

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II (Hämatologie und Onkologie)

Hubertus Wald Tumorzentrum

Universitäres Cancer Center Hamburg

des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

**Untersuchung der möglichen Rolle von zirkulierenden vaskulären und lymphatischen Endothelzellen, sowie zirkulierenden Tumorzellen im Blut als Surrogatmarker für die klinische Wirkung bei der antiangiogenetischen Therapie mit SU014813**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

**Karin Suhrbier**

**aus Münster**

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 17.09.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Fiedler

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. Schur

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. Lamszus

## Inhaltsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <u>Inhaltsverzeichnis</u>  | <u>I</u>   |
| <u>Tabellenverzeichnis</u>   | <u>III</u> |
| <u>Abbildungsverzeichnis</u>   | <u>III</u> |
| <u>1 Arbeitshypothese und Fragestellung</u>                                      | <u>1</u>   |
| <u>2 Einleitung</u>  | <u>2</u>   |
| 2.1 Blutgefäßneubildung .....  | 2          |
| 2.1.1 Vaskulogenese .....  | 4          |
| 2.1.2 Angiogenese .....  | 5          |
| 2.1.3 VEGF .....   | 6          |
| 2.1.4 Angiopoetine .....   | 7          |
| 2.1.5 Lymphangiogenese .....   | 8          |
| 2.1.6 Merkmale von lymphatischen Endothelzellen .....                            | 9          |
| 2.2 Zirkulierende Endothelzellen .....   | 10         |
| 2.3 Zirkulierende Tumorzellen .....  | 12         |
| 2.4 Herstellung der Antikörper .....   | 15         |
| 2.5 Studie SU014813 .....  | 16         |
| 2.5.1 Rationale .....  | 16         |
| 2.5.2 Pharmakokinetik .....  | 16         |
| 2.5.3 Freiwillige gesunde Testpersonen .....                                     | 17         |
| 2.5.4 Ziel der Studie .....  | 17         |
| 2.5.5 Auswahlkriterien der Patienten .....                                       | 17         |
| 2.5.6 Auswertung .....   | 18         |
| <u>3 Material und Methoden</u>   | <u>19</u>  |
| 3.1 Immunhistochemische Färbung zirkulierender Tumorzellen .....                 | 19         |
| 3.1.1 APAAP-Färbung .....  | 19         |
| 3.2 Validierung der Methode .....  | 24         |
| 3.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut oder Buffy Coats .....    | 24         |
| 3.2.2 Aufbewahrung der Cytospins .....   | 24         |
| 3.2.3 Kultivierung der Zellen .....  | 25         |
| 3.2.4 Positive Kontrollzellen .....  | 25         |
| 3.2.5 HUVECs .....   | 25         |
| 3.2.6 MCF7- Tumorzellen .....  | 26         |
| 3.2.7 Verdünnungsreihen .....  | 26         |
| 3.2.8 Patientenproben .....  | 27         |
| 3.3 Chemikalien .....  | 28         |
| 3.4 Laborgeräte .....  | 29         |
| 3.5 Verbrauchsmaterialien .....  | 30         |
| <u>4 Ergebnisse</u>  | <u>32</u>  |
| 4.1 Validierung der Detektion von Tumorzellen und vaskulären Endothelzellen .... | 32         |

|   |  |           |
|---|--|-----------|
| 4.2                                       | Detektion von Tumorzellen, vaskulären und lymphatischen Endothelzellen bei gesunden Spendern, bei Tumorpatienten, Studienpatienten und aus Leukaphareseprodukten ..... | 33        |
| 4.3                                       | Detektion von Tumorzellen bei SU014813 therapierten Patienten .....  | 34        |
| 4.4                                       | Detektion von vaskulären Endothelzellen bei SU014813 therapierten Patienten.....   | 37        |
| 4.5                                       | Detektion von lymphatischen Endothelzellen bei SU014813 therapierten Patienten.....  | 42        |
| <u>5</u>                                  | <u>Diskussion</u> .....  | <u>45</u> |
| <u>6</u>                                  | <u>Zusammenfassung</u> .....   | <u>53</u> |
| <u>Literaturverzeichnis</u> .....         |  | <u>IV</u> |
| <u>Danksagung</u> .....                   |  | <u>IX</u> |
| <u>Lebenslauf</u> .....                   |  | <u>X</u>  |
| <u>Eidesstattliche Versicherung</u> ..... |  | <u>XI</u> |

## Tabellenverzeichnis

|         |  |    |
|---------|--|----|
| Tab. 1: | Cytokeratinübersicht .....   | 15 |
| Tab. 2: | Verwendete Chemikalien und Medizinprodukte .....   | 29 |
| Tab. 3: | Verwendete Laborgeräte .....   | 30 |
| Tab. 4: | Verbrauchsmaterialien .....  | 31 |
| Tab. 5: | Verdünnungsreihen der Tumor- und Endothelzellen.....   | 32 |
| Tab. 6: | Tumor-, vaskuläre Endothel- und lymphatische Endothelzellzahlen von<br>gesunden Spendern, Leukaphareseprodukten und Tumorpatienten ..... | 33 |
| Tab. 7: | Tumorzellzahlen von SU014813 therapierter Patienten.....   | 36 |
| Tab. 8: | Vaskuläre Endothelzellzahlen von SU014813 therapierten Patienten .....   | 40 |
| Tab. 9: | Lymphatische Endothelzellzahlen von SU014813 therapierten Patienten .....  | 44 |

## Abbildungsverzeichnis

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Abb. 1:  | Arterienwandaufbau .....   | 3  |
| Abb. 2:  | Tumorangiogenese .....   | 4  |
| Abb. 3:  | Entstehung von Metastasen .....  | 13 |
| Abb. 4:  | Antigen-Antikörper-Komplex bei der APAAP-Färbung .....   | 19 |
| Abb. 5:  | ACIS-Computer; 1 ACIS Mikroskop, 2 Prozessor, Monitor, Tastatur und<br>Maus, 4 CD-Laufwerk, 5 Drucker, 6 Stromversorgung.....  | 22 |
| Abb. 6:  | APAAP-Färbung (400x) .....   | 34 |
| Abb. 7:  | Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen bei Tumorpatienten und gesunden<br>Probanden.....  | 37 |
| Abb. 8:  | APAAP-Färbung, mit dem P1H12-Antikörper positiv gefärbte<br>Endothelzelle (400x) .....   | 38 |
| Abb. 9:  | P1H12-positiv detektierte Zellzahlen der Studienpatienten an Tag 1<br>korreliert mit dem Ansprechen auf die Therapie mit SU014813;<br>Zellzahl/10 <sup>6</sup> Gesamtzellen..... | 41 |
| Abb. 10: | Differenz der Anzahl der zirkulierenden Endothelzellen der<br>Studienpatienten von Tag 1 und Tag 8 (p=0,039).....  | 41 |
| Abb. 11: | APAAP-Färbung, mit dem LYVE-1-Antikörper zwei positiv gefärbte<br>lymphatische Endothelzellen (200x).....  | 42 |

# 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

In dieser Arbeit wird die Rolle von zirkulierenden vaskulären und lymphatischen Endothelzellen, sowie zirkulierenden Tumorzellen im Blut als Surrogatmarker für die klinische Wirkung bei der antiangiogenen Therapie mit SU014813 untersucht.

Alle Patienten aus dieser Studie haben solide, metastasierte Tumore. Aufgrund der entscheidenden Rolle der vaskulären und lymphatischen Endothelzellen und Tumorzellen bei der Metastasierung, greift dieses Medikament diese Zellen an und versucht diese zu reduzieren. Wir versuchten diesen Effekt direkt an dem Patientenblut nachzuweisen.

Wenn durch dieses neue bzw. weiterentwickelte Medikament die vaskuläre und lymphatische Endothelzellproliferation gestoppt werden würde und wir diese Reduktion der Zellen im Blut nachweisen könnten, wäre die Wirksamkeit des Medikamentes auf dieser Ebene bewiesen.

Die Therapie dieser ausgewählten Patienten (ca.30) mit SU014813 wurde bereits vor 1,5 Jahren begonnen. Der Therapiezyklus besteht aus 28 Tagen. Das Blut wurde an drei Zeitpunkten der Therapie gesammelt (Tag 1, Tag 8 und Tag 28).

Die mononukleären Zellen werden isoliert und auf Objektträger geschleudert. Diese Objektträger können nun mit den ausgewählten Antikörpern für die gewünschten Zellen gefärbt werden. Dafür nahmen wir die bereits für die Tumorzellen etablierten APAAP (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase)- Methode (Schlimok et al, European J of cancer 1991).

Wir zählten die Anzahl der gefärbten Zellen zu jedem Zeitpunkt der Therapie für jeden Antikörper und versuchten so, eine Aussage über die Zellzahlen im Verlauf der Therapie zu treffen. Daraus könnte man dann auf die Wirksamkeit von SU014813 schließen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Blutgefäßneubildung

Blutgefäße sind Transport-, Kapazitäts- und Austauschwege, die nervös, hormonal und autonom reguliert werden können. Sie bilden für das vom Herzen kommende und zum Herzen zurückfließende Blut ein geschlossenes System aus elastischen Röhren, dessen Gesamtlänge auf 50.000 km geschätzt wird. Die Blutgefäße müssen verschleißfest, verstellbar und regenerationsfähig sein und eine bestimmte Durchlässigkeit im Bereich der Austauschstrecken besitzen.

Sie erfüllen so eine Vielzahl von lebenswichtigen **Funktionen**.

Die Gefäße transportieren Blutgase, Nährstoffe, Wasser, Mineralien, Hormone, Stoffwechselprodukte, Zellen des Abwehrsystems und Wärme. Sie versorgen mit ihrer zusätzlichen Austauschfunktion das Gewebe mit diesen lebensnotwendigen Substanzen. Bei lokalen Entzündungen unterstützen die Blutgefäße die Abwehrvorgänge, z.B. durch Vasodilatation (Gefäßweitstellung) und erhöhte Durchlässigkeit für Abwehrzellen.

Der Füllungszustand der Gefäße beeinflusst den Spannungszustand (Turgor) der Organe. Zum Beispiel kommt es bei einem Schock durch das Absinken des Blutdruckes zu einem allgemeinen Turgorabfall der Organgefäße und damit zu einer Versorgungsstörung. Es können dadurch Organschäden vor allem an der Niere (Schockniere), Herz und Lunge (Schocklunge) entstehen.

Blutgefäße besitzen einen charakteristischen **Wandbau**, der durch das umliegende Gewebe und die funktionelle Beanspruchung geprägt wird.

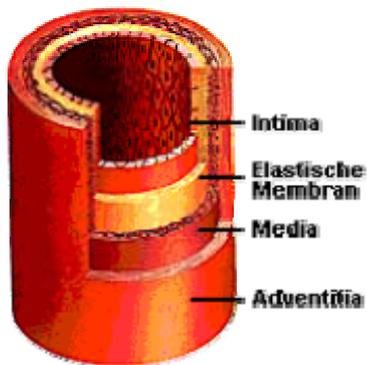


Abb. 1: Arterienwandaufbau

Die hier vereinfachte Darstellung zeigt den Aufbau einer Arterienwand.

Die Adventitia bildet die äußerste Schicht und besteht vor allem aus Bündeln von kollagenen Fibrillen, einem lockeren, elastischen Fasernetz, Fibrozyten (Bindegewebszellen) und einzelnen Mastzellen. Sie verbindet das Gefäß mit dem jeweiligen umgebenden Gewebe.

Die Media besteht aus elastischen Fasern und glatten Muskelzellen. Die Arterien werden je nach dem überwiegenden Anteil in Arterien vom elastischen Typ (herznah) und Arterien vom muskulären Typ unterschieden.

Die Intima ist die innerste Gefäßhaut. Zwischen dem Blutstrom und der Intima befindet sich eine geschlossene Schicht von Endothelzellen. Diese Endothelzellen werden in jedem Gefäßabschnitt mit unterschiedlicher Häufigkeit ausgewechselt und erneuert. Wenn das Endothel geschädigt wird, z.B. durch inhalierendes Rauchen, steigt diese Erneuerungsrate erheblich an.

Ein wichtiger Vorgang bei einer Entzündung ist die Migration der Leukozyten aus der Blutbahn durch die Gefäßwand in das umliegende Gewebe. Hier spielen die Endothelzellen eine wichtige Rolle. An ihrer Oberfläche befindet sich das Leukozytenadhäsionsmolekül 1 und 2 (E-Selektin) und das induzierbare Zelladhäsionsmolekül 1 (ICAM), das für die Anheftung der Lymphozyten und Monozyten verantwortlich ist.

Gefäßendothelzellen sind ständig den Blutstromscherkräften ausgesetzt und werden durch ein kontraktiles Filamentsystem (Aktin-Myosin-System) vor der Ablösung von

der Gefäßwand geschützt. Wenn sich diese Gefäßendothelzellen trotzdem von der Gefäßwand lösen, sind es frei im Blut zirkulierende Endothelzellen (CECs; circulating endothelial cells) (1).

Die Entstehung dieser Blutzellen in der Embryonalzeit aus Hämangioblasten wird Vaskulogenese genannt. Bei Erwachsenen erfolgt die Blutgefäßneubildung größtenteils durch das Aussprossen bereits vorhandener Blutgefäße. Dieser Vorgang wird als Angiogenese bezeichnet. Neuere Daten zeigen jedoch, dass die Vaskulogenese auch im adulten Organismus stattfindet (2).

Bei der **Tumorangiogenese** (siehe Bild unten) wird das Wachstum der Endothelzellen durch angiogenetische Zytokine induziert, das am besten charakterisierte ist VEGF. Hier wurde Avastin, das erste anti- angiogenetische Medikament in der Tumorthherapie entwickelt und angewandt. Avastin ist ein Antikörper, der direkt gegen VEGF gerichtet ist (3).

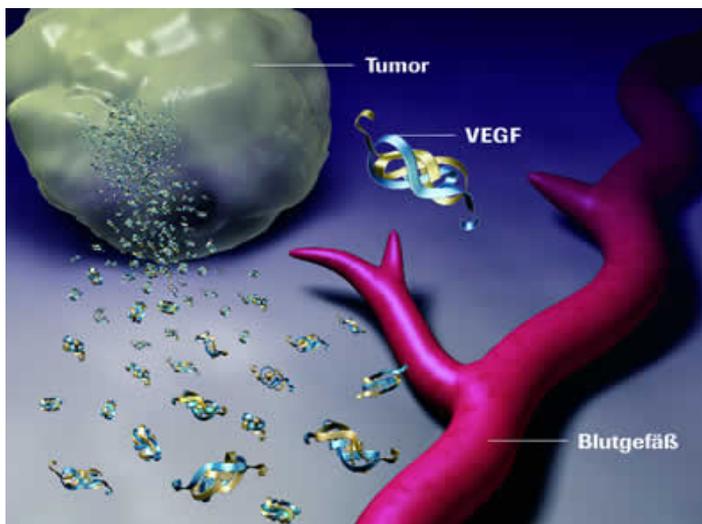


Abb. 2: Tumorangiogenese

### 2.1.1 Vaskulogenese

Die Entstehung der Blutgefäße in der Embryonalzeit wird Vaskulogenese genannt. In der Maus beginnt an Tag 7 nach der Befruchtung die Ausbildung von Blutinseln aus Zellen mesodermalen Ursprungs. Die Zellen in der Peripherie entwickeln sich zu Endothelzellen, die dann die im Zentrum gelegenen Zellen, die sich zu

hämatopoetischen Embryonalzellen differenzieren, einschließen und so die ersten vaskulären Strukturen ausbilden (4).

His erkannte schon 1901, dass die Entwicklung der Endothelzellen eng mit der der hämatopoetischen Zellen verbunden ist (5).

Die hämatopoetischen Stammzellen und Angioblasten stimmen in einigen Antigen determinanten wie Sc11/ Tal1, CD31, CD34, VE-Cadherin und Tie2 überein (6), so dass heute alles auf eine gemeinsame Vorläuferzelle von hämatopoetischen und endothelialen Zellen, die als Hämangioblast bezeichnet wird, hindeutet (7).

### 2.1.2 Angiogenese

Bei der Angiogenese gehen die Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen hervor (6). Damit Gefäßsprossen entstehen, muss die Basallamina zunächst abgebaut werden.

Für diese Vorgänge sind eine Vielzahl von Faktoren und Rezeptoren erforderlich. Die wichtigsten gehören zu der Familie des VEGF und der Angiopoetine.

Die Angiogenese kommt u.a. bei der Wundheilung, inflammatorische Erkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis, Psoriasis) und der Retinopathie vor. Bei einem Herzinfarkt und bei der Retinopathie werden durch niedrige Sauerstoffkonzentrationen (Hypoxie) Transkriptionsfaktoren (hypoxia-inducible transcription factors, HIF-1 $\alpha$ , -2 $\alpha$ , -3 $\alpha$ ) aktiviert, die an den Promotorregionen von verschiedenen Genen binden. Diese kodieren angiogene Faktoren, die dann ausgeschüttet werden und eine Blutgefäßneubildung aktivieren (8).

Die Angiogenese nimmt bei dem Tumorwachstum und der Metastasierung eine wichtige Rolle ein. Tumore können sich nur bis zu einer Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> durch Diffusion mit Nährstoffen versorgen, danach brauchen sie für weiteres Wachstum eine funktionierende Blutgefäßneubildung (9,10). Auch dort fördern die HIFs durch Hypoxie aktiviert die Angiogenese und somit das Tumorwachstum (8).

Der Ablauf der Angiogenese beginnt mit der Veränderung der Endothelzellmorphologie, einer Zunahme von Endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat und Mitochondrien. Nachdem der Endothelzellkontakt unterbrochen wird, werden die Basallamina und die extrazelluläre Matrix durch sezernierte proteolytischen

Enzyme wie Metalloproteinasen und Plasmin aufgelöst. Die Endothelzellen wandern in das umliegende Gewebe und ordnen sich röhrenförmig an. Die Bildung einer neuen Basallamina führt zu einer Stabilisierung des neuen Gefäßes (11).

### 2.1.3 VEGF

VEGF ist ein Zytokin. Es ist ein hoch konserviertes, disulfid-gebundenes dimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 34-46 kDa. Die VEGF- Rezeptoren (VEGFRs) gehören zu den Tyrosinkinase- Rezeptoren.

Es sind mehrere Faktoren an der Genexpression von VEGF beteiligt. Hypoxie, Wachstumsfaktoren, p53- Mutation, Östrogen und NO sind einige Beispiele.

Es sind sieben Mitglieder der VEGF- Familie bekannt: VEGF-A, PlGF (Placenta growth factor), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und svVEGF (snake venom VEGF) (12).

Von VEGF-A gibt es allein neun Subtypen, die durch unterschiedliches Splicen entstehen. Dieses Zytokin und seine Rezeptoren sind für die Entwicklung von Gefäßen und Blutzellen notwendig. Außerdem fördert VEGF-A das Aussprossen, die Migration und die Proliferation von Endothelzellen.

VEGF-A und seine Rezeptoren sind zusätzlich an der Kanzerogenese, Invasion, Fernmetastasierung und Angiogenese solider Tumore beteiligt (12).

VEGF-A bindet an den VEGFR-1 und den VEGFR-2.

Um die Bedeutung der einzelnen Rezeptoren zu erfassen, wurden transgene Mäuse mit ausgeschalteten VEGF-R Genen erzeugt. Bei den VEGFR-1 Knock out Mäusen entwickelten sich übermäßig viele Endothelzellen und ungeordnete, abnorme Blutgefäße. Die VEGFR-2 Knock out Mäuse starben an Defekten in der Hämatopoese und der Blutgefäßentwicklung, da Endothelzellen fehlten (13,14,15,16).

Der VEGF- Rezeptor- 1 wird auf vaskulären Endothelzellen und auf einigen nicht-endothelialen Zellen wie Makrophagen, Monozyten und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert (12).

Der VEGF- Rezeptor-2 wird auf vaskulären und lymphatischen Endothelzellen, Megakaryozyten und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Dieser Rezeptor spielt bei der Hämatopoese und Neo- Angiogenese sowie bei dem Wachstum und dem Überleben der Endothelzellen eine große Rolle, während VEGFR-1 bei der Gefäßbildung und auch in pathologischen Prozessen, wie Krebs, Ischämie und Entzündungen eine bedeutende Rolle einnimmt (12).

VEGF-B bindet nur an den VEGFR-1. Die VEGF-B Knock out Mäuse erscheinen äußerlich gesund und fertil. Bellomo und Kollegen entdeckten, dass diese Mäuse eine reduzierte Herzgröße und Defekte in der koronaren Blutgefäßbildung aufwiesen.

VEGF-C und VEGF-D binden an VEGFR-2 und -3 und haben eine bedeutende Rolle in der Lymphangiogenese. VEGFR-3 ist spezifisch auf den Lymphendothelzellen exprimiert und somit für die Lymphgefäßentwicklung entscheidend. Eine Inaktivierung von VEGFR-3 führt zu Lymphödemen.

VEGF-E wurde im Parapoxvirus Orf entdeckt. Dieses Zytokin bindet an den VEGFR-2. Es wurde gezeigt, dass VEGF-E ähnliche Aktivitäten wie VEGF-A aufweist und es scheint ebenfalls wie VEGF-A eine Endothelzellproliferation anzuregen (12).

PlGF wurde 1991 in der menschlichen Plazenta entdeckt und wird während der gesamten Schwangerschaft hoch exprimiert. PlGF bindet an VEGFR-1 und weist eine hohe Strukturähnlichkeit mit VEGF-A auf (12).

#### **2.1.4 Angiopoetine**

Angiopoetine gehören wie auch die VEGF- Familie zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und sind bei der Blutgefäßneubildung erforderlich. Die Angiopoetin-Familie besteht aus vier Faktoren, Angiopoetin-1 (Ang1), Angiopoetin-2 (Ang2), Angiopoetin-3 (Ang3) und Angiopoetin-4 (Ang4) und zwei Rezeptoren, Tie-1 und Tie-2 (17,18).

Alle Angiopoetine binden primär an den Tie-2- Rezeptor.

Um die physiologische Wirkung von Ang1 zu bestimmen, wurden Ang1 Knock-Out Mäuse erzeugt. Diese entwickelten weitgehend ein normales Blutgefäßsystem, das sich jedoch nicht weiter zu adulten Gefäßen entwickeln konnte. Die Endothelzellen konnten nicht mit den Stützzellen interagieren, die normalerweise Ang1 synthetisieren. Ang1 ist also für eine optimale Interaktion zwischen Endothelzellen und ihrer Umgebung und damit für die Bildung von funktionalen Blutgefäßen verantwortlich (19).

Ang2 blockiert in Endothelzellen den Tie2- Rezeptor und ist somit ein Antagonist von Ang1. Allerdings konnte Daly et al zeigen, dass Ang2 auch als Tie2 Agonist, wie auch Ang1 funktionieren kann. Der Tie2- Rezeptor wird auf Endothelzellen exprimiert. Ang2 funktioniert als autokriner Tie2- Blocker, als Promotor für die Remodellierung der Blutgefäße und ist an der Wiederherstellung von Gefäßdefekten beteiligt (20).

Ausserdem konnte gezeigt werden, dass Ang2 Knock-Out Mäuse ein desorganisiertes und hypoplastisch entwickeltes Lymphsystem haben (21).

### 2.1.5 Lymphangiogenese

„Das Lymphgefäßsystem ist ein Drainagesystem“ (Welsch), das letztendlich in die Venen oberhalb des Herzens mündet.

Täglich strömen ca. 2 l Flüssigkeit aus den Blutgefäßen in die Gewebsspalten. Diese Flüssigkeit gelangt dann über Gewebekanäle in die Lymphkapillaren. Diese Kapillaren beginnen blind und bilden ein ganzes Netzwerk. Gefüllte Lymphkapillaren haben einen Durchmesser von ca. 50µm, (der von Blutkapillaren beträgt 5-7 µm). Die dünnwandigen Lymphkapillaren sind mit einer Schicht von Lymphendothelzellen ausgekleidet. Diese Zellen sitzen auf einem subendothelialen Filz aus 10 nm dicken Kollagenfilamenten. Die Lymphkapillaren münden dann in immer größere Lymphgefäße ein. Diese besitzen Klappen und eine Muskelschicht, die den Transport durch rhythmische Kontraktion bis in die Lymphknoten vorantreibt. Nach Durchlaufen des Lymphknotens gelangt die Lymphe schließlich in große Lymphstämme und -gänge. Diese münden in den rechten und linken Venenwinkel der Vv. subclaviae und Vv. jugulares und leiten die Lymphe wieder in den Blutkreislauf.

Die Lymphgefäße transportieren die extrazelluläre Flüssigkeit und deren Proteine zurück in die venöse Gefäßzirkulation, sie spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr und sind eine Verbreitungsmöglichkeit von Tumorzellen (8).

Vom Tumor gelöste Tumorzellen gelangen häufig in die Lymphbahn, werden in den regionären Lymphknoten aufgefangen und fangen dort an zu wachsen, verstreuen weitere Tumorzellen über die efferenten Lymphgefäße (lymphogene Metastasierung).

Die frühe Lymphgefäßentwicklung wurde in Mausembryonen erforscht (22).

An der Entstehung und dem Wachstum von Lymphgefäßen, der Lymphangiogenese, sind VEGF-C und VEGF-D, sowie ihre Rezeptoren VEGFR-2 und -3, entscheidend beteiligt.

### **2.1.6 Merkmale von lymphatischen Endothelzellen**

Lymphatische Endothelzellen exprimieren spezifische lymphatische Oberflächenmoleküle, wie Prox-1, VEGF-3, LYVE-1 und Podoplanin.

Eine Subpopulation von Endothelzellen bilden Prox-1, damit sich aus diesen Zellen das lymphatische System entwickelt. Aus Tierversuchen ist bekannt, dass Prox-1-defiziente homozygote Mäuse eine unauffällige Vaskulogenese und Angiogenese zeigen, sich aber Lymphsystem und Leber nicht entwickelten.

Prox-1 ist außerdem für die Entwicklung von Retina und Pankreas notwendig (23).

Der LYVE-1 Rezeptor ist spezifisch auf vaskulären Lymphendothelzellen exprimiert. Es ist ein Membranprotein Typ I, das eine Rezeptorfunktion für lösliches und nicht mobilisiertes Hyaluron besitzt.

Hyaluron ist ein Glykosaminoglycan und ist eine wichtige Komponente der extrazellulären Matrix. Es ist an der Zellproliferation, Zellmigration und auch an der Entstehung von einigen malignen Tumoren beteiligt (24).

Der monoklonale LYVE-1 Antikörper ist gegen die extrazelluläre Domäne des menschlichen lymphatischen Endothelzell Hyaluronrezeptor 1 (rhLYVE-1) gerichtet. Er

wurde aus einer Fusion von Maus-Myelomzellen und B-Lymphozyten von einer mit menschlichem rhLYVE-1 immunisierten Maus gewonnen. Diese Fusionszellen aus der Maus wurden in Kaninchen gespritzt und aus deren Blut werden dann die Antikörper gegen den menschlichen rhLYVE-1 Rezeptor isoliert.

LYVE-1 ist ein Membranrezeptor Typ I, der freies und gebundenes Hyaluron bindet.

Hyaluron ist ein Glykosaminoglycan und ist eine wichtige Komponente der extrazellulären Matrix. Es ist an der Zellproliferation, Zellmigration und auch an der Entstehung von einigen malignen Tumoren beteiligt (24).

Dieser Rezeptor ist nur auf vaskulären Lymphendothelzellen exprimiert.

Der LYVE-1 Antikörper wird aus Kaninchen gewonnen und somit muss in der APAAP-Färbung ein Zwischenschritt für diese Zellen eingeführt werden.

Damit der Sekundärantikörper, der aus dem Kaninchen hergestellt wird und sich gegen Mausantigene richtet, auch hier bindet, wurde mit Absprache der Firma Dako der Monoclonal Mouse Anti- Rabbit Immunglobulins verwendet.

Podoplanin ist ein Membran- Mucoprotein mit einigen konservierten O-Glycosylierungsstellen. Es wurde erstmals auf der Oberfläche glomerulärer Ratten-Epithelzellen (Podozyten) detektiert. Es ist ein spezifischer Marker für lymphatische Endothelzellen.

## 2.2 Zirkulierende Endothelzellen

Die Bildung von neuen Blutgefäßen ist ein entscheidender Prozess für das Tumorwachstum und dessen Metastasierung (25).

Damit diese Gefäße entstehen können, müssen sich Endothelzellen ansammeln, sich differenzieren und das Lumen der neuen Gefäße bilden (26). In den frühen 1970er Jahren wurde erstmals das Interesse an frei zirkulierenden Endothelzellen und ihre Bedeutung bei verschiedenen Erkrankungen geweckt. Es wurden Methoden entwickelt, um diese Zellen zu identifizieren. Zirkulierenden Endothelzellen kommen nur in einer sehr geringen Anzahl im Blut vor (0,01%- 0,0001%) und die Suche nach geeigneten Methoden um sie genauer zu charakterisieren gestaltete sich sehr schwierig. Als erstes wurde die Immunfluoreszenzfärbung mit vWF als Antikörper benutzt.

Als der monoklonale Antikörper **P1H12** (auch CD146, S-endo-1, Mel-CAM, MUC18 genannt) von *George F et al.* 1991 entdeckt wurde, waren die Multicolour Flow Cytometry, real time PCR (polymerase chain reaction) und weitere Antikörperfärbungen möglich (27).

Der P1H12 Antikörper ist ein monoklonaler Anti-Endothelzell-Antikörper, der in Mäusen hergestellt wird. Er bindet spezifisch an den Interleukin-6 Rezeptor (CD126) der Endothelzellen.

Interleukin 6 reguliert den VEGF (vascular endothelial growth factor) und wird von verschiedenen Zellen während einer Infektion, eines Traumas oder einer Immunreaktion ausgeschüttet.

Außerdem spielt es eine wichtige Rolle während einer Krankheit und ist bereits als inflammatorisch und anti- inflammatorisches Cytokeratin entdeckt worden (28). Interleukin 6 bindet an den IL-6 Rezeptor und bildet somit einen ligandgesteuerten Rezeptorkomplex, der eine Zellproliferation, Differenzierung und Aktivierung im entzündlichen Prozess beeinflusst.

Die Immunisierung der Mäuse erfolgte mit HUVECs.

P1H12 bindet an zirkulierende Endothelzellen im Menschen, im Hund, im Kaninchen und in der Maus.

P1H12 färbt keine Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten, Thrombozyten und keine Leukozyten weder im Knochenmark noch im peripheren Blut. Es werden nur die frei zirkulierenden Endothelzellen durch diesen Antikörper gefärbt. Diese gefärbten Zellen sind außerdem für den von Willebrand Factor (vWF) und Thrombomodulin positiv.

Thrombomodulin ist ein integrales Membranprotein, das auf der Oberfläche von Epithelzellen exprimiert wird. Es ist ein Cofaktor in der thrombininduzierten Aktivierung von Protein C, das an der Antikoagulation beteiligt ist und bildet den Thrombomodulin- Thrombinkomplex.

Jetzt wurde gezeigt, dass sich bei verschiedenen Erkrankungen die zirkulierenden Endothelzellen im Blut erhöhen. *Dignat- George et al.* fand die CECs bei Rickettsien Infektion, Sichelzellanämie, thrombotisch thrombozytopenischen Purpura und dem akuten Koronarsyndrom. Eine Vielzahl von Untersuchungen hat gezeigt, dass sich die

CECs in verschiedensten Erkrankungen erhöhen, wie z. B. bei Infektionen, kardiovaskulären Ereignissen, Tumoren und Entzündungen (29).

Die zirkulierenden Endothelzellen werden von der Endothelzellschicht der Blutgefäße abgelöst und sind dann im peripheren Blut nachweisbar. Diese Zellen exprimieren Endothelzellmarker, wie vWF, VE-Cadherin und das Membranglykoprotein CD146 (P1H12). Durch das Fehlen von dem Leukozytenmarker CD45 und dem Stammzellmarker CD133 auf diesen Zellen, können sie eindeutig den Endothelzellen zugeordnet werden.

Die CECs werden nur sehr selten bei gesunden Probanden gefunden, dafür ist ihre Anzahl bei immunologischen und kardiovaskulären Erkrankungen, Infektionen und Tumoren deutlich erhöht. Es wird angenommen, dass die Erhöhung der CECs durch die direkte Schädigung des Endothels ausgelöst wird (29).

Patienten mit einem fortschreitendem Tumorleiden und bereits vorhandenen Metastasen weisen im Vergleich zu gesunden Patienten ein 3,6-fach erhöhte zirkulierende vaskuläre Endothelzellzahl auf. Tumorpatienten in einem stabilen Zustand (stable disease) haben eine ähnlich niedrige Anzahl der CECs (circulating endothelial cells) wie gesunde (30).

Die Zahl der zirkulierenden Endothelzellen korreliert mit dem Tumorstadium (progressive/stable disease) und damit auch mit der Prognose für die Patienten.

Die Anzahl von CECs (Circulating Endothelial Cells) im peripheren Blut kann als Surrogatmarker für die Beurteilung der Tumorangiogenese genutzt werden (26).

## 2.3 Zirkulierende Tumorzellen

Einzelne Zellen können sich mit Hilfe von histolytischen Enzymen (z.B. E-Cadherine) aus dem Zellverband ihres Primärtumors lösen. Sie können die umgebenden Bindegewebsstrukturen mit Hilfe von Metalloproteasen auflösen, um in die Lymph- oder Blutbahn zu gelangen.

Diese Tumorzellen sind durch einen Fibrin-Thrombozyten-Belag vor den Immunzellen des Körpers geschützt. Wenn diese Zellen durch das Blut zirkulieren, können sie in der

terminalen Endstrombahn hängen bleiben und einen Tumorembolus bilden. Über Oberflächenrezeptoren können die Tumorzellen an Endothelzellschichten binden und die Basalmembran zerstören. Mit Hilfe von proteolytischen Enzymen können sie dann in das Gewebe einwandern und ein eigenes Gefäßsystem entwickeln (31).

Die Mehrzahl der Tumorpatienten versterben nicht an ihrem Primärtumor, sondern an den Metastasen. Damit Metastasen entstehen, müssen die Tumorzellen eine Reihe von zusammenhängenden Schritten durchlaufen. In der folgenden Abbildung sind diese Schritte schematisch dargestellt.

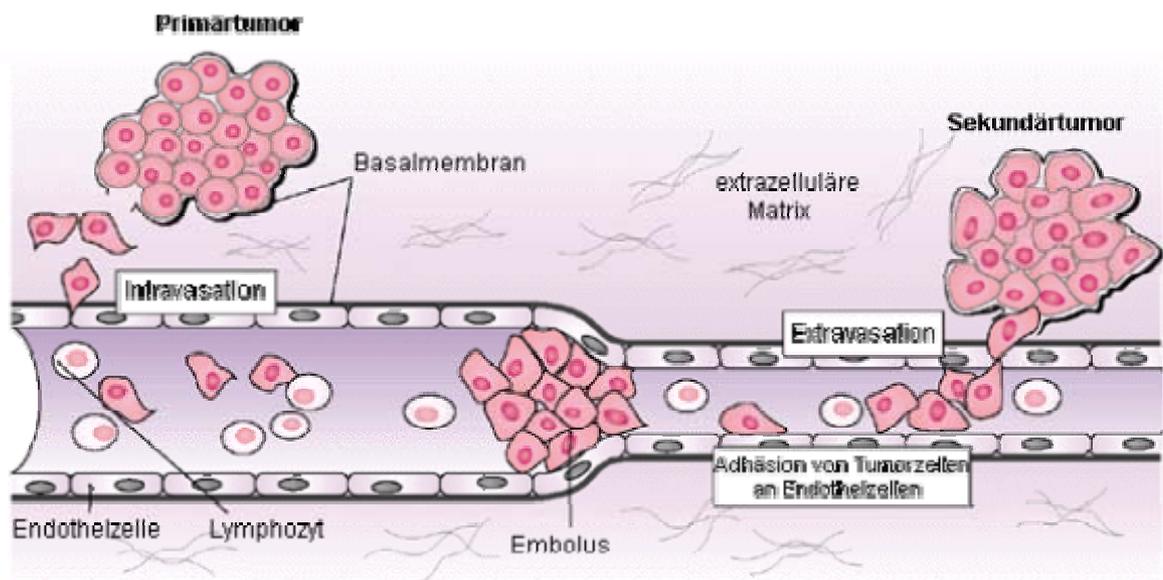


Abb. 3: Entstehung von Metastasen

Einige invasive Zellen des Primärtumors durchdringen die extrazelluläre Matrix (Stroma), die Endothelzellschicht von Blut- oder Lymphgefäßen und überleben in einer für sie völlig neuen Umgebung. Die Tumorzellen bleiben in den kleinen Blutgefäßen hängen. Es können Mikroembolien entstehen und durch die Anheftung der Tumorzelle an die Endothelgefäßwand beginnt die Extravasation und das Einwandern in das Gewebe. Aufgrund von Wachstumsfaktoren und einer Vielzahl von anderen Faktoren proliferiert die Tumorzelle und baut sich ihre eigene Blutgefäßversorgung (Tumorangiogenese) auf.

Die frei im Blut zirkulierenden Tumorzellen können durch verschiedene Methoden gemessen werden. Durch die Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Patientenvollblut mittels FICOLL, wurden die Zellen mit der APAAP-Methode gefärbt (32). Für die Identifizierung von zirkulierenden epithelialen Tumorzellen wurde der Cytokeratin-Antikörper A45-B/B3 verwendet (33).

Das Cytoskelett fast aller Epithelzellen besteht aus Cytokeratinfilamenten. Cytokeratine zählen zu der Gruppe der Intermediärfilamente, die zusammen mit den Mikrotubuli und Mikrofilamenten das Cytoskelett, also die Struktur und die Form der Zellen bilden. Es sind bereits 20 verschiedene Cytokeratine bekannt. Im Blut kommen diese nur als lösliche Fragmente vor, die dann messbar sind. Erhöhte Serumspiegel dieser Cytokeratine kommen besonders bei Mammakarzinompatienten vor. Aber auch bei anderen malignen Tumoren konnte eine Serumkonzentrationserhöhung festgestellt werden. Dieses lässt sich möglicherweise durch den hohen Zellumsatz bei diesen Patienten erklären.

CK1-CK8 werden zu der neutral- basischen Typ-B oder Typ II Subfamilie gezählt, CK9- CK20 stellen die saure Typ A oder Typ I Subfamilie dar. Diese Cytokeratine bilden in den Intermediärfilamenten Heterodimer- Komplexe, die jeweils aus einem Typ A und einem Typ B Cytokeratin bestehen. Diese Verteilungsmuster unterscheiden sich in den verschiedenen Epithelzellen so erheblich, dass mit Antikörpern gegen die Subtypen CK1-CK20 die Herkunft der Zellen eingegrenzt werden kann. So kann zum Beispiel die Herkunft von Tumormetastasen bestimmt werden.

In der folgenden Tabelle sind einige wichtige Cytokeratine aufgelistet.

| <b>A</b> (neutral-basisch) | <b>B</b> (sauer) | <b>Vorkommen</b>  |
|----------------------------|------------------|---|
| CK 1, 2                    | CK 9, 10         | mehrschichtig-verhornendes Epithel (Epidermis)          |
| CK 3                       | CK 12            | Hornhaut (Cornea)                                       |
| CK 4                       | CK 13            | mehrschichtig-unverhorntes Epithel                      |
| CK 5                       | CK 14, CK15      | Basalzellen komplexer Epithelien sowie Myoepithelzellen |

|      |             |  |
|------|-------------|--|
| CK 6 | CK 16, CK17 | mehrschichtig-unverhorntes Plattenepithel, Proliferation |
| CK 7 | CK 19       | einschichtiges Epithel, luminale Drüsenzellen            |
| CK 8 | CK 18, CK20 | einschichtiges Epithel, luminale Drüsenzellen            |

Tab. 1: Cytokeratinübersicht

Mit diesem Antikörper wurde in unseren Patientenblutproben nach allgemeinen zirkulierenden Tumorzellen gesucht.

## 2.4 Herstellung der Antikörper

Die verwendeten monoklonalen Antikörper, können mit einer hohen Spezifität ihr Antigen erkennen und so die gesuchten Zellen, hier zirkulierende Tumorzellen, vaskuläre und lymphatische Endothelzellen, binden und durch die APAAP-Färbung können diese sichtbar gemacht werden.

Um so einen Antikörper herzustellen, muss zuerst ein Antigen ausgewählt und produziert werden. Anschließend wird dieses Protein dann in ein Tier eingespritzt, bei den hier verwendeten Antikörpern ist es für P1H12 und A45-B/B3 die Maus und für den LYVE-1 Antikörper das Kaninchen, so dass dessen Immunsystem dann Antikörper gegen das bestimmte Antigen bildet. Die Antigene sind in diesem Fall bei dem A45-B/B3 Antikörper die Cytokeratine CK8, CK18 und CK19, bei dem LYVE-1 Antikörper der auf lymphatischen Endothelzellen vorkommende Hyaluronrezeptor 1 (rhLYVE-1) und für den P1H12 Antikörper der CD146-Rezeptor auf den HUVECs. Diese Immunisierung wird mehrmals wiederholt und nach einigen Wochen können dann die Antikörper aus dem Blut der Tiere isoliert werden.

## 2.5 Studie SU014813

### 2.5.1 Rationale

Angiogenese spielt eine große Rolle beim Wachstum, Invasion und Metastasierung von menschlichen Tumoren. Die folgenden drei Wachstumsfaktoren spielen hierbei eine große Rolle: VEGF (Vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor). Eine Mehrzahl von vorklinischen Studien haben gezeigt, dass die Blockierung eines oder mehrerer dieser Rezeptoren das Tumorwachstum stoppt, vor einer Metastasierung schützt oder eine Tumorregression bewirkt.

VEGF und PDGF- Rezeptoren sind direkt auf den Tumorzellen expressiert und regulieren möglicherweise das Überleben und die Proliferation durch einen autokrinen Loop-Mechanismus wie z.B. PDGFRb in Gliomen, VEGFR2 in Melanomen, KIT in SCLC (small cell lung cancer) und FLT 3 bei der AML.

SU014813 ist ein oraler Tyrosinkinase- Inhibitor, der selektiv den PDGF- Rezeptor, VEGF- Rezeptor 1+2, KIT und FLT 3 und die RTKs (receptor tyrosine kinases) inhibiert.

SU014813 ist das Nachfolgepräparat von SU011248. Es ist ein ähnlich kleines Molekül und scheint weniger Nebenwirkungen zu verursachen. In vitro wurde gezeigt, dass SU014813 die gleiche Potenz wie SU011248 für die Blockierung der ligandengesteuerten Rezeptoren (VEGFR-2, PDGFRb) und die FLT 3-Phosphorylierung aufweist.

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass SU014813 eine Anti-Tumoraktivität in Mäusen aufweist. Es induziert eine Regression von Colo205 (menschliches Colonkarzinom), 786-0 (menschliches Nierenzellkarzinom) und MV411 (menschliche AML) und hält das Tumorwachstum in C6-Ratten von Gliomen auf.

### 2.5.2 Pharmakokinetik

Die orale Absorption in Mäusen, Ratten und Affen ist sehr schnell und erreicht eine maximale Plasmakonzentration nach 1,5 Stunden. SU014813 liegt bei Mäusen und Menschen zu 95% proteingebunden vor.

SU014813 wird von den P450- Leberenzymen, besonders von CYP3A4 und CYP1A2 metabolisiert. Es wurden keine anderen aktiven Metaboliten gefunden.

### **2.5.3 Freiwillige gesunde Testpersonen**

Es wurde eine Phase I pharmakokinetische Doppelblindstudie an 6 gesunden männlichen Probanden mit einer Einmaldosis durchgeführt. Die Probanden bekamen entweder 12,5 mg von SU014813 als eine orale Einmaldosis oder Placebo. Es kam zu keinen nennenswerten Ereignissen.

### **2.5.4 Ziel der Studie**

Es sollte die maximal tolerierte Dosis (MTD) von SU014813 bei täglicher Gabe über 5 Wochen an Patienten mit soliden Tumoren festgestellt werden. Außerdem sollte die DLTs (dose limiting toxicities), die nicht dosislimitierte Toxizität und der Anti- Tumor Effekt untersucht werden.

Bei den Patienten wurde am Tag 1, 7 und 28 Blut entnommen. Nach der Aufreinigung und Isolierung der mononukleären Zellen, wurden die Cytospins für die APAAP-Färbung hergestellt.

### **2.5.5 Auswahlkriterien der Patienten**

Die Patienten mussten einen histologisch gesicherten Befund von einem malignen soliden Tumor aufweisen, der durch keine andere Therapie behandelt werden konnte oder wo eine Therapie bereits keinen Erfolg gezeigt hat.

Sie mussten über 18 Jahre alt sein. Zur letzten Chemotherapie musste ein Abstand von mindestens 3 Wochen bestehen, 4 Wochen zur letzten Bestrahlung und 6 Wochen zur Gabe von Nitrosoharnstoffe oder Mitomycin C. Das Serumalbumin musste  $\geq 3.0$  g/dL sein. Außerdem musste das Blutbild eine gute hämatopoetische Funktion aufweisen (Neutrophile  $\geq 1500/\text{mmc}$ , Thrombocyten  $\geq 75000/\text{mmc}$  und Hb  $\geq 10$  g/l), eine gute Nierenfunktion (Serumkreatinin  $< 1.5$  x vom jeweiligen oberen Laborgrenzwert) und eine ausreichende Leberfunktion (Serumbilirubin  $< 1,5$  x vom jeweiligen oberen

Laborgrenzwert, ALT/AST  $\leq 2,5$  x oberer Grenzwert (bei Lebermetastasen  $\leq 5$  x), Alkalische Phosphatase  $\leq 2,5$  x oberer Grenzwert (bei Knochen oder Lebermetastasen  $\leq 5$  x)).

Die Patienten wurden über die Studie ausführlich aufgeklärt und mussten ihr Einverständnis zu allen durchgeführten Maßnahmen geben.

Patienten mit Hirnmetastasen, einer spinalen Kompression oder einer Menigenmetastasierung wurden für diese Studie nicht zugelassen. Auch Patienten die einen Herzinfarkt oder koronale Bypässe aufwiesen oder an HIV (human immunodeficiency virus) erkrankt waren, wurden ausgeschlossen.

Die Patienten in der Studie durften zusätzlich keine Chemotherapeutika, keine Immuntherapeutika und keine hormonelle Medikamente (hier ausgenommen waren Kontrazeptiva oder Appetitanreger) einnehmen.

### **2.5.6 Auswertung**

Während der Studie mussten folgende Ereignisse sofort an den Sponsor gemeldet werden: Tod, lebensbedrohliche Situationen, Ereignisse, die einen längeren Krankenhausaufenthalt als geplant veranlassen oder zur Hospitalisierung führen und kongenitale Anomalien.

Auch auffällige Laborwerte oder auffällige körperliche Untersuchungen mussten dem Sponsor mitgeteilt werden. Bei allen Patienten mussten vorher Laborwerte, eine Urinuntersuchung und bei Frauen ein Schwangerschaftstest durchgeführt werden

Das Tumoransprechen der Studienpatienten wurde anhand der RECIST Kriterien (Thessa P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. J Natl Cancer Inst 2000, 92: 205-16) bestimmt.

Das Ansprechen der Tumore wurde in komplette Remission, partielle Remission, Progression oder als stabile Situation eingeteilt.

Plasmakonzentrationen von VEGF, VEGFR2 und c-KIT wurden an Tag 1, 8, 15 und 28 mittels ELISA (enzyme-linked Immunosorbent Assay) bestimmt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Immunhistochemische Färbung zirkulierender Tumorzellen

#### 3.1.1 APAAP-Färbung

In folgender Abbildung ist das Prinzip der Färbung dargestellt.

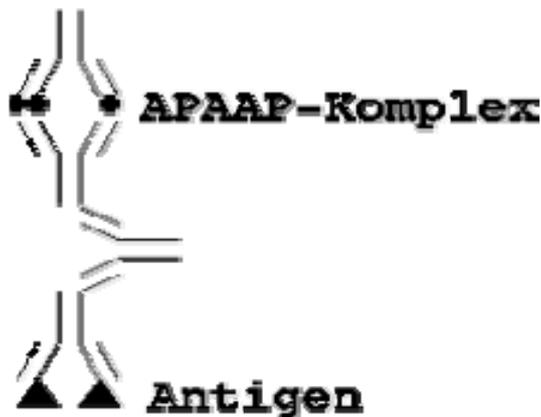


Abb. 4: Antigen-Antikörper-Komplex bei der APAAP-Färbung

Das Antigen, das auf der Zelloberfläche sitzt, wird zunächst von dem Primärantikörper gebunden.

An diesen Antikörper bindet der Brückenantikörper (Z 259), der dann vom APAAP-Komplex erkannt und gebunden wird. Durch das Enzymsubstrat kann dieser Komplex sichtbar gemacht werden.

Die Objektträger wurden etwa 30 Minuten bei Zimmertemperatur in der Aluminiumfolie aufgetaut.

Die Zellareale wurden mit dem Dako Pen umkreist und die Objektträger 5 Minuten in 100%-igem Aceton fixiert. Danach wurden die Objektträger 3x3 Minuten im 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnten PBS- Puffer (pH 7,4) gespült.

Auf jedes Zellareal wurden dann 150µl 10%-ige AB/PBS-Lösung pipettiert, um die unspezifischen Bindungen zu blockieren.

AB-Serum ist ein antikörperfreies, humanes Serum der Blutgruppe AB.

Nach 20 Minuten Inkubationszeit wurde die AB/PBS-Lösung von den Objektträgern entfernt und sofort der Primärantikörper bzw. die negative Kontrolle auf die Zellen pipettiert.

Die Antikörper A45 und P1H12 wurden in der Konzentration von 2µg/ml auf die Zellareale gegeben.

Beide Antikörper stammen aus der Maus und somit musste die Isotypkontrolle auch aus der Maus stammen. Hier wurde MOPC 21 in der Verdünnung 1:500 mit 10%-igem AB/PBS-Serum verwendet. MOPC 21 ist ein Maus- Myelom Protein IgG1κ.

Der LYVE-1 Antikörper wurde in der Konzentration von 50µl/ml auf die Cytospins pipettiert.

Diese Fusionszellen aus der Maus wurden in Kaninchen gespritzt und aus deren Blut werden dann die Antikörper gegen den menschlichen rhLYVE-1 Rezeptor isoliert.

Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten wurden alle Objektträger 3x3 Minuten mit der PBS-Lösung in getrennten Behältern gewaschen. Dann wurden die Objektträger einzeln wieder in die feuchte Kammer überführt und wurden sofort mit dem nächsten Antikörper, dem Sekundärantikörper beschickt.

Der Sekundärantikörper Z0259 reagiert mit allen murinen IgG-Unterklassen, Maus IgA und Maus-IgM.

Bei den mit LYVE-1 beschickten Objektträgern wurde vorher noch ein Zwischenschritt durchgeführt, weil der Sekundärantikörper ein Rabbit Anti-Mouse-Antikörper ist und der LYVE-1-Antikörper aus dem Kaninchen hergestellt wird. Mit Absprache der Firma Dako wurde der Monoclonal Mouse Anti-Rabbit Immunglobulin-Antikörper M0737 verwendet. Dieser Antikörper ist für die Markierung von Zellen mit Kaninchen-Primärantikörpern bestimmt.

Es wurde hier eine Konzentration von 20µl/ml verwendet.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde jetzt, nach dem Waschen in der PBS-Lösung, der Sekundärantikörper auf alle Objektträger aufgetragen.

Die Objektträger mit dem Sekundärantikörper Z259 wurden für 30 Minuten inkubiert, dann wurden die Objektträger 3x3 Minuten in PBS- Lösung gewaschen.

Dann wurde der APAAP- Komplex in einer 1:100 Konzentration auf die Zellareale pipettiert.

Der APAAP- Komplex ist ein Visualisierungsreagenz, das in der Immunzytochemie, beim Immunblotting und in ELISA- Verfahren verwendet wird. In der Immunzytochemie erweist sich der APAAP-Komplex besonders in Verbindung mit primären Mausantikörpern vorteilhaft bei der Anfärbung von Präparaten mit einem hohen Anteil an endogener Peroxidase, wie z.B. Blut und Knochenmark. Endogene alkalische Phosphatasen werden leicht durch Zugabe von Levamisol zum Enzymsubstrat inhibiert. Im APAAP-Komplex wird die alkalische Phosphatase von Levamisol nicht beeinflusst.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die Objektträger 3x3 Minuten in der PBS- Lösung gewaschen. In dieser Zeit wurde das Enzymsubstrat bei jeder Färbung frisch hergestellt.

Es wurden parallel drei Lösungen angesetzt, die dann kurz vor dem Pipettieren auf die Objektträger in einer bestimmten Reihenfolge zusammengebracht wurden.

Die erste Lösung besteht aus 78,8 ml demineralisiertem Wasser, 4,2 ml TRIS-Puffer pH= 9,5 und 200µl Levamisol 0,625 M.

Die zweite Lösung bestand aus 415µl NaNO<sub>2</sub> Stocklösung und 166µl 5%-igem Neufuchsin, die 3 Minuten inkubiert wurde.

Die dritte Lösung bestand aus 42mg Naphtol-AS-Bi-Phosphat, das in 500µl Dimethylformamid gelöst wurde.

Die zweite Lösung wurde in die erste gegeben und gut gemischt. Dann kam die dritte hinzu und das Enzymsubstrat wurde filtriert.

Es wurden auf jedes Zellareal  $180\mu\text{l}$  Enzymsubstrat pipettiert und alle Objektträger für 20 Minuten inkubiert. Nach dem 3x3 Minuten Waschen in der PBS-Lösung folgte nun die Gegenfärbung. Die Objektträger wurden erst für 20 Sekunden in eine 1:5 mit demineralisiertem Wasser verdünnte Hämalaun-Lösung und dann wurden einmal kurz in destilliertes Wasser getaucht. Danach wurden sie 3-4 mal in 0,1%-igen Essigsäure, 3-4 mal wieder in destilliertes Wasser, 30 Sekunden in  $\text{NaHCO}_3$  (Natriumhydrogencarbonat) gegeben und schließlich 3x3 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen.

Das Eindeckeln der Objektträger erfolgte mit dem DAKO-Mounting medium.

Nachdem dieses Medium getrocknet war, konnten die Objektträger mit dem Barcode in den ACIS (Automated Cellular Imaging System) eingelesen werden (siehe Abbildung).

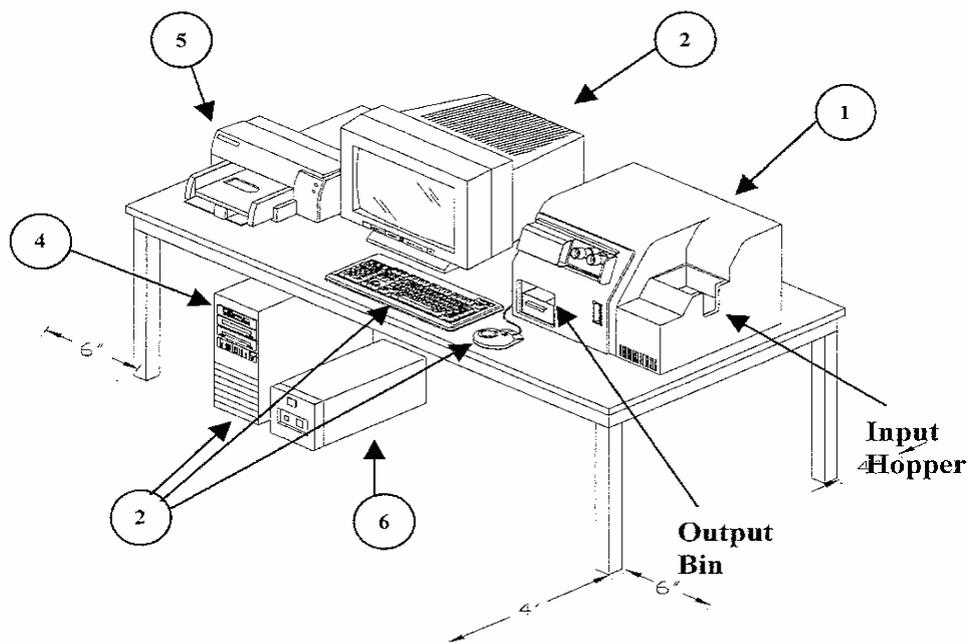


Abb. 5: ACIS-Computer; 1 ACIS Mikroskop, 2 Prozessor, Monitor, Tastatur und Maus, 4 CD-Laufwerk, 5 Drucker, 6 Stromversorgung

Das ACIS System kann gefärbte Zellen aufgrund ihrer Farbe, Form und Größe erkennen und speichern. Dieses System besteht aus einem automatisierten, robotergesteuertem Mikroskop mit einem digitalen Bild- Prozessor, der für die Analysierung der auf Glasobjektträgern fixierten Zellen zuständig ist. Außerdem gehört noch ein PC mit dem Windows NT Programm dazu.

Die Software erkennt aufgrund der Farbe und der dazugehörigen Form und Größe die positiven Zellen der gefärbten Objektträger. Diese durchlaufen roboterbewegt und softwarekontrolliert den ACIS, während die digitale Kamera jedes Einstellungsfeld fotografiert. In diesen Einstellungsfeldern vergrößert das Mikroskop einzelne Gebiete mit positiven Ereignissen und speichert diese. Da jedes fotografiertes Gebiet einem Einstellungsfeld zugeordnet werden kann, kann jede positive Zelle zurückverfolgt werden und genau auf dem Objektträger lokalisiert werden.

Damit die Kamera so genau arbeiten kann, müssen auf dem Objektträger die Zellen aber auch der Hintergrund spezifische Kriterien erfüllen, wie zum Beispiel eine bestimmte Intensität der Farbe entsprechen und auch die ungefähre Größe und Form der gesuchten Zellen muss der Software bekannt sein. Auch dürfen die Zellen nicht zu dicht nebeneinander liegen.

Das Instrument muss täglich kalibriert werden. Es müssen bei jedem Durchlauf Kontrollobjektträger dabei sein.

Damit die gespeicherten Ereignisse den richtigen Objektträgern zuzuordnen ist, muss jeder Objektträger mit einem einmaligen Barcode versehen werden. Für die Objektträger gibt es extra Plastikgestelle, in die 4 Objektträger hintereinander eingespannt werden können und sich so gleichzeitig in der richtigen Position für das Mikroskop befinden. Bis zu 100 Objektträger können gleichzeitig eingegeben werden.

Die exzellente Sensitivität, die Reproduzierbarkeit der Daten und Zuverlässigkeit des ACIS wurde von Bauer et al (34) im Jahr 2000 getestet und bewiesen.

## 3.2 Validierung der Methode

### 3.2.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut oder Buffy Coats

Das Vollblut wurde in EDTA-Röhrchen abgenommen und in einem Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt. Das Volumen des Spenderblutes betrug circa 50 ml. Dieses wurde dann in dem Verhältnis 2:3 auf FICOLL aufgetragen und mittels der Zentrifuge für Reaktionsgefäße zentrifugiert (30 min., 20°C, 1390 Umdrehungen, 400 g ohne Bremse). Das Volumen der Buffy Coats aus Blutkonserven gesunder Blutspender betrug auch circa 50 ml.

Aus den Proben wurden die mononukleären Zellen mittels Dichtezentrifugation mit FICOLL aufgereinigt.

Nach der Zentrifugation wurde die Schicht aus mononukleären Zellen, die genau zwischen dem FICOLL (unten) und dem Plasma/PBS (oben) liegt vorsichtig abpipettiert und 1:1 mit PBS verdünnt. Jetzt folgten noch mindestens drei Waschschrte (300 g, 5 Minuten, 4°C) mit PBS. Es kam bei roten Zellpellets zur zusätzlichen Verwendung von Erylysepuffer. Dieser besteht aus einer hypotonen Salzlösung, die das Wasser in die Erythrozyten strömen lässt, so dass diese platzen und lysiert sind.

Nach einer Resuspension mit 5 ml eisgekühltem Erylysepuffer und einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen nach Zugabe vom 10 ml PBS erneut abzentrifugiert (300g, 5 Minuten, 4°C). Der folgende Waschschrte entfernte die Reste des Erylysepuffers.

Die Zellen wurden gezählt und so verdünnt, dass in 700µl 700.000 Zellen waren, denn die Herstellung der Cytospins musste sofort im Anschluss erfolgen, da die Zellen nur etwa 90 Minuten in dem PBS- Puffer überleben. In dieser Zeit müssen die Falkonröhrchen ständig in Bewegung sein, da sich die Zellen sonst aneinander lagern.

Das Zählen erfolgte mit Trypanblau mit einer Verdünnung von 1:10 und gegebenenfalls von 1:100.

### 3.2.2 Aufbewahrung der Cytospins

Die Objektträger brauchen nach der Zentrifugation mindestens 3 Stunden an der Luft bei Raumtemperatur zum Trocknen. Danach wurden immer 2 Objektträger zusammen

in Aluminiumfolie gewickelt und dann in die  $-80^{\circ}\text{C}$  Gefriertruhe zur Aufbewahrung gelagert. Die Zellen sind so über Jahre haltbar.

### **3.2.3 Kultivierung der Zellen**

Alle Zellen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$ , humider Atmosphäre und 5%  $\text{CO}_2$  im Zellkultur-Inkubator kultiviert. Die Kontrolle und Begutachtung der Zellen erfolgte mit dem Umkehrmikroskop. Diese Aufgaben führte freundlicherweise Jasmin Otten (Diplom-Biologin, Prof. Fiedler) durch.

### **3.2.4 Positive Kontrollzellen**

Wir versuchten für alle drei von uns verwendeten Antikörper positive Zellen zu finden. Für die vaskulären Endothelzellen wurden die HUVECs verwendet. Nach einigen Testfärbungen konnte gezeigt werden, dass diese Zellen für die APAAP-Färbemethode verwendet werden konnten, da auch die Software vom ACIS diese positiven Zellen erkennen konnte.

Der Tumorantikörper A45 wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. K. Pantel, Institut für Tumorbiologie, UKE bereits für die APAAP-Färbung verwendet und für die positive Kontrolle erhielten wir die MCF7-Zellen freundlicherweise aus diesem Institut. Für die Kultivierung der Zellen danke ich Jasmin Otten.

### **3.2.5 HUVECs**

Diese Zellen wurden kommerziell von der Firma Cambrex erworben.

Die HUVECs wurden in sterilen Zellkulturflaschen mit EGM-2- Kompletmedium kultiviert. Sie wurden alle 3 Tage mit dem Medium gefüttert. Die Zellen wurden gegebenenfalls durch Zugabe von Trypsin + EDTA in PBS und 5 Minuten Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  1:4 geteilt.

HUVECs sind Zellen, die aus menschlicher Nabelschnurvene isoliert wurden.

Die Analyse der Oberflächenantigene von HUVECs im Vergleich mit anderen Zellen mittels Durchflusszytometrie hatte gezeigt, dass die Interleukin-6 Rezeptoren (CD126) auch auf Endothelzellen vorkommen. P1H12 bindet an dieses Antigen. Für die APAAP-Färbung wurden verschiedene Verdünnungen des Antikörpers gegen P1H12 untersucht. Schon in diesen Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass sich der P1H12-Antikörper für diese Färbemethode eignete. Die Verdünnungsreihen zeigten die besten Färbungsergebnisse bei einer P1H12-Konzentration von 2 µg/ml, die unter dem Mikroskop und im ACIS bestätigt wurde.

### **3.2.6 MCF7- Tumorzellen**

Diese Zellen erhielten wir freundlicherweise aus dem Institut für Tumorbilogie, Prof. Pantel. Sie sind auch kommerziell erwerbbar (z.B. Fa. Biotech).

Die MCF7-Tumorzellen wurden in sterilen Zellkulturflaschen mit RPMI + 10% FBS (fötales bovines Serum) kultiviert. Diese Zellen wurden je nach Dichte geteilt.

### **3.2.7 Verdünnungsreihen**

Die Zellzahlen aus den Versuchen mit den gesunden und den Tumorpatienten außerhalb der Studie zeigten uns, dass der Anteil an Tumor- bzw. Endothelzellen im Blut gering war. Da unsere gesuchten Zellen nur zwischen 0,0002- 0,005% der mononukleären Zellen im Blut ausmachen, musste die Sensitivität von dem ACIS getestet werden.

Es wurden Verdünnungsreihen mit den Kontrollzellen (HUVECs und A45-Tumorzellen) in den Verdünnungsstufen 1:1000 (700 positive Zellen auf einem Objektträger), 1:10.000 (70 positive Zellen/Objektträger), 1:100.000 (7 positive Zellen/Objektträger) und 1:1.000.000 (0,7 positive Zellen/ Objektträger) hergestellt, gefärbt und in den ACIS eingelesen.

Proben mit ausschließlich mononukleären Zellen dienten als Negativkontrolle.

### 3.2.8 Patientenproben

Es wurden Buffy coats von 10 gesunden Probanden gesammelt, wie oben beschrieben aufgearbeitet und mit der APAAP-Methode gefärbt.

Die Buffy coats wurden freundlicherweise von der Blutbank zur Verfügung gestellt.

Aufgrund von diesen Ergebnissen konnte die Anzahl der vaskulären und lymphatischen Endothelzellen sowie Tumorzellen bei gesunden Probanden ermittelt werden.

Es wurden Proben von 10 Tumorpatienten außerhalb der Studie gesammelt, die alle maligne solide Tumoren hatten und bereits metastasiert waren. Das periphere Blut wurde in Heparin-Röhrchen abgenommen und die Mononukleären Zellen (MNC) wurden mit Hilfe eines FICOLL-Hypaque Gradienten mittels Dichtezentrifugation aufgetrennt [siehe 3.2].

Aus diesen isolierten MNC wurden Cytospins mittels Zytozentrifuge hergestellt. Auf jedem Objektträger befanden sich, wie auch bei den Studienpatienten, 700.000 Zellen. Für eine Färbung wurden mindestens 3 Objektträger, das entspricht  $2 \times 10^6$  Zellen, benötigt.

Diese Objektträger wurden genauso wie die Studienpatientenobjektträger nach der APAAP (Alkalischen Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase)-Methode gefärbt.

Aus diesen Ergebnissen konnte die ungefähre Anzahl von vaskulären und lymphatischen Endothelzellen sowie Tumorzellen in dem Blut der Patienten herausgefunden werden.

Alle Patienten stimmten der wissenschaftlichen Verwertung ihrer Proben zu.

### 3.3 Chemikalien

Die folgende Tabelle zeigt die verwendeten Chemikalien.

| Bezugsquelle              | Chemikalien/Medizinprodukt   |
|---------------------------|--|
| DAKO, Glostrup (Dänemark) | Dako Pen, S 2002   |
|                           | Mouse Anti-Rabbit Immunglobulins, M 0737, Klon MR12/53               |
|                           | Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins, Z 0259                  |
|                           | APAAP, Mouse Monoclonal, Klon AP7/6/7, Isotyp IgG1 $\kappa$ , D 0651 |
|                           | Mounting medium, C563  |
| Merck, Darmstadt          | Aceton zur Analyse 100%  |
|                           | NaNO <sub>2</sub> Stocklösung, 9546                                  |
|                           | Neufuchsin, 4041   |
|                           | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 1.06580.1000   |
|                           | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 4873.1000                          |
|                           | Natriumnitrit, 9546  |
|                           | N,N-Dimethylformamid, 3053   |
|                           | HCL 5 Molar, 9911  |
|                           | Essigsäure 100%, 0063  |
|                           | NaHCO <sub>3</sub> , 6329  |
| Biotest AG, Dreieich      | AB-Serum, 805135   |
| Sigma, Deisenhofen        | MOPC 21, M 9269  |
|                           | Levamisol 0,625 M, L 9756  |

|                              |  |
|------------------------------|--|
| Bezugsquelle                 | Chemikalien/Medizinprodukt                             |
| DAKO, Glostrup (Dänemark)    | Dako Pen, S 2002                                       |
|                              | Mouse Anti-Rabbit Immunglobulins, M 0737, Klon MR12/53 |
|                              | TRIS-Puffer pH= 9,5, T 1503                            |
|                              | Trypanblau, Trypan Blue Solution 0,4%                  |
|                              | Naphtol-AS-Bi-Phosphat                                 |
| Cambrex, New Jersey, USA     | EGM-2- Kompletmedium                                   |
| Biochrom AG, Berlin          | Biocoll Separating Solution (Ficoll)                   |
| Chemicon, Temecula, USA      | P1H12-Antikörper MAB 16985                             |
| Micromed, München            | A45-B/B3-Antikörper, FAR 002A                          |
| ReliaTech GmbH, Braunschweig | LYVE-1 Antikörper, MAB 2089                            |
| Baker, Deventer, Holland     | NaCl 0278  |
| Gibco, Karlsruhe             | Trypsin-EDTA (10x)                                     |

Tab. 2: *Verwendete Chemikalien und Medizinprodukte*

### 3.4 Laborgeräte

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Laborgeräte aufgelistet.

| Bezugsquelle                     | Herstellerbezeichnung    | Gerät   |
|----------------------------------|--------------------------|---|
| Forma Scientific, Marietta (USA) | Water-Jacketed Incubator | Brutschrank   |
| Zeiss, Jena                      | Axiovert 25              | Umkehrmikroskop/<br>Fluoreszenz-<br>Umkehrmikroskop |

| Bezugsquelle                             | Herstellerbezeichnung      | Gerät                          |
|--|----------------------------|--------------------------------|
|  | Phomi 3                    | Mikroskop                      |
| Eppendorf, Hamburg                       | Centrifuge 5415            | Zentrifuge für Reaktionsgefäße |
|  | Reference 10, 100 und 1000 | Pipetten                       |
| Shandon, Frankfurt                       | Cytospin 2                 | Zytozentrifuge                 |
| Brand, Wertheim                          | Neubauer-Zählkammer        | Zellzählkammer                 |
| Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel | GFL Wasserbad              | Wasserbad                      |
| Heraeus Instruments, Hanau               | Lamin Air HB 2448          | Sterile Werkbank               |
| Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn        | Pipetus-akku               | Pipettierhilfe                 |
| Schott Geräte, Ludwigshafen              | PH-Meter CG811             | pH-Meter                       |

Tab. 3: *Verwendete Laborgeräte*

### 3.5 Verbrauchsmaterialien

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

| Bezugsquelle                                    | Verbrauchsmaterial                            |
|---|---|
| Sarstedt, Nümbrecht                             | Sterile Zellkulturflaschen, T75               |
|   | Pipettenspitzen; 10, 100, 1000 µl             |
|   | Sterile Zellkulturflaschen; T25, T75 und T175 |
| Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen | Objektträger                                  |

| Bezugsquelle                          | Verbrauchsmaterial                                     |
|---------------------------------------|--|
| Sarstedt, Nümbrecht                   | Sterile Zellkulturflaschen, T75                        |
|                                       | Deckgläser   |
| Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA | Discardit II Sterile Spitzen; 5, 10 und 20 ml          |
| BD Falcon, Heidelberg                 | Sterile Einweg-Pipetten; 1, 2, 5, 10 und 25 ml         |
|                                       | Zentrifugenröhrchen; 15 und 50 ml                      |
| Heinz Herenz, Hamburg                 | Pasteurpipetten 230 mm, Glas                           |
| Millipore, Schwalbach                 | Steriflip (Einweg-Sterilisationseinheit)               |
| Schleicher & Schuell, Dassel          | Papierfilter (595 ½ Folders Filters Ø 185 mm)          |
| Schott, Mainz                         | Glaswaren  |
| VWR International, Dietikon (Schweiz) | Sterile Syringe Filter 0,45 µm (Sterile Spitzenfilter) |

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Validierung der Detektion von Tumorzellen und vaskulären Endothelzellen

Frei zirkulierende Tumorzellen und Endothelzellen kommen nur in einer sehr geringen Anzahl von 0,0002-0,005% der mononukleären Zellen im peripheren Blut vor. Um die APAAP-Methode für die Antikörper P1H12 (vaskuläre Endothelzellen) und A45 (Tumorzellen) zu etablieren, wurden serielle Verdünnungsreihen hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass bei dieser Methode die detektierte Zellzahl mit der hergestellten Verdünnungsanzahl der Zellen signifikant korreliert.

Die Ergebnisse sind unten in der Tabelle 5 aufgeführt.

Damit zur Auswertung eine höhere Anzahl von Zellen beurteilt werden konnte, wurden jeweils drei Objektträger zusammengefasst und deren Mittelwert berechnet.

Die folgende Tabelle zeigt die detektierte Anzahl der Tumorzellen und der HUVECs in den verschiedenen Verdünnungsreihen. Die Anzahl der Zellen bezieht sich immer auf die Anzahl der positiven Zellen auf drei Objektträgern, d.h. insgesamt 2.100.000 gefärbter Zellen.

| Verdünnung  | Anzahl der detektierten Tumorzellen (Mittelwerte, n=3) pro $2,1 \times 10^6$ MNCs | Anzahl der detektierten Endothelzellen (HUVECs) (Mittelwerte, n=3) pro $2,1 \times 10^6$ MNCs |
|-------------|---|---|
| 1:1000      | 681,3   | 493,2   |
| 1:10.000    | 17,1  | 16,5  |
| 1:100.000   | 1,5   | 1,6   |
| 1:1.000.000 | 1,3   | 0,3   |

Tab. 5: Verdünnungsreihen der Tumor- und Endothelzellen

## 4.2 Detektion von Tumorzellen, vaskulären und lymphatischen Endothelzellen bei gesunden Spendern, bei Tumorpatienten, Studienpatienten und aus Leukaphareseprodukten

Es wurde peripheres Blut von zehn gesunden Spendern abgenommen und die mononukleären Zellen auf Cytospins zentrifugiert. Diese Zellen wurden mit den P1H12-, A45- und LYVE-1-Antikörpern gefärbt. Die Zellzahlen waren unsere Ausgangswerte bzw. Vergleichswerte für weitere Untersuchungen.

Zusätzlich wurden die mononukleären Zellen aus dem Blut von Tumorpatienten ohne oder vor Therapie gefärbt.

Es wurden die Zellen aus 5 Leukaphareseprodukten mit den drei Antikörpern gefärbt, um zu analysieren, ob die Zellpopulationen durch G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) ins periphere Blut mobilisiert werden können.

In folgender Tabelle werden die Mittelwerte der Zellzahlen dargestellt.

|  | Tumorzellen<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs | Vaskuläre<br>Endothelzellen<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs | Lymphatische<br>Endothelzellen<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs |
|--|--|--|---|
| Gesunde Spender<br>(Mittelwert, n=10)                    | 0  | 0,7  | 0,7   |
| Leukaphareseprodukte (n=5)                               | 0  | 0  | 0,6   |
| Tumorpatienten (n=10) +<br>Studienpatienten Tag 0 (n=35) | 10,4 (Tu)<br>0,9<br>=5,65                    | 0,4 (Tu)<br>1,9<br>=1,15                                     | 14,8 (Tu)<br>13,7<br>=14,25                                     |

Tab. 6: Tumor-, vaskuläre Endothel- und lymphatische Endothelzellzahlen von gesunden Spendern, Leukaphareseprodukten und Tumorpatienten

Die zirkulierenden Tumorzellen waren bei den gesunden Spendern und den Leukaphareseprodukten nicht nachzuweisen. Nur die Tumorpatienten zeigten A45 positive zirkulierende Tumorzellen (Mittelwert=5,65).

Die zirkulierenden vaskulären Endothelzellen waren bei den Tumorpatienten im Vergleich zu den Gesunden und den Leukaphareseprodukten erhöht. 2,1 vs. 0,9 cells/ $1 \times 10^6$  MNCs,  $p=0,03$ .

Bei den Leukaphareseprodukten ließen sich nur Zellen mit dem LYVE-1 Antikörper anfärben. Die Anzahl der lymphatischen Endothelzellen ( $0,6 \times 2 \times 10^6$ ) ist mit der der gesunden Spender ( $0,7 \times 2,1 \times 10^6$ ) zu vergleichen. Bei den Tumorpatienten wurden deutlich höhere Zellzahlen der LECs ( $14,25 \times 2,1 \times 10^6$ ) nachgewiesen.

### 4.3 Detektion von Tumorzellen bei SU014813 therapierten Patienten

Es wurden von jedem Patienten drei Objektträger pro Zeitpunkt mit je ca. 700.000 mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut mit dem A45-Cytokeratin-Antikörper gefärbt. Zu jedem Zeitpunkt wurden ca. 2,1 Mio. Zellen gefärbt und ausgewertet.

Auf dem folgenden Foto ist eine mit dem A45-Cytokeratin-Antikörper angefärbte Tumorzelle dargestellt.



Abb. 6: APAAP-Färbung (400x)

Die folgende Tabelle zeigt die detektierten Tumorzellen der einzelnen Studienpatienten bei unterschiedlicher Medikamentendosis.

| Patienten-<br>nummer | Medikamenten-<br>dosis<br>mg/Tag | Tag 0<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs | Tag 8<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs | Tag 28<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs |
|----------------------|----------------------------------|--|--|---|
| 22                   | 150                              | 1                                      | 0                                      | 0                                       |
| 47                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 4                                       |
| 51                   | 150                              | 2                                      | 0                                      | 0                                       |
| 59                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 1                                       |
| 15                   | 150                              | 1                                      | 0                                      | 0                                       |
| 58                   | 150                              | 1                                      | 0                                      | 0                                       |
| 60                   | 150                              | 9                                      | 3                                      | 6                                       |
| 50                   | 150                              | 0                                      | 1                                      | 0                                       |
| 33                   | 100                              | 1                                      | 1                                      | 2                                       |
| 34                   | 100                              | 4                                      | 2                                      | 0                                       |
| 14                   | 100                              | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 16                   | 100                              | 0                                      | 0                                      | -                                       |
| 41                   | 250                              | 3                                      | 20                                     | 0                                       |
| 35                   | 100                              | 0                                      | 1                                      | 0                                       |
| 1                    | 25                               | -                                      | -                                      | -                                       |
| 2                    | 25                               | -                                      | -                                      | -                                       |
| 3                    | 25                               | 0                                      | 0                                      | 1                                       |
| 5                    | 25                               | 0                                      | 0                                      | -                                       |
| 26                   | 150                              | 0                                      | 30                                     | 3                                       |
| 40                   | 250                              | 0                                      | 2                                      | 1                                       |
| 42                   | 250                              | 1                                      | 3                                      | 3                                       |

| Patienten-<br>nummer | Medikamenten-<br>dosis<br>mg/Tag | Tag 0<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs | Tag 8<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs | Tag 28<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs |
|----------------------|----------------------------------|--|--|---|
| 63                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 2                                       |
| 48                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 21                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | -                                       |
| 24                   | 150                              | 1                                      | -                                      | 0                                       |
| 72                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 3                                       |
| 76                   | 150                              | 0                                      | 1                                      | 0                                       |
| 77                   | 150                              | 0                                      | 1                                      | 0                                       |
| 74                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 75                   | 150                              | 2                                      | 1                                      | 0                                       |
| 29                   | 200                              | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 54                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 62                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 3                                       |
| 68                   | 150                              | 0                                      | 2                                      | 0                                       |
| 71                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 0                                       |

Tab. 7: Tumorzellzahlen von SU014813 therapierter Patienten

Zirkulierende Tumorzellen waren nur im Blut von Tumorpatienten zu finden und nicht bei gesunden Probanden (1,3 Zellen/  $1 \times 10^6$  MNCs).

Die folgende Abbildung zeigt, dass die zirkulierenden Tumorzellen bei Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht sind. Es besteht aber keine Korrelation zwischen der Zellzahlerhöhung und dem Ansprechen auf die Therapie mit SU014813.

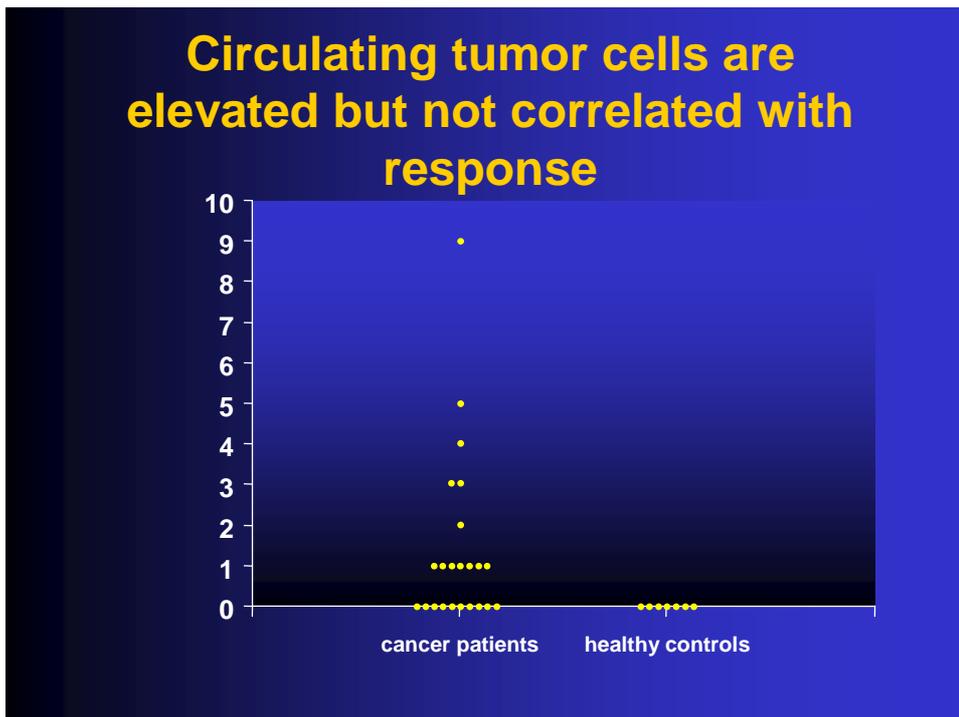


Abb. 7: Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen bei Tumorpatienten und gesunden Probanden

Es ergab sich keine Korrelation zwischen der Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen und der Anzahl der zirkulierenden CECs.

Es konnte keine signifikante Veränderung der Anzahl von den zirkulierenden Tumorzellen im Verlauf der Therapie beobachtet werden.

#### 4.4 Detektion von vaskulären Endothelzellen bei SU014813 therapierten Patienten

Es wurden von jedem Patienten drei Objektträger pro Zeitpunkt mit je ca. 700.000 mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut mit dem P1H12-Antikörper gefärbt. Zu jedem Zeitpunkt wurden ca. 2 Mio. Zellen gefärbt und ausgewertet.

Auf dem folgenden Foto ist eine mit P1H12-Antikörper angefärbte vaskuläre Endothelzelle dargestellt.



Abb. 8: APAAP-Färbung, mit dem PIH12-Antikörper positiv gefärbte Endothelzelle (400x)

Die folgende Tabelle zeigt die detektierten zirkulierenden vaskulären Endothelzellen der einzelnen Studienpatienten bei unterschiedlicher Medikamentendosis.

| Patienten-<br>nummer | Medikamenten-<br>dosis<br>mg/Tag | Tag 0<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs | Tag 8<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs | Tag 28<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs |
|----------------------|----------------------------------|--|--|---|
| 22                   | 150                              | 3                                      | 3                                      | 0                                       |
| 47                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 4                                       |
| 51                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 59                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 4                                       |
| 15                   | 150                              | 4                                      | 0                                      | 4                                       |
| 58                   | 150                              | 4                                      | 0                                      | 2                                       |
| 60                   | 150                              | 10                                     | 1                                      | 7                                       |
| 50                   | 150                              | 3                                      | 2                                      | 2                                       |
| 33                   | 100                              | 2                                      | 1                                      | 0                                       |
| 34                   | 100                              | 0                                      | 3                                      | 0                                       |
| 14                   | 100                              | 1                                      | 0                                      | 0                                       |
| 16                   | 100                              | 1                                      | 0                                      | 0                                       |

| Patienten-<br>nummer | Medikamenten-<br>dosis<br>mg/Tag | Tag 0<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs | Tag 8<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs | Tag 28<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs |
|----------------------|----------------------------------|--|--|---|
| 41                   | 250                              | 4                                      | 18                                     | 2                                       |
| 35                   | 100                              | 3                                      | 3                                      | -                                       |
| 1                    | 25                               | 1                                      | 0                                      | 0                                       |
| 2                    | 25                               | 2                                      | -                                      | 1                                       |
| 3                    | 25                               | 1                                      | 0                                      | 0                                       |
| 5                    | 25                               | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 26                   | 150                              | 1                                      | 2                                      | 1                                       |
| 40                   | 250                              | 6                                      | 5                                      | 1                                       |
| 42                   | 250                              | 1                                      | 1                                      | 3                                       |
| 63                   | 150                              | 0                                      | 2                                      | 0                                       |
| 48                   | 150                              | -                                      | -                                      | 0                                       |
| 21                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | -                                       |
| 24                   | 150                              | 0                                      | -                                      | 0                                       |
| 72                   | 150                              | 2                                      | 0                                      | 0                                       |
| 76                   | 150                              | 2                                      | 0                                      | 1                                       |
| 77                   | 150                              | 0                                      | 1                                      | 1                                       |
| 74                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 75                   | 150                              | 3                                      | 5                                      | 0                                       |
| 29                   | 200                              | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 54                   | 150                              | 5                                      | 0                                      | 0                                       |
| 62                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 68                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 0                                       |

| Patienten-<br>nummer | Medikamenten-<br>dosis<br>mg/Tag | Tag 0<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs | Tag 8<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs | Tag 28<br>pro $2,1 \times 10^6$<br>MNCs |
|----------------------|----------------------------------|--|--|---|
| 71                   | 150                              | 0                                      | 0                                      | 0                                       |

Tab. 8: Vaskuläre Endothelzellzahlen von SU014813 therapierten Patienten

Die Anzahl der CECs vor dem Therapiebeginn mit SU014813 korreliert mit dem Ansprechen der Patienten auf die Behandlung signifikant. Patienten mit einer niedrigen Anzahl von CECs sprachen besser auf die anti-angiogene Therapie an ( $p=0,002$ ).

Außerdem korreliert die Abnahme der CECs während der ersten Therapiewoche positiv mit dem Ansprechen ( $p=0,039$ ).

Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der CEC-Anzahl und der verabreichten Medikamentendosis von SU014813.

Die folgende Abbildung zeigt, dass die Anzahl der zirkulierenden Endothelzellen mit dem Ansprechen auf die Therapie mit SU014813 signifikant ( $p=0,002$ ) korrelierte.

Wir haben das Ansprechen der Therapie auf eine komplette Tumorremission, partielle Remission oder auf eine stabile Situation über sechs Monate bezogen.

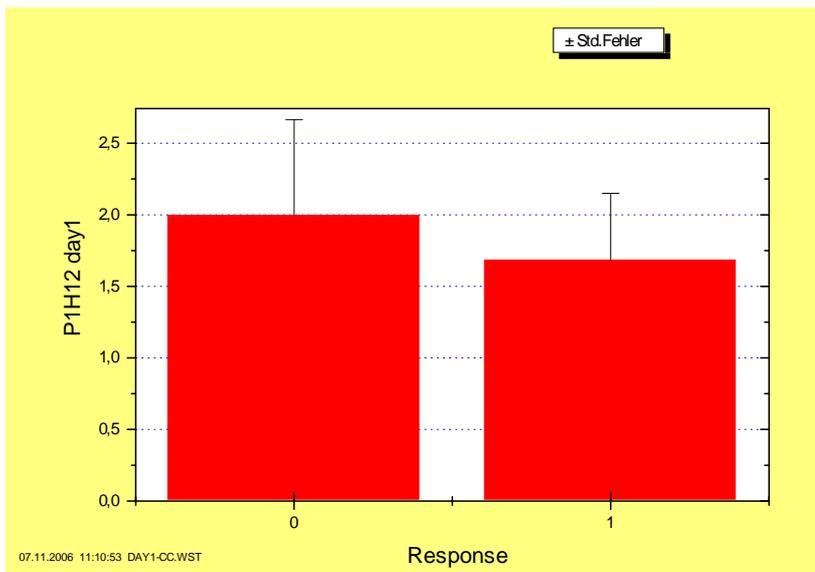


Abb. 9: P1H12-positiv detektierte Zellzahlen der Studienpatienten an Tag 1 korreliert mit dem Ansprechen auf die Therapie mit SU014813; Zellzahl/ $10^6$  Gesamtzellen

Die Studienpatienten mit einer hohen Anzahl von zirkulierenden Endothelzellen zu Beginn der Therapie sprachen schlechter auf die Therapie mit SU014813 an, als die Patienten mit einer geringeren Anzahl.

Das Zellzahlverhalten der CECs unter der Therapie ist in folgender Abbildung dargestellt.

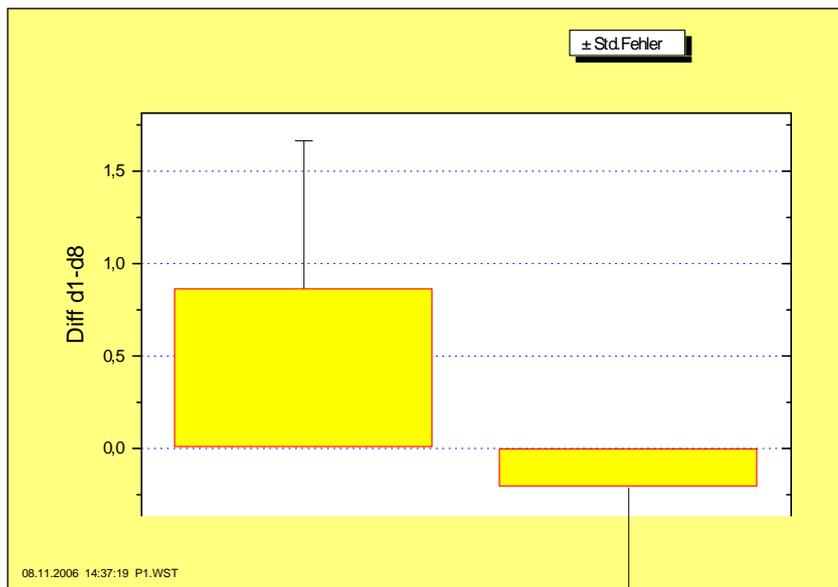


Abb. 10: Differenz der Anzahl der zirkulierenden Endothelzellen der Studienpatienten von Tag 1 und Tag 8 ( $p=0,039$ )

In dieser Abbildung werden die Zellzahlen der Studienpatienten von Tag 1 und Tag 8 verglichen.

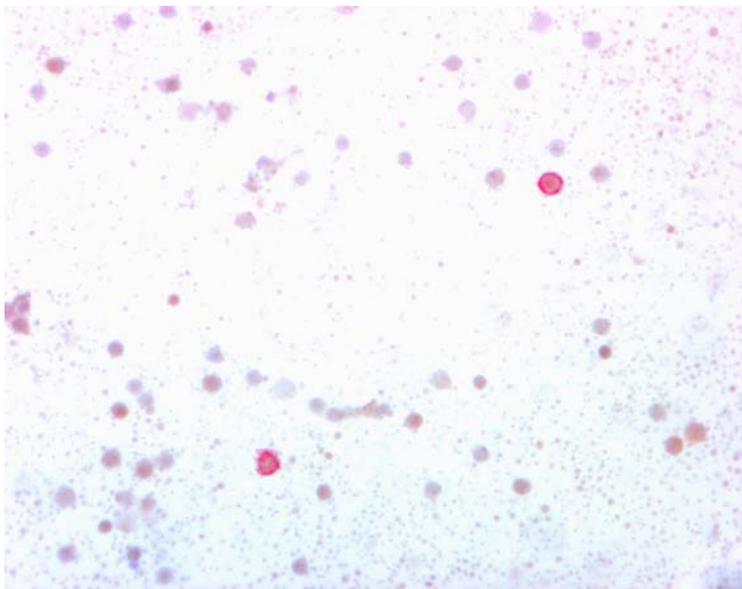
Es konnte gezeigt werden, dass die Patienten, die eine Abnahme der CECs innerhalb der ersten acht Tage unter SU014813 Therapie aufwiesen, besser auf die Therapie ansprachen, als die Patienten, bei denen sich die Zellzahl nicht veränderte oder zunahm.

#### **4.5 Detektion von lymphatischen Endothelzellen bei SU014813 therapierten Patienten**

Es wurden von jedem Patienten drei Objektträger pro Zeitpunkt mit je ca. 700.000 mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut mit dem LYVE-1-Antikörper gefärbt. Zu jedem Zeitpunkt wurden ca. zwei Mio. Zellen gefärbt und ausgewertet.

Bei neun von 35 Patienten waren nicht genug Objektträger vorhanden, so dass auf eine vollständige Auswertung verzichtet werden musste.

Auf dem folgenden Foto sind zwei, mit dem LYVE-1-Antikörper angefarbte lymphatische Endothelzellen angefarbt.



*Abb. 11: APAAP-Färbung, mit dem LYVE-1-Antikörper zwei positiv gefärbte lymphatische Endothelzellen (200x)*

Die folgende Tabelle zeigt die detektierten zirkulierenden lymphatischen Endothelzellen der einzelnen Studienpatienten bei unterschiedlicher Medikamentendosis.

| Patienten-<br>nummer | Medikamenten-<br>dosis | Tag 0 | Tag 8 | Tag 28 |
|----------------------|------------------------|-------|-------|--------|
| 22                   | 150                    | 0     | 1     | 0      |
| 47                   | 150                    | 0     | 0     | 0      |
| 51                   | 150                    | 0     | 1     | 3      |
| 59                   | 150                    | 0     | 0     | 0      |
| 15                   | 150                    | 276   | 0     | 0      |
| 58                   | 150                    | 4     | 1     | 46     |
| 60                   | 150                    | 8     | 7     | 17     |
| 50                   | 150                    | 4     | 1     | 0      |
| 33                   | 100                    | 0     | 0     | 4      |
| 34                   | 100                    | 5     | 19    | 18     |
| 14                   | 100                    | 0     | 7     | -      |
| 16                   | 100                    | -     | -     | -      |
| 41                   | 250                    | 4     | 4     | 0      |
| 35                   | 100                    | 1     | 1     | -      |
| 1                    | 25                     | -     | -     | -      |
| 2                    | 25                     | -     | -     | -      |
| 3                    | 25                     | -     | -     | -      |
| 5                    | 25                     | -     | -     | -      |
| 26                   | 150                    | 5     | 0     | 0      |
| 40                   | 250                    | 3     | 1     | 3      |

| Patienten-<br>nummer | Medikamenten-<br>dosis | Tag 0 | Tag 8 | Tag 28 |
|----------------------|------------------------|-------|-------|--------|
| 42                   | 250                    | 0     | 1     | 0      |
| 63                   | 150                    | 0     | 0     | 0      |
| 48                   | 150                    | -     | -     | -      |
| 21                   | 150                    | 0     | 1     | -      |
| 24                   | 150                    | 6     | -     | 0      |
| 72                   | 150                    | 0     | 0     | 9      |
| 76                   | 150                    | 1     | 2     | 1      |
| 77                   | 150                    | 7     | 2     | 2      |
| 74                   | 150                    | 2     | 0     | 11     |
| 75                   | 150                    | 0     | 0     | 1      |
| 29                   | 200                    | 0     | 0     | 1      |
| 54                   | 150                    | 0     | 0     | 0      |
| 62                   | 150                    | 18    | 0     | 6      |
| 68                   | 150                    | 9     | 22    | 0      |
| 71                   | 150                    | 1     | 0     | 0      |

*Tab. 9: Lymphatische Endothelzellzahlen von SU014813 therapierten Patienten*

Die zirkulierenden lymphatischen Endothelzellen (LECs, lymphatic endothelial cells) waren bei den Tumorpatienten im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht.

Die Anzahl der zirkulierenden lymphatischen Endothelzellen korreliert mit dem Ansprechen auf die antiangiogene Therapie mit SU014813.

Die Patienten mit vielen LECs sprechen besser auf die Therapie mit SU014813 an.

## 5 Diskussion

Angiogenese ist für das Wachstum und die Reparatur von Organen essentiell. Ein Ungleichgewicht in diesem Prozess ist an einer Vielzahl von malignen, entzündlichen, ischämischen, infektiösen und immunologischen Veränderungen pathogenetisch mit verantwortlich. Es sind über 70 pathologische Zustände bekannt, an denen die Angiogenese beteiligt ist (1). Der Einsatz von gerichteter Angiogenese oder Anti-Angiogenese bietet in der Medizin ein großes therapeutisches Potential.

Tumore müssen ab einem Durchmesser von 1-2mm<sup>3</sup> für eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung an das Blutgefäßsystem angeschlossen werden (14). Da sie auf die Angiogenese angewiesen sind, kann durch eine Beeinflussung der Angiogenese das Wachstum von Neoplasien reduziert oder gestoppt werden (15). Es sind über 300 Angiogenese-Inhibitoren bekannt, von denen 80 in klinischen Studien getestet werden (2).

Am bedeutendsten sind dabei die VEGF-Inhibitoren (1).

In der anti-angiogenen Therapie werden mit Bevacizumab bei metastasiertem kolorektalen Karzinomen große Fortschritte erzielt und es wurde deshalb als Erstlinienbehandlung für metastasierte Kolonkarzinome zugelassen.

Bevacizumab ist ein monoklonaler IgG1 Antikörper, der an VEGF-A bindet. In der Kombination mit der derzeitigen Standardtherapie für kolorektale Karzinome (Irinotecan, 5-Fluoro-Uracil, Leucovorin; IFL) verbesserte Bevacizumab im Vergleich zur Standardtherapie alleine die Überlebenszeit im Durchschnitt um fünf Monate (20,3 Monate IFL+Bevacizumab, 15,6 Monate IFL+Placebo). Das progressionsfreie Überleben verlängerte sich unter IFL+Bevacizumab um 4,4 Monate (10,6 Monate IFL+Bevacizumab, 6,2 Monate IFL+Placebo) (12).

Je mehr Tumorgefäße sich zurückbilden, desto effizienter ist die anti-angiogene Therapie. Das heißt aber auch, dass durch die Zerstörung des Blutgefäßnetzes im Tumor weniger zytotoxische Medikamente zu den Tumorzellen gelangen können. Das Ziel besteht darin, eine optimale Dosierung der anti-angiogenen Therapie zu finden, die die

Gefäßdichte im Tumor normalisiert und trotzdem eine maximale Dosis von Zytostatika zu den Zellen zulässt (3).

Es ist bisher noch nicht gelungen, die optimale individuelle Dosierung der Angiogenese-Inhibitoren herauszufinden. Das liegt hauptsächlich an fehlenden zuverlässigen Surrogatmarkern für die Tumorangiogenese.

Das Ansprechen der anti-angiogenen Therapie kann bereits indirekt beurteilt werden, indem die mikrovaskuläre Dichte, die Größe des Tumors oder die Konzentration von VEGF im Plasma oder im Tumor gemessen wird.

Bisher konnte die Messung der Konzentration der Wachstumsfaktoren (VEGF, PLGF, VEGFR2) im Plasma noch nicht für eine Vorhersage für das Ansprechen der anti-angiogenen Therapie validiert werden, da die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen diskrepant sind (4).

Es werden dringend neue und zuverlässigere Surrogatmarker für die Tumorangiogenese benötigt.

1973 berichteten Hladovec und Rossman erstmals über zirkulierende Endothelzellen im Blut (5). In den letzten zehn Jahren ist herausgefunden worden, dass die CECs in verschiedenen pathologischen Zuständen erhöht sind (6). Es gibt CECs, die ausdifferenziert sind und andere, die einen Stammzell- oder Vorläuferzellcharakter besitzen (4).

Die embryonale Vaskulogenese beginnt mit der Ausbildung von Blutinseln aus Zellen mesodermalen Ursprungs im Dottersack. Die im Zentrum gelegenen Zellen entwickeln sich in die embryonale hämatopoetische Richtung, während sich die in der Peripherie liegenden Zellen zu Endothelzellen entwickeln. Es bilden sich die ersten vaskulären Strukturen aus, die sogenannten Blutinseln (28). Die hämatopoetischen und endothelialen Zellen besitzen somit eine gemeinsame Ursprungszelle, den Hämangioblasten (29). Der Hämangioblast kann sich in eine Vorläuferzelle der Vaskulogenese (Endothelprogenitorzellen) oder in eine Vorläuferzelle der hämatopoetischen Blutbildung (hämatopoetische Stammzelle) differenzieren.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass es im peripheren Blut von Erwachsenen zirkulierende Vorläuferzellen gibt, die aus dem Knochenmark entstammen und ähnliche Eigenschaften besitzen wie embryonale Hämangioblasten. Das bedeutet, dass die Vaskulogenese nicht mit der Embryonalzeit abgeschlossen ist.

In der adulten Vaskulogenese können sich diese Vorläuferzellen in reife Endothelzellen differenzieren und werden deshalb endotheliale Progenitorzellen (EPCs=endothelial progenitor cells) genannt (30).

Die Freisetzung der EPCs aus dem Knochenmark unterliegt streng regulierten Prozessen, an denen Wachstumsfaktoren, Enzyme und Oberflächenrezeptoren beteiligt sind.

Die Freisetzung der EPCs aus dem Knochenmark kann mit Hilfe von GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) gesteigert werden. Auch Erkrankungen wie Gefäßwandverletzungen, Verbrennungen oder Extremitätenischämie steigern die Anzahl der zirkulierenden EPCs (30).

Aus peripherem Blut isolierte EPCs weisen eine hohe Expansionsfähigkeit auf. Im Blut kommen zusätzlich auch reife Endothelzellen, die sogenannten CECs, vor (17).

In folgender Tabelle sind einige Unterschiede aufgeführt (17).

|  | CECs                               | EPCs                           |
|--|------------------------------------|--------------------------------|
| Ursprung   | Knochenmark, Blutgefäße            | Knochenmark                    |
| Morphologie  | Durchmesser<br>20-50 $\mu\text{M}$ | Durchmesser < 20 $\mu\text{M}$ |
| Phänotyp   | CD133-                             | CD133+                         |
| Koloniebildungskapazität mit hohem Proliferationspotential | Nein                               | Ja                             |

Tab.11: Eigenschaften von CECs und EPCs

Bei der Therapie mit Bevacizumab zeigen Willett et al., dass sich durch die anti-angiogene Therapie nicht nur die Tumorgröße reduzierte, sondern auch die Anzahl der EPCs und CECs.

Bei sechs Patienten mit Rektumkarzinomen wurde zwölf Tage nach einmaliger Gabe von Bevacizumab bei einer Koloskopie festgestellt, dass bei Patient 1 eine Tumorregression von >30 % stattgefunden hatte, bei den anderen fünf Patienten war keine sichtbare Größenveränderung des Tumors zu sehen gewesen (8). Durch eine CT (Computertomographie)-Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine signifikante

Abnahme der Tumordurchblutung und des Tumorblutvolumens vorlag. Der interstitielle Druck nahm ebenfalls signifikant ab, was auf eine „Normalisierung“ der Tumorgefäße hindeuten könnte (8).

Duda et al. fanden mit der Durchflusszytometrie Zellen von Patienten mit kolorektalen Karzinomen, die den Phänotyp CD146+CD45+ hatten (11).

In einer anderen Arbeit wurde peripheres Blut von Tumorpatienten (n=8) mit kolorektalen Adenokarzinomen vor Bevacizumab-Gabe, nach 3 Tagen und 8 Tagen verwendet. Die Anzahl der CD31brightCD45-CECs und CD133 Progenitorzellen nahm drei Tage nach der VEGF-Blockade mit Bevacizumab bei kolorektalen Tumorpatienten ab (8,13).

In den Ergebnissen von Duda et al. zeigte sich keine signifikante Veränderung der CD146+ Zahlen im Blut der Patienten. Es fiel aber auf, dass ihre Anzahl an Tag 12 nach Bevacizumab-Therapie anstieg. Außerdem fanden sie heraus, dass einige CD146+ Zellen eine Subpopulation von T-Zellen darstellten, die CD146+CD45+ Zellen entsprachen (10, 18, 19, 20). Außerdem entnahmen sie Tumorbiopsien vor und nach 12 Tagen der Bevacizumab-Therapie. Das Gewebe wurde immunhistochemisch mit CD146 gefärbt. Es wurden Zellen der Gefäßwände, einige Perizyten und wenige, nicht in die Gefäßwand integrierte Zellen angefärbt, die zusätzlich CD45+ waren.

Diese Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass die Spezifität der CD146-Antikörper weiterhin überprüft werden muss, die Phänotypisierung der CECs und EPCs genauer charakterisiert und die Messmethoden für die klinische Weiterentwicklung und der optimierte Gebrauch der Biomarker verbessert werden müssen.

Ein Problem bei der Detektion von den CECs besteht in ihrer niedrigen Frequenz im Blut. Bertolini et al. fanden eine CEC in 1000 zirkulierenden Blutzellen bei gesunden Probanden. Für diese Messungen wurde eine Durchflusszytometrie mit den Antikörpern gegen CD 31, CD146 (bei CECs positiv) und CD 45 (negativ) durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde im Gegensatz dazu eine CEC in 2,8 Mio. Blutzellen im Durchschnitt (n=10) bei gesunden Probanden gefunden. Hier wurde die APAAP-Färbung mit dem P1H12 (CD 146)-Antikörper durchgeführt.

CD146 galt lange als spezifischer Marker der Endothelzellen und wurde bisher bei allen Versuchen und Methoden zur CEC und CEP-Bestimmung verwendet. Einige neue Forschungsergebnisse zeigen, dass CD146 auch auf aktivierten Lymphozyten zu finden

ist. Mohamed et al. fand 1% CD45+ CD146+ Zellen (aktivierte Lymphozyten) unter den mononukleären Zellen. Sie markierten das Vollblut von 10 gesunden Probanden mit den Antikörpern (P1H12, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) und maßen die positiven Zellen im FACS. In *in vitro* Kulturen zeigten sie, dass Lymphozyten nach Aktivierung eine Expression von CD146 zeigten. Die Messungen wurden unter den gleichen Bedingungen wie in den Versuchen vorher durchgeführt (10).

Diese Ergebnisse stellen die Spezifität des CD146-Antikörpers mit der FACS-Methode in Frage. Die Zahlen sind mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen nicht vergleichbar. In unseren Versuchen fanden wir nur 0,01%-0,0001% P1H12 positive Zellen unter den mononukleären Zellen.

Dieser eindeutige Zellzahlunterschied könnte zwar durch die unterschiedlich angewandten Methoden und Materialien und durch den Gebrauch von Antikörper unterschiedlicher Firmen (P1H12, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA (Elshal) und P1H12-Antikörper, MAB 16985 Chemicon, Temecula, USA) erklärt werden. Unsere geringen Zellzahlen sprechen gegen eine unspezifische Lymphozyten Färbung. Die FACS-Methode und die APAAP-Methode haben beide Vor- und Nachteile. Es ist die Frage, ob sich Ergebnisse von so unterschiedlichen Methoden überhaupt miteinander vergleichen lassen (s.u.).

Allerdings müssten wir für die Bestätigung unserer Ergebnisse zeigen, dass die mit P1H12 angefärbten Zellen CD45 negativ sind. Das wäre der Beweis, dass unsere detektierten Zellen keine aktivierten Lymphozyten waren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die APAAP-Methode mit dem P1H12-Antikörper etabliert, bei der die Anzahl der CECs im peripheren Blut von Studienpatienten bestimmt werden konnte. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, jede einzelne Zelle beurteilen zu können. Nach der APAAP-Färbung und anschließender ACIS-Auswertung kann jede gefärbte Zelle angesehen und ausgewertet werden. Zelltrümmer, einzelne falsch angefärbte Partikel oder Zellreste werden so erkannt und nicht mit in die Auswertung einbezogen. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass auch tote Zellen mit einer intakten Zellmembran angefärbt werden.

Im Rahmen der Studie mit dem Angiogeneseinhibitor SU014813 wurden vor der Therapie (Tag 0), an Tag 8 und 28 Blutproben der Patienten abgenommen, aufgetrennt und auf Cytospins zentrifugiert. Nach der APAAP-Färbung mit dem PIH12 Antikörper konnten die gefärbten Zellen gezählt und ausgewertet werden.

Eine wichtige Bedeutung der Surrogatmarker besteht in der Vorhersehbarkeit des Therapieansprechens und somit eine rasche Möglichkeit Patienten, die wirklich von dieser Therapie profitieren, zu identifizieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der CECs vor dem Therapiebeginn mit SU014813 mit dem Ansprechen der Patienten auf die Behandlung signifikant korrelierte. Patienten mit einer niedrigeren Anzahl von CECs sprachen besser auf die anti-angiogene Therapie an ( $p=0,002$ ). Außerdem korrelierte die Abnahme der CECs während der ersten Therapiewoche positiv mit dem Ansprechen ( $p=0,039$ ). Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der verabreichten Medikamentendosis und der CEC-Anzahl. Dieses könnte möglicherweise auf die zu kleine Fallzahl zurückzuführen sein.

Außerdem wurden mit dem Cytokeratinantikörper A45-B/B3 zirkulierende Tumorzellen aus dem peripheren Blut angefärbt. Es wurden frei zirkulierende Tumorzellen detektiert, es ließ sich jedoch keine Korrelation zwischen der Anzahl der Tumorzellen und den CECs finden.

Ein weiteres Problem in der Tumorthherapie stellt die lymphatische Metastasierung dar. Bösartige Tumore wie z.B. Mamma-, Colon-, Prostatakarzinome, Hals- und Kopf-Tumore und maligne Melanome metastasieren über Lymphbahnen zu ihren regionalen Lymphknoten. Verschiedene Studien zeigten, dass die quantitative Bestimmung der Lymphangiogenese im Tumor mit dem Metastasierungsrisiko und dem Gesamtüberleben korreliert. Es wurden Antikörper gegen spezifische Moleküle der Lymphendothelzellen entwickelt. Dazu gehören VEGFR-3, Podoplanin, Prox-1 und LYVE-1 (21). LYVE-1 ist der am häufigsten angewandte (Tumor-) Lymphangiogenesemarker (22, 23).

Es gibt Studien, die einen Zusammenhang zwischen Lymphangiogenese und Metastasierung zeigen konnten, andere konnten keine eindeutigen Korrelationen nachweisen (24, 25).

Es fehlt eine Standardisierung der Methoden. Außerdem ist es schwierig, die Lymphgefäße darzustellen, da sie sehr klein sind und einige gar kein Lumen aufweisen.

Es konnte gezeigt werden, dass LYVE-1 nicht nur von lymphatischen Endothelzellen exprimiert wird, sondern auch auf Makrophagen zu finden ist. Schledzewski et al. konnten anhand von Doppelfärbungen an Tumorgewebe zeigen, dass auch Makrophagen im Tumorgewebe und Granulationsgewebe mit LYVE-1 angefärbt wurden (21, 22, 26, 27).

Lymphangiogenese ist zu einem wichtigen Parameter für die Prognose von vielen Tumorpatienten geworden. Bisher muss eine Doppelfärbung durchgeführt werden, damit eine sichere Aussage getroffen werden kann, ob es sich um LYVE-1+ Lymphendothelzellen oder LYVE-1+ tumorinfiltrierende Makrophagen handelt.

Wir konnten in dieser Arbeit nachweisen, dass es neben den zirkulierenden vaskulären Endothelzellen, auch zirkulierende lymphatischen Endothelzellen bzw. tumorinfiltrierende Makrophagen im Blut gefunden werden können. Im Vergleich zu den gesunden Probanden waren die LECs bei Tumorpatienten signifikant erhöht. Das Ansprechen auf die anti-angiogene Therapie mit SU014813 korreliert mit der Anzahl der LECs. Die Patienten mit vielen zirkulierenden LECs im Blut sprachen besser auf die SU014813-Therapie an.

Es muss bei dieser Auswertung beachtet werden, dass die Färbung der mononukleären Zellen aus dem Blut ohne Lymphendothel-Kontrollzellen durchgeführt wurde. Die Färbungen mit dem Antikörper gegen Cytokeratine A45B/B3 kontrollierten wir mit den MCF7-Tumorzellen. Diese Zellreihe wurde bei jeder Färbung zur Kontrolle mitgefärbt. Bei dem Endothelzellantikörper P1H12 wurden HUVECs als Positivkontrolle mitgefärbt. Allerdings gab es bisher noch keine kommerzielle Zellreihe, die sich mit dem LYVE-1-Antikörper anfärben ließ. Die Gewinnung von kultivierbaren menschlichen lymphatischen Zellen, die für diese Färbung geeignet wären, ist komplex. Um die möglicherweise mitangefärbten Monozyten zu erkennen, müssen weitere Untersuchungen, wie z.B. eine Doppelfärbung durchgeführt werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Ansprechen der Patienten auf die Therapie mit SU014813 mit der Anzahl der CECs vor Therapiebeginn signifikant korreliert. Patienten mit einer niedrigen Anzahl von CECs sprachen besser auf die anti-angiogene Therapie an. Außerdem korreliert die Abnahme der CECs während der ersten Therapiewoche positiv mit dem Ansprechen.

Es ließ sich keine Korrelation zwischen der Anzahl der Tumorzellen und den CECs finden und es gab keine signifikante Veränderung der Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen im Verlauf der Therapie. Die Anzahl der zirkulierenden lymphatischen Endothelzellen korreliert mit dem Ansprechen auf die anti-angiogene Therapie mit SU014813. Als mögliche Surrogatmarker für die Zukunft würden sich somit die CECs und die zirkulierenden lymphatischen Endothelzellen eignen. Die Eindeutigkeit der Detektion dieser Zellen muss in weiteren Arbeiten untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Rolle von zirkulierenden vaskulären und lymphatischen Endothelzellen, sowie zirkulierenden Tumorzellen im Blut als Surrogatmarker für die klinische Wirkung bei der antiangiogenen Therapie mit SU014813 untersucht.

Es wurde die APAAP-Methode mit dem P1H12-Antikörper etabliert, bei der die Anzahl der zirkulierenden vaskulären Endothelzellen im peripheren Blut bestimmt werden konnte. Es wurde das Blut von 35 Studienpatienten vor der Therapie, an Tag 8 und Tag 28 abgenommen, aufgetrennt und für die Färbung auf Cytospins zentrifugiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der CECs vor dem Therapiebeginn mit SU014813 mit dem Ansprechen der Patienten auf die Behandlung (Tumorregression oder stabile Tumorsituation über 6 Monate) signifikant korrelierte. Patienten mit einer niedrigeren Anzahl von CECs sprachen besser auf die anti-angiogene Therapie an ( $p=0,002$ ). Außerdem korrelierte die Abnahme der CECs während der ersten Therapiewoche positiv mit dem Ansprechen ( $p=0,039$ ). Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der verabreichten Medikamentendosis und der CEC-Anzahl.

Es wurden mit dem Cytokeratinantikörper A45-B/B3 zirkulierende Tumorzellen aus dem peripheren Blut angefärbt. Frei zirkulierende Tumorzellen konnten detektiert werden und waren nur im Blut von Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Probanden zu finden. Es ließ sich jedoch keine Korrelation zwischen der Anzahl der Tumorzellen und den CECs finden. Es gab keine signifikante Veränderung der Anzahl von den zirkulierenden Tumorzellen im Verlauf der Therapie.

Mit dem LYVE-1-Antikörper wurden frei zirkulierende lymphatische Endothelzellen angefärbt. Diese waren bei den Tumorpatienten im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht. Die Anzahl der zirkulierenden lymphatischen Endothelzellen korreliert mit dem Ansprechen auf die anti-angiogene Therapie mit SU014813.

## Literaturverzeichnis

1. Carmeliet P. (2005): Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 15;438(7070):932-6. Review.
2. Park J. W., Kerbel R. S., Kelloff G. J., Barrett J. C., Chabner B. A., Parkinson D. R., Peck, J., Ruddon R. W., Sigman, C. C., Slamon D. J. (2004): Rationale for biomarkers and surrogate end points in mechanism-driven oncology drug development. *Clin Cancer Res*. 1;10(11):3885-96. Review.
3. Jain R.K. (2001): Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy; *Nature Medicine* **7**, 987 - 989, 10.1038/nm0901-987.
4. Bertolini, F., Shaked, Y., Mancuso, P., Kerbel, R. (2006): The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification, *Nature*, 835- 845.
5. Hladovec, J.& Rossman, P. (1973): Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the axperimental modification of their counts in rats, *Thromb. Res*. 3, 665-674.
6. Blann, A.D. et al. (2005): Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease, *Thromb. Haemost.* 93, 228-235.
7. Lin Y., Weisdorf D.J., Solovey, A. & Hebbel, R. P. (2000): Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood, *J. Clin. Invest.*, 105, 71-77.
8. 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., et al. (2004): Direct evidence that

the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nat Med*, 10(2):145-7.

9. Mancuso, P. et al. (2006): Circulating endothelial cell kinetics and viability predict survival in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapie. *Blood*, 108, 452-459.

10. Elshal, M. F., Khan, S. S., Takahashi, Y., Solomon, M. A., McCoy Jr., J.P. (2005): CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood*, 106, 2923-2924.

11. Duda D. G., Cohen K. S., di Tomaso E., Au P., Klein R. J., Scadden D. T., Willett C. G., Jain R. K. (2006): Differential CD146 Expression on circulating Versus Tissue Endothelial Cells in Rectal Cancer Patients: Implication for Circulating Endothelial and Progenitor Cells as biomarkers for Antiangiogenic Therapie, *J of Clin Onc*, 24, 1449-1453.

12.. Hurwitz, H. I., Fehrenbacher, L., Hainsworth, J. D., Heim, W., Berlin, J., Holmgren, E., Hambleton, J., Novotny, W. F., Kabbinar, F. (2005): Bevacizumab in Combination With Fluorouracil and Leucovorin: An Active Regimen for First-Line Metastatic Colorectal Cancer *Journal of Clinical Oncology*, Vol 23, No 15: pp. 3502-3508.

13. Willett C. G., Boucher Y., Duda D. G., et al (2005): Surrogate markers for antiangiogenetic therapie and dose-limiting toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapie: Continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients, *J Clin Oncol* 23:8136-8139.

14. Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 82(1):4-6.

15. Pepper, M. S. (1997): Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17(4):605-19.
16. Shaked, Y., Bertolini, F., Man, S., Rogers, M. S., Cervi, D., Foutz, T., Rawn, K., Voskas, D., Dumont, D. J., Ben-David, Y., et al. (2005): Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis: Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell*, vol.7, 101-111.
17. Blann, A. D., Woywodt, A., Bertolini, F., Bull, T. M., Buyon, J. P., Clancy, R. M., Haubitz, M., Hebbel, R. P., Lip, G. Y. H., Mancuso, P., Sampol, J., Solovey, A., Dignat-George, F. (2005): Circulating endothelial cells, Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost*, 93:228-35.
18. Schon, M., Kahne, T., Gollnick, H., et al. (2005): Expression of gp 130 in tumors and inflammatory disorders of the skin: Formal proof of its identity as CD146 (MUC18, Mel-CAM). *J Invest Dermatol*, 125:353-363.
19. Khan, S. S., Solomon, M. A., McCoy, J. P. Jr. (2005): Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometrie. *Cytometrie B Clin Cytom*, 64:1-8.
20. Pickl, W. F., Majdic, O., Fischer, G. F., et al. (1997): MUC18/MCAM (CD146), an activating antigen of human T lymphocytes. *J Immunol*, 158:2107-2115.
21. Schedzewski, K., Falkowski, M., Moldenhauer, P., Metharom, P., Kzhyshkowska, J., Ganss, R., Demory, A., Falkowska-Hansen, B., Kurzen, H., Ugurel, S., Geginat, G., Arnold, B., Goerdts, S. (2006): Lymphatic endothelium-specific hyaluron receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumors and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis. *J of Pathol*, 209:67-77.

22. Dadras, S. S., Paul, T., Bertoncini, J., Brown, L.F., Muzikansky, A., Jackson, D. G., et al. (2003): Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol*, 162:1951-1960.
23. Jackson, D. C. (2004): Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *AMPIS*, 112:526-538.
24. Sahni, D., Robson, A., Orchard, G., Szydlo, R., Evans, A. V., Russel-Jones, R. (2005): The use of LYVE-1 antibody for detecting lymphatic involvement in patients with malignant melanoma of known sentinel node status. *J Clin Pathol*, 58:715-721.
25. Dadras, S. S., Lange-Asschenfeld, B., Velasco, P., Nguyen, L., Vora, A., Muzikansky, A., et al. (2005): Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol*, 18:1232-1242.
26. Dadras, S. S., North, P.E., Bertoncini, J., Mihm, M. C., Detmar, M. (2004): Infantile hemangiomas are arrested in an early developmental vascular differentiation state. *Mod Pathol*, 17:1068-1079.
27. Wigle, J. T., Harvey, N., Detmar, M., Lagutina, I., Grosveld, G., Gunn, M. D., et al. (2002): An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J*, 21:1505-1513.
28. Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C., Keller, G. (1998): A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*. 125(4):725-32.
29. Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M. et al. (1999): Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 85(3):221-8.

30. Hirstov, M., Weber, C. (2004): Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med.* 8(4):498-508.

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. W. Fiedler für die zuverlässige und stetige Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit meiner vorliegenden Promotionsarbeit. Außerdem danke ich ihm für die Überlassung dieses interessanten Themas.

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. C. Bokemeyer für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchzuführen, danken.

Ich bedanke mich bei unserer gesamten Arbeitsgruppe und dem kompletten (ehemaligen) Pavillon 29 für die stets hilfsbereite Zusammenarbeit im Labor.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Dr. med. S. Loges, die mich engagiert und kompetent betreut hat und mich während der kompletten Zeit meiner Promotionsarbeit tatkräftig und großzügig unterstützt hat.

Ich danke Prof. Dr. med. Pantel für die gute Zusammenarbeit mit dem Institut für Tumorbologie. Dr. rer. nat. S. Riethdorf danke ich für die unkomplizierte, hilfsbereite Einarbeitung in die APAAP-Färbung, die Bereitstellung des ACIS-Computer, die Bereitstellung der Tumorzellen und die Unterstützung bei der Auswertung. Ich bedanke mich besonders bei den MTAs des Institutes für Tumorbologie, die mir äußerst freundlich, hilfsbereit und kompetent die Färbemethoden, die Aufarbeitung der Zellen und die Bedienung des ACIS gezeigt haben.

Für die großzügige Bereitstellung von Proben möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Blutbank/Zellseparation bedanken.

Ich möchte mich bei Frau Ilena Kappes für die tatkräftige Unterstützung bei der Formatierung bedanken.

Ich danke meinen Eltern, für die einzigartige Unterstützung, die sie mir schon mein ganzes Leben lang geben. Meiner Schwester möchte ich für die wertvollen Ratschläge rund um die Uhr und die intensive telefonische Betreuung jeglicher Probleme danken.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| Name          | Karin Suhrbier                        |
| Geburtsdatum  | 27.08.1980                            |
| Geburtsort    | Münster                               |
| Familienstand | ledig                                 |
| Abitur        | 2000 Kreisgymnasium Neustadt/Holstein |

## Hochschulausbildung Musik

|           |   |
|-----------|---|
| 2000-2001 | Richard-Strauss-Konservatorium München, Hauptfach Querflöte |
|-----------|---|

## Hochschulausbildung Medizin

|           |  |
|-----------|--|
| 2002-2003 | LMU München  |
| 2003      | Universität Hamburg  |
| 2004      | Physikum, 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  |
| 2004-2007 | Famulaturen<br>Allgemeinchirurgie, Prof. Schimmelpenning, Klinikum Neustadt;<br>Allgemeinchirurgie, Prof. Izbicki, UKE;<br>Hämatologie/Onkologie, Prof. Bokemeyer, UKE;<br>Neurologie/ Psychiatrie, Dr. Suhrbier, Neustadt in Holstein |
| 2007-2008 | Praktisches Jahr<br>Chirurgie, AK Altona und Kinderchirurgie Altona<br>Innere Medizin, UKE, Nephrologie<br>Wahlfach Neurologie, AK Altona  |
| 2008      | 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  |
| 08/2008   | Assistenzarztstelle am UKE, Medizinische Klinik III,<br>Nephrologie  |

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einen Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion bemüht habe.

Hamburg, den 23.02.2009

Karin Suhrbier