UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

II. Medizinische Klinik und Polyklinik (Onkologie und Hämatologie)

Hubertus Wald Tumorzentrum

Universitäres Cancer Center Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

Der Effekt des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 auf den kanonischen Hedgehog-Signalweg in Endothelzellen und seine Bedeutung in der Antiangiogenese

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Livia Fuhrmann
aus Gütersloh

Hamburg 2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 30.06.2014

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. A. Block

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. S. Riethdorf

Für Thomas –

Himmel und Meer sind endlos weit ohne Dich.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III
1 Arbeitshypothese und Fragestellung 1
2 Einleitung 2
2.1 Blutgefäßneubildung 2
2.1.1 Das Gefäßsystem 2
2.1.2 Arten des Gefäßwachstums 3
2.1.3 Vaskulogenese 4
2.1.4 Angiogenese 6
2.1.5 Bedeutung der Endothelzellen bei Krebserkrankungen 8
2.1.6 Antiangiogene Therapie bei Krebserkrankungen 10
2.2 Der Hedgehog-Signalweg 11
2.2.1 Der Hh-Signalweg in der Angiogenese 15
2.2.2 Der Hh-Signalweg bei Krebserkrankungen 16
2.2.3 Der Hh-Signalweg als therapeutischer Angriffspunkt bei Krebserkrankungen ... 17
3 Material und Methoden 19
3.1 Inhibitoren und Aktivatoren des Hedgehog-Signalwegs 19
3.1.1 Smoothened-Inhibitor PF-04449913 19
3.1.2 Sonic Hedgehog 1314-SH/CF 19
3.2 Endothelzell-Proliferation 19
3.2.1 HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) 19
3.2.2 OECs (Outgrowth Endothelial Cells) 19
3.2.3 Endothelzell-Proliferation über drei Tage mit HUVECs und CB7 20
3.2.4 Proliferation von HUVECs über 14 Tage 20
3.2.5 Proliferation von HUVECs über acht bzw. 24 Tage 20
3.3 Real-Time quantitative PCR-Analyse mit HUVECs 21
3.3.1 Ausplattieren und Stimulation der HUVECs für die RTq-PCR 21
3.3.2 RNA-Isolierung 22
3.3.3 cDNA-Gewinnung 22
3.3.4 Quantitative PCR-Analyse 22
4 Ergebnisse 24
4.1 Effekt des Sonic Hedgehog-Proteins und Smo-Inhibitors PF-04449913 auf die Proliferation von humanen Endothelzellen 24
4.1.1 Effekt des Smo-Inhibitors auf die Proliferation von HUVECs und OECs 24

4.1.2 Langzeitproliferation zur Analyse des Effektes von Shh und PF-04449913 auf HUVECs 24

4.2 Effekt von Sonic Hedgehog und des Smo-Inhibitors auf die mRNA-Expression von HUVECs 25

4.2.1 Effekt des Smo-Inhibitors auf die Expression der Gli-Gene von HUVECs 25

4.2.2 Effekt von Sonic Hedgehog und des Smo-Inhibitors auf die Expression der Gli-Gene von HUVECs 26

4.2.3 Effekt von Sonic Hedgehog und des Smo-Inhibitors auf die Expression von Stammzellgenen durch HUVECs 28

5 Diskussion 30

6 Zusammenfassung 35

7 Anhang 36

Tabellen 36

Abbildungsverzeichnis 37

Tabellenverzeichnis 38

Literaturverzeichnis 39

Danksagung 48

Lebenslauf 49

Eidesstattliche Versicherung 50

Abkürzungsverzeichnis

ABCA2	ATP-binding cassette sub-family A member 2
AML	Akute myeloische Leukämie
Ang	Angiopoietin
ATP	Adenosintriphosphat
BCC	Basalzellkarzinom
Bcl2	B-cell lymphoma 2
Boc	Brother of Cdo
cDNA	Complementary DNA
Cdo	Cell adhesion molecule downregulated by oncogenes
CK1	Casein kinase 1
CML	Chronische myeloische Leukämie
C_P	Crossing Point
Dhh	Desert Hedgehog
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelzelle
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
FBS	Fetal bovine serum (fötales Kälberserum)
FDA	United States Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1
Flt4	FMS-like tyrosine kinase 4
GANT	Gli-Antagonist
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gas1	Growth arrest-specific gene 1
Gli	Glioma associated oncogene
Gli_A	Aktive Form von Gli
Gli_{FL}	Full-length Form von Gli

Gli_R	Repressor-Form von Gli
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
Hh	Hedgehog
HHIP	Hedgehog-Interacting Protein
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HPC	Hämatopoetische Progenitorzelle
HPI	Hedgehog Pathway Inhibitor
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
Ihh	Indian Hedgehog
KDR	Kinase insert domain receptor
Kif7	Kinesin family member 7
KLF4	Kruppel-like factor 4
LKB1	Liver kinase B1
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
Oct4	Octamer binding transcription factor 4
OEC	Outgrowth endothelial cell
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-Puffer)
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PK A	Proteinkinase A
PlGF	Placental growth factor
POU5F1	POU domain, class 5, transcription factor 1
PRDM14	PR Domain Containing 14
Ptch	Patched
Ras	Rat sarcoma
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	Ribonukleinsäure

ROCK	Rho-abhängige Kinase
RTq-PCR	Real-Time quantitative PCR
Shh	Sonic Hedgehog
SMC	Smooth muscle cell (glatte Muskelzelle)
Smo	Smoothened (Typ III Rezeptor)
Smo-Inh	Smoothened-Inhibitor
Sox2	SRY-box 2
SRY	Sex determining region Y
STK11	Serin Threonin Kinase 11
SuFu	Supressor of Fused
svVEGF	snake venom VEGF
TGF-β	Transforming-Growth-Factor-β
Tie	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domain
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Der Hedgehog-Signalweg übernimmt einige wichtige Funktionen während der Embryonalentwicklung und steuert auch postnatal die Aktivität von Stamm- und Vorläuferzellen (Riobo und Manning 2007). Bei mehreren Krebs-Entitäten treten Mutationen im Hedgehog-Signalweg auf, sodass er konstitutiv aktiviert die maligne Progression fördert. Da gezeigt werden konnte, dass der Hh-Signalweg dabei nicht nur in den Tumorzellen an sich sondern auch im benachbarten Stroma von Bedeutung ist, soll in der vorliegenden Arbeit die Rolle des Rezeptors Smoothened bei Endothelzellen untersucht werden (Scales und Sauvage 2009). Dazu soll der Effekt des spezifischen Smoothened-Inhibitors PF-04449913 und des rekombinanten humanen Sonic Hedgehog-Proteins 1314-SH/CF auf die Proliferation und Genexpression verschiedener Endothelzellen analysiert werden. Untersucht wurden Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVECs) und Outgrowth Endothelial Cells, isoliert aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern, in Form von Proliferations-Assays und quantitativen PCR-Analysen auf die Downstream-Signale Gli1-3 sowie die Stammzell-typischen Transkriptionsfaktoren LKB1, KLF4, Nanog, POU5F1, PRDM14 und Sox2.

Vor dem Hintergrund, einen neuen antiangiogenen Therapieansatz für hämatologische und solide Malignome zu entwickeln, soll weitergehend diskutiert werden, inwiefern sich der Smoothened-Inhibitor als ergänzendes Therapeutikum in der Tumortherapie eignet.

2 Einleitung

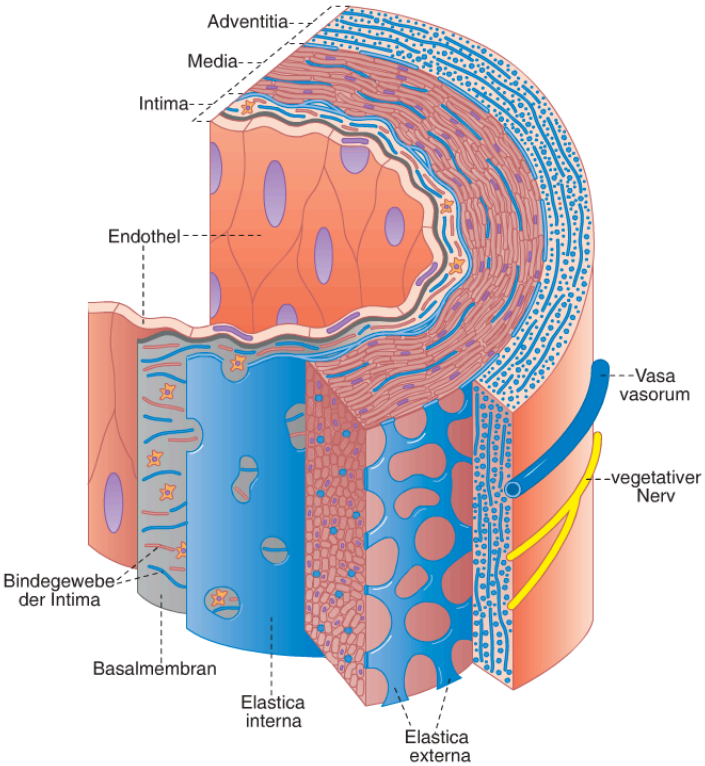
2.1 Blutgefäßneubildung

2.1.1 Das Gefäßsystem

Das Herz-Kreislauf-System versorgt die Organe des Körpers mit Sauerstoff und Nährstoffen und gewährleistet zugleich den Abtransport des mit Metaboliten angereicherten, sauerstoffarmen Blutes. Dabei weist das Gefäßsystem eine Hierarchie auf, bei der dem Herzen zunächst einzelne großlumige Arterien nachgeschaltet sind, die sich schließlich in vielzählige, immer kleiner werdende Blutgefäße verzweigen. Die endständigen, kleinsten Arterien, die Arteriolen, gehen schließlich in das Kapillarnetz über, wo der Flüssigkeits-, Sauerstoff- und Nährstoffaustausch mit dem umliegenden Gewebe stattfindet (Welsch 2006).

Arterien und Venen weisen einen dreischichtigen Wandaufbau aus der Tunica intima, media und adventitia auf, wobei die Ausprägung dieser Wandschichten an Funktion und Beanspruchung des jeweiligen Blutgefäßes angepasst ist (Welsch 2006). Abbildung 1 stellt schematisch diesen Gefäßaufbau dar.

Abbildung 1. Wandaufbau der Blutgefäße



Die innen gelegene Tunica intima kleidet mit ihrem einschichtigen Plattenepithel, dem Endothel, das Blutgefäßlumen aus. Es schließt sich die Basalmembran und eine lockere Bindegewebsschicht mit Fibrozyten, glatten Muskelzellen und Abwehrzellen an. Die Tunica media ist zirkulär angeordnet und setzt sich aus elastischen und kollagenen Fasern sowie glatten Muskelzellen zusammen. Die Tunica adventitia besteht aus longitudinalen Kollagenfibrillen, elastischen Fasern und Fibroblasten und geht unscharf in das umliegende Bindegewebe über (entnommen aus Welsch 2006).

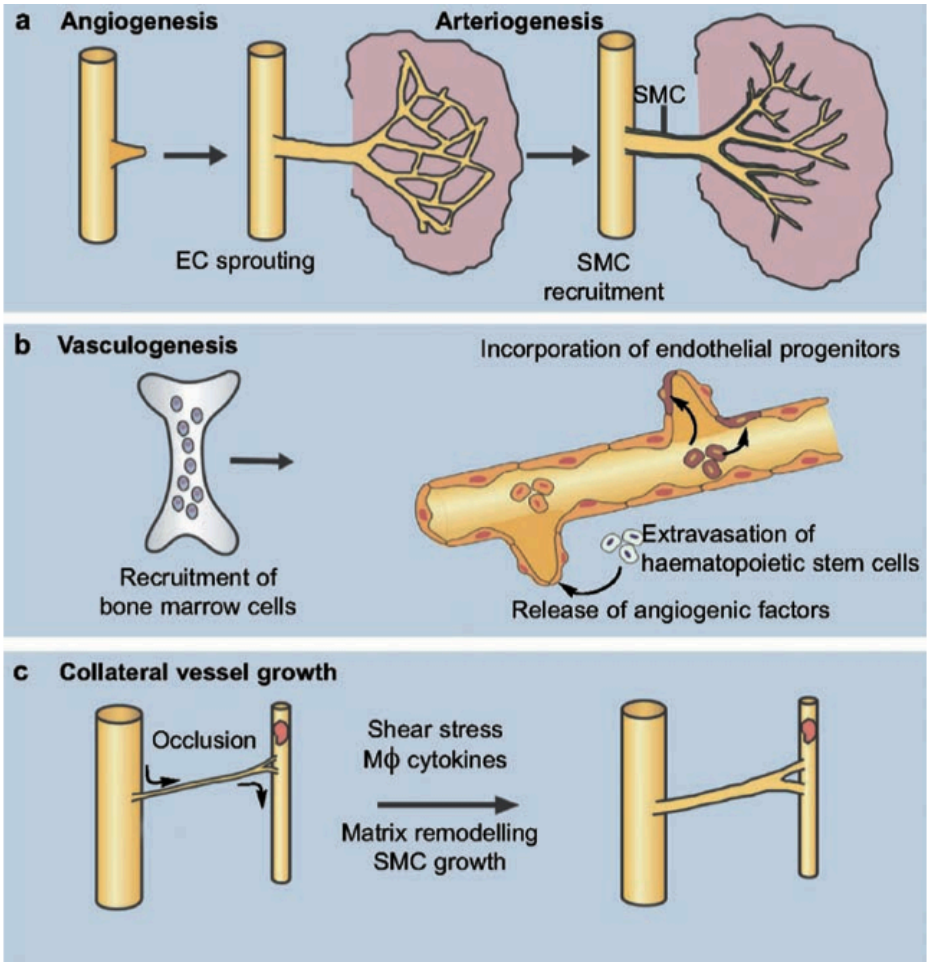
Das Kapillarnetz weist entsprechend seiner Funktion und seines Vorkommens bestimmte Eigenschaften auf. Um einen optimalen Stoffaustausch zu gewährleisten sind vielzählige Blutkapillaren parallelgeschaltet, sodass sie bei einem sehr kleinen Durchmesser von 6 - 12 µm eine maximale Gesamtoberfläche besitzen. Außerdem sind Kapillaren durch einen

weniger komplexen Wandaufbau bestimmt. Eine dünne Schicht aus Endothelzellen umgibt das Lumen, wobei bei kleineren Kapillaren zum Teil eine Endothelzelle ausreicht, um die gesamte Wand zu bilden. Je nach Anforderungen der Umgebung kann das Endothel vom kontinuierlichen, fenestrierten oder diskontinuierlichen Typ sein. Der Basalmembran des Endothels liegen kontraktile Perizyten an, die die Durchblutung der Kapillaren regulieren (Welsch 2006).

2.1.2 Arten des Gefäßwachstums

Sowohl während der Embryogenese als auch postnatal sorgen komplex regulierte Vorgänge für den Aufbau und Erhalt eines funktionierenden Gefäßsystems. Dabei können drei Hauptmechanismen der Blutgefäßbildung unterschieden werden: Die Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese. Abbildung 2 gibt einen schematischen Überblick dieser Vorgänge.

Abbildung 2. Arten des Gefäßwachstums



Die Vaskulogenese (b) beschreibt die Neubildung von Blutgefäßen aus endothelialen Progenitorzellen (EPC, endothelial progenitor cell), die aus zahlreichen embryonalen Regionen bzw. dem Knochenmark Erwachsener stammen. Dahingegen entstehen bei der Angiogenese (a) die neuen Gefäße durch Sprossungs- und Spaltungsvorgänge aus bereits bestehenden Blutgefäßen. Diese neu gewachsenen Blutgefäße werden während der Arteriogenese durch Perizyten und glatte Muskelzellen weiter stabilisiert. Die Arteriogenese beschreibt also einen Vorgang, bei dem vorbestehende Blutgefäße remodelliert werden, wie zum Beispiel auch während der Ausbildung von Kollateralen im Sinne eines natürlichen Bypasses nach dem Verschluss einer Stammarterie (c), und ist somit unabdingbar für den Erhalt eines stabilen, reifen und funktionsfähigen Gefäßsystems. Abkürzungen: EC = Endothelial Cell; SMC = Smooth muscle cell (entnommen aus Fischer *et al.* 2006).

Um die Blutgefäßneubildung besser verstehen zu können, soll im Folgenden detaillierter auf die Charakteristika von Vaskulo- und Angiogenese eingegangen werden.

2.1.3 Vaskulogenese

Die Vaskulogenese ist ein vorwiegend embryonaler Prozess. Bereits in der dritten Entwicklungswoche bilden sich Gewebeverdichtungen im Mesoderm von Dottersack, Haftstiel und Chorion, die sich zu kompakten Blutinseln entwickeln. Die zentral gelegenen Zellen dieser Inseln stellen primitive Blutzellen dar, die Hämozytoblasten, und schlagen somit eine hämatopoetische Differenzierung ein, während die Peripherie der Blutinseln endotheliale Vorläuferzellen, die Angioblasten, hervorbringen (Schiebler und Korf 2007). Diese enge Nachbarschaft von differenzierenden hämatopoetischen und endothelialen Zellen während der embryonalen Vaskulogenese zum einen und deren molekulare Ähnlichkeit zum anderen – sie exprimieren eine Reihe an identischen Oberflächenmarkern wie CD31, CD34, CD133 und c-Kit – deuten auf einen gemeinsamen, mesodermalen Vorläufer hin (Fischer *et al.* 2006). Die Theorie des Hämangioblasten, wie dieser Vorläufer genannt wird, konnten Pardanaud *et al.* (1996) durch Transplantationsversuche mit Wachtel- und Hühnerembryos unterstützen. Sie isolierten eine Zelllinie aus dem Seitenplatten-mesoderm, die sich sowohl in endotheliale als auch hämatopoetische Zellen differenzieren konnte. Gunsilius *et al.* (2000) übertrugen diese Erkenntnisse auf den Menschen, indem sie sechs CML (chronische myeloische Leukämie)-Patienten mit typischer BCR/ABL-Translokation untersuchten. Sie wiesen das BCR/ABL-Fusionsgen sowohl in hämatopoetischen Vorläuferzellen als auch in Endothelzellen nach, was die Existenz des Hämangioblasten als gemeinsamen Vorläufer und hier auch als Ursprung der CML-spezifischen Mutation unterstützt.

Die enge Verbindung zwischen Zellen endothelialer und hämatopoetischer Herkunft spielt auch klinisch eine Rolle. So treten aus dem Knochenmark stammende hämatopoetische Zellen in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) in tumoröses bzw. ischämisches Gewebe ein und stimulieren durch Sekretion von angiogenen Faktoren wie VEGF und Angiopoietin-2 (Ang-2) wiederum das Wachstum von Blutgefäßen (Okamoto *et al.* 2005). Außerdem demonstrierten Kaplan *et al.* (2005) an Mausversuchen die Beteiligung von hämatopoetischen Progenitorzellen (HPCs) aus dem Knochenmark an der prämetastatischen Nischenbildung. Diese hämatopoetischen Vorläuferzellen, die den VEGF-Rezeptor-1 exprimieren, schaffen optimale Umgebungs-bedingungen, sodass sich EPCs und zirkulierende Tumorzellen ansiedeln und Metastasen bilden können. Durch Gabe von VEGFR-1-Antikörpern konnte die prämetastatische Nischenbildung aufgehoben und eine Metastasierung verhindert werden.

Obwohl der Vaskulogenese die größte Wichtigkeit während der Embryogenese zukommt, deuten immer mehr Hinweise darauf, dass sie auch für das postnatale Gefäßwachstum relevant ist. Dieser Vorgang, bei dem im Blut zirkulierende und aus dem Knochenmark stammende endotheliale Vorläuferzellen neue Blutgefäße bilden, wird Neovaskulogenese genannt. Zunächst konnten Asahara *et al.* (1997) endotheliale Zellen aus $CD34^+$ bzw. $VEGFR\text{-}2^+$ mononukleären Zellen aus peripherem Blut erwachsener Menschen isolieren und zeigen, dass sich diese bei Mäusen und Kaninchen mit frischen Extremitätenischämien in die Wände neovaskularisierender Kapillaren einlagerten. Den Nachweis im menschlichen Organismus erbrachten Peichev *et al.* (2000), indem sie $AC133^+$, $VEGFR\text{-}2^+$ und $CD34^+$ Zellen aus peripherem Blut isolierten und als zirkulierende EPCs identifizierten. Da der Marker AC133 (heute CD133) während der endothelialen Differenzierung verloren geht, gelang so die Abgrenzung zu von Gefäßwänden abgeschilferten reifen Endothelzellen.

Weitergehend untersuchten sie explantierte linksventrikuläre Unterstützungssyteme, die als mechanisches Kunstherz Anschluss an das Gefäßsystem finden und von einer als Neointima bezeichneten Endothelschicht besiedelt werden. In dieser Neointima konnten $CD133^+$ EPCs identifiziert werden, die sich zu Wachstumsinseln in dem neu entstehenden Endothel zusammenschlossen und zu reifen Endothelzellen differenzierten (Peichev *et al.* 2000). Den Verdacht, dass Neovaskulogenese am postnatalen Gefäßwachstum beteiligt ist und dass die dazu beitragenden EPCs tatsächlich aus dem Knochenmark stammen, konnten Asahara *et al.* 1999 mit Versuchen an knochenmarktransplantierten Mäusen erhärten. Nach Transplantation von beta-Galaktosidase$^+$($lacZ^+$)-Knochenmark fanden sich $lacZ^+$ EPCs integriert in Kapillaren und umgebendem Stroma in Regionen von physiologischer (Ovar) und pathologischer (Tumor, Wundheilung, Myokard- und Extremitätenischämie) Neovaskularisation. Auf den Menschen übertragen zeigten Gunsilius *et al.* (2000), dass sich nach allogener Knochenmarktransplantation eines CML-Patienten Endothelzellen aus dem Spendermark in das vaskuläre Endothel integrierten, da diese Endothelzellen die spendertypischen HLA-Antigene jedoch nicht die BCR/ABL-Translokation des Patienten aufwiesen.

Neben diesen EPCs existiert eine weitere Population endothelialer Vorläuferzellen, die erstmals 2000 von Lin *et al.* beschrieben wurde. Charakteristischerweise verfügt sie über ein hohes Proliferationspotential und entwickelt sich erst zu einem späten Zeitpunkt aus mononukleären Zellen von Blutkulturen, weswegen sie späte EPCs oder auch Outgrowth Endothelial Cells (OECs) genannt werden. Sie besitzen außerdem eine hohe angiogene Aktivität *in vitro* und *in vivo*, wodurch sich OECs menschlichen Ursprungs in Mausmodellen in bestehende Gefäßwände integrierten und sogar neue Gefäße ausbildeten (Tura *et al.* 2013). Ingram *et al.* (2004) charakterisierten OECs nach ihrem Potential zu proliferieren und Klone zu bilden und stellten so eine neuartige Hierarchie an Vorläuferzellen auf, ähnlich wie sie auch bei der hämatologischen Zellreihe beobachtet werden kann. Ein mutmaßlich früher Vorläufer konnte aus Nabelschnurvenenblut gewonnen werden. Dieser verfügte, verglichen mit den OECs von Erwachsenen, über ein deutlich höheres Proliferationspotential *in vitro*, behielt eine hohe Telomerase-Aktivität und war fähig, sekundäre und tertiäre Kolonien zu bilden (Ingram *et al.* 2004). Der Ursprung der OECs ist gegenwärtig noch ungeklärt, es sprechen aber einige Hinweise für eine extramedulläre Herkunft. Bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen aus dem myeloproliferativen Formenkreis fehlte die krankheitsspezifische Mutation in den OECs, während sie in den übrigen hämatopoetischen und medullären Zellen nachgewiesen werden konnte (Otten *et al.* 2008, Piaggio *et al.* 2009). Eine ähnliche Erkenntnis erlangten Tura *et al.* (2013), da sie OECs nur aus mononukleären Zellen von peripherem oder Nabelschnurblut, nicht aber aus dem Knochenmark oder aus dem Knochenmark stammenden Zellen isolieren konnten. Dies und die Tatsache, dass sich OECs *in vitro* nahezu ununterscheidbar von reifen Endothelzellen darstellen (sie stimmen in Morphologie, Metabolismus, Expression von Oberflächenantigenen wie $CD34^+$, $CD133^-$, $CD146^+$ und Gen- und Proteinexpression überein), deuten auf einen vaskulären Ursprung der OECs außerhalb des Knochenmarks hin (Tura *et al.* 2013). Sogar einen Schritt weiter gingen Timmermans *et al.* (2007), indem sie die Hypothese aufstellten, dass OECs die eigentlichen endothelialen Progenitorzellen darstellen. Sie führten Markeranalysen an $CD34^+$ Zellpopulationen aus menschlichem Nabelschnurblut und Knochenmark durch und bestimmten eine $CD34^+$ VEGFR-2^+ $CD133^-$ $CD45^-$ Zellfraktion als Ursprung der OECs. CD133 galt bisher als typischer Marker endothelialer Vorläufer, der während der weiteren

Differenzierung zu reifen Endothelzellen verloren geht und nach Peichev *et al.* auf frühen EPCs vorhanden ist (s.o.). Dies grenzt OECs zum einen als eigenständige EPC-Population von frühen EPCs und hämatologischen Zellen ab und zeigt zum anderen deren phänotypische Ähnlichkeit zu reifen Endothelzellen.

2.1.4 Angiogenese

Das Prinzip der Angiogenese wurde erstmals 1787 durch den britischen Chirurgen Dr. John Hunter beschrieben, der Revaskularisierung in Rentiergeweihen nach Durchtrennung des hauptversorgenden Gefäßes beobachtete (Murley 1984, Hunter 1794). Etwa 150 Jahre später wurde der Begriff Angiogenese, abgeleitet von den griechischen Wörtern *angeion* für Gefäß und *genesis* für Entstehung, durch den Bostoner Pathologen Dr. Arthur T. Hertig geprägt, um die Blutgefäßneubildung in der Plazenta von schwangeren Affen zu bezeichnen (Hertig 1935). Nach der Geburt ist Angiogenese ein stark herunterregulierter Prozess, der physiologisch fast ausschließlich in den weiblichen Reproduktionsorganen während Schwangerschaft und Monatszyklus abläuft (Nikitenko und Boshoff 2006, Rumpold *et al.* 2004). Zudem kann sie zu Wundheilungs- und Reparaturzwecken reaktiviert werden, da Endothelzellen ein Leben lang ihre Teilungsfähigkeit behalten (Fischer *et al.* 2006). Auf der anderen Seite ist dysregulierte Angiogenese mitverantwortlich für eine Reihe von Erkrankungen und mittlerweile sind über 70 verschiedene Pathologien bekannt, an denen sie beteiligt ist (Carmeliet 2005). Pathognomonisch für diese Krankheitsbilder ist ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenen Stimuli, was zu Störungen dieses komplex regulierten Vorganges führt. Verhält sich die angiogene Reaktion überschießend, so nennt man dies einen „angiogenen Switch“ (Fischer e*t al.* 2006). Exzessive Angiogenese findet sich hauptsächlich bei entzündlichen Krankheiten, wie denen aus dem rheumatischen Formenkreis und ophthalmologischen Erkrankungen wie der diabetischen Retinopathie oder der altersbedingten Makuladegeneration (Folkman 1995, Mariotti und Maier 2006). Sie spielt aber auch eine entscheidende Rolle bei anderen Autoimmunerkrankungen, der Neurodegeneration bei Demenz vom Alzheimer- oder Parkinsontyp, der atherosklerotischen Plaquebildung und beim Asthma bronchiale (Kirk und Karlik 2003, Vagnucci und Li 2003, Barcia *et al.* 2004, Nakano *et al.* 2005). Nicht zuletzt ist Blutgefäßneubildung unabdingbar für das Tumorwachstum, da Diffusion bei soliden Tumoren ab einer Größe von 1-2 mm^3 keinen ausreichenden Sauerstoff- und Nährstoffaustausch gewährleisten kann (Folkman 1971). Darüber hinaus begünstigt sie neben der Progression auch die Metastasierung eines malignen Prozesses (Carmeliet 2005). Ist dahingegen der angiogene Switch unzureichend, resultiert dies in endothelialer Dysfunktion mit Blutgefäßfehl- und -rückbildungen bzw. verminderter Revaskularisierung und Regeneration des Gewebes (Fischer *et al.* 2006). Führende Beispiele für insuffiziente Angiogenese sind peptische Ulcera, Osteoporose und kardiovaskuläre Erkrankungen – wie ischämischer Schlaganfall und koronare Herzerkrankung – wovon letztere immer noch die häufigste Todesursache weltweit darstellen (Kim *et al.* 2004, Mariotti und Maier 2006, Fam *et al.* 2003, WHO 2011).

Bezüglich des Vorgangs der Angiogenese existieren verschiedene Mechanismen, wobei die sprossende von der nicht-sprossenden Angiogenese unterschieden werden kann (Risau 1997). Ist während der Vaskulogenese zunächst ein primitives vaskuläres Netzwerk entstanden, wird es durch Angiogenese in ein komplexes, hierarchisch organisiertes Gefäßsystem umgebaut. Dabei sezernieren hypoxische Regionen angiogene Faktoren, sodass aktivierte Endothelzellen die Basalmembran und extrazelluläre Matrix proteolytisch

abbauen, proliferieren und in Richtung der angiogenen Stimuli perlschnurartig aussprossen (Fischer *et al.* 2006). Es folgt die Lumenbildung und Reifung der neu entstandenen Gefäßaussprossungen durch Ausbildung einer neuen Basalmembran und Rekrutierung von periendothelialen Zellen wie Perizyten und glatte Muskelzellen (Jośko *et al.* 2000). Dieser Mechanismus beschreibt die sprossende Angiogenese. Die nicht-sprossende Angiogenese dahingegen wird auch Intussuszeption bezeichnet, da sich gegenüberliegende Endothelwände einstülpen und somit eine Längsspaltung des Gefäßes in zwei kleinere bewirken (Carmeliet und Jain 2011a).

Unter physiologischen Bedingungen stellt Angiogenese einen streng regulierten Vorgang dar, der ruhende Endothelzellen anzuregen vermag und das Gefäßbett auf diese Weise ständig an die wechselnden Anforderungen des umliegenden Gewebes anpasst. Der stärkste Trigger ist ein niedriger extrazellulärer Sauerstoffgehalt. Aber auch andere Hypoxiebedingte, metabolische Faktoren wie ein niedriger pH-Wert oder Hypoglykämie können den angiogenen Prozess anstoßen (Pugh und Ratcliffe 2003). Dabei verkörpern VEGFs die Schlüsselmediatoren der Angiogenese, welche zusammen mit den VEGF-Rezeptoren durch Hochregulation der Hypoxie-induzierten Faktoren (HIFs) in Endothelzellen vermehrt transkribiert werden (Chung *et al.* 2010). Die VEGF/ VEGF-Rezeptor-Achse umfasst sieben endothelzellspezifische Liganden, die Wachstum und Morphogenese von Blut und Lymphgefäßen regulieren: VEGF-A bis -E, PlGF (Placental Growth Factor) und das svVEGF (snake venom VEGF). Der bedeutendste Faktor unter ihnen, VEGF-A, wird verkürzt auch nur VEGF genannt. Durch alternatives Spleißen entstehen neun verschiedene VEGF-A-Isoformen, die sich in ihrer Aminosäurenanzahl und somit in ihrer Bindungsfähigkeit an Heparansulfat der extrazellulären Matrix unterscheiden (Takahashi und Shibuya 2005). Die Mitglieder der VEGF-Familie variieren in ihrer Bindungsaffinität zu den drei Rezeptoren VEGFR-1 (Flt1), -2 (KDR) und -3 (Flt4). Biochemisch handelt es sich dabei um Rezeptortyrosinkinasen vom Typ III mit einer extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Bindungsstelle, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Kinaseaktivität. Die proangiogene Wirkung von VEGF-A wie Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Induktion von endothelialer Migration und Proliferation wird vorwiegend über den VEGF-Rezeptor-2 übermittelt (Wagener und Müller 2009). Doch VEGF-A bindet auch an VEGFR-1, dessen Signaltransduktion in die Pathogenese von ischämischen, entzündlichen und karzinogenen Zuständen eingebunden ist. VEGFR-3 dagegen übernimmt mit seinen Liganden VEGF-C und -D die stärkste Rolle in der Lymphangiogenese. Neben den beschriebenen Rezeptoren existieren die zwei VEGF-Co-Rezeptoren Neuropilin 1 und 2, die den Effekt der VEGF-VEGFR-2-Signalkaskade potenzieren können und während der Embryogenese und Tumorangiogenese von Bedeutung sind (Takahashi und Shibuya 2005). Die Abhängigkeit der Angiogenese vom VEGF-Signalweg konnte anhand verschiedener Studien mit VEGF-A-, VEGFR-1- bzw. VEGFR-2-defizienten Mäusen gezeigt werden. Bei homo- bzw. heterozygotem Genverlust zeigte sich die Entwicklung des vaskulären und hämatopoetischen Systems stark gestört, was in allen Fällen zum Abort führte (Shalaby *et al.* 1995, Ferrara *et al.* 1996). Neben dem VEGF/VEGFR-Signalweg sind jedoch noch zahlreiche andere Faktoren und Signalwege an der Regulation der Angiogenese beteiligt. Darunter nehmen die FGF (Fibroblast Growth Factor)-Familie und die Angiopoietine mit ihren Rezeptoren Tie1 und 2 ebenfalls eine wichtige proangiogene Rolle ein, während Endostatin, Angiostatin und Vasostatin zu den bedeutendsten antiangiogen wirksamen Faktoren zählen (Jośko *et al.* 2000, O'Reilly *et al.* 1994, O'Reilly *et al.* 1997). Bis dato konnten mindestens 27

verschiedene endogene Angiogenesehemmer identifiziert werden, die entsprechend ihres Ursprungs in zwei Gruppen unterteilt werden. Endostatin als C-terminales Spaltprodukt von Kollagen XVIII gehört zu den Molekülen, die von größeren Proteinen der extrazellulären Matrix und Basalmembran abstammen (Ribatti 2009). Endothelzellspezifisch wirkt Endostatin antimigratorisch, antiproliferativ und apoptotisch, indem es u.a. die Bindung von VEGF-A an den VEGF-Rezeptor-2 unterbindet (Dhanabal *et al.* 1999a, Dhanabal *et al.* 1999b, Dixelius *et al.* 2002). Die zweite, nicht-Matrix-assoziierte Gruppe negativer Regulatoren der Angiogenese umfasst Wachstumsfaktoren, Zytokine und Metabolite von Blutgerinnungsfaktoren. Zu letzteren zählt auch Angiostatin, ein Abkömmling von Plasminogen (Ribatti 2009). Plasminogen stellt die inaktive Vorstufe der Serin-Protease Plasmin dar, welche im Blut zirkuliert und neben seinem Hauptsubstrat Fibrin auch Proteine der extrazellulären Matrix um Endothelzellen spaltet. Durch seine ähnliche Struktur blockiert Angiostatin diesen Signalweg und hemmt so die Migration von Endothelzellen (Nyberg *et al.* 2005). Des Weiteren bindet Angiostatin direkt an die ATP-Synthase auf Endothelzellen und hat auf diesem Wege einen antiproliferativen bzw. apoptotischen Einfluss (Moser *et al.* 1999). Die antiangiogene sowie tumorstatische Wirksamkeit von Endostatin, Angiostatin und weiteren endogenen Angiogeneseinhibitoren konnte in zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Studien belegt werden (Sund *et al.* 2005, O'Reilly *et al.* 1994, O'Reilly *et al.* 1996, Ribatti 2009, Kim *et al.* 2000).

2.1.5 Bedeutung der Endothelzellen bei Krebserkrankungen

Bereits vor ca. 40 Jahren belegte der Chirurg Judah Folkman die Abhängigkeit des Tumorwachstums von einer Neovaskularisierung und vermutete darüber hinaus einen therapeutischen Wert der Antiangiogenese in der Onkologie (Folkman 1971). In Versuchen mit Kaninchen, denen Tumore in die avaskuläre Kornea bzw. die gefäßreiche Retina transplantiert wurden, zeigte sich das Ausmaß des Tumorwachstums stark abhängig von der Fähigkeit des Tumors, Angiogenese zu induzieren und sich adäquat an das Gefäßbett anzuschließen (Gimbrone *et al.* 1972, Gimbrone *et al.* 1974). Ohne ausreichenden Anschluss an das Gefäßsystem starb die Tumormasse zwar nicht ab, verblieb jedoch in einem Gleichgewichtszustand zwischen Apoptose der innen gelegenen Zellen und Proliferation der Äußeren (Ribatti 2008).

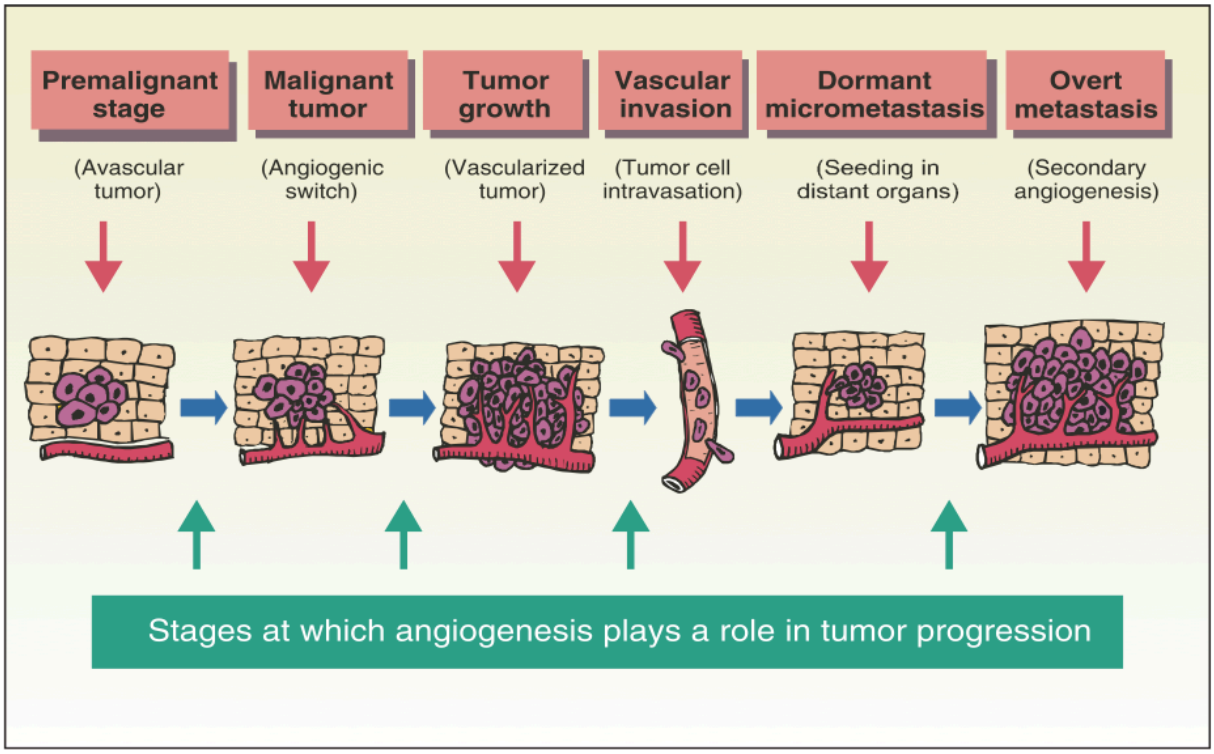
Getriggert wird der Switch zum angiogenen Phänotyp auf zwei Wegen, die beide zu einer Überexpression von VEGF und weiteren proangiogenen Faktoren führen. Zum einen aktivieren schlecht vaskularisierte und somit hypoxische Tumorareale den Transkriptionsfaktor HIF-1α und zum anderen entwickeln Tumore während der Karzinogenese typischerweise Mutationen in Onko- bzw. Tumorsuppressorgenen (Jośko *et al.* 2000, Ferrara und Kerbel 2005). Charakteristischerweise ist die angiogene Kaskade in Tumoren anhaltend, befreit von ihrer negativer Rückkopplung und somit nicht selbstlimitierend (Chung *et al.* 2010).

Neben Vaskulogenese, sprossender und intussuszeptiver Angiogenese sind wachsende Tumore befähigt, sich drei weiterer Mechanismen zu bedienen, um ihre Blutversorgung sicherzustellen (Carmeliet und Jain 2011a): 1.) Durch vaskuläre Kooption können maligne Raumforderungen vorbestehende Gefäße für sich beanspruchen. 2.) Bei einem Phänomen namens vaskuläre Mimikry bilden Tumorzellen selbst stellenweise die Gefäßwand. 3.) Und schließlich können stammzellähnliche Tumorzellen eine endotheliale Differenzierung

einschlagen, was jedoch auf Grund ihres irregulären, ungeordneten Wachstums Undichtigkeiten oder Thrombosen begünstigen kann (Wang *et al.* 2010, Carmeliet und Jain 2011a). Die während der Tumorangiogenese gebildeten Blutgefäße sind somit in vielerlei Hinsicht problematisch, da sie morphologische und charakteristische Besonderheiten aufweisen. Sie sind desorganisiert und entbehren der für das Gefäßsystem typischen Hierarchie in dem Sinne, als dass sie im Kaliber schwanken, plötzlich abbrechen oder einen retrograden Fluss zeigen können. Zudem sind Tumorgefäße hyperpermeabel, d.h. es tritt vermehrt Flüssigkeit ins Interstitium aus, sodass der Gewebedruck im Tumor ansteigt. Der dadurch abnehmende hydrostatische Druckunterschied zwischen Gefäß und Interstitium erschwert den Austritt von Chemotherapeutika und Immunzellen aus der Blutbahn ins Tumorgewebe. Andersherum jedoch wird der Flüssigkeitsüberschuss aus dem Tumorgewebe vermehrt über die Lymphe abtransportiert, wodurch auch die Tumorzellen zu den zunächst regionalen Lymphknoten verschleppt werden. Dies und die Tatsache, dass die undichten Blutgefäße eine leichte Eintrittspforte für Tumorzellen in die Blutstrombahn verkörpern, begünstigt die Tumormetastasierung (Wagener und Müller 2009). Ein sekundärer angiogener Switch ermöglicht dann das exponentielle Wachstum der initial schlecht vaskularisierten, ruhenden Mikrometastasen (Poon *et al.* 2001). Die unreife Architektur der Tumorgefäße führt zu einer unregelmäßigen Anbindung einzelner Tumorareale an das Gefäßsystem, wodurch ein Mosaik von gut und insuffizient oxigenierten Regionen entsteht. Die vermehrte Hypoxie wiederum hält einen Teufelskreis aus Neoangiogenese und zunehmender vaskulärer Insuffizienz aufrecht (Ziyad und Iruela-Arispe 2011). Sie triggert außerdem neben Angiogenese auch das invasive Wachstum sauerstoffminderversorgter Tumorzellen hin zu besser vaskularisierten Regionen (Pennacchietti *et al.* 2003) und stellt einen natürlichen Selektionsfaktor dar, der das Überleben und die Expansion von resistenteren, den hypoxischen Stress tolerierenden Tumorzellklonen favorisiert. Diese aggressiveren neuen Klone, die meist auch weniger strahlensensibel sind, haben dann die besten Voraussetzungen, der dominante Tumorzelltyp zu werden (Potente *et al.* 2011, Höckel und Vaupel 2001). Zusammengefasst stimulieren Hypoxie, Azidose und interstitielle Hypertonie als Resultat einer irregulären Gefäßstruktur und -funktion invasives Wachstum, maligne Progression und Metastasierung eines Primärtumors und vermindern außerdem die Wirksamkeit der konventionellen Krebstherapie (Carmeliet und Jain 2011b). Abbildung 3 veranschaulicht die Bedeutung der Angiogenese in den verschiedenen Stadien der Tumorprogression.

Darüber hinaus haben Endothelzellen perfusionsunabhängige Funktionen und sind befähigt, organspezifische vaskuläre Nischen zu präparieren (Carmeliet und Jain 2011a). Butler *et al.* (2010) konnten nachweisen, dass Endothelzellen während der Embryogenese in wachsende Organe migrieren und selbst in Abwesenheit eines Blutflusses die Organogenese fördern. Durch parakrine Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen stimulieren sie aktiv Stamm- und Vorläuferzellen und schaffen optimale Umgebungsbedingungen für die Expansion des Tumors. Dieses komplexe Zusammenspiel zwischen Krebs- und Endothelzellen ist nicht nur auf die Pathogenese von soliden Tumoren beschränkt, sondern wird auch zunehmend bei hämatologischen Erkrankungen beobachtet. Neoangiogenese läuft bei hämatologischen Malignomen im Knochenmark ab, woran sich zusätzlich Perizyten, Fibroblasten, EPCs, dendritische Zellen und die extrazelluläre Matrix beteiligen (Li *et al.* 2008). Als morphologisches Korrelat dieser Neoangiogenese bei hämatologischen Erkrankungen konnten in zahlreichen Studien eine vermehrte Mikrogefäßdichte sowie Über-

Abbildung 3. Angiogenese in den einzelnen Stadien der Karzinogenese



Angiogenese ist essentiell für die Progression eines Malignoms und beteiligt an der initialen Tumorbildung bis zum finalen Stadium der Metastasenausreifung (entnommen aus Pang und Poon 2006b).

expression angiogener Faktoren wie VEGF, VEGFR-1 und -2, FGF-2, Angiopoietine und HIF-1α im Knochenmark beobachtet werden, was jeweils mit einer negativen Prognose korrelierte (Schmidt und Carmeliet 2011, Dong *et al.* 2007). Durch Inhibition der Angiogenese können nicht nur maligne Zellen von ihrer Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr abgeschnitten werden, sondern auch die parakrinen und autokrinen Wechselwirkungen zwischen vaskulärer Nische und Tumorzellen im Knochenmark gestört werden (Li *et al.* 2008).

2.1.6 Antiangiogene Therapie bei Krebserkrankungen

Die Angiogenese stellt einen geeigneten therapeutischen Angriffspunkt in der Tumortherapie dar. Verglichen mit der zytotoxischen Chemotherapie ist ein medikamentöses Eingreifen an dieser Stelle relativ komplikationsarm, da physiologische Angiogenese beim Erwachsenen nur in sehr geringem Maße stattfindet (Pang und Poon 2006a). Zu einem gegebenen Zeitpunkt befindet sich unter physiologischen Bedingungen lediglich eine von 10.000 Endothelzellen in der Zellteilung (Wagener und Müller 2009). Außerdem macht man es sich zu Nutze, dass Tumorgefäße im Gegensatz zum normalen Gefäßsystem stark wachstumsfaktorabhängig sind. Da dem VEGF-Signalweg hier am meisten Bedeutung beigemessen wird, interferieren die meisten der zehn bisher erprobten Angiostatika direkt oder indirekt in diesem (Jain 2013). Der zuerst zugelassene VEGF-Inhibitor war der monoklonale Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab (Meadows und Hurwitz 2012). In Kombination mit Chemo- oder Zytokintherapie ist er zugelassen für die Therapie von verschiedenen fortgeschrittenen Tumoren in der metastatischen Phase oder im Rezidiv. Darüber hinaus zeigen die kleinmolekularen Tyrosinkinaseinhibitoren Sunitinib, Sorafenib, Pazopanib und Vandetanib eine relativ starke Affinität für die drei VEGF-Rezeptoren und finden Zulassung für eine Reihe weiterer Malignome (Potente *et al.* 2011). Anti-VEGF-

Therapie in murinen und humanen Studien der letzten Jahre hat die klinische Bedeutung einer vaskulären Normalisierung belegt, da sie die Tumorgefäßperfusion erhöht, Tumorhypoxie vermindert, den Transport von systemisch applizierten Tumortherapeutika begünstigt und die Strahlensensibilität verbessert (Huang *et al.* 2013). Dabei korrelierte der Grad der Gefäßnormalisierung bzw. eine erhöhte Tumordurchblutung mit der Länge des progressionsfreien Intervalls und der Überlebensrate (Jain 2013). Diese Ergebnisse konnten erst kürzlich durch Sorensen *et al.* (2012) und Emblem *et al.* (2013) manifestiert werden, die bei Respondern des kleinmolekularen Tyrosinkinaseinhibitors Cediranib unter Glioblastom-Patienten ein verlängertes Gesamtüberleben aufzeigten. Des Weiteren und besonders in Kombination mit der Immuntherapie versprechen sich Huang *et al.* (2013) durch Blockade des VEGF-Signalwegs eine Steigerung der antitumoralen Immunität. Dies könnte einerseits durch einen verbesserten intratumoralen Transport von immunogenen Zellen, durch Milderung des Hypoxie-bedingten immunsuppressiven Tumormilieus oder andererseits durch Neutralisierung der systemischen immunsuppressiven Funktion von VEGF realisiert werden (Huang *et al.* 2013).

Neben dem VEGF-Signalweg sind nun auch weitere proangiogene Faktoren in den Fokus der antiangiogenen Therapie gerückt (Huang *et al.* 2013). Antikörper oder kleinmolekulare Inhibitoren gegen PlGF, PDGF (Platelet-derived Growth Factor), Angiopoietine, deren Rezeptoren und Integrine scheinen auch einen gewissen Grad des Tumorgefäß-Remodellings zu erreichen (Goel *et al.* 2011).

So schnell die erste gefäßnormalisierende Wirkung bei Respondern in den bisherigen antiangiogenen Ansätzen einsetzt – sie ist in einem Intervall vom ersten Tag bis zu vier Monaten nach Beginn der Therapie nachweisbar – so moderat ist das Patientenoutcome hinsichtlich der Steigerung des Gesamtüberlebens (Jain 2013). Der transiente Charakter des antiangiogenen Effekts der bisherigen Therapien lässt mehrere Erklärungen zu: 1.) Ein zu potentes oder zu hoch dosiertes Agens kann das angiogene Gleichgewicht zu Gunsten der Inhibition verschieben, was zu einer exzessiven Gefäßreduktion und somit erneutem Hypoxieanstieg inklusive der oben beschriebenen Konsequenzen führt. 2.) Bei Blockierung der Neoangiogenese kann sich der Tumor außerdem alternativer Rekrutierungs-mechanismen von Blutgefäßen wie der vaskulären Kooption bedienen. 3.) Weiterhin begünstigt die andauernde Antiangiogenese den Selektionsdruck des Tumors hin zu VEGF-unabhängigen proangiogenen Signalwegen oder zu Tumorzellklonen, die durch genetische Variation resistent gegen die spezifische Anti-VEGF(R)-Therapie sind (Potente *et al.* 2011, Jain 2013). Um Resistenzen zu vermeiden und additive bzw. synergistische Antitumoreffekte zu erzielen, muss die Antiangiogenese sowohl in verschiedene Signalwege eingreifen als auch mit der konventionelle Radio- und/oder Chemotherapie kombiniert werden (Nikitenko 2009). Zu diesem Zwecke ist die Entwicklung von zusätzlichen, VEGF-unabhängigen antiangiogenen Therapeutika unerlässlich, sodass in ihrer Kombination ein breiteres Wirkspektrum erzielt wird (Potente *et al.* 2011).

2.2 Der Hedgehog-Signalweg

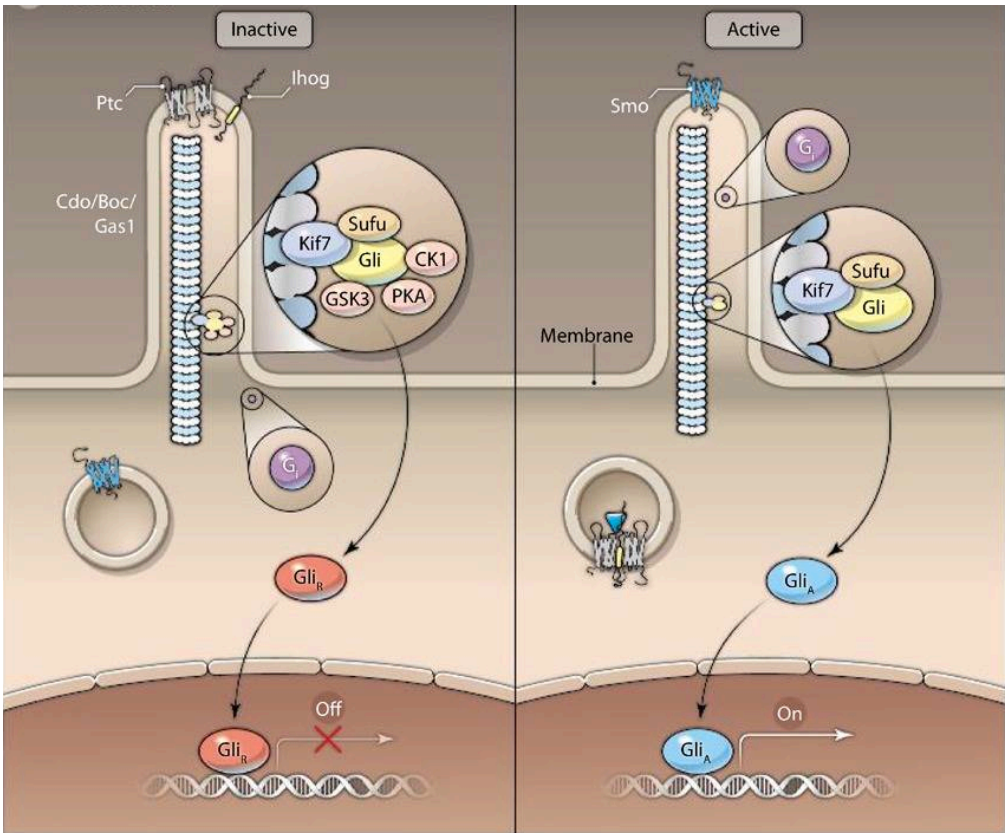
Das Hedgehog (Hh)-Gen wurde 1980 von den Entwicklungsbiologen Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus im Rahmen ihrer Analyse von embryonal letalen Mutanten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980). Für ihre Erkenntnisse über die genetische Kontrolle der frühen Embryogenese erhielten sie

1995 zusammen mit Edward B. Lewis den Nobelpreis für Medizin. Seitdem ist der Hedgehog-Signalweg in den Fokus der Forschung gerückt und es zeigte sich, dass er auch essentiell die embryonale Entwicklung der inneren Organe, Extremitäten, des ZNS (zentrales Nervensystem) und des hämatopoetischen und vaskulären Systems von Vertebraten reguliert (Riobo und Manning 2007). Postnatal nimmt seine Aktivität zwar ab, spielt jedoch noch eine entscheidende Rolle in der Proliferation, Differenzierung und Expansion von Stamm- und Vorläuferzellen physiologischerweise während Aufrechterhaltung, Regeneration und Heilung von Geweben (Irvine und Copland 2012). So führen Störungen in der Hh-Signaltransduktion zu kongenitalen Dysmorphien wie einer Holoprosencephalie, während viele Krebsentitäten wie das Basalzellkarzinom und eine Reihe hämatologischer Malignome mit einer übermäßigen Aktivierung des Hh-Signalwegs assoziiert sind (Yang *et al.* 2010).

Namensgebend für die Hh-Signalkaskade sind die drei Liganden Sonic (Shh), Indian (Ihh) und Desert (Dhh) Hedgehog, welche eine ähnliche Struktur aufweisen, sich jedoch durch ihre Gewebsspezifität unterscheiden. Shh als der bedeutendste Vertreter unter ihnen kontrolliert die Entwicklung von embryonalen Geweben. Ihh beeinflusst die frühe Hämatopoese im Knochenmark und anderem blutbildenden Gewebe. Und Dhh wird in Hoden und dem Nervensystem gebildet (Irvine und Copland 2012). Das Hedgehog-Protein wird als inaktive Vorstufe sekretiert und durch Spaltung und weitere Modifikationen in das aktive 19-kDa große N-terminale Hh-Fragment überführt. Dabei wird im Zielgewebe ein Hh-Konzentrationsgradient aufgebaut, dessen jeweilige Höhe die Kombination der transkribierten Gene bestimmt. Autokrin und parakrin binden die Hh-Liganden an die 12-spannigen Transmembranrezeptoren Patched (Ptch) 1 und 2, deren Bindung durch hohe Calciumkonzentrationen und die drei bei Vertebraten bekannten Co-Rezeptoren Cdo (Cell adhesion molecule downregulated by oncogenes), Boc (Brother of Cdo) und Gas1 (Growth arrest-specific gene 1) potenziert wird (Robbins *et al.* 2012). Ptch ist ein negativer Regulator des Hh-Signalwegs und hemmt in Abwesenheit von Hh den bedeutendsten positiven Faktor Smoothened (Smo). Der genaue Mechanismus ihrer Interaktion ist bislang noch unklar, es wird aber von einer indirekten Signalweiterleitung über kleinere Moleküle wie Oxysterole ausgegangen (Irvine und Copland 2012). Smo ist ein Typ III Rezeptor mit sieben Transmembranhelices und gekoppeltem, inhibitorischen G-Protein. Da Hh die Aktivität seines Rezeptors hemmt, führt die Bindung von Hh an Ptch zur Dysinhibition von Smo, welches dann in seiner phosphorylierten, dimerisierten und aktiven Form in die Zellmembran des primären Ziliums eingebaut wird (Robbins *et al.* 2012). Das primäre Zilium ist eine Mikrotubuli-basierte Zellausstülpung, die als Zellorganell von Wirbeltieren den Hh-Signalweg organisiert und verstärkt (Chen und Jiang 2013). In diesem Organell steuert Smo eine komplexe Signalkaskade, die schließlich zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Gli (Glioma associated oncogene) 1, 2 und 3 führt. Die drei Homologe der Gli-Familie gehören zu den Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren und regulieren in ihrer spezifischen Kombination die Expression von Genen, die an Embryogenese und adulter Gewebehomöostase beteiligt sind. Dabei existieren drei Zustandsformen der Gli-Proteine, die sich in ihrer Aktivität und Stabilität unterscheiden. In Abwesenheit von Hh liegen vorwiegend die full-length Form (Gli_{FL}) mit niedriger intrinsischer Aktivität und die proteolytisch prozessierte Form (Gli_R) mit hemmender Funktion vor. Unter Hh-Stimulation dahingegen wird Gli_{FL} nicht mehr zu Gli_R abgebaut, sondern zum aktiven, wenngleich auch weniger stabilen, Gli_A modifiziert. Von Bedeutung ist dabei SuFu (Supressor of Fused), das bei inaktivem Hh-Signalweg einen Komplex mit Gli_{FL} eingeht, der den Abbau zu Gli_R einleitet. Unter den drei homologen

Proteinen hat Gli1 ausschließlich Einfluss auf die Induktion der Transkription, Gli2 stellt den hauptsächlichen Transkriptionsaktivator (Gli_A) dar und Gli3 fungiert als der hauptsächliche Transkriptionsrepressor (Gli_R) (Robbins *et al.* 2012). Die Signalweiterleitung von Smo auf die Gli-Proteine kann noch nicht vollends nachvollzogen werden, jedoch scheint ein bestimmtes Phosphorylierungsmuster das Schicksal der Transkriptionsfaktoren zu bestimmen, sodass entweder proteolytische Prozessierung, Ubiquitinierung und der Abbau im Proteasom oder Modifikation in die aktive Form folgen. Dies kann Smo auf einem G-Protein-abhängigen Weg erreichen – indem es die Adenylatcyclase hemmt, die zelluläre cAMP-Konzentration senkt und dadurch die Proteinkinase A (PK A) inaktiviert – oder durch Regulation der Stabilität eines Proteinkomplexes im primären Zilium, welcher Gli bindet und modifiziert. Beteiligt an diesem Komplex ist das Gerüstprotein Kif7 (Kinesin family member 7), welches den Transport von Gli_{FL} in das primäre Zilium und seine Interaktion mit den Kinasen PK A, GSK3 (Glycogen synthase kinase 3) und CK1 (Casein kinase 1) ermöglicht (Chen und Jiang 2013). In Abbildung 4 wird der Hh-Signalweg in Vertebraten schematisch veranschaulicht.

Abbildung 4. Der Hedgehog-Signalweg



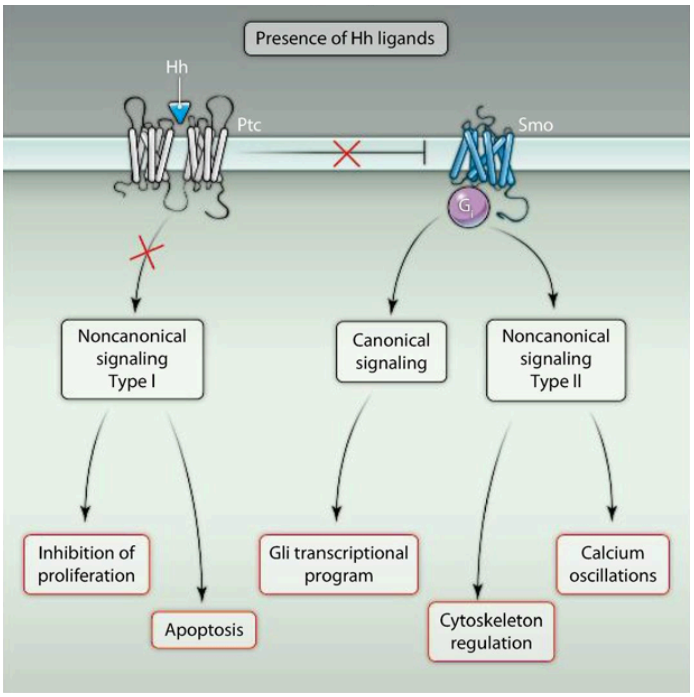
Links: In Abwesenheit der Hedgehog-Proteine ist der Signalweg inaktiviert. Ptch ist in der Zellmembran lokalisiert und verhindert den Einbau des Rezeptors Smo. Durch die Inaktivität von Smo kann an SuFu gebundenes Gli_{FL} mit Hilfe von Kif7 ins primäre Zilium transportiert, von den Kinasen GSK3, PK A und CK1 phosphoryliert und anschließend proteolytisch gespalten werden. Das entstandene Gli_R gelangt in den Zellkern und reprimiert die Transkription der Hh-Zielgene. Rechts: Die Bindung des Hedgehog-Liganden an seinen Rezeptor Ptch führt zu seiner Internalisierung in Vesikeln, wodurch die Hemmung von Smo entfällt, sodass es in die Membran des primären Ziliums transloziert wird. Unter anderem G-Protein-vermittelt bewirkt Smo die Dissoziation des SuFu-Gli_{FL}-Komplexes. Gli_{FL} kann nicht mehr phosphoryliert und abgebaut werden, akkumuliert im primären Zilium und wird zum potenten Transkriptionsaktivator Gli_A modifiziert. Dieser gelangt in den Nukleus und nimmt so Einfluss auf Zellzyklus, Apoptose und Differenzierung einer Zelle (entnommen aus Robbins *et al.* 2012).

Ist der Hedgehog-Signalweg erst einmal erfolgreich initiiert, moduliert ein vielfältiges System aus Feedback, Feedforward und Crosstalk Mechanismen seine Aktivität (Robbins *et al.* 2012). Das durch die Gli-Proteine geprägte Expressionsmuster stellt nur ein Beispiel dafür dar. So reguliert Gli_A die Expression von Hh-Downstream-Molekülen wie Gli1, Ptch 1 und 2

hoch und induziert somit positive als auch negative Rückkoppelungsprozesse (Irvine und Copland 2012).

Neben diesem klassischen Hedgehog-Signalweg, der über die Moleküle Hh, Ptch, Smo und Gli Einfluss auf den Zellzyklus nimmt, existieren zwei Arten nicht-kanonischer Hh-Signalwege, die entweder Smo- oder Gli-unabhängig agieren (Robbins *et al.* 2012). Zur ersten Gruppe zählt u.a. die proapoptotische Funktion des „dependence Rezeptors" Ptch 1, der über einen Multiproteinkomplex den Zelltod induzieren kann, wenn die als Überlebensfaktoren fungierenden Hh-Proteine nicht an ihn gebunden sind. Außerdem reguliert Ptch 1 Hh-abhängig die zelluläre Lokalisation von Cyclin B1, welches den Zellzyklus am G2-Kontrollpunkt steuert. Dabei führt die Bindung von Hh an Ptch 1 zur Dissoziation seines Komplexes mit Cyclin B1, sodass das Cyclin in den Zellkern gelangen und die Mitose einleiten kann (Jenkins 2009). Darüber hinaus scheint es eine alternative Aktivierung der Gli-Transkriptionsfaktoren zu geben, die weder von Hedgehog noch von Smoothened beeinflusst wird. Das Protoonkogen Ras und der Transforming-Growth-Factor-β (TGF-β)-Signalweg scheinen jeweils downstream von Smo in den Hh-Signalweg einzugreifen und so die Expression von Gli zu stimulieren (Lauth und Toftgård 2007). Zu den nicht-kanonischen Hh-Signalwegen Typ II gehört die Hh-abhängige Aktivierung von zellulären G-Proteinen der Familie Rho durch Smoothened. In Endothelzellen, Fibroblasten und Neuronen stimulieren so die kleinen GTPasen RhoA (Ras homolog gene family, member A) und Rac1 über Induktion von intrazellulären Calcium-Spikes und Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts die Migration dieser Zellen (Robbins *et al.* 2012). In Abbildung 5 wird die Wirkung von Hh auf sein Signalnetzwerk vereinfacht dargestellt. Es bleibt zu beachten, dass trotz der Vielfältigkeit der nicht-kanonischen Prozesse des Hh-Signalwegs diese hauptsächlich der Regulation und Modifikation des kanonischen Wegs dienen (Jenkins 2009).

Abbildung 5. Das Hedgehog-Signalnetzwerk



Die Bindung von Hh an Ptch reguliert den herkömmlichen (kanonischen) und die alternativen (nicht-kanonischen) Hh-Signalwege. Während ersterer die Hh-Signaltransduktion über die Moleküle Ptch, Smo, Gli und zum Teil inhibitorische G-Proteine vermittelt, umfasst der nicht-kanonische Hh-Signalweg Typ I ausschließlich den Rezeptoren Ptch und der nicht-kanonische Hh-Signalweg Typ II außerdem Smo und kleine G_i-Proteine (entnommen aus Robbins *et al.* 2012).

2.2.1 Der Hh-Signalweg in der Angiogenese

Der Hedgehog-Signalweg nimmt eine zentrale Rolle in der sachgemäßen Entwicklung des vaskulären Systems ein. Sowohl eine übermäßige Aktivierung als auch eine Inhibition des Hh-Signalwegs über Ptch 1- bzw. Smo-Knockout in Mausembryos führt schon früh zu letalen Störungen in der Vaskulogenese (Moran *et al.* 2012). Angioblasten und Endothelzellen einschließlich HUVECs besitzen ein primäres Zilium (Chinchilla *et al.* 2010) und exprimieren die Rezeptoren des Hh-Signalwegs Ptch 1, 2 und Smo (Vokes *et al.* 2004). Vokes *et al.* (2004) konnten zeigen, dass Shh einen direkten Einfluss auf murine Endothelzell-Kulturen ausübt, indem es VEGF-unabhängig die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen induziert. Des Weiteren konnten Hochman *et al.* (2006) einen direkten und Gli-abhängigen promigratorischen Effekt von Shh auf murine embryonale Endothelzellen nachweisen, was Asai *et al.* (2006) bestätigten, indem sie demonstrierten, dass Shh direkt die Proliferation, Adhäsion, Migration und Tubulogenese von EPCs fördert. Über die Vaskulogenese hinaus ist der Hh-Signalweg auch essentiell an der embryonalen Angiogenese beteiligt und reguliert die Anastomosenbildung von intersegmentalen Ästen der Aorta als eine der frühesten Formen der Angiogenese (Moran *et al.* 2012). Weiterhin konnte die Bedeutung des Hh-Signalwegs für die vaskuläre Entwicklung des Dottersacks in verschiedenen Studien belegt werden. Byrd *et al.* (2002) legten Kulturen von murinen Embryonalstammzellen an, die sie aus Ihh-/- bzw. Smo-/- Blutinseln des Dottersacks gewannen und beobachteten eine gestörte Vaskulo- und Angiogenese. Nagase *et al.* (2006) spezifizierten diesen Versuch und zeigten eine reine Störung der Angiogenese des Dottersacks durch Behandlung von *ex vivo* Kulturen ganzer Mausembryonen mit den direkten Smo-Inhibitoren Cyclopamin und Jervin zu einem Zeitpunkt nachdem bereits Vaskulogenese stattgefunden hatte. Postnatal wird der Hh-Signalweg nach Gewebsverletzung und -ischämie reaktiviert. Über eine *de novo* Expression von Shh wird sowohl Angiogenese als auch die Regeneration des betroffenen Gewebes induziert, was bisher für Muskel, Herz, Haut, Knochen, Korneaepithel und periphere sowie zentrale Nerven nachgewiesen werden konnte (Straface *et al.* 2009). Essentiell an diesem Vorgang beteiligt ist die Gli-abhängige Rekrutierung, Proliferation und Migration von endothelialen Vorläuferzellen (Renault *et al.* 2009).

Dahingegen unterstützen andere Studien die Hypothese, dass Hh nicht direkt mit Endothelzellen interagiert, sondern vielmehr perivaskuläres Gewebe stimuliert, welches über die Sekretion von proangiogenen Faktoren Einfluss auf Entwicklung und Proliferation der gefäßbildenden Zellen nimmt. Grund zu dieser Annahme sehen Moran *et al.* (2012) in zwei Versuchsreihen: 1.) Nach Stimulation von Endothelzellen mit Shh konnte weder eine Ptch 1- noch Gli1-Überexpression nachgewiesen werden, die als Zielgene des konventionellen Hh-Signalwegs und somit als dessen Indikator dienen. 2.) Während Mäuse mit einer globalen Smo-Defizienz an schweren vaskulären Störungen versterben, sind Mäuse mit ausschließlichem Smo-Knockout in den Endothelzellen überlebensfähig. In diesem Sinne konnten Coultas *et al.* (2010), Lawson *et al.* (2002) und Pola *et al.* (2001) zeigen, dass die VEGF-, Notch- und Ang-Signalwege dem Hh-Signalweg nachgeschaltet sind und Shh auf diese Weise sekundär seinen angiogenen Effekt ausüben kann.

Da in der gegenwärtigen Literatur sowohl direkte als auch indirekte Effekte von Shh auf Endothelzellen beschrieben werden, ist es denkbar, dass beide Mechanismen parallel nebeneinander existieren und je nach Zeitpunkt in Vaskulo- und Angiogenese aktiviert werden (He *et al.* 2013, Nagase *et al.* 2008, Byrd und Grabel 2004). Auch Chinchilla *et al.*

(2010) vermuten ein komplexes Zusammenspiel von direkten und indirekten Effekten der Hh-Proteine auf Endothelzellen. Initiiert würde der angiogene Prozess so durch die direkte Stimulation der nicht-kanonischen Hh-Signalwege in Endothelzellen. In einem zweiten Schritt aktivierten dann Hh-Proteine den Gli-abhängigen Hh-Signalweg in perivaskulären Fibroblasten, wodurch die Endothelzellen sekundär über die Sekretion von proangiogenen Faktoren wie VEGF und Ang-1 und -2 zu Proliferation, Migration und Reifung angeregt würden.

2.2.2 Der Hh-Signalweg bei Krebserkrankungen

Es ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen gesteigerter Hedgehog-Signalweg-Aktivität und der Karzinogenese beschrieben, insbesondere vor dem Hintergrund, dass der Signalweg physiologischerweise die Expression von Downstream-Genen für Zellschicksal, Überleben und Wachstum kontrolliert. Aktiviert wird der Signalweg in den verschiedenen Tumorentitäten auf folgenden drei Wegen (Scales und Sauvage 2009).

In Typ I Tumoren sind Mutationen in Komponenten des Hh-Signalwegs für eine Liganden-unabhängige und somit konstitutive Aktivierung verantwortlich (Li *et al.* 2011). Ptch 1 als hauptsächlicher negativer Regulator des Signalwegs wurde erstmalig als Tumor-suppressorgen klassifiziert: Johnson *et al.* und Hahn *et al.* konnten 1996 simultan das Ptch 1-Gen isolieren und verschiedene *loss of function* Mutationen mit dem Basalzellnävus-Syndrom in Verbindung bringen. Dieses hereditäre Syndrom, auch Gorlin-Goltz-Syndrom genannt, wird autosomal-dominant vererbt und zeichnet sich durch die schon frühe Entwicklung zahlreicher Basalzellkarzinome (BCCs) und weiterer maligner Neoplasien wie Medulloblastome und Rhabdomyosarkome aus (Lo Muzio 2008). Sporadische Basalzell-karzinome sind in fast allen Fällen ebenfalls auf eine gesteigerte Hh-Aktivität entweder durch *loss of function* im Tumorsuppressorgen Ptch 1 und/oder durch *gain of function* Mutationen im Protoonkogen Smo zurückzuführen. Des Weiteren sind über ein Viertel der sporadischen Medulloblastome und Rhabdomyosarkome ebenfalls mit einem Verlust der Heterozygotie bzw. inaktivierenden Mutationen in den beiden negativen Regulatoren des Hh-Signalwegs Ptch 1 und SuFu assoziiert (Scales und Sauvage 2009). Neben Smo stellen auch die Gli-Transkriptionsfaktoren potente Onkogene dar. So wurde Gli1 bereits 1987 durch Kinzler *et al.* als amplifiziertes und überexprimiertes Gen in humanen Gliom-Zellreihen identifiziert, was ihm den Namen „Glioma associated oncogene“ verliehen hat.

Bei der Typ II Aktivierung des Hh-Signalwegs überexprimieren Tumorzellen den Hh-Liganden und stimulieren auf diese Weise autokrin bzw. juxtakrin ihr eigenes Wachstum, Invasivität und Überleben. Eine Hh-Überexpression konnte bereits in Malignomen von Lunge, Pankreas, Prostata, Brust, Haut, dem oberen und unteren Gastrointestinaltrakt sowie bei Leukämien nachgewiesen werden (Scales und Sauvage 2009, Lin und Matsui 2012).

Typ III Tumore sekretieren Hh-Proteine für eine parakrine Aktivierung des umgebenden Stromas, welches wiederum Gli-abhängig Wachstums- und Überlebensfaktoren für den Tumor bereitstellt. Dies konnte bereits in Prostata-, Pankreas- und Kolonkarzinomen des Menschen gefunden werden. Über das parakrine Modell präpariert der Tumor also seine eigene Mikroumgebung und fördert Shh-vermittelt seine weitere Progression (Scales und Sauvage 2009). Neben mesenchymalen Zellen wirkt das überexprimierte Shh auch auf Endothelzellen, indem es die Motiliät und Tubulogenese fördert, sodass außerdem Angiogenese, Lymphangiogenese und Metastasierung des Tumors vorangetrieben werden

(Bailey *et al.* 2009). Dementsprechend wiesen auch Geng *et al.* (2007) einen direkten proliferativen Effekt von Shh auf HUVECs *in vitro* nach, welcher durch Cyclopamin vollständig antagonisiert werden konnte und dokumentierten eine signifikante Reduktion des Tumorgefäßbettes in Gefäßdichte und -permeabilität durch Hh-Antagonisierung in einem *in vivo* Melanom-Modell. Die Bedeutung der Hh-Signaltransduktion für die Tumorangiogenese wurde außerdem durch Yamazaki *et al.* (2008) verdeutlicht, da von Pankreaskarzinomzellen stammendes Shh die angiogene Funktion von EPCs induzierte.

Dem reversen parakrinen Modell entsprechend erhalten Typ IIIb Tumorzellen das aktivierende Hh-Signal von Stromazellen in der Tumormikroumgebung, was bisher in hämatologischen Malignomen wie dem B-Zell-Lymphom, Multiplem Myelom und Leukämien beobachtet werden konnte (Scales und Sauvage 2009).

Ein alternatives Konzept nimmt eine Relevanz des Hh-Signalwegs für die Aufrechterhaltung von Tumorstammzellen an (Scales und Sauvage 2009). Clement *et al.* (2007) zeigten, dass Tumorstammzellen in Gliomen vorhanden sind und gleichzeitig der kanonische Hh-Signalweg die Expression von Stammzellgenen und die typische asymmetrische Teilung dieser Zellpopulation reguliert. Gemäß der Tumorstammzell-Hypothese besitzen einige wenige, multipotente Ursprungszellen innerhalb des Malignoms die Fähigkeit, jede Tumorzell-Subpopulation hervorzubringen. Das Selbsterneuerungspotential und die hohe Strahlen- und Chemoresistenz dieser Tumorstammzellen werden dabei für Rezidive nach Therapie verantwortlich gemacht (Visvader und Lindeman 2008). Die Entwicklung von Therapien, die in den Metabolismus von Tumorstammzellen eingreifen – wie Hh-Signalweg-Antagonisten – ist folglich essentiell für eine erfolgreiche Remission.

2.2.3 Der Hh-Signalweg als therapeutischer Angriffspunkt bei Krebserkrankungen

Die beschriebene Dysregulation von Mitgliedern des Hh-Signalwegs bei Karzinogenese und Tumorangiogenese ließen den Hh-Signalweg in den Fokus der Antitumortherapie rücken. Gegenwärtig befinden sich acht verschiedene Hh-Inhibitoren, die allesamt Smo angreifen, in klinischer Erprobung. Das am meisten eingesetzte Präparat unter ihnen stellt der Smo-Inhibitor GDC-0449 (Vismodegib) dar, der in 44 verschiedenen Phase-I- und -II-Studien fortgeschrittener Tumore eingesetzt wird (Ng und Curran 2011). In einer initialen Phase-I-Untersuchung von 68 Patienten mit therapierefraktären, soliden Tumoren besaß Vismodegib ein akzeptables Sicherheitsprofil und Antitumor-Aktivität in BCCs und Medulloblastomen (NCT00968981) (Ruch und Kim 2013). In einer anschließenden Phase-II-Studie zeigte sich ein krankheitsstabilisierender Effekt von Vismodegib auf 96 Patienten mit fortgeschrittenem Basalzellkarzinom (NCT00833417). Eine randomisierte Phase-II-Doppelblindstudie mit 36 Gorlin-Goltz-Syndrom-Patienten stellte sogar die Placebokontrolle aufgrund signifikanter Unterschiede in der Anzahl neuer und der Größe bestehender BCCs ein (NCT00957229) (Lin und Matsui 2012). Auf Basis dieser Daten wurde Vismodegib 2012 für die Behandlung von fortgeschrittenen BCCs durch die FDA (United States Food and Drug Administration) zugelassen (Sandhiya *et al.* 2013). Ein weiterer potenter Smo-Inhibitor ist PF-04449913, auf den alle 49 Patienten mit verschiedenen hämatologischen Malignomen in einer Phase-I-Studie ansprachen (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00953758). Das Ansprechen auf PF-04449913 reichte von einer hämatologischen Normalisierung über den Verlust der pathognomonischen Mutation bis zur kompletten Remission (Jamieson *et al.* 2011, Lin und

Matsui 2012). Weitere vielversprechende Smo-Inhibitoren mit antitumoralen Effekten *in vitro* und *in vivo* stellen die ebenfalls oral verfügbaren BMS-833923, IPI-926 (Saridegib), LDE225, TAK-441, LY2940680 und LEQ-506 dar, die sich momentan in der klinischen Erprobung verschiedener maligner Indikationen befinden (Pimentel *et al.* 2013). Da der Hh-Signalweg jedoch auch an einigen physiologischen Prozessen während Embryogenese, Entwicklung und Regeneration beteiligt ist, kann eine medikamentöse Hemmung des Signalwegs neben den angestrebten Tumorzellen und umgebendem Stroma zusätzlich auch in die Homöostase der übrigen Körperzellen eingreifen. Die bisher dokumentierten unerwünschten Nebenwirkungen sind verhältnismäßig selten und schwach ausgeprägt und umfassen hauptsächlich Übelkeit, Erschöpfung, Haarverlust, Muskelspasmen und Geschmacksstörungen. Da jedoch eine Hh-Signalweg-Inaktivierung in jungen Mäusen schwerwiegende und permanente skelettale Defekte hervorbrachte, ist bei der Zulassung einer solchen Therapie für Medulloblastome bei Kindern hinsichtlich Skelett- und ZNS-Entwicklung besondere Vorsicht geboten (Ng und Curran 2011).

Obwohl die initiale Effektivität der Smo-Inhibitoren vielversprechend erscheint, sind Fälle von anschließenden Rezidiven unter Smo-Blockade in murinen und humanen Untersuchungen beobachtet worden, die auf die Ausbildung einer sekundären Resistenz zurückzuführen sind. Bekannte Resistenzmechanismen umfassen Punktmutationen in der Medikamentenbindungsstelle von Smo, Signalwegaktivierung downstream von Smo u.a. durch Amplifikation von Gli2 oder Hh-Zielgenen oder Hochregulation von Signalwegen, die mit Hh interagieren wie PI3K (Lin und Matsui 2012). Um diesen Resistenzentwicklungen entgegenzuwirken bzw. aberrante Hh-Aktivität downstream von Smo zu blockieren, befinden sich mittlerweile weitere Präparate in der präklinischen Prüfung, die gegen Downstream-Moleküle von Smo gerichtet sind. So stören die Hh Pathway Inhibitoren (HPI) 1-3 die Prozessierung und Funktion der Gli-Transkriptionsfaktoren, wobei der HPI 4 in die Ziliogenese eingreift. Zwei weitere Gli-Antagonisten, GANT 85 und 61, hemmen die Gli-vermittelte Transaktivierung von Zielgenen in Kolon- und Prostatakarzinom-Zelllinien. Schließlich interferiert Arsentrioxid mit den Gli-Proteinen und unterbindet auf diese Weise die Expression von Hh-Zielgenen in AML (akute myeloische Leukämie)-, Medulloblastom- und Ewing's Sarkom-Modellen (Ruch und Kim 2013).

Bei Tumoren mit ligandenabhängiger Typ II und III Aktivierung stellt außerdem das überexprimierte Hh-Protein eine potentielle Zielstruktur dar. Der monoklonale Antikörper 5E1 und der kleinmolekulare Hemmstoff Robotnikinin binden extrazelluläres Shh und sind momentan noch Gegenstand präklinischer Untersuchungen. Die Tatsache, dass dieser Mechanismus der Hh-Signalunterbrechung spezifisch auf Hh-überexprimierende Tumore wirkt, verdeutlicht die Notwendigkeit der Identifikation eines geeigneten Patientenkollektivs unter Betrachtung der jeweiligen Ätiologie der aberranten Hh-Aktivierung vor Einsatz einer Anti-Hh-Therapie (Ruch und Kim 2013).

3 Material und Methoden

3.1 Inhibitoren und Aktivatoren des Hedgehog-Signalwegs

3.1.1 Smoothened-Inhibitor PF-04449913

Für alle Versuche wurde der Smoothened-Inhibitor (Smo-Inh) PF-04449913 der Firma Pfizer verwendet. Es handelt sich um einen niedermolekularen, selektiven Hemmstoff des Hedgehog-Signalwegs mit potentieller antineoplastischer Aktivität. PF-04449913 hat ein Molekulargewicht von 447 g/mol, ist wasserunlöslich und besitzt eine Löslichkeit von 447 g/l DMSO (Dimethyldisulfoxid). Pfizer empfiehlt eine Dosierung von 1 µM *in vitro*. In Puderform wird der Smoothened-Inhibitor bei 4°C gelagert und für die Versuche zu 1 mM bzw. 100 µM in DMSO lysiert und maximal über zwei Wochen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.1.2 Sonic Hedgehog 1314-SH/CF

Zusätzlich wurde in Langzeitversuchen zur Endothelzell-Proliferation bzw. PCR-Analyse mit Hedgehog-Proteinen stimuliert. Dafür wurde das rekombinante humane Sonic Hedgehog 1314-SH/CF der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) käuflich erworben. Es handelt sich dabei um den am meisten exprimierten Liganden des Hedgehog-Signalwegs. Sonic Hedgehog hat ein Molekulargewicht von 20 kDa, ist wasserlöslich und wird nach Fujita *et al.* (2009) in einer Konzentration von 5 nM verwendet.

3.2 Endothelzell-Proliferation

Zur Endothelzell-Proliferation wurden zwei Zelltypen verwendet, HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) und zu Anfang auch Outgrowth Endothelial Cells (Klon OEC CB7). Sie wurden in einem Zellkulturinkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 kultiviert.

In allen Versuchen wurde der Effekt des Smoothened-Inhibitors auf das Wachstum von oben genannten Endothelzellen im Vergleich zur Null- bzw. DMSO-Kontrolle gemessen. In den Langzeitversuchen II und III wurde zusätzlich die Wirkung von Sonic Hedgehog auf die Proliferation von HUVECs betrachtet.

3.2.1 HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

HUVECs sind Endothelzellen, die die Nabelschnurvene auskleiden und dieser unmittelbar nach der Geburt entnommen werden. Sie wurden von der Firma Lonza käuflich erworben und in BC-Medium (EGM-2-Medium der Firma Lonza mit zusätzlich 10% FBS, Penicillin/Streptomycin und Amphotericin-B) kultiviert. HUVECs wachsen adhärent und wurden beim Splitten zu Kultivierungszwecken mittels Trypsin gelöst, während einer laufenden Versuchsreihe nach dem Ausplattieren jedoch mittels Zellschaber mechanisch von ihrem Untergrund abgetrennt.

3.2.2 OECs (Outgrowth Endothelial Cells)

Outgrowth Endothelial Cells sind endotheliale Vorläuferzellen, die standardmäßig im Labor aus Langzeitkulturen von Buffy Coats gesunder und erwachsener Spender gewonnen werden. Die Blutkulturen wurden von der Blutbank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt und die Isolierung und Kultivierung des OEC-Klons CB7 aus Buffy Coats wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Jasmin Wellbrock übernommen.

3.2.3 Endothelzell-Proliferation über drei Tage mit HUVECs und CB7

In den ersten Proliferationsversuchen wurde der Effekt von fünf verschiedenen Konzentrationen des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 (5 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,1 µM und 0,01 µM) auf das Wachstum von HUVECs und CB7 über einen Zeitraum von drei Tagen untersucht. Als Kontrollen dienten insgesamt drei verschiedene Ansätze aus einer Nullkontrolle und zwei unterschiedlich dosierten DMSO-Kontrollen, die der DMSO-Menge in den Ansätzen mit 0,1-µ-molarem bzw. 1-µ-molarem Smoothened-Inhibitor entsprachen. Es wurden jeweils Triplikate angesetzt, sodass man 24 Ansätze erhielt und der komplette Versuch anschließend wiederholt.

In einem Vorversuch zur Bestimmung der optimalen Zelldichte ließ eine Dichte von 20.000 Zellen pro Well einer 12-Well-Platte nach drei Tagen die beste Aussage über das Wachstum der Endothelzellen zu. So wurden an Tag d−2 jeweils 20.000 Endothelzellen in 500 µl BC-Medium (s.o.) pro Well ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das normale BC-Medium durch Hungermedium (EGM-2-Basalmedium + 4% FBS) ersetzt (d−1). In Vorversuchen zeigte sich außerdem, dass HUVECs und CB7 in Hungermedium mit einem zu geringeren Anteil an FBS (Fetal Bovine Serum) schlechter proliferierten und vermehrt abstarben. Daher wurde eine FBS-Konzentration von 4% gewählt. An d0 wurden die Zellen nach oben genanntem Schema stimuliert und nach drei Tagen (d3) mit Hilfe des ViCell-Analyzers der Firma Beckmann Coulter (Brea, CA, USA) ausgezählt.

3.2.4 Proliferation von HUVECs über 14 Tage

Neben den Kurzzeitproliferationen über drei Tage sollte der Einfluss des Smoothened-Inhibitors auf Endothelzellen zudem über einen längeren Zeitraum analysiert werden. Es wurden ausschließlich HUVECs untersucht, da die in den vorherigen Versuchen verwendete CB7-Population schnell seneszent zu werden schien. Es wurden Triplikate von drei Ansätzen angefertigt, die an d0 stimuliert wurden (1 µM Smoothened-Inhibitor, dem 1-µ-molarem Smoothened-Inhibitor entsprechende DMSO-Menge und Nullkontrolle). Zwei Tage zuvor wurden die adhärent wachsenden HUVECs in 6er-Wells ausplattiert (d−2), wobei nun entsprechend der größeren Wells 100.000 Endothelzellen und 2 ml Medium pro Well gewählt wurde. Am nächsten Tag wurde das BC-Medium wieder durch die gleiche Menge an Basalmedium + 4% FBS ausgetauscht (d−1). Ausgezählt wurden die Endothelzellen mit Hilfe des ViCell-Analyzers an den Tagen d3; 7; 10 und 14, wobei sie jeweils abhängig von ihrer Dichte einheitlich im Verhältnis 1 : 2-3 gesplittet und in neuen 6er-Wells ausplattiert wurden. Es wurde wieder 2 ml des Hungermediums hinzugefügt und unmittelbar nach gleichem Schema stimuliert. So wurde nach Auszählen und Splitten nicht wie zu Anfang die gleiche Anzahl an Endothelzellen pro Well ausplattiert sondern ein einheitlicher Bruchteil der in den vorigen Tagen gewachsenen HUVECs.

3.2.5 Proliferation von HUVECs über acht bzw. 24 Tage

In dem zweiten und dritten Langzeitversuch sollte die Proliferation von HUVECs unter Stimulation mit Sonic Hedgehog (Shh) bzw. dem Smoothened-Inhibitor (Smo-Inh) über einen Zeitraum von acht bzw. 24 Tagen betrachtet werden. Es wurden 100.000 HUVECs und 2 ml Medium pro 6er-Well ausplattiert und jeder Ansatz dreimal angefertigt. Um die Endothelzellen über einen solchen Zeitraum ausreichend zu ernähren und optimale Teilungsraten zu erzielen, wurde in diesen Versuchen ausschließlich BC-Medium verwendet.

So konnte an einem Tag ausplattiert bzw. gesplittet und nach folgendem Schema behandelt werden (d0):

1. Smo-Inh (1 µM)
2. Smo-Inh (0,1 µM)
3. DMSO (hochdosiert, Menge entspricht Smo-Inh 1 µM)
4. DMSO (niedrigdosiert, Menge entspricht Smo-Inh 0,1 µM)
5. Shh (5 nM) + DMSO (hochdosiert, Menge entspricht Smo-Inh 1 µM)

Im zweiten Langzeitversuch wurden die HUVECs nach drei und acht Tagen am ViCell-Analyzer ausgezählt, in einem einheitlichen Verhältnis je nach Zelldichte gesplittet, neu ausplattiert und stimuliert. Analog wurden die HUVECs im dritten Langzeitversuch an Tag 3; 7; 11; 16; 20 und 24 per Neubauer-Zählkammer ausgezählt, gesplittet und stimuliert.

3.3 Real-Time quantitative PCR-Analyse mit HUVECs

Mittels der Real-Time quantitativen PCR (RTq-PCR) sollte untersucht werden, welchen Effekt die Stimulation von HUVECs mit dem Inhibitor des Smoothened-Rezeptors PF-04449913 bzw. dem Hedgehog-Protein Sonic Hedgehog 1314-SH/CF auf die Genexpression von Mitgliedern des Hedgehog-Signalwegs ausübt.

Die einzelnen Schritte des Vorgehens werden im Folgenden beschrieben.

3.3.1 Ausplattieren und Stimulation der HUVECs für die RTq-PCR

3.3.1.1 Kurzzeitstimulation über acht Stunden

In einer ersten Versuchsreihe, die insgesamt zweimal wiederholt wurde, wurden an d−2 HUVECs in normalem BC-Medium gleichmäßig auf vier T75 Flaschen verteilt. Nachdem die HUVECs gut angewachsen waren und den Flaschenboden ausfüllten, wurde an d−1 das BC-Medium durch 10 ml EGM-2-Basalmedium ohne Zusatz von FBS ersetzt. An d0 erfolgte die Stimulation der vier Ansätze gemäß folgendem Schema:

1. Smo-Inh (1 µM)
2. Smo-Inh (0,1 µM)
3. DMSO-Kontrolle (hochdosiert, Menge entspricht Smo-Inh 1 µM)
4. Nullkontrolle

Nach achtstündiger Inkubation wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS (Phosphate buffered saline) gespült und die adhärent wachsenden HUVECs mit dem Zellschaber abgekratzt und bei −80°C weggefroren.

3.3.1.2 Langzeitstimulation über acht und 24 Stunden

In einer zweiten Versuchsreihe, die ebenfalls zweimal wiederholt wurde, wurden zwei Größen abgeändert. Es sollte nun zum einen der Effekt einer längerzeitigen Stimulation über 24 Stunden neben der über acht Stunden betrachtet werden und zum anderen die Auswirkung einer zusätzlichen Stimulation mit Sonic Hedgehog untersucht werden.

Dazu wurden HUVECs in BC-Medium gleichmäßig auf acht T75 Flaschen aufgeteilt (d−2). Nachdem die HUVECs flächendeckend angewachsen waren, wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml Basalmedium + 2% FBS ernährt (d−1). In Vorversuchen erwies sich die Zugabe einer geringen Menge an FBS und die Wahl der größeren T75 Flaschen gegenüber den 6er-Wells als günstig, da die HUVECs über den längeren Zeitraum sonst schlechter proliferierten und anschließend nicht genügend RNA isoliert werden konnte. Am Tag der Stimulation (d0) wurde um t = 0h mit dem Smoothened-Inhibitor bzw. DMSO stimuliert und um t = 2h Sonic Hedgehog hinzugefügt. Es ergaben sich Duplikate folgender vier Ansätze, die nach acht bzw. 24 Stunden wie oben beschriebenen geerntet und die Zellpellets bei −80°C weggefroren wurden:

1. DMSO (hochdosiert, Menge entspricht Smo-Inh 1 µM)
2. Shh (5 nM) + DMSO (hochdosiert, Menge entspricht Smo-Inh 1 µM)
3. Smo-Inh (1 µM)
4. Smo-Inh (1 µM) + Shh (5 nM)

3.3.2 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde das RNeasy Kit von Qiagen (Hilden) inklusive DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) gemäß der Herstellerangaben benutzt. Die isolierte RNA jedes Ansatzes wurde schließlich in jeweils 30 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und dessen Konzentration am Nanodrop-1000 (Peqlab, Erlangen) gemessen.

3.3.3 cDNA-Gewinnung

Um die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben, wurden die Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare, Fairfield, USA) und Random Primers von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Eingesetzt wurden 2 bzw. 5 µg RNA und die dabei gewonnene cDNA 1 : 2 bzw. 1 : 5 in RNase freiem Wasser verdünnt. Da nach einigen Versuchsreihen festgestellt wurde, dass die unterschiedliche Verdünnung keinen deutlichen Unterschied machte, wurde für alle weiteren PCR-Analysen bei ausreichend vorhandener RNA-Menge mit der 1 : 5 -Verdünnung gearbeitet. Die cDNA wurde anschließend bei −20°C gelagert.

3.3.4 Quantitative PCR-Analyse

Für die PCR-Analysen wurde das Mastermix-Kit FAST Start DNAMaster Sybr Green von Roche (Basel, Schweiz) verwendet und die PCR-Analyse am kapillarbasierten Light Cycler von Roche durchgeführt.

Um die cDNA-Konzentrationen der behandelten Proben quantifizieren zu können, wurden diese mit einem Plasmid-Standard in logarithmischen Verdünnungsstufen verglichen. Die Plasmide mit der zu untersuchenden cDNA wurden von der Firma Biocat (Heidelberg) käuflich erworben. Für die Primer PRDM14 (PR Domain Containing 14), POU5F1 (POU domain, class 5, transcription factor 1), Nanog, Sox2 (SRY-box 2), KLF4 (Kruppel-like factor 4) und LKB1 (Liver kinase B1) stand jedoch kein Standard zur Verfügung, weswegen hier zur Auswertung mit dem Crossing Point gearbeitet wurde.

Schließlich wurde das Expressionslevel des jeweiligen Gens einer jeden Probe gegen die Expression des Haushaltsgens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) normalisiert. Als Nullkontrolle diente ein Ansatz, bei dem lediglich Wasser zum Mastermix hinzugefügt wurde. Alle Ansätze wurden stets in Duplikaten angefertigt.

Die folgende Tabelle führt die verwendeten Primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) und die jeweiligen PCR-Bedingungen auf.

Tabelle 1. Primer und PCR-Bedingungen

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Amplifikatgröße	PCR-Bedingungen[1]
GAPDH	tgatgacatcaagaaggtgg	tttcttactccttggaggcc	246 bp	4 mM, 61°C
Gli1	ctacatcaactccggccaat	cggctgacagtataggcaga	155 bp	3 mM, 61°C
Gli2	caccaaccagaacaagcaga	acctcagcctcctgcttaca	246 bp	3 mM, 61°C
Gli3	ggccatccacatggaatatc	tgaagagctgctacgggaat	196 bp	3 mM, 59°C
PRDM14	aagtacacccccctgtgtgga	cagagtggactcgcatgtgt	196 bp	3 mM, 61°C
POU5F1	gaaggatgtggtccgagtgt	gtgaagtgagggctcccata	183 bp	3 mM, 61°C
Nanog	gatttgtgggcctgaagaaa	aagtgggttgtttgcctttg	155 bp	3 mM, 57°C
Sox2	aaccccaagatgcacaactc	cggggccggtatttataatc	152 bp	3 mM, 59°C
KLF4	cccaattacccatccttcct	tgccttgagatgggaactct	210 bp	3 mM, 59°C
LKB1	gctcttacggcaaggtgaag	ttttgtgccgtaacctcctc	153 bp	3 mM, 60°C

[1] Molarität des Primers und $MgCl_2$ im Mastermix, Annealing Temperatur. Abkürzung: bp = Basenpaare.

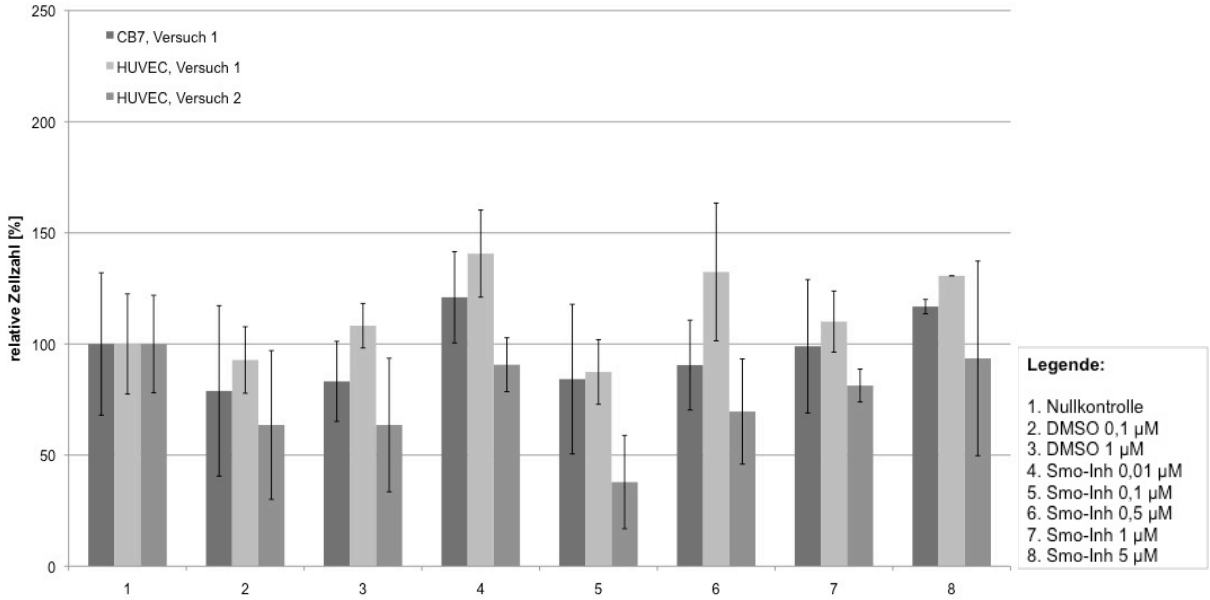
4 Ergebnisse

4.1 Effekt des Sonic Hedgehog-Proteins und Smo-Inhibitors PF-04449913 auf die Proliferation von humanen Endothelzellen

4.1.1 Effekt des Smo-Inhibitors auf die Proliferation von HUVECs und OECs

HUVECs und der OEC-Klon CB7 wurden mit dem Smoothened-Inhibitor PF-04449913 über einen Zeitraum von drei Tagen behandelt. Der Effekt von unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen wurde der Stimulation mit einer entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO sowie einer Nullkontrolle gegenübergestellt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten angelegt und der Versuch wiederholt. Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, führte keine der angewandten Inhibitor-Konzentrationen bei den Endothelzellen zu einer deutlichen Veränderung der Proliferation gegenüber den unbehandelten bzw. DMSO-Kontrollen.

Abbildung 6. Effekt des Smo-Inhibitors auf die Proliferation von HUVECs und den OEC-Klon CB7 über 3d.

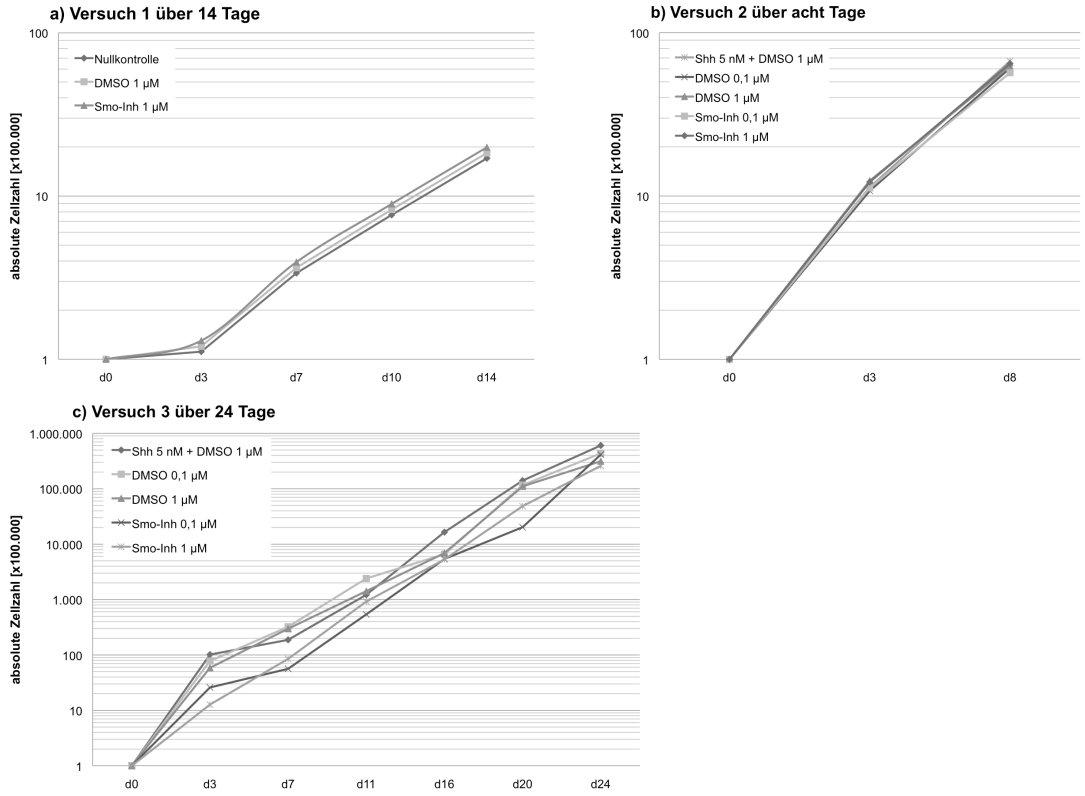


Der Smoothened-Inhibitor PF-04449913 zeigt in den verschiedenen angewandten Konzentrationen keinen eindeutigen Einfluss auf die Proliferation der primären Endothelzellen HUVEC und CB7 im Vergleich zur Null- und DMSO-Kontrolle. Abkürzungen: Smo-Inh = Smoothened-Inhibitor; d = Tage.

4.1.2 Langzeitproliferation zur Analyse des Effektes von Shh und PF-04449913 auf HUVECs

Die dreitägigen Proliferationsversuche zeigten keine einheitlichen Unterschiede im Endothelzellwachstum. Daher wurde nachfolgend untersucht, ob eine langzeitige Stimulation der Endothelzellen eine deutlichere Tendenz erkennen ließ. Dazu wurden HUVECs permanent mit dem Smoothened-Inhibitor PF-04449913, dem Sonic Hedgehog-Protein 1314-SH/CF als auch einer Kombination aus beiden Substanzen behandelt und mit einer DMSO-Kontrolle verglichen. Die Ansätze wurden in Triplikaten angefertigt und der Versuch dreimal durchgeführt. Die Proliferation wurde über acht, 14 bzw. 24 Tage beobachtet und die Zellzahl dabei alle drei bis vier Tage bestimmt. Abbildung 7 stellt die geringen Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen innerhalb der drei Versuchsdurchläufe dar, wobei keine einheitliche Tendenz ersichtlich wird.

Abbildung 7. Langzeitproliferation von HUVECs unter permanenter Behandlung mit Shh bzw. dem Smo-Inhibitor



Unter permanenter Stimulation der HUVECs mit dem Smoothened-Inhibitor (0,1 µM bzw. 1 µM) und Shh (5 nM) sowie einer Kombination aus beiden wurde die Proliferationsrate der Endothelzellen alle drei bis vier Tage ausgewertet. Über die Behandlungszeiträume von 8; 14 und 24 Tagen konnten weder deutliche Unterschiede noch eine einheitliche Tendenz der einzelnen Ansätze beobachtet werden. Abkürzungen: Smo-Inh = Smoothened-Inhibitor; d = Tag.

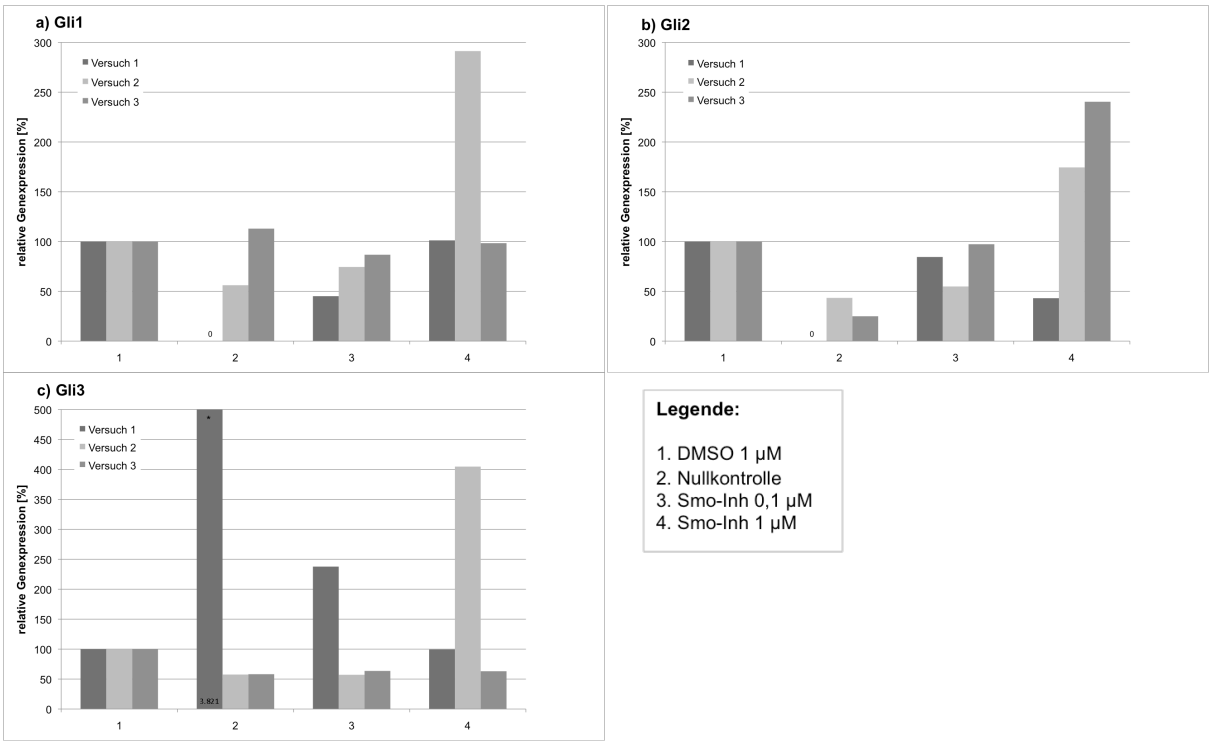
4.2 Effekt von Sonic Hedgehog und des Smo-Inhibitors auf die mRNA-Expression von HUVECs

Mit Hilfe der quantitativen PCR-Analyse wurde der Einfluss des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 und des Sonic Hedgehog-Proteins 1314-SH/CF auf die mRNA-Expression von HUVECs untersucht. Im Sinne des kanonischen Hedgehog-Signalwegs wurde dazu die Expression der drei Gli-Gene bestimmt und in einer weiterführenden Versuchsreihe zusätzlich die Expression der klassischen Stammzellgene LKB1 (= STK11), KLF4, Nanog, POU5F1 (= Oct4), PRDM14 und Sox2 analysiert. Diese Stammzell-typischen Transkriptionsfaktoren stellen bekannterweise essentielle Downstream-Zielgene in der Hh-Gli-induzierten Tumorentwicklung dar (Ruiz i Altaba 2011).

4.2.1 Effekt des Smo-Inhibitors auf die Expression der Gli-Gene von HUVECs

In drei unabhängigen Experimenten wurde der Effekt je einer hohen und einer niedrigen Konzentration des Smo-Inhibitors mit einer DMSO- bzw. unbehandelten Kontrolle verglichen. Jeder Ansatz wurde als Duplikat angesetzt. Tabelle 2 fasst die relative Gli-Expression von HUVECs in den Versuchen 1 - 3 zusammen, wobei die hohe Standardabweichung keine Aussage hinsichtlich eines einheitlichen Effektes des Smo-Inhibitors zulässt. Ebenso verbildlicht Abbildung 8 diese starken Abweichungen zwischen den drei Versuchs-durchläufen.

Abbildung 8. Effekt des Smo-Inhibitors auf die Gli-Expression von HUVECs



Die Inkubation von HUVECs mit dem Smo-Inhibitor lieferte bezüglich der mRNA-Expression von Gli1-3 kein einheitliches Ergebnis. (*) Es gilt zu beachten, dass die Gli3-Expression des Ansatzes „Nullkontrolle“ in Versuch 1 3.821% der DMSO-Kontrolle entspricht und somit gemäß der gewählten Skala nicht vollständig abgebildet werden kann (c). Abkürzung: Smo-Inh = Smoothened-Inhibitor.

Tabelle 2. Expression der Gli-Gene in den Versuchen 1 - 3

	Relative mRNA-Expression der Gli-Gene in den Versuchen 1-3 (Mittelwert ± Standardabweichung in %)		
Ansatz	**Gli1**	**Gli2**	**Gli3**
DMSO 1 µM	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0
Nullkontrolle	85 ± 56,5	34 ± 21,8	1.312 ± 2.172,8
Smo-Inh 0,1 µM	69 ± 21,4	79 ± 21,8	120 ± 102,5
Smo-Inh 1 µM	164 ± 110,6	153 ± 100,4	189 ± 187,6

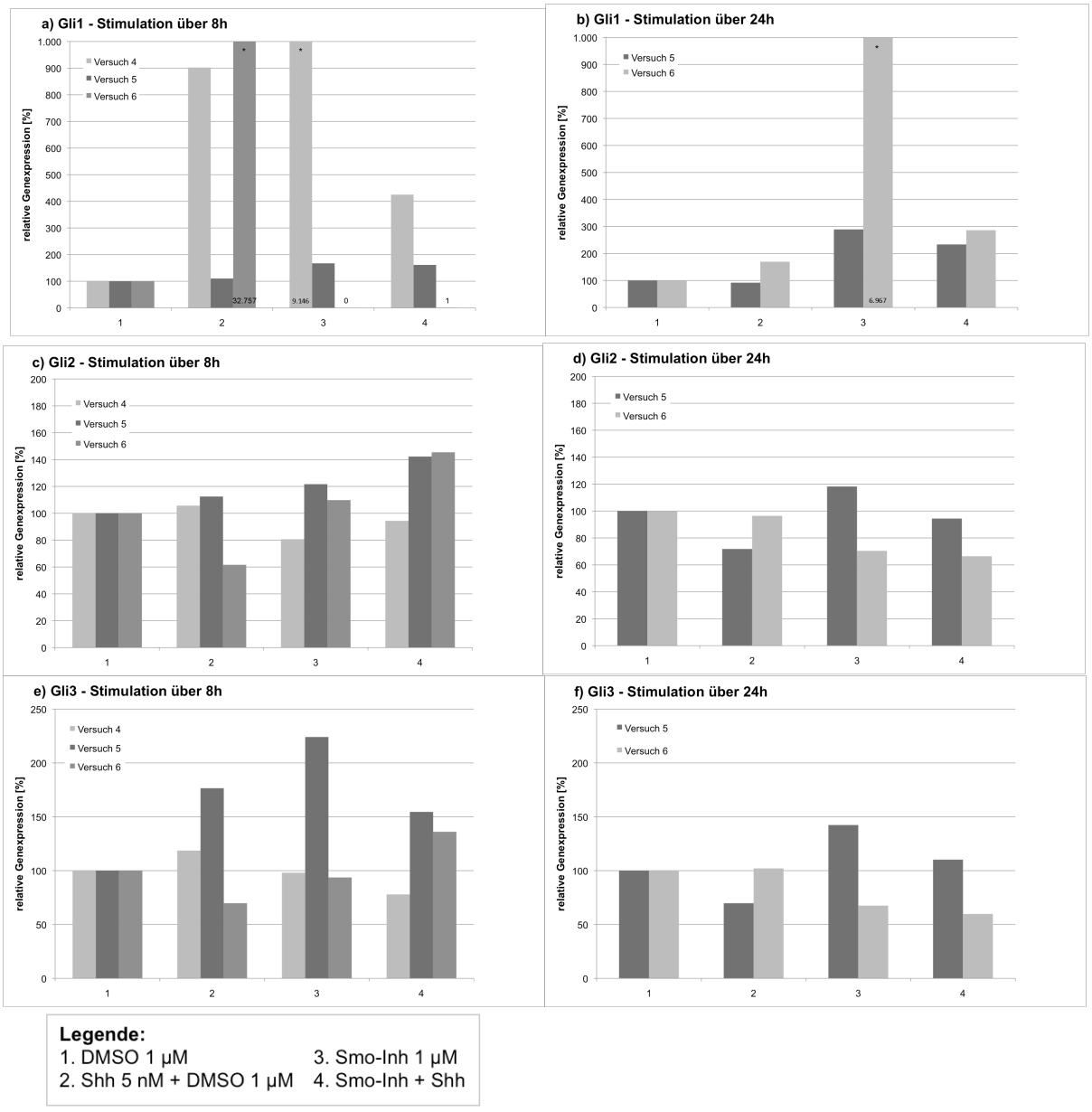
Eine ausführliche Version dieser Tabelle mit Angabe der einzelnen Mittelwerte aus Versuch 1 - 3 befindet sich im Anhang. Abkürzung: Smo-Inh = Smoothened-Inhibitor.

4.2.2 Effekt von Sonic Hedgehog und des Smo-Inhibitors auf die Expression der Gli-Gene von HUVECs

Nachdem die Kurzzeitstimulation über acht Stunden kein aussagekräftiges Ergebnis hervorbrachte, wurde zusätzlich untersucht, ob eine längere Stimulation über 24 Stunden einen deutlicheren Unterschied hervorruft. Zu diesem Zwecke wurden HUVECs nicht nur mit dem Smo-Inhibitor, sondern auch mit Sonic Hedgehog sowie einer Kombination aus beiden inkubiert und anschließend die mRNA-Expression von Gli1-3 bestimmt. Die Ansätze wurden in Duplikaten angefertigt und der Versuch zweimal wiederholt, wobei der erste Durchlauf noch keine Langzeit-Inkubation beinhaltete. Vergleicht man die graphische Versuchs-auswertung der drei unabhängigen Experimente in Abbildung 9, so ergibt sich ein sehr heterogener Effekt von Shh und des Smo-Inhibitors auf die Gli-Expression von HUVECs. Zusammen mit Tabelle 3, welche die relative Gli-Expression in Versuch 4 - 6 zusammenfasst und zum Teil sehr hohe Standardabweichungen angibt, wird deutlich, dass weder die

zusätzliche Stimulation mit Shh noch der längere Inkubationszeitraum einen deutlicheren Unterschied ausmachte.

Abbildung 9. mRNA-Expression der Gli-Gene nach Kurz- und Langzeitstimulation von HUVECs mit dem Smo-Inhibitor und Sonic Hedgehog



Die Stimulation mit Shh, dem Smo-Inhibitor oder der Kombination aus beiden Substanzen führte zu keinem einheitlichen Expressionsmuster der Gli-Gene durch HUVECs, da die Daten der drei Versuchsdurchläufe zum Teil stark gegensätzlich waren. (*) Beachte: Ausreißende Werte, die aufgrund der y-Skalierung nicht vollständig abgebildet werden können, sind gemäß ihres korrekten Wertes an der Basis der entsprechenden Säule gekennzeichnet. Abkürzungen: Smo-Inh = Smoothened-Inhibitor; h = Stunden.

Tabelle 3. Expression der Gli-Gene in den Versuchen 4 - 6

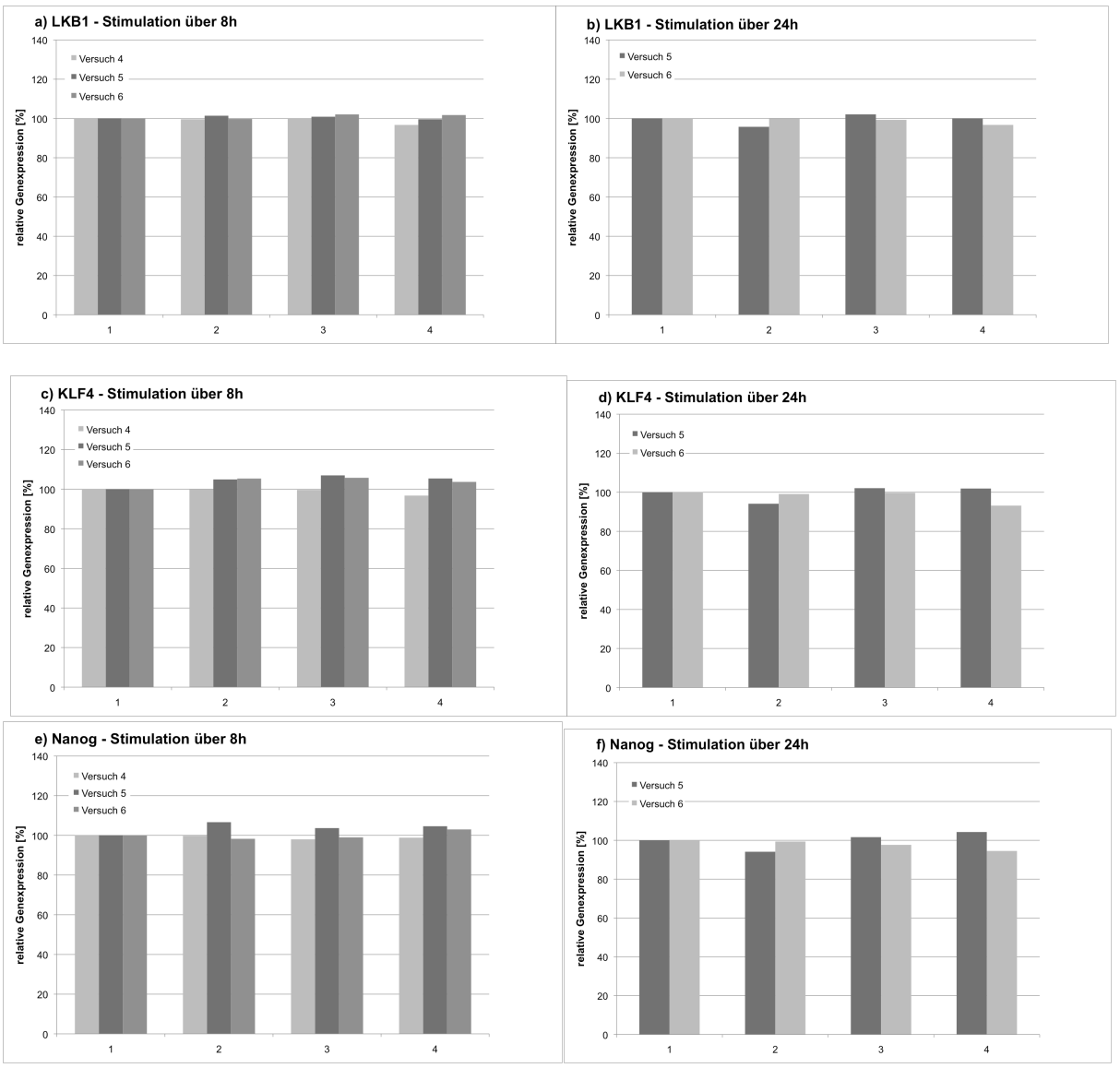
	Relative mRNA-Expression der Gli-Gene in den Versuchen 4-6 (Mittelwert ± Standardabweichung in %)					
Ansatz	**Gli1**		**Gli2**		**Gli3**	
	8h	**24h**	**8h**	**24h**	**8h**	**24h**
DMSO 1 µM	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0
Shh 5 nM + DMSO 1 µM	11.257 ± 18.624,4	131 ± 54,9	93 ± 27,6	84 ± 17,4	122 ± 53,4	86 ± 22,8
Smo-Inh 1 µM	3.104 ± 5.232,8	3.628 ± 4722,2	104 ± 21,1,5	94 ± 33,8	139 ± 74,0	105 ± 52,9
Smo-Inh 1 µM + Shh 5 nM	196 ± 214,2	260 ± 37,3	127 ± 28,6	80 ± 19,8	123 ± 40,0	85 ± 35,6

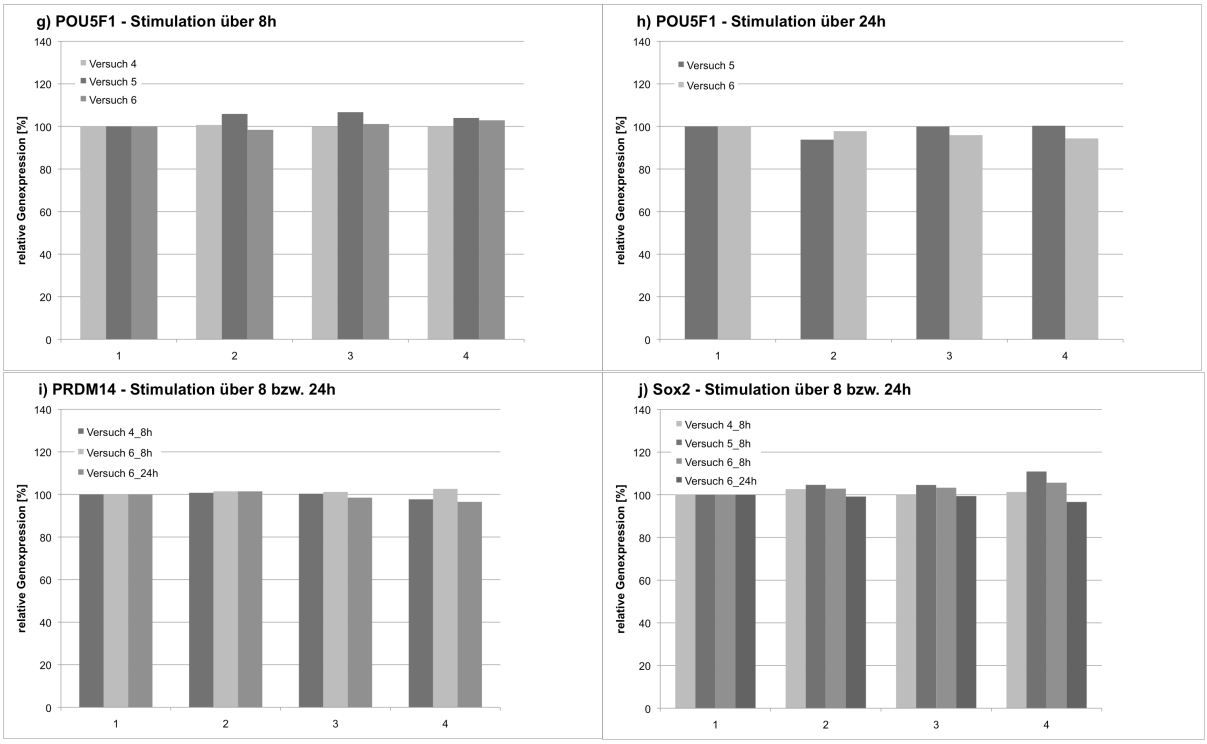
Eine ausführliche Version dieser Tabelle mit Angabe der einzelnen Mittelwerte aus Versuch 4 - 6 befindet sich im Anhang. Abkürzungen: Smo-Inh = Smoothened-Inhibitor; h = Stunden.

4.2.3 Effekt von Sonic Hedgehog und des Smo-Inhibitors auf die Expression von Stammzellgenen durch HUVECs

Weiterführend wurde in Versuchsdurchlauf 4 - 6 auch die mRNA-Expression von sechs Hh-Gli-abhängigen Stammzellgenen in den beschriebenen Ansätzen gemessen. Sowohl in der graphischen als auch tabellarischen Auswertung zeigt sich ein sehr homogenes Ergebnis mit geringen Standardabweichungen. Jedoch wurden die Stammzellgene auch in den unterschiedlichen Ansätzen sehr gleichmäßig und unabhängig von einer Stimulation mit dem Smo-Inhibitor bzw. Shh exprimiert (Abbildung 10 und Tabelle 4). Weder nach acht noch nach 24 Stunden war ein Effekt der beiden Substanzen auf die Expression von LKB1 (= STK11), KLF4, Nanog, POU5F1 (= Oct4), PRDM14 und Sox2 bei HUVECs zu verzeichnen.

Abbildung 10. mRNA-Expression der Stammzellgene nach Kurz- und Langzeitstimulation von HUVECs mit dem Smo-Inhibitor und Sonic Hedgehog





Legende:
1. DMSO 1 µM
2. Shh 5 nM + DMSO 1 µM
3. Smo-Inh 1 µM
4. Smo-Inh + Shh

Eine Behandlung von HUVECs mit Shh, dem Smo-Inhibitor oder der Kombination aus beiden bewirkte weder eine Up- noch Downregulation der Stammzellgene LKB1 (= STK11), KLF4, Nanog, POU5F1 (= Oct4), PRDM14 und Sox2. Nach acht bzw. 24h Inkubation mit den genannten Substanzen waren demnach keine Unterschiede zwischen den Ansätzen zu verzeichnen. i) und j) fassen die Ergebnisse aus der Stimulation über acht und 24 Stunden in einem Diagramm zusammen, da in den fehlenden Versuchsdurchläufen keine Expression von PRDM14 bzw. Sox2 festgestellt werden konnte. Abkürzungen: Smo-Inh = Smoothened-Inhibitor; h = Stunden.

Tabelle 4. Expression der Stammzellgene in den Versuchen 4 - 6

	Relative mRNA-Expression der Stammzellgene in den Versuchen 4-6 (Mittelwert ± Standardabweichung in %)											
Ansatz	**LKB1**		**KLF4**		**Nanog**		**POU5F1**		**PRDM14**		**Sox2**	
	8h	**24h**	**8h**	**24h**	**8h**	**24h**	**8h**	**24h**	**8h**	**24h**	**8h**	**24h**
DMSO 1 µM	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100	100 ± 0,0	100
Shh 5 nM + DMSO 1 µM	100 ± 1,0	98 ± 2,9	103 ± 3,1	97 ± 3,5	102 ± 4,5	97 ± 3,7	102 ± 3,8	96 ± 2,8	101 ± 0,5	101	103 ± 1,1	99
Smo-Inh 1 µM	101 ± 1,0	101 ± 2,0	104 ± 3,9	101 ± 1,7	100 ± 3,0	100 ± 2,8	103 ± 3,6	98 ± 2,8	101 ± 0,6	98	103 ± 2,4	99
Smo-Inh 1 µM + Shh 5 nM	99 ± 2,5	98 ± 2,3	102 ± 4,6	98 ± 6,2	102 ± 3,0	99 ± 6,9	102 ± 2,1	97 ± 4,2	100 ± 3,5	97	106 ± 4,8	97

Eine ausführliche Version dieser Tabelle mit Angabe der einzelnen Mittelwerte aus Versuch 4 - 6 befindet sich im Anhang. Abkürzungen: Smo-Inh = Smoothened-Inhibitor; h = Stunden.

5 Diskussion

Die Antiangiogenese in der Tumortherapie strebt eine Gefäßnormalisierung an, wodurch sowohl die Karzinogenese gestört als auch die Wirksamkeit der konventionellen Radio- und Chemotherapie verbessert werden soll. Auf diesem Wege wirkt sich die antiangiogene Therapie positiv auf die Prognose von Krebspatienten aus und birgt ein großes Potential für die Entwicklung neuartiger antitumoraler Substanzen (Jain 2013). Gegenwärtig zeigen die antiangiogenen Therapiekonzepte jedoch noch unbefriedigende Langzeitergebnisse, sodass die Entwicklung neuer Hemmstoffe essentiell erscheint, um Resistenzen und einer alternativen Aktivierung der Angiogenese vorzubeugen. So stellt der Hh-Signalweg und konkret der Smoothened-Inhibitor PF-04449913 einen geeigneten therapeutischen Ansatz dar, um die bisher eingesetzte Anti-VEGF(R)-Therapie zu erweitern.

Verschiedene präklinische *in vitro* Untersuchungen belegten bereits auf zellulärer Ebene, dass PF-04449913 den Smoothened-Rezeptor blockt. Auch in einem weiterführenden CML-Mausmodell reduzierte der Hemmstoff in der Blastenkrise signifikant die Leukämie-Stammzelllast (Jamieson *et al.* 2011). Außerdem zeigten Mäuse, denen Medulloblastomzellen mit inaktivierender Patched-Mutation xenotransplantiert wurden, eine herunterregulierte Gli1-Expression in Verbindung mit der kompletten Tumorregression (Papayannidis *et al.* 2011).

Mittlerweile ist PF-04449913 zu sieben verschiedenen klinischen Studien zugelassen (ClinicalTrials.gov). Seine Verträglichkeit und Wirksamkeit als Einzelsubstanz sowie in Kombination mit einer herkömmlichen Chemotherapie konnte bereits in Phase-I-Studien mit hämatologischen (NCT00953758, NCT01546038) und soliden Malignomen (NCT01286467) nachgewiesen werden (Cucchi *et al.* 2012). Dabei sprachen besonders Patienten mit hämatologischen Erkrankungen gut auf die Therapie mit dem Smo-Inhibitor an, was sich klinisch recht variabel ausdrückte. Es wurden Fälle von signifikanter Normalisierung des Blutbildes, stabiler Erkrankung und kompletter Remission bis hin zum Verlust der pathognomonischen Mutation eines Patienten in der Blastenkrise beobachtet (Jamieson *et al.* 2011). In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass der Smo-Inhibitor PF-04449913 fähig war, die generelle Chemoresistenz von Leukämie-Stammzellen aufzuheben, indem er antiapoptotische Gene wie Bcl2 (B-cell lymphoma 2) und ABCA2 (ATP-binding cassette sub-family A member 2) bei AML- und CML-Patienten stark herunterregulierte (Papayannidis *et al.* 2011). Angesichts dieser vielversprechenden Ergebnisse wird die Wirksamkeit des Inhibitors derzeitig in drei verschiedenen Phase-II-Studien mit Leukämie-Patienten getestet (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01546038, NCT01841333 und NCT01842646).

Da gezeigt werden konnte, dass der Hh-Signalweg während der Karzinogenese nicht nur in den Tumorzellen an sich sondern auch im benachbarten Stroma konstitutiv aktiviert sein kann, sollte in der vorliegenden Arbeit der Effekt des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 auf Endothelzellen untersucht werden (Scales und Sauvage 2009).

Entgegen der deutlichen Wirksamkeit in präklinischen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen und anschließenden klinischen Studien konnte hier dieser Effekt nicht an HUVECs und dem OEC-Klon CB7 durch Proliferations- bzw. quantitative PCR-Analysen belegt werden. Die Proliferationsversuche über drei Tage zeigten keine deutlichen Unterschiede zwischen den

behandelten Ansätzen und der Kontrolle, woraufhin Langzeitproliferationen über acht bis 24 Tage angefertigt und zusätzlich mit dem Sonic Hedgehog-Protein stimuliert wurde. Doch auch in diesen wurde keine einheitliche Tendenz über den längeren Zeitraum sichtbar. Mit Hilfe der Real-Time quantitativen PCR-Analyse wurde die mRNA-Expression der drei Gli-Gene durch HUVECs nach acht bzw. 24-stündiger Stimulation mit PF-04449913 bzw. Sonic Hedgehog bestimmt. Nachdem in sechs unabhängigen Versuchen kein Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen gemessen werden konnte, wurde in den letzten drei Versuchsdurchläufen zusätzlich die Expression der sechs Stammzell-typischen Transkriptionsfaktoren LKB1, KLF4, Nanog, POU5F1, PRDM14 und Sox2 untersucht, die bekanntermaßen wichtige Downstream-Zielgene in der Hh-Gli-induzierten Tumorentwicklung darstellen (Ruiz i Altaba 2011). Die Stammzellgene wurden zwar in den HUVECs exprimiert, jedoch konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen festgestellt werden. Obwohl der kanonische Hedgehog-Signalweg zelluläre Stammzellfunktionen kontrolliert, konnte daher bei sehr niedriger Standardabweichung zwischen den Versuchsdurchläufen keine Beeinflussung dieser Stammzellgene durch Shh bzw. PF-04449913 nachgewiesen werden (Irvine und Copland 2012).

Die Tatsache, dass der in der Literatur beschriebene Effekt von PF-04449913 in der vorliegenden Arbeit auf zellulärer Ebene nicht bestätigt werden konnte, lässt mehrere mögliche Erklärungen zu:

1.) Die Zell-Proliferation ist zwar eine etablierte Methode, um die Auswirkung einer Substanz auf das Zellwachstum zu messen, jedoch könnten gerade Hemmstoffe, die in Signalwege eingreifen, die die Genexpression verändern, eine längere Wirkdauer benötigen. Um diesen Fehler auszuschließen, wurde die Langzeitproliferation angeschlossen, welche zwar eine unterschiedliche Tendenz zwischen den Ansätzen deutlicher aufzeigt, jedoch auch durch die Gefahr der Fehlerverschleppung über den längeren Zeitraum und das zweimalige neue Ausplattieren pro Woche unsicherer sein kann.

Die RTq-PCR ist ein ebenso bewährtes Verfahren und misst die veränderte Genexpression nach Zell-Stimulation. Um Einflussfaktoren der Probenaufarbeitung auszuschließen und einen Vergleich zwischen den Ansätzen zu ermöglichen, wird das jeweilige Ergebnis zur Expression des Haushaltsgens GAPDH ins Verhältnis gesetzt. Dies setzt voraus, dass keine übermäßigen Schwankungen in der GAPDH-Expression von HUVECs herrschen. In der Regel wurde GAPDH einheitlich in den unterschiedlich stimulierten Proben exprimiert, deren Crossing Point (C_P) in einem frühen Zyklus um 20 lag. Eine Ausnahme davon bildete die Nullkontrolle im ersten Versuchsdurchlauf, dessen C_P in der GAPDH-Messung erst sechs Zyklen später erreicht wurde als in den restlichen Proben. Da sich der C_P-Wert umgekehrt proportional zur cDNA-Ausgangsmenge verhält, lässt sich vermuten, dass der Ansatz Nullkontrolle in Versuch 1 auch insgesamt eine geringere Genexpressions-Aktivität besitzt. Dementsprechend lag auch der C_P-Wert des Nullkontrolle-Ansatzes in der Gli1 und 2-Bestimmung – bei einem bereits hohen C_P-Grundniveau um 30 der übrigen Proben – über Zyklus 36 und konnte nicht mehr bestimmt werden (vgl. Tabelle 5, S. 36). Dieses Phänomen zeigte sich jedoch nur hier. Über alle sechs Versuche korrelierte des Weiteren die gemessene Expression der verschiedenen Gene innerhalb der Duplikate, die Standardkurve zeigte ein sinnvolles Bild und die Schmelzkurvenanalyse bot keinen Hinweis auf eine Verfälschung der Ergebnisse durch Kontamination oder unspezifisch entstandene Primer-Dimere.

2.) Wie in der Einleitung bereits eingeführt besteht eine diskrepante Auffassung bezüglich der Bedeutung des Hh-Signalwegs in Endothelzellen (vgl. 2.2.1). Auf der einen Seite integrieren HUVECs und andere Endothelzellen die Rezeptoren Ptch und Smo sowie das primäre Zilium in ihre Oberflächenmembran, wodurch der Grundstein für einen effizient ablaufenden Hh-Signalweg gelegt wird (Chinchilla *et al.* 2010). In einem weiterführenden Schritt konnten verschiedene Arbeitsgruppen einen direkten und Gli-abhängigen Effekt der Hh-Liganden auf die Proliferation, Migration, Adhäsion und Tubulogenese von Endothelzellen nachweisen (Vokes *et al.* 2004, Hochman *et al.* 2006, Asai *et al.* 2006). Über die Vaskulogenese hinausgehend demonstrierten dann unabhängige Studien die Rolle des Hh-Signalwegs auch in der Angiogenese des Dottersacks (Byrd *et al.* 2002, Nagase *et al.* 2006). Postnatal wird der Hh-Signalweg über eine *de novo* Expression von Shh in verletzten oder ischämischen Geweben reaktiviert, wodurch sowohl Angiogenese als auch die Regeneration des betroffenen Gewebes induziert wird (Straface *et al.* 2009). Essentiell an diesem Vorgang beteiligt ist eine Überexpression von Gli2 und 3 in Endothelzellen des ischämischen Areals, welche die Proliferation und Migration dieser Endothelzellen sowie die Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen organisiert (Renault *et al.* 2008, Renault *et al.* 2009). Auch im Rahmen der Tumorangiogenese nimmt die Typ IIIa Aktivierung des Hh-Signalwegs eine entscheidende Stellung ein (vgl. 2.2.2). Durch den Tumor sekretierte Hh-Proteine stimulieren parakrin die eigene Mikroumgebung, sodass optimale Wachstums- und Progressionsbedingungen geschaffen werden (Scales und Sauvage 2009). Endothelzellen als Teil des umgebenden Stromas werden in ihrer Motiliät und Tubulogenese gefördert, wodurch außerdem Angiogenese, Lymphangiogenese und Metastasierung des Tumors vorangetrieben werden (Bailey *et al.* 2009). Ebenso wiesen Geng *et al.* (2007) einen direkten proliferativen Effekt von Shh auf HUVECs *in vitro* nach und dokumentierten *in vivo* eine signifikante Reduktion des Tumorgefäßbettes in Gefäßdichte und -permeabilität durch Hh-Antagonisierung in einem Melanom-Mausmodell.

Auf der anderen Seite finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass Shh in Kulturen reifer Endothelzellen eher ein indirektes angiogenes Agens darstellt, während endothelialen Progenitorzellen zum Teil ein größerer direkter Effekt zugeschrieben wird (Asai *et al.* 2006, vgl. 2.2.1). Deswegen wurden in der vorliegenden Arbeit HUVECs und OECs verwendet, welche noch Vorläufereigenschaften aufweisen. Auch Chen *et al.* (2011) unterstützten die These, dass überexprimierte Hh-Liganden im Zuge der Typ IIIa Aktivierung in erster Linie auf perivaskuläre Zellen des Tumorstromas wirken. Seinen Effekt vermittelte Shh dabei über den kanonischen Hh-Signalweg in Fibroblasten, wobei die dadurch induzierte Genexpression mit dem Ausmaß der Angiogenese korrelierte und vorherrschend VEGF-A in *in vitro* sowie *in vivo* Versuchen den indirekten Hh-Effekt auf Endothelzellen ausübte. Andere Untersuchungen dagegen gehen zwar von einer direkten Wirkung der Hh-Proteine auf Endothelzellen aus, diese sei jedoch durch den nicht-kanonischen Hh-Signalweg vermittelt. He *et al.* (2013) demonstrierten in einem Kokultur-System von mikrovaskulären Gehirnendothelzellen und Astrozyten, dass letztere Zellart bei Sauerstoff-Glukose-Deprivation Shh produzierte, welches über den nicht-kanonischen Hh-Signalweg Typ II direkt die Proliferation, Migration und Tubulogenese dieser Endothelzellen förderte. Die dabei induzierte Signaltransduktion umging die Gli-Proteine über eine Smoothened-vermittelte RhoA/ROCK-Aktivierung. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit den *in vitro* und *in vivo* Arbeiten von Chinchilla *et al.* (2010) und Renault *et al.* (2010), welche einen direkten Einfluss von Shh auf die angiogene Aktivität von Endothelzellen über den RhoA/ROCK-

Signalweg darlegten. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass unter der Annahme, dass Hh-Proteine einen rein indirekten angiogenen Effekt auf Endothelzellen ausübten bzw. ein direkter Effekt nur durch nicht-kanonische Signalwege vermittelt werden würde, die Gli-Expression dann keine geeignete Messgröße wäre oder Endothelzellen nicht die geeignete Zellart darstellten. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll, in zukünftigen Untersuchungen zur Rolle des Hh-Signalwegs im Tumorstroma Kokulturen von Endothelzellen mit zum Beispiel Fibroblasten anzulegen oder im Falle der PCR-Analyse als Versuchsmethode auch Zielgene des nicht-kanonischen Signalwegs wie RhoA und ROCK einzuschließen (Chen *et al.* 2011). Da jedoch – wie weiter oben dargestellt – zahlreiche Studien eine direkte Wirkung von Shh auf die (nicht-)kanonischen Hh-Signalwege in Endothelzellen belegen konnten, wären zumindest die Proliferationsversuche im Gegensatz zu der Gli-Bestimmung durch PCR-Analyse ein geeignetes Verfahren, um Unterschiede darzustellen. Denn Shh übt ebenso Auswirkungen auf die nicht-kanonischen Signalwege Typ I (Ptch-abhängig und Smo-unabhängig) und II (Ptch- und Smo-abhängig, aber Gli-unabhängig) aus. Dementsprechend würde auch eine Smo-Blockade die nicht-kanonischen Hh-Signalwege Typ II beeinflussen (Robbins *et al.* 2012).

3.) Obwohl u.a. Pola *et al.* (2001) zeigten, dass Shh in *in vivo* Mausmodellen mit Myokard- oder Extremitätenischämie Angiogenese induziert, konnten sie keinen direkten Effekt auf die Proliferation oder Migration von kultivierten Endothelzellen *in vitro* nachweisen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Shh – wie im vorherigen Abschnitt beschrieben – lediglich einen indirekten angiogenen Faktor darstellt, welcher perivaskuläres Stroma anregt, proangiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF, Ang 1 und 2 zu produzieren. Darüber hinaus wäre es aber auch denkbar, dass reife Endothelzellen einen Mechanismus besitzen, um eine Gli-Aktivierung durch Hh-Proteine zu unterbinden. In diesem Sinne entdeckten Chuang und McMahon 1999 das Hedgehog-Interacting Protein (HHIP), welches gemäß seines Namens die drei Hh-Liganden in ähnlicher Affinität wie der Rezeptor Ptch bindet und sie somit für eine weitere Signaltransduktion unzugänglich macht. Als potentielles Zielgen des Hh-Signalwegs wird es von mesenchymalen Zellen in Anwesenheit der drei Hh-Proteine exprimiert. Dies und die Tatsache, dass transgene Mäuse mit einer HHIP-Überexpression einen vergleichbaren Phänotyp wie Ihh-Knockout-Mäuse zeigten, legte zusätzlich eine hemmende Rolle von HHIP im Hh-Signalweg nahe (Chuang und McMahon 1999). Daraufhin stellten Olsen *et al.* (2004) erstmals einen Bezug des endogenen Hh-Signalweg-Antagonisten zur physiologischen sowie Tumor-induzierten Angiogenese her. Sie konnten nachweisen, dass HHIP vorwiegend in Endothelzellen exprimiert wird, es die Wirkung der Hh-Liganden in der antwortenden Zelle antagonisiert und in HUVECs während *in vitro* Angiogenese herunterreguliert ist. Auf ähnliche Weise charakterisierten auch Yamazaki *et al.* (2008) das Hedgehog-Interacting Protein als Merkmal reifer Endothelzellen wie HUVECs, welches die Fähigkeit dieser Zellen hemmen kann, auf exogenes Shh zu reagieren. Des Weiteren konnte eine signifikante HHIP-Downregulation in verschiedenen humanen Tumorentitäten sowie in stark vaskularisierten, xenotransplantierten Prostata- und Lungenkarzinomen entdeckt werden, was für die Bedeutung eines aktivierten Hh-Signalwegs durch HHIP-Verlust in der Tumorangiogenese spricht (Olsen *et al.* 2004). Weiterhin finden sich epigenetische HHIP-Inaktivierungen in Endothelzellen pankreatischer Neoplasien, in Medulloblastom-Zelllinien und -Tumorproben, als auch in hepatischen und gastrointestinalen Karzinomen (Yamazaki *et al.* 2008, Shahi *et al.* 2011). HHIP fungiert demnach als Tumorsuppressorgen, das unter physiologischen Bedingungen reife Endothelzellen in einen Ruhezustand versetzt und das bei Ausschaltung

im Rahmen der Karzinogenese die maligne Progression fördert (Shahi *et al.* 2011). Dies würde zudem erklären, warum Endothelzellen wie HUVECs die nötigen Komponenten Ptch, Smo und Cdo des Hh-Signalwegs und darüber hinaus ein primäres Zilium enthalten, einige Studien jedoch keinen adäquaten Einfluss von Shh auf diese Zellen beobachten konnten (Moran *et al.* 2012, Chinchilla *et al.* 2010). Ebenso ließen sich kultivierte Endothelzellen dann nicht durch Shh voraktivieren und die Behandlung mit einem Smo-Inhibitor würde – bei konstitutiv reprimiertem Hh-Signalweg – keinen weiteren Unterschied ersichtlich machen. Dem zufolge könnte man in weiterführenden Experimenten untersuchen, ob eine initiale HHIP-Inaktivierung in Endothelzellen einen deutlicheren Effekt von Shh zutage bringt.

Die oben beschriebenen Erklärungsansätze sowie die Erkenntnis, dass der Hh-Signalweg nicht nur in Endothelzellen exprimiert wird, sondern auch eng mit der endothelialen Proliferation und Migration assoziiert ist (Yan *et al.* 2013), rechtfertigen weitergehende Untersuchungen dieser Zusammenhänge. Erst kürzlich demonstrierten Yan *et al.* (2013) das enge Zusammenspiel von mikrovaskulären Gehirnendothel- und Gliomstammzellen und belegten, dass ihre Interaktion über eine Aktivierung des kanonischen Hedgehog-Signalwegs in den Endothelzellen erfolgte. *In vivo* gruppierten sich die Gliomstammzellen um Mikrogefäße, *in vitro* führte eine gemeinsame Kultivierung der Endothel- und Tumorstammzellen zu einer gesteigerten endothelialen Migration und Proliferation. Eine gleichzeitig gemessene Überexpression von Shh sowie der Hh-Zielgene Gli1 und HHIP in den Endothelzellen als auch die Beobachtung, dass eine Smo-Blockade die migratorischen und proliferativen Fähigkeiten der reifen Endothelzellen wieder revidierte, ließ Yan *et al.* auf eine Aktivierung der Endothelzellen durch Induktion des kanonischen Hh-Signalwegs schließen.

Da auch die Tumorangiogenese die Progression eines malignen Prozesses in allen Phasen der Karzinogenese vorantreibt, kann der Einbezug der Antiangiogenese in der herkömmlichen Tumortherapie entscheidende Fortschritte bringen (Pang und Poon 2006b). So kamen auch Kobune *et al.* (2009) zu der Erkenntnis, dass aberrante Hh-Aktivität essentiell zum Überleben und zur Chemotherapie-Resistenz von $CD34^+$-Leukämiezellen beiträgt und eine Blockierung des Hh-Signalwegs in AML-Zellen direkt Apoptose sowie eine erhöhte Sensibilität gegenüber konventionellen Zytostatika induziert. Der Hedgehog-Signalweg und konkret der Smoothened-Rezeptor präsentieren sich folglich als geeigneter Ansatzpunkt in der antiangiogenen Tumortherapie. Die Kombination von PF-04449913 mit der konventionellen Radio-/Chemotherapie verspricht eine gewisse Addition und sogar Synergismus des antitumoralen und gefäßnormalisierenden Effektes.

6 Zusammenfassung

Der Hedgehog-Signalweg koordiniert die Proliferation, Differenzierung und Expansion von Stamm- und Vorläuferzellen während der embryonalen Entwicklung der Organe sowie des hämatopoetischen und vaskulären Systems (Riobo und Manning 2007). Postnatal stark herunterreguliert steuert er weiterhin die Aufrechterhaltung, Regeneration und Heilung von Geweben (Irvine und Copland 2012). Auf pathophysiologischer Ebene reguliert der Hh-Signalweg somit die Expression von Downstream-Genen für Zellschicksal, -überleben und -wachstum und fördert in konstitutiv aktiviertem Zustand die Tumorentstehung und anschließende maligne Progression. Aktivierende Mutationen des Hh-Signalwegs konnten bereits in Tumorzellen sowie dem Tumor umgebendem Stroma nachgewiesen werden, sodass in der vorliegenden Arbeit die Rolle der Rezeptoren Smoothened und Patched bei primären Endothelzellen untersucht wurde (Scales und Sauvage 2009).

Weder in Proliferations-Assays über drei Tage noch in Langzeit-Analysen von bis zu vier Wochen konnten einheitliche Unterschiede durch die Behandlung der HUVECs und OECs mit dem spezifischen Smoothened-Inhibitor PF-04449913 bzw. dem Sonic Hedgehog-Liganden 1314-SH/CF festgestellt werden. Darüber hinaus hatte die Stimulation der Endothelzellen mit den genannten Substanzen keine eindeutige Auswirkung auf die Expression der Downstream-Mediatoren Gli1-3. Da der Hh-Signalweg eine wichtige Rolle in der Stammzellbiologie übernimmt, wurden zudem einige Stammzell-relevanten Gene wie LKB1, KLF4, Nanog, POU5F1, PRDM14 und Sox2 analysiert. Hierbei waren jedoch ebenfalls keine Unterschiede bezüglich ihrer mRNA-Expression zu verzeichnen.

Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu präklinischen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen und aktuellen klinischen Phase-I- und -II-Studien des kleinmolekularen Hh-Signalweg-Antagonisten mit soliden und hämatologischen Tumoren (Papayannidis *et al.* 2011, ClinicalTrials.gov). Hier zeigte PF-04449913 ein sicheres und gut tolerierbares Wirkprofil und wies frühe Zeichen klinischer Wirksamkeit in Patienten mit AML, CML, Myelofibrose und Myelodysplastischem Syndrom auf (Jamieson *et al.* 2011). In diesem Sinne besteht weiter Forschungsbedarf, um die in der Literatur beschriebenen Unstimmigkeiten bezüglich der direkten angiogenen Wirkung der drei Hh-Liganden endgültig zu klären. Dafür sollte auch der Effekt des natürlichen Hh-Signalweg-Antagonisten HHIP, welcher in reifen Endothelzellen exprimiert wird, näher analysiert und probeweise ausgeschaltet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass obgleich eine alleinige Smo-Inhibierung keine Therapieoption für solide oder hämatologische Neoplasien darstellt, dieser antiangiogene Ansatz jedoch eine vielversprechende Ergänzung zur konventionellen Radio-/Chemotherapie sowie der bisher zugelassenen Anti-VEGF(R)-Therapie bietet. Auf diese Weise könnte Resistenzbildungen gegenüber diesen herkömmlichen Therapeutika entgegengewirkt und zudem additive und synergistische Antitumoreffekte erzielt werden, da eine Normalisierung des Tumorgefäßsystems nachweislich die Prognose verbessert (Jain 2013). Des Weiteren zeigt sich der Hh-Signalweg und konkret das Protoonkogen Smoothened als möglicher therapeutischer Angriffspunkt, um gemäß der Tumorstammzell-Hypothese die dysregulierte Aktivität dieser strahlen- und chemoresistenten malignen Ursprungszellen zu kontrollieren, welches einen essentiellen Schritt zur Verhinderung eines Tumorrezidivs ausmacht (Clement *et al.* 2007).

7 Anhang

Tabellen

Tabelle 5. Expression der Gli-Gene in den Versuchen 1 - 3 (detaillierte Version)

		Relative mRNA-Expression der Gli-Gene in den Versuchen 1-3 (Mittelwert bzw. Mittelwert ± Standardabweichung in %)		
Ansatz	**Versuch**	**Gli1**	**Gli2**	**Gli3**
DMSO 1 µM	1	100	100	100
	2	100	100	100
	3	100	100	100
	Ø	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0
Nullkontrolle	1	N/A	N/A	3.821
	2	56	43	58
	3	113	25	58
	Ø	85 ± 56,5	34 ± 21,8	1312 ± 2172,8
Smo-Inh 0,1 µM	1	45	85	238
	2	74	55	57
	3	87	97	64
	Ø	69 ± 21,4	79 ± 21,8	120 ± 102,5
Smo-Inh 1 µM	1	101	43	99
	2	291	174	405
	3	98	240	63
	Ø	164 ± 110,6	153 ± 100,4	189 ± 187,6

Ausführliche Version der Tabelle 2 (vgl. S. 26). Abkürzungen: Smo-Inh = Smoothened-Inhibitor; N/A = nicht vorhanden (not available), da keine Expression.

Tabelle 6. Expression der Gli-Gene in den Versuchen 4 - 6 (detaillierte Version)

		Relative mRNA-Expression der Gli-Gene in den Versuchen 4-6 (Mittelwert bzw. Mittelwert ± Standardabweichung in %)					
Ansatz	**Versuch**	**Gli1**		**Gli2**		**Gli3**	
		8h	**24h**	**8h**	**24h**	**8h**	**24h**
DMSO 1 µM	4	100	100	100	100	100	100
	5	100		100		100	
	6	100	100	100	100	100	100
	Ø	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0
Shh 5 nM + DMSO 1 µM	4	110	92	112	72	177	70
	5	902		106		119	
	6	32.757	170	62	96	70	102
	Ø	11.257 ± 18.624,4	131 ± 54,9	93 ± 27,6	84 ± 17,4	122 ± 53,4	86 ± 22,8
Smo-Inh 1 µM	4	167	289	122	118	224	142
	5	9.146		81		98	
	6	0	6.967	110	70	94	68
	Ø	3.104 ± 5.232,8	3.628 ± 4722,2	104 ± 21,1,5	94 ± 33,8	139 ± 74,0	105 ± 52,9
Smo-Inh 1 µM + Shh 5 nM	4	161	233	142	94	155	110
	5	425		94		78	
	6	1	286	145	66	136	60
	Ø	196 ± 214,2	260 ± 37,3	127 ± 28,6	80 ± 19,8	123 ± 40,0	85 ± 35,6

Ausführliche Version der Tabelle 3 (vgl. S. 27). Abkürzungen: Smo-Inh = Smoothened-Inhibitor; h = Stunden.

Tabelle 7. Expression der Stammzellgene in den Versuchen 4 - 6 (detaillierte Version)

		Relative mRNA-Expression der Stammzellgene in den Versuchen 4-6 (Mittelwert bzw. Mittelwert ± Standardabweichung in %)											
Ansatz	**Versuch**	**LKB1**		**KLF4**		**Nanog**		**POU5F1**		**PRDM14**		**Sox2**	
		8h	**24h**	**8h**	**24h**	**8h**	**24h**	**8h**	**24h**	**8h**	**24h**	**8h**	**24h**
DMSO 1 µM	4	100	100	100	100	100	100	100	100	N/A	N/A	100	N/A
	5	100		100		100		100		100		100	
	6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Ø	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100	100 ± 0,0	100
Shh 5 nM + DMSO 1 µM	4	101,4	95,8	104,9	94,1	106,7	94,1	105,9	93,8	N/A	N/A	104,7	N/A
	5	99,6		99,9		99,8		100,7		100,8		102,7	
	6	99,8	99,9	105,4	99,1	98,3	99,3	98,4	97,8	101,5	101,5	102,9	99,2
	Ø	100 ± 1,0	98 ± 2,9	103 ± 3,1	97 ± 3,5	102 ± 4,5	97 ± 3,7	102 ± 3,8	96 ± 2,8	101 ± 0,5	101	103 ± 1,1	99
Smo-Inh 1 µM	4	100,9	102,1	107,0	102,1	103,7	101,6	106,7	99,9	N/A	N/A	104,6	N/A
	5	100,0		99,7		98,0		99,9		100,3		99,9	
	6	102,1	99,3	105,8	99,7	99,0	97,6	101,1	95,9	101,2	98,5	103,3	99,4
	Ø	101 ± 1,0	101 ± 2,0	104 ± 3,9	101 ± 1,7	100 ± 3,0	100 ± 2,8	103 ± 3,6	98 ± 2,8	101 ± 0,6	98	103 ± 2,4	99
Smo-Inh 1 µM + Shh 5 n	4	99,6	100,0	105,4	101,9	104,6	104,3	104,0	100,3	N/A	N/A	110,9	N/A
	5	96,7		96,8		98,8		99,9		97,7		101,3	
	6	101,7	96,7	103,7	93,2	103,0	94,5	102,9	94,4	102,6	96,5	105,7	96,6
	Ø	99 ± 2,5	98 ± 2,3	102 ± 4,6	98 ± 6,2	102 ± 3,0	99 ± 6,9	102 ± 2,1	97 ± 4,2	100 ± 3,5	97	106 ± 4,8	97

Ausführliche Version der Tabelle 4 (vgl. S. 29). Abkürzungen: Smo-Inh = Smoothened-Inhibitor; h = Stunden; N/A = nicht vorhanden (not available), da keine Expression.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Wandaufbau der Blutgefäße 2
Abbildung 2. Arten des Gefäßwachstums 3
Abbildung 3. Angiogenese in den einzelnen Stadien der Karzinogenese 10
Abbildung 4. Der Hedgehog-Signalweg 13
Abbildung 5. Das Hedgehog-Signalnetzwerk 14
Abbildung 6. Effekt des Smo-Inhibitors auf die Proliferation von HUVECs und den OEC-Klon CB7 über 3d. 24
Abbildung 7. Langzeitproliferation von HUVECs unter permanenter Behandlung mit Shh bzw. dem Smo-Inhibitor 25
Abbildung 8. Effekt des Smo-Inhibitors auf die Gli-Expression von HUVECs 26
Abbildung 9. mRNA-Expression der Gli-Gene nach Kurz- und Langzeitstimulation von HUVECs mit dem Smo-Inhibitor und Sonic Hedgehog 27
Abbildung 10. mRNA-Expression der Stammzellgene nach Kurz- und Langzeitstimulation von HUVECs mit dem Smo-Inhibitor und Sonic Hedgehog 28

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Primer und PCR-Bedingungen 23
Tabelle 2. Expression der Gli-Gene in den Versuchen 1 - 3 26
Tabelle 3. Expression der Gli-Gene in den Versuchen 4 - 6 27
Tabelle 4. Expression der Stammzellgene in den Versuchen 4 - 6 29
Tabelle 5. Expression der Gli-Gene in den Versuchen 1 - 3 (detaillierte Version) 36
Tabelle 6. Expression der Gli-Gene in den Versuchen 4 - 6 (detaillierte Version) 36
Tabelle 7. Expression der Stammzellgene in den Versuchen 4 - 6 (detaillierte Version) 36

Literaturverzeichnis

ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER M, VAN DER ZEE R, LI T, WITZENBICHLER B, SCHATTEMAN G, ISNER JM (1997) Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. Science. 275:964-7.

ASAHARA T, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA C, PASTORE C, SILVER M, KEARNE M, MAGNER M, ISNER JM (1999) Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. Circ Res. 85:221-8.

ASAI J, TAKENAKA H, KUSANO KF, II M, LUEDEMANN C, CURRY C, EATON E, IWAKURA A, TSUTSUMI Y, HAMADA H, KISHIMOTO S, THORNE T, KISHORE R, LOSORDO DW (2006) Topical Sonic Hedgehog Gene Therapy Accelerates Wound Healing in Diabetes by Enhancing Endothelial Progenitor Cell-Mediated Microvascular Remodeling. Circulation. 113(20):2413-24.

BARCIA C, EMBORG ME, HIRSCH EC, HERRERO MT (2004) Blood vessels and parkinsonism. Front Biosci. 9:277-82.

BUTLER JM, KOBAYASHI H, RAFII S (2010) Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. Nat Rev Cancer. 10(2):138-46.

BYRD N, BECKER S, MAYE P, NARASIMHAIAH R, ST-JACQUES B, ZHANG X, MCMAHON J, MCMAHON A, GRABEL L (2002) Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis. Development. 129(2):361-72.

BYRD N, GRABEL L (2004) Hedgehog Signaling in Murine Vasculogenesis and Angiogenesis. Trends Cardiovasc Med. 14(8):308-13.

CARMELIET P (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature. 438:932-6.

CARMELIET P, JAIN RK (2011a) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature. 473(7347):298-307.

CARMELIET P, JAIN RK (2011b) Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. Nat Rev Drug Discov. 10(6):417-27.

CHEN W, TANG T, EASTHAM-ANDERSON J, DUNLAP D, ALICKE B, NANNINI M, GOULD S, YAUCH R, MODRUSAN Z, DUPREE KJ, DARBONNE WC, PLOWMAN G, DE SAUVAGE FJ, CALLAHAN CA (2011) Canonical hedgehog signaling augments tumor angiogenesis by induction of VEGF-A in stromal perivascular cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(23):9589-94.

CHEN Y, JIANG J (2013) Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction. Cell Res. 23(2):186-200.

CHINCHILLA P, XIAO L, KAZANIETZ MG, RIOBO NA (2010) Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. Cell Cycle. 9(3):570-79.

CHUANG PT, MCMAHON AP (1999) Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. Nature. 397(6720):617-21.

CHUNG AS, LEE J, FERRARA N (2010) Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. Nat Rev Cancer. 10(7):505-14.

CLEMENT V, SANCHEZ P, DE TRIBOLET N, RADOVANOVIC I, RUIZ I ALTABA A (2007) HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. Curr Biol. 17(2):165-72.

COULTAS L, NIEUWENHUIS E, ANDERSON GA, CABEZAS J, NAGY A, HENKELMAN RM, HUI CC, ROSSANT J (2010) Hedgehog regulates distinct vascular patterning events through VEGF-dependent and -independent mechanisms. Blood. 116(4):653-60.

CUCCHI D, OCCHIONE MA, GULINO A, DE SMAELE E (2012) Hedgehog signaling pathway and its targets for treatment in basal cell carcinoma. J Exp Pharmacol. 4:173-85.

DHANABAL M, RAMCHANDRAN R, VOLK R, STILLMAN IE, LOMBARDO M, IRUELA-ARISPE ML, SIMONS M, SUKHATME VP (1999a) Endostatin: Yeast Production, Mutants, and Antitumor Effect in Renal Cell Carcinoma. Cancer Res. 59(1):189-97.

DHANABAL M, RAMCHANDRAN R, WATERMAN MJ, LU H, KNEBELMANN B, SEGAL M, SUKHATME VP (1999b) Endostatin Induces Endothelial Cell Apoptosis. J Biol Chem. 274(17):11721-6.

DIXELIUS J, CROSS M, MATSUMOTO T, SASAKI T, TIMPL R, CLAESSON-WELSH L (2002) Endostatin Regulates Endothelial Cell Adhesion and Cytoskeletal Organization. Cancer Res. 62(7):1944-7.

DONG X, HAN ZC, YANG R (2007) Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hematologic malignancies. Crit Rev Oncol Hematol. 62:105-18.

EMBLEM KE, MOURIDSEN K, BJORNERUD A, FARRAR CT, JENNINGS D, BORRA RJ, WEN PY, IVY P, BATCHELOR TT, ROSEN BR, JAIN RK, SORENSEN AG (2013) Vessel architectural imaging identifies cancer patient responders to anti-angiogenic therapy. Nat Med. 19(9):1178-83.

FAM NP, VERMA S, KUTRYK M, STEWART DJ (2003) Clinician Guide to Angiogenesis. Circulation. 108(21):2613-8.

FERRARA N, CARVER-MOORE K, CHEN H, DOWD M, LU L, O'SHEA KS, POWELL-BRAXTON L, HILLAN KJ, MOORE MW (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature. 380(6573):439-42.

FERRARA N, KERBEL RS (2005) Angiogenesis as a therapeutic target. Nature. 438:967-74.

FISCHER C, SCHNEIDER M, CARMELIET P (2006) Principles and Therapeutic Implications of Angiogenesis, Vasculogenesis and Arteriogenesis. In: The Vascular Endothelium II. S. Moncada, A. Higgs (Hrsg). In: Handb Exp Pharmacol. Band 176/II. F. Hofmann (Hrsg) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 158-212.

FOLKMAN J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med. 285:1182-6.

FOLKMAN J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med. 1:27-31.

FUJITA K, MIYAMOTO T, SAIKA S (2009) Sonic hedgehog: its expression in a healing cornea and its role in neovascularization. Mol Vis. 15:1036-44.

GENG L, CUNEO KC, COOPER MK, WANG H, SEKHAR K, FU A, HALLAHAN DE (2007) Hedgehog signaling in the murine melanoma microenvironment. Angiogenesis. 10(4):259-67.

GIMBRONE MA JR, LEAPMAN SB, COTRAN RS, FOLKMAN J (1972) Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. J Exp Med. 136:261-76.

GIMBRONE MA JR, COTRAN RS, LEAPMAN SB, FOLKMAN J (1974) Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. J Natl Cancer Inst. 52:413-27.

GUNSILIUS E, DUBA HC, PETZER AL, KÄHLER CM, GRÜNEWALD K, STOCKHAMMER G, GABL C, DIRNHOFER S, CLAUSEN J, GASTL G (2000) Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. Lancet. 355:1688-91.

HAHN H, WICKING C, ZAPHIROPOULOUS PG, GAILANI MR, SHANLEY S, CHIDAMBARAM A, VORECHOVSKY I, HOLMBERG E, UNDEN AB, GILLIES S, NEGUS K, SMYTH I, PRESSMAN C, LEFFELL DJ, GERRARD B, GOLDSTEIN AM, DEAN M, TOFTGARD R, CHENEVIX-TRENCH G, WAINWRIGHT B, BALE AE (1996) Mutations of the Human Homolog of Drosophila *patched* in the Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome. Cell. 85(6):841-51.

HE QW, XIA YP, CHEN SC, WANG Y, HUANG M, HUANG Y, LI JY, LI YN, GAO Y, MAO L, MEI YW, HU B (2013) Astrocyte-Derived Sonic Hedgehog Contributes to Angiogenesis in Brain Microvascular Endothelial Cells via RhoA/ROCK Pathway After Oxygen–Glucose Deprivation. Mol Neurobiol. 47(3):976-87.

HERTIG AT (1935) Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. Contr Embryol Carnegie Inst. 25:37-81.

HOCHMAN E, CASTIEL A, JACOB-HIRSCH J, AMARIGLIO N, IZRAELI S (2006) Molecular Pathways Regulating Pro-migratory Effects of Hedgehog Signaling. J Biol Chem. 281(45):33860-70.

HÖCKEL M, VAUPEL P (2001) Biological consequences of tumor hypoxia. Semin Oncol. 28:36-41.

HUANG Y, GOEL S, DUDA DG, FUKUMURA D, JAIN RK (2013) Vascular Normalization as an Emerging Strategy to Enhance Cancer Immunotherapy. Cancer Res. 73(10):2943-8.

HUNTER J (1794) A Treatise on the Blood, Inflammation and Gunshot Wounds. Haswell, Barrington, and Haswell, Philadelphia.

INGRAM DA, MEAD LE, TANAKA H, MEADE V, FENOGLIO A, MORTELL K, POLLOK K, FERKOWICZ MJ, GILLEY D, YODER MC (2004) Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. Blood. 104:2752-60.

IRVINE DA, COPLAND M (2012) Targeting hedgehog in hematologic malignancy. Blood. 119(10):2196-204.

JAIN RK (2013) Normalizing Tumor Microenvironment to Treat Cancer: Bench to Bedside to Biomarkers. J Clin Oncol. 31(17):2205-18.

JAMIESON C, CORTES JE, OEHLER V, BACCARANI M, KANTARJIAN HM, PAPAYANNIDIS C, RICE KN, ZHANG X, SHAIK N, COURTNEY R, LEVIN WJ, MARTINELLI G (2011) Phase 1 Dose-Escalation Study of PF-04449913, An Oral Hedgehog (Hh) Inhibitor, In Patients with Select Hematologic Malignancies. Blood. 118:424.

JENKINS D (2009) Hedgehog signalling: Emerging evidence for non-canonical pathways. Cell Signal. 21(7):1023-34.

JOHNSON RL, ROTHMAN AL, XIE J, GOODRICH LV, BARE JW, BONIFAS JM, QUINN AG, MYERS RM, COX DR, EPSTEIN EH JR, SCOTT MP (1996) Human homolog of *patched*, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. Science. 272(5268):1668-71.

JOŚKO J, GWÓŹDŹ B, JEDRZEJOWSKA-SZYPUŁKA H, HENDRYK S (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis. Med Sci Monit. 6(5):1047-52.

KAPLAN RN, RIBA RD, ZACHAROULIS S, BRAMLEY AH, VINCENT L, COSTA C, MACDONALD DD, JIN DK, SHIDO K, KERNS SA, ZHU ZHENPING, HICKLIN D, WU Y, PORT JL, ALTORKI N, PORT ER, RUGGERO D, SHMELKOV SV, JENSEN KK, RAFII S, LYDEN D (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. Nature. 438:820-7.

KIM YM, JANG JW, LEE OH, YEON J, CHOI EY, KIM KW, LEE ST, KWON YG (2000) Endostatin Inhibits Endothelial and Tumor Cellular Invasion by Blocking the Activation and Catalytic Activity of Matrix Metalloproteinase. Cancer Res. 60(19):5410-3.

KIM JS, KIM JM, JUNG HC, SONG IS (2004) Helicobacter pylori down-regulates the receptors of vascular endothelial growth factor and angiopoietin in vascular endothelial cells: implications in the impairment of gastric ulcer healing. Dig Dis Sci. 49(5):778-86.

KINZLER KW, BIGNER SH, BIGNER DD, TRENT JM, LAW ML, O'BRIEN SJ, WONG AJ, VOGELSTEIN B (1987) Identification of an Amplified, Highly Expressed Gene in a Human Glioma. Science. 236(4797):70-3.

KIRK SL, KARLIK SJ (2003) VEGF and vascular changes in chronic neuroinflammation. J Autoimmun. 21:353-63.

KOBUNE M, TAKIMOTO R, MURASE K, IYAMA S, SATO T, KIKUCHI S, KAWANO Y, MIYANISHI K, SATO Y, NIITSU Y, KATO J (2009) Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells. Cancer Sci. 100(5):948-55.

LAUTH M, TOFTGÅRD R (2007) Non-Canonical Activation of GLI Transcription Factors: Implications for Targeted Anti-Cancer Therapy. Cell Cycle. 6(20):2458-63.

LAWSON ND, VOGEL AM, WEINSTEIN BM (2002) sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. Dev Cell. 3(1):127-36.

LI C, CHI S, XIE J (2011) Hedgehog signaling in skin cancers. Cell Signal. 23(8):1235-43.

LI WW, HUTNIK M, GEHR G (2008) Antiangiogenesis in haematological malignancies. Br J Haematol. 143:622-31.

LIN TL, MATSUI W (2012) Hedgehog pathway as a drug target: Smoothened inhibitors in development. Onco Targets Ther. 5:47-58.

LIN Y, WEISDORF DJ, SOLOVEY A, HEBBEL RP (2000) Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. J Clin Invest. 105:71-7.

LO MUZIO L (2008) Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). Orphanet J Rare Dis. 3:32.

MARIOTTI M, MAIER JAM (2006) Angiogenesis: An Overview. In: New Frontiers in Angiogenesis. R. Forough (Hrsg) Springer, Dordrecht, 1-29.

MEADOWS KL, HURWITZ HI (2012) Anti-VEGF Therapies in the Clinic. Cold Spring Harb Perspect Med. 2(10):1-27.

MORAN CM, MYERS CT, LEWIS CM, KRIEG PA (2012) Hedgehog Regulates Angiogenesis of Intersegmental Vessels Through the VEGF Signaling Pathway. Dev Dyn. 241(6):1034-42.

MOSER TL, STACK MS, ASPLIN I, ENGHILD JJ, HØJRUP P, EVERITT L, HUBCHAK S, SCHNAPER HW, PIZZO SV (1999) Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(6):2811-6.

MURLEY R (1984) John Hunter, velvet and vascular surgery. Ann R Coll Surg Engl. 66(3):214-8.

NAGASE M, NAGASE T, KOSHIMA I, FUJITA T (2006) Critical time window of hedgehog-dependent angiogenesis in murine yolk sac. Microvasc Res. 71(2):85-90.

NAGASE T, NAGASE M, MACHIDA M, FUJITA T (2008) Hedgehog signalling in vascular development. Angiogenesis. 11(1):71-7.

NAKANO T, NAKASHIMA Y, YONEMITSU Y, SUMIYOSHI S, CHEN YX, AKISHIMA Y, ISHII T, IIDA M, SUEISHI K (2005) Angiogenesis and lymphangiogenesis and expression of lymphangiogenic factors in the atherosclerotic intima of human coronary arteries. Hum Pathol. 36:330-40.

NG JM, CURRAN T (2011) The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. Nat Rev Cancer. 11(7):493-501.

NIKITENKO L, BOSHOFF C (2006) Endothelial Cells and Cancer. In: The Vascular Endothelium II. S. Moncada, A. Higgs (Hrsg). In: Handb Exp Pharmacol. Band 176/II. F. Hofmann (Hrsg) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 308-34.

NIKITENKO LL (2009) Vascular endothelium in cancer. Cell Tissue Res. 335(1):223-40.

NÜSSLEIN-VOLHARD C, WIESCHAUS E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. Nature. 287(5785):795-801.

NYBERG P, XIE L, KALLURI R (2005) Endogenous Inhibitors of Angiogenesis. Cancer Res. 65:3967-79.

OKAMOTO R, UENO M, YAMADA Y, TAKAHASHI N, SANO H, SUDA T, TAKAKURA N (2005) Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. Blood. 105:2757-63.

OLSEN CL, HSU PP, GLIENKE J, RUBANYI GM, BROOKS AR (2004) Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors. BMC Cancer. 4:43.

O'REILLY MS, HOLMGREN L, SHING Y, CHEN C, ROSENTHAL RA, MOSES M, LANE WS, CAO Y, SAGE EH, FOLKMAN J (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell. 79(2):315-28.

O'REILLY MS, HOLMGREN L, CHEN C, FOLKMAN J (1996) Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. Nat Med. 2(6):689-92.

O'REILLY MS, BOEHM T, SHING Y, FUKAI N, VASIOS G, LANE WS, FLYNN E, BIRKHEAD JR, OLSEN BR, FOLKMAN J (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell. 88(2):277-85.

OTTEN J, SCHULTZE A, SCHAFHAUSEN P, OTTERSTETTER S, DIERLAMM J, BOKEMEYER C, BRUMMENDORF TH, FIEDLER W, LOGES S (2008) Blood outgrowth endothelial cells from chronic myeloid leukaemia patients are BCR/ABL1 negative. Br J Haematol. 142:115-8.

PANG RWC, POON RTP (2006a) Clinical implications of angiogenesis in cancers. Vasc Health Risk Manag. 2(2):97-108.

PANG RWC, POON RTP (2006b) Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma. Cancer Lett. 242(2):151-67.

PAPAYANNIDIS C, GUADAGNUOLO V, IACOBUCCI I, DURANTE S, TERRAGNA C, OTTAVIANI E, ABBENANTE MC, CATTINA F, SOVERINI S, LAMA B, TONI L, LEVIN WJ, COURTNEY R, BALDAZZI C, CURTI A, BACCARANI M, JAMIESON C, CORTES JE, OEHLER V, MCLACHLAN K, VAN ARSDALE T, MARTINELLI G (2011) PF-04449913 reverts multi drug resistance (MDR) by a strong down-regulation of ABCA2 and BCL2 on leukemia stem cells in phase I acute myeloid leukemia and chronic myeloid leukemia treated patients. ASH Annu Meet Abstr. 118:1429.

PARDANAUD L, LUTON D, PRIGENT M, BOURCHEIX LM, CATALA M, DIETERLEIN-LIÈVRE F (1996) Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. Development. 122:1363-71.

PEICHEV M, NAIYER AJ, PEREIRA D, ZHU Z, LANE WJ, WILLIAMS M, OZ MC, HICKLIN DJ, WITTE L, MOORE MA, RAFII S (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human $CD34^+$ cells identifies a population of functional endothelial precursors. Blood. 95:952-8.

PENNACCHIETTI S, MICHIELI P, GALLUZZO M, MAZZONE M, GIORDANO S, COMOGLIO PM (2003) Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. Cancer Cell. 3(4):347-61.

PIAGGIO G, ROSTI V, CORSELLI M, BERTOLOTTI F, BERGAMASCHI G, POZZI S, IMPERIALE D, CHIAVARINA B, BONETTI E, NOVARA F, SESSAREGO M, VILLANI L, GARUTI A, MASSA M, GHIO R, CAMPANELLI R, BACIGALUPO A, PECCI A, VIARENGO G, ZUFFARDI O, FRASSONI F, BAROSI G

(2009) Endothelial colony-forming cells from patients with chronic myeloproliferative disorders lack the disease-specific molecular clonality marker. Blood. 114:3127-30.

PIMENTEL A, VELEZ M, BARAHONA LJ, SWORDS R, LEKAKIS L (2013) New prospects for drug development: the hedgehog pathway revealed. Focus on hematologic malignancies. Future Oncol. 9(5):681-97.

POON RT, FAN ST, WONG J (2001) Clinical Implications of Circulating Angiogenic Factors in Cancer Patients. J Clin Oncol. 19(4):1207-25.

POTENTE M, GERHARDT H, CARMELIET P (2011) Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. Cell. 146(6):873-87.

PUGH CW, RATCLIFFE PJ (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. Nat Med. 9(6):677-84.

POLA R, LING LE, SILVER M, CORBLEY MJ, KEARNEY M, BLAKE PEPINSKY R, SHAPIRO R, TAYLOR FR, BAKER DP, ASAHARA T, ISNER JM (2001) The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. Nat Med. 7(6):706-11.

RENAULT MA, RONCALLI J, TONGERS J, HAMADA H, THORNE T, MISENER S, ITO A, CLARKE T, MILLAY M, SCARPELLI A, KLYACHKO E, LOSORDO DW (2008) Abstract 5445: Gli2 and Gli3 are Over-expressed in the Ischemic Tissue and Participate in Ischemia-induced Angiogenesis and Myogenesis. Circulation. 118(suppl):551.

RENAULT MA, RONCALLI J, TONGERS J, MISENER S, THORNE T, JUJO K, ITO A, CLARKE T, FUNG C, MILLAY M, KAMIDE C, SCARPELLI A, KLYACHKO E, LOSORDO DW (2009) The Hedgehog transcription factor Gli3 modulates angiogenesis. Circ Res. 105(8):818-26.

RENAULT MA, RONCALLI J, TONGERS J, THORNE T, KLYACHKO E, MISENER S, VOLPERT OV, MEHTA S, BURG A, LUEDEMANN C, QIN G, KISHORE R, LOSORDO DW (2010) Sonic Hedgehog Induces Angiogenesis via Rho Kinase-dependent Signaling in Endothelial Cells. J Mol Cell Cardiol. 49(3):490-8.

RIBATTI D (2008) Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. Angiogenesis. 11:3-10.

RIBATTI D (2009) Endogenous inhibitors of angiogenesis: A historical review. Leuk Res. 33(5): 638-44.

RIOBO NA, MANNING DR (2007) Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. Biochem J. 403(3):369-79.

RISAU W (1997) Mechanisms of angiogenesis. Nature. 386(6626):671-4.

ROBBINS DJ, FEI DL, RIOBO NA (2012) The Hedgehog Signal Transduction Network. Sci Signal. 5(246):re6.

RUCH JM, KIM EJ (2013) Hedgehog signaling pathway and cancer therapeutics: progress to date. Drugs. 73(7):613-23.

RUIZ I ALTABA A (2011) Hedgehog Signaling and the Gli Code in Stem Cells, Cancer, and Metastases. Sci Signal. 4(200):pt9.

RUMPOLD H, WOLF D, KOECK R, GUNSILIUS E (2004) Endothelial progenitor cells: A source for therapeutic vasculogenesis? J Cell Mol Med. 8:509-18.

SANDHIYA S, MELVIN G, KUMAR SS, DKHAR SA (2013) The dawn of hedgehog inhibitors: Vismodegib. J Pharmacol Pharmacother. 4(1):4-7.

SCALES SJ, DE SAUVAGE FJ (2009) Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. Trends Pharmacol Sci. 30(6):303-12.

SCHIEBLER TH, KORF HW (2007) Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie, 10. Auflage. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 180-186.

SCHMIDT T, CARMELIET P (2011) Angiogenesis: a target in solid tumors, also in leukemia? Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011:1-8.

SHAHI MH, AFZAL M, SINHA S, EBERHART CG, REY JA, FAN X, CASTRESANA JS (2011) Human hedgehog interacting protein expression and promoter methylation in medulloblastoma cell lines and primary tumor samples. J Neurooncol. 103(2):287-96.

SHALABY F, ROSSANT J, YAMAGUCHI TP, GERTSENSTEIN M, WU XF, BREITMAN ML, SCHUH AC (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature. 376(6535):62-6.

SORENSEN AG, EMBLEM KE, POLASKOVA P, JENNINGS D, KIM H, ANCUKIEWICZ M, WANG M, WEN PY, IVY P, BATCHELOR TT, JAIN RK (2012) Increased Survival of Glioblastoma Patients who Respond to Antiangiogenic Therapy with Elevated Blood Perfusion. Cancer Res. 72(2):402-7.

STRAFACE G, APRAHAMIAN T, FLEX A, GAETANI E, BISCETTI F, SMITH RC, PECORINI G, POLA E, ANGELINI F, STIGLIANO E, CASTELLOT JJ JR, LOSORDO DW, POLA R (2009) Sonic hedgehog regulates angiogenesis and myogenesis during post-natal skeletal muscle regeneration. J Cell Mol Med. 13(8B):2424-35.

SUND M, HAMANO Y, SUGIMOTO H, SUDHAKAR A, SOUBASAKOS M, YERRAMALLA U, BENJAMIN LE, LAWLER J, KIERAN M, SHAH A, KALLURI R (2005) Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(8):2934-9.

TAKAHASHI H, SHIBUYA M (2005) The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. Clin Sci (Lond). 109(3):227-41.

TIMMERMANS F, VAN HAUWERMEIREN F, DE SMEDT M, RAEDT R, PLASSCHAERT F, DE BUYZERE ML, GILLEBERT TC, PLUM J, VANDEKERCKHOVE B (2007) Endothelial Outgrowth Cells Are Not Derived From CD133+ Cells or CD45+ Hematopoietic Precursors. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 27:1572-9.

Tura O, Skinner EM, Barclay R, Samuel K, Gallagher RCJ, Brittan M, Hadoke PWF, Newby DE, Turner ML, Mills NL (2013) Late Outgrowth Endothelial Cells Resemble Mature Endothelial Cells and are Not Derived from Bone Marrow. Stem Cells. 31:338-48.

VAGNUCCI AH JR, LI WW (2003) Alzheimer's disease and angiogenesis. Lancet. 361(9357): 605-8.

VISVADER JE, LINDEMAN GJ (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. Nat Rev Cancer. 8(10):755-68.

VOKES SA, YATSKIEVYCH TA, HEIMARK RL, MCMAHON J, MCMAHON AP, ANTIN PB, KRIEG PA (2004) Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. Development. 131(17):4371-80.

WAGENER C, MÜLLER O (2009) Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte, 3. Auflage. Thieme, Stuttgart, 366-89.

WANG R, CHADALAVADA K, WILSHIRE J, KOWALIK U, HOVINGA KE, GEBER A, FLIGELMAN B, LEVERSHA M, BRENNAN C, TABAR V (2010) Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. Nature. 468:829-33.

WELSCH U (2006) Sobotta Lehrbuch Histologie, 2. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München, 235-54.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2011) Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. S. Mendis, P. Puska, B Norrving (Hrsg) WHO library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva.

YAMAZAKI M, NAKAMURA K, MIZUKAMI Y, II M, SASAJIMA J, SUGIYAMA Y, NISHIKAWA T, NAKANO Y, YANAGAWA N, SATO K, MAEMOTO A, TANNO S, OKUMURA T, KARASAKI H, KONO T, FUJIYA M, ASHIDA T, CHUNG DC, KOHGO Y (2008) Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells. Cancer Sci. 99(6):1131-8.

YAN GN, LV YF, YANG L, YAO XH, CUI YH, GUO DY (2013) Glioma stem cells enhance endothelial cell migration and proliferation via the Hedgehog pathway. Oncol Lett. 6(5):1524-1530.

YANG L, XIE G, FAN Q, XIE J (2010) Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. Oncogene. 29(4):469-81.

ZIYAD S, IRUELA-ARISPE ML (2011) Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis. Genes Cancer. 2(12):1085-96.

ClinicalTrials.gov [Internetquelle] URL: http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=PF-04449913 [zuletzt aufgerufen am 22.01.14]

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen Menschen, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation unterstützt haben und ohne die diese nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Walter Fiedler, leitender Oberarzt der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des UKEs, für seine volle Unterstützung und die Möglichkeit, diese Arbeit zu verfassen.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. rer. nat. Jasmin Wellbrock für eine außergewöhnlich herzliche und ebenso zuverlässige Betreuung sowie die Bereitschaft, mir auch zu den stressigsten Zeiten überraschend zeitnah in jedweden Aspekten meiner Arbeit zur Seite zu stehen.

Ich danke allen weiteren Mitarbeitern unseres Labors, die mich stets hilfsbereit und geduldig bei meiner Arbeit unterstützt haben und bei denen ich viel gelernt habe. Dabei ist besonders meine Mitstreiterin Patrizia Seyfert hervorzuheben, mit der ich mich immer austauschen konnte und bereits so einige Monate parallel pipettiert, recherchiert, ausgewertet und geschrieben habe, was meine Motivation und Zielstrebigkeit stets aufrechterhalten hat.

Unendlich dankbar bin ich meinem Schwager Marc Hoeft für die Zeit und Geduld, die er für mich aufgewendet hat, indem ich nicht nur privat immer auf ihn zählen konnte, sondern er mir darüber hinaus auch die größtmögliche Hilfe in Excel-, Word- sowie Formatierungsfragen war und dabei meine perfektionistischen Ansprüche sogar übertroffen hat. Vielen Dank auch an Thomas Kampe, der mir schnell und unkompliziert bei der Literaturzusammenstellung zur Seite stand.

Ich möchte mich ferner bei meinen Eltern Susanne und Thomas Mestemacher bzw. Simone und Gerd Fuhrmann sowie meiner Schwester Chiara Fuhrmann bedanken, die mir durch ihre bedingungslose Unterstützung mein Studium und diese Arbeit ermöglicht haben. Sie haben mich zu dem gemacht, was ich bin und waren – jeder auf seine individuelle, unvergleichliche Weise – mein größter Rückhalt. Aus tiefstem Herzen danke ich Thomas, der mich verstanden, intellektuell sowie persönlich gestärkt und mir seine unendliche Wertschätzung entgegengebracht hat. In diesem Sinne bin ich meiner engsten Familie mit meiner außergewöhnlichen Patentante Annette Kornblum so sehr dankbar, dass sie die unmögliche Aufgabe bewältigt haben, diese Lücke zu schließen und mir ein sicherer Anker in den Untiefen von Himmel und Meer waren. Mein Dank gilt außerdem meinem aufgeweckten kleinen Bruderherz Fynn Fuhrmann, der stets Leben und Zusammenhalt in unsere Familie zu bringen vermag.

Zuletzt danke ich Inga Cordes, Kira Renzelmann, Martina Kohns und Jan Henrik Schirmer dafür, dass sie in den letzten Jahren immer, in jeglicher Hinsicht, für mich da waren und mit mir gemeinsam den akademischen Weg bestritten haben.

Lebenslauf

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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 einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: L. Fuhrmann