werden (Dormond O. et al. 2007; Garcia-Barros M. et al. 2003). Auffallend ist, dass die Tumorzellen des humanen Pankreaskarzinom L3.6pl *in vitro* resistent gegenüber beiden Therapien waren. Eine strahlenabhängige VEGF-Sekretion dieser Tumorzellen konnte dennoch durch den mTOR-Inhibitor RAD001 unterdrückt werden. Aufgrund dieser Beobachtungen kann die verbesserte Kontrolle des Tumorwachstums *in vivo*, insbesondere des orthotop implantierten humanen Pankreaskarzinoms L3.6pl, nicht alleine auf anti-proliferative Effekte auf die Tumorzellen zurückgeführt werden.

Die antitumorale Wirksamkeit der Kombinationstherapie aus dem mTOR-Inhibitor RAD001 und fraktionierter Bestrahlung *in vivo* kann anhand der beschriebenen Ergebnisse zusammenfassend erklärt werden:
Zunächst wird durch den mTOR-Inhibitor die VEGF-abhängige Proliferation der Endothelzellen der Tumormikrozirkulation gehemmt. Dadurch wird ein anti-angiogener Effekt in den Tumoren erzielt (Guba M. et al. 2002). Aufgrund ihrer unter dem kontinuierlichen Einfluss von angiogenen Wachstumsfaktoren gesteigerten Proliferationsrate und einer nachgewiesenen erhöhten Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges sind die ansonsten genetisch stabilen Endothelzellen der Tumormikrozirkulation besonders empfindlich gegenüber einer mTOR-Inhibition (Phung T. L. et al. 2006). Durch die Bestrahlung werden die Endothelzellen der Tumormikrozirkulation direkt geschädigt. Dadurch wird ein direkter anti-vaskulärer

Effekt im Tumor erzielt, der wesentlich zur Wirksamkeit der Bestrahlung beiträgt (Garcia-Barros M. et al. 2003).

Auf der Seite der Tumorzellen wird durch den mTOR-Inhibitor eine durch die Bestrahlung induzierte Stressantwort blockiert. Hierdurch wird eine unter Bestrahlung beobachtete vermehrte VEGF-Sekretion der Tumorzellen unterdrückt, über die der Tumor einen protektiven Effekt auf seine Gefäßversorgung ausüben kann. Es ist zudem bekannt, dass durch die strahlenabhängige Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber der Bestrahlung vermittelt wird, und über autokrine und parakrine Mechanismen die Repopulation eines Tumors begünstigt wird (Schmidt-Ullrich R. K. et al. 2003). Die Blockade dieser Resistenzmechanismen in den Tumorzellen durch den mTOR-Inhibitor kann zur Steigerung der Effektivität der Bestrahlung beitragen.

Schließlich kann durch eine anti-angiogene Therapie eine weitere Verbesserung der Strahlentherapie erzielt werden. Nach dem Modell des „Normalisierungseffektes“ wird durch die anti-angiogene Therapie eine Verbesserung der Tumorperfusion und Tumoroxygenierung erzielt. Eine ausreichende Oxygenierung des Tumors ist eine Vorraussetzung für die direkt gegen die Tumorzellen gerichtete Wirksamkeit der Bestrahlung. Die Normalisierungseffekte der anti-angiogenen Therapie sind jedoch vermutlich auf die Frühphase der Therapie beschränkt, bevor es zum vollständigen Untergang der Tumorgefäßversorgung und damit zur erneuten Verschlechterung der Tumorperfusion und Tumoroxygenierung kommt (Jain R. K. 2005; Jain R. K. 2001).

VI. SCHLUSSFOLGERUNG

In dieser Studie konnte durch die Kombination des mTOR-Inhibitors RAD001 und einer fraktionierten Strahlentherapie im Vergleich zu den Einzeltherapien eine signifikante Verbesserung der Kontrolle des Tumorwachstums erzielt werden. Diese therapeutischen Erfolge können auf anti-angiogene und anti-vaskuläre Mechanismen zurückgeführt werden. Die gegen das Tumorgefäßsystem gerichteten Effekte können darüber hinaus die Wirksamkeit der Strahlentherapie gegenüber den eigentlichen Tumorzellen steigern und Mechanismen der Resistenzentwicklung unterdrücken. Es bestehen tumorspezifische Unterschiede im Ansprechen auf die Therapie mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 und der Bestrahlung. Als spezifische Marker, die ein Ansprechen auf diese Therapie abschätzen lassen, könnten Regulatoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges, wie z.B. PTEN und TSC1/2, verwendet werden. Derartige Marker wurden im Rahmen dieser Studie jedoch nicht untersucht.

Die Studie besitzt besondere klinische Relevanz. Die Strahlentherapie stellt neben der Chirurgie ein therapeutisches Verfahren zur lokalen Kontrolle des Tumorwachstums bzw. der Vorbeugung eines Tumorrezidives dar. Die Entwicklung von Strahlenresistenzen der Tumoren sowie die Limitierung des Verfahrens aufgrund seiner Nebenwirkungen am benachbarten gesunden Gewebe haben die Suche nach Substanzen, die die Strahlenempfindlichkeit der Zielzellen steigern, angeregt. Die Anwendung von mTOR-Inhibitoren hat, entgegen der großen Erwartungen in diese Substanzgruppe, bisher nur im Nierenzellkarzinom, Endometriumkarzinom und Mantelzellymphom therapeutische Erfolge gezeigt (Easton J. B. und Houghton P. J. 2006; Faivre S. et al. 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern nun viel versprechende Daten dazu, dass eine Kombination von mTOR-Inhibiton und Strahlentherapie eine effektive therapeutische Option besonders im lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinom darstellen könnte.

LITERATURVERZEICHNIS

Abdollahi A., Lipson K. E., Han X., Krempien R., Trinh T., Weber K. J., Hahnfeldt P., Hlatky L., Debus J., Howlett A. R., and Huber P. E. (2003).
SU5416 and SU6668 attenuate the angiogenic effects of radiation-induced tumor cell growth factor production and amplify the direct anti-endothelial action of radiation *in vitro*. Cancer Res. 63:3755-3763.

Abraham R. T. and Gibbons J. J. (2007).
The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twists and turns in the road to cancer therapy. Clin. Cancer Res. 13:3109-3114.

Almoguera C., Shibata D., Forrester K., Martin J., Arnheim N., and Perucho M. (1988).
Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. Cell. %20;53:549-554.

Arber N., Shapira I., Ratan J., Stern B., Hibshoosh H., Moshkowitz M., Gammon M., Fabian I., and Halpern Z. (2000).
Activation of c-K-ras mutations in human gastrointestinal tumors. Gastroenterology. 118:1045-1050.

Asahara T., Takahashi T., Masuda H., Kalka C., Chen D., Iwaguro H., Inai Y., Silver M., and Isner J. M. (1999).
VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. EMBO J 18:3964-3972.

Baish J. W. and Jain R. K. (2000).
Fractals and cancer. Cancer Res. 60:3683-3688.

Bergers G. and Benjamin L. E. (2003).
Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat. Rev. Cancer. 3:401-410.

Bertolini F., Paul S., Mancuso P., Monestiroli S., Gobbi A., Shaked Y., and Kerbel R. S. (2003).
Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. Cancer Res. 63:4342-4346.

Bilton R. L. and Booker G. W. (2003).
The subtle side to hypoxia inducible factor (HIFalpha) regulation. Eur. J. Biochem. 270:791-798.

Boucher Y., Leunig M., and Jain R. K. (1996).
Tumor angiogenesis and interstitial hypertension. Cancer Res. 56:4264-4266.

Brenneisen P., Wenk J., Wlaschek M., Krieg T., and Scharffetter-Kochanek K. (2000).
Activation of p70 ribosomal protein S6 kinase is an essential step in the DNA damage-dependent signaling pathway responsible for the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts. J. Biol. Chem. 275:4336-4344.

Brignol N., McMahon L. M., Luo S., and Tse F. L. (2001).
High-throughput semi-automated 96-well liquid/liquid extraction and liquid chromatography/mass spectrometric analysis of everolimus (RAD 001) and cyclosporin a (CsA) in whole blood. Rapid Commun. Mass Spectrom. 15:898-907.

Browder T., Butterfield C. E., Kraling B. M., Shi B., Marshall B., O'Reilly M. S., and Folkman J. (2000).
Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. Cancer Res. 60:1878-1886.

Bruns C. J., Harbison M. T., Davis D. W., Portera C. A., Tsan R., McConkey D. J., Evans D. B., Abbruzzese J. L., Hicklin D. J., and Radinsky R. (2000).
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. Cancer Res. 6:1936-1948.

Bruns C. J., Harbison M. T., Kuniyasu H., Eue I., and Fidler I. J. (1999).
In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. Neoplasia. 1:50-62.

Bruns C. J., Koehl G. E., Guba M., Yezhelyev M., Steinbauer M., Seeliger H., Schwend A., Hoehn A., Jauch K. W., and Geissler E. K. (2004).
Rapamycin-induced endothelial cell death and tumor vessel thrombosis potentiate cytotoxic therapy against pancreatic cancer. Clin. Cancer Res. 10:2109-2119.

Butzal M., Loges S., Schweizer M., Fischer U., Gehling U. M., Hossfeld D. K., and Fiedler W. (2004).
Rapamycin inhibits proliferation and differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. Exp. Cell Res. 300:65-71.

Camphausen K. and Menard C. (2002).
Angiogenesis inhibitors and radiotherapy of primary tumours. Expert. Opin. Biol. Ther. 2:477-481.

Camphausen K. and Tofilon P. J. (2004).
Combining radiation and molecular targeting in cancer therapy. Cancer Biol. Ther. 3:247-250.

Cantley L. C. and Neel B. G. (1999).
New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:4240-4245.

Carmeliet P. (2003).
Angiogenesis in health and disease. Nat. Med. 9:653-660.

Carmeliet P. and Jain R. K. (2000).
Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 407:249-257.

Cengel K. A., Voong K. R., Chandrasekaran S., Maggiorella L., Brunner T. B., Stanbridge E., Kao G. D., McKenna W. G., and Bernhard E. J. (2007).
Oncogenic K-Ras signals through epidermal growth factor receptor and wild-type H-Ras to promote radiation survival in pancreatic and colorectal carcinoma cells. Neoplasia. 9:341-348.

Chakravarti A., Chakladar A., Delaney M. A., Latham D. E., and Loeffler J. S. (2002).
The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. Cancer Res. 62:4307-4315.

Chan S., Scheulen M. E., Johnston S., Mross K., Cardoso F., Dittrich C., Eiermann W., Hess D., Morant R., Semiglazov V., Borner M., Salzberg M., Ostapenko V., Illiger H. J., Behringer D., Bardy-Bouxin N., Boni J., Kong S., Cincotta M., and Moore L. (2005).
Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. J. Clin. Oncol. 23:5314-5322.

Chang S. M., Wen P., Cloughesy T., Greenberg H., Schiff D., Conrad C., Fink K., Robins H. I., De Angelis L., Raizer J., Hess K., Aldape K., Lamborn K. R., Kuhn J., Dancey J., and Prados M. D. (2005).
Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. Invest New Drugs. 23:357-361.

Citron M. L. (2004).
Dose density in adjuvant chemotherapy for breast cancer. Cancer Invest. 22:555-568.

Clark R. A., Lanigan J. M., DellaPelle P., Manseau E., Dvorak H. F., and Colvin R. B. (1982).
Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. J. Invest Dermatol. 79:264-269.

Clauss M., Gerlach M., Gerlach H., Brett J., Wang F., Familletti P. C., Pan Y. C., Olander J. V., Connolly D. T., and Stern D. (1990).
Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. J Exp Med 172:1535-1545.

Colevas A. D., Brown J. M., Hahn S., Mitchell J., Camphausen K., and Coleman C. N. (2003).
Development of investigational radiation modifiers. J. Natl. Cancer Inst. 95:646-651.

Contessa J. N., Hampton J., Lammering G., Mikkelsen R. B., Dent P., Valerie K., and Schmidt-Ullrich R. K. (2002).
Ionizing radiation activates Erb-B receptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. Oncogene 21:4032-4041.

D'Amore P. A. and Thompson R. W. (1987).
Mechanisms of angiogenesis. Annu. Rev. Physiol. 49:453-64.:453-464.

Dancey J. E. (2004).
Molecular targeting: PI3 kinase pathway. Ann. Oncol. 15 Suppl 4:iv233-9.:iv233-iv239.

Denekamp J. (1993).
Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. Br. J. Radiol. 66:181-196.

Ding M., Li J., Leonard S. S., Shi X., Costa M., Castranova V., Vallyathan V., and Huang C. (2002).
Differential role of hydrogen peroxide in UV-induced signal transduction. Mol. Cell Biochem. 234-235:81-90.

Dinney C. P., Fishbeck R., Singh R. K., Eve B., Pathak S., Brown N., Xie B., Fan D., Bucana C. D., Fidler I. J., and . (1995).
Isolation and characterization of metastatic variants from human transitional cell carcinoma passaged by orthotopic implantation in athymic nude mice. J. Urol. 154:1532-1538.

Dormond O., Madsen J. C., and Briscoe D. M. (2007).
The effects of mTOR-Akt interactions on anti-apoptotic signaling in vascular endothelial cells. J. Biol. Chem. 282:23679-23686.

Downward J. (2003).
Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. Nat. Rev. Cancer. 3:11-22.

Easton J. B. and Houghton P. J. (2006).
mTOR and cancer therapy. Oncogene. 25:6436-6446.

Edwards E., Geng L., Tan J., Onishko H., Donnelly E., and Hallahan D. E. (2002).
Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. Cancer Res. 62:4671-4677.

El Salem M., Raghunath P. N., Marzec M., Wlodarski P., Tsai D., Hsi E., and Wasik M. A. (2007).
Constitutive activation of mTOR signaling pathway in post-transplant lymphoproliferative disorders. Lab Invest. 87:29-39.

Eng C. P., Sehgal S. N., and Vezina C. (1984).
Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. J. Antibiot. (Tokyo) 37:1231-1237.

Faivre S., Kroemer G., and Raymond E. (2006).
Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. Nat. Rev. Drug Discov. 5:671-688.

Fidler I. J. (1989).
Origin and biology of cancer metastasis. Cytometry. 10:673-680.

Fidler I. J. (1990).
Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. Cancer Res. 50:6130-6138.

Fishman D., Galitzki L., Priel E., and Segal S. (1997).
Epidermal growth factor regulates protein kinase A activity in murine fibrosarcoma cells: differences between metastatic and nonmetastatic tumor cell variants. Cancer Res. 57:5410-5415.

Folkman J. (1971).
Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 285:1182-1186.

Folkman J. in Harrison's Textbook of Internal Medicine 15th ed. (eds Braunwald E. et al.) 517-530 (McGraw-Hill, New York, 2001)

Folkman J. (2002).
Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin. Oncol. 29:15-18.

Folkman J. and Shing Y. (1992).
Angiogenesis. J. Biol. Chem. 267:10931-10934.

Folkman J., Watson K., Ingber D., and Hanahan D. (1989).
Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature. 339:58-61.

Frost P., Shi Y., Hoang B., and Lichtenstein A. (2007).
AKT activity regulates the ability of mTOR inhibitors to prevent angiogenesis and VEGF expression in multiple myeloma cells. Oncogene. 26:2255-2262.

Garcia-Barros M., Paris F., Cordon-Cardo C., Lyden D., Rafii S., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., and Kolesnick R. (2003).
Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. Science 300:1155-1159.

Gasparini G., Longo R., Fanelli M., and Teicher B. A. (2005).
Combination of antiangiogenic therapy with other anticancer therapies: results, challenges, and open questions. J. Clin. Oncol. %20;23:1295-1311.

Geng L., Donnelly E., McMahon G., Lin P. C., Sierra-Rivera E., Oshinka H., and Hallahan D. E. (2001).
Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. Cancer Res. 61:2413-2419.

Georgakis G. V. and Younes A. (2006).
From Rapa Nui to rapamycin: targeting PI3K/Akt/mTOR for cancer therapy. Expert. Rev. Anticancer Ther. 6:131-140.

Gerber H. P., McMurtrey A., Kowalski J., Yan M., Keyt B. A., Dixit V., and Ferrara N. (1998).
Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. J. Biol. Chem. 273:30336-30343.

Giavazzi R., Campbell D. E., Jessup J. M., Cleary K., and Fidler I. J. (1986).
Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice. Cancer Res. 46:1928-1933.

Gorski D. H., Beckett M. A., Jaskowiak N. T., Calvin D. P., Mauceri H. J., Salloum R. M., Seetharam S., Koons A., Hari D. M., Kufe D. W., and Weichselbaum R. R. (1999).
Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. Cancer Res. 59:3374-3378.

Griffin R. J., Williams B. W., Wild R., Cherrington J. M., Park H., and Song C. W. (2002).
Simultaneous inhibition of the receptor kinase activity of vascular endothelial, fibroblast, and platelet-derived growth factors suppresses tumor growth and enhances tumor radiation response. Cancer Res. 62:1702-1706.

Griswold D. P. and Corbett T. H. (1975).
A colon tumor model for anticancer agent evaluation. Cancer. 36:2441-2444.

Guba M., von Breitenbuch P., Steinbauer M., Koehl G., Flegel S., Hornung M., Bruns C. J., Zuelke C., Farkas S., Anthuber M., Jauch K. W., and Geissler E. K. (2002).
Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by anti-angiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. Nat. Med. 8:128-135.

Guertin D. A. and Sabatini D. M. (2007).
Defining the role of mTOR in cancer. Cancer Cell. 12:9-22.

Gupta V. K., Jaskowiak N. T., Beckett M. A., Mauceri H. J., Grunstein J., Johnson R. S., Calvin D. A., Nodzenski E., Pejovic M., Kufe D. W., Posner M. C., and Weichselbaum R. R. (2002).
Vascular endothelial growth factor enhances endothelial cell survival and tumor radioresistance. Cancer J. 8:47-54.

Gysin S., Rickert P., Kastury K., and McMahon M. (2005).
Analysis of genomic DNA alterations and mRNA expression patterns in a panel of human pancreatic cancer cell lines. Genes Chromosomes. Cancer. 44:37-51.

Haimovitz-Friedman A. (1998).
Radiation-induced signal transduction and stress response. Radiat. Res. 150:S102-S108.

Hammes H. P., Brownlee M., Jonczyk A., Sutter A., and Preissner K. T. (1996).
Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. Nat. Med. 2:529-533.

Hanahan D. and Folkman J. (1996).
Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86:353-364.

Hansen-Algenstaedt N., Stoll B. R., Padera T. P., Dolmans D. E., Hicklin D. J., Fukumura D., and Jain R. K. (2000).
Tumor oxygenation in hormone-dependent tumors during vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade, hormone ablation, and chemotherapy. Cancer Res. 60:4556-4560.

Heidenreich R., Kappel A., and Breier G. (2000).
Tumor endothelium-specific transgene expression directed by vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences. Cancer Res 60:6142-6147.

Helman L. J. and Meltzer P. (2003).
Mechanisms of sarcoma development. Nat. Rev. Cancer. 3:685-694.

Hruban R. H., van Mansfeld A. D., Offerhaus G. J., van Weering D. H., Allison D. C., Goodman S. N., Kensler T. W., Bose K. K., Cameron J. L., and Bos J. L. (1993).
K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. Am. J. Pathol. 143:545-554.

Hsu S. M. and Raine L. (1981).
Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. J. Histochem. Cytochem. 29:1349-1353.

Huang C., Li J., Ke Q., Leonard S. S., Jiang B. H., Zhong X. S., Costa M., Castranova V., and Shi X. (2002).
Ultraviolet-induced phosphorylation of p70(S6K) at Thr(389) and Thr(421)/Ser(424) involves hydrogen peroxide and mammalian target of rapamycin but not Akt and atypical protein kinase C. Cancer Res. 62:5689-5697.

Huang S. and Houghton P. J. (2001).
Mechanisms of resistance to rapamycins. Drug Resist. Updat. 4:378-391.

Huang S. and Houghton P. J. (2003).
Targeting mTOR signaling for cancer therapy. Curr. Opin. Pharmacol. 3:371-377.

Huang S. M. and Harari P. M. (2000).
Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. Clin. Cancer Res. 6:2166-2174.

Hudis C. A. (2005).
Clinical implications of antiangiogenic therapies. Oncology (Williston. Park). 19:26-31.

Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S., Holmgren E., Ferrara N., Fyfe G., Rogers B., Ross R., and Kabbinavar F. (2004).
Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 350:2335-2342.

Ishiyama M., Tominaga H., Shiga M., Sasamoto K., Ohkura Y., and Ueno K. (1996).
A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. Biol. Pharm. Bull. 19:1518-1520.

Jacinto E. and Hall M. N. (2003).
Tor signalling in bugs, brain and brawn. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4:117-126.

Jain R. K. (2001).
Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. Nat. Med. 7:987-989.

Jain R. K. (2003).
Molecular regulation of vessel maturation. Nat. Med. 9:685-693.

Jain R. K. (2005).
Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts. Oncology (Williston. Park). 19:7-16.

Jefferies H. B., Fumagalli S., Dennis P. B., Reinhard C., Pearson R. B., and Thomas G. (1997).
Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70S6k. EMBO J. 16:3693-3704.

Jonathan E. C., Bernhard E. J., and McKenna W. G. (1999).
How does radiation kill cells? Curr. Opin. Chem. Biol. 3:77-83.

Kadambi A., Mouta C. C., Yun C. O., Padera T. P., Dolmans D. E., Carmeliet P., Fukumura D., and Jain R. K. (2001).
Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C differentially affects tumor vascular function and leukocyte recruitment: role of VEGF-receptor 2 and host VEGF-A. Cancer Res. 61:2404-2408.

Kahan B. D., Wong R. L., Carter C., Katz S. H., Von Fellenberg J., Van Buren C. T., and Appel-Dingemanse S. (1999).
A phase I study of a 4-week course of SDZ-RAD (RAD) quiescent cyclosporine-prednisone-treated renal transplant recipients. Transplantation. 68:1100-1106.

Kerbel R. and Folkman J. (2002).
Clinical translation of angiogenesis inhibitors. Nat. Rev. Cancer. 2:727-739.

Kerbel R. and Folkman J. (2002).
Clinical translation of angiogenesis inhibitors. Nat. Rev. Cancer 2:727-739.

Kerbel R. S. (2006).
Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? Science. 312:1171-1175.

Kerbel R. S. and Kamen B. A. (2004).
The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. Nat. Rev. Cancer. 4:423-436.

Kerbel R. S., Yu J., Tran J., Man S., Viloria-Petit A., Klement G., Coomber B. L., and Rak J. (2001).
Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. Cancer Metastasis Rev. 20:79-86.

Khaleghpour K., Li Y., Banville D., Yu Z., and Shen S. H. (2004).
Involvement of the PI 3-kinase signaling pathway in progression of colon adenocarcinoma. Carcinogenesis. 25:241-248.

Kim I. A., Bae S. S., Fernandes A., Wu J., Muschel R. J., McKenna W. G., Birnbaum M. J., and Bernhard E. J. (2005).
Selective inhibition of Ras, phosphoinositide 3 kinase, and Akt isoforms increases the radiosensitivity of human carcinoma cell lines. Cancer Res. 65:7902-7910.

Kim I. A., Fernandes A. T., Gupta A. K., McKenna W. G., and Bernhard E. J. (2004).
The influence of Ras pathway signaling on tumor radiosensitivity. Cancer Metastasis Rev. 23:227-236.

Kim J. J. and Tannock I. F. (2005).
Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. Nat. Rev. Cancer. 5:516-525.

Klement G., Baruchel S., Rak J., Man S., Clark K., Hicklin D. J., Bohlen P., and Kerbel R. S. (2000).
Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity [see comments]. J Clin Invest 105:R15-R24.

Klos K. S., Wyszomierski S. L., Sun M., Tan M., Zhou X., Li P., Yang W., Yin G., Hittelman W. N., and Yu D. (2006).
ErbB2 increases vascular endothelial growth factor protein synthesis via activation of mammalian target of rapamycin/p70S6K leading to increased angiogenesis and spontaneous metastasis of human breast cancer cells. Cancer Res. 66:2028-2037.

Korff T. and Augustin H. G. (1998).
Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. J. Cell Biol. 143:1341-1352.

Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends, Herausgeber: Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut. 5. Ausgabe, Saarbrücken 2006

Kupferwasser L. I., Amorn A. M., Kapoor N., Lee M. S., Kar S., Cercek B., Dohad S., Mirocha J., Forrester J. S., Shah P. K., and Makkar R. R. (2007).
Comparison of drug-eluting stents with bare metal stents in unselected patients with acute myocardial infarction. Catheter. Cardiovasc. Interv. 70:1-8.

Lapidot T. and Petit I. (2002).
Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. Exp. Hematol. 30:973-981.

Lee C. G., Heijn M., di Tomaso E., Griffon-Etienne G., Ancukiewicz M., Koike C., Park K. R., Ferrara N., Jain R. K., Suit H. D., and Boucher Y. (2000).
Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. Cancer Res. 60:5565-5570.

Lee C. G., Heijn M., di Tomaso E., Griffon-Etienne G., Ancukiewicz M., Koike C., Park K. R., Ferrara N., Jain R. K., Suit H. D., and Boucher Y. (2000).
Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. Cancer Res. 60:5565-5570.

Lupu C. M., Eisenbach C., Lupu A. D., Kuefner M. A., Hoyler B., Stremmel W., and Encke J. (2007).
Adenoviral B7-H3 therapy induces tumor specific immune responses and reduces secondary metastasis in a murine model of colon cancer. Oncol. Rep. 18:745-748.

Majumder P. K., Febbo P. G., Bikoff R., Berger R., Xue Q., McMahon L. M., Manola J., Brugarolas J., McDonnell T. J., Golub T. R., Loda M., Lane H. A., and Sellers W. R. (2004).
mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. Nat. Med. 10:594-601.

Mancuso M. R., Davis R., Norberg S. M., O'Brien S., Sennino B., Nakahara T., Yao V. J., Inai T., Brooks P., Freimark B., Shalinsky D. R., Hu-Lowe D. D., and McDonald D. M. (2006).
Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. J. Clin. Invest. 116:2610-2621.

Manning B. D., Logsdon M. N., Lipovsky A. I., Abbott D., Kwiatkowski D. J., and Cantley L. C. (2005).
Feedback inhibition of Akt signaling limits the growth of tumors lacking Tsc2. Genes Dev. 19:1773-1778.

Mehrabi A., Fonouni H., Kashfi A., Schmied B. M., Morath C., Sadeghi M., Schemmer P., Encke J., Sauer P., Zeier M., Weitz J., Buchler M. W., and Schmidt J. (2006).
The role and value of sirolimus administration in kidney and liver transplantation. Clin. Transplant. 20 Suppl 17:30-43.:30-43.

Miller K. D. (2003).
E2100: a phase III trial of paclitaxel versus paclitaxel/bevacizumab for metastatic breast cancer. Clin. Breast Cancer. 3:421-422.

Miriuka S. G., Rao V., Peterson M., Tumiati L., Delgado D. H., Mohan R., Ramzy D., Stewart D., Ross H. J., and Waddell T. K. (2006).
mTOR inhibition induces endothelial progenitor cell death. Am. J. Transplant. 6:2069-2079.

Moeller B. J., Cao Y., Li C. Y., and Dewhirst M. W. (2004).
Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. Cancer Cell 5:429-441.

Moeller B. J., Dreher M. R., Rabbani Z. N., Schroeder T., Cao Y., Li C. Y., and Dewhirst M. W. (2005).
Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. Cancer Cell. 8:99-110.

Morgan R. T., Woods L. K., Moore G. E., Quinn L. A., McGavran L., and Gordon S. G. (1980).
Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. Int. J. Cancer. 25:591-598.

Mueller-Klieser W. (1997).
Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. Am. J. Physiol. 273:C1109-C1123.

Naito S., von Eschenbach A. C., Giavazzi R., and Fidler I. J. (1986).
Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. Cancer Res. 46:4109-4115.

Naumov G. N., Akslen L. A., and Folkman J. (2006).
Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. Cell Cycle. 5:1779-1787.

Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., and Poltorak Z. (1999).
Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J. 13:9-22.

Neumayer H. H., Paradis K., Korn A., Jean C., Fritsche L., Budde K., Winkler M., Kliem V., Pichlmayr R., Hauser I. A., Burkhardt K., Lison A. E., Barndt I., and Appel-Dingemanse S. (1999).
Entry-into-human study with the novel immunosuppressant SDZ RAD in stable renal transplant recipients. Br. J. Clin. Pharmacol. 48:694-703.

Nieder C., Wiedenmann N., Andratschke N., and Molls M. (2006).
Current status of angiogenesis inhibitors combined with radiation therapy. Cancer Treat. Rev. 32:348-364.

Noll, S., Schaub-Kunnen, S. Praxis der Immunhistochemie. 2000; 1: 15, 17

Old L. J., Benacerraf B., Clarke D. A., Carswell E. A., and Stockert E. (1961).
The role of the reticuloendothelial system in the host reaction to neoplasia. Cancer Res 21:1281-1301.

Paris F., Fuks Z., Kang A., Capodieci P., Juan G., Ehleiter D., Haimovitz-Friedman A., Cordon-Cardo C., and Kolesnick R. (2001).
Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. Science. 293:293-297.

Parrott L. A. and Templeton D. J. (1999).
Osmotic stress inhibits p70/85 S6 kinase through activation of a protein phosphatase. J. Biol. Chem. 274:24731-24736.

Pende M., Um S. H., Mieulet V., Sticker M., Goss V. L., Mestan J., Mueller M., Fumagalli S., Kozma S. C., and Thomas G. (2004).
S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. Mol. Cell Biol. 24:3112-3124.

Phung T. L., Ziv K., Dabydeen D., Eyiah-Mensah G., Riveros M., Perruzzi C., Sun J., Monahan-Earley R. A., Shiojima I., Nagy J. A., Lin M. I., Walsh K., Dvorak A. M., Briscoe D. M., Neeman M., Sessa W. C., Dvorak H. F., and Benjamin L. E. (2006).
Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. Cancer Cell. 10:159-170.

Pullen N. and Thomas G. (1997).
The modular phosphorylation and activation of p70s6k. FEBS Lett. 410:78-82.

Rafii S., Lyden D., Benezra R., Hattori K., and Heissig B. (2002).
Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? Nat Rev Cancer 2:826-835.

Ramaswamy B., Elias A. D., Kelbick N. T., Dodley A., Morrow M., Hauger M., Allen J., Rhoades C., Kendra K., Chen H. X., Eckhardt S. G., and Shapiro C. L. (2006). Phase II trial of bevacizumab in combination with weekly docetaxel in metastatic breast cancer patients. Clin. Cancer Res. 12:3124-3129.

Reiling J. H. and Sabatini D. M. (2006). Stress and mTORture signaling. Oncogene. 25:6373-6383.

Rychahou P. G., Jackson L. N., Silva S. R., Rajaraman S., and Evers B. M. (2006). Targeted molecular therapy of the PI3K pathway: therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma. Ann. Surg. 243:833-842.

Sarbassov D. D., Ali S. M., and Sabatini D. M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. Curr. Opin. Cell Biol. 17:596-603.

Schmelzle T. and Hall M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. Cell 103:253-262.

Schmidt-Ullrich R. K., Contessa J. N., Dent P., Mikkelsen R. B., Valerie K., Reardon D. B., Bowers G., and Lin P. S. (1999). Molecular mechanisms of radiation-induced accelerated repopulation. Radiat. Oncol. Investig. 7:321-330.

Schmidt-Ullrich R. K., Contessa J. N., Lammering G., Amorino G., and Lin P. S. (2003). ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses. Oncogene 22:5855-5865.

Seo A., Fujii T., Inoue T., Onoda S., Koga A., Tanaka Y., Chin K., Kurusu T., Takikawa K., Shibata T., Taniguchi M., and Mochizuki S. (2007). Initial and long-term outcomes of sirolimus-eluting stents for calcified lesions compared with bare-metal stents. Int. Heart J. 48:137-147.

Sepp-Lorenzino L. and Thomas K. A. (2002).
Antiangiogenic agents targeting vascular endothelial growth factor and its receptors in clinical development. Expert. Opin. Investig. Drugs. 11:1447-1465.

Shahbazian D., Roux P. P., Mieulet V., Cohen M. S., Raught B., Taunton J., Hershey J. W., Blenis J., Pende M., and Sonenberg N. (2006).
The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. EMBO J. 25:2781-2791.

Shaked Y., Emmenegger U., Man S., Cervi D., Bertolini F., Ben David Y., and Kerbel R. S. (2005).
Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity. Blood. 106:3058-3061.

Stoelcker B., Ruhland B., Hehlgans T., Bluethmann H., Luther T., and Mannel D. N. (2000).
Tumor necrosis factor induces tumor necrosis via tumor necrosis factor receptor type 1-expressing endothelial cells of the tumor vasculature. Am J Pathol 156:1171-1176.

Thomas G. V. (2006).
mTOR and cancer: reason for dancing at the crossroads? Curr. Opin. Genet. Dev. 16:78-84.

Thomas G. V., Horvath S., Smith B. L., Crosby K., Lebel L. A., Schrage M., Said J., De Kernion J., Reiter R. E., and Sawyers C. L. (2004).
Antibody-based profiling of the phosphoinositide 3-kinase pathway in clinical prostate cancer. Clin. Cancer Res. 10:8351-8356.

Tsuzuki Y., Fukumura D., Oosthuyse B., Koike C., Carmeliet P., and Jain R. K. (2000).
Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha--> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. Cancer Res. 60:6248-6252.

Vaupel P. (2004).
The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. Oncologist. 9 Suppl 5:10-7.:10-17.

Vaupel P. (2004).
Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. Semin. Radiat. Oncol. 14:198-206.

Vezeridis M. P., Tzanakakis G. N., Meitner P. A., Doremus C. M., Tibbetts L. M., and Calabresi P. (1992).
In vivo selection of a highly metastatic cell line from a human pancreatic carcinoma in the nude mouse. Cancer. 69:2060-2063.

Weisz G., Moses J. W., Teirstein P. S., Holmes D. R., Jr., Raizner A. E., Satler L. F., Mishkel G., Wilensky R. L., Wang P., Kuntz R. E., Popma J. J., and Leon M. B. (2007).
Safety of sirolimus-eluting stenting and its effect on restenosis in patients with unstable angina pectoris (a SIRIUS substudy). Am. J. Cardiol. 99:1044-1050.

Weppler S. A., Li Y., Dubois L., Lieuwes N., Jutten B., Lambin P., Wouters B. G., and Lammering G. (2007).
Expression of EGFR variant vIII promotes both radiation resistance and hypoxia tolerance. Radiother. Oncol. 83:333-339.

Willett C. G., Boucher Y., di Tomaso E., Duda D. G., Munn L. L., Tong R. T., Chung D. C., Sahani D. V., Kalva S. P., Kozin S. V., Mino M., Cohen K. S., Scadden D. T., Hartford A. C., Fischman A. J., Clark J. W., Ryan D. P., Zhu A. X., Blaszkowsky L. S., Chen H. X., Shellito P. C., Lauwers G. Y., and Jain R. K. (2004).
Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. Nat. Med. 10:145-147.

www.dkfz.de/de/krebsatlas

Yu J. L., Coomber B. L., and Kerbel R. S. (2002).
A paradigm for therapy-induced microenvironmental changes in solid tumors leading to drug resistance. Differentiation. 70:599-609.

Yuan F., Chen Y., Dellian M., Safabakhsh N., Ferrara N., and Jain R. K. (1996).
Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:14765-14770.

Zhong H., Chiles K., Feldser D., Laughner E., Hanrahan C., Georgescu M. M., Simons J. W., and Semenza G. L. (2000).
Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. Cancer Res. 60:1541-1545.

Zingg D., Riesterer O., Fabbro D., Glanzmann C., Bodis S., and Pruschy M. (2004).
Differential activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt survival pathway by ionizing radiation in tumor and primary endothelial cells. Cancer Res. 64:5398-5406.

DANKSAGUNG

Nach Abschluss der experimentellen Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. K.-W. Jauch, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik München-Großhadern, für die freundliche Aufnahme und die Möglichkeit, in seiner Klinik meine Dissertation erstellen zu dürfen.

Frau PD Dr. C.J. Bruns, die mich in ihr Team aufnahm, mich von Anfang an förderte und mir bei allen Schritten dieser Arbeit hilfreich zur Seite stand. Ihre Begeisterung, vielfältigen Ideen und wissenschaftlichen Erfahrungen waren ein starker Antrieb meiner Arbeit. Ihr stetiges Engagement, die wertvollen Ratschläge und Diskussionen haben wesentlich zum Entstehen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Herrn PD Dr. med. M. Guba für wichtige gedankliche Anstöße und konstruktive Kritik. Anregende Diskussionen und seine hilfreichen Kommentare bereicherten meine Arbeit.

Herrn PD Dr. med. R. Wilkowski, ehemaliger Mitarbeiter der Abteilung für Strahlentherapie, für die freundliche Kooperation.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. P.C. Manegold, der mich in unermüdlicher Weise durch alle Höhen und Tiefen des experimentellen Arbeitens sicher und mit außerordentlicher fachlicher Kompetenz geleitet hat. Seine Betreuung und Hilfe bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente war

besonders geprägt durch seine Zuverlässigkeit und die Bereitschaft, mir stets mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Frau Dr. U. Kulka, ehemals Mitarbeiterin der Abteilung für Strahlentherapie, die mir durch ihre große Hilfsbereitschaft stets kompetent und bereitwillig zur Seite stand und so zu einem wertvollen persönlichen wie fachlichen Ansprechpartner in allen Bereichen wurde. Insbesondere bei Fragestellungen in Bezug auf die Strahlentherapie erreichte sie es, auch komplizierte Sachverhalte verständlich zu machen.

Meinen Mitdoktoranden Bettina Schwarz, Ulrike Albrecht und Stefan Huber, sowie den wissenschaftlichen Assistenten in unserem Team, Frau S. Schrepfer, Herrn Dr. I. Ischenko, Herrn Dr. P. Camaj, Herrn M. Luckner und Frau Dr. A. Papyan für ihre kontinuierliche fachliche und freundschaftliche Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Experimentellen Forschung Chirurgie für die freundliche Aufnahme und das immer angenehme und anregende Arbeitsklima.

CURRICULUM VITAE

Carmen Paringer
geboren am 22. November 1978 in Landshut

Schulausbildung

1985 - 1989	Grundschule Loiching-Kronwieden
1989 - 1995	Gymnasium Dingolfing
08/1995 - 07/1996	Andrew High School, Iowa, USA (Stipendium Fa. BMW AG) Abschluss: Amerikanisches High School Diploma
1996 - 1999	Gymnasium Dingolfing Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

05/2000 -10/2006	Studium der Humanmedizin an der LMU München
10/2005 - 9/2006	Praktisches Jahr: ▪ Chirurgische Klinik, Klinikum München Neuperlach ▪ Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Innenstadt, LMU, München ▪ Zentrum für Akutgeriatrie und Frührehabilitation, Klinikum München Neuperlach
10/06	Studienabschluss und Approbation

Berufliche Tätigkeit

Seit Februar 2007	Assistenzärztin an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Heidelberg; Direktor: Prof. Dr. Prof. h.c. Christof Sohn

Publikationen und Vorträge

1. Originalarbeiten:

Manegold PC, **Paringer C**, Kulka U, Krimmel K, Eichhorn ME, Wilkowski R, Jauch KW, Guba M, Bruns CJ.
Antiangiogenic therapy with mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 (Everolimus) increases radiosensitivity in solid cancer.
Clin Cancer Res. 2008 Feb 1; 14(3):892-900

2. Abstracts:

C. Paringer, P. Manegold, U. Kulka, R. Wilkowski, K.-W. Jauch, M. Guba, C.J. Bruns
Combination of antiangiogenic mTOR inhibitor RAD001 and ionizing radiation in therapy of malignant tumors
Angiogenesis 2006; 9:35

3. Vorträge und Präsentationen:

C. Paringer, P. Manegold, U. Kulka, R. Wilkowski, K.-W. Jauch, M. Guba, C.J. Bruns
Combination of antiangiogenic mTOR inhibitor RAD001 and ionizing radiation in therapy of malignant tumors
Second European Conference on Tumor angiogenesis an Antiangiogenic Therapy (ECTA)
München, 16.09.06 (Posterpräsentation)

C. Paringer, P. Manegold, U. Kulka, R. Wilkowski, K.-W. Jauch, M. Guba, C.J. Bruns
Combination of antiangiogenic RAD001 and ionizing radiation in therapy of malignant tumors
Pankreaskarzinom 2006/ Pancreatic Cancer 2006; Internationales Symposium
München, 03.06.06 (Posterpräsentation)

C. Paringer, P. Manegold, U. Kulka, R. Wilkowski, K.-W. Jauch, M. Guba, C.J. Bruns
Combination of antiangiogenic RAD001 and ionizing radiation in therapy of malignant tumors
123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie
Berlin, 02.05.06 (Vortrag im Chirurgischen Forum)

4. Buchbeiträge

C. Paringer, P. Manegold, U. Kulka, R. Wilkowski, K.-W. Jauch, M. Guba, C.J. Bruns
Kombination von antiangiogener Therapie mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 und Strahlentherapie als neues Therapiekonzept in der Tumortherapie
In H.-D. Saeger, K.-W. Jauch, H. Bauer (Hrsg), Chirurgisches Forum 2006 für experimentelle und klinische Forschung, S. 53-56, Springer 2006